

Der Einfluss von Nrf2 auf das Längenwachstum und die Regeneration von Knochen im Kollagen Typ 2- Nrf2/Keap1-Knock-Out-Mäusemodell

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

vorgelegt von

Fabian Schulz

aus Werl

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Thomas Pufe
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Georg Conrads

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	V
III.	Tabellenverzeichnis	VII
1	Einleitung.....	1
1.1	Das Nrf2/Keap1-System und dessen Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress.....	1
1.2	Rolle von Nrf2 in Chondrogenese und Knorpelstoffwechsel.....	4
1.2.1	Bedeutung von Nrf2 während der Osteoarthritis-Erkrankung	4
1.2.2	Beziehung von Nrf2 und Kollagen Typ 2 während der Chondrogenese... ..	5
1.2.3	Korrelation von Nrf2 und SOX-9 während der Chondrogenese	6
1.3	Rolle von Nrf2 in Osteogenese und Knochenstoffwechsel	7
1.3.1	Zusammenhang mesenchymaler Stammzellen und Nrf2 während der Osteogenese	7
1.3.2	Einfluss von Nrf2 auf die Knochenstruktur	7
1.3.3	Wechselwirkung von Nrf2 und VEGF während der endochondralen Knochenbildung.....	11
1.4	Rolle von Nrf2 während der Frakturheilung	11
1.5	Stand der Forschung.....	13
1.6	Hypothese und Fragestellung	15
2	Materialien und Methoden.....	17
2.1	Verwendete Geräte	17
2.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	18
2.3	Verwendete Substanzen	19
2.4	Verwendete Software-Programme	21
2.5	Verwendete Antikörper	21
2.6	In vitro-Versuche	22
2.6.1	Verwendete Mäuse.....	22
2.6.2	Zellkultur-Experiment.....	22

2.6.3	Isolieren und Kultivieren der Stammzellen	23
2.6.4	Passagieren der Stammzellen und Zellzahlbestimmung	24
2.6.5	Chondrogene Differenzierung	25
2.6.6	Safranin O-Extraktion	25
2.6.7	Alzianblau- und Safranin O-Färbung	26
2.6.8	Analyse der Safranin O- und Alzianblau-Färbung	27
2.7	Immunhistologische Färbung des Kniegelenks von Col2-Keap1-Cre ⁺ - und -Cre ⁻ -Mäusen	27
2.7.1	Ablauf der immunhistologischen Färbung	27
2.7.2	Analyse der immunhistologischen Schnitte	29
2.8	MRI-Untersuchung des Kniegelenks von Col2-Nrf2-Cre ⁺ - und -Cre ⁻ - Mäusen	32
2.9	Femur-μCT-Untersuchung von Col2-Nrf2-Cre ⁺ - und -Cre ⁻ -Mäusen sowie Col2-Keap1-Cre ⁺ - und -Cre ⁻ -Mäusen	33
2.10	Statistische Methoden	34
3	Ergebnisse	36
3.1	Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen isoliert aus Col2-Nrf2-Cre ⁻ - und Col2-Nrf2-Cre ⁺ - Mäusen	36
3.1.1	Vergleich des sGAG-Gehalts in Kollagen Typ 2 exprimierenden Zellen von Col2-Nrf2-Cre ⁻ - und Col2-Nrf2-Cre ⁺ -Mäusen nach 14- und 21-tägiger Differenzierung	36
3.1.2	Vergleich des Proteoglykan-Gehalts in Kollagen Typ 2 exprimierenden Zellen isoliert aus Col2-Nrf2-Cre ⁻ - und Col2-Nrf2-Cre ⁺ - Mäusen nach 14- und 21-tägiger Differenzierung	38
3.1.2.1	Vergleich des Proteoglykan-Gehalts durch Safranin O-Färbung und Intensitätsskalierung	38
3.1.2.2	Vergleich des Proteoglykan-Gehalts durch colorimetrische Analyse nach Safranin O-Färbung	39
3.2	Phänotypveränderung der Col2-Nrf2-Cre ⁻ - und Col2-Nrf2-Cre ⁺ -Mäuse und der Col2-Keap1-Cre ⁻ - und -Cre ⁺ -Mäuse	41
3.2.1	Körpergewicht sowie Körperlänge und Länge der Vertebrae caudales	41

3.2.2 Unterschiede der Femurlängen von Col2-Nrf2-Cre ⁻ - und -Cre ⁺ -Mäusen und Col2-Keap1-Cre ⁻ - und -Cre ⁺ -Mäusen	42
3.3 VEGF-Proteinexpression und Flächengröße in knorpeligen Gelenkarealen von Col2-Keap1-Cre ⁺ - und -Cre ⁻ -Mäusen	44
3.3.1 Analyse der Gelenkfläche und der VEGF-Proteinexpression innerhalb des distalen Femurkondylus.....	44
3.3.1.1 Vergleich der Gelenkfläche des distalen Femurkondylus von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen	44
3.3.1.2 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	46
3.3.1.3 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl pro Fläche in der femoralen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	48
3.3.1.4 Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	50
3.3.2 Analyse der Gelenkfläche und der VEGF-Proteinexpression innerhalb des proximalen Tibiaplateaus.....	51
3.3.2.1 Vergleich Gelenkfläche des proximalen Tibiakondylus von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen	51
3.3.2.2 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl in der tibialen Gelenkfläche von Col2-Nrf2-Cre ⁻ - und Col2-Nrf2-Cre ⁺ -Mäusen.....	53
3.3.2.3 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl pro Fläche in der tibialen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	55
3.3.2.4 Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der tibialen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen	56
3.3.2.5 Vergleich der VEGF-Färbungsintensitäten in der Gelenkfläche bei Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen	57
3.3.3 VEGF-Proteinexpression innerhalb der Epiphysenfuge der Tibia ...	58
3.3.3.1 Vergleich der Flächen der drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen	58

3.3.3.2	Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl in den drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	61
3.3.3.3	Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl pro Fläche in den drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	68
3.3.3.4	Anteil der VEGF-positiven Zellen an der Gesamtanzahl in den drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen.....	72
4	Diskussion	75
4.1	Auswirkungen von Col2-Nrf2-Cre ⁺ auf die Chondrogenese von murinen MSCs..	76
4.2	Auswirkungen von Col2-Nrf2-Cre ⁺ auf den Phänotyp.....	77
4.3	Auswirkungen von Col2-Keap1-Cre ⁺ auf die VEGF-Expression im hyalinen Gelenkknorpel und in der Epiphysenfuge	78
4.3.1	VEGF-Expression im hyalinen Gelenkknorpel	79
4.3.2	VEGF-Expression in der Epiphysenfuge	80
4.4	Limitationen.....	82
4.5	Die essentielle Rolle eines im Gleichgewicht befindlichen Nrf2-Spiegels auf das Knochen- und Knorpelwachstum	83
5	Zusammenfassung.....	84
6	Literaturverzeichnis	86
7	Anhang	97
7.1	Intensitätsskala der Safranin O-Färbung	97
7.2	Intensitätsskala der Alzianblau-Färbung	99
7.3	Intensitätsskala der VEGF-Gelenkflächenfärbung.....	101
7.4	Intensitätsskala der Wachstumsfugenfärbung	103
7.5	Intensität der VEGF-Färbung innerhalb der Wachstumsfuge bei Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1-Cre ⁺ -Mäusen	105

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAMTS1	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 1
ARE	Antioxidant Response Element
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
BSA	Bovine Serum Albumin
CTx	Carboxyterminales Typ-I-Kollagen-Telopeptid x
Cul3	Cullin-3
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases

EZM	Extrazelluläre Matrix
Facs	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF-1	Fibroblast Growth Factor 1
FOV	Field Of View
GST	Glutathion-S-Transferase
HO-1	Häm-Oxygenase 1
IBSP	Integrin-binding Sialoprotein
IHC	Immunhistochemie
IHH	Indian Hedgehog
IL-1 β	Interleukin-1 β
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KO	Knock-Out
Maf	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRI	Magnetic Resonance Imaging

mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAQO1	NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T-cells 1
NF-κB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF-BB	Platelet-derived Growth Factor-BB
PEST	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PCR	Polymerase Chain Reaction
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
Rbx	Ringbox
RNAi	Ribonucleic Acid interference

ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	revolutions per minute
Runx-2	Runt-related transcription factor-2
sFlt-1	soluble Fms-like tyrosine kinase-1
SIRT1	Sirtuin-1
Smad 3	Small mothers against decapentaplegic 3
SOX-9	SRY-related HMG-Box 9
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-2	Vascular Endotheial Growth Factor Receptor-2
WT	Wildtyp
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
μ CT	Mikro-Computertomographie

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Mechanismus der Nrf2-Aktivierung und -Regulierung	3
Abb. 2: Überblick über die mögliche Rolle der Nrf2-Aktivierung bei der Frakturheilung unter vorangegangenen oxidativem Stress (Kubo et al., 2019)	10
Abb. 3: Femurlängenvergleich zwischen Col2-Nrf2-Cre ⁺ - und Col2-Nrf2-Cre ⁻ - Maus in einem Alter von 18 Wochen	15
Abb. 4: Längenvergleich Col2-Nrf2-Cre ⁻ -Maus und Col2-Nrf2-Cre ⁺ -Maus	22
Abb. 5 Verlauf des Zellwachstums von der Aussaat bis zum Aufteilungszeitpunkt	24
Abb. 6: Vergleich der Safranin O-Färbung nach 21-tägiger Differenzierung	26
Abb. 7: Übersichtsaufnahme des Kniegelenks	29
Abb. 8: Markierung und Einteilung beider Gelenkflächen	30
Abb. 9: Eingrenzung der drei verschiedenen Zonen der Epiphysenfuge	31
Abb. 10: MRI-Mäusebeinaufnahmen	33
Abb. 11: µCT-Aufnahme der Mäusefemora	34
Abb. 12: Vergleich des sGAG-Gehalts anhand der Alzianblau-Intensitäten der Kontrollgruppe, der 14-tägigen und der 21-tägigen Differenzierung	37
Abb. 13: Vergleich des Gehalts an Proteoglykanen anhand der Safranin O- Intensitäten der Kontrollgruppe, der 14-tägigen und der 21-tägigen Differenzierung	39
Abb. 14: Vergleich der Absorptionsraten der Kontrollgruppe, der 14-tägigen und 21-tägigen Differenzierung	41
Abb. 15: Vergleich des Gewichts (A), der Körperlänge (B) und Länge der Vertebrae caudales (C) von Col2-Nrf2-Cre ⁻ -und Col2-Nrf2-Cre ⁺ -Mäusen	42
Abb. 16: Vergleich der mittels µCT gemessenen Femurlängen von Col2-Nrf2- Cre ⁻ - und Col2-Nrf2-Cre ⁺ -Mäusen	43
Abb. 17: Vergleich der Femurlängen von Col2-Keap1-Cre ⁻ - und Col2-Keap1- Cre ⁺ -Mäusen	43
Abb. 18: Femorale Gelenkfläche	46
Abb. 19: Eingezeichnete femorale Gelenkfläche mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen	47
Abb. 20: Gesamtanzahl an Zellen in der femoralen Gelenkfläche	48
Abb. 21: Anzahl VEGF-positiver Zellen (A) und Gesamtanzahl (B) pro 1000 µm ² femorale Gelenkfläche	50

Abb. 22: Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche.....	51
Abb. 23: Tibiale Gelenkfläche.....	52
Abb. 24: Eingezeichnete tibiale Gelenkfläche mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen.....	54
Abb. 25: Gesamtanzahl an Zellen in der tibialen Gelenkfläche.....	55
Abb. 26: Anzahl VEGF-positiver Zellen (A) und Gesamtanzahl (B) pro 1000 μm^2 tibiale Gelenkfläche	56
Abb. 27: Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der tibialen Gelenkfläche.....	57
Abb. 28: VEGF-Intensität innerhalb der Gelenkfläche	58
Abb. 29: Fläche der Reservezone	59
Abb. 30: Fläche der Proliferationszone	60
Abb. 31: Fläche der hypertrophen Zone.....	61
Abb. 32: Eingezeichnete Fläche der Reservezone der verschiedenen Untersuchungsgruppen (A - D) mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen.....	62
Abb. 33: Eingezeichnete Fläche der Proliferationszone der verschiedenen Untersuchungsgruppen (A - D) mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen.....	63
Abb. 34: Eingezeichnete Fläche der hypertrophen Zone der verschiedenen Untersuchungsgruppen (A - D) mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen.....	65
Abb. 35: Gesamtanzahl an Zellen in den drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge.....	67
Abb. 36: Anzahl VEGF-positiver Zellen pro 1000 μm^2 Flächeneinheit der drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge	69
Abb. 37: Gesamtanzahl an Zellen pro 1000 μm^2 Flächeneinheit der drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge	71
Abb. 38: Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl innerhalb der drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge	74
Abb. 39: Intensität der VEGF-Färbung innerhalb der Wachstumsfuge	105

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Substanzen	19
Tabelle 4: Software-Programme	21
Tabelle 5: Antikörper	21
Tabelle 6: Eigenschaften der unterschiedlichen Zonen der Epiphysenfuge	31

1 Einleitung

1.1 Das Nrf2/Keap1-System und dessen Rolle bei der Abwehr von oxidativem Stress

Der redoxensitive Transkriptionsfaktor Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) spielt eine wichtige Rolle in der Modulation der Abwehr von oxidativem Stress in unterschiedlichen Organen des menschlichen Körpers. Über ihn werden verschiedene zytoprotektive Gene exprimiert und führen somit zum Schutz vor degenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel Osteoarthritis (Baird & Yamamoto, 2020). Dabei handelt es sich um eine zeit- oder altersabhängige Zerstörung der Gelenke, die mit einer Schädigung des Gelenkknorpels, Veränderungen des subchondralen Knochens und Osteophytenbildung einhergeht (Glyn-Jones et al., 2015; Wang et al., 2016). Aus oben genannten Grund kann Nrf2 als mögliches Ziel einer pharmakologischen Therapie zur Vorbeugung und Behandlung dieses Leidens dienen und steht somit im Mittelpunkt der Forschung (Al-Sawaf et al., 2015).

Im physiologischen Grundzustand führt Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) als Teil einer E3-Ubiquitin-Ligase zum proteasomalen Abbau des größten Teils an Nrf2 und stabilisiert so dessen Gleichgewicht. Unter homöostatischen Bedingungen ist der Nrf2-Spiegel somit aufgrund seiner kontinuierlichen Ubiquitinierung und seines proteasomalen Abbaus niedrig. Keap1 kann als Inhibitorprotein von Nrf2 angesehen werden. Infolge der Entstehung von oxidativem Stress, einem Ungleichgewicht zwischen der Produktion freier Radikale sowie reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive Oxygen Species* (ROS)), wie Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (OH^-) und organische Peroxide als normale Produkte der biologischen Reduktion von molekularem Sauerstoff, und ihrer Beseitigung durch Schutzmechanismen mithilfe von Antioxidantien, kommt es zur Auflösung der Nrf2-Keap1-Bindung und somit auch zur Verhinderung des proteasomgesteuerten Abbaus (Tu et al., 2019) (Abb. 1). Eine anhaltende ROS-Akkumulation kann zu mitochondrialer Dysfunktion, Schwellung und Apoptose sowie zu Veränderungen bei der Seneszenz und Apoptose von Chondrozyten

beitragen (Blanco et al., 2004; Kensler et al., 2007; Ludtmann et al., 2014). Ebenso führt eine Anhäufung von ROS im Knochenstoffwechsel zu einer Verringerung der Anzahl an Osteoblasten, indem sie deren Proliferation und Differenzierung hemmt und eine vorzeitige Osteoblastenapoptose auslöst (Bai et al., 2004; Mody et al., 2001; Xu et al., 2011). Des Weiteren sorgen ROS für die Apoptose von Osteozyten, die sowohl die Osteoblasten- als auch die Osteoklastenfunktion steuern (Almeida et al., 2010). Es wird davon ausgegangen, dass niedrige ROS-Konzentrationen die Expression von antioxidativen Enzymen und anderen Abwehrmechanismen auslösen (Itoh et al., 1997; Schmidlin et al., 2020). Dies geschieht, indem das von der Keap1-Bindung gelöste und neu produzierte Nrf2 in den Zellkern transloziert und mit einem sMaf (*small Musculoaponeurotic fibrosarcoma*) -Protein heterodimerisiert. Dieser Komplex führt über die Kopplung an die ARE (*Antioxidant Response Element*)-Bindungsstelle zur Expression von zahlreichen Proteinen, wie zum Beispiel die Häm-Oxygenase 1 (HO-1), NAD(P)H (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Dehydrogenase (Chinon) 1 (NAQO1) und Glutathion-S-Transferase (GST) (Tu et al., 2019). Die gesteigerten Enzymkonzentrationen von zusätzlich Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase infolge der Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalwegs schützen vor $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ -induzierten oxidativen Schäden. In Nrf2-defizienten Zellen kann jedoch keine Zytoprotektion beobachtet werden, stattdessen eine verringerte Lebensfähigkeit und vermehrte Anzahl an Zelltoden, was die Nrf2-Abhängigkeit unterstreicht (Kweider et al., 2011).

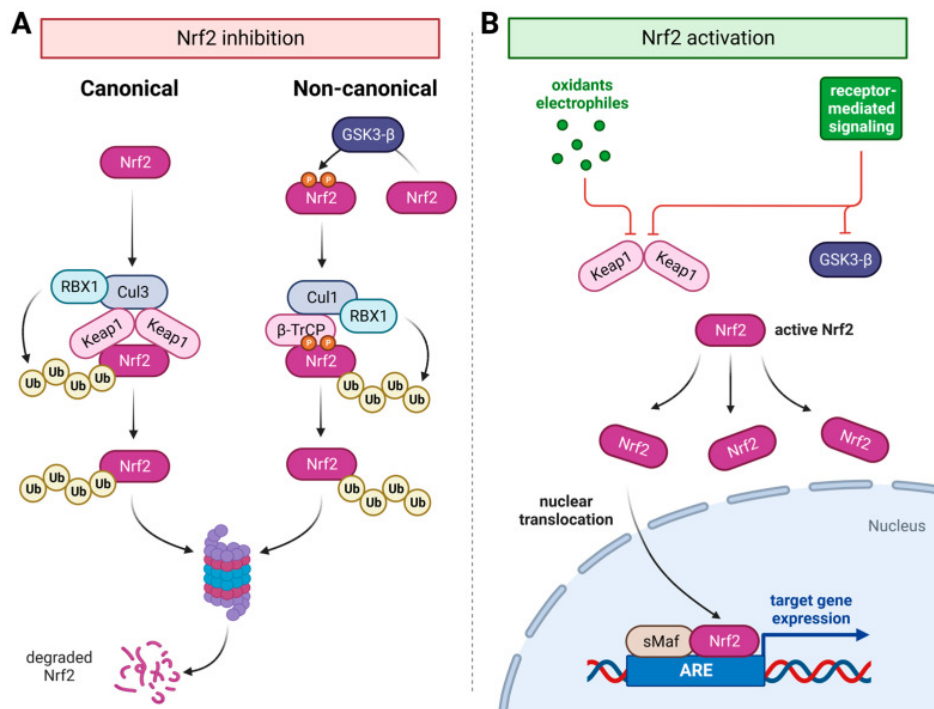


Abb. 1: Der Mechanismus der Nrf2-Aktivierung und -Regulierung

A: Im Grundzustand wird Nrf2 durch Keap1 und den Cullin-3 (Cul3-) Ringbox (Rbx)-Komplex ubiquitiniert, was anschließend zum proteasomalen Abbau führt.

B: Bei oxidativem Stress deaktivieren ROS den Keap1-Cul3-Komplex und Nrf2 wird freigesetzt. Darüber hinaus kann Nrf2 durch Zytokine oder VEGF in Abhängigkeit von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) aktiviert werden. Stabilisiertes Nrf2 wandert in den Zellkern, wo es ARE in den Promotorregionen von Zielgenen bindet und zusammen mit kleinen Maf-Proteinen (sMaf) die Expression antioxidativer Enzyme und zytoprotektiver Proteine wie HO-1, NQO1 und GST steigert (Fragoulis et al., 2023; Kubo et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivierung des Keap1-Nrf2-ARE-Signalwegs aus verschiedenen, aber miteinander verbundenen Komponenten besteht. Zu diesen zählen zum einen die chemischen Auslöser der Nrf2-Aktivität und zum anderen Keap1 als Sensor für diese Auslöser. Zudem spielen Nrf2, als Modulator der transkriptionellen Reaktion auf die Auslöser und den oxidativen Stress, sowie die Zielgene, die das zytoprotektive Endergebnis liefern, eine entscheidende Rolle (Baird & Yamamoto, 2020). Der Nrf2-Signalweg basiert dabei auf einer Störung der Interaktion zwischen Keap1 und Nrf2 (Bellezza et al., 2018).

1.2 Rolle von Nrf2 in Chondrogenese und Knorpelstoffwechsel

1.2.1 Bedeutung von Nrf2 während der Osteoarthritis-Erkrankung

Über die Aktivierung der oben genannten Antioxidantien können frühe Gelenkschmerzen gelindert werden (Hsu et al., 2016). Außerdem führt ein Mangel an Nrf2 im Mausmodell zur Entwicklung einer schweren Osteoarthritis und Anfälligkeit gegenüber oxidativer Belastung (Cai et al., 2015; Rushmore et al., 1991). Zudem wird die chondroprotektive Rolle von Nrf2 durch die Unterdrückung der Interleukin 1 β -induzierten Expression der Matrixmetalloproteasen MMP-1, -3 und -13, sowohl auf *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) - als auch auf Proteinbasis unterstrichen. Die Förderung von Nrf2-Downstream-Proteinen wie HO-1 und NQO1 führt zu einer Reduzierung der oben genannten OA-assoziierten Matrixmetalloproteinasen sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Cai et al., 2015; Kong et al., 2016). Jedoch muss beachtet werden, dass auch eine Überexpression von Nrf2 zu einer Hemmung der Knorpeldifferenzierung führt, indem spezifische Marker wie Kollagen Typ 2 und Osteopontin verringert exprimiert werden. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Nrf2-Homöostase (Hinoi et al., 2007; Solomon et al., 2008).

Die Arbeitsgruppe um Wruck *et al.* untersuchte die Nrf2-Expression in den Gelenken von Patienten¹ mit rheumatoider Arthritis. Dabei war die Nrf2-Expression in den Synovialzellen von Menschen mit Arthritis und in den subintimalen Adipozyten hochreguliert, nicht jedoch in denen von gesunden Spendern. Mithilfe eines Nrf2-Knockout-Mäusemodells mit Antikörper-induzierter Arthritis wurde das Ausmaß des oxidativen Stresses, der Aktivierungszustand von Nrf2 und das Expressionsniveau von Nrf2-Zielgenen analysiert. Eine gesteigerte Aktivierung von Nrf2 und Expression von Nrf2-Zielgenen konnte in den Gelenken von arthritischen Mäusen (Nrf2-Wildtyp) beobachtet werden. Dabei wiesen Nrf2-Knockout-Mäuse schwerere Knorpelverletzungen und vermehrt oxidative Schäden auf. Klinische Anzeichen waren dabei periartikuläre Erytheme und Ödeme an den Hinterpfoten. Histologisch wurden Hyperplasien,

¹ In der vorliegenden Promotion wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Es bezieht sich auf Personen aller Geschlechter.

Erosionen des Knorpels und Infiltrationen des Kniegelenks beobachtet. Somit spielt ein Mangel an Nrf2-vermittelten antioxidativen Abwehrmechanismen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, was deutlich an einer erhöhten Anfälligkeit für arthritische Gelenkveränderungen zu erkennen ist (Wruck et al., 2011).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Zhou *et al.* befasst sich mit der Möglichkeit, mittels endogener Nrf2-Aktivierung durch Melatonin den Knorpelabbau im Frühstadium der Osteoarthritis zu verhindern, indem eine signifikante Steigerung der Knorpelmatrixsynthese und eine Hochregulierung der antioxidativen Enzyme, vor allem der Häm-Oxygenase 1, bei gleichzeitiger Abnahme der Matrixabbauenzyme und der intrazellulären ROS in isolierten primären Chondrozyten aus Ratten mit chirurgisch induzierter Osteoarthritis erreicht wird (Zhou et al., 2022). Melatonin dient als endogenes Antioxidans, indem es freie Radikale abfängt und die Aktivität mehrerer intrazellulärer antioxidativer Enzyme erhöht (Zhang et al., 2022). Die Arbeitsgruppe beobachtete zudem, dass die microRNA miR-146a, ein Nrf2-Aktivator über oxidativen Stress, in osteoarthritischen Chondrozyten signifikant hochreguliert war. Durch Melatoninbehandlung konnte jedoch eine deutliche miR-146a-Reduzierung erzielt und somit das physiologische Gleichgewicht der Proteinkonzentration von Nrf2 erhalten werden. Die Überexpression von miR-146a verringert also die schützende Wirkung von Melatonin (Zhou et al., 2022).

1.2.2 Beziehung von Nrf2 und Kollagen Typ 2 während der Chondrogenese

Ein wichtiger Bestandteil bei dem Prozess der Chondrogenese und der chondralen Ossifikation ist Kollagen Typ 2, das als Modulator während der frühen osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen dient, indem es die *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2)-Aktivierung erleichtert und die Knochendefektreparatur durch einen endochondralen Verknöcherungsprozess verbessert (Chiu et al., 2014). Guo *et al.* zeigen, dass eine während der OA vorkommende Ferroptose eine verringerte Expression von Kollagen Typ II in den Chondrozyten bewirken kann. Über Aktivierung des antioxidativen Systems von Nrf2 mithilfe eines Eisenchelators kann die Kollagen Typ II-Expression verbessert werden (Guo et al., 2022). Ebenso führt eine Nrf2-Aktivierung mithilfe von RTA-

408 zu einer erhöhten Genexpression von Kollagen Typ 2 in OA-Chondrozyten (Taylor et al., 2023).

1.2.3 Korrelation von Nrf2 und SOX-9 während der Chondrogenese

Die Knorpeldifferenzierung ist von großer Bedeutung für die Knochenentwicklung. Bei dem Prozess der Chondrogenese spielt der Transkriptionsfaktor SOX-9 (*SRY-related HMG-Box 9*) eine wichtige Rolle, da er über eine Regulation durch Nrf2 zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der extrazellulären Matrix und der Chondrozytendifferenzierung beiträgt. Das Institut für Anatomie und Zellbiologie der RWTH Aachen University beschäftigte sich mit der Nrf2/ARE-Signalübertragung und deren Auswirkungen auf SOX-9 in humanen C-28/I2-Chondrozyten. Die SOX-9-Expression in artikulären Chondrozyten korrelierte mit der Knorpeldicke und den Degenerationsstufen in Nrf2-WT- und -KO-Mäusen. Nrf2-spezifisches RNAi (*Ribonucleic Acid interference*) verringerte dabei die SOX-9-Expression signifikant, während Keap1-spezifische RNAi sie erhöhte. Ebenso konnte anhand von Färbungen gegen SOX-9 gezeigt werden, dass in Nrf2-KO-Mäusen eine signifikant geringere Anzahl an positiven Chondrozyten aufzufinden war. Vor allem alte Nrf2-KO-Mäuse entwickelten osteoarthritische Veränderungen des Knorpels, einhergehend mit einer signifikant verringerten Knorpeldicke sowie Rissbildungen und Erosionen in der oberflächlichen Schicht. Zusätzlich identifizierte die Arbeitsgruppe zwei mutmaßliche ARE-Bindungsstellen (ARE 1 und ARE 2) in der Promoterregion von SOX-9, von denen die proximale stromaufwärts gelegene ARE-Stelle (ARE2) eine entscheidende direkte Rolle bei der Nrf2-vermittelten Induktion des SOX-9-Promotors in menschlichen Chondrozyten spielte, da nur die Mutagenese von ARE 2 die Promoteraktivität um 50 % reduzierte (Kubo, Beckmann, *et al.*, 2022). Dies wird durch eine von Cao *et al.* publizierte Arbeit, in der von einem Proteoglykanverlust bei postnataler SOX-9-Depletion berichtet wird, bestätigt (Cao et al., 2018). Ebenso zeigen Ouyang *et al.*, dass eine Überexpression von SOX-9 das Fortschreiten der menschlichen Osteoarthritis *in vitro* und *in vivo* abschwächt, indem dessen Hochregulierung die Interleukin-1 β (IL-1 β)-induzierte Entzündungsreaktion durch Smad 3 (*Small mothers against decapentaplegic 3*) hemmt (Ouyang et al., 2019).

1.3 Rolle von Nrf2 in Osteogenese und Knochenstoffwechsel

Neben der Einflussnahme auf die Chondrogenese und den Knorpelstoffwechsel existiert auch ein Zusammenhang von Nrf2 und der Osteogenese.

1.3.1 Zusammenhang mesenchymaler Stammzellen und Nrf2 während der Osteogenese

Bei der Osteogenese sind *Mesenchymal Stem Cells* (MSC) mit ihrer potenziellen Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zellen von essentieller Bedeutung. Diese spezifische Differenzierung kann durch bestimmte Bedingungen induziert werden (Friedenstein et al., 1970). Kubben *et al.* zeigen anhand des drastischen Falls des Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndroms, dass eine unterdrückte Nrf2-vermittelte antioxidative Reaktion zu einer Abnahme mesenchymaler Stammzellen führt. Eine Nrf2-Reaktivierung hingegen stellte die in vivo-Lebensfähigkeit von MSCs in einem Tiermodell wieder her (Kubben et al., 2016). Außerdem fanden Yoon et al. heraus, dass die Blockierung des Kernimports von Nrf2 zum Verlust des osteogenen Potenzials von MSCs im frühen Stadium führte. Umgekehrt begünstigte die Verstärkung des Nrf2-Kernimports die Aufrechterhaltung des Differenzierungspotenzials in der osteogenen Linie von MSCs aus frühen Passagen (Yoon et al., 2016).

1.3.2 Einfluss von Nrf2 auf die Knochenstruktur

Ein Ungleichgewicht von Nrf2 kann sich auf die Knochenstruktur und dessen einzelne Parameter auswirken und unterstreicht die Rolle von Nrf2 als möglichen Schlüsselfaktor bei der Regulierung des Knochenaufbaus, indem es sowohl die Osteoblasten- als auch die Osteoklastendifferenzierung beeinflusst (Park et al., 2014).

Durch erhöhten oxidativen Stress ist Nrf2 bei Pathomechanismen diverser Knochenerkrankungen, wie zum Beispiel der Osteonekrose, beteiligt. Osteonekrose beschreibt dabei das Absterben von Knochengewebe aufgrund einer insuffizienten Nährstoffversorgung (Ischämie), bei der oxidativer Stress als Risikofaktor eine Schlüsselrolle einnimmt (Mont et al., 2006). In einem Tiermodell von Yamamoto *et al.* fiel auf, dass vermehrte Kortikosteroidtherapie erhöhten

oxidativen Stress verursachte und zu Dysfunktion der Knochen- und Gefäßendothelzellen führte (Yamamoto et al., 1997). Die übermäßige Verabreichung hatte aber nicht nur direkte oxidative Stressschäden auf den Knochen zur Folge, sondern wirkte auch indirekt über ROS-Induktion gewebescheidigend (Ichiseki et al., 2004). Zu diesen durch ROS ausgelosten Ereignissen gehorten unter anderem Zellschaden durch Mutation der nuklearen und mitochondrialen *Deoxyribonucleic Acid* (DNA), verschiedene Zelltode (Apoptose, Nekrose und Nekroptose), eine verringerte Osteoblastendifferenzierung und eine erhohhte Osteoklastenaktivierung (Miura, 2004; Sakon et al., 2003; Vanella et al., 2012; Yamasaki et al., 2009). Dies hatte die Abnahme der Fahigkeit zur Knochenreparatur und -regeneration zur Folge und trug erheblich zu den irreversiblen nekrotischen Veranderungen des Knochengewebes bei (Kubo et al., 2021). Die negative Beeinflussung der knochernen Strukturen durch Nrf2-Mangel kann zudem zum einen durch Marin et al. untermauert werden, die ein erhohhtes Frakturrisiko aufgrund von Knochenbruchigkeit durch verminderte mechanische Knochenfestigkeit und gestorte Frakturheilung bei Diabetes mellitus Typ 2-Patienten beobachten konnten (Marin et al., 2018). Zum anderen zeigen Brown et al., dass Diabetes mellitus Typ 2-Mause mit Tibiafrakturen ein vermindertes Knochengewebe, reduziertes Frakturkallusvolumen sowie eine beeintrachtigte Torsionssteifigkeit aufwiesen (Brown et al., 2014). In einer fruheren Arbeit wurde zudem eine erhohhte Anzahl an spontanen Mikrofrakturen bei Nrf2-KO-Mausen mit Antikorper-induzierter Osteoarthritis beobachtet (Wruck et al., 2011).

Kanzaki et al. beschreiben eine geringere Anzahl *Tartrate Resistant Acid Phosphatase* (TRAP)-positiver mehrkerniger Zellen und eine Abschwachung der Osteoklastendifferenzierung und Knochenresorption sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Modellen. Ursache dessen ist eine ROS-unabhingige Uberexpression von Nrf2 verbunden mit einer Hochregulierung zytoprotektiver Enzyme und einer Verringerung der ROS-Konzentration. Eine Induktion des Nrf2/HO-1-Signalwegs kann somit das Potenzial haben, Knochenzellen vor Toxizitat zu schutzen und ihre Fahigkeit zur Knochenreparatur und -regeneration zu erhalten. Daruber hinaus wiesen alte Nrf2-KO-Mause signifikant mehr osteoklastenahnliche Zellen und weniger Osteozyten auf als WT-Mause, was mit einem Bericht uber eine erhohhte Osteoklastenaktivitat in Nrf2-spezifischen KO-Mausen im Vergleich zu WT-Mausen ubereinstimmt (Ibanez et al., 2014; Kanzaki et al., 2013).

