

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Michael J. Raschke -

Untersuchung des Einflusses von Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den nativen
Knochen im Alterungsprozess und die Frakturheilung
anhand der Integrin α_2 -Knock-out Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Jens Everding
aus Münster

2013

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

Dekan: Univ.– Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. med. Michael J. Raschke

2. Berichterstatterin: Univ.- Prof. Dr. rer nat. Christine Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2013

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Michael J. Raschke -
Referent: Univ.- Prof. Dr. med. Michael J. Raschke
Koreferent: Univ.- Prof. Dr. rer nat. Christine Hartmann

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung des Einflusses von Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den nativen Knochen im Alterungsprozess und die Frakturheilung anhand der Integrin α_2 -Knock-out Maus

Jens Everding

Fragestellung: Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es, die Bedeutung und Funktion des Zelladhäsionsmoleküls Integrin $\alpha_2\beta_1$ im Knochen zu evaluieren. In der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass dieses Protein in Prozesse des Knochenstoffwechsels eingebunden ist. Diese Arbeit bestimmt die Auswirkungen der Defizienz des Integrin $\alpha_2\beta_1$ in Abhängigkeit unterschiedlicher Knochenstoffwechselsituationen auf die Knochenstruktur und Knochenstabilität.

Methodik: Für dieses Vorhaben wurden histomorphologische und biomechanische Eigenschaften des nativen Knochens von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im Alterungsprozess untersucht. Einerseits erfolgte dies histomorphologisch am Lendenwirbelkörper, andererseits biomechanisch am Oberschenkel der vier, zwölf und achtzehn Monate alten Mäuse. Im Weiteren wurde eine Untersuchung von biomechanischen Eigenschaften des frakturierten Oberschenkels von vier Monate alten Tieren im Verlauf der Frakturheilung nach 28 Tagen durchgeführt.

Ergebnisse: In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Lendenwirbelkörpern eine verminderte mineralisierte Fläche infolge geringerer Kortikalisfläche und eine Rarefizierung der Trabekel bei jungen Knock-out Mäusen gegenüber altersgleichen Wildtyp-Mäusen auftrat. Der altersabhängige Verlauf nahezu aller Parameter wies eine stärkere und schnellere Abnahme der Werte bei den Wildtyp-Tieren auf. Weiterhin ergab sich im Oberschenkel eine erhöhte torsionale Steifigkeit bei zwölf und achtzehn Monate alten Knock-out Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen gleichen Alters, sowie ein geringerer initialer Ausgangswert des maximalen Torsionswinkels bei fehlendem altersabhängigen Anstieg des Wertes. Die biomechanischen Eigenschaften der frakturierten Oberschenkel waren 28 Tage nach der Fraktur bei beiden Genotypen vergleichbar.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse offenbarten zunächst phänotypische Veränderungen der nativen Wirbelkörper, die osteoporotische Eigenschaften entsprachen. Ein verringerter Knochenanbau bei Jungtieren und ein reduzierter Knochenabbau bei älteren Tieren in den nativen Wirbelkörpern, sowie eine verminderte Flexibilität der nativen Oberschenkel deuten weiterhin auf eine Abnahme der Remodelling Rate. Im frakturierten Oberschenkel nehmen offenbar andere Zelladhäsionsmoleküle wichtige Schlüsselrollen ein oder gleichen die Defizienz des Integrin $\alpha_2\beta_1$ aus.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2013
Tierversuchsgenehmigung G 67/2006 Aktenz.: 500835.10

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jens Everding, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation
mit dem Titel

*„Untersuchung des Einflusses von Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den nativen Knochen im
Alterungsprozess und die Frakturheilung anhand der Integrin α_2 -Knock-out 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.

Münster, den 27.08.2012

Jens Everding

*Meinen Eltern,
die mir alles ermöglicht haben.*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Zelladhäsionsrezeptoren.....	1
1.1.1 Familie der Integrine	2
1.1.1.1 Integrin $\alpha_2\beta_1$	3
1.1.1.2 Integrin α_2 -defiziente Maus.....	5
1.2 Knochenmetabolismus	6
1.2.1 Modelling und Remodelling	7
1.2.2 Frakturheilung.....	8
1.3 Histomorphologie.....	10
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	12
2 Material.....	13
2.1 Versuchstiere.....	13
2.2 Geräte.....	13
2.3 Chemikalien und Medikamente.....	14
2.4 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial.....	15
2.5 Software	15
2.6 Puffer und Lösungen.....	16
2.6.1 Technovit [®] 9100 NEU.....	16
2.6.2 Von Kossa Färbung	17
3 Methoden	18
3.1 Tiere.....	18
3.2 Gruppeneinteilung.....	18
3.3 Tötung und Präparation der Tiere	18
3.4 Eingriffe und Behandlungen an den Tieren.....	20
3.4.1 Frakturmodell und Frakturmaschine	20
3.4.2 Präoperatives Vorgehen	21
3.4.3 Operatives Vorgehen.....	21
3.4.4 Postoperative Versorgung	22
3.5 Histomorphologische Analyse	23
3.5.1 Fixierung, Wässerung und Entwässerung.....	24
3.5.2 Gewebereinbettung, Präparation der Gewebedünnschnitte.....	25

3.5.3 Von Kossa Färbung	25
3.5.4 Auswertung der gefärbten Schnitte	27
3.6 Biomechanische Analyse.....	28
3.6.1 Einbettung der Proben.....	29
3.6.2 Messvorgang mittels Materialprüfsystem LR5K Plus	30
3.6.3 Erfassung und Auswertung der biomechanischen Daten	30
3.7 Datenanalyse	31
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Klinische und Bildgebende Kontrolle der operierten Tiere	33
4.2. Untersuchungen zur nativen Knochenstruktur	34
4.2.1 Mineralisierte Gewebefläche	35
4.2.2 Kortikalisfläche.....	36
4.2.3 Kortikalisdicke	37
4.2.4 Trabekelfläche	38
4.2.5 Trabekelanzahl	39
4.2.6 Trabekelabstand	40
4.2.7 Trabekeldicke.....	41
4.3 Untersuchungen zur nativen Knochenstabilität.....	42
4.3.1 Maximales Drehmoment.....	42
4.3.2 Maximaler Torsionswinkel	44
4.3.3 Torsionale Steifigkeit	45
4.4 Untersuchungen zur Knochenstabilität nach Frakturheilung	46
4.4.1 Maximales Drehmoment.....	46
4.4.2 Maximaler Torsionswinkel	46
4.4.3 Torsionale Steifigkeit	48
5 Diskussion	49
5.1 Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den nativen Knochen im Verlauf des Alterungsprozesses	49
5.2 Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den Knochen im Verlauf der Frakturheilung.....	55
6 Zusammenfassung.....	58
7 Literaturverzeichnis	61
8 Abkürzungsverzeichnis	68
9 Danksagung.....	70
10 Lebenslauf	71

11 Anhang.....73

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsionsrezeptoren

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung, Funktion sowie Wiederherstellung von Gewebe. Während der Morphogenese und Homöostase des Gewebes treten spezifische Signale in der Zellumgebung auf, welche die Zellmembran überqueren und Zellaktivitäten wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose bestimmen und kontrollieren. Gleichzeitig beeinflussen auf umgekehrtem Wege intrazelluläre Signale durch Überschreiten der Zellmembran die extrazelluläre Matrix (Bouvard, *et al.*, 2001). Die Übermittlung dieser Signale erfolgt mit Hilfe von Zelladhäsionsmolekülen. Diese transmembranen Glykoproteine sind in der Lage einen strukturellen und funktionellen Kontakt zwischen Zellen untereinander, sowie zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix herzustellen, wodurch in hoch organisierten Prozessen, die tausende von dynamischen Verbindungen umfassen, eine Integration der Zelle in ihre Mikroumgebung erfolgt (Morgan *et al.*, 2007).

Insgesamt lassen sich vier große Familien von Adhäsionsrezeptoren unterscheiden, welche die calciumabhängigen Selektine und Cadherine, sowie die calciumunabhängigen Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und Integrine umfassen. Dabei exprimieren die vorwiegenden Zellen des knöchernen Skeletts, die Chondrozyten, die Osteoblasten und die Osteoklasten insbesondere zahlreiche, verschiedene Integrin-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (Gronthos *et al.*, 1997; Bouvard *et al.*, 2001).

Defekte in diesen Proteinen bedingen eine Unterbrechung des molekularen Dialogs zwischen der Zelle und ihrer Mikroumgebung. Der resultierende Ausfall des „outside-in signaling“ bzw. „inside-out signaling“ zwischen den beiden Kompartimenten (Zhang *et al.*, 2006) ruft Veränderungen des Gleichgewichtszustandes im Gewebe hervor.

Basierend auf dieser Pathophysiologie können verschiedene humane Krankheitsbilder beobachtet werden (Bouvard *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002), deren Auftreten durch das gezielte Ausschalten von Zelladhäsionsmolekülen in *in vivo* Studien verursacht werden können. Umgekehrt kann aber ebenso der bislang unbekannte Einfluss eines Zelladhäsionsmoleküls im Gewebe durch *in vivo* Studien aufgedeckt werden.

1.1.1 Familie der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die aus nicht kovalent verbundenen α und β Einheiten aufgebaut sind. Zurzeit sind insgesamt 18 α und 8 β Einheiten bekannt, welche sich in verschiedenen Kombinationen zu 24 unterschiedlichen Integrin-Rezeptoren zusammensetzen lassen. Integrine besitzen eine gleiche Grundstruktur (Luo *et al.*, 2007), bestehend aus dem extrazellulären und Liganden-bindenden N-terminus (Kopf), sowie zwei langen, C-terminalen Domänen, welche sich durch die Zellmembran in das Zytoplasma fortsetzen (Abb. 1a). Der kugelige Kopfanteil repräsentiert gleichzeitig die Verbindungsstelle der beiden Untereinheiten. Während die α Einheit des Kopfes sieben Segmente mit jeweils 60 Aminosäuren umfasst, die sich zu einem siebenflügeligen β -Propeller zusammenlagern, bildet die β Einheit der Kopfreion mit der β I Domäne den Bindungspartner des β -Propellers aus. Die Hälfte der Integrin α Untereinheiten weist zusätzlich eine von Willebrand-Faktor A Domäne (α I Domäne) auf, die als Bestandteil des Rezeptorkopfes eine wichtige Funktion in der Bindung von Liganden einnimmt (Luo *et al.*, 2007). Diesbezüglich sind die Transmembranproteine mit ihrer langen, extrazellulären Domäne in der Lage, sowohl Glykoproteine mit RGD-Sequenz wie Vitronektin, Osteopontin und Bone Sialoprotein, als auch nicht RGD-Region tragende Moleküle wie Kollagen und Laminin zu binden. (Duong *et al.*, 2000; McKee *et al.*, 2005). Oberflächenrezeptoren, zu denen VCAM-1 und Mitglieder der ICAM-Familie gehören, sind ebenfalls fähig, Verbindungen mit Integrinen einzugehen (Morgan *et al.*, 2007). Die in der Regel kürzere zytoplasmatische Domäne (ausgenommen β_4) der Rezeptoren ist über Adaptermoleküle (u.a. Talin, Vincullin) mit dem Aktinzytoskelett verbunden.

Integrine besitzen keine intrinsische enzymatische Aktivität, so dass Signalkaskaden über die Aktivierung von nicht-rezeptorgebundenen Kinasen reguliert werden. Hierzu zählen neben der Proteinkinase C ebenso die Tyrosinkinasen *Extrazelluläre-Signal-Regulierende Kinase* (ERK), *focal adhesion kinase* (FAK) und *Src*. Die beiden letzteren finden sich im Bereich der *focal adhesions*, an deren Ausbildung die Integrine beteiligt sind. Der dynamische Auf-, Um-, und Abbau der an speziellen Membranstellen lokalisierten *focal adhesions* sowie des Zytoskeletts selbst, wird auch durch die Interaktion der Integrinmoleküle mit der Rho-Subfamilie der kleinen GTPasen kontrolliert (Morgan *et al.*, 2007). Hierbei kommt es zu wechselnden Aktivitätszuständen von den drei wichtigsten Rho-Subfamilien Mitgliedern RhoA, Rac1

und Cdc42, wobei zwischen inaktiven GDP-gebundenen und aktiven GTP-gebundenen Konformation unterschieden wird (Abb. 1b).

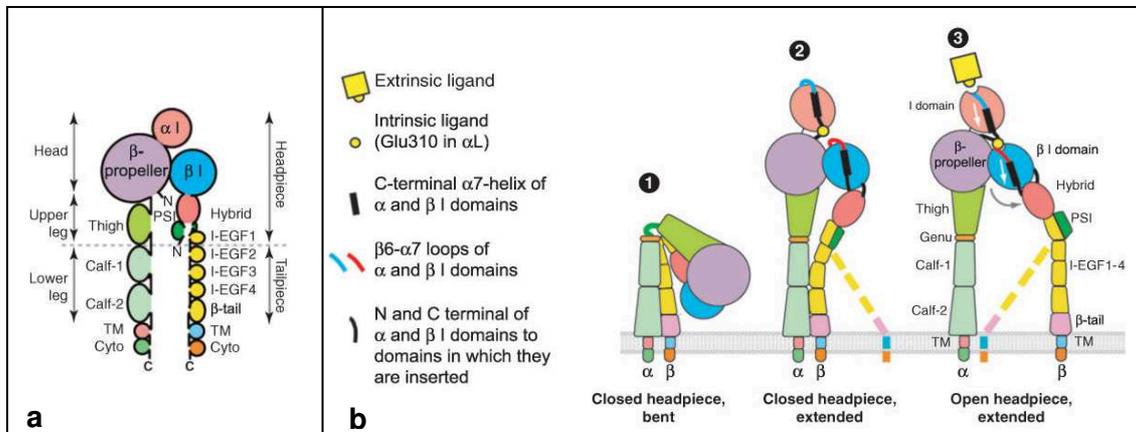


Abb. 1a/b: Struktur der Integrine (nach Luo *et al.*, 2007). **(a)** Integrine sind aus einer α und β Einheit aufgebaut, die im Bereich des Rezeptorkopfes in Kontakt treten. Die Hälfte der Integrine weist in ihrer Kopfregion als Bestandteil der α Einheit eine zusätzliche α I Domäne auf (von Willebrand-Faktor A Domäne), die eine wichtige Bindungsstelle für Liganden darstellt. **(b)** Unterschieden wird zwischen der abgewinkelten, niedrig affinen Konformation der Integrine (1), bei welcher die Beine der Untereinheiten eine V-förmig Struktur ausbilden, sowie der gestreckt geschlossenen (2) bzw. gestreckt offenen Konformation (3). Der Übergang von der abgewinkelten in die gestreckte Konformation beruht auf einer klappmesserartigen Bewegung.

Im Knochen nehmen Integrine unterschiedliche Funktionen wahr. Studien zu Integrin β_3 -defizienten Mäusen führten zu einer Ausbildung von dysfunktionalen Osteoklasten, so dass eine durch erhöhte Knochenmasse charakterisierte Osteosklerose auftrat (McHugh *et al.*, 2000). Bei Mäusen mit einer Doppel-Defizienz für α_3 - und α_6 -Integrin wurden schwerste Skelettanomalien beobachtet, die einen fehlenden Verschluss des Neuralrohrs vermuten lassen (De Arcangelis *et al.*, 1999). Auch der Ausfall von β_1 -Integrinen führt zu Veränderungen im knöchernen Skelett. Eine verschlechterte membranöse Knochenformation wurde in transgenen Mäusen nach Expression von dominant-negativen β_1 -Integrin Untereinheiten festgestellt (Zimmerman *et al.*, 2000).

1.1.1.1 Integrin $\alpha_2\beta_1$

Das Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Molekül wird auf zahlreichen epithelialen und endothelialen Zellen, sowie auf Zellen hämatopoietischer Herkunft und Fibroblasten exprimiert (Chen *et al.*, 2002; Mercurio, 2002). Der Arbeitsgruppe um Wu und Santora (1994) gelang es, dass Auftreten von Integrin- α_2 Untereinheiten auf hypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten in der embryonalen Skelettentwicklung bei Mäusen aufzuzeigen, was hingegen auf bereits im Knochen eingebettete Osteozyten nicht mehr zutraf. Ebenso

konnte eine hohe Expression von $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptoren auf Osteoblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden (Gronthos *et al.*, 1997).

Der Aufbau des transmembranen Glykoproteins basiert auf der Grundstruktur der Integrine. Gleichzeitig besitzt es eine zusätzlich eingefügte α I Domäne (von Willebrand-Faktor A Domäne), welche den entscheidenden Liganden-bindenden Ort darstellt. Neben Laminin und Fibronectin bindet der $\alpha_2\beta_1$ -Integrinrezeptor mit besonders hoher Affinität das fibrilläre Kollagen I, welches den Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix ausmacht. Hierbei beruht die Bindung des Kollagen I durch Integrin $\alpha_2\beta_1$ unter anderem auf dem Erkennen einer bestimmten Aminosäuresequenz (GFOGER) der α_1 Kette des Kollagen-Moleküls (Reyes *et al.*, 2004), wodurch intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden (Käpylä *et al.*, 2000; Nykvist *et al.*, 2000; Tulla *et al.*, 2001, Young, 2003) und infolgedessen dieser Interaktion einer essentiellen Bedeutung zugeschrieben wird.

Entsprechend gelang Mizuno *et al.* (2000) durch Auftragen und Kultivieren von multipotenten Knochenmarkszellen auf Kollagen I Matrix-Gele der Nachweis eines Anstiegs der Aktivität von Alkalischer Phosphatase in den Zellen, sowie der Beleg einer Kollagensynthese und Ausbildung von mineralisierter Matrix durch diese Zellen. Mit der nachfolgenden Expression von Osteokalzin- und Bone Sialoprotein-Genen als Osteoblasten-spezifische Gene deuteten weitere Untersuchungsergebnisse auf die Induktion einer osteoblastären Differenzierung der Knochenmarkszellen hin. Diese Beobachtungen konnten durch Inhibierung der Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Kollagen I Interaktion mittels DGEA Peptiden, welche die zellbindende Domäne des Kollagen I besetzen, und Anti- α_2 Integrin Antikörpern aufgehoben werden. Ähnlich gelang es der Arbeitsgruppe um Xiao *et al.* (1998) die gegenseitige Beeinflussung des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Moleküls und Kollagen I nachzuweisen. Eine Unterbrechung der Integrin-Kollagen Bindung auf gleiche Weise mit DGEA Peptiden und Anti- α_2 Integrin Antikörpern resultierte in einer Blockade der Aktivierung des Osteokalzin Gen 2 Promoters durch Ascorbinsäure und in eine Aufhebung der Induktion endogener Osteokalzin mRNA. Gleichzeitig wurde eine Blockade der Ascorbinsäure-abhängigen Bindung von Cbfa1 an die *osteoblast specific cis acting element 2* (OSE2) Promotorstelle der DNA festgestellt. Sowohl DGEA Peptide als auch Anti- α_2 Integrin Antikörper führten die selektive Inhibierung der Mineralisierung als Endpunkt der Osteoblasten Differenzierung herbei.

Eine Verminderung der TGF- β Rezeptoren an der Zelloberfläche von Osteoblasten, infolge der Aktivierung von FAK bei der Interaktion zwischen $\alpha_2\beta_1$ -Integrin und Kollagen I führte ebenso zu einer Stimulation der zunehmenden Differenzierung von

Osteoblasten (Takeuchi *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang konnte erneut ein Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität, des Osteokalzins und des Bone Sialoproteins (BSP) beobachtet werden (Takeuchi *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 2004).

In weiteren Untersuchungen (Phillips, 2005) konnte darüber hinaus eine synergistische Verbindung zwischen Matrix-Metalloproteinasen und Integrin $\alpha_2\beta_1$ belegt werden. Die gleichzeitige Anwesenheit von Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität und Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Aktivität führte zu einem verbesserten und erweiterten Kollagen-Remodelling, welches größer war als die Summe der Einzelaktivitäten dieser Proteine. In die gleiche Richtung gehen die Untersuchungen von Langholz *et al.* (1995) sowie Riikonen *et al.* (1995), welche die Induktion der Kollagenase 1 (MMP-1) durch Integrin $\alpha_2\beta_1$ nachweisen konnten. Neben den Auswirkungen des Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf die histomorphologischen Eigenschaften des Knochengewebes ist insbesondere die biomechanische Bedeutung dieses Proteins im Knochen noch ungeklärt.

1.1.1.2 Integrin α_2 -defiziente Maus

Obgleich das $\alpha_2\beta_1$ -Integrin in hohem Maße in der Plazenta und in zahlreichen weiteren Geweben während der Embryogenese von Mäusen exprimiert wird, sind Integrin- α_2 -defiziente Mäuse lebensfähig, normal entwickelt und fruchtbar (Wu und Santora, 1994; Holtkötter *et al.*, 2002). Gleichwohl zeigt sich bezüglich der Adhäsionseigenschaften von Thrombozyten dieser Mäuse, dass sowohl unter statischen Bedingungen, als auch unter Scherspannung keine Bindung an Kollagen I erfolgt. Ebenso ist der Prozess der Aggregation von aufbereiteten Thrombozyten aus α_2 -defizienten Mäusen gegenüber den aus Wildtyp-Mäusen gewonnenen Thrombozyten verlängert und von verminderter Intensität (Holtkötter *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002). Entgegen der lange bestehenden Annahme, dass Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine entscheidende Rolle in der Wundheilung einnimmt, konnte in neueren Studien die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls in diesem Zusammenhang relativiert werden (Zhang *et al.*, 2006). Eine wichtige Funktion des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins konnte jedoch hinsichtlich der Adhäsion von Keratinozyten an Kollagen I und IV nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Keratinozyten von Wildtyp Mäusen waren die α_2 -defizienten Keratinozyten nicht dazu befähigt an die beiden Kollagentypen zu binden. Wohingegen Fibroblasten keiner explizierten Ausbildung von Integrin- $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptoren bedurften, um entsprechende Bindungen einzugehen. Hier erfolgte ein Ausgleich des Verlustes durch die vermehrte Ausbildung von anderen Integrinrezeptoren (Zhang *et al.*, 2006). Hinsichtlich der Verzweigung von

Brustdrüsengängen in $\alpha_2^{(-/-)}$ -Mäusen zeigten sich Auffälligkeiten im Sinne einer verminderten Anzahl und Komplexität dieser Strukturen. Die Morphogenese der Brustdrüsenverzweigung wird entsprechend durch Integrin $\alpha_2\beta_1$ erleichtert, ist aber nicht essentiell von Bedeutung für diesen Prozess, zumal die Fähigkeit der Mäuse zur Laktation und Ernährung ihrer Jungen nicht eingeschränkt ist (Mercurio, 2002). Keine Abnormalitäten konnte die Arbeitsgruppe um Chen *et al.* (2002) bezüglich der Histologie in Herz, Lunge, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Haut und Geschlechtsorganen nachweisen.

1.2 Knochenmetabolismus

Das Skelett ist zeitlebens durch einen ständigen Abbau, Anbau und Umbau von knöcherner Substanz geprägt und als solches eines der stoffwechselaktivsten Organe des menschlichen Organismus. Überdies treten innerhalb des Knochens im Verlaufe des Lebens Zustände unterschiedlicher metabolischer Aktivität auf. Einerseits verbleibt der Knochenstoffwechsel während des Modellings und Remodellings auf einem stabilen, ausgewogenen Niveau. Andererseits besteht während der embryonalen Knochenbildung und dem Prozess der Frakturheilung ein exzessiv erhöhter Knochenstoffwechsel.

