

**Heriburg Hidding**

**Die Bedeutung der Proteoglykane Syndecan-1 und  
Syndecan-4 während der Frakturheilung**

**- 2013 -**

# **Biologie**

## **Die Bedeutung der Proteoglykane Syndecan-1 und Syndecan-4 während der Frakturheilung**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von  
Heriburg Hidding  
aus Billerbeck**

**- 2013 -**

**Dekan: Prof. Dr. Dirk Prüfer**

**Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael J. Raschke**

**Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rüdiger J. Paul**

**Dritter Gutachter: Dr. Berno Dankbar**

**Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2013**

**Tag der Promotion: 25.10.2013**

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                   | <b>V</b>    |
| <b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>                                     | <b>VII</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>                                   | <b>VIII</b> |
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Frakturheilung.....  | 1           |
| 1.1.1 Phasen der Frakturheilung.....                                 | 1           |
| 1.1.2 Degradation der Knorpelmatrix .....                            | 9           |
| 1.2 Syndecan - ein integrales Heparansulfat-Proteoglykan.....        | 12          |
| 1.2.1 Proteinstruktur der Syndecane .....                            | 14          |
| 1.2.2 Syndecan als Co-Rezeptor und als eigenständiger Rezeptor ..... | 15          |
| 1.2.3 Syndecan als Adhäsionsrezeptor.....                            | 15          |
| 1.2.4 Syndecan vermittelte Endozytose.....                           | 16          |
| 1.2.5 Shedding der Ectodomäne .....                                  | 17          |
| 1.2.6 Syndecan-1 .....   | 17          |
| 1.2.7 Syndecan-4 .....   | 19          |
| <b>2 ZIEL DER ARBEIT.....</b>  | <b>22</b>   |
| <b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>                                  | <b>23</b>   |
| 3.1 Materialien.....   | 23          |
| 3.1.1 Reagenzien und Lösungen .....                                  | 23          |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....                                     | 23          |
| 3.1.3 Geräte .....   | 23          |
| 3.1.4 Computer Software.....   | 25          |
| 3.1.5 Puffer, Lösungen und Nährmedien .....                          | 25          |
| 3.1.6 Primer.....  | 28          |
| 3.1.7 Antikörper .....   | 29          |
| 3.2 Tiere.....   | 30          |
| 3.3 Experimentelle Tierversuche .....                                | 31          |
| 3.3.1 Versuchstiergruppen.....                                       | 31          |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.3.2 | Eingriffe und Behandlungen an den Tieren.....   | 32 |
| 3.4   | Zellbiologische Methoden .....  | 34 |
| 3.4.1 | Zellkultur.....   | 34 |
| 3.4.2 | Isolierung Osteoprogenitor-Zellen aus neonatalen Calvarien.....                                       | 34 |
| 3.4.3 | Isolierung von Knochenmarkzellen und Differenzierung zu Osteoklasten .....                            | 35 |
| 3.4.4 | Isolation mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark.....  | 36 |
| 3.4.5 | Osteogene Differenzierung .....   | 36 |
| 3.4.6 | Chondrogene Differenzierung .....   | 37 |
| 3.4.7 | Adipogene Differenzierung .....   | 37 |
| 3.4.8 | Stimulationsversuche mit TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$ .....  | 37 |
| 3.4.9 | Kryokonservierung und Reaktivierung der MSZ .....   | 38 |
| 3.5   | Proteinbiochemische Methoden.....   | 38 |
| 3.5.1 | Bestimmung der Proliferation.....   | 38 |
| 3.5.2 | Nachweis der Alkalische Phosphatase Aktivität .....   | 39 |
| 3.6   | Molekularbiologische Methoden.....  | 39 |
| 3.6.1 | RNA-Isolation .....   | 39 |
| 3.6.2 | Synthese der cDNA .....   | 40 |
| 3.6.3 | Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....   | 40 |
| 3.6.4 | Genotypisierung der knock out Tiere .....   | 41 |
| 3.6.5 | Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten.....   | 42 |
| 3.7   | Aufbereitung der histologischen Präparate .....   | 42 |
| 3.7.1 | Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten .....  | 43 |
| 3.7.2 | Herstellung von Kunstharz-Schnittpräparaten.....  | 44 |
| 3.8   | Histochemische Methoden.....  | 45 |
| 3.8.1 | Nachweis von Adipozyten mittels Oil Red O-Färbung.....  | 45 |
| 3.8.2 | Von Kossa Färbung zur Visualisierung des mineralisierten Gewebes bzw. der extrazellulären Matrix..... | 45 |
| 3.8.3 | Alizarinrot-S-Färbung zur Quantifizierung der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix .....         | 46 |
| 3.8.4 | Identifikation von Knorpelgewebe mittels Alcianblau Färbung.....                                      | 46 |
| 3.8.5 | Identifikation von Knochengewebe mittels Masson-Goldner Färbung .....                                 | 47 |
| 3.8.6 | Nachweis von Osteoklasten mittels TRAP Färbung .....  | 47 |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.8.7    | Alcianblau-Kernechtrot-Färbung des gesamten murinen Skeletts.....  | 48        |
| 3.9      | Immunhistologische Methoden .....  | 49        |
| 3.9.1    | Detektion von Kollagen II und X mittels Dako ARK™ .....  | 49        |
| 3.9.2    | MMP-9 und TRAP -Doppelfärbung .....  | 50        |
| 3.9.3    | MMP-13- und ADAMTS-4-Immunhistologie .....   | 50        |
| 3.9.4    | Immunhistologischer Nachweis proliferierender Chondrozyten.....  | 51        |
| 3.10     | Quantitative Auswertung der histologischen Präparate.....  | 51        |
| 3.11     | Biomechanische Testungen.....  | 52        |
| 3.12     | µCT-Analysen.....  | 55        |
| 3.13     | Datenanalyse.....  | 56        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>   | <b>57</b> |
| 4.1      | Frakturheilung.....  | 57        |
| 4.1.1    | Charakterisierung des Frakturkallus am 14. postoperativen Tag .....  | 57        |
| 4.1.2    | Lokalisation der Proteasen im Frakturkallus .....  | 60        |
| 4.1.3    | Charakterisierung des Frakturkallus 28 Tage nach einer Fraktur.....  | 64        |
| 4.2      | Syndecan-1 im Knochenstoffwechsel .....  | 65        |
| 4.2.1    | Expression und Funktionalität von Syndecan-1 während der Osteoklasten-Differenzierung in vitro.....            | 66        |
| 4.2.2    | Expression und Funktionalität von Syndecan-1 während der Osteoblasten-Differenzierung .....                    | 72        |
| 4.2.3    | Knochenphänotyp der adulten Syndecan-1-defizienten Maus .....  | 74        |
| 4.2.4    | Knochenphänotyp der neonatalen Syndecan-1-defizienten Maus.....  | 79        |
| 4.3      | Die Rolle von Syndecan-4 während der frühen Phase der Frakturheilung .....                                     | 81        |
| 4.3.1    | Expression von Syndecan-4 in mesenchymalen Stammzellen .....   | 82        |
| 4.3.2    | Auswirkung der Reduktion der TNFα-Konzentration auf das Fehlen von Syndecan-4 während der Frakturheilung ..... | 84        |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>89</b> |
| 5.1      | Verzögerte Frakturheilung in der Syndecan-1 und Syndecan-4-defizienten Maus ..                                 | 89        |
| 5.1.1    | Der Verlust von Syndecan-1 und Syndecan-4 resultiert in einer verzögerten Frakturheilung.....                  | 89        |
| 5.1.2    | Einfluss von Syndecan-1 und Syndecan-4 auf die Differenzierung von   |           |

---

|   |            |
|---|------------|
| Chondrozyten .....  | 90         |
| 5.1.3 Einfluss von Syndecan1 und Syndecan-4 auf die Degradation der Knorpelmatrix .....                   | 90         |
| 5.2 Syndecan-4 in der Frakturheilung .....  | 92         |
| 5.2.1 TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$ modulieren die Expression von Syndecan-4 .....                        | 92         |
| 5.2.2 Syndecan-4 beeinflusst die Proliferation von Chondrozyten .....                                     | 93         |
| 5.2.3 TNF $\alpha$ beeinflusst die Frakturheilung in einem Syndecan-4 abhängigen Mechanismus .....        | 95         |
| 5.2.4 Funktionelle Bedeutung von Syndecan-4 während der Frakturheilung .....                              | 97         |
| 5.3 Die Rolle von Syndecan-1 im Knochenstoffwechsel .....   | 98         |
| 5.3.1 Reduzierte Anzahl an Osteoklasten innerhalb des Frakturkallus der Syndecan-1-defizienten Maus ..... | 98         |
| 5.3.2 RANKL und TNF $\alpha$ regulieren die Syndecan-1-Expression in Osteoklasten Vorläuferzellen.....    | 99         |
| 5.3.3 Syndecan-1 beeinflusst die Osteoklastogenese in vitro .....   | 100        |
| 5.3.4 Erhöhte Osteoklastenaktivität in der adulten Syndecan-1-defizienten Maus ..                         | 101        |
| 5.3.5 Das Fehlen von Syndecan-1 führt zur Ausbildung unterschiedlicher.....                               | 103        |
| Phänotypen .....  | 103        |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>107</b> |
| <b>LITERATUR.....</b>   | <b>109</b> |
| <b>LEBENS LAUF. ....</b>  | <b>119</b> |
| <b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>  | <b>121</b> |
| <b>DANKSAGUNG.....</b>  | <b>123</b> |
| <b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>   | <b>124</b> |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Stadien der Frakturheilung.....  | 3  |
| Abb. 2: Schematische Darstellung des Knorpelaufbaus.....   | 6  |
| Abb. 3: Die Syndecan-Familie.....  | 13 |
| Abb. 4: Frakturmaschine für Kleintiere. ....   | 33 |
| Abb. 5: Histomorphologische Untersuchung der frakturierten Femora der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse nach 14 Tagen .....                              | 59 |
| Abb. 6: Lokalisation von Kollagen II und X im Frakturkallus der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse am 14. postoperativen Tag.....                         | 60 |
| Abb. 7: Immunhistologische Detektion der Proteasen ADAMTS-4 und MMP-13 im Kallus der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse am 14. Tag der Frakturheilung ... | 62 |
| Abb. 8: Lokalisation von MMP-9- und TRAP-positiven Osteoklasten im Frakturkallus der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse .....                             | 63 |
| Abb. 9: Quantifizierung der Osteoklasten im Frakturkallus der Wildtyp-, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse am 14. postoperativen Tag.....                          | 64 |
| Abb. 10: Frakturheilung in der Wildtyp-, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Maus nach 28 Tagen .....   | 65 |
| Abb. 11: Expression der Syndecan-Familie während der Osteoklasten-Differenzierung .....  | 67 |
| Abb. 12: Syndecan-1-Expression unter TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Stimulation während der Osteoklasten-Differenzierung.....   | 68 |
| Abb. 13: Charakterisierung der Differenzierung von Knochenmarkszellen zu reifen Osteoklasten.....  | 69 |
| Abb. 14: Expression von Fusions- und Aktivitätsproteinen während der Osteoklasten-Differenzierung <i>in vitro</i> .....  | 71 |
| Abb. 15: Charakterisierung der Aktivität der differenzierten Osteoklasten.....   | 72 |
| Abb. 16: Expression und Funktionalität von Syndecan-1 während der Osteoblasten-Differenzierung .....   | 74 |
| Abb. 17: Bestimmung der Anzahl der Osteoklasten im fünften Lendenwirbel und in der Tibia adulter Mäuse.....  | 76 |
| Abb. 18: Quantitative Analyse des Knochenstruktur von WT und Syndecan-1-defizienten Mäusen mittels $\mu$ CT.....   | 77 |
| Abb. 19: Quantitative Analyse der Knochenstruktur eines Röhrenknochens der WT- und Syndecan-1-defizienten Maus mittels $\mu$ CT.....   | 78 |



---

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 20: Biomechanische Testung des 4. Lendenwirbels .....  | 79  |
| Abb. 21: Charakterisierung des Knochenphänotyps von 4 Tage alten neugeborenen Syndecan-1-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen ..... | 81  |
| Abb. 22: <i>In vitro</i> -Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten .....                  | 83  |
| Abb. 23: Expression der vier Syndecane in mesenchymalen Stammzell-Kulturen unter TNF $\alpha$ bzw. IL-1 $\beta$ Stimulation .....           | 84  |
| Abb. 24: Charakterisierung des Frakturkallus der WT- und Sdc4 <sup>-/-</sup> -Tieren unter anti-entzündlicher Behandlung .....              | 86  |
| Abb. 25: Proliferation der Knorpelzellen im Frakturkallus am 7. und 14. Tag .....   | 88  |
| Abb. 26: Schematische Darstellung der Osteoklasten-Differenzierung .....  | 106 |

## **TABELLENVERZEICHNIS**

|  |    |
|--|----|
| Tab. 1: Zusammenstellung der verwendeten Laborgeräte .....                         | 23 |
| Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten Computersoftware.....                     | 25 |
| Tab. 3: Bezeichnungen und Zusammensetzungen der Puffer, Lösungen und Nährmedien .. | 26 |
| Tab. 4: Sequenzen spezifischer Primer für die PCR-Amplifikation .....              | 28 |
| Tab. 5: Sequenzen spezifischer Primer für die Genotypisierung .....                | 29 |
| Tab. 6: Verwendete Antikörper in der Immunhistologie .....                         | 29 |
| Tab. 7: Übersicht der tierexperimentellen Versuche.....                            | 32 |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| A                                 | Ausgangsfläche  |
| Abb.                              | Abbildung   |
| ADAMTS                            | <i>A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motif</i> |
| ALP                               | Alkaline Phosphatase  |
| B Ar                              | Knochenfläche ( <i>bone area</i> )  |
| BMP                               | <i>Bone morphogenetic proteins</i>  |
| bp                                | Basenpaare  |
| B Pm                              | Durchmesser des Knochens ( <i>bone perimeter</i> )                        |
| BV / TV                           | Knochenvolumen pro Gewebefläche ( <i>bone volume / tissue volume</i> )    |
| °C                                | Grad Celsius  |
| cDNA                              | <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>                                |
| CCL2                              | <i>C-C motif chemokine</i>  |
| CT                                | <i>cycle threshold</i>  |
| Δ                                 | Delta   |
| ε                                 | Dehnung bzw. Stauchung  |
| DMF                               | Dimethylformamid  |
| DNA                               | Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )                   |
| E-Modul (E)                       | Elastizitätsmodul   |
| Exp.                              | Expression  |
| EZM                               | extrazelluläre Matrix   |
| F                                 | Kraft   |
| FGF                               | <i>Fibroblast growth factor</i>   |
| FAK                               | Focal Adhesion Kinase   |
| FKS                               | fetales Kälberserum   |
| GTPase                            | Guanosin Triphosphatase   |
| HIF1                              | <i>Heterodimer hypoxia inducible factor-1</i>                             |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> | destilliertes Wasser  |
| HPRT                              | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase                                    |
| Ig                                | Immunglobulin   |
| IL-1β                             | Interleukin-1 beta  |
| IL-6                              | Interleukin-6   |

---

|                  |   |
|------------------|---|
| IL-1R1           | Interleukin-1 Rezeptor 1  |
| l                | Liter   |
| M                | Molar   |
| μCT              | Mikro-Computertomographie   |
| M-CSF            | <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>   |
| MAPK             | <i>Mitogen-activated protein kinase</i>   |
| min              | Minuten   |
| ml               | Milliliter  |
| mm               | Millimeter  |
| MMPs             | Matrix-Metalloproteasen   |
| MSZ              | mesenchymale Stammzelle   |
| MT-MMP           | <i>Membrane type matrix metalloproteinase</i>   |
| MTT              | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid  |
| MW               | Mittelwert  |
| N                | Newton  |
| NaCl             | Natriumchlorid  |
| NF- κB           | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>                                 |
| OK / T Ar        | Osteoklasten pro Trabekeloberfläche ( <i>osteoclasts / trabecular area</i> )                          |
| OK Ar / T Ar     | Osteoklasten besetzte Oberfläche pro Trabekeloberfläche ( <i>osteoclasts area / trabecular area</i> ) |
| OPG              | Osteoprotegerin   |
| OSCAR            | <i>Osteoclast-associated receptor</i>   |
| p                | Signifikanzwert   |
| PCNA             | <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>   |
| PCR              | Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )  |
| PDGF             | <i>Plated-derived growth factor</i>   |
| PGK              | Phosphoglycerate Kinase   |
| PIP <sub>2</sub> | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat  |
| PKCα             | Proteinkinase Cα  |
| PMN              | polymorphonucleare Neutrophile  |
| RANK             | <i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>  |
| RANKL            | <i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>   |

|              |  |
|--------------|--|
| RNA          | Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )                                       |
| ROI          | <i>Region of interest</i>  |
| RT           | Raumtemperatur   |
| $\sigma$     | Spannung   |
| S            | Steifigkeit  |
| SD           | Standardabweichung   |
| Sdc          | Syndecan   |
| SDS          | Natriumdodecylsulfat   |
| sec          | Sekunde  |
| Tab.         | Tabelle  |
| Tb. Th.      | Trabekeldicke ( <i>trabecular thickness</i> )                                      |
| Tb. Sp.      | Trabekelabstand ( <i>trabecular separation</i> )                                   |
| TGF $\beta$  | <i>Transforming growth factor beta</i>   |
| Th. N.       | Trabekelanzahl ( <i>trabecular number</i> )  |
| TIMPs        | <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>                                     |
| TNF $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor alpha   |
| TRAP         | Tartrat-restitente saure Phosphatase ( <i>Tartrat-resistant acid phosphatase</i> ) |
| VEGF         | <i>Vascular endothelial growth factor</i>  |
| Wnt          | <i>Wingless Int-1</i>  |
| WT           | Wildtyp  |
| ZK           | Zellkern   |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Frakturheilung

Das Knochengewebe gilt als ein äußerst hartes Stützgewebe, das mit mehr als 220 Knochen das menschliche Skelett bildet. Durch seine besondere Struktur ist es ausgesprochen widerstandsfähig gegenüber Druck, Zug, Biegung und Torsion. Neben der Hauptfunktion als Kraftträger und Anheftungspunkt der Muskulatur schützt das Knochenskelett die inneren Organe, z.B. Herz, Gehirn und Lunge, vor äußeren Einwirkungen und fungiert als metabolisches Reservoir. Außerdem beherbergt es das blutbildende System, das das wichtigste Stammzellenreservoir des adulten Organismus darstellt.

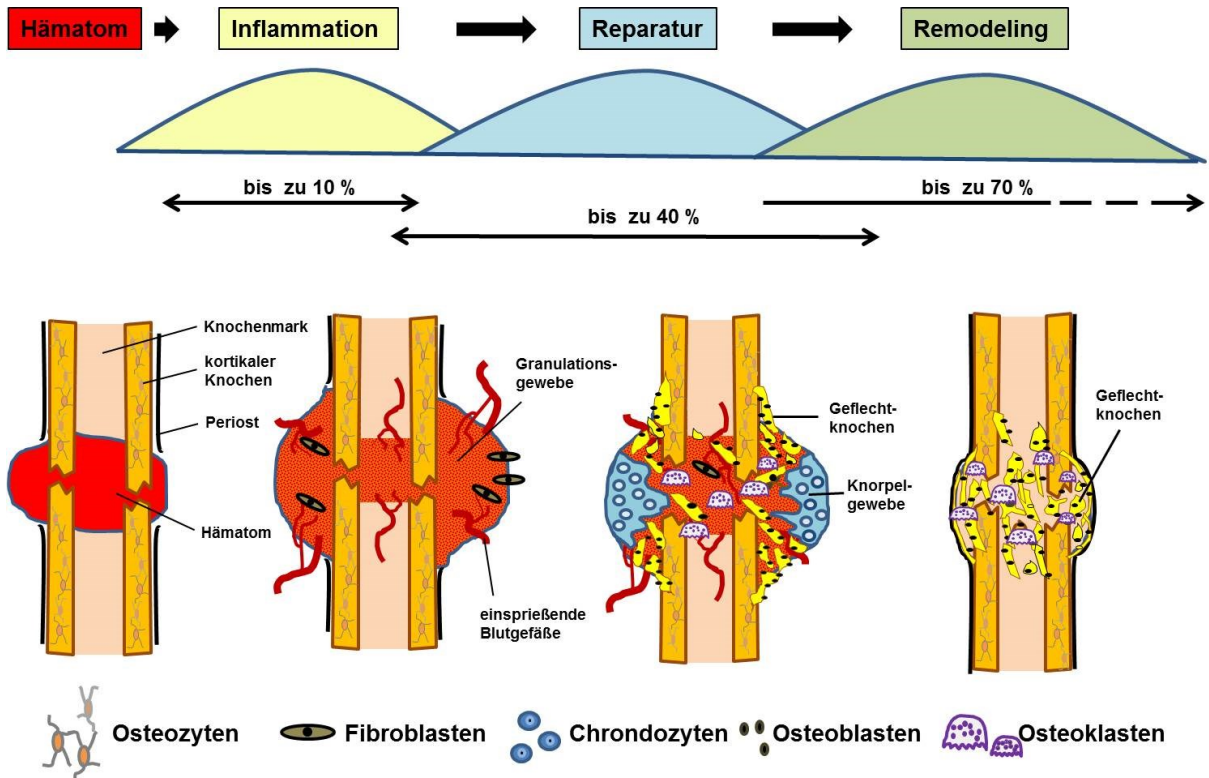
Erkrankungen und Verletzungen des muskuloskelettalen Systems wie z.B. Frakturen, Osteoporose oder Arthrose, schränken die Lebensqualität einer betroffenen Person stark ein und können schwerwiegende Folgen haben. Für eine erfolgreiche Behandlung sowie Prävention muss der Knochenstoffwechsel grundlegend verstanden werden. Trotz zahlreicher Erkenntnisse in den letzten Jahrzehnten ist uns die Komplexität vieler Prozesse unzureichend bekannt, wie z.B. die Entstehung von Pseudarthrosen oder Degradationsprozesse in der rheumatoiden Arthritis (RA). Ferner stellt die Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe weiterhin eine große Herausforderung dar. In diesen Bereich übersteigen der Bedarf und die Notwendigkeit an Medikamenten und Ersatzstoffen immer noch die bisherigen Möglichkeiten. Aus diesem Grund ist die Erforschung der Frakturheilung, bei der durch körpereigene Mechanismen große Mengen von neuem Knorpel- und Knochengewebe hergestellt wird, von großer Bedeutung. Für eine optimale Frakturheilung müssen die biologischen und biomechanischen Bedingungen stimmen. Unter optimalen Umständen kann die Heilung des Gewebes ohne Narbenbildung sowie Erreichen der Ursprungsform und der Funktionalität auftreten<sup>1</sup>. Folglich gilt die Frakturheilung als ein sehr gutes Modell, an dem grundlegende Regulationsmechanismen des Knochenumbaus, sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch im entzündlichen Kontext, erforscht und Fortschritte zur Behandlung von Erkrankungen des Skelettsystems erzielt werden.

### **1.1.1 Phasen der Frakturheilung**

Unser heutiges Wissen über die Frakturheilung resultiert größtenteils aus Tierversuchen. In

kleinen Tieren, wie z. B. Nagetieren, verläuft die Frakturheilung schneller und mit einer höheren Regenerationskapazität als bei großen Tieren bzw. Menschen<sup>2</sup>. Jedoch sind die grundlegenden Mechanismen identisch. Nach dem Bruch eines Knochens können zwei Formen der Frakturheilung beobachtet werden: die direkte (primäre) und die indirekte (sekundäre) Frakturheilung<sup>1,3</sup>. Die direkte Heilung ist die möglichst angestrebte Form nach einem chirurgischen Eingriff. Die Frakturfragmente werden in eine anatomiegerechte Position gebracht, in der sich bei einer rigiden Stabilisierung direkt Knochengewebe bildet<sup>3,4</sup>. Entweder wird hierbei der kleine Frakturspalt direkt durch spongiösen Knochen aufgefüllt (Spaltheilung) oder die Frakturenden werden durch Verzapfung der Osteone, meist durch Kompression herbeigeführt, so in räumliche Nähe gebracht, dass Osteoklasten kleine Resorptionskanäle bilden, in die wiederum Osteoblasten hinein wandern und eine stabilisierende Knochenmatrix bilden (Kontaktheilung).

Die indirekte Form ist die am häufigsten vorkommende Art der Heilung. Sie ist charakterisiert durch einen größeren Frakturspalt und/oder eine stärker ausgeprägte Beweglichkeit der Frakturfragmente<sup>1</sup>. Hierbei wird zunächst ein stabilisierender Kallus um den Frakturspalt gebildet, der erst sekundär in Knochengewebe umgewandelt wird. Die indirekte Frakturheilung kann in drei Phasen unterteilt werden, die sich zeitlich überlappen (Abb. 1). Zunächst tritt die Inflammationsphase ein, gefolgt von der Reparaturphase, in der ein weicher Frakturkallus gebildet wird, der zum größten Teil aus Knorpelgewebe besteht. Dieser weiche Kallus wird anschließend in einen harten Kallus, bestehend aus Geflechtknochen, umgebaut. Abschließend tritt die Remodelingphase ein, die über einen sehr langen Zeitraum von Monaten bis Jahre erfolgt, bis der Knochen annähernd seine ursprüngliche Geometrie und Funktion erreicht<sup>5,6</sup>. Im Zuge der Frakturheilung werden viele Prozesse, die während der embryonalen Skelettentwicklung und des Wachstums stattfinden, rekapituliert<sup>5,7</sup>. Ein wichtiger Unterschied findet sich jedoch in der frühen Phase der Heilung, in der inflammatorische Mechanismen dominieren, die während der Embryonalentwicklung so nicht auftreten. Der sehr komplexe Heilungsprozess unterliegt der Regulation durch verschiedenste Signalmoleküle, die in drei Hauptgruppen unterteilt werden können: 1. proinflammatorische Zytokine, 2. Wachstumsfaktoren und 3. Angiogenese-fördernde Signalmoleküle<sup>6,8-10</sup>. Im folgenden Teil der Arbeit werden die drei Phasen der Frakturheilung genauer charakterisiert.



**Abb. 1: Stadien der Frakturheilung**

Die Phasen der Frakturheilung, deren relative zeitliche Dauer und die Kallusmorphologie im Verlauf des Heilungsprozesses sind schematisch dargestellt. Unmittelbar nach der Fraktur bildet sich ein Hämatom und die Inflammationsphase wird durch die Zell- und Gewebeschäden eingeleitet. Die Kaskade der Entzündungsreaktion induziert die Bildung des Granulationskallus, in den Blutgefäße einsproießen und mesenchymale Zellen einwandern. Distal der Frakturrenden bildet sich trabekulärer Knochen (Geflechtknochen) mittels intramembranöser Ossifikation. Frakturspaltnah erfolgt die enchondrale Ossifikation. Hierbei bildet sich zunächst Knorpelgewebe, das anschließend abgebaut und durch trabekulären Knochen ersetzt wird. Nachdem die Fraktur durch eine knöcherne Brücke stabilisiert ist, wird während der Remodelingphase der Geflechtknochen ab- bzw. umgebaut bis die ursprüngliche Form und Funktion erreicht ist (modifiziert nach Claes *et al.* 2012 und Einhorn 2005).

### 1.1.1.1 Inflammationsphase

Durch die Fraktur zerreißen Blutgefäße im Knochen und in den meisten Fällen auch im benachbarten Gewebe. Dies führt zur Bildung eines Hämatoms im Frakturspalt und eine Entzündungsreaktion, begleitet von einer Gerinnungskaskade, wird ausgelöst (Abb. 1). Durch die unterbrochene Blutversorgung entsteht eine lokale Hypoxie und gleichzeitig sinkt der pH-Wert, wodurch die Entzündungsreaktion noch verstärkt wird<sup>1,11</sup>. In das verletzte Gewebe wandern Entzündungszellen ein. Die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten (auch als polymorphkernige Neutrophile bezeichnet) gehören zu den ersten Entzündungszellen, die durch tote Zellen und Zelltrümmer rekrutiert werden<sup>12,13</sup>. Diese Zellen wiederum produzieren



verschiedene Chemokine und Zytokine, wie z.B. Interleukin-6 (IL-6) und *C-C motif chemokine* (CCL2), wodurch Makrophagen angelockt werden<sup>14,15</sup>. Des Weiteren wandern Lymphozyten ein. Die aktivierten Entzündungszellen produzieren zahlreiche Botenstoffe. Innerhalb der ersten 24 Stunden erreichen die Zytokine Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ) maximale Konzentrationen<sup>16,17</sup>. Diese primäre Entzündungsreaktion initiiert die darauf einsetzende Reparaturkaskade<sup>6,8,9</sup>. Zusätzlich setzen Thrombozyten Signalstoffe wie z.B. *Transforming growth factor beta* (TGF $\beta$ ) und *Platelet-derived growth factor* (PDGF) frei, die die Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSZ) fördern<sup>4</sup>. Ein weiterer essentieller Schritt während der Frakturheilung ist die Angiogenese<sup>1,18</sup>. Einer der bedeutendsten Transkriptionsfaktoren der Angiogenese ist der *Heterodimer hypoxia inducible factor-1* (HIF1), der aus einer  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit besteht. Unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen wird in der Regel die Untereinheit HIF1- $\alpha$  ubiquitiniert und degradiert. Unter Hypoxie jedoch wird HIF1- $\alpha$  stabilisiert, interagiert mit der Untereinheit HIF1- $\beta$  und gelangt als Dimer in den Zellkern. Zahlreiche Gene unterliegen so der Regulation durch HIF1. Auf diese Weise wird auch die Expression von zwei wichtigen Angiogenese-fördernden Faktoren hochreguliert, Angiopoetin-1 und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF).

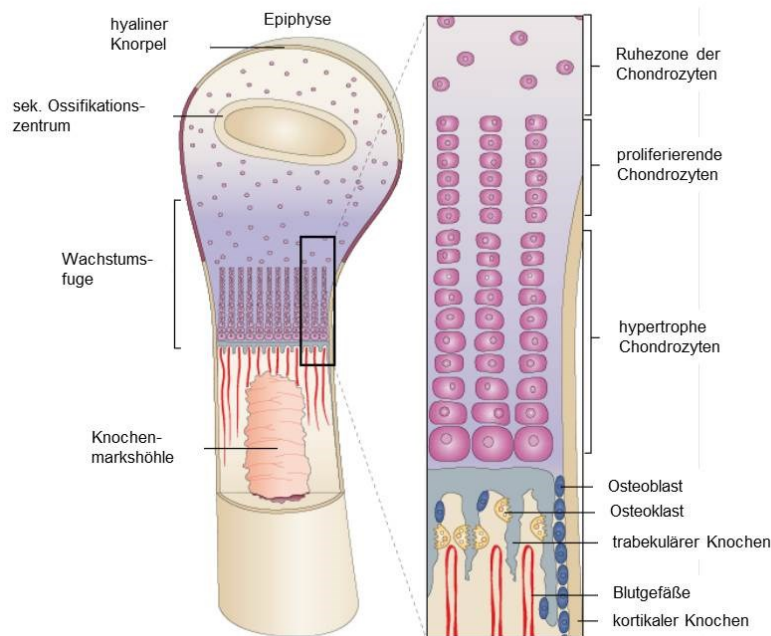
#### **1.1.1.2 Reparaturphase: Bildung des weichen Frakturkallus (Knorpelkallus)**

Über neu gebildete Gefäße können zum einen Zelltrümmer und Abfallprodukte abtransportiert werden und zum anderen Zellen, Nährstoffe und Mediatoren in das beschädigte Gewebe gelangen<sup>19</sup>. Außerdem wird die Normoxie wiederhergestellt. Durch einwandernde Fibroblasten wird zunächst ein Granulationsgewebe gebildet, wobei das Frakturhämatom als Gerüst dient (Abb. 1). Nach der zunächst hohen Konzentration von Zytokinen im geschädigten Gewebe folgt nun eine Reduktion der Entzündungsreaktion, allerdings wird phasenweise die Expression von spezifischen Zytokinen erneut hochreguliert. Zum Beispiel erreicht die Konzentration von IL-1 $\beta$  und IL-6 innerhalb der ersten 24 Stunden ein Maximum und steigt während der Remodeling-Phase erneut an<sup>9,17</sup>. Auch die Expressionslevel von TNF $\alpha$  sowie seiner spezifischen TNF $\alpha$ -Rezeptoren (p55 und p75) verlaufen biphasisch. Analog zu IL-1 $\beta$  und IL-6 erreicht die Hochregulation zu Beginn der Inflammation ihr Maximum, jedoch können auch noch nach 7 Tagen während der Frakturheilung hohe mRNA-Werte gemessen werden<sup>20</sup>. Ein erneuter Peak der TNF $\alpha$ -Expression erfolgt während des weiteren Umbaus des weichen Kallus sowie während des

Remodelings. Während der indirekten (sekundären) Frakturheilung wird nicht in allen Bereichen zunächst Knorpelgewebe gebildet, sondern teilweise direkt Knochenmatrix produziert. Es können also beide Formen der Knochenbildung beobachtet werden: die intramembranöse und die enchondrale Ossifikation (Abb. 1)<sup>4</sup>. Die intramembranöse Ossifikation startet frakturspaltfern in Bereichen geringer interfragmentärer Bewegung<sup>8,9</sup>. Aus dem Periost stammende osteoblastäre Vorläuferzellen differenzieren zu Osteoblasten und bilden direkt sogenannte trabekuläre Knochenstrukturen. Zeitgleich erfolgt die enchondrale Ossifikation, während der mesenchymale Vorläuferzellen zu Chondroblasten differenzieren und das Granulationsgewebe durch Knorpel ersetzen. Die Ausbildung von Knorpelgewebe findet näher zum Frakturspalt statt, wo eine höhere Mobilität zu finden ist. Durch die hohe interfragmentäre Beweglichkeit wird vermutet, dass die Neoangiogenese vermindert wird, wodurch in diesen Bereichen eine niedrige Sauerstoffkonzentration herrscht, was wiederum die Differenzierung von MSZ zu Chondroblasten begünstigt<sup>1</sup>. Die Kallusgröße sowie der Anteil an Knorpelgewebe hängen von der interfragmentären Beweglichkeit ab. Je instabiler eine Fraktur ist, desto stärker ist die enchondrale Ossifikation ausgeprägt und desto mehr Kallusgewebe wird zur Stabilisierung um den Frakturspalt gebildet, was zu einer verzögerten Frakturheilung führen kann<sup>21</sup>. Jedoch kann ab einer zu stark ausgeprägten interfragmentären Beweglichkeit wiederum eine verminderte Kallusbildung eintreten, woraus sich häufig eine sogenannte Pseudarthrose entwickelt. Als Pseudarthrose bezeichnet man ein Ausbleiben der knöchernen Überbrückung im Anschluss einer Fraktur, die zur pathologischen Beweglichkeit des Knochens bei fehlender Heilung führt.

Die eingewanderten MSZ differenzieren zu Chondrozyten, die zunächst proliferieren und durch die verstärkte Synthese spezifischer extrazellulärer Matrix (EZM)-Proteine um sich herum das Knorpelgewebe bilden. Klassische Markerproteine für dieses Differenzierungsstadium sind Kollagen II und das Proteoglykan Aggrekan, deren Expressionen zwischen dem 7. und 9. Tag der Frakturheilung in der Maus am stärksten ausgeprägt sind<sup>22-25</sup>. Nach 9 Tagen erreicht der Frakturkallus die maximale Größe. Während der späten Differenzierung der Chondrozyten, die zu diesem Zeitpunkt zirkulär von einer dicken Schicht selbstproduzierter EZM umgeben sind, ändert sich ihre Morphologie und sie werden hypertroph. Typisch für die hypertrophe Phase der Differenzierung ist die Synthese von Kollagen X. Im weiteren Verlauf scheiden sie vermehrt Kalzium aus und ihre EZM mineralisiert. Anschließend gehen die Zellen in Apoptose über<sup>23,26,27</sup>. Eine in diesem Zusammenhang hochinteressante Entdeckung war die Erkenntnis, dass innerhalb des

weichen Knorpelkallus die verschiedenen Stadien der Chondrozyten-Reifung denen in der Wachstumsfuge entsprechen (Abb. 2)<sup>6,7</sup>. Die temporale Synthese verschiedener Matrixproteine je nach Differenzierungsstadium, die den typischen Aufbau und die Vernetzung der einzigartigen Knorpelmatrix gewährleistet, sowie der Umbau des Knorpels in Knochen, erfolgen während der Frakturheilung analog zu den Vorgängen der Skelettentwicklung. Aufgrund des identischen Ablaufs rekapituliert die Frakturheilung Prozesse der embryonalen Knochenbildung bzw. der postnatalen Skelettentwicklung<sup>6</sup>.



**Abb. 2: Schematische Darstellung einer Wachstumsfuge**

Dargestellt sind die Phasen der Differenzierung der Chondrozyten innerhalb einer Wachstumsfuge bis zum Knorpelabbau und zum Aufbau von trabekulären Knochen (modifiziert nach Page-McCaw *et al.* 2007).

### 1.1.1.3 Reparaturphase: Bildung des harten Frakturkallus (Trabekulärer Kallus)

Das Knorpelgewebe überbrückt nach der Bildung des weichen Kallus den gesamten Frakturspalt, wodurch die Beweglichkeit an den Frakturenden sinkt und sich positiv auf die Revaskularisierung auswirkt<sup>1</sup>. Das Einsprießen von neuen Blutgefäßen ist ein kritischer Schritt für den Umbau des Knorpelgewebes in Geflechtknochen<sup>5</sup>. Während der enchondralen Ossifikation wird der zunächst gefäßfreie Knorpelkallus zu einem hoch vaskulären Gewebe umgebaut, in dem vorübergehend eine Hypervaskulierung vorzufinden ist<sup>1,28</sup>. Über neu

gebildete Kapillare wandern zu einen mesenchymale Stammzellen ein, die zu Osteoblasten differenzieren, und zum anderen Monozyten-Makrophagen, die zu den späteren Matrixabbauenden Osteoklasten reifen. In vielen Veröffentlichungen werden Osteoklasten als Osteoklasten-ähnliche Zellen bzw. Chondroblasten bezeichnet, wenn sie die Knorpelmatrix abbauen. Jedoch ist es sehr umstritten, ob es sich in diesem Fall wirklich um einen anderen Zelltyp handelt<sup>26,29</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wird nicht zwischen den knochen- und knorpelabbauenden Zellen unterschieden. Sie werden im Folgenden als Osteoklasten bezeichnet. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die die mineralisierte Matrix des Knochens und des Knorpels abbauen können<sup>30,31</sup>. Die initiale Induktion der Differenzierung der Monozyten-Makrophagen erfolgt unter der Kontrolle des *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)<sup>32</sup>. M-CSF wird von zahlreichen Zellen wie Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Myoblasten und Osteoblasten produziert. Er gilt als Überlebensfaktor für die Monozyten, Gewebsmakrophagen und deren Vorläuferzellen. Des Weiteren ist M-CSF ein Schlüsselregulator der Proliferation und Differenzierung dieser Zellen. Die weitere Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten werden durch den *Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand* (RANKL), der an den zelleigenen *Receptor activator of nuklear factor- $\kappa$ B* (RANK) bindet, stimuliert<sup>30,33</sup>. RANKL wurde nach dem intrazellulären Zielgen *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells B* (NF- $\kappa$ B) benannt und wird von zahlreichen Knochenzellen sowie nicht-skelettalen Zellen (z.B. Osteoblasten, Endothelzellen, T-Lymphoblasten) exprimiert. Die Expression dieser beiden für die Osteoklastogenese essentiellen Zytokine unterliegt einem biphasischen Verlauf. RANKL und M-CSF werden, wie auch IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ , in der Entzündungsphase und während der Degradation des mineralisierten Knorpels vermehrt synthetisiert<sup>9</sup>.

Aktive Osteoklasten treten in direkten Kontakt mit der Knochenoberfläche und bilden ein abgeschlossenes Kompartiment zur Knochenresorption (Resorptionslakune oder Howship Lakune). Innerhalb der Lakune erfolgt eine Absenkung des pH-Wertes durch Freisetzung von Protonen und Chloridionen<sup>30,33</sup>. Dies führt zur Herauslösung der Hydroxylapatit-Kristalle aus der extrazellulären Matrix (EZM). Anschließend wird die organische Matrix durch proteolytische Enzyme, wie z.B. Cathepsin K, saure Phosphatase und Metalloproteasen, abgebaut. In die Resorptionslakunen der Osteoklasten wandern dann mesenchymal abstammende Osteoblasten ein und füllen diese mit Knochenmatrix auf, wodurch der typische Geflechtknochen mit seinen trabekulären Strukturen gebildet wird. Zwischen den Trabekeln bilden sich das Knochenmark und zahlreiche kleine Blutgefäße (Abb. 1). In einem

Zeitraum von 25 bis 28 Tagen nach der Frakturierung ist in der Maus der Prozess des Umbaus des Knorpelkallus in den harten, trabekelhaltigen Frakturkallus in der Regel abgeschlossen.

#### 1.1.1.4 Remodelingphase

In der letzten Phase der Frakturheilung wird der harte Kallus von außen nach innen abgebaut, bis der Knochen seine ursprüngliche Form und Stabilität wieder erreicht hat. Der Geflechtknochen wird nun mit der steigenden Belastung und den so auf den Knochen wirkenden Druck- und Zugkräften in einen geordneten, lamellaren Knochen umgebaut. Zu diesem Zeitpunkt liegt eine hohe Osteoklasten-Aktivität vor, die an der äußeren Seite des Kallus am stärksten ausgeprägt ist. Gleichzeitig kann eine hohe Expression der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  beobachtet werden<sup>17</sup>. Beide Zytokine wirken positiv auf die Osteoklastogenese und werden von Entzündungszellen und von mesenchymalen Zellen synthetisiert<sup>8</sup>. Ebenfalls können sie selbst bei diesen Zellen die Expression von RANKL und zum Teil von M-CSF induzieren, wodurch sie über einen indirekten Mechanismus auf die Osteoklastogenese wirken. Jedoch nehmen beide Faktoren auch einen direkten Einfluss auf die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen. IL-1 $\beta$  gilt als ein Mediator, der die RANKL-induzierte Osteoklastogenese in Bezug auf die Fusion der Vorläuferzellen zu multinukleären Osteoklasten sowie deren Aktivität und Überleben steigert<sup>30</sup>. Durch die Bindung von IL-1 $\beta$  an den Rezeptor Interleukin-1 Rezeptor 1 (IL-1R1), einer von zwei spezifischen IL-1 Oberflächenrezeptoren, wird unter anderem die Expression des Fusionsrezeptors *Osteoclast-associated receptor* (OSCAR) und des Aktivitätsproteins *Tartrat-resistant acid phosphatase* (TRAP) in Osteoklasten hochreguliert<sup>34</sup>. Allerdings kann IL-1 $\beta$  in Abwesenheit von RANKL die Osteoklastogenese von Knochenmarkszellen nicht selbstständig induzieren. Der Grund für die unzureichende Stimulation liegt wahrscheinlich in dem geringen Vorhandensein von IL-1R1, der erst während der Differenzierung vermehrt exprimiert wird. Die Arbeitsgruppe von Kim konnte die Differenzierung der Zellen unter alleiniger IL-1 $\beta$ -Stimulation durch die Überexpression von dem Rezeptor IL-1R1 bzw. durch die Überexpression des Osteoklasten typischen Transkriptionsfaktor c-fos auslösen<sup>34</sup>. Die Expression von c-fos wird normalerweise durch RANKL induziert, wobei c-fos wiederum die Expression von IL-1R1 induziert.

TNF $\alpha$  scheint die Osteoklastogenese in jedem Stadium der Differenzierung beeinflussen zu können. Jedoch ist heute weiterhin umstritten, ob dieser Effekt auch unabhängig von RANKL erfolgen kann. Für M-CSF konnte ebenfalls dieser Effekt gezeigt werden. Die Expression des

Rezeptors für M-CSF (cFMS) wird unter  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation in Monozyten hochreguliert, wodurch sie aufgrund der hohen Rezeptordichte sensitiver auf geringere Konzentrationen von M-CSF reagieren<sup>35,36</sup>. Des Weiteren erhöht  $\text{TNF}\alpha$  die Expression von RANK in Osteoklasten-Vorläuferzellen und fördert das Überleben reifer Osteoklasten sowie die Zirkulation von Vorläuferzellen in der Blutbahn<sup>37,38</sup>. Allerdings scheint dieses Zytokin keinen direkten Einfluss auf die Aktivität der Zellen auszuüben wie  $\text{IL-1}\beta$ , sondern nur auf das Überleben und die Differenzierung dieses Zelltyps.

In dieser Phase der Frakturheilung ist jedoch nicht nur die Regulation der Osteoklasten-Differenzierung wichtig, sondern auch die der Osteoblasten, da ein gut aufeinander abgestimmter Auf- und Abbau des harten Kallus erfolgen muss. In diesem Fall wirken viele induzierende oder hemmende Signalstoffe auf die Differenzierung der Osteoblasten. Verschiedenste Signalwege werden synergistisch aktiviert oder inaktiviert bzw. temporal hintereinander geschaltet, wie z.B. der Wnt-Signalweg, der *Bone morphogenetic proteins* (BMP)-Signalweg, der *Fibroblast growth factor* (FGF)-Signalweg oder der *Transforming growth factor beta* ( $\text{TGF}\beta$ )-Signalweg<sup>6,39-41</sup>. Während ihrer Differenzierung produzieren die Osteoblasten zunächst eine stark vernetzte EZM, die zu 90 % aus Kollagen I besteht und den organischen Anteil des Knochens darstellt. In einem späteren Differenzierungsstadium dieses Zelltyps wird diese Matrix durch Einlagerung von Kalzium- und Phosphationen mineralisiert. Durch die Vernetzung und Mineralisierung der Matrix erhält der Knochen seine Stabilität und Härte, sowie auch ein gewisses Maß an Elastizität.

### **1.1.2 Degradation der Knorpelmatrix**

Ein entscheidender Prozess während der Frakturheilung ist die Degradation des Knorpels. Erst wenn der knorpelige Anteil in Knochengewebe umgebaut ist, erreicht der Knochen seine ursprüngliche Stabilität wieder. Dieser Umbauprozess ist komplex und unterliegt einer exakten Regulation, da die Stabilität der Bruchstelle nicht vermindert werden darf. Ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau führt zu einem pathologischen Verlauf der Heilung, z.B. dem Eintreten einer Pseudarthrose. Für die Degradation der Knorpelmatrix sind verschiedene, proteolytische Enzyme notwendig. Abgebaut werden muss zum einen ein mineralisiertes Gewebe und zum anderen eine stark vernetzte Matrix, die hauptsächlich aus Proteoglykanen (z.B. Aggrecan, Perlecan) und Faserproteinen (z.B. Kollagen II, Kollagen I) besteht. In diesem Fall handelt es sich um die identischen Proteasen, die ebenfalls für den Knorpelabbau während der Skelettentwicklung verantwortlich sind<sup>6,28,42,43</sup>. Zwei der

wichtigsten proteolytischen Enzym-Familien zur Degradation der EZM sind Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif* (ADAMTS)<sup>28,44</sup>.

