

**Analysis of the underlying mechanism of Retinoic
Acid-induced calvarial fragmentation in zebrafish
(*Danio rerio*)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Barbara Maria Ohlebusch

aus Immenstadt, Deutschland

Berichtersteller/in:

Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt

Prof. Martin Scaal

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Niels Gehring

Tag der mündlichen Prüfung:

11.04.2024

Summary

Retinoic acid (RA) is a potent signaling molecule that plays crucial roles in various aspects of vertebrate development including the formation of the skeletal system. Elevated RA levels can cause an array of bone-related phenotypes, such as growth arrest, ectopic mineralization, and bone fragmentation in developing zebrafish larvae and even in human fetuses (Laue et al., 2011). A previous study reported that RA-induced fragmentation of the calvarial plates of the skull involves a premature and increased transition of osteoblasts to pre-osteocytes, which in turn leads to aberrant activation of bone-resorbing osteoclasts (Jeradi and Hammerschmidt 2016). However, the RA-induced calvarial fragmentation always appears in very spatially restricted areas in the vicinity of underlying cartilaginous structures. Therefore, the aim of this thesis was to elucidate the putative necessity or involvement of cartilage at the site of calvarial fragmentation after RA exposure.

In zebrafish, the most prominent site of RA-induced calvarial fragmentation occurs within the frontal plates above a lateral cartilaginous crosslink connecting both sides of the skull called the epiphyseal bar (eb). While the study by Jeradi and Hammerschmidt (2016) identified osteoblastic cells in close proximity to bone-resorbing osteoclasts at the site of fragmentation as *cyp26b1*-expressing cells, a direct transcriptional target of RA signaling, I show that chondrocytes in the eb are also, if not the most RA-responsive cells.

While investigating whether chondrocytes in the eb are required for RA-induced calvarial fragmentation using a pharmaco-genetically controlled cell-ablation approach, I discovered that an RA-induced immune response also plays a role in RA-induced fragmentation. This result developed from inconclusive chondrocyte-specific ablation experiments, where the natural anti-inflammatory antibiotic potential of the drugs used for cell-ablation already abolished RA-induced fragmentation in WT background alone.

However, to better understand the underlying signaling mechanisms of RA-induced calvarial fragmentation, I performed a comparative RNA sequencing analysis of osteoblastic cell- vs. chondrocyte-ablated skulls. The combined results of RNA sequencing analysis and accompanying HCR staining identified several matrix metalloproteinases (mmp) encoding

genes such as *mmp9*, *mmp13b*, and *mmp14b* as specifically upregulated upon RA treatment in chondrocytes of the eb and resorbing osteoclasts at the site of fragmentation.

MMPs are known enzymes involved in the remodeling and degradation of the extracellular matrix (ECM). When MMPs are over-activated, they can cause excessive degradation of ECM in cartilage and bone, such as in the joints of patients with late-stage osteoarthritis (OA). I discovered that an excessive ECM degradation also occurs within and above the eb after RA exposure via Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging. Furthermore, TEM images revealed that the loosened intermediate space between eb and overlying calvarial plates which is due to ECM-degradation of secreted Mmps by RA-stimulated chondrocytes paves the way for osteoclast infiltration.

Furthermore, I was also able to alleviate the RA-induced calvarial fragmentation via pharmacological inhibition of Mmp13 proving that Mmp13-activity is necessary for RA-induced calvarial fragmentation.

Although the consequences of RA-induced calvarial fragmentation fit a severe OA-like phenotype with increased Mmp expression and activity, ECM degradation involving cartilage and bone, and a typical immune response, in zebrafish this all occurs at the calvaria and not in a synovial joint as in humans. Nevertheless, the very close proximity of bone and cartilage, the rather hypertrophic character of the chondrocytes in the eb, and a kind of joint cavity formed by the perichondrium around the eb, which connects the cartilaginous structure to the overlying bone and serves as a kind of synovial membrane, are all components comparable to those of a synovial joint in humans.

Taken together, my results demonstrate that RA-induced calvarial fragmentation in zebrafish is caused by mechanisms that mimic an OA-like phenotype in humans to a degree not yet shown in zebrafish. Thus, RA-induced calvarial fragmentation in zebrafish may serve as a potential *novel* model for OA, providing deeper insights into the pathobiology of this disabling disease of an aging human population.

Zusammenfassung

Retinsäure (RA) ist ein potentes Signalmolekül, das wesentliche Rollen in verschiedenen Aspekten der Wirbeltierentwicklung spielt, einschließlich der Bildung des Skelettsystems. Ein erhöhter RA-Spiegel kann in sich entwickelnden Zebrafischlarven als auch in menschlichen Föten eine Reihe von knochenbezogenen Phänotypen verursachen, wie z.B. Wachstumsstillstand, ektopische Mineralisierung und Knochenfragmentierung (Laue et al., 2011). Eine vorhergehende Studie zeigte, dass die durch RA induzierte Fragmentierung der Schädelplatten eine vorzeitige und erhöhte Differenzierung von Osteoblasten zu Prä-Osteozyten beinhaltet, was wiederum zu einer aberranten Aktivierung knochenresorbierender Osteoklasten führt (Jeradi und Hammerschmidt 2016). Allerdings tritt die durch RA induzierte Schädelplattenfragmentierung immer in räumlich sehr eingeschränkten Bereichen und in der Nähe von darunter liegenden knorpeligen Strukturen auf. Daher war das Ziel dieser Arbeit, zu klären, ob eine mögliche Notwendigkeit oder Beteiligung von Knorpel an der Stelle der Schädelplattenfragmentierung nach RA-Exposition vorhanden ist oder nicht.