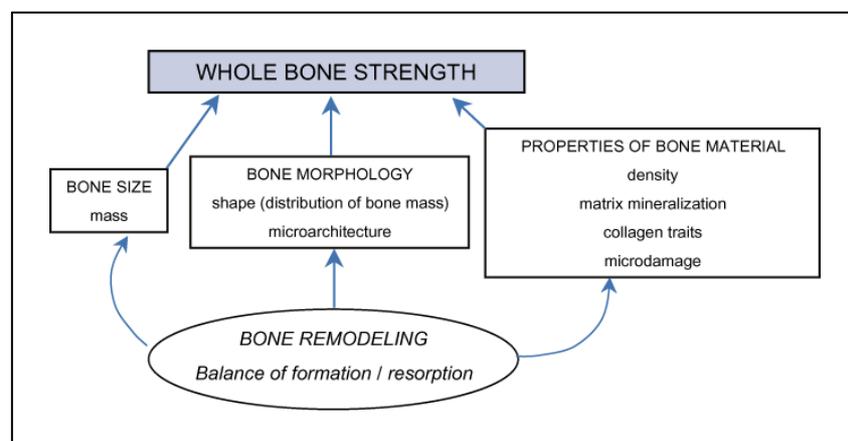


Abb. 2: Determinanten der Knochenstabilität (Bouxsein, 2005)

Die alleinige Regulation des knöchernen Metabolismus durch nicht-mechanische Faktoren wurde im Paradigma der skelettalen Physiologie postuliert. Das Paradigma schließt dabei unter anderem Hormone, Kalzium, Vitamin D, Geschlecht und Alter ein, berücksichtigt allerdings nicht die mechanischen Faktoren (Jee, 2000). Diese Erkenntnis der Schlüsselstellung von Biomechanik und Mechanismen auf

Gewebsebene bezüglich des Knochenmetabolismus wurde erst nachfolgend in zahlreichen weiteren Studien ermittelt (Frost, 1992; Jee und Frost, 1992) und daraufhin im *Utah Paradigm* festgehalten (Frost, 1995).

Der knöcherne Stoffwechsel selbst hingegen wirkt sich maßgeblich auf Masse, Form, Mikroarchitektur und Materialeigenschaften des Knochens aus, die alle Determinanten der Knochenstabilität sind (Bouxsein, 2005). Infolge einer gezielten Beeinflussung des Knochenmetabolismus können auf diese Art und Weise Veränderungen der Determinanten und folglich der Knochenstabilität erzeugt werden (Abb. 2).

1.2.1 Modelling und Remodelling

Eine besondere Eigenschaft des Knochens liegt in der Fähigkeit zur Adaptation von Größe und Form in Abhängigkeit von der einwirkenden Kraft (*Wolff'sches Gesetz*, *Utah Paradigm*). Die allmählich eintretende optimale mechanische Anpassung des Knochens erfolgt hierbei durch die unabhängige Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. Der Prozess der resultierenden Abtragung und Anlagerung von knöcherner Substanz tritt insbesondere während des Wachstums in Kindheit und Adoleszenz auf und wird durch den Begriff des Modelling beschrieben (Brandi, 2009). Das Remodelling hingegen entspricht einer lebenslangen Regeneration des Knochens, bei dem ein fortwährender Austausch von altem Knochen durch neuen Knochen an ein und derselben Stelle beobachtet wird. Dies führt über einen Zeitraum von 10 Jahren zu der vollständigen Erneuerung des gesamten knöchernen Skeletts (Parfitt, 1994). Hierdurch wird eine zunehmende Alterung des Knochens verhindert, eine Akkumulation von Mikroschäden und Ermüdungserscheinungen abgewendet und ebenso, infolge des kontinuierlichen Austausches von knöcherner Substanz, die Mineralstoff-Homöostase beeinflusst (Parfitt, 2002; Clarke, 2008).

Die vier Phasen des Remodelling setzen sich aus Aktivierung, Resorption, Inversion und Formation zusammen. In diesem Zyklus bilden Osteoklasten und Osteoblasten als basic multicellular unit (BMU) eine zentrale Funktionseinheit aus, welche die erforderliche räumliche und zeitliche Abstimmung hinsichtlich der Resorption und Formation von Knochen gewährleistet (Parfitt, 1994). Dabei verschiebt sich die Bilanz der BMU altersabhängig in Richtung Verlust von Knochenmasse, was in der reduzierten Formation, die ab dem mittleren Alter zu beobachten ist, begründet liegt (Vedi *et al.*, 1982).

In weiteren Studien konnte die Arbeitsgemeinschaft um Bousson *et al.* (2001) im Alter eine zunehmend erhöhte Porosität und erniedrigte Dicke des kompakten Knochens feststellen, wobei ebenso der Nachweis einer deutlich negativen Knochenbilanz an der endostalen Oberfläche gelang (Brown *et al.*, 1987). Durch gleichzeitige periostale Knochenapposition erfolgt eine partielle Kompensation dieses Prozesses. Dennoch wird hierdurch nur eine geringfügige Verringerung der insgesamt negativen Knochenbilanz erreicht (Balena *et al.*, 1992; Seeman und Delmas, 2006). Auch in spongiossem Knochen treten altersbedingte Veränderungen auf, welche sich vorrangig auf horizontale Trabekel beziehen und dadurch zu einer erheblichen Reduktion von axialer Stabilität führen (Thomsen *et al.*, 2002; Dempster, 2003).

1.2.2 Frakturheilung

Die embryonale Skelettentwicklung wiederholt sich in vielen Schritten im postnatalen Prozess der Frakturheilung. Dieser komplizierte, physiologische Vorgang umfasst die koordinierte Teilhabe von verschiedenen Zellen und wird durch Mediatoren, Wachstumsfaktoren und Hormone gesteuert. Abweichend von vielen anderen Geweben, welche durch eine niedrig organisierte Narbenbildung verheilen, kommt es bei der Frakturheilung zu einer vollständigen Regeneration des Knochens. Die Eigenschaften des ursprünglichen Gewebes werden wieder hergestellt, sowohl biomechanische Kompetenz, als auch die geometrische Form des Knochens gleichen dem vorherigen Gewebe (Gerstenfeld *et al.*, 2003).

In der klassischen Einteilung wird zwischen der primären und sekundären Knochenheilung unterschieden. Die primäre Frakturheilung beruht auf dem Versuch der Kortikalis, sich eigenständig, ohne Kallusbildung, zu regenerieren. Voraussetzung hierfür ist ein Kontakt der beiden Frakturfragmente im Sinne einer anatomischen Wiederherstellung durch eine interne Fixation. Osteoklasten sind in der Lage, Havers-Kanäle in den abgestorbenen Knochen zu bohren („*cunning cones*“), über welche Blutgefäße einspießen und die von Osteoprogenitorzellen begleitet werden (Kontaktheilung). Besteht bei stabil fixierten Frakturfragmenten kein direkter Kontakt, so wird der vorhandene Spaltraum zunächst mit Geflechtknochen aufgefüllt, welcher im Anschluss in Lamellenknochen umgewandelt wird (Spalthheilung).

Die sekundäre Frakturheilung hingegen umfasst die Kombination der intramembranösen und enchondralen Ossifikation. Der Heilungsprozess kann hierbei

in wenigstens fünf verschiedene Stadien unterteilt werden, die nacheinander, aber auch überlappend ablaufen.

- Phase der Inflammation
- Periostale Reaktion (Intramembranöse Ossifikation)
- Chondrogenese und Enchondrale Ossifikation
- Primäre Knochenbildung (Modelling)
- Sekundäre Knochenbildung (Remodelling)

Initial kommt es im Bereich der Frakturzone zur Phase der Inflammation und Hämatombildung. Das umliegende Gewebe reagiert auf die Verletzung mit einer Exsudation von Plasma und Leukozyten sowie einer Vasodilatation. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen werden aktiviert, wobei insbesondere letztere durch die Sekretion von Heparin und heparinähnlichen Substanzen zu einer verstärkten Vaskularisierung führen. Neben Interleukin-1 (IL1) und Interleukin-6 (IL6) (Einhorn *et al.*, 1995) sowie weiterer Zytokine, die von den inflammatorischen Zellen sezerniert werden, kommt es durch Degranulation von Thrombozyten zur Freisetzung von Molekülen der TGF- β Superfamilie (insbesondere BMP2, BMP4) und PDGF. Diese Signalmoleküle sind für die weitere Regulierung der Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen von wesentlicher Bedeutung (Bolander *et al.*, 1992; Bostrom *et al.*, 1995).

Die Relevanz des Periost und der damit verbundenen periostalen Reaktion wurde nicht zuletzt durch Buckwalter *et al.* (2001) bewiesen. So gelang es der Arbeitsgemeinschaft eine verminderte Kallusentwicklung im Rahmen der Frakturheilung nachzuweisen, nachdem zuvor das Periost des Knochens entfernt wurde. Tonna und Cronkite (1961) zeigten, dass eine erhöhte Zellteilung innerhalb von acht Stunden nach der Fraktur auftritt. Entsprechende Aktivitäten sind zunächst im Periost zu beobachten. Die aus vermutlich zwei Schichten bestehende Knochenhaut beinhaltet in seiner inneren, kambialen Schicht spindelförmige Osteoprogenitorzellen, welche nur sehr schwer von normalen Fibroblasten abzugrenzen sind, und welche im Weiteren die Differenzierung zu Osteoblasten erfahren (Nakahara *et al.*, 1990). Im Verlauf der periostalen Reaktion kommt es nun zu einer diaphysären Osteoidbildung und in Entfernung vom Frakturspalt beginnt die Bildung von Geflechtknochen. Es entsteht der harte Kallus (Einhorn *et al.*, 1998).

Unmittelbar angrenzend an den Frakturspalt entsteht der weiche Kallusanteil, in welchem sich hyaliner Knorpel entwickelt, der um den 14. Tag nach der Fraktur des humanen Knochens nahezu vollständig hypertrophiert ist. Es beginnt der Prozess der

enchondralen Ossifikation. Hypertrophierte Chondrozyten geben Matrixvesikel, die mit proteolytischen Enzymen zur Degeneration von Kalzifikations-inhibierenden Proteoglykanen und weiteren Proteinen beladen sind, in die extrazelluläre Umgebung ab (Einhorn *et al.*, 1989). Gleichzeitig kommt es zur Freisetzung von Calcium und damit zur Einleitung des Kalzifizierungsprozesses des Knorpels, wodurch das Einsproßen von Blutgefäßen ermöglicht und das Eindringen von Vorläuferzellen in den Frakturspalt erreicht wird. Die anschließende Phase der Resorption des zuvor kalzifizierten Knorpels weist eine hohe Aktivität von M-CSF, OPG und RANKL auf (Kimble *et al.*, 1997; Kon *et al.*, 2001) wohingegen die Konzentrationen von IL1 und IL6 einen Anstieg in der abschließenden Phase des Remodelling erfahren, in welcher der neu entstandene Geflechtknochen in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung in lamellären Knochen umgewandelt wird.

1.3 Histomorphologie

Die Architektur des Knochens ist ein essentielles Element der Knochenqualität (Abb. 2) und ihre Integrität trägt entscheidend zur mechanischen Kompetenz des Knochens bei (Carbonare *et al.*, 2005). Grundsätzlich ist zwischen kortikalen und trabekulären Knochen zu unterscheiden, die sich nicht zuletzt in ihrer Funktion voneinander abgrenzen. Das erwachsene, menschliche Skelett besteht mit 80% überwiegend aus kortikalem Knochen, der sich durch eine dichte und solide Struktur auszeichnet und besonders in den Diaphysen der langen Röhrenknochen ausgebildet wird. Eine hohe Tragkraft und ein guter Hebelarm beruht in diesen Bereichen auf einer Zunahme der Steifigkeit bei Abnahme der Flexibilität des Knochens. Der Anteil des trabekulären Knochens am erwachsenen, menschlichen Skelett liegt mit 20 % deutlich niedriger. Unter Ausbildung eines honigwabenartigen Netzwerks mit plattenförmigen und stabförmigen Strukturelementen, werden Zwischenräume zur Einlagerung von rotem Knochenmark geschaffen. Der trabekuläre Knochen absorbiert auftretende Kräfte ähnlich einer Feder, wobei diese Fähigkeit auf einer erniedrigten Steifigkeit und einer erhöhten Flexibilität basiert (Seemann, 2003; Brandi, 2009). Beide Knochentypen treten innerhalb der verschiedenen Knochen in einem beträchtlich variablen Verhältnis auf, so dass die Ratio von kortikalem zu trabekulärem Anteil in der Diaphyse des Radius 95:5 und im Corpus vertebrae 25:75 beträgt (Dempster, 2006).

Auf mikroskopischer Ebene setzt sich kompakter Knochen aus bone structural units (BSU), sogenannten Osteonen (Havers-System), zusammen. Diese nehmen eine

zylindrische Form mit einer Länge von 400mm und einem Basisdurchmesser von 200mm ein. Konzentrische Lamellen formen die Wände der innerhalb des kortikalen Knochens verzweigten Havers-Systeme (Clarke, 2008). Hingegen handelt es sich bei spongiösem Knochen um halbmondförmige Hemi-Osteonen (Parfitt, 1994), wobei ein dreidimensionales Gitter entsprechend der Kraftlinien (Trajektorien) entsteht.

Die Mikroarchitektur lässt sich anhand verschiedener Methoden beurteilen. Hier kann unter Verwendung von Lichtmikroskopen, entsprechend den Prinzipien der Histomorphometrie als quantitative histologische Untersuchung, die Evaluation von zweidimensionalen nicht-dekalzifizierten Knochenebenen durchgeführt werden. Die räumliche Interpretation erfolgt dabei unter Anwendung der Stereologie (Parfitt, 1987). Neben Strukturellen- können ebenso Remodelling-Parameter erhoben werden, letztere unterteilen sich in statische und dynamische Parameter (Kulak *et al.*, 2010).

In der jüngsten Vergangenheit gelang zunehmend die Entwicklung von weiteren, bildgebenden Verfahren zur Bestimmung der Mikroarchitektur. Sowohl *high resolution computed tomography* (hrCT), *micro computed tomography* und *volumetric quantitative computed tomography* (vQCT) zählen hierzu.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Das Zelladhäsionsmolekül Integrin $\alpha_2\beta_1$ zeichnet sich durch eine besonders hohe Affinität zum fibrillären Kollagen I aus, dem Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix. Die Interaktion der beiden Bindungspartner beeinflusst zahlreiche regulatorische Prozesse unter anderem während der Differenzierung von Osteoblasten. Um die Bedeutung des Integrin $\alpha_2\beta_1$ im Knochenstoffwechsel in Abhängigkeit unterschiedlicher metabolischer Aktivitätszustände zu evaluieren, wird anhand eines allgemeinen Modells mit Integrin α_2 -defizienten Mäusen die Knochenstruktur und Knochenstabilität dieser Tiere untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit werden zunächst am nativen Wirbelkörper vergleichende histomorphologische Untersuchungen von Wildtyp- und Knock-out-Mäusen durchgeführt. Wirbelkörper besitzen einen hohen trabekulären Knochenanteil. Infolge der unmittelbaren Nähe zu hämatopoetischen Gewebe und der am Knochenumsatz beteiligten Zellen treten Abweichungen in Knochenmasse und Knochenqualität zu einem frühen Zeitpunkt und in einem umfangreichen Ausmaß auf. Es wird in diesem Zusammenhang eine Methode zur quantitativen Auswertung verschiedener histomorphologischer Parameter von von Kossa gefärbten Wirbelkörperschnitten etabliert. Die biomechanischen Eigenschaften werden am nativen, rechten Oberschenkelknochen bestimmt. Dieser erweist sich aufgrund seines kortikalen Aufbaus im Schaftbereich und seiner geometrischen Form zur Ermittlung von maximalem Drehmoment, maximalem Torsionswinkel und torsionaler Steifigkeit im Torsionstest als besonders geeignet. Die torsionale Steifigkeit repräsentiert die Mineralisierung des Knochens und korreliert mit der Knochenmasse.

Im zweiten Teil der Arbeit wird der Einfluss der α_2 -Defizienz auf die Frakturheilung ermittelt. Die biomechanischen Parameter von Wildtyp- und Knock-out-Mäusen werden nach Anwendung eines etablierten Frakturmodells am linken Oberschenkelknochen 28 Tage nach der Fraktur erhoben.

Die vorliegende Arbeit soll zu der Charakterisierung des Knochens von Integrin α_2 -defizienten Mäusen beisteuern. Die Erkenntnisse dieser Grundlagenforschung sollen zu einem besseren Verständnis der Prozesse im Knochenstoffwechsel beitragen und Aufklärung über pathologische Veränderungen im Knochen leisten.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Tab. 1: Verwendete Versuchstiere

Versuchstiere	Lieferant
C57BL/6	Harlan-Winkelmann, Borcheln
ITGA2 ^(-/-) -Mäuse	Dr. rer. nat. Beate Eckes, Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Köln

2.2 Geräte

Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Chromatographiesäule	UKM Münster
Drehgeber WDG 58B	Wachendorff, Geisenheim
Eismaschine Frimon AF 80	Scotsman, Mailand, Italien
Filterabzug Captair® by Erlab	W. H. Mahl, Magdeburg
Frakturmaschine	Fein- und Elektromechanische Forschungswerkstätten UKM Münster
Gefrierschrank (- 20° Celsius)	Liebherr, Biberach
Kraftaufnehmer Typ S2	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Kühlschrank	Lec Medical, Prescott, UK
Lichtmikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Magnetrührer MR3002	Heidolph, Schwabach
Materialprüfsystem (Serie LR5K Plus)	Lloyd Instruments Ltd, Hampshire, UK
Megapixel CCD-Kamera	Digital Video Company, Berlin
Mikrotom	Leica, Wetzlar
PC Messelektronik (Spider8)	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttler SM-30	Edmund Bühler, Hechingen
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen
UV-Licht	Whatman Biometra, Göttingen
Waage BL 150S	Sartorius AG, Göttingen

2.3 Chemikalien und Medikamente

Tab. 3: Überblick über die verwendeten Chemikalien und Medikamente

Chemikalien/ Medikamente	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Alkohol, 80 %	Apotheke der UKM
Alkohol, 96 %	Apotheke der UKM
Alkohol, 100 %	Apotheke der UKM
Aqua dest.	Apotheke der UKM
Ethanol, 70 %	Apotheke der UKM
Ketamin 10 %	CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf
Leitungswasser	
NaCl 0,9 %, steril	Braun, Melsungen
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Natriumthiosulfat, 10 %	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Palacos Flüssigkeit	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim
Palacos R, Pulver Unsteril	Apotheke der UKM
Rimadyl® (Schmerzmittel)	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Technovit® 9100 NEU	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim
Thioglykolsäure, Pilca®	GlaxoSmithKline, Bühl
Vidisc®, (Augensalbe)	Bausch und Lomb, Berlin
Weißes Pflaster, Leukosilk®	Beiersdorf, Hamburg
Xylazin 2 %	CEVA TIERGESUNDHEIT GmbH, Düsseldorf
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
2-Methoxyethylacetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.4 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial

Tab. 4: Überblick über die verwendeten Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Hilfsmittel/Verbrauchsmaterial	Hilfsmittel/Verbrauchsmaterial
Becherglas	Inbusschlüssel
Becherglas, 100ml	Kanülen G23, G24, G25, G27
Bolzenschneider	Klemme
Deckglässchen 24 x 50mm	Küvetten
Edding schwarz (zur Markierung)	Messkolben
Einbettsockel	Messzylinder, 20ml
Eindeckelmedium (DPX Kleber)	Nadelhalter
Einmal-Skalpell No: 15	Okteniseptsprühflasche
Einmalhandschuhe, steril	Pinzette, anatomisch
Einmalspritzen, 1ml	Pinzette, chirurgisch
Eppendorf Reaktionsgefäße, 2ml	Pipettenspitze, 1000µl
Eppendorf Reaktionsgefäßständer	Rührstab, magnetisch
feuchte Kammer	Schaukeln
Gewichtsscheibe, 40g	Schere
Glasstäbe	Spannvorrichtung mit Einspannschlitten
Glastrichter	Spatel
Grünes OP-Tuch	Spritze, 5ml
Hautfäden 5-0, Prolene®	I Tiegel
Implantat	Wolframdraht 0,2mm, steril

2.5 Software

Tab. 5: Zusammenstellung der verwendeten Software

Software	Hersteller
Catman® 4.5	Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt
Image Pro Plus® 5.0	Chromaphor
Microsoft Excel®	Microsoft
Microsoft Power Point®	Microsoft
PASW® 18.0.0	SPSS
Photoshop® CS5	Adobe

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Technovit® 9100 NEU

Die Zusammensetzung der im Rahmen der Technovit® 9100 NEU verwendeten Lösungen für die Probeneinbettung sind darüber hinaus der Gebrauchsinformation des Herstellers zu entnehmen:

- **4 % Paraformaldehydlösung:** - 10ml der 10 % Stocklösung Paraformaldehyd
- 15ml Aqua dest.

=> mischen

- **Präinfiltrationslösung 1:** - 100ml Basislösung (stabilisiert)
- 100ml Xylol

=> mischen

- **Präinfiltrationslösung 2:** - 200ml Basislösung (stabilisiert)
- 1g Härter 1

=> mischen

- **Präinfiltrationslösung 3:** - 200ml Basislösung (entstabilisiert)
- 1g Härter 1

=> mischen

Zur Herstellung der entstabilisierten Basislösung wurde die stabilisierte Basislösung über eine mit 50g Aluminiumoxid (Al_2O_3) gefüllte Chromatographiesäule gegeben.

- **Infiltrationslösung:** - 250ml Basislösung (entstabilisiert)
- 20g PMMA-Pulver
- 1g Härter 1

=> mischen

Das PMMA–Pulver löst sich in der entstabilisierten Basislösung besonders langsam, so dass es am Abend der entstabilisierten Basislösung beigefügt und in einem Becherglas über Nacht gemischt wurde. Am nächsten Morgen wurde 1g Härter 1 hinzugegeben.

- **Stammlösung A:**
 - 500ml Basislösung (entstabilisiert)
 - 80g PMMA-Pulver
 - 3g Härter 1

=> mischen

- **Stammlösung B:**
 - 50ml Basislösung (entstabilisiert)
 - 4ml Härter 2
 - 2ml Regler

=> mischen

2.6.2 Von Kossa Färbung

Für die von Kossa Färbung wurden folgende Lösungen verwendet:

- **5 % Silbernitrat-Lösung**
 - 200mg Silbernitrat
 - 4ml Aqua dest.

=> mischen

- **Natrium-Formaldehyd:**
 - 25g Natriumcarbonat
 - 125ml Formalin (37 %)
 - 375ml Aqua dest.

=> mischen

- **10 % Natriumthiosulfat:**
 - 8g Natriumthiosulfat
 - 80ml Aqua dest.

=> mischen

3 Methoden

3.1 Tiere

Für die Versuche wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 der Firma The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine) verwendet. Die Herstellung der Integrin α_2 -defizienten Maus beruht auf der Verwendung des Cre/loxP-Systems (Holtkötter *et al.*, 2002). Hierbei wird der zu entfernende Genabschnitt mit Hilfe von zwei loxP-Stellen markiert, so dass die Rekombinase Cre, die in gleicher Richtung orientierten loxP-Stellen schneidet. Es kommt zu einer Exzision des entsprechenden Genabschnittes, welcher für die Codierung des α_2 -Monomers verantwortlich ist.

Die Knock-out Mäuse ITGA2^(-/-) wurden vom Institut für experimentelle Muskuloskelettale Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Pap zur Verfügung gestellt.

3.2 Gruppeneinteilung

Für die Versuche wurden insgesamt 98 Mäuse verwendet. In Abhängigkeit von dem Analysevorhaben wurden vier, zwölf und achtzehn Monate alte Tiere für die native Histomorphologie und Biomechanik, sowie vier Monate alte Tiere für die Versuche der Frakturheilung verwendet (Tab. 6). Alle Tierexperimente wurden entsprechend der lokalen Richtlinien für Haltung und Gebrauch von Labortieren durchgeführt (Tierversuchsgenehmigung G67/2006, Aktenzeichen 50.0835.1.0). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Standardnahrung und Leitungswasser. Die Temperatur (20° Celsius), die Luftfeuchtigkeit (64 %) und der Tag-Nacht-Rhythmus (Lichtperiode von 6.00 bis 18.00 Uhr) wurden kontrolliert und konstant gehalten.