Zudem fiel bei der microcomputertomographischen (μ CT) Analyse auf, dass die Deletion von Nrf2 eine geringere Knochenmasse zur Folge hatte. Kubo *et al.* zeigen, dass alte Nrf2-KO-Mäuse im Vergleich zu alten WT-Mäusen eine signifikant reduzierte trabekuläre *Bone Mass Density* (BMD), kortikale Dicke, kortikale Fläche sowie vermehrt osteoporotische Veränderungen aufwiesen, obwohl es bei jungen erwachsenen Mäusen keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und KO gab. Trabekulärer Knochen fehlte in der distalen femoralen Metaphyse bei 60 % der alten KO-Mäuse vollständig (Kubo *et al.*, 2022). Ähnliche Daten zu Knochenparametern wie Knochenmineraldichte, Knochenvolumenanteil oder Trabekeldicke konnten durch Kim *et al.*, Sun *et al.* und Ibáñez *et al.* gezeigt werden (Ibáñez *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

Park *et al.* beobachteten hingegen eine erhöhte Mineralisierungsrate in Nrf2-KO-Mäusen mit einer Zunahme der Osteoblasten pro Knochenperimeter und der Osteoblastenoberfläche pro Knochen und keiner Veränderung der Osteoklastenanzahl (Park *et al.*, 2014).

Pellegrini *et al.* beschreiben in ihrer Studie eine alters- und geschlechtsabhängige Nrf2-Regulation des Aufbaus der Knochenmasse und der endogenen antioxidativen Reaktion im Knochen. Dabei beziehen sie sich auf den altersbedingten Verlust von Knochenmasse und -festigkeit durch Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies. Auch hier wurde ein Nrf2-Knockout (KO)-Modell verwendet, bestehend aus jungen, drei Monate alten und 15 Monate alten Mäusen. Dabei fiel auf, dass die antioxidativen Reaktionen über HO-1, NQO1 und GST bei weiblichen KO-Mäusen zu einem verzögerten Knochenaufbau und bei männlichen KO-Mäusen zu einem höheren Knochenaufbau führten. Weibliche KO-Mäuse wiesen im Gegensatz zu männlichen KO-Mäusen ein geringeres Knochenvolumen, eine verminderte Trabekelanzahl und größere Trabekelabstände auf. Somit lässt sich ein entgegengesetzter, von Alter und Geschlecht abhängiger Effekt von Nrf2 auf den Knochenerwerb festhalten. Es wird vermutet, dass Nrf2 für den vollständigen Knochenaufbau im weiblichen Skelett erforderlich sein kann. Dies unterstreicht das Vorkommen von geschlechtsspezifischen Mechanismen im Knochen (Pellegrini *et al.*, 2017).

Die mechanistischen Grundlagen, durch die Nrf2 die zelluläre Reaktion bei Weibchen und Männchen unterschiedlich moduliert, sind unbekannt. Jedoch wird von einer Erhöhung der Nrf2-Aktivität durch östrogenabhängige

Signalübertragung in verschiedenen Zelltypen berichtet (C.-S. Chen et al., 2013; Wu et al., 2014; Yu et al., 2012). Eine Nrf2-Defizienz führt zur altersabhängigen Progression der weiblichen Osteoporose, ausgelöst durch die Folgen von oxidativem Stress in Form von einer Verringerung der Osteoblastogenese und einer Erhöhung der Osteoklastogenese (Kimball et al., 2021; Schröder, 2019). Im drastischsten Fall verursachen die irreversiblen Schäden verzögerte Frakturheilungen (Abb. 2) oder Nonunion-Frakturen (Kubo et al., 2019; Zhang et al., 2022). Die direkte Beziehung zwischen Östrogen und Nrf2 im Knochen ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wurde bei sechs bis neun Monate alten ovariectomierten Nrf2-defizienten KO-Mäusen von reduzierten Knochenparametern und einer erhöhten Osteoklastenaktivität berichtet. Ebenso wurde in Osteozyten alter Nrf2-KO-Mäuse weniger Aromatase, welches die Östrogenbiosynthese katalysiert, nachgewiesen (Ibáñez et al., 2014; Kubo et al., 2022).

Andere Autoren berichten von einer durch Östrogenmangel verursachten primären Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und eines 17β -Östradiol-induzierten antioxidativen Nrf2-Keap1-Komplexes. Chronischer Nrf2-Verlust kann so zu einer altersabhängigen Progression der Osteoporose bei Frauen führen (C.-S. Chen et al., 2013; Wu et al., 2014; Yu et al., 2012).

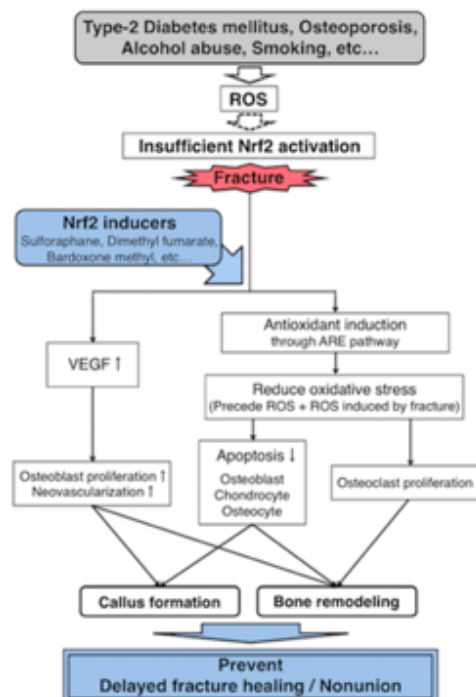


Abb. 2: Überblick über die mögliche Rolle der Nrf2-Aktivierung bei der Frakturheilung unter vorangegangenem oxidativem Stress (Kubo et al., 2019)

1.3.3 Wechselwirkung von Nrf2 und VEGF während der endochondralen Knochenbildung

Ein wichtiger Gesichtspunkt für das Verständnis der Regulationsfunktion von Nrf2 ist seine Wechselwirkung mit VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), einem wichtigen Wachstumsfaktor in der Angiogenese (Kweider et al., 2011). Bei der endochondralen Knochenbildung fördert VEGF die Rekrutierung von Osteochondroprogenitorzellen, induziert die Knorpelbildung und stimuliert die Resorption von Knorpel und dessen Ersatz durch Knochen (Peng et al., 2002; Tarkka et al., 2003). Während der Knochenentwicklung stimuliert VEGF, das von Osteoblastenvorläufern gebildet wird, die Osteoblastendifferenzierung (Zelzer et al., 2002). Es dient zudem als chemotaktischer Faktor für die Migration dieser Osteoblasten in primäre Ossifikationszentren zusammen mit vaskulären Endothelzellen und Osteoklasten (Gerber et al., 1999). Zur Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase wirkt VEGF auf benachbarte Endothelzellen, um mitogene und angiogene Effekte zu vermitteln, und spielt somit eine wichtige Rolle für den Erhalt der vaskulären Integrität und Knochenmasse (Liu et al., 2012; Wang et al., 2007). Kweider et al. zeigen, dass VEGF sowohl die Nrf2-Aktivität als auch die Expression von Nrf2-Zielgenen, wie zum Beispiel die antioxidativen Enzyme Thioredoxin und HO-1, in der zytotrophen Zelllinie „BeWo“ steigert (Kweider et al., 2011). Zusätzlich beschreiben sie eine positive Rückkopplung in der Aktivierung von Nrf2 durch VEGF und die damit verbundene Hochregulierung der Häm-Oxygenase-1, die zu einem Anstieg der Kohlenmonoxid (CO)-Produktion und anschließender VEGF-Expression führte. Eine verringerte VEGF-Expression aufgrund unzureichender Nrf2-Aktivierung hat eine höhere zelluläre Anfälligkeit und eine verringerte Abwehr vor oxidativem Stress zur Folge (Kweider et al., 2011).

1.4 Rolle von Nrf2 während der Frakturheilung

In der frühen Phase nach einer Fraktur werden unter entzündlichen und ischämischen Bedingungen aufgrund von Gefäßverletzungen und Weichteilschäden reaktive Sauerstoffspezies gebildet (Yeler et al., 2005). Unter normalen physiologischen Bedingungen werden durch ROS ausgelöste Schäden mithilfe von antioxidativen Schutzmechanismen verhindert (Ilyas et al., 2016).

Dabei spielt Nrf2 eine essentielle Rolle. Bei Patienten mit Osteoporose oder Diabetes mellitus Typ 2 kommt es jedoch aufgrund des intrinsischen oxidativen Stresses zur Anhäufung toxischer Radikale, der Nrf2-Schutzkomplex versagt und das Risiko einer unvollständigen Frakturheilung entsteht (Hamada et al., 2009; Lippross et al., 2014).

Des Weiteren spielt der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung. Lippross *et al.* beschäftigten sich als eine der ersten Arbeitsgruppen mit dem Einfluss von Nrf2 auf die Heilung von hierbei nicht traumatischen Frakturen anhand eines Nrf2-Knockout-Mäusemodells für geschlossene Femurschaftfrakturen (Lippross et al., 2014). Zum einen fiel eine verzögerte Knochenheilung und ein langsamerer Knochenumbau bei Nrf2-KO-Mäusen auf, zum anderen entwickelte sich bei ihnen deutlich weniger Kallusgewebe im Frakturspalt. Es wurde zudem beobachtet, dass Nrf2 während der Frakturheilung im knorpeligen Kallus hochreguliert war. Dies ist dahingehend von besonderer Bedeutung, da die Kallusbildung als ein kritischer Schritt zur Frakturheilung angesehen werden kann. Zudem war die biomechanische Qualität des reparierten Knochens bei den KO-Mäusen geringer. Dies erkennt man zum Beispiel daran, dass sich die Widerstandsfähigkeit gegen Scherkräfte während der Frakturheilung bei den WT-Mäusen signifikant verbesserte, bei den Nrf2-KO-Mäusen hingegen auf demselben Niveau verharrte. Es untermauert die Beobachtung einer unvollständigen Knochenheilung mit bestehendem Kallus. Histologisch wurde eine inhomogenere Kortikalis mit vermehrter Spaltbildung zwischen den Knochenlamellen beobachtet. Die Autoren begründen dies mit einer schlechteren Knochenqualität durch verstärkte Knochenanlagerung bei verringerter Knochenresorption (Lippross et al., 2014).

Nrf2-KO-Mäuse zeigten darüber hinaus eine altersabhängig geringere Frakturresistenz im Vergleich zu altersgleichen WT-Mäusen. Zusätzlich wiesen ältere Knochen eine inhomogene Dehnungsverteilung auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Verlust der Knochenqualität bei alten Nrf2-defizienten KO-Mäusen mit einer verminderten Knochenquantität korreliert (Kubo et al., 2022).

Neben der Kernaussage von Lippross *et al.*, dass Nrf2-Mangel die normale Frakturheilung beeinträchtigt und dass die Nrf2-Expression in der Frühphase der Fraktur annähernd zeitgleich mit dem Start der ROS-Produktion aktiviert wird, betonen Sun *et al.*, dass Nrf2 die Homöostase der Knochenzellen während der

Frakturheilung beeinflusst. Somit könnte eine pharmakologische Induktion von Nrf2 die Frakturheilung vermutlich nicht nur durch die Blockierung der schädlichen ROS-Produktion, sondern auch durch die Verbesserung der Knochengesundheit nach der Fraktur fördern (Lippross et al., 2014; Sun et al., 2015).

1.5 Stand der Forschung

Wie oben beschrieben spielt die Knorpeldifferenzierung eine große Rolle in der Osteogenese. Einhergehend damit ist es wichtig, den direkten Einfluss von Nrf2 auf die Chondrogenese zu betrachten. Kubo *et al.* bedienten sich dabei der Möglichkeit der Analyse des Zusammenhangs von SOX-9 und Nrf2. Ein systemischer Nrf2-Mangel führt zur Unterdrückung des Transkriptionsfaktors in Chondrozyten der Maus verbunden mit osteoarthritischen Veränderungen des Knorpels. Es ergeben sich daraus Hinweise, dass vermehrter oxidativer Stress abhängig vom Alter zu Knorpeldegeneration führen kann und Nrf2 für die Aufrechterhaltung und den Schutz der extrazellulären Matrix verantwortlich ist, indem es über SOX-9 die Gewebekomöostase aufrechterhält (Kubo, Beckmann, *et al.*, 2022). Im Gegensatz dazu führt eine Nrf2-Aktivierung zu einer Verbesserung der für die Chondrogenese essentiellen Kollagen Typ 2-Expression (Guo et al., 2022). Eine Nrf2-Überexpression hingegen hat eine Hemmung der Knorpeldifferenzierung zur Folge (Hinoi et al., 2007; Solomon et al., 2008).

Mehrere Autoren liefern Hinweise darauf, dass Nrf2 besonders während der endochondralen Ossifikation eine wichtige Rolle innerhalb der Epiphysenfuge einnimmt. Dong *et al.* zeigen mithilfe eines Manganmangel-Versuchs an Hühnern, dass ein dadurch ausgelöster Nrf2-Mangel und eine folgende Verringerung von Kollagen Typ 2 zu einer Schädigung der tibialen Epiphysenfuge mit einem verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix führte (Dong et al., 2022). Eine Stimulierung der Nrf2-Transkriptionsaktivität durch Dimethylfumarat (Tecfidera®) induzierte hingegen die hypertrophe Chondrozytendifferenzierung und führte zu einer Verlängerung der Körperlänge von Zebrafischen durch Unterstützung der Chondrozytenreifung als entscheidenden Faktor für das longitudinale Knochenwachstum (Chang et al., 2023).

Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Rolle von VEGF in Bezug auf Nrf2 gelegt werden. VEGF reguliert die Nrf2-Funktion, indem es sowohl die Nrf2-Aktivität als auch die Expression von Nrf2-Zielgenen steigert. Zusätzlich liegt eine positive Rückkopplung in der Aktivierung von Nrf2 durch VEGF vor (Kweider *et al.*, 2011). Gerber *et al.* zeigen, dass im hypertrophen Knorpel der Epiphysenfuge exprimiertes VEGF ein wesentlicher Koordinator der Chondrozytenfunktion, des Umbaus der extrazellulären Matrix und der Knochenbildung in der Epiphysenfuge ist (Gerber *et al.*, 1999). Vor allem während der chondralen Ossifikation fördert VEGF die Rekrutierung von Osteochondroprogenitorzellen, induziert die Knorpelbildung und stimuliert die Resorption von Knorpel und dessen Ersatz durch Knochen (Peng *et al.*, 2002; Tarkka *et al.*, 2003). Diese wichtige Rolle von VEGF bei der endochondralen Knochenbildung im hypertrophen Knorpelumbau unterstreichen Petersen *et al.*, die die Expression von VEGF-121 und -165 in der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge nachwiesen und somit VEGF als wichtigen Marker für Osteogenese und Längenwachstum bestimmten (Petersen *et al.*, 2002).

Ein Einfluss von Nrf2 auf die Knochenstruktur kann ebenso nachgewiesen werden. Eine Deletion hat verringerte Knochenparameter, wie zum Beispiel die trabekuläre Dichte oder die Mineralisierungsrate, zur Folge (Kubo *et al.*, 2022). Zudem spielt Nrf2 eine entscheidende Rolle bei der Frakturheilung, indem es die Bildung eines knorpeligen Kallus reguliert. Das Volumen des Kallus ist bei einem Knock-Out des Transkriptionsfaktors vermindert (Lippross *et al.*, 2014). Hu *et al.* zeigen, dass VEGF auch hierbei in mehreren Phasen des Reparaturprozesses eine entscheidende Rolle spielt. Der aus hypertrophen Chondrozyten gewonnene Transkriptionsfaktor stimuliert die Rekrutierung von Blutgefäßen und Osteoklasten und fördert die Knorpelresorption an der Reparaturstelle während der periostalen endochondralen Ossifikationsphase (Hu & Olsen, 2016).

Aufgrund seines großen entzündungshemmenden und antioxidativen Potenzials scheint es so, dass Nrf2 zum einen über seine angemessene, im Gleichgewicht befindliche Expression der Aufrechterhaltung einer regelrechten Chondrogenese und Knochenintegrität, zum anderen als potentieller pharmakologischer Angriffspunkt über seine Induktion der Behandlung von Erkrankungen wie Osteoarthritis dienen kann. Um dies umsetzen zu können, ist es notwendig, den

vollständigen Komplex des Nrf2/Keap1/ARE-Signalwegs und dessen Wechselwirkungen tiefergehend zu verstehen.

Vor allem bei jungen Mäusen spielt Nrf2 eine wichtige Rolle während der chondrogenen Ossifikation (Pellegrini et al., 2017). Der Einfluss von Nrf2 speziell auf die Epiphysenfuge während der chondralen Ossifikation wurde dabei noch nicht genau geklärt. Daher soll in dieser Promotion die Konzentration auf die Rolle von Nrf2 während der Entwicklung, speziell der chondralen Ossifikation, in Verbindung mit VEGF gelegt werden.

1.6 Hypothese und Fragestellung

Der aktuelle Forschungsstand und die Beobachtung der verkürzten Femora bei Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (siehe Abb. 3) lässt schlussfolgern, dass die Aktivität von Nrf2 die Wachstumsplatte beeinflusst und sich damit auf das Längenwachstum und die Regeneration von Knorpel und Knochen während der chondralen Ossifikation auswirkt. Dies hat ein langsames Knochenwachstum und womöglich auch eine verminderte Körperlänge sowie Körpergröße zur Folge.

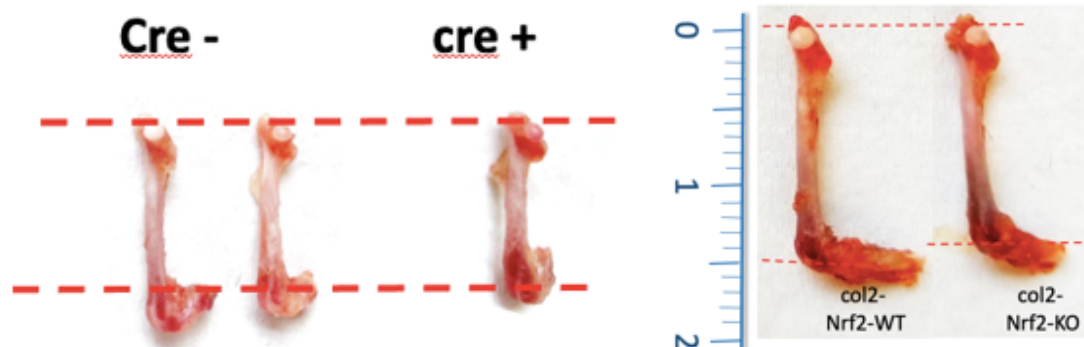


Abb. 3: Femurlängenvergleich zwischen Col2-Nrf2-Cre⁺- und Col2-Nrf2-Cre⁻-Maus in einem Alter von 18 Wochen

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen im Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{loxp/loxp}- sowie Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Keap1^{loxp/loxp}-Mäusemodell mithilfe von *in vitro*-, *Magnet Resonance Imaging* (MRI)- sowie μ CT-Maßnahmen, um die genannten Hypothesen zu überprüfen. Es wird der Einfluss eines Knock-Outs von Nrf2 auf die Differenzierung von Chondrozyten und einer Nrf2-Hyperaktivierung durch Keap1-Knock-Out auf die Expression von

VEGF betrachtet. Dabei wird besondere Aufmerksamkeit auf die Gelenkflächen von Femur und Tibia sowie auf die Epiphysenfuge der Tibia mit ihren drei verschiedenen Zonen gelegt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1: Geräte

Name	Firma
Aqualine AL 25 Wasserbad	Lauda Dr. Wobser GmbH & Co. KG
Axiophot Axioplan Durchlicht-Mikroskop	Carl Zeiss AG
Bruker BioSpec 70/20 USR 7T-MRT-Scanner	Bruker BioSpin GmbH, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 150i	Thermo Fischer Scientific
Eppendorf Reference Pipette, dunkelgrau, 0,1 - 2,5 µl, 4924000010	Thermo Fischer Scientific
Eppendorf Reference Pipette, grau, 0,5 – 10 µl, 4924000029	Thermo Fischer Scientific
Eppendorf Reference Pipette, gelb, 20 – 200 µl, 4924000061	Thermo Fischer Scientific
Eppendorf Reference Pipette, blau, 100 - 1000 µl, 4924000088	Thermo Fischer Scientific
Keyence-Mikroskop BZ-9000	Keyence Corporation
Lichtmikroskop DM IL	Leica Microsystems
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II, Safe 2020 1.8, 51026934	Thermo Electron LED GmbH
Magnetrührer mit Heizung, N2400-3010	Starlab GmbH
Neubauer-Zählkammer, 718605	Brand GmbH & Co. KG
Pipetus, 9907200	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG

Tecan Infinite	Tecan Group AG
U-CT-OI-Systems, MILabs B.V.	Houten, the Netherlands
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Zentrifuge Universal 32R	Hettich Zentrifugen

2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Deckgläser Stärke 1, 24 x 24 mm, H875	Carl Roth GmbH & Co. KG
Deckgläser Stärke 1, 24 x 32 mm, H877	Carl Roth GmbH & Co. KG
EcoLab-Faltenfilter Filtrak Qualitativ, E-1419	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Filtropur S 0,2, 83.1826.001	Sarstedt AG & Co. KG
Injekt Luer Solo 10 ml, 4606108V	B. Braun Melsungen AG
Mikroskopische Deckgläser, 12 mm Durchmesser, ECN 631-1577	VWR International
Objektträger, HistoBond microscope slides 76 x 26 x 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen 10 µl, 70.1130	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen 200 µl, 70.3030	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen 1000 µl, S1111-6001	Starlab GmbH
Reagiergefäß 0,5 ml, PP, 72.699	Sarstedt AG & Co. KG
Reagiergefäß 1,5 ml, 72.690.001	Sarstedt AG & Co. KG
Röhre 15 ml, 120 x 17 mm, PP, 62.554.502	Sarstedt AG & Co. KG
Röhre 50 ml, 114 x 28 mm, PP, 62.547.254	Sarstedt AG & Co. KG

Serologische Pipette 5 ml, 86.1253.001	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipette 10 ml, 86.1254.001	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipette 25 ml, 86.1685.001	Sarstedt AG & Co. KG
TC-Flasche T75, Standard, Bel. Ka., 83.3911.002	Sarstedt AG & Co. KG
TC-Platte 24 well, Standard, F, 83.3922	Sarstedt AG & Co. KG
TC-Platte 96 well, Standard, F, 83.3924	Sarstedt AG & Co. KG
TC-Schale 100, Standard, 83.3902	Sarstedt AG & Co. KG

2.3 Verwendete Substanzen

Tabelle 3: Substanzen

Name	Firma
Alcianblau 8GX, C.I.74240	Merck KGaA
Aluminiumsulfat-18-hydrat reinst Ph Eur, BP, 101102	Merck KGaA
basic Fibroblast Growth Factor; human FGF-basic 154 a.a., AF-100- 18B-50UG	Peprotech
Bovine Serum Albumine, fraction V, pH = 7,0	SERVA Electrophoresis GmbH
Citronensäure-Monohydrat, 3958.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
DePeX, 18243	SERVA Electrophoresis GmbH
Dexamethason, D2915-100MG	Sigma-Aldrich, Co.
DMEM(1X) + GlutaMAX™, 1.0g/L D- Glucose + pyruvate	gibco, Life Technologies Europe B.V.
Dulbecco's Modified Eagle Medium- high glucose, D5796-500ML	Sigma-Aldrich, Co.

Ethanol/Alkoholreihe	Institut für Anatomie und Zellbiologie, RWTH Aachen University
Ethylendiamintetraacetat- Dinatriumsalz, 8043.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
fetal bovine serum, qualified, HI	gibco, Life Technologies Limited.
Hämalaun/Hämatoxylin, 15938	Merck KGaA
ImmPACT DAB, Substrate Kit, Peroxidase	Vector Laboratories, Inc.
Isofluran-Piramal	Piramal Critical Care B.V.
Isopropanol, A3928,2500PE	PanReac AppliChem, ITW Reagents
ITS-G-Premix (100x)	gibco, Life Technologies Corporation
Kernechtrot (C.I.60760), 115939	Merck KGaA
L-Ascorbinsäure 2-PO4, A4544-25G	Sigma-Aldrich, Co.
L-Glutamat, G7513-100ML	Sigma-Aldrich, Co.
L-Prolin, P0380-10MG	Sigma-Aldrich, Co.
Natriumacetat, 1.06268.1000	Merck KGaA
Paraformaldehyd, 4 %	Institut für Anatomie und Zellbiologie, RWTH Aachen University
Penicillin-Streptomycin, P0781- 100ML	Sigma-Aldrich, Co.
Phosphate Buffered Saline, D8537- 500ML	Sigma-Aldrich, Co.
Safranin O (C.I. 50240), 1.15948.0025	Merck KGaA
Transforming Growth Factor-beta 3, human TGF- β 3	Peprtech
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 5429.4	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100, 1.08603.1000	Merck KGaA
Trypsin-EDTA, T4174-100ML	Sigma-Aldrich, Co.
Tryptanblau, 93595-250ML, Fluka Analytical	Sigma-Aldrich, Co
Wasserstoffperoxid, 30 %, 1.07209.0250	Merck KGaA

Xylol/Xylene Substitute, 6764506	Thermo Fisher Scientific Inc.
----------------------------------	-------------------------------

2.4 Verwendete Software-Programme

Tabelle 4: Software-Programme

Name	Firma
Bildanalyseprogramm ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health
GraphPad Prism, Version 9.2.0 für MacOS	GraphPad Software
MILabs Auto Rec 1.6 bzw. MILabs FLT Recon 1.1.0.8	MILabs B.V., A Rigaku Company
Tecan iControl-Programm	Tecan Group AG
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University

2.5 Verwendete Antikörper

Tabelle 5: Antikörper

Name	Firma
VEGF Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody, SP07-01, Verdünnung 1:75 (Primärantikörper)	Invitrogen
Dako Envision+ System-HRP, Labelled Polymer, Anti-Rabbit	Agilent Technologies, Inc.

2.6 *In vitro*-Versuche

2.6.1 Verwendete Mäuse

Für die *in vitro*-Versuche wurden Mäuse des Stammes B6/J-tg(Col2Cre)(Nrf2- P) im Alter von neun bis zehn Wochen verwendet. Dabei handelt es sich um fünf Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁻::Nrf2^{loxP/loxP}- und vier Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{loxP/loxP}-Mäuse. Zur Vereinfachung werden in den nachfolgenden Kapiteln stattdessen die Begriffe Col2-Nrf2-Cre⁻ (WT) und Col2-Nrf2-Cre⁺ (KO) verwendet.

2.6.2 Zellkultur-Experiment

Die körperlichen Daten der Mäuse wurden nach Finalisierung durch eine Inhalationsnarkose mithilfe von Isofluran erfasst. Dazu gehörten das Körpergewicht, die Körperlänge sowie die Länge der Vertebrae caudales (Abb. 4).

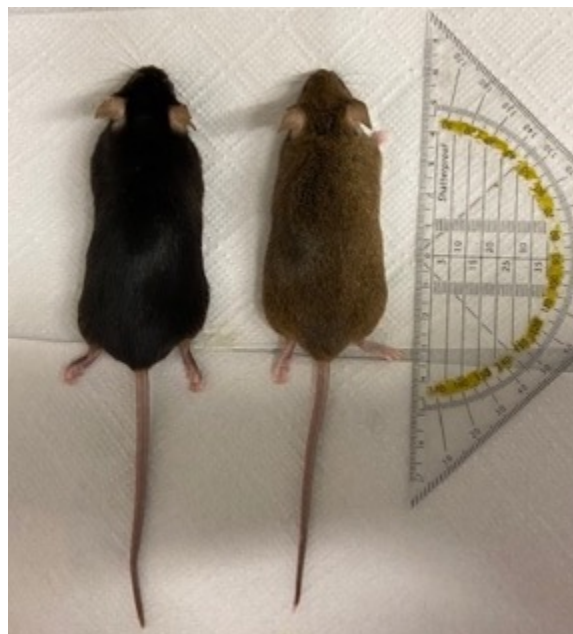


Abb. 4: Längenvergleich Col2-Nrf2-Cre⁻-Maus und Col2-Nrf2-Cre⁺-Maus

2.6.3 Isolieren und Kultivieren der Stammzellen

Anschließend erfolgte die Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation und deren Präparation zur Extraktion eines Humerus und beider Femora. Nach Restgewebeentfernung wurde einer der Femora mit Kniegelenk zur histologischen Aufbereitung in Ethanol, Wasser über 24 Stunden und einer 15-prozentigen Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)/Ethyldiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalz-Lösung als Puffersubstanz gegeben. Diese Lösung bestand aus 400 g EDTA und 136 g TRIS in jeweils vier Litern destilliertem Wasser und wies einen pH von 7,2 bis 7,4 auf.

Unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank für Primärkulturen fand die Weiterbehandlung des verbliebenen Humerus und Femurs statt. Nach Waschen in 70 % Ethanol wurden die Enden beider Knochen mithilfe eines Skalpells abgetrennt und das Knochenmark mit Proliferationsmedium durchgespült, sodass die Lösung aus Knochenmark und Medium in eine 10 cm-Petrischale gelangte. Das Proliferationsmedium bestand in der gesamten Versuchsreihe aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-*high glucose*, 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS), 1 % Penicillin-Streptomycin (PEST), 1 % L-Glutamat und 1 ng/ml *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Dabei wurden 50 µg bFGF in 50 ml sterilem 5mM TRIS-Puffer (pH=7,6) gelöst und davon 500 µl zum Medium hinzugegeben. Die Suspension aus Knochenmark und Proliferationsmedium wurde danach zentrifugiert (8 min bei 1200 rpm), der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in 10 ml Medium gelöst. Es erfolgte das Aussäen der Lösung auf eine neue 10 cm-Petrischale und die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂-Anteil. Am ersten und dritten Tag nach der Aussaat fand zusätzlich zum Mediumwechsel vorher das Waschen mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) statt, um unnötige Partikel vom Petrischalenboden zu lösen. Anschließend wurde das Medium drei Mal pro Woche gewechselt und regelmäßig die Kolonisation des Bodens unter einem Lichtmikroskop beobachtet (Abb. 5).

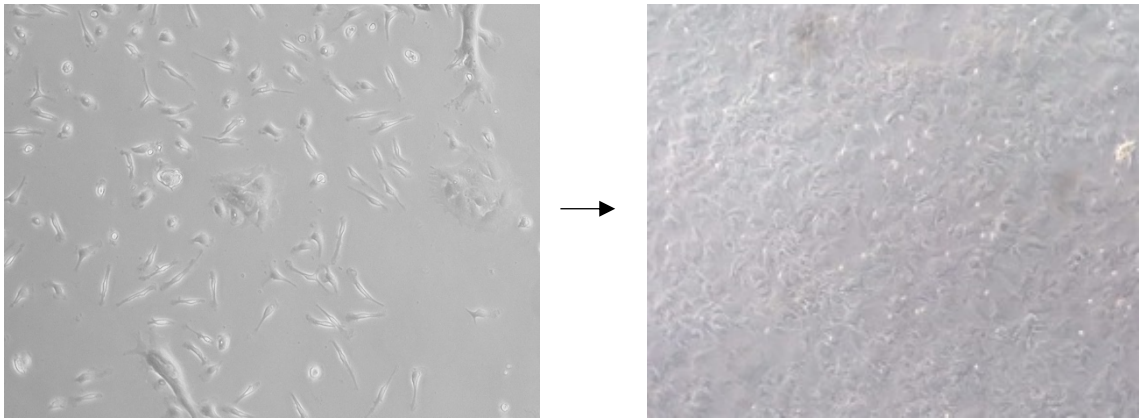


Abb. 5 Verlauf des Zellwachstums von der Aussaat bis zum Aufteilungszeitpunkt

2.6.4 Passagieren der Stammzellen und Zellzahlbestimmung

Nach ausreichender Proliferation der Zellen, sodass der Petrischalenboden vollständig bedeckt war, wurden die Zellen auf zwei T75-Flaschen aufgeteilt. Dafür musste zunächst das Medium abgesaugt, die Petrischale mit PBS gewaschen und 3 ml einer mit PBS verdünnten 10X-Trypsin-EDTA-Mischung (Endkonzentration 1X) sowie 7 ml PBS für die Ablösung der Zellen hinzugegeben werden. Nach fünf-minütiger Inkubation und Kontrolle des Ablösens unter dem Lichtmikroskop wurde die Reaktion mithilfe der Zugabe von Vollmedium gestoppt und das Gemisch bei 1200 *revolutions per minute* (rpm) für acht Minuten zentrifugiert. Es erfolgte das Absaugen des Überstands, das Hinzugeben von 5 ml Medium und das Resuspendieren. Von der Suspension wurden 30 µl mit derselben Menge Trypanblau zur Zählung in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop DM IL gemischt. Nach Berechnung der Zellzahl mithilfe der Formel

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl pro ml} &= \text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \\ \text{absolute Zellzahl} &= \text{Zellzahl pro ml} \times \text{Volumen der Zellsuspension} \end{aligned}$$

konnten die Zellen im gewünschten Verhältnis (ca. 500.000 Zellen pro 10 ml Medium) auf die T75-Flaschen aufgeteilt und in den Inkubator zwecks weiterer Proliferation gelegt werden. Nach weiterem Passagieren wurden die Zellen für den Versuch verwendet.