### 1.1.2.1 Matrix-Metalloproteasen

Die MMPs bilden mit über 20 Mitgliedern eine der größten Proteasen-Familien. Die Klassifizierung der MMPs erfolgt basierend auf ihrer strukturellen Domänenanordnung und ihrer Substratspezifität. Sie werden in Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), Matrilysine (MMP-7, MMP-26), membrangebundene (*membrane type*-MMP = MT-MMP, MT1-MMP etc.) und andere MMPs (MMP-19, etc.) unterteilt<sup>42,43,45</sup>.

Durch die Behandlung von 1-2 Wochen alten Mäusen mit einem unspezifischen MMP-Inhibitor (GM60001) konnte die Bedeutung von MMPs während der Osteogenese gezeigt werden<sup>28,43</sup>. Diese Mäuse wiesen eine starke Störung in der Knochenentwicklung auf, besonders der Abbau der Knorpelmatrix war verzögert. In der Wachstumsfuge war die Zone an hypertrophen Chondrozyten verlängert und eine geringere Bildung von Knochengewebe war zu beobachten<sup>28</sup>. Während der Frakturheilung zeigten adulte Mäuse unter Behandlung mit dem MMP-Inhibitor ebenfalls eine verzögerte Frakturheilung, in der nach 14 Tagen ein signifikant erhöhter Anteil an Knorpelgewebe und eine geringere Menge an Geflechtknochen innerhalb des Frakturkallus zu messen war<sup>46</sup>. MMPs scheinen während der enchondralen Ossifikation im Wachstum sowie in dem adulten Tier nach einer Fraktur eine entscheidende Funktion zu übernehmen. Durch die Generierung von gentechnisch veränderten Mäusen stellte sich die bedeutende Rolle von zwei Proteasen dar: MMP-13 und MMP-9<sup>47-51</sup>. MMP-13- und die MMP-9-defiziente Maus wiesen eine verzögerte Degradation des Knorpelgewebes innerhalb der Reparaturphase der Frakturheilung auf, was sich ebenfalls in der Wachstumsfuge während der Skelettentwicklung widerspiegelte<sup>28</sup>.

Beide Enzyme können Aggrekan spalten, jedoch nur MMP-13 kann auch fibrilläres Kollagen, wie z.B. Kollagen II der Knorpelmatrix, abbauen. Das degradierte Kollagen kann dann wiederum auch von MMP-9 weiter verdaut werden. MMP-13 wird von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten sezerniert, wohingegen MMP-9 von Osteoklasten, Endothelzellen, Entzündungszellen und zum Teil von mesenchymalen Zellen synthetisiert wird<sup>48,50,51</sup>. Die Synthese der MMPs durch verschiedene Zelltypen ermöglicht eine temporal und lokal unterschiedliche Regulation der Knorpeldegradation, wodurch eine synergistische

Zusammenarbeit von MMP-13 und MMP-9 in Bereich des Kollagenabbaus gewährleistet wird<sup>47</sup>.

#### **1.1.2.2 *A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motif* (ADAMTS)**

Eine weitere Gruppe von Proteasen, die in den letzten Jahren im Rahmen des Abbaus von Knorpelmatrix erforscht wurde, sind die *A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin motif* (ADAMTS). Sie sind bekannt für ihre Progression von Prokollagenen und für die Degradation von Aggrecan, Versican, Brevican und Neurocan. ADAMTS umfasst im menschlichen Organismus eine Gruppe von mehr als 19 Mitgliedern, die sich durch einen ähnlichen molekularen Aufbau auszeichnen<sup>52</sup>. Die Familie der ADAMTS spielt während der Entwicklung, der Zellmobilität, der Angiogenese, der Koagulation und der Progression von Osteoarthritis (OA) eine funktionelle Rolle<sup>53,54</sup>.

Nach dem Nachweis von ADAMTS4 (auch als Aggrecanase 1 bekannt) und ADAMTS5 (Aggrecanase 2 oder ADAMTS11) im physiologischen Knorpelgewebe und im Knorpelgewebe sowie in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten scheinen die beiden Proteasen in der Degradation des Knorpelgewebes involviert zu sein<sup>55,56</sup>. In einem murinen OA-Modell konnte das Ausschalten des ADAMTS5-Gens vor einem starken Abbau der Knorpelmatrix schützen, wohingegen das Fehlen von ADAMTS4 keine Prävention vor der inflammationsbedingten Degradation ausübt<sup>56-58</sup>. Die Expression und die Aktivität beider Proteine können durch Zytokine, wie z.B. IL-1, TNF $\alpha$  oder TGF $\beta$ , beeinflusst werden und werden selbst während der Frakturheilung hochreguliert<sup>53,55,59,60</sup>. Die Arbeitsgruppe von Gerstenfeld konnte während der Frakturheilung eine Hochregulation der Expression verschiedener Mitglieder der ADAMTS-Familie zeigen, wobei jedoch ADAMTS4 am stärksten reguliert wurde<sup>59</sup>. Bereits drei Tage nach der Frakturierung konnte ein deutlicher Anstieg an ADAMTS4-mRNA-Gehalt gemessen werden, der ein Maximum am Anfang der Reparatur-Phase zeigte.

#### **1.1.2.3 Regulation der Proteasen-Aktivität**

Die Expression und die Aktivität der Proteasen unterliegen einer Reihe von Kontrollmechanismen und posttranskriptionellen Proteinmodifikationen. Des Weiteren produziert der Organismus Inhibitoren, wodurch unter physiologischen Bedingungen ein

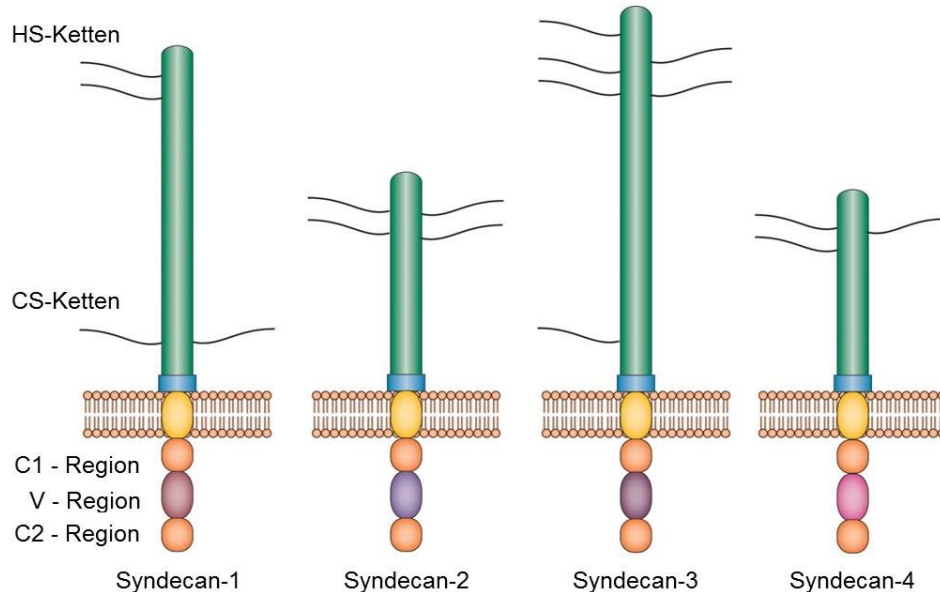


Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau erreicht wird. Wie komplex diese Regulation im Organismus gestaltet ist, zeigt die Aktivierung von MMP-2 (Gelatinase-A). Die Membran-gebundene MT1-MMP (auch MMP-14 genannt) bildet mit dem MMP-Inhibitor *Tissue inhibitors of metalloproteinases 2* (TIMP-2) und dem Propeptid von MMP-2 einen Komplex<sup>61</sup>. Erst dann kann das so gebundene Pro-MMP-2 durch ein TIMP-2-freies MT1-MMP aktiviert werden, indem die Pro-Sequenz von MMP-2 (Asn<sup>37</sup>-Leu<sup>38</sup>) hydrolysiert und anschließend autokatalytisch abgespalten wird (Asn<sup>80</sup>-Tyr<sup>81</sup>). Die Aktivierung hängt stark von den einzelnen Konzentrationen der drei MMPs bzw. von der Konzentration der frei vorliegenden MT1-MMP ab.

Eine weitere Proteinfamilie scheint eine regulierende Funktion auf die Proteasen-Aktivität auszuüben. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde immer wieder ein Einfluss von Syndecan auf die Expression, Aktivität und Lokalisation von Proteasen beschrieben<sup>62-65</sup>. Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit wird diese Gruppe von Proteoglykanen näher dargestellt.

## 1.2 Syndecan - ein integrales Heparansulfat-Proteoglykan

Syndecane sind zwischen 20 und 40 kDa große Type1-Transmembranproteine (*singlepass* Transmembranprotein), die zu den Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) gehören (Abb. 3)<sup>66,67</sup>. Die Familie der Syndecane umfasst bei Säugetieren insgesamt vier Mitglieder, Syndecan-1 (CD138), Syndecan-2 (Fibroglycan), Syndecan-3 (N-syndecan) und Syndecan-4 (Amphiglycan/Ryudocan), während bei Invertebraten wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* nur jeweils ein Syndecan gebildet wird<sup>68,69</sup>. Der Name Syndecan stammt aus dem Griechischen von „*syndein*“ ab und bedeutet verbinden/verknüpfen, was die Aufgabe dieser Proteoglykangruppe darstellt. Als transmembraner Rezeptor verbindet das Molekül den extrazellulären Raum mit dem Zytoskelett der Zelle. Die gebundenen, langen Zuckerketten ermöglichen einen weitreichenden Interaktionsraum mit zahlreichen, verschiedenen Partnern. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteinfamilie sehr viele zelluläre Prozesse beeinflussen kann, wie z.B. Genexpression, Proliferation, Apoptose, Adhäsion, Differenzierung, Zellmorphologie und -mobilität<sup>66,70-73</sup>.



**Abb. 3: Die Syndecan-Familie**

Die vier Mitglieder der Syndecan-Familie besitzen die gleiche Grundstruktur. Das Hauptprotein kann in eine extrazelluläre, transmembrane und zytosolische Domäne unterteilt werden. An die extrazelluläre Domäne binden Heparansulfat-Ketten (HS-Ketten) und in einigen Fällen auch Chondroitinsulfat-Ketten (CS-Ketten). Die zytosolische Domäne besteht aus zwei sehr homologen Regionen, die C1- und C2-Region, sowie einer variablen (V-) Region (modifiziert nach Pap & Bertrand 2013).

Obwohl die meisten Zellen mehrere Mitglieder der Syndecan-Familie besitzen, zeigt sich ein charakteristisches Gewebe-, Entwicklungs- und Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster. Syndecan-1 befindet sich vor allem in Epithelzellen und Plasmazellen, Syndecan-2 ist in Fibroblasten sowie in Endothelgewebe und Syndecan-3 ist hauptsächlich im Nervensystem zu finden. Syndecan-4 ist ein ubiquitäres Protein und wird in vergleichsweise geringen Mengen exprimiert. Starke Veränderungen in der Expression der Syndecane konnten während des Wachstums und der Differenzierung beobachtet werden<sup>66,74</sup>. In Invertebraten ist das einzige vorkommende Syndecan für die neuronale Entwicklung und Ausrichtung der Axone essentiell, wohingegen das Ausschalten einzelner Syndecane in Mäusen keinen starken Phänotyp in der Entwicklung zeigt<sup>75,76</sup>. Die entsprechenden *knock out*-Mäuse sind lebensfähig und können sich fortpflanzen, jedoch treten unterschiedlichste Defekte unter Stress bzw. in pathologischen Prozessen auf. Zum Beispiel zeigen die Syndecan-1- und die Syndecan-4-defiziente Mäuse eine veränderte Wundheilung, Angiogenese und Inflammation<sup>69,77</sup>. Die Syndecan-3-defizienten Mäuse weisen Defizite im Lern- und Erinnerungsvermögen auf. Über Syndecan-2-defiziente Mäuse gibt es bisher keine Veröffentlichungen.

### 1.2.1 Proteinstruktur der Syndecane

Alle vier Syndecane zeichnen eine identische Grundstruktur aus (Abb. 3). Sie bestehen aus einem Core-Protein, das in eine lange extrazelluläre, eine hochkonservierte zytoplasmatische und eine intrazelluläre Domäne unterteilt werden kann<sup>66,68</sup>. Die zytoplasmatische Domäne ist sehr kurz und kann wiederum in drei Regionen unterteilt werden (C1, C2 und V). Zwischen C1 und C2, die fast identische Sequenzen zwischen den einzelnen Mitgliedern der Proteinfamilie aufweisen, liegt die variable Domäne. Sie ist für jedes Syndecan-Molekül unterschiedlich zusammengesetzt und ist bis heute nur für Syndecan-4 gut untersucht. In der C2-Domäne befindet sich bei allen Syndecanen eine EFYA-Sequenz (Glu-Phe-Tyr-Ala), die die Interaktion mit verschiedenen PDZ-bindenden Proteinen, wie z.B. Syntenin, CASK und Synectin, vermittelt und so die Bindung multimolekularer Komplexe an das Aktin-Zytoskelett ermöglicht<sup>78</sup>. Bis heute ist nur zwischen Syndecan-4 und  $\alpha$ -Actin eine direkte Interaktion beschrieben worden<sup>79</sup>. Des Weiteren beinhalten alle Syndecane in den intrazellulären, konservierten Domänen eine Serin- und drei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen<sup>69,80</sup>.

Die extrazelluläre Domäne der Syndecane zeichnet sich durch die kovalente Bindung von linearen Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) aus. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Heparansulfat-Ketten, die zellspezifisch sehr stark in ihrer Länge und Zusammensetzung variieren können<sup>66,81</sup>. Die Ketten bestehen aus 50 bis 200 Disacchariden und binden kovalent an einen Serinrest des Core-Proteins<sup>76</sup>. Nach einer typischen Anfangssequenz der Ketten aus vier Sacchariden (Glukuronyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Galaktosyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Galaktosyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-Xylosyl- $\beta$ -1-O-(Serin)) folgen sich wiederholende Disaccharid-Einheiten, bestehend aus den Zuckersäuren Glucuronsäure oder Iduronsäure und einem N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) oder/und Galactosaminrest (GalN), die an verschiedenen Positionen sulfatiert werden. Die Modifizierung der GAG erfolgt nicht nur intrazellulär im Golgi-Apparat, sondern auch extrazellulär durch Sulfotransferasen und Epimerasen. Bis heute ist noch ungewiss, unter welcher Regulation die Zusammensetzung und spätere Abwandlung stehen. Die Differenzierung der einzelnen Zellen sowie pathologische Prozesse scheinen Einfluss auf diese späte extrazelluläre Modifikation auszuüben<sup>66</sup>. Des Weiteren binden Syndecan-1 und -3 auch Chondroitinsulfat-Ketten (CS). Vereinzelt wird ebenfalls für Syndecan-4 eine Bindung von CS-Ketten beschrieben<sup>66,68,82</sup>. Über die GAG-Ketten erfolgt die Interaktion mit einer Vielzahl von extrazellulären Matrixfaktoren, z.B. Fibronectin und Kollagen, sowie mit Wachstumsfaktoren, Chemokinen und Zytokinen<sup>70,77</sup>. Durch ihre Bindung erfolgt eine lokale Erhöhung der Konzentration und ihre Wirkung kann auf diese Weise reguliert werden (*fine*

*tuning*). Ferner wurde eine Oligomerisation von Syndecanen beobachtet. Für die Bildung von diesen Detergenz-restistenten Dimeren ist die transmembrane, konservierte Sequenz (GxxxG) essentiell<sup>72,83,84</sup>. Jedoch wird aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens verschiedener Homodimere eine weitere, extrazelluläre Region vermutet, die für die Dimerisierung verantwortlich ist und durch extrazelluläre Interaktionen modifiziert werden kann.

### **1.2.2 Syndecan als Co-Rezeptor und als eigenständiger Rezeptor**

Zeitweise galten Syndecane hauptsächlich als Co-Rezeptoren spezifischer transmembraner Rezeptoren. Durch die Bindung spezifischer Liganden an ihre GAG-Ketten und die gleichzeitige Clusterung von Syndecan-Dimeren wird deren Konzentration lokal erhöht, wodurch eine Bindung an den spezifischen Rezeptor ermöglicht und stabilisiert wird. Die Interaktion von FGF2 und den GAG-Ketten der Syndecane zur Stabilisierung der Bindung zum spezifischen Rezeptor FGFR-1 war als einer der Ersten entdeckt worden<sup>85-87</sup>. Bis heute konnten zahlreiche Liganden identifiziert werden, die indirekt über die GAG-Ketten oder direkt an die Ektodomäne der Syndecane binden, z.B. OPG, VEGF, Wnt, MMPs, Fibronectin und Kollagen 1<sup>70,71,73,77,88,89</sup>. Darüber hinaus scheinen diese Proteoglykane ebenfalls selbst ein Signal über die Zellmembran zu erzeugen<sup>66,90,91</sup>. Die Übermittlung der Informationen der extrazellulären Umwelt, z.B. ausgelöst durch die Bindung eines Liganden, in das Innere der Zelle erfolgt durch Signal- und Adaptermoleküle, die mit der zytoplasmatischen Domäne der Syndecane assoziiert sind. Einerseits erzeugen sie dabei chemische Signale (z.B. Phosphorylierung von Signalmolekülen) und andererseits verändern sie durch die Verknüpfung bzw. das Lösen der Interaktion mit anderen Proteinen die Anordnung des Zytoskeletts.

### **1.2.3 Syndecan als Adhäsionsrezeptor**

In vielen Veröffentlichungen konnte eine funktionelle Kopplung der Syndecane an Integrine (ITG) gezeigt werden<sup>76,91</sup>. Die Interaktion von Syndecanen und Integrinen beeinflusst die Ausbildung von fokalen Kontakten und damit die Adhäsion, Migration, Form (*spreading*) und Kontraktilität der Zellen. Diese Verbindung kann sowohl direkt als auch indirekt über Adaptermoleküle erfolgen. Zum Beispiel ermöglicht eine kurze Sequenz der extrazellulären Domäne (NXIP-Motif) von Syndecan-4 die  $\beta_1$ -ITG abhängige Zelladhäsion<sup>92</sup>. Beauvais *et al.*

konnten die direkte Interaktion zwischen Syndecan-1 und  $\alpha_v\beta_3$  Integrin bzw.  $\alpha_v\beta_5$  Integrin zeigen<sup>93</sup>. Die Interaktion verschiedener Syndecane und Integrine wirkt sich auf die Stabilität der fokalen Kontakte aus und ist zellspezifisch sowie substratspezifisch für den Untergrund<sup>66,90,91,94,95</sup>.

#### **1.2.4 Syndecan vermittelte Endozytose**

In den letzten Jahren sprechen mehrere Publikationen für eine Beteiligung von Syndecanen an der Endozytose<sup>80,91,96,97</sup>. Unter Endozytose wird die Aufnahme eines extrazellulären Stoffes durch die Einstülpung der Zellmembran in das Zellinnere und anschließendes Abschnüren eines intrazellulären Vesikels verstanden. In vielen Fällen wird der so aufgenommene Stoff von einem Rezeptor gebunden und die Bildung des Endosoms wird eingeleitet. Des Weiteren kann die Endozytose auch zum Recyceln von Rezeptoren bzw. Membranproteinen dienen, wie z.B. die Wiederverwendung von Integrinen zur Ermöglichung einer schnellen Zellmigration. Durch die c-Src bedingte Phosphorylierung von Syndecan-4 kann die Stabilität von Adhäsionskomplexen sowie die Einleitung der Endozytose von Integrinen beeinflusst werden<sup>96</sup>. Die Phosphorylierungsstelle, die von Src aktiviert werden kann, befindet sich in der C1-Domäne (Tyrosin<sub>180</sub>) und ist bei allen Mitgliedern konserviert. Aufgrund dieser Tatsache wäre ein ähnlicher Mechanismus für alle Syndecan Mitglieder denkbar.

Die durch Syndecan vermittelte Aufnahme von Molekülen in das Zellinnere wird zurzeit schon in ersten Studien zur Krebstherapie des Multiplen Myeloms genutzt. Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung des Knochenmarks, in der eine unkontrollierte Vermehrung von B-Lymphozyten eintritt. Diese Entartung führt zu Störungen der Blutbildung und verursacht häufig Knochenlysen. Syndecan-1 wird von diesen Krebszellen in hohen Konzentrationen produziert. In der Therapie werden monoklonale Antikörper, die spezifisch an die extrazelluläre Domäne von Syndecan-1 binden, eingesetzt<sup>98,99</sup>. Der Antikörper ist mit dem zytotoxischen Maytansinoid-Derivat (DM4) gekoppelt und bildet so das Immunkonjugat BT-062 der Firma Biotest AG (Dreieich). Durch die Interaktion des Antikörpers mit Syndecan-1 wird die Internalisierung des Komplexes durch die Zielzelle ausgelöst. Nach der Endozytose des Konjugats wird DM4 intrazellulär freigesetzt, wo es durch seine zytotoxische Aktivität zum Zelltod führt.

### 1.2.5 *Shedding der Ectodomäne*

Zum einen sind Syndecane Oberflächenrezeptoren, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln und zu intrazellulären Signalen verarbeiten. Zum anderen können sie als lösliche Faktoren vorkommen. Durch das „*Shedding*“ der extrazellulären Domäne wird der lokale, autokrine Rezeptor zu einem parakrinen Signalpeptid. Einerseits kann so ein Gradient (Chemotaxis) gebildet werden und andererseits zügig ein Rezeptor bzw. gebundener Ligand beseitigt werden<sup>100,101</sup>. Als Sheddasen sind die Proteasen der MMPs und ADAMTS bekannt, die die komplette Ectodomäne mit den gebundenen HS-Ketten abtrennen, sowie die Heparanasen und Endosulphatasen, die nur innerhalb der gebundenen Seitenketten schneiden können<sup>102,103</sup>. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sind bekannt für das *Shedden* der Syndecane 1, 2 und 4. Syndecan-1 kann auch durch MMP-7, MT1-MMP oder MT3-MMP extrazellulär abgespalten werden. Die beiden Serinproteasen Thrombin und Plasmin sowie ADAMTS1 sind ebenfalls als Sheddasen für Syndecan-4 beschrieben<sup>104</sup>. Innerhalb ihrer extrazellulären Domäne besitzen die einzelnen Proteoglykane mehrere Schnittstellen, die zwischen den einzelnen Spezies in den meisten Fällen konserviert sind<sup>102</sup>. Die Homologie der Schnittstellen lässt auf eine evolutionär lang bestehende Funktion des *Sheddings* schließen.

### 1.2.6 *Syndecan-1*

Während der Embryogenese konnte Syndecan-1 schon in sehr frühen Entwicklungsstadien detektiert werden. Es wird innerhalb des Ektoderms während der Gastrulation, im Mesoderm während der axialen Differenzierung und während der Differenzierung der Trophoblasten (Zellen, die den embryonalen Teil der Plazenta bilden) exprimiert<sup>105</sup>. Im erwachsenen Organismus wird Syndecan-1 hauptsächlich in Plasmazellen und von Zellen des Epithelgewebes exprimiert<sup>106</sup>. Sanderson *et al.* konnten am Beispiel der B-Lymphozyten zeigen, dass die Expression von Syndecan nicht nur zellspezifisch, sondern auch abhängig vom Differenzierungsstadium einer Zelle ist<sup>107</sup>. Vorläuferzellen der B-Lymphozyten zeigten innerhalb des Knochenmarks eine Expression von Syndecan-1. Reife, zirkulierende B-Lymphozyten synthetisierten dieses Proteoglykan jedoch nicht mehr. Dagegen exprimieren immobile Plasmazellen, die Antikörper produzierten, erneut Syndecan-1. Des Weiteren wird eine Hochregulation von Syndecan-1 innerhalb pathologischer Prozesse beobachtet, wie z.B. nach einem Herzinfarkt, nach Infektion, während der Wundheilung und in einigen Krebszellen (z.B. Prostatakrebs, Brustkrebs, Multiples Myelom)<sup>65,100,108</sup>. Durch den *knock out* dieses

Proteins zeigten Mäuse unter induzierten Erkrankungen häufig stärker ausgeprägte pathologische Phänotypen, z.B. eine erhöhte Sterblichkeit nach einer induzierten Colitis oder bakteriellen Sepsis<sup>109-111</sup>. In vielen Experimenten konnte die Bedeutung von Syndecan-1 für die Rekrutierung und das Einwandern von Entzündungszellen gezeigt werden. Li *et al.* untersuchten in einem murinen Entzündungsmodell der Lunge die Syndecan-1 abhängige Migration von neutrophilen Granulozyten<sup>100</sup>. Die Epithelzellen der Bronchialgänge, die durch die lokale Behandlung mit dem Zytostatikum Bleomycin verletzt wurden, induzierten eine Entzündungsreaktion und sekretierten Chemokine. Hauptsächlich wird das CXC-Chemokin KC produziert, das funktionell homolog zu dem humanen Interleukin (IL-8) ist und zu der *Growth regulated protein*-Gruppe gehört. KC bindet extrazellulär an Syndecan-1, das wiederum durch die Protease MMP-7 abgespalten wird. Das gescheddete Syndecan-1 stellt nun einen löslichen Komplex mit dem gebundenen Chemokin KC dar und bildet einen chemischen Gradienten (Chemotaxis), der neutrophile Zellen aus den Gefäßen in das Lumen der Bronchialgänge zum Herd der Entzündung einwandern lässt.

Weitere Untersuchungen wiesen nicht nur eine funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der transepithelialen Migration auf, sondern auch während der transendothelien Migration sowie einen inhibierenden Effekt auf die Adhäsion von Leukozyten auf Endothelzellen<sup>69,112</sup>. Syndecan-1 übernimmt während der Regulierung von Entzündungsprozessen bzw. der Rekrutierung von Entzündungszellen in Bezug auf Stärke, Lokalisation und Dauer eine wichtige Rolle. Ein Fehlen von Syndecan-1 führt häufig zu einer überschießenden lokalen Immunantwort, die sich negativ auf den Heilungsverlauf auswirkt<sup>69</sup>. Des Weiteren scheint Syndecan-1 ebenfalls direkt das Remodeling der EZM zu beeinflussen. Nach einem induzierten Herzinfarkt war in der Syndecan-1-defizienten Maus ein stärkerer Abbau des nekrotischen Gewebes und eine vermehrte Kollagenproduktion zu beobachten<sup>65</sup>. Jedoch war die Qualität der Matrix schlechter. Sie bestand aus ungeordneten und kürzeren Kollagenfragmenten aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen den Proteasen MMP-2/9 und der aktivierten Transglutaminase, die einzelne Kollagene quervernetzt. Ebenso spielt Syndecan-1 eine wichtige Rolle während der Wundheilung. Das Fehlen sowie die Überexpression von Syndecan-1 führten zu einer verzögerten Heilung<sup>113</sup>. Durch diese Experimente wird deutlich, dass Syndecan-1 Prozesse der Regenerierung modellieren kann. Jedoch müssen dabei die Konzentrationen und Lokalisation sowie das „Shedding“ dieses Proteins aufeinander abgestimmt sein.

Mehrere Publikationen sprechen auch für einen Einfluss von Syndecan-1 auf die Aktivität von

Proteasen. In der Wundflüssigkeit von Hautwunden kann durch „Shedding“ generiertes lösliches Syndecan-1 die neutrophilen Proteasen Elastase und Cathepsin G binden, wodurch deren Inhibierung vermieden wird<sup>62</sup>. Mittels Syndecan kann anscheinend das Gleichgewicht zwischen aktivierten und inhibierten Proteasen reguliert werden.

Interessant scheint auch die funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der Frakturheilung zu sein. Die Expression von Syndecan-1 wird während der Frakturheilung zu einem Zeitpunkt hoher Proteasen-Aktivität, hochreguliert<sup>114</sup>. Wie bereits für die Wundheilung beschrieben konnte Syndecan-1 ebenfalls in der Frakturheilung die Aktivität von Proteasen modulieren.

### **1.2.7 Syndecan-4**

Syndecan-4 besteht aus einem 22 kDa großen Core-Protein, an dessen N-terminalen Ende der extrazellulären Domäne drei GAG-Ketten binden können<sup>115</sup>. Die extrazelluläre und die cytosolische Domäne sind zu 70 % identisch mit Syndecan-2, während Syndecan-1 und -3 eine geringere Ähnlichkeit zu Syndecan-4 aufweisen<sup>73</sup>.

Eine besondere Eigenschaft von Syndecan-4, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie, ist die Aktivierung der Proteinkinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ )<sup>72</sup>. Die variable Domäne der intrazellulären Region kann sich mit Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) verbinden, was eine Dimerisierung bzw. Clusterbildung von Syndecan-4 begünstigt<sup>116</sup>. Durch die Bindung von Syndecan-4 mit PIP<sub>2</sub> kann wiederum die PKC $\alpha$  gebunden und aktiviert werden<sup>117</sup>. In zahlreichen Publikationen konnte die Aktivierung kleiner GTPasen (RhoA, RhoG und Rac1) und der Focal Adhesion Kinase (FAK) durch Syndecan-4 gezeigt werden, die Auswirkung auf die Adhäsion und Migration von Zellen hatte<sup>97</sup>. Des Weiteren kann auch der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg durch Syndecan-4 aktiviert werden<sup>118</sup>.

Analog zur Syndecan-1 *knock out*-Maus ist die Syndecan-4-defiziente Maus vital und fertil. Unter pathologischen Bedingungen jedoch führt das Fehlen dieses Proteoglykans ebenfalls zu starken Auffälligkeiten, vergleichbar mit der Sdc1<sup>-/-</sup>-Maus. Zum Beispiel zeigen beide Genotypen eine Wundheilungsstörung, obwohl verschiedenen Zelltypen die beiden Syndecane während der Heilung exprimieren. Syndecan-4 wird hauptsächlich von Fibroblasten produziert, wohingegen Syndecan-1 in Keratinozyten und Endothelzellen nachgewiesen wurde<sup>109,119</sup>. Das Fehlen dieser integralen Proteine führt in beiden Zelltypen zu einer verzögerten Migration. Interessant ist, dass beide Proteoglykane gesheddet in der



Wundflüssigkeit zu finden sind, wo sie wahrscheinlich synergistische Funktionen zur optimalen Heilung ausüben<sup>120</sup>. Nach einem Herzinfarkt ist Syndecan-4 wie auch Syndecan-1 in wichtige Reparaturmechanismen involviert. Die Expression beider Proteine wird infolge des Infarkts hochreguliert, allerdings wieder in verschiedenen Zelltypen. Syndecan-1 wird hauptsächlich von Entzündungszellen und vaskulären Zellen exprimiert, wohingegen Syndecan-4 in Kardiomyozyten zu finden ist<sup>65,118</sup>. Syndecan-4 scheint das Überleben dieser Herzmuskelzellen nach einer Ischämie zu unterstützen und schützt so vor großen Gewebeschäden des Herzens<sup>118,121</sup>.

Eine weitere funktionelle Übereinstimmung der beiden Proteoglykane ist in der Bindung von Proteasen und somit der Stabilisierung ihrer Aktivität zu finden. Innerhalb der Nucleus pulposus, der die gallertartige Masse im Zentrum der Bandscheibe bildet, bestehend aus einem großen Anteil an Proteoglykanen und Hyaluronsäure, konnte eine Hochregulation von Syndecan-4 und ADAMTS5 im entzündlichen Kontext beobachtet werden<sup>122</sup>. Des Weiteren scheint Syndecan-4 mittels der Heparansulfatketten mit ADAMTS-5 zu interagieren und seine Aktivität zu erhöhen (gemessen anhand von Aggrecan-Abbauprodukten). Die Arbeitsgruppe von Pap konnte in einem murinen Osteoarthritis-Model identische Beobachtungen machen. Der Verlust von Syndecan-4 in gentechnisch veränderten Mäusen sowie die Hemmung von Syndecan-4 mittels spezifischer Antikörper schützten vor dem Abbau des Gelenkknorpels nach Induktion einer Osteoarthritis<sup>64</sup>. Die Aggrecanase ADAMTS-5, die als eine der Hauptaggrecanasen für den pathologischen Knorpelabbau verantwortlich ist, scheint durch die fehlende Interaktion mit Syndecan-4 eine geringere Aktivität zu zeigen. Die Expression der Protease MMP-3, induziert durch Interleukin-1, war in diesem Modell ebenfalls reduziert. Es wird vermutet, dass MMP-3 synergistisch mit Syndecan-4 die Aktivität von ADAMTS-5 reguliert.

Jedoch nicht nur im entzündlichen Kontext scheint Syndecan-4 eine Rolle während der Knorpeldegradation auszuüben. Während der Entwicklung der Röhrenknochen innerhalb der Embryogenese konnte eine Promotoraktivität von Syndecan-4 in allen Stadien der Chondrozyten-Differenzierung beobachtet werden<sup>123</sup>. Die sogenannte enchondrale Ossifikation, während der zunächst Knorpelgewebe gebildet wird, welches im Anschluss in Knochengewebe umgebaut wird, findet während der Skelettentwicklung und der Frakturheilung statt (s. Kap. 1.1.1.2). Da Syndecan-4 in allen Stadien der Chondrozyten-Differenzierung exprimiert wird und dieses Protein im entzündlichen Kontext von Heilungs-

prozessen an Bedeutung zunimmt, könnte es ebenfalls eine bedeutsame, modulierende Funktion während der Frakturheilung ausüben.

## 2 ZIEL DER ARBEIT

Die Frakturheilung ist ein Reparaturvorgang, der Prozesse der Embryogenese rekapituliert, jedoch zusätzlich eine wichtige inflammatorische Komponente zeigt. Während der Heilung werden aus mesenchymalen Zellen verschiedene Gewebearten aufgebaut und im Verlauf wieder ab- bzw. umgebaut. Durch das grundlegende Verständnis dieser einzelnen Vorgänge könnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die zukünftig zur Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe sowie der Inhibierung des pathologischen Abbaus von Gewebe dienen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 und Syndecan-4 während der Frakturheilung untersucht. Die beiden Proteoglykane sind an zahlreichen Heilungs- und Reparaturprozessen beteiligt. Aufgrund der Vielfältigkeit ihrer Bindungspartner und daraus resultierenden verschiedenen Reaktionen moduliert die Familie der Syndecane sehr viele physiologische sowie pathologische Prozesse. Der Hauptfokus dieser Arbeit wurde auf den Umbau des weichen Knorpelkallus in den harten Frakturkallus bestehend aus Geflechtknochen gelegt. Hierbei wurde die Zusammensetzung des Frakturgewebes und die Synthese spezifischer Proteasen in der Syndecan-1 bzw. Syndecan-4-defizienten Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren analysiert. Erste Ergebnisse wiesen auf eine Funktion von Syndecan-1 innerhalb der Osteoklastogenese hin, woraufhin die Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten *in vitro* sowie *in vivo* unter dem Verlust von Syndecan-1 erforscht wurde. Im Weiteren wurde der Knochenphänotyp der Syndecan-1-defizienten Maus in der vorliegenden Arbeit charakterisiert.

Für Syndecan-4 konnten Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung in der frühen Phase der Frakturheilung gefunden werden. In weiterführenden Versuchen wurden zum einen der Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion und der Expression von Syndecan-4 *in vitro* untersucht. Zum anderen wurde der Verlauf der Frakturheilung unter dem Verlust von Syndecan-4 und einer verminderten Inflammation betrachtet. Hierzu wurde das gebildete TNF $\alpha$ , das eines der Hauptzytokine innerhalb der Frakturheilung darstellt, mittels eines monoklonalen Antikörpers inaktiviert und so die TNF $\alpha$  Konzentration im Organismus gesenkt.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Reagenzien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (München), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim) und Roth (Karlsruhe) in Analyse- bzw. Reinstqualität bezogen.

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wie Zellkulturflaschen, Lochplatten und Zellschaber wurden von der Firma Greiner-Bio-one (Frickenhausen) bezogen. 5, 15 und 50 ml Falconröhrchen sowie Einwegpipetten wurden von BD Biosciences (Heidelberg) und Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml und 2 ml) von Eppendorf (Hamburg) verwendet. Sterilfilter wurden von Sartorius (Göttingen) und Pipettentips sowie Filtertips verschiedener Größen von Eppendorf (Hamburg) erworben. Für die Anfertigung der Paraffinschnitte wurden Mikrotom-Klingen N35 der Firma Feather Safety Rezor (Osaka, Japan) sowie Super Frost Objektträger der Firma R. Langenbrück (Teningen) benutzt. Auch sonstige allgemeine Verbrauchsmaterialien stammten von diesen Herstellern.

##### 3.1.3 Geräte

Die aufgeführten Geräte (Tab. 1) wurden für mehrere Versuche verwendet und werden im Kapitel Methoden nicht explizit aufgeführt.

**Tab. 1: Zusammenstellung der verwendeten Laborgeräte**

| Gerät                                    | Hersteller                            |
|--|---------------------------------------|
| Autoklav HV-25I                          | HMC Europe, Engelsberg                |
| Bio Photometer                           | Eppendorf, Hamburg                    |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator HERA cell 150 | Kendro, Langenselbold                 |
| Elisa reader Sunrise                     | Tecan, Crailsheim                     |
| Eismaschine Frimon AF80                  | Scotsmann, Pogliano Milanese, Italien |
| Filterabzug Captair®                     | Erlab, Köln                           |

|  |  |
|--|--|
| Folienschweiß-Gerät  | Hawo, Mosbach  |
| Gefrierschränke (-20°C)  | Liebherr, Ochsenhausen   |
| Standgefrierschrank MDF (-80°C)  | Sanyo, Wood Dale, Illinois, USA                                    |
| Gelelektrophorese-System   | Biometra, Göttingen  |
| IN-VIVO MS FX Pro (Röntgengerät)   | Carestream, Stuttgart  |
| Infinity Dokumentationssystem Modell 1000  | Peqlab Biotechnologie, Erlangen                                    |
| Issue Cool Plate COP20   | Medite, Berlin   |
| Kamera: Digitalkamera Power Shot G5<br>Megapixelkamera CCD-Kamera                  | Canon, Krefeld<br>Digital Video Company, Berlin                    |
| Kleintier Röntgen In-Vivo DXS Pro Imaging  | Carestream, Stuttgart  |
| Kraftmessdose Metek®   | Lloyd Instruments, Meerbusch                                       |
| Kühlplatte Cop 20  | Medite, Burgdorf   |
| Kühlschrank  | LecMedical, Merseyside UK  |
| Magnetrührer MR3002  | Heidolph, Schwabach  |
| Materialprüfmaschine LR5K Plus   | Lloyd Instruments, Meerbusch                                       |
| Digitaler Messschieber   | Mitutoyo, Neuss  |
| Mikroskope: Inverses Mikroskop AE31<br>Mikroskop BX31<br>Mikroskop CKX41           | Motic DEutschland, Wetzlar<br>Olympus, Hamburg<br>Olympus, Hamburg |
| Mikrotome: Paraffin Mikrotom RM2145<br>Technovit Mikrotom RM2165<br>CryoStar NX 70 | Leica, Wetzlar<br>Leica, Wetzlar<br>Thermo Scientific Schwerte     |
| 1420 Multilabel Counter Victor3  | Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim                                     |
| Multipipette Research Pro  | Eppendorf, Hamburg   |
| Paraffinbehälter mit Wärmeplatte EG112   | Leica, Wetzlar   |
| Paraffin Streckbad TFB   | Medite, Burgdorf   |
| PCR: PCR-Cycler<br>Real time PCR Biorad  | Eppendorf, Hamburg<br>Biorad Laboratories GmbH, München            |
| pH-Meter MP125   | Mettler-Toledo, Gießen   |
| Pipetus®   | Hirschmann, Eberstadt  |
| Rotator Compact Line OV4   | Biometra, Göttingen  |
| Schüttler SM-30  | Edmund Bühler, Hechingen   |
| Sterilbank Hera safe   | Heraeus, Hanau   |
| Trockenschrank   | Memmert, Schwabach   |
| Vortexer REAX Top  | Heidolph, Schwabach  |
| Wärmeschrank   | Binder   |

|                                    |                         |
|------------------------------------|-------------------------|
| Waage BL150S                       | Sartorius AG, Göttingen |
| Wasserbad Sonorex RK 100H          | Memmert, Schwabach      |
| Zentrifugen: Zentrifugen Mini Spin | Eppendorf, Hamburg      |
| Zentrifuge 4K15                    | Sigma-Aldrich, Hamburg  |
| Zentrifuge 5415R                   | Eppendorf, Hamburg      |
| Tischzentrifuge Galaxy Mini        | Eppendorf, Hamburg      |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R           | Haraeus, Hanau          |

### 3.1.4 Computer Software

Die in Tab. 2 aufgeführten Programme wurden verwendet.

**Tab. 2: Zusammenstellung der verwendeten Computer Software**

| Software              | Hersteller                                     |
|-----------------------|--|
| Catman® 4.5           | HBM, Darmstadt                                 |
| EndNote X4            | Thomson Reuters, New York, USA                 |
| GraphPad Prism4       | GraphPad Inc., San Diego, Kalifornien, USA     |
| ImagePro®Plus 7.0     | Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA      |
| Nexygen™ MT v4.5      | Lloyd Instruments, West Sussex, Großbritannien |
| Microsoft Office 2010 | Microsoft, Redmond, USA                        |
| Photoshop 7.0         | Adobe Systems GmbH, München                    |

### 3.1.5 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Die Bezeichnungen und Zusammensetzungen der Puffer, Lösungen und Nährmedien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in der Tab. 3 aufgelistet. Alle Lösungen sowie Puffer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, soweit nichts anderes angegeben ist, angesetzt.

**Tab. 3: Bezeichnungen und Zusammensetzungen der Puffer, Lösungen und Nährmedien**

| <b>Bezeichnung</b>                | <b>Zusammensetzung</b>   |
|-----------------------------------|--|
| Adipozyten-Kulturmedium           | 20 % fetales Kälber Serum (FKS; Gibco Invitrogen, Karlsruhe; v/v)<br>100 U/ml Penicillin/Streptomycin (v/v)<br>2 mM L-Glutamin (v/v)<br>1 mM Dexamethason (gelöst in Methanol)<br>25 mM Insulin (v/v)<br>0,5 mM 3-Isobuthyl-1-methylaxanthin (gelöst in DMSO)<br>in DMEM high Glucose (PAA Laboratories, Pasching)   |
| Alizarinrot-S-Lösung              | 0,5 % Alizarin-Red-S (w/v)<br>pH-Wert wurde mit HCl auf 4,0 eingestellt  |
| Alizarin-Entfärber                | 10 % Cetylpyridinium (w/v)   |
| ALP-Nachweisreagenz               | 0,1 mg/ml Naphthol As-MX-Phosphat (w/v)<br>gelöst in 100 µl DMF<br>1 mg/ml Fast red Violet LB Salt (w/v)<br>gelöst in 100 mM Tris/HCl, pH 8,2  |
| Chondroblasten-Kulturmedium       | 10 % FCS<br>100 U/ml Penicillin/Streptomycin (v/v)<br>2 mM L-Glutamin (v/v)<br>10 ng /ml TGFβ3 (Peprotech, Hamburg)<br>37,5 µg/ml L-Ascorbat (w/v)<br>100 nM Dexamethason (gelöst in Methanol)<br>0,3 mM L-Proline (w/v)<br>ITS Premix 100X (BD Biosciences, Konzentration: 6,25 µg/ml Insulin, 6,25 µg/ml Transferrin, 6,25 µg/ml Selen, 5,33 µg Linolsäure, 1,25 mg/ml FCS)<br>1 mM Natriumpyruvat (w/v) |
| MTT-Lösung                        | 0,5 % MTT (w/v) gelöst in PBS,<br>anschließend steril filtriert  |
| MTT-Detergens                     | 20 % SDS (w/v)<br>50 % DMF (v/v)   |
| Natriumkarbonat-Formaldehydlösung | 2 M Natriumkarbonat (w/v)<br>9,25 % Formaldehyd (v/v)  |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Osteoblasten-Kulturmedium   | 10 % FKS (v/v)<br>100 U/ml Penicillin-Streptomycin Lösung (v/v)<br>10 nM Dexamethason (gelöst in Methanol)<br>0,2 mM L-Ascorbat-2-Phosphat (w/v)<br>10 mM $\beta$ -Glycerolphosphat (w/v)<br>in $\alpha$ MEM (PAA Laboratories, Pasching)         |
| Osteoklasten-Färbelösung I  | 9 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub><br>100 $\mu$ l Naphthol AS-BI Phosphatsäure<br>400 $\mu$ l Acetat<br>200 $\mu$ l Tartrat-Lösung   |
| Osteoklasten-Färbelösung II | 100 $\mu$ l Fast Garnet GBC Basislösung<br>100 $\mu$ l Natriumnitrit-Lösung   |
| Osteoklasten-Fixierlösung   | 25 ml Citratsäure<br>65 ml Aceton<br>8 ml 37 % Formaldehyd  |
| PBS                         | 150 mM NaCl<br>2 mM KCl<br>2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O   |
| Red Oil O-Färbelösung       | 150 mg Oil Red O (Sigma, München) gelöst in 150 ml 99 % Ethanol;<br>kurz vor dem Gebrauch wird die Lösung 1:3 mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> verdünnt und nach 10 min Inkubation wurden ausfallende Farbaggregate durch Filtration entfernt |
| Sörensen-Phosphatpuffer     | 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat (Stammlösung A)<br>0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat (Stammlösung B)<br>Stammlösung A wird mit Stammlösung B auf den pH-Wert 7,38 im Verhältnis 1:4 eingestellt.   |
| 10x Tris-Puffer             | 13,5 M Tris<br>18,54 M Tris-HCl<br>0,67 M NaCl  |
| 100 mM Tris-HCl-Puffer      | 100 mM Tris<br>pH-Wert würde auf 8,2 – 8,5 mit HCl einstellen   |



### 3.1.6 Primer

Die in Tab. 4 und Tab. 5 angegebenen Primer wurden als Lyophilisat von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen, in DEPC behandeltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> rekonstituiert und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Die Primer-Sequenzen wurden mit dem Programm „Probe Finder Version 2.45“ von Roche (Mannheim) erstellt.