3.3 Tötung und Präparation der Tiere

Die zur histomorphologischen Analyse der nativen Wirbelkörperstruktur verwendeten Tiere wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten (Tab. 6) durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Wirbelsäule wurde freipräpariert und von Weichteilen unter Erhaltung des Periosts befreit. Anschließend erfolgte die kraniale Durchtrennung der Wirbelsäule auf Höhe des 10. Brustwirbels. Im Hüftgelenk wurde das rechte und linke

Femur unter vollständiger Bewahrung der Beckenschaufel vorsichtig exartikuliert. Die Proben wurden umgehend in Gewebekästchen platziert, beschriftet und über Nacht bei + 4° Celsius in einer gepufferten, formaldehydhaltigen Fixierlösung eingelegt.

Für die Versuche der nativen Biomechanik wurden die Tiere ebenfalls zu den entsprechenden Zeitpunkten (Tab. 6) durch eine zervikale Dislokation getötet. Das hierfür verwendete rechte Femur wurde gleichfalls freipräpariert und von Weichteilen unter Erhaltung des Periosts befreit. Anschließend konnte das Femur im Hüftgelenk und Kniegelenk exartikuliert werden.

Die Mäuse, denen eine Fraktur am linken Femur zugeführt wurde, wurden am 120. Tag nach der Geburt durch eine zervikale Dislokation getötet (Tab.6). Dies entsprach gleichzeitig dem 28. postoperativen Tag. Bei diesen Tieren wurde zusätzlich zum rechten Femurknochen der frakturierte linke Oberschenkelknochen unter besonderer Sorgfalt und Berücksichtigung der Kallusbildung präpariert.

Alle für die biomechanischen Analysen bestimmten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 20° Celsius tiefgefroren (Sedlin E. D., 1966).

Die Kadaver wurden fachgerecht in der Verbrennungsanlage der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikum Münster entsorgt.

Tab. 6: Gruppeneinteilung für die Versuche in Abhängigkeit vom Analysevorhaben

	Gruppe	Alter (Monate)	Genotyp	Tieranzahl
Histo- morphologie	I	4	WT	10
	II	12	WT	7
	III	18	WT	6
	IV	4	ITGA2 ^(-/-)	8
	V	12	ITGA2 ^(-/-)	12
	VI	18	ITGA2 ^(-/-)	7
Native Biomechanik	I	4	WT	20
	II	12	WT	9
	III	18	WT	6
	IV	4	ITGA2 ^(-/-)	17
	V	12	ITGA2 ^(-/-)	8
	VI	18	ITGA2 ^(-/-)	8
Frakturheilung	I	4	WT	10
	II	4	ITGA2 ^(-/-)	14

3.4 Eingriffe und Behandlungen an den Tieren

Operiert wurden ausschließlich die für die Versuche der Frakturheilung bestimmten Mäuse. Bei einem Alter von zwölf Wochen hatten die Tiere vor dem Eingriff ein Gewicht von $20\text{g} \pm 3\text{g}$. Die Operationen und Untersuchungen fanden im OP-Bereich der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster statt.

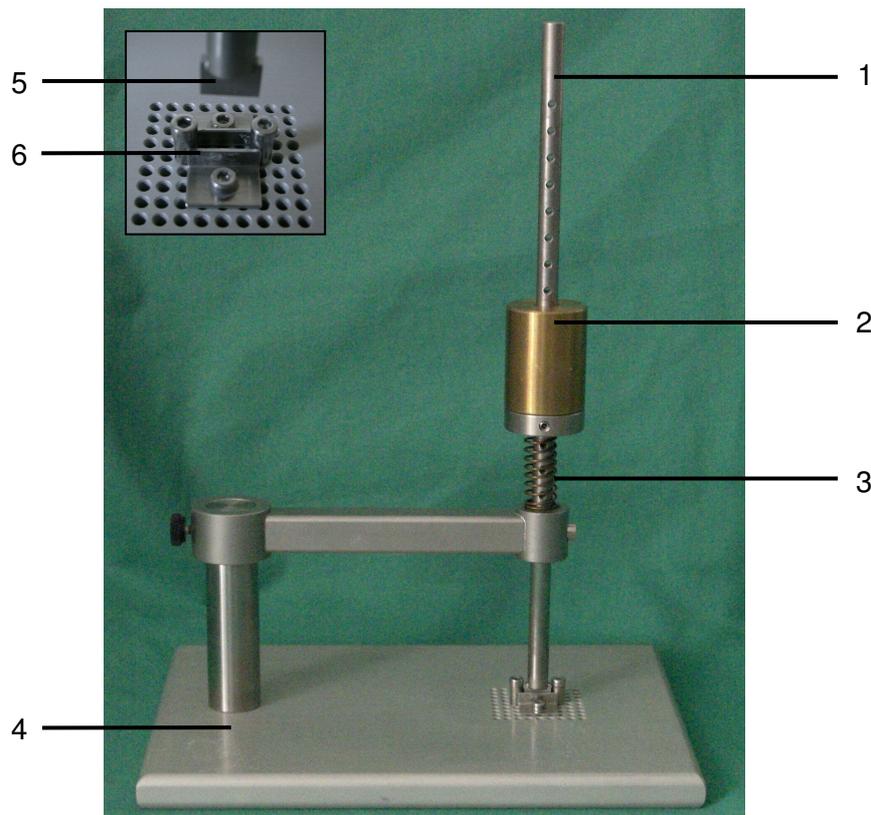


Abb. 3: Darstellung der Frakturmaschine. 1. Führungsstange; 2. Vorlast und Schlaggewicht; 3. Feder; 4. Bodenplatte; 5. Stempel; 6. Auflageschiene für das Bein; (Frakturmaschine modifiziert nach Schmidmaier *et al.*, 2004)

3.4.1 Frakturmodell und Frakturmaschine

Im Rahmen der Operation wurde mit Hilfe einer speziell entwickelten Frakturmaschine (Abb. 3) eine standardisierte, geschlossene Querfraktur des linken Femurschaftes bei minimalem Weichteilschaden herbeigeführt (entsprechend der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthese, AO 32-A3.2). Hierbei wurde das Prinzip der Dreipunktbiegung genutzt. Das im Hüftgelenk außenrotierte und abduzierte linke Femur wurde auf zwei Schienen

(Abstand 5mm) gelagert (Abb. 5), so dass sich ein Winkel von 90° zwischen dem Stempel und Femurschaft ergab. Im weiteren Verlauf wurde entlang einer Führungsschiene der Stempel mit einem Gewicht von 220g belastet, welches zuvor in einer Fallhöhe von 10,5cm manuell festgehalten wurde. Hierdurch entstand ein Impuls, der eine Belastung des Stempels bewirkte und zu der oben beschriebenen geschlossenen Querfraktur führte.

3.4.2 Präoperatives Vorgehen

Die Tiere wurden präoperativ gewogen und durch eine intraperitoneale Injektion von Xylacin 2 % (12mg/kg Körpergewicht) und Ketaminhydrochlorid 100mg/ml (75mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Im Anschluss wurden die Tiere gewogen. Das zu operierende linke Bein wurde mit einer gängigen Enthaarungscreme (Pilca®) depiliert und mit Alkohol desinfiziert. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu verhindern, erfolgte das Aufbringen einer Dexpanthenol-Augensalbe.

3.4.3 Operatives Vorgehen

Die Inzision von Haut und Faszie erfolgte über der Patellasehne. Die Sehne wurde median gespalten und der Markraum des Femur interkondylär mit Hilfe einer 23er Injektionsnadel eröffnet (Abb. 4).



Abb. 4: Aufsuchen und Eröffnung des Cavum medullaris des linken Femurs.

Ein steriler 0,2mm Wolframdraht wurde im Weiteren als intramedulläre Führungshilfe in Seldinger Technik über die 23er Injektionsnadel in den Markraum vorgeschoben. Nach dem Entfernen der Injektionsnadel konnte mittels der Frakturmaschine eine standardisierte geschlossene Querfraktur des linken Femurknochens erzeugt werden (Abb. 5) (Bonnarens und Einhorn, 1984; Schmidmaier *et al.*, 2004).

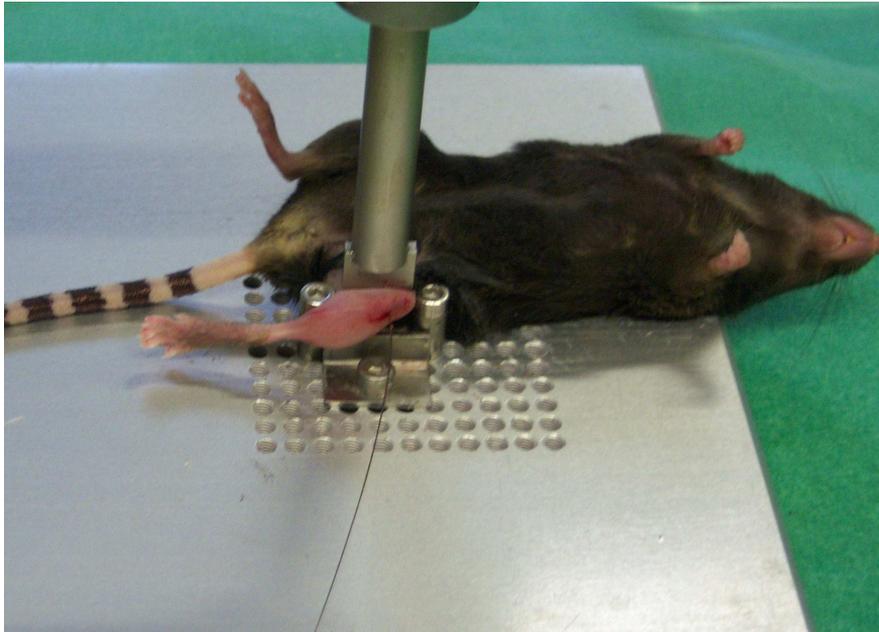


Abb. 5: Standardisierte Frakturierung des linken Femurknochens.

Im Anschluss an die erfolgreiche Fraktursetzung konnte die 23er Injektionsnadel als intramedullärer Kraftträger erneut über den noch im Markraum lokalisierten Zieldraht vorgeschoben werden. Der Draht wurde entfernt und das überstehende Ende der Nadel im Bereich der Insertionsstelle abgetrennt.

Die Faszie und Haut wurden zuletzt mit Einzelknopfnähten verschlossen und zum Schutz der Nähte mit Leukosilk® verbunden (Abb. 6).

3.4.4 Postoperative Versorgung

Postoperativ erhielten die Tiere ein nichtsteroidales Antiphlogistikum, Rimadyl® 50mg/ml (4mg/kg Körpergewicht), welches subkutan in den Nacken appliziert wurde. Bis zum Erwachen aus der Narkose standen die Tiere unter ständiger Beobachtung.

Im Rahmen von Nachuntersuchungen wurden die Tiere während der gesamten Dauer des Versuchsvorhabens regelmäßig auf ihr Wohlbefinden hin überprüft. Traten

Schmerzen aufgrund der induzierten Fraktur auf, wurde Rimadyl® über das Trinkwasser appliziert.

In wöchentlichen Abständen erfolgte die Bestimmung von Körpergewicht und Temperatur. Darüber hinaus wurden Röntgenbilder im anterior-posterioren Strahlengang der Femura angefertigt. Die hierfür notwendige Narkose wurde wie oben beschrieben durchgeführt.



Abb. 6: Abschließender Wundverschluss.

3.5 Histomorphologische Analyse

Die histomorphologische Analyse umfasste eine phänotypische Charakterisierung der Knochenstruktur des vierten und fünften Lendenwirbelkörpers von vier, zwölf und achtzehn Monate alten Wildtyp- und ITGA2^(-/-)-Mäusen. Die präparierten und entsprechend vorbehandelten Wirbelsäulen wurden hierzu in ein Technovit® Einbettmedium überführt, um mit dem Mikrotom zu 5µm dicken Serienschnitten verarbeitet zu werden. Technovit® 9100 Neu ist ein speziell für die Lichtmikroskopie zur Einbettung von mineralisiertem Gewebe entwickeltes Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat. Die chemische Polymerisation erfolgt hierbei unter Sauerstoffausschluss mit Hilfe eines Katalysatorsystems aus Peroxid und Amin. Weitere Komponenten wie PMMA-Pulver und Regler ermöglichen eine gesteuerte Polymerisation bei Kälte.

3.5.1 Fixierung, Wässerung und Entwässerung

Wie bereits erwähnt, wurde die präparierte Wirbelsäule umgehend in ein Gewebekästchen platziert, beschriftet und über Nacht bei + 4° Celsius in einer 4 %igen, gepufferten, formaldehydhaltigen Lösung fixiert. Anschließend wurde das fixierte Gewebe für 2 Stunden gewässert. Danach begann die Entwässerungsphase des Gewebes, um sogenannte Lunkerstellen zu verhindern. In einem wöchentlichen Zyklus wurde zu diesem Zwecke die Probe zunächst einmal in 70 % Alkohol entwässert, ehe das Gewebe für jeweils 2x 7 Tage in 80 % und für weitere 2x 7 Tage in 96 % Alkohol überführt wurde. Im Anschluss erfolgte eine Entwässerung für 3x 7 Tage in 100 % Alkohol und schließlich die Überführung in Xylol für weitere 2x 2 Stunden.

1.) Entwässerungsphase:

→ 1x 70 % Alkohol	je 7 Tage
→ 2x 80 % Alkohol	je 7 Tage
→ 2x 96 % Alkohol	je 7 Tage
→ 3x 100 % Alkohol	je 7 Tage

2.) Überführung in Xylol:

→ 2x Xylol	je 2 Stunden
------------	--------------

Schon während der Entwässerungsphase wurden die für die Gewebereinbettung notwendigen Präinfiltrationslösungen angesetzt. Gleiches galt für die Infiltrationslösung und die Stammlösungen A und B. Zur Herstellung der Lösungen mussten im Vorfeld 1000ml Basislösung entstabilisiert werden. Zu diesem Zwecke durchlief die Basislösung eine mit 50g Aluminiumoxid (Al_2O_3) gefüllte Chromatographiesäule. Die dadurch entstabilisierte Basislösung wurde in beschrifteten Braunglasflaschen portioniert und im Kühlschrank bei + 4° Celsius bis zur Verwendung gelagert. Im weiteren Verlauf wurde das Gewebe auf die Einbettung in die Technovitlösung vorbereitet. Hierzu durchliefen die Proben einen weiteren wöchentlichen Zyklus, in welchem es für jeweils 7 Tage bei Raumtemperatur in der Präinfiltrationslösung 1 und in der Präinfiltrationslösung 2 aufbewahrt wurde. Es folgte eine Überführung in die Präinfiltrationslösung 3 und in die Infiltrationslösung für jeweils 7 Tage, wobei auf eine Lagerung der Proben im Kühlschrank bei + 4° Celsius zu achten war.

3.) Vorbereitung des Gewebes auf die Technovitlösung:

→ Präinfiltrationslösung 1	7 Tage bei Raumtemperatur
→ Präinfiltrationslösung 2	7 Tage bei Raumtemperatur
→ Präinfiltrationslösung 3	7 Tage im Kühlschrank bei + 4° Celsius
→ Infiltrationslösung	7 Tage im Kühlschrank bei + 4° Celsius

Während der Infiltrationslösungsphase wurde das Gewebe 2-3x pro Woche für jeweils 30 Minuten im Exsikkator evakuiert, um die in der Probe eventuell vorhandenen Luftblasen zu beseitigen.

3.5.2 Gewebeeinbettung, Präparation der Gewebedünnschnitte

In der Folge wurde die Stammlösung A und die Stammlösung B im Verhältnis 9 Volumenteile und 1 Volumenteil in einem Becherglas mit Hilfe eines Glasstabes gemischt. Die mit ventraler Seite nach oben orientierte Wirbelsäule wurde in die Einbettform gelegt, mit dem Polymerisationsgemisch randvoll übergossen und im mit Hilfe von Eis vorgekühlten Exsikkator für etwa 10 Minuten evakuiert, bis keine Luftblasen mehr aufstiegen. Die Einbettform wurde luftdicht verschlossen und für mindestens 24 Stunden im Kühlschrank bei 0° bis – 2° Celsius zur Auspolymerisation belassen.

Am Mikrotom wurden in der Frontalebene 5µm Serienschnitte der Wirbelsäule geschnitten, auf Superfrost plus-Objektträger aufgebracht und mit 30 %igem Ethanol als sogenannte Streckflüssigkeit benetzt. Zum Schutz der Präparate wurden diese luftblasenfrei mit einer PVC-Folie (Kisolfolie) abgedeckt und mit fortlaufender Nummer versehen, um später eine bessere Zuordnung und Beurteilung zu ermöglichen. Die Objektträger wurden im Anschluss gestapelt und in der Schnittpresse unter senkrecht auf das Gewebe ausgeübten Druck bei + 40° Celsius im Brutschrank getrocknet.

3.5.3 Von Kossa Färbung

Die von Kossa Färbung dient der Darstellung des mineralisierten Knochengewebes der entsprechend vorbehandelten Proben (siehe oben), wobei auf indirektem Wege Calciumionen nachgewiesen werden. Die Silberionen (Ag^+) reagieren mit den Carbonat- und Phosphationen des Kalks und verdrängen hierdurch die Calciumionen aus ihren Verbindungen. Durch Lichteinwirkung (UV-Licht) werden die Silberionen zu

metallischen Silber reduziert und demzufolge als braun-schwarzer Niederschlag sichtbar.

Die Technovitschnitte wurden in einem ersten Schritt zunächst entplastet und zu diesem Zwecke für 20 Minuten in Xylol eingetaucht. Nach weiteren 20 Minuten in einer zweiten Xylollösung wurden die Wirbelsäulenschnitte für erneut 20 Minuten in 2-Methoxyethylacetat aufbewahrt, um im Anschluss für 10 Minuten in Aceton getränkt zu werden. Es folgte eine kurze, einmalige Spülung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und ein zweimaliges Waschen des nun technovitfreien Gewebes in Leitungswasser.

1.) Entplasten der Wirbelsäulenschnitte:

→ 1x Xylol I	je 20 min.
→ 1x Xylol II	je 20 min.
→ 1x 2-Methoxyethylacetat	je 20 min.
→ 1x Aceton	je 10 min.
→ 1x Aqua dest.	kurz spülen
→ 1x Leitungswasser I	kurz spülen
→ 1x Leitungswasser II	kurz spülen

Im zweiten Schritt begann die eigentliche Färbung des Gewebes mit 5 %iger Silbernitratlösung. Die Proben wurden dem UV-Licht ausgesetzt, um eine Reduktion der Silberionen zu erreichen. Nach 30 Minuten erfolgte ein kurzes, dreimaliges Waschen der Proben in Leitungswasser. Zur weiteren Reduktion des Silbers wurden die Wirbelsäulenschnitte für 2 Minuten in eine Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung gegeben. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen der Schnitte in Leitungswasser und die Überführung des Gewebes in eine 10 %ige Natriumthiosulfat-Lösung für insgesamt 5 Minuten, um eine Entfernung des überschüssigen Silbernitrats und eine Fixierung zu erreichen.

2.) Versilberung der Wirbelsäulenschnitte:

→ 5 % Silbernitrat (UV-Licht)	je 30 min.
→ 1x Leitungswasser I	kurz spülen
→ 1x Leitungswasser II	kurz spülen
→ 1x Leitungswasser III	kurz spülen
→ 1x Natrium-Formaldehyd	je 2 min.
→ 1x Leitungswasser I	kurz spülen
→ 1x Leitungswasser II	kurz spülen
→ 1x Leitungswasser III	kurz spülen
→ 1x 10 % Natriumthiosulfat	je 5 min.
→ 1x Leitungswasser I	kurz spülen

Der letzte Schritt umfasste die Entwässerungsphase für jeweils 2 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 80 %, 96 % und 2x 100 % Alkohol. Schließlich wurden die Schnitte für jeweils 5 Minuten in zwei weiteren Xylollösungen zur Entfettung eingetaucht.

3.) Entwässerung der Wirbelsäulenschnitte:

→ 1x 80% Alkohol	je 2 min.
→ 1x 96% Alkohol	je 2 min.
→ 1x 100 % Alkohol	je 2 min.
→ 1x 100 % Alkohol	je 2 min.
→ 1x Xylol II	je 5 min.
→ 1x Xylol III	je 5 min.

Die feuchten Schnitte wurden mit DPX-Kleber eingedeckelt.

3.5.4 Auswertung der gefärbten Schnitte

Die Auswertung der Schnitte erfolgte anhand von digitalen Fotos der gefärbten Lendenwirbelkörper mit dem Programm Image Pro Plus[®] 5.0 (Abb. 7a). Als entscheidender Parameter wurde die mineralisierte Fläche als Verhältnis der schwarz gefärbten Lendenwirbelkörperfläche zur gesamten Lendenwirbelkörperfläche bestimmt. Einbezogen wurden in diese Berechnungen auch die Procc. costales der Corpus vertebrae. Weiterhin wurden mit Hilfe des Programms der Trabekelabstand (in μm) und die Trabekeldicke (in μm) bestimmt. Der ermittelte durchschnittliche Trabekelabstand ergab sich hierbei als Mittelwert der Trabekelabstände von zehn benachbarten Trabekelpaaren je Lendenwirbelkörper (Abb. 7b). Ebenso ergab sich die durchschnittliche Trabekeldicke als Mittelwert der Trabekeldicken von zehn Knochenbälkchen (Abb. 7c). Die Trabekelanzahl (pro mm) ließ sich berechnen, indem mit Hilfe des Programms Image Pro Plus[®] ein Rechteck über den Wirbelkörper gelegt wurde und die darin enthaltenen Trabekel bestimmt wurden. Die Anzahl der gezählten Trabekel wurde entsprechend auf ein Millimeter umgerechnet. Als weiterer Parameter wurde die Kortikalisdicke (in μm) bestimmt. Hier entsprach das angewendete Verfahren dem zur Ermittlung der Trabekeldicke (Abb. 7d). Zuletzt erfolgte die Erfassung der Trabekelfläche, als Wert des Verhältnisses der gefärbten Trabekelfläche des Lendenwirbelkörpers zur gesamten Lendenwirbelkörperfläche, sowie die Erhebung der

Kortikalisfläche, welche sich aus dem Verhältnis der gefärbten Kortikalisfläche zur gesamten Lendenwirbelkörperfläche ergab.



Abb 7: (a) Lendenwirbelkörper einer zwölf Monate alten ITGA2^(-/-)-Maus (LWK 4). Die mineralisierte Fläche (*) wurde mittels Von Kossa Färbung schwarz gefärbt und im Verhältnis zur Gesamtfläche des Wirbelkörpers gesetzt. Hierbei wurden die Procc. costales des Corpus vertebrae in die Berechnung mit einbezogen. (b) Die Bestimmung des Trabekelabstandes (Tb.S) erfolgte durch Ermittlung des Mittelwertes der Abstände zwischen zehn benachbarten Trabekelpaaren. (c/d) Bezüglich der Bestimmung von Trabekeldicke (Tb.Th) und Kortikalisdicke (Ct.Th) wurde gleichermaßen verfahren.

3.6 Biomechanische Analyse

In der biomechanischen Analyse wurden Versuche zur Knochenstabilität unter Berücksichtigung verschiedener metabolischer Aktivitätszustände innerhalb des Knochens durchgeführt. Um die biomechanischen Eigenschaften der Oberschenkelknochen zu ermitteln, erfolgte die Belastung der Knochen von Wildtyp- und ITGA2^(-/-)-Mäusen auf Torsion bis zum Versagen.

