

Universität Ulm
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. Anita Ignatius

Immunhistologische Untersuchungen zur Frakturheilung Midkine-defizienter Mäuse

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Simon Thomas Beie
geboren in Nürnberg

Ulm 2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 16.11.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau des Knochengewebes	1
1.2 Knochenbildung und Knochenumbau	4
1.3 Proteine der Mineralisation	6
1.4 Frakturheilung	10
1.5 Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren	17
1.6 Ziele der Arbeit	23
2 Materialien und Methoden	24
2.1 Chemikalien und Lösungen.....	24
2.2 Geräte und Software	28
2.3 Antikörper	30
2.4 Frakturheilungsstudie.....	31
2.5 Histologische Methoden.....	34
2.6 Zellkultur.....	41
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	43
2.8 Statistische Methoden.....	48
3 Ergebnisse	49
3.1 Deskriptive Histologie des Frakturheilungsmodells.....	49
3.2 Immunhistologischer Nachweis von Midkine in der Frakturheilung	52
3.3 Immunhistologischer Nachweis von Mineralisationsproteinen im Frakturheilungsmodell	55
3.4 Immunhistologischer Nachweis neutrophiler Granulozyten im Frakturheilungsmodell	61
3.5 Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen im Frakturheilungsmodell	64

3.6	Expression möglicher MDK-Rezeptoren während der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen.....	69
3.7	Einfluss von rekombinanten Midkine auf die Genexpression von mesenchymalen Stammzellen.....	71
4	Diskussion	74
4.1	Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von Midkine im Frakturheilungsmodell	75
4.2	Ergebnisse der Expression von Mineralisationsproteinen im Frakturheilungsmodell	77
4.3	Ergebnisse des Nachweises inflammatorischer Zellen im Frakturheilungsmodell	80
4.4	Ergebnisse der <i>in-vitro</i> Untersuchungen mesenchymaler Zellen.....	82
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	85
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis.....	88
	Danksagung	101
	Lebenslauf.....	102

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Destilliertes Wasser
AKT	Proteinkinase B
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ALPL	<i>human alkaline phosphatase gene</i>
AMPase	Adenosinmonophosphatase
ANK	<i>progressive ankylosis protein</i>
ANKH	<i>human progressive ankylosis protein gene</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>bone multicellular unit</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
cbf-alpha1	<i>core-binding factor subunit alpha-1</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert	<i>cycle threshold Wert</i>
ΔCT	Differenz der CT-Werte
DMP1	Dentin-Matrix-Protein 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ENPP1	<i>ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Normfallbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDF	<i>growth differentiation factor</i>
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker

GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3β</i>
H ⁺	Wasserstoffion oder Proton
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hydroxylapatit
HB-GAM	<i>heparin-binding growth-associated molecule</i>
HCL	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
K _D	Dissoziationskonstante
LRP	<i>lipoprotein receptor-related protein</i>
Ly6G	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
M	Mol/Liter
mM	Millimol/Liter
MDK	Midkine-Protein
<i>Mdk</i>	murines Midkine-Gen
<i>Mdk</i> ^{-/-}	Midkine-defiziente Maus
<i>Mdk</i> ^{+/+}	Wildtyp-Maus
MEM	<i>minimal essential Medium</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MV	Matrixvesikel
Na ⁺	Natrium-Ion
NPP1	<i>ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1</i>
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
PChol	Cholinphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEA	Phosphoethanolamin
PHOSPHO1	<i>phosphatase orphan 1</i>

Pi	Phosphat-Ion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIT1	<i>sodium-dependent phosphate transporter 1</i>
PKB	Proteinkinase B
PPi	Pyrophosphationen
PTH	Parathormon
PTN	Pleiotrophin-Protein
<i>Ptn</i>	murines Pleiotrophin-Gen
PTPR ζ	Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ ζ
qPCR	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SD	Standardabweichung
SIBLING	<i>small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein</i>
<i>Slc20a1</i>	solute carrier family 20, member 1
STH	somatotropes Hormon
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TNSALP	<i>tissue non-specific alkaline phosphatase</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelia growth factor</i>
VF	Verdünnungsfaktor
Wnt	Abkürzung aus <i>Wingless</i> und <i>Integration 1</i>

1 Einleitung

1.1 Aufbau des Knochengewebes

Das Knochengewebe übernimmt eine Vielzahl an biomechanischen und physiologischen Funktionen im Organismus. Als Teil des Stütz- und Bewegungsapparates trägt es nicht nur zur äußeren Form des Körpers und dem Schutz der inneren Organe bei, sondern ermöglicht im Zusammenspiel mit Muskeln, Sehnen und Bändern die Mobilität des Körpers. Darüber hinaus ist es an Stoffwechselvorgängen wie der Kalzium- und Phosphathomöostase beteiligt [17]. Schließlich bietet es auch Raum für das Knochenmark und damit für das wichtigste Organ der Hämatopoese [20, 33]. Knochengewebe unterscheidet sich von anderen Binde- und Stützgeweben durch seine mineralisierte extrazelluläre Matrix und durch die Fähigkeit der narbenlosen Heilung.

1.1.1 Knochenzellen

Im Knochengewebe finden sich verschiedene Zelltypen. Dazu gehören Zellen der mesenchymalen Vorläufer, z.B. Osteoblasten, Osteozyten und Knochenbelegzellen sowie Zellen der hämatopoetischen Zellreihe z.B. Osteoklasten.

- **Osteoklasten**

Osteoklasten sind durch Fusion von Blutmonozytenvorläufern entstandene mehrkernige Riesenzellen, die mineralisierten Knochen und Knorpelgewebe resorbieren. Um Knochen abzubauen bildet der Osteoklast mit Hilfe von Integrinen zwischen sich und der Knochenoberfläche ein abgeschlossenes, extrazelluläres Kompartiment (Howship-Lakune). In dieser Resorptionslakune werden durch Exozytose zahlreiche lysosomale Enzyme sezerniert. Die in der Zellmembran gelegenen H⁺-ATPasen sezernieren Protonen und generieren so ein saures extrazelluläres Milieu (pH 4,5). Der niedrige pH-Wert aktiviert wiederum die lysosomalen Enzyme wie saure Proteasen (z.B. Cathepsin K), Matrixmetalloproteasen und Phosphatasen (z.B. *tartrate-resistant acid phosphatase*), um so organische und anorganische Knochenbestandteile abzubauen [71]. Für die Differenzierung bzw. Aktivierung der Osteoklasten bedarf es die Anwesenheit verschiedener Wachstumsfaktoren wie z.B. *macrophagen colony-stimulating factor* (M-CSF), *receptor activator of nuclear factor kappa-B*

ligand (RANKL) und Hormonen wie z.B. Cholecalciferol (Vitamin D₃) und Parathormon (PTH) [10, 71].

- **Osteoblasten**

Aus mesenchymalen Stammzellen entstehen unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *bone morphogenetic protein* (BMP) und Transkriptionsfaktoren wie *runx-related transcription factor 2* (RUNX2) Präosteoblasten, die sich dann in der Gegenwart von Hormonen wie z.B. Parathormon (PTH), Somatotropes Hormon (STH), Östrogene und weiteren Wachstumsfaktoren z.B. *insulin-like growth factor* (IGF) zu differenzierten Osteoblasten entwickeln [19, 20]. Aktive Osteoblasten synthetisieren und sezernieren die unmineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) und sind damit knochenbildende Zellen. Allerdings ist der Mechanismus, der zur Mineralisation des Osteoids führt, bis jetzt noch nicht abschließend verstanden. Weiterhin sind die Osteoblasten auch an der Regulation des Knochenabbaus beteiligt, sie sezernieren z.B. RANKL und Osteoprotegerin (OPG), zwei Proteine, die die Osteoklastendifferenzierung beeinflussen. Nach Abschluss der Knochenneubildung induziert ein Teil der Osteoblasten den programmierten Zelltod durch Apoptose. Einige Zellen lagern sich als ruhende Osteoblasten der neuen Knochenoberfläche an und werden somit zu Knochenbelegzellen, während andere Zellen durch die neue Knochenmatrix eingeschlossen werden und sich zu Osteozyten differenzieren [33, 116].

- **Osteozyten**

Osteozyten liegen in der Knochenmatrix eingebettet in sogenannten Lakunen, die durch ein System aus Kanälen untereinander verbunden sind. In diesen als *canaliculi* bezeichneten Gängen befinden sich zytoplasmatische Fortsätze der Osteozyten, die über *gap junctions* die Osteozyten untereinander und mit den Zellen des Endosts und Periosts verbinden [19, 62]. Über dieses Netzwerk können die Zellen einerseits ernährt werden und andererseits über Abgabe von Botenstoffen den Zustand und die Reparaturbedürftigkeit der Matrix nach außen übermitteln [15, 54].

In der Differenzierung der Osteoblasten in Osteozyten spielt das Protein Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP1) eine wichtige Rolle. Untersuchungen an *Dmp1*-defizienten Mäusen konnten Anomalien in der Osteozytenmorphologie und eine

Störung des gesamten Osteozytennetzwerkes zeigen. Die Abwesenheit von DMP1 hatte einen hypomineralisierten Knochenphänotyp (Osteomalazie) zur Folge [23].

- **Knochenbelegzellen**

Einen weiteren Zelltyp stellen die Knochenbelegzellen dar, diese sind flache, längliche Zellen mit wenigen Zellorganellen. Sie bedecken die periostealen und endostealen Knochenoberflächen, die sich gerade nicht in Umbau befinden [76]. Über *gap junctions* stehen auch sie untereinander und mit den Osteozyten aus dem Inneren des Knochens in Verbindung. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass sie sowohl an der Ernährung der Osteozyten als auch der Steuerung des Zu- und Abstroms von Kalzium und Phosphat in bzw. aus dem Knochen beteiligt sind [103]. Ihre Funktionen sind jedoch noch nicht abschließend geklärt.

1.1.2 Knochenmatrix

Die Extrazellulärmatrix (EZM) des Knochens lässt sich in organische und anorganische Bestandteile unterscheiden. Die Biegefestigkeit des Knochens, also die Vereinigung der Materialeigenschaften von Druck- und Zugfestigkeit, beruht auf der Zusammensetzung dieser besonderen interzellulären Substanz [66]. Der anorganische Anteil besteht aus verschiedenen Salzen, darunter Calciumphosphat, Magnesiumphosphat und Calciumcarbonat. Diese organisieren sich zu einem hexagonalen Kristallsystem (Hydroxylapatit), das ca. 95% der anorganischen EZM ausmacht und dem Knochen seine Härte und Festigkeit verleiht [26]. Für die Elastizität des Knochens sind die organischen, aus Proteinen bestehenden Anteile (Osteoid), verantwortlich. Das Osteoid besteht zum größten Teil aus Kollagen Typ I und zu einem weitaus kleineren Teil aus nicht-kollagenen Proteinen und Glykoproteinen wie z.B. Osteocalcin und Osteopontin. Sie nehmen möglicherweise Einfluss auf die Zellbindungen, die Knochenmineralisation und binden Kalzium und Hydroxylapatit-Kristalle [123, 124].

1.2 Knochenbildung und Knochenumbau

1.2.1 Arten der Ossifikation

Grundsätzlich unterscheidet man zwei verschiedene Arten der Knochenbildung (Ossifikation): die chondrale und die desmale Ossifikation. Man findet die unterschiedlichen Formen der Ossifikation sowohl während der Entstehung eines neuen Knochens (Osteogenese) und dessen Wachstums, als auch bei der Knochenheilung (Frakturheilung) [66, 91].

Verdichten sich in sogenannten Ossifikationszentren Mesenchymzellen, um sich zu Osteoblasten zu differenzieren, nennt man den Vorgang desmale Ossifikation. Diese Osteoblasten beginnen mit der Produktion von Osteoid, welches im Laufe der Zeit mineralisiert wird. Durch appositionelles Wachstum verbinden sich die so entstandenen „Knocheninseln“ zu einem gemeinsamen Knochen. Auf diese Art und Weise entstehen Plattenknochen also z.B. Skapula, Schädel- und Gesichtsknochen [17].

Bei der chondralen Ossifikation erfolgt die Verknöcherung über eine knorpelige Matrice. Das heißt, dass Chondrozyten zunächst ein knorpeliges Grundgerüst modellieren. Dieses wird dann in einem zweiten Schritt entweder durch einsprossende Gefäße, Osteoklasten und Osteoblasten in Knochen umgewandelt (enchondrale Ossifikation), oder es differenzieren sich im außen anliegendem Perichondrium Osteoblasten und bilden eine knöcherne Manschette (perichondrale Ossifikation). Dieser Vorgang lässt sich nicht nur in der Entwicklung der menschlichen Röhrenknochen wiederfinden, sondern auch während ihres Längenwachstums in den Epiphysenfugen beobachten [17, 66].

Beide Mechanismen der Ossifikation führen zunächst zur Bildung von Geflecht- bzw. Faserknochen. Auf Grund der Anordnung der Kollagenfibrillen und der Osteozyten grenzt man davon den wesentlich stabileren Lamellenknochen ab. Dieser zeigt eine charakteristische Architektur aus parallel verlaufenden Kollagenfibrillen, die sich mit Lagen von Osteozyten abwechseln. Diese lamelläre Anordnung erfolgt um einen zentralen Gefäßkanal und wird als Osteon (Havers-System) bezeichnet. Nachdem die Neubildung von Geflechtknochen abgeschlossen ist, wird dieser in Lamellenknochen umgewandelt [91, 103].

1.2.2 Knochenremodeling

Der Vorgang des Knochenumbaus wird *Remodeling* genannt. Dieser Umbauprozess findet zeitlebens statt, nicht nur während der Entstehung des Knochens oder während der Frakturheilung. So werden jährlich ca. 28% der Spongiosa und 4% der Kompakta des Knochens umgebaut, was einem durchschnittlichen Umbau von 10% der gesamten Skeletts pro Jahr entspricht [17, 66]. Dieser ständige Vorgang ist einerseits essenziell um eine Materialermüdung durch Reparatur von Mikroschäden zu verhindern und ermöglicht andererseits dem Knochen, sich an funktionelle Belastungen anzupassen und rasch verfügbares Kalzium in großen Mengen für den Organismus bereitzuhalten [20, 73].

Damit die Abbau- und Aufbauprozesse zeitlich und örtlich koordiniert werden können, organisieren sich Osteoblasten und Osteoklasten zu sogenannten *basic multicellular units* (BMU) [103]. An der Spitze dieser BMU bauen Osteoklasten bestehende Knochensubstanz ab. Ihnen folgen Osteoblasten, die eine erste Osteoidlamelle an die neue Knochenoberfläche niederlegen. Die nächste Gruppe Osteoblasten sezerniert die zweite Lamelle, wodurch die erste Osteoblastengeneration eingemauert wird und sich zu Osteozyten entwickelt. Auf diese Art und Weise entsteht die typische Schichtung bzw. Lamellenform des reifen Knochens [71, 74, 88].

1.3 Proteine der Mineralisation

Die Mineralisation des Knochens geschieht durch die Anreicherung von anorganischen Hydroxylapatit-Kristallen (HA) in der organischen, extrazellulären Matrix (Osteoid). Dieser Mineralisationsprozess wird durch Matrixvesikel der Osteoblasten oder der hypertrophen Chondrozyten eingeleitet und reguliert. Sie reichern Phosphat und Kalzium für die Formation von Hydroxylapatit an und geben dieses durch Auflösung ihrer Membran an die EZM ab [125]. Eine wichtige Rolle in der Regulation der physiologischen und pathologischen Gewebsmineralisation spielt dabei die Phosphat-Pyrophosphat-Homöostase. Während hohe Konzentrationen von Phosphat eine Grundvoraussetzung für die Mineralisation sind, konnten Untersuchungen zeigen, dass Pyrophosphat einen hemmenden Einfluss auf die Bildung von Kalziumphosphat und damit auf die Mineralisation hat [35]. Verschiedenste Proteine modulieren das Phosphat-Pyrophosphat-Verhältnis wie z.B. *tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNSALP), *adenosin triphosphatase* (ATPase), *adenosine monophosphatase* (AMPase), *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* (NPP1), *phosphatase orphan 1* (PHOSPHO1), *sodium-dependent phosphate symporter* (PiT), Annexin, *progressive ankylosis protein* (ANK) und Osteopontin (OPN) [125].

- **Alkalische Phosphatase**

Die *tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNSALP) wird beim Menschen durch das Gen *ALPL* kodiert und ist eine membrangebundene Phosphomonoesterase. Man findet sie auf der Oberfläche von Osteoblasten und Osteozyten sowie ihrer Matrixvesikel. Mutationen im humanen *ALPL*-Gen verursachen die Erkrankung Hypophosphatasie, die durch Hypomineralisation gekennzeichnet ist und bei Kindern Rachitis bzw. bei Erwachsenen Osteomalazie auslöst. Diese Mutationen gehen einher mit einer erhöhten extrazellulären Pyrophosphat (PPi)-Konzentration [6]. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine verminderte PPi-Konzentration verbunden mit spontanen HA-Einlagerungen im Kollagen-Gerüst bei transgener Überexpression von *Alpl* im Mausmodell [35].

- **NPP1**

Für die Produktion von PPi ist hauptsächlich die Familie der *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase* zuständig, wobei das Gen *Enpp1* die Isoform NPP1 kodiert, die auch auf Matrixvesikeln (MV) exprimiert wird. Ebenso wie TNSALP ist auch NPP1 auf der Oberfläche von Osteoblasten und Osteozyten zu finden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NPP1 die Differenzierung von Osteoblasten und deren Genexpression beeinflusst [67, 68]. Beim Menschen verursacht eine *Loss-of-function*-Mutation des NPP1-Proteins Erkrankungen mit ektopter Ossifikation wie z.B. bei der autosomal rezessiven hypophosphatämischen Rachitis Typ 2, der Ossifikation des Ligamentum longitudinale posterius und der generalisierten infantilen arteriellen Kalzifikation [104].

- **ANK**

Im Gegensatz zu TNSALP und NPP1 ist das ANK-Protein, das durch das Gen *progressive ankylosis (Ank)* kodiert wird, nicht in der Membran der MV zu finden sondern nur in Osteoblasten und Osteozyten. ANK bildet einen transmembranen Kanal, welcher es den Pyrophosphatmolekülen erlaubt aus dem Zytoplasma durch die Zellmembran nach außen zu gelangen [36]. Verschiedene Punktmutationen im humanen ANK-Gen (*ANKH*) werden in Verbindung mit der Erkrankung Craniometaphysäre Dysplasie gebracht. Diese Erkrankung wird durch kraniofaziale Anomalien wie z.B. Hyperostose und Sklerose der Schädelknochen sowie Verdickungen der Gesichtsschädelknochen gekennzeichnet [98]. Andere Mutationen im *ANKH*-Gen führen zur familiären Chondrokalzinose, auch bekannt unter dem Namen Pseudogicht oder Kalziumpyrophosphat-Kristallarthropathie. Diese zuletzt genannte Erkrankung wird durch Ablagerungen von Kalziumpyrophosphat-Kristallen im Gelenkknorpel charakterisiert und weist im Gegensatz zur Craniometaphysären Dysplasie keinerlei Störungen der Schädel- oder Röhrenknochen auf [89]. Dabei scheint ANK jedoch nicht nur als reiner Transporter für PPi zu dienen, sondern auch auf anderen Wegen Einfluss auf die Regulation der Knochenentstehung und das *Remodeling* zu nehmen. So lassen verschiedene Studien an *Knock-out*- und *Knock-in*-Mäusen auf eine direkte Beeinflussung der Osteoblastogenese und Osteoklastogenese schließen [52, 125].

- **PiT1**

Der Natrium/Phosphat-Kotransporter *sodium-dependent phosphate transporter 1* (PiT1) wird durch das Gen *Slc20a1* kodiert. Er nützt den natürlichen Na⁺-Gradienten der Zellmembran, um im Gegenzug den Einstrom von Phosphat (Pi) durch die Membran zu ermöglichen. Man geht davon aus, dass PiT1 eine wichtige Rolle in der Gefäß- und Knochenphysiologie spielt. So konnte in Untersuchungen die verstärkte Expression von *Slc20a1* (mRNA) in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden. Dies führte zu der Annahme, dass PiT1 eine potentielle Rolle in der Gewebsmineralisation spielt. So wurde PiT1 auch in Zusammenhang mit der Kalzifikation von Gefäßen gebracht. Hierbei scheint der Transporter entscheidend Einfluss auf die Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen in osteoblastenähnliche Zellen zu nehmen [25, 55]. In Experimenten an Ratten mit transgener Überexpression von *Slc20a1* konnte zwar ein Einfluss auf den Kalzium-Phosphat-Stoffwechsel festgestellt werden, jedoch nicht auf die Mineralisation der Knochenmatrix oder die Skelettentwicklung [8, 111]. *Slc20a1*-Knockout-Mäuse sterben noch in der embryonalen Phase, sodass hierdurch keine weiteren Rückschlüsse auf die Funktion des Transporters möglich sind [55].

- **DMP1**

Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) gehört zur Familie der *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins* (SIBLING) und scheint auf unterschiedliche Weise an der Mineralisation beteiligt zu sein. Einerseits wirkt DMP1 intrazellulär als Transkriptionsfaktor, andererseits wird es im phosphorylierten Zustand in den extrazellulären Raum transportiert und fördert dort die Entstehung von HA-Kristallen [83]. In transgenen Mäusen mit *Dmp1*-Überexpression zeigte sich ein Knochenphänotyp mit höherer Mineralisationsdichte und insgesamt verbesserten kortikalen Knocheneigenschaften [7]. Auch in der Knochenheilung scheint DMP1 eine wichtige Rolle zu spielen, so konnte während der Frakturheilung eine starke Expression von *Dmp1* (mRNA) im Bereich des Kallus in Präosteozyten und Osteozyten nachgewiesen werden [117].

