

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Muskuloskelettale Medizin (IMM)
Abteilung für Regenerative Muskuloskelettale Medizin
-Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Richard Stange-

Einfluss von kollagenbindenden Integrinen auf den
Frakturheilungsprozess
an der $\alpha 2$ -defizienten Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Louisa Dorothee Wendler
aus Minden

2020

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Richard Stange

2. Berichterstatter: PD Dr. Benedikt Schliemann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2020

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Abteilung für Regenerative Muskuloskelettale Medizin
- Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Richard Stange -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Richard Stange
Koreferent: PD Dr. Benedikt Schliemann

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss von kollagenbindenden Integrinen auf den Frakturheilungsprozess
an der $\alpha 2$ -defizienten Maus

Louisa Dorothee Wendler

Fragestellung: Studien zur Defizienz des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins im nativen Knochen zeigten, dass der Verlust dieses Proteins zu einer kompensatorischen Überproduktion von Kollagen Typ-I und konsekutiv zu veränderten ossären Eigenschaften führt. Die Ergebnisse dienten als Basis für Untersuchungen des Einflusses der Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Defizienz auf einen akuten Prozess des Knochenumbaus wie der Frakturheilung.

Methodik: Linke Femora 14 Wochen alter C57BL/6-Mäuse wurden frakturiert und mit einem intramedullären Implantat stabilisiert. Um den Verlauf des Frakturheilungsprozesses darzustellen, wurden die Femora 4, 7, 14 und 21 Tage nach Fraktursetzung auf zellulärer, molekulargenetischer und struktureller Ebene untersucht.

Ergebnisse: Bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz erfolgten die Formation des knorpeligen Kallus sowie die Bildung einer mineralisierten Matrix früher und in höherer Quantität. Im Heilungsverlauf zeigten sich eine erhöhte Expression der Knochenmarkergene und des Chondrozytenmarkers Sox9, ein vermehrter Gehalt der Cyclooxygenase-2, eine Überexpression des Integrins $\alpha 10$, eine verminderte Zellteilungsrate sowie ein erhöhter Kollagengehalt, ein größerer Trabekelabstand und dickeres Trabekelwerk.

Schlussfolgerung: Das Fehlen des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins führt zu einem akzelerierten Durchlaufen der Frakturheilungsphasen. Eine höhere Expression der Knochenmarkergene weist auf eine gesteigerte osteoblastäre Differenzierung hin. Die gesteigerte Expression der COX-2 suggeriert eine vermehrte Prostaglandinsynthese mit positiv chondro- und osteogenen Effekten. Integrin $\alpha 10$ ist bei Fehlen des $\alpha 2$ -Integrins kompensatorisch erhöht. Die abweichende Architektur des Kallus lässt eine veränderte Biomechanik mit fraglich höherer Stabilität des Frakturkallus vermuten.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2020

Tierversuchsgenehmigung vom 19.01.2012 Aktenz.: 84-02.04.2012.A016

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Louisa Dorothee Wendler, an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

*„Einfluss von kollagenbindenden Integrinen auf den Frakturheilungsprozess
an der α 2-defizienten Maus“*

selbstständig angefertigt,

nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten
angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material
verwendet, keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder
ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder
zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Louisa Dorothee Wendler

Münster, den 24.09.2019

*Für Oma Hicky und Opa Dieter,
die mich stets auf meinem Weg begleiten.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Integrine	1
1.1.1	Kollagenbindende Integrine.....	2
1.2	Knöcherner Bewegungsapparat	7
1.2.1	Morphologie und Aufbau	7
1.2.2	Entwicklung des Knochens	7
1.2.3	Modeling und Remodeling.....	8
1.2.4	Frakturheilung	11
1.3	Zielsetzung der Arbeit.....	15
2	Material.....	16
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Laborgeräte	16
2.3	Chemikalien und Pharmaka.....	17
2.3.1	Biochemikalien	18
2.3.2	Puffermedien	20
2.3.3	Verbrauchsmaterial und Hilfsmittel.....	20
2.3.4	Software	21
3	Methoden	22
3.1	Die Integrin α 2-defiziente Maus	22
3.1.1	Gruppeneinteilung	22
3.1.2	Operation der Tiere	23

3.1.3 Tötung und Präparation der Tiere	27
3.1.4 Methoden der Probenverarbeitung.....	28
3.1.5 Histomorphologische Analyse des Frakturkallus	29
3.1.6 Quantifizierung des Kollagengehaltes im Kallus	36
3.1.7 Analyse der Morphologie des Kallus mittels μ CT.....	38
3.1.8 Genexpressionsanalytik	40
3.1.9 Datenanalyse & Statistik	47
4 Ergebnisse	47
4.1 Klinische und bildgebende Kontrolle.....	47
4.2 Histomorphologische Evaluation des Frakturkallus.....	48
4.2.1 Alcianblau	48
4.2.2 Kollagen Typ II	50
4.2.3 Kollagen Typ X	52
4.2.4 Masson-Goldner: Mineralisierung	54
4.2.5 Kallusgröße	56
4.2.6 TRAP: Anzahl Osteoklasten.....	57
4.2.7 BrdU: Zellproliferation (Zellen in der S-Phase)	59
4.2.8 COX-2: Inflammationsmarker	60
4.3 Colorimetrische Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes	63
4.4 Radiographische Bestimmung der Kallusmorphologie.....	64
4.4.1 Bone volume / Tissue volume (BV/TV)	64
4.4.2 Bone surface / Bone volume (BS/BV)	66
4.4.3 Trabecular Number	68

4.4.4 Trabecular Separation	70
4.4.5 Trabecular Thickness	72
4.5 Genexpressionsanalytik.....	74
4.5.1 Ergebnisse 7 Tage nach Fraktursetzung	74
4.5.2 Ergebnisse 4 Tage nach Fraktursetzung	79
5 Diskussion	80
6 Zusammenfassung.....	92
7 Literaturverzeichnis	94
8 Abkürzungsverzeichnis	105
9 Danksagung	108
10 Lebenslauf.....	109
11 Anhang.....	I
11.1 Protokoll 1: Masson-Goldner-Trichrom	I
11.2 Protokoll 2: Alcianblau	II
11.3 Protokoll 3: Tartrat Resistente Saure Phosphatase	III
11.4 Protokoll 4: Anti-BrdU	IV
11.5 Protokoll 5: Anti-COX-2	VI
11.6 Protokoll 6: Anti-Kollagen II und -X.....	VII
11.7 Protokoll 7: Extraktion von RNA aus Gewebe.....	VIII
11.8 Protokoll 8: cDNA-Synthese aus RNA.....	IX

1 Einleitung

1.1 Integrine

Voraussetzung für die korrekte Funktionalität hinsichtlich Morphogenese, Homöostase und Integrität einer Zelle im Gewebsverband ist ihre Fähigkeit zur Kommunikation untereinander und mit ihrer Umgebung. Fokale Bindungsstellen an der Plasmamembran, sogenannte Zelladhäsionsmoleküle oder CAMs (cell-adhesion molecules), registrieren ankommende Signale und kontrollieren darüber Vorgänge wie Zellmigration, -proliferation, -überleben und -differenzierung. Die Signaltransduktion erfolgt über zytoplasmatische CAM-Domänen, die mit dem Zytoskelett der adressierten Zelle konjugiert sind. Hauptvertreter der CAMs sind die kalziumabhängigen Cadherine und Selektine sowie Ca^{2+} -unabhängige Immunglobuline, Muzine und Integrine, wobei letztere nicht nur Zell-Zell-, sondern auch Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln (Bouvard et al., 2001).

Integrine dienen als transmembranöse Rezeptorproteine unter anderem der bidirektionalen Zell-Zell- und, anders als die meisten anderen Zelladhäsionsproteine, der Zell-Matrix-Interaktion. Über ihre Verbindung mit dem Aktinskelett der Zelle fungieren sie zudem als Mechanorezeptoren und tragen zur Übersetzung ankommender biomechanischer Signale in molekularbiochemische Informationen bei (Geiger et al., 2009). Die Integrinfamilie gehört seit ihrer Entdeckung vor etwa 30 Jahren (Hynes, 1987) zu der am besten verstandenen Zelladhäsionsrezeptorfamilie. Integrine spielen eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl körpereigener Prozesse, beispielsweise bei der Immunantwort und der Hämostase und können bei fehlerhafter oder ungenügender Funktion die Ursache verschiedener genetischer, autoimmunologischer und maligner tumoröser Erkrankungen sein (Hynes 2002).

1.1.1 Kollagenbindende Integrine

Alle Integrine weisen die gleiche Grundstruktur auf. Als heterodimere transmembranöse Glykoproteine, deren Vielfalt durch 18 α - und 8 β -Untereinheiten bestimmt wird (Barczyk et al., 2010), weisen sie eine extrazellulär gelegene N-terminale globuläre Kopfregion auf, an der die Ligandenbindung stattfindet und die als Verbindungsstück zwischen den Untereinheiten fungiert. C-Terminal von dieser Rezeptorregion befindet sich eine Linker-Region, die den Abstand zu der Zellmembran reguliert, danach sind beide Untereinheiten mittels einer transmembranösen Domäne in der Membran verankert. Am C-Terminus befindet sich jeweils eine zytosolische Domäne, an der die Signalweiterleitung und Bindung von fokalen Bindungspartnern wie Paxilin stattfinden kann. Die α -Untereinheit des Kopfes umfasst 60 Aminosäuren und faltet sich zu einer siebenflügeligen β -Propeller-Domäne, die bei der Hälfte der Integrine zwischen dem zweiten und dritten Flügel eine sogenannte α I Domäne (von Willebrand-Faktor A-Domäne) enthält. Die β -Untereinheit steht über die β I-Domäne, die als Analogon zur α I-Domäne gesehen werden kann, mit dem β -Propeller (α -Untereinheit) in Verbindung (Abb.1, Luo et al., 2007).

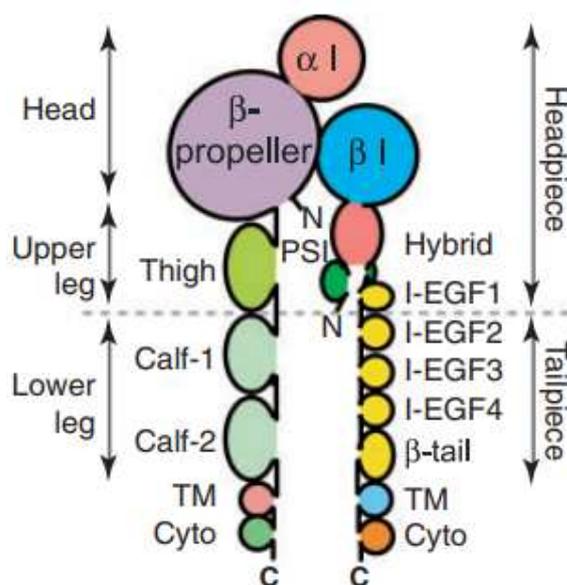


Abb. 1: Integrinstruktur (Luo et al., 2007). Schematischer Aufbau eines Integrins mit extrazellulärer Kopfregion zur Ligandenbindung (Headpiece) und intrazellulärer Schwanzregion (Tailpiece) zur Signalweiterleitung an die Zelle. Die Zellmembran wird durch eine horizontale gestrichelte Linie dargestellt.

Durch nicht-kovalente Zusammenlagerung dieser Untereinheiten ergibt sich eine Variabilität von 24 verschiedenen Integrinklassen (Abb. 2). Vier der 18 α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$) binden Kollagen über die α I-Domäne, deren Ligandenspezifität und -affinität innerhalb der Gruppe der kollagenbindenden Integrine variiert.

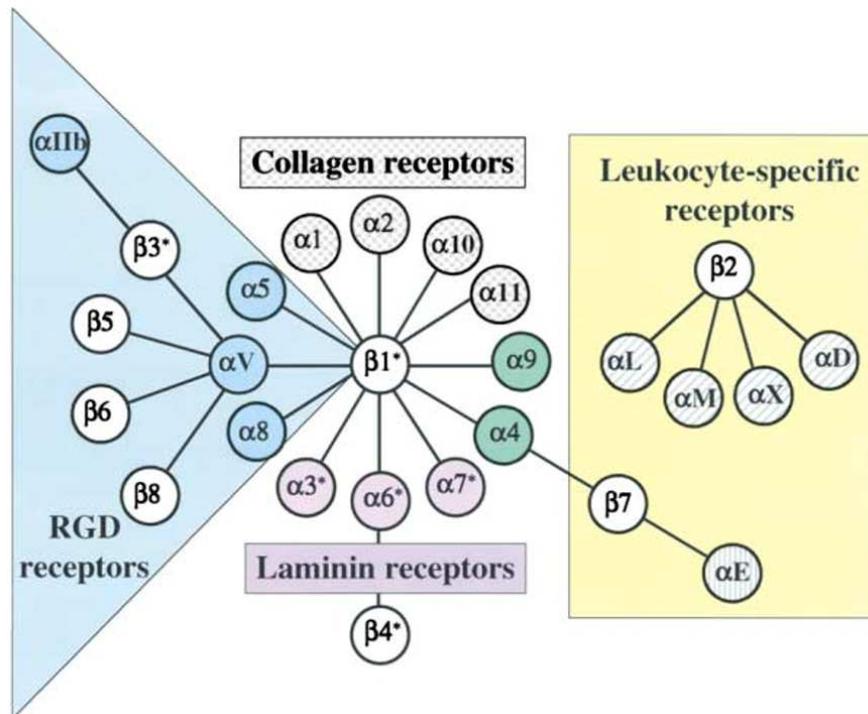


Abb. 2: Übersicht der Integrinklassen (Hynes et al., 2002).

Dargestellt sind die bisher bekannten reziproken Kombinationsmöglichkeiten der α - und β -Integrinuntereinheiten. 18 α -Untereinheiten können sich mit 8 β -Untereinheiten zu den abgebildeten Konformationen zusammenlagern und schaffen so eine Vielfalt von insgesamt 24 Integrinklassen. α -Untereinheiten, die über eine α -I (I/A)- Domäne zur Kollagenbindung verfügen ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$) sind grau kariert hinterlegt. α -Domänen, die die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) auf Molekülen wie Fibronektin oder Vitronektin erkennen ($\alpha 5$, αV , $\alpha 11b$, $\alpha 8$), sind blau markiert. $\beta 1$ -Untereinheiten ($\alpha 6$ mit $\beta 4$), die als Rezeptor für das Laminin der Basalmembran fungieren, sind violett gefärbt. Sternchen markieren Domänen, die einem alternativen Splicing unterliegen. Die Untereinheiten $\alpha 4$ und $\alpha 9$ (grün) kommen ausschließlich bei Wirbeltieren vor. Ein gelber Kasten kennzeichnet Untereinheiten, die ausschließlich auf Leukozyten zu finden sind (αL , αM , αX , αD , $\beta 2$, $\beta 7$).

Am besten verstanden sind derzeit die Funktionen der α I-Domänen der Integrine $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$.

Die $\alpha 1$ I-Domäne ist fähig, monomeres Kollagen der Typen I, II, III, IV, V, VI und XIII zu erkennen. Sie bindet bevorzugt an das Kollagen Typ IV der Basalmembran (Tulla et al., 2001; Zhang et al., 2003; Kern et al., 1993, Calderwood et al., 1997; Nykvist et al., 2000).

Die $\alpha 2$ I-Domäne weist zwar große strukturelle Ähnlichkeit mit der $\alpha 1$ I-Domäne auf und beide Domänen binden an dieselbe Sequenz (GFOGER) des tripelhelikalen Kollagens, jedoch erfüllen sie jeweils unterschiedliche Funktionen im Gewebsverbund. Integrin $\alpha 2$ kann demnach Bindungen mit den Kollagentypen I bis V eingehen, erkennt neben monomerem auch fibrilläres Kollagen und weist gegenüber der $\alpha 1$ -I Domäne eine vielfach höhere Affinität für Kollagen Typ I-Fibrillen auf (Heino, 2000). Da diese die Majorität der knöchernen Matrix ausmachen und Kollagen Typ I im Gewebsverbund fast ausschließlich fibrillär vorliegt, steht demnach das Integrin $\alpha 2\beta 1$ im besonderen Fokus der Analysen des Knochenstoffwechsels und ossärer Umbauprozesse.

Die α I-Domäne des $\alpha 10$ -Integrins bindet bevorzugt an netzbildendes Kollagen Typ IV der Basalmembran und an das bindegewebsassoziierte perlschnurartige Typ VI-Kollagen (Heino, 2000). Darüber hinaus wird dieser Domäne aufgrund ihrer Adhäsionskapazität an Kollagen Typ II und der vermehrten Expression auf Chondrozyten der Wachstumsfuge eine entscheidende Rolle bei Vorgängen der chondralen Entwicklung und Differenzierung wie der chondralen Ossifikation zugeschrieben. Sie wird zudem als wichtigste Integrin-Untereinheit bei der Chondrozyten-Kollagen-Interaktion diskutiert (Camper et al., 2001; Bengtsson et al., 2005).

Integrin $\alpha 11$ besitzt eine ähnliche Ligandenspezifität wie $\alpha 2$ bei der Adhäsion an helikale GFOGER-Sequenzen fibrillärer Kollagene (Zhang et al., 2003), bindet an diese jedoch mit geringerer Affinität.

Die für den Knochenmetabolismus relevanten Auswirkungen eines Verlustes einzelner kollagenbindender α -Untereinheiten sind folgend in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel bei Fehlen einzelner kollagenbindender α -Untereinheiten des Integrins

Verlust	Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel
$\alpha 1$	Gestörte Kallusformation mit reduzierter Produktion von Knorpelgewebe, Verringerte Anzahl mesenchymaler Progenitorzellen (Ekholm et al., 2002)
$\alpha 2$	Überexpression von Kollagen Typ I im nativen Knochen, verringerter Knochenverlust im Alter (Stange et al., 2013)
$\alpha 10$	Milde Chondrodysplasie mit reduzierter Chondrozytenproliferationsrate (Bengtsson et al., 2005)

1.1.1.1 Integrin $\alpha 2\beta 1$

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins, das mit hoher Affinität an Kollagen Typ I (Kern et al., 1993) und in geringerem Maße an die Kollagentypen II bis V bindet (Kamata and Takada, 1994; Nykvist et al., 2000). Darüber hinaus fungiert es als Mediator für Laminin-1 bis -5 (Pfaff et al., 1994; Decline und Rousselle, 2001). Als Rezeptor für Kollagen Typ I, welches mit 95% den Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix darstellt, vermittelt es eine Verbindung zwischen Knochenzellen und Extrazellulärmatrix (ECM) (Jokinen et al., 2004) und nimmt somit eine essenzielle Rolle im Knochenmetabolismus und in der Integrität skelettaler Einheiten in der umgebenden Matrix ein. Dabei wird dem Integrin $\alpha 2\beta 1$ eine wichtige Rolle bei Zellentwicklungs- und -differenzierungsprozessen zugeschrieben. Diesbezüglich führten bereits Wu und Santoro Untersuchungen zur Expression des Rezeptors während der murinen Embryogenese durch. Sowohl das Gewebe der Plazenta als auch hypertrophe Chondrozyten und die für den ossären Auf- und Umbau obligaten Osteoblasten und Osteoklasten, nicht aber ortsständige Osteozyten, wiesen dabei eine Expression von Integrin $\alpha 2\beta 1$ auf (Wu, Santoro, 1994). Überdies konnte die Anwesenheit der $\alpha 2$ -Untereinheit auf Thrombozyten, Endothelzellen,

Fibroblasten und Epithelzellen *in vitro* nachgewiesen werden (Elices und Hemler, 1989; Kirchhofer et al., 1990), wo sie unter anderem bei der Vermittlung von Plättchenadhäsion und -aggregation eine Rolle spielt (Santoro, 1999). Im Hinblick auf die Rolle des Rezeptors bei immunologischen Prozessen konnte die Integrin $\alpha 2$ -Untereinheit auf einigen Zellen der lymphozytären Reihe wie T- und B-Zellen sowie Monozyten detektiert werden (Luo et al, 2007).

1.1.1.2 Die Integrin $\alpha 2$ -defiziente Maus

Obwohl Studien dem $\alpha 2\beta 1$ -Integrin einige wichtige Funktionen, insbesondere bei der Embryogenese, zuschreiben (Wu, Santoro, 1994), sind Tiere mit komplettem Verlust dieses Gens lebensfähig, normal entwickelt und fertil. Nachkommen $\alpha 2$ -defizienter Individuen entwickeln sich regelrecht, was darauf hinweist, dass es zu keiner relevanten plazentären Dysfunktion kommt. Im Vergleich zum Wildtyp weisen die Tiere eine veränderte Morphologie und Verzweigung der Brustdrüsengänge auf. Die Fähigkeit zur Laktation scheint dennoch unbeeinflusst. Darüber hinaus konnten keine anatomischen und physiologisch relevanten Anomalien beobachtet werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass es zu einer verzögerten Aggregation, nicht jedoch zu einer reduzierten Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten an fibrilläres Kollagen kommt (Holtkötter et al., 2002). Ein isoliertes Fehlen des Integrin $\alpha 2$ -Rezeptors scheint also die physiologische Entwicklung der Maus nur in sehr geringem Maße zu beeinflussen, wohingegen die Depression zweier kollagenbindender Integrine zu erheblichen Entwicklungsdefiziten führt. Blumbach und andere konnten in diesem Zusammenhang belegen, dass das gleichzeitige Fehlen von $\alpha 2$ - und $\alpha 11$ -Integrin in den ersten Lebenswochen sowohl zu einer Wachstumsretardierung als auch zu einem osteoporotischen Phänotyp führt (Blumbach et al., 2012). Experimentelle Untersuchungen *in vitro* haben zudem gezeigt, dass die Inhibition des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins in Kollagen Typ I-gecoateten Knochemarkszellen sowohl die Mineralisation als auch die osteogene Differenzierung behindert (Wu, Santoro, 1994; Mizuno et al., 2000). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe um Riikonen

in Zellkulturanalysen aufzeigen, dass die Integrin $\alpha 2$ -Untereinheit mit einem noch nicht bekannten Rezeptor konkurriert, der negativ auf die Expression des Kollagen- $\alpha 1$ -Gens wirkt. Eine Überexpression von Integrin $\alpha 2\beta 1$ bewirkt somit die indirekte Induktion der Kollagen Typ I-Synthese (Riikonen et al., 1995).

1.2 Knöcherner Bewegungsapparat

1.2.1 Morphologie und Aufbau

Das menschliche Skelett besteht aus etwa 212 Knochen, deren Anzahl und Morphologie individuell variieren können. Das Skelett erfüllt neben seiner Funktion als Stützapparat noch eine Vielzahl anderer Funktionen. Es dient als Reservoir für Kalzium und trägt als Puffersystem über die Abgabe von Phosphat und Bicarbonat zur Regulation des Säure-Basen-Haushaltes bei. Unsere Knochensubstanz besteht zu 30% aus organischem und zu 70% anorganischem Material. Der organische Gewebsanteil wird zu gut 95% von Kollagen Typ I repräsentiert. Lediglich 5% entfallen auf nichtkollagene Proteine wie Osteokalzin, Osteonektin, Proteoglykan, Sialoprotein, Proteolipid und bone morphogenetic protein (BMP). Der anorganische Anteil setzt sich seinerseits zu 95% aus Hydroxylapatit ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{Ca}(\text{OH})_2$) und zu 5% aus Chloriden und Fluoriden zusammen (Felsenberg, 2001). Der Stützapparat des Menschen besteht zu 80% aus kortikaler und zu 20% aus trabekulärer Knochensubstanz, wobei unterschiedliche Knochen des Skelettes in ihrer Zusammensetzung variieren. Der Wirbelkörper besteht demnach zu etwa 75% aus trabekulärem und zu 25% aus kortikalem Knochen, wohingegen der Femurschaft ein Verhältnis von 95:5 zugunsten des kortikalen Anteils aufweist (Clarke, 2008).

1.2.2 Entwicklung des Knochens

Der Vorgang der initialen Bildung neuer Knochengrundsubstanz wird Ossifikation, oder auch Osteogenese, genannt. Die Entwicklung des Knochens

erfolgt entweder im Rahmen der direkten intramembranösen (desmalen) oder im Zuge der indirekten enchondralen Osteogenese.

1.2.2.1 Direkte intramembranöse Osteogenese

In Geweben mit höherer Dehnungsbelastung, vor allem während des Wachstums, erfolgt die direkte intramembranöse Osteogenese. Die Differenzierung von Mesenchymzellen zu knochensubstanzbildenden Osteoblasten führt über die Sekretion einer, größtenteils aus Kollagen Typ I bestehenden Matrix, zu einer direkten Bildung von Geflecht-, Deck- oder Belegknochen. Durch diesen Mechanismus erfolgt die Entwicklung von Schädelkalotte, Clavicula und der Mehrzahl der Gesichtsknochen.

1.2.2.2 Indirekte enchondrale Osteogenese

Die meisten Knochen des menschlichen Körpers entwickeln sich jedoch im Zuge der indirekten enchondralen Osteogenese. Anders als bei der direkten erfolgt bei der indirekten Osteogenese die Synthese des Knochengewebes auf Basis eines knorpeligen Gerüsts, das im Verlauf der Entwicklung als Vorlage für die Bildung neuer Knochensubstanz dient. Während der Embryonalentwicklung erfolgt die Anlage dieses Primordialskelettes aus hyalinem Knorpel, der dem mesenchymalen Bindegewebe entstammt. Im Verlaufe des Knochenwachstums erfolgt die Resorption des Knorpels durch Chondroklasten und anschließende Mineralisierung durch Osteoblasten und somit ein Umbau von Knorpel- in mineralisiertes und stützfähiges Knochengewebe. Der Vorteil dieser Art der Knochenneubildung ist die relativ schnelle Gewebsneubildung und die damit verbundene zeitige Übernahme einer provisorischen Stützfunktion.

1.2.3 Modeling und Remodeling

Der Knochenmetabolismus wird maßgeblich durch die miteinander konkurrierenden Grundvorgänge der Osteogenese und der Osteolyse bestimmt. Die Erkenntnis, dass sich lange Röhrenknochen durch Änderung ihrer Form und Struktur an biomechanische Belastung anpassen, hat bereits der Berliner

Anatom und Chirurg Julius Wolff im 19. Jahrhundert durch das *Wolff'sche Transformationsgesetz* postuliert. Besonders während des Wachstums, aber auch als Reaktion auf andauernde biomechanische Be- oder Entlastung, sorgen substanzaufbauende Osteoblasten und knochenabbauende Osteoklasten unabhängig voneinander für die Anpassung des menschlichen Skeletts an statische und funktionelle Bedürfnisse (Peel, 2009). Dieser Anpassungsprozess wird *Modeling* genannt. Die finalen mechanischen Eigenschaften, insbesondere die knöcherne Stabilität, werden dabei unter anderem von Zellumsatzrate, Größe, Struktur, Geometrie und Dichte des Knochens sowie der Zusammensetzung der kollagenen Matrix determiniert (Datta et al., 2008).

Remodeling dagegen beschreibt die kompensatorische osteoblastäre Formation neuer Knochensubstanz als Reaktion auf eine zuvor erfolgte Resorption durch Osteoklasten, mit dem Ziel, die mechanische Integrität und Qualität des Skelettes zeitlebens zu gewährleisten (Peel, 2009). Im Zuge dessen unterliegen nahezu 10% des adulten Skelettes einer jährlichen Neuformation, was dazu führt, dass alle 10 Jahre ein vollständiger Austausch von altem zu neuem Knochen an ein und derselben Stelle stattfindet (Parfitt, 1994). Auch nach einem stattgefundenen Trauma mit Frakturschaden erfolgt die Regeneration des geschädigten Gewebes nach den Prinzipien des Remodelings (Peel, 2009).

Der Prozess des ständigen Auf- und Abbaus erfolgt innerhalb sogenannter „basic multicellular units“ (BMUs), bestehend aus Osteoklasten und Osteoblasten (van Oers et al., 2008). *Osteoklasten* formieren durch Schaffung eines sauren Milieus (pH 4,5) auf der Trabekeloberfläche sogenannte Howship-Lakunen, die durch eine Versiegelungszone aus osteoklastärem Aktin und, verbunden über Integrin $\alpha\beta3$, ossärem Osteopontin (Hu et al., 1995) von der übrigen Knochenmatrix getrennt werden. Somit erfolgt die Resorption knöcherner Grundsubstanz, die vornehmlich aus Calcium-Phosphat-Verbindungen besteht, in räumlich separierten subosteoklastischen Kompartimenten. Das Hydroxylapatit als Baustein der knöchernen Grundsubstanz ist säureanfällig. Des Weiteren bauen

lakunäre proteolytische und nicht-proteolytische Enzyme wie Cathepsin K und Metalloprotease 9 (MMP-9) unter anderem Kollagen, nicht-kollagene Proteine und Proteoglykane ab (Everts et al., 1992). Derzeit wird ebenfalls über die Rolle der sogenannten Chondroklasten als modifizierte Osteoklasten diskutiert. N. Rodionova definierte diese als gewebsspezifische Makrophagen mit der Fähigkeit, nicht-mineralisierte Knorpelmatrix und hypertrophe Chondrozyten zu resorbieren (Rodionova, 1986). Sowohl Osteo- als auch Chondroklasten exprimieren während ihrer Aktivität das Enzym Tartratreisistente Saure Phosphatase (TRAP) und können somit, auch aufgrund ihres ähnlichen Phänotyps, in der Histomorphologie nicht klar voneinander abgegrenzt werden. Die Arbeitsgruppe um H. J. Knowles geht sogar davon aus, dass zwischen beiden Zelltypen nicht unterschieden werden kann und spricht daher bei Chondroklasten von ausgereiften Osteoklasten, die fähig sind, neben Knochen- auch Knorpelmatrix zu resorbieren (Knowles et al., 2012). *Osteoblasten* füllen nun die entstandenen Resorptionszonen auf und synthetisieren eine vornehmlich aus Kollagen Typ I bestehende Matrix, das sogenannte Osteoid. Über die Sekretion membrangebundener kalzium- und phosphatreicher Vesikel sowie die Hemmung mineralisationshemmender Enzyme (Pyrophosphate, Proteoglykane) regulieren sie die Mineralisation der osteoiden Matrix (Anderson, 2003).