Hierzu wurde eine speziell in den Fein- und Elektromechanischen Forschungswerkstätten des Universitätsklinikum Münster angefertigte Torsionstestmaschine verwendet, die unter anderem aus einem Drehgeber und einem Kraftaufnehmer bestand, welche beide auf einer Bodenplatte fixiert waren (Abb. 9). Kombiniert wurde die Torsionstestmaschine mit einem Materialprüfsystem (Abb. 10).

3.6.1 Einbettung der Proben

Das präparierte und tief gefrorene Femur wurde am Vorabend der Messung aus der Tiefkühltruhe entnommen und im Kühlschrank langsam auf + 4° Celsius aufgetaut. Am Tag der Messung wurde zunächst die Länge, sowie der transversale und sagittale Femurdurchmesser bestimmt. Bei frakturierten Knochen wurde ein besonderes Augenmerk auf die Kallusbildung am linken Oberschenkelknochen gelegt. Mögliche Besonderheiten wurden notiert. Im Anschluss erfolgte die vorsichtige Entfernung des während der Operation eingefügten Implantats. Im Weiteren wurde das distale Femurende im Einbettsockel fixiert. Hierzu wurde die Probe mit Hilfe der Stellschrauben der Spannvorrichtung mittig in den Einspannschlitten positioniert, wobei der die Kondylenflächen bedeckende Gelenkknorpel des Kniegelenks nach anterior ausgerichtet und auf eine achsengerechte, zentrale und senkrechte Stellung des Femur geachtet wurde (Abb. 8a). Im Anschluss wurde der Knochenzement im Verhältnis 2 Volumenteile Palacos Pulver und 1 Volumenteil Palacos Flüssigkeit gemischt und in den ersten Einbettsockel gegossen. Der Einbettsockel wurde schließlich in den Einspannschlitten fixiert, dergestalt, dass das distale Femurende in den Einbettsockel eintauchte. Nach 30 Minuten war der Knochenzement ausgehärtet. Das proximale Femurende wurde in einem letzten Schritt auf gleiche Art und Weise in dem Einbettsockel fixiert (Abb. 8b).

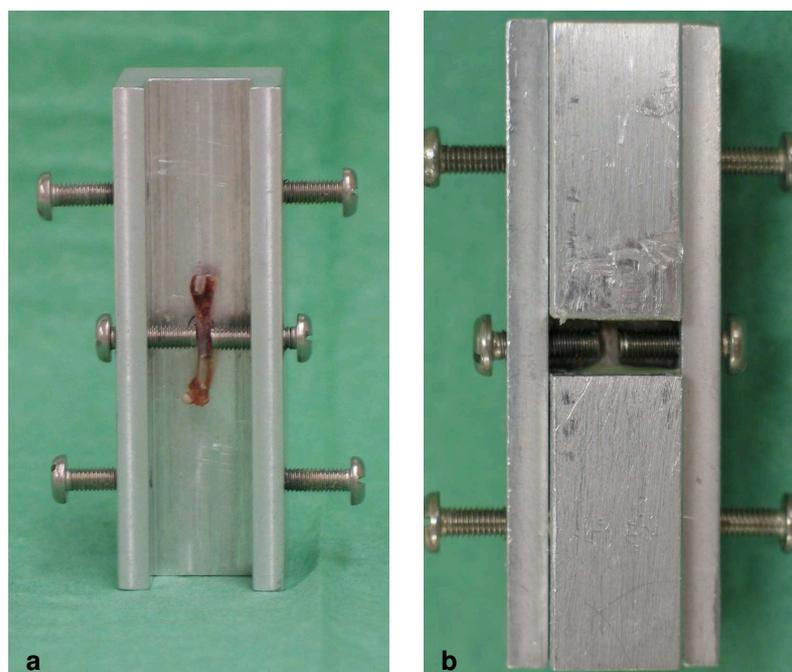


Abb. 8a/b: Einbettung der Knochenprobe.

3.6.2 Messvorgang mittels Materialprüfsystem LR5K Plus

Die Einbettsockel wurden wie in Abb. 9 dargestellt in die Torsionstestmaschine (Fein- und Elektromechanische Forschungswerkstätten am Universitätsklinikum Münster) zwischen Kraftaufnehmer und Drehgeber eingespannt, so dass die Längsachsen der Einbettsockel mit der Rotationsachse parallel verliefen. Durch eine axiale Vorlast von 0,4 N wurde ein gleichmäßiger Druck auf das Femur ausgeübt, wodurch die bei der torsionalen Testung infolge von Längenänderung auftretende Zugbelastung minimiert wurde. Im Anschluss wurde der zur Stabilisierung dienende Einspannschlitten entfernt.

Die Torsionstestmaschine wurde mit einer spindelgetriebenen Materialprüfmaschine kombiniert, deren Ausgangsposition bestimmt und fixiert wurde, und welche mit konstanter Geschwindigkeit (2mm/min) eine Kraft aufbrachte, die durch die Torsionstestmaschine in eine Drehbewegung umgewandelt wurde. Dies geschah über einen Hebelarm, der die Rotationsbewegung auf den zu prüfenden Knochen übertrug. Mit einem weiteren Hebelarm, der dem Kraftaufnehmer auflag, wurde am anderen Ende das Torsionsmoment gemessen (Abb. 10). Endpunkt des Versuchs war das vollständige Versagen der Knochenprobe.

3.6.3 Erfassung und Auswertung der biomechanischen Daten

Die Erfassung der Biomechanischen Daten erfolgte mit Hilfe des Kraftaufnehmers und des Drehgebers, welche über die PC Messelektronik (Spider8) mit dem Computer verbunden waren, wobei als Endpunkt der Messung das vollständige Versagen des Knochens festgelegt wurde. Die entstehende Kraft–Deformitätskurve mit dem entsprechenden Ergebnis von Torsionsmoment (in Nmm) und Torsionswinkel (in Bogenmaß) in Abhängigkeit von der Zeit wurde durch das Softwareprogramm Catman® 4.5 für Microsoft® registriert. Durch Verwendung von Microsoft Excel® wurden die entsprechenden Daten graphisch dargestellt, abgespeichert und der späteren Auswertung zugänglich gemacht. Hierzu wurde unter anderem eine speziell programmierte Excel-Matrix verwendet, in welche die zuvor erfassten Daten eingefügt wurden und mit deren Hilfe die torsionale Steifigkeit als Quotient aus ermitteltem maximalen Torsionsmoment und maximalen Torsionswinkel bestimmt wurde.

Im Rahmen der Analysen zur Frakturheilung wurden die Ergebnisse von maximalem Torsionsmoment, maximalen Torsionswinkel und der torsionalen Steifigkeit des

frakturierten linken Femurknochens jeweils in das Verhältnis mit dem nativen rechten Knochen gesetzt und in Prozent ausgedrückt, um intraindividuelle Unterschiede der Tiere einer Gruppe auszugleichen.

3.7 Datenanalyse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Office Excel® und Microsoft Office Power Point®. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von PASW® Version 18.0.0 für Windows durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde der Median \pm die Standardabweichung (STABW) bestimmt. Verwendet wurde hierbei grundsätzlich der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, da die Ergebnisse keiner Gauß'schen Normalverteilung folgten. Hierbei wurden die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen mit einer Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ ermittelt ($p \leq 0,01$ hoch signifikant).

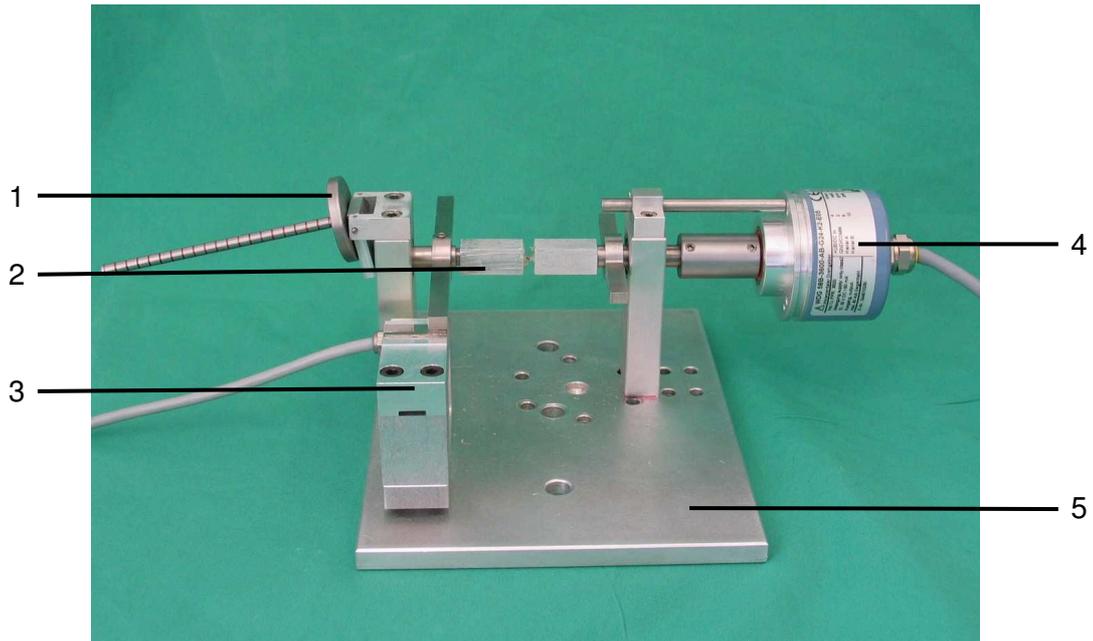


Abb. 9: Torsionstestmaschine. 1. Vorlast; 2. Einbettsocket gefüllt mit Palacos, welches den zu testenden Femurknochen in Position hält; 3. Kraftaufnehmer; 4. Drehgeber; 5. Bodenplatte; (Fein- und Elektromechanische Forschungswerkstätten am Universitätsklinikum Münster)

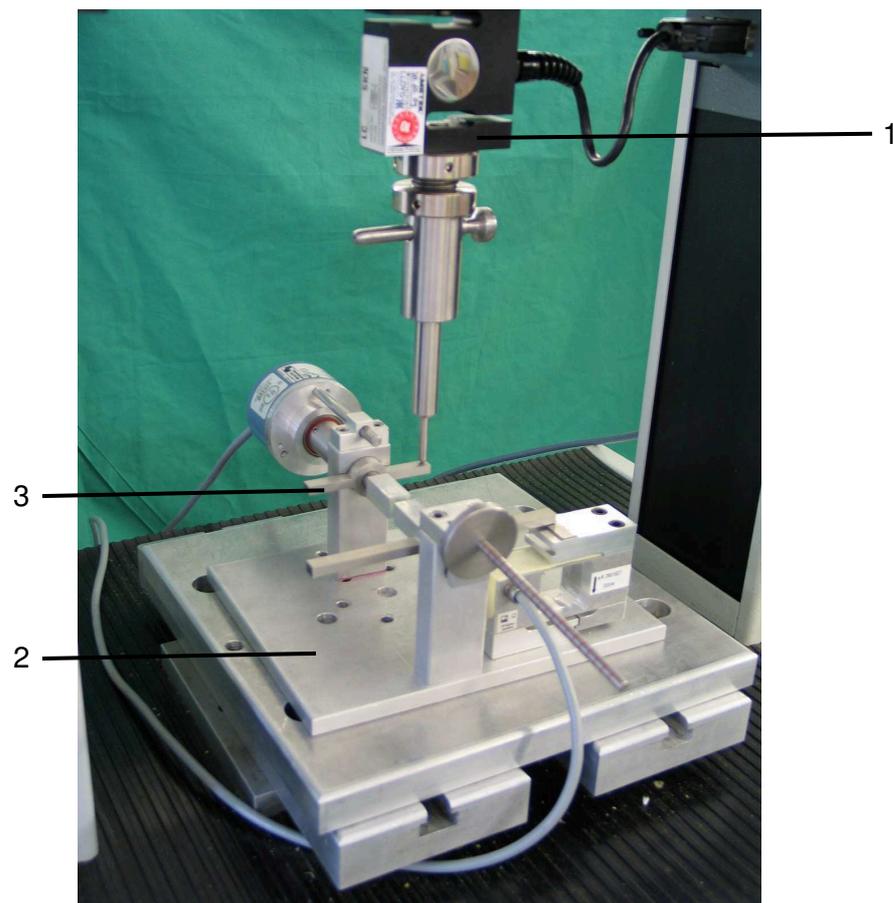


Abb. 10: Biomechanischer Versuchsaufbau: Kombination der Torsionstestmaschine mit dem Materialprüfsystem LR5K Plus. 1. Materialprüfsystem; 2. Torsionstestmaschine; 3. Hebelarm;

4 Ergebnisse

4.1 Klinische und Bildgebende Kontrolle der operierten Tiere

Postoperativ zeigte sich im anterior-posterioren Strahlengang die gewünschte Querfraktur des linken Femurschaftes (AO 32-A3.2) bei exakter Lage des intramedullären Kraftträgers. Die Aktivität der Tiere war zunächst reduziert und das operierte Bein wurde stark entlastet. In den folgenden klinischen Verlaufskontrollen, die in der ersten postoperativen Phase täglich, dann wöchentlich durchgeführt wurden, kam es bei allen Tieren zu einer steigenden Belastung des operierten Beins. Die radiologische Verlaufskontrolle am 14. postoperativen Tag wies darüber hinaus eine zunehmende Kallusbildung im Bereich der Frakturstelle bei weiterhin korrekter Lage des Implantats auf. Das Gangbild der Tiere glich wieder dem präoperativen Zustand. Zum Zeitpunkt der Tötung erschienen alle Tiere lebhaft und unauffällig.

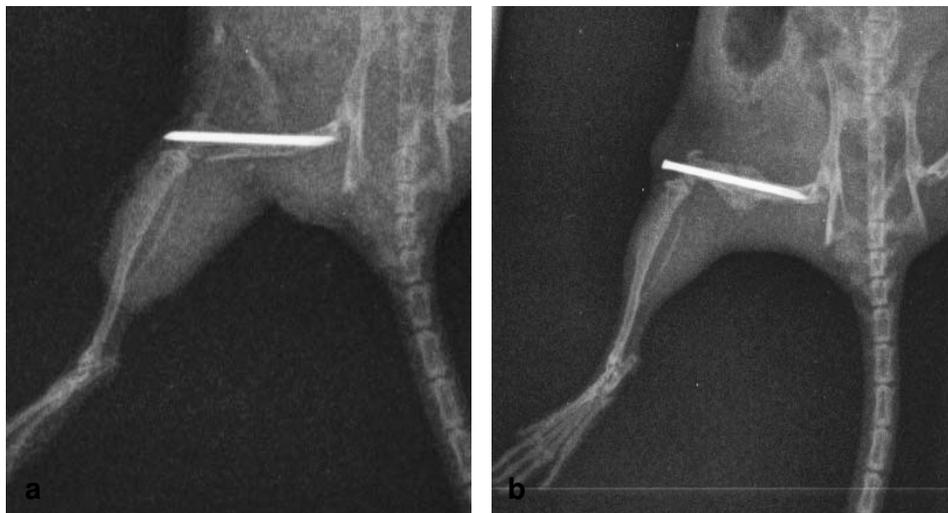


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der angefertigten Röntgenbilder (a-p Ebene). (a) Postoperatives Röntgenbild des linken Femur einer ITGA2^(+/+)-Maus (AO 32-A3.2). Als intramedullärer Kraftträger diente eine 23er Injektionsnadel. **(b)** Radiologische Verlaufskontrolle des frakturierten Femurschaftes 14 Tage postoperativ.

4.2. Untersuchungen zur nativen Knochenstruktur

In den histomorphologischen Untersuchungen erfolgte die Bestimmung von mineralisierter Fläche, Kortikalisfläche, und -dicke, sowie Trabekelfläche, -anzahl, -abstand, und -dicke der Lendenwirbelkörper von Wildtyp- und ITGA2^(-/-)-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten (Tab. 6), wodurch Veränderungen der Parameter in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf nachgezeichnet werden sollten. Das mineralisierte Gewebe der eingebetteten und zu 5µm dicken Serienschritten verarbeiteten Gewebeproben wurde durch die von Kossa Färbung dargestellt, so dass ein Vergleich der Knochenstruktur der beiden Genotypen durchgeführt werden konnte (Abb. 12).

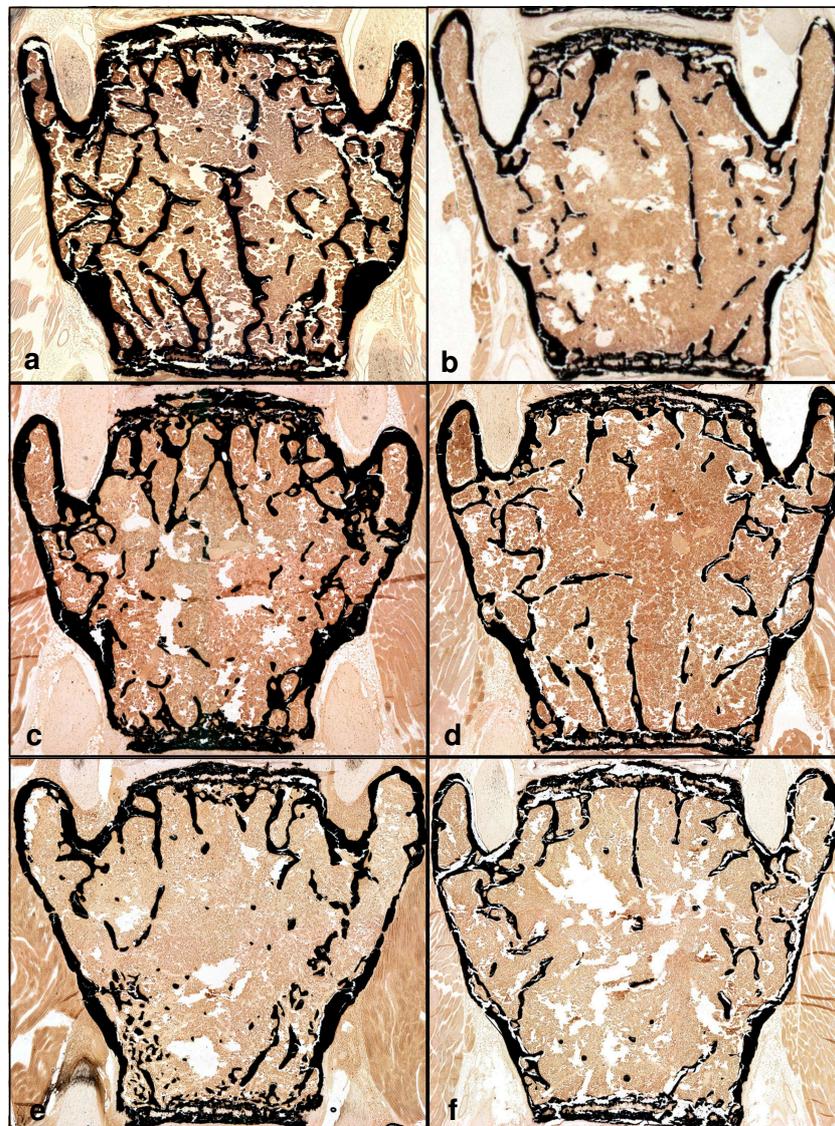


Abb. 12: Histomorphologische Frontalschnitte zur Charakterisierung des Knochenbaus von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen. Gezeigt sind repräsentative Schnitte nach von Kossa Färbung der LWK 4/5. **a)** 4 Monate alte Wildtyp-Maus. **b)** 4 Monate alte ITGA2^(-/-)-Maus. **c)** 12 Monate alte Wildtyp-Maus. **d)** 12 Monate alte ITGA2^(-/-)-Maus. **e)** 18 Monate alte Wildtyp-Maus. **f)** 18 Monate alte ITGA2^(-/-)-Maus

4.2.1 Mineralisierte Gewebefläche

Es konnte nachgewiesen werden, dass bei beiden Genotypen mit zunehmendem Alter der Versuchstiere eine niedrigere mineralisierte Fläche der Lendenwirbelkörper auftrat, ausgehend von einem Maximum in der jeweils jüngsten Altersgruppe (Abb. 13). Während sich für die Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt ein Median von $0,323 \% \pm 0,039$ berechnete, besaß die altersgleiche ITGA2^(-/-)-Gruppe einen Median von $0,257 \% \pm 0,035$. Die mineralisierte Fläche der Lendenwirbelkörper von jungen Knock-out Mäusen war damit hoch signifikant niedriger ($p < 0,003$). Mit fortschreitendem Alter kam es im Verlauf bei den Wildtyp-Mäusen zu einer stärkeren Abnahme der mineralisierten Gewebefläche als bei den Integrin α_2 -defizienten Mäusen. Es resultierte eine hoch signifikante ($p < 0,003$) Abnahme des Wertes bei den Wildtyp-Mäusen auf $0,241 \% \pm 0,035$ und eine weitere signifikante Verringerung ($p < 0,035$) der mineralisierten Lendenwirbelkörperfläche auf $0,212 \% \pm 0,041$. Im Gegensatz hierzu fiel der Medianwert mit $0,224 \% \pm 0,036$ in der mittleren ITGA2^(-/-)-Altersgruppe deutlich schwächer ab und blieb mit $0,221 \% \pm 0,033$ in der ältesten Knock-out Gruppe nahezu gleich bei bereits niedrigem Ausgangsniveau.