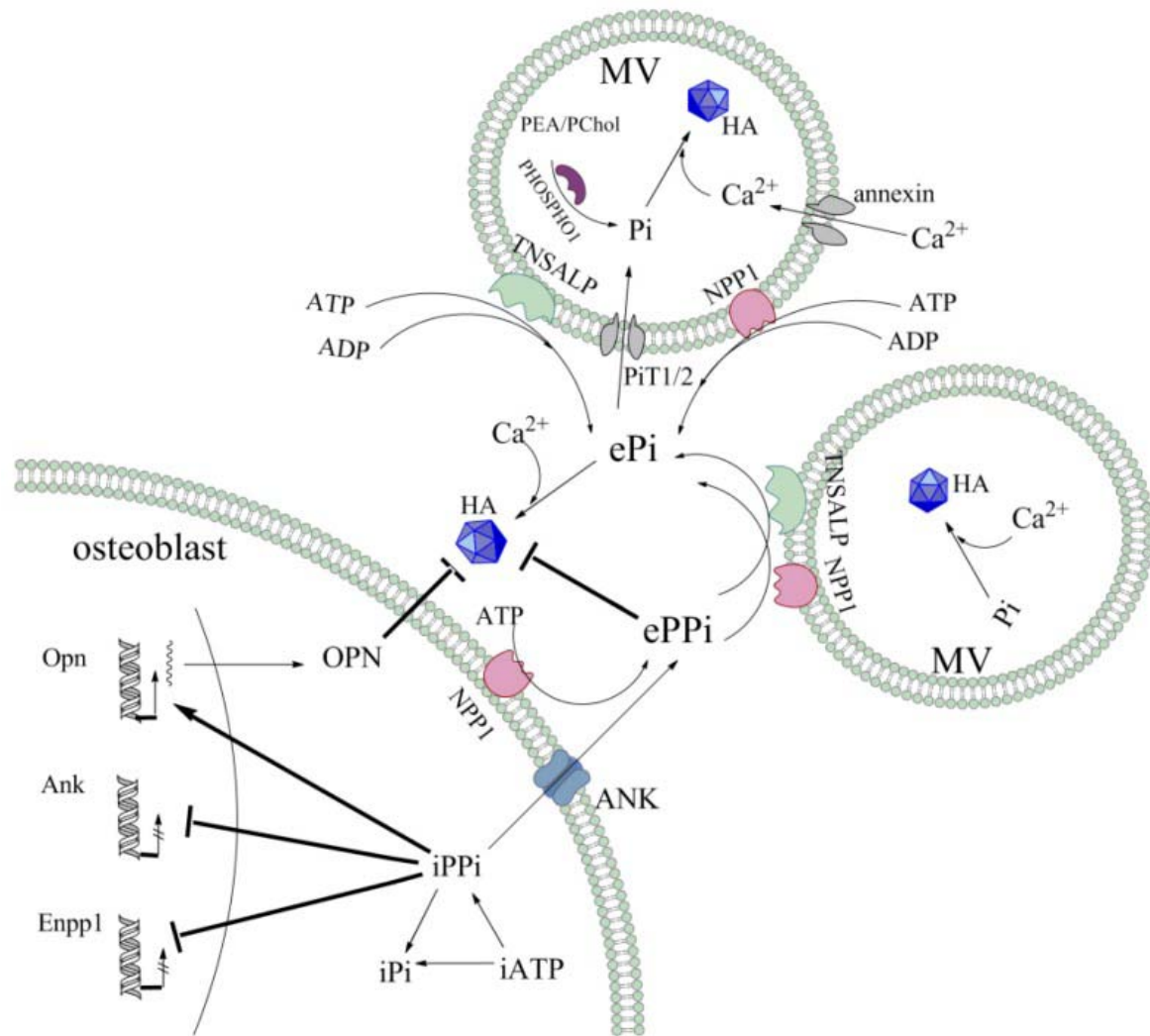


Abbildung 1: Schematische Abbildung der Regulierung des Phosphat-Pyrophosphat (Pi/PPi)-Spiegels in der Matrixvesikel (MV)-abhängigen Mineralisation
 Hydroxylapatit (HA) formt sich aus Phosphat (Pi) und Kalzium (Ca²⁺) im Inneren von MV oder in ihrer unmittelbaren Umgebung. Dazu steigt der Pi-Spiegel von MV durch die Aktivität des Pi-Transporters PiT1/2 oder durch die Hydrolyse der Phosphomonoester Phosphoethanolamin (PEA) bzw. Cholinphosphat (PChol) mit Hilfe der *phosphatase orphan 1* (PHOSPHO1). Der nötige Ca²⁺-Einstrom erfolgt über den Annexin-Kanal der MV. Extrazelluläres Pyrophosphat hemmt die Bildung von HA. Der Pool des extrazellulären Pyrophosphats (ePPi) stammt aus der ATP-Katalyse der *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* (NPP1) und aus dem Export von intrazellulärem PPi durch den *progressive ankylosis protein transporter* (ANK) der Osteoblasten und Chondrozyten. Die *tissue non-specific alkaline phosphatase* (TNSALP) und die NPP1 der MV können dieses ePPi wieder in ePi umwandeln. In Osteoblasten und Chondrozyten gibt es verschiedene Rückkopplungsmechanismen. So inhibiert intrazelluläres PPi (iPPi), das durch Phosphatase-Aktivität aus intrazellulärem Adenosin-5'-Triphosphat (iATP) entstand, die Expression von *Ank* und *Enpp1*, die für ANK bzw. NPP1 kodieren. Auf der anderen Seite verstärkt dieses iPPi die Expression von Osteopontin (*Opn*), einem Inhibitor von extrazellulärem HA in der Umgebung von Osteoblasten und Chondrozyten [125].

1.4 Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein einzigartiger, physiologischer Reparaturmechanismus, der eine narbenlose Regeneration und Wiederherstellung der ursprünglichen Eigenschaften ermöglicht [22]. Im Allgemeinen lassen sich dabei viele zelluläre und biochemische Aspekte der Skelettentwicklung und des Wachstums wiederfinden [108].

1.4.1 Ablauf der Frakturheilung

Der Ablauf der Reparatur hängt von den mechanischen Bedingungen im Frakturspalt und der anatomischen Lokalisation der Fraktur ab. So unterscheidet man die metaphysäre bzw. epiphysäre Knochenheilung und die diaphysäre Knochenheilung, weiterhin unterteilt man in primäre und sekundäre Frakturheilung [16].

Die primäre oder direkte Frakturheilung bedarf einer äußerst stabilen Frakturversorgung mit minimaler interfragmentärer Beweglichkeit und Spaltgröße, Bedingungen wie sie nur selten im natürlichen Frakturheilungsverlauf zu finden sind. Sind diese Voraussetzungen gegeben, z.B. durch Druckplattenosteosynthese, kommt es zur Ausbildung sogenannter *cutting cones*, bestehend aus Osteoklasten, die den Frakturspalt überqueren und dabei einen länglichen Kanal generieren. Es folgen Osteoblasten, die den entstandenen Hohlraum wieder mit lamellären Knochengewebe auffüllen und so die knöcherne Verbindung der Fraktarenden wiederherstellen [44, 75]. Dieser Vorgang findet bei Spaltgrößen kleiner 0,1 mm statt und wird Kontaktheilung genannt. Bei Spaltgrößen bis zu 0,8 mm findet man die sogenannte Spaltheilung, bei der lamellärer Knochen zunächst senkrecht zur Knochenachse generiert wird und dadurch den Frakturspalt überbrückt. Es bedarf demnach einen zweiten Schritt, in dem durch *Remodeling* die achsengerechte Lamellenstruktur wieder hergestellt wird [72].

In den meisten Fällen der osteosynthetischen Frakturversorgung wie z.B. beim Fixateur externe verbleibt jedoch ein deutlich größerer Frakturspalt. Dieser ist mit einer erhöhten interfragmentären Beweglichkeit verbunden, die zur Ausbildung eines temporären Knochenkallus führt [16]. Diese Art der Frakturheilung wird sekundäre oder indirekte Frakturheilung genannt, sie stellt eine Kombination aus desmaler und enchondraler Ossifikation dar. Man beobachtet die enchondrale

Knochenentstehung vorwiegend in direkt an den Frakturspalt angrenzenden Bereichen mit geringer Stabilität. Die desmale Ossifikation hingegen ist vor allem in den proximalen und distalen Randbereichen der Frakturzone zu finden, wo sie zur direkten Ausbildung von knöchernem („harten“) Kallus führt [21]. Im Verlauf der sekundären Knochenheilung lassen sich im Wesentlichen vier überlappende Phasen der Frakturheilung unterscheiden: die Phase der Inflammation, die Phase des knorpeligen („weichen“) Kallus, die Phase des knöchernen („harten“) Kallus und die Phase des *Remodelings* [108].

Nach einer Fraktur kommt es zur Ausbildung eines Frakturhämatoms und dadurch zur Einwanderung von Entzündungszellen. Die ersten dieser einwandernden Zellen sind segmentkernige, neutrophile Granulozyten, die in den ersten Stunden nach der Fraktur durch das untergehende Gewebe angelockt werden [14]. Neutrophile Granulozyten haben nur eine kurze Lebensdauer von ca. einem Tag, sind jedoch für die Sekretion von wichtigen Chemokinen und damit für die Rekrutierung weiterer Zellen, z.B. von Makrophagen, verantwortlich. Makrophagen sind für den weiteren Verlauf der Frakturheilung entscheidend. So sind die auf der endostalen und periostalen Knochenoberfläche befindlichen Gewebsmakrophagen essentiell für die desmale Ossifikation, während einwandernde Makrophagen an den Vorgängen der enchondralen Ossifikation beteiligt sind [2]. Im Gegensatz zu Makrophagen, die sich positiv auf den Heilungsverlauf auswirken, wird angenommen, dass neutrophile Granulozyten, sollten sie zu lange in der Frakturzone vorhanden sein, einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung haben [95, 96]. Nach einer Phase der Rekrutierung und Aktivität der Makrophagen beginnt die Migration von Lymphozyten und damit die Reaktion der spezifischen bzw. adaptiven Immunabwehr [16]. Während dieser inflammatorischen Phase sorgen die Entzündungszellen für den Beginn einer Reparaturkaskade durch Aktivierung angiogener Prozesse und die Rekrutierung bzw. Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen.

Im Laufe der nächsten Phase kommt es zu einer starken Neubildung von Knorpel und damit zur Ausbildung eines periostalen, „weichen“ Kallus. Das Knorpelgewebe stabilisiert zunächst den Frakturspalt und liefert ein Gerüst für neues Knochengewebe. Die im Zentrum des wachsenden Kallus befindlichen hypertrophen Chondrozyten induzieren im weiteren Verlauf ihren apoptotischen Zelltod und werden durch einwandernde Gewebsteoklasten und Osteoblasten

ersetzt. Damit beginnt die Umwandlung des Knorpelgewebes in trabekulären Knochen, wodurch der sogenannte „harte“ Kallus entsteht. Mit der Zeit wird so eine vollständige, knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes erreicht. Die letzte Phase der Frakturheilung, das sogenannte *Remodeling*, sorgt schließlich durch die Reduktion des periostalen Kallus und die Umwandlung des Geflechtknochens in Lamellenknochen für die Wiederherstellung der ursprünglichen anatomischen Struktur des Knochens [29].

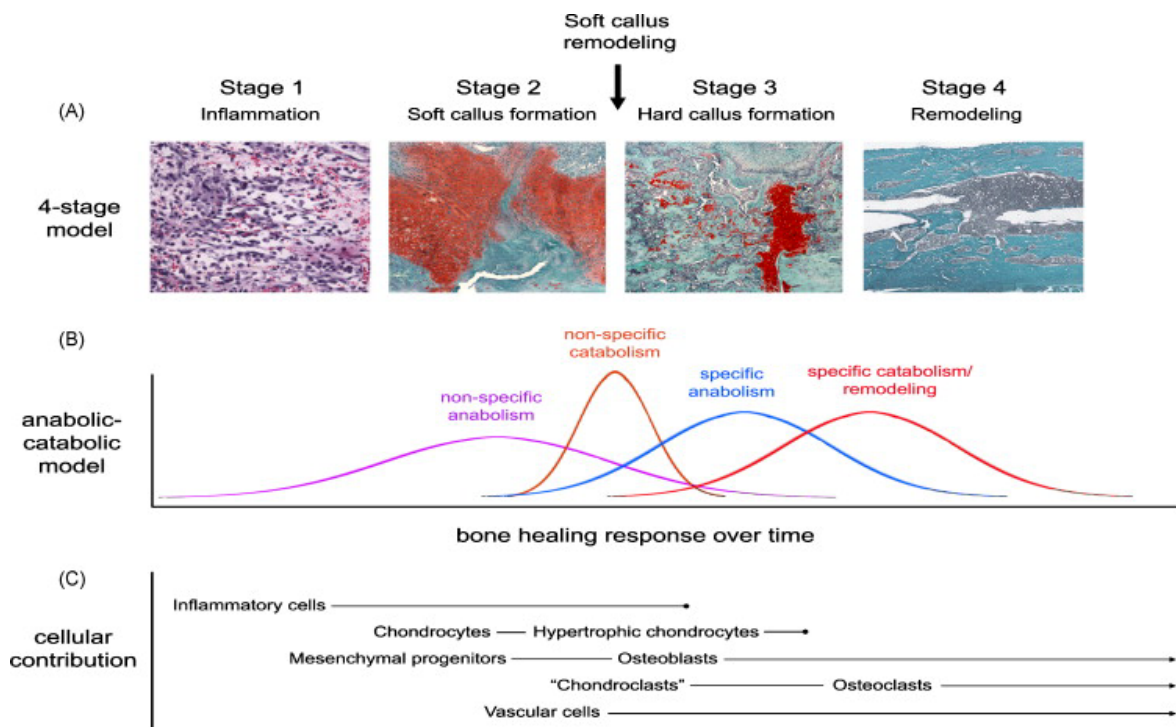


Abbildung 2: Verschiedene Modelle des Frakturheilungsverlaufs

(A) Beispielhafte histologische Abbildungen der vier Phasen des Frakturheilungsverlaufs. Zwischen der Phase 2 und 3 findet das *Remodeling* des weichen Kallus statt (*soft callus remodeling*). (B) Anabolismus/Katabolismus-Modell der Frakturheilung beschreibt die stattfindenden Umbauprozesse im Verlauf der Heilung, wobei das Konzept des nicht-spezifischen Anabolismus (*non-specific anabolism*) die frühe Wundreparatur und der nicht-spezifische Katabolismus (*non-specific catabolism*) das *Remodeling* des weichen Kallus beschreibt. (C) Schematische Übersicht im zeitlichen Verlauf der am Prozess der Frakturheilung beteiligten Zellen [108].

1.4.2 Regulation der Frakturheilung

Die biologischen Prozesse während der Frakturheilungsphasen werden durch verschiedene Signalmoleküle streng reguliert. Diese lassen sich in drei große Gruppen unterteilen: pro-inflammatorische Zytokine, Mitglieder der *transforming growth factor beta* (TGF β)-Familie und angiogene Faktoren. Die drei unterschiedlichen Gruppen regulieren die überlappenden, biologischen Prozesse und das Zusammenspiel verschiedener Zellpopulationen.

- **Pro-inflammatorische Zytokine**

Man geht davon aus, dass die inflammatorischen Zytokine die Reparaturkaskade der Frakturheilung starten. So werden vor allem Interleukin-1 und -6 (IL-1 und IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) in der Initialphase der Frakturheilung von Zellen mesenchymalen Ursprungs, Entzündungszellen und Makrophagen sezerniert. Durch sie werden weitere inflammatorische Zellen rekrutiert, die die Synthese von extrazellulärer Matrix anregen und die Angiogenese stimulieren [53]. Die Expression von Interleukinen und TNF α ist in den ersten 24 Stunden nach Trauma am höchsten und nimmt dann schnell bis auf kaum nachweisbare Werte am dritten Tag nach Fraktur ab [13, 53]. Während die Expression von IL-1 und IL-6 erst wieder in der Phase des *Remodelings* der Frakturheilung ansteigt, beobachtet man einen Anstieg von TNF α am Ende der enchondralen Ossifikation, in Verbindung mit der Resorption von mineralisiertem Knorpel [28]. Dabei stimuliert TNF α die Osteoklasten und induziert die Apoptose von hypertrophen Chondrozyten. Die Abwesenheit von TNF α führt folglich zu einer Verzögerung der Resorption von mineralisiertem Knorpelgewebe und verhindert damit die Entstehung von neuem Knochen [28]. Die Expression von RANKL und OPG, zwei Mitglieder der TNF-Familie, sowie die Expression von M-CSF, allesamt Schlüsselfaktoren der Osteoklastogenese, steigt vor allem in der inflammatorischen Phase und während der Resorption von mineralisiertem Knorpel an. In der Phase des *Remodelings* treten wieder vermehrt IL-1 und IL-6 auf, während man keinen Anstieg von RANKL, OPG und M-CSF beobachtet [29].

- ***Transforming growth factor beta* (TGF β)**

Zu der TGF β -Familie gehören unter anderem *bone morphogenetic protein* (BMP), *growth differentiation factor* (GDF) und TGF β selbst. Alle drei Mitglieder der TGF β -Familie sind an der Frakturheilung beteiligt und werden kurz nach dem Trauma von Thrombozyten-Granula und später von Osteoblasten und Chondrozyten freigesetzt. Bestimmte Faktoren dieser Familie wie BMP2 bis BMP8, GDF1, -5, -8 und -10 und TGF β 1-3 unterstützen verschiedene Phasen der desmalen und enchondralen Ossifikation während der Knochenheilung [13].

BMP werden von mesenchymalen Zellen, Osteoblasten und Chondrozyten produziert, um eine Reihe von Prozessen zur Unterstützung der Knorpel- und Knochenbildung zu starten. Dazu gehören zelluläre Prozesse wie z.B.

Chemotaxis, mesenchymale Zelldifferenzierung, Angiogenese und Synthese von EZM [97]. In Studien zur murinen Knochenheilung konnten maximale Expressionwerte von *Bmp2* (mRNA) bereits in den ersten 24 Stunden nach Trauma festgestellt werden. Man geht daher davon aus, dass BMP2 für die Einleitung der Frakturheilung relevant ist. BMP3, -4, -7 und -8 zeigen einen begrenzten Expressionszeitraum zwischen Tag 14 und Tag 21 der Frakturheilung, wenn die Resorption von verkalktem Knorpel und die Rekrutierung von Osteoblasten am stärksten aktiv ist. BMP5 und -6 wiederum werden zwischen Tag 3 und 21 nach Trauma konstant exprimiert, was zu der Annahme führt, dass sie für die Regulation der desmalen und enchondralen Ossifikation gleichermaßen wichtig sind [13]. Verschiedene Studien kamen zu dem Ergebnis, dass BMP2, -6 und -9 die stärksten Aktivatoren der mesenchymalen Differenzierung zu Osteoblasten sind, während die restlichen BMP für die Reifung der osteoblastären Vorläufer verantwortlich sind [12].

Auch TGF β unterstützt die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten und induziert darüber hinaus die Expression von extrazellulären Matrixproteinen. So wird beispielsweise der Zeitpunkt der maximalen Expression von TGF β 2 und -3 an Tag 7 der murinen Frakturheilung beobachtet, wenn die Synthese von Kollagen Typ 2 am höchsten ist. Daher wird davon ausgegangen, dass TGF β 2 und -3 essentiell für die Knorpelentstehung sind [3, 13].

- **Angiogene Faktoren**

Eine optimale Knochenheilung hängt von einer adäquaten Vaskularisation ab, weshalb es einer Entwicklung neuer Gefäße bzw. der Ausbildung von Kollateralen bedarf. Die Angiogenese wird hauptsächlich durch zwei verschiedene Signalwege reguliert: der *vascular endothelia growth factor* (VEGF)-abhängige Signalweg und der Angiopoetin-abhängige Signalweg. Man geht davon aus, dass beide Signalwege in der Frakturheilung eine Rolle spielen [1]. Angiopoetine, darunter Angiopoetine -1 und -2, sind sogenannte *vascular morphogenetic proteins*, die an der Ausbildung von Kollateralen bestehenden Gefäße beteiligt sind. Beispielsweise sind Angiopoetine vor allem in der initialen Phase der Frakturheilung verstärkt nachweisbar und damit für das Einwachsen neuer Gefäße in das Periost verantwortlich [58].

Auch VEGF wird eine Schlüsselrolle in der Gefäßregeneration zugesprochen [51]. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Osteoblasten als auch hypertrophe Chondrozyten große Mengen an VEGF während der Frakturheilung [27]. Dabei unterstützt VEGF nicht nur die Neo-Angiogenese durch Aggregation und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen, sondern auch die Ausbildung von Kollateralgefäßen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von exogenem VEGF die Frakturheilung zusätzlich fördert, während die Blockierung von VEGF-Rezeptoren die Gefäßbildung behindert und dadurch zu einer verzögerten Frakturheilung führt [1, 51].

Tabelle 1: Zusammenfassung der Phasen der Frakturheilung und der begleitenden Expression von Signalmolekülen [1].