Erhöht sich die Aktivität der Osteoklasten, sind gesteigerte Knochenumbauprozesse und somit eine höhere Remodelingrate die Folge. Auch während der Menopause kommt es durch den Verlust des osteoprotektiven Effektes des Östrogens zu einem gesteigerten Abbau der Knochengrundsubstanz. Erfolgt kompensatorisch kein ausreichender Knochenaufbau durch Osteoblasten, ist ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und -formation mit der Ausdünnung trabekulärer Strukturen und einem gesteigerten Frakturrisiko die Folge (Peel, 2009).

1.2.4 Frakturheilung

Einige Gewebe der Vertebraten behalten während der gesamten Lebenszeit die Fähigkeit zur Regeneration. Ein Beispiel dafür liefert der knöcherne Bewegungsapparat. Unter idealen Voraussetzungen schließt sich der Zerstörung knöcherner Strukturen, beispielsweise durch ein Trauma, reaktionär ein Regenerationsprozess mit dem Ziel der vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Anatomie und biomechanischen Funktionalität an. Bei der Frakturheilung wird dabei zwischen primärer Defektheilung ohne Kallusbildung und sekundärer Defektheilung mit Kallusbildung unterschieden, wobei letztere, bedingt durch die Mechanik des Unfalltraumas und der daraus resultierenden Fehlstellung der Frakturrenden in Verbindung mit einem begleitenden Weichteilschaden, den weitaus häufigeren Heilungsmechanismus ausmacht. Bei der sekundären Frakturheilung heilt die Fraktur bei optimalen Bedingungen, wie adäquater biomechanischer Stimulation und einer gesicherten Durchblutung, in der Regel, äquivalent zur embryonalen Skelettentwicklung, nach den Prinzipien der enchondralen Ossifikation. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bei dem Prozess der Frakturheilung bestimmte Aspekte der embryologischen Skelettentwicklung wie die Induktion von Signalkaskaden der Chondro- und Osteogenese rekapituliert werden (Sandberg et al., 1993; Vortkamp et al., 1998). Die Signale und Prozesse, die zur Differenzierung von proliferativen zu hypertrophen Chondrozyten und damit zur konsekutiven Ossifikation im Zuge des Remodelingprozesses führen, folgen sowohl bei der embryonalen Skelettentwicklung als auch bei der adulten Skelettformation im Rahmen der Frakturheilung den selben molekularen Mechanismen (Gerber et al., 1999). Dennoch können Osteogenese und -regeneration nicht gleichgesetzt werden. Bestimmte Bedingungen wie die lokale Gewebshypoxie mit nachfolgender Entzündungsreaktion kommen ausschließlich im Rahmen eines Traumas vor und begünstigen die Induktion bestimmter Signalwege der Zellproliferation und -migration (Brighton et al., 1991; Bolander et al., 1992). Ein Beispiel ist die Induktion der Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenasen,

wobei die Cyclooxygenase-2 (COX-2) besonders während der frühen Phase der Frakturheilung von Knorpelvorläuferzellen exprimiert wird. Prostaglandine stimulieren sowohl die Chondrogenese als auch die Knochenformation und -resorption und sind somit essenziell für Auf- und Umbauprozesse während der Frakturheilung (Naik et al., 2009; Kawaguchi et al., 1995). Zhang und andere konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der Verlust von COX-2 zu einer verzögerten Frakturheilung führt, welche durch die Persistenz mesenchymaler Stammzellen und eine reduzierte Osteoblastogenese gekennzeichnet war (Zhang et al., 2002).

Die Frakturheilung kann in vier sich teils überlappende Phasen eingeteilt werden:

- | | | |
|----|------------------------------|-------|
| 1. | Inflamationsphase | 0-3* |
| 2. | Formation des weichen Kallus | 4-10 |
| 3. | Formation des harten Kallus | 11-17 |
| 4. | Remodelingphase | 18-24 |

**Heilungszeitraum in Tagen am Mausmodell (Richtwerte)*

Die murine Frakturheilung beginnt nach der traumatisch bedingten Zerstörung von Weichgewebe, Gefäßen und der knöchernen Architektur innerhalb der ersten 72 Stunden mit einer initialen *Entzündungsreaktion (Inflamationsphase)* und führt zu der Initiierung einer Reihe von Wundheilungsprozessen. Die frische Blutung führt zur Hämatombildung, in das nun degranulierende Thrombozyten, Makrophagen und Entzündungszellen wie Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten einwandern. Diese Zellen spielen sowohl bei der Prävention von Infektionen als auch bei der Sekretion von Zytokinen (IL-1 und IL-6) und Wachstumsfaktoren (TGF- β , PDGF, FGF-2, VEGF, M-CSF, BMPs, TNF- α) eine entscheidende Rolle und tragen damit zur initialen Entzündungsreaktion und Bildung eines fibrinösen Thrombus bei. Dem Einwachsen von Kapillaren folgt schließlich das Abräumen von Zelldebris durch Makrophagen und Riesenzellen (Schindeler et al., 2008).

Der Phase der Inflammation folgt die *Formation des weichen Kallus*, die mit der Bildung einer fibrös-knorpeligen Manschette eine provisorische Stützfunktion zur Stabilisierung der Bruchstelle erfüllt. Der initialen Kondensation pluripotenter mesenchymaler Stammzellen folgt eine durch Sox9 vermittelte Differenzierung zu proliferativen Chondrozyten, deren stetige Vermehrung in vertikaler Ausrichtung, verbunden mit der Sekretion einer Kollagen Typ II- und proteoglykanhaltigen Matrix, zu einem Längenwachstum des Knorpels führt. In Regionen insuffizienter Knorpelproduktion übernehmen Fibroblasten mit der Sekretion einer fibrösen Gewebsbrücke die primäre Stabilisierung des Kallus. Während die Chondrozyten in den distalen Segmenten weiter proliferieren, sistiert ihre Aktivität im Zentrum der Verdichtungszone. Die inaktiven Zellen differenzieren zu blasig aufgetriebenen und Kollagen Typ X produzierenden hypertrophen Chondrozyten, die eine Reihe bedeutsamer Aufgaben im Knochenstoffwechsel übernehmen. So induzieren sie über die Produktion des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) das Einsprossen von Gefäßen mit einer Invasion von Osteoprogenitorzellen in das primäre Ossifikationszentrum und stimulieren dort die Differenzierung eingewanderter und perichondraler Osteochondroprogenitorzellen zu Osteoblasten. Dieser Differenzierungsprozess wird vor allem von den sogenannten BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), stimuliert (Chen et al., 2004), wobei vor allem BMP-2 und BMP-7 eine osteoinduktive Wirkung haben. Dem zugrunde liegt die Smad-abhängige Regulation der Expression und Funktion des für die osteoblastäre Differenzierung obligaten Transkriptionsfaktors Runx2, der seinerseits die Induktion des, ebenfalls essenziellen, Differenzierungsfaktors Osterix begünstigt (Matsubara et al., 2008).

Die differenzierten Osteoblasten formen über die Produktion einer Kollagen Typ I-haltigen Matrix eine diaphysäre Knochenmanschette und leiten so die Phase der *Formation des harten Kallus* ein (Kronenberg, 2003). In der aktivsten Phase der Osteogenese dominiert neben dem chondroblastären Knorpelabbau und der zunehmenden Einsprossung von Gefäßen vor allem die osteoblastäre Sekretion

des nichtmineralisierten Osteoids mit anschließender Mineralisierung zu primärem Geflechtknochen. Osteoblasten produzieren zudem das Enzym Alkalische Phosphatase (ALP), das, durch die lokale Konzentrationserhöhung des mineralisationsfördernden anorganischen Phosphats und die Inhibition des extrazellulären und mineralisationshemmenden Pyrophosphats, die Bildung neuer Knochensubstanz erleichtert (Holtz et al., 1999; Harmeý et al., 2004).

Im Zuge des *Remodelings* erfolgt der Umbau des primären Geflechtknochens in sekundären Lamellenknochen durch Osteoblasten. Ziel dieser Regenerationsphase ist die Wiederherstellung der ursprünglichen biomechanischen Eigenschaften des Knochens. Der Sekretion von M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) und RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) durch reife Osteoblasten folgt die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in Osteoklasten und deren Aktivierung und Koordinierung im Zuge der Resorption des Geflechtknochens (Fan et al., 1997; Kong et al., 1999).

Die Arbeitsgruppe um Louis Gerstenfeld hat zudem im Jahre 2003 die Analogie von *Entwicklung, Heilung und Alterung* des Knochens beschrieben und sieht in der Untersuchung der Frakturheilung in diesem Zusammenhang eine geeignete Methode zur Beschreibung von Alterungsprozessen (Gerstenfeld et al., 2003). Im Zuge der demografischen Entwicklung sei als wohl klinisch und epidemiologisch relevantester Alterungsprozess die Osteoporose zu nennen.

Auf Basis dieser Erkenntnisse ist die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit zellulären und molekulargenetischen Vorgängen während des Frakturheilungsprozesses als essenziell für das Verständnis entwicklungsbedingter und degenerativer Pathologien der Knochenstruktur anzusehen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Analyse des Frakturheilungsprozesses an der Integrin $\alpha 2$ -defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp. Basierend auf aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen, können folgende Hypothesen aufgestellt werden:

1. Es besteht eine Analogie zwischen Prozessen der Knochen*alterung* und der Knochen*heilung* (Gerstenfeld et al., 2003). Eine Integrin $\alpha 2$ -Defizienz hat eine verlangsamte altersabhängige Degeneration muriner Femurknochen zur Folge (Stange et al., 2013).

Hypothese: Integrin $\alpha 2$ -defiziente Tiere weisen gegenüber Wildtypen eine veränderte Frakturheilung auf.

2. Ursächlich für die verzögerte Knochenalterung bei den Integrin $\alpha 2$ -defizienten Tieren ist eine vermehrte Kollagenexpression (Stange et al., 2013).

Hypothese: Auch während der Frakturheilung exprimieren die Knock-out-Tiere vermehrt Kollagen.

Ziel der Arbeit war demnach die Evaluation der Rolle des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins bei der Frakturheilung zu den Zeitpunkten 4, 7, 14 und 21 Tagen. Die Zusammensetzung des murinen Frakturkallus wurde dazu histomorphologisch, immunhistochemisch, colorimetrisch sowie mittels bildgebender und molekulargenetischer Verfahren zu den oben genannten Zeitpunkten analysiert.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Tab. 2: Übersicht über die Art und die Herkunft der Versuchstiere

Versuchstiere	Lieferant
C57BL/6	Harlan-Winkelmann, Borcheln
ITA2 ^(-/-) -Mäuse	Dr. rer. nat. Beate Eckes, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Köln

2.2 Laborgeräte

Tab. 3.: Übersicht über die verwendeten Geräte mit Angabe des Herstellers

Gerät	Hersteller
ELISA-Reader SUNRISE	TECAN, Zürich, Schweiz
Filterabzug Captair® by Erlab	W.H. Mahl, Magdeburg
Frakturmaschine	Fein- und Elektromechanische Forschungswerkstätten UKM Münster
Lichtmikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Magnetrührer MR3002	Heidolph, Schwabach
Mikro-Computertomograph SKYSCAN 1174	Bruker Corporations, Massachusetts, USA
Mikrotom	Leica, Wetz
MP125 pH-Meter	Mettler-Toledo, Ohio, USA
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Rasierer	Braun, Aschaffenburg
Realtime-PCR-Cycler MyiQ5	Bio-Rad Laboratories, California, USA
Röntgengerät	Bruker Corporations, Massachusetts, USA
Schüttler SM-30	Edmund Bühler, Hechingen
Sterile Werkbank HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts
Thermocycler (PCR-Block)	Bio-Rad Laboratories, California, USA
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen
Waage BL 150S	Sartorius AG, Göttingen

2.3 Chemikalien und Pharmaka

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Medikamente mit Angabe des Herstellers

Chemikalie / Medikament	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Acetatlösung 2,5 M, pH 5,2	
- Citratlösung pH 3,6±0.1, 27 mM	
- Fast Garnet GBC Base	
- Naphthol AS-BI Phosphorsäure	
- Natriumnitritlösung	
- Tartratlösung	
Alcianblau 8 GS	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Aluminiumsulfat	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Aqua dest.	Apotheke der UKM
Aquatex® (Eindeckmedium, wässrig)	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Azophloxin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Essigsäure, 36 %	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ethanol, 100 %	Apotheke der UKM
Ethanol, 96%	Apotheke der UKM
Ethanol, 90%	Apotheke der UKM
Ethanol, 80%	Apotheke der UKM
Ethanol, 70%	Apotheke der UKM
Eukitt® (Eindeckmedium)	ORSAtec GmbH, Bobingen
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kernechtrot	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ketaminhydrochlorid 10 %	CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf
Leitungswasser	
Masson-Goldner-Trichrom Kit	Merck Millipore, Massachusetts, USA
- Azophloxin	
- Essigsäure, 10 %	
- Lichtgrün SF	
- Phosphorwolframsäure Orange-G	

Methylgrün	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NaCl 0,9 %, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Octenisept® Wund-Desinfektion Spray	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Rimadyl® (Analgetikum)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Vidisic® (Augensalbe)	Bausch & Lomb GmbH, Berlin
Weigerts Eisenhämatoxylin A + B	Merck Millipore, Massachusetts, USA
SYBR® Green I (Farbstoff)	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande
Xylazin 2 %	CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

2.3.1 Biochemikalien

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Biochemikalien mit Angabe von Herkunft und Hersteller

Biochemikalie	Herkunft / Typ	Hersteller
Antikörper		
Bromdesoxyuridin (BrdU), Maus	Maus / mono*, IgG	Sigma-Aldrich
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Maus / mono*, IgG	BD Biosciences
Kollagen Typ II, Maus	Maus / mono*, IgG	Merck Millipore
Kollagen Typ X, Maus	Maus / mono*, IgG	quartett GmbH
Enzyme		
Alkalische Phosphatase		Sigma-Aldrich
Protease XXIV 0,05%		Sigma-Aldrich
Trypsin		Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxidase		Sigma-Aldrich
Proteine		
Albumin Fraktion V 20 %	Rind	Sigma-Aldrich

*mono = monoklonal

2.3.1.1 Oligodesoxynukleotide

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligodesoxynukleotidprimerpaaren (fwd+rev) mit jeweiligen Sequenzen und Schmelztemperaturen [Tm (°C)]

Primer			Sequenz 5'-3'	Tm (°C)
ALP	Alkalische Phosphatase	<i>fwd</i>	<i>CGG ATC CTG ACC AAA AAC C</i>	57
		<i>rev</i>	<i>TCA TGA TGT CCG TGG TCA AT</i>	56
β2M	Beta-2-Mikroglobulin	<i>fwd</i>	<i>CTG CTA CGT AAC ACA GTT CCA CCC</i>	67
		<i>rev</i>	<i>CAT GAT GCT TGA TCA CAT GTC TCG</i>	64
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2	<i>fwd</i>	<i>AGA TCT GTA CCG CAG GCA CT</i>	60
		<i>rev</i>	<i>GTT CCT CCA CGG CTT CTT C</i>	59
COX-1	Cyclooxygenase-1	<i>fwd</i>	<i>CCT CTT TCC AGG AGC TCA CA</i>	60
		<i>rev</i>	<i>TCG ATG TCA CCG TAC AGC TC</i>	60
COX-2	Cyclooxygenase-2	<i>fwd</i>	<i>GAT GCT CTT CCG AGC TGT G</i>	59
		<i>rev</i>	<i>GGA TTG GAA CAG CAA GGA TTT</i>	57
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	<i>fwd</i>	<i>TGA TAG ATC CAT TCC TAT GAC TGT AGA</i>	64
		<i>rev</i>	<i>AAG ACA TTC TTT CCA GTT AAA GTT GAG</i>	62
HBMS	Hydroxymethylbilan-Synthase	<i>fwd</i>	<i>GAG TCT AGA TGG CTC AGA TAG CAT GC</i>	68
		<i>rev</i>	<i>CCT ACA GAC CAG TTA GCG CAC ATC</i>	67
ITA1	Integrin alpha 1	<i>fwd</i>	<i>GAT GGG GAC GTC AAC ATT CT</i>	55
		<i>rev</i>	<i>TGT GGT TAA GAC GCT ACC AAA G</i>	55
ITA10	Integrin alpha 10	<i>fwd</i>	<i>GAA TCA GGC CGC ATC CTA C</i>	55
		<i>rev</i>	<i>AAG TAT CGG AGG GCC TGT G</i>	56
ITA11	Integrin alpha 11	<i>fwd</i>	<i>GCA GAC GTC CTC TTT ACC AGA</i>	56
		<i>rev</i>	<i>GAG CTG TTT GCC TTG ACC TC</i>	56
Osx	Osterix	<i>fwd</i>	<i>GAT GGC GTC CTC TCT GCT TG</i>	58
		<i>rev</i>	<i>CTT TCC CCA GGG TTG TTG AG</i>	55
Runx2	Runt-related transcription factor 2	<i>fwd</i>	<i>CCC AGG CGT ATT TCA GAT GA</i>	54
		<i>rev</i>	<i>TAG TGC ATT CGT GGG TTG GA</i>	56
Sox9	Sox9	<i>fwd</i>	<i>GTA CCC GCA TCT GCA CAA C</i>	57
		<i>rev</i>	<i>CTC CTC CAC GAA GGG TCT CT</i>	57

2.3.2 Puffermedien

Tab. 7: Verwendete Puffermedien mit Herstellerangabe

Puffermedium	pH	Hersteller
PBS (Phosphate-buffered saline) Sørensen-Phosphat-Puffer	7,4	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
<ul style="list-style-type: none"> - 2 Teile Kaliumdihydrogenphosphatlösung 0,1 M - 8 Teile Dinatriumhydrogenphosphatlösung 0,1 	7,38	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
TBS (Tris-buffered saline)	7,2-7,6	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
<ul style="list-style-type: none"> - NaCl - Tris-Base - Tris-HCl 		

2.3.3 Verbrauchsmaterial und Hilfsmittel

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Hilfsmittel und des Verbrauchsmaterials

Hilfsmittel/Verbrauchsmaterial	Hilfsmittel/Verbrauchsmaterial
Deckgläschen 25 x 50 mm	Pinzette anatomisch
Draht, 0,2 mm	Pinzette chirurgisch
Einmalhandschuhe steril	Nadelhalter
Eppendorfgefäß 1,5 ml	Schere
Eppendorfgefäß 2 ml steril	Schilder für Käfige
Implantat (intramedulläre)	Skalpell
Kompressionsschraube, MouseScrew	Spritze 1 ml
Kanüle G23 1¼ BD Microlance	Stift, wasserfest (Edding)
Kanüle G25 BD Microlance	Tupfer
Nahtmaterial 5-0 Prolene, nicht resorbierbar	Unterlage/Moltex klein
Objektträger	Unterlage/Moltex groß
OP-Tuch grün	Weißes Pflaster, Leukosilk®

2.3.4 Software

Tab. 9: Verwendete Software mit Angabe des Entwicklers

Software	Entwickler
cellSens Dimension	OLYMPUS K.K., Tokio, Japan
CTAn	Bruker, Massachusetts, USA
CTVox	Bruker, Massachusetts, USA
Excel®	Microsoft Corporation, Washington, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., California, USA
iQ™5 Optical System Software, Version 2.1	Bio-Rad Laboratories, California, USA
NRecon	Bruker, Massachusetts, USA
Word®	Microsoft Corporation, Washington, USA
XFluor™ für Excel®	TECAN, Zürich, Schweiz

3 Methoden

3.1 Die Integrin $\alpha 2$ -defiziente Maus

Die Versuche wurden simultan mit Tieren eines Wildtyp- und eines Integrin $\alpha 2$ -defizienten Stammes durchgeführt. Den Inzuchtstamm C57BL/6 entwickelte die Firma The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Die Integrin $\alpha 2$ -defizienten Mäuse wurden vom Institut für Muskuloskelettale Medizin (IMM) zur Verfügung gestellt.

Generiert wurden diese Knock-out Tiere unter Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems (Holtkötter et al., 2002). Dabei wurden zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt. Bei einer Zuchtreihe wurde die Expression einer Cre (cyclization recombination/causes recombination)- Rekombinase unter der Kontrolle gewebsspezifischer Regulatoren induziert („gewebsspezifische Cre-Maus). Eine andere Zuchtfamilie trug die Cre-Erkennungssequenzen, auch loxP (locus of X-over P1)-Stellen genannt, die in gleicher Orientierung auf beiden Seiten des zu entfernenden Genabschnittes lagen („gefloxte Zielmaus“) (Metzger et al. 1999). Hybride der beiden Stämme exprimierten ebenfalls die Cre-Rekombinase, sodass nun im selben Tier die DNA-Sequenz zwischen beiden Cre-Erkennungssequenzen deletiert wurde und somit den gewünschten „knock out“ des betreffenden Genabschnittes verursachte (Bouvier et al., 2009).

3.1.1 Gruppeneinteilung

Insgesamt wurden 115 Mäuse für die Untersuchungen verwendet. Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Frakturierung des Femurs betrug vierzehn Wochen, an die sich, in Abhängigkeit von der Art des Analysevorhabens, eine Heilungsphase von 4, 7, 14 oder 21 Tagen anschloss. Alle tierexperimentellen Vorhaben entsprachen in ihrer Durchführung den Richtlinien für Haltung und Gebrauch von Labortieren (Tierversuchsgenehmigung 84-02.04.2012.A016). Die Tiere erhielten zu jedem Zeitpunkt Zugang zu Standardnahrung und Leitungswasser. Sowohl Temperatur (20° Celsius) als auch Luftfeuchtigkeit (64%) und Tag-Nacht-

Rhythmus (Lichtperiode von 6.00 bis 18.00 Uhr) wurden kontrolliert konstant gehalten.

Tab. 10: Anzahl der verwendeten Versuchstiere pro Methode

Genotyp	Wildtyp				Integrin $\alpha 2^{(-/-)}$			
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Gruppeneinteilung								
Heilungszeitraum (Tage)	4	7	14	21	4	7	14	21
Histologie								
Alcianblau		9	7	7		12	7	5
Masson-Goldner		8	6	7		11	9	6
TRAP			6	6			7	5
Immunhistochemie								
BrdU		2				3		
COX-2		3	4			3	4	
Kollagen Typ II		6	6	5		11	6	6
Kollagen Typ X		6	5	5		10	5	5
Molekulargenetik (qPCR)	2	3			1	4		
Total-Kollagen-Assay		3				3		
MikroCT			5	8			4	5

3.1.2 Operation der Tiere

Die Frakturierung des linken Femurs erfolgte im Rahmen einer Operation mit Narkose und peri- und postoperativer Analgesie der Versuchstiere. Das Gewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Operation $20\text{g} \pm 3\text{g}$. Die Eingriffe wurden ärztlich begleitet in einem eigens dafür ausgestatteten Operationsraum des Institutes für Muskuloskeletale Medizin (IMM) durchgeführt.

3.1.2.1 Frakturmodell

Zielsetzung der Operation war das Herbeiführen einer standardisierten geschlossenen Querfraktur des linken Femurschaftes. Die Fraktursetzung erfolgte mit einer eigens entwickelten Frakturmaschine (Abb. 3a) nach dem Prinzip der Dreipunktbiegung (Schmidmaier et al. 2004). Hierbei wurde das Femur zunächst im Hüftgelenk nach außen rotiert und abduziert und auf zwei Schienen (Abstand 5 mm) platziert. Zur finalen Fraktursetzung wurde der

Stempel der Maschine mit einem Gewicht von 220 g belastet und eine, zuvor manuell bestimmte und in allen Versuchen konstant gehaltene, Fallhöhe von 10,5 cm bestimmt (Abb. 3a). Das Herabfallen des Stempels orthogonal zum Femurschaft führte zu einer geschlossenen Querfraktur bei minimalem Weichteilschaden.

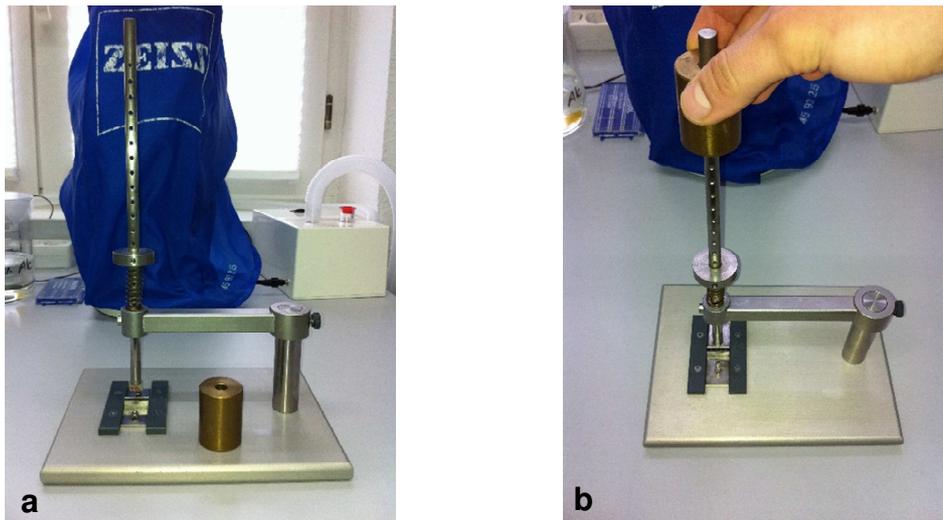


Abb. 3a/b: Frakturmaschine (a) mit Stempel. Abb (b) zeigt die Verwendung des Stempels mit Definition der Fallhöhe.

Es wurde die oben beschriebene Methode der artifiziiellen Fraktursetzung gewählt, da der vergleichbar geringe Weichteilschaden die Analyse des kompletten Frakturkallus und die Migration der zur Heilung beitragenden Zellen ermöglichte. Des Weiteren war durch die Reproduzierbarkeit standardisierter Brüche die Möglichkeit zur Analyse molekularbiologischer Signalprozesse gegeben (Hiltunen et al., 1993).

3.1.2.2 Narkose und präoperative Vorbereitung

Um das Stresslevel der Tiere möglichst gering zu halten, wurde vor allen Eingriffen eine gewichtsadaptierte Narkose und Analgesie durchgeführt. Die Mäuse wurden zunächst gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion von Xylazin 2% (medistar®, 2 mg/kg Körpergewicht) und Ketaminhydrochlorid (Ketavet; 100 mg/ml; 75 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert (Tab. 11).

Die Narkosetiefe wurde mit Erlöschen des Umdrehreflexes überprüft und daraufhin das linke Femur im Bereich des Operationsgebietes mit einem Rasierer großzügig depiliert und desinfiziert. Ein Austrocknen der Augen wurde durch die präoperative Applikation von Augensalbe (Dexpanthenol) verhindert.

Tab. 11: Schema zum Ansetzen der Injektionslösung bei einem Körpergewicht der Versuchstiere von 20 Gramm.

Anzahl Tiere (0,2 ml / Tier à 20 g)	10	15	20
Xylazin 2%	0,09 ml	0,13 ml	0,18 ml
Ketaminhydrochlorid 10%	0,12 ml	0,18 ml	0,24 ml
NaCl, 0,9%, steril	1,89 ml	2,83 ml	3,78 ml
Gesamtvolumen	2,10 ml	3,14 ml	4,20 ml

3.1.2.3 Operationsprozedere

Das linke Femur wurde zunächst in etwa 90° flektiert und Haut und Faszie über eine etwa 1 cm lange Inzision medial der Patellasehne eröffnet. Nach der Mobilisierung der Sehne nach lateral erfolgte die Eröffnung des Markraumes mit einem 0,5 mm Titanbohrer im Bereich der Fossa intercondylaris des distalen Femurs (Abb. 4).