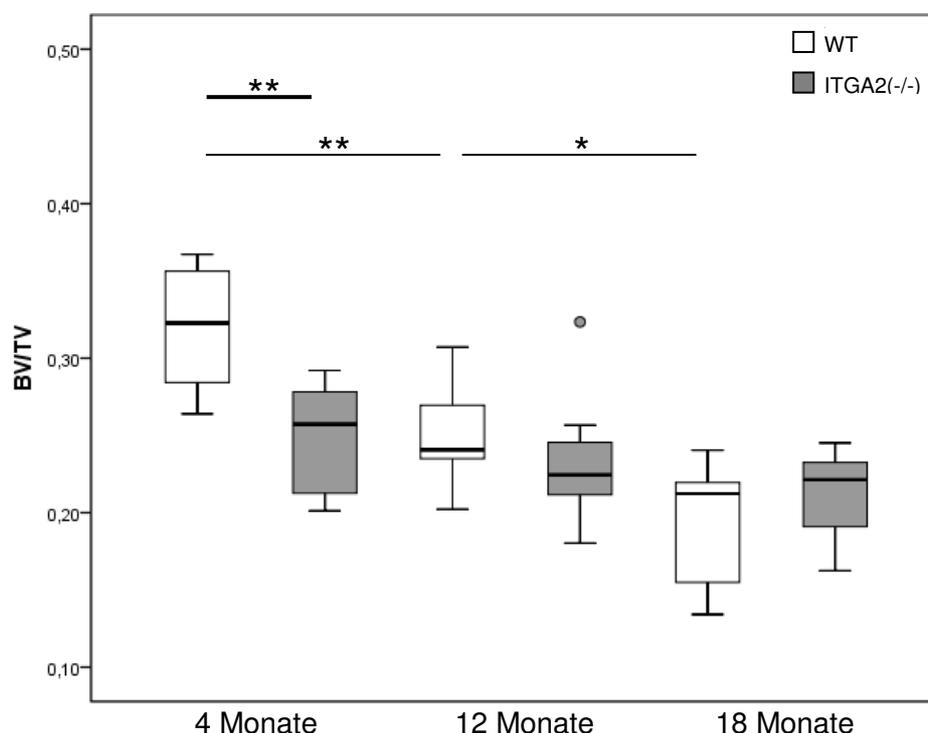
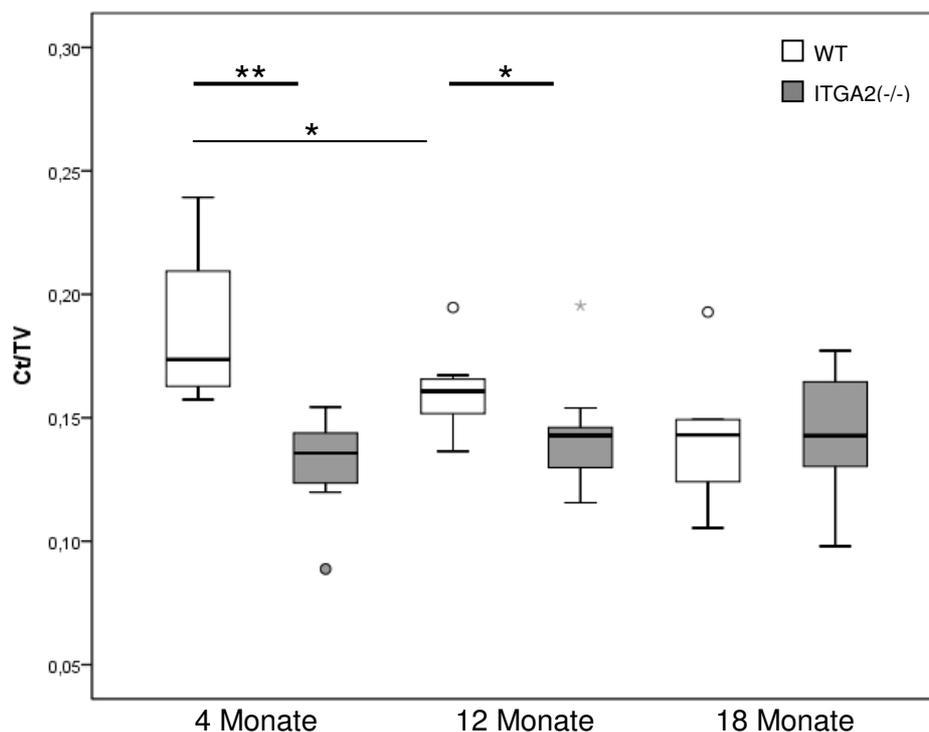


Abb. 13: Mineralisierte Gewebefläche der LWK 4/5 von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die angefertigten Frontalschnitte der Lendenwirbelkörper wurden mittels von Kossa Färbung gefärbt. Das Verhältnis von schwarz gefärbtem mineralisiertem Gewebe und gesamter Gewebefläche konnte anhand digitaler Fotos mit dem Programm Image Pro Plus® 5.0 quantitativ berechnet werden. Die Procc. costales der Wirbelkörper wurden in die Berechnung einbezogen. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.2.2 Kortikalisfläche

Die Kortikalisfläche erwies sich bei den vier Monate alten Wildtyp-Mäusen mit $0,173 \% \pm 0,029$ signifikant höher gegenüber der nachfolgenden Kontrollgruppe, deren Median um das ca. 0,9fache auf $0,161 \% \pm 0,018$ abnahm ($p < 0,043$) (Abb. 14). Ein erneuter Abfall des Wertes in der ältesten Wildtyp-Gruppe auf $0,143 \% \pm 0,029$ entsprach schließlich einem Minimum. Eine relativ konstante Kortikalisfläche im zeitlichen Verlauf, allerdings auf niedrigem Niveau, konnte für den Integrin α_2 -defizienten Genotyp festgestellt werden. Für die jüngsten ITGA2^(-/-)-Mäuse ergab sich ein Median von $0,136 \% \pm 0,020$. Einen nahezu identischen Wert besaßen mit $0,143 \% \pm 0,021$ und $0,143 \% \pm 0,028$ die beiden nachfolgenden Altersgruppen. Die Kortikalisfläche vier Monate alter ITGA2^(-/-)-Mäuse erwies sich hoch signifikant geringer gegenüber der Kortikalisfläche gleichaltriger Wildtyp-Mäuse ($p < 0,000$). Ein signifikanter Unterschied bestand darüber hinaus zwischen den Genotypen der mittleren Altersgruppe ($p < 0,036$).



4.2.3 Kortikalisdicke

Die jüngste Kontrollgruppe wies eine Kortikalisdicke von $73,15 \mu\text{m} \pm 13,38$ auf (Abb. 15). Während der Median in der mittleren Wildtyp-Gruppe auf $56,56 \mu\text{m} \pm 9,93$ abfiel, kam es in der ältesten Wildtyp-Gruppe zu einer Zunahme des Wertes auf $69,54 \mu\text{m} \pm 10,32$. Für die ITGA2^(-/-)-Mäuse ließ sich in den ersten beiden Altersgruppen eine konstante Kortikalisdicke von $63,83 \mu\text{m} \pm 8,32$ und $62,55 \mu\text{m} \pm 9,03$ feststellen. Eine Abnahme des Wertes auf $56,62 \mu\text{m} \pm 7,55$ trat in der ältesten Knock-out Gruppe auf. Tendenziell ergab sich eine niedrigere Kortikalisdicke in den beiden ersten ITGA2^(-/-)-Gruppen gegenüber den altersgleichen Kontrollgruppen.

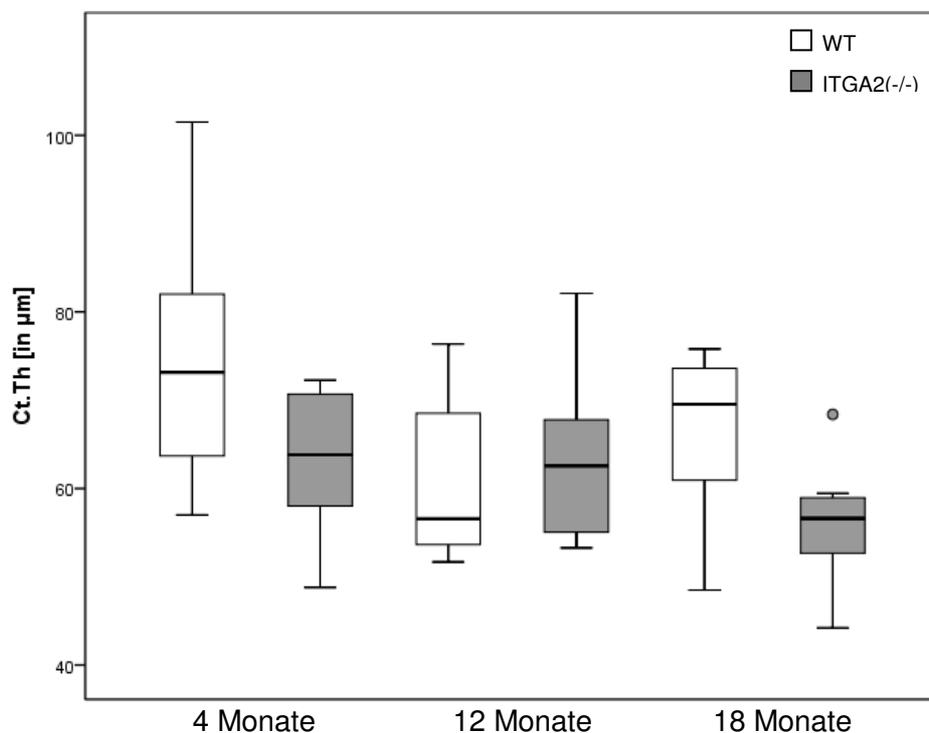


Abb. 15: Kortikalisdicke der LWK 4/5 von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die angefertigten Frontalschnitte der Lendenwirbelkörper wurden mittels von Kossa Färbung gefärbt. Die Kortikalisdicke an zehn unterschiedlichen Stellen der Substantia compacta eines Lendenwirbelkörpers wurde anhand digitaler Fotos mit dem Programm Image Pro Plus[®] 5.0 berechnet und hieraus als arithmetisches Mittel bestimmt. (Mann-Whitney-U-Test; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.2.4 Trabekelfläche

Eine inverse altersabhängige Beziehung konnte auch für die Trabekelfläche beobachtet werden (Abb. 16). Die maximale Trabekelfläche von $0,127 \% \pm 0,020$ bei den jüngsten Wildtyp-Mäusen nahm in den nachfolgenden Altersstufen dieses Genotyps hoch signifikant ab, zunächst um das 0,6fache auf $0,080 \% \pm 0,023$ ($p < 0,007$) und schließlich um das 0,7fache auf $0,056 \% \pm 0,020$ ($p < 0,008$). Für die ITGA2^(-/-)-Mäuse ergab sich ein Maximum von $0,123 \% \pm 0,025$ bei den vier Monate alten Tieren. Auch hier kam es im zeitlichen Verlauf zu signifikanten Verlusten von Trabekelfläche. Der Median betrug in der folgenden Altersgruppe $0,088 \% \pm 0,021$ ($p < 0,016$) und bei den ältesten Knock-out Tieren $0,070 \% \pm 0,011$ ($p < 0,036$). Es konnte jedoch zwischen den Genotyp-Gruppen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

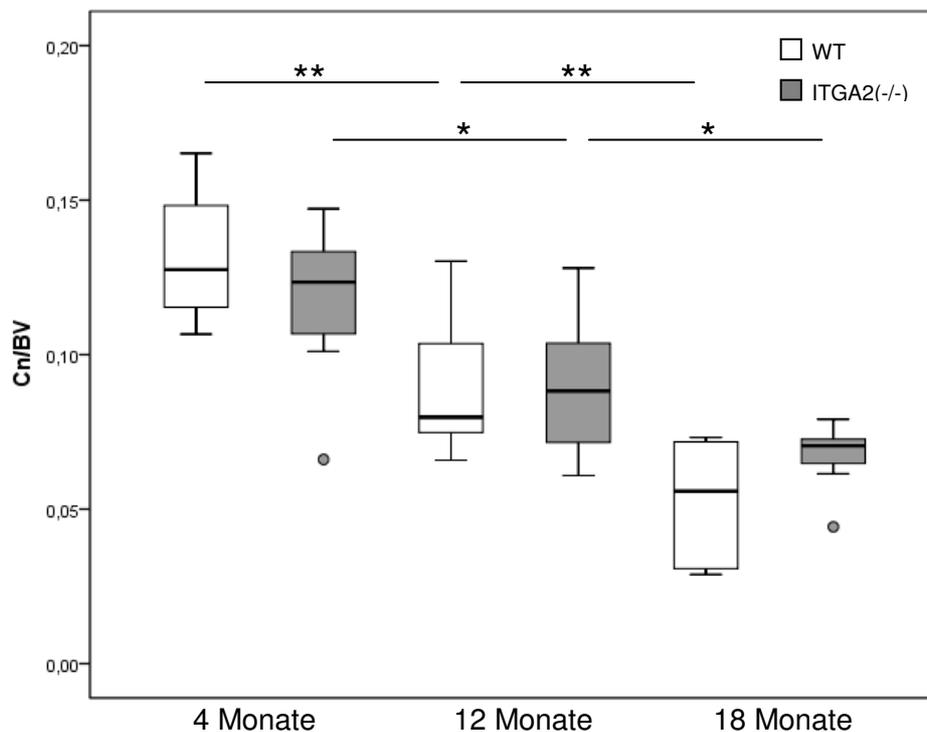


Abb. 16: Trabekelfläche der LWK 4/5 von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die angefertigten Frontalschnitte der Lendenwirbelkörper wurden mittels von Kossa Färbung gefärbt. Das Verhältnis von braun-schwarz gefärbter mineralisierter Trabekelfläche zur gesamten Gewebefläche konnte anhand digitaler Fotos mit dem Programm Image Pro Plus[®] 5.0 quantitativ berechnet werden. Die Procc. costales der Wirbelkörper wurden in die Berechnung einbezogen. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.2.5 Trabekelanzahl

Die Trabekelanzahl verringerte sich bei beiden Genotypen im zeitlichen Verlauf (Abb. 17). Für die Wildtyp-Gruppen konnte zunächst ein Median von 3,41 pro/mm \pm 0,43 erhoben werden. In der Folge reduzierte sich die Trabekelanzahl auf 2,59 pro/mm \pm 0,96 und erreichte durch eine ca. 0,5fache Abnahme ein Minimum von 1,28 pro/mm \pm 0,81. Eine Trabekelanzahl von 2,66 pro/mm \pm 0,53 konnte für die jüngsten ITGA2^(-/-)-Mäuse ermittelt werden. In den nachfolgenden Altersstufen der Knock-out Tiere fiel der Median auf 2,27 pro/mm \pm 0,44 und schließlich auf 1,94 pro/mm \pm 0,45, die Verringerung war jedoch im Altersverlauf sehr viel schwächer als bei den Kontrollgruppen. Die Trabekelanzahl junger Knock-out Tiere war hoch signifikant geringer im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen ($p < 0,000$).

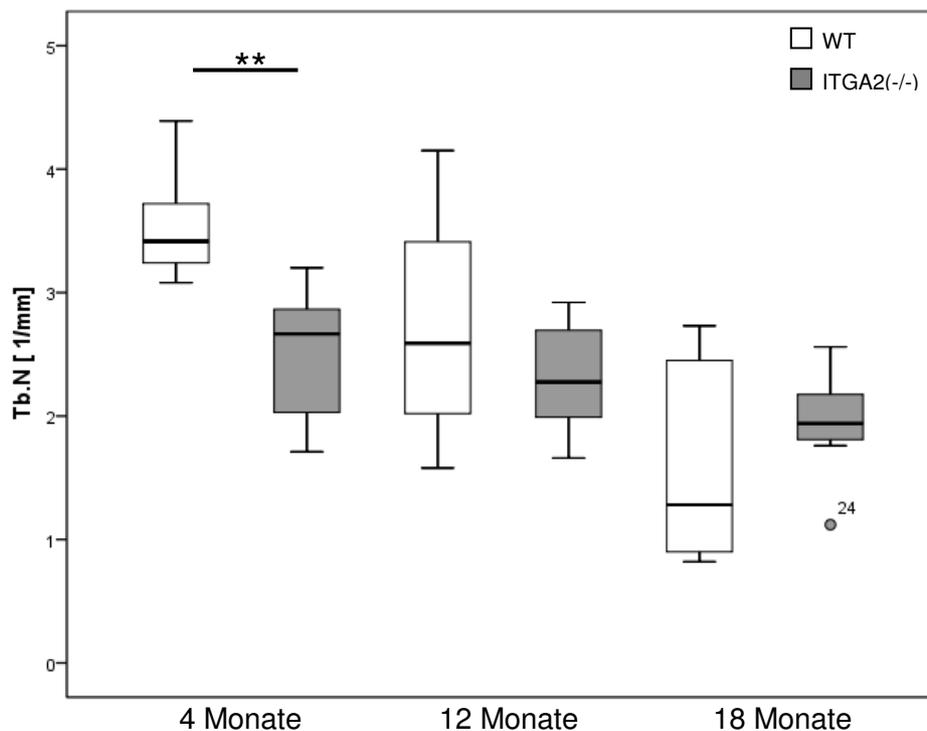


Abb. 17: Trabekelanzahl der LWK 4/5 von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die angefertigten Frontalschnitte der Lendenwirbelkörper wurden mittels von Kossa Färbung gefärbt. Die Trabekelanzahl innerhalb einer definierten Fläche des Lendenwirbelkörpers wurde anhand digitaler Fotos mit dem Programm Image Pro Plus[®] 5.0 gezählt und pro Millimeter umgerechnet. (Mann-Whitney-U-Test ** $p < 0,01$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.2.6 Trabekelabstand

Weiterhin zeigte sich bei den Wildtyp-Mäusen mit $163,89 \mu\text{m} \pm 19,07$ in der jüngsten und $181,42 \mu\text{m} \pm 29,48$ in der mittleren Gruppe ein vergleichbarer Trabekelabstand (Abb. 18). Dieser vergrößerte sich im Verlaufe hoch signifikant auf $275,53 \mu\text{m} \pm 23,51$ ($p < 0,001$). Die Knock-out Mäuse wiesen über alle drei Altersstufen gleich bleibende Trabekelabstände auf. Der Median betrug hier zunächst $225,07 \mu\text{m} \pm 24,03$ und blieb mit $221,55 \mu\text{m} \pm 31,35$ sowie $224,78 \mu\text{m} \pm 22,65$ in den Folgegruppen stabil. Es bestanden hoch signifikante Unterschiede zwischen vier ($p < 0,000$), als auch zwölf ($p < 0,005$) Monate alten Mäusen unterschiedlichen Genotyps, sowie ein signifikanter Unterschied zwischen ältester Kontrollgruppe und altersgleicher ITGA2^(-/-)-Gruppe ($p < 0,022$).

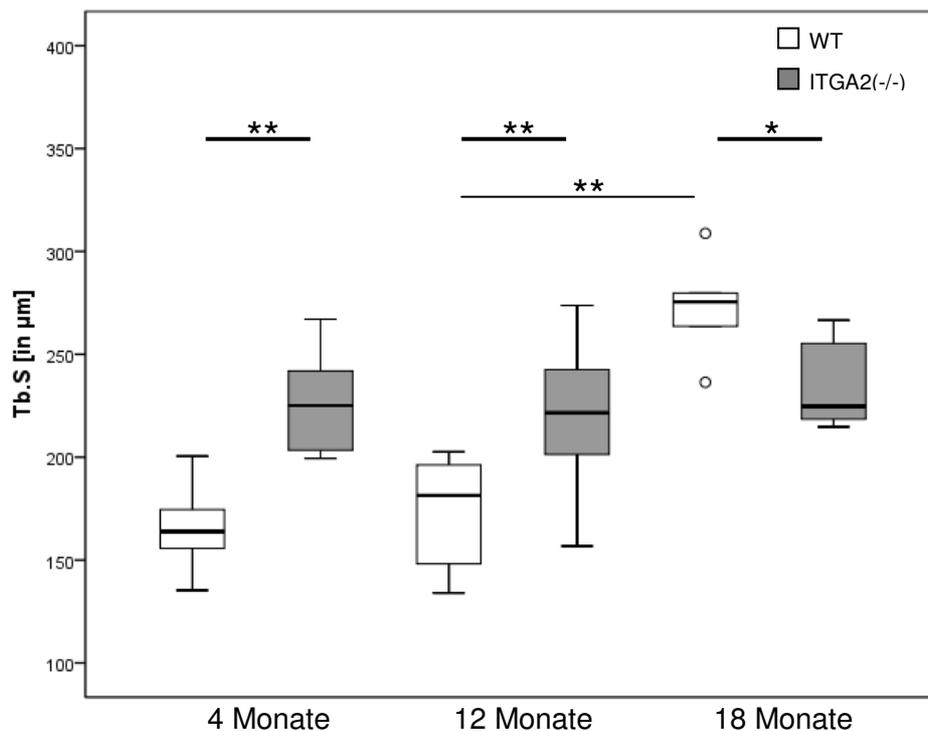


Abb. 18: Trabekelabstand der LWK 4/5 von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die angefertigten Frontalschnitte der Lendenwirbelkörper wurden mittels von Kossa Färbung gefärbt. Der Trabekelabstand zwischen insgesamt zehn Trabekelpaaren eines Lendenwirbelkörpers wurde anhand digitaler Fotos mit dem Programm Image Pro Plus[®] 5.0 berechnet und hieraus als arithmetisches Mittel bestimmt. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.2.7 Trabekeldicke

Die Integrin α_2 -defizienten Mäuse besaßen über alle Altersstufen einen Median von $39,75 \mu\text{m} \pm 0,5$ und eine Standardabweichung von $3,8 \pm 0,7$, was einer nahezu gleichen Trabekeldicke entsprach (Abb. 19). Der Median der Wildtyp-Mäuse lag zunächst bei $42,56 \mu\text{m} \pm 3,28$. Nach einer geringfügigen Abnahme auf $41,15 \mu\text{m} \pm 5,74$ stieg dieser signifikant auf $43,09 \mu\text{m} \pm 1,31$ in der ältesten Wildtyp-Gruppe an ($p < 0,035$).

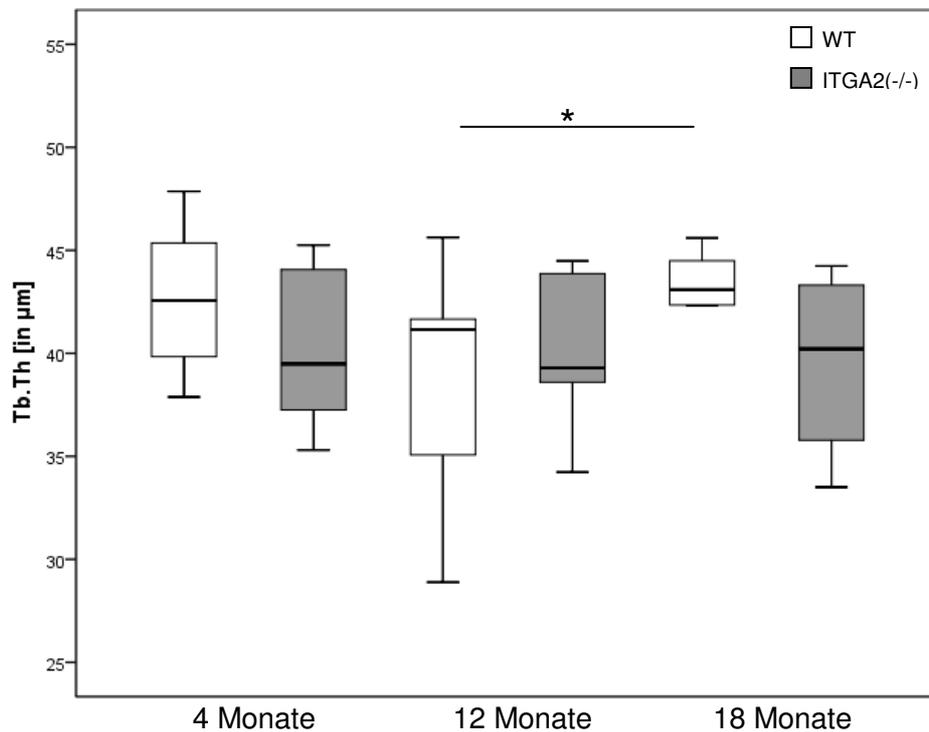


Abb. 19: Trabekeldicke der LWK 4/5 von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die angefertigten Frontalschnitte der Lendenwirbelkörper wurden mittels von Kossa Färbung gefärbt. Die Trabekeldicke von insgesamt zehn Knochenbälkchen eines Lendenwirbelkörpers wurde anhand digitaler Fotos mit dem Programm Image Pro Plus[®] 5.0 berechnet und hieraus als arithmetisches Mittel bestimmt. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$)

4.3 Untersuchungen zur nativen Knochenstabilität

In den Untersuchungen zu der nativen Biomechanik wurden die drei biomechanischen Parameter, maximales Drehmoment, maximaler Torsionswinkel und torsionale Steifigkeit der rechten Femurknochen von Wildtyp- und ITGA2^(-/-)-Mäusen im Torsionstest miteinander verglichen. Die Femura wurden hierbei Mäusen unterschiedlichen Alters entnommen (Tab. 6), so dass auch hier Veränderung im zeitlichen Verlauf dargestellt werden sollten. Bezüglich der Morphologie der Knochen beider Genotypen ließen sich keine besonderen Unterscheidungsmerkmale feststellen. Form und Länge der Femura gleicher Altersgruppen entsprachen sich, subjektive Abnormalitäten konnten insbesondere bei den Knochen der Knock-out Mäuse nicht beobachtet werden.

4.3.1 Maximales Drehmoment

Das maximale Drehmoment, also die Kraft, die zum Versagen des Knochens geführt hat, betrug bei den vier Monate alten Wildtyp-Mäusen 20,65 Nmm \pm 8,67 und stieg in der folgenden Altersgruppe auf 27,69 Nmm \pm 8,38 an (Abb. 20). Die aufzuwendende Kraft bis zum vollständigen Versagen des rechten Femur lag demnach um das 1,3fache höher. Eine Abnahme dieses Wertes auf 21,74 Nmm \pm 1,77 konnte in der ältesten Kontrollgruppe verzeichnet werden. Die Integrin α_2 -defizienten Mäuse zeigten zunächst ebenfalls einen Anstieg der Knochenstabilität in Abhängigkeit vom Alter. Während die Femura der Gruppe der vier Monate alten ITGA2^(-/-)-Mäuse ein maximales Drehmoment von 19,68 Nmm \pm 6,71 besaßen, stieg dieses in der folgenden Knock-out Gruppe hoch signifikant um das 1,5fache auf 29,05 Nmm \pm 6,50 an ($p < 0,001$). Mit 27,57 Nmm \pm 3,92 blieb der Wert in der ältesten ITGA2^(-/-)-Gruppe nahezu stabil. Es ergab sich ein tendenziell geringeres maximales Drehmoment für die jüngste Integrin α_2 -defiziente Gruppe gegenüber den gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen, wohingegen ein vergleichbarer Wert für die zwölf Monate alten Tiere beider Genotypen ermittelt werden konnte. Ein signifikanter Unterschied bestand zwischen den beiden ältesten Genotyp-Gruppen ($p < 0,014$).

