

Kurzzusammenfassung

In vitro Studien lassen vermuten, daß Annexine in kalziumabhängiger Weise Matrixvesikel und extrazelluläres Kollagen X binden und über ihre postulierte Kalziumkanalfunktion den Influx von Kalziumionen in die Vesikel regulieren. Bisher konnte dieses Mineralisierungsmodell *in vivo* jedoch nicht bestätigt werden, da gendefiziente Mäuse für die Annexine AnxA5 und AnxA6 keine offensichtlichen Störungen in der Skelettentwicklung und Kalzifizierung der Röhrenknochen aufwiesen. Auf Grund ihrer ähnlichen Proteinstruktur und funktionalen Eigenschaften könnte das Fehlen des jeweiligen Annexins durch das noch vorhandene Annexin kompensiert werden. Zur Untersuchung der Relevanz von Annexin-Kollagen Wechselwirkungen für die Knorpelkalzifizierung *in vivo* wurden daher Mausstämmen etabliert, denen die einzelnen Annexine AnxA5 oder AnxA6, beide Annexine, Kollagen X oder alle drei Proteine gleichzeitig fehlen. Die Skelettentwicklung wurde in neugeborenen, juvenilen und adulten Mäusen mittels histochemischer, immunhistologischer, computertomographischer sowie ultrastruktureller Methoden detailliert analysiert. In Neugeborenen konnten im Skelettaufbau keine Unterschiede zwischen Wildtyp-Mäusen und Mutanten festgestellt werden. Die Verteilung der von Kossa angefärbten Mineralablagerungen in Paraffinschnitten der Hinterbeine der Mutanten unterschied sich nicht von Wildtyp-Tieren. Allerdings war in *Col10*^(-/-) und *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-)/*Col10*^(-/-) Tieren die Fläche der prähypertrophen/hypertrophen Wachstumsfugenzone im Vergleich zu Wildtyp- und *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-) Mäusen vergrößert und die Anzahl der Chondrozyten signifikant erhöht. In histochemisch angefärbten Paraffinschnitten der Femora von juvenilen zwei Wochen, sowie ein Monat alten *Col10*^(-/-) und *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-)/*Col10*^(-/-) Tieren konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr beobachtet werden. Die Verteilung von Proteoglykanen, Kollagenen (II, X und IX), COMP und Matrilin 3 in der extrazellulären Matrix der Wachstumsfuge unterschied sich in allen untersuchten Mutanten nicht von Wildtyp-Kontrolltieren. Periphere quantitative Computertomographie Messungen der Femora von ein Monat und ein Jahr alten mutanten Mäusen zeigten keine Veränderungen in der Mineralisierung, jedoch wiesen *Col10*^(-/-) und *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-)/*Col10*^(-/-) Mäuse einen verringerten peri- und endostealen Umfang des diaphysialen Kortikalknochens auf. Durch ultrastrukturelle Analyse der Wachstumsfugen juveniler mutanter Tiere konnten keine auffälligen Abweichungen in der Morphologie und Verteilung der Matrixvesikel nachgewiesen werden. Mögliche kompensatorische Wirkungen durch differentielle Expression der verbleibenden Annexine konnten mit Hilfe von quantitativer PCR- und

Microarray-Analysen in *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-) Tieren auf RNA-Ebene ausgeschlossen werden. Mittels Durchflusszytometrie wurden geringfügige Unterschiede in der Anzahl reifer IgM+/IgD+ B-Zellen des Knochenmarks in ein Monat alten mutanten Tieren nachgewiesen. Deren Zellzahlen waren sowohl im Knochenmark als auch in der Milz von ein Jahr alten *Col10*^(-/-) und *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-)/*Col10*^(-/-) Tieren deutlich erhöht. Die Menge an CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen war in der Milz von ein Monat sowie ein Jahr alten *Col10*^(-/-) bzw. *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-)/*Col10*^(-/-) Mäusen signifikant verändert.

Diese Analyse bestätigte, daß geringfügige Veränderungen der Chondrozytendifferenzierung, wie am Beispiel der Kollagen X geninaktivierten Mäuse gezeigt, Auswirkungen auf die Knochenarchitektur und sekundär auf die Blutzellenbildung im Knochenmark zur Folge haben können. Das Modell der Annexin-Kollagen vermittelten Mineralisierung konnte jedoch nicht bestätigt werden, da das Fehlen der Annexine AnxA5 und AnxA6 keine Verschlechterung des Phänotyps in *Anxa5*^(-/-)/*Anxa6*^(-/-)/*Col10*^(-/-) Mäusen hervorrief. Folglich belegt diese Arbeit die Bedeutung des Kollagen X für die enchondrale Ossifikation und hämatopoetische Differenzierung, während sie die Relevanz der Annexine AnxA5 und AnxA6 für diese Prozesse in Frage stellt.