Phase	Biologische Prozesse	Signalmoleküle und ihrer Funktion
Inflammation	Hämatom	IL-1, -6 und TNF α starten u.a. die Reparaturkaskade.
	Inflammation	TGF β , PDGF und BMP2 initiieren die Kallusbildung.
	Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen	GDF8-Expression nur am Tag 1 lässt eine Regulation der Zellproliferation vermuten.
Knorpelbildung und periostale Reaktion	Chondrogenese und Beginn der enchondralen Ossifikation	TGF β 2, - β 3 und GDF5 sind beteiligt an Chondrogenese und enchondraler Ossifikation.
	Zellproliferation der desmalen Ossifikation	BMP5 und -6 steigen an.
	Einwachsen von Gefäßen und Neo-Angiogenese	Angiopoetin und VEGF stimulieren das Einwachsen von Gefäßen in das Periost.
Knorpelresorption und primäre Knochenentstehung	Osteogenese	TNF α steigt in Verbindung mit der Resorption mineralisierten Knorpels an. Dies unterstützt die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und leitet die Apoptose hypertropher Chondrozyten ein.
	Rekrutierung von Knochenzellen und Entstehung von Geflechtknochen	RANKL und M-CSF steigen in Verbindung mit der Resorption mineralisierten Knorpels an.
	Apoptose von Chondrozyten und Matrixproteolyse; Rekrutierung von Osteoklasten und Knorpelresorption	BMP3, -4, -7 und -8 steigen mit der Resorption von verkalktem Knorpel an. Sie unterstützen die Rekrutierung von osteoblastären Vorstufen. BMP5 und -6 werden konstant hoch exprimiert und lassen auf die Regulation sowohl desmalen als auch enchondraler Ossifikation schließen.
	Neo-Angiogenese	VEGFs sind hochreguliert und stimulieren die Neo-Angiogenese.
Sekundäre Knochenentstehung und <i>Remodeling</i>	Knochen <i>remodeling</i> in Verbindung mit Osteoblastenaktivität	IL-1 und -6 steigen in Verbindung mit dem Knochen <i>remodeling</i> an, während RANKL und M-CSF verminderte Expressionswerte zeigen.
	Entstehung von Knochenmark	Verminderte Expression der Mitglieder der TGF β -Familie.

1.5 Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren

1.5.1 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Pleiotrophin und Midkine

Die Familie der Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren besteht aus den beiden Proteinen Midkine (MDK) und Pleiotrophin (PTN). Sie zeigen untereinander eine 45-prozentige Homologie in der Aminosäuresequenz und unterscheiden sich von anderen Wachstumsfaktoren [119]. Das Midkine-Gen (*Mdk*) wurde erstmals 1988 bei Untersuchungen an embryonalen Teratokarzinomzellen beschrieben [48]. Das humane *MDK*-Gen zeigt eine 87-prozentige Übereinstimmung der Aminosäureabfolge mit der murinen Form [119]. Die Expression von *Mdk* ist ab Tag 7 der Embryogenese in fast allen Geweben nachweisbar. Während der mittleren Gestationsperiode der Embryonalentwicklung verstärkt sich die Expression in bestimmten Geweben, wie z.B. dem Gehirn, der Wirbelsäule, den Extremitäten, dem Epithelgewebe der Lunge, des Verdauungssystems und der Niere. Ab Tag 15 der Embryogenese findet sich eine signifikante *Mdk*-Expression schließlich nur noch im Nierengewebe. Diese Beobachtung führte zu dem Namen Midkine, der eine Zusammensetzung der Begriffe „*mid*gestation“ und „*kidney*“ darstellt [45, 79].

PTN, auch bekannt als *heparin-binding growth-associated molecule* (HB-GAM), wurde 1989 aus dem sich entwickelnden Gehirn von Ratten isoliert [94]. Die stärkste Expression von *Ptn* findet man im Gegensatz zu *Mdk* zum Zeitpunkt der Geburt vor allem im Knochengewebe und im Nervengewebe des Gehirns [46].

In adulten Organismus ist die Expression beider Wachstumsfaktoren im Regelfall sehr stark limitiert. Eine verstärkte Expression beider Wachstumsfaktoren findet man während der Reparatur geschädigter Gewebe, im Verlauf entzündlicher Reaktionen sowie in der Tumorbilogie verschiedenster Organe. Dabei unterstützen diese Wachstumsfaktoren unterschiedliche Funktionen, wie z.B. die Migration von neuronalen, osteoblastären und inflammatorischen Zellen, sowie das Wachstum von Fibroblasten, Keratinozyten und verschiedenen Tumorzellen [41, 80, 94].

1.5.2 Einfluss auf den Knochenstoffwechsel von Midkine und Pleiotrophin

In verschiedenen Untersuchungen konnte der Einfluss von *Ptn* auf den Knochen nachgewiesen werden. So zeigten *in-vitro* Experimente eine starke Expression von *Ptn* in murinen, osteoblastären MC3T3-E1-Zellen sowie einen positiven Effekt

von PTN auf die Migration, Differenzierung und Knochenmatrixsynthese von Osteoblasten [113, 122]. *In-vivo* Untersuchungen an transgenen Mäusen mit *Ptn*-Überexpression zeigten ein verbessertes Längenwachstum der Knochen in der frühen Phase der Knochenentwicklung [60, 113]. Jedoch zeigten Langzeitstudien, dass der zunächst positive Einfluss von PTN auf den Knochenphänotyp mit zunehmendem Alter wieder verschwindet. So stellte sich der Knochen in älteren, transgenen Mäusen zunehmend poröser und brüchiger da. Weiterhin ließ sich eine beeinträchtigte Frakturheilung bei *Ptn*-Überexpression nachweisen. Die transgenen Mäuse mit *Ptn*-Überexpression zeigten im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen eine verzögerte Kallusbildung sowie ein verzögertes Knochenremodeling während der Frakturheilung [60]. Lehmann et al. konnten bei *in-vivo* Untersuchungen am *Ptn*-defizienten Mausmodell keine signifikanten Veränderungen in der Entwicklung des Skeletts feststellen. So zeigten sich keine Veränderungen der Organisation der Wachstumsplatten, des trabekulären und kortikalen Knochenremodelings sowie der biomechanischen Eigenschaften. Ebenfalls unverändert stellte sich die Morphologie und Anzahl der Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten dar. In einer anschließend durchgeführten Genexpressionsanalyse an primären Osteoblasten, zeigten Lehmann et al. eine zunehmende Expression von *Mdk* jedoch ohne nennenswerte Erhöhung von PTN während der Differenzierung. Daher wurde vermutet, dass *Ptn in-vivo* keine Schlüsselrolle in der Knochenphysiologie spielt bzw. der Mangel an PTN durch andere Faktoren, z.B. MDK ausgeglichen wird [59]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Imai et al. die ebenso ein *Ptn*-defizientes Mausmodell untersuchten und zunächst eine normale Knochenentwicklung der *Ptn*-defizienten Tiere beobachteten. Mit zunehmendem Alter zeigten die defizienten Mäuse jedoch eine Wachstumsverzögerung, sowie eine geringere Knochendichte und schlechtere biomechanische Eigenschaften der langen Röhrenknochen, nicht aber der Wirbelkörper. Darüber hinaus zeigten die defizienten Tiere keinerlei Knochenmasseverlust durch Immobilisation. In-vitro konnten Imai et al. schließlich eine signifikante Zunahme der *Ptn*-Expression von Osteozyten durch mechanische Stimulation feststellen [43].

In anderen Studien konnte nachgewiesen werden, dass MDK Einfluss auf die Knochenheilung nimmt. Beispielsweise zeigte die Arbeitsgruppe Ohta et al. 1999 einen positiven Einfluss von MDK auf die Chondrogenese. So konnte gezeigt

werden, dass Chondrozyten und mesenchymalen Stammzellen *Mdk* während der frühen Frakturheilung exprimieren. Weiterhin konnten Ohta et al. *in-vitro* durch Transfektion von chondrogenen Zellen mit *Mdk* (cDNA) eine verstärkte Produktion von Glycosaminoglykanen, Aggrecan und Typ 2 Kollagen induzieren [86]. Weitere *in-vitro* Experimente stellten auch einen Einfluss von MDK auf Osteoblasten fest. So ließ sich im Laufe der Differenzierung von primären Osteoblasten aus Mauskalvarien eine Zunahme der *Mdk*-Expression feststellen. Zudem zeigte sich, dass nach Stimulation der primären Osteoblasten durch rekombinantes MDK der Transkriptionsfaktor c-Fos und der Proliferationsmarker H4 vermindert exprimiert wird [126]. Weiterhin konnte *in-vitro* eine erhöhte Aktivität der gewebsunspezifischen Alkalischen Phosphatase sowie eine erniedrigte Expression von *Ank* und *Enpp1* in *Mdk*-defizienten Osteoblasten gezeigt werden [84]. Schließlich konnten Neunaber et al. durch *in-vivo* Experimente am *Mdk*-defizienten Mausmodell bei 12 und 18 Monate alten Mäusen ein erhöhtes trabekuläres Knochenvolumen, sowie eine größere *mineralizing surface* und eine gesteigerte *bone formation rate* feststellen. Außerdem zeigten sich diese transgenen Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtypen resistent gegenüber Ovariectomie-bedingten Knochenmasseverlust [84]. In einem weiteren *in-vivo* Experiment an *Mdk*-defizienten Mäusen konnten Liedert et al. ein verstärktes, kortikales Knochenwachstum nach mechanischer Stimulation nachweisen [61].

Die Ergebnisse aus diesen Studien am Mausmodell lassen zusammengefasst auf einen anabolen Effekt der *Mdk*-Defizienz schließen. Inwieweit sich die Frakturheilung *Mdk*-defizienter Mäuse von Wildtyp-Mäusen unterscheidet wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

1.5.3 Rezeptoren und Signalwege von Midkine und ihr Einfluss auf den Knochenstoffwechsel

Es konnten bereits mehrere, mögliche Rezeptoren für MDK beschrieben werden. So wäre es denkbar, dass abhängig vom zellulären Kontext unterschiedliche Rezeptoren exprimiert werden und dadurch die vielfältigen Wirkungen des Wachstumsfaktors vermittelt werden [47].

- **ALK**

Anaplastic lymphoma kinase (ALK) ist eine Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase und bekannt aus der Tumorgenese des anaplastischen Riesenzelllymphoms oder des

nicht-kleinzelligem Lungenkarzinoms. ALK wird als möglicher Rezeptor von MDK angesehen, so zeigt MDK eine hohe Affinität zu ALK (K_D 100 pM) [110]. Es scheint auch gewisse funktionelle Gemeinsamkeiten von ALK und MDK zu geben, so bedingen beide Faktoren eine verbesserte Proliferation von unreifen sympathischen Nervenfasern. Umgekehrt lässt sich durch *Knockdown* von *Alk* oder *Mdk* die Proliferation der Nervenfasern unterdrücken [99]. Aktivierung von ALK, z.B. durch agonistische Antikörper, resultiert in einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie Erk oder Akt. Diese Phosphorylierung von ALK konnte jedoch für MDK bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden [47].

- **PTPR ζ und Integrine**

Ein weiterer MDK-Rezeptor ist der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ ζ (PTPR ζ), ein Chondroitinsulfat-Proteoglykan mit intrazellulärer Tyrosinphosphatase-Domäne [69]. Die Chondroitinsulfat-Ketten scheinen eine wichtige Rolle für die Interaktion von MDK und PTPR ζ zu spielen. So führt das Entfernen der Chondroitinsulfat-Ketten von PTPR ζ zum Verlust der hohen Bindungsaffinität zwischen MDK und PTPR ζ . MDK scheint zusammen mit PTPR ζ die Migration von osteoblastären Zellen zu verstärken. So lässt sich die MDK-induzierte Migration durch Gabe von Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitoren unterdrücken [92]. Weiterhin beteiligt an der durch MDK-induzierten osteoblastären Zellmigration sind die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 6\beta 1$, die ebenfalls eine hohe Affinität zu MDK aufweisen. So konnte z. B. durch Gabe von Anti- $\alpha 4$ - und Anti- $\alpha 5$ -Antikörpern die MDK-abhängige Zellmigration blockiert werden [78].

Weiterhin scheint PTPR ζ den negativen Einfluss von MDK auf Zielgene des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs zu vermitteln. Dies zeigten Liedert et al. durch *in-vitro* Experimente an osteoblastären Zellen [61]. Einige Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs spielen eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel indem sie z.B. die Proliferation von Osteoblasten fördern.

- **LRP-Familie**

MDK bindet zudem auch an verschiedene Mitglieder der *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)-Familie [77]. Proteine der LRP-Familie wiederum sind als Co-Rezeptoren im β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg bekannt und damit auch an der Regulation des Knochenremodelings beteiligt. Dabei agieren vor allem LRP5 und LRP6 zusammen mit Molekülen der *Frizzled*-Familie als

Oberflächenrezeptoren des Wnt-Signalwegs [30, 85]. Welchen besonderen Einfluss diese Moleküle auf den Knochenstoffwechsel nehmen können, zeigen bekannte Mutationen im *Lrp5* Gen, die sowohl eine Osteoporose als auch eine erhöhten Knochenmasse zur Folge haben können [9, 37].

Neben den Möglichkeiten über Oberflächenrezeptoren und ihren Signalkaskaden indirekt in die Expression von Zielgenen einzugreifen, könnte MDK durch Endozytose auch direkt im Zellkern Einfluss auf die Expression von Zielgenen nehmen. Beispielsweise wurde MDK als Ligand von LRP1 identifiziert (K_D 3,5 nM) und scheint an der Endozytose von MDK beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass in LRP1-defizienten Zellen keine Endozytose von MDK stattfindet. Weiterhin konnte diese fehlende Funktion durch Transfektion mit LRP1-aktiven Vektoren wiederhergestellt werden [109]. Es wird angenommen, dass ein Teil des MDK im Zytoplasma der Endosomen an Nucleolin bindet und schließlich mit dessen Hilfe in den Zellkern gelangt [112]. Im Nukleus scheint die MDK-Aktivität, u.a. durch anti-apoptotische Signale, entscheidend an der Steuerung des Zellüberlebens beteiligt zu sein [106, 109].

- **Syndecan-Familie**

Auch Mitglieder der Syndecan-Familie wurden als möglicher Rezeptoren für MDK beschrieben. Hier scheint die Bindung von MDK an Syndecan-1 und Syndecan-3 für die neuronale Entwicklung während der embryonalen Phase von Bedeutung zu sein [82].

- **Signaltransduktion**

Die Bindung von MDK an die unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren könnte modulierend auf verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden wirken. So könnten die zytoplasmatischen Tyrosinkinasedomänen der Rezeptoren zytoplasmatische Proteine wie Paxillin oder Src-Kinasen aktivieren und damit die Tyrosinphosphorylierung weiterer Signalmoleküle fördern. Weitere intrazelluläre Signalwege, die durch MDK induziert werden, könnten über die Familie der MAP-Kinasen oder Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) vermittelt werden. PI3K wiederum spielt zusammen mit der Proteinkinase B (AKT) eine Schlüsselrolle im PI3K/AKT-Signalweg, der eine wichtige Rolle in der Proliferation und im Überleben von Zellen zu spielen scheint [80]. Auch *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β) und β -Catenin, zwei Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, könnten so durch

das Zusammenspiel von MDK mit z.B. PTPR ζ oder LRP beeinflusst werden. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wiederum beeinflusst die Regulation der Chondrogenese, Osteoblastogenese und Osteoklastogenese [30]. Damit ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg entscheidend an der Steuerung der Knochenhomöostase und der Regeneration des Knochengewebes nach einer Fraktur beteiligt [4, 11]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass MDK durch Endozytose direkt Einfluss auf die Expression von Zielgenen nehmen könnte. Dies könnte wie oben beschrieben durch Proteine wie z.B. LRP1 vermittelt werden.

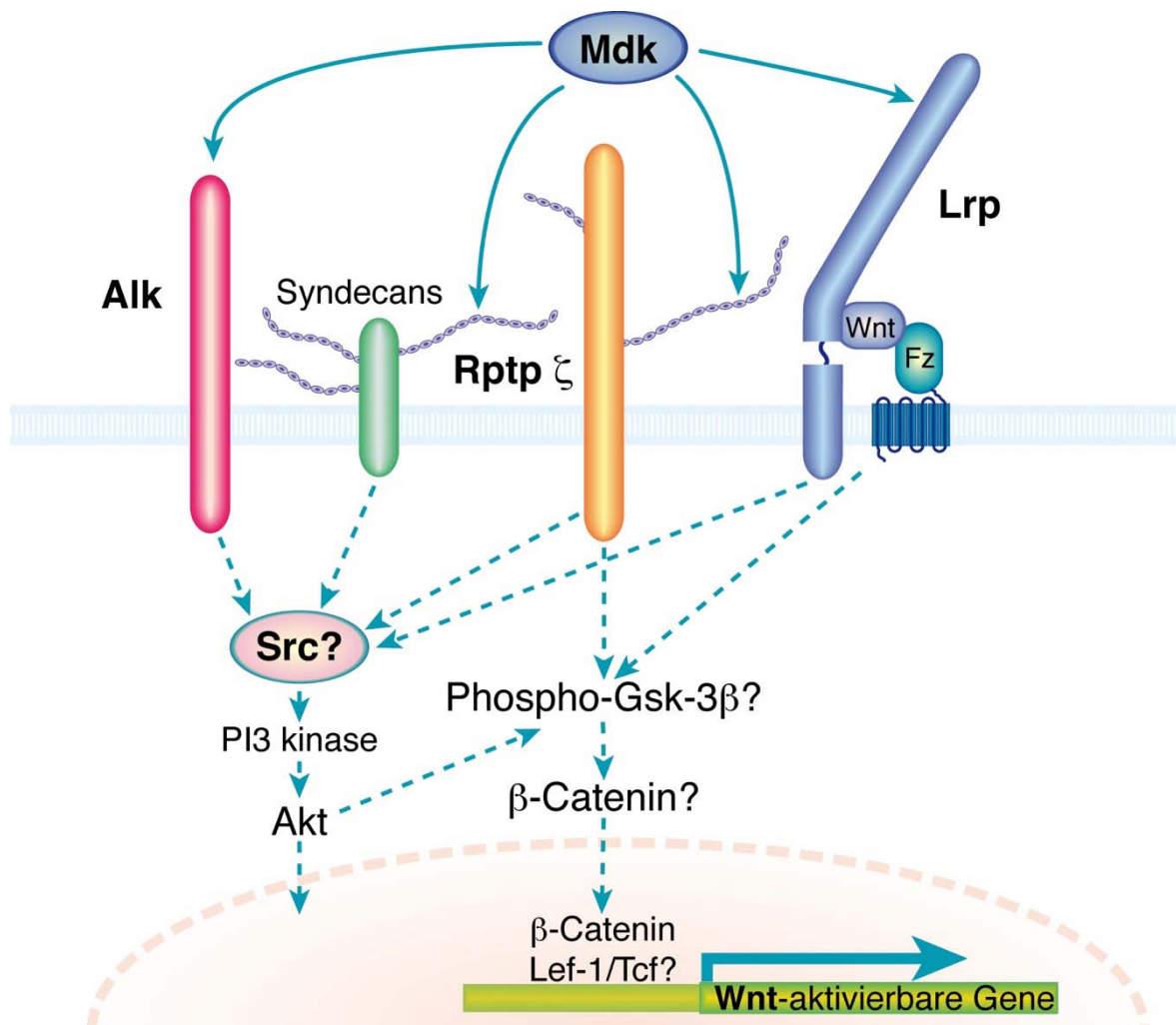


Abbildung 3: Midkine-Rezeptoren und ihre möglichen intrazellulären Signalwege
Midkine (Mdk) bindet an Oberflächenrezeptoren wie z.B. *anaplastic lymphoma kinase* (Alk), Mitglieder der Syndecan-Familie, Rezeptor Protein-Tyrosin-Phosphatase Typ ζ (Rptp ζ) oder *low-density lipoprotein receptor-related protein* (Lrp). Bei der Bindung von Mdk an einige dieser Rezeptormoleküle spielen Chondroitinsulfatketten eine wichtige Rolle. Lrp und Molekülen der *Frizzled*-Familie (Fz) bilden zusammen mit Wnt-Liganden (Wnt) einen Rezeptorkomplex, der wahrscheinlich einen modulierenden Einfluss auf die *glycogen synthase kinase 3 β* (Gsk-3 β) und β -Catenin hat. β -Catenin aktiviert zusammen mit Transkriptionsfaktoren wie z.B. Lef-1 oder Tcf, Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Außerdem können die zytosolischen Domänen der Transmembranrezeptoren z.B. auch Src-Kinasen (Src) aktivieren, die wiederum andere intrazelluläre Signalmoleküle wie die Phosphoinosid-3-Kinase (PI3 kinase) oder die Proteinkinase B (Akt) aktivieren [126]

1.6 Ziele der Arbeit

Die an der Regulation der Frakturheilung beteiligten Moleküle und Signalwege sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Insbesondere die Rolle des Wachstumsfaktors *Mdk* im Zusammenhang mit der Frakturheilung und seines Einflusses auf die Mineralisation des Knochens ist unbekannt.

Um diesen Einfluss von *Mdk* auf die Frakturheilung besser verstehen zu können führten wir *in-vivo* Analysen mit Hilfe eines speziellen Frakturmodells an *Mdk*-defizienten Mäusen durch. Hierzu wurden die Femura von *Mdk*-defizienten Mäusen und von Wildtyp-Mäusen durch ein standardisiertes Operationsverfahren osteotomiert. Anschließend wurde, mit Hilfe immunhistologischer Verfahren, die Expression von *Mdk*, Mineralisationsproteinen und Entzündungszellen während unterschiedlicher Phasen der Frakturheilung untersucht.

Darüber hinaus wurde in *in-vitro* Experimenten die Expression möglicher *Mdk*-Rezeptoren im Verlauf der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen untersucht. Weiterhin analysierten wir den Einfluss von rekombinantem MDK auf die Genexpression der mesenchymalen Zellen.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat die *Mdk*-Defizienz *in-vivo* auf die Expression von Mineralisationsproteinen während der Frakturheilung?
2. Welchen Einfluss hat die *Mdk*-Defizienz *in-vivo* auf die inflammatorischen Zellen im Kallus während der frühen Phase der Frakturheilung?
3. Welche potentiellen Rezeptorproteine von Midkine werden während der Differenzierung mesenchymaler Zellen exprimiert?
4. Welchen Einfluss hat MDK *in-vitro* auf die Expression von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs in mesenchymalen Zellen?