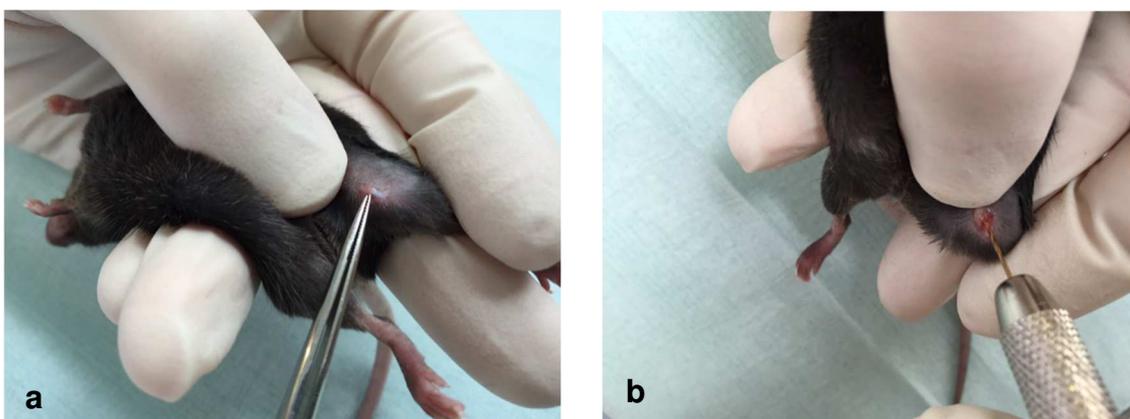


Abb. 4a/b: (a) Inzision von Haut und Faszie mit Lateralisierung der Patellasehne
(b) Eröffnung des Markraumes

Der Markraum wurde daraufhin zunächst mit einer 25G- und folgend mit einer 23G-Kanüle unter Perforation der Kortikalis im Bereich des Trochanter major erweitert. Über letztere erfolgte das anterograde Einbringen eines 0,2 mm starken Drahtes in Seldinger-Technik. Darauf folgte das Setzen der Querfraktur gemäß der in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Vorgehensweise.

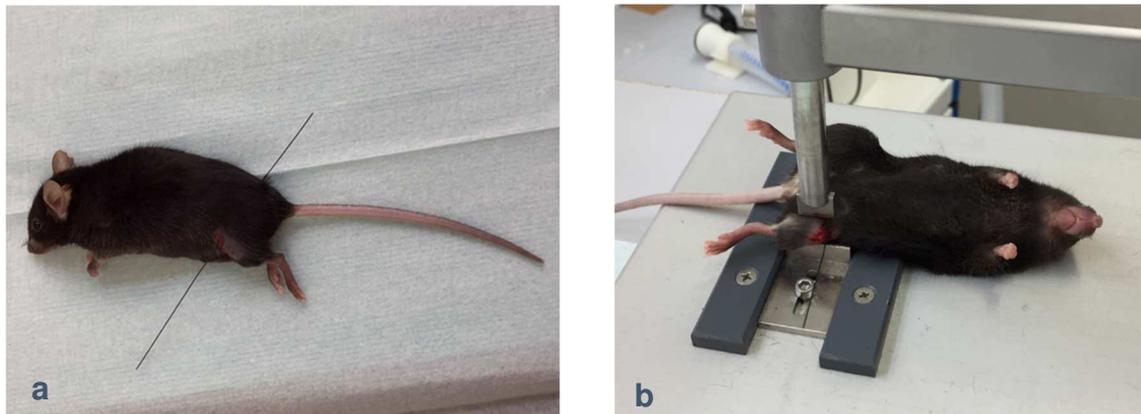


Abb. 5a/b: (a) Liegender 0,2 mm Führungsdraht im linken Femur (b) Fraktursetzung mit Auftreffen des Stempels der Frakturmaschine auf die Diaphyse des linken Femurs

Nach röntgenologischer Überprüfung der Bruchstelle in der anterior-posterioren (a.p.) Ebene erfolgte die Stabilisierung der Fraktur durch ein intramedulläres Implantat (RIS Systems, Davos, Schweiz) (Abb. 6a), das mit Hilfe des zuvor eingebrachten Führungsdrahtes im Markraum platziert wurde. Danach wurde der Draht entfernt. Ein abschließendes Röntgen des Femurs (Abb. 6b) zeigte die Position des Implantates und den Erfolg der Operation. Der Verschluss von Faszie und Haut erfolgte mittels Einzelknopfnähten mit einem nicht resorbierbaren Faden der Stärke 5-0 (Dicke 0,1–0,15 mm). Zum Schutz der Nähte wurde die Wunde zusätzlich mit Leukosilk® verbunden.

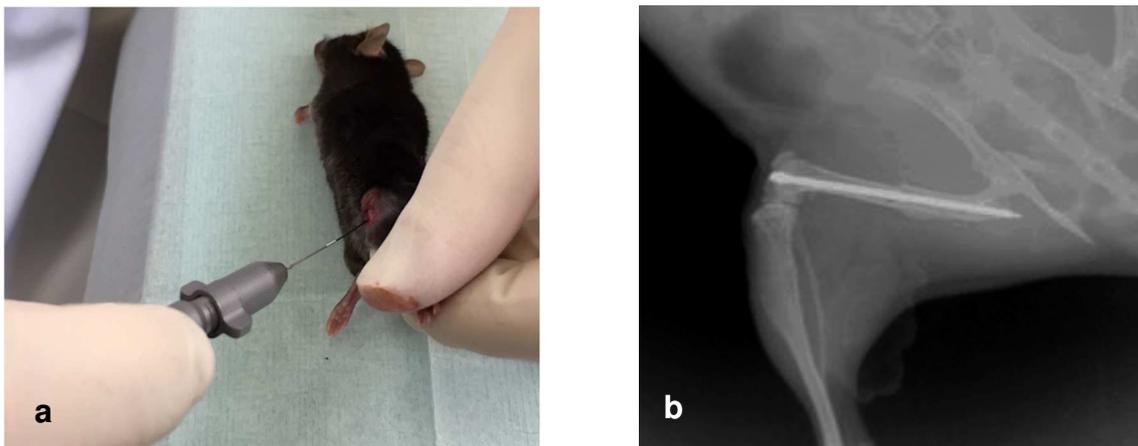


Abb. 6a/b: (a) Insertion des intramedullären Implantates über den Führungsdraht
(b) Postoperatives Röntgenbild (a.p.) des linken Femurs. Regelrechte Implantatlage.

3.1.2.4 Postoperative Versorgung

Nach der Operation wurde den Tieren zur initialen Schmerzreduktion gewichtsadaptiert ($4 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht) das nichtsteroidale Antirheumatikum Rimadyl subkutan in die Nackenfalte appliziert. Da die Hypothermie als häufigste operationsassoziierte Todesursache gilt, wurde der Käfig mit den operierten Tieren während der Aufwachphase auf einer Heizdecke platziert und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht. In den folgenden postoperativen Tagen wurden die Tiere täglich während der gesamten Dauer des Versuchs visitiert und auf ihr Wohlbefinden geprüft. Bei Anzeichen von Schmerzen wurde erneut Rimadyl ($4 \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht) subkutan in die Nackenfalte appliziert.

3.1.3 Tötung und Präparation der Tiere

Die Tiere wurden entsprechend den in Tab. 10 aufgeführten Zeitpunkten durch eine zervikale Dislokation getötet. Die linke untere Extremität wurde freipäpariert und der Femurkopf aufgesucht. Das Femur wurde proximal im Bereich des Hüftgelenkes und distal durch Einbringen eines Hebels in den Kniegelenksspalt exartikuliert und mobilisiert.

3.1.4 Methoden der Probenverarbeitung

3.1.4.1 Fixierung und Entkalkung

Um dem Prozess der Auto- beziehungsweise Heterolyse des Gewebes entgegenzuwirken, wurden die für die Histologie gewonnenen Femora direkt nach der Präparation in 4% Paraformaldehyd fixiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Fixierung erfolgte dabei über die irreversible Vernetzung von Proteinen. Die gewünschte Verfestigung des Gewebes erleichterte die anschließende Entfernung der Mouse-Screw und reduzierte das Risiko einer manuellen Dislozierung der Fraktarenden. Um das Schneiden knöcherner Strukturen mit dem Mikrotom zu ermöglichen, wurden die Femora über sechs Wochen in der schwachen organischen Säure EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) entkalkt. Als Chelator für Metalle bildet sie mit Calcium einen Komplex und löst dieses somit aus der knöchernen Substanz, deren Hauptbestandteil das hydroxylierte Calciumphosphatsalz Hydroxylapatit ist. Durch diesen Vorgang wird ein schwach basisches Milieu geschaffen. Die Entkalkung durch EDTA ist somit für die Proben eine schonende Alternative zur Behandlung mit Trichloressigsäure.

3.1.4.2 Paraffineinbettung, Herstellung von Schnittpräparaten

Bevor die Proben in 5 µm dicken Mikrotomschnitten auf Objektträgern fixiert werden konnten, mussten sie in einen Paraffinblock eingebettet werden. Da die Hydrophobizität des Wachses eine vorherige Dehydratation der Proben erforderte, wurden diese in einen Entwässerungsautomaten überführt, der die Präparate in mehreren Waschschrritten zunächst von Überresten des Entkalkungsmediums befreite und sie anschließend entwässerte. Im letzten Schritt erfolgte die Einbettung der Proben. Dafür wurden diese zunächst in stets gleicher Orientierung des Caput femoris nach rechts in einer Ausgussform platziert und, gemeinsam mit dem beschrifteten Gewebeskästchen, mit heißem flüssigem Paraffin übergossen, das sich nach anschließender Kälteinkubation verfestigte. Der ausgehärtete Paraffinblock konnte daraufhin leicht aus der Ausgussform gelöst werden. Die Herstellung der 5 µm dicken

Schnittpräparate erfolgte mittels Mikrotoms der Firma Leica. Die Schnitte wurden zunächst in ein Kalt- und anschließend in ein etwa 50°C warmes Streckbad überführt, bevor sie auf einem Objektträger fixiert wurden. Die Definition einer standardisierten Schnittebene erfolgte durch das Aufsuchen des durch das Implantat geschaffenen Hohlraumes im Inneren des Knochenmarks. Dabei wurden nur jene Schnitte fixiert, die den Hohlraum auf der gesamten Länge des Knochens darstellten.

3.1.4.3 Isolation des Kallusgewebes

Für die Methoden der colorimetrischen Gesamtkollagenbestimmung sowie der quantitativen real time PCR wurde der Knochen schonend von Weichteilen befreit, bis das, im Vergleich zum umgebenden Muskelgewebe, derbere Kallusgewebe freigelegt war. Um die Prozesse der Denaturierung des avitalen Gewebes und damit den Verlust intakter DNA möglichst gering zu halten, musste das Kallusgewebe zügig entfernt und unter ständiger Kühlung in ein steriles Gefäß überführt werden.

3.1.5 Histomorphologische Analyse des Frakturkallus

Die Darstellung zellulärer und extrazellulärer Bestandteile des Frakturkallus erfolgte mittels histologischer und immunhistochemischer Methoden. Dabei erfolgte der histologische Nachweis einzelner Bestandteile des Kallus mit den in Tab. 12 aufgelisteten Färbemethoden. Die Arbeitsprotokolle zur Durchführung der einzelnen Färbungen sind im Anhang dieser Arbeit zu finden.

Tab. 12: Übersicht der Methoden der histomorphologischen Evaluation des Frakturkallus und der in dieser Arbeit verwendeten Färbemethoden

Methode	Detektion	Farbe
<u>Histologie</u>		
Alcianblau	Proteoglykane (Knorpel)	blau
	Zellkerne	rot
Masson-Goldner-Trichrom, Übersichtsfärbung	Bindegewebe	grün
	Mineralisierte Fläche	leuchtend grün
	Muskulatur	ziegelrot
	Osteoid	rot
	Saure Mucosubstanzen	grün
	Zellkerne	dunkelbraun
Tartratresistente saure Phosphatase (TRAP)	Zytoplasma	ziegelrot
	Saure Phosphatase (Osteoklasten)	magentarot bis violett
<u>Immunhistochemie</u>		
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Zellen in der S-Phase (Proliferation)	braun
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Entzündungsmarker	braun
Kollagen Typ II	Proliferative Chondrozyten	braun
Kollagen Typ X	Hypertrophe Chondrozyten	braun

3.1.5.1 Histologische Färbungen

3.1.5.1.1 Masson-Goldner-Trichrom

Mit der Übersichtsfärbung nach Masson Goldner erfolgte die Abgrenzung von mineralisierten und nicht mineralisierten Anteilen des Frakturkallus. Mineralisierte Matrix stellte sich leuchtend grün dar, wohingegen nicht mineralisiertes Osteoid sowie Zytoplasma eine Rotfärbung annahmen (s. Anhang, Protokoll 1)

3.1.5.1.2 Alcianblau

Über die Detektion saurer Mucopolysaccharide und Proteoglykane mittels Alcianblau erfolgte die histologische Lokalisation des Knorpels (blau) im Frakturkallus. Zur Darstellung der Zellkerne (rot) wurde Kernechtrot verwendet (s. Anhang, Protokoll 2).

3.1.5.1.3 Tartrat-Resistente Saure Phosphatase (TRAP)

Das Enzym tartrat-resistente saure Phosphatase wird hauptsächlich von Osteoklasten, aber auch von anderen hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen exprimiert. Es fungiert während der Frakturheilung als Marker für Knochenresorptions- und -remodelingprozesse. Die Proben wurden gemäß Protokoll mit dem Acid Phosphatase, Leukocyte-Kit 387 A der Firma Sigma-Aldrich behandelt. TRAP-positive Zellen im Frakturkallus waren Osteoklasten. Sie stellten sich magentarot bis violett dar (s. Anhang, Protokoll 2).

3.1.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität von Antikörper-Antigen-Komplexen, um gesuchte Strukturen und ihre Lokalisation farblich darzustellen. Dafür wurden die Paraffinschnitte zunächst durch die absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und gewässert. Nach einem Waschschrift erfolgte in einigen Fällen eine enzymatische oder thermische Antigen-Demaskierung, da die Vorbehandlung mit Paraformaldehyd zu einer Quervernetzung (Cross-linking) von Biomolekülen geführt hat und somit einige Epitope ohne Vorbehandlung nicht detektiert werden konnten. Eine unspezifische Hintergrundfärbung konnte durch vorherige

Inkubation mit der Eiweißlösung BSA (Bovines Serum-Albumin) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen verringert werden. Die Visualisierung gesuchter Proteine erfolgte mit Hilfe löslicher Enzym-Immunkomplexe. In dieser Arbeit wurden für die Markierung gesuchter Epitope sowohl die PAP (Peroxidase-Anti-Peroxidase) - als auch die APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) - als Methoden der löslichen Enzym-Immunkomplexe (Joppien et al., 2011) verwendet.

Das Prinzip des Antigennachweises mittels löslicher Enzym-Immunkomplexe liegt in dem nacheinander Auftragen folgender Reagenzien:

- 1.) Unkonjugierter Primärantikörper
- 2.) Unkonjugierter Sekundärantikörper
- 3.) Löslicher Enzym-anti-Enzymkomplex
- 4.) Substratlösung

Sowohl der primäre als auch der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes stammten aus derselben Spezies, sodass der Sekundärantikörper (Brückenantikörper) durch Bindung seiner Fab-Fragmente an das Fc-Fragment sowohl des Primärantikörpers als auch des Enzym-Immunkomplexes eine Verbindung zwischen beiden Komponenten herstellen konnte. Als Chromogene (Substratlösung) wurden 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (braun) oder Neufuchsin (rot) verwendet.

3.1.5.2.1 Bromdesoxyuridin (BrdU)

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon und wird während der S-Phase des Zellzyklus an dessen Stelle in die DNA eingebaut (Gratzner, 1982). Somit dient die immunhistochemische Detektion des BrdU der Lokalisation von proliferierenden Zellen und erlaubt zudem Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität verschiedener Zelltypen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden mittels Peroxidase-Anti-Peroxidase(PAP)-Methode immunhistochemische Färbungen zum Zeitpunkt 7 Tage nach Fraktursetzung angefertigt.

Es wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus vom Typ IgG der Firma Sigma Aldrich verwendet (s. Anhang, Protokoll 4).

3.1.5.2.2 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird während der frühen Phase der Frakturheilung zum größten Teil in den Knorpelvorläuferzellen exprimiert. Das Enzym ist verantwortlich für die Synthese von Prostaglandinen, die als Stimulatoren der Chondro- und Osteogenese einen positiven Effekt auf den Frakturheilungsprozess ausüben (Naik et al., 2008; Kawaguchi et al., 1995). Die Menge und Lokalisation des Enzyms während der frühen Kallusformation wurde anhand der immunhistochemischen Detektion mittels PAP-Methode über einen monoklonalen COX-2-Antikörper nachgewiesen (s. Anhang, Protokoll 5).

3.1.5.2.3 Kollagen II und Kollagen X

Zusätzlich zum Nachweis des Gesamtknorpelanteils mittels Alcianblau erfolgte mit der immunhistochemischen Detektion von Kollagen II und Kollagen X mittels monoklonaler Antikörper der Nachweis proliferativer und hypertropher Chondrozyten im Frakturkallus. Initial proliferative Knorpelzellen sezernieren zu großen Teilen Typ II-Kollagen, nach ihrer Differenzierung in das hypertrophe Stadium überwiegt hingegen die Sekretion von Kollagen Typ X. Mit der Immunhistochemie anhand der PAP-Methode wurden Quantität und Lokalisation beider Differenzierungsstadien eruiert (s. Anhang, Protokoll 6).

3.1.5.3 Auswertung der gefärbten Schnitte

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte mit der Bildanalysesoftware cellSense, OLYMPUS. Die auf dem Objektträger angefärbten Präparate wurden zunächst mit einem hochauflösenden Mikroskop in 20-facher Vergrößerung digitalisiert. Um subjektive Einflussfaktoren bei der Auswertung, wie den Rosenthal-Effekt, zu vermeiden, wurden die Dateien zuvor verblindet. Die zu untersuchende Kallusregion wurde manuell mit der Definition einer Region Of Interest (ROI) festgelegt. Die Quantifizierung der gesuchten Objekte und Strukturen erfolgte mithilfe einer schwellenwertbasierten Objekterkennung. Hierbei wurde für jede Färbemethode ein individueller Schwellenwert festgelegt, der sich auf alle Bilder derselben Methode anwenden ließ. Individuelle Schwankungen der Bildqualität wurden dabei berücksichtigt und der Schwellenwert manuell angepasst, indem dieser auf sichere positive Strukturen wie die Wachstumsfuge bezogen wurde (Abb. 7).

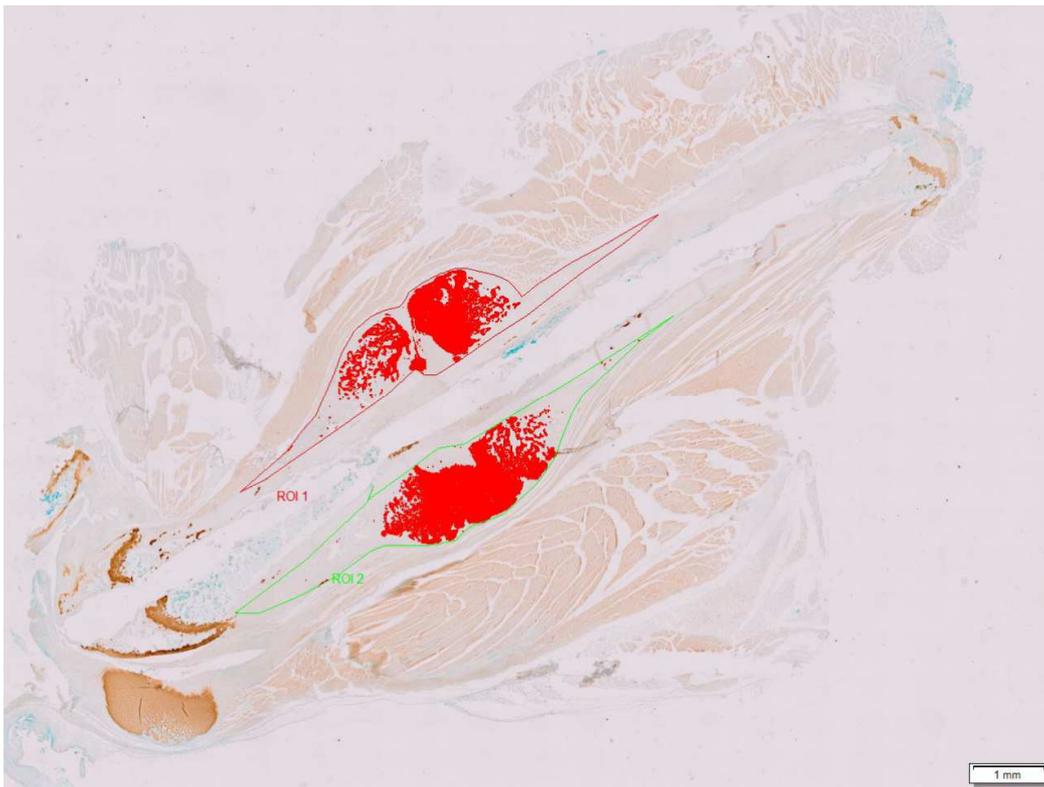


Abb. 7: Bestimmung positiv gefärbter Areale mittels CellSens am Beispiel der Kollagen Typ II Immunhistochemie. 10-fach lichtmikroskopische Vergrößerung. Dargestellt ist ein Wildtyp nach 14-tägiger Frakturheilung. Das Kallusgewebe ist mit ROI 1 und ROI 2 markiert (Region Of Interest). Die Wachstumsfuge (links im Bild) wurde als Schwellenwertreferenz herangezogen. Die rote Markierung innerhalb des Kallus markiert das positiv gefärbte Knorpelgewebe und wird zur Berechnung des knorpeligen Anteils an der Gesamtkallusfläche herangezogen.

3.1.5.4 Messung der Kallusgröße

Die Größe des Kallus wurde anhand der histologischen Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner bestimmt. Hierbei erfolgte die manuelle Bestimmung der Kallusregion mittels einer „Region of Interest“ (ROI). Mithilfe der Software CellSens wurde daraufhin die Kallusfläche in Quadratmillimetern (mm^2) errechnet.

3.1.6 Quantifizierung des Kollagengehaltes im Kallus

Zur Messung des Gesamtkollagengehaltes im Frakturkallus wurde das *Total Collagen Assay* der Firma *Quickzyme Biosciences* verwendet. Prinzip dieses Assays ist die colorimetrische Darstellung von Hydroxyprolin, einer Aminosäure des Kollagens, das zu dessen Stabilisierung als Tripelhelix beiträgt. Bevor das Kallusgewebe analysiert werden konnte, musste es zunächst unter mikroskopischer Sicht vom zuvor mobilisierten linken Oberschenkelknochen extrahiert werden. Dafür erfolgte initial die Entfernung von Haut, Muskulatur und Fettgewebe, bevor der, als derbere Struktur erscheinende Kallus, im Gesamten entfernt werden konnte.

Gewonnenes Kallusgewebe wurde abgewogen und in ein verschraubbares Eppendorfgefäß überführt. Danach wurde dem Gewebe eine gewichtsadaptierte Menge 12M HCl (12 molare Salzsäure) zugeführt (10 µl HCl / mg Kallusgewebe) und für 20 Stunden bei 95°C inkubiert. Die Behandlung mit Salzsäure führte zu einer hydrolytischen Denaturierung der Proteinstruktur unter Zerstörung der Wasserstoffbrückenbindungen, sodass eine Aufspaltung in einzelne Aminosäuren erfolgte. Zeitgleich wurde der im Kit enthaltenen Kollagen-Standardlösung, die als Referenzgröße pures Kollagen enthält, ebenfalls eine adaptierte Menge an HCl hinzugefügt und zu den Proben in den Hitzeinkubator gestellt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei 13 000 x g (g = Gravitationskraft) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde für die weiteren Untersuchungen abpipettiert.

Zur Erstellung einer Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe der Standardlösung angefertigt. Dafür wurden acht Eppendorfgefäße gemäß des in Tab. 13 aufgeführten Schemas beschriftet und befüllt.

Tab. 13: Verdünnungsreihe der Standardproben zur Erstellung der Eichgerade. Der Probe S1 wurden 125 µl der zuvor unter Hitze denaturierten Kollagen-Standardlösung (Stock), 62,5 µl 4M HCl und 62,5 µl H₂O zur weiteren Verdünnung und Oxidation hinzugefügt. Die Kollagenkonzentration der Probe ist in [µg/ml] angegeben.

	Probe	4M HCl	H ₂ O	[µg/ml]
S1	125 µl Stock	62,5 µl	62,5 µl	300
S2	120 µl S1	60 µl		200
S3	90 µl S2	90 µl		100
S4	90 µl S3	90 µl		50
S5	90 µl S4	90 µl		25
S6	90 µl S5	90 µl		12,5
S7	90 µl S6	90 µl		6,25
S8	0 µl	90 µl		

Die Standardlösungen S1-S8 und die zu untersuchenden Kallusgewebeproben wurden anschließend wie folgt auf eine 96-Well-Platte übertragen (Abb. 8):

	8	9	10	11	12
A	ITA2 ^{-/-} 1:10	WT 1:10	ITA2 ^{-/-} 1:20	WT 1:20	S1
B					S2
C					S3
D					S4
E					S5
F					S6
G					S7
H					S8



The photograph shows a 96-well plate with wells labeled 8-12 at the top. Wells A8 and A10 contain a pinkish-red color, while other wells show varying degrees of yellow and white. A red box highlights the wells A8-A12 and H8-H12 in the table and the corresponding wells in the photograph.

Abb. 8a/b: (a) Ausschnitt einer 96-Well-Platte am Beispiel einer Belegung mit Kallusgewebe eines Wildtyps (WT, FS100) und einer Integrin α 2-defizienten Probe (ITA2^{-/-}, FS104) sowie der Standardproben S1-S8. Die Kallusgewebeproben wurden zuvor mit 4M HCl jeweils in einem Verhältnis von 1:10 und 1:20 verdünnt. In jedes Well wurden 35 µl der jeweiligen Probe und 75 µl der im Kit enthaltenen Pufferlösung gegeben. (b) Foto der in Abb 7a abgebildeten Plattenbelegung. Es ist eine intensivere Farbentwicklung in den Wells A8 und A10, die mit Integrin α 2 defizientem Kallusgewebe belegt sind, als Hinweis für einen höheren Kollagengehalt im Kallus zu erkennen.

Die belegte Platte wurde anschließend mit Folie verschlossen und für 20 Minuten auf die Rüttelplatte gestellt, um ein gleichmäßiges Verteilen der Reagenzien zu gewährleisten.

Die finale Farbentwicklung erfolgte durch Zugabe eines im Kit enthaltenen Detektionsreagenzes, dessen Bestandteile A und B im Verhältnis von 2:3 miteinander vermischt und jeweils 75 µl der Mixtur auf jedes belegte Well aufgetragen wurden. Anschließend wurde die Platte mit Folie verschlossen und für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Die Analyse der Hydroxyprolinmenge erfolgte anschließend durch das Auslesen der Platte in einem Mikrotiterplatten-Photometer (TECAN Sunrise) bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Hilfe der Software XFLUOR4, Version 4.50. Durch die Bindung des Chromogens an modifiziertes Hydroxyprolin erfolgte so der indirekte colorimetrische Nachweis von Kollagen im Frakturkallus. Die Messungen wurden bei jeweils drei Tieren jedes Genotyps zum Zeitpunkt 7 Tage durchgeführt.

3.1.7 Analyse der Morphologie des Kallus mittels µCT

Neben der histomorphologischen Auswertung galt die Untersuchung mittels Mikro-Computertomographie (µCT) als zusätzliche qualitative und quantitative Analyse der Zusammensetzung des Frakturkallus. Die Verwendung eines standardisierten Auswertungsalgorithmus erlaubte zudem eine höhere Objektivität der Untersuchung.

Die Visualisierung des frakturierten Femurs erfolgte direkt nach Tötung und Präparation der Tiere mit dem *in vivo-microCT Skyscan 1176* der Firma *Bruker*. Die dort erstellten zweidimensionalen Bilder (Abb. 9) mussten für die weitere Evaluation in ein 3D-Format umgewandelt werden. Dies erfolgte mit der Software *NRecon (Bruker)*, wobei für jeden der dort verwendeten Rekonstruktionsparameter, unter anderem Kontrast und Artefaktreduktion, der gleiche Wert für alle Knochenpräparate voreingestellt wurde.



Abb. 9: Frakturiertes Femur eines Integrin α 2-defizienten Versuchstieres nach 14-tägiger Frakturheilung. Dargestellt ist ein zweidimensionales Röntgenbild zur orientierenden Planung des Bereiches für die dreidimensionale computertomographische Darstellung.

Mit der Software *CTVox (Bruker)* wurden die Oberschenkelknochen im dreidimensionalen Raum visualisiert und vertikal ausgerichtet. Die Auswertung der Bestandteile des Kallus erfolgte mit dem Programm *CTAn (Bruker)* mittels standardisierter Operatoren. Hierbei wurde das Prinzip der Grauwerterkennung zur Bestimmung der Gewebedichte genutzt (Abb. 10). Da Röntgenstrahlen bei dichterem Gewebe wie Knochen im Vergleich zum Weichgewebe eine verminderte Durchlässigkeit besitzen, konnte somit eine exakte Differenzierung von mineralisierter zu nicht-mineralisierter Matrix erfolgen.