2.6.5 Chondrogene Differenzierung

Sobald eine Konfluenz von 80 – 90 % der Zellen erreicht war, wurden sie für das Experiment eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen mithilfe des oben genannten Verfahrens der Trypsinisierung und Trypanblaumischung gezählt und konnten auf die Wells einer 24-Well-Platte aufgeteilt werden, sodass sich in jedem Well 60.000 Zellen in 500 µl Proliferationsmedium befanden. Dabei unterschieden sich die 24-Well-Platten je nach Gruppe (Kontrollgruppe, 14-tägige und 21-tägige Differenzierungsgruppe) und geplantem Experiment. Zur Ermöglichung der späteren histologischen Analyse wurde die Hälfte der Wells mit Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm versehen. Danach gab es keine Unterschiede mehr in der Behandlung der 24-Well-Platten. Nach zweitägiger Proliferation wurde die Kontrollgruppe mehrmals mit PBS gewaschen, mit 4 % PFA Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 5 bis 7 °C feucht gelagert. Bei den Differenzierungsgruppen fand hingegen ein Austausch des Mediums durch Differenzierungsmedium statt, das jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Dieses Differenzierungsmedium bestand aus DMEM(1X) + GlutaMAX™ (1.0g/L D-Glucose + pyruvate), 10 % FBS, 100 U/ml PEST, 100ng/ml Dexamethason, 50 µg/ml L-Ascorbinsäure 2-PO₄, 40 µg/ml L-Prolin, 10 µl/ml Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)-G-Premix und kurz vor Gebrauch hinzugefügten 5 ng/ml *Transforming Growth Factor-beta 3* (TGF-β₃). Die einzelnen Bestandteile wurden unter sterilen Bedingungen unter der Bench durch Filtrierung zum Nährmedium hinzugegeben. Dexamethason, L-Ascorbinsäure und L-Prolin wurden dabei vorher in Pulverform in autoklaviertem VE-Wasser gelöst, verdünnt und aliquotiert. PEST und ITS-G-Premix hingegen konnten direkt mit autoklaviertem VE-Wasser verdünnt und aliquotiert werden. Nach 14 beziehungsweise 21 Tagen wurden die beiden Differenzierungsgruppen mit 4 % PFA fixiert und ebenso feucht bei 5 bis 7 °C gelagert.

2.6.6 Safranin O-Extraktion

Die für die Färbung verwendete 0,1-prozentige Safranin O-Lösung bestand aus 0,1 g Safranin O pro 100 ml destilliertem Wasser und wurde vor Gebrauch filtriert. Um das PBS zunächst von den Wells zu entfernen, wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen, das danach wieder abipettiert wurde. Anschließend folgte

die Zugabe von 300 μ l 0,1 % Safranin O für 30 Minuten. Nach Beendigung der Färbezeit wurde das Safranin O abgesaugt und Reste, die zu Fehlern in der Absorptionsmessung führen könnten, mit PBS abgewaschen (Abb. 6).

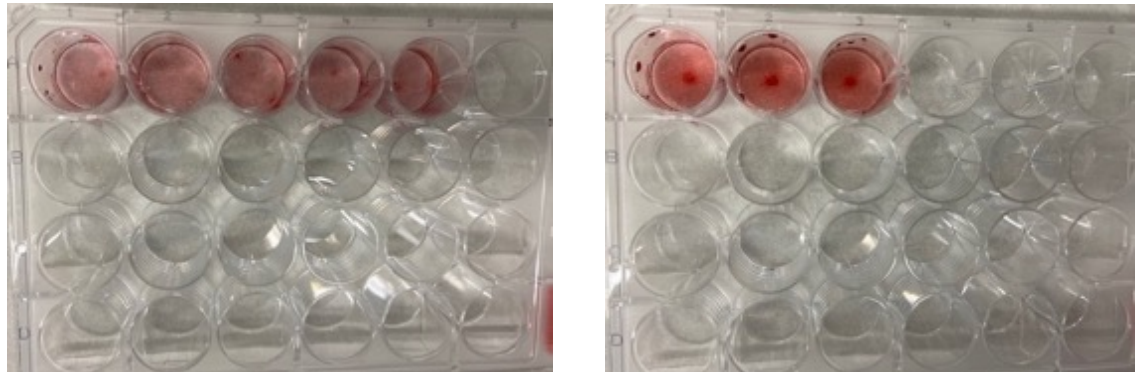


Abb. 6: Vergleich der Safranin O-Färbung nach 21-tägiger Differenzierung
links: Col2-Nrf2-Cre⁻; rechts: Col2-Nrf2-Cre⁺

Um die Farbe aus den Zellen zu extrahieren, beinhaltete der letzte Schritt die Zugabe von 250 μ l Isopropanol und die 20-minütige schüttelnde Inkubation unter Raumluftbedingungen. Als Messplatte wurde eine 96-Well-Platte verwendet, in deren jeweiligen Wells sich vertikale Triplets aus je 70 μ l des Isopropanol/Safranin O/Zell-Gemischs befanden. Eine 96-Well-Messplatte beinhaltete dabei sechs verschiedene Gruppen: Col2-Nrf2-Cre⁺-Kontrolle, Col2-Nrf2-Cre⁻-Kontrolle, Col2-Nrf2-Cre⁺-14 Tage Differenzierung, Col2-Nrf2-Cre⁻-14 Tage Differenzierung, Col2-Nrf2-Cre⁺-21 Tage Differenzierung und Col2-Nrf2-Cre⁻-21 Tage Differenzierung. Die kolorimetrische Messung wurde mithilfe des Tecan Infinite und des iControl-Programms durchgeführt und die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 540 nm wiedergegeben.

Diese Safranin O-Extraktion wurde in drei Versuchsreihen mit den Zellen der oben beschriebenen Gruppen ausgeführt.

2.6.7 Alzianblau- und Safranin O-Färbung

Die fixierten 24-Well-Platten mit Deckgläschen wurden wie die vorherigen Platten für die Safranin O-Extraktion mit destilliertem Wasser zwei Mal für je fünf Minuten gewaschen. Anschließend folgte die Färbung mit Safranin O in Natriumacetatpuffer (0,5 g Safranin O in 100 ml Natriumacetatpuffer, pH = 4,6) für 10 Minuten und das Waschen mit destilliertem Wasser. Die Deckgläschen

wurden kurz in 96% Alkohol getaucht und zum Schluss zwei Mal für jeweils 5 Minuten in Xylol gegeben. Das Eindeckeln der Deckgläschen erfolgte mit DePeX. Zur Färbung mit Alzianblau wurden 0,1 g des Färbemittels in 3 % Essigsäure gelöst und ein pH von 2,6 eingestellt. Vor Gebrauch fand die Filtration der Lösung statt. Wie bei der Safranin O-Färbung entfernte man die PBS-Rückstände durch das Waschen mit destilliertem Wasser. Danach erfolgte die Färbung mit Alzianblau (pH = 2,6) für mindestens 45 Minuten, das erneute Waschen mit destilliertem Wasser und die Gegenfärbung mit filtriertem 0,1-prozentigen Kernechtrot für drei Minuten. Das Färbemittel zur Gegenfärbung bestand aus 5 g Aluminiumsulfat, gelöst in 100 ml destilliertem Wasser, und gemischt mit 0,1 g Kernechtrot, das anschließend für fünf bis zehn Minuten gekocht und nach dem Erkalten filtriert wurde. Auch hier war der letzte Schritt die verkürzte aufsteigende Alkoholreihe, bestehend aus 96 %-Alkohol und zweimaliger Xylol-Anwendung sowie das Eindeckeln mit DePeX.

2.6.8 Analyse der Safranin O- und Alzianblau-Färbung

Analysiert wurden die Deckgläschen mithilfe des Axiophot Axioplan Durchlicht-Mikroskops mit 20X-Objektiv. Um die Intensitäten der jeweiligen Färbungen vergleichen zu können, wurde mithilfe des Bildanalyseprogramms ImageJ anhand der gefärbten Objektträger eine subjektive Intensitätsskala nach Augenmaß für die Safranin O- sowie für die Alzianblaufärbung erstellt (vergleiche Anhang).

2.7 Immunhistologische Färbung des Kniegelenks von Col2-Keap1-Cre⁺- und -Cre⁻-Mäusen

2.7.1 Ablauf der immunhistologischen Färbung

Im Institut für Anatomie und Zellbiologie der RWTH Aachen University hergestellte 3,5 µm dicke Paraffinschnitte des Kniegelenks von acht und zwölf Wochen alten Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Keap1^{loxp/loxp}-Mäusen (Col2-Keap1-Cre⁺) und Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁻::Keap1^{loxp/loxp}-Mäusen (Col2-Keap1-Cre⁻) des Stammes B6/J-tg(Col2Cre)(Keap1-P) wurden mithilfe des monoklonalen

Antikörpers gegen VEGF angefärbt. Dabei handelte es sich um sieben acht Wochen alte männliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse, vier zwölf Wochen alte männliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse, sechs acht Wochen alte weibliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse und drei zwölf Wochen alte weibliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse. Bei den Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen wurden vier acht Wochen alte männliche, drei zwölf Wochen alte männliche, drei acht Wochen alte weibliche und zwei zwölf Wochen alte weibliche verwendet. Es wurde darauf geachtet, immer drei Objektträger pro Tier anzufärben.

Nach Etablierung der optimalen Konzentration des Primärantikörpers legte man eine Konzentration von 1:75 in 1,5 % *Bovine Serum Albumine* (BSA)/TRIS (pH = 7,6) fest. Neben den zu färbenden Schnitten enthielt die Färbereihe zusätzlich eine Negativkontrolle (BSA/TRIS-Blockierung ohne Primärantikörper) und eine Positivkontrolle (Schnitt einer Mausniere).

Am ersten Tag erfolgte zunächst die absteigende Alkoholreihe. Diese bestand aus der zweimaligen Einlage der Schnitte in Xylol für zehn Minuten und einem jeweils fünfminütigen Isopropanol- und 100 % Ethanol-Bad. Anschließend wurden die Schnitte 15 Minuten lang in ein dreiprozentiges Gemisch aus Wasserstoffperoxid (30 % H₂O₂) sowie Methanol und drei Mal in 0,1 % Triton X/TRIS (pH = 7,6) für je zehn Minuten gegeben. Der nächste Schritt der immunhistologischen (IHC) Färbung bestand aus der Einlage der Schnitte in aufgekochte Zitronensäure (pH = 6), die sich aus 2,1 g Zitronensäure-Pulver und einem Liter destillierten Wasser zusammensetzte. Dabei war es jedoch wichtig, die Zitronensäure zunächst für fünf bis sechs Minuten abkühlen zu lassen, da die enorme Hitze sonst zu Ablösungen und Rissen des Gewebes geführt hätte. Die mit Zitronensäure befüllte und die Schnitte enthaltene Küvette wurde danach für 30 Minuten bei 60° C in den Trockenschrank gelegt. Anschließend folgte eine Abkühlphase von 15 Minuten, das dreimalige Waschen der Schnitte in TRIS-Puffer (pH = 7,6) für je 10 Minuten und die Blockierung der Schnitte mittels 1,5 % BSA/TRIS für 15 Minuten. Für die Färbung wurden pro Schnitt 70 µl der VEGF-Antikörper/1,5 %-BSA/TRIS-Verdünnung (1:75) verwendet und über Nacht bei 4° C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Am zweiten Tag erfolgte als nächster Schritt das erneute Waschen drei Mal mit TRIS-Puffer für je zehn Minuten. Danach wurden auf jeden Schnitt 70 µl des sekundären Antikörpers (Dako Envision+ System-HRP, Labelled Polymer, Anti-Rabbit) gegeben und dieser nach 30-minütiger Wartezeit mit TRIS-Puffer

dreimalig zehn Minuten lang abgewaschen. Es folgte die Zugabe von Diaminobenzidin (DAB) als chromogenes Substrat für die Immunfärbung mit einer Wirkdauer von sechs Minuten und 30 Sekunden. Dabei war es wichtig, den Farbumschlag der Schnitte mithilfe des Lichtmikroskops kontinuierlich zu kontrollieren und bei Auftreten dieses Phänomens das Waschen mit destilliertem Wasser für fünf Minuten mit dreimaligem Wechsel einzuleiten. Nachdem die Hämalun-Gegenfärbung für drei Minuten durchgeführt und das Färbemittel kurz mit Leitungswasser abgewaschen wurde, erfolgte unter dem Abzug die aufsteigende Alkoholreihe, bestehend aus fünfminütigen Einlagen in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Ethanol. Zum Schluss wurden die Schnitte nochmals zwei Mal für fünf Minuten in Xylol gegeben und anschließend mit DePeX, wie die oben beschriebenen Deckgläschen-Färbungen, eingedeckelt.

2.7.2 Analyse der immunhistologischen Schnitte

Die Analyse der immunhistologisch gefärbten Schnitte wurde mithilfe zweier Mikroskope durchgeführt. Für die Übersichtsaufnahmen wurde das Keyence-Mikroskop mit 10X-Objektiv verwendet (Abb. 7), wohingegen für die detaillierten Aufnahmen der Gelenkflächen von Tibia und Femur sowie der Epiphysenfuge das Axiophot Axioplan Durchlicht-Mikroskop mit 10X- beziehungsweise 20X-Objektiv gewählt wurde.

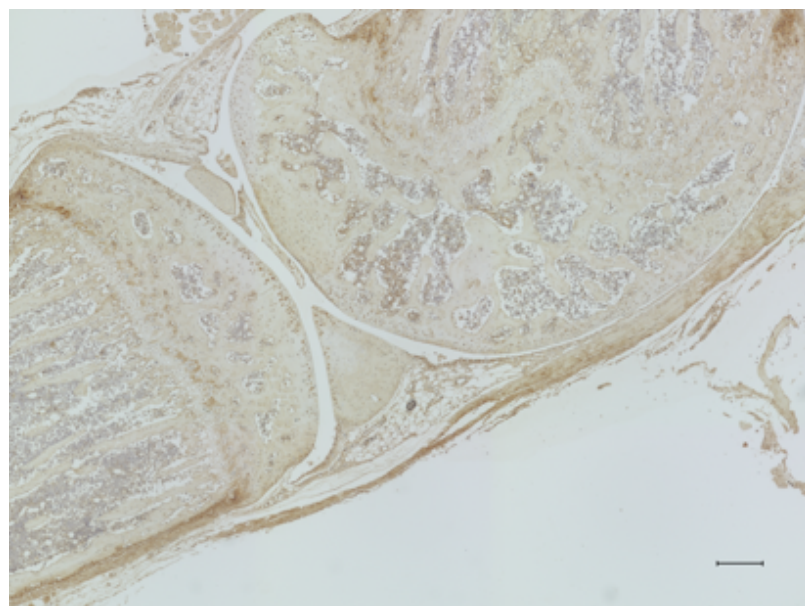


Abb. 7: Übersichtsaufnahme des Kniegelenks
Skalierung 200 μm

Die Auswertung der Bilder fand mithilfe des ImageJ-Programms statt. Dabei wurden die Gelenkflächen von Femur und Tibia zwischen den Mitten der Menisken eingeteilt (Abb. 8).

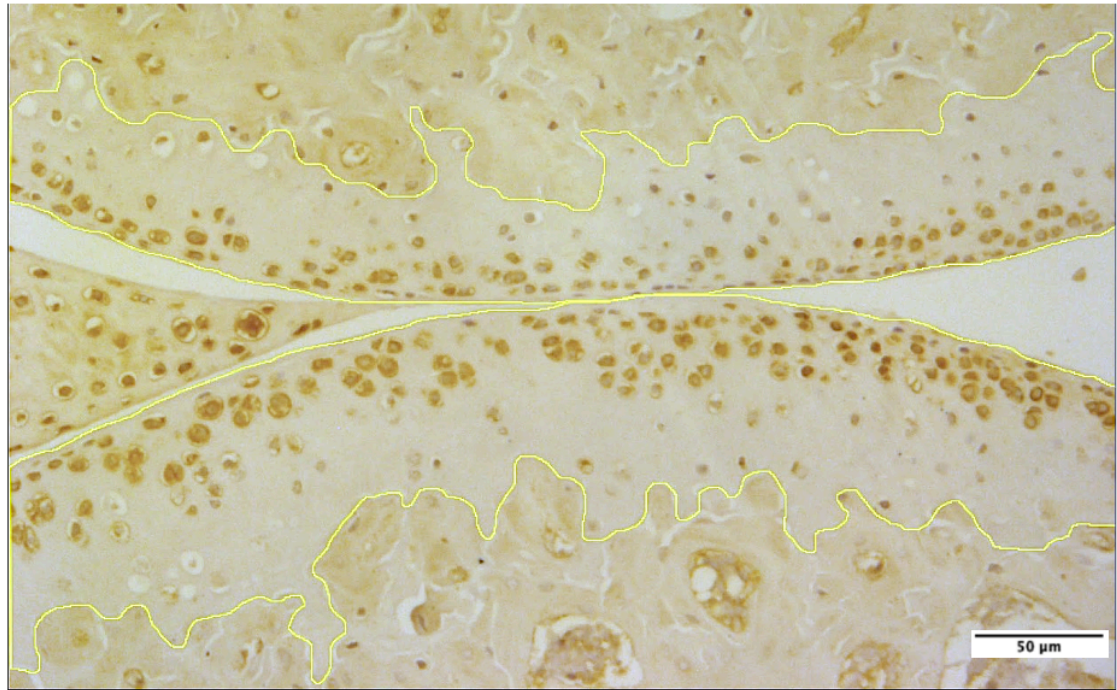


Abb. 8: Markierung und Einteilung beider Gelenkflächen

Ebenso erfolgte die Markierung der drei Zonen der Epiphysenfuge (Reservezone, Säulen-/Proliferationszone, hypertrophe Zone) auf einer Breite von 230 µm. Zur Festlegung der verschiedenen Zonen wurden Kriterien festgelegt. Um zwischen der Säulen-/Proliferationszone und der hypertrophen Zone unterscheiden zu können, wurden die Durchschnittszelldurchmesser der beiden Zonen berechnet und eine ungefähre Grenze festgelegt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Eigenschaften der unterschiedlichen Zonen der Epiphysenfuge

Reservezone	Säulen- /Proliferationszone	Hypertrophe Zone
Rundliche Knorpelzellen	Longitudinal in Säulen angeordnet	Blasenartiges Aussehen
Einzel oder in kleinen Gruppen liegend	Abgeflachte Chondrozyten	Breiter Hof und großes Zellvolumen
Interzellulärsubstanz überwiegt deutlich	Durchmesser < 5,2 µm	Dicht aneinander liegende Zellen
		Eher ungeordnet (keine Säulen)
		Durchmesser > 5,2 µm

Nach der Berechnung der jeweiligen Flächen wurde in den manuell eingezeichneten Flächen der Gelenkfläche und der Epiphysenfuge die Gesamtanzahl an Zellen sowie die Anzahl an positiven Zellen gezählt. Ebenso erfolgte die Ausrechnung der positiven Zellen und der Gesamtanzahl an Zellen pro Flächeneinheit von 1000 µm². Außerdem wurde der Anteil der positiven Zellen an der Gesamtanzahl an Zellen bestimmt (Abb. 9).

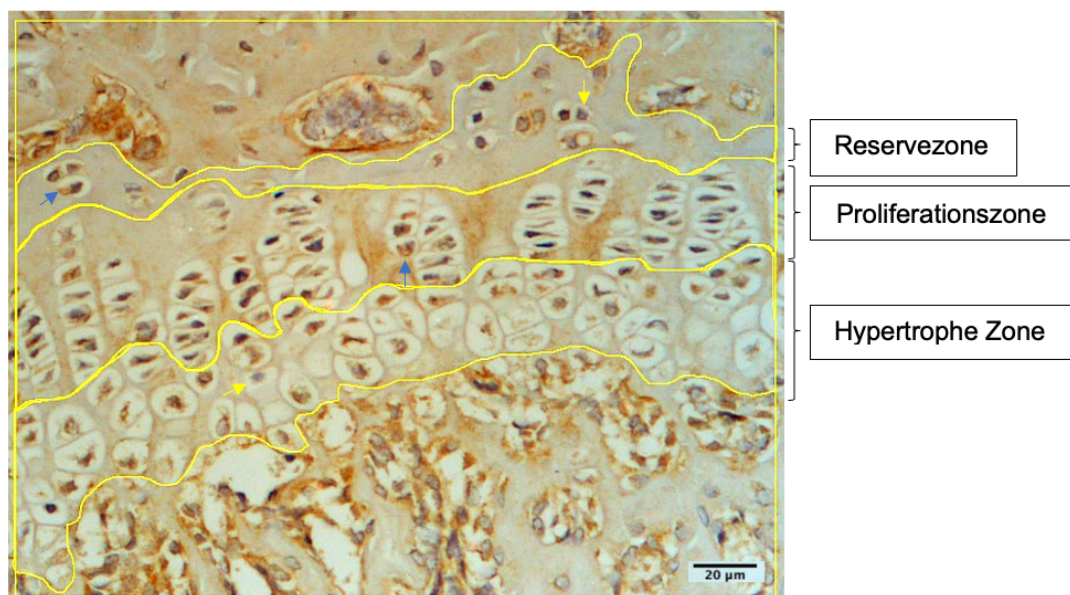


Abb. 9: Eingrenzung der drei verschiedenen Zonen der Epiphysenfuge

Blaue Pfeile markieren die VEGF-positiven und gelbe Pfeile die VEGF-negativen Zellen in der jeweiligen Zone der Epiphysenfuge

2.8 MRI-Untersuchung des Kniegelenks von Col2-Nrf2-Cre⁺- und - Cre⁻-Mäusen

Für die MRI-Untersuchung des Kniegelenks wurden Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäuse (Col2-Nrf2-Cre⁺) und Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁻::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäuse (Col2-Nrf2-Cre⁻) des Stammes B6/J-tg(Col2Cre)(Nrf2-P) verwendet. Die post mortem-MR-Experimente wurden freundlicherweise von Elena Rama vom Institut für Experimentelle Molekulare Bildgebung der RWTH Aachen University mit einem Bruker BioSpec 70/20 USR 7T-MRT-Scanner durchgeführt, der mit einer 1H-Sende-Empfangs-Volumenspule mit aktiver Verstimmung mit einem Innendurchmesser von 82 mm und einer Bohrungslänge von 112 mm sowie einer Single-Loop-Spule mit 2 mm Durchmesser für den Empfang des Signals ausgestattet war. Letztere wurde direkt auf dem Kniegelenk platziert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern und Suszeptibilitätsartefakte zu minimieren.

Die transversalen Relaxationszeiten (T2) wurden mit einer 2D-Multi-Slice-Multi-Echo-Spin-Echo-Sequenz (MSME) mit einem 90°-Anregungsimpuls, gefolgt von einer Serie gleichmäßig verteilter 180°-Refokussierungsimpulse, gemessen [Wiederholungszeit (TR) = 3000 ms; Echozeit (TE) = 10 ms; Echoabstand = 10 ms; Echobilder = 40; Anzahl der Mittelwerte = 10; Matrixgröße = 200 x 240; FOV = (20 x 20) mm²; Schichtdicke = 0,8 mm].

T2- und T2*-gewichtete Bilder wurden mit einer T2-gewichteten schnellen Spinechosequenz [TR= 2550 ms; TE= 40 ms; Echoabstand= 13 ms; Anzahl der Mittelwerte= 20; Beschleunigungsfaktor= 8; Matrixgröße= 360 x 360; FOV= (20 x 20) mm²; Schichtdicke= 0. 8 mm] und einer T2*-gewichteten schnellen Spinechosequenz [TR= 3000 ms; TE= 30 ms; Echoabstand= 10 ms; Anzahl der Mittelwerte= 20; Beschleunigungsfaktor= 8; Matrixgröße= 360 x 360; FOV= (20 x 20) mm²; Schichtdicke= 0,8 mm] erworben.

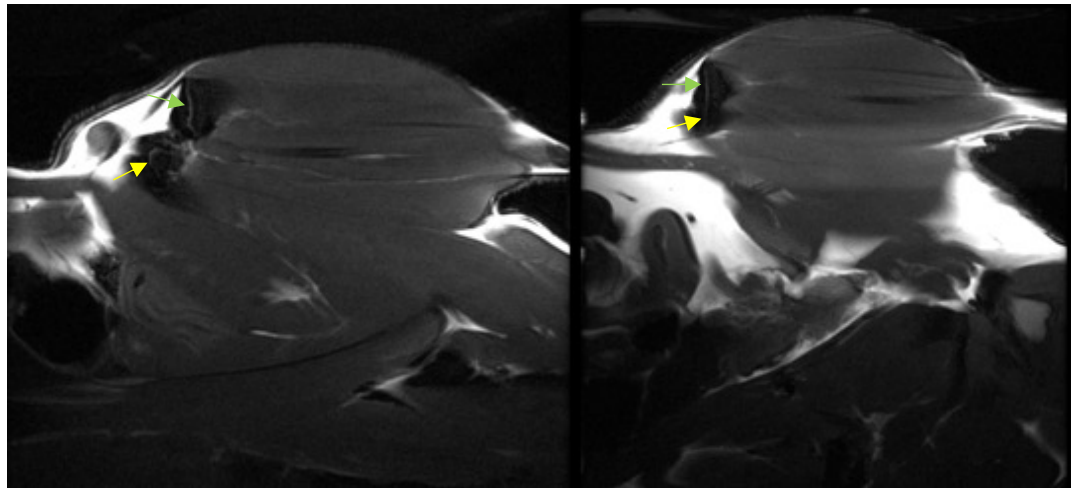


Abb. 10: MRI-Mäusebeinaufnahmen

Darstellung des Kniegelenks (links: Col2-Nrf2-Cre⁻; rechts: Col2-Nrf2-Cre⁺; grüne Pfeile markieren die tibiale Epiphysenfuge, gelbe die femorale)

Die Pfeile zeigen hierbei auf die Epiphysenfugen, die innerhalb der dichten dunklen Knochensubstanz gräulich hervorgehoben werden. Dabei weist der grüne Pfeil auf die Epiphysenfuge der Tibia und der gelbe Pfeil auf die des Femurs. Somit ist es möglich, mittels MRI die Auswirkungen einer Nrf2-Deletion auf Weichteile und Knorpelgewebe zu überprüfen (Abb. 10).

2.9 Femur-μCT-Untersuchung von Col2-Nrf2-Cre⁺- und -Cre⁻-Mäusen sowie Col2-Keap1-Cre⁺- und -Cre⁻-Mäusen

Als weitere Maßnahme zur Gegenüberstellung diente die Untersuchung der Femurlängen von vier Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (Col2-Nrf2-Cre⁺) und drei Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁻::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (Col2-Nrf2-Cre⁻) im Alter von 33 bis 35 Wochen mittels *in vivo*-μCT-Aufnahmen. Es wurden ebenso die Femurlängen von fünf Col2-Keap1-Cre⁻- und drei Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen im Alter von 35 Wochen verglichen.

Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Koletnik und Herrn Schumacher vom Institut für Molekulare Bildgebung aus der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. Kießling durchgeführt. Sie wendeten die Methode nach der Publikation von Schraven *et al.* aus dem Jahr 2022 an. (Schraven *et al.*, 2023). Die Durchführung der CT-Scans erfolgte mithilfe des U-CT-OI-Systems im „*accurate ultra focus*“-Scanmodus mit einer Röhrenspannung von 50 kV, einem Röhrenstrom von 0,21 mA und einer Scanzeit von fünf Minuten und 15 Sekunden.

Analysiert wurden die Bilder bei einer Voxelgröße von $0,02 \times 0,02 \times 0,02 \text{ mm}^3$. Die Rekonstruktion der CT-Scans fand mittels MILabs Auto Rec 1.6 bzw. MILabs FLT Recon 1.1.0.8 (basierend auf CT-Scans) statt. Zur beidseitigen Messung der Femurlängen wurden zwei klar definierte anatomische Strukturen ausgewählt. Als oberer Messpunkt diente der *Trochanter major* und als unterer der tiefste Anteil der *Facies patellaris femoris* (Abb. 11).

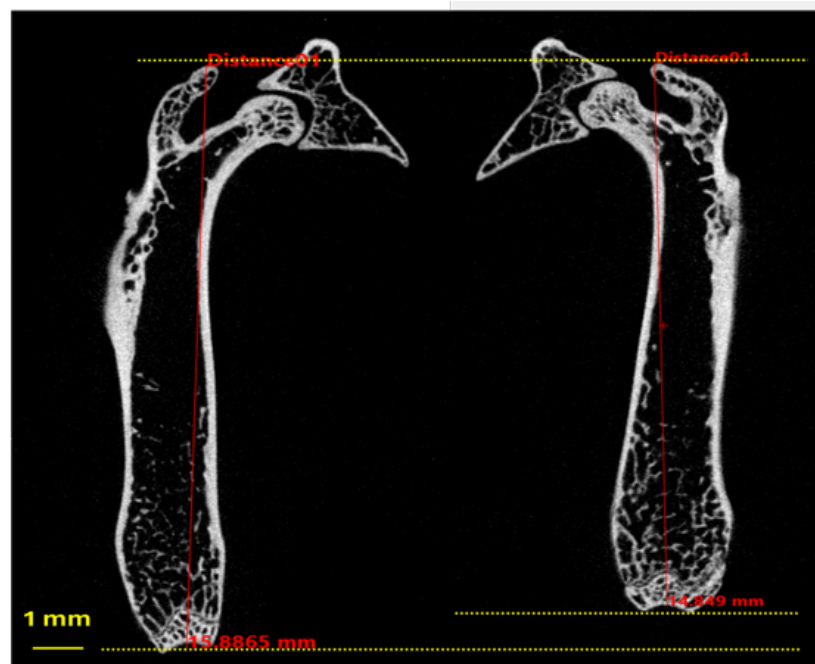


Abb. 11: μ CT-Aufnahme der Mäusefemora

Zweidimensionale Darstellung der dreidimensionalen μ CT-Aufnahme des Mäusefemurs mit Messung seiner Länge von *Trochanter Major* bis zum tiefsten Anteil der *Facies patellaris femoris* (links: Col2-Keap1-Cre⁻; rechts: Col2-Keap1-Cre⁺)

2.10 Statistische Methoden

Vor der statistischen Analyse wurden die Residuen mit dem Shapiro-Wilk-Normalitätstest auf Normalverteilung und bei einer statistischen 2-way-ANOVA mit dem Spearman-Test auf Heteroskedastizität geprüft. Bei Nichtbestehen eines dieser Tests wurden die Daten transformiert, um eine Normalverteilung der Werte zu gewährleisten und erneut mithilfe des statistischen Tests untersucht. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels T-Test (bei zwei Gruppen) oder zweifacher ANOVA (bei mehr als zwei Gruppen) ermittelt. Anschließend erfolgte Tukeys Mehrfachvergleichstest.

Alle statistischen Berechnungen und Datendarstellungen wurden mit GraphPad Prism, Version 9.2.0 für MacOS, durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ (*) festgelegt.

3 Ergebnisse²

3.1 Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen isoliert aus Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen

Um einen vergleichbaren Wert für die mögliche chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (abgekürzt: Col2-Nrf2-Cre⁺/KO) und Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁻::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (abgekürzt: Col2-Nrf2-Cre⁻/WT) zu generieren, wurde eine Alzianblau- und Safranin O-Färbung der Zellkulturen durchgeführt.

Mithilfe der erstellten Skalen (siehe Anhang) für die verschiedenen Intensitäten der Färbungen wurde geschaut, ob ein Knock-Out von Nrf2 in Kollagen Typ 2-exprimierenden Zellen Auswirkungen auf die Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) hat, die sich wiederum in der Farbintensität der Färbungen widerspiegeln.

3.1.1 Vergleich des sGAG-Gehalts in Kollagen Typ 2 exprimierenden Zellen von Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen nach 14- und 21-tägiger Differenzierung

Bei der Alzianblau-Färbung gingen positiv geladene Alzianblau-Moleküle zur Färbung sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG) elektrostatische Wechselwirkungen mit zum Beispiel negativ geladenen Sulfatgruppen ein. Hierbei wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der 14-tägigen sowie 21-tägigen Differenzierungsgruppe festgestellt. Somit führte die Differenzierung nach 14 und 21 Tagen zu einer erhöhten Expression von sGAG, was durch eine verstärkte Intensität von Alzianblau ermittelt wurde (WT DM 14 Tage: $p = 0,0003$; KO DM 14 Tage: $p < 0,0001$; WT DM 21 Tage: $p < 0,0001$; KO DM 21 Tage: $p < 0,0001$). (Abb. 12)

² Zur Vereinfachung wird in allen nachfolgenden Diagrammen dieser Promotion auf die Begriffe „KO“ für „Kollagen Typ 2-Nrf2/Keap1-Cre⁺“-Mäuse und „WT“ für „Kollagen Typ 2-Nrf2/Keap1-Cre⁻“-Mäuse zurückgegriffen.

Sowohl nach 14-tägiger als auch nach 21-tägiger Differenzierung wiesen die Färbungen der isolierten Zellen aus Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen keine signifikanten Abweichungen in ihrer Intensität und damit keine Unterschiede im sGAG-Gehalt auf (14 Tage: $p = 0,9660$; 21 Tage: $p = 0,9659$) (Abb. 12).