**Tab. 4: Sequenzen spezifischer Primer für die PCR-Amplifikation**

| Primer   | Sequenz 5' → 3'   | Länge [bp] |
|--|---|------------|
| <b>Cathepsin K</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i> | cgaaaagagcctagcgaaca<br>tggtagcagcagaaactg                | 67         |
| <b>DC-Stamp</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>    | gtatcggctcatctcctcca<br>actcctgggttctctgct                | 99         |
| <b>HPRT</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>        | tgatagatccattcctatgactgtaga<br>aagacattcttccagttaaagttgag | 126        |
| <b>MMP-2</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>       | ctggaatgccatccctgat<br>gcaccctgaagaagtagctatg             | 78         |
| <b>MMP-9</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>       | acgacatagacggcatcca<br>gctgtggttcagttgtggtg               | 87         |
| <b>SIRPα</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>       | ggagggggaacagaggctta<br>ttcacttctggtcaggtatgc             | 92         |
| <b>Syndecan-1</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>  | tctgggatgactctgacaac<br>tgccgtgacaaagtatctgg              | 68         |
| <b>Syndecan-2</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>  | ttcaggagtatatcctattgatgatga<br>actctctatgtctcatcagctcct   | 76         |
| <b>Syndecan-3</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>  | cagctccctcagaagagcat<br>accacgatcacggctac                 | 60         |
| <b>Syndecan-4</b><br><i>forward</i><br><i>reverse</i>  | ccctccctgaagtgattga<br>agttcctgggctctgagg                 | 98         |

**Tab. 5: Sequenzen spezifischer Primer für die Genotypisierung**

Die verschiedenen Primer wurden für die Bestimmung der Genotypen auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl pro Primer eingestellt.

| Primer   | Sequenz 5→3'  | Länge [bp]   |
|--|---|--|
| <b>Syndecan-1 Primer Mix:</b><br>SynF1 <i>forward</i><br>SynF2 <i>reverse</i><br>N3193 (neo cassette)                                  | cggcgaacctacagccctc<br>gcatcggcgagtggcgagtc<br>cgagactagtgagacgtgctactcc                            | 290 bp <i>sdc1</i> <sup>+/+</sup><br>459 bp <i>sdc1</i> <sup>-/-</sup>     |
| <b>Syndecan-4 Primer Mix:</b><br>Sdc4 Wildtype <i>forward</i><br><i>reverse</i><br><br>Sdc4 knock out <i>forward</i><br><i>reverse</i> | gtgccactggataaccacatccc<br>ctcaattctctcaaatggtg<br><br>ttagggccgcaagaaaactatcc<br>ggaacacggcgcatcag | 196 bp <i>sdc4</i> <sup>+/+</sup><br><br>657 bp <i>sdc4</i> <sup>-/-</sup> |

### 3.1.7 Antikörper

In Vorversuchen wurden die optimale Demaskierung der Epitope sowie die Konzentrationen für den jeweiligen Primär- bzw. Sekundärantikörper (Tab. 6) anhand der Hintergrundfärbung, Kreuzreaktionen und Ausmaß der spezifischen Detektion ermittelt. Bei jedem Durchlauf wurde eine Negativkontrolle zum Ausschluss falsch-positiver oder unspezifischer Färbereaktionen mitgeführt.

**Tab. 6: Verwendete Antikörper in der Immunhistologie**

| Antikörper             | Typ                    | Klonalität | Hersteller                           |
|------------------------|------------------------|------------|--------------------------------------|
| ADAMTS-4               | Kaninchen IgG          | polyclonal | Acris Antibodies GmbH, Herford       |
| Kaninchen IgG          | biotinyliert Ziege IgG | polyclonal | VECTOR Laboratories, Eching          |
| Kollagen II (Klon 6B3) | Maus IgG               | monoclonal | Millipore, Schwalbach                |
| Kollagen X (Klon X53)  | Maus IgG               | monoclonal | Quartett, Berlin                     |
| MMP9                   | Kaninchen IgG          | polyclonal | Abcam, Cambridge, UK                 |
| MMP13                  | Kaninchen IgG          | polyclonal | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| PCNA (Klon PC10)       | Maus IgG               | monoclonal | Dako, Hamburg                        |

### 3.2 Tiere

Es wurden Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6 der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA) verwendet. Die Syndecan-4 bzw. die Syndecan-1-defizienten wurden auf dem Hintergrund der C57BL/6 Mäuse generiert. Die Syndecan-4-defiziente Maus wurde von dem Institut für Experimentelle Muskuloskelettale Medizin unter Leitung von Prof. Dr. med. Thomas Pap zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Syndecan-4-defizienten Maus wurde eine *IRES- $\beta$ geo cassette* (*viral internal ribosome-entry site* mit *lacZ-neo<sup>R</sup>fusion gene  $\beta$ geo*) verwendet. Mittels homologer Rekombination konnte das Gen *sdc4* durch das Reportergen *lacZ* hinter die Syndecan-4 Promotorregion ersetzt werden<sup>119</sup>. Das Reportergen *lacZ* codiert das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, das aus dem Laktose-Stoffwechsel von Bakterien stammt und das Gen *neo* ist ein Neomycin-Resistenzgen. Durch Mikroinjektion wurde das veränderte Genom in Blastozysten eingesetzt und zur Herstellung von chimären Tieren in Zuchtmäuse eingepflanzt. Durch Rückkreuzung über 10 Generationen wurden homologe Syndecan-4 *knock-out* Mäuse gezüchtet.

Die Syndecan-1-defiziente Maus wurde von dem Forschungslabor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe an dem Universitätsklinikum Münster unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Martin Götte zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung der Syndecan-1-defizienten Maus wurde eine *PGKneo cassette* in die Signalsequenz des ersten Exons der Genomsequenz eingebracht und so ein *knock out* des Zielgens erreicht<sup>124,125</sup>. PGK codiert die Promotorregion der Phosphoglycerate Kinase, unter deren Regulation das Neomycin-Resistenzgen steht. Im Weiteren wurde wie bei der Herstellung der Syndecan-4-defizienten Maus durch Mikroinjektion das veränderte Genom in Blastozysten eingesetzt, diese wiederum in Zuchtmäuse eingepflanzt und mittels Rückkreuzung über 10 Generationen homologe, stabile Syndecan-1 *knock-out*-Mäuse erzeugt.

Alle Tierexperimente und die Haltung der Labortiere wurden entsprechen der Richtlinien des Tierschutzes des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrheinwestfalens durchgeführt (Tierversuchsgenehmigungen NR. G6/72006 und Nr. 84-02.04.2012.A066). Die Tiere wurden in kleinen Tiergruppen von maximal 4 Tieren in einem angereicherten Makrolon-Käfig Typ II bzw. von 6 Tieren in Makrolon-Käfig Typ III mit Streu, Nistmaterial und einer Plastikröhre gehalten. Sie erhielten *ad libitum* Zugang zu Standardfutter und Leitungswasser. Die Raumtemperatur (20°C), Luftfeuchtigkeit und der Tag-Nacht-Rhythmus (12/12 Stunden) wurden konstant gehalten.

### **3.3 Experimentelle Tierversuche**

Der Verlauf der Frakturheilung in *knock out* und Wildtyp Mäusen, nach experimentell induzierter Fraktur, wurde durch radiologische Untersuchungen, histomorphometrische und immunhistochemische Färbungen analysiert. Der Schwerpunkt war sowohl auf den Heilungsverlauf, auf die Differenzierung von Chondroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten als auch auf die Degradation des Kallusgewebes durch das Fehlen von Syndecan-4 bzw. Syndecan-1 gerichtet. In einem weiteren *in vivo*-Versuch wurde die initiale Entzündungsreaktion zu Beginn der Frakturheilung durch die Gabe eines blockierenden TNF $\alpha$ -Antikörpers gehemmt, sowie im Verlauf der Heilung durch die kontinuierliche Gabe des Antikörpers die TNF $\alpha$ -Konzentration im Tier reduziert. Durch diese Behandlung wurde die Bedeutung von Syndecan-4 im entzündlichen Kontext der Frakturheilung analysiert. Des Weiteren wurde der Knochenphänotyp von adulten und neonatalen Syndecan-1-defizienten Mäusen charakterisiert.

#### **3.3.1 Versuchstiergruppen**

Zur Charakterisierung des Knochenphänotyps wurden 16 Wochen alte weibliche Mäuse verwendet. Nach der Tötung der Tiere wurde ein Röntgenbild der gesamten Maus zur Erkennung von anatomischen Fehlbildungen bzw. Auffälligkeiten des Skeletts aufgenommen. Anschließend wurde der untere Bereich der Lendenwirbelsäule (3. bis 6. Lendenwirbel) mit dem Becken sowie die Tibia freipräpariert und der Technovit-Einbettung zugeführt. Im Rahmen der Frakturheilungsexperimente wurden pro Zeitpunkt, Genotyp und Behandlung 10 weibliche Tiere im Alter von 12 Wochen operiert (s. Tab. 7). Die geringere Tieranzahl im Ergebnisteil ist auf Komplikationen bei der Operation, z.B. Splitterbruch, zurückzuführen, woraufhin der Versuch abgebrochen wurde.

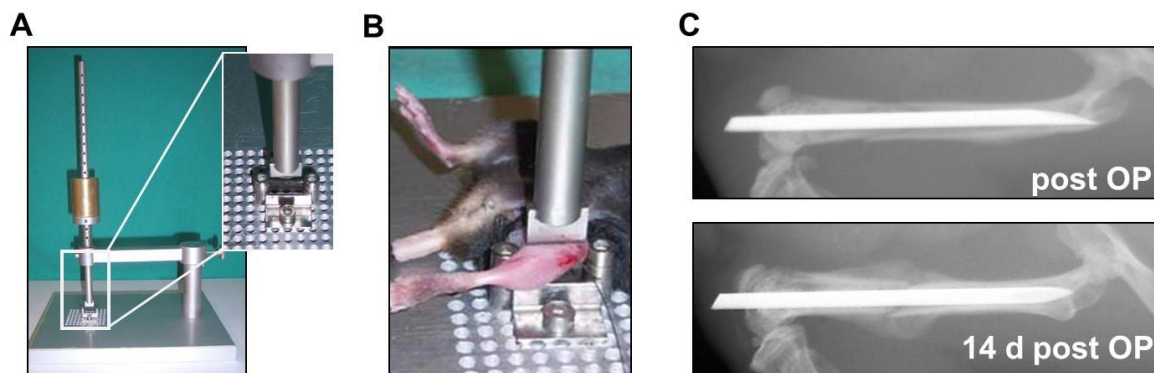
**Tab. 7: Übersicht der tierexperimentellen Versuche**

| Standzeitpunkt | Genotyp             | Behandlung        | Anzahl an Tieren |
|----------------|---------------------|-------------------|------------------|
| 7 d            | WT                  |                   | 10               |
|                | Sdc4 <sup>-/-</sup> |                   | 10               |
|                | WT                  | anti TNF $\alpha$ | 10               |
|                | Sdc4 <sup>-/-</sup> | anti TNF $\alpha$ | 10               |
| 14 d           | WT                  |                   | 10               |
|                | Sdc4 <sup>-/-</sup> |                   | 10               |
|                | Sdc1 <sup>-/-</sup> |                   | 10               |
|                | WT                  | anti TNF $\alpha$ | 10               |
|                | Sdc4 <sup>-/-</sup> | anti TNF $\alpha$ | 10               |
| 28 d           | WT                  |                   | 10               |
|                | Sdc4 <sup>-/-</sup> |                   | 10               |
|                | Sdc1 <sup>-/-</sup> |                   | 10               |

### 3.3.2 Eingriffe und Behandlungen an den Tieren

Operiert wurden ausschließlich eigens für Tierversuche gezüchtete Mäuse, die täglich an menschlichen Kontakt gewöhnt, betreut und medizinisch überwacht wurden. Alle Operationen und Untersuchungen fanden im Operationsbereich der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster statt und wurden von den erfahrenden Fachärzten Dr. med. Britta Wieskötter und Dr. med. Richard Stange durchgeführt. Zwölf Wochen alte, weibliche Mäuse wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektionen von Ketaminhydrochlorid 75 mg/kg Körpergewicht (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) und Xylazin 12 mg/kg Körpergewicht (Medistar®, 2 % ig, Medistar, Hozwickede) in Narkose versetzt. Die Augen der Mäuse wurden unter der Anästhesie mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bepanthen Vital GmbH, Leverkusen) vor dem Austrocknen geschützt. Eine Verlängerung der Anästhesie war durch Nachinjektion der halben Initialdosis möglich. Für den operativen Eingriff wurde das linke Bein im Bereich der Patella rasiert, desinfiziert und steril abgedeckt. Nach Inzision der Haut und Faszie parallel zur Patellasehne wurde mit einer sterilen G23-Kanüle (Durchmesser 0,6 mm, B&D Biosciences, Heidelberg) der Markraum zwischen den Kondylen des Femurs geöffnet und intramedullär ein Kanal retrograd vorgebohrt. Über die liegende Kanüle wurde ein feiner Führungsdraht (0,1 mm dicker Wolframdraht) vorgeschoben, der im Gegensatz zur Kanüle während der Fraktur im Markraum verblieb und im Anschluss als Führungshilfe zur Reposition des Femurs diente. Das zu operierende Bein wurde nun mittels einer Frakturmaschine (s. Abb. 4) standardisiert frakturiert (modifiziert nach Schmidmaier *et al.*, 2004<sup>126</sup>). Hierzu wurde der linke Ober-

schenkel auf die parallel verlaufenden Balken positioniert. Von oben berührte der Stempel die Schaftmitte des Femurs. Aus einer definierten Höhe von 8 cm wurde ein Gewicht von 220 g auf den Stempel fallen gelassen. Der Kraftimpuls, der durch das Gewicht ausgelöst wurde, führte zu einer Drei-Punkt-Biegung des Femurs, die in eine geschlossene Fraktur mit einem definierten Weichteilschaden resultierte. Anschließend wurde über den liegengebliebenen Führungsdraht eine G23 Kanüle als intramedullärer Kraftträger in den Markraum vorgeschoben und auf dieser Weise die Fraktur reponiert sowie stabilisiert. Das überstehende Ende der Kanüle wurde im Niveau der Kondylen abgetrennt und die Haut mit einer Einzelknopfnah (Prolene 5-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Nach Anlage eines Verbandes (Leukosilk®, BSN medical GmbH, Hamburg) erfolgte eine Röntgenkontrolle des reponierten Femurs. Intraoperativ und nach 24 h erhielten die Tiere subkutan das Schmerzmittel Rimadyl® (Carprofen, 2 mg/kg Körpergewicht, Pfizer, Berlin). Weitere Gaben erfolgten nach Bedarf postoperativ. Die Mäuse wurden mindestens einmal täglich auf ihr Wohlbefinden und auf die Wundverhältnisse visitiert. Zusätzlich wurde einmal pro Woche ihr Körpergewicht gemessen.



**Abb. 4: Frakturmaschine für Kleintiere** Darstellung der Frakturmaschine für Mäuse (A); positionierter Oberschenkel einer Maus (B); Röntgenbilder eines frakturierten Femurs mit intramedullären Kraftträger nach der OP sowie 14 Tage nach der Frakturierung (C).

Die Tiere der anti-TNF $\alpha$ -Behandlungsgruppe erhielten intraoperativ sowie alle 2 Tage intraperitoneal Certolizumab (10 mg/kg Körpergewicht; rekombinanter, monoklonaler Antikörper, Cimzia® UCB, Kanada).

Zu den Zeitpunkten 7, 14 und 28 Tagen postoperativ wurden die Tiere mit Isofluran® (Baxter, Unterschleißheim) narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Vor Entnahme des frakturierten Femurs wurden die Tiere geröntgt. Bei der Probeentnahme

wurde auf Entzündungszeichen, Verwachsungen und sonstige Auffälligkeiten im Bereich des operierten Gewebes geachtet. Die entnommenen Proben wurden anschließend zur Herstellung der Schnittpräparate aufbereitet (s. Kapitel 3.8).

## **3.4 Zellbiologische Methoden**

### **3.4.1 Zellkultur**

Jegliche verwendete Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Primäre Osteoprogenitor-Zellen sowie primäre Knochenmarkzellen, die zu Osteoklasten differenzierten, wurden in alpha Minimal Essential Medium ( $\alpha$ MEM) mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe) und primäre Knochenmarkzellen zur Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe) kultiviert. Alle verwendeten Medien wurden mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS, Gibco Invitrogen, Karlsruhe) und 1 % Penicillin-Streptomycin Lösung (Stocklösung 100x, Endkonzentration: Penicillin 100 Units/ml, Streptomycin 10  $\mu$ g/ml, PAA Laboratories, Cölbe) supplementiert. Das Medium der MSZ wurde zusätzlich wöchentlich mit 1 % L-Glutamin (Sigma, München) angereichert.

Bei Konfluenz der Zellen wurden diese mit 1x PBS gewaschen, mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories, Cölbe) versetzt und bis zum Ablösen der Zellen bei 37°C inkubiert. Die mesenchymalen Stammzellen wurden nach 3 min zusätzlich mit einem Zellschaber vorsichtig gelöst. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, gewaschen und in neue Zellkulturflaschen überführt bzw. für die entsprechenden Versuche eingesetzt. Zellzahlen wurden mittels Neubauer Zählkammer am Mikroskop ermittelt.

### **3.4.2 Isolierung Osteoprogenitor-Zellen aus neonatalen Calvarien**

Die osteogenen Progenitor-Zellen wurden aus den Calvarien von 3 bis 5 Tage alten, neugeborenen Mäusen isoliert (modifiziert nach Malaval *et al.*<sup>127</sup>; Bellows *et al.*<sup>128</sup>). Hierzu wurden die Tiere mit Isofloran® (Baxter, Unterschleißheim) betäubt und im Anschluss durch zervikale Dislokation getötet. Die Schädeldächer wurden frei präpariert, von Bindegewebe und Blutgerinnseln befreit und zerkleinert. Die Zellen von 4 bis 6 Calvarien wurden mittels eines sequenziellen, enzymatischen Verdau mit 2 mg/ml Dispase Grad II (Roche Diagnostik, Mannheim) und 1 mg/ml Kollagenase aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* (Sigma-

Aldrich, Hamburg) isoliert. Nach 20 min bei 37°C unter Rotation wurde der Überstand (20 ml) verworfen und die Schädeldächer erneut mit 30 ml Verdauungslösung für 30 min bei 37°C rotiert. Über ein 70 µm Zellsieb wurden größere Gewebstücke entfernt und anschließend die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen je nach Versuchsbedingung in einer bestimmten Zelldichte ausgesät. Zur Entfernung von Zelltrümmern bzw. toten Zellen wurde nach 24 h das Medium gewechselt und die Differenzierung mittels Osteoblasten-Kulturmedium (Tab. 3) induziert. In den Kontrollen wurden die Zellen nur in Kulturmedium inkubiert. Über den Versuchszeitraum erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel. Für die Versuche der Expressionsanalyse wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro *well* einer 6-well Platte gegeben. Für die Charakterisierung der Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Osteoblasten wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro *well* einer 12-well Platte ausgesät. Im Verlauf der Kultivierung wurden Proliferation und zellspezifische Funktionalität anhand der Mineralisierung der EZM untersucht.

### **3.4.3 Isolierung von Knochenmarkzellen und Differenzierung zu Osteoklasten**

Zur Bestimmung der Differenzierung von Vorläuferzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie zu reifen Osteoklasten wurden Knochenmarkzellen von sechs bis acht Wochen alten, männlichen Mäusen isoliert (modifiziert nach Binder *et al.*<sup>129</sup>). Durch die Inkubation mit zwei essentiellen Faktoren, M-CSF und RANKL, differenzierten die Vorläuferzellen innerhalb einer Woche zu reifen Osteoklasten. Die Mäuse wurden nach einer Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Tibia sowie Femur unter sterilen Bedingungen freipräpariert. Die Enden der Knochen wurden in Höhe der Epiphyse abgetrennt und das Knochenmark mit eiskaltem PBS mit Hilfe einer 27G-Kanüle (Becton Dickinson, Heidelberg) aus den Röhrenknochen herausgespült. Die gesammelte Spülflüssigkeit wurde über ein 40 µm Zellsieb filtriert und bei 1200 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet beinhaltete viele Erythrozyten, die im nächsten Schritt lysiert wurden. Hierzu wurde das Pellet in 1 ml *Red Blood Cell Lysing* Puffer (Sigma-Aldrich, Hamburg) resuspendiert und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension erneut mit 1200 rpm bei 4°C 5 min lang zentrifugiert. Nun erfolgten zwei weitere Waschschrte mit je 1 ml  $\alpha$ -MEM. Zum Schluss wurden die Zellen in Kulturmedium, dem 50 ng/ml M-CSF (rekombinant Maus / *E.coli*, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt) zugesetzt war, aufgenommen und in einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro *well* in einer 96-well Platte ausgesät. Pro *well*



wurde 200 µl Medium zum Kultivieren verwendet. Nach drei Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums. Diesem Kulturmedium waren zur weiteren Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen 30 ng/ml M-CSF und 50 ng/ml RANKL (rekombinant Maus / *E.coli*, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt) zugegeben. Am fünften Tag wurde erneut das Medium (30 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL) gewechselt. Für den Aktivitätstest wurden die isolierten Zellen auf ca. 1 mm hohe Dentinplättchen in einer 96-well-Platte ausgesät und für insgesamt 9 Tage kultiviert, wo zusätzlich am 7. Tag ein Mediumwechsel erfolgte. Als Dentinquelle diente ein Walzahn. Die Oberfläche der zurechtgesägten Dentinplättchen wurden im Vorfeld kurz mit feinem Schmirgelpapier (600er Körnung) geglättet und für 40 min in einem Ultraschallbad sowie mit 70 % Ethanol gereinigt.

#### **3.4.4 Isolation mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark**

Die Isolation des Knochenmarks erfolgte wie im Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Aufgrund der geringen Anzahl von MSZ im Knochenmark wurde auf die Lyse der Erythrozyten sowie auf anschließende Waschschriffe verzichtet. Das Zellpellet wurde direkt in MSZ-Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturflaschen ausgesät. Zweimal pro Woche wurde 50 % des Kulturmediums gewechselt. Nach ca. 3 bis 4 Wochen bildeten sich mehrere Zellhaufen von mesenchymalen Zellen und die Zellen konnten zum ersten Mal passagiert werden. Nach 3 bis 4 Passagen war in den Kulturen eine hohe Dichte von MSZ vorhanden und nur noch eine geringe Anzahl anderer Zelltypen des Knochenmarks. Zur Analyse der Multipotenz der isolierten Zellen wurde ihre Fähigkeit zu osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung überprüft. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 4 bis 9 eingesetzt.

#### **3.4.5 Osteogene Differenzierung**

Die MSZ wurden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen und die neonatalen Osteoprogenitor-Vorläuferzellen in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen in 12-well Platten ausgesät und nach 24 h die Differenzierung mittels Osteoblasten-Kulturmedium (Tab. 3) induziert. Die Differenzierung zu reifen Osteoblasten wurde anhand der Aktivität des Markerproteins Alkalische Phosphatase (ALP) und der Mineralisierung der EZM der Zellen nach 7, 15 und 25 Tagen gemessen.

### **3.4.6 Chondrogene Differenzierung**

Für die chondrogene Differenzierung wurden die MSCs in einer Pellet-Kultur mit 10 ng/ml TGF $\beta$ 3 (rekombinant Maus / *E.coli*, Peprotech, Hamburg) sowie zahlreichen weiteren Stimulanzen (Chondroblasten-Kulturmedium, s. Tab. 3) gezüchtet.  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in 500  $\mu$ l Medium in einem 15 ml Reaktionsgefäß für 8 min bei 600g zentrifugiert und das so entstandene Pellet bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Innerhalb der ersten 24 h löste sich das Pellet vom Gefäßrand und bildete ein kugelförmiges Zellaggregat, wodurch medial eine geringere Sauerstoffkonzentration erreicht wurde, die sich positiv auf die Differenzierung der Chondrozyten auswirkt. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 7 und 14 Tagen wurde das Pellet einmal mit PBS gewaschen, anschließend in Tissue Präp-Einbettmedium (Zeis, Oberkochen) eingebettet und bei -80°C gelagert. Zur Analyse der Differenzierung wurden 5 und 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte angefertigt, die bei -80°C gelagert wurden. Für die histologischen und immunhistologischen Färbungen wurden die Schnitte in eiskaltem Aceton für 10 min fixiert.

### **3.4.7 Adipogene Differenzierung**

Zur Adipozyten-Differenzierung wurden mesenchymale Stammzellen in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro *well* in eine 12-*well* Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium zur Entfernung von Zelltrümmern gewechselt. Sobald die Zellen 80 % Konfluenz erreicht hatten, erfolgte die Induktion der Differenzierung mittels des Adipozyten-Kulturmediums (Tab. 3). Nach 7, 14 und 25 Tagen wurde der Differenzierungsstatus mittels Oil Red O-Färbung (s. Kapitel 3.8.1) bestimmt, indem die zelltypischen, lipidhaltigen Vesikel angefärbt wurden.

### **3.4.8 Stimulationsversuche mit TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$**

Zur Analyse der Syndecan-4 Expression in den MSZ-Kulturen unter dem Einfluss der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurden die Zellen in einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro *well* in einer 6-*well* Platte ausgesät und die Stimulation bei einer Konfluenz von 90-100% gestartet. TNF $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  wurden in einer Endkonzentration von 10 ng / ml (gelöst in 2 % BSA in PBS) dem supplementierten Kulturmedium zugesetzt. Nach 1, 3, 6 und 24 Stunden erfolgte die Isolation der mRNA (Kapitel 3.6.1).

### **3.4.9 Kryokonservierung und Rekultivierung der MSZ**

Zur dauerhaften Lagerung wurden die MSZ wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und bei 1200 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 1 % Penicillin-Streptomycin und 25 % FKS in  $\alpha$ MEM) resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Diese wurden in Einfrierboxen gefüllt mit Isopropanol (Cryo 1°C Freezing container; Thermo Fischer, Dreieich) langsam über 24 h auf -80°C heruntergekühlt und anschließend im Stickstofftank CS 300B (Cryo System GmbH, Wilnsdorf) gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese kurz auf 37°C erwärmt und mit frischem Medium versetzt. Zur vollständigen Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1200 g zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in einem geeigneten Volumen Kulturmedium aufgenommen und kultiviert.

## **3.5 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.5.1 Bestimmung der Proliferation**

Die Proliferation der Zellen wurde mittels des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test) bestimmt (modifiziert nach Mosmann 1983<sup>130</sup>). Die Zellen wurden in einer Zelldichte von  $5 \times 10^3$  Zellen in einer dreifach Bestimmung in 96-well Platten ausgesät. An den Testtagen wurde dem Kulturmedium MTT-Lösung in einer Verdünnung 1:10 hinzugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurden die Zellen bei 37°C für 2 h inkubiert. In dieser Zeit wurde das gelöste, gelbe Tetrazoliumsalz MTT zu einem blau-violetten Formazan-Farbstoff von den Zellen reduziert, der sich intrazellulär als blaue Kristalle mikroskopisch zeigte. Die Reduktion erfolgte intrazellulär durch zelleigene Enzyme (z.B. mitochondriale Dehydrogenasen). Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und der Zelllayer getrocknet. Zum Lösen der Kristalle wurde 100  $\mu$ l MTT-Detergenz auf den Zelllayer gegeben. Nach mikroskopischer Überprüfung des vollständigen Lösen der Formazan-Kristalle wurde die Absorption bei 590 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) gemessen. Die Absorption spiegelt die Vitalität der Zellen wieder und ist proportional zur Zellzahl<sup>130,131</sup>.

Da Vorläuferzellen der Osteoklasten nach einer Proliferationsphase von 3 Tagen zu multinukleären Riesenzellen fusionieren, wurde für die Zellzahlbestimmung von

differenzierenden Osteoklasten der *CyQuant Assay* von Invitrogen (Karlsruhe) genutzt. Die Zellzahlbestimmung erfolgt anhand der Detektion der DNA. Die Bindung des fluoreszierenden Farbstoffs *CyQuant* an zelluläre Nukleinsäure erzeugt eine hohe Verstärkung der Fluoreszenz. Zu diesem Zweck wurden Zellen in 96-well Platten ausgesät und für 3, 5, 7 und 9 Tage kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Platten nach Herstellerangaben behandelt. Die Messung der Proben wurde mit dem *1420 Multilabel Counter Victor3* (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) bei Wellenlängen von 485/535 nm durchgeführt. Als Größenstandard diente isolierte DNA aus dem Phagen  $\lambda$  (Invitron, Karlsruhe).

### **3.5.2 Nachweis der Alkalische Phosphatase Aktivität**

Die Aktivität des Markerproteins Alkalische Phosphatase (ALP) in Osteoblasten-Kulturen wurde anhand der Umsetzung eines löslichen Substrats in einen farbigen Farbkomplex gemessen. Die kultivierten Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und dann mit eiskaltem Methanol ( $\geq 99,9\%$ ) auf der Kühlplatte für 10 min fixiert. Nach der Fixierung erfolgten 3 Waschschrte mit PBS und eine 30 min Inkubation bei 37°C mit 400  $\mu$ l ALP-Nachweisreagenz. Im Anschluss wurde der Zelloyer zweimal mit  $H_2O_{dest.}$  gespült und fotografiert.

## **3.6 Molekularbiologische Methoden**

### **3.6.1 RNA-Isolation**

Nach einmaligem Waschen des Zelloyers mit eiskaltem PBS wurden die Zellen mit 350  $\mu$ l RLT-Puffer (Qiagen, Hamburg), versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol, lysiert und vor der weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die Isolierung der RNA der differenzierten Osteoklasten wurden jeweils 8 wells der 96-well-Platte gepoolt. In allen anderen Versuchen reichten die Zellen eines 6-wells. Nach dem langsamen Auftauen des Zelloysats auf Eis wurde die RNA mittels des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen isoliert. Die Durchführung erfolgte laut Hersteller. Von der gewonnenen RNA wurde photometrisch die Konzentration und die Reinheit bestimmt. Bis zum weiteren Verbrauch wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 3.6.2 Synthese der cDNA

Für die Synthese der cDNA wurde das High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Als Template für die cDNA diente 0,5 µg isolierte RNA. Diese wurde nach Herstellerangaben mit 1 µl 20x Enzym Mix und 10 µl 2x Puffer auf ein Endvolumen von 20 µl mit RNase freiem Wasser zusammen pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden gevortext, anschließend kurz zentrifugiert und bei 37°C für 60 min inkubiert. Abschließend wurde die Probe für 5 min bei 95°C inaktiviert und für die PCR eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

### 3.6.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation der gewünschten Sequenz wurde mit der cDNA eine quantitative *real time*-PCR mit den in der Tab. 4 aufgelisteten, genspezifischen Primern durchgeführt. Hierzu wurde das DyNAmo Flash SYBRGreen qPCR Kit von Biozym (Hamburg) verwendet und folgender Ansatz in die IQ-96well-PCR-Platte (BioRad, München) als Triplett pipettiert:

|                   |       |
|-------------------|-------|
| 2x Master Mix     | 10 µl |
| Wasser            | 8 µl  |
| Primer-Mix (10µM) | 1 µl  |
| cDNA              | 1 µl. |

Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurde pro Ansatz eine Kontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> anstatt cDNA gefahren. Die Reaktionsansätze wurden kurz zentrifugiert und in einem Thermocycler nach folgendem Programm amplifiziert:

|         |        |                            |   |
|---------|--------|----------------------------|---|
| 1) 95°C | 7 min  | Aktivierung der Polymerase |   |
| 2) 95°C | 10 sec | Denaturierung              | ← |
| 3) 60°C | 30 sec | Annealing und Elongation   |   |
| 4) 95°C | 60 sec | abschließende Elongation   |   |

Im Anschluss der PCR wurde direkt eine Schmelzpunktanalyse der entstandenen Produkte zum Ausschluss unspezifischer Primerdimere oder anderen Artefakte durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde dabei in 1°C Schritten von 50°C auf 95°C erhitzt und kontinuierlich

die Fluoreszenz gemessen. Anschließend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt. Für die Auswertung wurden die einzelnen Expressionslevel zu dem Kontrollgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) zu jedem Zeitpunkt normalisiert. HPRT gilt als ein anerkanntes *house keeping gene* in der Maus<sup>132</sup>. Der *cycle threshold*-Wert (CT-Wert) wurde zu jedem Zeitpunkt normalisiert, d.h. für jede untersuchte Probe wurde der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta CT = CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{HPRT}).$$

Im nächsten Schritt wurde der CT-Wert vom Zeitpunkt 0 als Referenzwert verwendet und vom  $\Delta CT$  abgezogen:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Exp. Zeit}_x) - \Delta CT(\text{Exp. Zeit}_0).$$

Der relative Expressionsunterschied der Probe normalisiert zum Referenzgen HPRT und bezogen auf eine Kontrolle (Zeitpunkt 0 vor der Behandlung) wurde graphisch mit der arithmetischen Formel dargestellt:

$$2^{-\Delta\Delta CT (\text{Exp. Zeit } 0)} = 1.$$

### 3.6.4 Genotypisierung der knock out Tiere

Für die Genotypisierung der genetisch veränderten Tiere wurde das RedExtract-N-Amp Tissue Tm PCR Kit (Sigma, Hamburg) verwendet. Die Durchführung erfolgte modifiziert nach den Herstellerangaben. Zur Isolation der tierischen DNA wurden Gewebeproben (nach der Tötung entnommene Schwanzspitzen bzw. Hautstanzen, die bei der Ohrmarkierung abfallen) in 100 µl Extraktionslösung und 25 µl Gewebepräparationslösung für 40 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 95°C gekocht. Nach Zugabe von 100 µl Neutralisationslösung wurde folgender Ansatz für die PCR zusammen pipettiert:

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | 8 µl  |
| RedExtra PCR Reaction Mix           | 7 µl  |
| Primer Mix (Tab. 5)                 | 1 µl  |
| Gewebeextract                       | 4 µl. |

Die Reaktionsansätze wurden gevortext, anschließend kurz zentrifugiert und in einem Thermocycler nach folgendem Programm amplifiziert:

|    |      |        |                          |             |
|----|------|--------|--------------------------|-------------|
| 1) | 95°C | 3 min  | Denaturierung            |             |
| 2) | 95°C | 45 sec | Denaturierung            | ← 35 Zyklen |
| 3) | 56°C | 30 sec | Annealing                |             |
| 4) | 72°C | 60 sec | Elongation               |             |
| 5) | 72°C | 10 min | abschließende Elongation |             |
| 6) | 4°C  | ∞      | Kühlung                  |             |

Zur Kontrolle der Amplifikation sowie der Genotypen wurde anschließend das PCR-Produkt auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurden Proben einer WT, einer *knock out* und einer heterozygoten Maus mitgeführt.

### 3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mit Gelen hergestellt aus 1,5 % Agarose (Bio Rad, München) in 1x TAE-Puffer. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht wurde dem Agarosegel 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandard wurde der 100 bp DNA-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die PCR-Ansätze wurden im Agarosegel in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Dokumentationssystem Infinity Modell 1000 (Peqlab, Erlangen).

## 3.7 Aufbereitung der histologischen Präparate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die freipräparierten Frakturkalli, Tibiae sowie Wirbelsäulen histologisch aufgearbeitet. Für die immunhistochemische Bearbeitung der Knochenproben mussten diese entkalkt und in Paraffin eingebettet werden. Aufgrund der noch gering kalzifizierten Knochen der Embryonen und neonatalen Mäusen wurden diese Proben nicht entkalkt und direkt der Paraffineinbettung zugeführt. Zum Teil wurden die Präparate anschließend während des Schneidens durch das Benetzen der Schnittfläche mit 20 %iger EDTA-Lösung entkalkt. Für die histomorphologische Auswertung, bei der eine quantitative

Analyse des mineralisierten und nicht mineralisierten Gewebes erfolgte, durften die Proben nicht entkalkt werden und wurden aus diesem Grund in einem speziellen Kunststoff eingebettet, der die analoge Härte von nicht entkalkten Knochen aufweist und so ein Schneiden der Proben ermöglicht.

### **3.7.1 Herstellung von Paraffin-Schnittpräparaten**

Nach der Entnahme wurden die Knochen in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert. Danach wurde das Paraformaldehyd über einen Zeitraum von 24 h in Sörensen-Phosphatpuffer ausgewaschen. Die sich anschließende Entkalkung der Präparate in 20%iger Na-EDTA-Lösung (Apothek des Universitätsklinikums Münster, Münster) versetzt mit 0,2 % Paraformaldehyd (pH 7,9) dauerte 7 Wochen. EDTA ist ein Komplexbildner und geht an seinen freien Bindungsstellen eine Verbindung mit Kalzium-Ionen ein. Es bildeten sich EDTA-Kalzium-Präzipitate, wodurch dem Knochen Kalzium entzogen wurde. Um eine möglichst effektive Entkalkung zu gewährleisten, wurde die EDTA-Lösung dreimal wöchentlich erneuert. Das entkalkte Gewebe und somit freiliegende Proteine wurden durch die geringe Konzentration an Paraformaldehyd nachfixiert. Der intramedulläre Nagel wurde vorsichtig vor der Entkalkung zur besseren Diffusion der Entkalkungslösung entfernt. Nach 7 Wochen wurden die Proben erneut in Sörensen-Phosphatpuffer für 24 h gewaschen. Zur Entwässerung der Präparate wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet (12 h in 70% Ethanol, schließlich jeweils 24 h in 90%, 96% und 100% Ethanol). Imprägniert wurden die Proben durch Einlegen in Zedernholzöl (Merk, Darmstadt) für mindestens 24 h, in Paraffin-Zedernholzölgemisch (24 h bei 48°C) und abschließend in Paraffin (Merk, Darmstadt) für 5 aufeinander folgenden Inkubationsschritten bei 60°C für je 8 bis 16 h. Die endgültige Einbettung der Präparate in Paraffin erfolgte frontal, so dass die Schnittebene der Präparate in der Frontalebene verlief. Am Rotationsmikrotom wurden aus den Paraffinblöcken 5 µm dünne Serienschnitte hergestellt. Diese wurden in einem 50°C warmen Wasserbad gestreckt, auf beschichtete Objektträger (R. Langenbrück, Teningen) gebracht und bei 37°C über Nacht getrocknet.

Um die Auswahl der Schnitte für die Frakturheilung zu standardisieren, wurden nur Serienschnitte gewählt, die einen Bohrkandurchmesser entsprechend der G23 Kanüle aufwiesen. Für alle histochemischen und immunhistologischen Färbungen wurden die getrockneten Schnittpräparate zunächst dreimal für je 5 min in Xylol (Baker, Denventer, Holland) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 98 %, 90 %, 80 % und 70



% Ethanol) für jeweils 2 min rehydriert und anschließend in  $H_2O_{\text{dest.}}$  aufgenommen. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte den einzelnen immunhistologischen und histochemischen Färbungen zugeführt. Nach der jeweiligen Färbung wurde die Dehydrierung der Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 % und 100 % für je 2 min) durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in Xylol für 5 min inkubiert und zum Schluss mit Eindeckmedium für wasserfreie Präparate (Carl Roth, Karlsruhe) eingedeckelt. Erfolgte jedoch die Färbung mit einem Farbstoff (z.B. bei der TRAP-Färbung), der sich in organischem Lösungsmittel löst, wurde ein Eindeckmedium auf wässriger Basis verwendet (Aquatex, Merck, Darmstadt) und auf die Dehydrierungsschritte verzichtet.

### **3.7.2 Herstellung von Kunstharz-Schnittpräparaten**

Die Einbettung der mineralisierten Präparate erfolgte mit einem Polymerisationsverfahren auf Basis von Methylmetacrylat (Technovit® 9100, Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland), welches speziell für die Einbettung von mineralisiertem Gewebe für die Lichtmikroskopie entwickelt wurde. Die chemische Polymerisation erfolgt unter Ausschluss von Sauerstoff mit Hilfe eines Katalysatorensystems aus Peroxid und Amin. Die zusätzlichen Komponenten PMMA-Pulver (polymerisierten Methylmetacrylat-Pulver) und Regler (Radikalfänger) ermöglichen die gesteuerte Polymerisation bei Kälte. Die Einbettung erfolgte laut Herstellerangaben. Zunächst wurden die Proben nach der Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol für 3 d, 80 % Ethanol, 96 % Ethanol und 100 % Ethanol für jeweils 7d) entwässert und dann zur Entfettung für vier Stunden in Xylol (Xylene®, J.T. Baker, Deventer, Niederlande) überführt. Das Xylol verdrängt dabei das Ethanol aus dem Gewebe und vermischt sich in dem folgenden Inkubationsschritt mit der Präinfiltrationslösung, welche wiederum das Xylol vollständig ersetzt. Die Präparate werden bei Raumtemperatur für 3 Tage in der Präinfiltrationslösung I (50 % Basislösung und 50 % Xylol) und für 7 Tage in der Präinfiltrationslösung II (Basislösung mit 0,5 % Härter) gelagert. Anschließend werden die Proben für weitere sieben Tage in einer Präinfiltrationslösung III (Basislösung, entstabilisierte mittels einer  $Al_2O_3$  Chromatographiesäule und 0,5 % Härter) gefolgt von einer Infiltrationslösung (entstabilisierte Basislösung mit 8 % PMMA und 0,5 % Härter) bei 4 °C gelagert. Für die Einbettung der Knochen in Methylmetacrylat wurden diese in luftdicht, verschließbare Teflonschalen frontal platziert, so dass die Schnittebene identisch zu den Paraffinproben lateral lag. Die Gefäße wurden anschließend mit dem Polymerisations-

gemisch (Technovit®9100) gefüllt und in den luftdicht abgeschlossenen Gefäßen für mind. 24 Stunden bei 4 °C zur Polymerisierung gelagert. Aus den ausgehärteten Kunststoffblöcken wurden nun unter ständiger Benetzung mit 30 % Ethanol 5 µm dicke Serienschnitte am Hartschnittmikrotom angefertigt und auf mit 50 %igem Alkohol benetzte beschichtete Objektträger (R. Langenbrück, Teningen) gezogen. Zum Anheften der Schnitte auf den Objektträger wurden die Präparate mit einer Polyethylen-Schutzfolie abgedeckt und über Nacht bei 60°C in einer Presse getrocknet. Die Hartgewebeschnitte wurden zum einen für die Darstellung des mineralisierten Gewebes mittels von Kossa Färbung und zum anderen für die TRAP-Färbung verwendet. Im Vorfeld der Färbungen wurden die Schnittpräparate zweimal für 20 min in Xylol und anschließend für 20 min in 2-Methoxyethylacetat entplastet. Danach wurden die Proben in Aceton für 10 min und im Anschluss kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült. Nach der jeweiligen Färbung erfolgten die Dehydrierung der Schnittpräparate sowie ihre Eindeckelung wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

## 3.8 Histochemische Methoden

### 3.8.1 *Nachweis von Adipozyten mittels Oil Red O-Färbung*

Die *Oil Red O*-Färbung diente zum Nachweis der Adipozyten-Differenzierung anhand der optischen Darstellung der zelltypischen, lipidgefüllten Vesikel. Der Zelllayer wurde dreimal mit kaltem PBS gewaschen und 5 min auf der Eisplatte mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit gekühltem 50 % Ethanol gewaschen und für 20 min mit 0,2 % *Oil Red O*-Lösung (modifiziert nach Romeis Mikroskopische Techniken, 1989) inkubiert. In den lipidhaltigen Vesikeln lagerte sich der rote, lipophile Farbstoff an. In stark differenzierten Bereichen bildete sich ein rot-schwarzer Niederschlag. Zur Entfernung unspezifische Färbungen wurde der Zelllayer mit 50 % Ethanol gewaschen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> überschichtet.

### 3.8.2 *Von Kossa Färbung zur Visualisierung des mineralisierten Gewebes bzw. der extrazellulären Matrix*

Die von Kossa-Färbung dient dem Nachweis von mineralisiertem Gewebe. Die Silberionen der Färbelösung reagieren mit den Karbonat- und Phosphationen des Kalks und verdrängen so die Kalziumionen. Durch Lichteinwirkung (UV-Licht) werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und als braun-schwarzer Niederschlag sichtbar. Nach der

Fixierung wurden der Zelllayer bzw. die entplasteten Gewebeschnitte (Technovit eingebettet, nicht entkalktes Knochengewebe) mit Leitungswasser gewaschen und 30 min bei RT sowie bei Tageslicht (UV-Licht) mit 5 %-iger Silbernitratlösung inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit Leitungswasser. Zur weiteren Reduktion des Silbers wurde Natriumkarbonat-Formaldehydlösung auf die Probe gegeben. Nach 2 min wurden die Proben erneut mit Leitungswasser gewaschen und überschüssiges Silbernitrat durch 10 %-iges Natriumthiosulfat für 5 min bei RT entfernt. Im Anschluss wurde der Zelllayer mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  überschichtet bzw. die Gewebeschnitte entwässert und eingedeckelt (s. Kapitel 3.7.1). Die Bestimmung des mineralisierten Areals erfolgte anhand der schwarz gefärbten Fläche.

### **3.8.3 Alizarinrot-S-Färbung zur Quantifizierung der Kalzifizierung der extrazellulären Matrix**

Nach der Fixierung der Zellen mit Methanol für 5 min wurde der Zelllayer dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit 1 ml Alizarinrot-S-Lösung (modifiziert nach Stanford *et al.*, 1995<sup>133</sup>) für 1 h auf dem Schüttler. Hierbei bildet das Alizarinrot-S einen Chelatkomplex mit Kalzium, der als rote Ablagerung sichtbar wird. Im Anschluss wurde der Zelllayer dreimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gespült und 10 min mit PBS zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Farbstoff gewaschen. Zur Quantifizierung wurde die gefärbte EZM mit 1 ml 10 % Cethylpyridiniumchlorid entfärbt. Die Entfärbung erfolgte über Nacht bei RT auf dem Schüttler. Am nächsten Morgen wurde in einer dreifachen Bestimmung die Absorption des Überstandes bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm photometrisch bestimmt.

### **3.8.4 Identifikation von Knorpelgewebe mittels Alcianblau Färbung**

Zur Darstellung der knorpeligen Regionen im Frakturkallus erfolgte die Alcianblau Färbung, in der saure Glykosaminoglykane, die hauptsächlich im Knorpelgewebe vorkommen, blau angefärbt werden. Als Gegenfärbung wurde die Kernechtrotfärbung gewählt. Nach der Entparaffinierung bzw. Entplastung und Rehydrierung wurden die Proben für drei min in 3 % Essigsäure und anschließend in der Alcianblau-Färbelösung (1 % Alcianblau gelöst in 3 % Essigsäure, pH-Wert 3) für 30 min inkubiert. Zur Entfernung von überschüssiger Farbe wurden die Proben kurz in 3 % Essigsäure gespült. Darauf folgend wurden die Zellkerne mit der Farblösung Kernechtrot (Roth, Karlsruhe) für 5 min rot angefärbt und kurz in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

gewaschen. Zum Schluss wurden die Proben entwässert und eingedeckelt (s. 3.7.1).