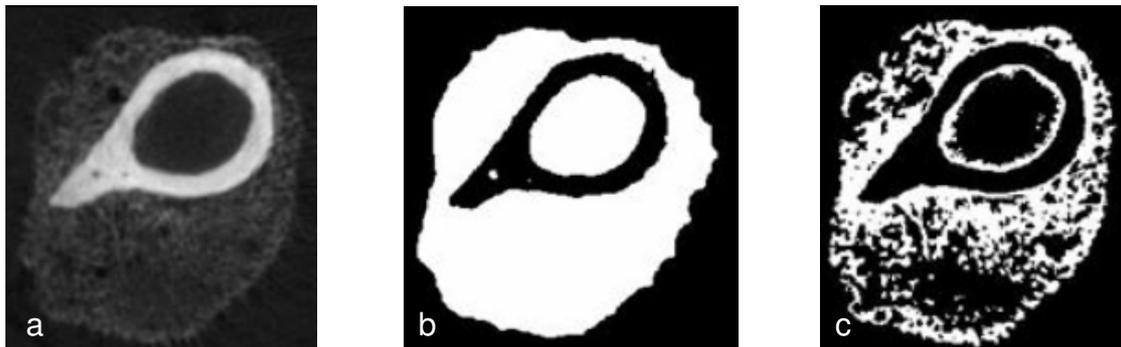


Abb. 10a/b/c: Vereinfachte Darstellung der Knochenanalyse im μ CT mit der Software CTAn. Gezeigt ist ein linkes Femur im Querschnitt. Zunächst erfolgte die Definition einer Region of Interest anhand des Nativbildes (a). Mit Hilfe eines zuvor festgelegten Protokolls wurde nun automatisiert der zu analysierende Kallusbereich (b) (äußere weiße Fläche) definiert. Im letzten Schritt erfolgte über die Grauwertbestimmung die Abgrenzung von mineralisiertem (weiß) zu nicht-mineralisiertem (schwarz) Gewebe (c).

Es wurden die Zeitpunkte 14 und 21 Tage untersucht. Eine frühere Begutachtung nach 4 und 7 Tagen erschien nicht sinnvoll, da der Kallus in den frühen Stadien der Frakturheilung überwiegend aus Weichgewebe besteht.

3.1.8 Genexpressionsanalytik

Die Analyse spezifischer mRNA-Expressionsmuster gibt Aufschluss über die Transkriptionsaktivität und somit Expression einzelner Gene und Proteine in Zellen und Geweben. Bevor eine Genexpressionsanalytik mittels quantitativer Real Time PCR (RT-qPCR) mit Hilfe spezifischer Primer erfolgen konnte, musste das zu untersuchende Gewebe zunächst isoliert und einer Reihe weiterer Verarbeitungsschritte (RNA-Extraktion, Reverse Transkription und cDNA-Synthese) unterzogen werden. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Zusammensetzung des Kallusgewebes zum Zeitpunkt 4 und 7 Tage nach Fraktur. Alle Prozeduren zur Verarbeitung des Gewebes wurden mit den Reagenzien und Hilfsmitteln der Firmen Qiagen und Applied Biosystems (Tab. 14) durchgeführt.

Tab. 14: Auflistung der Prozeduren zur Aufbereitung des Gewebes und Herkunft der Reagenzien und Chemikalien.

Prozedur	Herkunft
RNA-Extraktion	RNeasy® Mini Kit (Qiagen)
RNA-Reinigung (DNA-Verdau)	RNase-Free DNase Set (Qiagen)
cDNA-Synthese	High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems)
qPCR-Analyse	Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen)

3.1.8.1 RNA-Extraktion aus Kallusgewebe

Zunächst erfolgte, unter mikroskopischer Sicht und sterilen Bedingungen, die Gewinnung des Kallusgewebes des linken Femurs. Das extrahierte Gewebe wurde in Metallkugeln enthaltende Eppendorfgefäße überführt. Zur chemischen Gewebslyse wurde der Puffer RLT (RNeasy) unter Zusatz von β -Mercaptoethanol zur Deaktivierung von RNasen (10 ml RLT / 10 mg Gewebe) hinzugegeben. Zusätzlich wurde das chemisch lysierte Gewebe für einige Minuten in einen Homogenisator gestellt, dessen schnelles und ruckartiges vertikales Rütteln Bewegungen der Metallkugeln innerhalb der Eppendorfgefäße

auslöste und somit die mechanische Lyse des Gewebes bewirkte. Das Lysat wurde danach auf höchster Stufe für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand für die Extraktion von RNA verwendet. Es wurde gemäß des im Anhang befindlichen Protokolls verfahren (s. Anhang, Protokoll 7). Es erfolgte daraufhin für jede Probe eine photometrische Messung des RNA- und auch DNA-Gehalts. Dafür wurden jeweils 2 µl einer Probe mit 60 µl Pufferlösung (PBS) versetzt und mit Hilfe der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm der Gehalt einsträngiger RNA gemessen. Die Extinktion bei 280 nm diente zum Ausschluss von Verunreinigungen durch Doppelstrang-DNA und somit zur Überprüfung der Reinheit der Probe. Dafür wurde in einem nächsten Schritt der Quotient der jeweiligen Wellenlängen von RNA / DNA (260 nm / 280 nm) gebildet. Nur jene Proben, deren Quotient > 2 war, die also eine mehr als doppelt so hohe Menge an einsträngiger RNA im Verhältnis zu doppelsträngiger DNA aufwiesen, wurden im weiteren Verlauf verwendet.

3.1.8.2 cDNA-Synthese

Da das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion auf der Amplifikation von Doppelstrang-DNA mit Hilfe DNA-spezifischer Enzyme beruht, musste aus der zuvor extrahierten RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert werden. Die zugrundeliegende Transkription einsträngiger RNA in Doppelstrang-cDNA erfolgte hierbei durch das Enzym Reverse Transkriptase, das als spezialisierte RNA-abhängige DNA-Polymerase zunächst eine Primersequenz für die initiale Bindung an die zu transkribierende RNA benötigte. Die heute verwendeten Transkriptions-Kits enthalten daher, zusätzlich zur Enzymkomponente, ein Puffermedium, das, neben der zur Strangsynthese benötigten dT-Nukleotide, ein Oligo-dT-Nukleotid (Primer) enthält. In dieser Arbeit wurde das High-Capacity *RNA-to-cDNA™ Kit* der Firma *Applied Biosciences* verwendet und anhand eines im Labor etablierten Protokolls verfahren (s. Anhang, Protokoll 8).

3.1.8.3 Real-Time quantitative PCR

Die Methode der real-time quantitativen PCR (qPCR) diente der Bestimmung der Expressionsmenge spezifischer mRNA in Echtzeit. Dabei wurde das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase chain reaction) genutzt, bei der eine exponentielle Vervielfältigung unter Verdopplung der zuvor synthetisierten cDNA in jedem Zyklus stattfand. In jedem Zyklus wurden drei Phasen durchlaufen: Denaturierung, Annealing und Elongation. Zunächst wurde die Doppelstrang-cDNA unter kurzzeitiger Hitzeinkubation bei 95°C aufgetrennt (denaturiert). Im nächsten Schritt erfolgte die Anlagerung spezifischer Primer an für die gesuchten Genprodukte kodierenden Loci auf der einsträngigen cDNA. Dieser Prozess erfolgte bei einer zuvor determinierten Temperatur von 60°C (Annealingtemperatur), bei der eine optimale Annäherung der Primer an den Einzelstrang stattfinden konnte. Alle verwendeten Primer wiesen ihr Temperaturoptimum in diesem Bereich auf, sodass die Bildung unspezifischer Primerdimere bei zu geringen oder eine fehlende Produktbildung bei zu hohen Temperaturen verhindert wurde. Mit der Verwendung jeweiliger Vorwärts (forward, fwd)- und Rückwärts (reverse, rev)-Primer wurde Anfangs- und Endpunkt des zu detektierenden Genabschnittes bestimmt. Die Bindung ausgewählter Primer an die cDNA-Abschnitte war obligat für die nachfolgende Elongationsphase, bei der eine hitzestabile Taq (*Thermus aquaticus*) - Polymerase bei einem Temperaturoptimum von 72°C an das 3'-Ende des Primers binden und den dazugehörigen cDNA-Abschnitt in 3'-5'-Richtung mit den fehlenden Nukleotiden auffüllen konnte. Mit der Zugabe des, mit der Doppelstrang-cDNA interkalierenden, Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green konnte der Gehalt an neusynthetisierter Doppelstrang-cDNA nach jedem Zyklus bestimmt werden. Im Zuge der real-time quantitativen PCR (qPCR) konnte hier mit einer integrierten Kamera die Amplifikation der cDNA-Produkte unter Messung der Fluoreszenz in Echtzeit dargestellt werden. Das Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz im Verlauf der Amplifikation wurde als Zyklus-Schwellenwert (Ct-Wert, cycle threshold) determiniert. Erst mit Überschreiten des

Schwellenwertes konnte die exponentielle Vervielfältigung der cDNA zuverlässig quantifiziert werden. Je früher dieser Wert erreicht wurde, desto höher war der Gehalt gesuchter cDNA in der analysierten Probe. In dieser Arbeit wurde in der Versuchs- und Kontrollgruppe die Expression der in Tab. 15 aufgeführten Gene in murinem Frakturkallusgewebe (4 und 7 Tage Heilung) untersucht. Zur exakten Quantifizierung der Expressionsmengen wurden zunächst die Amplifikationseffizienzen jedes Primerpaares (fwd+rev) für einen Zyklus bestimmt. Unter Zuhilfenahme einer Verdünnungsreihe (1:1, 1:2, 1:4; 1:8, 1:16; 1:32; 1:64) mit einer Kontroll-cDNA an die der untersuchte Primer sicher bindet, wurde anhand der Ct-Werte eine lineare Regressionsgerade für jeden Primer erstellt. Aus der Steigung der Geraden konnte mit Anwendung folgender Formel die Effizienz E berechnet werden:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Eine Effizienz $E = 2$ (100%) bedeutete eine vollständige Verdopplung der cDNA während eines Zyklus. Michael W. Pfaffl sah in dieser Methode der Effizienzbestimmung einen Nachteil hinsichtlich einer überschätzen Effizienz (Pfaffl, 2004). In dieser Arbeit erreichten einige Primer ebenfalls Effizienzwerte $E > 2$. Diese Tatsache konnte jedoch durch die sorgfältige Prüfung der Schmelzkurven der Primer hinsichtlich ihrer Spezifität und durch die Evaluation des Bestimmtheitsmaßes R^2 der Verdünnungsreihen vernachlässigt werden. Alle Untersuchungen der Genexpression erfolgten mit Hilfe der Software *iQTM5 Optical System Software, Version 2.1* der Firma *Bio-Rad Laboratories*. Abbildung 11 zeigt einen optimalen Schmelzkurvenverlauf am Beispiel des Primers Runx2 mit der Ausbildung eines einzelnen Peaks als Ausdruck der Entstehung eines spezifischen PCR-Produkts. Primer, die mehr als einen Peak aufwiesen, haben

nicht spezifisch an die cDNA gebunden und wurden von der Analyse ausgeschlossen.

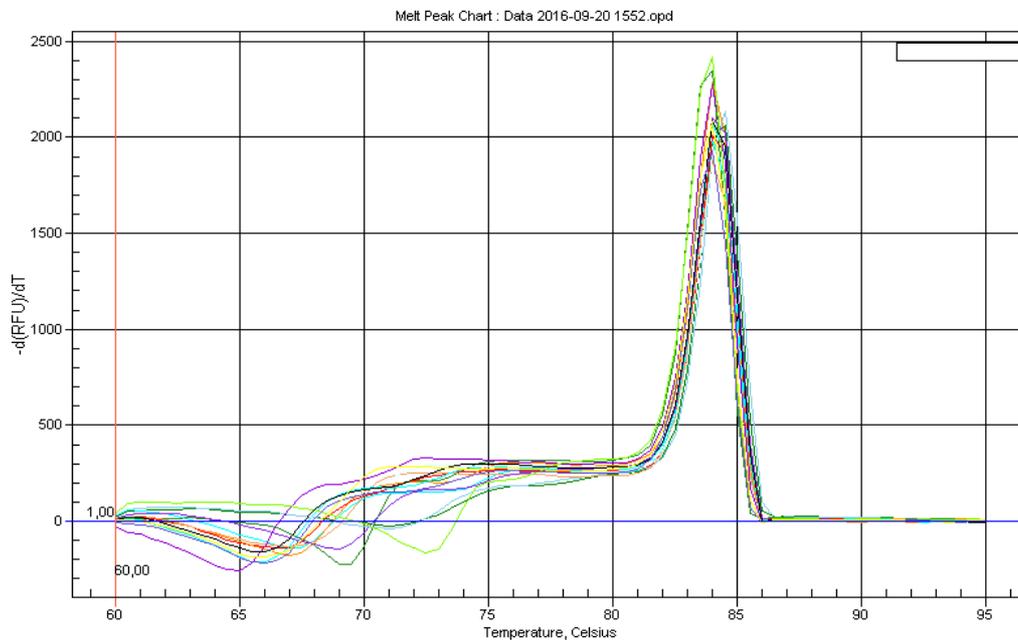
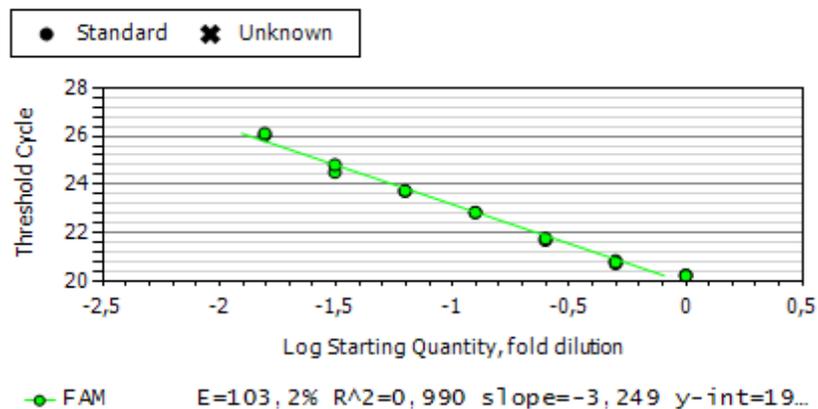


Abb. 11: Schmelzkurvenanalyse des Primers Runx2 mit einzeltem Peak und spezifischer cDNA-Bindung. Es wurde die Temperatur in °C (x-Achse) gegen die Fluoreszenz im Verhältnis zur Temperatur $-d(\text{RFU})/dT$ (y-Achse) aufgetragen

Anhand der linearen Regressionsgeraden der Verdünnungsreihe konnte zudem das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt werden, das einen Parameter für die Kontinuität und Verlässlichkeit der Primerbindung an Proben unterschiedlichen cDNA-Gehalts darstellte. $R^2=1$ bedeutete, dass der Primer bei jeder cDNA-Konzentration in gleichem Maße an die cDNA gebunden hat (s. Abb. 12).



PCR Standard Curve : Data 2016-09-20 1552.opd

Abb. 12: Lineare Regressionsgerade einer cDNA-Verdünnungsreihe mit dem Primer Runx2. Es wurde die n-fache Verdünnung (x-Achse) gegen den Schwellen-/Ct-Wert (y-Achse) aufgetragen. Die Software berechnete eine Effizienz $E=103,2\%$ und ein Bestimmtheitsmaß $R^2=0,99$

Nur Primer, die eine Effizienz $E > 1,97$ und $E < 2,24$ sowie eine spezifische Schmelzkurve und ein Bestimmtheitsmaß $R^2 > 0,986$ aufwiesen, wurden für die Analysen herangezogen.

Für alle Prozeduren der Genexpressionsanalytik wurden die im Jahre 2009 von Bustin und anderen herausgegebenen MIQE-Richtlinien (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) als Orientierungshilfe herangezogen (Bustin et al., 2009). Gemäß dieser Richtlinien wurden für die relative Quantifizierung der qPCR-Produkt nicht nur ein, sondern zwei Referenzgene, die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und das $\beta 2$ -Mikroglobulin (B2M) verwendet. Diese sogenannten Housekeeping-Gene dienen als Normalisierungsfaktor und konnten aufgrund ihrer konstanten Expression in den untersuchten Geweben beider Gruppen (WT und ITA2^(-/-)) zur relativen Quantitätsbestimmung der gesuchten, in Tab. 15 aufgeführten, Genprodukte verwendet werden.

Tab. 15: Auflistung durchgeführter Genexpressionsanalytik und dazugehöriger Markergene

Analysegruppe	Primer	Kontroll-cDNA	R ²	E in %
<i>Kollagenbindende</i>	Integrin α 1	MC3T3	0,996	106,9
<i>Integrine</i>	Integrin α 10	MC3T3	0,994	103,4
	Integrin α 11	MC3T3	0,996	117,7
<i>Knochen- metabolismus</i>	Runx2	MC3T3	0,990	103,2
	Osterix	MC3T3	0,995	109,8
	ALP	MC3T3	0,986	124,1
	BMP2	MC3T3	0,997	99,8
<i>Chondrozyten- differenzierung</i>	Sox9	Chondrozyten	0,993	99,1
<i>Inflammation</i>	COX-1	TNF- α -Fibroblasten	0,994	98,9
	COX-2	TNF- α -Fibroblasten	0,993	97,1

Die Berechnung der amplifizierten cDNA-Mengen jedes Primers erfolgte mit der Delta-Delta-Ct-Methode. Dabei wurde zunächst die Differenz der gemittelten Ct-Werte des Zielgens, also des gesuchten Gens, und der mittleren exprimierten Menge des Referenzgens (auch Housekeeping-Gen) gebildet (Delta-Ct). In einem nächsten Schritt wurden die für jede Gruppe (ITA2^(-/-)/WT) separat errechneten Differenzen gemittelt und dienten zur Differenzbildung zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe (Delta-Delta-Ct). Die errechneten Delta-Delta-Ct-Werte wurden anschließend als negativer Exponent zur Basis der Effizienz des Zielgens eingesetzt, sodass eine relative Quantifizierung mit Berücksichtigung der Primereffizienzen erfolgen konnte.

3.1.9 Datenanalyse & Statistik

Die Ergebnisse wurden mit *Microsoft Office Excel®* dokumentiert und mit dem Programm *GraphPad Prism 6* der Firma *GraphPad Software Inc* grafisch dargestellt und statistisch evaluiert. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Versuchsreihe determiniert. Für die statistische Evaluation wurde der Mann-Whitney-U-Test zur nicht-parametrischen Testung unabhängiger Stichproben angewandt. Eine Ausnahme bildete die Auswertung der Genexpression mittels qPCR, bei der wegen der Betrachtung gepaarter Stichproben der Wilcoxon-Signed-Rank-Test zur Anwendung kam.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische und bildgebende Kontrolle

Die klinischen und bildgebenden Kontrollen der Versuchstiere erfolgten sowohl postoperativ mit Überwachung der Atmung während der Aufwachphase und einer röntgenologischen Dokumentation der Lage des intramedullären Implantates als auch postmortal mit der Gewichtsdocumentation und einer erneuten röntgenologischen Lageüberprüfung des Osteosynthesematerials. Für die Evaluation wurden ausschließlich Tiere verwendet, die keine der folgenden Ausschlusskriterien erfüllten:

- Infektion des Operationsgebietes
- Dislozierung des Osteosynthesematerials (z.B. Austreten des Implantates aus dem Knochen)
- Grobe Dislozierung der Frakturrenden
- Perioperativer Exitus

4.2 Histomorphologische Evaluation des Frakturkallus

4.2.1 Alcianblau

Die quantitative Auswertung der Alcianblau-positiven Areale des Kallus ergab bei den Integrin $\alpha 2^{(-/-)}$ -Versuchstieren nach 7 Tagen der Heilung mit $46,0 \% \pm 10$ im Vergleich zu $23,3 \% \pm 7,8$ bei den Wildtypen einen signifikant ($p < 0,0001$) höheren Anteil an Knorpelgewebe bezogen auf die Gesamtgröße des Frakturkallus ($n = 9; 12$ [WT; ITA2^(-/-)]). Zum Zeitpunkt 14 Tage konnte dagegen mit $14,9 \% \pm 3,3$ ein signifikant ($p < 0,0111$) höherer knorpeliger Anteil am Gesamtkallus bei den Wildtypen, verglichen mit $7,9 \% \pm 4,2$ bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz festgestellt werden [$n = 7; 7$ (WT; ITA2^(-/-))]. Nach 21 Tagen Frakturheilung zeigten die Gruppen keinen Unterschied ($p < 0,7005$) [$n = 7; 5$ (WT; ITA2^(-/-))] (Abb. 13).

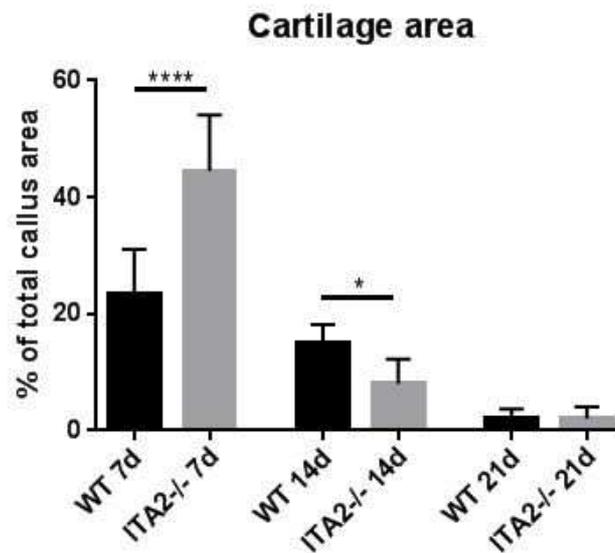


Abb. 13a: Histomorphologische Quantifizierung des relativen Anteils der Alcianblau-positiv gefärbten Fläche an der gesamten Kallusfläche. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

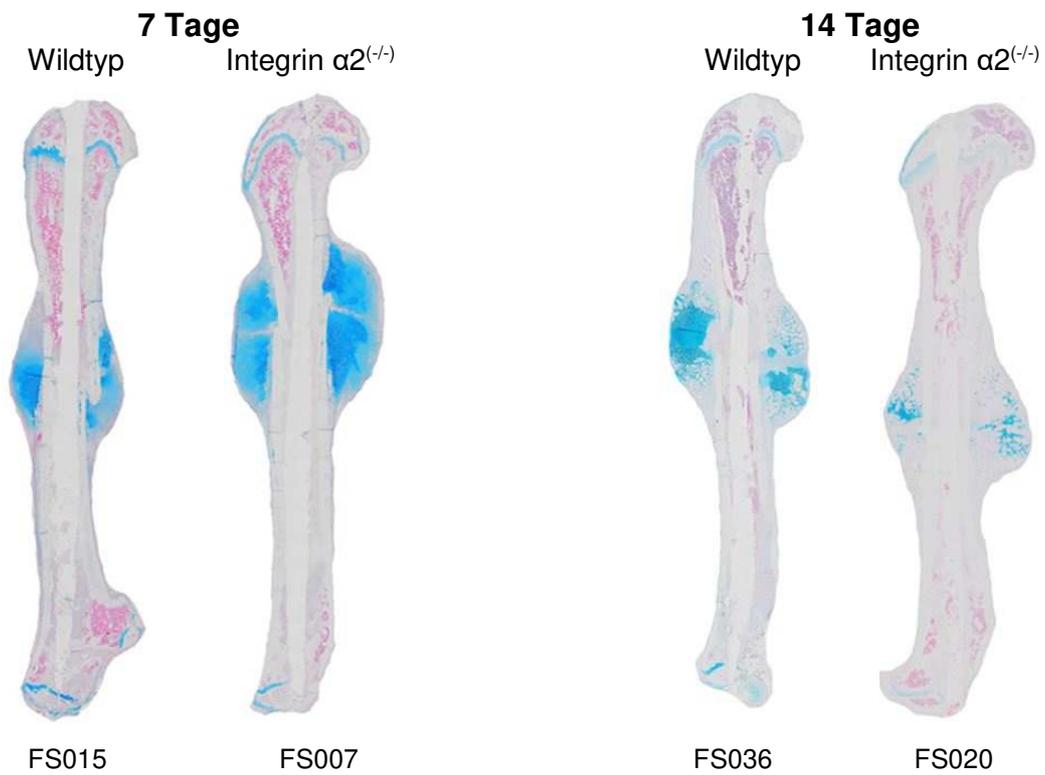


Abb.13b: Repräsentative Bilder der mit Alcianblau gefärbten Frakturkalli nach 7 und 14 Tagen Heilungszeitraum.

4.2.2 Kollagen Typ II

Bei der immunhistochemischen Analyse ergab sich mit $35,4 \% \pm 12,3$ eine signifikant ($p < 0,0003$) erhöhte Expression des Typ II-Kollagens im 7 Tage alten Frakturkallus der Integrin $\alpha 2^{(-/-)}$ -Versuchstiere im Vergleich zu $17,6 \pm 2,1$ beim Wildtyp [$n = 6;11$ (WT;ITA2^(-/-))]. 14 Tage nach Fraktursetzung zeigten dagegen die Wildtypen mit $16,2 \pm 2,3$ einen signifikant ($p < 0,0087$) höheren Kollagen Typ II-Anteil im Vergleich zu $8,5 \% \pm 3,4$ beim Knockout-Typ [$n = 6;6$ (WT;ITA2^(-/-))]. Nach drei Wochen konnte kein Unterschied ($p < 0,0736$) zwischen den Genotypen festgestellt werden [$n = 5;6$ (WT;ITA2^(-/-))] (Abb. 14).

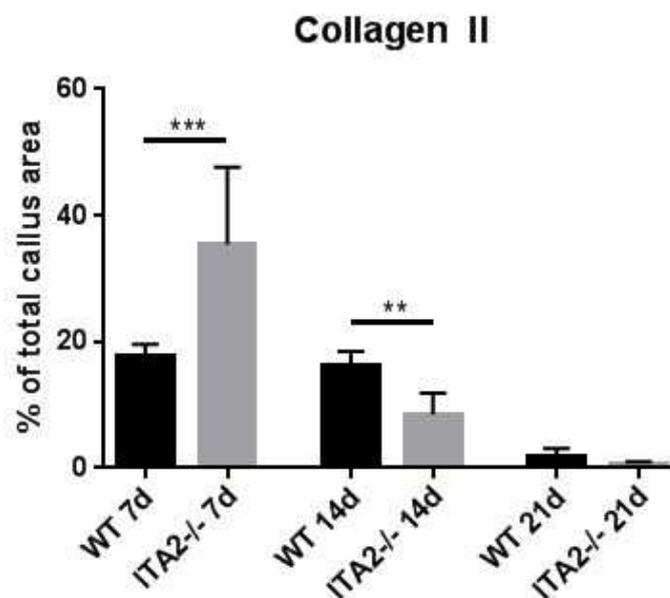


Abb. 14a: Immunhistochemische Quantifizierung des Kollagen Typ II-Gehalts des Frakturkallus (WT und ITA2^(-/-)) nach 7,14 und 21 Tagen der Heilung (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.3 Kollagen Typ X

Analog zu den Ergebnissen der Kollagen Typ II-Immunhistochemie zeigten Integrin $\alpha 2^{(-/-)}$ Tiere mit $15,7 \% \pm 7,6$ eine, verglichen zu $6,8 \% \pm 1$ beim Wildtyp, signifikant ($p < 0,0047$) erhöhte Kollagen Typ X-Expression in der frühen Phase (nach 7 Tagen) der Frakturheilung [$n = 6; 10$ (WT; ITA2 $^{(-/-)}$)]. Zum Zeitpunkt 14 Tage dominierte die signifikante ($p < 0,0079$) Überexpression des Typ X-Kollagens mit $12 \% \pm 1$ auf Seiten der Wildtypen, verglichen mit $6,1 \% \pm 3$ bei Integrin $\alpha 2$ defizienten Tieren [$n = 5; 5$ (WT; ITA2 $^{(-/-)}$)]. Es konnte kein Unterschied ($p < 0,9683$) zwischen den Gruppen nach 21 Tagen festgestellt werden [$n = 5; 5$ (WT; ITA2 $^{(-/-)}$)] (Abb. 15).