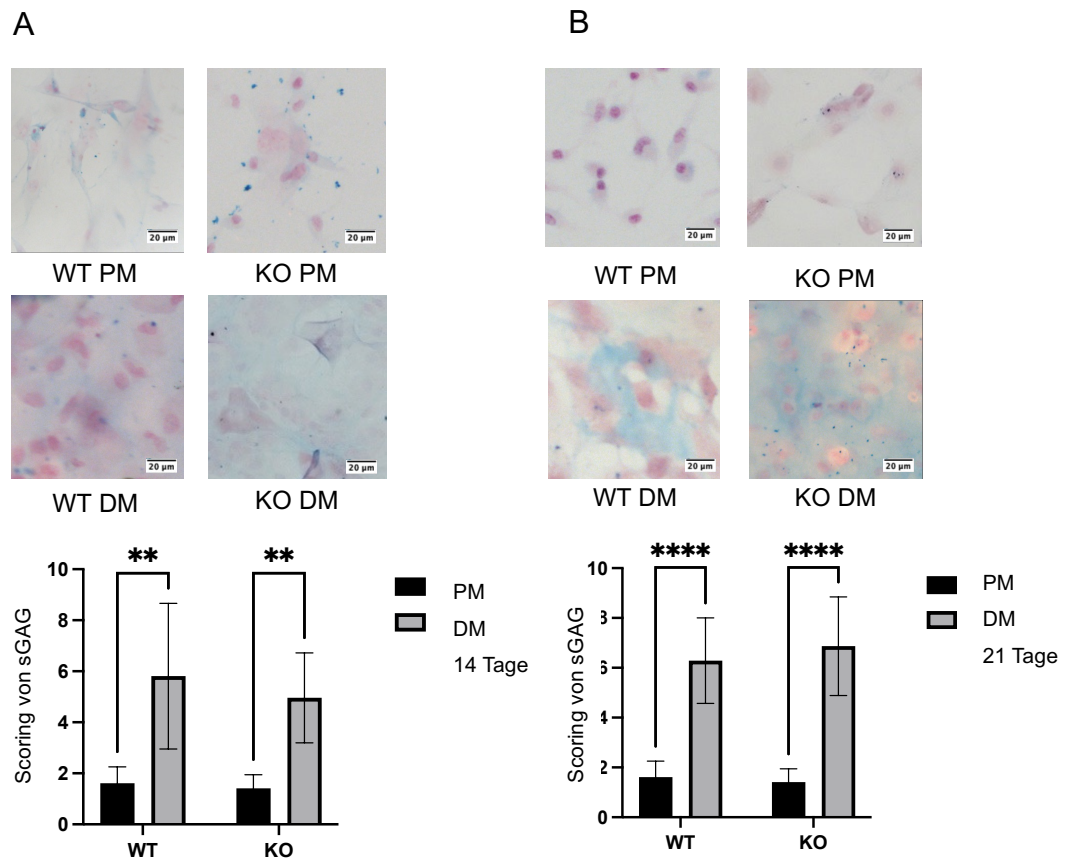


Abb. 12: Vergleich des sGAG-Gehalts anhand der Alcianblau-Intensitäten der Kontrollgruppe, der 14-tägigen und der 21-tägigen Differenzierung

„WT“, „PM“: $n = 6$; „KO“, „PM“: $n = 8$; „WT“, „DM“ 14 Tage: $n = 7$; „KO“, „DM“ 14 Tage: $n = 8$; „WT“, „DM“ 21 Tage: $n = 7$; „KO“, „DM“ 21 Tage: $n = 5$; 2-way ANOVA; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$, Mittelwerte $\pm$ SEM, „PM“ = Proliferationsmedium (Kontrollgruppe), „DM“ = Differenzierungsmedium; A: 14-tägige Differenzierung; B: 21-tägige Differenzierung

3.1.2 Vergleich des Proteoglykan-Gehalts in Kollagen Typ 2 exprimierenden Zellen isoliert aus Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen nach 14- und 21-tägiger Differenzierung

Es erfolgte eine Safranin O-Färbung der Zellkulturen mit anschließender Extraktion. Safranin O diente hierbei als Standardmittel zur Färbung von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen in Knorpelgewebe. Als kationischer Farbstoff ging Safranin O elektrostatische Wechselwirkungen mit diesen ECM-spezifischen Markern aufgrund ihrer sauren Polysaccharide ein.

3.1.2.1 Vergleich des Proteoglykan-Gehalts durch Safranin O-Färbung und Intensitätsskalierung

Sowohl bei 14- als auch bei 21-tägiger Differenzierung konnte eine signifikante Veränderung der Safranin O-Färbungsintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe (nur Proliferationsmedium) erkannt werden, der eine erhöhte Expression von Proteoglykanen zu Grunde lag ($p < 0,0001$) (Abb. 13).

Der Vergleich der Safranin O-Färbungen der Zellkulturen Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse zeigte nach 14- und 21-tägiger Differenzierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Proteoglykan-Gehalts (14 Tage: $p = 0,9999$; 21 Tage: $p = 0,9816$), was anhand der ähnlichen Färbungsintensitäten zu erkennen war (Abb. 13).

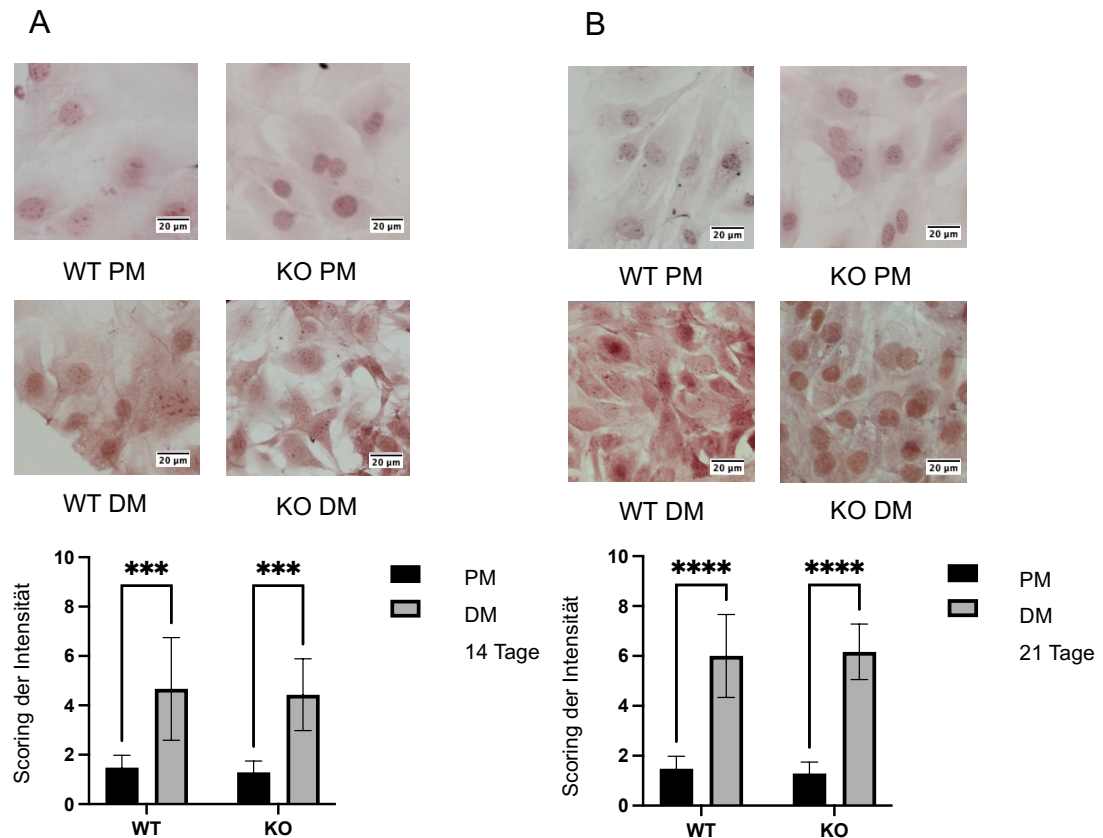


Abb. 13: Vergleich des Gehalts an Proteoglykanen anhand der Safranin O-Intensitäten der Kontrollgruppe, der 14-tägigen und der 21-tägigen Differenzierung

„WT“, „PM“: n = 7; „KO“, „PM“: n = 8; „WT“, „DM“ 14 Tage: n = 8; „KO“, „DM“ 14 Tage: n = 10; „WT“, „DM“ 21 Tage: n = 9; „KO“, „DM“ 21 Tage: n = 8; 2-way ANOVA; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$, Mittelwerte $\pm$ SEM, „PM“ = Proliferationsmedium (Kontrollgruppe), „DM“ = Differenzierungsmedium; A: 14-tägige Differenzierung; B: 21-tägige Differenzierung

3.1.2.2 Vergleich des Proteoglykan-Gehalts durch colorimetrische Analyse nach Safranin O-Färbung

Zur semi-quantitativen Analyse wurde die colorimetrische Messung nach erfolgter Safranin O-Färbung und -Extraktion durchgeführt. Sowohl nach 14-tägiger als auch nach 21-tägiger Differenzierung fiel für die Zellkulturen der Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Differenzierungsmedium eine intensivere Färbung und damit ein höherer Gehalt auf ($p < 0,0001$). Bei den differenzierten Zellen, isoliert aus Col2-Nrf2-Cre⁻-Mäusen, ergab die statistische Auswertung der Daten lediglich für die 21-tägige Differenzierung einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$) und daraus folgend einen höheren Gehalt an Proteoglykanen.

Dieser konnte für die 14-tägige Differenzierung nicht festgestellt werden (Abb. 14).

Nach 14-tägiger Differenzierung zeigten sich durchschnittliche Absorptionswerte von $0,3351 \pm 0,090$ in der Col2-Nrf2-Cre⁻-Kontrollgruppe (nur Proliferationsmedium) und $0,2208 \pm 0,029$ in der Col2-Nrf2-Cre⁺-Kontrollgruppe (nur Proliferationsmedium). Dem gegenübergestellt wies die Col2-Nrf2-Cre⁻-Differenzierungsgruppe einen durchschnittlichen Wert von $0,5068 \pm 0,045$ und die Col2-Nrf2-Cre⁺-Differenzierungsgruppe von $1,092 \pm 0,087$ auf. Die statistische Auswertung der Daten ergab signifikant höhere Absorptionswerte in der Col2-Nrf2-Cre⁺-Gruppe im Vergleich zu der Col2-Nrf2-Cre⁻-Gruppe und damit einen größeren Gehalt an Proteoglykanen ($p < 0,0001$) (Abb. 14).

Die 21-tägige Differenzierung ergab nach Messung durchschnittliche Absorptionswerte von $0,3087 \pm 0,017$ in der Col2-Nrf2-Cre⁻-Kontrollgruppe und $0,1681 \pm 0,012$ in der Col2-Nrf2-Cre⁺-Kontrollgruppe. Die Col2-Nrf2-Cre⁻-Differenzierungsgruppe wies einen durchschnittlichen Wert von $0,8401 \pm 0,042$ und die Col2-Nrf2-Cre⁺-Differenzierungsgruppe von $1,656 \pm 0,071$ auf. Es konnte ein signifikant höherer Gehalt an Proteoglykanen in der differenzierten Col2-Nrf2-Cre⁺-Gruppe im Vergleich zur Col2-Nrf2-Cre⁻-Gruppe nachgewiesen werden ($p < 0,0001$) (Abb. 14).

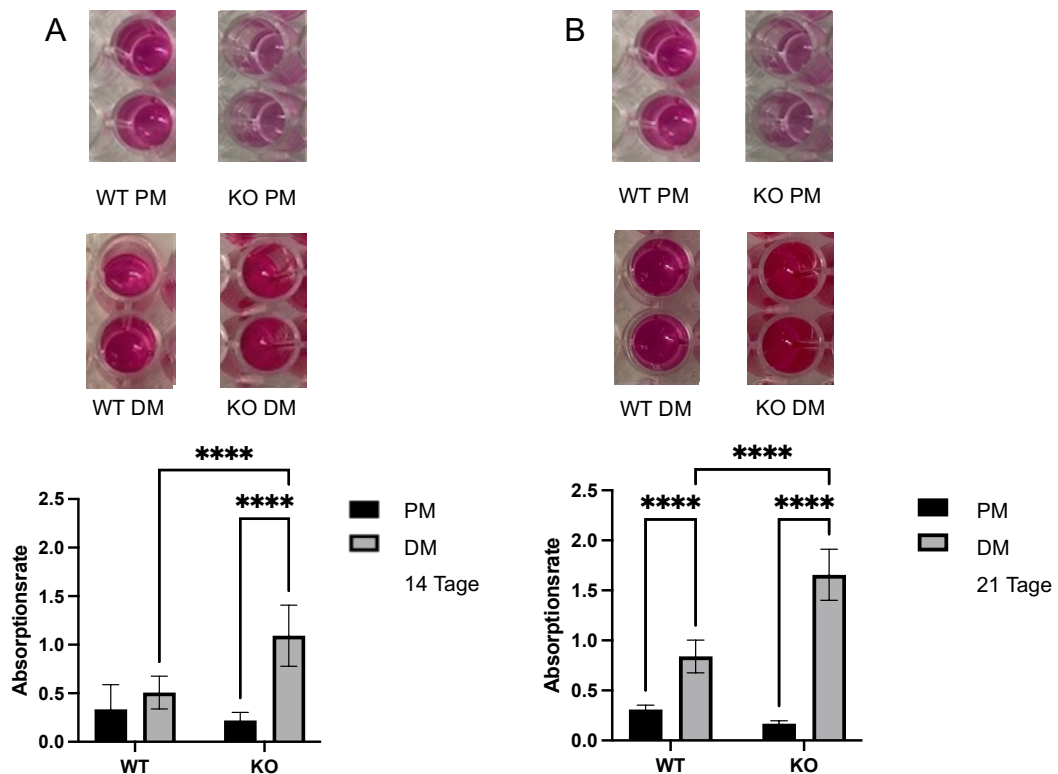


Abb. 14: Vergleich der Absorptionsraten der Kontrollgruppe, der 14-tägigen und 21-tägigen Differenzierung

A: „WT“, „PM“: n = 8; „KO“, „PM“: n = 8; „WT“, „DM“: n = 14; „KO“, „DM“: n = 13; 2-way-ANOVA; **** = p < 0,0001; Mittelwerte ± SEM

B: „WT“, „PM“: n = 7; „KO“, „PM“: n = 6; „WT“, „DM“: n = 15; „KO“, „DM“: n = 13; 2-way-ANOVA; **** = p < 0,0001, Mittelwerte ± SEM; „PM“ = Proliferationsmedium (Kontrollgruppe), „DM“ = Differenzierungsmedium; A: 14-tägige Differenzierung; B: 21-tägige Differenzierung

3.2 Phänotypveränderung der Col2-Nrf2-Cre⁻ und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse und der Col2-Keap1-Cre⁻ und -Cre⁺-Mäuse

3.2.1 Körpergewicht sowie Körperlänge und Länge der Vertebrae caudales

Der Vergleich der Körpergewichte von neun bis zehn Wochen alten Col2Cre⁻::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (Col2-Nrf2-Cre⁻/WT) und Col2Cre⁺::Nrf2^{loxp/loxp}-Mäusen (Col2-Nrf2-Cre⁺/KO) ergab keinen signifikanten Unterschied (p = 0,6223). Das durchschnittliche Körpergewicht der Col2-Nrf2-Cre⁻-Mäuse betrug 28 g ± 1,080, von Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen 27,15 g ± 1,138 (Abb. 15).

Die Körperlänge der neun bis zehn Wochen alten Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse unterschied sich ebenso nicht signifikant ($p = 0,094$). Die Durchschnittswerte betrugen $9,475 \text{ cm} \pm 0,063$ (Col2-Nrf2-Cre⁻) und $9,083 \text{ cm} \pm 0,160$ (Col2-Nrf2-Cre⁺) (Abb. 15).

Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse wiesen mit Durchschnittswerten von $7,2 \text{ cm} \pm 0,082$ eine signifikant geringere Länge der Vertebrae caudales auf als Col2-Nrf2-Cre⁻-Mäuse mit Werten von $7,9 \text{ cm} \pm 0,147$ ($p = 0,0019$) (Abb. 15).

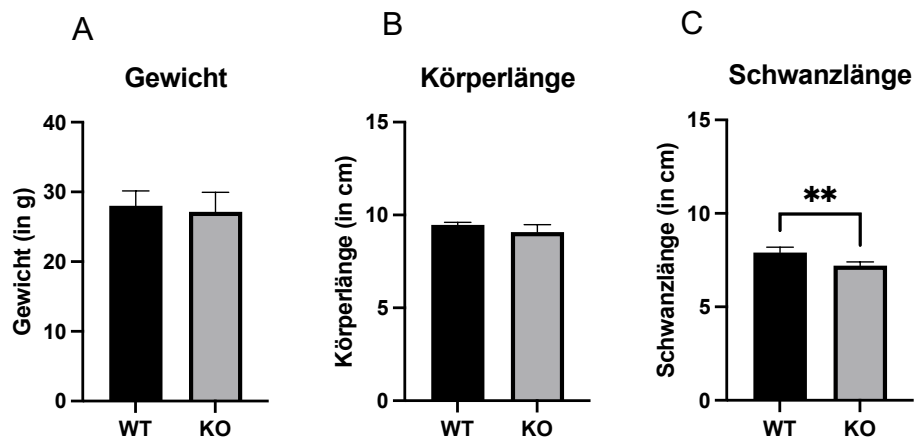


Abb. 15: Vergleich des Gewichts (A), der Körperlänge (B) und Länge der Vertebrae caudales (C) von Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen

Betrachtung neun bis zehn Wochen alter Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse (Col2-Nrf2-Cre⁻/WT: $n = 4$; Col2-Nrf2-Cre⁺/KO: $n = 6$; die Geschlechter wurden gemischt; unpaired t-test, ** = $p < 0,01$; Mittelwerte $\pm$ SEM)

3.2.2 Unterschiede der Femurlängen von Col2-Nrf2-Cre⁻- und -Cre⁺-Mäusen und Col2-Keap1-Cre⁻- und -Cre⁺-Mäusen

Die geschlechterunabhängige Analyse der mithilfe des μ CTs gemessenen Femurlängen ergab für die Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁻::Nrf2^{lox/lox}-Mäuse (Col2-Nrf2-Cre⁻/WT) im Alter von 33 bis 35 Wochen eine durchschnittliche Länge von $15,49 \text{ mm} \pm 0,157$, wohingegen die Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Nrf2^{lox/lox}-Mäuse (Col2-Nrf2-Cre⁺/KO) eine mittlere Länge von $14,43 \text{ mm} \pm 0,112$ aufwiesen. Beim Vergleich der Genotypen fiel eine signifikant geringere Femurlänge bei den Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen auf ($p < 0,01$) (Abb. 16).

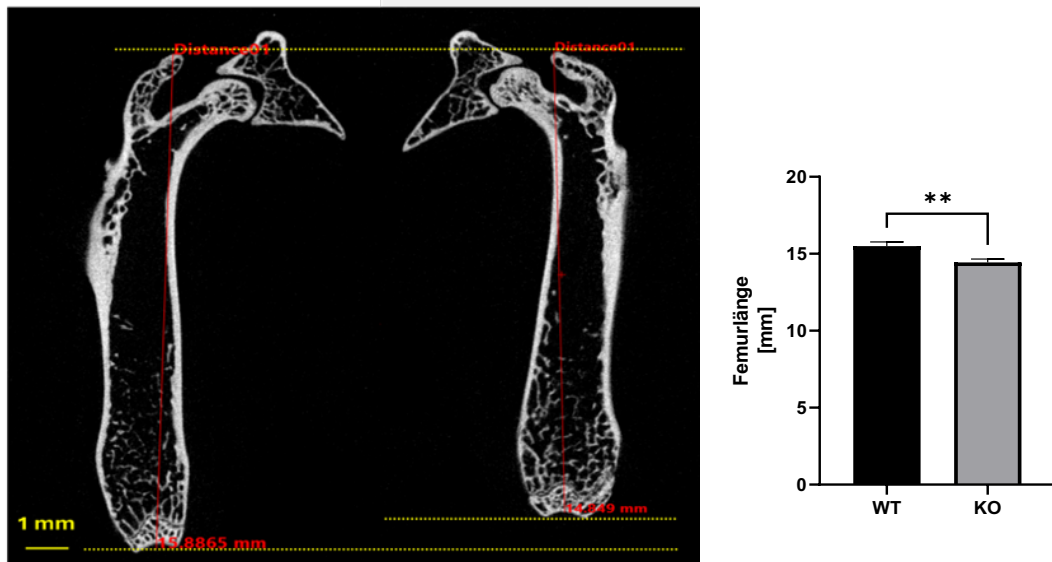


Abb. 16: Vergleich der mittels μ CT gemessenen Femurlängen von Col2-Nrf2-Cre^{-/-} und Col2-Nrf2-Cre^{+/+}-Mäusen

Zweidimensionale Darstellung der dreidimensionalen μ CT-Aufnahme des Mäusefemurs mit Messung seiner Länge von *Trochanter Major* bis zum tiefsten Anteil der *Facies patellaris femoris* (links: Col2-Nrf2-Cre^{-/-}; rechts: Col2-Nrf2-Cre^{+/+})

Betrachtung 33-35 Wochen alter Col2-Nrf2-Cre^{-/-} und Col2-Nrf2-Cre^{+/+}-Mäuse (Col2-Nrf2-Cre^{-/-}/WT: n = 3; Col2-Nrf2-Cre^{+/+}/KO; n = 4; die Geschlechter wurden gemischt; unpaired t test; ** = p < 0,01), Mittelwerte $\pm$ SEM

Bei 35 Wochen alten Col2-Keap1-Cre^{+/+}-Mäusen wurde im Vergleich zu Cre^{-/-}-Mäusen auch eine geringere Femurlänge festgestellt. Diese betrug bei den Cre^{-/-}-Mäusen gemittelt 15,89 mm (Mittelwerte $\pm$ SEM) und bei den Cre^{+/+}-Mäusen mit 14,85 mm (Mittelwerte $\pm$ SEM) ungefähr einen Millimeter weniger (Abb. 17).

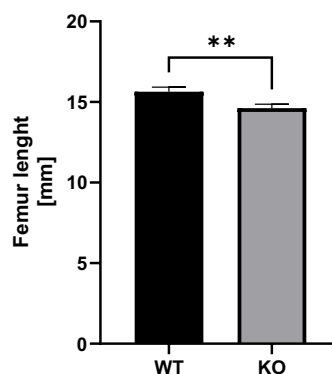


Abb. 17: Vergleich der Femurlängen von Col2-Keap1-Cre^{-/-} und Col2-Keap1-Cre^{+/+}-Mäusen

Betrachtung 35 Wochen alter Col2-Keap1-Cre^{-/-} und Col2-Keap1-Cre^{+/+}-Mäuse (Col2-Keap1-Cre^{-/-}: n = 5; Col2-Keap1-Cre^{+/+}; n = 3; die Geschlechter wurden gemischt; unpaired t test; ** = p < 0,01), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3 VEGF-Proteinexpression und Flächengröße in knorpeligen Gelenkarealen von Col2-Keap1-Cre⁺- und -Cre⁻-Mäusen

Die Untersuchung der VEGF-Proteinexpression wurde mithilfe einer immunhistologischen Färbung histologischer Sagittal-Schnitte des Kniegelenks von verschiedenen Genotypen ermöglicht. Anschließend erfolgte die Analyse der VEGF-Expression in diversen Arealen wie der femoralen und tibialen chondralen Gelenkfläche und der Epiphysenfuge der proximalen Tibia mit ihren drei verschiedenen Zonen in Serienschnitten.

Zudem wurde anhand der immunhistologischen Abbildungen und des ImageJ-Analyseprogramms die Fläche in verschiedenen Knorpelarealen ermittelt. Hierbei wurde die jeweilige Fläche manuell eingezeichnet, deren Größe mithilfe des ImageJ-Programms berechnet und für eine untersuchte Maus der Mittelwert mehrerer Schnitte angegeben.

Es wurden acht und zwölf Wochen alte Col2Cre⁻::Keap1^{loxp/loxp}- (Col2-Keap1-Cre⁻/WT) und Col2Cre⁺::Keap1^{loxp/loxp}-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁺/KO) verwendet. Zur vereinfachten Lesbarkeit der Gegenüberstellungen der statistischen Daten werden in Klammern die Abkürzungen Cre⁺ (für Col2-Keap1-Cre⁺), Cre⁻ (für Col2-Keap1-Cre⁻), m (für männlich) und w (für weiblich) benutzt.

3.3.1 Analyse der Gelenkfläche und der VEGF-Proteinexpression innerhalb des distalen Femurkondylus

Bei den Sagittalebenechnitten im Bereich des distalen Femurkondylus wurde die Fläche der knorpeligen Gelenkareale sowie die dortige VEGF-Expression gemessen. Als Variablen der VEGF-Expression galten die Anzahl der VEGF-positiven Zellen, dessen Anteil an der Gesamtanzahl und die Anzahl pro 1000 µm² knorpelige Fläche.

3.3.1.1 Vergleich der Gelenkfläche des distalen Femurkondylus von Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Sowohl zwischen acht Wochen alten männlichen als auch zwischen weiblichen Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen wurde kein signifikanter

Unterschied in der Größe der Gelenkfläche des distalen Femurkondylus festgestellt (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p > 0,999$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,5204$). Ebenso ergab der Vergleich innerhalb einer Genotyp-Gruppe zwischen männlichen und weiblichen Mäusen keine signifikanten Abweichungen hinsichtlich der Gelenkflächengröße (Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,8822$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,87$) (Abb. 18).

Die Femurgelenkflächen von zwölf Wochen alten männlichen und weiblichen Col2-Keap1- Cre^+ -Mäusen unterschieden sich nicht deutlich von denen der Col2-Keap1- Cre^- -Mäuse (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,6895$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p > 0,999$). Innerhalb der Col2-Keap1- Cre^- - sowie Col2-Keap1- Cre^+ -Gruppe konnten zudem keine Unterschiede in der Gegenüberstellung von männlichen und weiblichen Mäusen dargelegt werden (Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,6125$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p > 0,9999$) (Abb. 18).

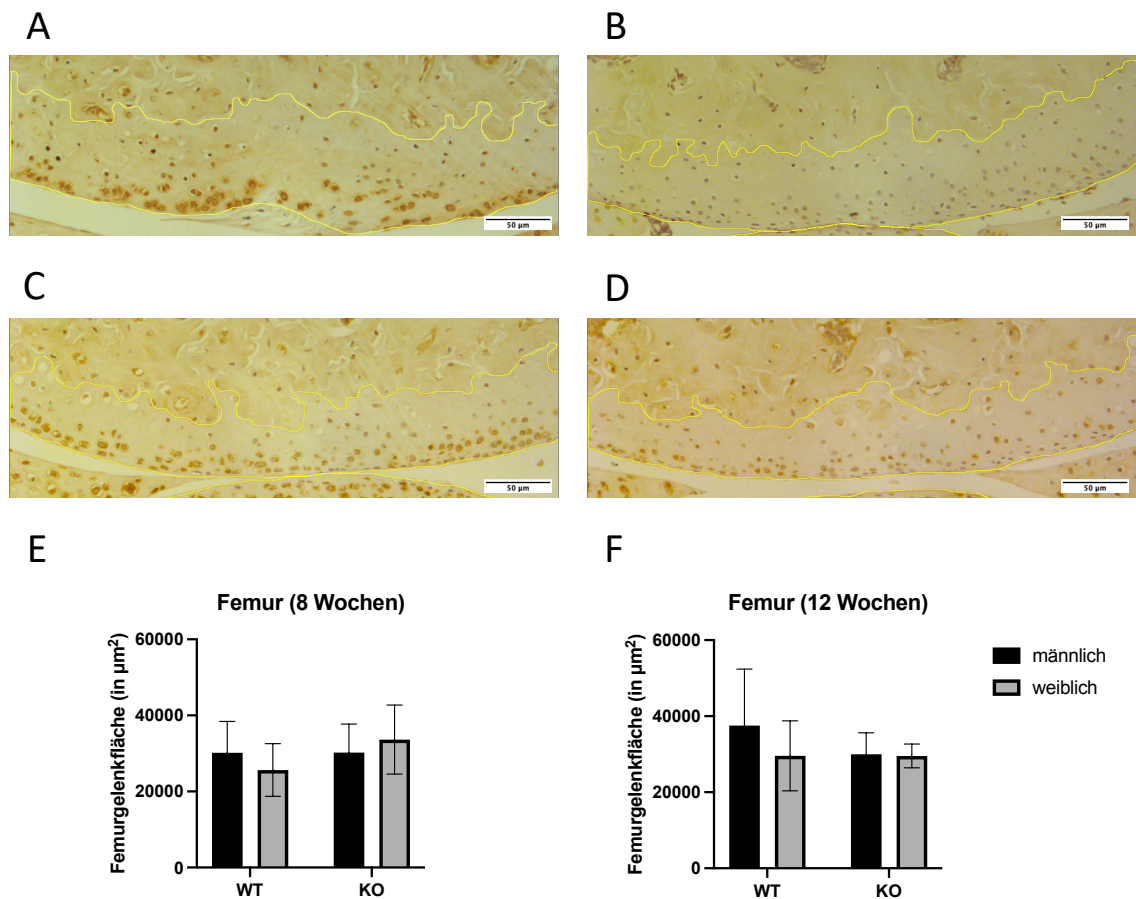


Abb. 18: Femorale Gelenkfläche

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten femoralen Gelenkflächen der gegen VEGF gefärbten Knie-Gewebeschnitte in der Sagittalen (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.1.2 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre⁻ und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Zusätzlich zu der Größe der Gelenkfläche wurden die gesamte Zellzahl und die Anzahl VEGF-positiver Zellen innerhalb dieser abgegrenzten Fläche des Femurs quantifiziert.

Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl VEGF-positiver Zellen zwischen sowohl männlichen als auch weiblichen acht Wochen alten Col2-

Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,7998; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9787) sowie innerhalb der beiden Geschlechtergruppen (Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,982; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p > 0,9999) erkannt werden. Es konnten auch keine Unterschiede in der Anzahl der positiven Zellen bei zwölf Wochen alten Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen beobachtet werden (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,5056; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9905; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,2023; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9938) (Abb. 19).

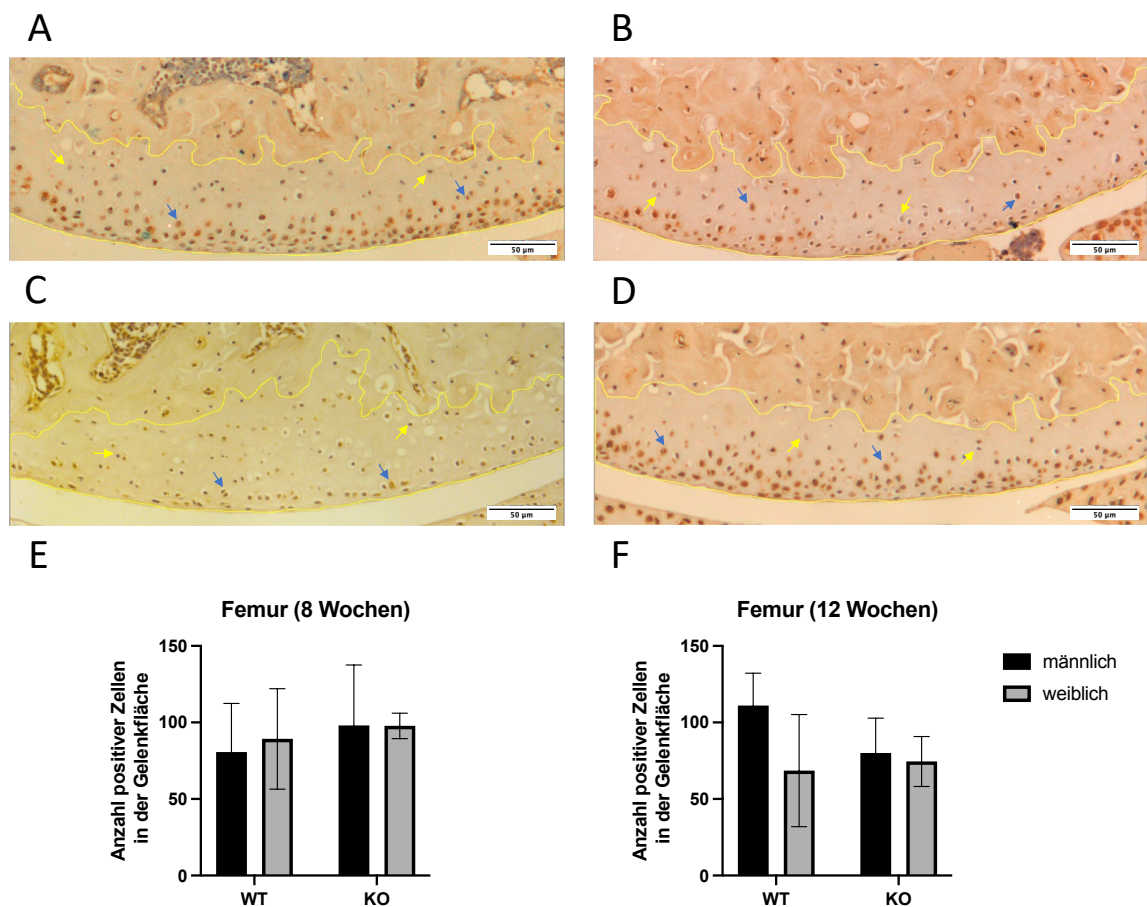


Abb. 19: Eingezeichnete femorale Gelenkfläche mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten femoralen Gelenkflächen der gegen VEGF gefärbten Knie-Gewebeschnitte in der Sagittalen (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt; blaue Pfeile markieren die VEGF-positiven Zellen, gelbe die VEGF-negativen)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte ± SEM

Im eingezeichneten Bereich des Femurs wurde bei acht Wochen alten männlichen sowie weiblichen Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen die ähnliche Gesamtanzahl an Zellen beobachtet (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,7526; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,7748; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9930) (Abb. 20).

Einen Unterschied in der Anzahl an den gesamten Zellen gab es zudem nicht bei den zwölf Wochen alten Mäusen innerhalb der Genotyp- und Geschlechtergruppen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,62; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,6364; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,2874; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9278) (Abb. 20).

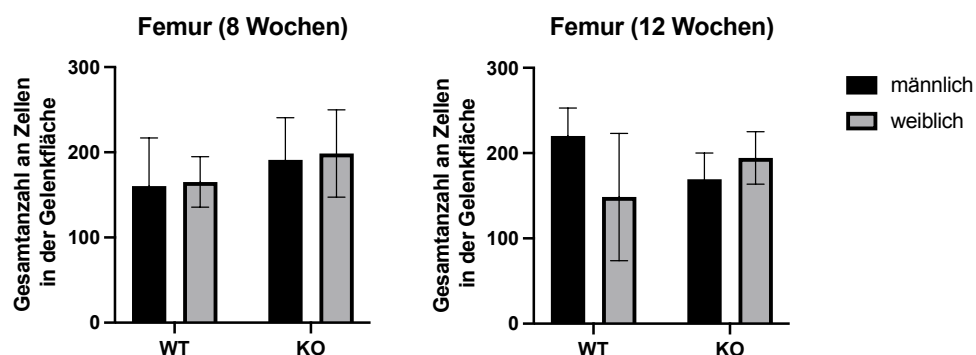


Abb. 20: Gesamtanzahl an Zellen in der femoralen Gelenkfläche

Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.1.3 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl pro Fläche in der femoralen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Bei Betrachtung der Anzahl positiver Zellen pro Flächeneinheit der femoralen Gelenkfläche (hier 1000 μm^2) wurde bei acht Wochen alten Mäusen eine gleiche Anzahl innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen quantifiziert (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,7003; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9425; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,7424; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9467) (Abb. 21).