### **3.8.5 Identifikation von Knochengewebe mittels Masson-Goldner Färbung**

Zur Unterscheidung der Regionen mit neu gebildetem Geflechtknochen, besonders während der intramembranösen Ossifikation, von knorpeligen Bereichen wurden Gewebeschnitte der Masson-Goldner Färbung (Trichomfärbung) unterzogen. Hierzu wurde das Masson-Goldner Färbekit der Firma Merck (Darmstadt) verwendet und laut Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate wurde eine Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin für 5 min durchgeführt. Im Anschluss wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen, wobei ein Farbumschlag der Kerne zu dunkelbraun bis schwarz eintrat. Da die nächsten Färbeschritte in einem sauren Milieu stattfanden, wurden die Proben für 30 sec in 1 % Essigsäure gespült. Durch die Inkubation in Azophloxin-Lösung für 10 min und Orange G-Lösung für 1 min wurden Muskulatur, Zytoplasma und Erythrozyten rot angefärbt. Nach kurzem Spülen in 1 % Essigsäure wurde kollagenhaltiges Gewebe, wie z.B. Knochen, für 2 min mit Lichtgrün SF angefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift mit Essigsäure wurden die Schnittpräparate dehydriert und mit Deckgläsern eingedeckelt.

### **3.8.6 Nachweis von Osteoklasten mittels TRAP Färbung**

Die Färbung dient der Identifizierung von Osteoklasten durch den Nachweis der Enzymaktivität, der für diese Zellen typischen tartrat-resistenten sauren Phosphatase (Tartrat-resistant acid phosphatase, TRAP). Da aber auch andere Zellen, wie z. B. Makrophagen, gefärbt werden, erfolgt die Quantifizierung der Osteoklasten nicht nur aufgrund des positiven Färbeergebnisses, sondern auch anhand ihrer Lokalisation (an der Knochen- bzw. Knorpeloberfläche) *in vivo* und anhand der Anzahl ihrer Zellkerne (> als 3 Zellkerne) *in vitro*. Für diese Färbung wurde das Saure Phosphatase Kit der Firma Sigma (Hamburg) verwendet. Nachdem die Schnitte der eingebetteten Knochen entparaffiniert und rehydriert bzw. entplastet waren, wurden sie für 45 min bei 37°C mit Osteoklasten Färbelösung I inkubiert. In dieser Zeit setzte das Osteoklasten spezifische Enzym TRAP das Substrat um. Anschließend wurde für weitere 10 min der Lösung Osteoklastenfärbelösung II beigemischt. Nun bindet das freigesetzte Naphtol AS-BI, dass während des vorherigen Inkubationsschritts hydrolysiert wurde, an Fast Garnet GBC und bildet eine unlösliche,

violette Farbablagerung direkt an den Aktivitätsstellen der einzelnen Zellen. Zum Schluss wurden die Schnitte zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gewaschen und eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin (1:5 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verdünnt, Sigma, Hamburg) durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Schnitte entwässert und eingedeckelt wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

Diese Färbung wurde ebenfalls bei den kultivierten Knochenmarkszellen zur Charakterisierung der Osteoklasten-Differenzierung eingesetzt. Am 7. Tag der Kultivierung wurden die Zellen mit Osteoklasten-Fixierlösung für 3 min bei RT fixiert. Nach drei Waschschritten mit 37°C warmen PBS erfolgte die Substratumsetzung. In diesem Reaktionsschritt wurde direkt eine Mischung der Osteoklasten-Färbelösung I und II (1:100) auf den Zelllayer gegeben und bei 37°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem PBS-Glycerin-Gemisch (1:1) überschichtet.

### **3.8.7 Alcianblau-Kernechtrot-Färbung des gesamten murinen Skeletts**

Vier Tage alte neonatale Mäuse aus heterozygoten Verpaarungen wurden mittels einer Überdosierung an Isoflaran® getötet. Zur Genotypisierung wurden die inneren Organe der Mäuse präpariert. Anschließend erfolgte die Fixierung des kompletten Körpers für 1 Woche in 90 %-igen Ethanol. Vor der nun folgenden Färbung wurden vorsichtig die komplette Haut sowie die restlichen inneren Organe entfernt. Für drei Tage inkubierten die Präparate bei RT in einer Alcianblau-Lösung (0,01 % Alcian Blau in 96 % Ethanol unter Zusatz von 20 % Essigsäure), wodurch sich das Knorpelgewebe blau färbte. Im Anschluss wurden die Proben in mehreren Schritten rehydriert (10 h in 70 % Ethanol, 5 h in 40 % Ethanol, 5 h in 15 % Ethanol und 5 h in  $\text{Aqua}_{\text{dest.}}$ ). Danach wurden die Tiere in 1 %-iger Kalilauge zur Mazeration gelagert. Sobald die Körper mit Ausnahme des blau gefärbten Knorpelgewebes transparent waren, wurden die mineralisierten Bereiche des Knochens mit einer Alizarinrot S-Lösung (0,001% Alizarinrot S gelöst in 1 % KOH) rot gefärbt. Nach drei Tagen wurden die Präparate zur Entfernung unspezifischer Färbungen für 15 h in 1 % KOH geschwenkt und abschließend in mehreren Schritten zur Lagerung in Glycerin überführt. Für die Auswertung erfolgte zunächst die Aufnahme des kompletten Mausskeletts mit einer Spiegelreflexkamera. Danach wurden Detailaufnahmen der Extremitäten unter Verwendung eines Binokulars angefertigt. Mittels dem Programm Image Pro plus wurden die maximale Länge der einzelnen Knochen (Humerus, Femur und Tibia), sowie das Verhältnis der Länge des mineralisierten Areals zur Gesamtlänge des Knochens bestimmt.

### 3.9 Immunhistologische Methoden

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte bzw. der Fixierung der Kryoschnitte wurden die Proben dreimal für 5 min mit 1x TBS gewaschen und durch nachgeschaltete enzymatische Verdauung vorbehandelt, um das zu detektierende Antigen im Gewebe zu demaskieren.

#### 3.9.1 Detektion von Kollagen II und X mittels Dako ARK™

Für die Detektion von Kollagen II und X im knorpeligen Anteil des Frakturkallus der Mauspräparate wurde das Dako Animal Research Kit™ (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Hier wurde im Vorfeld der primäre Antikörper mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper (biotinylierte Fab Antikörper, anti Maus Ig) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  für 15 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert. Im Weiteren wurde durch die Zugabe von Maus Immunglobuline (Ig), die in der *blocking*-Reagenz des Herstellers enthalten waren, mögliche Interaktionsbereiche der Antikörper mit endogenen Immunglobulinen im Gewebeschnitt blockiert. Durch diese vorgeschaltete Interaktion konnten primäre Antikörper, die in Mäusen hergestellt wurden, in Mausproben verwendet werden. Vorab wurde ein Verdau der Knorpelmatrix mit Protease XXIV (Sigma, Hamburg) für 10 min bei 37°C, gefolgt von drei Waschschritten mit 1x TBS, durchgeführt. Danach erfolgte ein Verdau mit 0,1 % Hyaluronidase (w/v; Sigma, Hamburg) in 0,1 M Natriumacetat pH 6 für 90 min bei 37°C. Nach weiteren Waschschritten mit 1x TBS wurde die endogene Peroxidase des Gewebes mit 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min geblockt. Nach erneuten Waschschritten wurde zunächst die Detektion von Kollagen X (1:50) durchgeführt. Hierzu wurde für 15 min bei RT der im Vorfeld biotinylierte, primäre Antikörper auf die Schnitte pipettiert. Abermals wurde dreimal für 5 min mit 1x TBS gewaschen, worauf nun die Bildung des Biotin-Streptavidin-Komplexes durch die Zugabe der Streptavidin-HRP-Gebrauchslösung (Dako) für 15 min auf die Proben erfolgte. Danach wurden die Schnitte dreimal gewaschen. Die Substratumsetzung durch die am Streptavidin gebundene Peroxidase und die damit verbundene Ausfällung eines braun-schwarzen Niederschlages am Bindungsort des primären Antikörpers wurde durch die Zugabe der Substratlösung (1 Tropfen 3,3'-diaminobenzidine Chromogen Lösung auf 1 ml Substratpuffer) induziert. Im Anschluss wurden drei 10 min Waschschrritte mit 1x TBS und 0,1 % Tween 20 zur Entfernung aller nicht spezifischen Bindungen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte nun die zweite immunhistologische Detektion von Kollagen II (1:50) analog zur Kollagen X-Färbung, jedoch konnte auf eine erneute Demaskierung sowie Blockung der endogenen

Peroxidase verzichtet werden. Außerdem wurde Streptavidin, das mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt war, verwendet (Alkalische Phosphatase Reagenz, ALP Standard Vectastain ABC Kit der Firma Vector Laboratories, Barlingame, USA). Das Alkalische Phosphatase Reagenz wurde für 30 min bei RT auf die Proben pipettiert. Nach drei 5 min Waschschritten fand die Umsetzung des Substrats (Alkaline Phosphatase Substrate Rot Kit I der Vector Laboratories) lichtgeschützt innerhalb von 15 min statt. Der Substratlösung war ein Tropfen Levamisol-Lösung zugesetzt, die die zelleigene ALP hemmt. Nach der Umsetzung des Substrats in einen roten, nicht löslichen Farbstoff wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt, Sigma, Hamburg) für 30 sec gegengefärbt und diese Kernfärbung 10 min lang unter Leitungswasser gebläut (Farbumschlag von braun zu blau). Zum Schluss wurden die Präparate entwässert und eingedeckelt (s. Kapitel 3.7.1).

### **3.9.2 MMP-9 und TRAP -Doppelfärbung**

Für die Detektion von MMP-9 wurde eine kombinierte Färbung durchgeführt, in der zusätzlich Osteoklasten, die die Hauptproduzenten von MMP-9 sind, mittels TRAP-Färbung identifiziert werden konnten. Zunächst erfolgte ein Verdau der Knorpelmatrix mit Trypsin für 10 min bei 37°C gefolgt von drei Waschschritten mit 1x TBS. Nachdem potenzielle unspezifische Bindungsstellen mit 10 % Ziegen Serum für 30 min geblockt wurden, inkubierten die Schnitte für 60 min bei 37°C mit dem primären Antikörper (1:2000 verdünnt mit 2 %igem Ziegen Serum). Nach drei Waschschritten wurden die Proben mit dem sekundären, Biotin-gekoppelten Antikörper gegen Kaninchen (1:200) überschichtet und für 30 min bei RT gelagert. Nach den einzelnen Schritten der Antikörperdetektion wurden jeweils 3 Waschschrritte mit TBS durchgeführt. Für die Bindung der Streptavidin-gekoppelten ALP und die anschließende Farbreaktion wurde wieder das Alkalische Phosphatase Standard Vectastain ABC Kit verwendet (s. Kapitel 3.9.1), jedoch wurde zur leichteren Identifizierung das ABC Kit Blau verwendet. Ferner wurden nach einem weiteren Waschschrtritt in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> die Osteoklasten mittels TRAP-Färbung (s. Kapitel 3.8.6) und im Anschluss die Zellkern mit Hämatoxylin (s. Kapitel 3.9.1) angefärbt.

### **3.9.3 MMP-13- und ADAMTS-4-Immunhistologie**

Im Anschluss an die Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnittpräparate für die

ADAMTS-4 Detektion mit Trypsin für 10 min bei 37°C demaskiert. Nach drei Waschschritten mit TBS und einem 30 minütigen Blockierungsschritt mit 10 % Ziegen Serum, wurde der primäre Antikörper gegen ADAMTS-4 (1:50 verdünnt mit 2 % Ziegen Serum) für eine Stunde bei 37°C auf die Schnitte pipettiert. Für die MMP-13 Detektion wurden die Proben im Vorfeld mit Protease XXIV für 10 min bei 37°C und mit Hyaluronidase für 60 min bei 37°C demaskiert (s. 3.9.1). Anschließend wurden die Schnittpräparate mit 10 % Ziegen Serum geblockt und für 60 min bei 37°C mit dem anti-MMP-13 Antikörper (1:750 verdünnt mit 2 % Ziegen Serum) inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte der Immunhistologie waren für ADAMTS-4 und MMP-13 identisch. Nachdem der sekundäre, biotinylierte anti-Kaninchen Antikörper (1:200) gebunden hatte, erfolgte die Bindung der Streptavidin gekoppelten ALP, die Farbreaktion mittels ALP Standard Vectastain ABC Kit Rot, die Kerngegenfärbung sowie die Eindeckelung wie in Kapitel 3.9.1 beschrieben.

#### **3.9.4 Immunhistologischer Nachweis proliferierender Chondrozyten**

Für den Nachweis von proliferierenden Chondrozyten innerhalb des Frakturkallus wurde der monoklonale Antikörper gegen das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) verwendet. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte zunächst das Freilegen des Antigens durch das Kochen der Schnitte in Citratpuffer (10 mM pH 6,0) für drei Minuten bei 350 Watt in der Mikrowelle. Im Anschluss kühlten die Schnitte für weitere 20 min bei RT ab. Danach wurde die Detektion mittels Dako ARK Kit, wie in Kap. 3.9.1 beschrieben, durchgeführt. Der Antikörper konnte in einer Konzentration von 1:250 angewendet werden und die Farbreaktion erfolgte analog zu der Immunhistologie von Kollagen X mit einer gekoppelten Peroxidase (Kap. 3.9.1). Zum Schluss wurden alle Zellkerne mit dem fluoreszierenden DNA-Farbstoff Bisbenzimid (1:2500, Hoechst 33342 von AppliChem, Darmstadt) zur Ermittlung der Gesamtzellzahl gegengefärbt.

### **3.10 Quantitative Auswertung der histologischen Präparate**

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte digital an einem Bildanalysesystem (Fluoreszenz- und Lichtmikroskop BX51, Olympus, Hamburg; Megapixel-CCD Kamera, Digital Video Company, Berlin) und der Software Image-Pro® Plus 5.0 (Media Cybernetics, Inc, Bethesda, Maryland, USA). Die verwendete ermöglicht eine digitale Bilderfassung und bietet die Möglichkeit der Bildbearbeitung sowie der quantitativen Erfassung einzelner, spezifisch



angefärbter Gewebearten und ist in der Lage, anhand bestimmter Farbpixel Flächen zu erkennen und zu berechnen. Je nach Färbung und den ermittelten Parametern wurde das Computerprogramm kalibriert. Pro Tier erfolgte die Auswertung von Serienschnitten für die verschiedenen histochemischen und immunhistologischen Färbungen. Da das System für verschiedene Vergrößerungen geeicht wurde, waren Messungen in absoluten Einheiten ( $\mu\text{m}$  bzw. mm) möglich.

Die histomorphometrische Untersuchung der Frakturheilung beinhaltete die Ausmessung der Fläche des Frakturkallus, des Geflechtknochens und die automatisch gemessene Alcian blau positiv gefärbte Knorpelfläche. Die Fläche der angefärbten Areale in den immunhistochemischen Schnitten wurde manuell umfahren. Der prozentuelle Anteil von spezifischen Gewebearten bzw. Detektionen in Bezug zur Gesamtkallusfläche wurde berechnet.

Histomorphometrische Auswertung der TRAP-Färbung im Frakturkallus, in der Wirbelsäule und in der Tibia erfolgte in einem abgegrenzten Bereich (*area of interest* = AOI). In der Wirbelsäule wurde eine Fläche im Abstand von 0,25 mm von der Wachstumszone und Kortikalis analysiert. In der neonatalen Tibia wurde bis 1 mm und in der adulten Tibia 0,25 mm bis 2,5 mm proximal der Wachstumsfuge ausgewertet. In den Frakturkalli wurden vier ROI von  $680 \mu\text{m} \times 860 \mu\text{m}$  (10er Objektiv) im Bereich des Geflechtknochens angrenzend zum Knorpelgewebe ausgezählt. Aufgrund der sehr geringen Größe einzelner Frakturkalli konnte in einigen Fällen nur zwei ROI pro Kallus ausgewertet werden.

Die Bestimmung der proliferierenden Chondrozyten anhand der positiven PCNA detektierten Zellkerne erfolgte in einem ROI von  $680 \mu\text{m} \times 860 \mu\text{m}$  (10er Objektiv) und wurde in Relation zur Gesamtanzahl der Zellkerne des begrenzten Knorpelgewebes gesetzt. Für die Zählung der gesamten Zellkerne wurde die Hoechst-Färbung verwendet.

Für die Quantifizierung der Osteoklasten *in vitro* wurden pro *well* 10 Fotos standardisiert aufgenommen (10er Objektiv) und mit dem Programm Image Pro Plus ausgewertet. Als reifer Osteoklast wurden rot-violett gefärbte Zellen mit drei oder mehr Zellkernen (ZK) gezählt. Ferner wurden die Osteoklasten in drei Gruppen nach Anzahl ihrer Zellkerne eingeteilt (Gruppe 1 = 3 bis 5 ZK; Gruppe 2 = 6 bis 10 ZK; Gruppe 3 = > 10 ZK).

### **3.11 Biomechanische Testungen**

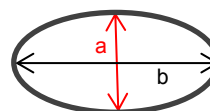
Zur Charakterisierung der Knochenstabilität von Mauswirbeln wurde der 4. Lendenwirbel von

16 Wochen alten, weiblichen Wildtypen und Syndecan-1-defizienten Mäusen in einem Kompressionsversuch getestet. In diesem Experiment wurden die einzelnen Wirbelkörper einer Kompression bis zum Bruch ausgesetzt. Unter Belastung (in diesem Fall die Kraft ausgeübt durch die Kompression) stauchen sich alle Knochen, dabei verändern sie ihre Länge und ihr Durchmesser in einem bestimmten Verhältnis zueinander<sup>134</sup>. Bei der biomechanischen Testung wird die Kraft  $F$ , die auf den Knochen ausgeübt wird, und die dadurch verursachte Deformierung  $\Delta l$  des Wirbels (veränderte Höhe des Wirbelkörpers) gemessen. Die beiden gemessenen Werte werden in einem Diagramm als Kraft-Deformierungs-Kurve aufgetragen. Der vordere Teil der Kurve stellt die elastische Verformung dar, sie endet hinter dem linearen Anstieg. Die Kraft, die am Ende der elastischen Verformung auftritt, ist die Kraft  $F_F$ . Wenn der Knochen nur in diesem Bereich belastet wird, verhält er sich wie eine Feder und kehrt bei Entlastung in seine Ausgangsform zurück. Das bedeutet die Deformierung des Knochens unter dieser Kraft ist reversible. Der darauf folgende Teil der Kraft-Deformierungs-Kurve beschreibt die plastische Verformung. Sie knüpft an die elastische Verformung an und endet beim Erreichen der Maximalkraft  $F_B$ , durch die der Bruch des Knochens entsteht.

Im Vorfeld des Versuches wurden die Wirbelkörper von Muskeln, Sehnen, Nerven und Bändern frei präpariert. Während der Präparation und während der gesamten Testung wurden die Wirbel mit isotoner Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) feucht gehalten. Bis zur endgültigen Testung wurden alle Proben in 0,9 %iger NaCl-befeuchteten Kompressen für 1 bis 3 Wochen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Dies ist eine anerkannte Methode, um Knochenproben über einen längeren Zeitraum zu lagern<sup>134</sup>. Die Ausgangslänge  $l_0$  (entspricht der Höhe des Wirbelkörpers) und die Durchmesser der Wirbelkörper wurden mit einem digitalen Messschieber bestimmt. Aufgrund der ungleichen Körperform eines Wirbels wurde die Ausgangsfläche einer Ellipse angenähert und die Ausgangsfläche  $A_0$  nach folgender Formel:

Fläche des Wirbelkörpers

$$A_0 = \frac{a}{2} * \frac{b}{2} * \pi$$



errechnet.

Da die Grundfläche eines Wirbels nicht gerade war, wurde jeder Wirbelkörper cranial in Palacos® Knochenzement (Haraeus, Hanau) eingebettet. Die über die Endplatten herausragenden, cranialen Fortsätze wurden so tief in den Palacos eingedrückt, dass die Wirbelkörper komplett auf dem Knochenzement auflagern. So konnte gewährleistet werden,

dass die Kraft senkrecht auf den Wirbel wirkt und er nicht wackelte bzw. nicht seitlich weggedrückt wurde. Nachdem die Wirbel in Position gebracht worden waren, härtete der Knochenzement für 20 Minuten aus. Die Druckversuche wurden mit der Materialprüfmaschine LR5K-plus der Firma Lloyd Instruments durchgeführt. Die Kräfte wurden mittels einer 250 N-Kraftmesszelle aufgenommen. Diese verfügt über eine Messgenauigkeit von 0,5% ab 2% des Messbereichsendwerts. Das resultierende Kraft-Längenänderungs-Diagramm wurde mit dem Programm „Nexygen“ (Lloyd Instruments) aufgezeichnet. Über das Zusatzprogramm „Ondio Prüfungsordnung“ der Software wurde eine eigene Prüfung erzeugt. Als Prüfrichtung wurde Druck ausgewählt, die Prüfgeschwindigkeit betrug 1mm pro Minute. Die Messungen wurden nach ca. 1 mm Stauchung per Hand gestoppt. Nach der Platzierung des eingebetteten Wirbels in der Materialprüfmaschine wurde der Knochen mit einem Stempel, dessen Querschnittsfläche der Fläche des Wirbelkörpers entsprach, getestet. So wurde nur der Wirbelkörper isoliert vom Wirbelbogen belastet. Das während der Messung aufgezeichnete Kraft-Längenänderungs-Diagramm wurde in ein Spannungs-Dehnungs-Diagramm umgerechnet. Da die zu tragende Kraft mit der Größe des Knochens variiert, kann die Spannung  $\sigma$  in  $\text{N/mm}^2$  zwischen verschiedenen Knochen besser miteinander verglichen werden. Von der gemessenen Kraft kann über die Grundfläche  $A_0$  des Knochens die Spannung wie folgt berechnet werden:

$$\sigma_i = \frac{F_i}{A_0}$$

Die prozentuale Dehnung bzw. Stauchung  $\varepsilon_{\%}$  in % ist das Verhältnis der Längenänderung zur Ausgangslänge.

$$\varepsilon_{\%i} = \frac{\Delta l_i}{l_0} * 100$$

Aus den Diagrammen wurden die Kräfte  $F_F$  und  $F_B$ , die Steifigkeit  $S$ , und der Elastizitätsmodul  $E$  abgelesen bzw. mit den folgenden, aufgeführten Formeln berechnet:

Die Steifigkeit [N/mm] ist die Steigung des linearen Teils der Kraft- Deformierungs- Kurve.

$$S = \frac{F_F - F_0}{\Delta l_F - \Delta l_0}$$

Der Elastizitätsmodul (auch: Youngscher Modul) ist ein Materialkennwert aus der Werkstofftechnik, der den Zusammenhang zwischen Spannung (in diesem Fall die Kraft, die

bei der Kompression wirkte) und der verursachten Stauchung (Dehnung) bei der Verformung eines festen Körpers bei linear elastischem Verhalten beschreibt. Der Elastizitätsmodul wird mit E-Modul (E) abgekürzt. Der Betrag des Elastizitätsmoduls ist um so größer, je mehr Widerstand ein Material seiner Verformung entgegensetzt. Ein Material mit hohem Elastizitätsmodul ist also steif, ein Material mit niedrigem Elastizitätsmodul ist nachgiebig. Zum Beispiel hat Stahl ein sehr hohes E-Modul von ca. 200 000 N/mm<sup>2</sup>, wogegen Silikonkautschuk nur ein E-Modul von 10 bis 100 N/mm<sup>2</sup> aufweist. Der E-Modul kann über verschiedene Wege errechnet werden, in dieser Arbeit wurde er über die Steifigkeit errechnet.

$$E = S * \frac{l_0}{A_0}$$

In dem E-Modul spiegelt sich der Stabilitätsverlust des Knochens noch deutlicher wieder als in der Steifigkeit, da die Ausgangshöhe und die Ausgangsfläche des Wirbelkörpers mit einbezogen werden. Durch das allmähliche Zusammensacken des Wirbels verringert sich die Höhe und vergrößert sich die Fläche. Der E-Modul gibt die eigentliche Steifigkeit des Knochens, unabhängig von seiner Größe, an. Daher konnten die E-Module der verschiedenen Wirbel miteinander verglichen werden ohne die Maße der Knochen zu beachten<sup>134</sup>.

### 3.12 $\mu$ CT-Analysen

Für die Micro Computertomographie ( $\mu$ CT)-Analysen wurden die Wirbelsäulen und Tibiae von vier Monate alten Tieren über Nacht in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C fixiert, anschließend in Phosphatpuffer für 24 h inkubiert und in 80 %igen Ethanol überführt. Die  $\mu$ CT-Aufnahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Uwe Kornak des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik (Charité, Universitätsmedizin Berlin) in einem Kleintier- $\mu$ CT. Der Scan erfolgte alle 10  $\mu$ m in einer *Region of interest* (ROI) der in der Wirbelsäule 0,4 mm von der Wachstumsfuge und in der Tibia 0,2 mm bis 0,6 mm proximal der Wachstumsfuge entfernt war. Die Kortikalis der Tibia wurde mit einem Abstand von 3mm von der Wachstumsfuge vermessen.

### **3.13 Datenanalyse**

Die graphischen Darstellungen wurden mit Microsoft Office Excel, Power Point 2003, Photoshop, Image Pro Plus und GraphPad Prism erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism für Microsoft. Bei allen Versuchen wurde der Mittelwert (MW)  $\pm$  die Standardabweichung (SD) bzw. in der Auswertung der biomechanischen Testung der Median sowie der Interquartilbereich (25 und 75 % Quartil) bestimmt. Aufgrund der tierexperimentell-bedingten, niedrigen Fallzahl folgten die Ergebnisse keiner Gauß'schen Normalverteilung und wurden daher mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test (zweiseitig) für unabhängige Stichproben analysiert. Hierbei wurden die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen mit einer Signifikanzgrenze von  $p \leq 0,05$  ermittelt ( $p \leq 0,01$  hoch signifikant).

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Frakturheilung

Die Frakturheilung umfasst einen komplexen Reparaturmechanismus, in dem verschiedenste Prozesse wie z.B. die primäre Entzündungsreaktion, Invasion von Vorläuferzellen sowie Auf- und Abbau von verschiedenen Gewebearten, parallel bzw. aufeinander abgestimmt erfolgen müssen. Ein entscheidender Prozess ist die Degradation des mineralisierten Knorpelkallus, der größtenteils durch Proteasen der Familie der MMPs und ADAMTS erfolgt. Diese Enzyme werden zum einen von hypertrophen Chondroblasten und zum anderen von einwandernden Osteoklasten, Osteoblasten und Endothelzellen synthetisiert. Um einen Stabilitätsverlust des frakturierten Knochens während des Knorpelabbaus und dem gleichzeitigen Aufbau von Geflechtknochen vorzubeugen, nimmt das „*fine tuning*“ der Expression und Aktivität der Proteasen eine hohe Priorität ein. Proteoglykane der Syndecan-Familie zeigen sich in entzündlichen Prozessen als ein Regulationsmechanismus, der die Aktivität sowie die Expression von Proteasen moduliert. In einem Osteoarthrose-Modell konnte gezeigt werden, dass Syndecan-4 die Degradation von Knorpelgewebe beeinflusst<sup>119</sup>. Ein Ausschalten dieses Proteins verursachte einen verminderten Abbau des Knorpels. Des Weiteren wurde auch Syndecan-1 im Zusammenhang mit der Expression und Aktivierung bzw. Stabilisierung von Proteasen diskutiert, z.B. während der Wundheilung oder nach einem Herzinfarkt<sup>62,65</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Frakturheilung in den genetisch veränderten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erforscht. Hierbei wurde die Auswirkung des Verlusts von Syndecan-1 bzw. Syndecan-4 auf die Gewebzusammensetzung des Frakturkallus und die Synthese von spezifischen Proteasen untersucht.

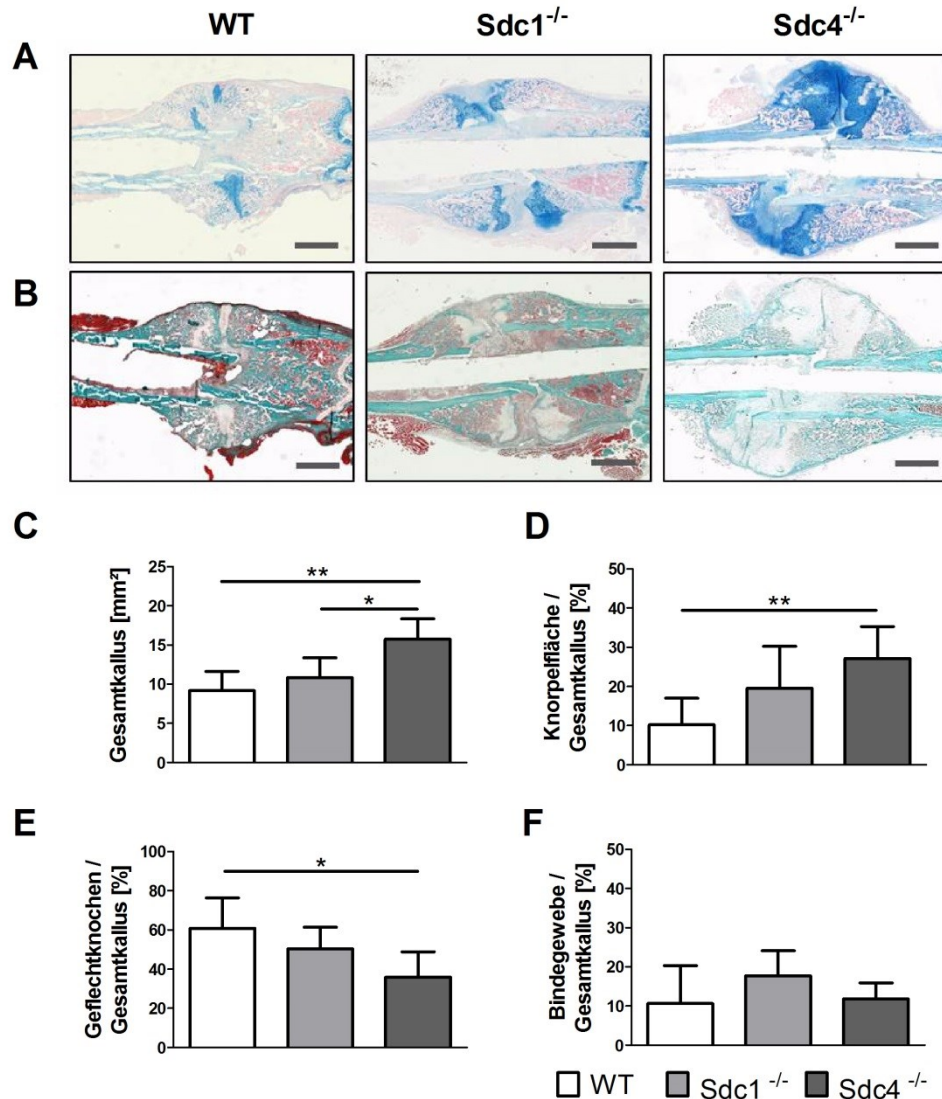
#### 4.1.1 Charakterisierung des Frakturkallus am 14. postoperativen Tag

Mittels eines standardisierten Verfahrens wurde den Versuchstieren eine geschlossene Schaftquerfraktur des linken Femurs mit minimalem Weichteilschaden gesetzt, und diese im Anschluss mit einem intramedullären Kraftträger stabilisiert. Nach 14 Tagen wurde der Verlauf der Frakturheilung der Syndecan-1- und der Syndecan-4-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren charakterisiert (s. Abb. 5). Wie in zahlreichen Studien belegt, erfolgt zu diesem Zeitpunkt der Umbau des knorpeligen Kallus in Geflechtknochen und die Expression bzw. Aktivität der Proteasen erreicht ihr Maximum<sup>4</sup>. In den WT-Mäusen war am

14. Tag ein großer Anteil des weichen Frakturkallus in Geflechtknochen umgebaut. Nur noch im mittleren Bereich des Gesamtkallus war Knorpelgewebe vorhanden (blau gefärbt, s. Abb. 5A). Die Knorpelfläche betrug nur noch ca. 10 % des Gesamtkallus (s. Abb. 5D) und ca. 60% bestand aus Geflechtknochen (grün gefärbt, s. Abb. 5B u. E). In diesem Heilungsstadium wiesen die Syndecan-1 *knock out*-Mäuse eine geringfügig größere Kallusfläche von durchschnittlich 17 % auf, die zu 20 % aus Knorpelgewebe und zur Hälfte aus trabekulärem Gewebe gebildet war. Die Syndecan-4-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zu WT einen fast doppelt so großen Frakturkallus mit signifikant mehr Knorpelgewebe ( $p = 0,001$ ). Der Frakturkallus bestand zu ca. 27 % aus Knorpel und nur zu 35 % aus Geflechtknochen. Der durchschnittliche Bindegewebsanteil war in den WT- sowie  $Sdc4^{-/-}$ -Proben fast identisch (WT: 11 %;  $Sdc4^{-/-}$ : 12 %), wohingegen die  $Sdc1^{-/-}$ -Kalli mit 18 % des Gesamtkallus am meisten unspezifisches Gewebe aufwiesen (s. Abb. 5F).

Anhand der Kollagen II- und X-Detektion in den Gewebeschnitten konnte der Differenzierungsgrad des Knorpels untersucht werden (s. Abb. 6). Kollagen II wird von proliferierenden Chondrozyten synthetisiert, wohingegen Kollagen X nur von hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und die späte Differenzierung signalisiert<sup>28</sup>. Die Detektion von Kollagen X (braun) überdeckte in diesem Fall die Kollagen II-Färbung (rot). Nach 14 Tagen war in allen drei Genotypen der Gehalt an nur Kollagen II-haltiger Knorpelmatrix sehr gering ( $\leq 7$  % des Kallus, Abb. 6). Am meisten Kollagen II und somit am meisten proliferierende Chondrozyten beinhalteten die  $Sdc4^{-/-}$ -Frakturkalli mit 7 % des Gesamtkallus (WT: 3 %,  $Sdc1^{-/-}$ : 2 %). Der knorpelige Anteil der Frakturkalli bestand in allen drei Genotypen zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich aus hypertrophen Chondrozyten, die Kollagen X-positive Knorpelmatrix synthetisierten. Beide *knock out*-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen vergrößerten Frakturkallus mit vermehrter Bildung von Knorpelgewebe (s. Abb. 5), und somit auch mit einer erhöhten Kollagen X-positiven Fläche, wie in Abb. 6 zu sehen ist. Im Falle der Syndecan-4-defizienten Maus war der Unterschied signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Die Kollagen X-positive Fläche der  $Sdc4^{-/-}$ -Kalli betrug mit durchschnittlich 29 % des Gesamtkallus einen 2,4-fach höheren Wert als die WT-Proben (WT: 12 %  $\pm$  5). Die detektierte Fläche der  $Sdc1^{-/-}$ -Präparate umfasste 17 % des Gesamtkallus, allerdings wiesen die Proben eine hohe Varianz von  $\pm 12$  % auf.

Durch das Fehlen von Syndecan-4 war die Zusammensetzung des Frakturkallus signifikant beeinflusst. Die  $Sdc4^{-/-}$ -Tiere zeigten einen signifikant größeren Frakturkallus mit vermehrtem



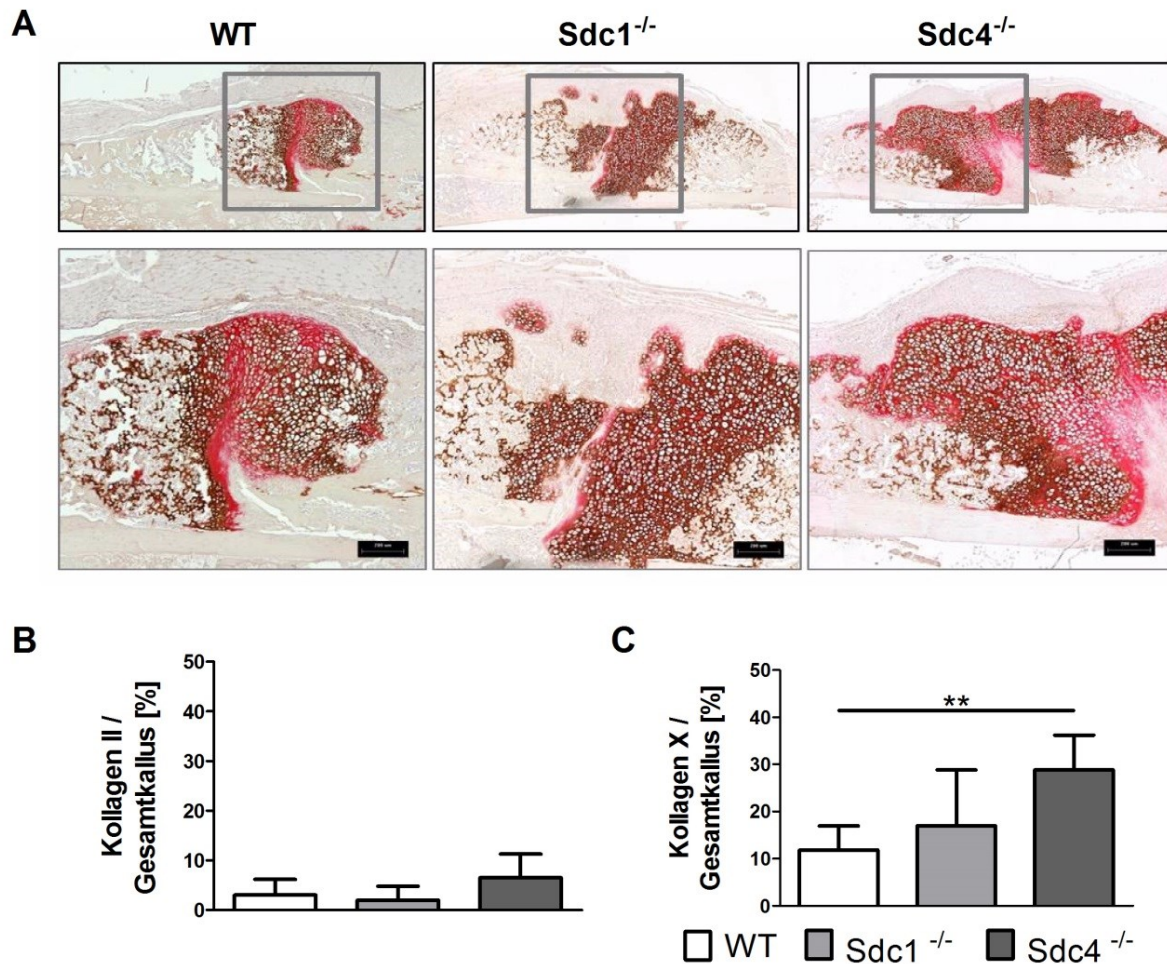
**Abb. 5: Histomorphologische Untersuchung der frakturierten Femora der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse nach 14 Tagen**

Für die Visualisierung und Analyse zwischen Knorpelgewebe und neu gebildetem trabekulären Knochen wurde die Alcianblau-Färbung (A, Knorpelgewebe = blau) und Masson Goldner-Färbung (B, Knochengewebe = grün) verwendet. Die Fläche des Gesamtkallus in mm<sup>2</sup> wurde erfasst (C), und der prozentuale Anteil an Knorpelgewebe (D), Geflechtknochen (E) und Bindegewebe (F) am Gesamtkallus ermittelt. Dargestellt sind MW ± SD (WT: n = 9; Sdc1<sup>-/-</sup>: n = 6; Sdc4<sup>-/-</sup>: n = 7; Maßstab entspricht 1 mm).

Anteil an Knorpelgewebe und verminderten Fläche an Geflechtknochen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Auch in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine ausgeprägtere Kallusbildung mit vermehrtem Knorpelgewebe beobachtet werden. Die Analyse des Differenzierungsgrades der Knorpelzellen anhand des Verhältnisses der Kollagen II- und X-Detektion ergab keine



starken Differenzen zwischen den Genotypen. Nach 14 Tagen waren die Chondrozyten innerhalb der untersuchten Frakturkalli größtenteils hypertroph und Kollagen X positiv. Dies deutet auf ein annähernd identisches Stadium der Differenzierung des Knorpelgewebes zu diesem Zeitpunkt hin.



**Abb. 6: Lokalisation von Kollagen II und X im Frakturkallus der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse am 14. postoperativen Tag**

Die Kollagen II (A und B, rot) bzw. Kollagen X (A und C, braun) positiv detektierten Flächen in Relation zum Gesamtkallus wurden quantifiziert. Dargestellt sind MW ± SD (n = 6, Maßstab entspricht 200 µm).

#### 4.1.2 Lokalisation der Proteasen im Frakturkallus

Die Degradation des Knorpelgewebes ist ein kritischer Schritt während der enchondralen Ossifikation, wie viele Studien an *knock out*-Mäusen belegen<sup>6</sup>. Das Fehlen einzelner

Proteasen führt zu einer verzögerten Frakturheilung mit einer stärker ausgeprägten Kallusbildung und einem erhöhtem Anteil an Knorpelgewebe. Im Folgenden wurde der Abbau des knorpeligen Gewebes anhand der Lokalisation von drei bedeutenden Proteasen, ADAMTS-4, MMP-13 und MMP-9, im Frakturkallus am 14. Tag der Heilung ermittelt.

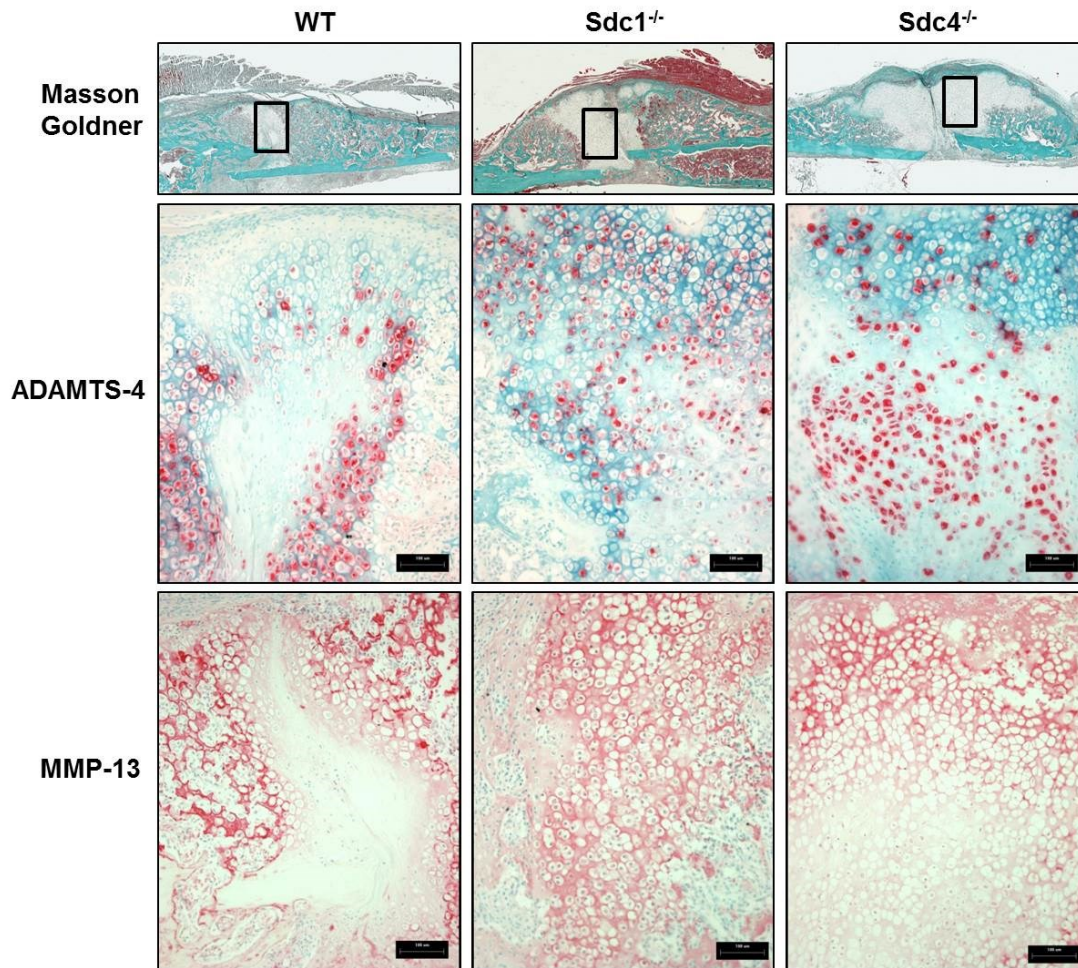
#### 4.1.2.1 Lokalisation von ADAMTS-4

Die Protease ADAMTS-4 wird von Chondrozyten synthetisiert und spaltet Aggrekan, das den größten Anteil der Proteoglykane in der Knorpelmatrix ausmacht<sup>23,44</sup>. In den hier vorliegenden Proben konnte ADAMTS-4 großflächig im Knorpelgewebe des Kallus nachgewiesen werden. Es konnte in Knorpelzellen eines frühen Differenzierungsstadiums sowie in hypertrophen Chondrozyten bis kurz vor der Degradationskante der WT-Proben detektiert werden (s. Abb. 7). Eine identische Lokalisation in Bezug auf die verschiedenen Differenzierungsstadien der Chondrozyten war in den Wachstumsfugen dieser Proben vorzufinden und entspricht dem typischen Expressionsmuster, wie in zahlreichen Publikationen gezeigt wurde (Bilder der Wachstumsfuge nicht gezeigt)<sup>135</sup>. In den Frakturkalli der beiden anderen Genotypen war der Nachweis dieser Protease vergleichbar mit dem Wildtyp. Aufgrund des erhöhten Anteils an Knorpelgewebe und folglich vermehrter Anzahl an Chondrozyten in den *knock out*-Tieren waren dementsprechend mehr ADAMTS-4-positive Zellen vorhanden. Besonders stark ausgeprägt war dies in den Syndecan-4-defizienten Proben zu beobachten.

#### 4.1.2.2 Lokalisation von MMP-13

Die Protease MMP-13 wird von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten in dem Übergangsbereich zwischen Knorpelgewebe und Geflechtknochen produziert<sup>51</sup>. In den WT-Proben war MMP-13 in den hypertrophen Chondrozyten und den neu entstandenen Trabekeln, wo noch weiterhin Knorpelmatrix umgebaut wird, lokalisiert (s. Abb. 7). Identische Regionen wurden in den Syndecan-1- und -4-defizienten Tieren detektiert. Im Vergleich zum WT stellte sich in den *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Schnitten eine breitere Zone an hypertrophen, MMP-13-positiven Chondrozyten dar. Dies ist höchstwahrscheinlich auf dem erhöhten Anteil an hypertrophem Knorpelgewebe zurückzuführen. Vergleichbar zu den Ergebnissen der *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Präparaten zeigte sich die Detektion der Protease in den *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Proben. Auch hier war die Zone der MMP-13-positiven Chondrozyten breiter, aber in einer geringeren Ausprägung entsprechend dem kleineren Frakturkallus.

In allen drei Genotypen wurden eine gleich starke Intensität und eine identische Lokalisation der MMP-13-Detektion beobachtet. MMP-13 war in hypertrophen Chondrozyten im Bereich des Umbaus von Knorpel zu Geflechtknochen und in neu entstandenen Trabekeln synthetisiert.