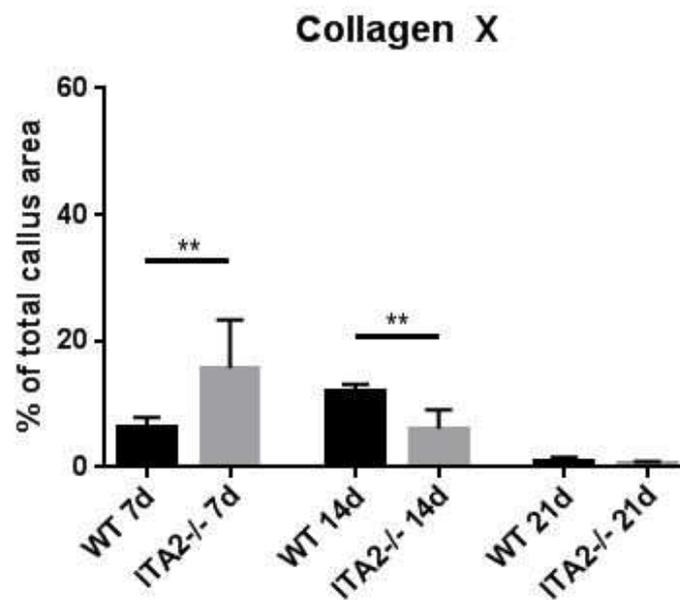


Abb. 15a: Immunhistochemische Quantifizierung des Kollagen Typ-X-Gehalts des Frakturkallus (WT und ITA2 $^{-/-}$) nach 7, 14 und 21 Tagen der Heilung (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.4 Masson-Goldner: Mineralisierung

Die histologische Quantifizierung der mineralisierten Kallusfläche anhand der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung ergab mit $23,8 \% \pm 5,7$ einen hochsignifikant ($p < 0,0004$) vermehrt mineralisierten Flächenanteil des Kallus bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz im Vergleich zu $11,1 \% \pm 3,4$ beim Wildtyp zum Zeitpunkt 14 Tage [$n = 6; 9$ (WT; ITA2^(-/-))]. Auch nach 21 Tagen der Heilung wiesen die Knockout-Tiere mit $35,5 \% \pm 5,1$ eine signifikant ($p < 0,0221$) vermehrte Kallusmineralisation verglichen mit $28,8 \% \pm 3,7$ beim Wildtyp auf [$n = 7; 6$ (WT; ITA2^(-/-))]. In der frühen Phase der Frakturheilung konnte kein Unterschied ($p < 0,5931$) hinsichtlich der mineralisierten Kallusfläche detektiert werden [$n = 8; 11$ (WT; ITA2^(-/-))] (Abb. 16).

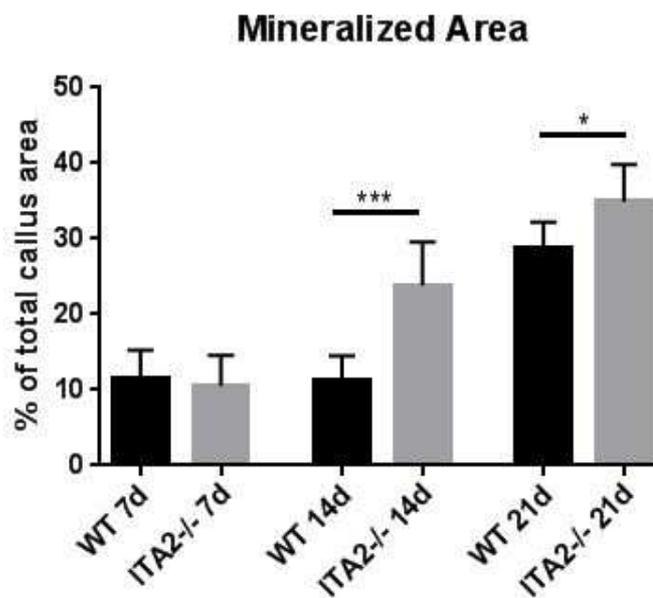


Abb. 16a: Histomorphologische Quantifizierung des relativen Anteils der leuchtend grün gefärbten Fläche an der gesamten Kallusfläche (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

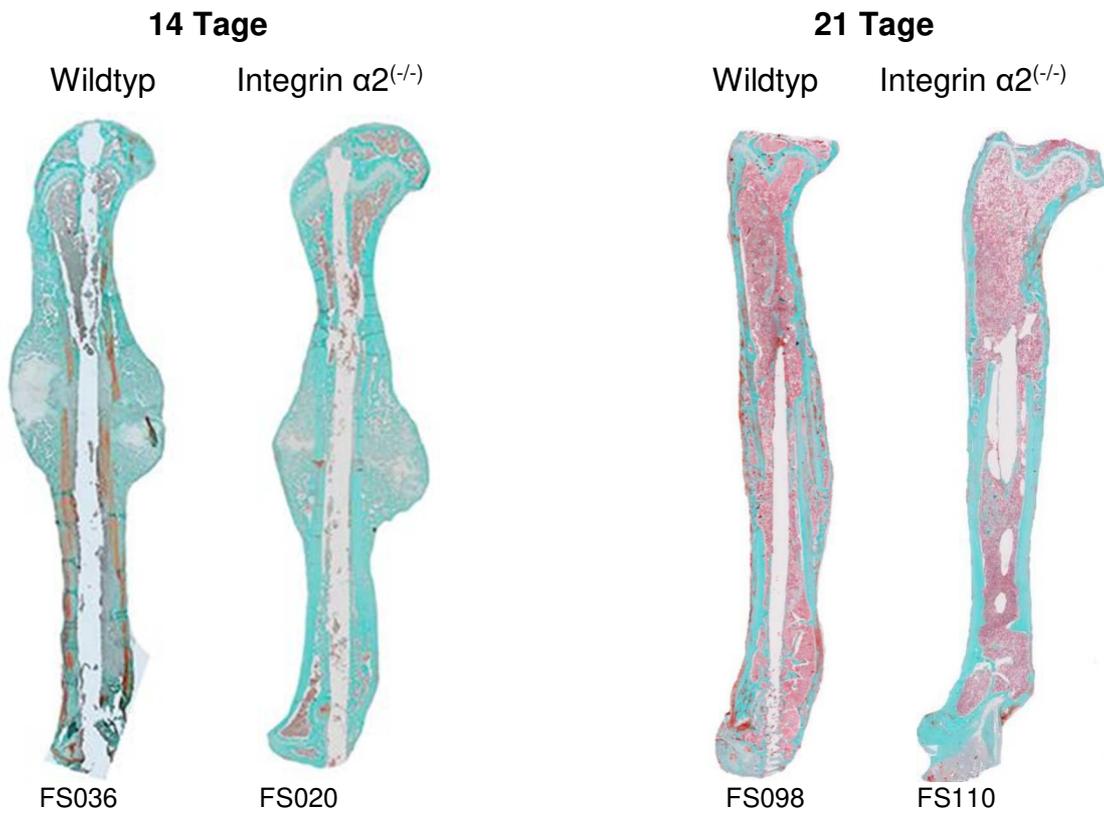


Abb. 16b: Repräsentative Bilder der mit Masson-Goldner-Trichrom gefärbten frakturierten Knochen 14 und 21 Tage nach Fraktursetzung

4.2.5 Kallusgröße

Die Integrin $\alpha 2$ -defizienten Tiere wiesen in der frühen Heilungsphase, sprich einer Heilungszeit von 7 Tagen, mit einer mittleren Kallusfläche von $6,098 \text{ mm}^2 \pm 1$ einen hochsignifikant ($p < 0,0007$) größeren Frakturkallus als die Wildtypen (Mittelwert $3,564 \text{ mm}^2 \pm 1,34$) auf [$n = 8; 11$ (WT; ITA2^{-/-})]. Nach einem Heilungszeitraum von 14 Tagen kehrten sich diese Ergebnisse jedoch zugunsten der Kontrollgruppe um. Diese zeigte mit einer mittleren Kallusgröße von $7,82 \text{ mm}^2 \pm 0,61$ eine hochsignifikant ($p < 0,007$) größere Kallusfläche als die ITA2^{-/-}-Gruppe mit $4,57 \text{ mm}^2 \pm 1,96$ [$n = 6; 9$ (WT; ITA2^{-/-})]. Es konnte kein Unterschied zum Zeitpunkt 21 Tage festgestellt werden (Abb. 17).

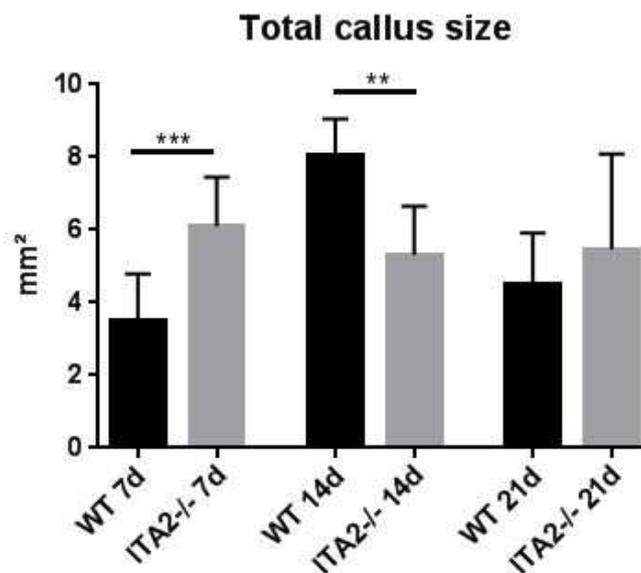


Abb.17: Histomorphologische Auswertung der Gesamtkallusgröße zu den Zeitpunkten 7, 14 und 21 Tagen nach Frakturierung (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.6 TRAP: Anzahl Osteoklasten

Die Auszählung der TRAP-positiven Osteoklasten in den Frakturkalli ergab signifikante Unterschiede in der Anzahl der knochenresorbierenden Zellen. Sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen wiesen die Tiere mit Integrin α 2-Defizienz höhere Osteoklastenzahlen im Frakturheilungsgebiet auf. Die Zahl TRAP-positiver Zellen betrug nach 14 Tagen gemittelt 56 ± 17 Zellen / mm^2 Kallusfläche bei den Wildtypen und 169 ± 47 Zellen / mm^2 Kallusfläche bei den Integrin α 2-defizienten Tieren ($p < 0,0012$) [$n = 6;7$ (WT;ITA2^{-/-})]. Nach 21-tägiger Heilung konnte bei den Wildtypen eine Zellzahl von 60 ± 19 Zellen / mm^2 und bei den Knockout-Tieren eine Zellzahl von 113 ± 41 Zellen / mm^2 Kallusfläche verzeichnet werden ($p < 0,0173$) [$n = 6;5$ WT;ITA2^{-/-}] (Abb. 18).

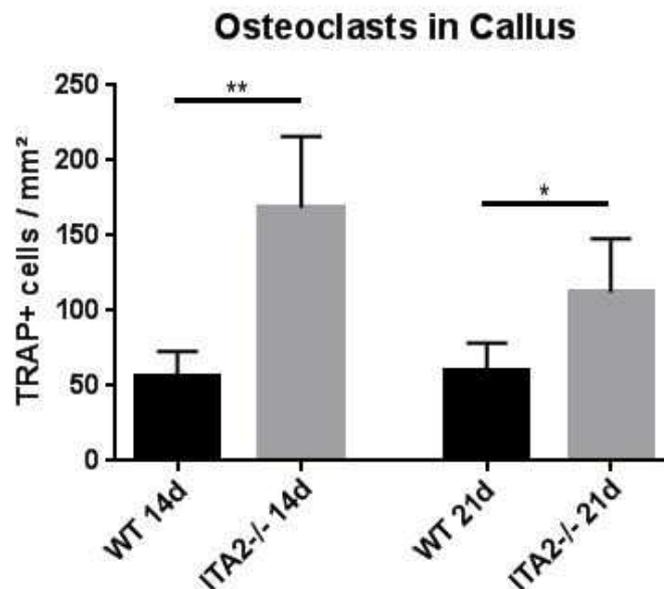


Abb.18a: Histomorphologische Auswertung der TRAP+ Zellen im Frakturkallus (Osteo-(Chondro-)klasten) nach zwei und drei Wochen Heilungsperiode (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

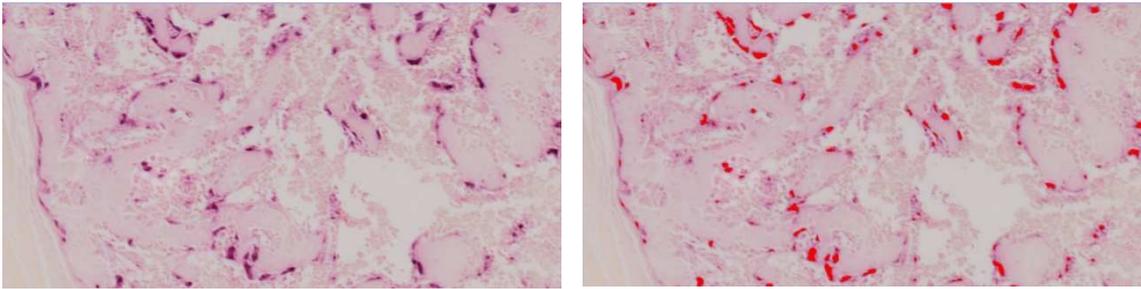


Abb. 18b: Repräsentative Bilder der TRAP-positiven Zellen im Integrin $\alpha 2$ - defizienten Frakturkallus nach 21-tägiger Frakturheilung. Die rechte Abbildung zeigt TRAP-positive mehrkernige Riesenzellen (Osteoklasten) innerhalb der Resorptionszonen. Links ist nach Bestimmung eines Schwellenwertes die Auszählung der TRAP-positiven Zellen erfolgt.

4.2.7 BrdU: Zellproliferation (Zellen in der S-Phase)

Nach Quantifizierung der Zellen in der S-Phase zur Analyse der Zellproliferationsrate in den Kalli 7 Tage alter Frakturen, konnte mit durchschnittlich 1176 ± 259 BrdU⁺- Zellen / mm² Kallusfläche bei den Wildtypen und 520 ± 56 BrdU⁺- Zellen / mm² Kallusfläche bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz ein nicht signifikanter Trend ($p < 0,2$) zugunsten der Wildtypen festgestellt werden [$n = 2;3$ WT; ITA2^(-/-)] (Abb. 19).

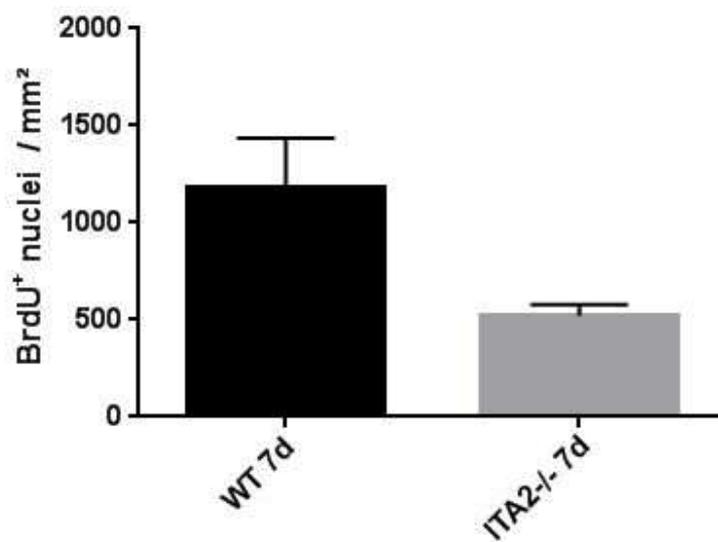


Abb. 19: Immunhistochemische Quantifizierung der Zellproliferationsrate mittels anti-BrdU-Antikörper (Anzahl Zellen in der S-Phase) nach einwöchiger Frakturheilung (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.8 COX-2: Inflammationsmarker

Die Quantifizierung des Enzyms COX-2 im Frakturkallus erfolgte nach 7- und 14-tägiger Frakturheilung. Die Positivität der Färbung zeigte sich nach 7 Tagen überwiegend intrazellulär, wohingegen nach 14 Tagen das Signal überwiegend extrazellulär detektiert werden konnte. Demnach erfolgte nach 7 Tagen eine Auszählung der COX-2-positiven Zellen pro mm² Kallusgewebe und nach 14 Tagen die Bestimmung der COX-2-positiven Fläche im Gesamtkallus.

Die Auszählung nach 7 Tagen ergab eine durchschnittliche Zellzahl COX-2-positiver Zellen von 80 ± 16 Zellen / mm² Kallusgewebe bei den Wildtypen und von 206 ± 75 Zellen / mm² bei den Integrin $\alpha 2$ -defizienten Mäusen ($p < 0,1$) [$n = 3; 3$ WT; ITA2^(-/-)] (Abb. 20a,b).

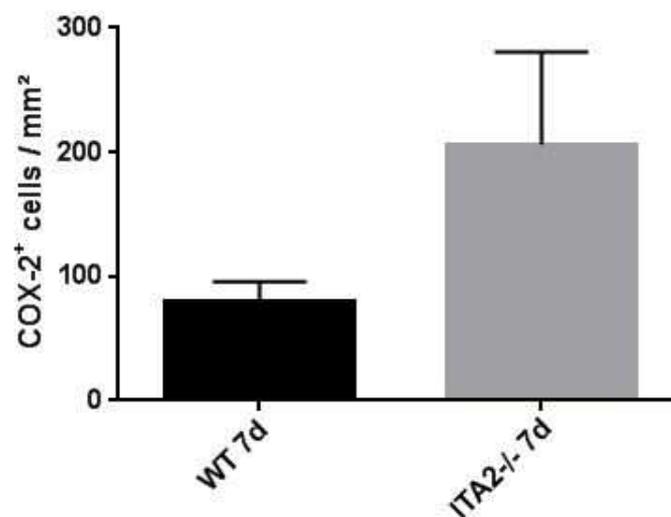
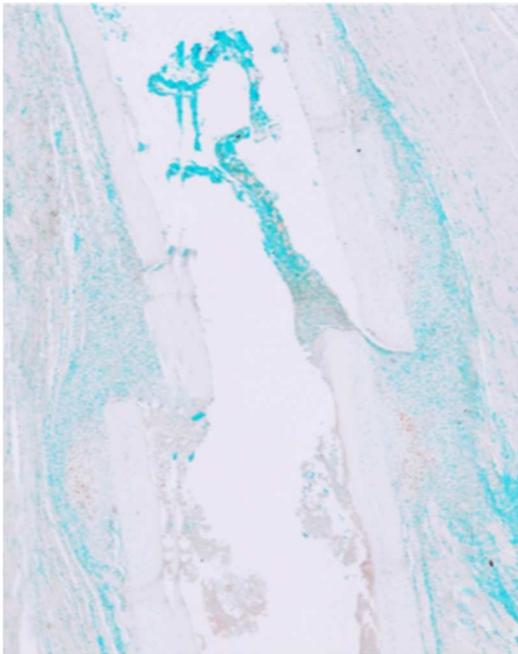
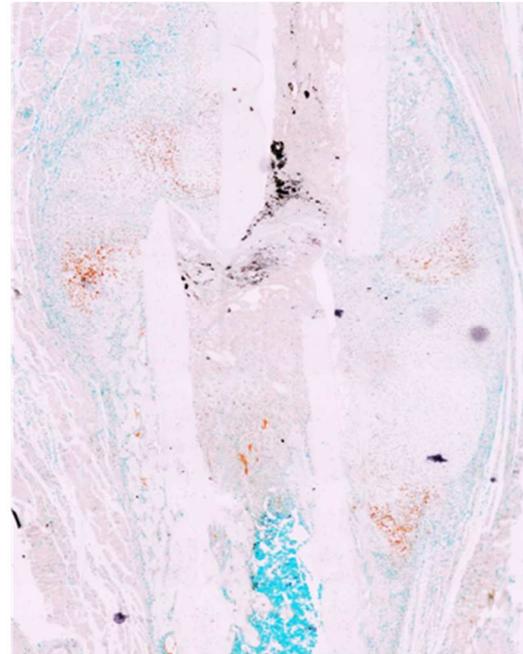


Abb. 20a: Auszählung der COX-2-positiven Zellen pro mm² Kallusgewebe nach 7 tägiger Frakturheilung. Es konnte ein nicht signifikanter Trend zugunsten der Tiere mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz eruiert werden (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



WT 7d



ITA 2 -/- 7d

Abb. 20b: Repräsentative Bilder der COX-2-Immunhistochemie nach 7-tägiger Frakturheilung. Im Frakturkallus Integrin $\alpha 2$ -defizienter Tiere konnte eine signifikant höhere Anzahl COX-2-positiver Zellen, insbesondere intrazellulär in den Chondrozyten, detektiert werden.

Nach 14-tägiger Heilungsperiode konnte eine COX-2-Expression nur noch im Extrazellulärraum detektiert und somit quantifiziert werden. Es wurde eine COX-2-positive Fläche von $3,3 \% \pm 1,46$ bei den Wildtypen und von $2,8 \% \pm 1,57$ vom Gesamtkallus bei der Knockout-Gruppe und somit kein relevanter Unterschied festgestellt ($p < 0,99$) (Abb. 20c).

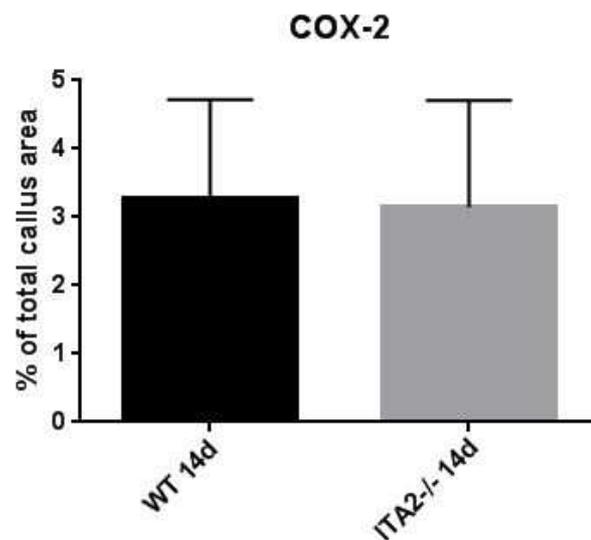


Abb. 20c: Prozentuale Erfassung der COX-2-positiven Fläche am Gesamtkallus bei 14-tägiger Heilungsperiode. Es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und Integrin $\alpha 2$ -defizienten Tieren festgestellt werden ($p < 0,99$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.3 Colorimetrische Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes

Die Quantifizierung des Gesamtkollagengehaltes im Kallusgewebe beider Gruppen nach 7-tägigem Heilungsprozess lieferte Hinweise auf eine gesteigerte Kollagenproduktion bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz, die im Vergleich zur Kontrollgruppe eine fast doppelt so hohe Menge an Gesamtkollagen (WT: 3604 $\mu\text{g/ml}$; ITA2^{-/-}: 6868 $\mu\text{g/ml}$) aufwiesen [n = 3;3 (WT;ITA2^{-/-})] (Abb. 21).

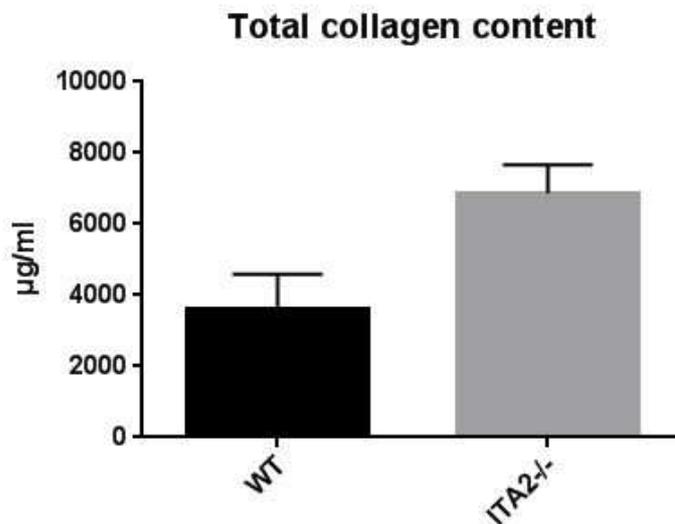


Abb. 21: Colorimetrische Bestimmung des Gesamtkollagengehalts im Kallusgewebe einwöchiger Frakturen (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4 Radiographische Bestimmung der Kallusmorphologie

Unterstützend zur bereits durchgeführten Histomorphologie stellten die Analysen der Struktur des Frakturkallus eine weitere objektive Methode der Auswertung dar. Bereits mineralisierte Kallusanteile konnten somit sowohl quantitativ als auch qualitativ beurteilt werden. Es wurden die Zeitpunkte 14 Tage (Phase der harten Kallusformation) und 21 Tage (Remodelingphase) untersucht.

4.4.1 Bone volume / Tissue volume (BV/TV)

Es konnten signifikante Unterschiede in dem prozentualen Anteil mineralisierter Fläche an der Gesamtkallusfläche festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 14 Tage zeigten die Tiere mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz einen signifikant höheren Anteil ($p < 0,0286$) mineralisierter Kallusfläche als die Vergleichsgruppe. Während die ITA2^{-/-}-Gruppe hier einen Mittelwert von $49 \% \pm 6,1 \%$ aufwies, berechnete sich für die Kontrollgruppe ein Mittelwert von $37,94 \% \pm 3,07 \%$ [$n = 4;4$ (WT; ITA^{-/-})]. (Abb. 22a).

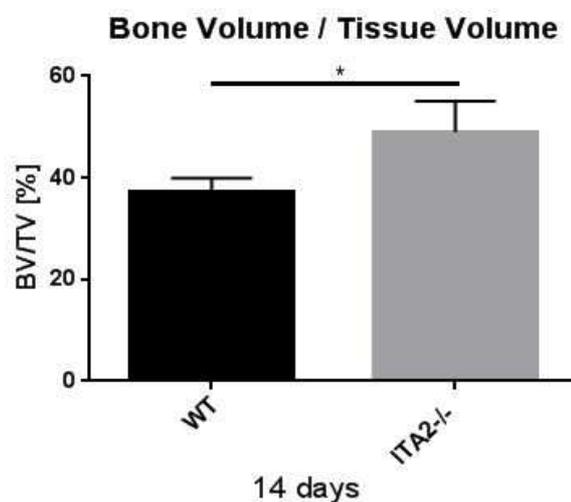


Abb. 22a: Darstellung des Knochenvolumens im Verhältnis zum Gewebsvolumen des 14-tägigen Frakturkallus (BV/TV). Es konnte ein signifikant größerer Anteil mineralisierten Knochens bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Der Unterschied zum Zeitpunkt 21 Tage war sogar hochsignifikant zugunsten der Knockout-Gruppe ($p < 0,0062$). Integrin $\alpha 2$ -defiziente Tiere zeigten einen Mittelwert von $83,48 \% \pm 4,17 \%$, die Kontrollgruppe lediglich $73,58 \% \pm 5,47 \%$ mineralisierte Kallusfläche [$n = 8;5$ (WT;ITA2^{-/-})] (Abb. 22b).

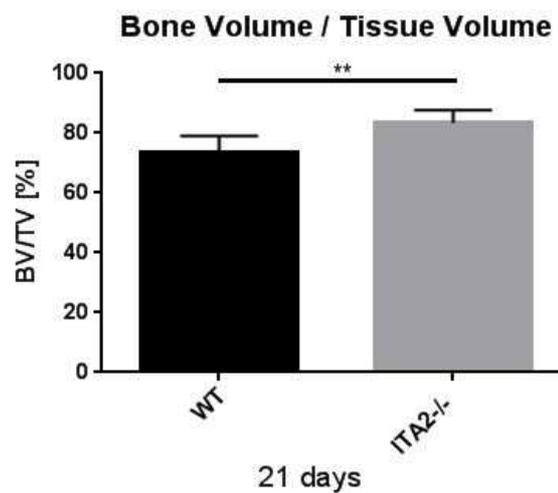


Abb. 22b: Darstellung des Knochenvolumens im Verhältnis zum Gewebsvolumen des Frakturkallus nach 21 Tagen (BV/TV). Es wurde ein hochsignifikant größerer Anteil mineralisierten Knochens bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz festgestellt (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.2 Bone surface / Bone volume (BS/BV)

Die Bestimmung der Knochenoberfläche im Verhältnis zum Volumen ergab einen größeren Oberflächenanteil bei der Wildtypgruppe ($p < 0,0571$). Für diese berechnete sich nach 14 Tagen Frakturheilung ein gemittelt Verhältnis von $53,34 \frac{1}{mm} \pm 11,06$, während die ITA2^(-/-)-Gruppe einen Mittelwert von $33,07 \frac{1}{mm} \pm 5,86$ aufwies [n = 4;4 (WT;ITA2^(-/-))] (Abb. 23a).

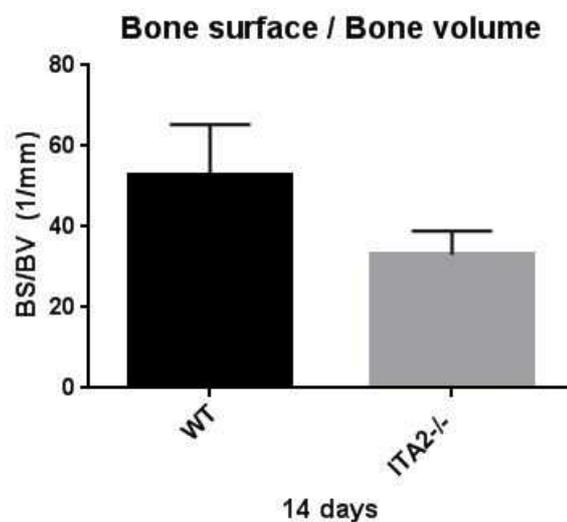


Abb. 23a: Darstellung der Knochenoberfläche im Verhältnis zum Knochenvolumen (BS/BV) des 14-tägigen Frakturkallus. Es konnte eine größere Knochenoberfläche im Verhältnis zum Knochenvolumen nach 14 Tagen Frakturheilung bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz festgestellt werden ($p < 0,0571$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Auch nach 21-tägiger Heilung wiesen die Wildtypen im Mittel ein größeres Knochenoberflächen-Volumen-Verhältnis auf ($p < 0,2844$). Diese zeigten einen Mittelwert von $61,44 \frac{1}{mm} \pm 6,54$. Die Knockout-Gruppe dagegen zeigte ein gemittelt Verhältnis von $40,38 \frac{1}{mm} \pm 23,05$. [$n = 8;5$ (WT; ITA2^{-/-}) (Abb. 23b).