Auch bei einem Alter von zwölf Wochen war keine wesentliche Differenz zu erkennen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,955$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9994$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,764$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9911$) (Abb. 21).

Acht Wochen alte Mäuse wiesen bezüglich der Gesamtanzahl an Zellen pro $1000 \mu\text{m}^2$ Flächeneinheit der Femurgelenkfläche keine Unterschiede innerhalb der jeweiligen Col2-Keap1-Cre^+ - und Col2-Keap1-Cre^- -Gruppe sowie des gleichen Geschlechts auf (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,4854$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9295$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,5943$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9090$) (Abb. 21).

Außerdem ergab der Vergleich der Gesamtanzahl an Zellen pro Flächeneinheit zwölf Wochen alter Mäuse keine signifikanten Unterschiede (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9993$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9978$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,8716$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9754$) (Abb. 21).

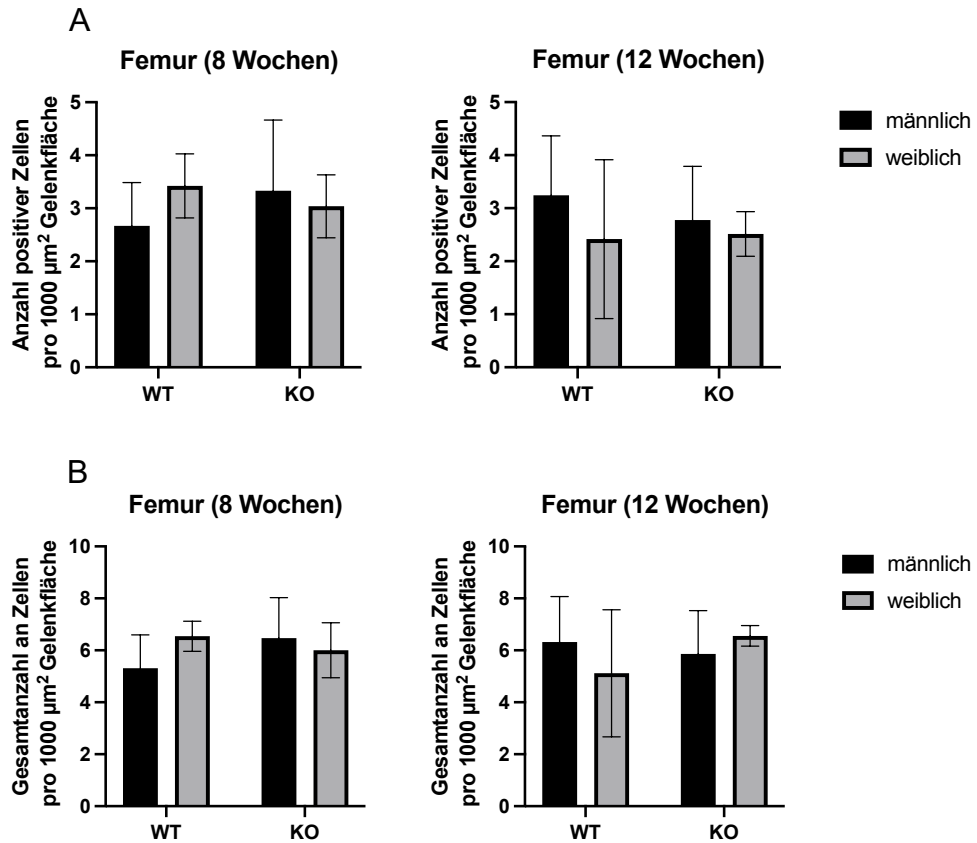


Abb. 21: Anzahl VEGF-positiver Zellen (A) und Gesamtanzahl (B) pro 1000 μm^2 femorale Gelenkfläche

A und B: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.1.4 Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Die Gegenüberstellung des Anteils der positiven Zellen an der Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche ergab keine signifikanten Unterschiede bei den acht Wochen alten Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9996; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9966; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9905; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9940) (Abb. 22).

Auch die zwölf Wochen alten Mäuse wiesen keine Differenzen im Prozentsatz der positiven Zellen auf (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9653; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,7457; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9443; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,7617) (Abb. 22).

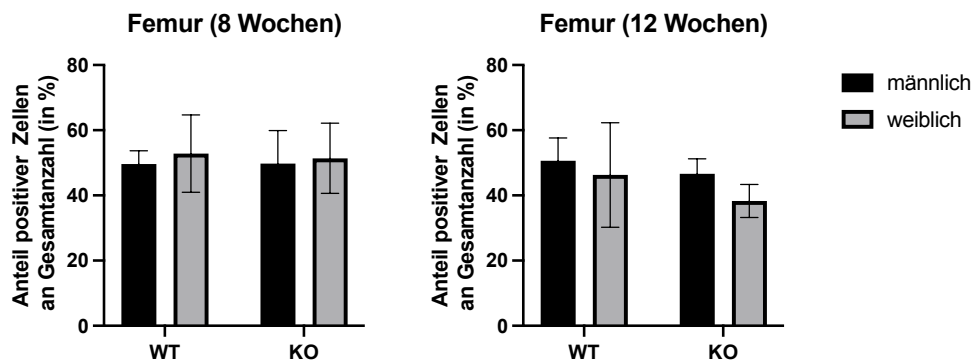


Abb. 22: Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der femoralen Gelenkfläche

Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.2 Analyse der Gelenkfläche und der VEGF-Proteinexpression innerhalb des proximalen Tibiaplateaus

Bei den Sagittalebenechnitten im Bereich des proximalen Tibiaplateaus wurde die Fläche der knorpeligen Gelenkareale sowie die dortige VEGF-Expression gemessen. Als Variablen der VEGF-Expression galten die Anzahl der VEGF-positiven Zellen, dessen Anteil an der Gesamtanzahl und die Anzahl pro 1000 μm^2 knorpelige Fläche.

3.3.2.1 Vergleich Gelenkfläche des proximalen Tibiakondylus von Col2-Keap1-Cre⁻ und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Bei der Gelenkfläche der Tibia beobachtete man ähnliche Ergebnisse wie beim Femur. Zwischen den acht Wochen alten Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen, sowohl männlich als auch weiblich (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9985; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,5848), konnte kein Unterschied festgestellt werden. Der Vergleich innerhalb dieser Geschlechter-Gruppen zwischen männlichen und weiblichen Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,923; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9313) ergab ebenso keinen Unterschied (Abb. 23).

Bei dem Vergleich innerhalb der Genotyp- und Geschlechtergruppen der vier Wochen älteren Mäuse war dies ebenso der Fall. (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,5299;

Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9996; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,721; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9563) (Abb. 23).

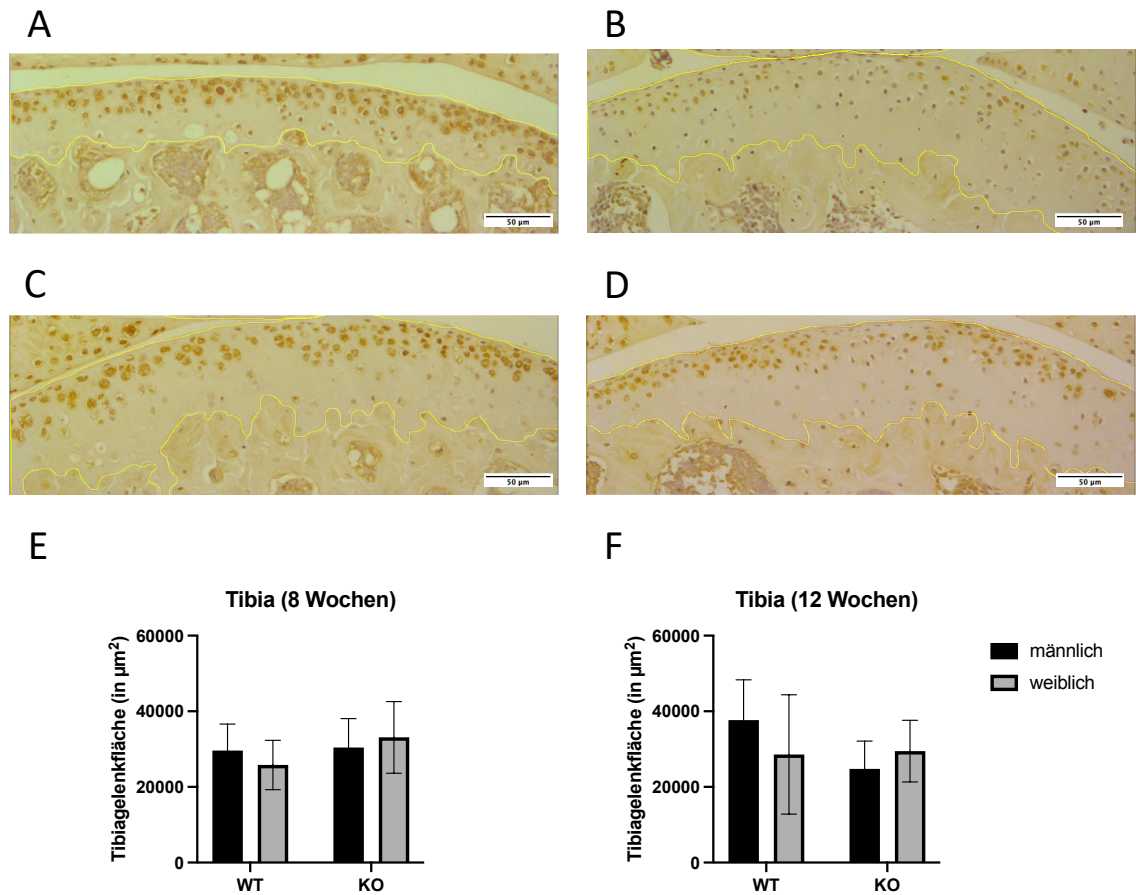


Abb. 23: Tibiale Gelenkfläche

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten tibialen Gelenkflächen der gegen VEGF gefärbten Knie-Gewebeschnitte in der Sagittalen (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte ± SEM

3.3.2.2 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl in der tibialen Gelenkfläche von Col2-Nrf2-Cre⁻- und Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen

Im Alter von acht Wochen war sowohl zwischen Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9269$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,826$) als auch zwischen männlichen und weiblichen Mäusen einer Gruppe (Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,3445$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $0,9348$) kein Unterschied in der Anzahl VEGF-positiver Zellen zu erkennen (Abb. 24).

Dies war ebenso bei zwölf Wochen alten Mäusen der Fall (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,8538$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,9696$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,7913$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,9642$) (Abb. 24).

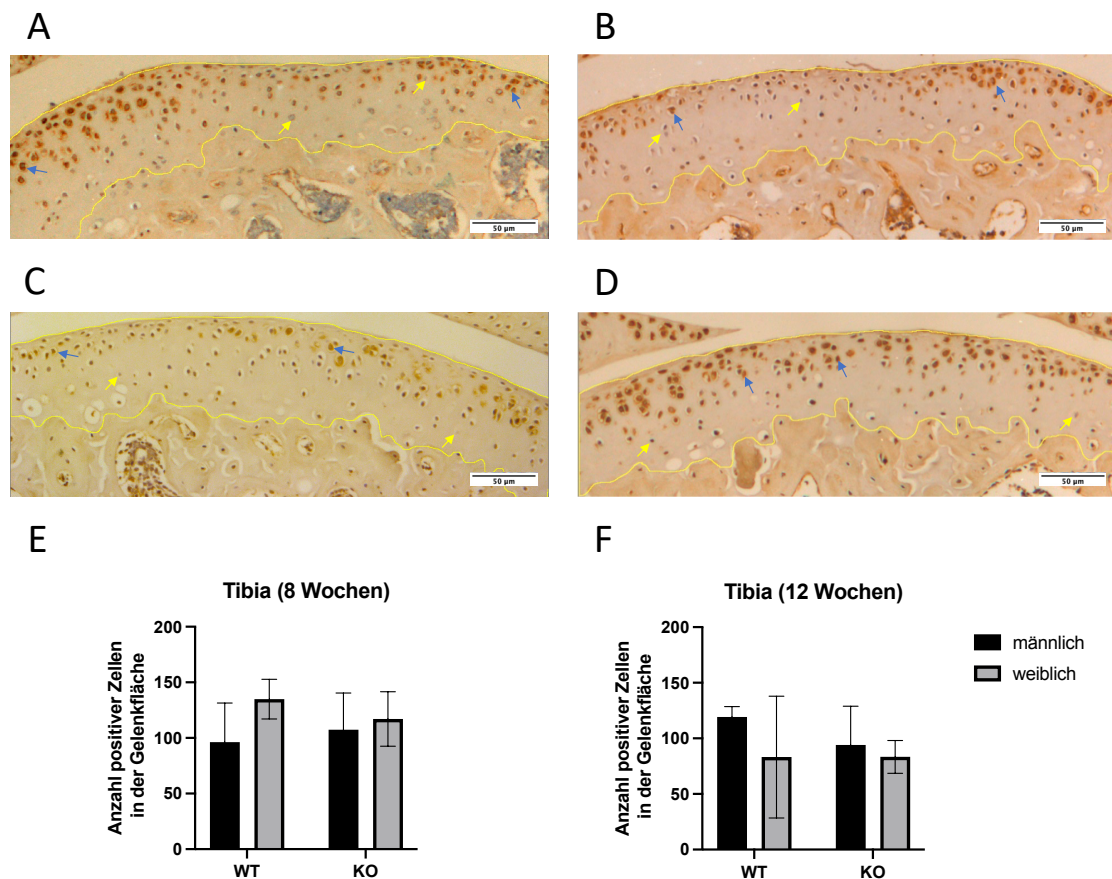


Abb. 24: Eingezeichnete tibiale Gelenkfläche mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen

A - D: Beispielfhaft dargestellt sind die analysierten tibialen Gelenkflächen der gegen VEGF gefärbten Knie-Gewebeschnitte in der Sagittalen (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt; blaue Pfeile markieren die VEGF-positiven Zellen, gelbe die VEGF-negativen)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

Bei der Untersuchung der tibialen Gelenkfläche der acht Wochen alten Mäuse zeigte sich innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtanzahl an Zellen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9582; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9999; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,7154; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,8458) (Abb. 25).

Die statistische Untersuchung der Anzahl an Zellen der zwölf Wochen alten Mäuse ergab ebenso keinen Unterschied innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9022; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p =

0,9604; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9583; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9054) (Abb. 25).

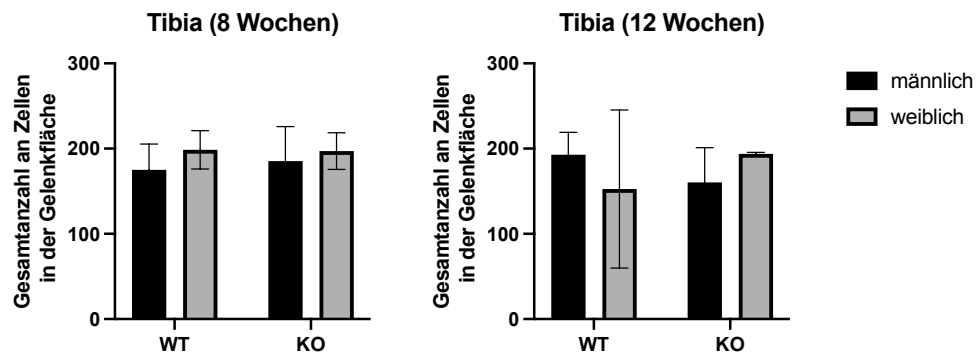


Abb. 25: Gesamtanzahl an Zellen in der tibialen Gelenkfläche

A und B: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte ± SEM

3.3.2.3 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl pro Fläche in der tibialen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Bei der Tibia unterschied sich die Anzahl der positiven Zellen pro Fläche im Vergleich der männlichen sowie weiblichen Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Gruppe (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9138; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,1211) nach acht Wochen nicht. In der Gegenüberstellung der männlichen und weiblichen Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse (Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9893; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,1211) fielen ebenso keine Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu wiesen weibliche Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse deutlich mehr positive Zellen pro Flächeneinheit (5/1000 µm²) auf als männliche (Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,041). Bei zwölf Wochen alten Mäusen war diese Signifikanz jedoch nicht vorhanden und Unterschiede konnten nicht identifiziert werden. (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9694; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9969; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9996; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,885) (Abb. 26).

Bei der Gesamtanzahl pro 1000 µm² Flächeneinheit ergaben die Daten der acht Wochen alten Mäuse wie bei der Untersuchung der Femora keinen signifikanten

Unterschied (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9889$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,1692$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,1615$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9997$). Dies war ebenso bei den zwölf Wochen alten Mäusen der Fall (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,7997$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,6767$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,9994$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9945$) (Abb. 26).

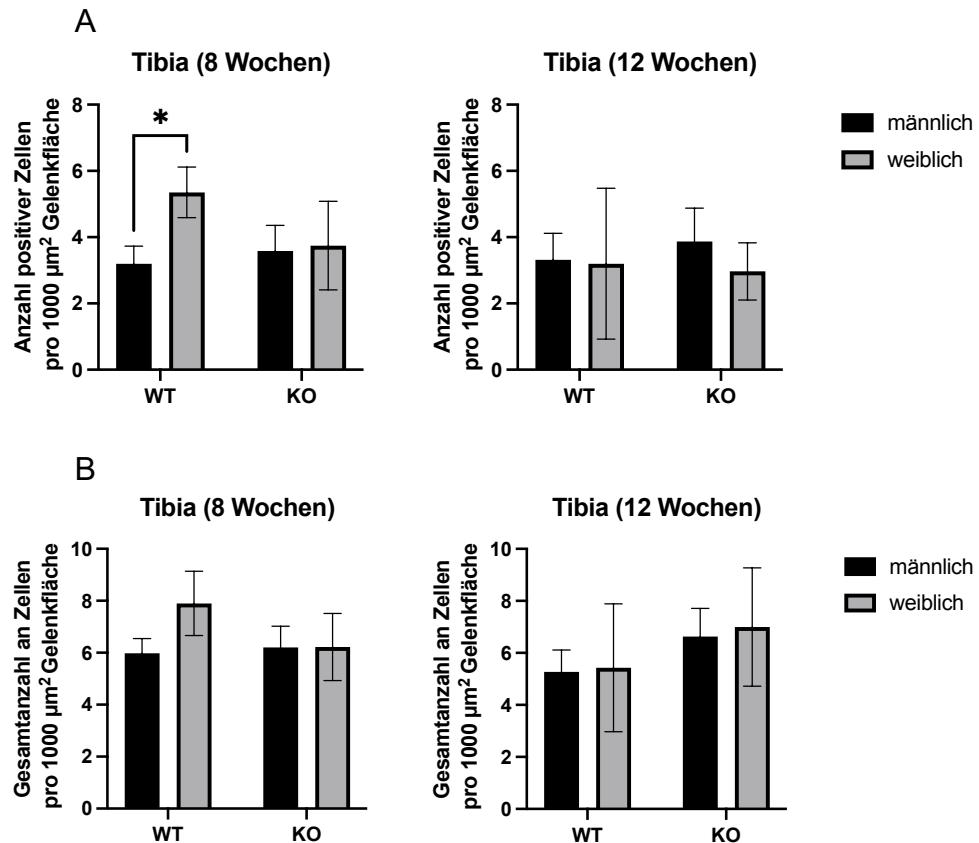


Abb. 26: Anzahl VEGF-positiver Zellen (A) und Gesamtanzahl (B) pro 1000 μm^2 tibiale Gelenkfläche

A und B: Betrachtung acht Wochen ($\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, m: $n = 4$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, w: $n = 3$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, m: $n = 7$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, w: $n = 6$; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter $\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$ - und $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$ -Mäuse ($\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, m: $n = 3$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, w: $n = 6$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, m: $n = 4$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, w: $n = 3$; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.2.4 Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der tibialen Gelenkfläche von Col2-Keap1-Cre^- - und Col2-Keap1-Cre^+ -Mäusen

Die Analyse des Anteils VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der proximalen Tibia ergab keinen Unterschied bei den acht Wochen alten Mäusen innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p =$

0,9483; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,6026; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,2850; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9853) (Abb. 27).

Ebenso zeigte der Vergleich der Daten der zwölf Wochen alten Mäuse gleiche Anteile bei männlichen sowie weiblichen Col2-Keap1-Cre⁻-und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9603; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,6367; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,7442; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,4325) (Abb. 27).

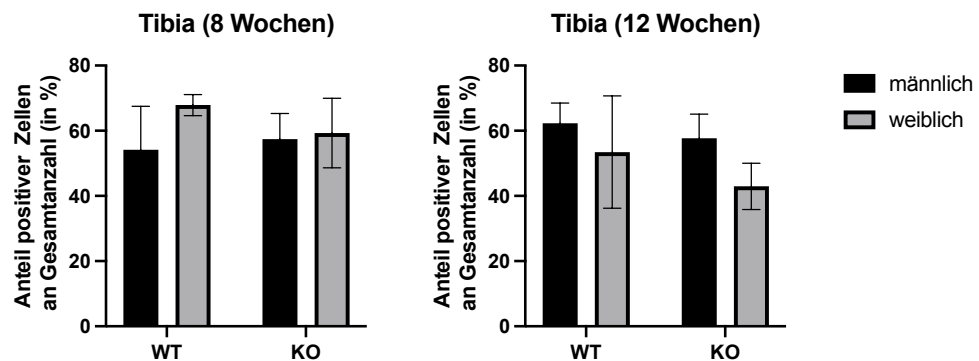


Abb. 27: Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der tibialen Gelenkfläche

Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte ± SEM

3.3.2.5 Vergleich der VEGF-Färbungsintensitäten in der Gelenkfläche bei Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Der Vergleich der Intensitäten der VEGF-Färbungen im Bereich der Gelenkfläche mithilfe der manuell erstellten Skala (siehe Anhang) ergab keinen signifikanten Unterschied bei den acht Wochen alten Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,2843; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9997; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9637; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,4260) (Abb. 28).

Auch bei der Analyse der Färbungen von Kniegelenken zwölf Wochen alter Mäuse fielen keine Diskrepanzen auf (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9988; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,8699; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,3891; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,1342) (Abb. 28).

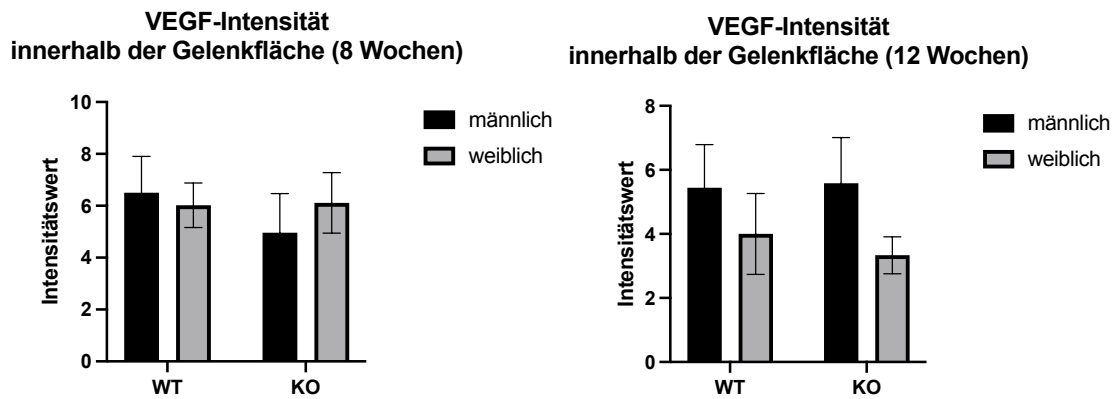


Abb. 28: VEGF-Intensität innerhalb der Gelenkfläche

Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.3 VEGF-Proteinexpression innerhalb der Epiphysenfuge der Tibia

Bei den auf einzelne Bereiche der Epiphysenfuge vergrößerten Sagittalebenechnitten im Bereich der proximalen Tibia wurde die Fläche der einzelnen Zonen sowie die jeweilige VEGF-Expression in den Regionen gemessen. Als Variablen der VEGF-Expression galten die Anzahl der VEGF-positiven Zellen, dessen Anteil an der Gesamtanzahl und die Anzahl pro 1000 μm^2 Fläche.

3.3.3.1 Vergleich der Flächen der drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Die Daten der acht Wochen alten Mäuse wiesen für die Reservezone weder im Vergleich des Geschlechts noch des Genotyps einen signifikanten Unterschied auf (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9842; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,6318; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,7125; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9867) (Abb. 29).

Zwölf Wochen alte Mäuse zeigten ebenso keine Differenzen hinsichtlich der Fläche ihrer Reservezone (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,7634; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,8034; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9956; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: 0,9999) (Abb. 29).

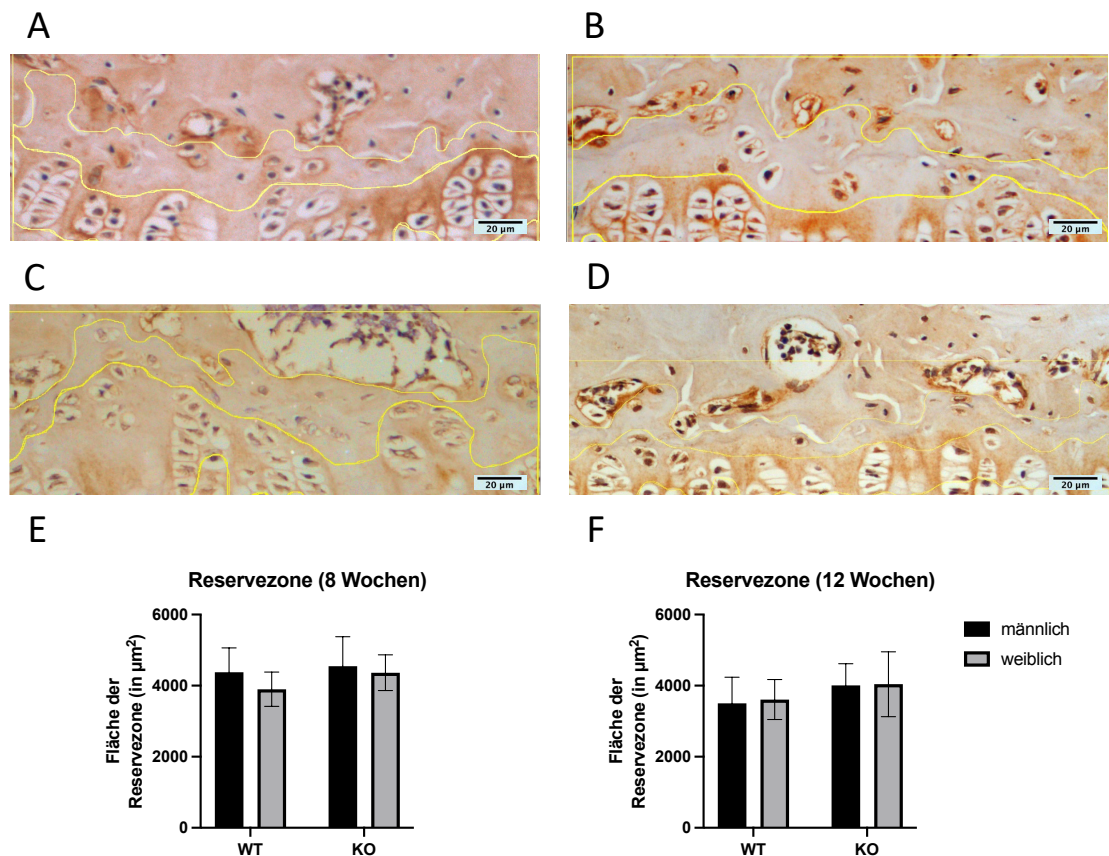


Abb. 29: Fläche der Reservezone

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten Reservezonenflächen im Bereich der proximalen Tibia der gegen VEGF gefärbten Gewebeschnitte (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte $\pm$ SEM

Auch der Vergleich der Flächen der Proliferationszone acht Wochen alter Mäuse ließ keine Unterschiede innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen erkennen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,4707; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,8409; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9999; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,8908) (Abb. 30).

Allerdings wiesen zwölf Wochen alte männliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse eine signifikant größere Fläche auf als Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse gleichen Alters und Geschlechts (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,0457). Die Gegenüberstellung der Daten der anderen Gruppen zwölf Wochen alter Mäuse ergab keine Unterschiede

(Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9776; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,2268; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,8699) (Abb. 30).

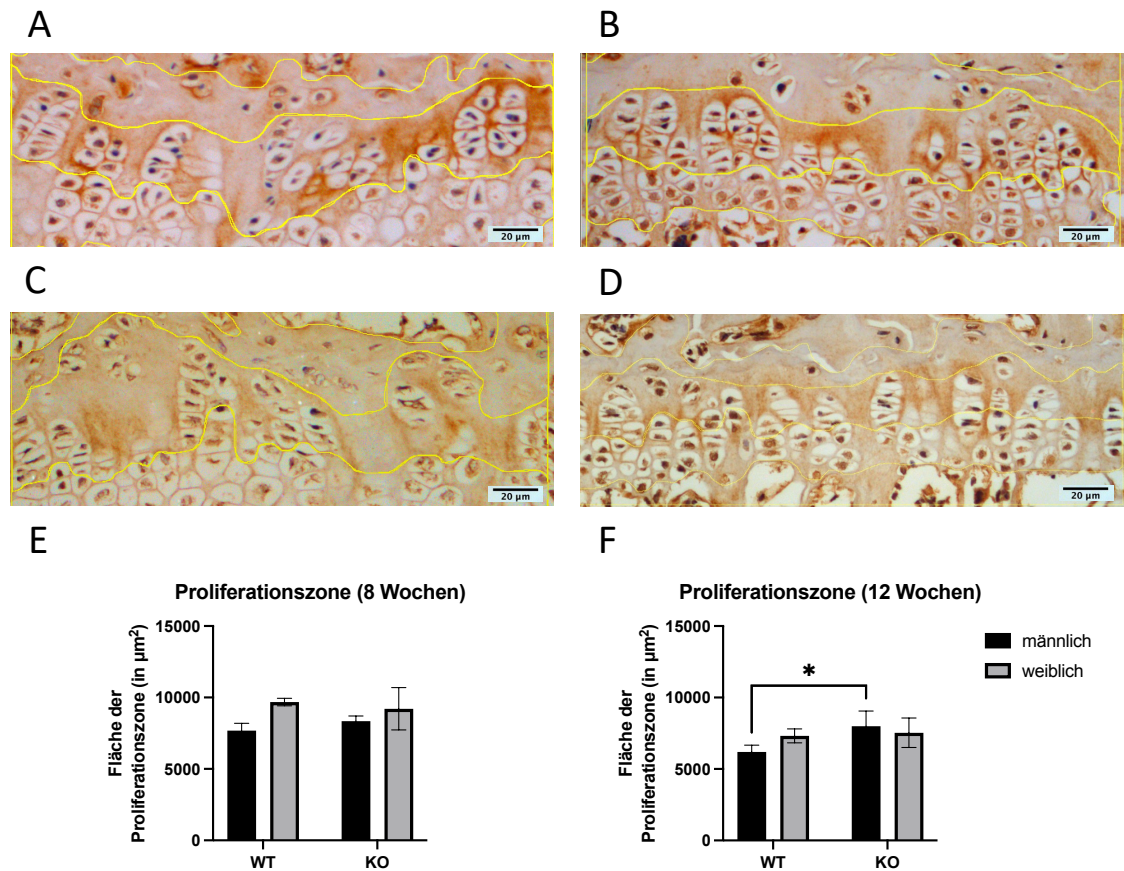


Abb. 30: Fläche der Proliferationszone

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten Proliferationszonenflächen im Bereich der proximalen Tibia der gegen VEGF gefärbten Gewebeschnitte (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte $\pm$ SEM

Die Analyse der Flächen der hypertrophen Zone ergab weder bei den acht Wochen alten (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,8875; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9606; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,8482; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,7932) noch bei den zwölf Wochen alten Mäusen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,4573; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9796; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,4053; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: 0,9809) einen

signifikanten Unterschied im Vergleich des Geschlechts und des Genotyps (Abb. 31).