Beim Zebrafisch tritt die prominenteste Stelle der durch RA induzierten Schädelplattenfragmentierung innerhalb der Frontalplatten oberhalb einer lateralen knorpeligen Querverbindung auf, die beide Seiten des Schädels verbindet und als Epiphysenbalken (engl. epiphyseal bar (eb)) bezeichnet wird. Während in der Studie von Jeradi und Hammerschmidt (2016) osteoblastische Zellen in unmittelbarer Nähe zu knochenresorbierenden Osteoklasten an der Fragmentierungsstelle als *cyp26b1*-exprimierende Zellen identifiziert wurden, was ein direktes transkriptionelles Zielgen des RA-Signalweges ist, zeige ich, dass Chondrozyten im eb ebenfalls, wenn nicht sogar am stärksten auf RA reagieren.

Bei der Untersuchung der Frage, ob Chondrozyten im eb für die RA induzierte Schädelplattenfragmentierung notwendig sind, habe ich mit Hilfe eines pharmako-genetisch kontrollierten Zellablationsansatzes entdeckt, dass eine RA-induzierte Immunantwort ebenfalls eine Rolle, bei der durch RA-induzierten Fragmentierung spielt. Dieses Ergebnis ergab sich aus nicht schlüssigen chondrozyten-spezifischen Ablationsexperimenten, bei denen das natürliche entzündungshemmende antibiotische Potenzial der für die Zellablation

verwendeten Medikamente bereits die RA-induzierte Fragmentierung allein im WT-Hintergrund aufhob.

Um die zugrunde liegenden Signalmechanismen der durch RA induzierten Schädelplattenfragmentierung besser zu verstehen, führte ich eine vergleichende RNA-Sequenzierungsanalyse von osteoblastischen Zell- vs. Chondrozyten-ablatierten Schädelplatten durch. Die kombinierten Ergebnisse der RNA-Sequenzierungsanalyse und der begleitenden HCR-Färbung identifizierten mehrere Matrix-Metalloproteinasen (MMP) die für Gene wie *mmp9*, *mmp13b* und *mmp14b* kodieren und spezifisch in Chondrozyten des eb und in resorbierenden Osteoklasten an der Fragmentierungsstelle nach RA-Behandlung hochreguliert waren.

MMPs sind bekannte Enzyme, die an der Umgestaltung und dem Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt sind. Wenn MMPs überaktiviert sind, können sie einen übermäßigen Abbau der ECM in Knorpel und Knochen verursachen, wie es in den Gelenken von Patienten mit fortgeschrittener Osteoarthritis (OA) der Fall sein kann. Ich verifizierte anhand Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bilder, dass ein übermäßiger ECM-Abbau auch innerhalb und oberhalb der eb nach RA-Exposition auftritt. Darüber hinaus zeigten die TEM-Bilder, dass der aufgelockerte Zwischenraum zwischen eb und den darüber liegenden Schädelplatten, der auf den ECM-Abbau durch sekretiertes MMPs durch RA-stimulierten Chondrozyten zurückzuführen ist, den Weg für die Infiltration von Osteoklasten ebnet.

Darüber hinaus konnte ich die durch RA induzierte Schädelplattenfragmentierung durch pharmakologische Hemmung von *Mmp13* lindern, was beweist, dass die *Mmp13*-Aktivität für die durch RA induzierte Schädelplattenfragmentierung notwendig ist.

Obwohl die Konsequenzen der durch RA induzierten Schädelplattenfragmentierung einem schweren OA-ähnlichen Phänotypen mit erhöhter *Mmp*-Expression und -Aktivität, ECM-Abbau, der Knorpel und Knochen einbezieht, und einer typischen Immunantwort entsprechen, tritt dies bei Zebrafischen alles an den Schädelplatten und nicht in einem Synovialgelenk wie beim Menschen auf. Dennoch ist die Nähe von Knochen und Knorpel, der eher hypertrophe Charakter der Chondrozyten in der eb und eine Gelenkhöhlen-artige Struktur, gebildet durch ein eb-umgebendes Perichondrium, welches dadurch diese mit dem

darüber liegenden Knochen verbindet und als eine Art Synovialmembran dient, alles Komponenten, die mit einem Synovialgelenk beim Menschen vergleichbar sind.

Zusammengefasst zeigen meine Ergebnisse, dass die durch RA induzierte Schädelplattenfragmentierung bei Zebrafischen durch Mechanismen verursacht wird, die einem OA-ähnlichen Phänotypen beim Menschen in einem bisher bei Zebrafischen nicht gezeigten Ausmaß nachahmen. Daher könnte die durch RA induzierte Schädelplattenfragmentierung bei Zebrafischen als potenzielles neues Modell für OA dienen und tiefere Einblicke in die Pathobiologie dieser einschränkenden Krankheit einer alternden Bevölkerung bieten.