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Liste der Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
AEC Single Solution	Zytomed Systems	Berlin
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe
Aquatex	Merck KGaA	Darmstadt
Ascorbatphosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim
Augengel Vidisic	Dr. Mann Pharma	Berlin
Basenpaarleiter	Gibco BRL	Karlsruhe
BSA	SERVA GmbH	Heidelberg
Clindamycin	Pfizer Pharma	Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Essigsäure	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol	VWR International, LLC	Radnor, USA
FCS	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Formalin	Merck KGaA,	Darmstadt
GelStar	Lonza Group AG	Basel, Schweiz
H ₂ O ₂	Otto Fischar GmbH	Saarbrücken
Hämatoxylin	Merck KGaA	Darmstadt
Isofluran	Abbott Biotechnology GmbH	Wiesbaden
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Methanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Midkine	CYT-26805	Dianova, Hamburg

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
NaCl	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
<i>Omniscript RT Kit</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
Paraplast Plus	McCormick Scientific	St. Louis, USA
PBS-Puffer	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Austria
Penicillin/Streptomycin	Biochrom	Berlin
<i>QIAshredder Kit</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>RLT-Puffer</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>RNase-Free DNase Kit</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen	Venlo, Niederlande
Salzsäure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Streptavidin-HRP-Conjugate	Zytomed Systems	Berlin
Tramalhydrochlorid	Gruenenthal	Aachen
Tri-Natriumcitrat	Merck KGaA,	Darmstadt
TRIS-Base	USB Corporation	Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich	Steinheim
Xylen	VWR International, LLC	Radnor, USA
Zitronensäuremonohydrat	Merck KGaA	Darmstadt
α -MEM	Biochrom	Berlin
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim

Tabelle 3: Liste der Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
1x TAE	40 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0
1x TBST	6,1 g TRIS-Base, 8,8 g NaCl, 10 ml Triton-X100 in 1 L H ₂ O; pH 7,6
Alkalifarbstofflösung	110 µl Natriumnitrit-Lösung, 110 µl Diazoniumsalz-Lösung, 110 µl Naphtol-Alkali-Lösung in 5 ml H ₂ O
Antigen-Blocklösung	1% BSA in PBS-Puffer, 0,1% Triton X-100
Antikörper-Verdünnungspuffer	1% BSA in PBS-Puffer, 0,1% Triton X-100
Fixiernatriumlösung	5 g Natriumthiosulfat-Pentahydrat in 100 ml H ₂ O
Lysepuffer	RLT-Puffer, 1% 2-Mercaptoethanol
Peroxidase-Blocklösung	10 ml 30% H ₂ O ₂ , 90 ml 100% Methanol
Pyrogalluslösung	1 g Pyrogallol in 100 ml H ₂ O
Silbernitratlösung	5 g AgNO ₃ in 100 ml H ₂ O
Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung A	1 g Hämatoxylin in 100 ml 95% Ethanol
Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung B	4 ml 29% Eisenchlorid-Lösung, 1 ml 1 M Salzsäure in 95 ml H ₂ O
Zitrat-Aceton-Formaldehyd-Lösung	5 ml 0,1 M Natriumcitrat, 13 ml Propanon, 1,6 ml 37% Propanon
Zitratpuffer	5,4 ml 0,1 M Zitronensäuremonohydrat, 24,6 ml 0,1 M Tri-Natriumcitrat in 300 ml H ₂ O; pH 6,0

Tabelle 4: Liste der Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Differenzierungsmedium	α -MEM, 10% FCS (hitzeinaktiviert), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 0,2 mM Ascorbatphosphat, 10 mM β -Glycerolphosphat, 10nM Vitamin D
Serumreduziertes Medium	α -MEM, 0,25% BSA, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 0,2 mM Ascorbatphosphat, 10 mM β -Glycerophosphat, 10nM Vitamin D
Zellkultur Medium	α -MEM, 10% FCS (hitzeinaktiviert), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 10nM Vitamin D

2.2 Geräte und Software

Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte und Software

Bezeichnung	Modell/Version	Hersteller/Vertrieb, Ort
Brutschrank	Heracell 150i	ThermoSientific, USA
Einbettkassetten	M490-6	Simport, Kanada
Einbettstation	MPS/C+P	Slee medical GmbH, Mainz
Elektrophoresekammer	Horizon 11-14	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Fettstift	Dako Pen S2002	Dako, Dänemark
Fixateur externe	MouseExFix	RISystem, Schweiz
Geldokumentations- Programm	Fusion-Capt	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Geldokumentationsgerät	Fusion SL	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
Gewebeeinbettautomat	MTM I/II	Slee medical GmbH, Mainz
Gigli-Säge	0.22 mm	RISystem, Schweiz
Inhalationsarbeitsplatz	IAS-38	Foehr Medical Instruments GmbH, Seeheim
Kamera Mikroskop	DFC420C	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Literaturprogramm	EndNote X6	Thomson Reuters
Magnetrührer	RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	DMI6000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mini-Schanz	MountingPin 0.45 mm	RISystem, Schweiz
Objektträger	SuperFrost-Plus	VWR International, USA

Bezeichnung	Modell/Version	Hersteller/Vertrieb, Ort
OneStep Plus System	Ver. 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR Platten	96 Well	Greiner
Photospektrometer	NanoQuant M200	Teca, Schweiz
Rotationsmikrotom	CUT 6062	Slee medical GmbH, Mainz
RT-PCR Analysesoftware	LinRegPCR Ver. 2012.1	Heart Failure Research Center (HFRC), Niederlande
Schüttler	HS 501 D	IKA Labortechnik, Staufen
Software Mikroskop	LAS 4.1	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Software Photospektrometer	i-Control	Teca, Schweiz
Statistikprogramm	SPSS 19	IBM
<i>Thermocycler</i>	T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Waage	440-47	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wärmeschrank	III 30	Memmert, Schwabach
Wasserbad	WB 24	Medax Nagel KG, Kiel

2.3 Antikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Bestellnr.	Hersteller, Ort
Anti-Maus F4/80-Antikörper	ab6640	AbD Serotec, Kidlington, UK
AP-konjugiertes Anti-Ratten IgG	STAR131A	AbD Serotec, Raleigh USA
Biotinyliertes Anti-Ziegen IgG	SC-3854	Santa Cruz Biotechnology, Dallas USA
Monoklonaler Anti-Maus Ly6G(<i>Purified</i>)-Antikörper	127601	BioLegend, San Diego USA
Polyklonaler Anti-Maus DMP1- Antikörper	AF-4386	R&D Systems, Minneapolis USA
Polyklonaler Anti-Maus ENPP1- Antikörper	SAB2500355	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Polyklonaler Anti-Maus MDK- Antikörper	SC-1398	Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas USA
Ratten IgG	405401	BioLegend, San Diego USA
Ziegen IgG	I-9140	Sigma-Aldrich, St. Louis USA

2.4 Frakturheilungsstudie

2.4.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 24 weibliche Versuchstiere des Stammes C57BL/6 im Alter von 36 Wochen eingesetzt. Dabei handelte es sich um Wildtyp-Tiere (*Mdk*^{+/+}) und *Mdk*-defiziente Tiere (*Mdk*^{-/-}). Sowohl die *Mdk*-defizienten Tiere als auch die Wildtyp-Tiere wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Amling des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf zur Verfügung gestellt [81].

Die Mäuse wurden in klimatisierten und fensterlosen Räumen des Tierforschungszentrums der Universität Ulm in Käfigen (Grundfläche von 370 cm²) in Gruppen von bis zu 5 Tieren gehalten. Die Tiere unterlagen einem Tag-Nacht-Rhythmus von 14 zu 10 Stunden und erhielten Standardfutter und Wasser ad libitum. Der Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Registernummer 1079).

2.4.2 Aufbau der Frakturheilungsstudie

Um den Einfluss von Midkine auf den Frakturheilungsverlauf durch histologische und immunhistologische Methoden untersuchen zu können, wurden jeweils 12 *Mdk*^{+/+} und 12 *Mdk*^{-/-} Tiere in einem standardisierten Operationsverfahren im Bereich der rechten Femurdiaphyse osteotomiert und anschließend mit einem Fixateur externe versorgt.

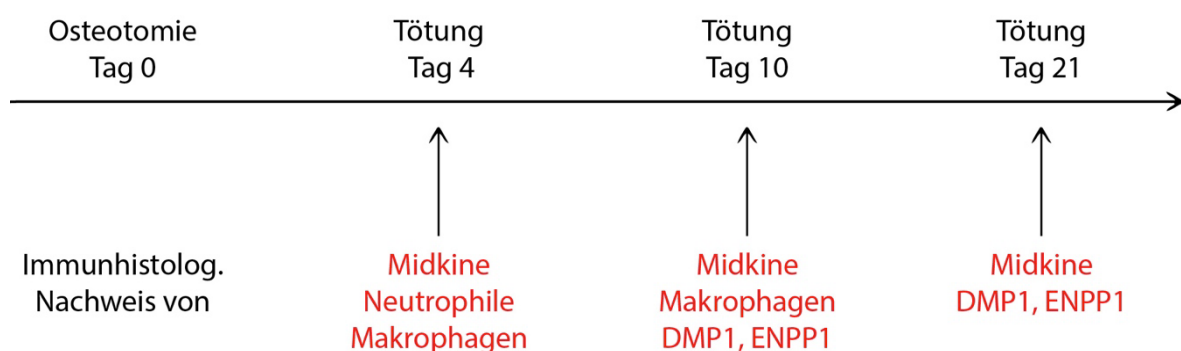


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Angegeben sind die immunhistologischen Färbungen an den Untersuchungszeitpunkten Tag 4, 10 und 21. Es erfolgte der Nachweis von Midkine, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Dentin-Matrix-Protein 1 (DMP1) und *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* (ENPP1).

Zur Darstellung des zeitlichen Verlaufes der Frakturheilung in beiden Versuchsgruppen wurden drei verschiedene Tötungszeitpunkte (Tag 4, Tag 10 und Tag 21) nach dem Operationstag (Tag 0) gewählt. An diesen drei

Untersuchungszeitpunkten wurden histologische Schnitte des Frakturspaltes angefertigt und anschließend mit Hilfe immunhistologischer Färbungen hinsichtlich der Expression verschiedener Proteine untersucht.

Tabelle 7: Liste aller Versuchstiere und ihrer Aufteilung auf die Versuchsgruppen und den Tötungszeitpunkt

Tötungstag	Genotyp	Versuchstier-Nr.	Anzahl
Tag 4	<i>Mdk</i> ^{+/+}	1067, 1093, 1107, 1108	4
	<i>Mdk</i> ^{-/-}	1102, 1103, 1190, 1191	4
Tag 10	<i>Mdk</i> ^{+/+}	1705, 9346, 9347, 9348	4
	<i>Mdk</i> ^{-/-}	994, 1019, 1020, 1021	4
Tag 21	<i>Mdk</i> ^{+/+}	11426, 11428, 1056, 1118	4
	<i>Mdk</i> ^{-/-}	1037, 1039, 1040, 1074	4
Anzahl der Versuchstiere insgesamt			24

2.4.3 Operationsverfahren

Die Schnittosteotomie und die Frakturversorgung durch Fixateur externe wurde in den beiden Versuchsgruppen in einem standardisierten Operationsverfahren durchgeführt [40, 102].

Hierfür bekamen alle Tiere zur Schmerz- und Stressreduktion während der perioperativen Phase jeweils zwei Tage vor der geplanten Operation bis drei Tage nach der Operation 12.55 mg Tramadol in eine 500 ml fassende Trinkwasserflasche gemischt.

Zur Durchführung der Anästhesie der Versuchstiere diente ein Inhalationsanästhesie-Arbeitsplatz für kleine Labortiere. Dabei kam das Inhalationsanästhetikum Isofluran zum Einsatz. Zur Einleitung der Narkose erhielten die Versuchstiere initial ein Isofluran-Sauerstoff-Gasmischung mit 5% bis 6% Isofluran in einer nach außen abgeschlossenen Inhalationskammer. Anschließend wurde die Narkose bis zum Ende der Operation mit reduzierter Isoflurankonzentration von 1,5% bis 2% über eine Inhalationsmaske fortgesetzt. Zur Beurteilung der korrekten Narkosetiefe wurde vor Beginn der Operation der

Reflexstatus (Zwischenzehen- und Schwanzreflex) der Maus überprüft. Um während der Anästhesiedauer ein Austrocknen der Kornea des Versuchstieres zu verhindern, wurden je ein Tropfen Augengel aufgetragen und die Augen anschließend mit Klebestreifen verschlossen. Zur Prophylaxe operationsbedingter Wundinfektionen erhielt das Versuchstier anschließend eine subkutane Injektion von 500 µl 0,9% NaCl-Lösung versetzt mit 45 mg/kg Clindamycin.

Nach der Rasur und der Desinfektion des Operationsgebietes erfolgte der Hautschnitt über dem Femur und die Durchtrennung der Fascia lata in Längsrichtung. Daraufhin wurde das Femur zwischen Musculus gluteus superficialis und Musculus biceps femoris stumpf präpariert. An dieser Stelle folgte die Anbringung des Fixateur externe mit einer axialen Steifigkeit von 3.0 N/mm in kranio-lateraler Ausrichtung mit Hilfe von vier Mini-Schanz Schrauben, wobei die ersten beiden Schrauben distal des Trochanter tertius eingebracht wurden. Nach Überprüfung der Stabilität des Fixateur externe und dessen korrekter Position, erfolgte die Osteotomie zwischen dem zweiten und dritten *Pin* mit Hilfe einer 0,45 mm Gigli-Säge. Nach Spülung des Operationsgebietes erfolgte der subkutane Wundverschluss mittels fortlaufender Naht mit Vicryl 5-0 und anschließendem Hautverschluss durch Einzelknopfnah mit Resolon 5-0. Nachdem die Wunde inklusive des Fixateur externe sorgfältig verbunden wurde konnte die Anästhesie beendet werden.

2.4.4 Postoperativer Verlauf und Tötung

Nach Beendigung der Narkose war es den Tieren bereits möglich die operierte Gliedmaße uneingeschränkt zu belasten. Postinterventionell erhielten die Versuchstiere zur Analgesie bis zum dritten postoperativen Tag Tramadol über ihr Trinkwasser. Darüber hinaus wurde eine tägliche Wundkontrolle bzw. Wundpflege zur Vermeidung postoperativer Wundinfektionen durchgeführt.

Entsprechend dem Versuchsprotokoll erfolgte die Tötung der Tiere in der Kohlendioxidkammer am jeweils festgelegten Versuchstag.

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Aufbereitung histologischer Proben

Nach der Tötung der Versuchstiere zum jeweils festgesetzten Zeitpunkt erfolgte die Exartikulation des frakturierten Femurs aus dem Hüft- und Kniegelenk. Anschließend folgte lediglich eine grobe Präparation des umliegenden Weichteilgewebes um den Frakturkallus möglichst nicht zu zerstören. Um eine gute Fixierung bzw. Einbettung des Präparates zu garantieren, wurde der Markraum proximal der ersten Schraube mittels Osteotomie eröffnet.

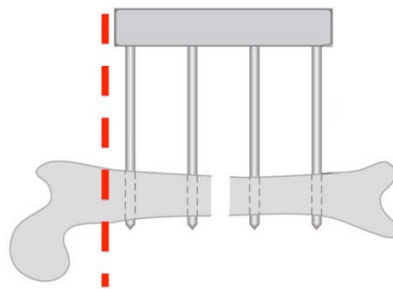


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Eröffnung des Markraumes der Präparate Femur mit Fixateur externe und Osteotomiespalt. Links: proximaler Femur mit Markierung (rotgestrichelte Linie) der Osteotomie zur Eröffnung des Markraumes. Rechts: distaler Femur. Die Abbildung wurde übernommen aus einer internen Anleitung des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm.

Anschließend folgte eine Fixierung der Präparate in 3,5% Formaldehyd über mindestens 24 Stunden. Dieser Schritt wurde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Vor der Entkalkung der Knochenpräparate, schloss sich ein zweistündiger Waschschriff unter Leitungswasser zur Entfernung des Fixiermediums an. Danach folgte die Entkalkung in 20% EDTA-Lösung über ca. 10 bis 12 Tage.

2.5.2 Einbettung und Schneiden der Präparate

Direkt im Anschluss an die Entkalkung und einem weiteren Waschschriff unter Leitungswasser folgte die Entwässerung der Knochenpräparate in aufsteigender Alkoholreihe mit Hilfe eines Gewebeeinbettautomaten.

Tabelle 8: Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe des Gewebeeinbettautomaten

Lösung	Zeit	Anzahl der Inkubationen
40% reiner Alkohol	45 Minuten	1 x
70% reiner Alkohol	50 Minuten	1 x
70% reiner Alkohol	60 Minuten	1 x
80% reiner Alkohol	60 Minuten	1 x
90% reiner Alkohol	60 Minuten	1 x
100% reiner Alkohol	60 Minuten	1 x
100% reiner Alkohol	60 Minuten	1 x
Xylol (rein)	90 Minuten	1 x
Xylol (rein)	90 Minuten	1 x
Paraffin 60°C	60 Minuten	4 x

Anschließend wurden die Präparate in definierter Ausrichtung in Einbettkassetten gelegt und in 60°C warmen Paraffin eingebettet. Auf einer Kälteplatte kühlten die Paraffinblöcke schließlich aus. Nach Aushärtung des Paraffins konnten die Proben mit Hilfe eines manuellen Rotationsmikrotoms geschnitten werden. Hierfür wurde der jeweilige Block eingespannt und das Paraffin in groben Schichten entfernt, bis sich der Knochen in einer Ebene darstellte. Nun konnten etwa 4 µm bis 6 µm dicke Gewebsschichten gewonnen werden und in ein vorgewärmtes Wasserbad gegeben werden. Mit einem Pinsel konnten die Präparate schließlich auf einen vorher beschrifteten Objektträger aufgezo-gen werden und anschließend zum besseren Anhaften der Präparate auf der Objektträgeroberfläche angetrocknet werden. Dabei wurde jeweils zwei Gewebeschnitte auf einen Objektträger aufgebracht um später während der immunhistologischen Färbungen eine Negativkontrolle mitführen zu können. Danach folgte eine staubfreie Lagerung der Schnittpräparate in Objektträgerkästen bis zur weiteren Aufarbeitung.

2.5.3 Entparaffinieren der Gewebsschnitte

Um eine immunhistologische Färbung zu ermöglichen, mussten die Schnittpräparate zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Hierfür mussten die Objektträger für 10 bis 20 min bei ca. 60°C im Wärmeschrank erhitzt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden.

Tabelle 9: Protokoll der absteigenden Alkoholreihe zur Rehydrierung der histologischen Schnittpräparate

Reagenz	Zeit	Anzahl der Inkubationen
Xylol	5 min	2 x
100% Ethanol	5 min	2 x
90% Ethanol	5 min	2 x
70% Ethanol	5 min	1 x
A. dest.	5 min	2 x

Nach dem Entparaffinieren konnten die Schnittpräparate histologisch bzw. immunhistochemisch gefärbt werden.

2.5.4 Safranin O Färbung

Die Safranin O Färbung eignet sich besonders zur Identifikation von Knorpelgeweben in histologischen Schnitten, da sich durch diese Methode proteoglykanhaltige Gewebe orange bis rot färben, während sich Zellzytoplasma grünlich und Zellkerne schwarz darstellen.

Nach erfolgter Entparaffinierung der Schnitte wurden diese für 4 min mit Weigerts Eisenhämatoxilin-Lösung (Lösung A und B 1:1) gefärbt. Daraufhin wurden sie kurz in angesäuertem Alkohol (1 ml 1 M HCl in 100 ml 70% Alkohol) inkubiert und anschließend für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Es folgte ein 3 min Färbeschritt mit 0,02% Echtgrün und einer 30 sec Spülung mit 1% Essigsäure. Nach 5 min in 0,1% Safranin O-Lösung konnten die gefärbten Objektträger schließlich eingedeckelt werden.

2.5.5 Immunhistologische Färbungen

Zur Detektion der Proteine MDK, DMP-1 und ENPP-1 sowie der Makrophagen wurde jeweils das gleiche Protokoll verwendet. Zum Einsatz kam eine sogenannte

ABC-Methode mit biotinyliertem sekundärem Antikörper. An diesen mit Biotin markierten Antikörper bindet schließlich ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex, der die Umsetzung eines Farbstoffes katalysiert.

Um eine Hintergrundfärbung der Schnitte durch die endogene Peroxidaseaktivität zu verhindern, wurde die Schnitte nach der Rehydrierung in einer 3% Wasserstoffperoxid-Lösung für 15 min inkubiert. Es folgte eine zweimalige Spülung der Objektträger für 5 min in entmineralisiertem Wasser.

Anschließend wurden die Schnitte zur Demaskierung der gesuchten Antigene in einer Küvette mit 100 ml Zitratpuffer bei pH 6,0 für 15 min in einem 95°C warmen Wasserbad erhitzt. Nach einer Abkühlungsphase von 15 min konnten die Objektträger in eine TRIS-Puffer-Lösung bei pH 7,6 für 5 min gewaschen werden. Um bei der weiteren Bearbeitung der Schnitte die Menge an eingesetzten Antikörpern und Chemikalien zu reduzieren, wurden die Präparate nun mit einem Fettstift in ausreichendem Abstand umfahren.

Dann wurden jeweils 50 µl einer 10% BSA-Lösung auf die jeweiligen Präparate gegeben, um freie Bindungsstellen zu Beginn der Färbungen zu blockieren. Diese wurden anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die beiden auf dem Objektträger befindlichen Gewebeschnitte von der Serumlösung durch Abklopfen gereinigt. Im folgenden Schritt wurde jeweils eine Probe auf dem Objektträger mit einem Primärantikörper behandelt, während die zweite Probe (Negativkontrolle) mit einem entsprechenden nichtbindenden Immunglobulin der Spezies des Primärantikörpers behandelt wurde.