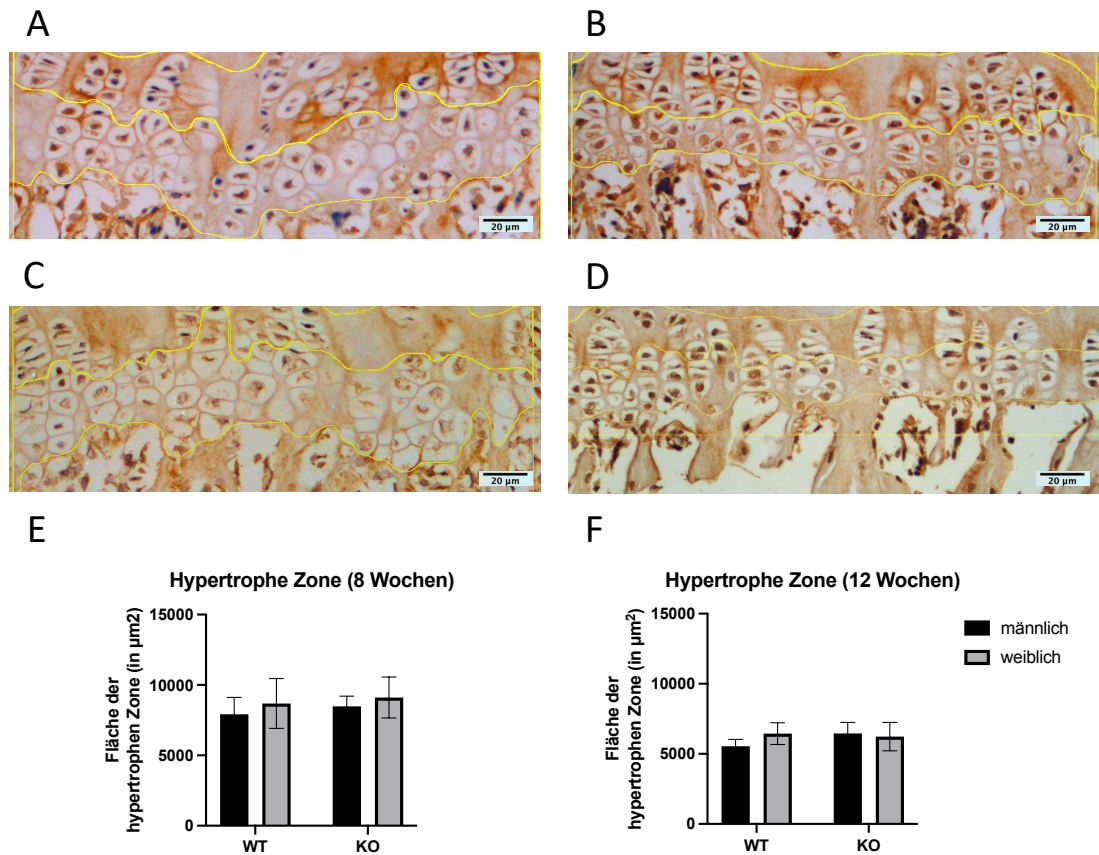


Abb. 31: Fläche der hypertrophen Zone

A - D: Beispielfhaft dargestellt sind die analysierten Flächen der hypertrophen Zonen im Bereich der proximalen Tibia der gegen VEGF gefärbten Gewebeschnitte (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte $\pm$ SEM

3.3.3.2 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl in den drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre⁻ und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Innerhalb der Reservezone ergab der Vergleich der Anzahl positiver Zellen acht Wochen alter Mäuse keine Differenzen zwischen den verschiedenen

Geschlechtern und Genotypen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9645$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,7107$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,8053$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,2055$). Keine Unterschiede lieferte ebenso die Analyse in der Reservezone zwölf Wochen alter Mäuse (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9308$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p > 0,9999$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,8057$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,991$) (Abb. 32).

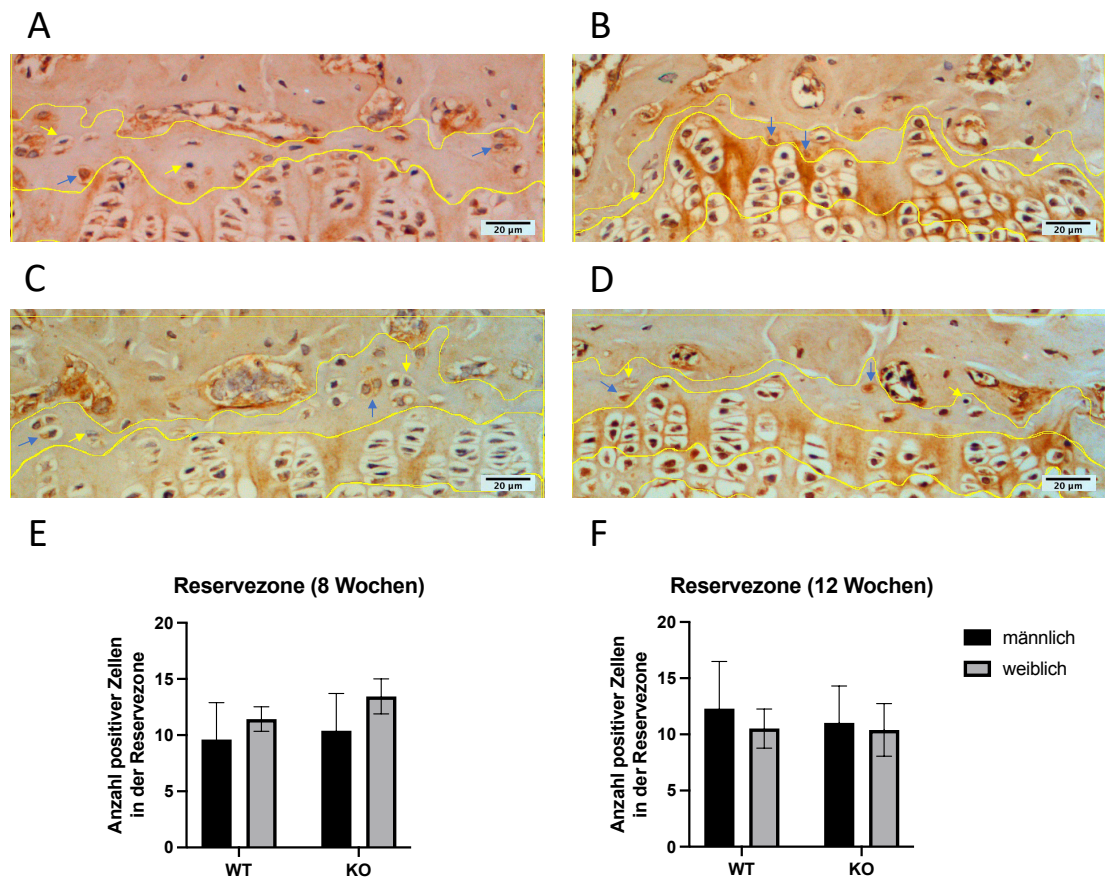


Abb. 32: Eingezeichnete Fläche der Reservezone der verschiedenen Untersuchungsgruppen (A - D) mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten Reservezonenflächen im Bereich der proximalen Tibia mit markierten VEGF-positiven Zellen (A: Col2-Keap1-Cre^+ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre^+ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre^- 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre^- 12 Wochen alt; blaue Pfeile markieren die VEGF-positiven Zellen, gelbe die VEGF-negativen)

E und F: Betrachtung acht Wochen ($\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, m: $n = 4$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, w: $n = 3$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, m: $n = 7$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, w: $n = 6$; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter $\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$ - und $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$ -Mäuse ($\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, m: $n = 3$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^-/\text{WT}$, w: $n = 6$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, m: $n = 4$; $\text{Col2-Keap1-Cre}^+/\text{KO}$, w: $n = 3$; 2-way ANOVA; * = $p < 0,05$), Mittelwerte $\pm$ SEM

Innerhalb der Proliferationszone acht Wochen alter Mäuse verschiedenen Geschlechts und Genotyps gab es keinen Unterschied im Hinblick auf die Anzahl

der positiven Zellen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,8613$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9277$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,1473$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,4836$) (Abb. 33).

Die statistische Analyse der Daten zwölf Wochen alter Mäuse ergab hierbei keine signifikanten Unterschiede (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,1889$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9764$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9998$). Es war aber die Tendenz zu erkennen, dass weibliche Col2-Keap1- Cre^- -Mäuse mehr positive Zellen aufwiesen als männliche (Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,0847$) (Abb. 33).

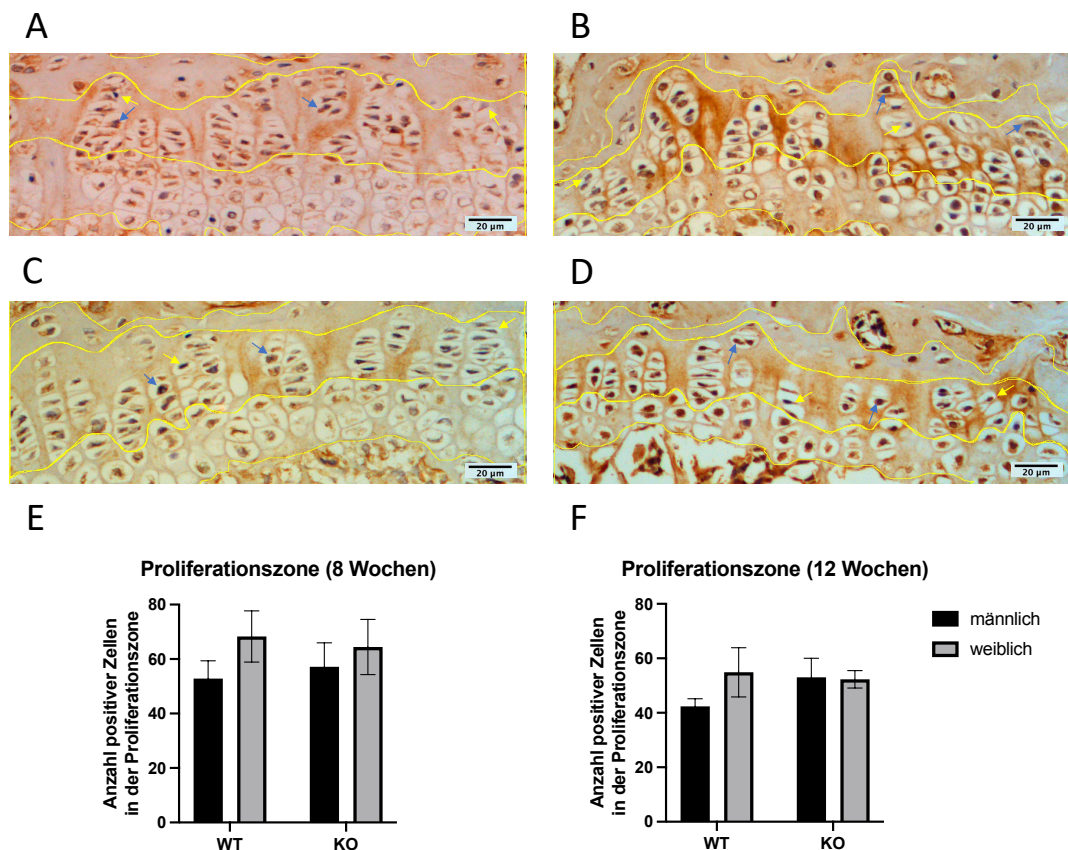


Abb. 33: Eingezeichnete Fläche der Proliferationszone der verschiedenen Untersuchungsgruppen (A - D) mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten Proliferationszonenflächen im Bereich der proximalen Tibia mit markierten VEGF-positiven Zellen (A: Col2-Keap1- Cre^+ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1- Cre^+ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1- Cre^- 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1- Cre^- 12 Wochen alt; blaue Pfeile markieren die VEGF-positiven Zellen, gelbe die VEGF-negativen)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1- Cre^- /WT, m: $n = 4$; Col2-Keap1- Cre^- /WT, w: $n = 3$; Col2-Keap1- Cre^+ /KO, m: $n = 7$; Col2-Keap1- Cre^+ /KO, w: $n = 6$; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1- Cre^- /WT- und Col2-Keap1- Cre^+ /KO-Mäuse (Col2-Keap1- Cre^- /WT, m: $n = 3$; Col2-Keap1- Cre^- /WT, w: $n = 6$; Col2-Keap1- Cre^+ /KO, m: $n = 4$; Col2-Keap1- Cre^+ /KO, w: $n = 3$; 2-way ANOVA; * = $p < 0,05$), Mittelwerte $\pm$ SEM

Für die erhobenen Daten in der hypertrophen Zone der acht Wochen alten Mäuse konnte weder im Vergleich des Geschlechts noch des Genotyps ein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl VEGF-positiver Zellen erkannt werden (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p > 0,9999$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9090$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,9866$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,5489$) (Abb. 34).

Zwölf Wochen alte Mäuse zeigten ebenso keine Differenzen hinsichtlich der Anzahl VEGF-positiver Zellen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,8904$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9038$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,9270$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $0,8645$) (Abb. 34).

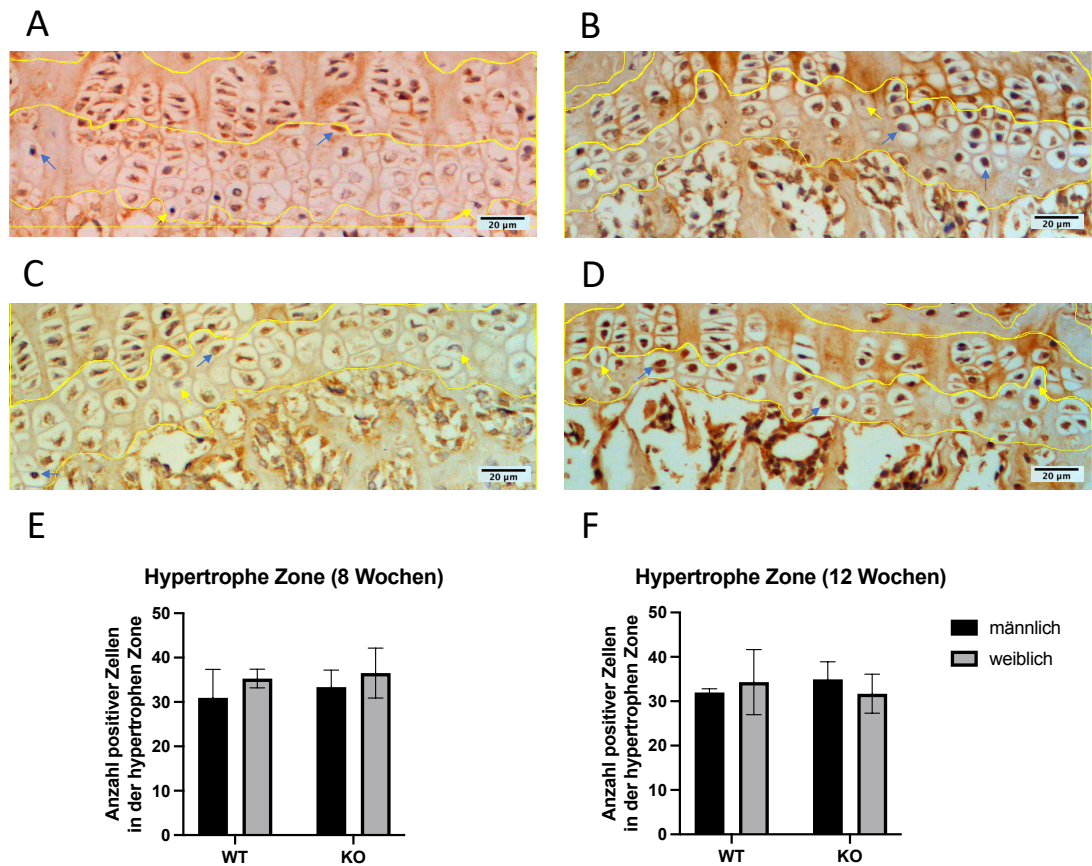


Abb. 34: Eingezeichnete Fläche der hypertrophen Zone der verschiedenen Untersuchungsgruppen (A - D) mit markierten VEGF-positiven und -negativen Zellen

A - D: Beispielhaft dargestellt sind die analysierten Flächen der hypertrophen Zone im Bereich der proximalen Tibia mit markierten VEGF-positiven Zellen (A: Col2-Keap1-Cre⁺ 8 Wochen alt; B: Col2-Keap1-Cre⁺ 12 Wochen alt; C: Col2-Keap1-Cre⁻ 8 Wochen alt; D: Col2-Keap1-Cre⁻ 12 Wochen alt; blaue Pfeile markieren die VEGF-positiven Zellen, gelbe die VEGF-negativen)

E und F: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte ± SEM

Bei der Gegenüberstellung der Gesamtanzahl der Zellen in der Reservezone acht Wochen alter Mäuse konnte innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen kein Unterschied erkannt werden (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9724; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9032; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9098; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9706) (Abb. 35).

Des Weiteren wurden keine Abweichungen bei den Daten der zwölf Wochen alten Mäuse identifiziert (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9975; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p =

0,9975; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9971; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9979) (Abb. 35).

Innerhalb der Proliferationszone acht Wochen alter Mäuse ergab die statistische Analyse der Gesamtanzahl an Zellen keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Geschlechtern und Genotypen. (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9994; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,8454; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,4694; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,8225) (Abb. 35).

Bei den zwölf Wochen alten Mäusen ließen sich die gleiche Anzahl an Zellen in der Proliferationszone weiblicher sowie männlicher Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse erkennen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,1787; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9242; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,9931; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,0782) (Abb. 35).

Bei der Analyse der Daten der hypertrophen Zone acht Wochen alter Mäuse fiel kein Unterschied in der Gesamtanzahl der Zellen auf (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9965; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9795; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9877; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,8953) (Abb. 35).

Auch bei den vier Wochen älteren Mäusen zeigte der Vergleich zwischen den verschiedenen Genotypen und Geschlechtern keine Differenzen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,6916; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9595; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,8373; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,8573) (Abb. 35).

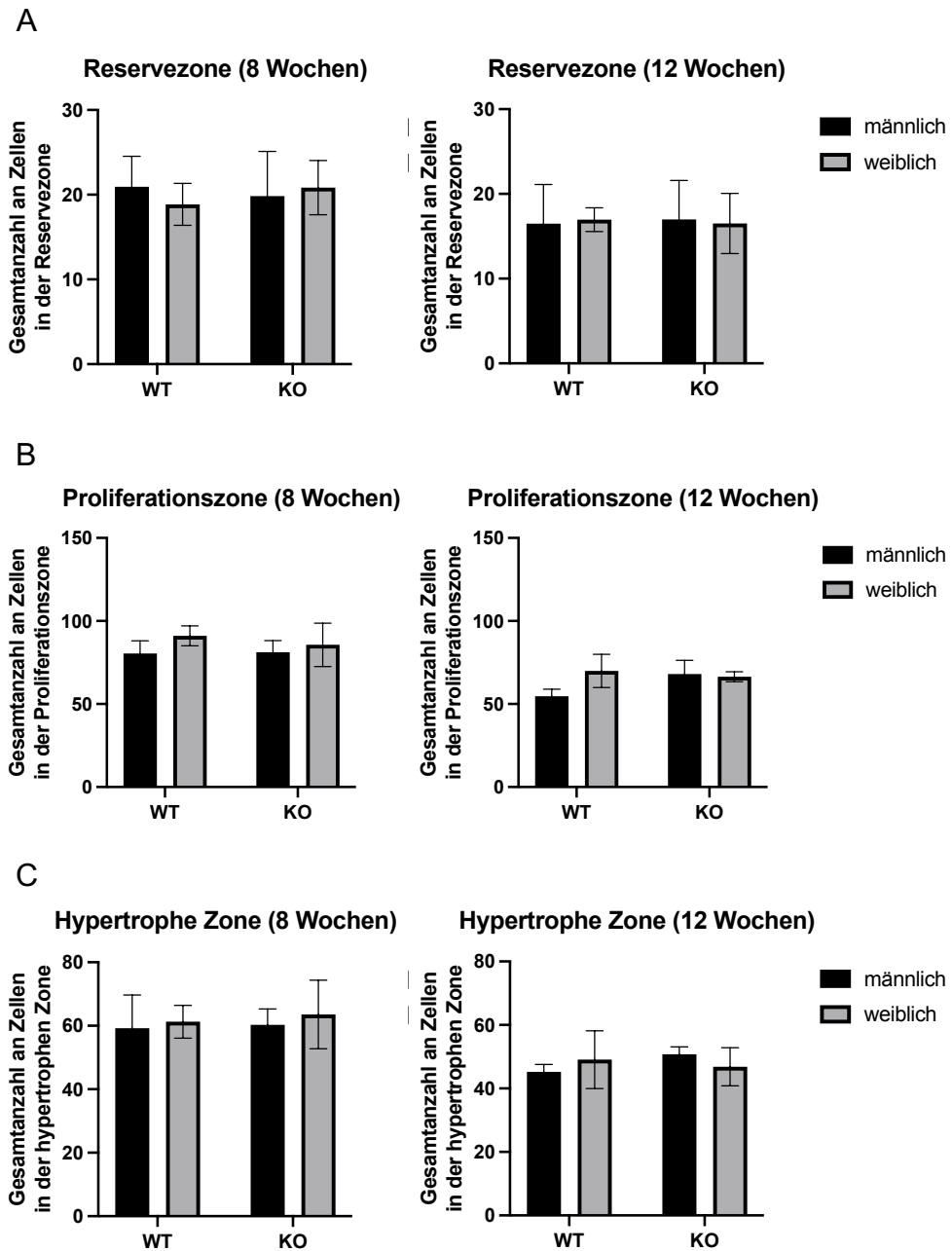


Abb. 35: Gesamtanzahl an Zellen in den drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge

A, B und C: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁺/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁺/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁺/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte ± SEM

3.3.3.3 Anzahl VEGF-positiver Zellen und Gesamtanzahl pro Fläche in den drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Acht Wochen alte Mäuse wiesen hinsichtlich ihres Anteils an positiven Zellen pro Flächeneinheit (1000 μm) in der Reservezone keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen auf (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9948$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,9806$). Eine Differenz war ebenso nicht im Vergleich von männlichen und weiblichen Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen ersichtlich (Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,2113$). Jedoch konnte man erkennen, dass weibliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse einen höheren Anteil hatten als männliche (Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,0363$) (Abb. 36).

Die statistische Analyse der Daten zwölf Wochen alter Mäuse zeigte keine Differenzen zwischen den Genotypen sowie den Geschlechtern (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,6865$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $0,9468$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,8334$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,9983$) (Abb. 36).

Weder acht Wochen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,8069$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,7282$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,7171$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,9167$) noch zwölf Wochen alte Mäuse (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9765$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,7332$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,5387$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,8884$) zeigten innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen Unterschiede bezüglich des Anteils VEGF-positiver Zellen pro Fläche in der Proliferationszone (Abb. 36).

Auch die Gegenüberstellung des Anteils VEGF-positiver Zellen pro Flächeneinheit der hypertrophen Zone acht Wochen alter Mäuse zeigte keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf den Genotyp und das Geschlecht (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9854$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,9809$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,8451$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,994$) (Abb. 36).

Ebenso war bei den zwölf Wochen alten Versuchstieren keine Differenz zu erkennen (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,8794$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,9748$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,6608$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,887$) (Abb. 36).

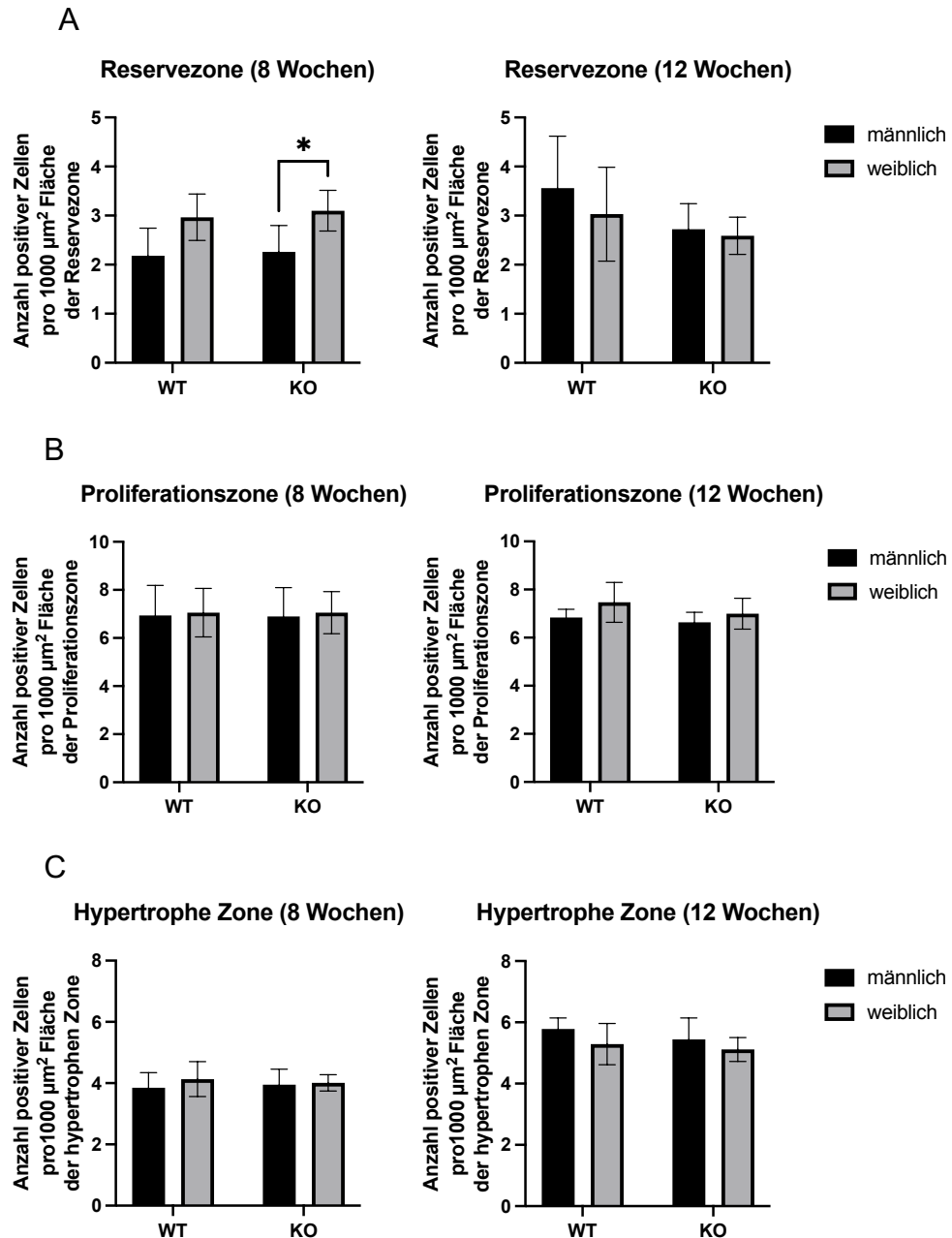


Abb. 36: Anzahl VEGF-positiver Zellen pro 1000 μm^2 Flächeneinheit der drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge

A, B und C: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte $\pm$ SEM

Für die Reservezone ergab die Analyse der Gesamtanzahl der Zellen pro Flächeneinheit keinen Unterschied in der Gruppe der acht Wochen alten Mäuse (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: p = 0,9544; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: p = 0,9972; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: p = 0,9388; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: p = 0,6856) (Abb. 37).

Auch bei den zwölf Wochen alten Mäusen waren keine Unterschiede in Bezug auf die Geschlechter und Genotypen zu identifizieren (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,8601$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,7058$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,9995$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9993$) (Abb. 37).

Innerhalb der Proliferationszone war bei den acht Wochen alten Mäusen hinsichtlich des Anteils der gesamten Zellzahl pro Fläche kein Unterschied innerhalb der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen zu erkennen (Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,8095$; Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,2867$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,6524$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,4009$) (Abb. 37).

Bei den zwölf Wochen alten Versuchstieren waren ebenso keine Unterschiede diesbezüglich auszumachen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9679$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,6501$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,5702$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9364$) (Abb. 37).

Acht Wochen alte Mäuse zeigten innerhalb der Geschlechter- und Genotypgruppen gleiche Anteile der Gesamtanzahl an Zellen pro Fläche der hypertrophen Zone (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,7034$, Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,9468$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,8688$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,953$) (Abb. 37). Ähnliche Anteile an Zellen pro Flächeneinheit waren auch bei den zwölf Wochen alten männlichen sowie weiblichen Col2-Keap1-Cre^- und Col2-Keap1-Cre^+ -Mäusen zu beobachten (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9804$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p > 0,9999$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,7523$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9311$) (Abb. 37).

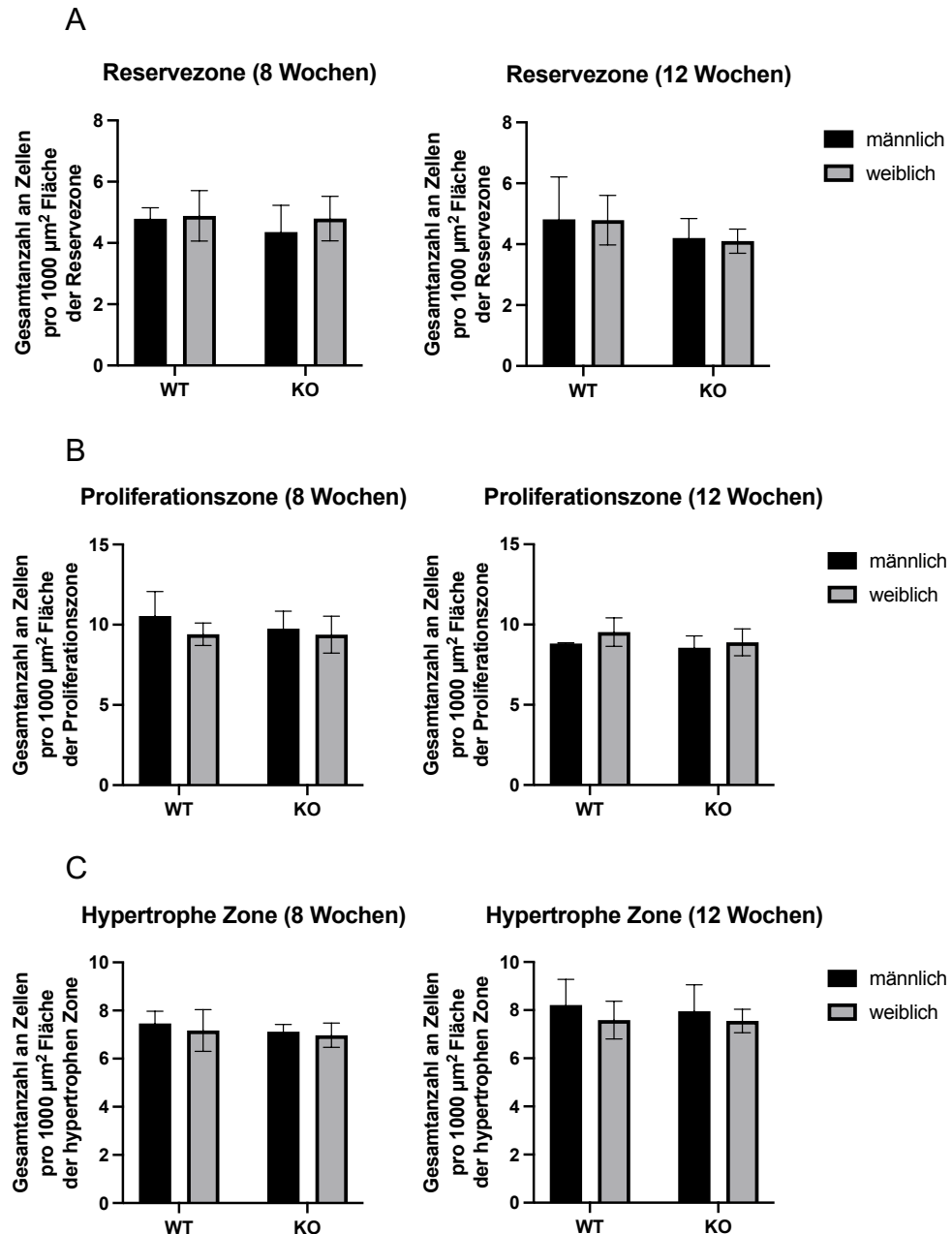


Abb. 37: Gesamtanzahl an Zellen pro 1000 μm^2 Flächeneinheit der drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge

A, B und C: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁺/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁺/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁺/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte $\pm$ SEM

Die Ergebnisse der VEGF-positiven Zellen und der Gesamtanzahl an Zellen pro 1000 μm^2 Fläche stimmten hierbei zum Teil überein. So war bei diesen beiden Variablen innerhalb der Genotyp- und Geschlechter-Gruppen kein Unterschied erkennbar und die Anzahl der VEGF-positiven Zellen sowie der gesamten Zellen pro Fläche blieb innerhalb der Reserve- und Proliferationszone während des

vierwöchigen Wachstumsprozesses auf einem konstanten Niveau. Eine Beobachtung stach hingegen heraus. Wie in Abbildung 35 zu erkennen, wiesen acht Wochen alte weibliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse in der Reservezone signifikant mehr VEGF-positive Zellen pro Fläche als die gleichaltrigen männlichen Mäuse auf. Bei der Gesamtanzahl an Zellen pro Fläche war jedoch kein Unterschied vorhanden (Abb. 36, Abb. 37).

3.3.3.4 Anteil der VEGF-positiven Zellen an der Gesamtanzahl in den drei Zonen der Epiphysenfuge bei Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Die statistische Auswertung der für die Reservezone erhobenen Daten acht Wochen alter Mäuse ergab für den Vergleich der Genotypen keinen Unterschied (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,5296$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,6881$). Allerdings zeigten die Ergebnisse, dass sowohl weibliche Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse als auch weibliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse einen höheren Anteil an positiven Zellen pro Gesamtanzahl als ihre männlichen Gruppenpartner aufwiesen (Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,0409$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,0059$) (Abb. 38).

Zwölf Wochen alte männliche Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse besaßen einen signifikant höheren Anteil als männliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,0236$). Bei dem Vergleich der restlichen drei Gruppen wurden hingegen keine Differenzen identifiziert (Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,7050$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,3507$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,0666$) (Abb. 38).

In den Grafiken fiel vor allem der starke Anstieg des Anteils der positiven Zellen pro Gesamtanzahl bei männlichen Mäusen innerhalb der vierwöchigen Alterung auf. Bei weiblichen Mäusen hingegen pendelte sich der Anteil bei 60 bis 65 Prozent ein (Abb. 38).

Innerhalb der Proliferationszone acht Wochen alter Mäuse unterschied sich der Anteil der positiven Zellen an der Gesamtanzahl an Zellen im Vergleich der Geschlechter- und Genotyp-Gruppen nicht (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9283$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,9947$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,8679$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p > 0,9999$) (Abb. 38).

Ebenso waren keine Unterschiede beim Vergleich der Daten zwölf Wochen alter weiblicher und männlicher Col2-Keap1-Cre⁻- sowie Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse zu

erkennen (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,0554$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,8748$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,1802$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $0,9977$) (Abb. 38).

Acht Wochen alte Mäuse wiesen beim Vergleich des Anteils der positiven Zellen pro Gesamtanzahl innerhalb der hypertrophen Zone nach statistischer Auswertung der Daten keine signifikanten Differenzen in Bezug auf den Genotyp und das Geschlecht auf (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9851$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,8374$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,9929$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,7051$) (Abb. 38).