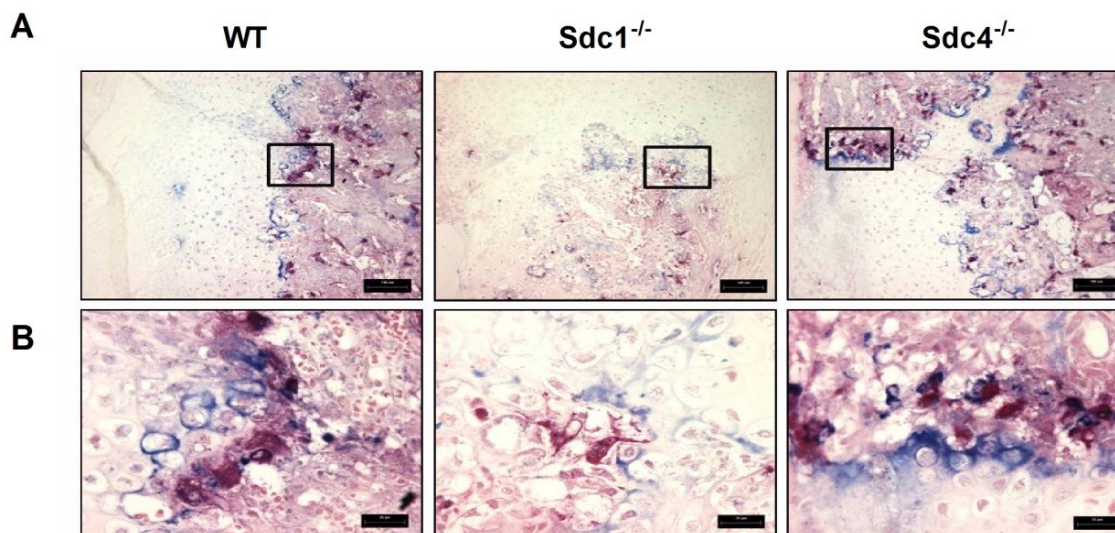


**Abb. 7: Immunhistologische Detektion der Proteasen ADAMTS-4 und MMP-13 im Kallus der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse am 14. Tag der Frakturheilung**  
 Dargestellt sind Übersichtsfärbungen repräsentativer Frakturkalli (Masson Goldner-Färbung) und immunhistologischer Nachweis der Proteasen MMP-13 und ADAMTS-4 innerhalb der Degradationszone zwischen trabekulären Knochen und Knorpelgewebe im Frakturkallus der WT-, Sdc1<sup>-/-</sup>- und Sdc4<sup>-/-</sup>-Maus (n = 6, Maßstab entspricht 100 µm).



#### 4.1.2.3 Lokalisation von MMP-9 und Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) positiven Zellen

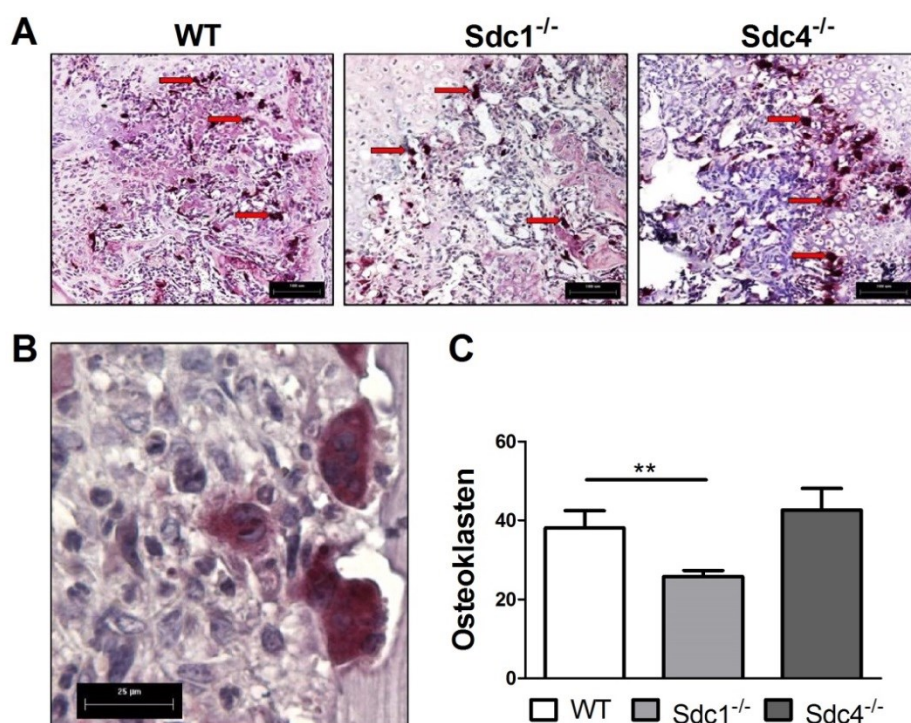
Das proteolytische Enzym MMP-9 wird hauptsächlich von Osteoklasten sowie von eingewanderten Entzündungszellen und Endothelzellen während der Frakturheilung produziert<sup>48</sup>. In vielen Veröffentlichungen wird eine Kolo­kalisierung von MMP-9 und TRAP-positiven Osteoklasten gezeigt. In den Wildtyp-Proben konnte MMP-9 (blau) an der Grenze zwischen Knorpelgewebe und Geflecht­knochen detektiert und zum Teil eine Kolo­kalisierung mit TRAP-positiven Zellen (violett-rot) beobachtet werden (s. Abb. 8). Auffällig war die stark verminderte Expression von MMP-9 in den Syndecan-1-defizienten Proben. Nur einzelne, zum Teil schwach positive Bereiche, sowie eine geringe Kolo­kalisierung von MMP-9 und Osteoklasten waren am Übergang zwischen Knorpel und Geflecht­knochen zu erkennen. Ebenfalls schien die Osteoklastendichte in den *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Proben reduziert zu sein. In den Syndecan-4-defizienten Tieren konnte eine starke MMP-9-Synthese nachgewiesen werden. Zum einen erfolgte die Detektion der Protease deutlich entlang der Kante des Knorpelgewebes innerhalb der Degradationszone, und zum anderen stellte sich eine deutliche Kolo­kalisierung von MMP-9 und TRAP positiven Zellen dar.



**Abb. 8: Lokalisation von MMP-9- und TRAP-positiven Osteoklasten im Frakturkallus der Wildtyp, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse**

Nach 14 Tagen erfolgte der immunhistologische Nachweis der Protease MMP-9 (blau) und die gleichzeitige Darstellung der Osteoklasten mittels TRAP-Färbung (rot-violett). Der Fokus wurde auf die Degradationszone zwischen trabekulären Knochen und Knorpelgewebe im Frakturkallus der WT-, *Sdc1*<sup>-/-</sup>- und *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Maus gerichtet (n = 6; Maßstab entspricht 100 µm (A) bzw. 25 µm (B)).

Die Quantifizierung der TRAP-positiven Zellen zeigte eine signifikant verminderte Anzahl an Osteoklasten von ca. 32 % in den Syndecan-1-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp (WT:  $38 \pm 4$  Osteoklasten,  $Sdc1^{-/-}$ :  $26 \pm 2$  Osteoklasten,  $p = 0,005$ ; s. Abb. 9). Die Syndecan-4-defizienten Proben wiesen eine gering höhere Anzahl an TRAP-positiven Zellen zu den Kontrolltieren auf ( $43 \pm 5$ ).



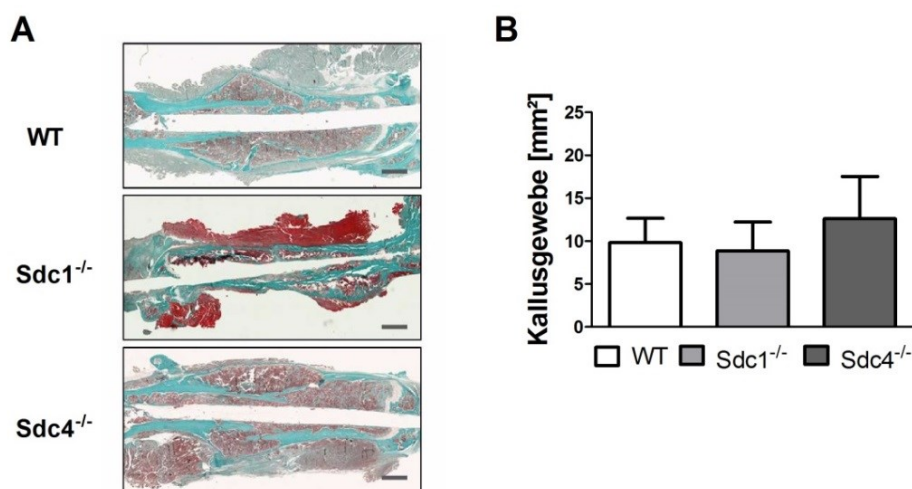
**Abb. 9: Quantifizierung der Osteoklasten im Frakturkallus der Wildtyp-, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Mäuse am 14. postoperativen Tag**

Zur Analyse der Osteoklasten innerhalb der Degradationszone zwischen Knorpelgewebe und trabekulären Knochengewebe im Frakturkallus der drei Genotypen wurde die TRAP-Färbung durchgeführt (A). Als reifer Osteoklast wurden TRAP-positive Zellen, die an der Knorpel- bzw. Knochenoberfläche lokalisiert waren, gezählt (B). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD (C,  $n = 6$ ; roter Pfeil zeigt typische Osteoklasten, Maßstab entspricht 100  $\mu$ m (A) bzw. 25  $\mu$ m (B)).

#### 4.1.3 Charakterisierung des Frakturkallus 28 Tage nach einer Fraktur

Nach 28 Tagen befindet sich der Frakturkallus in der Phase des *Remodelings*. Der harte Frakturkallus, der in diesem Stadium nur noch aus trabekulären Knochen besteht, wird über einen längeren Zeitraum abgebaut, bis idealerweise die ursprüngliche Struktur und Funktion des Knochens erreicht wird. Die frakturierten Femura von WT-,  $Sdc1^{-/-}$ - und  $Sdc4^{-/-}$ -Tieren

zeigten nach 28 Tagen eine annähernd gleich große Kallusgröße (s. Abb. 10., WT:  $9,2 \pm 2,8$  mm<sup>2</sup>, Sdc1<sup>-/-</sup>:  $8,8 \pm 3,4$  mm<sup>2</sup>, Sdc4<sup>-/-</sup>:  $12,6 \pm 4,9$  mm<sup>2</sup>). Ebenso war in allen Frakturkalli kein Knorpelgewebe mehr nachweisbar. Innerhalb von zwei Wochen hatten die beiden *knock out*-Tiergruppen die Verzögerung in der Frakturheilung, die unterschiedlich stark ausgeprägt war, kompensiert. Nach 28 Tagen erreichten alle drei Genotypen histomorphologisch betrachtet ein einheitliches Niveau der Frakturheilung.



**Abb. 10: Frakturheilung in der Wildtyp-, Syndecan-1- und Syndecan-4-defizienten Maus nach 28 Tagen**

Für die Visualisierung und Analyse des neu gebildeten, trabekulären Knochens wurde die Masson Goldner-Färbung (A, Knochengewebe = grün) verwendet. Die Fläche des gesamten Kallusgewebes in mm<sup>2</sup> erfolgte (B). Dargestellt sind MW ± SD (WT: n = 6; Sdc1<sup>-/-</sup>: n = 6; Sdc4<sup>-/-</sup>: n = 8; Maßstab entspricht 1 mm).

## 4.2 Syndecan-1 im Knochenstoffwechsel

Die bisherigen Ergebnisse der Experimente zeigten eine signifikant geringere Anzahl an Osteoklasten innerhalb des Kallusgewebes der Sdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen am 14. Tag der Frakturheilung. Diese Beobachtung könnte auf eine funktionelle Rolle von Syndecan-1 in der Rekrutierung und / oder Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen hinweisen. Welche Funktion Syndecan-1 im Knochenmetabolismus hat, besonders im Hinblick auf die Osteoklastogenese, ist bisher nicht untersucht. Im Folgenden wird die Bedeutung von Syndecan-1 im Knochenstoffwechsel analysiert. Zur Charakterisierung der Funktion dieses

Proteoglykans wurden *in vitro*-Untersuchungen an primären Knochenzellen sowie *in vivo*-Analysen der Knochenstruktur der Syndecan-1-defizienten Maus durchgeführt.

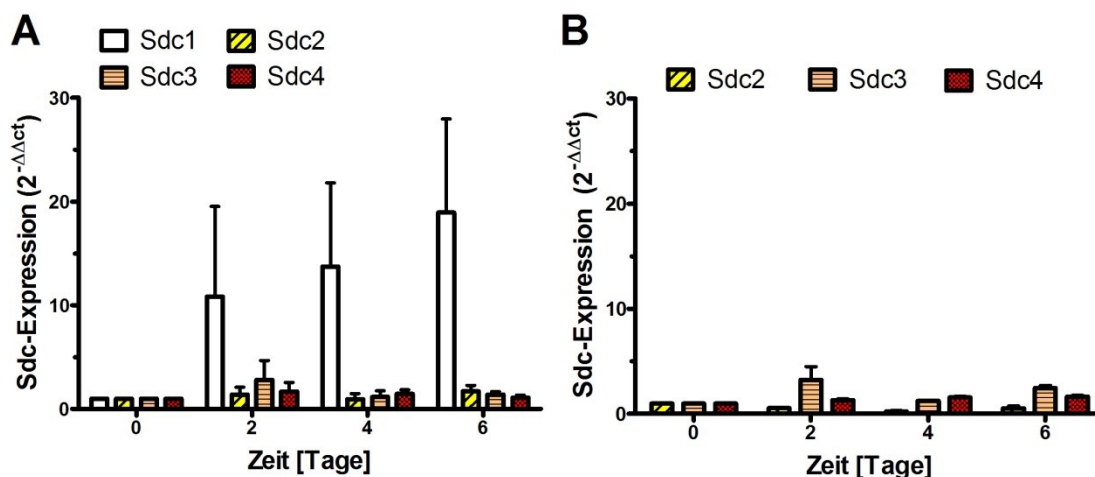
#### **4.2.1 Expression und Funktionalität von Syndecan-1 während der Osteoklasten-Differenzierung *in vitro***

##### **4.2.1.1 Expression von Syndecan-1 während der Osteoklastogenese *in vitro***

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die aus fusionierenden, mononukleären Monozyten entstehen. Durch die Induktion der Differenzierung mit M-CSF und RANKL reifen Monozyten aus dem isoliert Knochenmarkszellen zu aktiven, multinukleären Osteoklasten heran. Nach drei Tagen Vordifferenzierung der isolierten Zellen mit M-CSF wurde die Expression der vier Mitglieder der Familie der Syndecane im zeitlichen Verlauf unter RANKL-Stimulation ermittelt (s. Abb. 11A). Als einziges Syndecan wurde die Expression von Syndecan-1 stark hochreguliert. Am Tag zwei der RANKL-Stimulation war die Expression ca. 10-fach, am vierten Tag ca. 14-fach und am sechsten Tag ca. 19-fach im Vergleich zu den vorstimulierten Kulturen (3 Tage M-CSF) erhöht.

In vielen Fällen kann das Fehlen eines Proteins durch Kompensationsmechanismen ausgeglichen werden. Aufgrund der starken Homologie zwischen den einzelnen Syndecanen wurde ebenfalls untersucht, ob das Fehlen von Syndecan-1 während der Differenzierung durch die Hochregulation der Expression eines oder mehrerer Syndecan-Mitglieder kompensiert wurde (s. Abb. 11B). Hierzu wurden Zellen aus dem Knochenmark von Syndecan-1-defizienten Mäusen verwendet und zu Osteoklasten differenziert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Expression der anderen Mitglieder in Bezug auf das Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von Syndecan-1.

Für die *in vitro*-Kultivierung von Osteoklasten sind die beiden Faktoren M-CSF und RANKL essentiell, jedoch beeinflussen zahlreiche weitere Mediatoren die Differenzierung dieser Riesenzellen<sup>129,136,137</sup>. Die beiden Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wirken beide über unterschiedliche Mechanismen positiv auf die Osteoklastogenese und spielen außerdem eine wichtige Rolle während der Frakturheilung. Im Folgenden wurde durch die *in vitro*-Stimulation mit IL-1 $\beta$  bzw. TNF $\alpha$  deren Einfluss auf die Syndecan-1-Expression während der Osteoklastogenese erforscht. Es stellte sich heraus, dass die Expression von Syndecan-1 nicht durch das Zytokin IL-1 $\beta$  beeinflusst wurde (s. Abb. 12A). Es zeigte sich eine fast



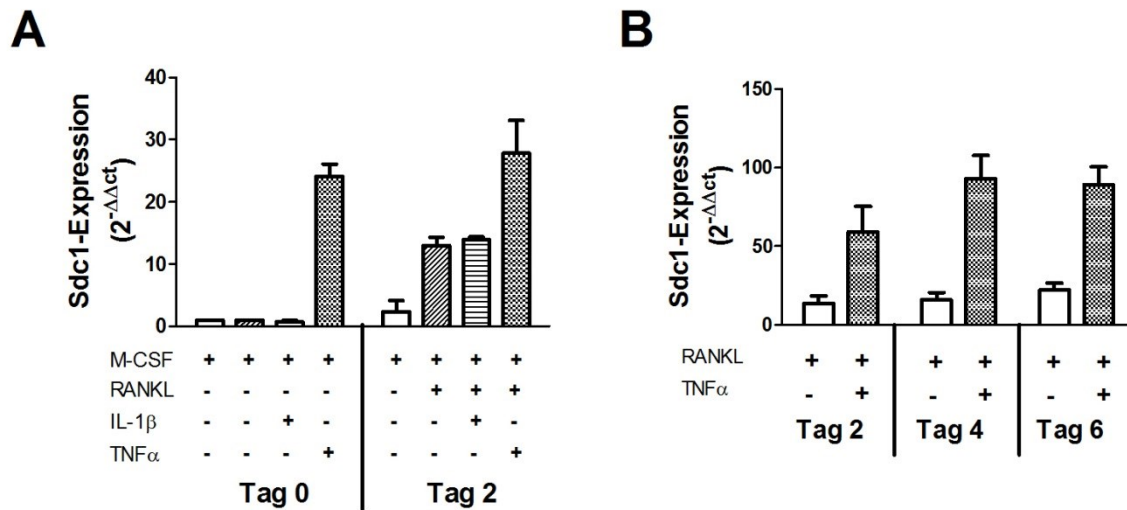
**Abb. 11: Expression der Syndecan-Familie während der Osteoklasten-Differenzierung**

Isolierte Knochenmarkszellen wurden drei Tage lang mit M-CSF vorinkubiert und für weitere sechs Tage unter RANKL/M-CSF-Stimulation zu reifen Osteoklasten differenziert. Die Expression der einzelnen Mitglieder der Familie der Syndecane wurde mittels *real time*-PCR bestimmt und im Verhältnis zu dem Kontrollgen HPRT dargestellt. Für diesen Versuch wurden jeweils drei unabhängige Isolate aus Wildtyp (A) und Syndecan-1-defizienten Mäusen (B) verwendet. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD.

unveränderte Expression während der Vorinkubation (Tag 0) bzw. unter der parallelen Stimulation mit RANKL (Tag 2). Jedoch unter der Stimulation von TNF $\alpha$  wurde ein deutlicher Anstieg des Syndecan-1 mRNA-Gehalts gemessen (s. Abb. 12A). Ebenso unter der gleichzeitigen Behandlung mit TNF $\alpha$  und RANKL wurde die Expression von Syndecan-1 deutlich hochreguliert. Im zeitlichen Verlauf der Differenzierung wurde durch die parallele Behandlung der Vorläuferzellen mit RANKL und TNF $\alpha$  das Maximum der Expression durchschnittlich zwei Tage früher in den Kulturen erreicht (s. Abb. 12B). Am 4. Tag der Differenzierung betrug die Expression von Syndecan-1 unter der TNF $\alpha$ -RANKL-Stimulation ca. das 6-fache als nur unter RANKL.

Während der Differenzierung von Monozyten zu reifen Osteoklasten wurde die Expression von Syndecan-1 als einziges Mitglied dieser Proteoglykan-Familie unter RANKL-Stimulation hochreguliert. Dieser Effekt wurde durch simultane Stimulation mit TNF $\alpha$  maximiert. Ferner wurde das Fehlen von Syndecan-1 nicht durch eine Hochregulation der Expression der anderen Syndecane kompensiert.





**Abb. 12: Syndecan-1-Expression unter TNFα- bzw. IL-1β-Stimulation während der Osteoklasten-Differenzierung**

(A) Isolierte Knochenmarkszellen wurden drei Tage lang mit M-CSF vorinkubiert und zum Teil mit den Zytokin IL-1β bzw. TNFα stimuliert (Tag 0). Für weitere zwei Tage wurden diese Vorläuferzellen unter RANKL/M-CSF-Stimulation zu Osteoklasten differenziert und teilweise mit IL-1β bzw. TNFα stimuliert (Tag 2). Die Expression von Syndecan-1 wurde mittels *real time*-PCR bestimmt und im Verhältnis zu dem Kontrollgen HPRT dargestellt. Für diesen Versuch wurden zwei unabhängige Isolate aus Wildtyp-Mäusen als Triplettestet.

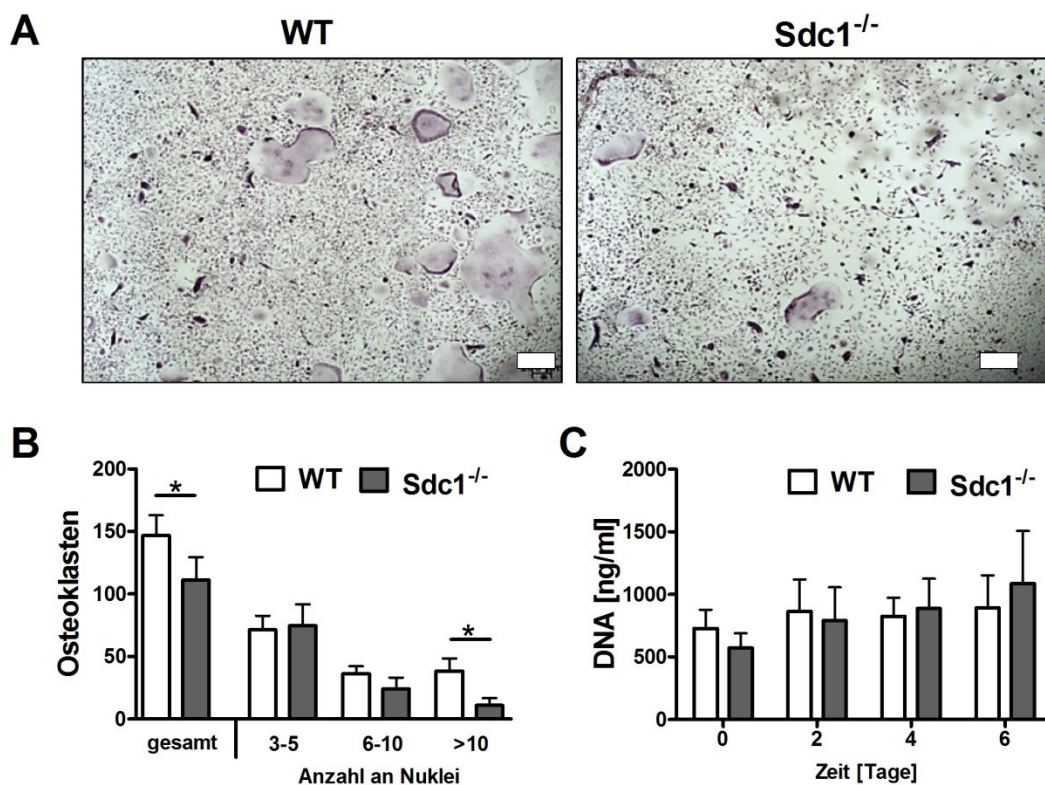
(B) Im Weiteren wurde die Expression von Syndecan-1 unter TNFα-Stimulation im Verlauf der Differenzierung der Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten untersucht. Es wurden jeweils drei unabhängige Isolate aus Wildtyp-Mäusen als Triplettest verwendet. Dargestellt sind MW ± SD.

#### 4.2.1.2 Funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der Osteoklasten-Differenzierung

Nachdem die isolierten Knochenmarkszellen vier Tage lang unter M-CSF/RANKL-Stimulation kultiviert wurden, erfolgte die Quantifizierung der reifen Osteoklasten. Als Marker für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten dienten der Nachweis des Enzyms TRAP und die Fusion von mindestens drei Vorläuferzellen zu einer multinukleären Zelle. Die Anzahl der TRAP-positiv gefärbten Osteoklasten, die mindestens drei Zellkerne beinhalteten, unterschied sich signifikant zwischen WT- und Sdc1<sup>-/-</sup>-Kulturen (s. Abb. 13). Syndecan-1-defiziente Kulturen wiesen ca. 25 % weniger reife Osteoklasten auf (WT = 147 ± 16, Sdc1<sup>-/-</sup> = 111 ± 18, p = 0,02). Des Weiteren wurden die Osteoklasten nach Stärke ihrer Fusion anhand der Anzahl ihrer Zellkerne in drei Gruppen eingeteilt. Unter dieser Klassifikation zeigte sich eine Verzögerung der Differenzierung der Sdc1<sup>-/-</sup>-Kulturen zu multinukleären Zellen mit mehr als 10 Zellkernen. In dieser Gruppe waren signifikant weniger

Zellen in den *knock out*-Kulturen im Vergleich zum WT vorhanden (WT =  $38 \pm 10$ , Sdc1<sup>-/-</sup> =  $11 \pm 6$ ,  $p = 0,02$ ). In der Einteilung der Osteoklasten mit 3 - 5 bzw. 6 – 10 Zellkernen stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen dar.

Aufgrund der entscheidenden Rolle der Zelldichte der Vorläuferzellen während der Differenzierung wurde die Proliferation bzw. die Zellzahl im Verlauf der Kultivierung anhand des DNA-Gehalts der Kulturen verglichen. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen beobachtet werden (s. Abb. 13C).



**Abb. 13: Charakterisierung der Differenzierung von Knochenmarkszellen zu reifen Osteoklasten**  
 Isolierte Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und Syndecan-1-defizienten Mäusen wurden drei Tage lang mit M-CSF vorinkubiert und für weitere vier Tage unter RANKL/M-CSF Stimulation zu reifen Osteoklasten differenziert (A). Am 7. Tag wurde die Anzahl reifer Osteoklasten mittels TRAP-Färbung bestimmt und anhand der Anzahl der Zellkerne in drei Gruppen unterteilt (B). Die Proliferation der Vorläuferzellen wurde anhand des DNA-Gehalts der Kulturen bestimmt (C). Es erfolgte eine dreifach Bestimmung von jeweils vier unabhängigen Isolaten (MW  $\pm$  SD, weißer Balken 200  $\mu$ m).

#### 4.2.1.3 Funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der Osteoklastogenese *in vitro*

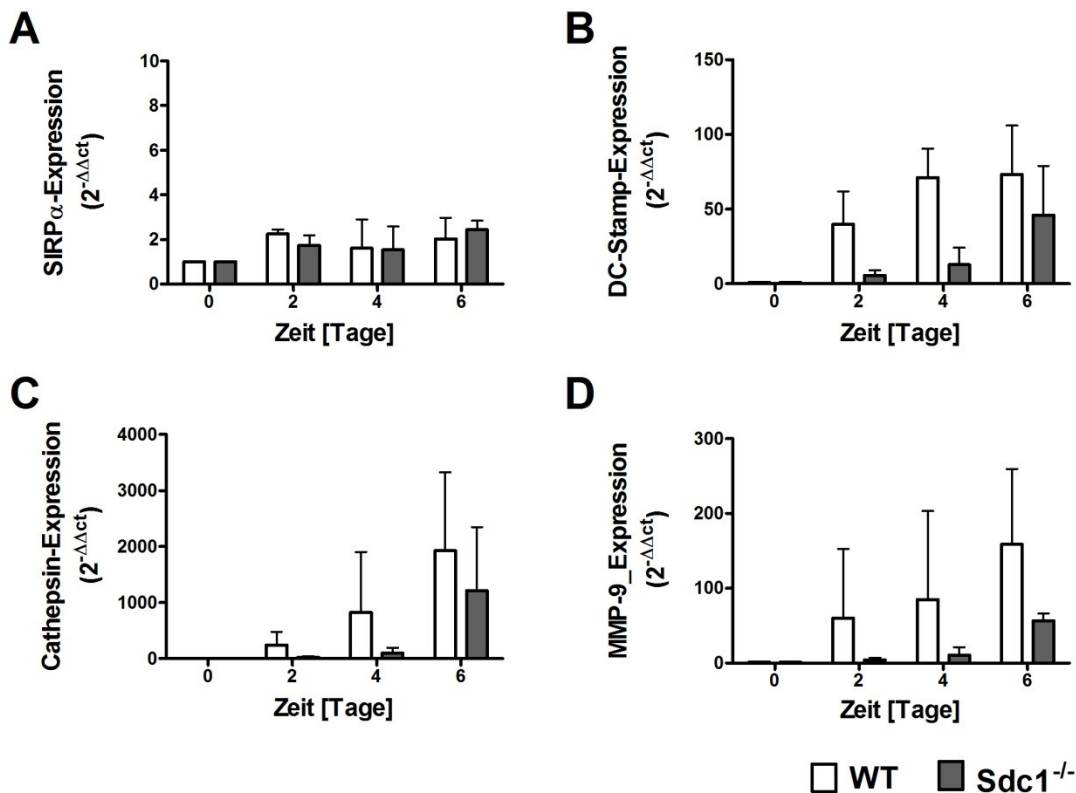
Um Rückschlüsse auf die funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der Osteoklastogenese zu schließen, wurde eine Expressionsanalyse spezifischer Fusionsproteine und Aktivitätsproteine während der Differenzierung durchgeführt. SIRP $\alpha$  (*signal regulatory proteine*, auch als SHPS-1, p84, BIT oder SIRPA bekannt) ist ein Transmembranprotein der Immunglobulin-Familie<sup>138</sup>. Die extrazelluläre Domäne beinhaltet drei Immunglobulin-ähnliche Domänen. Nach Bindung eines extrazellulären Liganden erfolgt die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne, wodurch weitere Target-Proteine aktiviert werden und sich auf die Migration und Fusion von Zellen auswirken. Die Interaktion von SIRP $\alpha$  mit dem Rezeptor CD47 scheint Einfluss auf die Fusion von Monozyten/Markrophagen zu haben. Durch die Hemmung der Zell-Zell-Interaktion von SIRP $\alpha$  und CD47 mittels blockierender Antikörper konnte die Fusion von Osteoklasten *in vitro* reduziert werden<sup>139</sup>.

Ein weiterer Oberflächenrezeptor ist DC-Stamp (*dendritic cell-specific transmembrane protein*). Yagi *et al.* konnte zeigen, dass dieser transmembrane Rezeptor essentiell für die Fusion von Vorläuferzellen ist<sup>140,141</sup>. DC-Stamp defiziente Osteoklasten konnten *in vivo* sowie *in vitro* nicht zu mehrkernigen Zellen fusionieren. Jedoch war die Verschmelzung der Zellen nicht notwendig für die Funktionalität. Diese Zellen waren trotzdem aktiv und konnten mineralisierten Knochen resorbieren. Da jedoch die Aktivität mit der Größe der Zelle bzw. Mehrkernigkeit zusammenhängt, wiesen diese mononukleären Osteoklasten eine geringe Resorptionskapazität im Vergleich zu multinukleären Zellen auf.

Zum Abbau von mineralisierten Knochen sezernieren reife Osteoklasten zahlreiche proteolytische Enzyme. Eine typische Protease ist Cathepsin K, die in sehr großen Mengen in den Raum zwischen Osteoklast und Knochen (Resorptionslakune) synthetisiert wird. Ebenfalls wurde die Expression der Osteoklasten-typischen Protease MMP-9 in den Kulturen untersucht.

Das Fusionsprotein SIRP $\alpha$  wird schon in monozytären Vorläuferzellen hochreguliert und wird während der Differenzierung dieser Zellen zu reifen Osteoklasten nicht mehr stark reguliert, was sich in den Kulturen beider Genotypen vergleichbar darstellte (s. Abb. 14A). In der Expression der drei anderen Markerproteine zeigte sich in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Kulturen eine verzögerte Hochregulation im Vergleich zum WT (s. Abb. 14). Am stärksten ausgeprägt war der Unterschied am zweiten und vierten Tag der Differenzierung. Die Expression der Gene

DC-Stamp, Cathepsin K und MMP-9 war um mehr als 80 % niedriger in den *knock out*-Kulturen als in den WT-Kulturen. Im Verlauf zeigte sich eine verzögerte Steigerung der Expression dieser Markergene.



**Abb. 14: Expression von Fusions- und Aktivitätsproteinen während der Osteoklasten-Differenzierung *in vitro***

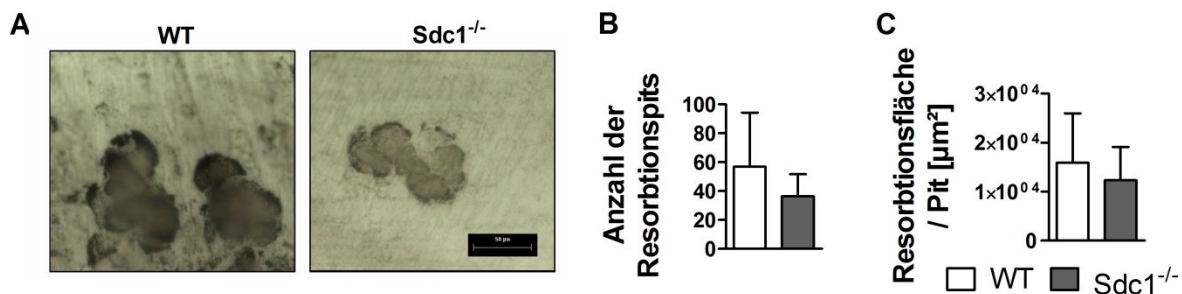
Isolierte Knochenmarkszellen aus WT- und Syndecan-1-defizienten Mäusen wurden drei Tage mit M-CSF vorstimuliert und im Anschluss für weitere 6 Tage durch RANKL zu reifen Osteoklasten differenziert. Vor der RANKL-Stimulation sowie nach 2, 4 und 6 Tagen wurde die Expression von SIRP $\alpha$  (A), DC-Stamp (B), Cathepsin K (C) und MMP-9 (D) mittels *real time*-PCR gemessen und in Relation zum Kontrollgen HPRT gesetzt. Der Versuch wurde mit jeweils drei unabhängigen Isolaten durchgeführt.

#### 4.2.1.4 Funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der Osteoklastenaktivität *in vitro*

In dem folgenden Versuch wurde direkt die Aktivität von Syndecan-1-defizienten Osteoklasten im Vergleich zu Wildtyp-Zellen gemessen. Die Vorläuferzellen wurden für diesen Versuch auf Dentinplättchen ausgesät und unter identischen Bedingungen in 9 Tagen

zu reifen Osteoklasten differenziert. Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Resorptionslakunen der Osteoklasten mittels Tuschepartikel angefärbt und quantifiziert (s. Abb. 15). In den *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Kulturen war durchschnittlich ca. 35 % weniger Resorptionsfläche pro Gesamtfläche zu detektieren (WT = 20 % ± 5; *Sdc1*<sup>-/-</sup> = 13% ± 5). In den Kontrollen betrug die Anzahl der Resorptions-*pits* im quantifizierten Bereich 57 ± 38 im Vergleich zu nur 34 ± 15 *pits* in den *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Kulturen. Ferner war auch die Resorptionsfläche pro einzelner *Pit* der *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Osteoklasten um durchschnittlich 20 % reduziert (WT = 1,6 x 10<sup>4</sup> ± 1 x 10<sup>4</sup> μm<sup>2</sup>; *Sdc1*<sup>-/-</sup> = 1,2 x 10<sup>4</sup> ± 0,7 x 10<sup>4</sup> μm<sup>2</sup>).

Folglich scheint die Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen durch das Fehlen von Syndecan-1 leicht retardiert zu sein, wie die verzögerte Hochregulation der Expression wichtiger Markerproteine, die niedrigere Anzahl an großen multinukleären Klasten und die geringere Resorptionsfläche der *knock out*-Kulturen widerspiegeln.



**Abb. 15: Charakterisierung der Aktivität der differenzierten Osteoklasten**

Die Aktivität der Osteoklasten wurde anhand ihrer Resorptionsfähigkeit gemessen. Vorläuferzellen isoliert aus Wildtyp- und Syndecan-1-defizienten Tieren wurden durch die Kultivierung mit den Differenzierungsfaktoren M-CSF und RANKL auf Dentinplättchen zu reifen Osteoklasten differenziert. Am 9. Tag der Kultivierung wurden die Resorptionslakunen der Osteoklasten mittels Tusche angefärbt und die Anzahl an Resorptions-*pits* (B) sowie die Resorptionsfläche pro *Pit* (C) bestimmt. Es erfolgte eine dreifach Bestimmung von jeweils zwei unabhängigen Isolaten (MW ± SD, schwarzer Balken 50 μm).

**4.2.2 Expression und Funktionalität von Syndecan-1 während der Osteoblasten-Differenzierung**

Das Knochengewebe besteht aus unterschiedlichen Zelltypen. Die Osteoblasten stellen eine große Gruppe der Knochenzellen dar und bilden das mineralisierte Gewebe. Des Weiteren produzieren Osteoblasten Stimulanzen, wie zum Beispiel RANKL und OPG, die sich positiv bzw. negativ auf die Osteoklastogenese auswirken. Daher ist es unerlässlich neben der

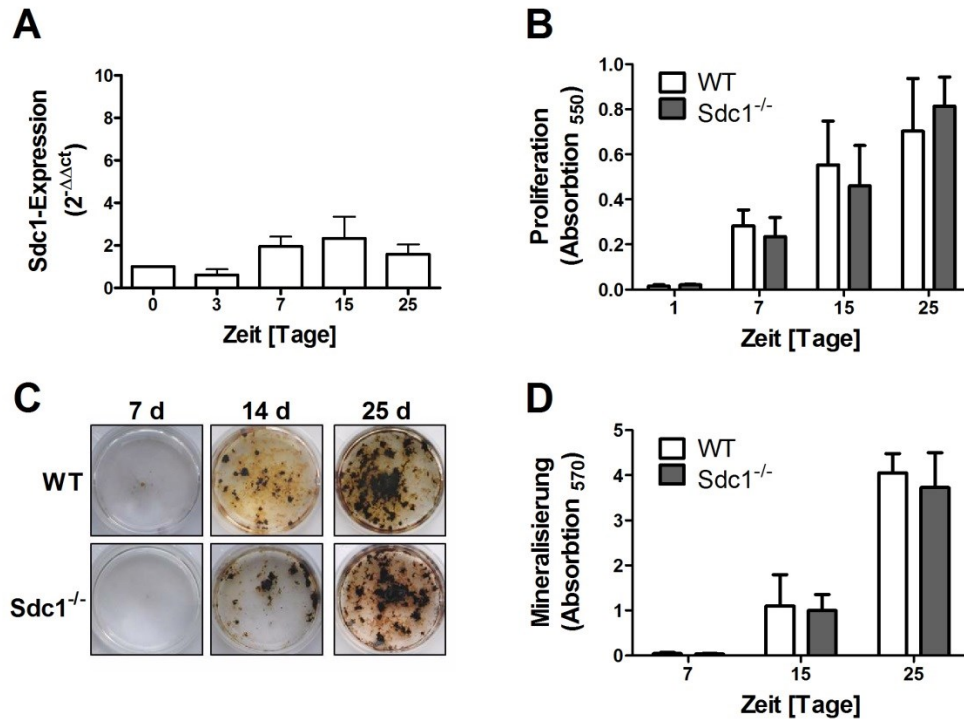
Osteoklastogenese auch die Differenzierung und Funktionalität von Osteoblasten, denen Syndecan-1 fehlt, zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Osteoblasten-Vorläuferzellen enzymatisch aus den Schädeldächern von neonatalen WT- und  $Sdc1^{-/-}$ - Mäusen isoliert und zu reifen Osteoblasten differenziert. Während der Differenzierung der Osteoblasten-Vorläuferzellen konnte nur eine geringe Hochregulation der Expression von Syndecan-1 um ein zweifaches an Tag 15 der WT Kultivierung beobachtet werden (s. Abb. 16A).

Von großer Bedeutung während der Differenzierung von Osteoblasten ist die Proliferation, denn erst nach der Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes wird die extrazelluläre Matrix durch Einlagerung von Hydroxylapatit ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) mineralisiert. Diese Kalzifizierung ist ein typischer Nachweis von reifen, aktiven Osteoblasten<sup>127,128,142</sup>. Die Proliferation der Syndecan-1-defizienten Zellen wurde über einen Zeitraum von 25 Tagen mittels MTT-Test bestimmt und mit Wildtyp-Kulturen verglichen (Abb. 16B). Die anfängliche Anzahl an vitalen Zellen war 24 h nach der Aussaat fast identisch. Im weiteren Verlauf stieg die Zellzahl beider Ansätze kontinuierlich an und erreichte ihr Maximum bei beiden Genotypen am 25. Tag (WT:  $0,7031 \pm 0,2230$ ;  $Sdc1^{-/-}$ :  $0,8136 \pm 0,1290$ ). Unterschiede in der Proliferationsfähigkeit aufgrund des Defizits von Syndecan-1 konnten demnach nicht festgestellt werden.

Der Grad der Mineralisierung wurde zum einen visuell mittels von Kossa Färbung und zum anderen photometrisch mittels Alizarinrot-S-Färbung im zeitlichen Verlauf nach 7, 15 und 25 Tagen analysiert. Durch die von Kossa-Färbung wurden indirekt Kalziumionen durch den schwarzen Niederschlag der reduzierten Silberionen im Zelllayer nachgewiesen (s. Abb. 16C). An Tag 7 war kaum mineralisierte Matrix in den Kulturen zu finden. Im weiteren Verlauf der Differenzierung nahm die Mineralisierung der Wildtyp und der *knock out*-Zellen fortwährend zu. In der quantitativen Bestimmung mittels der Alizarinrot-S-Färbung konnte über den gesamten Zeitraum der Kultivierung kein Unterschied zwischen WT und  $Sdc1^{-/-}$  gemessen werden (s. Abb. 16D). Am 7. Tag betrug die Absorption der WT-Proben  $0,0443 \pm 0,0304$  und der  $Sdc1^{-/-}$   $0,0337 \pm 0,0193$ . Innerhalb der weiteren Kultivierung konnte ein starker Anstieg der Kalziumeinlagerung beobachtet werden. Nach 25 Tagen war die Absorption um ein vierfaches im Vergleich zu Tag 15 angestiegen und erreichte in beiden Ansätzen ein vergleichbares Maximum (WT:  $4,0490 \pm 0,4306$ ;  $Sdc1^{-/-}$ :  $3,7283 \pm 0,7738$ ).

Die Proliferation der isolierten Zellen und die Mineralisierung der EZM zeigten im Verlauf der Kultivierung keinen Unterschied zwischen Syndecan-1-defizienten und Wildtyp-Osteoblasten. Das Fehlen von Syndecan-1 beeinflusst nicht die Osteoblasten-Differenzierung sowie deren

Funktionalität unter stabilen *in vitro*-Bedingungen.



**Abb. 16: Expression und Funktionalität von Syndecan-1 während der Osteoblasten-Differenzierung**

Osteoprogenitor-Zellen, isoliert aus Wildtyp und Syndecan-1-defizienten, neonatalen Mäusen, wurden über einen Kultivierungszeitraum von 25 Tagen zu reifen Osteoblasten differenziert. Im Verlauf der Kultivierung wurde die Genexpression von Syndecan-1 mittels *real time*-PCR untersucht und in Relation zum Kontrollgen HPRT gesetzt. (A, n = 3). Mittels MTT-Test wurde die Proliferation nach 1, 7, 15 und 25 Tagen gemessen (B). Die Mineralisierung der extrazellulären Matrix der Osteoblasten wurde mit der von Kossa-Färbung detektiert (C) und mittels Alizarinrot-S-Färbung quantitativ am 7., 15. und 25. Tag bestimmt (D, MW ± SD, n ≥ 4).

#### 4.2.3 Knochenphänotyp der adulten Syndecan-1-defizienten Maus

Im bisherigen Verlauf der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Syndecan-1 eine funktionelle Rolle während der Osteoklastogenese *in vitro* und anscheinend *in vivo* während der Frakturheilung ausübt. Es stellte sich daher die Frage, in wieweit Syndecan-1 Einfluss auf den Knochenstoffwechsel *in vivo* unter physiologischen Bedingungen nimmt. Hierbei richtete sich im Folgenden der Hauptfokus auf die Analyse des Vorkommens von Osteoklasten, auf die Untersuchungen der Knochenstruktur und der Knochenstabilität in der adulten Maus in Abwesenheit von Syndecan-1.

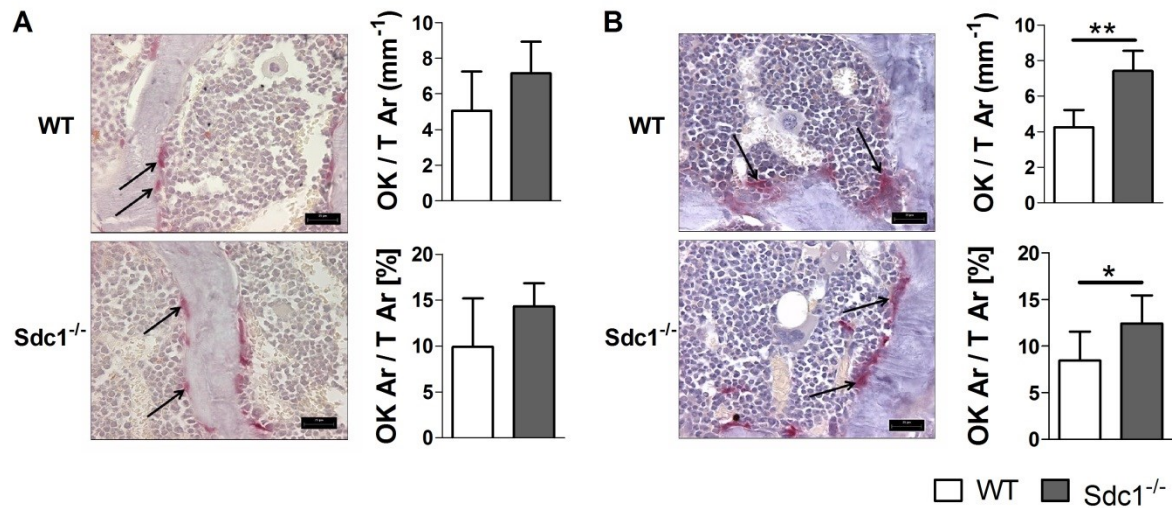


#### 4.2.3.1 Quantifizierung der Osteoklasten in der adulten Maus

Zunächst erfolgte die Quantifizierung der Osteoklasten in Gewebeschnitten der adulten Syndecan-1-defizienten Maus verglichen zu den Wildtyp-Tieren. TRAP-positiv gefärbte Zellen, die an der Trabekeloberfläche des 5. Lendenwirbels bzw. der Tibia von 4 Monate alten Tieren lokalisiert waren, wurden als reife Osteoklasten gewertet (s. Abb. 17). In den Lendenwirbeln der *knock out*-Mäuse waren durchschnittlich ca. 40 % mehr Osteoklasten pro Trabekeloberfläche im Vergleich zur Kontrolle zu quantifizieren (WT:  $5 \pm 2$  OK/mm<sup>-1</sup>; Sdc1<sup>-/-</sup>:  $7 \pm 2$  OK/mm<sup>-1</sup>;  $p = 0,11$ ). Des Weiteren zeigte auch die Osteoklasten besetzte Trabekeloberfläche eine Erhöhung von durchschnittlich 45 % in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Tieren, allerdings mit einer starken Varianz in beiden Tiergruppen (WT:  $9,91 \pm 5,30$  % OK Ar / T Ar; Sdc1<sup>-/-</sup>:  $14,32 \pm 2,54$  % OK Ar / T Ar;  $p = 0,29$ ).