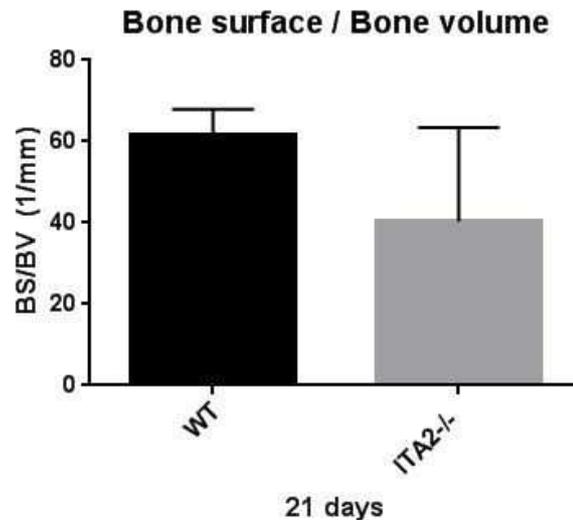


Abb. 23b: Darstellung der Knochenoberfläche im Verhältnis zum Knochenvolumen (BS/BV) des Frakturkallus nach 21 Tagen. Die Wildtypgruppe zeigte eine im Vergleich zu den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis ($p < 0,2844$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.3 Trabecular Number

Hinsichtlich der Anzahl der Trabekel im heilenden Frakturkallus konnte nach 14 Tagen Heilungszeitraum kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden ($p < 0,8857$). Während die Kontrollgruppe eine mittlere Anzahl von $4,64 \frac{1}{mm} \pm 0,84$ aufwies, erreichte die Gruppe mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz einen Mittelwert von $4,74 \frac{1}{mm} \pm 0,3$ [$n = 4;4$ (WT;ITA2^{-/-})] (Abb. 24a).

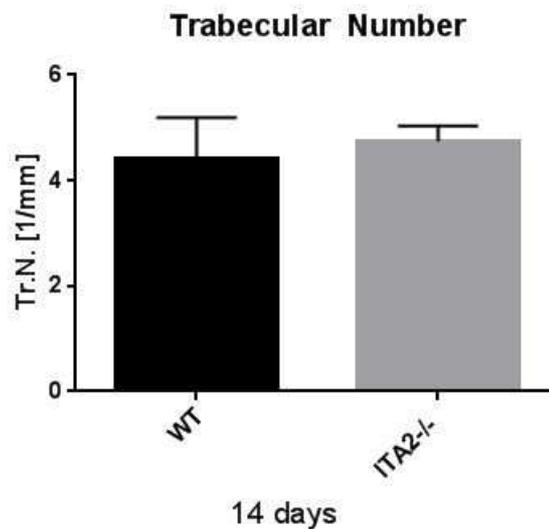


Abb. 24a: Auswertung der Anzahl der Trabekel des 14 Tage alten Frakturkallus. Es konnte kein relevanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen festgestellt werden. ($p < 0,8857$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nach einer Frakturheilungszeit von 21 Tagen zeigte sich mit gemittelt $10,79 \frac{1}{mm} \pm 1,79$ Trabekel pro Millimeter eine nicht signifikant erhöhte Trabekelanzahl im Frakturkallus der Wildtypen im Vergleich zur Versuchsgruppe, die im Mittel $7,58 \frac{1}{mm} \pm 4,14$ Trabekel betrug [n = 8;5 (WT;ITA2^{-/-})] (Abb. 24b).

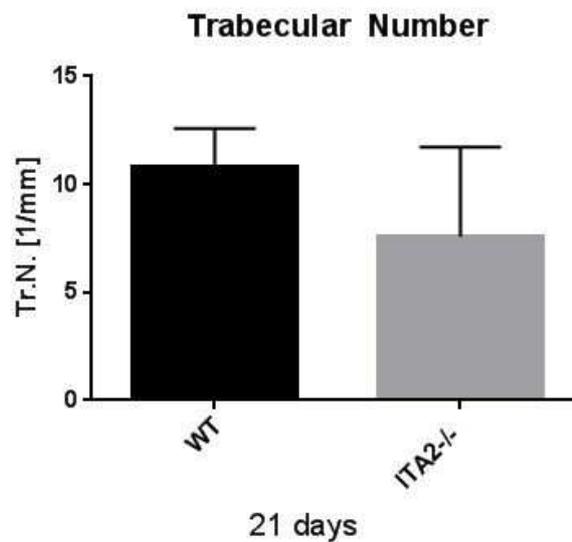


Abb. 24b: Auswertung der Anzahl der Trabekel des Frakturkallus nach 21 Tagen Heilungszeitraum. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen festgestellt werden. ($p < 0,3543$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.4 Trabecular Separation

Die Messung des Abstandes der Trabekel untereinander ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen nach einer 14-tägigen Heilungsperiode ($p < 0,0286$). Während der trabekuläre Abstand bei den Wildtypen gemittelt lediglich bei $0,087 \text{ mm} \pm 0,0015$ lag, betrug er bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz $0,192 \text{ mm} \pm 0,0249$ [$n = 5; 4$ (WT; ITA2^{-/-})] (Abb 25a).

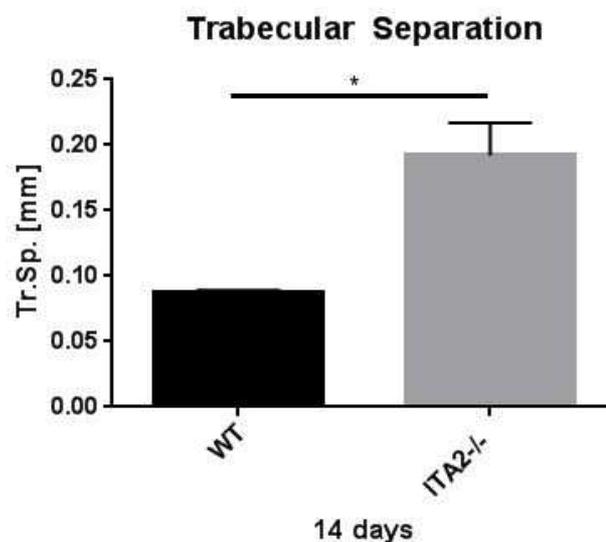


Abb. 25a: Auswertung des Trabekelabstandes nach einer Heilungszeit von 14 Tagen. Es konnte ein signifikant größerer intertrabekulärer Abstand in Integrin $\alpha 2$ -defizienten Frakturkalli eruiert werden ($p < 0,0286$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Nach einem Heilungszeitraum von 3 Wochen konnte hinsichtlich des trabekulären Abstandes des Kallus kein Unterschied innerhalb der Gruppen festgestellt werden ($p < 0,9433$). Der Trabekelabstand betrug bei der Vergleichsgruppe (WT) $0,0343 \text{ mm} \pm 0,002$ und bei der Versuchsgruppe ITA2^(-/-) $0,0340 \text{ mm} \pm 0,003$ [$n = 8; 5$ (WT; ITA2^(-/-))] (Abb 25b).

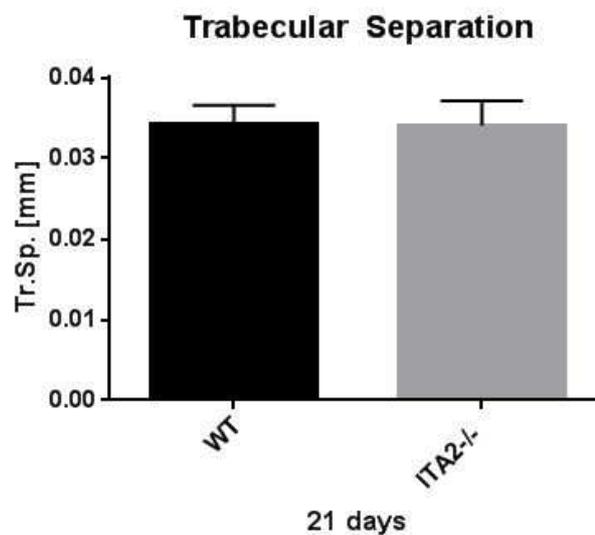


Abb. 25b: Auswertung des Trabekelabstandes nach einer 3-wöchigen Heilungsperiode. Es konnte kein Unterschied innerhalb der Gruppen festgestellt werden ($p < 0,9433$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.4.5 Trabecular Thickness

Neben Trabekelabstand und -separierung wurde auch die Trabekeldicke innerhalb der Frakturkalli untersucht. Sowohl nach zweiwöchiger als auch nach dreiwöchiger Heilungsperiode konnte bei den Integrin $\alpha 2$ -defizienten Versuchstieren eine signifikant höhere Trabekeldicke nachgewiesen werden.

14 Tage nach Fraktursetzung und osteosynthetischer Versorgung konnte in den Kalli der Tiere mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz eine durchschnittliche Trabekeldicke von $0,103 \text{ mm} \pm 0,013$ im Gegensatz zu $0,073 \text{ mm} \pm 0,004$ bei den Wildtypen festgestellt werden ($p < 0,0286$) [$n = 5; 4$ (WT; ITA2^{-/-})] (Abb 26a).

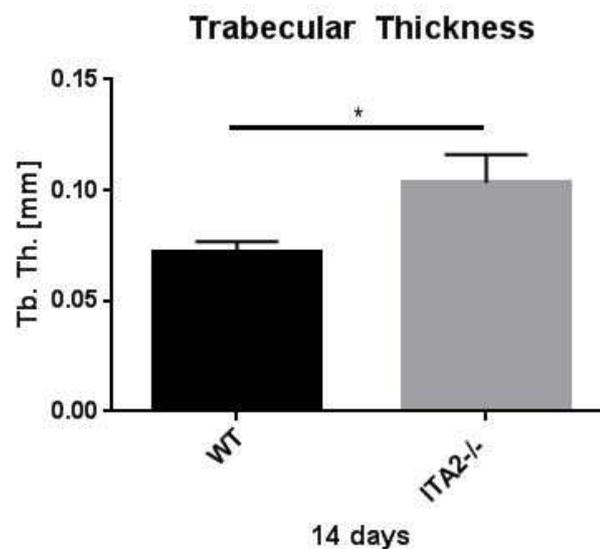


Abb. 26a: Auswertung der Trabekeldicke nach einem Heilungszeitraum von zwei Wochen. Es konnte ein signifikanter Unterschied zugunsten der Tiere mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz eruiert werden ($p < 0,0286$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Kongruent zu den nach Ergebnissen der Kallusanalyse nach einer Heilungszeit von 14 Tagen konnte nach einer dreiwöchigen Heilungsperiode ebenfalls ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der trabekulären Dicke zugunsten der Integrin $\alpha 2$ -defizienten Versuchsgruppe erhoben werden ($p < 0,0109$).

Diese wiesen eine mittlere Trabekeldicke von $0,114 \text{ mm} \pm 0,076$ im Gegensatz zu $0,05 \text{ mm} \pm 0,004$ bei den Wildtypen auf [$n = 8;5$ (WT; ITA2^{-/-})] (Abb. 26b).

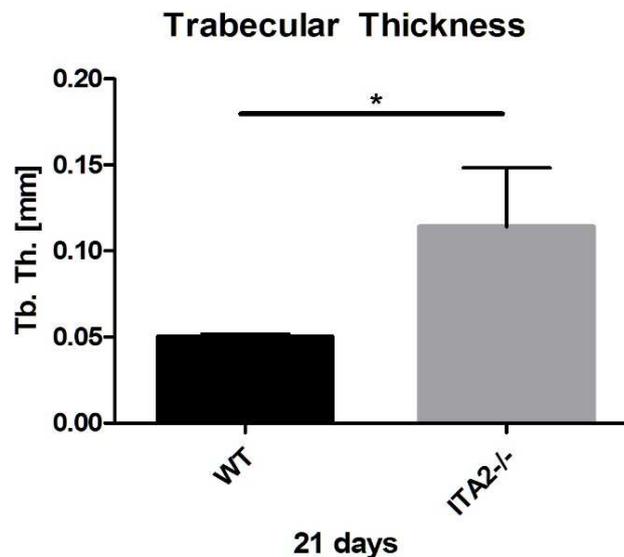


Abb. 26b: Auswertung der Trabekeldicke 21 Tage nach Fraktursetzung. Integrin $\alpha 2$ -defiziente Versuchstiere wiesen dabei etwa doppelt so dicke Trabekel wie die Wildtypen auf ($p < 0,0109$) (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5 Genexpressionsanalytik

4.5.1 Ergebnisse 7 Tage nach Fraktursetzung

Mittels quantitativer realtime PCR (qPCR) wurde das Kallusgewebe 7 Tage alter Frakturen auf die Expression von Knochenmarkergenen, inflammationsassoziierten Cyclooxygenasen, anderen kollagenbindenden Integrinen und Sox9, einem Chondrozytendifferenzierungsmarker, untersucht. Dabei wurde die Expression der jeweiligen Gene im Gewebe des Wildtyps auf 100% oder den Faktor 1 ($y = 1$) festgelegt. Die Höhe der Balken auf der y-Achse korreliert folglich mit der n-fachen Expressionsmenge der jeweiligen Genprodukte im Integrin $\alpha 2$ -defizienten Kallusgewebe im Vergleich zur Genexpression im Kallusgewebe der Wildtypen.

4.5.1.1 Knochenmarkergene

Die sogenannten „Bone markers“, oder auch Knochenmarker, wurden zur Bestimmung der knöchernen Stoffwechselaktivität herangezogen. Dabei zeigten sich bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz bei allen Knochenmarkergenen Tendenzen einer vermehrten Expression gegenüber dem Wildtyp. Die Evaluation des Osteoblastendifferenzierungsmarkers Runx2 ergab eine 1,99-fache ($\pm 1,8$) Expression im Kallus der ITA2^(-/-)- Mäuse verglichen zur Ausprägung im Wildtyp ($p < 0,0781$). Der Osteblastenmarker Osterix wies eine erhöhte Expression um den Faktor $1,62 \pm 1,18$ bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz auf ($p < 0,2188$). Auch bei der Alkalischen Phosphatase (ALP) konnte eine Mehrexpression um das 2,62-Fache ($\pm 2,86$) bei der Knockout-Gruppe festgestellt werden ($p < 0,1563$). Die Expression des Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) war bei der Versuchsgruppe $1,77 \pm 0,91$ mal so hoch wie bei der Kontrollgruppe ($p < 0,1563$) [$n = 3; 4$ (WT; ITA2^(-/-))] (Abb. 27).

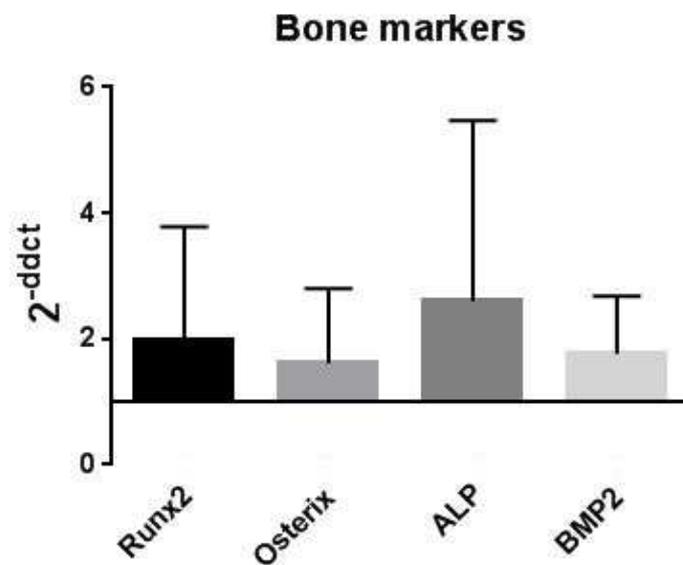


Abb. 27: Auswertung der Expression der Knochenmarkergene (Bone Markers) im Kallusgewebe nach 7 Tagen Frakturheilung mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Es konnte bei allen Genen eine Tendenz zur vermehrten Expression bei der Versuchsgruppe (Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($y = 1$) festgestellt werden (Wilcoxon-Signed-Rank-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5.1.2 Cyclooxygenasen

Bei der Quantifizierung der Cyclooxygenasen 1 und -2 konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der in allen Körperzellen kontinuierlich exprimierten COX-1 eruiert werden (Expression von ITA2^(-/-) im Vergleich zum WT: $0,923 \pm 0,71$) ($p < 0,6406$). Die Menge des vornehmlich an inflammatorischen Prozessen beteiligten Enzyms COX-2 war im Kallusgewebe der Integrin $\alpha 2$ -defizienten Tiere mit einer $1,805 \pm 0,89$ -fachen Expression jedoch signifikant höher ($p < 0,0234$) [$n = 3;4$ (WT;ITA2^(-/-))] (Abb. 28).

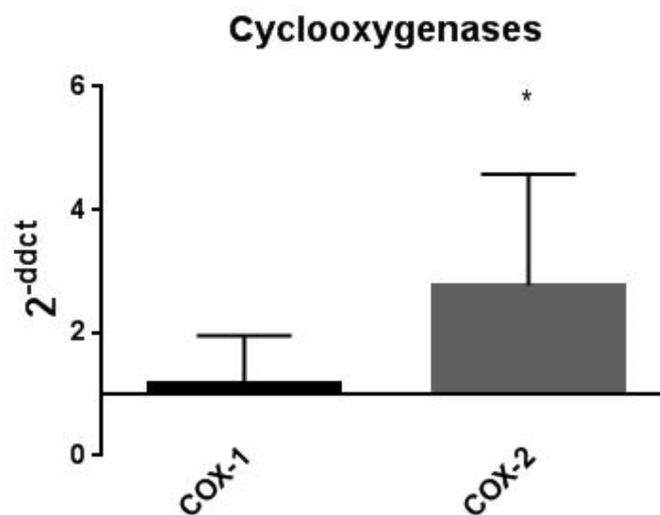


Abb. 28: Evaluation der Expressionsmengen der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 im Kallusgewebe nach 7-tägiger Frakturheilung mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Zwischen den Gruppen konnte kein Unterschied in der Expression der COX-1 festgestellt werden ($p < 0,6406$). Die COX-2 zeigte jedoch eine signifikante Überexpression im Kallusgewebe der Tiere mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz ($p < 0,0234$) (Wilcoxon-Signed-Rank-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5.1.3 Kollagenbindende Integrine

Die Auswertung der Integrinexpression erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Während sich die Mengen an Integrin $\alpha 1$ (ITA1) mit einer $0,912 \pm 0,49$ -fachen ($p < 0,6875$) und an Integrin $\alpha 11$ mit einer $1,067 \pm 0,58$ -fachen ($p < 0,9375$) Expression der Knockout-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp präsentiert, wurde beim Integrin $\alpha 10$ mit einer $2 \pm 1,95$ – fachen ($p < 0,2969$) Expression der Trend einer Überexpression im Kallusgewebe der Tiere mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz erkennbar [$n = 3; 4$ (WT; ITA2^{-/-})] (Abb. 29).

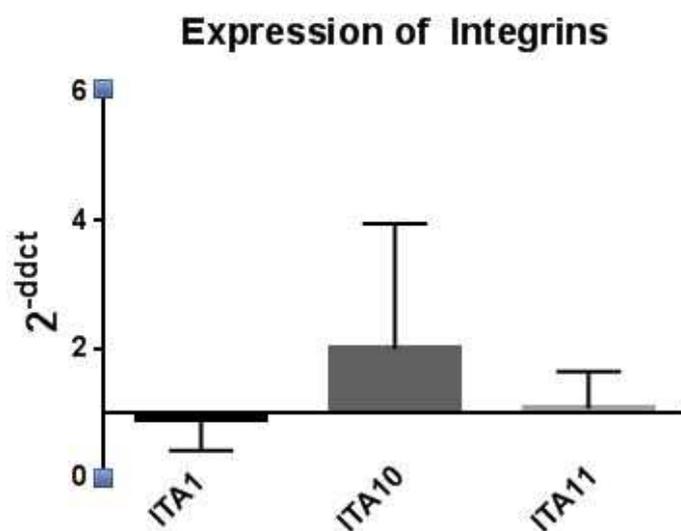


Abb. 29: Ergebnisse der Genexpressionsmessung der kollagenbindenden Integrine $\alpha 1$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$ im Kallusgewebe eine Woche nach Fraktursetzung ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode). Es konnte kein Unterschied in den Mengen von $\alpha 1$ und $\alpha 11$, jedoch ein Trend zu einer Überexpression des $\alpha 10$ -Integrins bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz festgestellt werden (Wilcoxon-Signed-Rank-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5.1.4 Chondrozytendifferenzierungsmarker

Zur Evaluation der Chondrozytendifferenzierung wurde die Expression von Sox9 im einwöchigen Frakturkallusgewebe untersucht. Dabei konnte mit einer $1,546 \pm 0,98$ -fachen Expression der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p < 0,7422$) [$n = 3;4$ (WT;ITA2^(-/-))] (Abb. 30).

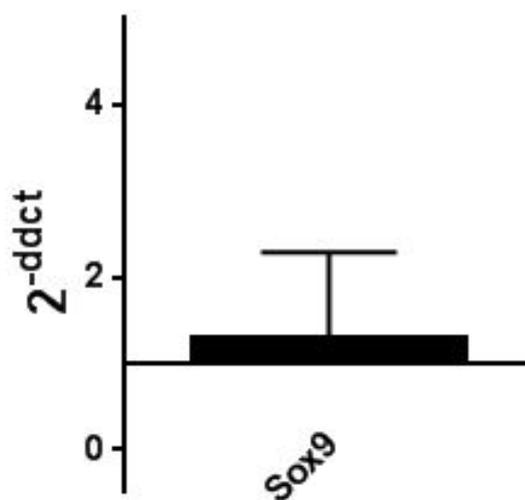


Abb. 30: Auswertung der Genexpression des Chondrozytendifferenzierungsmarkers Sox9 im Kallusgewebe mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode 7 Tage nach Fraktur. Zwischen Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz und gleichaltrigen Wildtypen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p < 0,7422$) (Wilcoxon-Signed-Rank-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5.2 Ergebnisse 4 Tage nach Fraktursetzung

Die Evaluation der Genexpressionsanalyse nach einer Heilungsperiode von 4 Tagen ließ aufgrund der geringen Fallzahl [n = 2;1 (WT;ITA2^{-/-})] lediglich eine Interpretation im Sinne möglicher Ergebnistrends zu. So zeigten alle untersuchten Gene den Trend einer vermehrten Expression bei der Integrin α 2-defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp. Am stärksten war diese in der Expression des Integrins α 11 mit einer 3,25-fachen Ausprägung des Knock out-Typs gegenüber dem Wildtyp, gefolgt von einer 2,95-fachen Expression des Osteoblastendifferenzierungsfaktors Osterix zu verzeichnen. Die Alkalische Phosphatase (ALP) im Frakturkallus war bei den Tieren mit Integrin α 2 Defizienz 2,88-mal, die Menge an Integrin α 10 war 2,45-mal höher als im Kallus der Wildtypen. Der Chondrozytendifferenzierungsmarker Sox9 zeigte eine 2,21-fache, der Osteoblastenfaktor Runx2 eine 2,13-fache Expression. Die Quantifizierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ergab eine 1,85-fache Menge bei der Versuchsgruppe. Das Integrin α 1 kam auf eine 1,64-fache Expression. Mit einer Ausprägung vom 1,34-Fachen im Vergleich zum Wildtyp konnte bei der Bestimmung des BMP-2 bei der Knockout-Maus kein relevanter Unterschied eruiert werden.

5 Diskussion

Histomorphologische Evaluation

Chondrozyten: Alcianblau und Kollagen II und -X

Es erfolgte die histomorphologische Detektion von Knorpel/Chondrozyten mittels Alcianblaufärbung sowie eine weitere immunhistochemische Differenzierung der Knorpelzellen in initiale Kollagen Typ II-positive reife Chondrozyten und Kollagen Typ X-positive hypertrophe Chondrozyten. Interessant war hierbei der zeitliche Verlauf. Während die o.g. Parameter bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz nach 7 Tagen der Frakturheilung, entsprechend der Phase der Formation des weichen Kallus, signifikant erhöht waren, zeigte sich während der Phase der harten Kallusformation nach 14 Tagen ein umgekehrtes Bild zugunsten der Wildtypen. Somit scheint das Fehlen des $\alpha 2$ -Integrins eine früher einsetzende Knorpelformation und somit eine schnellere Initiierung des Frakturheilungsprozesses zur Folge zu haben. Die Arbeitsgruppe um Lisbet Camper lieferte bereits 1998 einen möglichen Erklärungsansatz. Sie eruierte die Rolle von Integrin $\alpha 2$ als Rezeptor des Chondroadherins, einem Mediator zwischen der extrazellulären Matrix und den Chondrozyten, aber auch zu Fibroblasten und Osteoblasten. Die Verwendung eines Antikörpers gegen Integrin $\alpha 2$ führte zu einer verminderten Bindungsfähigkeit der Chondrozyten sowie der Fibroblasten an Chondroadherin in vitro (Camper et al., 1998). Im Frakturmodell unter Integrin $\alpha 2$ -Defizienz könnte das Fehlen des Rezeptors für Chondroadherin und dessen Funktionsverlust in einer kompensatorischen Überproduktion der Bindungspartner dieses Mediators resultieren.

Mineralisierung: Masson Goldner

Entsprechend des Prinzips der enchondralen Ossifikation, bei der einer initialen Chondrozytenproliferation die substituelle Mineralisierung zum Zwecke der Wiederherstellung einer harten Knochensubstanz folgt, konnte bei den Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz eine frühere und zum Ende des

Heilungsprozesses signifikant höhere Mineralisierung detektiert werden. Bereits die AG Stange konnte bei den Integrin $\alpha 2$ defizienten Tieren eine erhöhte Expression des Typ 1-Kollagens der Osteoblasten in vitro sowie eine verlangsamte Knochenalterung in vivo detektieren (Stange et al., 2013). Da bestimmte Prozesse der Knochenalterung und der Knochenheilung analog ablaufen (Gerstenfeld et al., 2003) und die knöchernen Matrix zu etwa 95% aus Kollagen Typ 1 besteht und ein erhöhter Typ 1-Kollagengehalt gleichzusetzen ist mit dem Grad der Ossifikation, konnten mit dieser Arbeit bisherige Erkenntnisse verifiziert werden.

Osteoklasten: TRAP

Die histomorphologische Quantifizierung ergab einen signifikant höheren Anteil TRAP-positiver Zellen im Frakturkallus Integrin $\alpha 2$ defizienter Mäuse. Jedoch kann histomorphologisch keine Differenzierung zwischen knochenresorbierenden Osteo- und knorpelresorbierenden Chondroklasten vorgenommen werden. Knowles et al. haben 2012 statuiert, dass zwischen beiden Zelltypen nicht unterschieden werden kann, sodass man im Allgemeinen von ausgereiften TRAP-positiven Osteoklasten spricht, die in der Lage sind, sowohl Knorpel- als auch Knochenmatrix zu resorbieren (Knowles et al., 2012). Diese Ergebnisse dieser Arbeit lassen, unter der Annahme, dass die individuelle Aktivität der Zellen durch eine hohe Zellzahl nicht beeinträchtigt ist, auf akzelerierte Knorpel als auch Knochenumbauprozesse bei Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz schließen.