Zu diesem Ergebnis gelangte man ebenso bei Analyse der Daten zwölf Wochen alter Mäuse (Cre^- , m vs. Cre^+ , m: $p = 0,9389$; Cre^- , w vs. Cre^+ , w: $p = 0,932$; Cre^- , m vs. Cre^- , w: $p = 0,98$; Cre^+ , m vs. Cre^+ , w: $p = 0,9866$) (Abb. 38).

Hier erkannte man bei der Gegenüberstellung beider Grafiken den ausnahmslosen Anstieg des Anteils von 52 bis 57 Prozent auf 68 bis 71 Prozent (Abb. 38).

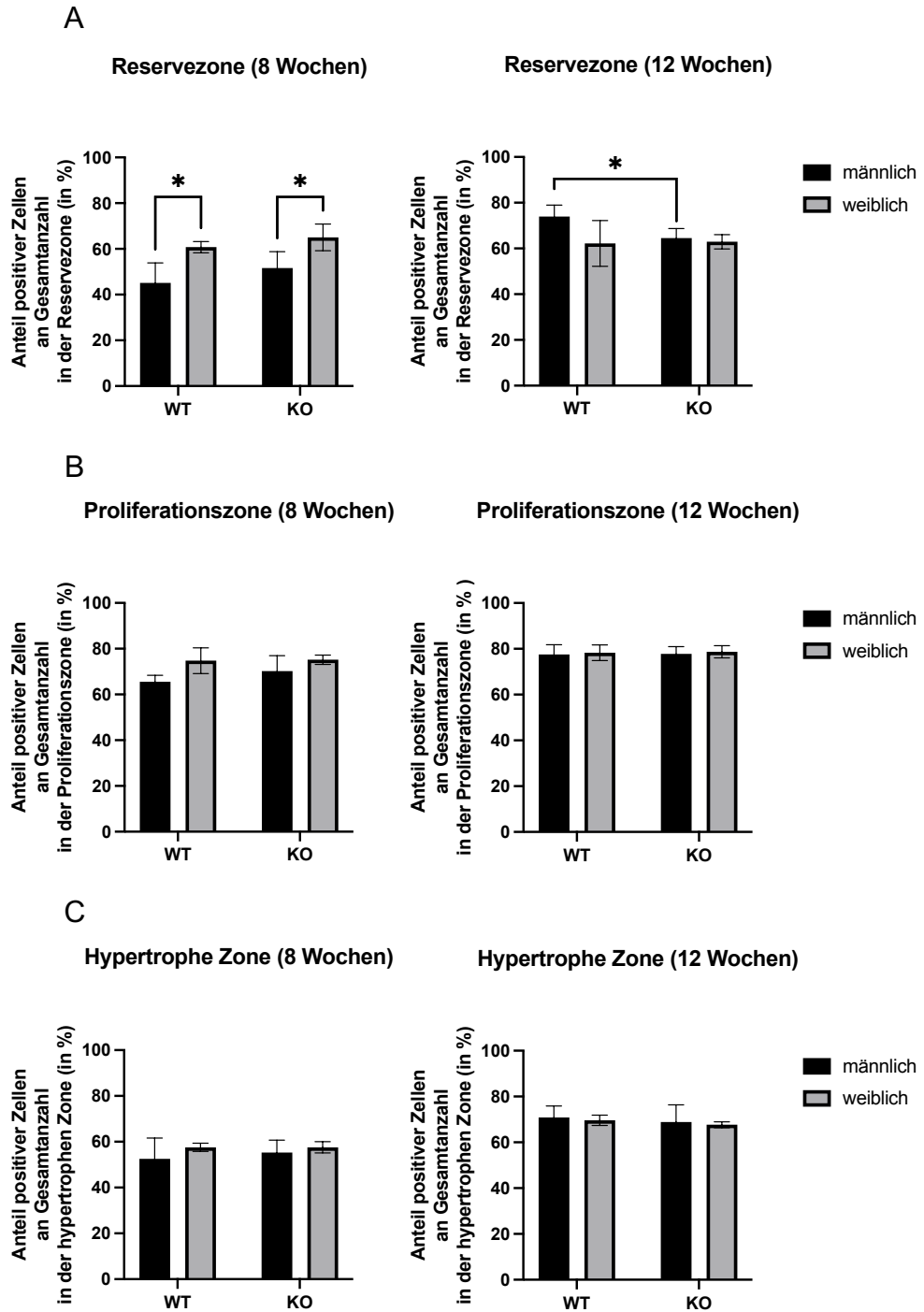


Abb. 38: Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl innerhalb der drei verschiedenen Zonen (A, B und C) der Epiphysenfuge

A, B und C: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 7; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 6; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: n = 3; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: n = 6; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: n = 4; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: n = 3; 2-way ANOVA; * = p < 0,05), Mittelwerte ± SEM

4 Diskussion

Die aktuelle Studienlage zeigt, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 eine wichtige Rolle während der Knochenentwicklung sowie der Frakturheilung spielt und damit auch die chondrale Ossifikation als Teil dieser Prozesse beeinflusst. Aus diesem Grund befasst sich ein übergeordnetes Projekt des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der RWTH Aachen University mit der Rolle von Nrf2 in knorpeligen Strukturen, die im Laufe der Entwicklung ossifizieren. Mit Fokus auf der chondralen Ossifikation konzentrieren sich die Untersuchungen auf die Beteiligung von durch Kollagen Typ 2 exprimierende Zellen gebildetes Nrf2 beim Knochenwachstum. Da der Prozess der chondralen Ossifikation bei jungen Tieren stärker ausgeprägt ist, wurden für die vorliegende Arbeit noch nicht adulte Mäuse im Alter von acht bis zwölf Wochen ausgewählt. Im Zentrum des Interesses lag vor allem der Übergangsbereich von knorpeligen zu knöchernen Strukturen, in dem Kollagen Typ 2 in der EZM exprimiert wird. Daher wurde Nrf2 in Kollagen Typ 2 produzierende Zellen der untersuchten Mäuse ausgeschaltet (Col2-Nrf2-Cre⁺). Ebenso wurde Keap1 in diesen Zellen ausgeschaltet (Col2-Keap1-Cre⁺), um zusätzlich eine Überaktivierung von Nrf2 zu analysieren. μ CT-Daten einer parallel durchgeführten Promotion von Alwafai *et al.* zeigten schon eine geringere Femurlänge bei Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen im Alter von vier, acht und zwölf Wochen (Alwafai *et al.*, 2024). Während des Prozesses der chondralen Ossifikation in der Knochenwachstumsphase kann VEGF-A nicht nur die Angiogenese zur Erleichterung der Knochenbildung einleiten, sondern diesen Prozess direkt durch die Induktion der Proliferation und Migration von Osteoblasten stimulieren (Mayr-Wohlfart *et al.*, 2002). Aus diesem Grund fand im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels immunhistologischer Färbung die Analyse der Expression von VEGF, einem dort gebildeten relevanten Wachstumsfaktor, in der tibialen Epiphysenfuge von acht und zwölf Wochen alten Col2-Keap1-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁻-Mäusen statt.

Zusätzlich fokussierten sich die Untersuchungen der Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäuse auf die Körpermaße sowie die Unterschiede im chondrogenen Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen.

4.1 Auswirkungen von Col2-Nrf2-Cre⁺ auf die Chondrogenese von murinen MSCs

Die Bildung einer knorpeligen Übergangsstruktur ist Teil der Prozesse der Frakturheilung und des Knochenwachstums (Lippross et al., 2014). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Modell etabliert, um den Einfluss einer Ausschaltung von Col2-Nrf2 auf das Differenzierungspotential von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. Hierfür erfolgten die Extraktion und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen aus dem femoralen und humeralen Knochenmark von Col2-Nrf2-Cre⁺- und Col2-Nrf2-Cre⁻-Mäusen und deren chondrogene Differenzierung. Über anschließende histologische Färbungen von spezifischen Bestandteilen der extrazellulären Matrix konnten die Auswirkungen auf das chondrogene Differenzierungspotenzial und damit auf die Bildung einer knorpeligen Zwischenstruktur beim Knochenwachstum untersucht werden. Die Safranin O- bzw. Alzianblau-Färbungen als etablierte Färbemethoden sind eine gängige Methode zur Analyse spezifischer chondrogener Marker der EZM, wie zum Beispiel Proteoglykane und sulfatierte Glykosaminoglykane (F. Li et al., 2018). Die Analyse der Färbungsintensitäten ermöglichte einen semi-qualitativen Vergleich der chondrogenen Differenzierung von MSCs aus Col2-Nrf2-Cre⁺- und Col2-Nrf2-Cre⁻-Mäusen. Die ähnlichen Intensitäten der Alzianblau- und Safranin O-Färbungen nach 14 und 21 Tagen deuten auf den fehlenden qualitativen Einfluss einer Ausschaltung von Nrf2 auf die Bildung der Knorpelmatrix durch MSCs *in vitro* hin. Dass eine Ausschaltung von Nrf2 zu einer verringerten Knorpeldifferenzierung führen kann, konnte von Ye *et al.* unter anderem mithilfe von Safranin O-Färbungen festgestellt werden. Eine verringerte Färbungsintensität und damit eine verringerte EZM-Produktion waren bei Nrf2-Knock-Out-Mäusen im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren zu beobachten. EZM-Komponenten, wie zum Beispiel Aggrecan und Kollagen Typ 2, waren in Nrf2-Knock-Out-Mäusen vermindert. Hierbei ist aber zu betonen, dass es sich um eine generelle Deletion von Nrf2 und um *in vivo* Untersuchungen handelte (Ye et al., 2024).

Um auch quantitative Aussagen über den Einfluss einer Ausschaltung von Nrf2 auf die Bildung der Knorpelmatrix durch MSCs treffen zu können, wurde ein Teil der differenzierten Zellen ebenso mit Safranin O angefärbt, dieses dann extrahiert und mittels colorimetrischer Messung die Absorptionsrate gemessen.

Der Differenzierungsversuch und die anschließende Absorptionsmessung zeigten bei Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen eine vermehrte Produktion von Proteoglykanen nach 14- sowie 21-tägiger Differenzierung. Ob dies *in vivo* über eine beschleunigte Chondrogenese und einem damit verbundenen frühzeitigen Wachstumsstopp mögliche Auswirkungen auf die Osteogenese hat, ist nicht eindeutig. Es sind somit weitere Untersuchungen notwendig, zu denen Analysen mittels *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (PCR) zählen. Sie sollen zur Überprüfung, inwieweit Kollagen Typ 2 in den verwendeten MSCs exprimiert wird und ob in diesen Zellen Unterschiede in der Nrf2-Genexpression feststellbar sind, dienen.

4.2 Auswirkungen von Col2-Nrf2-Cre⁺ auf den Phänotyp

Die mithilfe von μ CT-Aufnahmen gemessenen verkürzten Oberschenkel­längen bei Col2-Nrf2-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen liefern Hinweise darauf, dass ein Col2-Nrf2-Mangel sowie eine Col2-Nrf2-Hyperaktivierung zu Wachstumseinschränkungen führen können. Weitere auf das Knochenwachstum und die Knochenstruktur einschränkende Beobachtungen waren die verringerte Länge der *Vertebrae caudales* bei Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen. Diese wurden zum einen gemessen, da der Schwanz ein definierter Teil der Wirbelsäule ist. Zum anderen diente die Bestimmung dazu, eine zuverlässig messbare Variable zu generieren, die unabhängig von der postmortalen Kyphose der Maus ist.

Einflüsse von Nrf2 auf das Knochenwachstum konnten zudem in anderen Arbeiten belegt werden. μ CT- und histomorphometrische Analysen von Park *et al.* zeigten eine Zunahme der Knochenmasse von Nrf2-KO-Mäusen im Vergleich zu Nrf2-WT-Mäusen (Park *et al.*, 2014). Zudem zeigten Kim *et al.*, dass Nrf2-KO-Mäuse ein deutliches Defizit beim postnatalen Knochenaufbau aufwiesen, das im Alter von 3 Wochen am stärksten ausgeprägt war (Kim *et al.*, 2014). Ebenso waren bei Kubo *et al.* eine signifikant reduzierte trabekuläre *Bone Mass Density* (BMD) sowie kortikale Dicke bei alten Nrf2-KO-Mäusen im Vergleich zu alten WT-Mäusen auffällig, obwohl es bei jungen erwachsenen Mäusen keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und KO gab (Kubo *et al.*, 2022). Eine niedrigere BMD war zudem bei weiblichen KO-Mäusen zu beobachten, wohingegen männliche KO-Mäuse eine höhere BMD aufwiesen (Pellegrini *et al.*,

2017). Diese Ergebnisse zeigen eine mögliche altersabhängige Wirkung von Nrf2 auf das Knochenwachstum.

In der vorliegenden Arbeit wurden außerdem als zusätzliche Daten das Körpergewicht und die Körperlänge der Col2-Nrf2-Cre⁻- und -Cre⁺-Mäuse gemessen, die für die Extraktion der MSCs aus dem Knochenmark von Femur und Humerus vorgesehen waren. Hierbei konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Einschränkend zu nennen ist dabei die mit der Messung der gesamten Körperlänge der Mäuse verbundene Ungenauigkeit durch die postmortale Kyphose. Es wurden Mäuse beiden Geschlechts im Alter von neun und zehn Wochen verwendet. In diesem Alter ist das Wachstum der Mäuse noch nicht beendet und spiegelt somit annähernd die phänotypische Situation der für den immunhistochemischen Teil dieser Arbeit verwendeten Mäuse wider. Da für die Zellkulturexperimente das genaue Alter nicht relevant war, ergab sich die größere Altersspanne. Aufgrund der begrenzten Gruppengröße wurde eine gemeinsame geschlechterunabhängige Auswertung vorgenommen. Zukünftige Arbeiten beschäftigen sich mit der Untersuchung der Unterschiede innerhalb eines Geschlechts. Zudem finden jüngere Mäuse Verwendung.

4.3 Auswirkungen von Col2-Keap1-Cre⁺ auf die VEGF-Expression im hyalinen Gelenkknorpel und in der Epiphysenfuge

Eine verringerte oder erhöhte VEGF-Expression im Gelenkknorpel kann zu verschiedenen körperlichen Einschränkungen führen. Bei einer Verringerung der VEGF-Expression sind Wachstumsverzögerungen möglich, wohingegen bei einer verstärkten VEGF-Expression frühzeitige Apoptosen der Chondrozyten der Fall sein und Gelenkerkrankungen wie Arthrose begünstigt werden können (Pufe et al., 2004; Saetan et al., 2014). Gerber *et al.* zeigten schon 1999, dass im hypertrophen Knorpel der epiphysären Wachstumsplatte gebildetes VEGF als Schlüsselkoordinator für die Funktion der Chondrozyten, der Remodellierung der extrazellulären Matrix und der Knochenbildung dient (Gerber *et al.*, 1999). VEGF-A kann nicht nur die Angiogenese zur Erleichterung der Knochenbildung einleiten, sondern diesen Prozess direkt durch die Induktion der Proliferation und Migration von Osteoblasten stimulieren (Mayr-Wohlfart et al., 2002). Daher wurde in diesem Projekt der Fokus auf den Effekt einer Hyperaktivierung von Nrf2 auf

die VEGF-Expression im hyalinen Gelenkknorpel gelegt. Da sich, wie oben beschrieben, Unterschiede in der Femurlänge von Kollagen Typ 2(Col2)Cre⁺::Keap1^{loxp/loxp}-Mäusen darstellten und Kubo *et al.* verringerte Knochenlängen und -dicken bei Nrf2-KO-Mäusen feststellten, konzentrierte sich diese Arbeit zusätzlich auf den Einfluss von Nrf2 auf die Epiphysenfuge (Kubo *et al.*, 2022).

Als Methode zur Untersuchung der VEGF-Expression wurde in dieser Arbeit die etablierte IHC-Färbung mittels an VEGF bindende spezifische Antikörper gewählt. So konnte eine qualitative (Intensität der Färbung) sowie semi-quantitative (Zählung VEGF-positiver Zellen) Analyse durchgeführt werden. Neben der Untersuchung der hyalinen Knorpelareale in der Gelenkfläche fand eine Einteilung der Epiphysenfuge in drei verschiedene Zonen nach klar definierten Kriterien (siehe Tabelle 6) statt, um die verschiedenen Stadien der chondralen Ossifikation abzudecken. Hierbei wurden die jeweiligen Flächengrößen gemessen sowie die Anzahl der VEGF-positiven Zellen und die Gesamtanzahl an Zellen gezählt. Anschließend wurde zusätzlich das Verhältnis der Zellen zueinander und zur Fläche bestimmt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen und ausreichend gerade Ausschnitte der Epiphysenfuge zu erhalten, fanden die Bestimmungen in der tibialen Epiphysenfuge statt und nicht in der histologisch heterogen dargestellten femoralen Epiphysenfuge.

4.3.1 VEGF-Expression im hyalinen Gelenkknorpel

Eine Hyperaktivierung von Nrf2 in Kollagen Typ 2 exprimierende Zellen hatte keinen Einfluss auf die VEGF-Expression in hyalinem Gelenkknorpel. Weder die Größe der Gelenkfläche noch die Gesamtanzahl an Zellen sowie der Anteil der Gesamtanzahl an der Fläche unterschieden sich zwischen männlichen und weiblichen Col2-Keap1-Cre⁺- und -Cre⁻-Mäusen. Ebenso waren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an VEGF-positiven Zellen, dem Anteil an VEGF-positiven Zellen an der Gesamtanzahl und der Anzahl VEGF-positiver Zellen pro 1000 µm² Fläche zwischen Col2-Keap1-Cre⁺- und -Cre⁻- Mäusen zu erkennen. Unterschiedliche Studien zeigten bereits, dass neben VEGF andere Faktoren, wie zum Beispiel *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) und *Transforming growth factor beta 1* (TGFβ1) eine Rolle in der Knorpelhomöostase und während

des Knochenwachstums spielen können (G. Chen et al., 2012; Linkhart et al., 1996; van den Berg, 1999). Es scheint daher naheliegend, dass weitere Faktoren neben der VEGF-Expression in der Interaktion mit Nrf2 wichtig sind. Daher sind zusätzliche Untersuchungen, die deren Zusammenspiel mit Nrf2 analysieren, zielführend.

4.3.2 VEGF-Expression in der Epiphysenfuge

Insgesamt wurden geringe Unterschiede in der VEGF-Expression innerhalb diverser Zonen der Epiphysenfuge von Col2-Keap1-Cre⁺- und -Cre⁻-Mäusen festgestellt. Eine Col2-Nrf2-Hyperaktivierung hat somit einen Einfluss auf die VEGF-Expression.

Zwölf Wochen alte männliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse hatten eine größere Proliferationszonenfläche als Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse gleichen Alters und Geschlechts. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die VEGF-Expression beim weiblichen Geschlecht im Alter von acht Wochen unabhängig von Nrf2 höher ist als bei gleichaltrigen Männchen. Es wurde beobachtet, dass weibliche Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse mehr positive Zellen in der Proliferationszone aufwiesen als männliche, jedoch hatten diese auch eine tendenziell höhere Gesamtanzahl an Zellen in dieser Zone. Einen Unterschied in der VEGF-Expression zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zeigt zudem zum einen die signifikant höhere Anzahl an VEGF-positiven Zellen pro Fläche der Reservezone von acht Wochen alten weiblichen Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen im Vergleich zu männlichen Gruppenpartnern. Zum anderen hatten acht Wochen alte weibliche Col2-Keap1-Cre⁻-Mäuse und weibliche Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse einen höheren Anteil an VEGF-positiven Zellen pro Gesamtanzahl in der Reservezone als ihre männlichen Gruppenpartner. Einen weiteren Hinweis auf einen Effekt der Col2-Nrf2-Hyperaktivierung auf die VEGF-Expression zeigt der signifikant erhöhte Anteil VEGF-positiver Zellen an der Gesamtanzahl in der Reservezone bei zwölf Wochen alten männlichen Col2-Keap1-Cre⁻ im Vergleich zu männlichen Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen. Da bei weiblichen Tieren diese Beobachtung nicht gemacht werden konnte, deutet dies auf eine geschlechterabhängige Beeinflussung von Nrf2 hin, die erst bei fortgeschrittenem Entwicklungsstadium (siehe zwölfte Woche) in Erscheinung tritt.

Die vorhandenen Wechselwirkungen zwischen Nrf2 und VEGF unterstreichend, beobachteten Lippross *et al.* eine reduzierte Expression von VEGF und Osteocalcin während der Frakturheilung bei Mäusen, in denen Nrf2 generell ausgeschaltet wurde (Lippross *et al.*, 2014). In unterschiedlichen Studien unabhängig vom Knorpel- und Knochenstoffwechsel konnte ebenso die gegenseitige Nrf2-VEGF-Interaktion nachgewiesen werden. Li *et al.* etablierten zum Beispiel ein *in vivo* Modell der venösen Hypertonie sowohl in WT- als auch in Nrf2-KO-Ratten. In den WT-Ratten konnte eine signifikant erhöhte Expression von Nrf2 und VEGF beobachtet werden. Der Knock-Out von Nrf2 hemmte jedoch die Hochregulation von VEGF deutlich, wie durch Western-Blot-Analyse und qRT-PCR festgestellt wurde (L. Li *et al.*, 2016).

Die Mehrheit der Literatur widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einer vermehrten VEGF-Expression in der Proliferationszone, da dort VEGF hauptsächlich in der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge exprimiert wird. Zu beachten ist dabei, dass sich der Großteil der Studien auf adulte Mäuse bezieht (Gerber *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2002). Es gibt aber auch mögliche Gründe für diese Beobachtungen in der Proliferationszone. Zum einen könnte es sein, dass bei jungen Tieren mit hoher Proliferationsaktivität VEGF auch oder bereits in der Proliferationszone aktiv ist. Stempel *et al.* betonen in ihrer Arbeit, dass zwei Wochen alte Mäuse auch eine VEGF-Aktivität in der Proliferationszone aufwiesen (Stempel *et al.*, 2011). Dies wird von Garcia-Ramirez *et al.* unterstützt, die eine VEGF-Proteinexpression auch in proliferativen Regionen der frühen fötalen Wachstumsplatten des Menschen fanden (Garcia-Ramirez *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigen Evans *et al.*, dass Zellen der proliferativen und frühen hypertrophen Regionen eine signifikant höhere Gesamt-VEGF-mRNA-Expression aufwiesen als Zellen der ruhenden und späten hypertrophen Regionen. Die VEGF-Proteinexpression war jedoch in der proliferativen Zone nur schwach ausgeprägt. Sie betonen, dass die VEGF-Aktivität in der proliferativen Zone umso geringer und in der hypertrophen Zone umso höher war, je älter das Tier war (Evans & Oberbauer, 2008). Andererseits ist es auch möglich, dass in der vorliegenden Arbeit VEGF-exprimierende prähypertrophe Chondrozyten in die Proliferationszone miteinbezogen wurden.

4.4 Limitationen

Als Limitation für die Untersuchung der chondrogenen Differenzierung von MSCs kann die eher geringe Ausbeute an Zellen nach Extraktion aus dem Knochenmark von Femur und Humerus, Kultivierung und anschließender Differenzierung angesehen werden. Ob dies zum Beispiel am Cre/loxP-System von Nrf2 liegt, ist unklar.

Bezüglich der Analyse der VEGF-Expression kann als Limitation die Auswahl von Mäusen lediglich im Alter von acht und zwölf Wochen genannt werden. Bei Mäusen, die älter als zwölf Wochen alt sind, sollten die Unterschiede jedoch in einem geringeren Ausmaß ausfallen, da sie ab diesem Zeitpunkt schon als adult gelten und Wachstumsprozesse daher nicht mehr stark ausgeprägt sind. Die Einbeziehung jüngerer Mäuse im Alter von zum Beispiel vier Wochen wird Gegenstand zusätzlicher Arbeiten sein, um das Wachstum und damit vor allem den Ablauf der chondralen Ossifikation in einem größeren Rahmen abzudecken. Ebenso sind mögliche Fehler bei der Zonenanalyse der Epiphysenfuge, vor allem beim Übergang zwischen hypertropher Zone und Proliferationszone, trotz sorgfältiger Auswahl der Regionen zu nennen, wodurch die Zuteilung von Zellen zu den jeweiligen Zonen unterschiedlich sein kann. Ungeachtet der erstellten Kriterien zur Zoneneinteilung kann es zu Ungenauigkeiten kommen. Die untersuchten Schnitte stellen die Situation nur zweidimensional dar, was die Lage trotz präziser Auswahl an Präparaten variieren lässt. Außerdem stellt sich die Frage nach der Selektivität der VEGF-Färbung. Dies ist jedoch vernachlässigbar, da die Negativ- sowie Positivkontrollen mit VEGF-positiven Zellen innerhalb der Gefäßwände eine funktionierende selektive Färbung zeigten. Weitere molekularbiologische Methoden würden die Aussagekraft erhöhen.

Des Weiteren sollten zusätzliche Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel *Indian Hedgehog Homolog* (IHH), *Parathormon-related Peptide* oder FGF, miteinbezogen werden. Diese steuern den Prozess der chondralen Ossifikation im Bereich der Epiphysenfuge mit (L. Chen et al., 2019; Sieker et al., 2015). Aus diesem Grund sind die genannten Wachstumsfaktoren Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

4.5 Die essentielle Rolle eines im Gleichgewicht befindlichen Nrf2-Spiegels auf das Knochen- und Knorpelwachstum

Die Hypothese über ein eingeschränktes Wachstum bei Col2-Nrf2-Cre⁺- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen kann mithilfe der μ CT-Daten der Mäusefemora unterstützt werden. Die immunhistologische VEGF-Färbung innerhalb der Epiphysenfuge liefert Hinweise darauf, dass eine Nrf2-Hyperaktivierung in Kollagen Typ 2 exprimierende Zellen geringe Auswirkungen auf die VEGF-Expression und dadurch auf das Knochenwachstum hat.

Der Großteil der verfügbaren Literatur unterstreicht die essentielle Rolle eines im Gleichgewicht befindlichen Nrf2-Spiegels auf das Knochen- und Knorpelwachstum. Bei einer generellen Nrf2-Hyperaktivierung in Keap1-defizienten Mäusen, die durch Deletion des ösophagealen Nrf2 in Keap1-Null-Mäusen generiert wurden, sind eine kleinere Körpergröße und eine geringere Knochendichte zu beobachten (Yoshida et al., 2018). Zudem führt ein Nrf2-Mangel zu verringerten Knochenlängen und -dicken (Kubo et al., 2022). Eine im Gleichgewicht befindliche Aktivierung von Nrf2 durch Unterbrechung von Keap1 führt hingegen zu einem Anstieg der Knochenbildungsrate, einer Reduzierung der Osteoklastenzellen insbesondere bei männlichen Mäusen, einem verringerten CTx (Carboxyterminales Typ-I-Kollagen-Telopeptid x) -Spiegel und einer erhöhten Knochenmasse (Yin et al., 2020).

Die gewonnenen Erkenntnisse in dieser Arbeit unterstützen eingeschränkt die Beobachtungen, dass ein Mangel sowie eine Hyperaktivierung von Col2-Nrf2 die Epiphysenfuge beeinträchtigen und sich damit auf das Längenwachstum und die Regeneration von Knorpel und Knochen auswirken. Ein geringeres Knochenwachstum und womöglich auch eine verminderte Körperlänge sowie Körpergröße sind die Folge.

5 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurde untersucht, wie sich die Nrf2-Ausschaltung in Kollagen Typ 2 exprimierende Zellen auf das chondrogene Differenzierungspotenzial von murinen MSCs auswirkt. Ebenfalls wurde mittels immunhistologischer Färbung untersucht, wie sich eine Nrf2-Hyperaktivierung in Kollagen Typ 2 exprimierende Zellen auf die VEGF-Expression in der tibialen Epiphysenfuge und dem Gelenkknorpel auswirkt. μ CT-Messungen dienten zusätzlich dem Vergleich der Femurlängen von Col2-Keap1/Nrf2-Cre⁺/Cre⁻-Mäusen.

Die ähnlichen Intensitäten der Alzianblau- und Safranin O-Färbungen nach 14 und 21 Tagen Differenzierung deuten auf einen fehlenden qualitativen Einfluss einer Col2-Nrf2-Ausschaltung auf die Bildung der Knorpelmatrix hin. Mittels Colorimetrie nachgewiesene semi-quantitative Unterschiede in der Absorptionsrate nach erfolgter Safranin O-Extraktion zeigen aber, dass die chondrogene Differenzierung von MSCs durch Nrf2 beeinflusst wird. Höhere Absorptionsraten wurden bei Col2-Nrf2-Cre⁺-Mäusen beobachtet.

Die VEGF-Expression innerhalb der hypertrophen Zone, der Proliferations- und der Reservezone der Epiphysenfuge von acht und zwölf Wochen alten Col2-Keap1-Cre⁺/Cre⁻-Mäusen wird begrenzt durch eine Col2-Nrf2-Hyperaktivierung beeinflusst.

μ CT-Messungen zeigen verkürzte Femurlängen bei Col2-Nrf2/Keap1-Cre⁺-Mäusen und deuten auf Wachstumseinschränkungen hin.

Die Ergebnisse geben Anhaltspunkte dazu, dass sowohl Nrf2-Defizite als auch eine Nrf2-Hyperaktivierung zu einem eingeschränkten Knorpel- und Knochenwachstum führen. Ein stabiler, moderater Col2-Nrf2-Spiegel während der chondralen Ossifikation ist daher für ein regelrechtes Knochenwachstum notwendig. Die Hypothese eines eingeschränkten Wachstums bei Col2-Nrf2/Keap1-Cre⁺-Mäusen trifft somit zu. Es kann unterstrichen werden, dass VEGF entgegen der Hypothese nicht der zentrale Nrf2-abhängige Mitspieler im Prozess der chondralen Ossifikation ist.