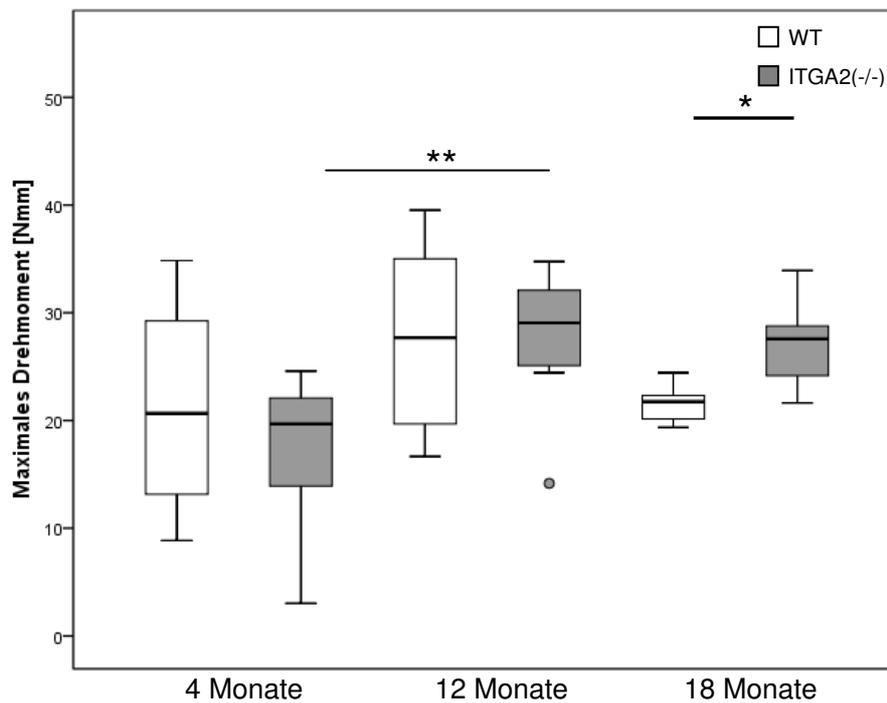


Abb. 20: Biomechanische Untersuchungen zum maximalen Drehmoment von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die rechten Femurknochen der Mäuse unterschiedlichen Genotyps und Alters wurden freipräpariert, in Knochenzement eingebettet und in die Torsionstestmaschine eingespannt. Durch Anlegen einer torsionalen Belastung bis zum Versagen des Knochens wurde das maximale Drehmoment bestimmt und mittels Boxplots dargestellt. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.3.2 Maximaler Torsionswinkel

Der maximale Torsionswinkel, der durch den Drehgeber gemessen wurde und ein Maß für die zurückgelegte Wegstrecke als Ausdruck der Torsion darstellte, kann als ein Parameter für die Flexibilität des Knochens betrachtet werden. Dieser nahm zunächst von $6,86^\circ \pm 3,25$ auf $8,03^\circ \pm 2,52$ bei den Wildtyp-Mäusen zu und erhöhte sich erneut um das ca. 1,6fache auf $12,83^\circ \pm 4,59$ bei den Femura der ältesten Kontrollgruppe (Abb. 21). Es kam zu einer Steigerung der Flexibilität der getesteten Wildtyp-Knochen über alle drei Altersstufen. Die Femura der ITGA2^(-/-)-Mäuse verzeichneten hingegen einen annähernd konstanten maximalen Torsionswinkel, dessen Wert um $7,00^\circ \pm 0,5$ schwankte. In der ältesten Integrin α_2 -defizienten Gruppe konnte im Vergleich zu den altersgleichen Wildtyp-Mäusen ein signifikant erniedrigter Wert festgestellt werden ($p < 0,013$).

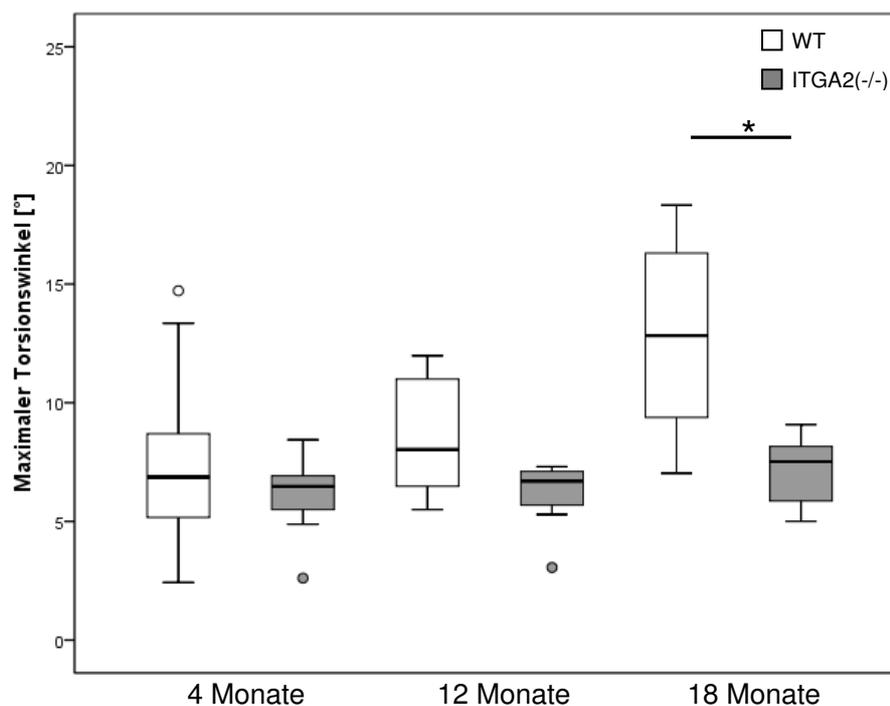


Abb. 21: Biomechanische Untersuchungen zum maximalem Torsionswinkel von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die rechten Femurknochen der Mäuse unterschiedlichen Genotyps und Alters wurden freipräpariert, in Knochenzement eingebettet und in die Torsionstestmaschine eingespannt. Durch Anlegen einer torsionalen Belastung bis zum Versagen des Knochens wurde der maximale Torsionswinkel bestimmt und mittels Boxplots dargestellt. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.3.3 Torsionale Steifigkeit

Die torsionale Steifigkeit ließ sich als Quotient aus dem zuvor registrierten maximalen Drehmoment und maximalen Torsionswinkel berechnen. Es ergab sich für die Femura der jüngsten Wildtyp-Gruppe zunächst ein Median von $4,18 \text{ Nmm/}^\circ \pm 1,24$, der im Weiteren mit $3,43 \text{ Nmm/}^\circ \pm 1,42$ zunächst stabil blieb und eine hoch signifikante Abnahme ($p < 0,002$) um das 0,5fache auf $1,72 \text{ Nmm/}^\circ \pm 0,74$ in der ältesten Kontrollgruppe zeigte (Abb. 22). Dem gegenüber war bei den $\text{ITGA2}^{(-/-)}$ -Tieren eine hoch signifikante Zunahme der torsionalen Steifigkeit der Femura zwischen der Gruppe der vier Monate und zwölf Monate alten Mäuse zu beobachten ($p < 0,000$). Der Wert stieg von $3,76 \text{ Nmm/}^\circ \pm 1,25$ in der jüngsten Knock-out Gruppe um das ca. 1,4fache auf $5,95 \text{ Nmm/}^\circ \pm 1,07$ in der nachfolgenden Altersgruppe an. Bei den Femura der ältesten $\text{ITGA2}^{(-/-)}$ -Tiere trat wiederum eine signifikante Verringerung des Median auf $4,80 \text{ Nmm/}^\circ \pm 1,26$ auf ($p < 0,038$). Weiterhin bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Altersgruppen beider Genotypen ($p < 0,015$), sowie ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den ältesten Genotyp-Gruppen ($p < 0,001$).

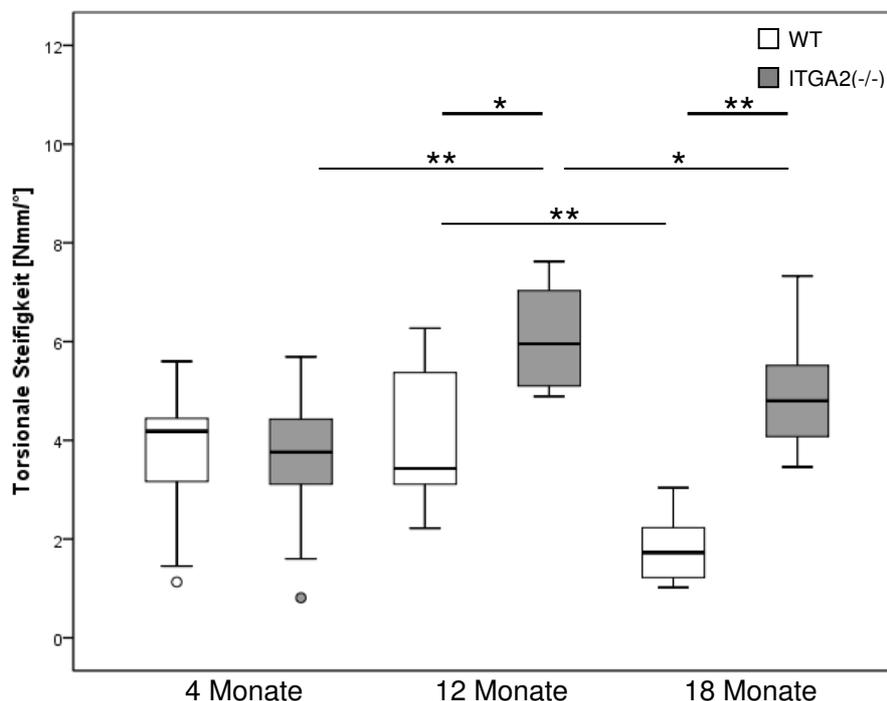


Abb. 22: Biomechanische Untersuchungen zur torsionalen Steifigkeit von Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen im zeitlichen Verlauf. Die rechten Femurknochen der Mäuse unterschiedlichen Genotyps und Alters wurden freipräpariert, in Knochenzement eingebettet und in die Torsionstestmaschine eingespannt. Durch Anlegen einer torsionalen Belastung bis zum Versagen des Knochens wurde die torsionale Steifigkeit bestimmt und mittels Boxplots dargestellt. (Mann-Whitney-U-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.4 Untersuchungen zur Knochenstabilität nach Frakturheilung

Die Versuche zur Knochenstabilität nach Frakturheilung wurden ausschließlich an vier Monate alten Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen durchgeführt. Der linke Femur wurde hierzu im Rahmen des oben beschriebenen Eingriffs frakturiert und nach einem standardisierten und definierten Zeitraum von 28 Tagen den biomechanischen Untersuchungen zugänglich gemacht. Um intraindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren einer Gruppe auszugleichen, wurden die ermittelten Werte von maximalem Drehmoment, maximalem Torsionswinkel und torsionaler Steifigkeit der linken Femurknochen mit den Werten der zugehörigen rechten Femurknochen gleicher Mäuse ins Verhältnis gesetzt und prozentual dargestellt. Nach 28 Tagen stellte sich eine ausgeprägte Kallusbildung dar, worin sich jedoch in Ausmaß und Stärke die beiden Tiergruppen nicht unterschieden.

4.4.1 Maximales Drehmoment

Die aufzuwendende Kraft bis zum vollständigen Versagen des linken Femur bei Torsion betrug im Verhältnis zur Gegenseite in der Kontrollgruppe $110 \% \pm 69$ (Abb. 23). Für die Gruppe der ITGA2^(-/-)-Mäuse ergab sich ein Median von $113 \% \pm 56$. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen konnte nicht erhoben werden. Im Vergleich zu den nicht frakturierten rechten Femura zeigte sich jedoch bei den linken Oberschenkelknochen der Wildtyp-Mäuse eine absolute Abnahme des maximalen Drehmoments von $20,65 \text{ Nmm} \pm 8,48$ auf $17,11 \text{ Nmm} \pm 7,29$. Auch die Knock-out Mäuse verzeichneten eine Verringerung dieses Wertes in absoluten Zahlen von $19,68 \text{ Nmm} \pm 6,71$ bei den nicht frakturierten rechten Femura auf $16,80 \text{ Nmm} \pm 7,84$ bei den linken Oberschenkelknochen (nicht abgebildet).

4.4.2 Maximaler Torsionswinkel

Der maximale Torsionswinkel lag in der Wildtyp-Gruppe bei $109 \% \pm 45$ und war mit $110 \% \pm 31$ in der Knock-out Gruppe identisch (Abb. 24). Es ergab sich in absoluten Zahlen eine vergleichbare Flexibilität der frakturierten linken Oberschenkel gegenüber der nicht frakturierten Gegenseite bei beiden Genotypen (nicht abgebildet).

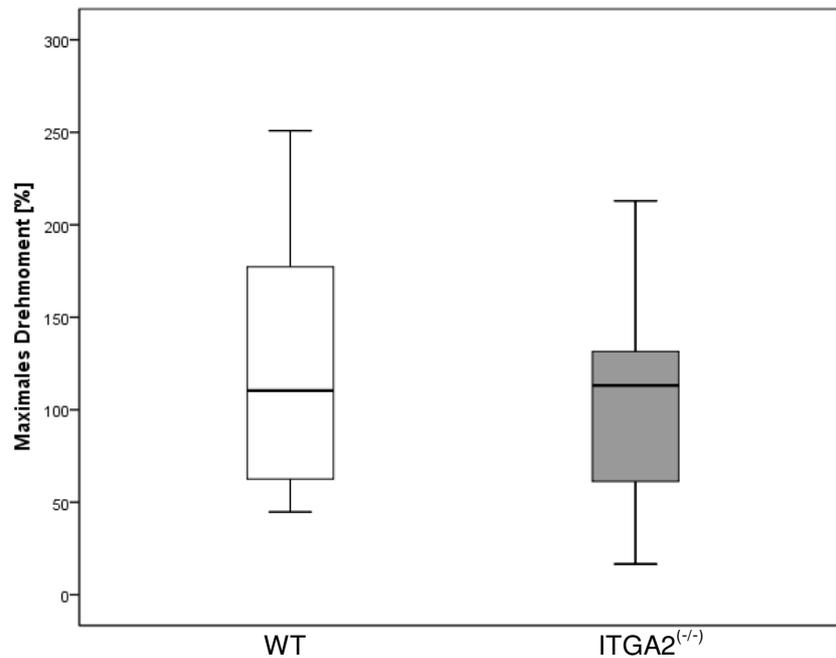


Abb. 23: Verhältnis des maximalen Drehmoments frakturierter linker Femura gegenüber der nicht frakturierten Gegenseite bei vier Monate alten Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen. Die linken Femura der WT und ITGA2^(-/-)-Mäuse wurden in einem operativen Eingriff frakturiert und nach einer Frakturheilungsphase von 28 Tagen auf ihre biomechanischen Eigenschaften analysiert. Es wurde das Verhältnis der ermittelten Werte von frakturierten linken und zugehörigem nicht frakturierten rechten Oberschenkelknochen bestimmt und prozentual dargestellt. (Mann-Whitney-U-Test)

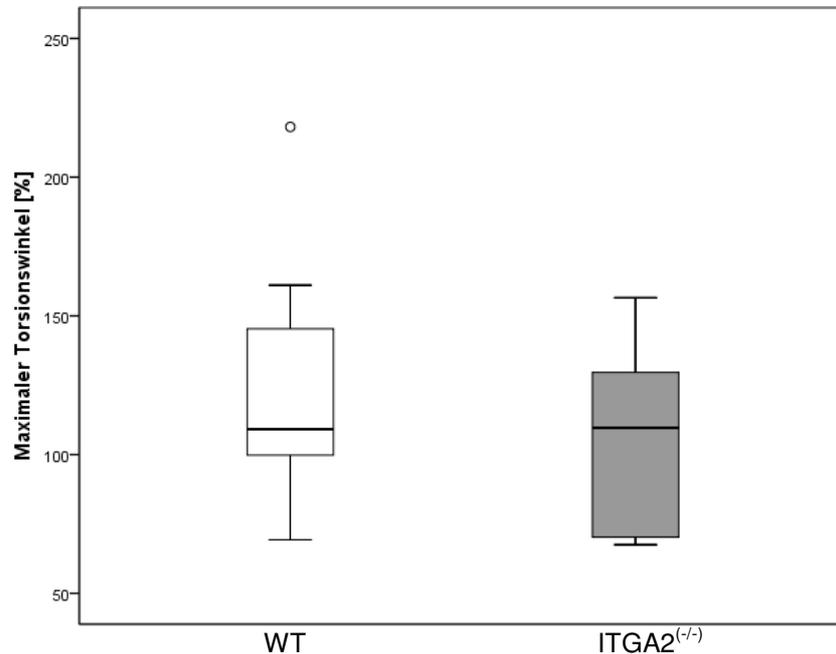


Abb. 24: Verhältnis des maximalen Torsionswinkels frakturierter linker Femura gegenüber der nicht frakturierten Gegenseite bei vier Monate alten Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen. Die linken Femura der WT und ITGA2^(-/-)-Mäuse wurden in einem operativen Eingriff frakturiert und nach einer Frakturheilungsphase von 28 Tagen auf ihre biomechanischen Eigenschaften analysiert. Es wurde das Verhältnis der ermittelten Werte von frakturierten linken und zugehörigem nicht frakturierten rechten Oberschenkelknochen bestimmt und prozentual dargestellt. (Mann-Whitney-U-Test; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand)

4.4.3 Torsionale Steifigkeit

Hinsichtlich der torsionalen Steifigkeit wurde für die Kontrollgruppe ein Median von 117 % \pm 99 bestimmt, was einem nahezu vergleichbaren Wert von 123 % \pm 56 in der ITGA2^(-/-)-Gruppe entsprach (Abb. 25). Die linken Femura beider Genotypen zeichneten sich gegenüber den jeweiligen unfrakturierten, rechten Oberschenkeln durch eine erhöhte torsionale Steifigkeit aus (nicht abgebildet). Es konnte eine signifikante Zunahme des Medians von 4,18 Nmm/° \pm 1,10 beim rechten Femur auf 5,23 Nmm/° \pm 1,73 beim linken Femur in absoluten Zahlen für die Wildtyp-Gruppe festgestellt werden ($p < 0,021$). Die torsionale Steifigkeit der rechten Femura der Knock-out Tiere stieg von 3,76 Nmm/° \pm 1,25 auf 4,98 Nmm/° \pm 2,02 auf der Gegenseite dieser Tiere an.

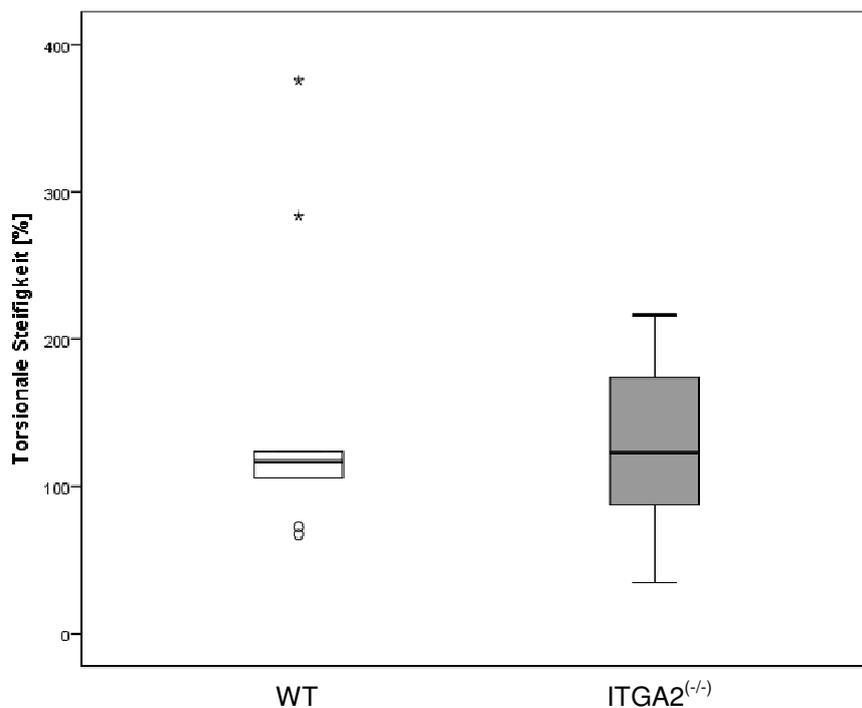


Abb. 25: Verhältnis der torsionalen Steifigkeit frakturierter linker Femura gegenüber der nicht frakturierten Gegenseite bei vier Monate alten Wildtyp- und Integrin α_2 -defizienten Mäusen. Die linken Femura der WT und ITGA2^(-/-)-Mäuse wurden in einem operativen Eingriff frakturiert und nach einer Frakturheilungsphase von 28 Tagen auf ihre biomechanischen Eigenschaften analysiert. Es wurde das Verhältnis der ermittelten Werte von frakturierten linken und zugehörigem nicht frakturierten rechten Oberschenkelknochen bestimmt und prozentual dargestellt. (Mann-Whitney-U-Test; o entspricht Wert zwischen 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand; * entspricht Wert außerhalb des 3fachen Interquartilsabstand)

5 Diskussion

5.1 Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den nativen Knochen im Verlauf des Alterungsprozesses

Diese Arbeit sollte die Unterschiede im nativen Knochen von Wildtyp- und Knock-out Mäusen infolge der Defizienz des Integrin $\alpha_2\beta_1$ zeigen und beleuchten, inwiefern es zu Veränderungen im Knochenstoffwechsel mit Auswirkungen auf die Knochenstruktur und Knochenstabilität kommt. Es konnte in der Histomorphologie nachgewiesen werden, dass eine geringere kalzifizierte Fläche der Lendenwirbelkörper vier Monate alter Integrin α_2 -defizienter Mäuse gegenüber gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen vorlag. Diese Verminderung war insbesondere auf eine reduzierte Kortikalisfläche zurückzuführen. Die Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in Bezug auf die Trabekelfläche fielen hingegen minimal aus. Gleiches konnte hinsichtlich der mineralisierten Fläche in Abhängigkeit des Genotyps bei den zwölf und achtzehn Monate alten Mäusen festgestellt werden. Des Weiteren gelang es, eine geringere Trabekelanzahl im Knochen junger Integrin α_2 -defizienter Tiere, sowie einen erhöhten Trabekelabstand im Knochen der ersten beiden Altersgruppen dieser Tiere zu belegen. Es wurde deutlich, dass die altersabhängige Abnahme der Trabekelfläche von Integrin α_2 -defizienten Mäusen eine Folge der zunehmend geringeren Trabekelanzahl im alternden Knochen ist, da sowohl die Trabekeldicke, als auch der Trabekelabstand über alle Altersgruppen dieser Tiere annähernd konstant blieben. Interessanterweise ließen sich bei nahezu allen untersuchten Parametern (BV/TV, Ct/TV, Cn/TV, Tb.N, Ct.Th) ausgehend von einem anfänglich niedrigeren Ausgangswert wesentlich schwächere und langsamer abnehmende bzw. relativ stabile altersabhängige Parameterwerte für die Knock-out Mäuse aufzeigen. Hingegen wiesen die Wildtyp-Tiere eine stärkere und schnellere altersabhängige Abnahme der Werte auf. Eine gegenteilige Entwicklung konnte in Analogie hierzu für den Trabekelabstand (Tb.S) beobachtet werden.