In der Quantifizierung der Röhrenknochen stellten sich signifikante Unterschiede dar (s. Abb. 17 B). Die Trabekeloberfläche war mit ca. 40 % mehr Osteoklasten in den Syndecan-1-defizienten Tibiae im Vergleich zu den WT-Proben besetzt (WT:  $4,24 \pm 0,97$  OK/mm<sup>-1</sup>; Sdc1<sup>-/-</sup>:  $7,42 \pm 1,12$  OK/mm<sup>-1</sup>;  $p = 0,002$ ). Durchschnittlich betrug die Osteoklasten besetzte Oberfläche 8,46 % der Trabekeloberfläche in den WT-Tibiae und 12,41 % in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Proben ( $p = 0,03$ ). Die Sdc1<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Wirbelkörper sowie im Röhrenknochen eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten gegenüber den WT-Mäusen.





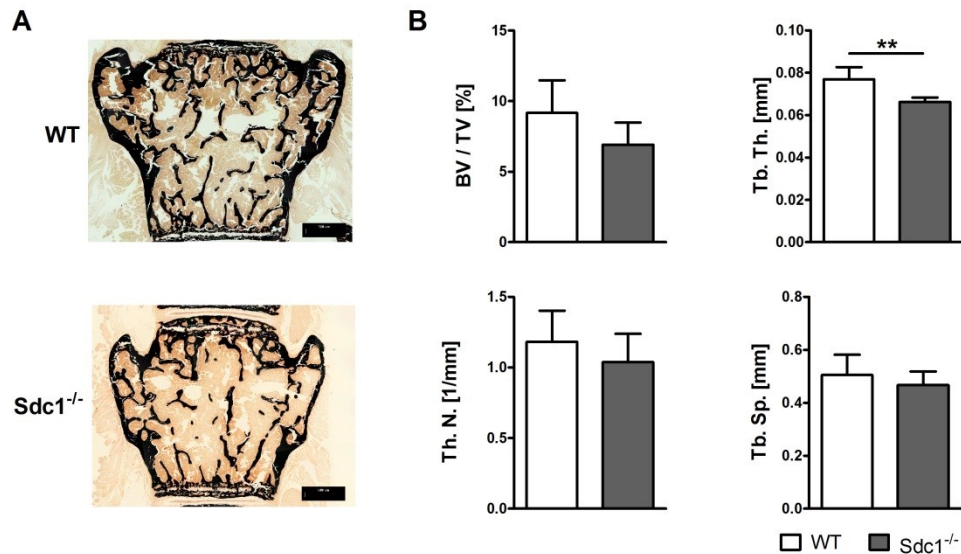
**Abb. 17: Bestimmung der Anzahl der Osteoklasten im fünften Lendenwirbel und in der Tibia adulter Mäuse**

Quantifizierung der Osteoklasten mittels TRAP-Färbung erfolgte in vier Monate alten WT- und Sdc1<sup>-/-</sup>-Tieren. Als reifer Osteoklast wurden TRAP-positiv gefärbte Zellen, die an der Trabekeloberfläche lokalisiert waren, gewertet. In histologischen Präparaten des fünften Lendenwirbels (A) und der Tibia (C) wurden die Osteoklasten pro Trabekeloberfläche (OK / T Ar in mm<sup>-1</sup>) sowie die Osteoklasten besetzte Oberfläche zur gesamten Trabekeloberfläche (OK Ar / T Ar in %) bestimmt (B und D). Dargestellt sind MW ± SD (WS: n ≥ 4; Tibiae: n = 6; Maßstab entspricht 25 µm).

#### 4.2.3.2 Histomorphologische Analyse der Knochenstruktur

Während des lebenslangen Auf- und Abbau des Knochengewebes (*remodeling*) muss der Knochenaufbau sowie -abbau aufeinander abgestimmt sein. Eine veränderte Osteoklastogenese bzw. Anzahl an reifen Osteoklasten kann dieses Gleichgewicht stören und spiegelt sich häufig in einer veränderten Knochenstruktur wieder. Aus diesem Grund wurden histomorphologische Analysen der Knochenstruktur mittels µCT-Aufnahmen durchgeführt. Es wurde zum einen der 5. Lendenwirbel, der hauptsächlich aus trabekulären Strukturen besteht und zum anderen die Tibia als Röhrenknochen, in der die Kraftaufnahme sowohl über die Trabekel als auch über die Kortikalis erfolgt, analysiert. Die Lendenwirbel der Sdc1<sup>-/-</sup>-Maus wiesen ca. 25 % weniger Knochenvolumen im Verhältnis zum gesamten Volumen des Wirbelkörpers vergleichend zum WT auf (Abb. 18 A u. B, WT = 9,16 ± 2,31 %; Sdc1<sup>-/-</sup> = 6,91 ± 1,56 %). Die Trabekeldicke war signifikant reduziert zwischen den beiden Genotypen (WT = 0,08 ± 0,01 mm; Sdc1<sup>-/-</sup> = 0,07 ± 0,002 mm; p = 0,008) und die Anzahl der Knochenbälkchen unterschied sich um 12 %. In den Sdc1<sup>-/-</sup> Tieren betrug die Anzahl durch-

schnittlich  $1,04 \pm 0,20$  Trabekel pro mm im Vergleich zu WT mit  $1,18 \pm 0,22$  pro mm. Der Abstand der Trabekel war jedoch zwischen den Genotypen nur geringfügig verändert.

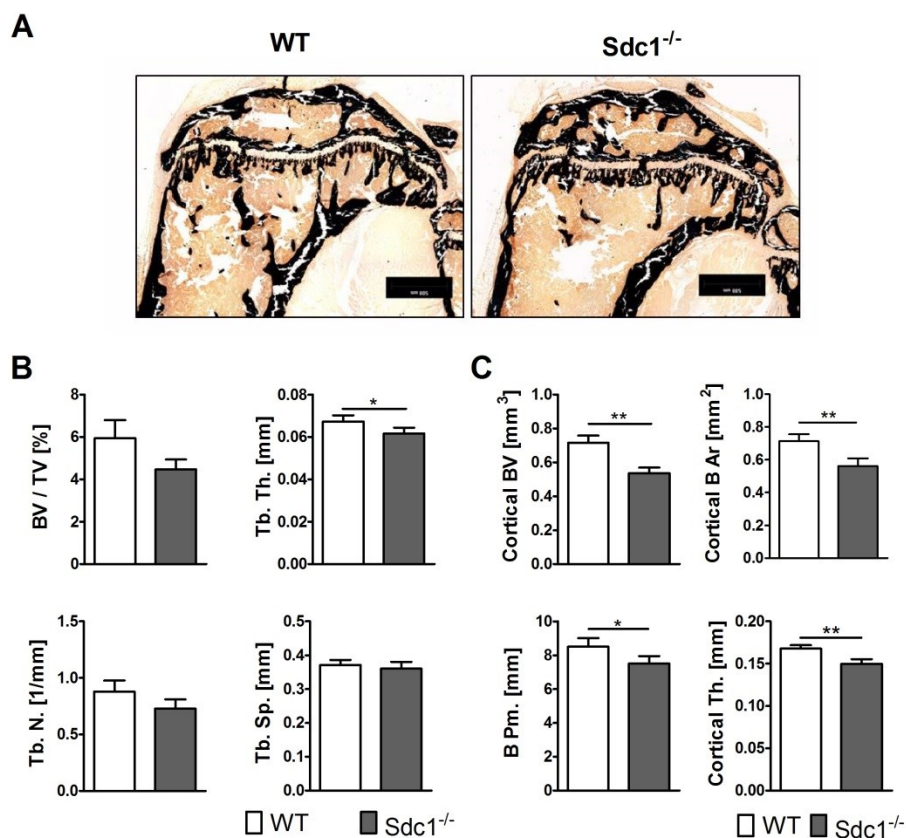


**Abb. 18: Quantitative Analyse des Knochenstruktur von WT und Syndecan-1-defizienten Mäusen mittels  $\mu$ CT**

Die Wirbelsäule von vier Monate alten Mäusen wurde im  $\mu$ CT auf ihre Knochenstruktur analysiert. Repräsentative Darstellung des 5. Lendenwirbels der WT- und Sdc1<sup>-/-</sup>-Maus (A, von Kossa gefärbte Technovit-Proben zur Darstellung des mineralisierten Gewebes). Für die quantitative Auswertung des  $\mu$ CTs wurde das Knochenvolumen in Relation zur gesamten Gewebefläche (*bone volume / tissue volume* = BV / TV in %), Trabekeldicke (*trabecular thickness* = Tb. Th. in mm), Trabekelanzahl (*trabecular number* = Th. N. pro mm) und Trabekelabstand (*trabecular separation* = Tb. Sp. in mm) bestimmt (B, MW  $\pm$  SD, n = 5, Maßstab entspricht 500  $\mu$ m).

Die Analyse der Knochenstruktur der Tibiae zeigte ähnliche Tendenzen wie die der Wirbelkörper. Ebenfalls war das Knochenvolumen im Verhältnis zum Gesamtgewebe um 24 % in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert (s. Abb. 19 B, WT:  $5,94 \pm 0,85$  %; Sdc1<sup>-/-</sup>:  $4,47 \pm 0,47$  %; p = 0,056). Die Trabekeldicke in den *knock out*-Tieren war um 9 % dünner (WT:  $0,07 \pm 0,003$  mm; Sdc1<sup>-/-</sup>:  $0,06 \pm 0,003$  mm; p = 0,016), und es zeigte sich eine geringere Anzahl an Trabekeln (WT:  $0,88 \pm 0,1$  Trabekel pro mm; Sdc1<sup>-/-</sup>:  $0,73 \pm 0,008$  Trabekel pro mm). Der Abstand der einzelnen Knochenbälkchen war jedoch zwischen den beiden Versuchsgruppen sehr ähnlich. Die Analyse der Parameter des kortikalen Knochens der Tibia ergaben zwischen Sdc1<sup>-/-</sup> und WT weitere signifikante Unterschiede (p = 0,008, Abb. 19 C). Das kortikale Knochenvolumen und die kortikale Knochenfläche waren um mehr als 20 % in der Sdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert. Der Durchmesser der Kortikalis und der Umfang der Tibia waren in

den WT-Tieren um ca. 10 % höher. Insgesamt zeigte die Syndecan-1-defiziente Maus einen mäßig ausgeprägten Knochen-Phänotyp mit einem reduzierten Knochenvolumen in den Lendenwirbelkörpern sowie in den Röhrenknochen.



**Abb. 19: Quantitative Analyse der Knochenstruktur eines Röhrenknochens der WT- und Syndecan-1-defizienten Maus mittels  $\mu$ CT**

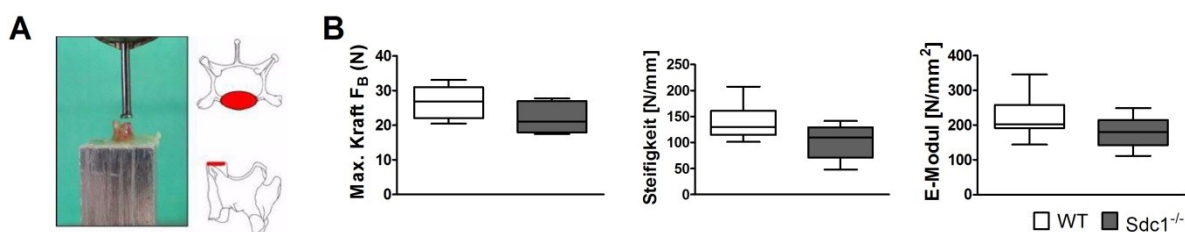
Die Tibiae von vier Monate alten Mäusen wurden im  $\mu$ CT auf ihre Knochenstruktur analysiert, und anschließend wurden Gewebsschnitte der Tibiae zur Darstellung des mineralisierten Gewebes mittels von Kossa-Färbung angefertigt (A, Maßstab entspricht 500  $\mu$ m). Zur quantitativen Auswertung wurden die Parameter der trabekulären Strukturen (B) und der Kortikalis der Tibiae (C) im  $\mu$ CT bestimmt. Vermessen wurden das Knochenvolumen in Relation zur gesamten Gewebefläche (*bone volume / tissue volume* = BV / TV in %), Trabekeldicke (*trabecular thickness* = Tb. Th. in mm), Trabekelanzahl (*trabecular number* = Th. N. pro mm), Trabekelabstand (*trabecular separation* = Tb. Sp. in mm), Knochenvolumen der Kortikalis (*cortical bone volume* = cortical BV in mm<sup>3</sup>), die Knochenfläche der Kortikalis (*cortical bone area* = cortical B Ar in mm<sup>2</sup>), der Durchmesser des Knochens (*bone perimeter* = B Pm. in mm) und die Dicke der Kortikalis (*cortical thickness* = cortical Th. in mm). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD (n = 5).

#### 4.2.3.3 Biomechanische Testung der Knochenstabilität des 4. Lendenwirbels

Eine der Hauptaufgaben des Skeletts ist seine Stützfunktion, wo es auf die Stabilität, Härte

und Elastizität des Knochens ankommt. Ein geringeres Knochenvolumen mit einer niedrigen Anzahl an Trabekeln, wie es bei der  $Sdc1^{-/-}$ -Maus zu beobachten war, lässt auf eine niedrigere Knochenstabilität schließen. Aus diesem Grund wurden im folgenden Versuch Wirbelkörper der Mäuse auf ihre biomechanischen Eigenschaften mittels eines Kompressionstest untersucht. Hierbei wurde der vierte Lendenwirbelkörper axial bis zum Versagen (Bruch des Wirbelkörpers) belastet und aus dem aufgezeichneten Kraft-Längenänderungs-Diagramm die Werte der biomechanischen Eigenschaft bestimmt.

In allen Testparametern wiesen die Syndecan-1-defizienten Wirbel niedrigere Werte im Vergleich zum Wildtyp auf (s. Abb. 20). Die maximale Kraft  $F_B$ , die jeder einzelne Wirbelkörper aufnehmen konnte, war durchschnittlich 18 % geringer in den  $Sdc1^{-/-}$ -Knochen (WT:  $26,87 \pm 4,54$  N;  $Sdc1^{-/-}$ :  $21,05 \pm 4,38$  N;  $p = 0,09$ ). Ferner war die errechnete Steifigkeit  $S$  um ca. 15 % in den *knock out*-Knochen niedriger. Die  $Sdc1^{-/-}$ -Wirbel zeigten eine Steifigkeit von durchschnittlich  $110 \pm 34$  N/mm vergleichend zum WT mit  $129 \pm 32$  N/mm. Der Elastizitätsmodul (E-Modul) ist ein Parameter, der den Zusammenhang zwischen auftretender Spannung und der verursachten Stauchung, unter Berücksichtigung der Ausgangshöhe und Ausgangsfläche, darstellt. Auch hier zeigten die  $Sdc1^{-/-}$ -Wirbel um ca. 10 % reduzierte Werte im Vergleich zum WT (WT:  $201 \pm 58$  N/mm<sup>2</sup>;  $Sdc1^{-/-}$ :  $179 \pm 47$  N/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,18$ ).



#### Abb. 20: Biomechanische Testung des 4. Lendenwirbels

Die biomechanischen Eigenschaften des 4. Lendenwirbels der  $Sdc1^{-/-}$ - und WT-Maus wurden durch einen Kompressionstest des Wirbelkörpers untersucht und anhand der max. Kraft  $F_B$ , ihrer Steifigkeit und des Elastizitätsmoduls (E-Modul) charakterisiert. Der Testaufbau und eine schematische Darstellung der getesteten Wirbelfläche in rot (A) sowie die Testergebnisse als Median mit ihrer Streuung wurden dargestellt (B, WT:  $n = 10$ ,  $Sdc1^{-/-}$ :  $n = 6$ ).

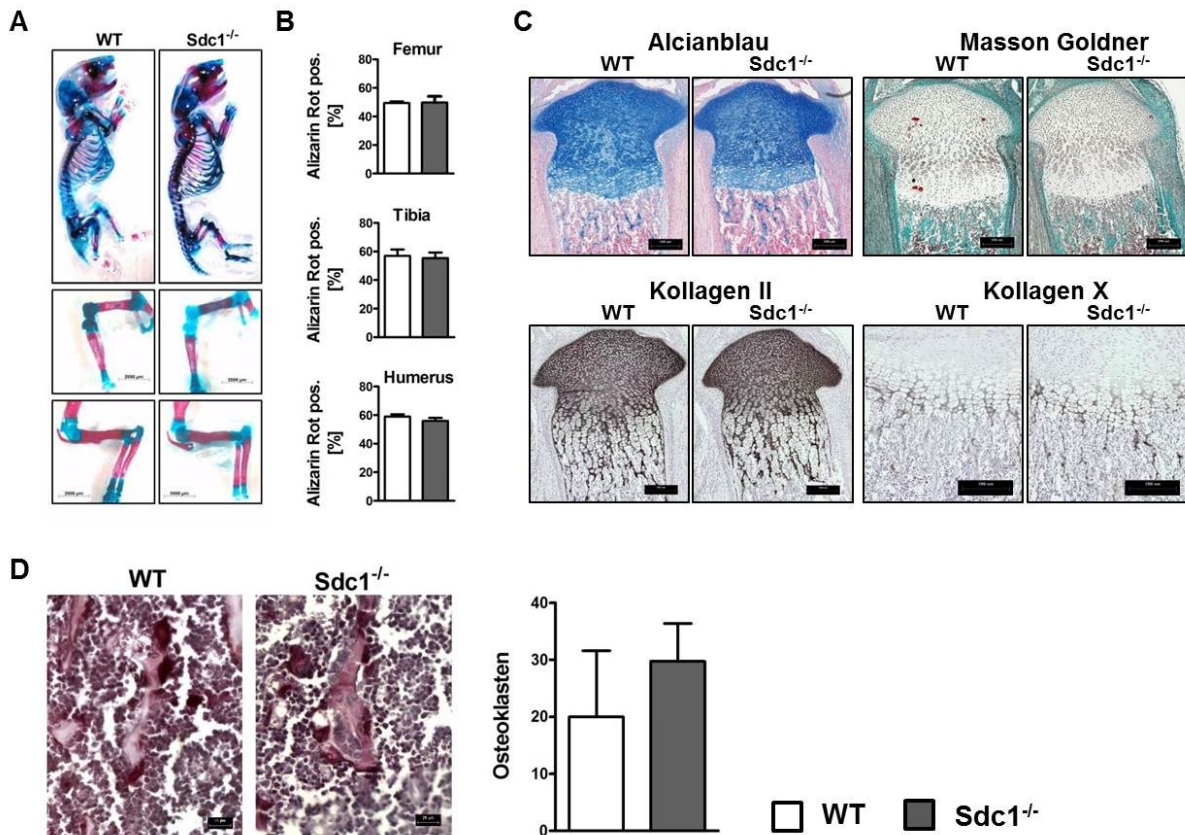
#### 4.2.4 Knochenphänotyp der neonatalen Syndecan-1-defizienten Maus

Das altersbedingte *Remodeling*, unter dem man den fortwährenden Auf- und Abbau des Knochengewebes zur Reparatur und Adaption an veränderte mechanische Belastungsanforderungen im adulten Organismus versteht, unterliegt anderen Kontroll-

mechanismen als die Degradation des Frakturkallus bzw. Umbauprozessen innerhalb des harten Kallus. Während der Frakturheilung werden zahlreiche Vorgänge der Embryogenese und des Längenwachstums rekapituliert. Es können analog zur Skelettbildung die beiden Formen der Knochenbildung, die intramembranöse und die enchondrale Ossifikation, beobachtet werden. Während der Embryogenese werden mittels enchondrale Ossifikation die Röhrenknochen gebildet, indessen entstehen flache Knochen, wie zum Beispiel das Schädeldach, durch intramembranöse Ossifikation. Einen Überblick über den Entwicklungsstand der Skelettbildung bietet die Gesamtskelettfärbung eines Embryos, bei der das Knorpel- und Knochengewebe unterschiedlich koloriert werden. Im Folgenden wurde mittels der Alzianblau-Alizarinrot-Doppelfärbung das Skelett von vier Tage alten neugeborenen Mäusen aus heterozygoten Verpaarungen untersucht. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die  $Sdc1^{-/-}$  und die WT-Tiere einen identischen Entwicklungsstand (s. Abb. 21). Kieferknochen sowie vordere Gesichtsschädel, wo hauptsächlich die Knochenbildung mittels intramembranöser Ossifikation erfolgt, waren gleich stark mineralisiert (rot angefärbter Bereich). Ebenfalls die Quantifizierung der Röhrenknochen (Humerus, Femur und Tibia), die durch die enchondrale Ossifikation gebildet werden, wiesen keine Unterschiede auf (s. Abb. 21 B). Die Länge der mineralisierten Zone im Verhältnis zur Gesamtlänge der Knochen war in den WT- und  $Sdc1^{-/-}$ -Proben gleich.

Zur genaueren Analyse der enchondralen Ossifikation wurden die Tibiae von 4 Tage alten neugeborenen Mäusen histomorphologisch sowie immunhistologisch untersucht (s. Abb. 21 C). Mittels Alcianblau-Färbung konnte der knorpelige Anteil und mittels Masson Goldner-Färbung der knöcherne Bereich der proximalen Tibia charakterisiert werden. Das Verhältnis zwischen Knorpel- und Knochengewebe zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Des Weiteren ließ die Detektion der beiden Markerproteine Kollagen II sowie Kollagen X keine Differenzen zwischen WT und  $Sdc1^{-/-}$  erkennen. Die Differenzierung der Knorpelzellen zu hypertrophen Chondrozyten sowie der Umbauprozess von Knorpelgewebe in trabekulären Knochen waren durch das Fehlen von Syndecan-1 am vierten Lebenstag nicht beeinflusst. Auffälligkeiten waren jedoch bei der Quantifizierung der Osteoklasten in den Tibiae zu erkennen. Wie bei den adulten Tieren wiesen die  $Sdc1^{-/-}$ -Proben eine erhöhte Anzahl an TRAP-positiven Zellen von mehr als 45 % im Vergleich zum WT auf (s. Abb. 21 D). Jedoch muss hier die Varianz innerhalb der einzelnen Genotypen beachtet werden (WT:  $20 \pm 11,6$  OK;  $Sdc1^{-/-}$ :  $30 \pm 6,6$  OK,  $p = 0,18$ ).





**Abb. 21: Charakterisierung des Knochenphänotyps von 4 Tage alten neugeborenen Syndecan-1-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen**

Histomorphologische Analyse der Skelettentwicklung mittels Alcianblau-Alizarinrot-Färbung von vier Tage alten Mäusen aus heterozygoten Verpaarungen (A) und Quantifizierung des mineralisierten Gewebes (rot) im Verhältnis zur Gesamtlänge der Röhrenknochen (B, WT: n = 3; Sdc1<sup>-/-</sup>: n = 5). Die neonatalen Tibiae wurden histomorphologisch und immunhistologisch auf Unterschiede in der enchondralen Ossifikation (C, Maßstab entspricht 200 µm) sowie in der Osteoklastenzahl (D, TRAP-Färbung, Maßstab entspricht 25 µm) untersucht (WT: n = 5; Sdc1<sup>-/-</sup>: n = 4).

### 4.3 Die Rolle von Syndecan-4 während der frühen Phase der Frakturheilung

Durch das Fehlen von Syndecan-4 wurde die Zusammensetzung des Frakturkallus stark beeinflusst. Nach 14 Tagen war der Frakturkallus der Sdc4<sup>-/-</sup>-Maus stark vergrößert mit einem erhöhten Anteil an Knorpelgewebe im Vergleich zu den WT-Tieren. Die Degradation der Knorpelmatrix schien vermindert, jedoch konnte in den Präparaten zu diesem Zeitpunkt keine

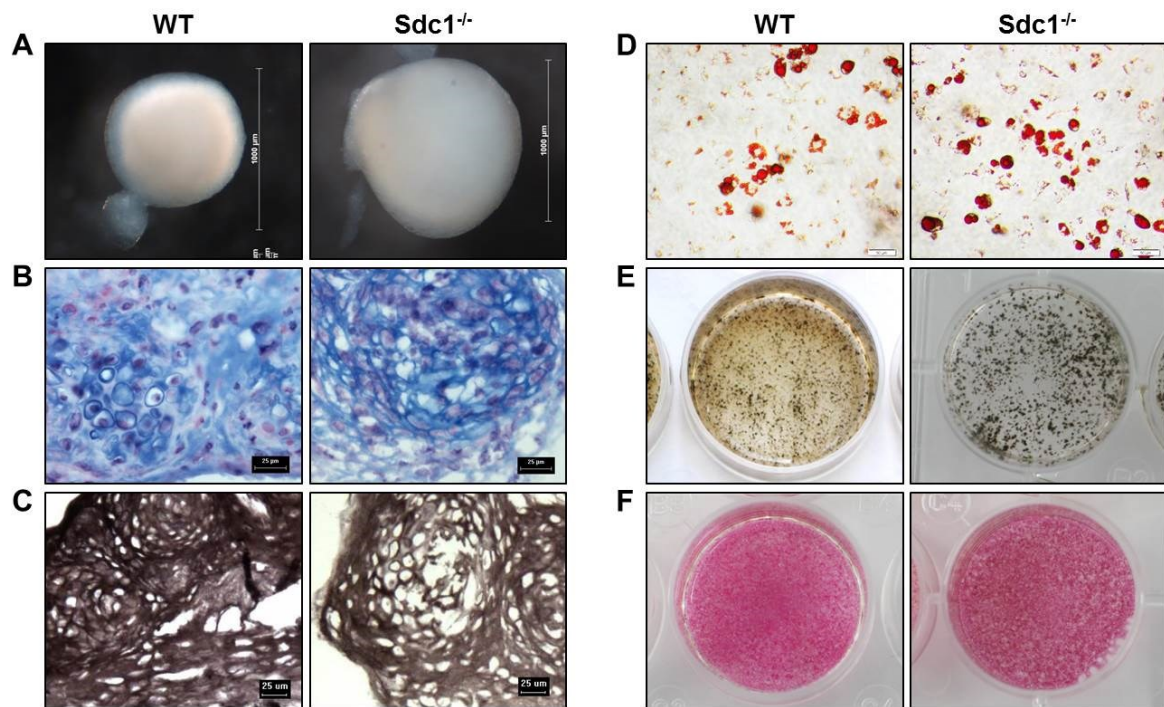
geringere Synthese von wichtigen Proteasen der Frakturheilung und keine reduzierte Anzahl an Osteoklasten beobachtet werden. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen scheint die Ursache für die verzögerte Heilung in der *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Mäusen in einer früheren Phase der Frakturheilung zu liegen. Das frühe Stadium des Reparaturprozesses steht unter der Kontrolle der Entzündungsreaktion, wo zahlreiche Zytokine ausgeschüttet werden. In dem dritten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Inflammation auf das Fehlen bzw. Vorhandensein von Syndecan-4 während der Frakturheilung untersucht.

#### **4.3.1 Expression von Syndecan-4 in mesenchymalen Stammzellen**

Zwei bedeutende Zytokine, die die Kaskade der Frakturheilung initiieren, sind TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Durch die Entzündungsreaktion werden MSZ rekrutiert bzw. wandern in das geschädigte Gewebe direkt aus dem Knochenmark, Periost oder über neu einspritzende Gefäße ein. Diese Zellen differenzieren je nach Stimulus zu Chondroblasten oder Osteoblasten. Im Folgenden wird der Einfluss der beiden Entzündungsfaktoren TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf die Expression der Syndecane in mesenchymalen Stammzellen untersucht.

Im Vorfeld wurden die isolierten MSZ auf ihre Multipotenz getestet, indem sie unter jeweils spezifischer Induktion zu drei verschiedenen Zelltypen differenzierten (s. Abb. 22). Die Differenzierung zu Chondrozyten konnte in der Pelletkultur durch den Nachweis von Proteoglykanen (blau gefärbt mittels Alcianblau-Färbung) und dem Markerprotein Kollagen II in der EZM gezeigt werden (s. Abb. 22 A-C). Isolierte Zellen, die mit adipogenen Reagenzien kultiviert wurden, wiesen typische Lipidvakuolen im Zellinneren auf (rot angefärbt durch Red Oil, s. Abb. 22 D). Ferner konnten Zellen des gleichen Isolats zu reifen Osteoblasten differenziert werden, wie der Nachweis der Aktivität der ALP sowie der mineralisierten Matrix im Zellschicht bewies (s. Abb. 22 E u. F).

Unter der TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Stimulation war in den MSZ-Kulturen eine deutliche Hochregulation der Syndecan-4-Expression zu beobachten (s. Abb. 23). In den TNF $\alpha$  induzierten Zellen war bereits nach 60 Minuten der RNA-Gehalt auf mehr als das Fünffache erhöht und erreichte nach drei Stunden sein Maximum ( $6,4 \pm 2,4$ ; Abb. 23 A). Nach 6 und 24 Stunden nahm die Expression von Syndecan-4 kontinuierlich ab. Ebenfalls die Induktion mit IL-1 $\beta$  verursachte eine Zunahme der Syndecan-4-mRNA mit einem Maximum nach drei Stunden ( $4,8 \pm 0,7$ ; Abb. 23 B). Des Weiteren war eine starke Abnahme der Syndecan-2 Expression auffällig (s. Ausschnitt in Abb. 23). Unter TNF $\alpha$ -Stimulation nahm die Expression um ca. 40 % und unter IL-1 $\beta$  Stimulation um ca. 35 % innerhalb von 24 h ab. Einen Einfluss



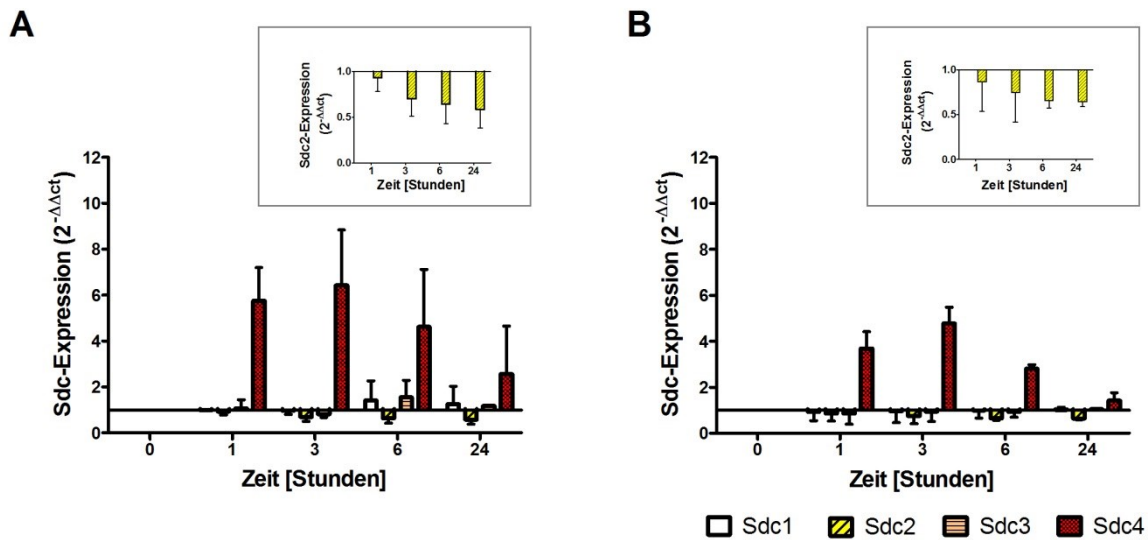
**Abb. 22: *In vitro*-Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten**

Zellen, isoliert aus dem Knochenmark von WT- und  $Sdc1^{-/-}$ -Tieren, wurden in der vierten Passage den verschiedenen Kultivierungen zugeführt und ihre Differenzierung in den jeweiligen Zelltyp mittels spezifischer Substanzen induziert. Innerhalb von 14 Tagen wurden MSZ in Pelletkulturen zu reifen Chondrozyten differenziert (A, Maßstab entspricht 1 mm). Im Anschluss erfolgte der Nachweis anhand der knorpeltypischen Matrix mittels Alcianblau-Färbung (B) und der Immunhistologie von Kollagen II im Kryoschnitt (C, Maßstab entspricht 25  $\mu\text{m}$ ). Zur Identifikation von Adipozyten konnten in 25 Tage alten adipogenen Kulturen typische intrazelluläre Lipidvakuolen angefärbt werden (D, Maßstab entspricht 50  $\mu\text{m}$ ). Der Nachweis von reifen Osteoblasten nach 25 Tagen Differenzierung erfolgte anhand der mineralisierten extrazellulären Matrix mittels von Kossa Färbung (E) und der ALP-Aktivität (F).

der Stimulanzen auf die Expression von Syndecan-1 und Syndecan-3 konnte nicht beobachtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass zwei der wichtigsten Zytokine der Frakturheilung die Syndecan-4-Expression in mesenchymalen Zellen *in vitro* regulieren. Hierbei zeigte die TNF $\alpha$  Stimulation einen stärkeren Effekt als IL-1 $\beta$ . Außerdem war die Expression von Syndecan-2 durch die Zytokine beeinflusst.





**Abb. 23: Expression der vier Syndecane in mesenchymalen Stammzell-Kulturen unter TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  Stimulation**

Zellen, isoliert aus dem Knochenmark von WT- und Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren, wurden in der vierten Passage mit 10 ng / ml TNF $\alpha$  (A) bzw. IL-1 $\beta$  (B) stimuliert. Der zeitliche Verlauf der Expression von Syndecan1, 2, 3 und 4 wurde mittels *real time*-PCR gemessen und in Relation zum Kontrollgen HPRT gesetzt. Zur besseren Übersicht wurde die Expression von Syndecan-2 extra in einem Zusatzfenster dargestellt. Der Versuch wurde mit jeweils drei unabhängigen Isolaten durchgeführt.

#### 4.3.2 Auswirkung der Reduktion der TNF $\alpha$ -Konzentration auf das Fehlen von Syndecan-4 während der Frakturheilung

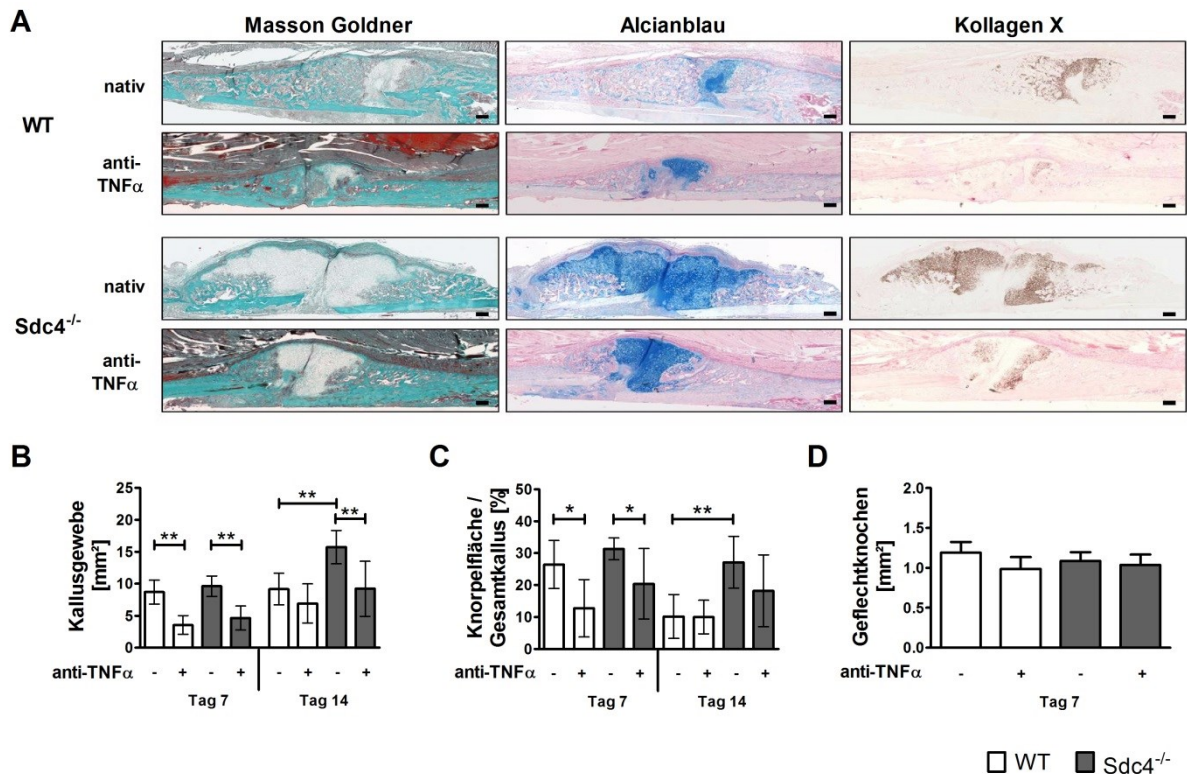
In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Syndecan-4 in mesenchymalen Zellen im entzündlichen Kontext hochreguliert wird und das Fehlen dieses Proteoglykans eine verzögerte Frakturheilung verursacht. In wieweit diese Beobachtung auch in der TNF $\alpha$ -induzierten Entzündungsreaktion während des Reparaturprozesses eine Rolle spielt, wurde in einem *in vivo*-Versuch anhand der Reduktion der TNF $\alpha$ -Konzentration mittels eines blockierenden Antikörpers überprüft. Hierzu wurde direkt vor der Fraktur und alle zwei Tage während der Frakturheilung der handelsübliche rekombinante, monoklonale Antikörper Certolizumab (Cimzia® 10mg/kg) p.a. den Mäusen injiziert. Dieses Medikament wird zur Behandlung von rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn eingesetzt. Der injizierte Antikörper bindet membranassoziiertes sowie lösliches TNF $\alpha$  und senkt damit die TNF $\alpha$ -Konzentration im Organismus.

#### 4.3.2.1 Charakterisierung der Zusammensetzung des Frakturkallus unter anti-inflammatorischer Medikation

Am 7. Tag der Frakturheilung wiesen die WT-Tiere unter der anti-TNF $\alpha$  Behandlung einen hoch signifikant reduzierten Frakturkallus auf (WT nativ:  $8,7 \pm 1,9$  mm<sup>2</sup>; behandelt:  $3,7 \pm 1,5$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ; Abb. 24 B). Ebenfalls war die Fläche des Knorpelgewebes stark vermindert (nativ:  $26,6 \pm 7,5$  %; behandelt:  $12,8 \pm 9,0$  % des Gesamtkallus;  $p = 0,02$ ; Abb. 24 C). Auch nach 14 Tagen konnte eine durchschnittlich kleinere Kallusfläche festgestellt werden (WT nativ:  $9,2 \pm 2,5$  mm<sup>2</sup>; behandelt:  $6,9 \pm 3,1$  mm<sup>2</sup>), die jedoch einen fast identischen Anteil an Knorpelgewebe zu den unbehandelten Mäusen aufwies (Abb. 24 A-C). Die Sdc4<sup>-/-</sup>-Tiere zeigten wie die WT-Mäuse unter der anti-inflammatorischer Medikation eine signifikante Abnahme der Kallusbildung und der Knorpelfläche (s. Abb. 24 A-C). Am 7. Tag war der Gesamtkallus verglichen mit den unbehandelten Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren um ca. die Hälfte geringer ausgebildet und erreichte fast identische Ausmaße wie in den WT-Mäusen unter der anti-TNF $\alpha$ -Behandlung ( $4,7 \pm 1,9$ ). Nach 14 Tagen konnte weiterhin eine deutlich geringere Kallusgröße in den *knock out*-Tieren gemessen werden (nativ:  $15,7 \pm 2,6$  mm<sup>2</sup>; behandelt:  $9,3 \pm 4,3$  mm<sup>2</sup>;  $p < 0,01$ ). Das Knorpelgewebe betrug durchschnittlich 20 % des Gesamtkallus nach 7 und 14 Tagen und war unter der Hemmung der TNF $\alpha$ -Signalkaskade wie in den WT-Mäusen deutlich geringer gebildet.

Neben der enchondralen Knochenbildung findet Frakturspalt-fern die intramembranöse Ossifikation statt, bei der direkt Knochengewebe gebildet wird. Nach der Fraktur proliferieren und differenzieren Vorläuferzellen aus dem Periost stammend zu Osteoblasten und bilden direkt trabekulären Knochen. Nach 7 Tagen kann die maximale Proliferation dieser Zellen beobachtet werden<sup>8,143</sup>. Die Quantifizierung erfolgte anhand der neu gebildeten Trabekel distal und proximal des Frakturkallus. In den WT- und Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren war die intramembranöse Ossifikation nicht durch die Blockierung von TNF $\alpha$  beeinflusst. Beide Genotypen zeigten annähernd gleiche Werte (s. Abb. 24 D).

Die Bildung und Zusammensetzung des Frakturkallus zeigte eine deutliche Veränderung durch die reduzierte TNF $\alpha$ -Konzentration in beiden Genotypen. Die Unterschiede in der Fläche des Gesamtkallus und des Knorpelgewebes zwischen WT- und Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren waren unter der anti-TNF $\alpha$ -Behandlung nur noch geringfügig ausgeprägt.



**Abb. 24: Charakterisierung des Frakturkallus der WT- und Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren unter anti-entzündlicher Behandlung**

Die Tiere wurden während der Frakturheilung mit einem anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelt und nach 7 bzw. 14 Tagen der Frakturkallus auf seine Gewebezusammensetzung untersucht. Für die Visualisierung und Analyse zwischen Knorpelgewebe und neu gebildeten trabekulären Knochen wurde die Masson Goldner-Färbung (Knochengewebe = grün), Alcianblau-Färbung (Knorpelgewebe = blau) und Kollagen X-Immunhistologie verwendet (A). Die Fläche des Gesamtkallus (B) und Geflechtknochen (C) in mm<sup>2</sup> wurde erfasst, und der prozentuale Anteil an Knorpelgewebe (D) ermittelt. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD (n > 6; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; Maßstab entspricht 250  $\mu$ m)

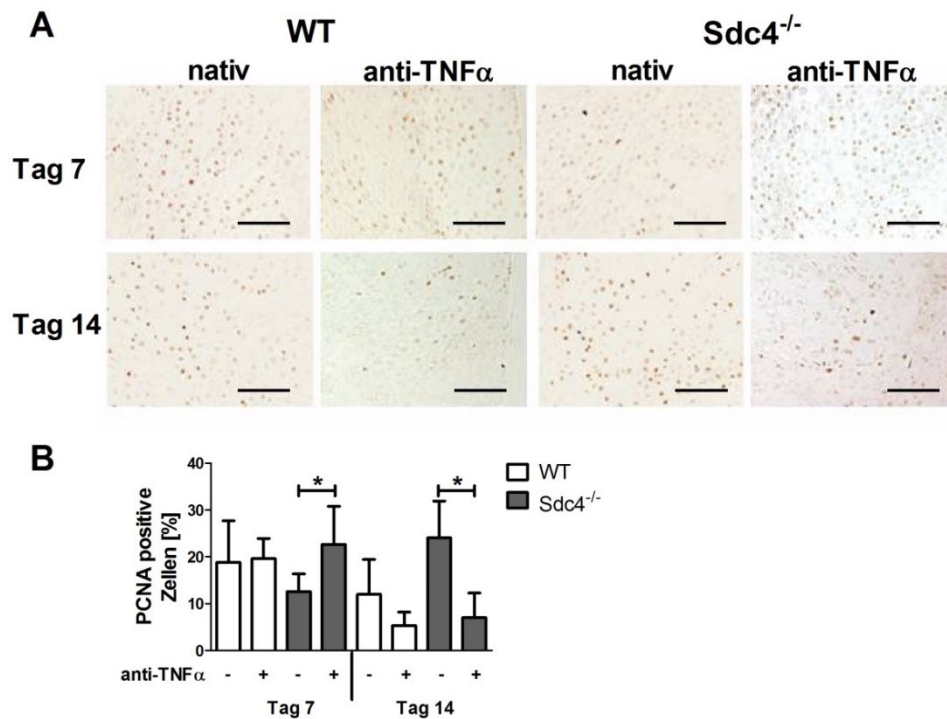
#### 4.3.2.2 Proliferation der Knorpelzellen unter anti-inflammatorischer Medikation während der Frakturheilung

Zur Untersuchung der Proliferation wurden die proliferierenden Chondrozyten des Knorpelgewebes mittels eines PCNA-Antikörpers detektiert (s. Abb. 25). Die Quantifizierung der PCNA-positiven Zellen ergab an Tag 7 im Kallus der unbehandelten Sdc4<sup>-/-</sup>-Mäuse eine geringere Proliferation als in der nativen WT-Vergleichsgruppe (WT: 19  $\pm$  9 %; Sdc4<sup>-/-</sup>: 13  $\pm$  4 %). Hingegen war der Anteil an PCNA-positiven Zellen in den *knock out*-Proben nach 14 Tagen erhöht im Vergleich zu den Kontrollen, was auf eine erhöhte Proliferationsrate hindeutet und höchstwahrscheinlich mit der vermehrten Kallusbildung in den Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren

zusammenhängt (WT:  $12 \pm 7,4$  %; Sdc4<sup>-/-</sup>:  $24 \pm 7,8$  %).

Unter der anti-entzündlichen Behandlung konnte in den gentechnisch veränderten Tieren auch eine veränderte Proliferationsrate beobachtet werden. Am 7. Tag war das Verhältnis von proliferierenden Chondrozyten zur Gesamtzellzahl in den anti-TNF $\alpha$  behandelten Sdc4<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant höher als in den unbehandelten und erreichte ein identisches Niveau wie die WT-Tiere (WT:  $20 \pm 4,3$ %; Sdc4<sup>-/-</sup>:  $22 \pm 7,7$  %). Die Anzahl der PCNA positiven Zellen im Knorpelgewebe der WT-Proben war zu diesem frühen Zeitpunkt der Heilung nicht durch die Gabe des Antikörpers beeinflusst. Nach 14 Tagen konnte bei beiden Genotypen eine geringere Proliferation unter der anti-TNF $\alpha$  Behandlung beobachtet werden. Erneut zeigten die Sdc4-defizienten Tiere eine Annäherung zur WT-Kontrolle. In den WT-Proben waren  $5 \pm 2,9$  % der Chondrozyten PCNA positiv und in den Sdc4<sup>-/-</sup>  $7 \pm 5,2$  %, das signifikant niedriger zu der unbehandelten Tiergruppe war ( $p = 0,002$ ).