Typ Färbung Datum	Tiernummer + Projekt-Nr.	Probe Negativkontrolle
----------------------	-----------------------------	--

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Aufteilung und Beschriftung der Objektträger

Dabei wurden die Primärantikörper und die Immunglobulin-Kontrollen in einem Antikörper-Verdünnungspuffer jeweils im gleichen Verdünnungsverhältnis angesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht. In dieser Zeit banden die Antikörper an die zu detektierenden Antigene bzw. Proteine.

Tabelle 10: Für die immunhistologischen Färbungen eingesetzte Primärantikörper und ihre Verdünnungsverhältnisse

Primärantikörper	Verdünnungsverhältnis
Monoklonaler Anti-Maus MDK-Antikörper	1:100
Polyklonaler Anti-Maus DMP1-Antikörper	1:400
Polyklonaler Anti-Maus ENPP1-Antikörper	1:500
Polyklonaler Anti-Maus Ly6G-Antikörper	1:300
Polyklonaler Anti-Maus F4/80-Antikörper	1:500

Am nächsten Tag folgte ein dreimaliger Waschschrift von jeweils 2 min in 100 ml TRIS-Puffer-Lösung (TBST bei pH 6,4), bevor alle Proben mit einem biotinylierten Sekundärantikörper im Verdünnungsverhältnis 1:100 behandelt wurden. Die anschließende, halbstündige Inkubationsphase bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer ermöglichte die Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Es folgte abermals eine dreimalige TRIS-Puffer-Spülung für jeweils 2 min, um überschüssigen, nichtgebundenen Sekundärantikörper wieder zu entfernen.

Daraufhin wurden alle Schnittpräparate mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex beträufelt und wiederum für 15 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser mit dem Peroxidase-Enzym konjugierte Komplex konnte so an den biotinylierten Sekundärantikörper binden. Nun wurde erneut dreimalig mit TRIS-Puffer-Lösung für jeweils 2 min gewaschen. Anschließend wurde auf die Schnitte ein Chromogensubstrat zur Darstellung der Antikörper-Antigen-Komplexe pipettiert und die Schnitte unter lichtmikroskopischer Beobachtung entwickelt. Die Färbung wurde schließlich in entmineralisiertem Wasser abgestoppt und gewaschen. Es folgte eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer. Schließlich konnten die Objektträger mit Hilfe eines Eindeckmediums fixiert werden.

Zur Detektion der Anzahl neutrophiler Granulozyten wurden die Gewebsschnitte mit einem monoklonalem Ly6G-Antikörper gefärbt. Das Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte erfolgt nach oben genanntem Schema. Danach erfolgte eine Inkubation in 10% Ziegsenserum für 1 Stunde bei 37°C, um unspezifisches

Binden des Primärantikörpers zu reduzieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper im Verdünnungsverhältnis 1:300 erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschschritten konnte der mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper im Verdünnungsverhältnis von 1:100 zugegeben werden. Die Inkubation bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer dauerte 30 min. Nach weiteren Waschschritten und der Zugabe des Chromogensubstrates, wurden die Schnitte für ca. 12 min unter lichtmikroskopischer Kontrolle entwickelt. Nach einer Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer konnten die Schnitte eingedeckelt werden.

2.5.6 Auswertung der histologischen Präparate

Zunächst wurden alle Schnittpräparate der beiden Untersuchungsgruppen deskriptiv analysiert. Im Falle der inflammatorischen Zellen wurde anschließend eine quantitative Auswertung der Schnitte durchgeführt.

Voraussetzung für die Auszählung der neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen war die Definition der *Region of Interest (ROI)*, also der Region besonderen Interesses. Dies gewährleistete eine einheitliche und möglichst standardisierte Auswertung der Präparate und ermöglichte eine direkte Vergleichbarkeit der beiden Versuchsgruppen. Der Ausgangspunkt für die Erstellung der *ROI* war die Einteilung Frakturkallus in vier Quadranten (A, B, C, D). Die Quadranten wurden definiert durch den Knochenschaft als horizontale Linie und eine senkrecht zur Knochenachse verlaufenden Linie durch die Mitte des Frakturspaltes. Die Auszählung erfolgte lichtmikroskopisch bei 200x Vergrößerung mit Hilfe eines Zähllokulars.

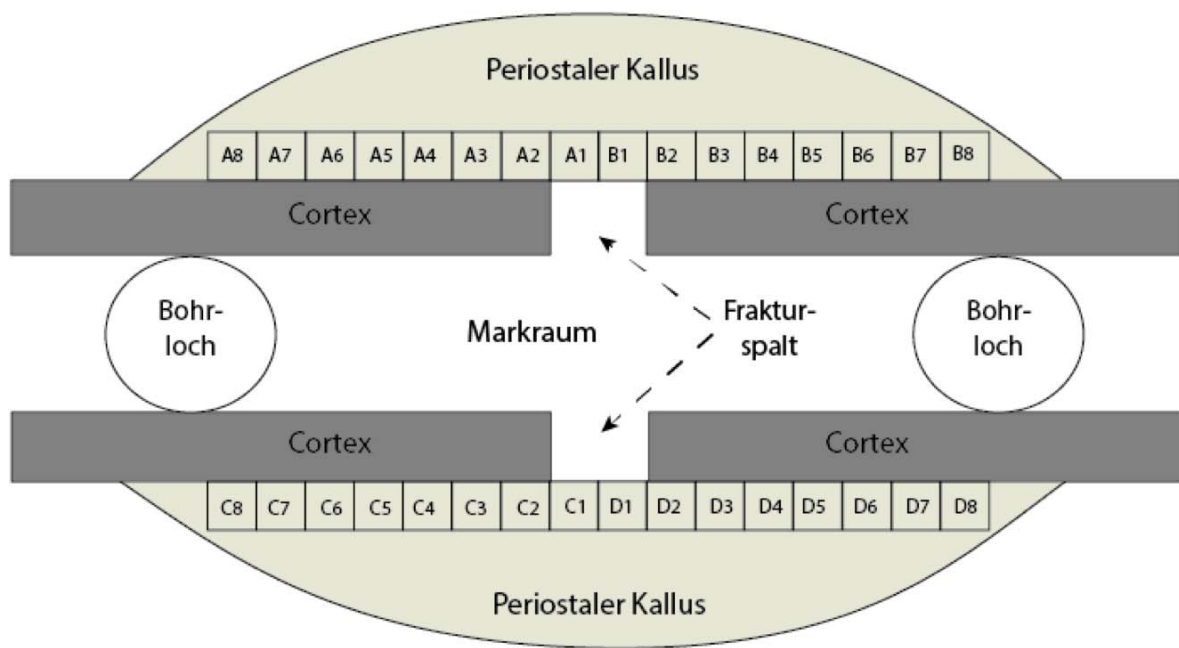


Abbildung 7: Schema zur Bestimmung der Zellzahl in einer *Region of interest* (ROI)
Einteilung des Frakturkallus in vier Quadranten (A-D). Auszählung von jeweils acht Quadranten (1-8) pro Quadrant. Die Kantenlänge eines Zählquadrats entspricht bei 200x Vergrößerung $250\ \mu\text{m}$. Die ausgezählte Gesamtfläche von 32 Quadranten beläuft sich damit pro Präparat auf $2\ \text{mm}^2$.

Die Auswertung der neutrophilen Granulozyten erfolgte im Bereich des periostalen Kallus. Ausgezählt wurde in jedem Quadranten der Bereich des Periosts zwischen der Mitte des Frakturspaltes und der Mitte des ersten Bohrlochs. Eingeteilt wurde dieser Bereich in jeweils acht Quadrate (siehe Abbildung 7) mit einer Kantenlänge von $250\ \mu\text{m}^2$. Die Gesamtfläche der ROI aller vier Quadranten belief sich damit auf $2\ \text{mm}^2$. Anschließend wurde die Fläche der Leerräume bestimmt, z.B. von Schnittartefakte ohne Gewebeanteil, um diese von der Gesamtfläche abzuziehen. Somit wurde der Einfluss schnittbedingter Unterschiede zwischen den Präparaten reduziert. Gezählt wurden ausschließlich segmentkernige Zellen mit eindeutig positiver Färbung. Schließlich wurde die Anzahl positiver Zellen pro mm^2 berechnet.

Im Falle der quantitativen Auswertung der Makrophagen wurde eine ROI innerhalb des endostalen Kallus definiert. Hierfür identifizierten wir für jedes einzelne Präparat die Region mit der höchsten Dichte positiver Zellen im Bereich des an den Frakturspalt angrenzenden endostalen Kallus. Die Fläche der ROI betrug für jedes der ausgewerteten Präparate $0,305\ \text{mm}^2$. Innerhalb dieser ROI bestimmten wir die Anzahl der Makrophagen und interpolierten sie anschließend auf die Zellzahl pro mm^2 .

2.6 Zellkultur

2.6.1 C3H10T1/2-Zellen

Die verwendeten Zellen der Zelllinie C3H10T1/2 wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) erworben. Diese pluripotente fibroblasten-ähnliche Zelllinie wurde ursprünglich aus C3H Maus-Embryozellen isoliert [101].

2.6.2 Versuchsaufbau Zellversuch

Die C3H10T1/2 Zellen wurden aufgetaut und in Zellkulturmedium kultiviert und ausgesät. Die Zellen wurden schließlich für 5, 14 bzw. 21 Tage differenziert. An Tag 5, 14 bzw. 21 der Differenzierung wurden die Zellen entweder für 1 Stunde (+1h MDK) oder für 6 Stunden (+6h MDK) mit rekombinantem Midkine stimuliert. Es wurde auch eine nichtstimulierte Kontrolle (- MDK) mitgeführt.

Tabelle 11: Versuchsaufbau zur Stimulation von C3H10T1/2-Zellkulturen mit rekombinantem Midkine (MDK)

Zellen	Tag 5	Tag 14
C3H10T1/2	- MDK	- MDK
	+ 1h MDK	+ 1h MDK
	+ 6h MDK	+ 6h MDK

2.6.3 Aussaat und Kultivierung von C3H10T1/2-Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die C3H10T1/2 Zellen wurden aufgetaut und im Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen kultiviert. Nachdem sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen manuell gezählt und zu je 110.000 Zellen pro Well ausgesät. Es folgte eine Vorkultivierungsphase von 2 Tagen im Zellkulturmedium. Anschließend wurden die Zellen im Differenzierungsmedium für 4, 13 bzw. 20 Tage differenziert. Am Tag 4, 13 bzw. 20 erfolgte ein Mediumwechsel zu serumreduziertem Medium, bevor die Zellen schließlich am Tag 5, 14 bzw. 21 für jeweils 1 bzw. 6 h mit 100 ng/ml rekombinantem Midkine stimuliert wurden.

2.6.4 Bestimmung der Viabilität und Zellzahl

Die Ermittlung der Viabilität erfolgte durch optische Unterscheidung von toten und lebendigen Zellen mit Hilfe von Trypanblau. Der Farbstoff Trypanblau kann nicht durch die intakte Membran lebender Zellen dringen, sodass nur tote und damit lysierte Zellen angefärbt werden. Lebende Zellen erscheinen dadurch hell, während tote Zellen blau gefärbt werden.

Zunächst wurden die Zellen mittels Trypsin-Behandlung vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin-Lösung bedeckt und anschließend wieder mit ausreichend Kulturmedium gespült. Dabei wurde auf eine möglichst kurze Inkubationszeit geachtet, um die Zellen vor der Proteaseaktivität des Trypsins zu schützen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 150x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einem 10 ml FCS-Medium resuspendiert. Danach wurde 10 µl Trypan-Blau-Lösung angesetzt und mit einem Aliquot von 10 µl der Zellsuspension gemischt. Danach wurden 10 µl der Lösung in die Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Anschließend wurden unter dem Lichtmikroskop 4 Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Summe der Zellen ($\sum Q_{1-n}$) der gezählten Quadrate wurde durch deren Anzahl geteilt, um einen Durchschnittswert zu erhalten. Dieser Durchschnittswert wurde schließlich mit dem spezifischen Verdünnungsfaktor (VF) der Zählkammer und der Trypanlösung ($10.000 \text{ VF}_{\text{Zählkammer}} \times 2 \text{ VF}_{\text{Trypan-Blau}} = 20.000 \text{ VF}_{\text{insgesamt}}$) multipliziert. Durch dieses Verfahren konnte die durchschnittliche Zellzahl/ml ermittelt werden.

2.6.5 Stimulation von C3H10T1/2-Zellen durch rekombinantes Midkine

Die Stimulation der C3H10T1/2 Zellen erfolgte am 5. Tag bzw. 14. Tag der Differenzierung durch Zugabe von rekombinantem Midkine in einer Konzentration von 100 ng/ml. Zunächst wurde am Tag 4 bzw. 13 das Differenzierungsmedium abgesaugt und durch serumreduziertes Medium ersetzt. Anschließend wurden die zu stimulierenden Zellen mit 20 µl Midkine (100 ng/ml) im Medium bedeckt und anschließend für 1 Stunde bzw. 6 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nun wurden die Zellen mit steriler PBS-Lösung gespült bevor sie schließlich mit 350 µl Lyse-Puffer für 2-3 min inkubiert wurden. Daraufhin konnte die Zell-Suspension mit Hilfe eines Zellschabers in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden und die Isolation der RNA nach Protokoll durchgeführt werden.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Genexpressionsanalyse

Um Veränderungen in der Quantität der mRNA nach chemischer Stimulation feststellen zu können, wurde die Gesamt-RNA der Proben aus den Zellen isoliert und mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben. Anschließend konnte eine Analyse durch quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR) durchgeführt werden. Die Kombination dieser beiden Methoden wird als quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) genannt. Dabei kamen spezifische Oligonukleotide (*Primer*) zur Amplifikation der Zielgene zum Einsatz. Die Zielgen-Expression wurden auf die analog ermittelten Expressionswerte des *Housekeeping*-Gens Actin normiert.

2.7.2 Isolation und Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Zur Isolierung der mRNA aus den Zellkulturen wurden die Zellpellets zunächst mit 350 µl des Lyse-Puffers (*RLT Buffer*) versetzt und auf den Filtereinsatz (*QIAshredder*) im Zentrifugengefäß pipettiert. Nach 2 min in der Zentrifuge bei 20.000 x g wurde dem erhaltenen Lysat ein Volumen 70% Ethanol zugesetzt und mehrmals mit der Pipette aufgesaugt. Danach wurde das Eluat auf eine *RNeasy*-Säule pipettiert und bei 8.000 x g für 15 sec zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 500 µl Pufferlösungen (*Buffer RW1*), bei wiederum 8.000 x g für 15 sec. Der Durchfluss wurde abermals verworfen. Das Retentat im Filter wurde schließlich mit 80 µl DNase-Lösung (10 µl DNase Stammlösung + 70 µl *RDD Buffer*) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde wieder mit 500 µl Pufferlösung (*Buffer RW1*) gewaschen und das Eluat verworfen. Nach Überführung der Säulen in ein neues Sammelgefäß wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer (*Buffer RPE*) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im letzten Schritt wurden die Säulen wiederum in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 50 µl RNase-freiem Wasser bei 20.000 x g für 1 min zentrifugiert. Im anschließenden Schritt konnte die Qualität und Konzentration der gewonnen RNA bestimmt werden.

Die Konzentrationsbestimmung aller Nukleinsäure-Lösungen erfolgte photometrisch bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers. Hierzu wurden 2 µl jeder Probe das Gerät aufgetragen und vermessen. Im Anschluss wurde die gewonnene RNA bei -80°C eingelagert.

2.7.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Reverse Transkription beschreibt die Synthese von cDNA aus RNA, d.h. dass RNA als Matrize für die Transkription von cDNA genutzt wird. Hierfür benötigt man ein spezielles Enzym, die sogenannte Reverse Transkriptase. Dieses Enzym ist in vielen Retroviren zu finden, z.B. im HIV (*human immunodeficiency virus*). Das hier verwendete rekombinante Enzym Omniscript (Qiagen) hat drei verschiedene Aktivitäten: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine RNA-DNA-Hybrid-abhängige Exoribonuklease (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase.

Für die Synthese von cDNA aus mRNA wurde zunächst die mRNA aufgetaut und mit RNase-freiem Wasser verdünnt, sodass jede Probe 1 µg mRNA auf 12 µl Volumen enthielt. Danach wurden die RNA-Lösungen bei 65°C für 5 min denaturiert und anschließend sofort auf 4°C abgekühlt um eine Renaturierung zu verhindern. In der Zwischenzeit konnte der Mastermix nach dem Protokoll angesetzt werden.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die cDNA-Synthese

Bestandteile	pro 20 µl-Ansatz
Reaktionspuffer RT (10x)	2 µl
dNTPs (0,5 mM)	2 µl
RNase Inhibitor (10 U/µl)	1 µl
Oligo-dT- <i>Primer</i> (5mM)	1 µl
Random-Hexamer- <i>Primer</i> (50 mM)	1 µl
Omniscript (4 U)	1 µl
mRNA (1 µg in 12µl RNase freiem H ₂ O)	12 µl

Die anschließende Transkription erfolgte zunächst während einer Inkubation bei 37°C für 60 min und danach bei 42°C für weitere 60 min. Direkt im Anschluss konnten die Proben bei -20°C tiefgefroren werden.

2.7.4 Standard-PCR

Die Standard-Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von Zielgensequenzen und ermöglicht im Anschluss ein semiquantitatives Auswerten, z.B. mit Hilfe der Gelelektrophorese. Diese Methode wurde verwendet um die Spezifität verschiedener *Primer*sequenzen für die Verwendung in der qRT-PCR zu bestimmen.

Für die PCR-Reaktion wurde 1 µl der cDNA, 5 µl des *Primer-Mix* (0,5 µM) und 10 µl PCR-Mix mit 4 µl A. dest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Das PCR-Protokoll des *Thermocyclers* startete mit einer initialen Enzymaktivierung von 15 min bei 95 °C, darauf folgten 32 Zyklen mit den Schritten Denaturierung 1 min, 95 °C, *Primer-Annealing* 45 sec, 60 °C und Elongation 1 min, 72 °C. Abschließend wurde eine finale Extension für 15 min bei 72 °C durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proben auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen.

2.7.5 Quantitative *Real-Time*-PCR

Das Prinzip der quantitativen *Real-Time*-PCR (qPCR) beruht auf der Quantifizierung des PCR-Produktes über die mit der Menge des PCR-Produktes proportionale Zunahme des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) während der einzelnen PCR-Zyklen. Um die relative Expression der Zielgene in den Proben zu bestimmen, wurde diese stets auf das *Housekeeping*-Gen β -Actin normiert.

In der folgenden Tabelle sind die zur Detektion der Zielgene verwendeten *Primer*sequenzen gelistet.

Tabelle 13: *Primer*sequenzen der quantitativen *Real-Time*-PCR

Zielgen	Sequenzen
β -Actin	5'-tga agt gtg acg ttg aca tcc-3' 5'-ctt ctg cat cct gtc agc aa-3'
<i>Alpl</i>	5'-gct gat cat tcc cac gtt tt-3' 5'-gag cca gac caa aga tgg ag-3'
<i>Dmp-1</i>	5'-agt gag gag gac agc ctg aa-3' 5'-ctg agg ctc tcg ttg gac tc-3'

<i>c-Fos</i>	5'-cca gtc aag agc atc agc aa-3'
	5'-atg atg ccg gaa aca aga ag-3'
<i>cMyc</i>	5'-ccc caa ggt agt gat cct ca-3'
	5'-tcg tct gct tga atg gac ag-3'
<i>Syndecan-3</i>	5'-ata ctg gag cgg aag gag gt-3'
	5'-gta gat gag cag cgt gac ca-3'
<i>Ptprζ</i>	5'-aga ctg gaa cta acc tgc cac cac-3'
	5'-agc atc tgg aga aaa cga ctc g-3'
<i>Lrp1</i>	5'-cga gct ctg tga cca gtg tt-3'
	5'-aag agc aca cga tgc ctt ca-3'
<i>α4-Integrin</i>	5'-agc aac agc ttt tcc aga gc-3'
	5'-ggg cca cgt tct cat ctt ta-3'
<i>α6-Integrin</i>	5'-cgt tct tcg ttc cag gtt gt-3'
	5'-atg gaa gcc ctc agg aga at-3'
<i>β1-Integrin</i>	5'-cct act ggt ccc gac atc at-3'
	5'-ggc aag gcc aat aag aac aa-3'
<i>Lrp6</i>	5'-tca ctg agt gcg aag acc ac-3'
	5'-ctg gca cac tgg aac tga ga-3'

Alle verwendeten *Primer* wurden standardmäßig in folgendem Reaktionsansatz mit 25 µl Gesamtvolumen verwendet:

Tabelle 14: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die quantitative *Real-Time*-PCR

Bestandteile	pro 25 µl-Ansatz
2x SYBR-Green® Mastermix	12,5 µl
ROX® Dye	0,25 µl
<i>Primer</i> (5µM) <i>Forward</i>	1 µl
<i>Primer</i> (5µM) <i>Reverse</i>	1 µl
H ₂ O	8,25 µl
cDNA	2 µl

Zur Durchführung der qPCR wurden 25µl Reaktionsansatz in 96-Well Platten pipettiert. Das Programm des *Thermocyclers* sah dabei wie folgt aus:

Tabelle 15: PCR-Programm des *Thermocyclers* für die quantitative *Real-Time*-PCR

Zyklus	Temperatur	Zeit
<i>Holding Stage</i>	50°C	2 min
	95°C	2 min
<i>Cycling Stage</i>	95°C	15 sec
40 Zyklen	60°C	1 min
<i>Melt curve Stage</i>	95°C	15 sec
	60°C	1 min
	+ 0,3°C Schritte bis 95°C	15 sec

2.7.6 Auswertung der quantitativen *Real-Time*-PCR

Die Auswertung der qPCR erfolgte mittels Effizienz-korrigierter delta-delta-CT Methode. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen *β-Actin* verwendet. Die Software des *Thermocyclers* (StepOne™ Software, Applied Biosystems) lieferte hierfür die CT-Werte. Daraufhin wurde mit Hilfe der Software LinRegPCR die

mittlere Effizienz der PCR für jedes einzelne Gen bestimmt [93]. Die durchschnittliche Effizienz der qPCR wurde später für die Korrektur der delta-delta-CT-Werte verwendet. Dabei wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Rel. Änderung der Genexpression} = \frac{E_{(\text{Zielgen})}^{\Delta\text{CT}(\text{Kontrolle-Stimuliert})}}{E_{(\text{Referenzgen})}^{\Delta\text{CT}(\text{Kontrolle-Stimuliert})}}$$

Abbildung 8: Formel zur Berechnung der Effizienz-korrigierten relativen Genexpression [90]

2.7.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der DNA-Moleküle im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Diese Methode wurde verwendet, um Produkte der Standard-PCR und der qRT-PCR auf ihre Größe und Reinheit zu überprüfen. Für die PCR-Produkte wurde ein 2% Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurden 2 g Agarose abgewogen und mit 100 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle für 3 min erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach einem ersten Abkühlen der Agarose-Lösung wurde der Fluoreszenzfarbstoff in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugegeben. Die Agarose wurde dann nach Einsetzen des Gelkamms luftblasenfrei in den Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Gelieren und Entfernen des Gelkamms, konnte das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Die Elektrophoresekammer wurde mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Jeweils 10 µl der mit 6-fachem Ladepuffer versetzten Proben, wurden schließlich in den Geltaschen bei 110 V für ca. 60 min aufgetrennt. Anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht mit einem Geldokumentationsgerät detektiert werden.