Die Ergebnisse offenbarten demzufolge eine veränderte Knochenstruktur bei den Knock-out Mäusen, die vereinbar mit Eigenschaften und histologischem Bild einer senilen Typ II-Osteoporose waren. Die Charakterisierung dieses Osteoporose-Typs durch einen Verlust von kompakter und spongiöser Knochenmasse spiegelt sich in einem erniedrigten Ausgangswert der Kompakta bei den vier Monate alten Integrin α_2 -

defizienten Tieren wieder, der mit einem spongiösen Verlust von Knochen im fortschreitendem Alter assoziiert war. Diese Beobachtung deutet auf das Auftreten einer frühen Störung der Mineralisierung von Extrazellulärer Knochenmatrix hin und unterstützt die Erkenntnisse von Xiao *et al.* (1998) sowie Mizuno *et al.* (2000) über eine Einbindung des Integrin $\alpha_2\beta_1$ in diese Prozesse. Den beiden Arbeitsgemeinschaften gelang die Induktion der Reifung von Osteoblasten und der Genexpression in Abhängigkeit von der Interaktion des Integrin $\alpha_2\beta_1$ mit dem Kollagen I. Das fibrilläre Kollagen I bildet mit 80 % den überwiegenden Anteil der organischen Knochenmatrix aus und besitzt eine besonders hohe Affinität zum Integrin $\alpha_2\beta_1$. Im Gegensatz zu dieser Arbeit trat allerdings bei Xiao *et al.* (1998) und Mizuno *et al.* (2000) durch Blockade der Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern eine ausgeprägte Inhibierung der Mineralisierung von Extrazellulärer Matrix als Endpunkt dieser Zelldifferenzierung in den untersuchten Zellkulturen auf.

Das Modelling und Remodelling des Knochens modifiziert die Größe und Form, als auch die interne Architektur des Knochens durch An- und Abbau von Knochen an der periostalen, endostalen und trabekulären Oberfläche. Während der Wachstumsphase überwiegt die Zunahme von knöcherner Substanz. Während des Alterns tritt eine Abnahme von knöcherner Substanz auf. Der Gewinn und Verlust von Knochen in den verschiedenen Lebensphasen wird dabei entscheidend durch die Remodelling-Rate beeinflusst (Seeman und Delmas, 2006). Boivin *et al.* (2002) konnten dies an humanen iliakalen Knochenproben beweisen und beschrieben den Knochenumsatz als biologische Determinante der Mineralisierung. Dabei gilt, je höher die Remodelling-Rate, desto positiver die Knochenbilanz im Wachstum und desto negativer die Knochenbilanz im Alterungsprozess. Umgekehrt besteht bei geringerer Remodelling-Rate ein umso verringerter knöcherner Gewinn in Kindheit und Adoleszenz und ein umso verminderter knöcherner Verlust im Alter. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen deshalb eine Abnahme der Remodelling-Rate bei den Integrin α_2 -defizienten Mäusen vermuten. Die niedrigeren Ausgangswerte bei den jungen Knock-out Mäusen könnten auf einen reduzierten Knochenanbau im Wachstum hinweisen, während der Verlauf der Werte in den weiteren Altersgruppen der Integrin α_2 -defizienten Tiere auf einen geringen Knochenabbau im Alter hindeuten könnte. Dass der Ausfall des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor zur Abnahme des Kollagen-Remodelling führt, stellte bereits Phillips (2005) in seinen Versuchen fest. Kundu *et al.* (2009) belegten unter anderem den Einfluss des Remodelling der Extrazellulären Matrix infolge *de novo* Synthese von extrazellulären

Proteinen auf die osteogenetische Differenzierung von multipotenten mesenchymalen Stammzellen, in deren Prozess sich erhöhte Expressionsmuster für Integrin $\alpha_2\beta_1$ ergaben. Die Remodelling Rate und das Integrin $\alpha_2\beta_1$ scheinen demnach eng miteinander verknüpft zu sein.

In dieser Arbeit war ein Nachweis von mineralisiertem Knochengewebe in den Lendenwirbelkörpern der Knock-out Mäuse durch die von Kossa Färbung möglich. Dies entsprach weiteren in unserem Labor erhobenen Ergebnissen, in welchen ebenfalls eine Mineralisierung der Matrix durch isolierte Integrin α_2 -defiziente Osteoblasten erfolgte (Hidding, 2009). Gleichzeitig wichen die Resultate in der vorliegenden Arbeit deutlich von den Studien der Arbeitsgemeinschaften um Xiao *et al.* (1998) und Mizuno *et al.* (2000) ab, in welchen ein stark ausgeprägter inhibierender Effekt auf osteoblastische Markerproteine mit vermehrter Abnahme der Mineralisierung von Extrazellulären Matrix infolge Unterbrechung der Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Kollagen I Wechselwirkung auftrat. Die Begründung könnte in einem Ausgleich des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Verlustes auf Gewebesebene liegen. Der ohnehin subtile Phänotyp der α_2 -defizienten Maus erweckt den Verdacht der Kompensation dieses Integrins in spezifischem Gewebe, so dass dessen Funktion möglicherweise durch andere Integrine erfüllt wird (Mercurio, 2002). Diese umfassen, unter Berücksichtigung der in zahlreichen Studien nachgewiesenen Bedeutung der Interaktion von Integrin und Kollagen im Knochenstoffwechsel, mit $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ und $\alpha_{11}\beta_1$ vier weitere Kollagen-bindende Rezeptoren der Familie. Die Rezeptoren unterscheiden sich in ihren Bindungsaffinitäten gegenüber kollagenen Proteinen und lösen dadurch verschiedene Signalwege aus (Langholz *et al.*, 1995; Riikonen *et al.*, 1995; Heino, 2000). Wenn allerdings Integrin $\alpha_2\beta_1$ für die Mineralisierung der Extrazellulären Knochenmatrix verantwortlich ist, müssten die durch dieses Protein vermittelten Signalwege, basierend auf Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) mit nachfolgender Stimulation der *Extrazelluläre-Signal-Regulierende Kinase* (ERK) und verminderter Expression von TGF- β Rezeptoren an der Zelloberfläche der Osteoblasten (Takeuchi *et al.*, 1997), anderweitig ausgelöst werden. Ein solcher Nachweis gelang Chaudhary *et al.* (1997), als auch Klees *et al.* (2005). Letzterer zeigte dies anhand einer Integrin $\alpha_3\beta_1$ -vermittelten Adhäsion von humanen mesenchymalen Stammzellen an Laminin-5 und wurde durch Salaszyk *et al.* (2007) in seinen Erkenntnissen bestätigt. Die gleiche, gemeinsame Endstrecke in allen unterschiedlichen Studien besteht hierbei in der

Aktivierung des ERK/MAPK Signalwegs, der offenbar notwendig ist für die Mineralisierung der Knochenmatrix (Lai *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit des Knochens, Frakturen abzuwenden, wird durch die Knochenmasse, Knochenqualität (Form und Mikroarchitektur) und intrinsischen Eigenschaften des Knochens bestimmt (Abb. 2). Die knöcherne Widerstandsfähigkeit kann mittels zahlreichen verschiedenen biomechanischen Parametern charakterisiert werden, wobei jeder gemessene Parameter eine andere Eigenschaft des Knochens widerspiegelt (Turner *et al.*, 2006). Die Knochenmasse korreliert mit der Steifigkeit (Bouxsein, 2005), die in enger Beziehung zur Mineralisierung steht. Es ergab sich in den weiteren biomechanischen Versuchen eine erhöhte torsionale Steifigkeit der Femura zwölf Monate alter Integrin α_2 -defizienter Mäuse gegenüber gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. Ebenso konnte eine Zunahme der torsionalen Steifigkeit der Femura der ältesten Knock-out Tiere gegenüber den altersgleichen Kontroll-Tieren nachgewiesen werden. Einerseits beruhte dies auf einem höheren maximalen Drehmoment, besonders in der ältesten Knock-out Gruppe. Andererseits ergab sich ein geringerer maximaler Torsionswinkel bei den Integrin α_2 -defizienten Tieren. Dieser blieb über alle Altersgruppen dieses Genotyps nahezu konstant, wohingegen die Wildtyp-Mäuse einen zunehmenden altersabhängigen Anstieg des maximalen Torsionswinkels erfuhren.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche erschließt sich erneut eine Abnahme der Remodelling Rate. Dies ergibt sich als Umkehrschluss aus einem gesteigerten Frakturrisiko bei einer Zunahme der Remodelling Rate, was durch verschiedene Faktoren verursacht wird: Erstens resultiert eine vermehrte Resorption von altem, dicht mineralisiertem Knochen mit einem Ersatz durch jungen, schwach mineralisierten Knochen in eine Reduktion der Steifigkeit des Knochens. Dies bewirkt eine vermehrte Flexibilität und Biegsamkeit des Knochenmaterials, so dass normalen Belastungen nicht standgehalten werden kann und eine frühzeitige Fraktur auftritt. Zweitens bleiben ausgehöhlte Resorptionsstellen zeitweise ungefüllt, infolge der verzögerten Initiation und langsameren Durchführung der Formation. Da die auftretenden Kräfte nicht mehr adäquat verteilt werden können, bilden sich Stellen konzentrierter und fokussierter Belastungen im Knochen aus. Diese Stellen sind prädisponierend für Mikroschäden. Drittens verschlechtert erhöhtes Remodelling die Isomerisation und Reifung von Kollagen, wodurch erneut die Brüchigkeit des Knochens herauf gesetzt wird, vermutlich

durch Veränderung der Vernetzungen zwischen benachbarten Kollagenfibrillen (Seeman, 2006). Die erhöhte torsionale Steifigkeit bei den beiden älteren Knock-out Gruppen könnte Hinweis gegenteiliger Prozesse sein und insofern eine vermehrte Widerstandsfähigkeit des Knochens erklären.

In dieser Arbeit zeigte sich ein niedriger und über alle Altersgruppen nahezu konstanter maximaler Torsionswinkel bei den Integrin α_2 -defizienten Mäusen. Die zum Ausdruck gebrachte verminderte Flexibilität des Knochens bereits im Alter von vier Monaten könnte Folge des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptorverlustes sein, der mit Kollagen I, dem Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, interagiert und welches für eben diese flexiblen Eigenschaften des Knochens verantwortlich ist. Phillips (2005) beschrieb eine synergistische Wirkung infolge gleichzeitiger Anwesenheit der Aktivität von Matrix Metalloproteinasen und Integrin $\alpha_2\beta_1$, so dass ein verbessertes und erweitertes Matrix-Remodelling auftrat, welches größer war als die Summe des jeweiligen individuellen Beitrags der entsprechenden Einzelaktivität der Proteine. Der Verlust des Zelladhäsionsmoleküls mit Ausfall der Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Kollagen I Interaktion könnte demzufolge eine verminderte Matrix Metalloproteinase Aktivität hervorrufen, wodurch das Remodelling der organischen Knochenmatrix geringer und infolgedessen die Flexibilität des Knochens reduziert ist. Ein Zusammenhang zwischen Integrin $\alpha_2\beta_1$ und Matrix Metalloproteinasen konnten auch die Arbeitsgemeinschaften um Langholz *et al.* (1995) sowie Riikonen *et al.* (1995) nachweisen, welche den Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptor als positiver Regulator der Kollagenase 1 (MMP-1) identifizierten. Wenngleich die MMP-1 in murinen Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, ist dennoch die Existenz eines vergleichbaren Proteins mit ähnlicher Wechselwirkung zum Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Molekül anzunehmen. Schiro *et al.* (1991) gelang der Nachweis, dass die Reorganisation sowie die Kontraktion von Kollagen-Matrix durch Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelt und beeinflusst wird.

Die histomorphologischen und biomechanischen Versuche zum nativen Knochen im Alterungsprozess weisen vorwiegend übereinstimmende und sich aufeinander beziehende Ergebnisse auf. Die Korrelation bezüglich der Abnahme der Remodelling-Rate wird besonders deutlich. Im Gegensatz hierzu widersprechen sich die Daten der mineralisierten Gewebefläche der Lendenwirbelkörper und der torsionalen Steifigkeit der Oberschenkelknochen von vier Monate alten Tieren. Die deutliche Differenz zwischen den Genotypen in der mineralisierten Gewebefläche müsste sich in einer hochgradigen unterschiedlichen torsionalen Steifigkeit äußern (Hernandez, 2008). Dies

konnte allerdings nicht beobachtet werden. Die Steifigkeit repräsentiert die Mineralisierung des Knochens (Turner *et al.*, 2006) und steht in einer nicht-linearen Beziehung zu der trabekulären Knochendichte, dessen Abnahme um 25 % eine prognostizierte Verringerung der Steifigkeit und trabekulären Stabilität um 44 % hervorrufen würde (Bouxsein, 2005). Der Widerspruch in den Daten könnte durch die Verwendung verschiedener Knochen erklärt werden. Remodelling erfolgt an der Knochenoberfläche. Der trabekuläre Wirbelkörper besitzt mehr Oberflächen als der kortikale Femur. Da mehr Remodelling-Stellen pro Volumen-Einheit im spongiösen Wirbelkörper als im kompakten Femurschaft vorhanden sind, unterliegt ein größerer Anteil des in der Histomorphologie verwendeten spongiösen Knochens diesem Prozess (Parfitt, 1983). Es resultiert folglich stets ein im Vergleich zum trabekulären Knochen erniedrigtes Remodelling im kortikalen Knochen, so dass der deutliche Unterschied hinsichtlich der histomorphologisch bestimmten mineralisierten Gewebefläche und der biomechanisch ermittelten torsionalen Steifigkeit erklärt werden könnte. Der weitere altersabhängige Verlauf der abnehmenden, mineralisierten Gewebefläche bei den Wildtyp-Mäusen spiegelt sich treffend in der zunehmend verringerten torsionalen Steifigkeit in den höheren Altersgruppen wieder. Die mineralisierte Gewebefläche der Integrin α_2 -defizienten Tiere stagniert im Verlauf, was in Diskrepanz zu der gesteigerten torsionalen Steifigkeit in den nachfolgenden Altersstufen steht. Die Abweichung der Daten könnte erneut in der Verwendung verschiedener Knochen begründet liegen.

In weiteren Studien könnte die Remodelling Rate im Knochen von Integrin α_2 -defizienten Tieren detaillierter untersucht werden. Die Formation von Knochen könnte durch Fluoreszenzfarbstoffe (Tetrazykline) markiert und mikroskopisch dargestellt werden. Dies würde zusätzliche Rückschlüsse auf veränderte Remodelling Prozesse in der Knock-out Maus erlauben. Ein Ausgleich des Verlustes von Integrin $\alpha_2\beta_1$ durch andere Rezeptoren könnte durch die Ermittlung von Expressionsmustern aufgedeckt werden. Eine Zunahme in der Genexpression dieser Rezeptoren würde eine Kompensation des Integrin $\alpha_2\beta_1$ bedeuten. Interessant wäre auch eine Bestimmung des qualitativen und quantitativen Knochenmaterials der Knock-out Mäuse. Es würde eine Aufklärung über die genaue Knochenzusammensetzung von Knock-out Tieren ermöglichen und Abweichungen aufzeigen. Einen biomechanischen Beitrag könnte diesbezüglich auch die Berechnung der Belastbarkeit des Knochens leisten, welche durch die kollagene Phase verliehen wird (Wang *et al.*, 2001). Die aufzubringende

Energie bis zum Versagen des Knochens wird durch das Kollagen-Netzwerk stärker beeinflusst als durch die Steifigkeit, was zu Auswirkungen auf die Zerbrechlichkeit und das Frakturrisiko des Knochens führt (Wang *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2006). Die festgestellte verminderte Flexibilität der Knochen von Integrin α_2 -defizienten Mäusen könnte deshalb auch eine Veränderung der Belastbarkeit dieser Knochen bewirken. Insofern wäre die Bestimmung des Integrals der Spannungs-Dehnungskurve in zukünftigen Studien, wodurch eine Änderung der Belastbarkeit des Knochens von Knock-out Tieren dargestellt und weitere Hinweise auf eine, infolge des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptorverlusts aufgetretene veränderte Kollagen-Matrix, ermittelt werden könnte, von großem Interesse.

5.2 Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ auf den Knochen im Verlauf der Frakturheilung

Die Arbeit sollte zusätzlich die biomechanischen Unterschiede im frakturierten Knochen von Wildtyp-Mäusen und Integrin α_2 -defizienten Tieren ermitteln. Es ergaben sich jedoch keine Differenzen in der torsionalen Steifigkeit beider Genotypen. Gleiches galt für das maximale Drehmoment und den maximalen Torsionswinkel.

Die Ergebnisse weichen erheblich von den vorherigen Beobachtungen im nativen Knochen ab, was durch verschiedene Ursachen bedingt sein könnte. Zunächst war die den Untersuchungen zugrunde liegende Fallzahl in der Wildtyp- und Knock-out-Gruppe geringer. Dies könnte die fehlende Signifikanz zwischen den Genotypen erklären und wäre auch ein denkbarer Grund für die vorhandene Streuung der Werte. Weiterhin könnten die hervorgerufenen Frakturen trotz standardisiertem Frakturmodell in ihrem Weichteilschaden geringfügig variiert haben. Hulth (1989) beschrieb, dass die Frakturheilung durch Schädigung des umliegenden Gewebes beeinflusst wird. Insofern könnten resultierende Schwankungen der biomechanischen Parameter hierin begründet liegen. Zuletzt muss die Möglichkeit einer fehlenden Auswirkung des Integrin $\alpha_2\beta_1$ 28 Tage nach der Fraktur auf die untersuchten biomechanischen Eigenschaften berücksichtigt werden. Der frakturierte Knochen rekapituliert zahlreiche molekulare und zelluläre Mechanismen der pränatalen embryonalen Skelettentwicklung. Dieser Prozess unterliegt einer exzessiv erhöhten Stoffwechselaktivität und ist deshalb von dem metabolischen Zustand im nativen Knochen abzugrenzen. Die veränderten Ausgangsbedingungen könnten Ursache dafür

sein, dass in den Untersuchungen zum nativen und frakturierten Knochen abweichende Beobachtungen auftraten. Es wäre möglich, dass das Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Protein eine untergeordnete Funktion in der Frakturheilung ausübt und andere Zelladhäsionsproteine wichtige Schlüsselrollen übernehmen.

In Frage käme hier Integrin $\alpha_1\beta_1$, dessen Funktion in diesem Prozess bereits beschrieben ist. Ekholm *et al.* (2002) belegte eine reduzierte Kallusbildung und verminderte Knorpelsynthese als Folge des Verlustes von Integrin $\alpha_1\beta_1$ im Verlauf der Frakturheilung. Camper *et al.* (2001) gelang der Nachweis einer Expression von Integrin $\alpha_{10}\beta_1$ in Zellen der Ranvier- Rinne und in osteoblastischen Zellen der Knochenrinde. Die Identifizierung dieses Proteins, als dominierendes Kollagenbindendes Integrin während der Chondrogenese, lassen unter anderem eine im Rahmen der enchondralen Ossifikation bestehende zentrale Rolle vermuten, die Auswirkungen auf die Ausbildung des Frakturkallus haben könnte (Camper *et al.*, 2001). Die Arbeitsgemeinschaft um Popov *et al.* (2011) zeigte, dass das $\alpha_{11}\beta_1$ -Protein die höchste basale Expression unter den Mitgliedern der Integrinfamilie in humanen Mesenchymalen Stammzellen (hMSC) besitzt. Dabei können die aus dem Knochenmark stammenden hMSC aufgrund ihrer Differenzierung zu Zellen der Osteoblasten-Linie als Quelle der Knochenregeneration und Knochenheilung betrachtet werden. In weiterführenden Studien trat im Verlauf der Entwicklung von hMSC in Osteoblasten eine deutliche Zunahme der Expression des α_{11} -Monomers auf. Das gezielte Ausschalten dieses Integrins durch RNA-Interferenz führte zu einem dramatischen Verlust von hMSC und einer verminderten osteoblastischen Differenzierung, so dass eine wichtige Funktion des Proteins in der Frakturheilung vorliegen könnte (Popov *et al.*, 2011).

Der Austausch von Informationen zwischen humanen Mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und der überwiegend aus Kollagen I bestehenden organischen, Extrazellulären Matrix ermöglicht das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung dieser Zellen. Neben dem Integrinrezeptor $\alpha_{11}\beta_1$ konnte auch für das $\alpha_2\beta_1$ -Integrin eine Relevanz im Zusammenhang mit der Knochenregeneration und Knochenheilung nachgewiesen werden (Popov *et al.*, 2011). Die biomechanischen Ergebnisse 28 Tage nach Fraktur in dieser Arbeit scheinen hiervon tendenziell abzuweichen. Erklärt werden könnte dies durch eine ebenfalls von Popov *et al.* (2011) festgestellte verstärkte Ausbildung von α_1 - und α_{11} -Untereinheiten während der

Abwesenheit des α_2 -Integrins. Der Proteinverlust könnte deshalb biomechanisch aufgrund Kompensation durch andere Integrine nicht ins Gewicht fallen. Eine kooperative Beziehung scheint diesbezüglich besonders zwischen Integrin $\alpha_1\beta_1$ und Integrin $\alpha_2\beta_1$ vorhanden zu sein. Beide Integrine konnten als positiver Regulator der Kollagenase 3 (MMP-13) identifiziert werden (Ravanti *et al.*, 1999). Kosaki *et al.* (2007) gelang der Nachweis einer verzögerten und beeinträchtigten Frakturheilung in MMP-13-defizienten Mäusen. Ein Ausfall des stimulierenden Einflusses des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors auf die MMP-13 in den Knock-out Mäusen scheint allerdings keine Veränderungen in der Frakturheilung zu verursachen, weshalb von einer Bedeutungszunahme des Integrins $\alpha_1\beta_1$ auszugehen ist. Ähnlich ergab sich dies auch in den Studien von Jikko *et al.* (1999), der eine Verbindung zwischen kollagenen Integrinrezeptoren und bone morphogenetic protein 2 (BMP2)-Signalwegen herleiten konnte. Die bone morphogenetic proteins besitzen eine starke osteoinduktive Potenz und sind regulatorische Faktoren während der Frakturheilung (Bostrom *et al.*, 1995). Integrin $\alpha_1\beta_1$ oder Integrin $\alpha_2\beta_1$ waren notwendig für die BMP2-vermittelte Induktion der Differenzierung und Funktion von Osteoblasten, da die aufgrund Integrin- Kollagen Interaktion ausgelösten Signale bedeutend in die durch den BMP2-Rezeptor hervorgerufenen Signalwege eingriffen (Jikko *et al.*, 1999). Der Verlust des Integrin $\alpha_2\beta_1$ scheint diesbezüglich ebenfalls keine Auswirkungen hervorzurufen, was erneut auf eine zunehmende Einbindung von Integrin $\alpha_1\beta_1$ hindeuten könnte.

In weiteren Studien könnte eine histologische Charakterisierung des Knochen-Remodellings während der Frakturheilung von Integrin α_2 -defizienten Mäusen durchgeführt werden. Dies würde ein Gewinn zusätzlicher Erkenntnisse über die Knochenstruktur in dem Prozess der Frakturheilung ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Integrine spielen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Integration der Zelle in ihre Mikroumgebung. Verschiedene Integrine dienen hierbei der Kommunikation und dem Austausch von mechanochemischen Signalen zwischen Intra- und Extrazellularraum. Im Knochen ist das Integrin $\alpha_2\beta_1$ in diese Prozesse eingebunden. Das Protein bindet mit besonders hoher Affinität Kollagen I, das den Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix ausbildet. Die Interaktion dieser beiden Bindungspartner führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, die in eine fortschreitende Differenzierung von Osteoblasten und Mineralisierung von Extrazellulärer Matrix resultiert.

Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie wurden Versuche zur Knochenstruktur und Knochenstabilität der Integrin α_2 -defizienten Maus durchgeführt. Es wurde im nativen Knochen der Einfluss des Integrin $\alpha_2\beta_1$ im Verlauf des Alterungsprozesses beschrieben. Einerseits erfolgte dies durch Bestimmung histomorphologischer Eigenschaften der Lendenwirbelkörper von Wildtyp- und Knock-out Mäusen. Andererseits wurden die biomechanischen Eigenschaften der rechten Oberschenkelknochen dieser Tiere ermittelt.

In weiteren Untersuchungen wurden unter veränderten metabolischen Aktivitätszuständen im Knochen die biomechanischen Eigenschaften der frakturierten, linken Oberschenkelknochen von vier Monate alten Wildtyp- und Knock-out Mäusen 28 Tage nach Fraktur bestimmt.

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass die vier Monate alten Integrin α_2 -defizienten Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen gleichen Alters eine reduzierte mineralisierte Fläche der Lendenwirbelkörper besaßen. Dies basierte auf einer verminderten Kortikalisfläche. Die trabekulären Strukturen der Lendenwirbelkörper von Knock-out Mäusen unterschieden sich durch eine geringere Trabekelanzahl in der jüngsten Altersgruppe und durch einen erhöhten Abstand der Knochenbälkchen in den ersten beiden Altersgruppen von den Wildtyp-Mäusen. Der Trabekelabstand der Lendenwirbelkörper nahm in der ältesten Knock-out Gruppe stark ab, so dass dieser schließlich im Vergleich zur altersgleichen Kontroll-Gruppe niedriger lag.

Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die torsionale Steifigkeit der rechten Femura von zwölf und achtzehn Monate alten Integrin α_2 -defizienten Mäusen gegenüber altersgleichen Wildtyp-Mäusen erhöht war. Zum einen konnte dies auf das höhere

maximale Drehmoment der Femura der Knock-out Tiere, besonders in der ältesten Gruppe zurückgeführt werden. Zum anderen war aber besonders der über alle Altersgruppen geringere maximale Torsionswinkel der Femura der Knock-out Tiere ursächlich, dessen niedriger initiale Ausgangswert im Gegensatz zu den Femura der Wildtyp-Tiere keinen altersabhängigen Anstieg verzeichnete.

Im Anschluss konnten vergleichbare biomechanische Parameter der frakturierten, linken Oberschenkelknochen von Wildtyp- und Integrin $\alpha_2\beta_1$ -defizienten Mäusen festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Defizienz des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors im nativen Knochen zu einer Beeinflussung von histomorphologischen und biomechanischen Charakteristika führt. Es trat in den nativen Wirbelkörpern eine veränderte Knochenstruktur auf, die Eigenschaften eines osteoporotischen Knochengewebes erfüllte. Gleichzeitig ergab sich ein verringerter Knochenanbau bei den Jungtieren und ein reduzierter Knochenabbau bei den älteren Mäusen, sowie eine verminderte Flexibilität der nativen Oberschenkel bei den Integrin $\alpha_2\beta_1$ -defizienten Tieren. Dies lässt eine deutliche Verringerung der Remodelling-Rate im nativen Knochen vermuten.

Eine Beeinflussung der biomechanischen Eigenschaften des Oberschenkels 28 Tage nach Fraktur durch die Defizienz des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Rezeptors konnte durch die Ergebnisse dieser Studie allerdings nicht gezeigt werden. Möglicherweise nehmen andere Zelladhäsionsproteine in der Frakturheilung wichtige Schlüsselrollen ein. Es könnte auch eine Kompensation des Integrin $\alpha_2\beta_1$ insbesondere durch Integrin $\alpha_1\beta_1$ oder Integrin $\alpha_{11}\beta_1$ vorliegen.

Die gewonnenen Erkenntnisse scheinen eine Bedeutung und Funktion des Integrin $\alpha_2\beta_1$ im Knochen zu unterstützen. Um weitergehende Aussagen diesbezüglich treffen zu können, sollten zusätzliche Untersuchungen zu diesem Protein durchgeführt werden. Ansatzpunkte wären die detaillierte Bestimmung der Remodelling Rate durch Fluoreszenzfarbstoffe, die Analyse von Expressionsmustern anderer Integrinrezeptoren, um einen Ausgleich des Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Verlustes durch diese Proteine aufzudecken, und die Darstellung des qualitativen und quantitativen Knochenmaterials in den Knock-out Mäusen. Ebenso wäre die Berechnung der biomechanischen Belastbarkeit des Knochens in den Integrin α_2 -defizienten Mäusen

von Interesse. Ein weiterer Aspekt wäre die histologische Charakterisierung des frakturierten Knochens von Integrin α_2 -defizienten Mäusen.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Balena R, Shih MS, Parfitt AM (1992) Bone resorption and formation on the periosteal envelope of the ilium: a histomorphometric study in healthy women. *J.Bone Miner.Res.* 7 (12): 1475-1482
- (2) Boivin G, Meunier PJ (2002) Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. *Connect.Tissue Res.* 43 (2-3): 535-537
- (3) Bolander ME (1992) Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200 (2): 165-170
- (4) Bonewald LF, Dallas SL (1994) Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J.Cell.Biochem.* 55 (3): 350-357
- (5) Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J.Orthop.Res.* 2 (1): 97-101
- (6) Boskey AL, Wright TM, Blank RD (1999) Collagen and bone strength. *J.Bone Miner.Res.* 14 (3): 330-335
- (7) Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, et al. (1995) Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J.Orthop.Res.* 13 (3): 357-367
- (8) Bousson V, Meunier A, Bergot C, Vicaut E, Rocha MA, Morais MH, et al. (2001) Distribution of intracortical porosity in human midfemoral cortex by age and gender. *J.Bone Miner.Res.* 16 (7): 1308-1317
- (9) Bouvard D, Brakebusch C, Gustafsson E, Aszodi A, Bengtsson T, Berna A, et al. (2001) Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ.Res.* 89 (3): 211-223
- (10) Boussein ML (2005) Determinants of skeletal fragility. *Best Pract.Res.Clin.Rheumatol.* 19 (6): 897-911
- (11) Brandi ML (2009) Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology (Oxford)* 48 Suppl 4: iv3-8
- (12) Brodt MD, Ellis CB, Silva MJ (1999) Growing C57Bl/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties. *J.Bone Miner.Res.* 14 (12): 2159-2166
- (13) Brown JP, Delmas PD, Arlot M, Meunier PJ (1987) Active bone turnover of the cortico-endosteal envelope in postmenopausal osteoporosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 64 (5): 954-959
- (14) Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh LJ (2001) Bone and joint healing. In: Buchholz RW, Heckman JD (Hrsg) *Rockwood and Green's fractures in adults*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 5. Aufl., S. 245-271
- (15) Camper L, Holmvall K, Wangnerud C, Aszodi A, Lundgren-Akerlund E (2001) Distribution of the collagen-binding integrin alpha10beta1 during mouse development. *Cell Tissue Res.* 306 (1): 107-116

- (16) Chaudhary LR, Avioli LV (1997) Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK1 in human, rat, and mouse osteoblastic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 238 (1): 134-139
- (17) Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM (2002) The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *Am.J.Pathol.* 161 (1): 337-344
- (18) Civitelli R (2008) Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch.Biochem.Biophys.* 473 (2): 188-192
- (19) Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.* 3 Suppl 3: S131-9
- (20) Currey JD (2002) *Bones: structure and mechanics.* Princeton University Press
- (21) Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, et al. (2005) Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 36 (7-8): 609-616
- (22) De Arcangelis A, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L, Georges-Labouesse E (1999) Synergistic activities of alpha3 and alpha6 integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development* 126 (17): 3957-3968
- (23) Dempster D (2006) Anatomy and functions of the adult skeleton. In: Favus M (Hrsg) *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* American Society for Bone and Mineral Research, Washington, DC, 6th edn., S. 7-11
- (24) Dempster DW (2003) Bone microarchitecture and strength. *Osteoporos.Int.* 14 Suppl 5: S54-6
- (25) Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. (2008) Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front.Biosci.* 13: 2001-2021
- (26) Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA (2000) Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol.* 19 (2): 97-105
- (27) Einhorn TA, Hirschman A, Kaplan C, Nashed R, Devlin VJ, Warman J (1989) Neutral protein-degrading enzymes in experimental fracture callus: a preliminary report. *J.Orthop.Res.* 7 (6): 792-805
- (28) Einhorn TA (1995) The expression of cytokin activity by fracture callus. *J.Bone Miner.Res.* 10 (8): 1272-1281
- (29) Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (355 Suppl) (355 Suppl): S7-21
- (30) Ekholm E, Hankenson KD, Uusitalo H, Hiltunen A, Gardner H, Heino J, et al. (2002) Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am.J.Pathol.* 160 (5): 1779-1785
- (31) Frost HM [Hrsg] (1995) *Introduction to a new skeletal physiology.* The Pajaro Group, Inc., Pueblo, CO, Bd. Vol I, II
- (32) Frost HM (1992) Perspectives: bone's mechanical usage windows. *Bone Miner.* 19 (3): 257-271

- (33) Frost HM (2000) The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J.Bone Miner.Metab.* 18 (6): 305-316
- (34) Frost HM (2001) From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat.Rec.* 262 (4): 398-419
- (35) Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J.Cell.Biochem.* 88 (5): 873-884
- (36) Gokhale JA, Robey PG, Boskey AL (2001) *The biochemistry of bone.* Academic Press: 88-107
- (37) Gorski JP (1998)
Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:201-23 9 (2): 201-223
- (38) Gronthos S, Stewart K, Graves SE, Hay S, Simmons PJ (1997) Integrin expression and function on human osteoblast-like cells. *J.Bone Miner.Res.* 12 (8): 1189-1197
- (39) Heino J (2000) The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. *Matrix Biol.* 19 (4): 319-323
- (40) Hernandez CJ (2008) How can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? *Bone* 42 (6): 1014-1020
- (41) Hidding H (2009) In vitro Untersuchungen zur Funktion von Syndecan-4 und α_2 -Integrin im Knochenstoffwechsel [zugl. Masterarbeit]. Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Münster, Münster
- (42) Holtkotter O, Nieswandt B, Smyth N, Muller W, Hafner M, Schulte V, et al. (2002) Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J.Biol.Chem.* 277 (13): 10789-10794
- (43) Hulth A (1989) Current concepts of fracture healing. *Clin.Orthop.Relat.Res.* (249) (249): 265-284
- (44) Jee WS, Frost HM (1992) Skeletal adaptations during growth. *Triangle* 31 (2/3): 77-88
- (45) Jee WS (2000) Principles in bone physiology. *J.Musculoskelet.Neuronal Interact.* 1 (1): 11-13
- (46) Jikko A, Harris SE, Chen D, Mendrick DL, Damsky CH (1999) Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J.Bone Miner.Res.* 14 (7): 1075-1083
- (47) Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, Kapyla J, White DJ, Ivaska J, et al. (2004) Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. *J.Biol.Chem.* 279 (30): 31956-31963
- (48) Kapyla J, Ivaska J, Riikonen R, Nykvist P, Pentikainen O, Johnson M, et al. (2000) Integrin alpha(2)I domain recognizes type I and type IV collagens by different mechanisms. *J.Biol.Chem.* 275 (5): 3348-3354
- (49) Kimble RB, Bain S, Pacifici R (1997) The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *J.Bone Miner.Res.* 12 (6): 935-941

- (50) Klees RF, Salasznyk RM, Kingsley K, Williams WA, Boskey A, Plopper GE (2005) Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. *Mol.Biol.Cell* 16 (2): 881-890
- (51) Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. (2001) Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J.Bone Miner.Res.* 16 (6): 1004-1014
- (52) Kosaki N, Takaishi H, Kamekura S, Kimura T, Okada Y, Minqi L, et al. (2007) Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 354 (4): 846-851
- (53) Kulak CA, Dempster DW (2010) Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq.Bras.Endocrinol.Metabol.* 54 (2): 87-98
- (54) Kundu AK, Khatiwala CB, Putnam AJ (2009) Extracellular matrix remodeling, integrin expression, and downstream signaling pathways influence the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on poly(lactide-co-glycolide) substrates. *Tissue Eng.Part A.* 15 (2): 273-283
- (55) Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, et al. (2001) Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J.Biol.Chem.* 276 (17): 14443-14450
- (56) Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, et al. (1995) Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J.Cell Biol.* 131 (6 Pt 2): 1903-1915
- (57) Luo BH, Carman CV, Springer TA (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 25: 619-647
- (58) Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE (1999) Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J.Cell.Biochem.* 74 (4): 616-627
- (59) Manigrasso MB, O'Connor JP (2004) Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J.Orthop.Trauma* 18 (10): 687-695
- (60) Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr.Rev.* 21 (2): 115-137
- (61) Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu.Rev.Cell Biol.* 6: 597-641
- (62) McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, et al. (2000) Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J.Clin.Invest.* 105 (4): 433-440
- (63) McKee MD, Addison WN, Kaartinen MT (2005) Hierarchies of extracellular matrix and mineral organization in bone of the craniofacial complex and skeleton. *Cells Tissues Organs* 181 (3-4): 176-188
- (64) McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J.Bone Joint Surg.Br.* 60-B (2): 150-162

- (65) Mercurio AM (2002) Lessons from the alpha2 integrin knockout mouse. *Am.J.Pathol.* 161 (1): 3-6
- (66) Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y (2000) Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. *J.Cell.Physiol.* 184 (2): 207-213
- (67) Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD (2007) Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8 (12): 957-969
- (68) Müller ME (1990) *The Comprehensive Classification of Fracture of Long Bones.* Springer Verlag, Berlin
- (69) Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, et al. (1990) Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11 (3): 181-188
- (70) Noda M, Camilliere JJ (1989) In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 124 (6): 2991-2994
- (71) Nykvist P, Tu H, Ivaska J, Kapyla 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. *J.Biol.Chem.* 275 (11): 8255-8261
- (72) Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS (1983) Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J.Clin.Invest.* 72 (4): 1396-1409
- (73) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J.Bone Miner.Res.* 2 (6): 595-610
- (74) Parfitt AM (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J.Cell.Biochem.* 55 (3): 273-286
- (75) Parfitt AM (2002) Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 30 (1): 5-7
- (76) Peng Y, Kang Q, Luo Q, Jiang W, Si W, Liu BA, et al. (2004) Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J.Biol.Chem.* 279 (31): 32941-32949
- (77) Phillips JA, Bonassar LJ (2005) Matrix metalloproteinase activity synergizes with alpha2beta1 integrins to enhance collagen remodeling. *Exp.Cell Res.* 310 (1): 79-87
- (78) Popov C, Radic T, Haasters F, Prall WC, Aszodi A, Gullberg D, et al. (2011) Integrins alpha2beta1 and alpha11beta1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell.Death Dis.* 2: e186
- (79) Ravanti L, Heino J, Lopez-Otin C, Kahari VM (1999) Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 274 (4): 2446-2455
- (80) Reyes CD, Garcia AJ (2004) Alpha2beta1 integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation. *J.Biomed.Mater.Res.A.* 69 (4): 591-600

- (81) Riiikonen T, Westermarck J, Koivisto L, Broberg A, Kahari VM, Heino J (1995) Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *J.Biol.Chem.* 270 (22): 13548-13552
- (82) Salasznyk RM, Klees RF, Boskey A, Plopper GE (2007) Activation of FAK is necessary for the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on laminin-5. *J.Cell.Biochem.* 100 (2): 499-514
- (83) Schiro JA, Chan BM, Roswit WT, Kassner PD, Pentland AP, Hemler ME, et al. (1991) Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* 67 (2): 403-410
- (84) Schmidmaier G, Wildemann B, Melis B, Krummrey G, Einhorn TA, Haas NP, et al. (2004) Development and Characterization of a Standard Closed Tibial Fracture Model in the Rat. *Eur J Trauma* 30 (1): 35-42
- (85) Sedlin ED, Hirsch C (1966) Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop. Scand.* 37 (1): 29-48
- (86) Seeman E (2003) Bone quality. *Osteoporos.Int.* 14 Suppl 5: S3-7
- (87) Seeman E (2003) Periosteal bone formation--a neglected determinant of bone strength. *N.Engl.J.Med.* 349 (4): 320-323
- (88) Seeman E, Delmas PD (2006) Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N.Engl.J.Med.* 354 (21): 2250-2261
- (89) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89 (2): 309-319
- (90) St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP (1999) Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13 (16): 2072-2086
- (91) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr.Rev.* 20 (3): 345-357
- (92) Takeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T (1996) Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. *J.Biol.Chem.* 271 (7): 3938-3944
- (93) Takeuchi Y, Suzawa M, Kikuchi T, Nishida E, Fujita T, Matsumoto T (1997) Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J.Biol.Chem.* 272 (46): 29309-29316
- (94) Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, et al. (1997) Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 204 (1-2): 35-46
- (95) Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde LI (2002) Age-related differences between thinning of horizontal and vertical trabeculae in human lumbar bone as assessed by a new computerized method. *Bone* 31 (1): 136-142

- (96) Tonna EA, Cronkite EP (1961) Cellular Response to Fracture Studied with Tritiated Thymidine. *J Bone Joint Surg Am.* 43 (3): 352-362
- (97) Tulla M, Pentikainen OT, Viitasalo T, Kapyla J, Impola U, Nykvist P, et al. (2001) Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J.Biol.Chem.* 276 (51): 48206-48212
- (98) Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14 (4): 595-608
- (99) Turner CH (2006) Bone strength: current concepts. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1068: 429-446
- (100) Vedi S, Compston JE, Webb A, Tighe JR (1982) Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of normal British subjects. *Metab.Bone Dis.Relat.Res.* 4 (4): 231-236
- (101) Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM (2001) The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J.Orthop.Res.* 19 (6): 1021-1026
- (102) Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM (2002) Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 31 (1): 1-7
- (103) Wu JE, Santoro SA (1994) Complex patterns of expression suggest extensive roles for the alpha 2 beta 1 integrin in murine development. *Dev.Dyn.* 199 (4): 292-314
- (104) Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT (1998) Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J.Biol.Chem.* 273 (49): 32988-32994
- (105) Young MF (2003) Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos.Int.* 14 Suppl 3: S35-42
- (106) Zhang ZG, Bothe I, Hirche F, Zweers M, Gullberg D, Pfitzer G, et al. (2006) Interactions of primary fibroblasts and keratinocytes with extracellular matrix proteins: contribution of alpha2beta1 integrin. *J.Cell.Sci.* 119 (Pt 9): 1886-1895
- (107) Zimmerman D, Jin F, Leboy P, Hardy S, Damsky C (2000) Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev.Biol.* 220 (1): 2-15

8 Abkürzungsverzeichnis

-/-	homozygote Gendeletion
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMU	<i>Bone Remodelling Units</i>
BV/TV	<i>Bone Volume/Tissue Volume</i>
Cbfa1	<i>Runt- related transcription factor 2 (= RUNX2)</i>
Cn/TV	<i>Cancellous bone tissue/ Tissue volume</i>
COL I	Kollagen Typ I
CP	Kollagene Proteine
Ct/TV	<i>Cortical bone tissue/ Tissue volume</i>
Ct.Th	<i>Cortical thickness</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
ERK	Extrazelluläre-Signal-Regulierende Kinase
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblast growth factor
Gl.	Gleichung
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
IL	Interleukin
ITGA2	Integrin α_2
Kap.	Kapitel
MAPK	Mitogen-Aktivierende Proteinkinase
MSC	Mesenchymale Stammzellen
M- CSF	<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NCP	Nicht-kollagene Proteine
NF κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
OPG	Osteoprotegerin
OSE2	<i>Osteoblast specific cis acting element 2</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PTH	Parathormon

PTH/PTHrP– R	<i>Parathormon/Parathormon–related–Protein Receptor</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NFκB- Ligand</i>
Src	Tyrosinkinase
Tab.	Tabelle
Tb.N	Trabecular number
Tb.S	Trabecular
Tb.Th	Trabecular thickness
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF	<i>Tumor-Nekrose-Faktor</i>
TRAP	Tartrat–resistente–Saure-Phospatase
Vit. D	Vitamin D
Vrgl.	Vergleich
WT	Wildtyp

9 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.- Prof. Dr. Michael J. Raschke für die Möglichkeit der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit in seiner Klinik. Weiterhin bedanke ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens durch Herrn Univ.- Prof. Dr. Michael J. Raschke.

Herrn Dr. Richard Stange und Frau Dr. Melanie Timmen danke ich besonders herzlich für die Überlassung dieses Dissertationsthemas und für die Aufnahme in eure Arbeitsgruppe. Ihr habt mich stets exzellent betreut und standet mir immer mit wissenschaftlichem Rat zur Seite.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Simone Niehues für die Unterstützung bei der Aufbereitung der histologischen Präparate bedanken.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und die lehrreiche und interessante Zeit, die wir gemeinsam gehabt haben.

Meiner Familie danke ich für die unermüdliche Unterstützung. Ihr ward stets mit Wort und Tat für mich da. Ihr habt mir die Möglichkeit gegeben zu studieren. Euch habe ich alles zu verdanken und ohne euch wäre diese Arbeit nie gelungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Christina Pohlkamp bedanken. Du hast mich von Anfang an bei dieser Dissertation begleitet. Gemeinsam haben wir die Höhen und Tiefen durchlebt und ich konnte mich stets auf dich verlassen. Dir gebührt ein großer Anteil an dieser Arbeit.

10 Lebenslauf

11 Anhang



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn
Dr. med. Richard Stange
Klinik für Unfall, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie
Universitätsklinikum Münster
Waldeyerstr. 1
48149 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 6-7
48143 Münster
Telefon: 0251 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-2115
Raum: C 211
Auskunft erteilt:
Herr Skoff
E-Mail:
Dez50@brms.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 67/2006)

18 Oktober 2006

Tierschutz; Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom 02.08.2006, hier eingegangen am 18.08.2006

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d

Sehr geehrter Herr Dr. Stange,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der zurzeit gültigen Fassung (BGBl. I S. 1105, 1818) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Untersuchung der Rolle von Zelladhäsionsmolekülen im Rahmen der Frakturheilung unter physiologischen und Entzündungsbedingungen.“

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Dr. med. Richard Stange
Klinik für Unfall, Hand- und
Wiederherstellungschirurgie
Waldeyerstr. 1
48149 Münster

Herr
Univ.-Prof. Dr. Thomas Pap
Klinik u. Poliklinik f. Allg. Orthopädie

Domagkstr. 3
48143 Münster

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de
Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300
ÖPNV - Haltestellen:
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20
Bezirksregierung II, Linie 17 (Haus N)

Konten der Landeskasse	Deutsche Bundesbank - Filiale Münster	WestLB AG Münster
BLZ:	400 000 00	400 500 00
Konto:	40 001 520	61 820
IBAN:	DE34 4000 0000 0040 0015 20	DE85 4005 0000 0000 0618 20
BIC:	MARKDEF1400	WELADE3M

1/3

NRW.

Diese Genehmigung gilt bis zum **31.10.2009**.

Gem. TierSchG sind max. 3 Jahre genehmigungsfähig. Die Genehmigung kann 2 mal um 1 Jahr verlängert werden.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

Maximal 924 Mäuse

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung kann zurückgenommen werden, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie kann widerrufen werden, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Ich weise darauf hin, dass diese Genehmigung eine evtl. erforderliche Zustimmung nach dem Gentechnikgesetz für Arbeiten mit transgenen Tieren nicht einschließt.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Die Tierschutzkommission kam in ihrer Sitzung am 11.10.2006 zu dem Schluss, dass es schwierig ist festzustellen, ob die Versuchstiere nach der Operation unter Schmerzen leiden oder nicht. Sie empfiehlt aus diesem Grund grundsätzlich eine Schmerztherapie nach der Operation.

Rechtsbehelfsbelehrung

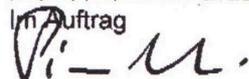
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen

In Auftrag



Dr. Piontkowski