Als Limitationen sind mögliche Fehler bei der Zoneneinteilung der Epiphysenfuge zu nennen. Zukünftige Arbeiten sollten sich mit der Analyse anderer Wachstumsfaktoren beschäftigen. Zu diesen zählen IHH, *Parathormon-related*

Peptide sowie *Integrin-Binding Sialoprotein* (IBSP). Um den Einfluss einer Nrf2-Ausschaltung auf MSCs weiter zu analysieren, kann ein dreidimensionaler Aufbau des Differenzierungsversuchs mithilfe einer chondrogenen Sphäroidkultur hilfreich sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Almeida, M., Han, L., Ambrogini, E., Bartell, S. M., & Manolagas, S. C. (2010). Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF-kappaB in osteoblastic cells via a PKCbeta/p66shc signaling cascade: Counter regulation by estrogens or androgens. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(10), 2030–2037. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0189>
2. Al-Sawaf, O., Clarner, T., Fragoulis, A., Kan, Y. W., Pufe, T., Streetz, K., & Wruck, C. J. (2015). Nrf2 in health and disease: Current and future clinical implications. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 129(12), 989–999. <https://doi.org/10.1042/CS20150436>
3. Bai, X., Lu, D., Bai, J., Zheng, H., Ke, Z., Li, X., & Luo, S. (2004). Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.073>
4. Baird, L., & Yamamoto, M. (2020). The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 40(13), e00099-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.00099-20>
5. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1865(5), 721–733. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
6. Blanco, F. J., López-Armada, M. J., & Maneiro, E. (2004). Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis. *Mitochondrion*, 4(5–6), 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.022>
7. Brown, M. L., Yukata, K., Farnsworth, C. W., Chen, D.-G., Awad, H., Hilton, M. J., O'Keefe, R. J., Xing, L., Mooney, R. A., & Zuscik, M. J. (2014). Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PloS One*, 9(6), e99656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099656>
8. Cai, D., Yin, S., Yang, J., Jiang, Q., & Cao, W. (2015). Histone deacetylase inhibition activates Nrf2 and protects against osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17, 269. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0774-3>
9. Cao, Z., Huang, S., Dou, C., Xiang, Q., & Dong, S. (2018). Cyanidin suppresses autophagic activity regulating chondrocyte hypertrophic

- differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2332–2342. <https://doi.org/10.1002/jcp.26105>
10. Chang, S.-H., Giong, H.-K., Kim, D.-Y., Kim, S., Oh, S., Yun, U. J., Lee, J.-S., & Park, K. W. (2023). Activation of Nrf2 by sulfuretin stimulates chondrocyte differentiation and increases bone lengths in zebrafish. *BMB Reports*, 56(9), 496–501. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2023-0056>
11. Chen, C.-S., Tseng, Y.-T., Hsu, Y.-Y., & Lo, Y.-C. (2013). Nrf2-Keap1 antioxidant defense and cell survival signaling are upregulated by 17 β -estradiol in homocysteine-treated dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neuroendocrinology*, 97(3), 232–241. <https://doi.org/10.1159/000342692>
12. Chen, G., Deng, C., & Li, Y.-P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 272–288. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>
13. Chen, L., Liu, G., Li, W., & Wu, X. (2019). Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells following transfection with Indian hedgehog and sonic hedgehog using a rotary cell culture system. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 24, 16. <https://doi.org/10.1186/s11658-019-0144-2>
14. Chiu, L.-H., Lai, W.-F. T., Chang, S.-F., Wong, C.-C., Fan, C.-Y., Fang, C.-L., & Tsai, Y.-H. (2014). The effect of type II collagen on MSC osteogenic differentiation and bone defect repair. *Biomaterials*, 35(9), 2680–2691. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.005>
15. Dong, P.-F., Jin, C., Lian, C.-Y., Wang, L., & Wang, Z.-Y. (2022). Enhanced Extracellular Matrix Degradation in Growth Plate Contributes to Manganese Deficiency-Induced Tibial Dyschondroplasia in Broiler Chicks. *Biological Trace Element Research*, 200(7), 3326–3335. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02921-w>
16. Evans, K. D., & Oberbauer, A. M. (2008). Spatiotemporal Localization of VEGF-A Isoforms in the Mouse Postnatal Growth Plate. *The Anatomical Record*, 291(1), 6–13. <https://doi.org/10.1002/ar.20616>
17. Fragoulis, A., Tohidnezhad, M., Kubo, Y., Wruck, C. J., Craveiro, R. B., Bock, A., Wolf, M., Pufe, T., Jahr, H., & Suhr, F. (2023). The Contribution of the Nrf2/ARE System to Mechanotransduction in Musculoskeletal and Periodontal Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7722. <https://doi.org/10.3390/ijms24097722>

18. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
19. Garcia-Ramirez, M., Toran, N., Andaluz, P., Carrascosa, A., & Audi, L. (2000). Vascular endothelial growth factor is expressed in human fetal growth cartilage. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 15(3), 534–540. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.3.534>
20. 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), 623–628. <https://doi.org/10.1038/9467>
21. Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H., & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *Lancet (London, England)*, 386(9991), 376–387. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60802-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3)
22. Guo, Z., Lin, J., Sun, K., Guo, J., Yao, X., Wang, G., Hou, L., Xu, J., Guo, J., & Guo, F. (2022). Deferoxamine Alleviates Osteoarthritis by Inhibiting Chondrocyte Ferroptosis and Activating the Nrf2 Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 791376. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.791376>
23. Hamada, Y., Fujii, H., & Fukagawa, M. (2009). Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone*, 45 Suppl 1, S35–38. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.02.004>
24. Hinoi, E., Takarada, T., Fujimori, S., Wang, L., Iemata, M., Uno, K., & Yoneda, Y. (2007). Nuclear factor E2 p45-related factor 2 negatively regulates chondrogenesis. *Bone*, 40(2), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.08.016>
25. Hsu, D.-Z., Chu, P.-Y., & Jou, I.-M. (2016). Daily sesame oil supplement attenuates joint pain by inhibiting muscular oxidative stress in osteoarthritis rat model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 29, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.10.007>
26. Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 509–526. <https://doi.org/10.1172/JCI82585>

27. 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, 726590. <https://doi.org/10.1155/2014/726590>
28. Ichiseki, T., Matsumoto, T., Nishino, M., Kaneuji, A., & Katsuda, S. (2004). Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 9(5), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s00776-004-0816-1>
29. Ilyas, A., Odatsu, T., Shah, A., Monte, F., Kim, H. K. W., Kramer, P., Aswath, P. B., & Varanasi, V. G. (2016). Amorphous Silica: A New Antioxidant Role for Rapid Critical-Sized Bone Defect Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 5(17), 2199–2213. <https://doi.org/10.1002/adhm.201600203>
30. Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., & Nabeshima, Y. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>
31. Kanzaki, H., Shinohara, F., Kajiya, M., & Kodama, T. (2013). Pellegrini. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(32), 23009–23020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478545>
32. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
33. Kim, J.-H., Singhal, V., Biswal, S., Thimmulappa, R. K., & DiGirolamo, D. J. (2014). Nrf2 is required for normal postnatal bone acquisition in mice. *Bone Research*, 2, 14033. <https://doi.org/10.1038/boneres.2014.33>
34. Kimball, J. S., Johnson, J. P., & Carlson, D. A. (2021). Oxidative Stress and Osteoporosis. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 103(15), 1451–1461. <https://doi.org/10.2106/JBJS.20.00989>
35. Kong, P., Chen, G., Jiang, A., Wang, Y., Song, C., Zhuang, J., Xi, C., Wang, G., Ji, Y., & Yan, J. (2016). Sesamin inhibits IL-1 β -stimulated inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes by activating Nrf2 signaling

- pathway. *Oncotarget*, 7(50), 83720–83726. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13360>
36. Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T. C., Yang, J., Qu, J., Liu, G.-H., & Misteli, T. (2016). Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell*, 165(6), 1361–1374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.017>
37. Kubo, Y., Drescher, W., Fragoulis, A., Tohidnezhad, M., Jahr, H., Gatz, M., Driessen, A., Eschweiler, J., Tingart, M., Wruck, C. J., & Pufe, T. (2021). Adverse Effects of Oxidative Stress on Bone and Vasculature in Corticosteroid-Associated Osteonecrosis: Potential Role of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 in Cytoprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 35(5), 357–376. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8163>
38. 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. (2022). Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) deficiency causes age-dependent progression of female osteoporosis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 23(1), 1015. <https://doi.org/10.1186/s12891-022-05942-1>
39. Kubo, Y., Wruck, C. J., Fragoulis, A., Drescher, W., Pape, H. C., Lichte, P., Fischer, H., Tohidnezhad, M., Hildebrand, F., Pufe, T., & Jahr, H. (2019). Role of Nrf2 in Fracture Healing: Clinical Aspects of Oxidative Stress. *Calcified Tissue International*, 105(4), 341–352. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00576-3>
40. Kweider, N., Fragoulis, A., Rosen, C., Pecks, U., Rath, W., Pufe, T., & Wruck, C. J. (2011). Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2 (Nrf2): Implications for preeclampsia. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 42863–42872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286880>
41. Li, F., Truong, V. X., Fisch, P., Levinson, C., Glattauer, V., Zenobi-Wong, M., Thissen, H., Forsythe, J. S., & Frith, J. E. (2018). Cartilage tissue formation through assembly of microgels containing mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 77, 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.015>
42. Li, L., Pan, H., Wang, H., Li, X., Bu, X., Wang, Q., Gao, Y., Wen, G., Zhou, Y., Cong, Z., Yang, Y., Tang, C., & Liu, Z. (2016). Interplay between VEGF and

- Nrf2 regulates angiogenesis due to intracranial venous hypertension. *Scientific Reports*, 6, 37338. <https://doi.org/10.1038/srep37338>
43. Linkhart, T. A., Mohan, S., & Baylink, D. J. (1996). Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*, 19(1 Suppl), 1S-12S. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(96\)00138-x](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(96)00138-x)
 44. 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), 349–361. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9900-5>
 45. Liu, Y., Berendsen, A. D., Jia, S., Lotinun, S., Baron, R., Ferrara, N., & Olsen, B. R. (2012). Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3101–3113. <https://doi.org/10.1172/JCI61209>
 46. Ludtmann, M. H. R., Angelova, P. R., Zhang, Y., Abramov, A. Y., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). Nrf2 affects the efficiency of mitochondrial fatty acid oxidation. *The Biochemical Journal*, 457(3), 415–424. <https://doi.org/10.1042/BJ20130863>
 47. Marin, C., Luyten, F. P., Van der Schueren, B., Kerckhofs, G., & Vandamme, K. (2018). The Impact of Type 2 Diabetes on Bone Fracture Healing. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00006>
 48. Mayr-Wohlfart, U., Waltenberger, J., Hausser, H., Kessler, S., Günther, K.-P., Dehio, C., Puhl, W., & Brenner, R. E. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, 30(3), 472–477. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(01\)00690-1](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00690-1)
 49. Miura, Y. (2004). Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *Journal of Radiation Research*, 45(3), 357–372. <https://doi.org/10.1269/jrr.45.357>
 50. Mody, N., Parhami, F., Sarafian, T. A., & Demer, L. L. (2001). Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(4), 509–519. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00610-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00610-4)
 51. Mont, M. A., Jones, L. C., & Hungerford, D. S. (2006). Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: Ten years later. *The Journal of Bone and*

- Joint Surgery. American Volume*, 88(5), 1117–1132.
<https://doi.org/10.2106/JBJS.E.01041>
52. Ouyang, Y., Wang, W., Tu, B., Zhu, Y., Fan, C., & Li, Y. (2019). Overexpression of SOX9 alleviates the progression of human osteoarthritis in vitro and in vivo. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 2833–2842.
<https://doi.org/10.2147/DDDT.S203974>
 53. 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, 36–46.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.01.025>
 54. 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), e0171161.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171161>
 55. Peng, H., Wright, V., Usas, A., Gearhart, B., Shen, H.-C., Cummins, J., & Huard, J. (2002). Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(6), 751–759. <https://doi.org/10.1172/JCI15153>
 56. Petersen, W., Tsokos, M., & Pufe, T. (2002). Expression of VEGF121 and VEGF165 in hypertrophic chondrocytes of the human growth plate and epiphyseal cartilage. *Journal of Anatomy*, 201(2), 153–157.
<https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00085.x>
 57. Pufe, T., Lemke, A., Kurz, B., Petersen, W., Tillmann, B., Grodzinsky, A. J., & Mentlein, R. (2004). Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *The American Journal of Pathology*, 164(1), 185–192. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63109-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63109-4)
 58. Rushmore, T. H., Morton, M. R., & Pickett, C. B. (1991). Marche. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(18), 11632–11639.
 59. Saetan, N., Honsawek, S., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Meknavin, S., Ngarmukos, S., Tanpowpong, T., & Parkpian, V. (2014). Relationship of plasma and synovial fluid vascular endothelial growth factor with radiographic severity in primary knee osteoarthritis. *International Orthopaedics*, 38(5), 1099–1104. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2192-y>
 60. Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J.-H., Yagita, H., Okumura, K., Doi, T., & Nakano, H. (2003). NF-kappaB

- inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *The EMBO Journal*, 22(15), 3898–3909. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg379>
61. Schmidlin, C. J., Zeng, T., Liu, P., Wei, Y., Dodson, M., Chapman, E., & Zhang, D. D. (2020). Chronic arsenic exposure enhances metastatic potential via NRF2-mediated upregulation of SOX9. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 402, 115138. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115138>
 62. Schraven, S., Rosenhain, S., Brueck, R., Wiechmann, T. M., Pola, R., Etrych, T., Lederle, W., Lammers, T., Gremse, F., & Kiessling, F. (2023). Dye labeling for optical imaging biases drug carriers' biodistribution and tumor uptake. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 48, 102650. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2023.102650>
 63. Schröder, K. (2019). NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 132, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.036>
 64. Sieker, J. T., Kunz, M., Weißenberger, M., Gilbert, F., Frey, S., Rudert, M., & Steinert, A. F. (2015). Direct bone morphogenetic protein 2 and Indian hedgehog gene transfer for articular cartilage repair using bone marrow coagulates. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(3), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.11.008>
 65. Solomon, L. A., Bérubé, N. G., & Beier, F. (2008). Transcriptional regulators of chondrocyte hypertrophy. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(2), 123–130. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20124>
 66. Stempel, J., Fritsch, H., Pfaller, K., & Blumer, M. J. F. (2011). Development of articular cartilage and the metaphyseal growth plate: The localization of TRAP cells, VEGF, and endostatin. *Journal of Anatomy*, 218(6), 608–618. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01377.x>
 67. 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, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.12.066>
 68. Tarkka, T., Sipola, A., Jämsä, T., Soini, Y., Ylä-Herttuala, S., Tuukkanen, J., & Hautala, T. (2003). Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. *The Journal of Gene Medicine*, 5(7), 560–566. <https://doi.org/10.1002/jgm.392>

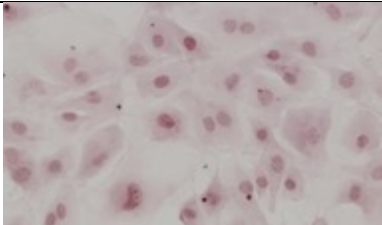
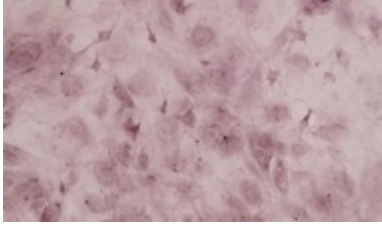
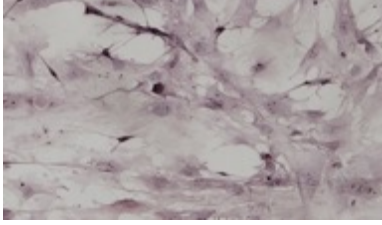
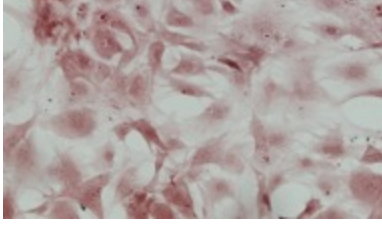
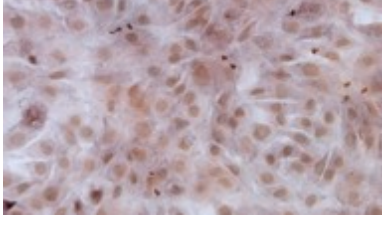
69. Taylor, E. L., Collins, J. A., Gopalakrishnan, P., Chubinskaya, S., & Loeser, R. F. (2023). Age and oxidative stress regulate Nrf2 homeostasis in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 31(9), 1214–1223. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.05.004>
70. Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q., & Sha, H. (2019). The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging and Disease*, 10(3), 637–651. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0513>
71. van den Berg, W. B. (1999). The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Zeitschrift Fur Rheumatologie*, 58(3), 136–141. <https://doi.org/10.1007/s003930050163>
72. Vanella, L., Sanford, C., Kim, D. H., Abraham, N. G., & Ebraheim, N. (2012). Oxidative stress and heme oxygenase-1 regulated human mesenchymal stem cells differentiation. *International Journal of Hypertension*, 2012, 890671. <https://doi.org/10.1155/2012/890671>
73. Wang, Y., Teichtahl, A. J., & Cicuttini, F. M. (2016). Osteoarthritis year in review 2015: Imaging. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.07.027>
74. Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S. R., Boussein, M. L., Faugere, M.-C., Guldberg, R. E., Gerstenfeld, L. C., Haase, V. H., Johnson, R. S., Schipani, E., & Clemens, T. L. (2007). The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(6), 1616–1626. <https://doi.org/10.1172/JCI31581>
75. Wruck, C. J., Fragoulis, A., Gurzynski, A., Brandenburg, L.-O., Kan, Y. W., Chan, K., Hassenpflug, J., Freitag-Wolf, S., Varoga, D., Lippross, S., & Pufe, T. (2011). Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: Insights from the Nrf2-knockout mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(5), 844–850. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.132720>
76. Wu, J., Williams, D., Walter, G. A., Thompson, W. E., & Sidell, N. (2014). Estrogen increases Nrf2 activity through activation of the PI3K pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Experimental Cell Research*, 328(2), 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.030>
77. Xu, Z.-S., Wang, X.-Y., Xiao, D.-M., Hu, L.-F., Lu, M., Wu, Z.-Y., & Bian, J.-S. (2011). Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-

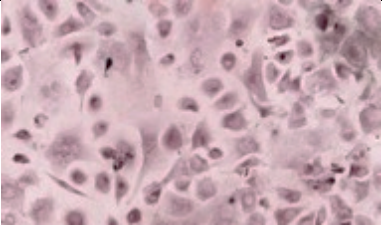
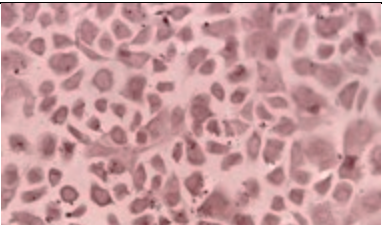
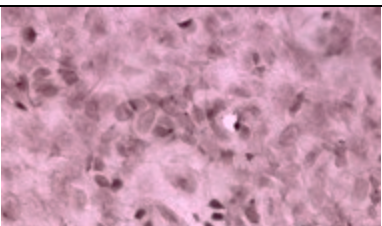
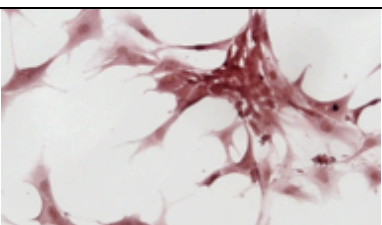
- induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(10), 1314–1323. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.016>
78. Yamamoto, T., Irida, T., Sugioka, Y., & Sueishi, K. (1997). Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: Corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis and Rheumatism*, 40(11), 2055–2064. <https://doi.org/10.1002/art.1780401119>
 79. Yamasaki, N., Tsuboi, H., Hirao, M., Nampei, A., Yoshikawa, H., & Hashimoto, J. (2009). High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor. *Bone*, 44(1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.09.015>
 80. Ye, H., Cai, T., Shen, Y., Zhao, L., Zhang, H., Yang, J., Li, F., Chen, J., & Shui, X. (2024). MST1 knockdown inhibits osteoarthritis progression through Parkin-mediated mitophagy and Nrf2/NF-κB signalling pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(11), e18476. <https://doi.org/10.1111/jcmm.18476>
 81. Yeler, H., Tahtabas, F., & Candan, F. (2005). Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochemistry and Function*, 23(2), 137–139. <https://doi.org/10.1002/cbf.1199>
 82. 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), 348. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57185-1>
 83. Yoon, D. S., Choi, Y., & Lee, J. W. (2016). Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53-SIRT1 axis. *Cell Death & Disease*, 7(2), e2093. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.3>
 84. 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: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 23(5), 386–392. <https://doi.org/10.1111/gtc.12579>
 85. Yu, J., Zhao, Y., Li, B., Sun, L., & Huo, H. (2012). 17β-estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 26(7), 264–269. <https://doi.org/10.1002/jbt.21417>

86. Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y.-S., Fukai, N., Reginato, A. M., Lovejoy, S., D'Amore, P. A., & Olsen, B. R. (2002). Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 129(8), 1893–1904. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1893>
87. Zhang, Y., Hou, M., Liu, Y., Liu, T., Chen, X., Shi, Q., Geng, D., Yang, H., He, F., & Zhu, X. (2022). Recharge of chondrocyte mitochondria by sustained release of melatonin protects cartilage matrix homeostasis in osteoarthritis. *Journal of Pineal Research*, 73(2), e12815. <https://doi.org/10.1111/jpi.12815>
88. Zhou, X., Zhang, Y., Hou, M., Liu, H., Yang, H., Chen, X., Liu, T., He, F., & Zhu, X. (2022). Melatonin Prevents Cartilage Degradation in Early-Stage Osteoarthritis Through Activation of miR-146a/NRF2/HO-1 Axis. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 37(5), 1056–1072. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4527>

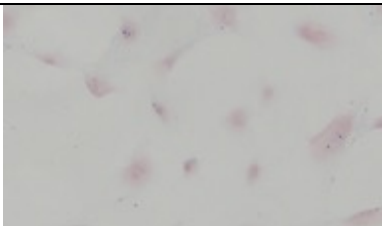
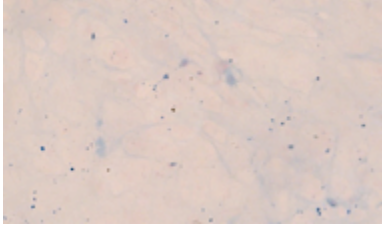
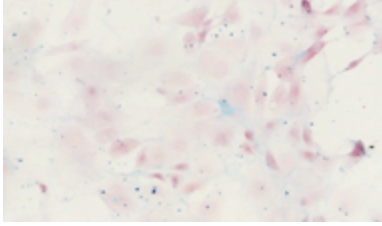
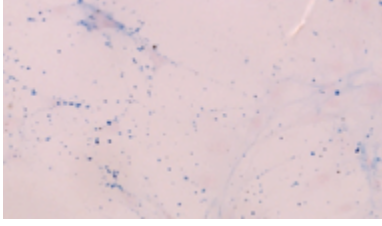
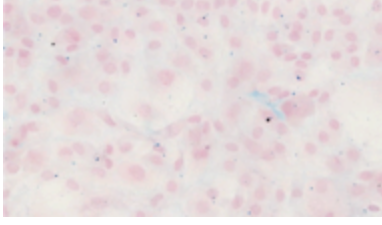
7 Anhang

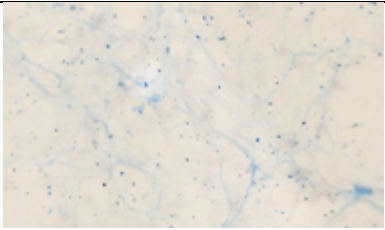
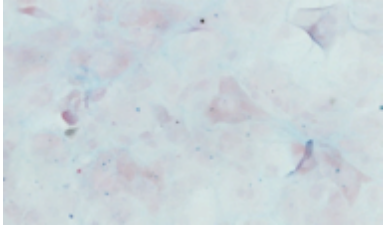
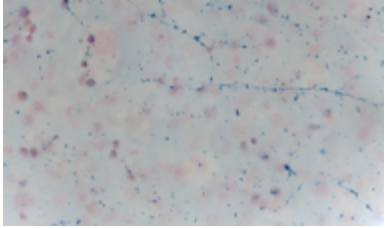
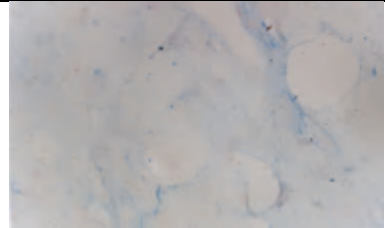
7.1 Intensitätsskala der Safranin O-Färbung

Skalierungswert	Beispielfärbung
1	
2	
3	
4	
5	
6	

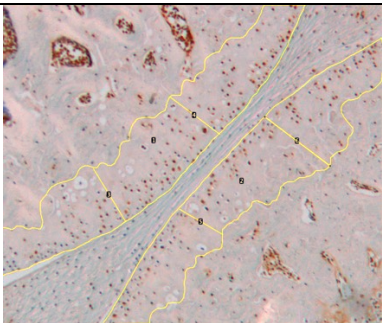
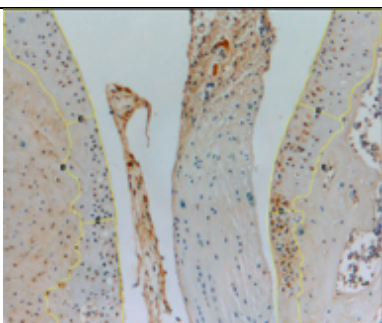
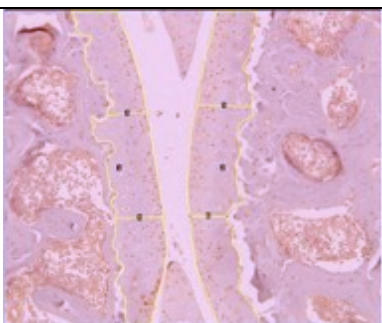
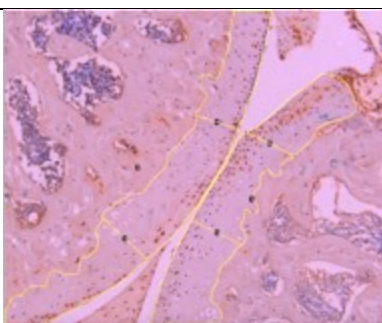
7	
8	
9	
10	

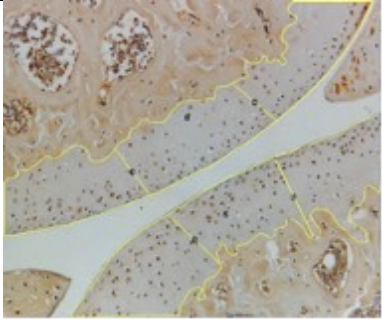
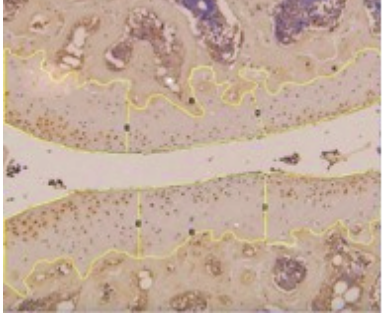
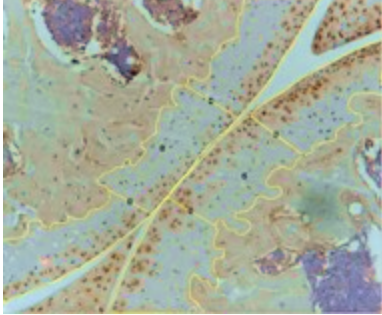
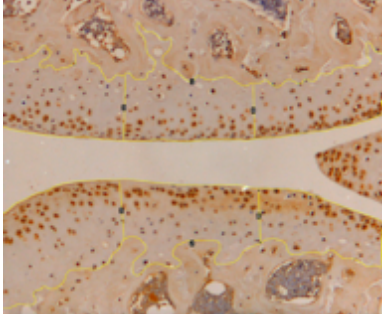
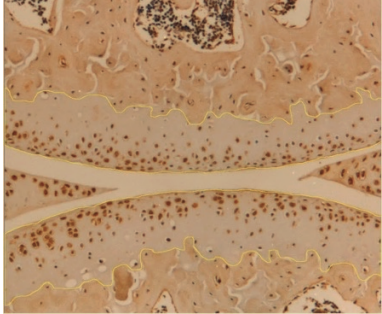
7.2 Intensitätsskala der Alzianblau-Färbung

Skalierungswert	Beispielfärbung
1	
2	
3	
4	
5	
6	

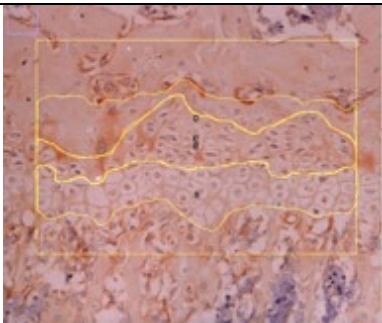
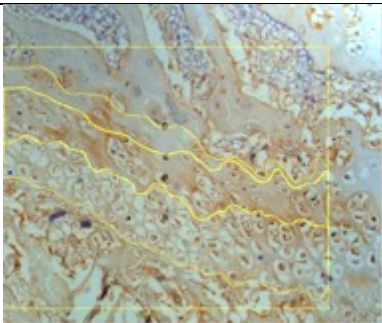
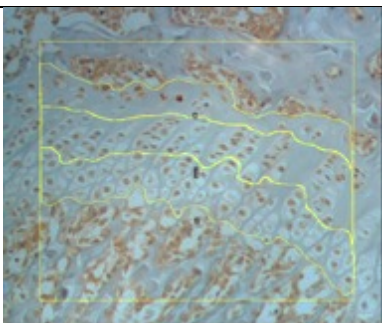
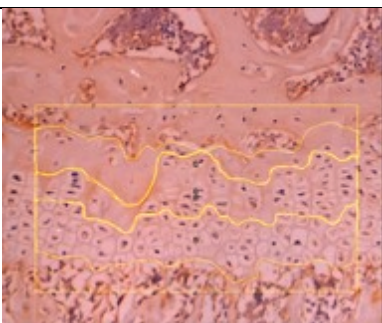
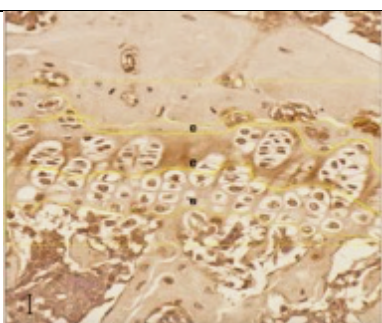
7	
8	
9	
10	

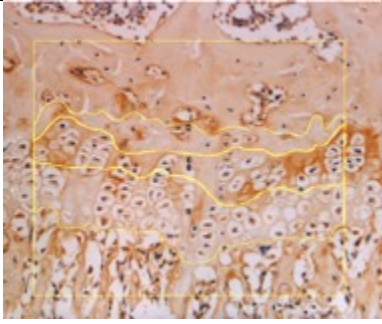
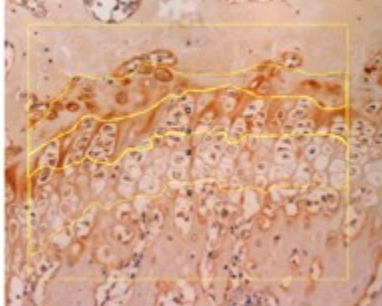
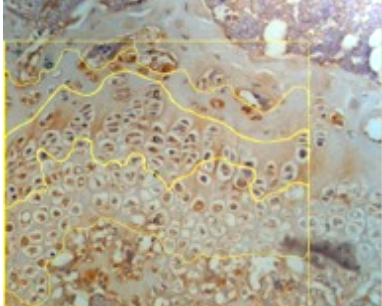
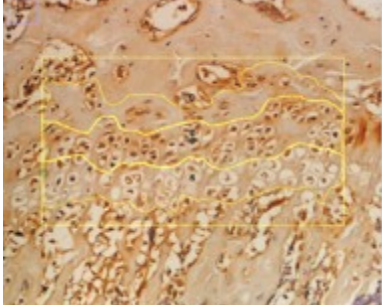
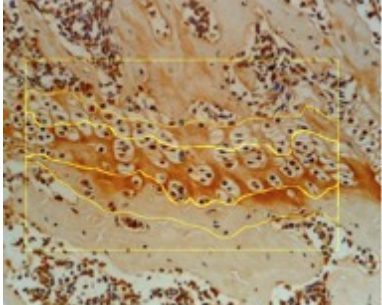
7.3 Intensitätsskala der VEGF-Gelenkflächenfärbung

Skalierungswert	Beispielfärbung
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	
10	

7.4 Intensitätsskala der Wachstumsfugenfärbung

Skalierungswert	Beispielfärbung
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	
9	
10	

7.5 Intensität der VEGF-Färbung innerhalb der Wachstumsfuge bei Col2-Keap1-Cre⁻- und Col2-Keap1-Cre⁺-Mäusen

Die Intensität der VEGF-Färbung unterschied sich zwischen den verschiedenen Gruppen der acht Wochen alten Mäuse nicht (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9708$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,5251$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,9617$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,2368$) (Abb. 39).

Die Färbungen zwölf Wochen alter Mäuse wiesen ebenso keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Intensität auf (Cre⁻, m vs. Cre⁺, m: $p = 0,9872$; Cre⁻, w vs. Cre⁺, w: $p = 0,5251$; Cre⁻, m vs. Cre⁻, w: $p = 0,9992$; Cre⁺, m vs. Cre⁺, w: $p = 0,7066$) (Abb. 39).

Beim Vergleich der beiden Grafiken war zu erkennen, dass die mittelwertige Intensität der VEGF-Färbung mit steigendem Alter zunimmt. Eine Ausnahme bildete dabei die Gruppe der weiblichen Col2-Keap1-Cre⁺-Mäuse, die auf einem konstant hohen Intensitätsgrad von fünf bis sechs verharrte (Abb. 39).

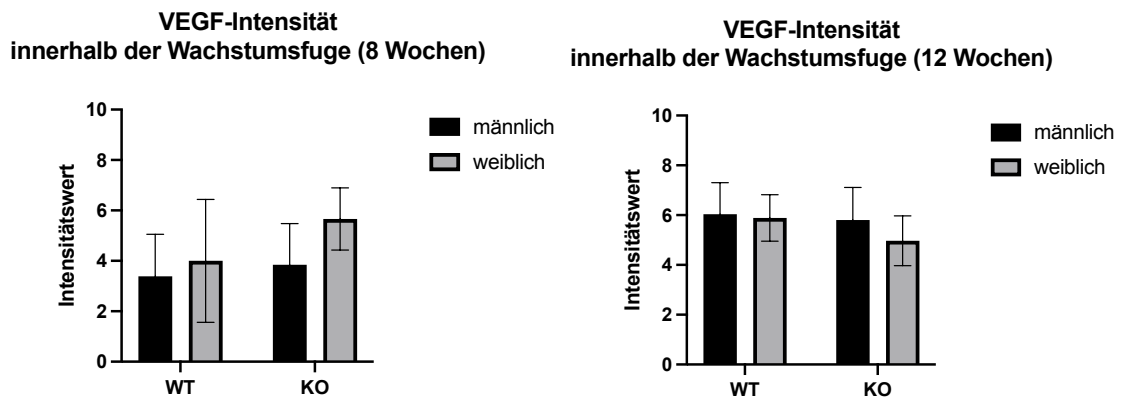


Abb. 39: Intensität der VEGF-Färbung innerhalb der Wachstumsfuge

A, B und C: Betrachtung acht Wochen (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: $n = 4$; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: $n = 3$; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: $n = 7$; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: $n = 6$; 2-way ANOVA) und zwölf Wochen alter Col2-Keap1-Cre⁻/WT- und Col2-Keap1-Cre⁺/KO-Mäuse (Col2-Keap1-Cre⁻/WT, m: $n = 3$; Col2-Keap1-Cre⁻/WT, w: $n = 6$; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, m: $n = 4$; Col2-Keap1-Cre⁺/KO, w: $n = 3$; 2-way ANOVA; * = $p < 0,05$), Mittelwerte $\pm$ SEM

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Mersedeh Tohidnezhad für die hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Zudem danke ich dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), mit dessen Unterstützung die Arbeit unter der Projektnummer OC1-1 erfolgte. Außerdem möchte ich mich bei allen medizinisch-technischen Angestellten sowie den anderen Promovierenden bedanken, die mir im Rahmen meiner Promotion mit Rat und produktiven Gesprächen zur Seite standen. Des Weiteren möchte ich meinen Dank an die Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Molekulare Bildgebung (ExMI) Frau Elena Rama sowie Frau Susanne Koletnik und Herrn Jan Erik Schuhmacher für die Zurverfügungstellung der MRI-Bilder und μ CT-Aufnahmen aussprechen. Ebenso danke ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe für die Ermöglichung dieser Promotion.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

in dem Institut für Anatomie und Zellbiologie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen bei meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Mersedeh Tohidnezhad sowie meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Fabian Schulz, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Der Einfluss von Nrf2 auf das Längenwachstum und die Regeneration von Knochen im Kollagen Typ 2-Nrf2/Keap1-Knock-Out-Mäusemodell“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe. Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Doktorand Herr Fabian Schulz	Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Mersedeh Tohidnezhad	Kooperations- partner ExMI	ANATZ MTAs	Doktorvater Herr Univ.- Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe	Summe (%)
Studienüberwachung		40			60	100
Studiendesign	60	20			20	100
Bereitstellung von Materialien		30			70	100
Durchführung <i>in vitro</i> Experiment + Analyse	100					100
Anfertigung histologischer Schnitte	50			50		100
Durchführung immun- und histologische Färbung + Analyse	100					100
Durchführung MRI- Untersuchung			100			100
Durchführung µCT- Untersuchung			100			100
Durchführung MRI- und µCT-Analyse	100					100
Statistik	100					100
Datenauswertung	100					100
Interpretation der Datenauswertung	60	20			20	100

Unterschrift des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Fabian Schulz.

Unterschrift des Doktorvaters