2.8 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Ergebnisse wurde zur Abschätzung der zentralen Tendenz ob sich zwei Stichproben voneinander signifikant unterscheiden der Mann-Whitney-U Test verwendet. Hierbei handelt es sich um einen nichtparametrischen Test zur Überprüfung unabhängige Stichproben. Die abhängige Variable muss dabei nicht normalverteilt, aber mindestens ordinalskaliert sein [70].

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Histologie des Frakturheilungsmodells

Zur Beurteilung der Gewebe des Frakturkallus am Tag 4, Tag 10 und Tag 21 der Knochenheilung wurden die Präparate mit Safranin O/*Fast Green* gefärbt.

Dabei beobachteten wir am Tag 4 der Frakturheilung im Osteotomiespalt ein teilweise durch lockeres Bindegewebe ersetzt Frakturhämatom. Ein Frakturkallus ließ sich zu diesem Zeitpunkt ebenso wenig abgrenzen wie Knorpel- oder Knochengewebe innerhalb des Frakturspalt. In einigen Schnitten beobachteten wir unmittelbar an den Frakturspalt angrenzend ein reaktiv verdicktes Periost (siehe Abbildung 9).

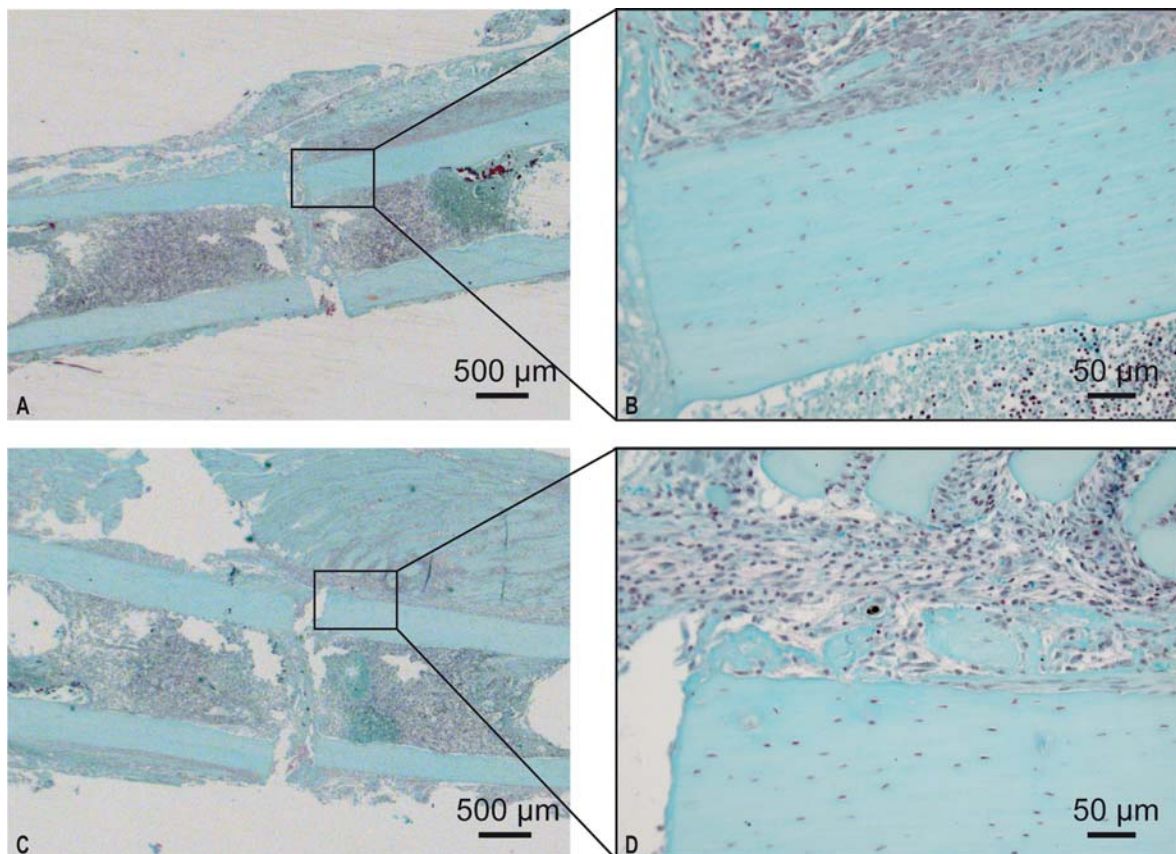


Abbildung 9: Safranin O Färbung des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie. Knorpelgewebe je nach Proteoglykangehalt orange bis rot, Zytoplasma grünlich und Zellkerne schwarz gefärbt.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus;

(A,C) Übersichtsaufnahme in 12,5x Vergrößerung; (B,D) Aufnahme in 200x Vergrößerung.

Am Tag 10 der Knochenheilung konnten wir in allen Präparaten einen definierten Frakturkallus beschreiben. Dieser war in der Mehrheit der Versuchstiere auf einer

Seite und selten auf beiden Seiten des osteotomierten Femurs zu finden. Der Hauptbestandteil des Kallus zu diesem Zeitpunkt war hyaliner Knorpel, dessen Bildung in den an den Osteotomiespalt angrenzenden, periostalen Regionen zu beobachten war. Weiterhin konnte bereits eine beginnende desmale Ossifikation in den peripheren Regionen des Frakturkallus festgestellt werden. Das anfängliche Hämatom im Frakturspalt war nun weitestgehend organisiert und durch Bindegewebe ersetzt worden. Auffallend war, dass der größtenteils aus Knorpel bestehende Kallus in den Wildtyp-Tieren durchschnittlich größer erschien als in den *Mdk*-defizienten Tieren (siehe Abbildung 10). Histomorphometrische Untersuchungen der Gewebeverteilung konnten diese Beobachtung bestätigen [32].

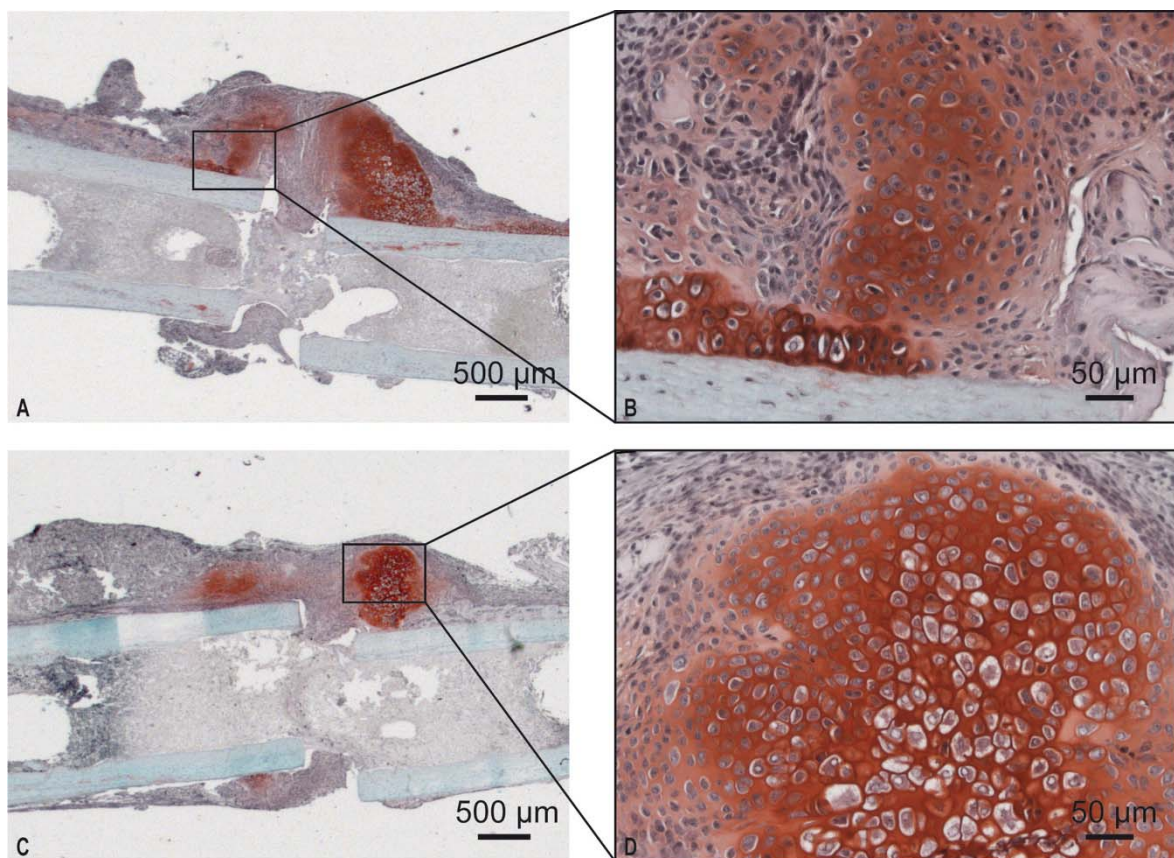


Abbildung 10: Safranin O Färbung des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie. Knorpelgewebe je nach Proteoglykangehalt orange bis rot, Zytoplasma grünlich und Zellkerne schwarz gefärbt.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus;

(A,C) Übersichtsaufnahme in 12,5x Vergrößerung; (B,D) Aufnahme in 200x Vergrößerung.

Am Tag 21 der Frakturheilung war der Frakturkallus bei allen Versuchstieren bereits größtenteils verknöchert und zeigte nur noch einen minimalen Knorpelanteil. Lediglich im Frakturspalt und der osteochondrogenen Übergangszone des Frakturkallus ließ sich noch Knorpelgewebe nachweisen.

Anders als am Tag 10 der Frakturheilung beobachteten wir nun einen größeren Anteil an Knorpelgewebe in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere. Auch diese Ergebnisse konnten durch histomorphometrische Untersuchungen bestätigt werden [32]. Die knöchernen und bindegewebigen Gewebeanteile zeigten dabei keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe Abbildung 11).

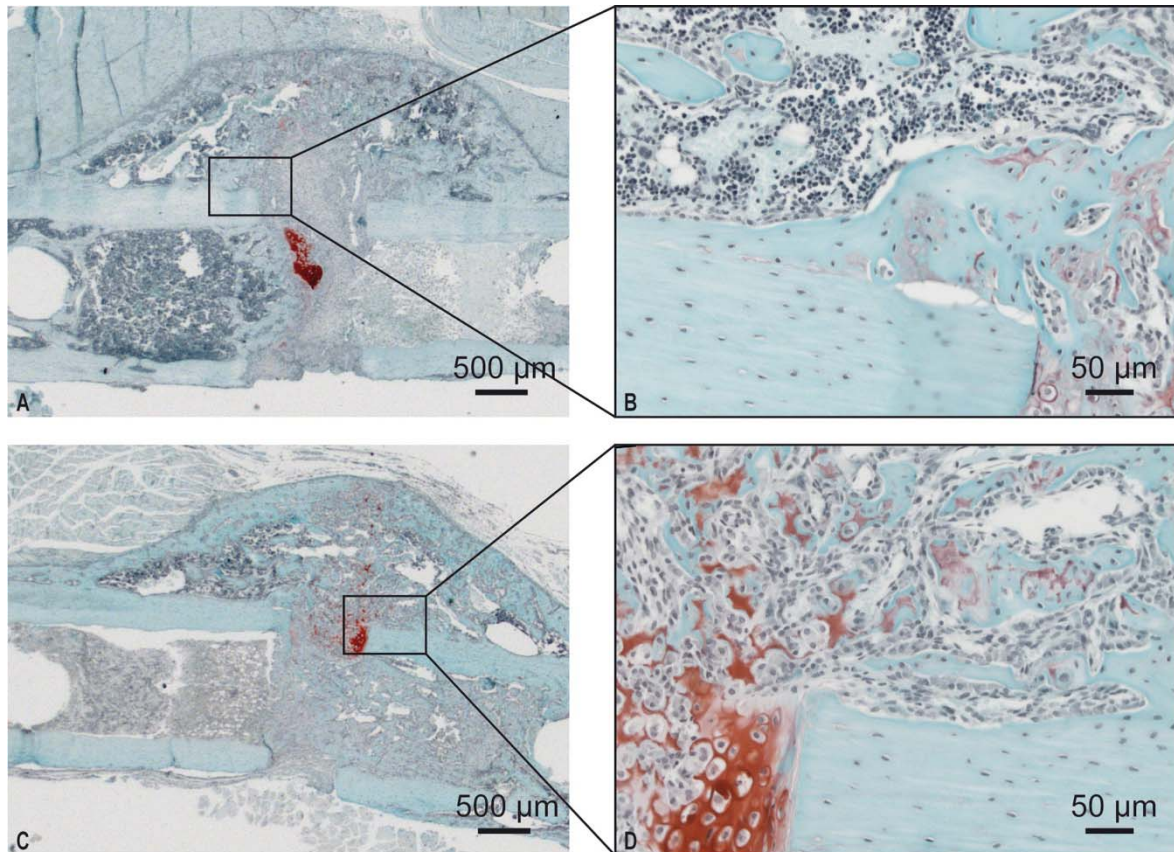


Abbildung 11: Safranin O Färbung des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 21 nach Osteotomie. Knorpelgewebe je nach Proteoglykangehalt orange bis rot, Zytosplasma grünlich und Zellkerne schwarz gefärbt.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus;

(A,C) Übersichtsaufnahme in 12,5x Vergrößerung; (B,D) Aufnahme in 200x Vergrößerung.

Insgesamt zeigte sich in der Betrachtung aller Präparate eine sekundäre Frakturheilung mit Ausbildung eines einseitigen Frakturkallus. Hinsichtlich der knöchernen Strukturen konnten keine Unterschiede zwischen den Wildtypen und den *Mdk*-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Jedoch beobachteten wir Unterschiede in der Knorpelbildung zwischen den beiden Versuchsgruppen. So zeigten *Mdk*-defiziente Tiere am Tag 10 zunächst einen geringeren Knorpelanteil als Wildtyp-Tiere. Am Tag 21 nach Fraktur drehte sich diese Beobachtung jedoch um, sodass sich innerhalb der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere ein deutlich höherer Anteil an Knorpelgewebe nachweisen ließ. Diese Beobachtung konnte durch histomorphometrische Untersuchungen der Präparate bestätigt werden [32].

3.2 Immunhistologischer Nachweis von Midkine in der Frakturheilung

Für die deskriptiven Analysen der immunhistologischen Färbungen von MDK gingen alle 12 Wildtyp-Tiere in die Auswertung ein. Der verwendete polyklonale Antikörper erkennt ein Epitop des C-terminalen Endes von murinem MDK. Die mit nichtbindendem Immunglobulin behandelten Negativkontrollen zeigten in keinem der untersuchten Präparate eine positive Färbung (siehe Abbildung 12).

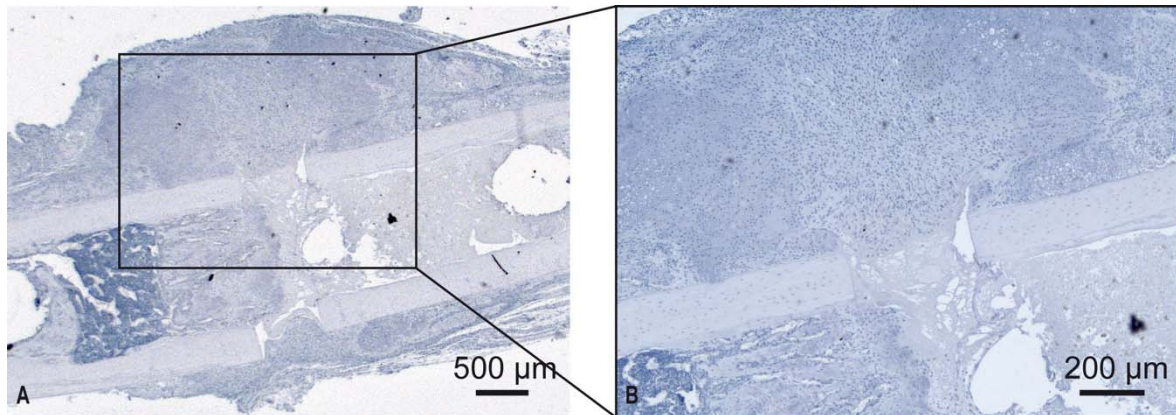


Abbildung 12: Negativkontrolle der immunhistologischen Färbung mit Midkine-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. (A) 12,5x Vergrößerung; (B) 50x Vergrößerung.

Am Tag 4 der Frakturheilung konnte in einzelnen Präparaten eine schwache MDK-positive Färbung im Bereich des Periosts beobachtet werden. Diese periostalen Bereiche waren in unmittelbarer Nähe zum Osteotomiespalt zu finden und zeigten sich in den Regionen der MDK-positiven Zellen deutlich verdickt. Somit könnte es sich bei diesen Zellen um proliferierende, osteochondrogene Vorläuferzellen im reaktiven Periost des Frakturkallus gehandelt haben (siehe Abbildung 13).

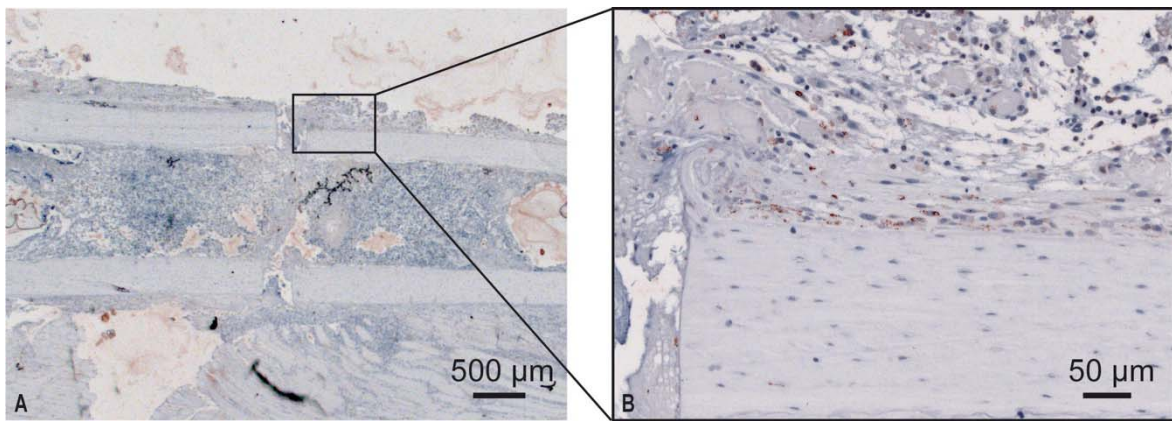


Abbildung 13: Immunhistologische Färbung mit Midkine-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Midkine-positive Zellen bräunlich gefärbt.

(A) 12,5x Vergrößerung; (B) 200x Vergrößerung.

Das Maximum der *Mdk*-Expression der drei Untersuchungszeitpunkte wurde am Tag 10 der Frakturheilung erreicht. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine starke MDK-Immunreaktion im Zytoplasma chondrozytärer Zellen gefunden werden. Vor allem die hypertrophen Chondrozyten im Bereich enchondraler Ossifikation zeigten eine starke Expression von *Mdk*. Chondroblasten und weniger differenzierte Chondrozyten waren nur vereinzelt positiv für MDK (siehe Abbildung 14).

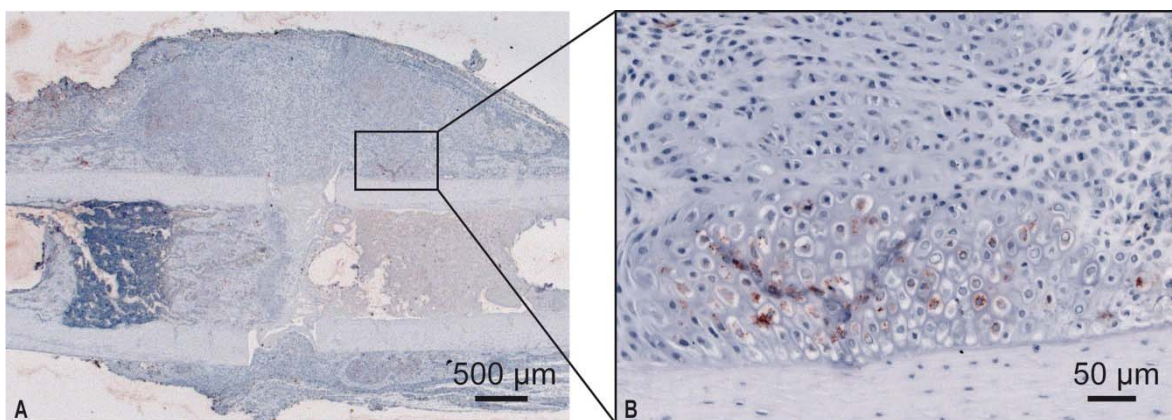


Abbildung 14: Immunhistologische Färbung mit Midkine-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Midkine-positive Zellen bräunlich gefärbt.