Zellproliferationsmarker BrdU

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde eine Bestimmung der Zellproliferationsrate mit dem Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) nach 7-tägiger Frakturheilung veranlasst, bei der immunhistochemisch durch Anfärben der Zellkerne jene Zellen detektiert wurden, die sich zu dem Zeitpunkt in der S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus befanden. Unerwartet wurde eine fast doppelt so hohe Anzahl an BrdU-positiven Zellen in den Frakturkalli der Kontrollgruppe im Vergleich zu Integrin $\alpha 2$ -defizientem Heilungsgewebe festgestellt. Eine

mögliche Erklärung wäre, dass die initiale Migration und Proliferation der für die frühe Phase der Frakturheilung verantwortlichen Zellen bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz zu einem früheren Zeitpunkt als bei der Kontrollgruppe stattfindet und die Zellen bereits im Kallus aktiv sind. Ein anderer Erklärungsansatz wäre eine indifferente Proliferation mit gesteigerter zellulärer Aktivität bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz, die sich in den o.g. Ergebnissen der Histologie widerspiegeln. Zur Überprüfung der ersten Hypothese müsste die Anzahl der BrdU-positiven Zellen zu einem früheren Zeitpunkt der Frakturheilung, etwa nach 4 Tagen, bestimmt werden. Untersuchungen von Popov et al. hinsichtlich des Fehlens einzelner Integrine während der Osteogenese in Zellkultur ergaben in diesem Zusammenhang, dass das Fehlen der $\alpha 2$ - oder $\alpha 11$ -, nicht aber der $\alpha 1$ -Integrinuntereinheit zu einer Reduktion der Anzahl mesenchymaler Stammzellen in Verbindung mit einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrien führt und konnte bei Patienten mit Osteoporose eine verminderte Aktivität der $\alpha 2$ -Untereinheit eruieren (Popov et al., 2011). Es ist jedoch auch bekannt, dass das Fehlen des $\alpha 2$ -Integrins im Mausmodell zu einer verlangsamten Knochenalterung führt (Stange et al., 2013) und somit dem $\alpha 2$ -Verlust eine eher osteoprotektive Wirkung zugeschrieben wird. Neueste Erkenntnisse aus dem Jahr 2018 weisen zudem darauf hin, dass die Expression von Integrin $\alpha 2\beta 1$ zu einer verlangsamten Zellproliferation führt (Ojalill et al., 2018). Die aktuell eher ambivalente Studienlage zu diesem Thema erfordert die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes (Kollagen – Assay)

Basierend auf Untersuchungen der Arbeitsgruppe Stange hinsichtlich der Auswirkungen eines Integrin $\alpha 2$ -Verlusts auf den knöchernen Alterungsprozess mit signifikant höherem Kollagen Typ 1-Gehalt im Knochengewebe nativer Femora der Knock out-Tiere, wurde in dieser Arbeit der Gesamtkollagengehalt in Kallusgewebe einwöchiger Frakturen untersucht. Es konnte ein etwa doppelt so hoher Gehalt an Kollagen in den Kalli Integrin $\alpha 2$ -defizienter Tiere festgestellt werden, wobei die verwendete enzymatisch-photometrische Methode keine

Differenzierung der unterschiedlichen Kollagentypen erlaubte. Während bei der Untersuchung des nativen reifen Knochens, der zu 95% aus Typ-I-Kollagen besteht, die Menge des Gesamtkollagens mit dem Gehalt an Kollagen Typ I etwa gleichzusetzen ist, weist der Frakturkallus, der dynamischen Umbauprozessen unterliegt, in den jeweiligen Frakturheilungsphasen unterschiedliche Zusammensetzungen des Gesamtkollagens auf. So besteht der frühe Kallus nach 7 Tagen (Phase der weichen Kallusformation) zu großen Teilen aus proliferativen Chondrozyten, die Kollagen Typ II sezernieren, später aus dem Kollagen Typ X der hypertrophen Chondrozyten und während der Phase der harten Kallusformation, nach etwa 14 Tagen, aus dem Kollagen Typ I-haltigen Osteoid (Gerstenfeld et al., 2003). Die hier durchgeführte Gesamtkollagenbestimmung der einwöchigen Frakturkalli lässt somit auf erhöhte Expressionen der Kollagene des Typs II und auch X schließen, was mit den in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen mittels Kollagen II- und -X-Antikörpern übereinstimmt. Da eine osteoblastäre Kollagen Typ I-Synthese zum untersuchten Zeitpunkt (7 Tage nach Fraktur) noch nicht suffizient vorliegt, kann die Analyse dieses Kollagens erst in einer späteren Phase der Frakturheilung (ab 14 bis 21 Tagen) erfolgen und sollte Bestandteil zukünftiger Analysen sein.

Untersuchungen der Knochenstruktur (Mikro-CT)

Mit der bildgebenden Analyse der Knochen- und Kallusmorphologie mittels Mikro-CT (μ CT) konnten die bereits durch die histomorphologische Quantifizierung der mineralisierten Kallusfläche (Masson Goldner) erhobenen Ergebnisse durch ein weiteres objektives und standardisiertes Verfahren bestätigt werden. Da die Frakturkalli Integrin α 2-defizienter Versuchstiere insgesamt einen höheren Anteil mineralisierten Gewebes aufweisen, ist die größere Knochenoberfläche der Wildtypen nur mit einer unterschiedlichen Morphologie der knöchernen Struktur innerhalb der beiden Gruppen zu erklären. Ein ähnliches Ergebnis hinsichtlich des Trabekelabstandes nach 14-tägiger

Frakturheilung, wie in dieser Arbeit vorliegend, lieferte die Arbeitsgruppe Stange bei der Untersuchung des Trabekelabstandes nativer Wirbelkörperknochen 4 und 12 Monate alter Versuchstiere. Dort konnte ein erhöhter trabekulärer Abstand bei Tieren mit Integrin $\alpha 2$ -Defizienz eruiert werden (Stange et al., 2013). Die hier vorliegende Studie konnte jedoch keinen Unterschied des Trabekelabstandes nach 21 Tagen aufzeigen.

Morphologische Differenzen ergaben sich somit in einem größeren trabekulären Abstand sowie einem höheren Grad der Mineralisierung des heilenden Kallus, der mit einem insgesamt dickeren Trabekelwerk bei geringem Oberflächen-Volumen-Verhältnis des Knochens bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz einhergeht. Welche Relevanz jene Unterschiede bei der knöchernen Stabilität nach 14 und 21 Tagen der Frakturheilung haben, muss in weiteren Untersuchungen der Biomechanik eruiert werden. Die Anordnung und Morphologie der Trabekel spielt bei der ossären Statik eine entscheidende Rolle. Erwartungsgemäß sollten die knöchernen Trabekelstrukturen in einem physikalisch günstigen Verhältnis stehen, um einer vertikalen Druckbelastung sowie Zug- und Scherkräften während der plantaren Belastung standzuhalten. Kummer beschrieb bereits im Jahr 1956 dieses Konzept der Spannungstrajektorien, nach dem das übergeordnete Ziel zum Erreichen der Stabilität die Biegefreiheit aller beteiligten Konstituenten sei, die durch deren parallele Anordnung zu den Druck- und Zugspannungslinien erreicht werden könne (Kummer, 1956).

Untersuchung der Genexpression (quantitative real-time PCR)

Knochenmarkergene (bone-markers): Runx2, Osterix, BMP-2, ALP

Molekulargenetische Untersuchungen der Genexpression einzelner, an der osteogenen Differenzierung nach 7 Tagen Heilungszeit beteiligten Faktoren, den sogenannten „bone markers“ wie Runx2, Osterix, ALP sowie BMP2, erbrachten bei allen Knochenmarkern den Nachweis einer erhöhten Expression beim Knockout-Typ gegenüber dem Wildtyp und liefern somit einen möglichen

Erklärungsansatz für die beschleunigte Frakturheilung im Rahmen einer akzelerierten Osteoblastendifferenzierung.

Runx2 agiert als Osteoblastendifferenzierungsmarker und wird in kondensierten mesenchymalen Stammzellen exprimiert, die sich von Osteochondroprogenitorzellen abgrenzen und sich zu Vorläufer-Osteoblasten differenzieren (Sinha, Zhou, 2013). In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der Runx2-Expression im einwöchigen Frakturkallus Integrin $\alpha 2$ -defizienter Versuchstiere eruriert werden. Eine Überexpression von Runx2 kann somit einen möglichen Erklärungsansatz für eine akzelerierte Knochenheilungstendenz liefern. Dass dieser Faktor essenziell für die osteogene Differenzierung ist, haben bereit Komori et al. im Jahre 1997 gezeigt, indem sie Mäuse mit heterozygotem Runx2^{+/-}-Genotyp züchteten, die einen veränderten Phänotyp mit hypoplastischen Claviculae und Nasenbeinen sowie eine verspätete Verknöcherung der Schädelknochen aufwiesen (Komori et al., 1997). Einen Schritt weiter ging dieselbe Arbeitsgruppe im gleichen Jahr gemeinsam mit Otto et al., indem der Versuch einer homozygoten Anzucht unternommen wurde, denen das Runx2-Gen komplett fehlte. Der Runx2^{-/-}-Genotyp starb jedoch direkt nach der Geburt und zeigte keine Formation ossären Gewebes, allerdings eine intakte chondrogene Entwicklung (Komori et al. 1997, Otto et al., 1997). Als weiterer Mediator der osteogenen Differenzierung gilt der Faktor **Osterix**, der in enger Interaktion mit Runx2 steht. Nach Stimulation der Osteochondroprogenitorzellen in Präosteoblasten durch Runx2 erfolgt in diesen Zellen die Expression von Osterix, wodurch sich die Vorläuferblasten in reife funktionelle Osteoblasten und letztendlich in ortsständige Osteozyten differenzieren (Sinha, Zhou, 2013). In dieser Arbeit konnte auch bei diesem Knochenmarker im Kallus der Versuchsgruppe im Vergleich zum Wildtyp eine Tendenz der Überexpression nachgewiesen werden, was mit den vorherigen Ergebnissen, insbesondere mit der erhöhten Expression von Runx2 als Mediator der Osterixproduktion kongruent ist. Eine weitere wichtige Rolle im Prozess der enchondralen Ossifikation werden den **BMPs** (Bone Morphogenetic Proteins)

zugeschrieben. Cho et al. konnten für verschiedene Mitglieder der BMPs als Mitglieder der TGF β -Familie unterschiedliche Expressionsmaxima während der Frakturheilung am Mausmodell eruieren. So konnte für das BMP-2 eine erhöhte Aktivität innerhalb der ersten Woche nach Frakturierung nachgewiesen werden (Cho, Gerstenfeld, Einhorn, 2002; Gerstenfeld et al., 2003). Auch in dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des BMP-2 nach 7 Tagen bei Integrin α 2-Verlust erhöht ist. Bereits 1965 hatten Urist et al. die Rolle der BMPs als Induktoren der enchondralen Ossifikation erkannt, indem sie Extrakte aus demineralisiertem Knochen verwendeten, um die ektope Chondro- und Osteogenese zu induzieren. Jene Fraktion demineralisierter Knochenmatrix nannte Urist Bone Morphogenetic Protein (BMP) (Urist, 1965). Matsubara et al. haben herausgefunden, dass BMP-2 die Expression von Osterix über verschiedene Signalwege, unter anderem unter Beteiligung von Runx2, stimuliert (Matsubara et al., 2008). Auch klinisch konnte dem BMP-2 bereits ein Nutzen zugesprochen werden. In Studien der Biomechanik und der Zellhistologie am Rattenmodell konnten Schmidmaier et al. eine Zunahme der knöchernen Stabilität und einen beschleunigten Frakturheilungsprozess bei jenen Frakturen feststellen, die mit BMP-2-beschichteten Titaniumimplantaten stabilisiert wurden (Schmidmaier et al., 2002). Zudem fungiert BMP-2 als Induktor der Aktivität der **Alkalischen Phosphatase (ALP)** in Fibroblasten. ALP wird sowohl im Knochen als auch im kalzifizierenden Knorpel in der frühen Entwicklung exprimiert und in Matrixvesikeln gespeichert. In der späteren Osteogenese steigt die Aktivität der Alkalischen Phosphatase und somit auch die lokale Konzentration anorganischen Phosphats, das gemeinsam mit Kalzium den Hydroxylapatitanteil der knöchernen Matrix ausmacht (Golub et al., 2007). Im Mausmodell wurde die höchste Expression von ALP nach einem Frakturheilungszeitraum von 14 Tagen gemessen, der mit der Formation des harten Kallus und dem Ersatz von kalzifiziertem Knorpel durch Geflechtknochen den aktivsten Zeitraum des knöchernen Umbaus darstellt (Einhorn, 1998). Analog dazu konnte in dieser Arbeit eine gesteigerte ALP-Expression in den Kalli einwöchiger Frakturen

Integrin $\alpha 2$ -defizienter Versuchstiere detektiert werden. Anlehnend an die oben genannten Ergebnisse von Einhorn und basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Resultaten der Histologie mit Masson Goldner sowie des Micro-CTs, ist im nächsten Schritt die Untersuchung der Genexpression der alkalischen Phosphatase im 14 Tage alten Frakturkallus anzustreben.

Marker der chondrozytären Differenzierung: Sox9

Bei der quantitativen Bestimmung des Chondrozytendifferenzierungsmarkers **Sox9** konnte bei Integrin $\alpha 2$ -Defizienz eine Tendenz zur Überexpression gegenüber dem Wildtyp eruiert werden. Exprimiert in proliferativen, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten, induziert dieser Faktor die Produktion von Kollagen Typ II in Zellen der Wachstumsfuge. Während Sox9 einerseits die Entwicklung zu hypertrophen Chondrozyten inhibiert, trägt andererseits Runx2 zu deren Differenzierung bei (Smits et al, 2004; Lefebvre und Smits 2005). Eine komplette Deletion von Sox9 führt zudem zu einer fehlerhaften Chondrogenese im Sinne chondrodysplastischer Veränderungen beim Mausembryo (Akiyama et al., 2002). Da jedoch dem Vorgang der Chondrozytendifferenzierung ein hochkomplexer Mechanismus zugrunde liegt und Sox9 nicht als einziger Induktor der Chondrogenese gesehen werden kann, müsste ein anderer Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit eruierten Ergebnisse einer chondrozytären Überexpression gefunden werden. Hartmann und Tabin konnten dazu im Jahr 2000 eine beschleunigte Differenzierung der Chondrozyten bei Hühnerembryonen durch die β -Catenin-vermittelte Expression von Wnt-4 feststellen (Hartmann und Tabin, 2000). Nicht nur bei der chondrogenen Entwicklung könnte der Wnt/ β -Catenin-Signalweg Aufschluss über die in dieser Arbeit erhobenen Resultate geben. Auch in Osteoblasten und Präosteoblasten konnte über diese Signalkaskade die Aktivierung von BMP2 nachgewiesen werden (Zhang et al., 2013). Die Komplexbildung der Smads mit β -Catenin führt außerdem über die Aktivierung von Smad1 und Smad5 zur Induktion der BMP-Signaltransduktion und somit zu einem Progress der enchondralen Ossifikation (Edlund et al., 2005; Retting et al., 2009). Neueste Erkenntnisse aus dem Jahr

2017 zeigen zudem, dass eine Überexpression des Integrins $\alpha 2$ in mesenchymalen Stammzellen zu einer verzögerten osteoblastären Differenzierung führt. Zudem konnte in diesem Zusammenhang die inhibitorische Wirkung des Integrins $\alpha 2$ auf den β -Catenin-Signalweg dargelegt werden (Ren et al., 2017). Somit kann bei Fehlen dieses Integrins von einer ausbleibenden Inhibition des β -Catenin-Pathways und von einer Induktion der oben genannten, auf den Knochenstoffwechsel positiv einwirkenden Faktoren ausgegangen werden.

Inflammationsmarker: Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1, COX-2)

Anlehnend an klinische Erfahrungen sowie wissenschaftlich belegte Studien, die eine verzögerte Frakturheilung unter der Einnahme nicht-steroidaler Antirheumatika darlegen, wurde in dieser Arbeit die Expression der Cyclooxygenasen-1 und -2 untersucht. Butcher et al. haben bereits 1996 eruiert, dass Tibiafrakturen jener Patienten, die zur Schmerz- und Entzündungshemmung mit NSAIDs (=NSARs) behandelt wurden, im Schnitt sechs bis sieben Wochen länger für die Heilung benötigten als die Frakturen derer, die nur ein Placebo erhalten hatten (Butcher und Marsh, 1996). Zudem können Inhibitoren der **COX-2** eingesetzt werden, um einer heterotopen Ossifikation nach Hüftgelenkersatz vorzubeugen (Grohs et al., 2007). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass Frakturen jener Tiere, die täglich den unselektiven COX-Hemmer Indometacin erhalten hatten, einer verzögerten Heilung und einer geringeren Kallusbildung unterlagen (Rø et al., 1976). In dieser Studie konnte in der qPCR eine Mehrexpression der Cyclooxygenase-2 in 7 Tage alten Frakturkalli Integrin $\alpha 2$ -defizienter Tiere detektiert werden. Auch die immunhistochemische Untersuchung erbrachte den Nachweis einer etwa doppelt so hohen Anzahl COX-2-positiver Zellen im 7-tägigen Frakturkallus der Knockout-Gruppe. Während sich COX-2 nach einwöchiger Heilung vorwiegend intrazellulär in den Chondrozyten nachweisen lassen, konnte es nach 14 Tagen überwiegend extrazellulär nachgewiesen werden. Quantitativ zeigte sich nach zwei Wochen Heilungsprozess zudem kein Unterschied im COX-2-Gehalt

des Kallus. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Erkenntnissen von Naik et al.. Die Arbeitsgruppe hatte eruiert, dass die Menge der Cyclooxygenase-2 nach einer Fraktur nach 5 Tagen am höchsten ist und dass die COX-2-Expression zunächst in den frühen Knorpelvorläuferzellen stattfindet (Naik et al., 2009). Da COX-2 über die Synthese der Prostaglandine zu einer Stimulation der Chondro- sowie der Osteogenese führt (Naik et al., 2009; Kawaguchi et al., 1995), könnte die Überexpression der Cyclooxygenase-2 ein möglicher Erklärungsansatz für eine beschleunigte Frakturheilung sein. Ausgehend von den Ergebnissen von Naik et al. sollte im nächsten Schritt eine Untersuchung der Genexpression nach etwa 4-5 Tagen erfolgen, um ein mögliches Expressionsmaximum der COX-2 zu detektieren.

Kollagenbindende Integrine: Integrin 1, Integrin 10 und Integrin 11

Ausgehend von der Vermutung, dass ein, für den Funktionserhalt des Organismus notwendiger, Kompensationsmechanismus für das Fehlen eines Bindungspartners eine Mehrexpression eines anderen Partners derselben Familie sein kann, wurde in dieser Arbeit eruiert, inwiefern ein Fehlen des Integrins $\alpha 2$ die Expressionsmengen der anderen kollagenbindenden Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$ beeinflusst. Somit konnte auf Genexpressionsebene gezeigt werden, dass ein $\alpha 2$ -Verlust zu einer Überexpression der $\alpha 10$ -Untereinheit führt. Es ergaben sich jedoch innerhalb der Vergleichs- und der Kontrollgruppe keine Unterschiede der Expressionsmengen der $\alpha 1$ oder $\alpha 11$ -Untereinheiten. Bengtsson et al. haben im Jahr 2005 die Auswirkungen eines homozygoten Integrin $\alpha 10$ -Verlustes auf den Mausorganismus untersucht und konnten bei diesen Tieren eine defizitäre Knorpelentwicklung im Sinne einer milden Chondrodysplasie mit reduzierter Chondrozytenproliferationsrate detektieren (Bengtsson et al., 2005). Hinsichtlich der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse erlaubt dies die Vermutung, dass im Umkehrschluss die hier vorliegende Mehrexpression der $\alpha 10$ -Untereinheit bei den Integrin $\alpha 2$ -defizienten Tieren zu einer Stimulation der Chondrogenese führt und liefert somit einen möglichen Erklärungsansatz für die akzelerierte

Frakturheilung. Trotz struktureller Ähnlichkeiten der $\alpha 1$ - und funktioneller Kongruenz der $\alpha 11$ - zur $\alpha 2$ -Untereinheit sind die Expressionsmengen dieser Einheiten im einwöchigen Frakturkallus im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Es ist bekannt, dass sich eine Integrin $\alpha 1$ -Defizienz sowohl in einer verminderten Kallusgröße als auch in einer gestörten murinen Knorpelsynthese äußert (Ekholm et al., 2002). Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit untereinander unterscheiden sich $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Integrine jedoch hinsichtlich ihrer kollagenen Bindungsaffinitäten. Während die $\alpha 2$ -Untereinheit bevorzugt an das Typ I-Kollagen der Knochenmatrix bindet, liegt bei der $\alpha 1$ -Einheit eine hohe Affinität zum Typ IV-Kollagen der Basalmembran vor (Heino, 2000).

Eine Überexpression des $\alpha 1$ -Integrins hätte folglich funktionell keinen effizienten Nutzen hinsichtlich des Kollagen-I-Metabolismus erbracht. Die $\alpha 11$ -Untereinheit besitzt zwar eine ähnliche Ligandenspezifität wie $\alpha 2$, bindet aber mit geringer Affinität an seine Liganden (Zhang et al., 2003). Somit hätte diese Einheit eine fehlende $\alpha 2$ -Untereinheit in der Theorie kompensieren können. Tiger et al. haben bereits die multifunktionelle Rolle der Integrin $\alpha 11$ -Untereinheit in der Erkennung und der Organisation interstitieller Kollagenmatrizes während der murinen embryonalen Entwicklung erkannt (Tiger et al., 2001). Da zudem gezeigt werden konnte, dass bei der Frakturheilung einige Schritte und Signalwege äquivalent zu jenen der Embryogenese durchlaufen werden (Sandberg et al., 1993; Vortkamp et al., 1998), wäre die Untersuchung des Einflusses einer Integrin $\alpha 11$ -Defizienz auf den Prozess der Knochenheilung ein weiterer interessanter Forschungsansatz.

Ausblick: Die Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Inhibition in der Klinik

Diese Studie zeigt auf, dass das Fehlen des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins eine akzelerierte murine Frakturheilung sowie eine veränderte Knochenarchitektur mit verbreiterten Trabekeln zur Folge hat. Wird dieses Modell auf den Menschen übertragen, könnte die Hemmung dieses Integrins besonders in der Orthopädie und Unfallchirurgie, aber auch in der geriatrischen Versorgung klinische Anwendung finden. So könnten Frakturen, die schneller heilen, unter Umständen früher belastet und somit eine frühere Mobilisation und kürzere Krankenhausverweildauer der Patienten erreicht werden. Des Weiteren kann die Inhibition von Integrin $\alpha 2\beta 1$ als Therapieansatz der Osteoporose gesehen werden, da neben einer vermehrten Mineralisierungstendenz während der Frakturheilung auch eine verlangsamer Knochenabbau im Prozess der Knochenalterung beschrieben wurde (Stange et al., 2013). Einen Ansatz dazu lieferte bereits die Arbeitsgruppe um Funahashi im Jahr 2002 mit dem Angiogeneseinhibitor E7820. Dieses Sulfonamidderivat inhibiert die in-vitro-Proliferation von menschlichen HUVEC (human umbilical vascular endothelial cell) und führt zu einem Funktionsverlust verschiedener Integrine, insbesondere der $\alpha 2$ -Untereinheit (Funahashi et al., 2002).

Limitationen dieser Arbeit

Auch hinsichtlich der experimentellen Methodik ergaben sich in dieser Studie Limitationen. So war histomorphologisch und immunhistochemisch keine direkte Quantifizierung der Osteoblasten im Frakturkallus möglich. Eine direkte Anfärbung der Paraffinschnitte mittels Alkalischer Phosphatase (ALP) oder Osterix war nicht erfolgreich, sodass mittels Masson-Goldner-Trichrom-Färbung die indirekte Osteoblastenaktivität anhand der mineralisierten Kallusfläche bestimmt werden konnte. Mögliche Fehlerquellen können eine inkorrekte Durchführung, fehlerhafte Materialien oder die Fixierung, Entkalkung und anschließende Paraffineinbettung der Proben beinhalten.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Evaluation der Rolle des Integrins $\alpha 2\beta 1$ während des murinen Frakturheilungsprozesses. Dafür wurden die linken Femora 14 Wochen alter Mäuseweibchen frakturiert, mittels intramedullärem Implantat stabilisiert und zu definierten Zeitpunkten entsprechend der Phasen der murinen Frakturheilung untersucht. Die Ergebnisse zeigten ein akzeleriertes Durchlaufen der Heilungsphasen im Sinne eines gesteigerten Remodelings bei Integrin $\alpha 2\beta 1$ -Defizienz.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass der Kollagenrezeptor Integrin $\alpha 2\beta 1$ eine essenzielle Rolle während der Frakturheilung einnimmt. Das Fehlen dieses Rezeptors führt zur früheren Rekrutierung von Zellen, die für die Bildung des Frakturkallus und dessen Umbau zuständig sind. Es kommt zu einem akzelerierten Aufbau des knorpeligen Frakturkallus. Vermehrte Expressionen osteoblastärer Differenzierungsmarker führen zu einer früheren Mineralisierung. Es ergaben sich ebenfalls Übereinstimmungen mit der Literatur hinsichtlich einer veränderten knöchernen Architektur. Die Studie konnte zudem eine vermehrte Expression der COX-2 im einwöchigen Frakturkallus aufzeigen. Da Prostaglandinen eine chondro- sowie osteogene Wirkung mit positivem Einfluss auf die Differenzierung von Knorpel- und Knochenzellen zugeschrieben wird, ist anzunehmen, dass auch eine Mehrexpression der COX-2 zu den erlangten Ergebnissen geführt hat.

Die Inhibition des $\alpha 2\beta 1$ -Integrins liefert somit auch einen klinisch interessanten Ansatz bei der Therapie von Frakturen oder Osteoporose. Werden bisher erlangte Erkenntnisse auf die Anwendung am Menschen übertragen, könnten Patienten durch die Blockade dieses Kollagenrezeptors mit konsekutiv akzelerierter Frakturheilung von einer kürzeren Krankenhausverweildauer und einem früheren Erlangen ihrer Mobilität und ihrer Selbstständigkeit im Alltag profitieren. Da ebenfalls ein auf den Knochenabbau negativ wirkender Einfluss

bekannt ist, könnten Integrin α 2-Inhibitoren ebenfalls zur Therapie der Osteoporose eingesetzt werden, um den knöchernen Alterungsprozess zu verlangsamen.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A., De Crombrughe, B. (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & Development* 16: 2813–2828
- (2) Anderson, H. C. (2003). Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports* 5 (3): 222–226
- (3) Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research* 339 (1): 269–280
- (4) Bengtsson, T., Aszodi, A., Nicolae, C., Hunziker, E. B., Lundgren-Akerlund, E., Fässler, R. (2005). Loss of alpha10beta1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes. *Journal of Cell Science* 118 (5): 929–936
- (5) Blumbach, K., Niehoff, A., Belgardt, B. F., Ehlen, H. W. A., Schmitz, M., Hallinger, R., Eckes, B. (2012). Dwarfism in mice lacking collagen-binding integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 11\beta 1$ is caused by severely diminished IGF-1 levels. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (9): 6431–6440
- (6) Bolander, M. E. (1992). Regulation of fracture repair by growth factors. *Experimental Biology and Medicine* 200: 165–170
- (7) Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszódi, A., Bengtsson, T., Berna, A., Fässler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circulation Research* 89 (3): 211–223
- (8) Bouvier, J. and Cheng, J. (2009). Recombineering-based procedure for creating Cre/loxP conditional knockouts in the mouse. *Current Protocols in Molecular Biology* 85 (1): 23.13.1-23.13.27
- (9) Brighton, C. T., Schaffer, J. L., Shapiro, D. B., Tang, J. J. S., Clark, C. C. (1991). Proliferation and macromolecular synthesis by rat calvarial

bone cells grown in various oxygen tensions. *Journal of Orthopaedic Research* 9: 847–854

- (10) Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–622
- (11) Butcher, C. K., Marsh D. R. (1996). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs delay tibial fracture union. *Injury* 27 (5): 375
- (12) Calderwood, D. a, Tuckwell, D. S., Eble, J., Kühn, K., Humphries, M. J. (1997). The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (19): 12311–12317
- (13) Camper, L., Hellman, U., Lundgren-Åkerlund, E. (1998). Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit $\alpha 10$, a $\beta 1$ -associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 20383–20389
- (14) Camper, L., Holmvall, K., Wangnerud, C., Aszodi, A., Lundgren-Akerlund, E. (2001). Distribution of the collagen-binding integrin $\alpha 10\beta 1$ during mouse development. *Cell Tissue Resarch* 306 (1): 107-116
- (15) Chen, D., Zhao, M., Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors (Chur, Switzerland)* 22 (4): 233–241
- (16) Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 17 (3): 513–520
- (17) Clarke B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* 3 (3): 131–139

- (18) Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. a, Tuck, S. P., Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* 61 (5): 577–587
- (19) Decline, F., Rousselle, P. (2001). Keratinocyte migration requires alpha2beta1 integrin-mediated interaction with the laminin 5 gamma2 chain. *Journal of Cell Science* 114 (4): 811–823
- (20) Edlund, S., Lee, S. Y., Grimsby, S., Zhang, S., Aspenström, P., Heldin, C., Landström, M. (2005). Interaction between Smad7 and beta-catenin: importance for transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 25 (4): 1475–1488
- (21) Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 355: 7–21
- (22) Ekholm, E., Hankenson, K. D., Uusitalo, H., Hiltunen, A., Gardner, H., Heino, J., Penttinen, R. (2002). Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *The American Journal of Pathology* 160 (5): 1779–1785
- (23) Elices, M.J., Hemler, M.E. (1989). The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and collaged laminin receptor on others. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9906-9910
- (24) Everts, V., Delaissé, J. -M, Korper, W., Niehof, A., Vaes, G., Beertsen, W. (1992). Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *Journal of Cellular Physiology* 150 (2): 221–231
- (25) Fan, X., Biskobing, D. M., Fan, D., Hofstetter, W., Rubin, J. (1997). Macrophage colony stimulating factor down-regulates MCSF-receptor expression and entry of progenitors into the osteoclast lineage. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12 (9): 1387–1395

- (26) Felsenberg, D. (2001). Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *Pharmazie in Unserer Zeit* 30 (6): 488–494
- (27) Funahashi, Y., Sugi, N. H., Semba, T., Yamamoto, Y., Hamaoka, S., Tsukahara-Tamai, N., Wakabayashi, T. (2002). Sulfonamide derivative, E7820, is a unique angiogenesis inhibitor suppressing an expression of integrin $\alpha 2$ subunit on endothelium. *Cancer Research* 2 (21): 6116–6123
- (28) Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 21–33
- (29) 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
- (30) Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 88 (5): 873–884
- (31) Golub, E. E., Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics* 18 (5): 444–448
- (32) Gratzner, H. G. (1982). Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science (New York, N.Y.)* 218 (4571): 474–475
- (33) Grohs, J. G., Schmidt, M., Wanivenhaus, A. (2007). Selective COX-2 inhibitor versus indomethacin for the prevention of heterotopic ossification after hip replacement: A double-blind randomized trial of 100 patients with 1-year follow-up. *Acta Orthopaedica* 78 (1): 95–98
- (34) Harmey, D., Hesse, L., Narisawa, S., Johnson, K. a, Terkeltaub, R., Millán, J. L. (2004). Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the