Unter der antientzündliche Behandlung war die Proliferation der Knorpelzellen zwischen WT und Sdc4<sup>-/-</sup> wieder auf einem vergleichbaren Level. Übereinstimmend mit der geringeren Kallusgröße in den anti-TNF $\alpha$  behandelten Tieren war die Zahl der proliferierenden Zellen an Tag 14 niedriger.



**Abb. 25: Proliferation der Knorpelzellen im Frakturkallus am 7. und 14. Tag**

WT- und Sdc4<sup>-/-</sup>-Tiere wurden während der Frakturheilung mit einem anti-TNF $\alpha$ -Antikörper behandelt und die Kallusbildung nach 7 und 14 Tagen untersucht. Zur Identifikation der proliferierenden Chondrozyten wurde der immunhistologische Nachweis von PCNA in den Schnittpräparaten erbracht (A). Die PCNA positiven Zellen wurden in Relation zur Gesamtzellzahl innerhalb einem standardisierten Knorpelareal gesetzt (B). Dargestellt sind MW  $\pm$  SD (n > 6; Maßstab entspricht 100  $\mu$ m)

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Verzögerte Frakturheilung in der Syndecan-1 und Syndecan-4-defizienten Maus

Wie in zahlreichen Veröffentlichungen gezeigt wurde, übernehmen Syndecan-1 und Syndecan-4 verschiedenste, regulatorische Funktionen. Aufgrund der besonderen Fähigkeit mittels der GAG-Ketten bzw. direkt diverse Moleküle zu binden, Signaltransduktionen zu vermitteln bzw. selbst auszulösen, und als löslicher Faktor sowie als Komplex mit einem Bindungspartner vorzukommen, kann diese Gruppe von membranständigen Rezeptoren wichtige Regulationsmechanismen modulieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die funktionelle Relevanz von Syndecan-1 und Syndecan-4 innerhalb der Frakturheilung an einem murinen Frakturmodell untersucht.

#### ***5.1.1 Der Verlust von Syndecan-1 und Syndecan-4 resultiert in einer verzögerten Frakturheilung***

Zu einem Zeitpunkt der Reparaturphase, in der der Aufbau des weichen Kallus abgeschlossen war und der Umbauprozess von Knorpelgewebe in Knochen auf einem maximalen Level erfolgte, konnte eine erhöhte Bildung sowie eine veränderte Zusammensetzung des Frakturkallus in den gentechnisch veränderten Tieren beobachtet werden. Die Abwesenheit von Syndecan-4 bzw. Syndecan-1 resultierte in einer verzögerten Frakturheilung. Besonders stark war der Phänotyp unter dem Verlust von Syndecan-4 ausgeprägt. Die *Sdc4<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten einen signifikant größeren Frakturkallus mit einem erhöhten Anteil an Knorpelgewebe und weniger neu gebildeten Geflechtknochen im Vergleich zu den WT-Tieren am 14. Tag nach der Frakturierung. Der Phänotyp der *Sdc1<sup>-/-</sup>*-Maus war im Vergleich zur Kontrolle nur sehr leicht ausgebildet, allerdings wies er starke Ähnlichkeiten zu den Merkmalen der Syndecan-4-defizienten Maus auf. Ebenfalls war die Fläche des Knorpelgewebes in den *Sdc1<sup>-/-</sup>*-Tieren erhöht, und die des neu gebildeten Geflechtknochen vermindert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Frakturheilung durch die beiden Proteoglykane Syndecan-1 und Syndecan-4 beeinflusst wird.

### **5.1.2 Einfluss von Syndecan-1 und Syndecan-4 auf die Differenzierung von Chondrozyten**

Abhängig von dem verwendeten Frakturmodell kann während der Frakturheilung eine vermehrte enchondrale bzw. intramembranöse Ossifikation beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde ein Modell, modifiziert nach Schmidmaier *et al.*, verwendet, in dem beide Arten der Ossifikation erfolgen. Der Schwerpunkt der Heilung liegt aber in der Bildung eines gut ausgeprägten Knorpelkallus, und ermöglicht so eine umfangreiche Analyse der enchondralen Ossifikation<sup>126</sup>.

Aufgrund des größeren Frakturkallus und der erhöhten Fläche an Knorpelgewebe in den *Sdc1*<sup>-/-</sup>- bzw. *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde zunächst von einer verzögerten Reifung des Knorpelgewebes ausgegangen. Jedoch war der Differenzierungsgrad der Chondrozyten innerhalb des weichen Kallus zwischen Wildtyp- und *knock out*-Tieren am 14. Tag der Frakturheilung analog. Der größte Anteil der Chondrozyten war hypertroph, wie der Nachweis des Markerproteins Kollagen X bestätigte. In den Syndecan-4-Proben war zwar im Vergleich zu den WT-Präparaten eine gering höhere Anzahl an Kollagen II-positiven Chondrozyten zu finden, allerdings im Verhältnis zum Gesamtkallus war dies eine sehr geringe Population von Zellen.

### **5.1.3 Einfluss von Syndecan1 und Syndecan-4 auf die Degradation der Knorpelmatrix**

Ein weiterer Grund für den erhöhten Anteil an Knorpelgewebe kann eine verminderte Degradation dieser speziellen Matrix sein. Innerhalb des Abbauprozesses der Knorpelmatrix gelten MMP-9 und MMP-13 als Hauptproteasen und üben durch ihre unterschiedlichen Spaltungseigenschaften sowie Lokalisation eine synergistische Funktion aus<sup>47</sup>. Ein *knock out* der Proteasen führte zu einem verzögerten Knorpelabbau in der Frakturheilung. Die MMP-13<sup>-/-</sup>- und die MMP-9<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten ebenfalls einen größeren Kallus mit einem erhöhten Anteil an Knorpelgewebe nach 14 Tagen, in denen die Reifung der Chondrozyten nicht retardiert war<sup>28,48,144</sup>. Aufgrund des übereinstimmenden Phänotyps mit der MMP-9- bzw. der MMP-13-defizienten Mäuse erfolgte der Nachweis dieser beiden Enzyme bei den in dieser Arbeit untersuchten Genotypen. Zudem ist ein Einfluss von Syndecan-1 und Syndecan-4 auf die Aktivität von Proteasen bekannt<sup>62-64,122</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine identische Lokalisation von MMP-13 in den *knock out*- und WT-Präparaten festgestellt werden. Infolge

des erhöhten Anteils an hypertrophen Chondrozyten in dem Frakturkallus der *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Maus war die MMP-13-positiv detektierte Fläche breiter. In den *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Proben stellte sich gleichermaßen eine breitere Zone an hypertrophen, MMP-13-positiven Chondrozyten dar, jedoch in einem geringeren Ausmaß entsprechend dem kleineren Frakturkallus.

Interessanterweise unterschied sich die Detektion der Protease MMP-9, die hauptsächlich von Osteoklasten produziert wird, zwischen den *knock out*-Präparaten. In den *Sdc4*<sup>-/-</sup>-Proben war, wie im Vorfeld schon bei MMP-13, ein leicht stärkerer Nachweis von MMP-9 und eine höhere Anzahl der MMP-9 produzierenden Osteoklasten zu beobachten. Der Grund für den stärkeren Nachweis von MMP-9 bzw. die erhöhte Anzahl an Osteoklasten lässt sich auf den stärkeren Abbaubedarf der Knorpelmatrix zurückführen, die im Vergleich zu WT ca. um das 2,7-fache erhöht war. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Osteoklasten im Frakturkallus der Syndecan-1-defizienten Mäuse am 14. Tag der Frakturheilung signifikant reduziert. Außerdem war die Protease MMP-9 nur geringfügig im Gewebe der *Sdc1*<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zur Kontrollgruppe zu detektieren. Aufgrund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob Syndecan-1 in die Differenzierung von Osteoklasten involviert ist. Dieser Aspekt wird in Kapitel 5.3 detaillierter erörtert.

Eine weitere interessante Protease ist ADAMTS-4, die schon in einem frühen Reifestadium der Chondrozyten innerhalb der Skelettbildung und während der Frakturheilung exprimiert wird<sup>6</sup>. In Studien an 16,5 Tage alten Embryonen konnte durch das Ausschalten des Syndecan4-Gens Auffälligkeiten im Bereich der proliferierenden Chondrozyten in der Tibia beobachtet werden. In den *Sdc4*<sup>-/-</sup>-defizienten Mäusen wurde eine geringere Expression von ADAMTS-4 und eine niedrigere Konzentration von <sup>374</sup>ARGSV-Neoepitopen, die spezifische Abbaupeptide von Aggrecan durch ADAMTS-4 darstellen, gemessen<sup>123</sup>. In einer weiteren Veröffentlichung konnte die Interaktion der aktiven Form von ADAMTS-4 mit den HS- und CS-Seitenketten von Syndecan-1 gezeigt werden<sup>63</sup>. Somit wurde in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion der Syndecane und der Protease ADAMTS-4 vermutet, und von einer veränderten Detektion dieser Protease in den genetisch veränderten Tieren ausgegangen. Diese Hypothese bestätigte sich jedoch nicht. Die Detektion der Aggrecanase ADAMTS-4 war zwischen den *knock out*- und WT-Tieren vergleichbar. Nur aufgrund des erhöhten Anteils an Knorpelgewebe war erneut in den *Sdc4*<sup>-/-</sup> und in geringem Ausmaß in den Syndecan-1-defizienten Tieren eine erhöhte Anzahl an ADAMTS-4 positiven Chondrozyten zu beobachten.

Die Expression von ADAMTS-4, MMP-13 und MMP-9 scheint durch die Abwesenheit von



Syndecan-4 in der fortgeschrittenen Phase der Frakturheilung nicht beeinflusst zu werden. Ebenso wirkt sich das Fehlen von Syndecan-1 nicht auf die Synthese von MMP-13 und ADAMTS-4 aus. Jedoch kann eine reduzierte Enzymaktivität in den Versuchen aufgrund des fehlenden Nachweises von spezifischen Spaltprodukten nicht ausgeschlossen werden. Da sich aber das Voranschreiten der Frakturheilung zwischen den genetisch veränderten Tieren und der Kontrollgruppe im weiteren Verlauf annäherte, erscheint eine verminderte Protease-Aktivität zu diesem Zeitpunkt unwahrscheinlich. Nach 28 Tagen war kein Unterschied mehr in Bezug auf die Größe des Frakturkallus zwischen den drei Genotypen zu beobachten (s. Kap. 4.1.3).

Des Weiteren muss in Betracht gezogen werden, dass besonders durch das Fehlen von Syndecan-4 die Aktivität einer anderen Protease, die an der Degradation der mineralisierten Knorpelmatrix zu einem früheren Zeitpunkt beteiligt ist, beeinflusst wird und diesen Phänotyp verursacht. Die Protease ADAMTS-5 besitzt die gleichen funktionellen Eigenschaften wie ADAMTS-4. Im Vergleich zu ADAMTS-4 wird diese Aggrecanase zwar in Folge einer Fraktur weniger stark exprimiert, jedoch zeigt sie während des Knorpelabbaus im entzündlichen Kontext eine größere Bedeutung<sup>59</sup>. Nur durch den *knock out* von ADAMTS-5 und nicht von ADAMTS-4 konnte die Degradation des Gelenkknorpels in einem murinen RA-Modell vermindert werden<sup>56-58</sup>. Wang *et al.* zeigte in einem *in vitro*-Versuch mit Nucleus Pulposus Zellen (isoliert aus dem Kern der Bandscheibe), dass TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Expression von Syndecan-4 und der Protease ADAMTS-5 hochregulieren<sup>122</sup>. Ferner konnte in einem *Pull down*-Versuch die spezifische Interaktion von Syndecan-4 und ADAMTS-5 gezeigt werden. Diese Wechselwirkung scheint eine stabilisierende Wirkung auf ADAMTS-5 auszuüben, da das Ausschalten des Sdc4-Gens (*knock-down*) sowie die Behandlung der Zellen mit Heparinase bzw. einem Inhibitor der Heparansulfat-Synthese in einer reduzierten Enzymaktivität von ADAMTS-5 resultierte. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse könnte Syndecan-4 die TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  abhängige ADAMTS-5-Aktivität während der Frakturheilung kontrollieren.

## 5.2 Syndecan-4 in der Frakturheilung

### 5.2.1 TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$ modulieren die Expression von Syndecan-4

Chondrozyten stammen wie die Osteoblasten von den mesenchymalen Stammzellen ab.

Diese multipotenten Zellen besitzen ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential und tragen im adulten Organismus zur Aufrechterhaltung sowie zur Regeneration des Stütz- und Bindegewebes bei. Die Differenzierung dieser Zellen unterliegt einer feinen, aufeinander abgestimmten Regulation, die durch die temporale Präsenz verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Die Expression, Lokalisation und Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren wiederum werden durch zahlreiche Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine moduliert. Die Expression von Syndecan-4 kann ebenfalls durch Wachstumsfaktoren und Zytokine beeinflusst werden, z.B. reguliert FGF2 die Expression von Sdc4 in Fibroblasten und Osteoblasten hoch<sup>122,145,146</sup>. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten besonders in Stresssituationen, in denen eine Entzündungsreaktion ausgelöst wurde, eine Hochregulation der Syndecan-4-Expression zeigen<sup>64,122,123</sup>. Wang *et al.* untersuchten die Zusammenhänge der charakteristischen Hochregulation der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und des Proteoglykans Syndecan-4 während der pathologischen Bandscheiben-Degeneration<sup>122</sup>. Anhand von *in vitro*-Stimulationsversuchen konnten sie eine induzierte Hochregulation der Expression von Syndecan-4 vermittelt über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch die Zytokine TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  belegen. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe von Pap in einem murinen Osteoarthritis-Modell, in dem hohe Konzentrationen von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gemessen wurden, eine hohe Syndecan-4-Synthese in Chondrozyten des Gelenkknorpels zeigen<sup>64</sup>. In Embryonen wurde die Expression von Syndecan-4 in einem unreifen Zellstadium anhand des indirekten Nachweises der Promotoraktivität von Syndecan-4 in kondensierten MSZ dargestellt<sup>123</sup>. In der Entwicklung differenzieren diese kondensierten MSZ zu Chondrozyten und bilden mittels enchondraler Ossifikation die späteren Röhrenknochen. Während der kompletten Phase der Chondrozyten-Differenzierung konnte eine Promotoraktivität von Syndecan-4 beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Hochregulation von Syndecan-4 in undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen induziert durch TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  gezeigt werden. Syndecan-4 scheint während der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten in entwicklungspezifischen und in pathologischen Prozessen exprimiert zu werden.

### **5.2.2 Syndecan-4 beeinflusst die Proliferation von Chondrozyten**

Aufgrund der Hochregulation der Syndecan-4-Expression in mesenchymalen Zellen, die noch die Fähigkeit der Multipotenz besitzen, kann dieses Proteoglykan eine besondere regulierende Aufgabe während der Zelldifferenzierung einnehmen. Die Proliferationsfähigkeit

einer Zelle nimmt mit fortschreitender Differenzierung ab. Aufgrund dieser reziproken Kopplung wirkt sich eine Regulation der Zellreife in den meisten Fällen auch auf die Fähigkeit zur Zellteilung aus. In den Frakturkalli zeigten sich zunächst am 7. Tag der Frakturheilung eine geringere Anzahl an proliferierenden Chondrozyten in den *Sdc4<sup>-/-</sup>*-Tieren im Vergleich zur Kontrolle. Im Anschluss stellte sich eine erhöhte Zahl PCNA-positiver Chondrozyten in den *knock out*-Proben am 14. Tag dar (s. Abb. 25). Eine veränderte Proliferation der Knorpelzellen war ebenfalls in der embryonalen Entwicklung während der Entstehung der Röhrenknochen in Syndecan-4-defizienten Tieren zu finden. Bertrand *et al.* zeigte eine signifikant reduzierte Proliferation der Chondrozyten innerhalb der Wachstumszone von 16,5 Tage alten *Sdc4<sup>-/-</sup>*-Embryonen<sup>123</sup>. Syndecan-4 scheint die Proliferation von Chondrozyten während der Differenzierung der Chondrozyten in der Embryogenese sowie in der Frakturheilung zu beeinflussen.

In der Skelettentwicklung von neugeborenen Mäusen führte das Fehlen von Syndecan-4 zu keiner verzögerten Reifung der Chondrozyten bzw. keiner verminderten Knochengröße. Jedoch während der Frakturheilung im adulten Organismus bedingte die Abwesenheit von Syndecan-4 eine retardierte Heilung. Anscheinend kann der Verlust von Syndecan-4 in der Knochenbildung während der Entwicklung kompensiert werden, aber nicht im Falle des Knochenaufbaus in der adulten Maus.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen Syndecan-2 und Syndecan-4 wird eine Kompensation von Sdc-4 durch Sdc-2 angenommen<sup>123,147</sup>. Diese Vermutung wurde durch die deutlich höhere Detektion von Syndecan-2 in der Wachstumsfuge eines 16,5 Tage alten *Sdc4<sup>-/-</sup>*-Embryos im Vergleich zu WT-Tieren untermauert<sup>123</sup>. In einem entzündlichen Kontext, der z.B. während der Frakturheilung eintritt, konnte jedoch die kompensierende Hochregulation anderer Syndecan-Moleküle nicht erfolgen. Die hier untersuchten MSZ zeigten unter Stimulation mit TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  einen unveränderten mRNA-Gehalt von Sdc1 und Sdc3, sowie eine deutliche Herunterregulation der Syndecan-2-Expression im zeitlichen Verlauf (s. Kap. 4.3.1). Bestätigt wird diese Beobachtung auch in murinen Chondrozyten-Kulturen. Bertrand *et al.* konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Syndecan-2-Expression unter TNF $\alpha$ -Stimulation zeigen<sup>123</sup>. Zudem wurde die Induktion der Syndecan-2 Expression durch den Wachstumsfaktor Wnt3a, der die Differenzierung von MSZ zu Chondrozyten-Vorläuferzellen fördert, in diesen Kulturen schon in Gegenwart geringer TNF $\alpha$ -Konzentrationen gehemmt. In Prozessen der Embryogenese bzw. des Längenwachstums scheint Syndecan-4 durch Syndecan-2 ersetzt werden zu können, aber im Falle einer

Inflammation wird dieser Kompensations-Mechanismus durch einzelne Zytokine unterdrückt. Aus diesem Grund kann vermutlich während der Frakturheilung sowie in vielen anderen Krankheitsprozessen, in deren Verlauf die TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Konzentration zunehmen, keine Kompensation für das Fehlen von Syndecan-4 beobachtet werden.

Die funktionelle Bedeutung für Syndecan-4 in diesem Heilungsprozess ist jedoch weiterhin unklar. Ein weiteres Experiment, in dem die entzündungsbedingte TNF $\alpha$  induzierte Hochregulation von Syndecan-4 reduziert wurde, sollte Aufschluss über die Rolle dieses Proteins geben. Da das Ausschalten des spezifischen IL-1 $\beta$ -Rezeptor keine starken Auswirkungen auf die Frakturheilung ausübte, wurde der Fokus in Rahmen dieser Arbeit auf den TNF $\alpha$ -Signalweg gelegt<sup>148</sup>.

### **5.2.3 TNF $\alpha$ beeinflusst die Frakturheilung in einem Syndecan-4 abhängigen Mechanismus**

TNF $\alpha$  gilt als einer der Hauptfaktoren, der die Entzündungsreaktion zur Induktion der Reparaturkaskade nach einer Verletzung induziert<sup>25</sup>. Durch das Ausschalten der beiden TNF $\alpha$ -Rezeptoren (p55<sup>-/-</sup>/p75<sup>-/-</sup>) in einem Mausmodell wurde der TNF $\alpha$ -induzierte Signalweg geblockt. Dies führte einerseits zu einer Retardierung der Chondrozyten-Differenzierung und andererseits zu einer verzögerten Degradation des Knorpelgewebes<sup>25</sup>. Glass *et al.* konnte für TNF $\alpha$  je nach Konzentration verschiedene und zum Teil gegensätzliche Funktionen zeigen<sup>149</sup>. Mesenchymale Stammzellen, die aus dem Muskel angrenzend zu einer Fraktur, isoliert wurden und eine Multipotenz aufwiesen, zeigten eine starke Migration entlang eines TNF $\alpha$ -Gradienten und eine ausgeprägte Osteoblasten-Differenzierung unter TNF $\alpha$ -Stimulation. Zur Förderung der Migration musste jedoch die TNF $\alpha$ -Konzentration um den Faktor 1000 niedriger sein als zur osteogenen Induktion. Die identische Konzentration von TNF $\alpha$  hemmte sogar die Migration dieser Zellen. Ähnlich verhielten sich die Zellen, wenn durch einen spezifischen Antikörper TNF $\alpha$  aus dem Überstand von kultivierten, frakturierten Knochenfragmenten gebunden wurde. Die normalerweise ausgelöste Migration in einem *in vitro*-Migrationsmodell entlang des Gradienten des Überstandes nahm stark ab. TNF $\alpha$  scheint die Einwanderung und die Differenzierung von MSZ zu Beginn der Frakturheilung zu beeinflussen. Weitere Studien konnten die konzentrationsabhängige Bedeutung von TNF $\alpha$  auch in der Reifung von Osteoblasten darstellen. Niedrige TNF $\alpha$ -Konzentrationen förderten die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, wohingegen hohe TNF $\alpha$ -Level die Osteoblastogenese *in vitro* und *in vivo* inhibierten<sup>149-152</sup>.

Die komplexe Regulation von TNF $\alpha$  ist abhängig von der jeweiligen Konzentration und spiegelt sich auch in der Frakturheilung wieder. Die absolute Abwesenheit des TNF $\alpha$ -Signalweges führte, wie bereits erwähnt, im Bereich der intramembranösen und enchondralen Ossifikation zu einer verzögerten Heilung<sup>25</sup>. Stark erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen verursachten ebenfalls eine verminderte Frakturheilung<sup>151</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Reduktion der TNF $\alpha$ -Konzentration mittels des TNF $\alpha$ -Antikörpers die frühe Phase der Frakturheilung stark beeinflusst werden. Am 7. Tag war die Bildung des Frakturkallus in den Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert und die Zusammensetzung des Kallus hatte sich stark verändert. Es war signifikant weniger Knorpelgewebe gebildet worden, wohingegen sich der Anteil an Geflechtknochen zwischen den nativen und behandelten Tiergruppen nicht verändert hatte. Durch die anti-TNF $\alpha$ -Behandlung scheint in diesem Frakturmodell nur die enchondrale Knochenbildung, jedoch nicht die intramembranöse Ossifikation beeinflusst zu sein. Durch den kompletten Verlust des TNF $\alpha$ -Signalweges, wie Experimente mit der TNF $\alpha$ -Rezeptor-defizienten Maus zeigten, wurden beide Formen der Ossifikation vermindert<sup>25</sup>.

Die Syndecan-4-defizienten Mäuse, die im unbehandelten Zustand einen vergrößerten Frakturkallus mit signifikant erhöhtem Knorpelgewebe entwickelten, zeigten unter der anti-TNF $\alpha$ -Behandlung eine geringer ausgeprägte Kallusbildung mit annähernd gleich großem Anteil an Knorpelgewebe wie der anti-TNF $\alpha$ -behandelte Wildtyp (s. Kap. 4.3.2.1). Die zunächst verzögerte Frakturheilung bedingt durch das Fehlen von Syndecan-4 scheint durch den vermindert aktivierten TNF $\alpha$ -Signalweg aufgehoben zu sein. Unter dem reduzierten TNF $\alpha$ -Spiegel glich sich der Phänotyp der WT- und *knock out*-Maus beinahe vollständig an. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass TNF $\alpha$  zum Teil abhängig von Syndecan-4 die Frakturheilung regulieren kann.

Die Expression von Syndecan-4 steht selbst unter der Kontrolle von TNF $\alpha$ , wie die *in vitro*-Stimulierungsversuche mit MSZ zeigten. Durch die anti-TNF $\alpha$ -Behandlung wurde gleichzeitig die hemmende Wirkung von TNF $\alpha$  auf die Expression von Syndecan-2 reduziert. Bertrand *et al.* konnte immunhistologisch eine zunehmende Detektion von Syndecan-2 in den frakturierten Femura von anti-TNF $\alpha$ -behandelten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Tieren darstellen<sup>123</sup>. Aufgrund der sehr starken Ähnlichkeit der beiden Glykoproteine könnte Sdc2 den Verlust von Sdc4 kompensieren, wie es bereits für die Embryogenese beschrieben wurde. Die Möglichkeit der Kompensation von Syndecan-4 durch Syndecan-2 wurde auch von der Arbeitsgruppe Bruckner im Jahre 2008 vermutet. In einem Krankheitsmodell der Niere

konnte in der Syndecan-4-defizienten Maus eine Hochregulation von Syndecan-2 beobachtet werden, wodurch höchstwahrscheinlich kompensierende Mechanismen aktiviert wurden<sup>147</sup>.

Während der enchondralen Ossifikation in Folge einer Fraktur werden viele Prozesse der embryonalen Skelettentwicklung rekapituliert, jedoch sind nicht alle Mechanismen zur Regulation dieser komplexen Heilung identisch<sup>25</sup>. Ein fehlendes TNF $\alpha$  *Signalling*, das durch das Ausschalten der Gene der beiden TNF $\alpha$  Rezeptor ( $p55^{-}/p75^{-}$ ) ermöglicht wurde, verursacht wie bereits beschrieben eine stark verzögerte Frakturheilung. Diese gentechnisch veränderten Mäuse zeigten aber keine Auffälligkeiten in ihrer Skelettentwicklung während der Embryogenese<sup>25</sup>. Ebenso wiesen die Syndecan-4-defizienten Mäuse nur minimale Veränderungen während der embryonalen enchondralen Ossifikation auf, die keine Auswirkung auf die Entwicklung der Röhrenknochen von neugeborenen Mäusen hatten. Allerdings in einem Heilungsprozess, der unter der Regulation der Inflammation erfolgte, führte der Verlust von Syndecan-4 zu einem stärker ausgeprägten Phänotyp in der enchondralen Knochenbildung. Prozesse, die in der Embryogenese kompensiert werden, konnten im entzündlichen Kontext nicht mehr ausgeglichen werden. Es scheint sogar, dass diese Prozesse, wie z.B. die Hochregulation von Syndecan-2 in MSZ und Chondrozyten, gezielt gehemmt werden.

Im Fall einer erhöhten Konzentration von spezifischen Zytokinen bedingt durch eine Verletzung bzw. Erkrankung stellt sich für Syndecan-4 eine besondere Bedeutung heraus. Syndecan-4 scheint als einziges Mitglied der Syndecan-Familie in mesenchymal abstammenden Zellen nach der Induktion der Entzündungsreaktion durch TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  hochreguliert zu werden und kann so wichtige Regulationsvorgänge modellieren. Während der Frakturheilung scheint dieses Proteoglykan hauptsächlich in einem TNF $\alpha$ -abhängigen Mechanismus die Knorpelbildung während der enchondralen Ossifikation zu beeinflussen.

#### **5.2.4 Funktionelle Bedeutung von Syndecan-4 während der Frakturheilung**

In dieser Arbeit konnte eine wichtige Rolle von Syndecan-4 für eine schnelle, komplikationslose Frakturheilung gezeigt werden. Durch das Fehlen von Syndecan-4 entsteht ein signifikant größerer Kallus mit einem erhöhten Anteil an Knorpelgewebe. Am 14. Tag des Reparaturvorgangs, ein Zeitpunkt des höchsten Gewebeumbaus, konnte eine verzögerte Reifung der Chondrozyten sowie verminderte Degradation der Knorpelmatrix anhand der Detektion der Proteasen MMP-13, MMP-9 und ADAMTS-4 in den Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren ausge-

geschlossen werden. Der Verlust von Syndecan-4 scheint zu einem früheren Zeitpunkt zur einer veränderten und somit zu einer verzögerten Frakturheilung zu führen.

In der Frakturheilung treten die meisten Prozesse nicht nur hintereinander geschaltet sondern parallel zu einander ein. Zum Beispiel erfolgt meist Frakturspalt nah die Proliferation der Chondrozyten und der Aufbau der Knorpelmatrix, wohingegen gleichzeitig reifere Bereiche der Knorpelmatrix zu Geflechtknochen umgebaut werden. Zur Untersuchung einer Funktion von Syndecan-4 auf die Differenzierung von MSCs zu reifen Chondrozyten, bzw. auf die Aktivität von Proteasen, müssten Prozesse in der frühen Phase der Frakturheilung analysiert werden. Mit Blick auf die TNF $\alpha$ -induzierte Sdc4-Expression in MSZ, die veränderte Proliferation der Chondrozyten bzw. reduzierte Bildung des Knorpelgewebes in den Sdc4<sup>-/-</sup>-Tieren unter der anti-TNF $\alpha$ -Behandlung liegt es nahe, dass Syndecan-4 eine regulierende Funktion auf die Differenzierung und Proliferation von Chondrozyten ausübt.

### **5.3 Die Rolle von Syndecan-1 im Knochenstoffwechsel**

#### ***5.3.1 Reduzierte Anzahl an Osteoklasten innerhalb des Frakturkallus der Syndecan-1-defizienten Maus***

In den Syndecan-1-defizienten Mäusen bildete sich nach der Frakturierung des Femurs ein leicht vergrößerter Frakturkallus im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Zusammensetzung des Kallusgewebes zeigte sich, wie im Falle der Syndecan-4-defizienten Maus, verändert. Das Ausschalten der Syndecane resultierte in einem identischen Phänotyp, der jedoch unterschiedlich stark ausprägt war. Aufgrund dieser Beobachtung wurde zunächst von einer annähernd gleichen Funktion der beiden Proteine während der Frakturheilung ausgegangen. Es konnte aber in den Syndecan-1-defizienten Frakturkali eine signifikant niedrigere Anzahl an Osteoklasten und eine verringerte Synthese von MMP-9 nachgewiesen werden. Aufgrund der stark verminderten Anzahl an Osteoklasten stellte sich die Frage, ob Syndecan-1 in der Osteoklastogenese involviert ist, und ein Fehlen dieses Proteoglykans unter physiologischen Bedingungen zu einem veränderten Knochenphänotyp führt (s. Kap. 5.3.3).

Betrachtet man die Bedeutsamkeit dieser beiden Proteoglykane, scheint Syndecan-1 im Vergleich zu Syndecan-4 weniger relevant während der Frakturheilung zu sein. Die Überbrückung des Frakturspalts sowie das Erreichen einer primären Stabilität werden haupt-

sächlich durch die Ausbildung eines knorpeligen Gewebes erreicht. Erst im Abbau der mineralisierten Matrix liegt die Hauptaufgabe der Osteoklasten. Wie bedeutend Osteoklasten für die enchondrale Knochenbildung sind, wird kontrovers diskutiert<sup>153,154</sup>. Die Knorpelmatrix wird ebenfalls durch proteolytische Enzyme, die die Chondrozyten selbst sowie einwandernde Osteoblasten und Endothelzellen produzieren, abgebaut<sup>23</sup>. Deckers *et al.* zeigten, dass Endothelzellen unabhängig von Osteoklasten in die Knorpellakunen einwandern, nicht mineralisierte Matrix abbauen und Gefäße ausbilden<sup>153</sup>. Allerdings übernehmen Osteoklasten neben der Funktion der Matrixdegradation wichtige Aufgaben während der Angiogenese, indem sie bedeutende Signalstoffe produzieren. Anhand der MMP-9-defizienten Maus konnte gezeigt werden, dass der Verlust dieser Protease nicht nur in einer verminderten Degradation der Knorpelmatrix resultiert<sup>48</sup>. MMP-9 scheint darüber hinaus für die Rekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen sowie für die biologische Aktivität von VEGF bedeutend zu sein. Während der Frakturheilung konnte der Phänotyp der MMP-9<sup>-/-</sup>-Maus, der eine unveränderte Expression von VEGF und deren spezifischen Rezeptoren aufwies, durch die Applikation von rekombinanten, aktiven VEGF aufgehoben werden<sup>48</sup>. Die Autoren dieser Publikation vermuten eine Kompensation von MMP-9 durch das rekombinante VEGF, indem die Invasion und/oder die Differenzierung drei verschiedener Zelltypen, Osteoklasten, Endothelzellen sowie Osteoblasten, Proteasen unabhängig stimuliert wurde. Es konnte nämlich ein erhöhter Abbau der Knorpelmatrix, eine erhöhte Anzahl TRAP positiver Zellen und Endothelzellen und einen erhöhten Aufbau von Knochenmatrix in den behandelten Tieren beobachtet werden. Da MMP-9 von Osteoklasten und Endothelzellen produziert wird, wäre der Vergleich der Invasion von Endothelzellen bzw. das Einsproießen von neuen Gefäßen zwischen WT- und Syndecan-1-defizienten Tieren interessant. Syndecan-1 wird ebenfalls in Endothelzellen von frisch einsproießenden Gefäßen produziert<sup>155</sup>. Die geringe MMP-9 Detektion in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Frakturkalli könnte zusätzlich zu der niedrigen Dichte von reifen Osteoklasten, auch durch eine verminderte Anzahl an Endothelzellen verursacht worden sein.

### **5.3.2 RANKL und TNF $\alpha$ regulieren die Syndecan-1-Expression in Osteoklasten Vorläuferzellen**

Im Rahmen der Arbeit konnte zum ersten Mal die Hochregulation der Syndecan-1-Expression als einziges Syndecan während der Osteoklastogenese *in vitro* gezeigt werden. Isolierte Monozyten aus dem Knochenmark zeigten nach der Stimulation mit dem Zytokin RANKL,



einem essentiellen Faktor der Osteoklastogenese, einen zunehmenden mRNA-Gehalt von Syndecan-1 im Verlauf ihrer Differenzierung. Durch die simultane Stimulation mit dem Zytokin TNF $\alpha$  und RANKL erhöhte sich die Expression. Ferner bewirkte TNF $\alpha$  allein bereits eine sehr starke Erhöhung der Syndecan-1-Expression.

In vielen Veröffentlichungen ist eine Hochregulation der Sdc1 Expression im entzündlichen Kontext, also unter Beteiligung einer hohen TNF $\alpha$ -Konzentration, zu finden<sup>65,77,100,109-111</sup>. Die Arbeitsgruppe von Bernfield entdeckte im Promotorbereich von Syndecan-1 mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B<sup>156</sup>. NF- $\kappa$ B kann unter anderem durch die proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aktiviert werden<sup>157,158</sup>. In Studien mit malignen Glioma-Zellen konnte eine Korrelation zwischen einer hohen Konzentration von phosphorylierten NF- $\kappa$ B und einer hohen Syndecan-1-Expression festgestellt werden. *In vitro*-Experimente zeigten eine Hochregulation der Syndecan-1-Expression unter der Stimulation von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B<sup>159</sup>. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Hochregulation der Syndecan-1 Expression durch RANKL dargestellt werden. Wie bereits für TNF $\alpha$  beschrieben, aktiviert auch RANKL den NF- $\kappa$ B-Signalweg während der Osteoklasten-Differenzierung, wodurch die erhöhte Expression erklärt werden könnte<sup>158</sup>. Obwohl in einigen Studien für IL-1 $\beta$  eine induzierende Rolle auf die Syndecan-1-Expression beschrieben wird, konnte dies in den durchgeführten Versuchen während der Osteoklasten-Differenzierung nicht beobachtet werden.

### **5.3.3 Syndecan-1 beeinflusst die Osteoklastogenese *in vitro***

Die reduzierte Anzahl an Osteoklasten innerhalb der Frakturheilung in den Syndecan-1-defizienten Tieren zeigte sich ebenfalls in der *in vitro*-Differenzierung von isolierten Monozyten zu reifen Osteoklasten. Nach 7 Tagen waren in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Kulturen signifikant weniger Osteoklasten vorhanden. Die geringere Anzahl an den typischen Riesenzellen mit mehr als 10 Zellkernen lässt auf eine verzögerte Differenzierung der Vorläuferzellen schließen. Die verzögerte Hochregulation der Expression von typischen Markerproteinen, die zum einen wichtig für die Fusion der Vorläuferzellen und zum anderen funktionelle Proteine für die Degradation der Knochenmatrix sind, unterstützt diese Hypothese. Des Weiteren war die Resorptionsaktivität der Sdc1<sup>-/-</sup>-Osteoklasten auf Dentin-Plättchen im Vergleich zu WT-Zellen vermindert. Die Aktivität wird durch die Synthese spezifische Enzyme, wie z.B. MMP-9, Kathepsin K etc., und durch die Größe der Zelle bestimmt<sup>160</sup>. Insgesamt betrachtet ist jedoch die Verzögerung sowie die geringere Resorptionsaktivität durch den Verlust von

Syndecan-1 im Vergleich zu Studien, in denen andere osteoklastogene Proteine untersucht wurden, gering ausgeprägt. Die starke Hochregulation der Syndecan-1-Expression durch die simultane Stimulation von RANKL und TNF $\alpha$  deutet darauf hin, dass dieses Proteoglykan eine besondere Funktion in einem entzündlichen Kontext ausübt und besonders unter chronischen Entzündungsreaktionen an Bedeutung zunimmt. Über die konkrete Funktion von Syndecan-1 lässt sich im Moment nur spekulieren. Aufgrund der bisher bekannten Funktionen dieses Proteins könnte es als membrangebundener Co-Rezeptor oder als löslicher Komplex die osteoklastogene Funktionen von Chemokinen bzw. anderen Stimulanzien unterstützen. Syndecan-1 kann zahlreiche Liganden binden, die wichtige regulatorische Funktion auf die Differenzierung von Osteoklasten ausüben können, wie z.B. OPG, VEGF, IL-8 etc.<sup>89,161-163</sup>. Des Weiteren wäre eine funktionelle Bedeutung von Syndecan-1 während der Migration und Invasion der Osteoklasten Vorläuferzellen möglich, wie es bereits für einige andere Zelltypen beschrieben wurde<sup>69,100,164,165</sup>. Binder *et al.* zeigten, dass Chemokine, die den C-C-Chemokin-Rezeptor (CCR-2) aktivieren, die Osteoklastogenese *in vivo* und *in vitro* fördern. Der Verlust des Rezeptors CCR-2 in einer genetisch veränderten Maus schützte vor der induzierten postmenopausalen Osteoporose, die mittels einer Ovariectomie ausgelöst wurde<sup>129</sup>. Als einer der wichtigsten, aktivierenden Liganden von CCR-2 stellte sich das *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1, auch häufig als CCL2 bezeichnet) heraus. MCP-1 beinhaltet, wie die meisten Chemokine, eine Heparansulfat-Bindestelle und seine biologische Aktivität wird vermutlich durch die Bindung von GAG-Ketten moduliert<sup>166</sup>. Dagouassat *et al.* konnte durch blockierende Antikörper gegen Syndecan-1 die MCP-1 induzierte Migration von humanen Zellen eines Leberkarzinoms reduzieren<sup>167</sup>. Ebenfalls wurde für Syndecan-1 ein Shedding durch die Protease MMP-9 in kultivierten Makrophagen beschrieben<sup>168</sup>. Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre die Bildung eines Gradienten denkbar, der die Osteoklasten-Fusion unterstützt.

#### **5.3.4 Erhöhte Osteoklastenaktivität in der adulten Syndecan-1-defizienten Maus**

In der Regel resultiert eine verzögerte Osteoklastogenese *in vitro* in einem höheren Knochenvolumen mit mehr bzw. dickeren Trabekeln. Zum Beispiel durch das Ausschalten des Chemokin-Rezeptor CCR2 zeigte sich eine verzögerte Osteoklastogenese *in vitro* und ein erhöhtes Knochenvolumen *in vivo*<sup>129</sup>. Die verminderte Anzahl der Osteoklasten in dem Frakturkallus der Sdc1<sup>-/-</sup>-Tiere und die verzögerte Osteoklastogenese der kultivierten Sdc1<sup>-/-</sup>-

Vorläuferzellen deuteten ebenfalls auf die Ausbildung eines solchen Knochenphänotyps hin. Überraschenderweise zeigte sich entgegen den Erwartungen ein gegensätzlich ausgeprägter Phänotyp. In den Röhrenknochen und in den Wirbelkörpern von 4 Monate alten *Sdc1<sup>-/-</sup>*-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten quantifiziert werden. Die erhöhte Dichte dieser Zellen verursachte einen höheren Knochenabbau. Die Tibiae und die Wirbelkörper wiesen ca. 25 % weniger Knochenvolumen im Vergleich zu den WT-Tieren auf (s. Kap. 4.2.3.2). Die Dicke der einzelnen Trabekel war signifikant reduziert und die Kortikalis der Tibia zeigte ein geringeres Knochenvolumen in den *knock out*-Mäusen.

Die Ausprägung des Phänotyps war erneut schwach, wie bereits in der Frakturheilung und in den Zellkultur-Versuchen zu beobachten war. Erst bei einem reduzierten Knochenvolumen von mehr als 50 % wird von einem osteoporotischen Phänotyp gesprochen<sup>129,169</sup>. Obwohl das Fehlen von Syndecan-1 nur einen mäßigen Knochenverlust zur Folge hatte, konnte in den Tieren bereits eine veränderte Stabilität des Knochens festgestellt werden (s. Kap. 4.2.3.3).

Eine akute Infektion bzw. eine chronische Erkrankung mit erhöhtem TNF $\alpha$ -Spiegel wie z.B. im Falle einer akuten Osteomyelitis, rheumatoiden Arthritis oder Morbus Crohn, könnte im Organismus zu einer Erhöhung der Syndecan-1-Expression in Osteoklasten-Vorläuferzellen führen. Welche Konsequenz eine erhöhte Synthese bzw. ein Verlust dieses Proteoglykans *in vitro* und *in vivo* hat, müsste in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Für das integrale Protein CD44, das zu einer anderen HPSG-Familie als die Syndecane gehört, konnte die Arbeitsgruppe von Schett eine entscheidende Bedeutung in der Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen in einem entzündlichen Kontext zeigen<sup>170</sup>. Obwohl das Fehlen von CD44 in der Maus unter physiologischen Bedingungen keine Auswirkung auf den Knochenphänotyp und auf die *in vitro*-Differenzierung von Osteoklasten zeigte, war die induzierte Arthritis durch den Verlust von CD44 sehr aggressiv. Die Arthritis wurde durch das Kreuzen der CD44 *knock out*-Maus mit einer transgenen Maus, die das humane TNF $\alpha$  in hohen Konzentrationen produziert, erzeugt. Durch das produzierte humane TNF $\alpha$  wird eine Arthritis-ähnliche Erkrankung in der Maus ausgelöst. Die CD44<sup>-/-</sup>/hTNF $\alpha$  Maus zeigte innerhalb von vier Wochen eine sehr aggressive Arthritis mit einem hohen Knochenverlust aufgrund einer erhöhten Anzahl von Osteoklasten. Die Proliferation der Osteoklasten war erhöht und deren Apoptose reduziert. Die durchschnittliche Zellgröße der Klasten war größer im Vergleich zu den WT-Proben. Unter physiologischen Bedingungen war die Funktion von CD44 nicht essentiell, aber in einem entzündlichen Kontext veränderte sich

deren Bedeutung drastisch.

Im Falle der Syndecan-1-defizienten Maus konnte bereits in neugeborenen Mäusen analog zu den adulten Mäusen eine höhere Anzahl von Osteoklasten beobachtet werden. Es stellte sich jedoch kein Unterschied in der Entwicklung der Röhrenknochen dar. Die Länge der untersuchten, neonatalen Knochen sowie das Vorschreiten der Mineralisierung waren zwischen den WT- und Syndecan-1-defizienten Mäusen unverändert. Das Fehlen von Syndecan-1 führte erst im Falle des Knochen-Remodeling, das zur Instandhaltung des Skeletts lebenslang bzw. zur Adaption an veränderte Belastungsanforderungen erfolgt, zu einem erhöhten Abbau der Knochenmatrix. Aufgrund dieser Beobachtung stellt sich die Frage, ob die Abwesenheit von Sdc1 in einem höheren Alter der Mäuse zu einer stärkeren Ausbildung des Phänotyps führt, bzw. Einfluss auf die Stärke einer altersbedingten Osteoporose nimmt. Im adulten Organismus unterliegt die Differenzierung der Osteoklasten dem RANKL/OPG-Quotienten<sup>171</sup>. In den späten 90igern wurden RANKL, sein spezifischer Rezeptor Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANK) sowie Osteoprotegerin (OPG) als Schlüsselfaktoren für den Knochenstoffwechsel entdeckt. OPG ist der natürliche Gegenspieler von RANKL und somit ein Inhibitor der Osteoklasten-Differenzierung. OPG, das unter anderem wie M-CSF und RANKL von osteogenen Zellen produziert wird, hemmt durch die Bindung an RANKL dessen Interaktion mit RANK auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen und damit deren Differenzierung. Ein Ungleichgewicht des RANKL/OPG-Quotienten kann zu einem erhöhten bzw. verminderten Abbau der Knochensubstanz führen. Syndecan-1, das selbst, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, induziert durch RANKL und dem Zytokin TNF $\alpha$  vermehrt in Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird, kann wiederum OPG binden<sup>89,172</sup>. Welche Funktion bzw. welches Signal durch die Interaktion von Syndecan-1 und OPG ausgelöst wird, ist zurzeit noch unbekannt. Standal *et al.* zeigten, dass OPG an der Oberfläche von Myeloma-Zellen gebunden, internalisiert und anschließend abgebaut wird<sup>172</sup>. Dieser Prozess war abhängig von der Bindung von OPG an die Heparansulfat Ketten von Syndecan-1. Eine ähnliche Interaktion dieser beiden Proteine wäre während der Osteoklastogenese denkbar und würde durch den erhöhten Abbau von OPG in einer gesteigerten Osteoklastendichte resultieren.