(A) 12,5x Vergrößerung; (B) 200x Vergrößerung.

Im weiteren Verlauf der Frakturheilung konnte ein Rückgang der Expression von *Mdk* beobachtet werden. So reduzierte sich die Zahl der positiven Chondrozyten am Tag 21 aufgrund der fortgeschrittenen Ossifikation des Frakturkallus. In dieser Phase befanden sich nur noch vereinzelt positive Chondrozyten zwischen den neuen Knochentrabekeln der osteochondrogenen Übergangszone des Kallus bzw. des Frakturspalts (siehe Abbildung 15).

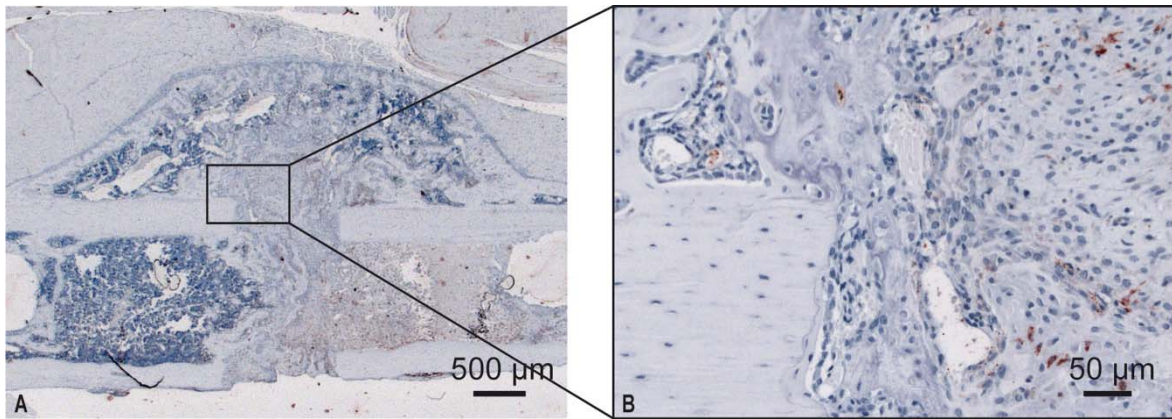


Abbildung 15: Immunhistologische Färbung mit Midkine-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 21 nach Osteotomie. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Midkine-positive Zellen bräunlich gefärbt.

(A) 12,5x Vergrößerung; (B) 200x Vergrößerung.

Es bleibt festzuhalten, dass *Mdk* während aller Phasen der Frakturheilung nachzuweisen war. Die stärkste Expression beobachteten wir während der Phase der enchondralen Ossifikation. Dabei wurde *Mdk* insbesondere von hypertrophen Chondrozyten exprimiert.

3.3 Immunhistologischer Nachweis von Mineralisationsproteinen im Frakturheilungsmodell

3.3.1 Deskriptive Immunhistologie der *Dmp1*-Expression in der Frakturheilung von Midkine-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen

Untersucht wurde die Expression des Mineralisationsproteins DMP1 an Tag 10 und Tag 21 der Frakturheilung. In die deskriptive Auswertung der immunhistologischen Färbungen gingen an beiden Tagen insgesamt 8 *Mdk*^{+/+} Tiere bzw. 8 *Mdk*^{-/-} Tieren ein. Die mit nichtbindendem Immunglobulin behandelten Negativkontrollen zeigten in keinem der Fälle eine positive Färbung.

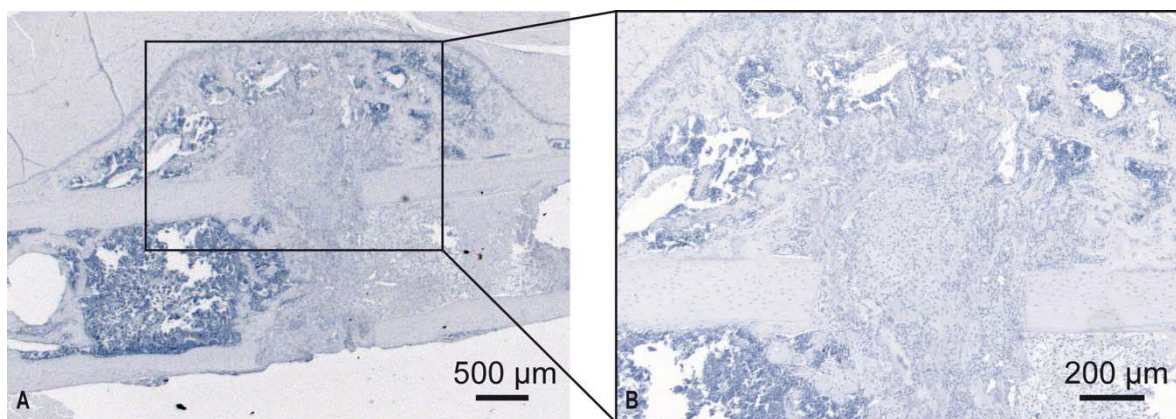


Abbildung 16: Negativkontrolle der immunhistologischen Färbung von Dentin-Matrix-Protein 1 des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 21 nach Osteotomie. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. (A) 12,5x Vergrößerung; (B) 50x Vergrößerung.

Am Tag 10 der Frakturheilung konnte die Expression von *Dmp1* vor allem in der Kortikalis und in Bereichen desmalen Ossifikation beobachtet werden. Insbesondere die Osteozyten des neuen trabekulären Knochens im Bereich des periostalen und endostalen Kallus zeigten dabei eine besonders starke *Dmp1*-Expression. Die Expression von *Dmp1* beschränkte sich in den positiven Geweben nicht nur auf das Zytoplasma der osteogenen Zellen, sondern konnte in ihrer gesamten EZM nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17).

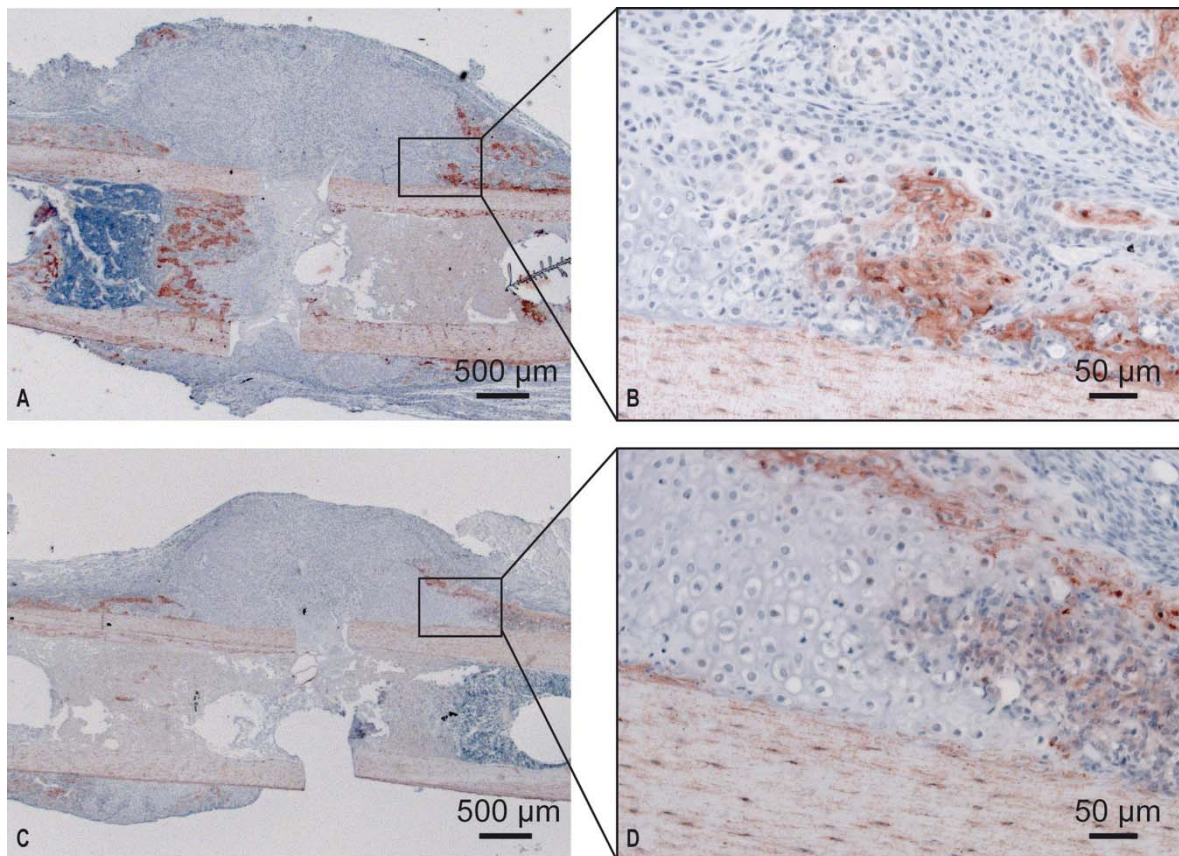


Abbildung 17: Immunhistologische Färbung mit Dentin-Matrix-Protein 1-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie. Dentin-Matrix-Protein bräunlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.
(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus.
(A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

Am Tag 21 der Knochenheilung zeigte sich im Wesentlichen ein ähnliches Expressionsmuster für *Dmp1* wie am Tag 10. Der neue Geflechtknochen, der zwischenzeitlich den Großteil des Kallus ersetzt hatte, zeigte besonders im Bereich appositionellen Wachstums eine intensive Färbung (siehe Abbildung 18).

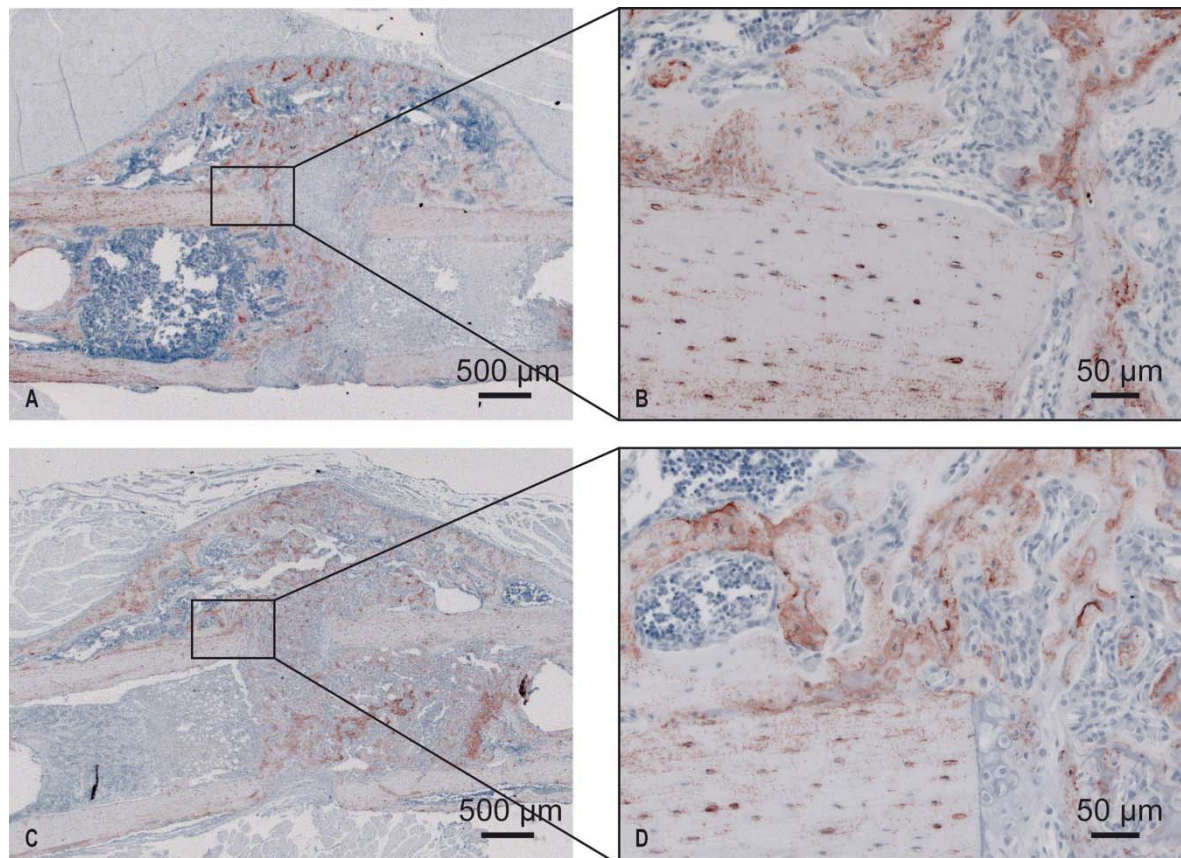


Abbildung 18: Immunhistologische Färbung mit Dentin-Matrix-Protein 1-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 21 nach Osteotomie. Dentin-Matrix-Protein bräunlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus.

(A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

Zusammenfassend ließ sich aus der reinen Betrachtung der Präparate zu keinem Zeitpunkt der Frakturheilung eine Aussage hinsichtlich der unterschiedlichen Expression von *Dmp1* zwischen den beiden Genotypen treffen. Ein Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf die Expression von *Dmp1* während der Frakturheilung erscheint somit wenig wahrscheinlich. Allerdings machte das beobachtete Expressionsmuster von *Dmp1* die Bedeutung des Proteins für die Mineralisation von neuem Knochengewebe während der Frakturheilung deutlich.

3.3.2 Deskriptive Immunhistologie der *Enpp1*-Expression in der Frakturheilung von Midkine-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen

Analog zu der Untersuchung von DMP1 wurden für die immunhistologischen Analysen des Proteins ENPP1 die Präparate von jeweils vier Tieren jedes Genotyps an Tag 10 bzw. Tag 21 der Frakturheilung beurteilt. Zur Anwendung kam ein polyklonaler Antikörper gegen das C-terminale Ende des Proteins. Es mussten keine Tiere aufgrund einer positiven Negativkontrolle von den Auswertungen ausgeschlossen werden.

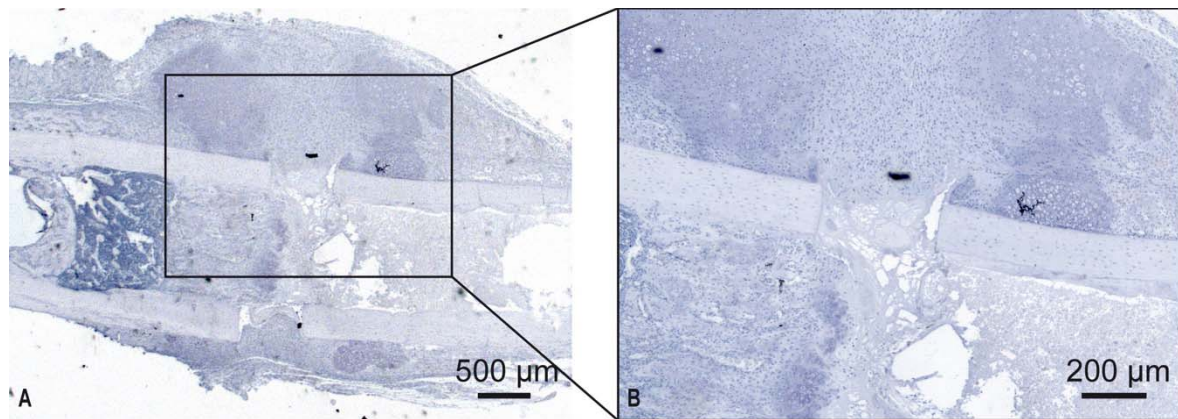


Abbildung 19: Negativkontrolle der immunhistologischen Färbung von *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1* des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie.

(A) 12,5x Vergrößerung; (B) 50x Vergrößerung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Am Tag 10 der Knochenheilung zeigten vor allem proliferierende osteoblastäre und chondrogene Zellen in den Randbereichen des entstandenen Knorpelgewebes eine starke extrazelluläre *Enpp1*-Expression im Bereich der Zellmembran. Die differenzierten und hypertrophen Chondrozyten waren hingegen nur selten positiv für ENPP1. Im Gegensatz zur Färbung von DMP1 zeigten die Osteozyten und ihre EZM im kortikalen Knochen keine Expression von *Enpp1* (siehe Abbildung 20).

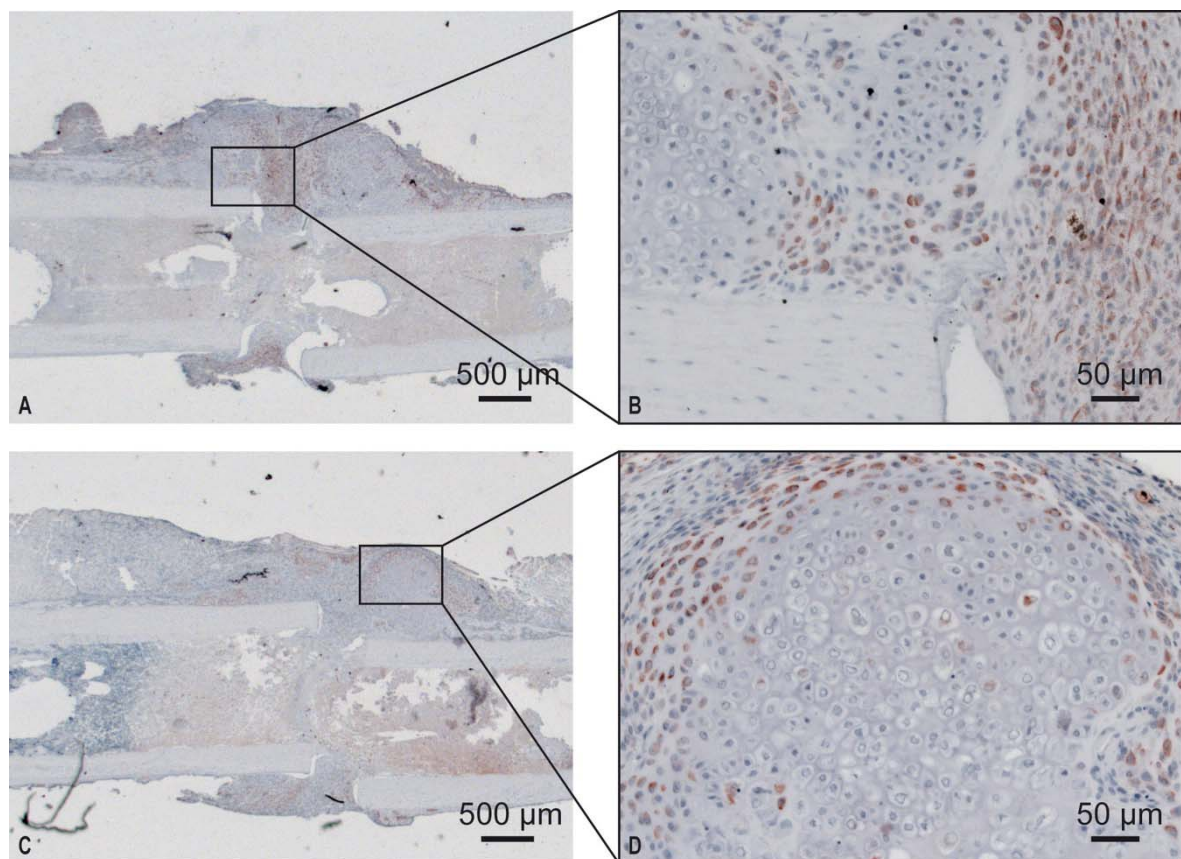


Abbildung 20: Immunhistologische Färbung mit *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1*-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie. *Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1*-Protein bräunlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus.

(A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

Am Tag 21 der Frakturheilung war das Knorpelgewebe des periostalen Kallus fast vollständig durch Geflechtknochen ersetzt worden, sodass positive Zellen vor allem entlang der neuen Knochen trabekel beobachtet werden konnten. Damit war eine *Enpp1*-Expression zu diesem Zeitpunkt vor allem in Bereichen des appositionellen Knochenwachstums zu finden. Weiterhin negativ für ENPP1 stellte sich das mineralisierte Knochengewebe des kortikalen und trabekulären Knochens dar (siehe Abbildung 21).