- pathogenesis of mineralization disorders. *The American Journal of Pathology* 164 (4): 1199–1209
- (35) Hartmann, C., Tabin, C. J. (2000). Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development (Cambridge, England)* 127 (14): 3141–3159
- (36) Heino, J. (2000). The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biology* 19: 319-323
- (37) Hiltunen, A., Vuorio, E., Aro, H. T. (1993). A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *Journal of Orthopaedic Research* 11 (2): 305–312
- (38) Holtkötter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Müller, W., Hafner, M., Schulte, V., Eckes, B. (2002). Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 10789–10794
- (39) Holtz, K. M., Kantrowitz, E. R. (1999). The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: Insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Letters* 462 (1-2): 7-11
- (40) Hu, D. D., Lin, E. C. K., Kovach, N. L., Hoyer, J. R., Smith, J. W. (1995). A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins $\alpha 1$ and $\alpha 5$. *Journal of Biological Chemistry* 270 (44): 26232–26238
- (41) Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549–554
- (42) Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (6): 673-687
- (43) Jokinen, J., Dadu, E., Nykvist, P., Käpylä, J., White, D. J., Ivaska, J., Heino, J. (2004). Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (30): 31956–31963

- (44) Joppien, S., Maier, S. L., Wendling, D. (2010). Immunhistologie I + II. Basics Experimentelle Doktorarbeit: 90-93
- (45) Kamata, T., Takada, Y. (1994). Direct binding of collagen to the I-domain of integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation- independent manner. *Journal of Biological Chemistry* 269: 26006–26010
- (46) Kawaguchi, H., Pilbeam, C. C., Harrison, J. R., Raisz, L. G. (1995). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (313): 36–46
- (47) Kern, A., Eble, J., Golbik, R., Kühn, K. (1993). Interaction of type IV collagen with the isolated integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *European Journal of Biochemistry* 215: 151-159
- (48) Kirchhofer, D., Languino, L. R., Ruoslahti, E., Pierschbacher, M. D. (1990). Alpha 2 beta 1 integrins from different cell types show different binding specificities. *Journal of Biological Chemistry* 265: 615-618.
- (49) Knowles, H. J., Moskovsky, L., Thompson, M. S., Grunhen, J., Cheng, X., Kashima, T. G., Athanasou, N. A. (2012). Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Archiv* 461 (2): 205–210
- (50) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of *cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 (5): 755–764
- (51) Kong, Y. Y., Boyle, W. J., Penninger, J. M. (1999). Osteoprotegerin ligand: A common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunology and Cell Biology* 77: 188-193
- (52) Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423 (6937): 332–336
- (53) Kummer, B. (1956). Eine vereinfachte Methode zur Darstellung von Spannungstrajektorien, gleichzeitig ein Modellversuch für die

- Ausrichtung und Dichteverteilung der Spongiosa in den Gelenkenden der Röhrenknochen. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 119 (3): 223–234
- (54) Lefebvre, V., Smits, P. (2005). Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today* 75 (3): 200–212
- (55) Luo, B.-H., Carman, C. V., Springer, T. a. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review of Immunology* 25: 619–647
- (56) Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., Yoneda, T. (2008). BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 283 (43): 29119–29125
- (57) Metzger, D. Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5): 470-476
- (58) Mizuno, M., Fujisawa, R., Kuboki, Y. (2000). Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction. *Journal of Cellular Physiology* 184 (2): 207–213
- (59) Naik, A. A., Xie, C., Zuscik, M. J., Kingsley, P., Schwarz, E. M., Awad, H., O’Keefe, R. J. (2009). Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 24 (2): 251–264
- (60) Nykvist, P., Tu, H., Ivaska, J., Käpylä, J., Pihlajaniemi, T., Heino, J. (2000). Distinct recognition of collagen subtypes by $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. $\alpha 1\beta 1$ mediates cell adhesion to type XIII collagen. *Journal of Biological Chemistry* 275 (11): 8255–8261

- (61) Ojalill, M., Parikainen, M., Rappu, P., Aalto, E., Virtanen, N., Siljamäki, E., Heino, J. (2018). Integrin $\alpha 2\beta 1$ decelerates proliferation, but promotes survival and invasion of prostate cancer cells. *Oncotarget* 9 (65): 32435–32447
- (62) Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Owen, M. J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89 (5): 765–771
- (63) Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry* 55: 273-286
- (64) Peel, N. (2009). Bone remodelling and disorders of bone metabolism. *Surgery (Oxford)* 27 (2): 70–74
- (65) Pfaff, M., Göhring, W., Brown, J. C., Timpl, R. (1994). Binding of purified collagen receptors ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$) and RGD-dependent integrins to laminins and laminin fragments. *European Journal of Biochemistry* 225 (3): 975–984
- (66) Pfaffl, M. W. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 10 (1): 92–95
- (67) Popov, C., Radic, T., Haasters, F., Prall, W. C., Aszodi, A., Gullberg, D., Docheva, D. (2011). Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 1$ regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell Death & Disease* 2: 186
- (68) Ren, T., Piperdi, S., Koirala, P., Park, A., Zhang, W., Ivenitsky, D., Zhang, Y., Villanueva-Siles, E., Hawkins, D. S., Roth, M., Gorlick, R. (2017). CD49b inhibits osteogenic differentiation and plays an important role in osteosarcoma progression. *Oncotarget*, 8 (50): 87848–87859.
- (69) Retting, K. N., Song, B., Yoon, B. S., Lyons, K. M. (2009). BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development (Cambridge, England)* 136 (7): 1093–1104

- (70) Riikonen, T., Westermarck, J., Koivisto, L., Broberg, A., Kähäri, V. M., Heino, J. (1995). Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (22): 13548–13552
- (71) Rø, J., Sudmann, E., Marton, P. F. (1976). Effect of indomethacin on fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica* 47 (6): 588–599
- (72) Rodionova, N. V. (1986). Chondroclastic properties of the cartilaginous tissue macrophages of developing bone. *Tsitologiya* 28 (10): 1103–1106
- (73) Sandberg, M. M., Aro, H. T., Vuorio, E. I. (1993). Gene expression during bone repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (289): 292–312
- (74) Santoro S.A. (1999). Platelet surface collagen receptor polymorphisms: variable receptor expression and thrombotic/hemorrhagic risk. *Blood* 93: 3575–3577.
- (75) Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., Little, D. G. (2008). Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19 (5): 459–466
- (76) Schmidmaier, G., Wildemann, B., Cromme, F., Kandziora, F., Haas, N. P., Raschke, M. (2002). Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 30 (6): 816–822
- (77) Schmidmaier, G., Wildemann, B., Melis, B., Krummrey, G., Einhorn, T. A., Haas, N. P., Raschke, M. (2004). Development and characterization of a standard closed tibial fracture model in the rat. *European Journal of Trauma* 30 (1): 35–42
- (78) Sinha, K. M., Zhou, X. (2013). Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of Cellular Biochemistry* 114 (5): 975–984

- (79) Smits, P., Dy, P., Mitra, S., Lefebvre, V. (2004). Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *The Journal of Cell Biology* 164 (5): 747–758
- (80) Stange, R., Kronenberg, D., Timmen, M., Everding, J., Hidding, H., Eckes, B., Hansen, U., Holtkamp, M., Karst, U., Pap, T., Raschke, M. J. (2013). Age-related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin $\alpha 2\beta 1$ deficient mice. *Bone* 56 (1): 48-54
- (81) Tiger, C. F., Fougereuse, F., Grundström, G., Velling, T., Gullberg, D. (2001). $\alpha 11\beta 1$ integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Developmental Biology* 237 (1): 116–129
- (82) Tulla, M., Pentikäinen, O. T., Viitasalo, T., Käpylä, J., Impola, U., Nykvist, P., Heino, J. (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin $\alpha 11$, $\alpha 21$, and $\alpha 101$ domains. *Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 48206–48212
- (83) Urist, M. R. (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150 (3698): 893-899
- (84) Van Oers, R. F. M., Ruimerman, R., Tanck, E., Hilbers, P. A. J., Huiskes, R. (2008). A unified theory for osteonal and hemi-osteonal Remodeling. *Bone* 42 (2): 250–259
- (85) Vortkamp, A., Pathi, S., Peretti, G. M., Caruso, E. M., Zaleske, D. J., Tabin, C. J. (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mechanisms of Development* 71 (1–2): 65–76
- (86) Wu, J. E., Santoro, S. A. (1994). Complex patterns of expression suggest extensive roles for the alpha 2 beta 1 integrin in murine development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 199 (4): 292–314
- (87) Zhang, X., Schwarz, E. M., Young, D. A., Edward Puzas, J., Rosier, R. N., O’Keefe, R. J. (2002). Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell

differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *Journal of Clinical Investigation* 109 (11): 1405–1415

- (88) Zhang, R., Oyajobi, B. O., Harris, S. E., Chen, D., Tsao, C., Deng, H. W., Zhao, M. (2013). Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone* 52 (1): 145–156
- (89) Zhang, W. M., Käpylä, J., Puranen, J. S., Knight, C. G., Tiger, C. F., Pentikäinen, O. T. Gullberg, D. (2003). α 11 β 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 7270–7277

8 Abkürzungsverzeichnis

-/-	Homozygote Gendeletion
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
a.p.	anterior-posterior
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
B2M	Beta-2 Mikroglobulin
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
BS/BV	Bone Surface / Bone Volume
BV/TV	Bone Volume / Tissue Volume
Ca ²⁺	Calcium
CAM	Cell Adhesion Molecule
Cbfa1	Runt-related transcription factor 2 (=Runx2)
cDNA	complementary DNA (=komplementäre DNS)
Cre	cyclization recombination / causes recombination
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct	Cycle threshold
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Efficiency (Effizienz)
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylentetradiaminoacetat
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
GFOGER	Glycin-Phenylalanin-Hydroxyprolin-Glycin-Glutamat-Arginin

H ₂ O	Hydrogen(di)oxid (Wasser)
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HUVEC	human umbilical vascular endothelial cell
ITA2	Integrin alpha 2
loxP	locus of X-over P1
MC3T3	Zelllinie muriner osteoblastärer Vorläuferzellen
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
μCT	Mikro-Computertomograph (MicroCT)
mRNA	messenger RNA
MMP	Matrixmetalloprotease
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Osx	Osterix
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
R ²	Bestimmtheitsmaß, Determinationskoeffizient
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RLT	Guanidin-Thiocyanat Lysepuffer
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROI	Region of interest
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Realtime-quantitative Polymerase Chain Reaction
Smad	Sma (Small body size); MAD (Gen der Taufliede)
Sox9	SRY-Box 9 (Sex-determining Region of Y)-Box 9 Protein
TBS	Tris-buffered saline
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Tartrat resistant acid phosphatase
Tr.N.	Trabecular Number

Tr.Sp.	Trabecular Separation
Tr.Th.	Trabecular Thickness
UE	Untereinheit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Univ-Prof. Dr. Michael J. Raschke bedanken, der mir durch die Bereitstellung der Räumlichkeiten seiner Klinik zu Beginn die Durchführung meiner wissenschaftlich-experimentellen Tätigkeit ermöglicht hat.

Ich bedanke mich zudem bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Richard Stange und bei Herrn Dr. rer. nat. Daniel Kronenberg für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die Aufnahme in eure Arbeitsgruppe und damit die Eingliederung in ein tolles Team, das ich auch nach meiner Zeit im Institut gern in Erinnerung behalte.

Dabei möchte ich vor allem Frau Simone Niehues und Frau Iska Loesmann meinen allergrößten Dank aussprechen. Ihr habt mir bei allen labortechnischen Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Herrn Dr. Jens Everding danke ich für die stetige Begleitung meiner Arbeit und vor allem für die lehrreichen Erfahrungen im Rahmen der gemeinsamen Operationen und Kongressteilnahmen.

Ein weiterer Dank gilt dem Medizinerkolleg Münster für die didaktische und auch finanzielle Unterstützung im Rahmen meiner wissenschaftlich-experimentellen Tätigkeiten im Institut für Muskuloskelettale Medizin.

Auch bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Ganz besonders möchte ich jedoch meinen Großeltern danken, die mich auf meinem Lebensweg allzeit begleitet haben und mir in jeder Lebenslage zur Seite standen. Durch euch habe ich gelernt, auch in schwierigen Situationen nie den Mut zu verlieren. Danke.

10 Lebenslauf

11 Anhang

11.1 Protokoll 1: Masson-Goldner-Trichrom

Masson-Goldner Trichrom – Färbung (MERCK)

Ergebnis

Zellkerne	dunkelbraun bis schwarz
Zytoplasma, Muskulatur	ziegelrot
Bindegewebe	grün
mineralisierte Fläche	leuchtend grün
Osteoid	rot
saure Mucosubstanzen	grün

Vorbereitung

Weigert's Hämatoxylin ansetzen	1 Teil A + 1 Teil B
Essigsäure 1% ansetzen	

Durchführung

1. Entparaffinierung:	Xylol	3 x 5 Min
	EtOH 100%	2 Min
	EtOH 96%	2 Min
	EtOH 80%	2 Min
	EtOH 70%	2 Min
2. Weigert's Hämatoxylin		5 Min
3. Leitungswasser I		kurz spülen
4. Leitungswasser II	fließend wässern	10 Min
5. Essigsäure 1%		30 s spülen
6. Azophloxin		10 Min
7. Essigsäure 1%		30 s spülen
8. Phosphorwolframsäure-Orange G		1 Min
9. Essigsäure 1%		30 s spülen
10. Lichtgrün		2 Min
11. Essigsäure 1%		30 s spülen
12. Entwässern:	EtOH 70%	30 s spülen
	EtOH 96%	30 s spülen
	EtOH 100%	2 x 2 Min
	Xylol	2 x 5 Min
13. Eindeckeln in Eukitt		

11.2 Protokoll 2: Alcianblau

Alcianblau-Färbung nach Mowry

Farbstoffe

Alcianblau: 1 g Alcianblau 8 GS in 100 ml 3% Essigsäure lösen.
Den pH auf 2,5 einstellen und Lösung vor Gebrauch filtrieren.

Kernechtrot-Lösung: 0,1 g Kernechtrot + 100 ml 5% wässrige Aluminiumsulfatlösung
heiß lösen und vor Gebrauch filtrieren

Durchführung

- | | | |
|--------------------------|------------|-------------|
| 1. Entparaffinieren: | Xylol | 3 x 5 Min |
| | EtOH 100% | 2 x 2 Min |
| | EtOH 96% | 2 Min |
| | EtOH 80% | 2 Min |
| | EtOH 70% | 2 Min |
| | Aqua dest. | 2 Min |
| 2. Essigsäure 3% | | 3 Min |
| 3. Alcianblau | | 30 Min |
| 4. Essigsäure 3% | | kurz spülen |
| 5. Leitungswasser | | 2 Min |
| 6. Kernechtrot-Lösung | | 5 Min |
| 7. Spülen mit Aqua dest. | | 3 Min |
| 8. Entwässern: | EtOH 96% | 2 Min |
| | EtOH 100% | 2 x 3 Min |
| | Xylol | 2 x 5 Min |
| 9. Eindeckeln in Eukitt | | |

pH-Modifikationen:

Alcianblau pH 2,5 (in Essigsäure 3%): Sulfat- und Carboxygruppen

Alcianblau pH 1 (gelöst in 0,1N HCl): Sulfatgruppen

11.3 Protokoll 3: Tartrat Resistente Saure Phosphatase

TRAP (Tartrat Resistant Acid Phosphatase) - Färbung

Acid Phosphatase, Leukocyte-Kit (387 A, SIGMA-ALDRICH)

Ergebnis

Tartratresistente saure Phosphatase magentarot bis violett
(im Paraffinschnitt des Kallus werden hauptsächlich Osteoklasten angefärbt)

Durchführung

- | | | |
|--|--|--------------------------------------|
| 1. Entparaffinierung: | Xylol | 3 x 5 Min |
| | EtOH 100% | 2 x 2 Min |
| | EtOH 96% | 2 Min |
| | Aqua dest. | 2 Min |
| 2. Färbelösung 1 ansetzen und auftragen
150µl / Schnitt | ddH₂O 1,125 ml | 2,25 ml 4,5 ml |
| | Naphtol 12,5 µl | 25 µl 50 µl |
| | Acetat 50 µl | 100 µl 200 µl |
| | Tartrat 25 µl | 50 µl 100 µl |
| 3. Inkubation | 37°C | 1h |
| 4. Färbelösung 2 vorbereiten | 0,5 ml Fast Garnet GBC + 0,5 ml Sodianitrite | 30s vortexen und 2 Min stehen lassen |
| 5. Färbelösung 2 (10 µl / Schnitt) auf die Schnitte pipettieren und durchmischen | | |
| 6. Inkubation (Färbeschritt) | 37°C | 5 Min |
| 7. Färbung mit Aqua dest. stoppen | | |
| 8. Ggf. Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin (1:1 mit A.d.) | | 30 s |
| 9. Leitungswasser | fließend wässern | 10 - 15 Min |
| 10. Aqua dest. | | 5 Min |
| 11. In wässrigem Milieu eindeckeln (z.B. Aquatex) | | |

11.4 Protokoll 4: Anti-BrdU

Anti-BrdU Immunhistochemie

PAP-Methode

Vorbereitung

Verdünnungslösung (Stock-Lösung, 10-fach konzentriert) für 1. AK (BrdU) herstellen:

- 3600 µl TBS
- + 400 mg BSA
- + 18 µl Tween 20

zur AK-Verdünnung den Stock auf 1-fache Konzentration mit TBS verdünnen

Durchführung

Erster Tag

- | | | |
|---|------------|----------------|
| 1. Entparaffinieren: | Xylol | 3 x 5 Min |
| | EtOH 100% | 2 Min |
| | EtOH 96% | 2 Min |
| | EtOH 80% | 2 Min |
| | EtOH 70% | 2 Min |
| | Aqua dest. | 2 Min |
| 2. TBS | | 3 x 5 Min |
| 3. 3% H ₂ O ₂ in Methanol | 37°C | 10 Min |
| 4. TBS | | 3 x 5 Min |
| 5. 2N HCl | 37°C | 15 Min |
| 6. TBS | | 3 x 5 Min |
| 7. 100 µl Trypsin 1x | 37°C | 20 Min |
| 8. TBS | | 3 x 5 Min |
| 9. 10% BSA | RT | 30 Min |
| 10. Nur abgießen | | |
| 11. 1. AK anti-BrdU | 1:2000 | 4°C über Nacht |

Zweiter Tag

- | | | |
|---|----|-----------|
| 10. TBS | | 3 x 5 Min |
| 11. 2. AK horse anti-mouse biot. 1:500 | | 1h |
| 12. 30 Min vorher Peroxidase-Reagenz ansetzen: 1 Trpf A + 1 Trpf B in 5ml TBS (Dako) | | |
| 13. TBS | | 3 x 5 Min |
| 14. Peroxidase-Reagenz | RT | 30 Min |
| 15. TBS | | |
| 16. DAB-Substrat: 1 Tbl. Silber + 1 Tbl Gold in 1ml A.dest lösen, 2 Min stehen lassen | | |
| 17. Färbeschritt: DAB-Substrat auf Schnitt pipettieren, Sichtkontrolle! | | |
| 18. Abstoppen mit A. dest. | | |

- | | | |
|---------------------------|-----------|-----------|
| 19. Ggf. Gegenfärbung | | |
| 20. Entwässern: | EtOH 70% | kurz |
| | EtOH 80% | kurz |
| | EtOH 90% | 2 Min |
| | EtOH 10 % | 2 Min |
| | Xylol | 3 x 5 Min |
| 21. Eindeckeln mit Eukitt | | |

11.5 Protokoll 5: Anti-COX-2

Anti-COX-2 Immunhistochemie

PAP-Methode

Durchführung

Erster Tag

- | | | |
|---|------------|------------|
| 1. Entparaffinieren: | Xylol | 3 x 5 Min |
| | EtOH 100% | 2 Min |
| | EtOH 96% | 2 Min |
| | EtOH 80% | 2 Min |
| | EtOH 70% | 2 Min |
| | Aqua dest. | 2 Min |
| 2. TBS | | 3 x 5 Min |
| 3. 3% H ₂ O ₂ in Methanol | 37°C | 10 Min |
| 4. TBS | | 3 x 5 Min |
| 5. 100µl Trypsin 1x | 37°C | 20 Min |
| 6. TBS | | 3 x 5 Min |
| 7. 10% horse serum | RT | 30 Min |
| 8. Nur abgießen | | |
| 9. 1. AK anti COX-2 | 1:200 | 4°C |
| | | über Nacht |

Zweiter Tag

- | | | |
|---|-----------|-----------|
| 10. TBS | | 3 x 5 Min |
| 11. 2. AK horse anti-mouse biot. 1:200 | | 1h |
| 12. 30 Min vorher Peroxidase-Reagenz ansetzen: 1 Trpf A + 1 Trpf B in 5ml TBS (Dako) | | |
| 13. TBS | | 3 x 5 Min |
| 14. Peroxidase-Reagenz | RT | 30 Min |
| 15. TBS | | |
| 16. DAB-Substrat: 1 Tbl. Silber + 1 Tbl Gold in 1ml A.dest lösen, 2 Min stehen lassen | | |
| 17. Färbeschritt: DAB-Substrat auf Schnitt pipettieren, Sichtkontrolle! | | |
| 18. Abstoppen mit A. dest. | | |
| 19. Ggf. Gegenfärbung | | |
| 20. Entwässern: | EtOH 70% | kurz |
| | EtOH 80% | kurz |
| | EtOH 96% | 2 Min |
| | EtOH 100% | 2 Min |
| | Xylol | 3 x 5 Min |
| 21. Eindeckeln mit Eukitt | | |

11.6 Protokoll 6: Anti-Kollagen II und -X

Anti-Kollagen II und -X Immunhistochemie

PAP-Methode

1. Entparaffinieren:	Xylol	3 x 5 Min
	EtOH 100%	2 Min
	EtOH 96%	2 Min
	EtOH 80%	2 Min
	EtOH 70%	2 Min
	Aqua dest.	2 Min
2. TBS		3 x 5 Min
3. Protease XXIV 0,05%	37°C	10 Min
4. TBS		3 x 5 Min
5. Hyaluronidase	37°C	90 Min
6. TBS		3 x 5 Min
Blocksolution der endogenen Peroxidase		
7. (Dako)		5 Min
8. TBS		3 x 5 Min
9. 1. AK mouse anti-Collagen (II/X) 1:25 50 µl / Schnitt	2 µl AK (Collagen II oder Collagen X) 2 µl Biotinylierungsreagenz in 48 µl A. dest	
	RT	15 Minuten
	2 µl Blocklösung zugeben	
10. 1. AK auf den Schnitt pipettieren	RT	15 Min
11. TBS		3 x 5 Min
Streptavidin-HRP-Gebrauchslösung auf den		
12. Schnitt pipettieren	RT	15 Min
13. TBS		3x 5 Min
14. Substratlg. (DAKO Liquid Substrat System)	1 Tropfen auf 1 ml	
15. Substratlösung auf Schnitt pipettieren		kurz
16. Abstoppen mit A. dest. Ggf. Gegenfärbung mit Methylgrün		
17. 1:4 in A. dest.		
18. Entwässern:	EtOH 70%	kurz
	EtOH 80%	kurz
	EtOH 96%	2 Min
	EtOH 100%	2 Min
	Xylol	3 x 5 Min
19. Eindeckeln mit Eukitt		

11.7 Protokoll 7: Extraktion von RNA aus Gewebe

Extraktion von RNA aus Gewebe

RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)

1. Working Solution vorbereiten:
4 Teile Ethanol (96-100%) zu RPE-Puffer hinzugeben
2. Für jede Probe:
1 Teil Ethanol (70%) zu 1 Teil Gewebslysat hinzugeben
3. 700 µl einer Probe auf eine Filtersäule in einem 2 ml Sammelgefäß geben.
Für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugieren. Den Überstand verwerfen.
4. DNase-Verdau:
 1. 350 µl RW1-Puffer auf die Filtersäule geben.
15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugieren. Den Überstand verwerfen.
 2. 10 µl DNase I Stocklösung mit 70 µl RDD-Puffer mischen. Kurz zentrifugieren.
 3. 80 µl DNase I Inkubationsmix direkt auf die Filtersäulenmembran geben.
Für 15 Minuten bei 20-30°C inkubieren.
 4. 350 µl RW1-Puffer auf die Filtersäule geben.
15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugieren.
5. 500 µl RPE-Puffer auf die Filtersäule geben. 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugieren.
6. 500 µl RPE-Puffer auf die Filtersäule geben. 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugieren.
7. Die Filtersäule in einem neuen 1,5 ml Sammelgefäß platzieren.
50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule geben. 1 Minute bei 8000 x g zentrifugieren.
8. Extrahierte RNA sofort verwenden oder bei -80°C einfrieren

11.8 Protokoll 8: cDNA-Synthese aus RNA

cDNA-Synthese aus RNA

High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)

1. RNA-Gehalt ($\mu\text{g RNA / ml Probe}$) photometrisch bestimmen
2. Für 1 $\mu\text{g cDNA}$ werden 500 ng RNA benötigt
Anhand des RNA-Gehaltes ($\mu\text{g / ml}$) kann die benötigte Probengröße berechnet werden
Bsp.: $500 / 143 \mu\text{g RNA} = 3,5 \mu\text{l Probe}$
3. Proben anhand des folgenden Schemas bis auf 9 μl / Eppi auffüllen

	Probenmenge	RNase-freies Wasser
Kontrolle	0 μl	9 μl
Probe 1	3,5 μl	5,5 μl
Probe 2	1,2 μl	7,8 μl
...

4. Mastermix anhand des folgenden Schemas ansetzen.

	für 1 Probe	für n Proben
Puffer	10 μl	n x 10 μl
Enzym*	1 μl	n x 1 μl

* *Reverse Transkriptase (RT)*

5. Zu jeder Probe (9 μl) jeweils 1 x Mastermix/RT+Puffer (11 μl) hinzugeben
6. Eppendorfgefäße gut verschließen. Gemisch in den Cycler stellen und das voreingestellte Programm wählen
(1 h 37°C, 5 Min 95°C, Ende 4°C)
7. cDNA sofort verwenden oder bei -20°C einfrieren

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Dr. Richard Stange
Klinik für Unfall-, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1, Geb. W1
48149 Münster

Tierversuchsvorhaben;

Eingangsbestätigung des Antrags auf Genehmigung zur Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken gem. § 8 Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206) in der z.Zt. gültigen Fassung

Ihr Antrag vom 05.01.2012

Sehr geehrter Herr Dr. Stange,

hiermit bestätige ich den Eingang Ihres o. a. Antrags
„**Untersuchung zur Funktion von Zelladhäsionsproteinen im Rahmen des Knochenstoffwechsels und Knochenheilung**“,
der mit der Stellungnahme des Tierschutzbeauftragten vom 12.01.2011 am
05.01.2012 hier eingegangen ist.

Der Antrag wird bei mir künftig unter dem
Aktenzeichen **84-02.04.2012.A016**
geführt.

Bei künftigem Schriftverkehr bitte ich um Angabe dieses Aktenzeichens.

Aufgrund des o. a. Tierschutzgesetzes bin ich gehalten, den vollständigen Antrag der nach § 15 Abs. 1 Tierschutzgesetz einberufenen Kommission vorzulegen. Hierdurch bedingt können Verzögerungen in der Bearbeitung nicht ausgeschlossen werden.

Unaufgefordert werden Sie von mir zu gegebener Zeit Nachricht erhalten.

Auskunft erteilt:

Herr Salart

Direktwahl 02361-305-3709

Fax 02361/305-3439

fachbereich84@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

84-02.04.2012.A016

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 19.01.2012

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 bis Haltestelle

"Siemensstraße" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12

Anträge auf Ausnahmegenehmigungen nach § 9 Abs. 1 Satz 4 und § 9 Abs. 2 Nr. 7 Tierschutzgesetz sind rechtzeitig bei der zuständigen Ordnungsbehörde der Stadt Münster zu stellen und mir nach Erhalt unaufgefordert nachzureichen.

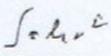
Seite 2 /

Für die Berechnung der Fristen nach § 8 Abs. 5 a Tierschutzgesetz ist der Tag des Posteingangs maßgeblich. Bei der Fristberechnung bleiben die Zeiten unberücksichtigt, während derer der Antragsteller, trotz schriftlicher Aufforderung der Behörde über weitere Anforderungen, dieser nicht nachgekommen ist.

Hinweis:

Ich möchte Sie ausdrücklich bitten, den Tierschutzbeauftragten (Herrn Dr. Martin Lücke) über den Erhalt dieser Eingangsbestätigung mit dem vergebenen Aktenzeichen für Ihr Vorhaben zu unterrichten.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag


(Salert)