### **5.3.5 Das Fehlen von Syndecan-1 führt zur Ausbildung unterschiedlicher Phänotypen**

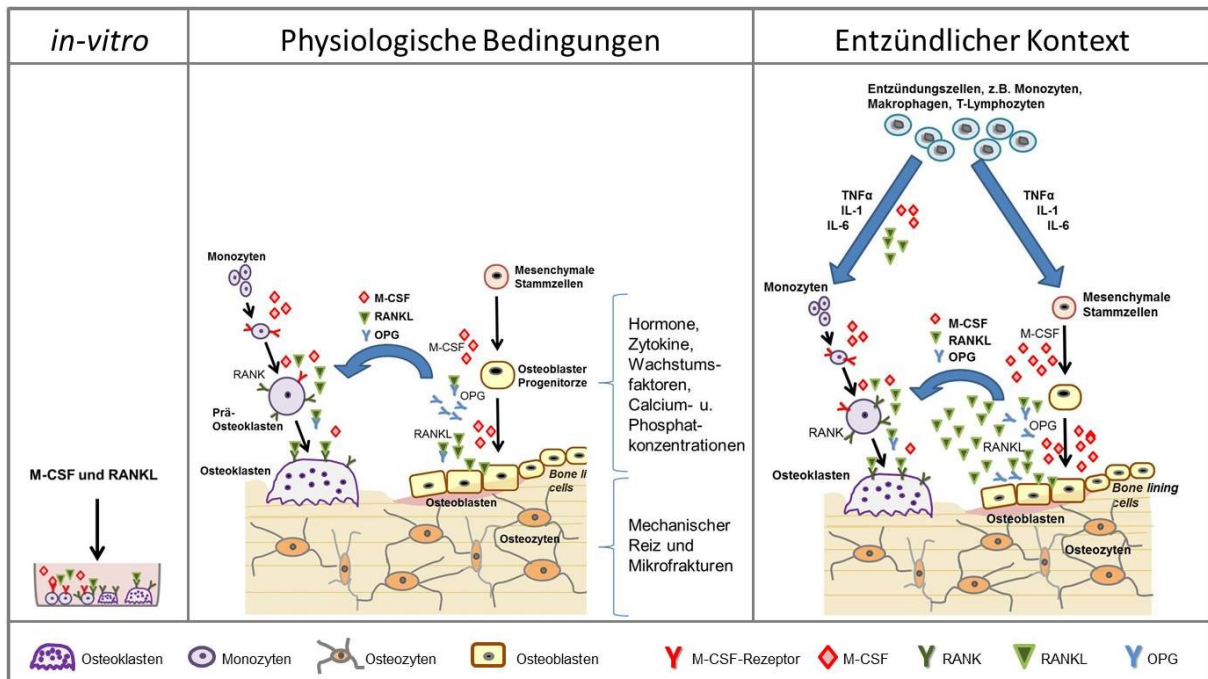
Syndecan-1 ist ein Protein, das nicht nur zellspezifisch, sondern auch abhängig von dem

Differenzierungsstadium einer Zelle exprimiert wird, wie Untersuchungen zur Reifung von B-Lymphozyten zeigten<sup>107</sup>. In den *in vitro*-Kulturen von Osteoklasten-Vorläuferzellen unterlag die Expression von Syndecan-1 der Regulation durch RANKL und TNF $\alpha$  (s. Kap. 4.2.1.1). In zahlreichen Publikationen wurde bereits eine TNF $\alpha$  abhängige Regulation der Syndecan-1-Expression gezeigt, die sich jedoch je nach Zelltyp unterschiedlich auswirkte. Zum Beispiel reguliert TNF $\alpha$  in Epithelzellen und in Endothelzellen die Sdc1-Expression herunter, wohingegen der mRNA-Gehalt in TNF $\alpha$ -stimulierten Keratinozyten unverändert blieb und in malignen Glioma Zellen hochreguliert wurde<sup>159,173,174</sup>. Die Stärke der TNF $\alpha$ -Regulation auf die Expression kann durch andere Modulatoren stark beeinflusst werden. Kainulainen *et al.* zeigten, dass die TNF $\alpha$  induzierte Herunterregulation der Syndecan-1-Expression in kultivierten Endothelzellen durch die Zugabe von niedrigen Dosen fetalem Kälberserum reduziert wurde<sup>174</sup>.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von Syndecan-1 während der Differenzierung von aktivierten Monozyten zu reifen Osteoklasten gezeigt. Bisher war nur die Synthese von Sdc1 in aktivierten Monozyten-Makrophagen beschrieben worden<sup>168,175</sup>. Aktuell ist wenig über die Funktion von Syndecanen in der Differenzierung von Osteoklasten bekannt. Für gesheddetes Syndecan-1 wird eine gegensätzliche Wirkung auf die Reifung von Osteoklasten *in vitro* beschrieben. Dhodapkar *et al.* zeigten eine verzögerte Osteoklastogenese, nachdem monozytäre Vorläuferzellen in einer Co-Kultur mit Osteoblasten mit der extrazellulären Domäne von Syndecan-1, die das gesheddete Syndecan-1 signalisieren sollten, stimuliert wurden<sup>176</sup>. Hierzu im Widerspruch beschreibt Kelly *et al.* eine erhöhte Osteoklastogenese induziert durch die Stimulation mit Zellüberständen einer Brustkrebs-Zelllinie, in denen gesheddetes Syndecan-1 vorhanden war<sup>161</sup>. Erfolgte im Vorfeld eine Entfernung des geshedderten Syndecan-1 aus dem Überstand mittels Immunopräzipitation, zeigten die stimulierten Kulturen eine geringere Osteoklasten-Differenzierung. In beiden Fällen wurde die Funktion von Syndecan-1 in einem sehr komplexen Experiment untersucht, wodurch eine genaue Analyse der Funktion des Proteoglykans und möglicher Wechselwirkungen schwer durchführbar war. In einer Co-Kultur beeinflussen sich die Osteoblasten- und Osteoklasten-Vorläuferzellen stark untereinander. Außerdem beinhaltet der Zellüberstand zahlreiche Komponenten, die den zu untersuchenden Prozess beeinflussen können. Zur genaueren Analyse sollten Versuche mit reinen Monozyten-Makrophagen Kulturen und genau definierte Stimulanzen verwendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in den frakturierten Femura der Syndecan-1-defizienten Mäusen eine geringere Anzahl an Osteoklasten während der enchondralen Ossifikation nachgewiesen werden. In den *in vitro*-Kulturen bestätigte sich die verzögerte Differenzierung von Sdc1<sup>-/-</sup>-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten unter der Stimulation von M-CSF und RANKL. Im Gegensatz dazu wurden in vier Tage alten sowie vier Monate alten *knock out*-Mäusen eine höhere Dichte an Osteoklasten nachgewiesen. Die Knochenentwicklung der neonatalen Tiere war durch die erhöhte Anzahl der Knochenabbauenden Zellen nicht verändert. In den adulten Tieren jedoch führte der Verlust von Syndecan-1 in Folge der erhöhten Osteoklasten-Aktivität zu einem geringeren Knochenvolumen und einer messbar geringeren Knochenstabilität der Wirbelkörper. Die überraschend gegensätzlichen Phänotypen, induziert durch den Verlust von Syndecan-1 war in jedem untersuchtem Fall nicht gravierend ausgebildet, führten jedoch zu funktionellen Einschränkungen des Organismus (niedrigere biomechanische Stabilität, verzögerte Frakturheilung). Syndecan-1 scheint die Funktion eines „Schalter-Molekül“ auszuüben, das sich positiv bzw. negativ auf die Osteoklasten-Differenzierung und -Aktivität auswirken kann. Die verwendete *in vitro*-Kultivierung in dieser Arbeit stellte eine Methode dar, in der eine Zelle sehr isoliert betrachtet wird. Die Differenzierung wurde allein durch die beiden Stimulanzen M-CSF und RANKL reguliert. Beide Zytokine sind essentiell für die Osteoklastogenese und induzieren sie in Monozyten-Kulturen. In der adulten Maus und während der Frakturheilung unterliegt die Differenzierung der Vorläuferzellen weiterhin der Regulation durch M-CSF und RANKL, jedoch beeinflussen zahlreiche weitere Faktoren direkt und indirekt die Osteoklastogenese (s. Abb. 26). Wie bereits in Kapitel 5.3.4 erwähnt, unterliegt der lebenslange Umbau des Knochenskeletts dem RANKL/OPG-Quotienten. Die Synthese dieser zwei Faktoren erfolgt zum größten Teil durch Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen und ist abhängig von der biomechanischen Belastung, Hormonen, Kalzium-Phosphat-Serumspiegel, systemische Entzündungsreaktionen sowie zahlreichen weiteren Faktoren im Knochenstoffwechsel. Die Komplexität dieses Mechanismus ist in der Abb. 26 vereinfacht dargestellt. Des Weiteren kann Syndecan-1 aufgrund seiner zahlreichen Bindungspartner verschiedene Funktionen als transmembranes Protein und auch als löslicher Faktor ausüben. Aufgrund dieser Vielfältigkeit konnte durch das Ausschalten von Syndecan-1 verschiedene bis sogar gegensätzliche Auswirkungen auf die Osteoklastogenese abhängig von den äußeren Bedingungen festgestellt werden. Für die genaue Identifikation sind weitere Unter-

suchungen notwendig. Eine an Bedeutung zunehmende Funktion scheint Syndecan-1 in einem entzündlichen Kontext einnehmen, wie die Zytokin-abhängige Regulation der Syndecan-1-Expression und die Frakturheilung in der Syndecan-1-defizienten Maus vermuten lassen.



**Abb. 26: Schematische Darstellung der Osteoklasten-Differenzierung *in vitro* und *in vivo***

Zwei essentielle Faktoren für die Osteoklastogenese stellen *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand* (RANKL) dar, die zur *in vitro*-Differenzierung von isolierten Monozyten zu reifen Osteoklasten eingesetzt werden. Unter physiologischen Bedingungen werden M-CSF und RANKL hauptsächlich von Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen produziert, die ebenfalls Osteoprotegerin (OPG) synthetisieren. OPG ist ein Gegenspieler des spezifischen RANKL-Rezeptors *Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B* (RANK). Es bindet RANKL, aber kann selbst keine Signaltransduktion hervorrufen, so dass die Differenzierung der Osteoklasten gehemmt wird. Die Osteoblasten unterliegen der Kontrolle von zahlreichen weiteren Faktoren, die auf die Synthese von OPG, M-CSF und RANKL wirken und somit den RANKL-OPG-Quotienten beeinflussen. Im entzündlichen Kontext produzieren Entzündungszellen verschiedene Zytokine, die direkt oder indirekt die Osteoklastogenese beeinflussen (modifiziert nach Hofbauer 2010 und Long & Humphrey 2012<sup>136,177</sup>).

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Frakturheilung stellt einen hochkomplexen Reparaturmechanismus dar, in dem verschiedenste Prozesse aufeinander abgestimmt erfolgen. Zum einen muss eine primäre Entzündungsreaktion zur Induktion der Reparaturphase ausgelöst werden, die zur Invasion von Entzündungs- sowie Vorläuferzellen führt. Zum anderen muss die Differenzierung unterschiedlichster Zelltypen koordiniert und der Aufbau sowie Abbau verschiedenster Gewebearten reguliert werden.

Die beiden Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) Syndecan-1 und Syndecan-4 beeinflussen den Heilungsverlauf verschiedenster Organe bzw. Gewebsarten nach einer Schädigung bzw. induzierten Entzündung. In der vorliegenden Arbeit konnte eine funktionelle Relevanz für die beiden Proteoglykane in der Frakturheilung gezeigt werden. Gentechnisch veränderte Mäuse, bei denen das Gen Syndecan-1 bzw. Syndecan-4 ausgeschaltet wurde, wiesen eine verzögerte Frakturheilung auf. Besonders unter dem Verlust von Syndecan-4 stellten sich ein signifikant vergrößerter Frakturkallus und eine veränderte Zusammensetzung des Kallus mit einem erhöhten Anteil an Knorpelgewebe am 14. Tag der Frakturheilung dar. Der Verlauf der Frakturheilung der Syndecan-4-defizienten Maus konnte bei einer reduzierten Entzündungsreaktion, verursacht durch die Gabe von anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, dem der WT-Tiere angenähert werden. Die Größe der Frakturkalli und deren Gewebezusammensetzung waren in beiden Genotypen unter der anti-inflammatorischen Behandlung vergleichbar. Syndecan-4 scheint daher besonders in der Differenzierung von Chondrozyten-Vorläuferzellen involviert zu sein und während der enchondralen Ossifikation unter TNF $\alpha$  wichtige Mechanismen zu regulieren.

Der Verlust von Syndecan-1 führte *in vitro* zu einer verzögerten Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen. Innerhalb der Frakturkalli waren die Zahl der reifen Osteoklasten sowie der Nachweis der Osteoklasten-Markerproteine MMP-9 und TRAP in den Sdc1<sup>-/-</sup>-Mäusen am 14. Tag der Heilung reduziert. Unter physiologischen Bedingungen jedoch stellte sich ein gegensätzlicher Osteoklasten-Phänotyp dar. Sowohl vier Tage als auch vier Monate alte Syndecan-1-defiziente Tiere wiesen eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten im Vergleich zum Wildtyp auf. Im adulten Organismus der *knock out*-Mäuse führte dies zu einem geringeren Knochenvolumen der Röhrenknochen und Wirbelkörper, das in einer verminderten Knochenstabilität des 4. Lendenwirbels resultierte.



Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine spezifische Hochregulation der Expression von Syndecan-1 und Syndecan-4 in unterschiedlichen Zelltypen des Knochengewebes gezeigt werden. Die Expression der beiden HPSG unterlag der Kontrolle von Zytokinen, die während der Frakturheilung wichtige Prozesse regulieren. Syndecan-4 wird, induziert durch  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ , als einziges Syndecan in mesenchymalen Zellen vermehrt exprimiert und beeinflusst in einem  $\text{TNF}\alpha$ -abhängigen Mechanismus die enchondrale Ossifikation während der Frakturheilung. In zu Osteoklasten differenzierenden Monozyten konnte eine Hochregulation der Expression von Syndecan-1 als einziges Mitglied dieser Familie gezeigt werden. RANKL, der als essentieller Faktor der Osteoklasten-Differenzierung gilt, und  $\text{TNF}\alpha$ , der ebenfalls die Reifung von Osteoklasten fördert, induzierten die Zunahme der Syndecan-1 mRNA. Dies deutet auf eine wichtige regulatorische Funktion von Syndecan-1 speziell im Rahmen der Osteoklasten-Differenzierung im entzündlichen Kontext hin.

Eine Funktion in der Vermittlung von inflammatorischen Signalen wird den Syndecanen heute mehr und mehr zugeschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Theorie. Jedoch wird deutlich, dass jedes Syndecan-Protein in seiner speziellen Zell- und Gewebenische wirkt und an den Prozess angepasste Funktionen erfüllt.

## LITERATUR

- 1 Claes, L., Recknagel, S. & Ignatius, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8, 133-143, doi:10.1038/nrrheum.2012.1 (2012).
- 2 Histing, T. *et al.* Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49, 591-599, doi:10.1016/j.bone.2011.07.007 (2011).
- 3 Marsell, R. & Einhorn, T. A. The biology of fracture healing. *Injury* 42, 551-555, doi:10.1016/j.injury.2011.03.031 (2011).
- 4 Einhorn, T. A. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21 (1998).
- 5 Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P. & Little, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19, 459-466, doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.004 (2008).
- 6 Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T. & Einhorn, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88, 873-884, doi:10.1002/jcb.10435 (2003).
- 7 Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T. & Helms, J. A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87, 57-66 (1999).
- 8 Dimitriou, R., Tsiridis, E. & Giannoudis, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36, 1392-1404, doi:10.1016/j.injury.2005.07.019 (2005).
- 9 Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87, 107-118 (2008).
- 10 Cho, T. J., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17, 513-520, doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513 (2002).
- 11 Kolar, P., Gaber, T., Perka, C., Duda, G. N. & Buttgerit, F. Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* 469, 3118-3126, doi:10.1007/s11999-011-1865-3 (2011).
- 12 Pape, H. C. *et al.* Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma* 24, 522-525, doi:10.1097/BOT.0b013e3181ed1361 (2010).
- 13 Lenz, A., Franklin, G. A. & Cheadle, W. G. Systemic inflammation after trauma. *Injury* 38, 1336-1345, doi:10.1016/j.injury.2007.10.003 (2007).
- 14 Zhang, X. *et al.* Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* 75, 358-372, doi:10.1189/jlb.0903412 (2004).
- 15 Soehnlein, O. *et al.* Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 112, 1461-1471, doi:10.1182/blood-2008-02-139634 (2008).
- 16 Chung, R., Cool, J. C., Scherer, M. A., Foster, B. K. & Xian, C. J. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol* 80, 1272-1280, doi:10.1189/jlb.0606365 (2006).
- 17 Kon, T. *et al.* Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16, 1004-1014, doi:10.1359/jbmr.2001.16.6.1004 (2001).
- 18 Hausman, M. R., Schaffler, M. B. & Majeska, R. J. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29, 560-564 (2001).

- 19 Hankenson, K. D., Dishowitz, M., Gray, C. & Schenker, M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury* 42, 556-561, doi:10.1016/j.injury.2011.03.035 (2011).
- 20 Toben, D. *et al.* Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res* 26, 113-124, doi:10.1002/jbmr.185 (2011).
- 21 Claes, L. E. *et al.* Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *Clin Orthop Relat Res*, S132-147 (1998).
- 22 Bland, Y. S., Critchlow, M. A. & Ashurst, D. E. The expression of the fibrillar collagen genes during fracture healing: heterogeneity of the matrices and differentiation of the osteoprogenitor cells. *Histochem J* 31, 797-809 (1999).
- 23 Mackie, E. J., Tatarczuch, L. & Mirams, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol* 211, 109-121, doi:10.1530/joe-11-0048 (2011).
- 24 Hiltunen, A., Aro, H. T. & Vuorio, E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clin Orthop Relat Res*, 23-27 (1993).
- 25 Gerstenfeld, L. C. *et al.* Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 18, 1584-1592, doi:10.1359/jbmr.2003.18.9.1584 (2003).
- 26 Hojo, H., Ohba, S., Yano, F. & Chung, U. I. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J Bone Miner Metab* 28, 489-502, doi:10.1007/s00774-010-0199-7 (2010).
- 27 Lee, F. Y., Choi, Y. W., Behrens, F. F., DeFouw, D. O. & Einhorn, T. A. Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 16, 144-150, doi:10.1002/jor.1100160124 (1998).
- 28 Ortega, N., Behonick, D. J. & Werb, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14, 86-93, doi:10.1016/j.tcb.2003.12.003 (2004).
- 29 Knowles, H. J. *et al.* Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Arch* 461, 205-210, doi:10.1007/s00428-012-1274-3 (2012).
- 30 Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342, doi:10.1038/nature01658 (2003).
- 31 Edwards, J. R. & Mundy, G. R. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol* 7, 235-243, doi:10.1038/nrrheum.2011.23 (2011).
- 32 Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251-264, doi:10.1016/j.bone.2006.09.023 (2007).
- 33 Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508 (2000).
- 34 Kim, J. H. *et al.* The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. *J Immunol* 183, 1862-1870, doi:10.4049/jimmunol.0803007 (2009).
- 35 Lam, J. *et al.* TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106, 1481-1488, doi:10.1172/jci11176 (2000).
- 36 Yao, Z. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J Biol Chem* 281, 11846-11855, doi:10.1074/jbc.M512624200 (2006).
- 37 David, J. P. & Schett, G. TNF and bone. *Curr Dir Autoimmun* 11, 135-144, doi:10.1159/000289202 (2010).
- 38 Zhang, Y. H., Heulsmann, A., Tondravi, M. M., Mukherjee, A. & Abu-Amer, Y. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem* 276, 563-568, doi:10.1074/jbc.M008198200 (2001).

- 39 Marie, P. J. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene* 316, 23-32 (2003).
- 40 Deschaseaux, F., Sensebe, L. & Heymann, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 15, 417-429, doi:10.1016/j.molmed.2009.07.002 (2009).
- 41 Bais, M. *et al.* Transcriptional analysis of fracture healing and the induction of embryonic stem cell-related genes. *PLoS One* 4, e5393, doi:10.1371/journal.pone.0005393 (2009).
- 42 Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-233, doi:10.1038/nrm2125 (2007).
- 43 Ortega, N., Behonick, D., Stickens, D. & Werb, Z. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 995, 109-116 (2003).
- 44 Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S. & Mirams, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 46-62, doi:10.1016/j.biocel.2007.06.009 (2008).
- 45 Borkakoti, N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med (Berl)* 78, 261-268 (2000).
- 46 Lieu, S. *et al.* Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Dis Model Mech* 4, 203-211, doi:10.1242/dmm.006304 (2011).
- 47 Stickens, D. *et al.* Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131, 5883-5895, doi:10.1242/dev.01461 (2004).
- 48 Colnot, C., Thompson, Z., Miclau, T., Werb, Z. & Helms, J. A. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development* 130, 4123-4133 (2003).
- 49 Vu, T. H. *et al.* MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93, 411-422 (1998).
- 50 Yamagiwa, H. *et al.* Expression of metalloproteinase-13 (Collagenase-3) is induced during fracture healing in mice. *Bone* 25, 197-203 (1999).
- 51 Behonick, D. J. *et al.* Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. *PLoS One* 2, e1150, doi:10.1371/journal.pone.0001150 (2007).
- 52 Kumar, S. R., N. and Ge, r. Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer. *Cancer Res* 4, 1252-1299 (2012).
- 53 Jones, G. C. & Riley, G. P. ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, 160-169, doi:10.1186/ar1783 (2005).
- 54 Tang, B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 33-44 (2001).
- 55 Yamanishi, Y. *et al.* Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol* 168, 1405-1412 (2002).
- 56 Majumdar, M. K. *et al.* Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56, 3670-3674, doi:10.1002/art.23027 (2007).
- 57 Glasson, S. S. *et al.* Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* 50, 2547-2558, doi:10.1002/art.20558 (2004).
- 58 Glasson, S. S. *et al.* Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 434, 644-648, doi:10.1038/nature03369 (2005).
- 59 Wang, K. *et al.* Analysis of fracture healing by large-scale transcriptional profile identified temporal relationships between metalloproteinase and ADAMTS mRNA expression. *Matrix Biol* 25, 271-281, doi:10.1016/j.matbio.2006.02.001 (2006).

- 60 Stanton, H., Melrose, J., Little, C. B. & Fosang, A. J. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta* 1812, 1616-1629, doi:10.1016/j.bbadis.2011.08.009 (2011).
- 61 Murphy, G. *et al.* Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107, 38-44 (1999).
- 62 Kainulainen, V., Wang, H., Schick, C. & Bernfield, M. Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem* 273, 11563-11569 (1998).
- 63 Gao, G. *et al.* ADAMTS4 (aggrecanase-1) activation on the cell surface involves C-terminal cleavage by glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane type 4-matrix metalloproteinase and binding of the activated proteinase to chondroitin sulfate and heparan sulfate on syndecan-1. *J Biol Chem* 279, 10042-10051, doi:10.1074/jbc.M312100200 (2004).
- 64 Echtermeyer, F. *et al.* Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med* 15, 1072-1076, doi:10.1038/nm.1998 (2009).
- 65 Vanhoutte, D. *et al.* Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation* 115, 475-482, doi:10.1161/circulationaha.106.644609 (2007).
- 66 Pap, T. & Bertrand, J. Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat Rev Rheumatol*, doi:10.1038/nrrheum.2012.178 (2012).
- 67 Rosenberg, R. D., Shworak, N. W., Liu, J., Schwartz, J. J. & Zhang, L. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest* 99, 2062-2070, doi:10.1172/jci119377 (1997).
- 68 Carey, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 327 ( Pt 1), 1-16 (1997).
- 69 Teng, Y. H., Aquino, R. S. & Park, P. W. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol* 31, 3-16, doi:10.1016/j.matbio.2011.10.001 (2012).
- 70 Roper, J. A., Williamson, R. C. & Bass, M. D. Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. *Curr Opin Struct Biol* 22, 583-590, doi:10.1016/j.sbi.2012.07.003 (2012).
- 71 Couchman, J. R. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 89-114, doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104126 (2010).
- 72 Simons, M. & Horowitz, A. Syndecan-4-mediated signalling. *Cell Signal* 13, 855-862 (2001).
- 73 Bernfield, M. *et al.* Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 8, 365-393, doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.002053 (1992).
- 74 Kim, C. W., Goldberger, O. A., Gallo, R. L. & Bernfield, M. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Mol Biol Cell* 5, 797-805 (1994).
- 75 Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S. A. & Zimmermann, P. The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans. *Curr Opin Cell Biol* 21, 662-669, doi:10.1016/j.ceb.2009.05.002 (2009).
- 76 Manon-Jensen, T., Itoh, Y. & Couchman, J. R. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J* 277, 3876-3889, doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x (2010).
- 77 Gotte, M. Syndecans in inflammation. *FASEB J* 17, 575-591, doi:10.1096/fj.02-0739rev (2003).
- 78 Bass, M. D. & Humphries, M. J. Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem J* 368, 1-15,

- doi:10.1042/bj20021228 (2002).
- 79 Greene, D. K., Tumova, S., Couchman, J. R. & Woods, A. Syndecan-4 associates with alpha-actinin. *J Biol Chem* 278, 7617-7623, doi:10.1074/jbc.M207123200 (2003).
- 80 Morgan, M. R. *et al.* Syndecan-4 Phosphorylation Is a Control Point for Integrin Recycling. *Dev Cell*, doi:10.1016/j.devcel.2013.01.027 (2013).
- 81 Sanderson, R. D. & Bernfield, M. Molecular polymorphism of a cell surface proteoglycan: distinct structures on simple and stratified epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9562-9566 (1988).
- 82 Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O. & Sugahara, K. Chondroitin sulfate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparan sulfate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 279, 37368-37376, doi:10.1074/jbc.M403031200 (2004).
- 83 Choi, S. *et al.* Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4. *J Biol Chem* 280, 42573-42579, doi:10.1074/jbc.M509238200 (2005).
- 84 Dews, I. C. & Mackenzie, K. R. Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20782-20787, doi:10.1073/pnas.0708909105 (2007).
- 85 Olwin, B. B. & Rapraeger, A. Repression of myogenic differentiation by aFGF, bFGF, and K-FGF is dependent on cellular heparan sulfate. *J Cell Biol* 118, 631-639 (1992).
- 86 Schlessinger, J. *et al.* Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 6, 743-750 (2000).
- 87 Rapraeger, A. C., Krufka, A. & Olwin, B. B. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252, 1705-1708 (1991).
- 88 Sanderson, R. D., Turnbull, J. E., Gallagher, J. T. & Lander, A. D. Fine structure of heparan sulfate regulates syndecan-1 function and cell behavior. *J Biol Chem* 269, 13100-13106 (1994).
- 89 Theoleyre, S. *et al.* Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 460-467, doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.120 (2006).
- 90 Kwon, M. J., Jang, B., Yi, J. Y., Han, I. O. & Oh, E. S. Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEBS Lett* 586, 2207-2211, doi:10.1016/j.febslet.2012.05.037 (2012).
- 91 Morgan, M. R., Humphries, M. J. & Bass, M. D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 957-969, doi:10.1038/nrm2289 (2007).
- 92 Whiteford, J. R. & Couchman, J. R. A conserved NXIP motif is required for cell adhesion properties of the syndecan-4 ectodomain. *J Biol Chem* 281, 32156-32163, doi:10.1074/jbc.M605553200 (2006).
- 93 Beauvais, D. M., Ell, B. J., McWhorter, A. R. & Rapraeger, A. C. Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med* 206, 691-705, doi:10.1084/jem.20081278 (2009).
- 94 Saoncella, S. *et al.* Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A* 96, 2805-2810 (1999).
- 95 Vuoriluoto, K. *et al.* Syndecan-1 supports integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen. *Exp Cell Res* 314, 3369-3381, doi:10.1016/j.yexcr.2008.07.005 (2008).
- 96 Bass, M. D. *et al.* A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev Cell* 21, 681-693, doi:10.1016/j.devcel.2011.08.007 (2011).
- 97 Brooks, R., Williamson, R. & Bass, M. Syndecan-4 independently regulates multiple small GTPases to promote fibroblast migration during wound healing. *Small GTPases* 3, 73-79, doi:10.4161/sgtp.19301 (2012).
- 98 Ikeda, H. *et al.* The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 15, 4028-4037, doi:10.1158/1078-0432.ccr-08-2867 (2009).
- 99 Erickson, H. K. *et al.* Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Res* 66, 4426-4433, doi:10.1158/0008-5472.can-05-4489 (2006).
- 100 Li, Q., Park, P. W., Wilson, C. L. & Parks, W. C. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. *Cell* 111, 635-646 (2002).
- 101 Shapiro, S. D. Immunology: Mobilizing the army. *Nature* 421, 223-224, doi:10.1038/421223a (2003).
- 102 Manon-Jensen, T., Multhaupt, H. A. & Couchman, J. R. Mapping of MMP cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J*, doi:10.1111/febs.12174 (2013).
- 103 Rodriguez-Manzaneque, J. C. *et al.* Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 800-810, doi:10.1016/j.biocel.2008.08.014 (2009).
- 104 Schmidt, A., Echtermeyer, F., Alozie, A., Brands, K. & Buddecke, E. Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds. *J Biol Chem* 280, 34441-34446, doi:10.1074/jbc.M501903200 (2005).
- 105 Sutherland, A. E. *et al.* Expression of syndecan, a putative low affinity fibroblast growth factor receptor, in the early mouse embryo. *Development* 113, 339-351 (1991).
- 106 Hayashi, K. *et al.* Immunocytochemistry of cell surface heparan sulfate proteoglycan in mouse tissues. A light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 35, 1079-1088 (1987).
- 107 Sanderson, R. D., Lalor, P. & Bernfield, M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul* 1, 27-35 (1989).
- 108 Li, J., Brown, L. F., Laham, R. J., Volk, R. & Simons, M. Macrophage-dependent regulation of syndecan gene expression. *Circ Res* 81, 785-796 (1997).
- 109 Stepp, M. A. *et al.* Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci* 115, 4517-4531 (2002).
- 110 Kharabi Masouleh, B. *et al.* Role of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 (CD138) in delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 182, 4985-4993, doi:10.4049/jimmunol.0800574 (2009).
- 111 Floer, M. *et al.* Enoxaparin improves the course of dextran sodium sulfate-induced colitis in syndecan-1-deficient mice. *Am J Pathol* 176, 146-157, doi:10.2353/ajpath.2010.080639 (2010).
- 112 Gotte, M. & Echtermeyer, F. Syndecan-1 as a regulator of chemokine function. *ScientificWorldJournal* 3, 1327-1331, doi:10.1100/tsw.2003.118 (2003).
- 113 Elenius, V., Gotte, M., Reizes, O., Elenius, K. & Bernfield, M. Inhibition by the soluble

- syndecan-1 ectodomains delays wound repair in mice overexpressing syndecan-1. *J Biol Chem* 279, 41928-41935, doi:10.1074/jbc.M404506200 (2004).
- 114 Song, S. J., Hutmacher, D., Nurcombe, V. & Cool, S. M. Temporal expression of proteoglycans in the rat limb during bone healing. *Gene* 379, 92-100, doi:10.1016/j.gene.2006.04.029 (2006).
- 115 Tkachenko, E., Rhodes, J. M. & Simons, M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* 96, 488-500, doi:10.1161/01.RES.0000159708.71142.c8 (2005).
- 116 Koo, B. K. *et al.* Structural basis of syndecan-4 phosphorylation as a molecular switch to regulate signaling. *J Mol Biol* 355, 651-663, doi:10.1016/j.jmb.2005.09.087 (2006).
- 117 Keum, E. *et al.* Syndecan-4 regulates localization, activity and stability of protein kinase C- $\alpha$ . *Biochem J* 378, 1007-1014, doi:10.1042/bj20031734 (2004).
- 118 Echtermeyer, F. *et al.* Syndecan-4 signalling inhibits apoptosis and controls NFAT activity during myocardial damage and remodelling. *Cardiovasc Res* 92, 123-131, doi:10.1093/cvr/cvr149 (2011).
- 119 Echtermeyer, F. *et al.* Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest* 107, R9-R14, doi:10.1172/jci10559 (2001).
- 120 Subramanian, S. V., Fitzgerald, M. L. & Bernfield, M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 272, 14713-14720 (1997).
- 121 Xie, J. *et al.* Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 53, 250-258, doi:10.1016/j.yjmcc.2012.04.014 (2012).
- 122 Wang, J. *et al.* TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  promote a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type I motif-5-mediated aggrecan degradation through syndecan-4 in intervertebral disc. *J Biol Chem* 286, 39738-39749, doi:10.1074/jbc.M111.264549 (2011).
- 123 Bertrand, J. *et al.* Bone fracture repair, but not fetal skeletal development is supported by syndecan-4. *Arthritis Rheum*, doi:10.1002/art.37817 (2012).
- 124 Alexander, C. M. *et al.* Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet* 25, 329-332, doi:10.1038/77108 (2000).
- 125 Rops, A. L. *et al.* Syndecan-1 deficiency aggravates anti-glomerular basement membrane nephritis. *Kidney Int* 72, 1204-1215, doi:10.1038/sj.ki.5002514 (2007).
- 126 Schmidmaier, G. *et al.* Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- $\beta$  1) treatment on fracture healing. A safety study for using growth factors. *J Orthop Res* 22, 514-519, doi:10.1016/j.orthres.2003.09.009 (2004).
- 127 Malaval, L., Liu, F., Roche, P. & Aubin, J. E. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 74, 616-627 (1999).
- 128 Bellows, C. G., Aubin, J. E., Heersche, J. N. & Antosz, M. E. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 38, 143-154 (1986).
- 129 Binder, N. B. *et al.* Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2-dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis. *Nat Med* 15, 417-424, doi:10.1038/nm.1945 (2009).
- 130 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63 (1983).
- 131 Weichert, H., Blechschmidt, I., Schroder, S. & Ambrosius, H. The MTT-assay as a rapid test for cell proliferation and cell killing: application to human peripheral blood lymphocytes (PBL). *Allerg Immunol (Leipz)* 37, 139-144 (1991).
- 132 Tan, S. C. *et al.* Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors. *Mol Biol Rep* 39, 4857-4867, doi:10.1007/s11033-011-1281-5



- (2012).
- 133 Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A. & Midura, R. J. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 270, 9420-9428 (1995).
- 134 Turner, C. H. & Burr, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14, 595-608 (1993).
- 135 Mitani, H. *et al.* Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol* 126, 371-380, doi:10.1007/s00418-006-0171-8 (2006).
- 136 Hofbauer, L. C. Bedeutung des RANK/RANKL/OPG-Signalwegs für den Knochenstoffwechsel. *Osteologie* 19, 354-357 (2010).
- 137 Braun, T. & Schett, G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. *Curr Osteoporos Rep* 10, 101-108, doi:10.1007/s11914-012-0104-5 (2012).
- 138 Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H. & Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19, 72-80, doi:10.1016/j.tcb.2008.12.001 (2009).
- 139 Lundberg, P. *et al.* Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRPalpha-interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 444-448, doi:10.1016/j.bbrc.2006.11.057 (2007).
- 140 Miyamoto, T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med* 60, 101-105 (2011).
- 141 Yagi, M. *et al.* DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202, 345-351, doi:10.1084/jem.20050645 (2005).
- 142 Anderson, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*, 266-280 (1995).
- 143 Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld, L. C. & Einhorn, T. A. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 14, 1805-1815, doi:10.1359/jbmr.1999.14.11.1805 (1999).
- 144 Kosaki, N. *et al.* Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase-13 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 846-851, doi:10.1016/j.bbrc.2006.12.234 (2007).
- 145 Song, S. J., Cool, S. M. & Nurcombe, V. Regulated expression of syndecan-4 in rat calvaria osteoblasts induced by fibroblast growth factor-2. *J Cell Biochem* 100, 402-411, doi:10.1002/jcb.21068 (2007).
- 146 Zhang, Y., Pasparakis, M., Kollias, G. & Simons, M. Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. *J Biol Chem* 274, 14786-14790 (1999).
- 147 Cevikbas, F. *et al.* Unilateral nephrectomy leads to up-regulation of syndecan-2- and TGF-beta-mediated glomerulosclerosis in syndecan-4 deficient male mice. *Matrix Biol* 27, 42-52, doi:10.1016/j.matbio.2007.07.003 (2008).
- 148 Lange, J. *et al.* Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res* 28, 778-784, doi:10.1002/jor.21061 (2010).
- 149 Glass, G. E. *et al.* TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1585-1590, doi:10.1073/pnas.1018501108 (2011).
- 150 Frost, A., Jonsson, K. B., Nilsson, O. & Ljunggren, O. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand* 68, 91-96 (1997).
- 151 Hashimoto, J. *et al.* Inhibitory effects of tumor necrosis factor alpha on fracture healing in rats. *Bone* 10, 453-457 (1989).
- 152 Wahl, E. C. *et al.* Direct bone formation during distraction osteogenesis does not require TNFalpha receptors and elevated serum TNFalpha fails to inhibit bone

- formation in TNFR1 deficient mice. *Bone* 46, 410-417, doi:10.1016/j.bone.2009.09.011 (2010).
- 153 Deckers, M. M. *et al.* Dissociation of angiogenesis and osteoclastogenesis during endochondral bone formation in neonatal mice. *J Bone Miner Res* 17, 998-1007, doi:10.1359/jbmr.2002.17.6.998 (2002).
- 154 McDonald, M. M. *et al.* MMP driven endochondral fracture union proceeds independently of osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, doi:10.1002/jbmr.1889 (2013).
- 155 Elenius, K. *et al.* Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol* 114, 585-595 (1991).
- 156 Hinkes, M. T., Goldberger, O. A., Neumann, P. E., Kokenyesi, R. & Bernfield, M. Organization and promoter activity of the mouse syndecan-1 gene. *J Biol Chem* 268, 11440-11448 (1993).
- 157 Solt, L. A. & May, M. J. The I $\kappa$ B kinase complex: master regulator of NF- $\kappa$ B signaling. *Immunol Res* 42, 3-18, doi:10.1007/s12026-008-8025-1 (2008).
- 158 Abu-Amer, Y. NF- $\kappa$ B signaling and bone resorption. *Osteoporos Int*, doi:10.1007/s00198-013-2313-x (2013).
- 159 Watanabe, A. *et al.* Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor- $\kappa$ B in upregulation of syndecan-1 expression. *J Neurooncol* 77, 25-32, doi:10.1007/s11060-005-9010-3 (2006).
- 160 Ishii, M. & Saeki, Y. Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol* 18, 220-227, doi:10.1007/s10165-008-0051-2 (2008).
- 161 Kelly, T., Suva, L. J., Nicks, K. M., MacLeod, V. & Sanderson, R. D. Tumor-derived syndecan-1 mediates distal cross-talk with bone that enhances osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 25, 1295-1304, doi:10.1002/jbmr.16 (2010).
- 162 Mosheimer, B. A. *et al.* Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2964-2971, doi:10.1210/jc.2004-1895 (2005).
- 163 Yongchaitrakul, T., Manokawinchoke, J. & Pavasant, P. Osteoprotegerin induces osteopontin via syndecan-1 and phosphoinositol 3-kinase/Akt in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 44, 776-783, doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01190.x (2009).
- 164 Altemeier, W. A., Schlesinger, S. Y., Buell, C. A., Parks, W. C. & Chen, P. Syndecan-1 controls cell migration by activating Rap1 to regulate focal adhesion disassembly. *J Cell Sci* 125, 5188-5195, doi:10.1242/jcs.109884 (2012).
- 165 Stepp, M. A. *et al.* Reduced migration, altered matrix and enhanced TGF $\beta$ 1 signaling are signatures of mouse keratinocytes lacking Sdc1. *J Cell Sci* 120, 2851-2863, doi:10.1242/jcs.03480 (2007).
- 166 Lau, E. K. *et al.* Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem* 279, 22294-22305, doi:10.1074/jbc.M311224200 (2004).
- 167 Dagouassat, M. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer* 126, 1095-1108, doi:10.1002/ijc.24800 (2010).
- 168 Brule, S. *et al.* The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* 16, 488-501, doi:10.1093/glycob/cwj098 (2006).
- 169 Bucay, N. *et al.* osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12, 1260-1268 (1998).
- 170 Hayer, S. *et al.* CD44 is a determinant of inflammatory bone loss. *J Exp Med* 201, 903-914, doi:10.1084/jem.20040852 (2005).

- 
- 171 Hofbauer, L. C. & Heufelder, A. E. [Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone diseases]. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 145-150, doi:10.1055/s-2001-11050 (2001).
- 172 Standal, T. *et al.* Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 100, 3002-3007, doi:10.1182/blood-2002-04-1190 (2002).
- 173 Day, R. M., Mitchell, T. J., Knight, S. C. & Forbes, A. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine* 21, 224-233 (2003).
- 174 Kainulainen, V. *et al.* Suppression of syndecan-1 expression in endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 271, 18759-18766 (1996).
- 175 Yeaman, C. & Rapraeger, A. C. Post-transcriptional regulation of syndecan-1 expression by cAMP in peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 122, 941-950 (1993).
- 176 Dhodapkar, M. V. *et al.* Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 91, 2679-2688 (1998).
- 177 Long, C. L. & Humphrey, M. B. Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling. *Bonekey Rep* 1, doi:10.1038/bonekey.2012.59 (2012).

## **LEBENS LAUF**



## VERÖFFENTLICHUNGEN

### ORIGINALARBEITEN:

#### **Bone fracture repair, but not fetal skeletal development is supported by Syndecan-4**

Jessica Bertrand, Richard Stange, **Heriburg Hidding**, Frank Echtermeyer, Giovanna Nalesso, Lars Godmann, Melanie Timmen, Peter Bruckner, Francesco Dell'Accio, Michael J. Raschke, Thomas Pap und Rita Dreier

Arthritis & Rheumatism, März 2013, Volumen 65(3):743-52. doi: 10.1002/art.37817

#### **Age-related bone deterioration is diminished by disrupted collagen sensing in integrin $\alpha 2\beta 1$ deficient mice.**

Richard Stange, Daniel Kronenberg, Melanie Timmen, Jens Everding, **Heriburg Hidding**, Beate Eckes, Uwe Hansen, Micheal Holtkamp, Uwe Karst, Thomas Pap und Micheal J. Raschke

Bone, September 2013, Volumen 56(1):48-54. doi: 10.1016/j.bone.2013.05.003

### VERÖFFENTLICHTE ABSTRACTS UND POSTERPRÄSENTATIONEN:

#### **Einfluss des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-4 auf die Knochenstabilität bei Östrogenmangel-induzierter Osteoporose in der Maus**

Britta Wieskötter, Melanie Timmen, **Heriburg Hidding**, Michael J. Raschke, Thomas Pap und Richard Stange

Osteologie1/2012 (V1.6)

#### **Syndecan-4 is critically involved in inflammation driven bone fracture repair, but not fetal skeletal development**

Jessica Bertrand, Richard Stange, **Heriburg Hidding**, Frank Echtermeyer, Giovanna Nalesso, Lars Godmann, Francesco Dell'Accio, Thoams Pap und Rita Dreier

Osteoarthritis Cartilage 2012, ISSN 1063-4584, S25-S26

**Transient Receptor Potential Canonical Channel 1 dependent pathways are required for osteoclast fusion and mediate osteoporotic bone loss**

Daniel Umlauf, **Heriburg Hidding**, Otto Lindemann, Berno Dankbar, Svetlana Frank, Christoph Cromme, A. Dietrich, Robert P. Marshall, Michael Amling, Magdalena Steiner, Uwe Kornak, Albrecht Schwab, Thomas Pap und Jessica Bertrand

Ann. Rheum Dis 2012, Vol. 71: Suppl 1 (A 67)

**Role of Syndecan-4 in chondrocyte differentiation**

**Heriburg Hidding**, Rita Dreier, Jessica Bertrand, Simone Niehues, Melanie Timmen, Frank Echtermeyer, Thomas Pap, Michael J. Raschke und Richard Stange

Ann. Rheum Dis 2011, Vol. 70: Suppl 2 (A 90-91)

**Loss of syndecan-4 results in increased callus and cartilage formation during fracture healing**

**Heriburg Hidding**, Rita Dreier, Jessica Bertrand, Simone Niehues, Melanie Timmen, Frank Echtermeyer, Thomas Pap, Michael J. Raschke und Richard Stange

Workshop of the International Society for Fracture Repair (ISFR), Würzburg, Deutschland, 5-7. September 2011

**The heparansulfate proteoglycan syndecans-4 influences bone fracture healing**

**Heriburg Hidding**, Melanie Timmen, Britta Wieskötter, Janine Hallensleben, Frank Echtermeyer, Thomas Pap, Michael J. Raschke und Richard Stange

57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS) 2011, Long Beach, Kalifornien, USA

## **DANKSAGUNG**

### **Mein besonderer Dank gilt...**

- Herrn Prof. Dr. Michael J. Raschke für die freundliche Überlassung des Themas und der Begutachtung der Dissertation;
- Herrn Prof. Dr. Thomas Pap für die herzliche Aufnahme in das Institut, die sehr hilfreichen Projektbesprechungen und die ansteckende Begeisterung für die einzelnen Projekte;
- Herrn Prof. Dr. Rüdiger J. Paul für die spontane Übernahme des Gutachtens und Frau Prof. Eva Liebau für die Betreuung meiner Promotion;
- Herrn Dr. Berno Dankbar für die Bereitschaft meine Arbeit als dritter Gutachter zu betreuen, für die vielen Hilfestellungen und für das stets offene Ohr für Fragen;
- Dr. Richard Stange für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die gute Betreuung während der Promotion; Danke für Dein Vertrauen in meine Arbeit!
- Dr. Melanie Timmen für die ausgezeichnete Betreuung und für die stetige Erreichbarkeit trotz Mutterschutz, Erziehungszeit und Hausbau; Danke für den motivierenden Zuspruch!
- Simone Niehues für die großartige Unterstützung und einfach für alles!  
Iska Leifert für die tatkräftige Unterstützung und für die gute Laune;  
Dr. Doreen Wendholt für die Tipps & Korrekturen bes. bei der Postergestaltung und der sehr netten Schreibtisch-Nachbarschaft;  
Dr. Daniel Kronenberger für die hilfreichen Tipps;  
Dr. Britta Wieskötter für die zahlreichen Operationen nach diversen Diensten und an einigen Wochenenden sowie deinem stetigen Optimismus;
- Dr. Jessica Bertrand und Dr. Rita Dreier für die gute, erfolgreiche Kooperation;
- Klaudia Niepagenkemper für die Hilfe beim Röntgen und beim Kryoschneiden im Haus Rosenbach;
- allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des IEMM für die offene und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

### **Ein herzliches Danke für die Unterstützung, den Zuspruch und vieles mehr ....**

an Martin, Nour, Dominik, Peter, Svetlana, Corinna, Marianne, Christina, Christoph, Lars, Daniel, Katharina, Sarah, Borna, Frans, Atha, Rene, Birgit, Heidi, Jenny, Peter, Anja, Mareike und Karin.

Auch ein besonderer Dank an die Feinmechanik für die Herstellung von Dentinplättchen bis hin zu den kleinen Fahrradreparaturen und für die Flur-Smalltalks!

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken. Vielen Dank für eure Hilfe und Unterstützung bei allem, was ich mache.

Zum Schluss und ganz besonders möchte ich mich bei Matthias bedanken. Danke dafür, dass du meine wechselnde Begeisterung für die Forschung in den letzten Jahren mitgelebt und ausgehalten hast.



---

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.  
Weiterhin versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen habe.

Münster, .....  
*(Unterschrift)*