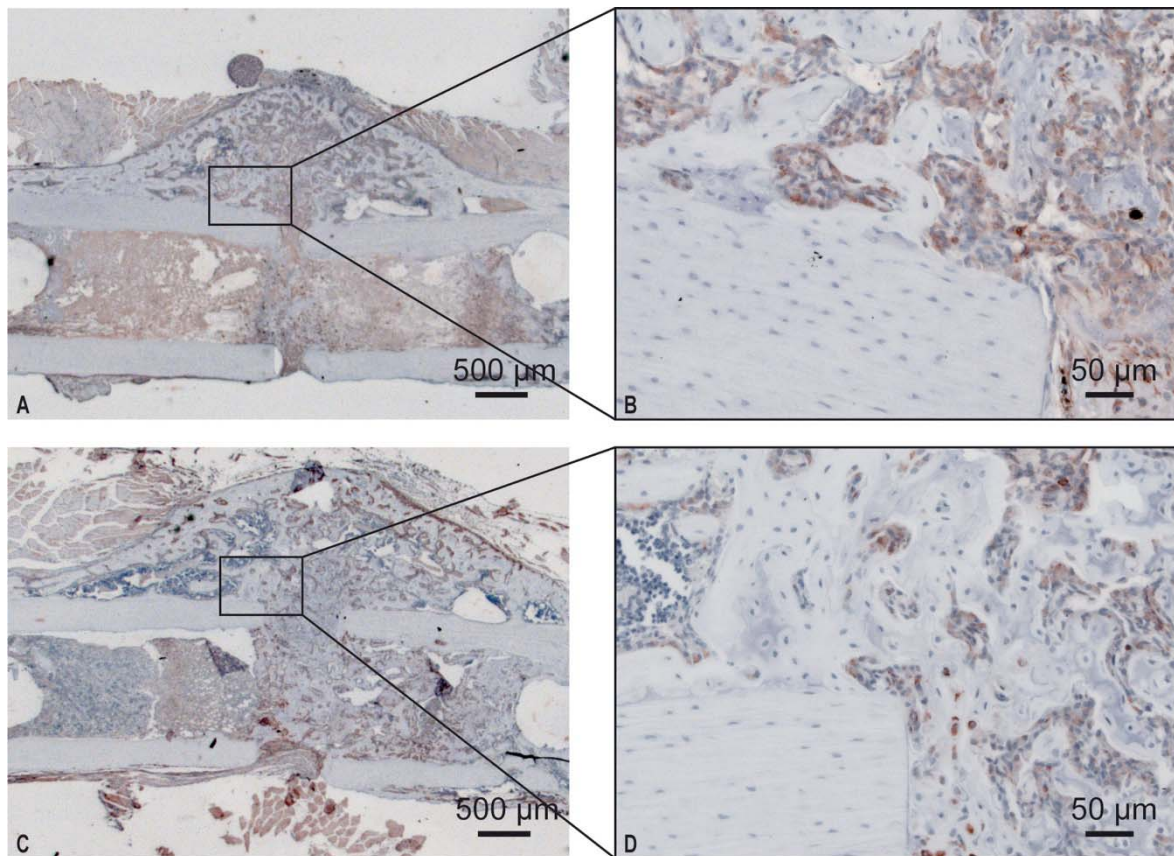


Abbildung 21: Immunhistologische Färbung mit *ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1*-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 21 nach Osteotomie. *Ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1*-Protein bräunlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus.

(A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

In der Zusammenschau konnte bei der Betrachtung der *Enpp1*-Expression in allen Präparaten kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen (*Mdk*^{+/+} und *Mdk*^{-/-}) festgestellt werden. Es ist demnach davon auszugehen, dass die *Mdk*-Defizienz keinen Einfluss auf die Expression von *Enpp1* in der Frakturheilung hat. Dennoch lässt das beobachtete spatio-temporale Expressionsmuster auf die Bedeutung von ENPP1 in der Ossifikation des Frakturkallus schließen.

3.4 Immunhistologischer Nachweis neutrophiler Granulozyten im Frakturheilungsmodell

Untersucht wurden die Präparate von insgesamt zehn Versuchstieren (5 *Mdk*^{+/+} und 5 *Mdk*^{-/-}). Ein Präparat (*Mdk*^{-/-}, Nr.1125) musste aufgrund schnittbedingter Artefakte von der Auswertung ausgeschlossen werden. Der immunhistologische Nachweis der neutrophilen Granulozyten wurde mit einem Ly6G-Antikörper durchgeführt. Ly6G ist einer von mehr als 20 Mitgliedern der Ly6-Familie. Sie sind Oberflächenproteine lymphozytärer Zellen, die wie Ly6G mit ihrem C-terminalen Ende an einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) gebunden sind [57].

Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Familie, wie z.B. Ly6C-Antigen, das im peripheren Gewebe auf neutrophilen Zellen, eosinophilen Zellen, proliferierenden Prä-Monozyten und dendritischen Zellen zu finden ist, wird Ly6G ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert [18]. Dies ermöglicht zusammen mit der Betrachtung der Kernmorphologie der Zellen den spezifischen Nachweis von neutrophilen Granulozyten. Es wurden daher ausschließlich positiv (rot) gefärbte, segmentkernige Zellen berücksichtigt. Die mit nichtbindendem Immunglobulin behandelten Negativkontrollen zeigten in keinem der Präparate eine positive Färbung.

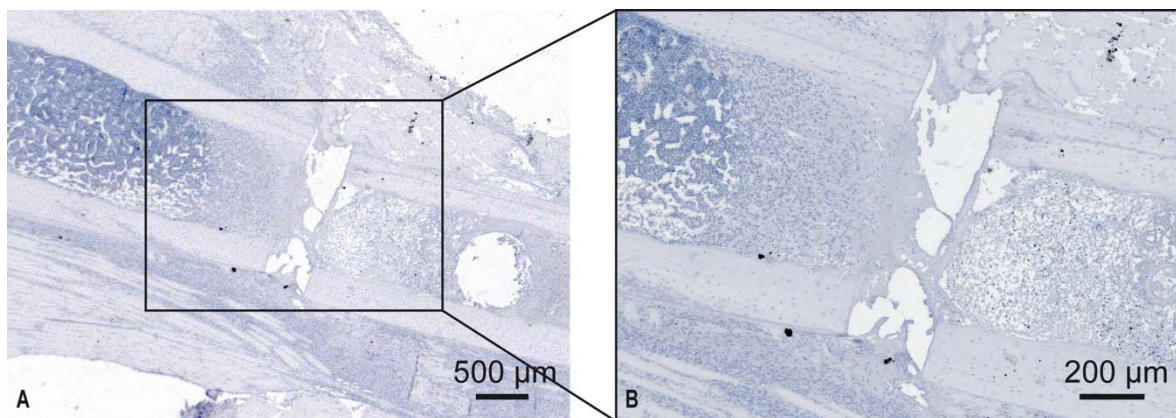


Abbildung 22: Negativkontrolle der immunhistologischen Färbung neutrophiler Granulozyten des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie.
(A) 12,5x Vergrößerung; (B) 50x Vergrößerung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Da neutrophile Granulozyten vor allem zu Beginn der Inflammationsphase zu erwarten sind und im Anschluss sehr bald wieder eliminiert werden, untersuchten wir ausschließlich die am Tag 4 der Frakturheilung angefertigten Präparate.

Zu diesem Zeitpunkt konnten wir in unseren mit Ly6G-Antikörper behandelten Präparaten eine starke, positive Immunreaktion im Bereich des Frakturhämatoms und des Knochenmarks beobachten. Neben den intramedullären positiven Zellen, konzentrierte sich eine große Anzahl neutrophiler Zellen auf Bereiche des Periosts in unmittelbarer Nähe zum Osteotomiespalt sowie auf das umliegende Muskel- und Bindegewebe (siehe Abbildung 23). Da aufgrund schnittbedingter Artefakte die sonst übliche Region des Osteotomiespalts nicht für die Auswertung geeignet erschien, definierten wir für die Auszählung der Präparate eine *ROI* in der periostalen Region der Frakturzone (siehe Kapitel 2.5.6).

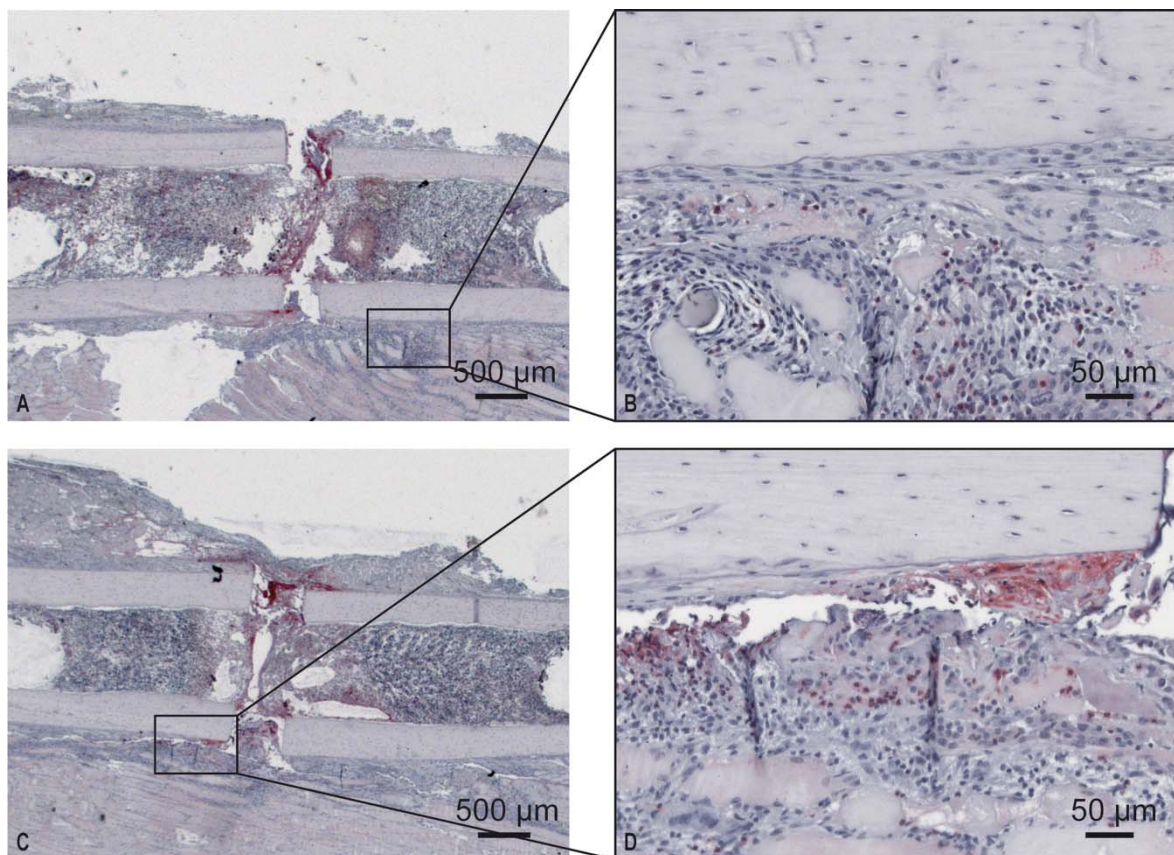


Abbildung 23: Immunhistologische Färbung mit Ly6G-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie. Ly6G-Antigen rötlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. (A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus. (A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

Bestimmt wurde die Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro mm^2 periostalen Gewebes. Dabei zählten wir in den Wildtyp-Tieren durchschnittlich weniger Zellen pro mm^2 (75 Zellen pro mm^2) als in den *Mdk*-defizienten Tieren (142 Zellen pro mm^2).

In der statistischen Auswertung konnten wir damit zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen nachweisen, jedoch lässt sich ein

Trend erkennen, dass in den Gewebeschnitten der *Mdk*-defizienten Tiere am Tag 4 tendenziell häufiger neutrophile Granulozyten im Periost des Frakturkallus zu finden waren.

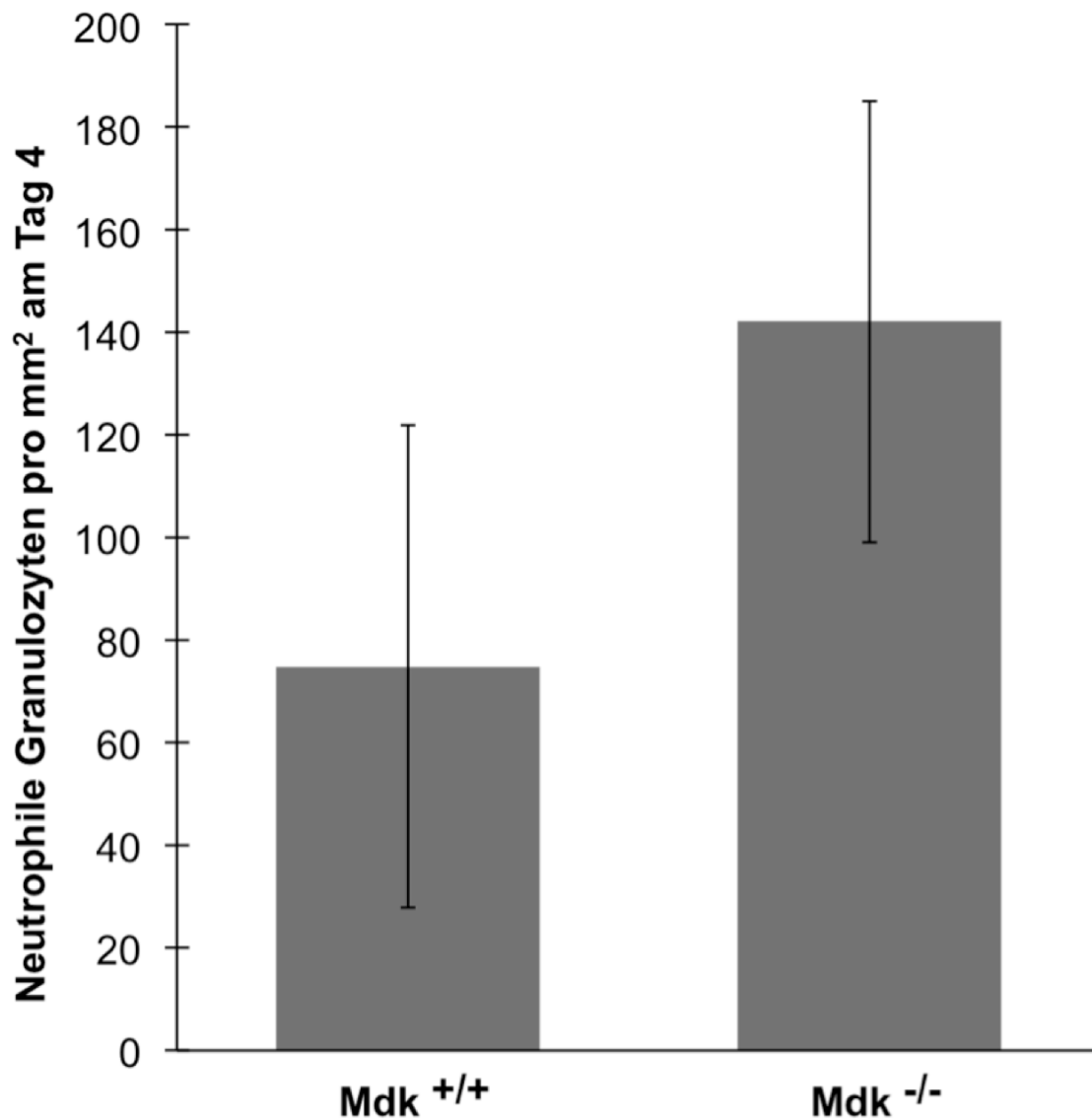


Abbildung 24: Anzahl neutrophiler Granulozyten pro mm² periostalen Gewebes eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie.

Mdk ^{+/+} (Wildtyp): Mittelwert 75 Zellen/mm², Standardabweichung 47; Zahl der Tiere n=5.

Mdk ^{-/-} (Midkine-Defizienz): Mittelwert 142 Zellen/mm², Standardabweichung 43; Zahl der Tiere n=4. Signifikanzwert p=0,065

3.5 Immunhistologischer Nachweis von Makrophagen im Frakturheilungsmodell

Parallel zur Untersuchung der neutrophilen Granulozyten wurden die Präparate von insgesamt zehn Versuchstieren (5 *Mdk*^{+/+} und 5 *Mdk*^{-/-}) hinsichtlich des Verteilungsmusters von Gewebsmakrophagen untersucht. Dabei musste das Präparat (*Mdk*^{-/-}, Nr. 1125) aufgrund schnittbedingter Artefakte von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden.

Zum Nachweis der Makrophagen wurde das Antigen F4/80 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers angefärbt. F4/80 ist ein für Makrophagen spezifisches Antigen, das zu der EGF-TM7-Familie gehört. Durch die Expression von F4/80 unterscheiden sich Makrophagen insbesondere von Osteoklasten und anderen Knochengewebszellen wie z.B. Chondrozyten, Fibroblasten und Osteoblasten [39]. Zur quantitativen Auswertung der Präparate wurde eine ROI einer definierten Größe in den Bereich der intramedullären Frakturzone gelegt, der den höchsten Anteil an positiv gefärbten Zellen enthält.

Die mit Immunglobulin als Negativkontrolle mitgeführten Schnitte zeigten in keinem der ausgewerteten Schnitte eine positive Färbung.

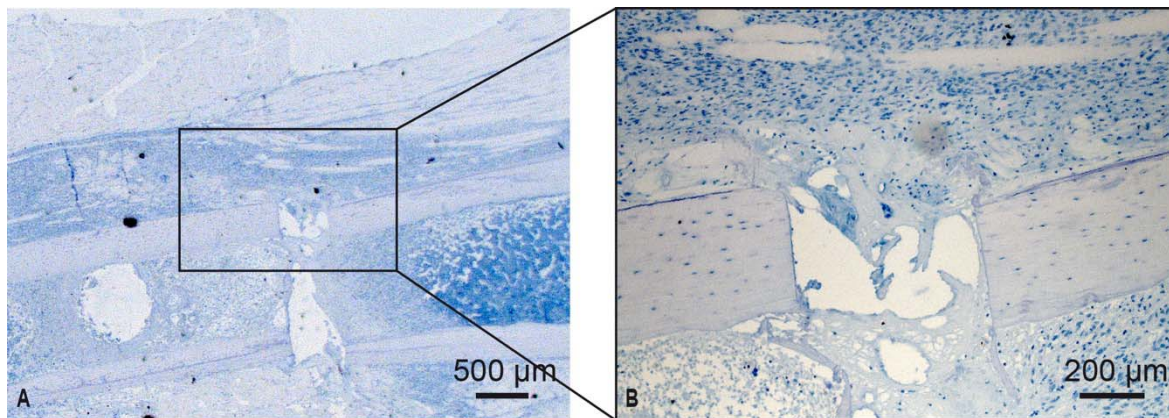


Abbildung 25: Negativkontrolle der immunhistologischen Färbung von Makrophagen des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie.
(A) 12,5x Vergrößerung; (B) 50x Vergrößerung. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Da vorhergehende Arbeiten Makrophagen auch während späterer Phasen der Frakturheilung nachweisen konnten, untersuchten wir die zur Verfügung stehenden Präparate an Tag 4 und Tag 10 der Frakturheilung.

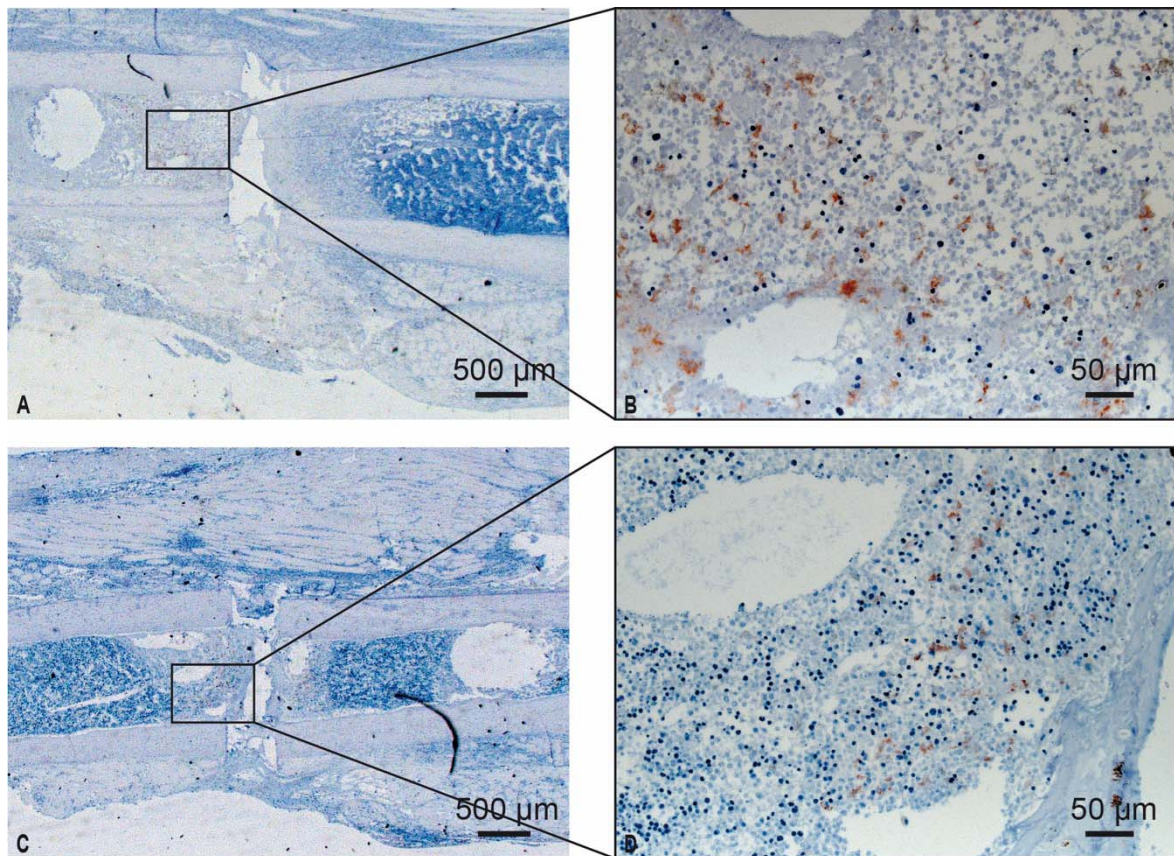


Abbildung 26: Immunhistologische Färbung mit F4/80-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie. F4/80-Antigen bräunlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus.

(A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

An Tag 4 der Frakturheilung war keine besondere Häufung F4/80-positiver Zellen im Bereich des Periosts zu beobachten. Hier ließen sich lediglich vereinzelte Zellen am Rande des periostalen Kallus beobachten. Der weitaus größte Teil der F4/80-positiven Zellen konzentrierte sich auf den Markraum und dort vor allem in unmittelbarer Nähe des Frakturspalt. Mit zunehmender Entfernung vom Frakturspalt ließen sich nur noch einzelne positiv gefärbte Zellen nachweisen (siehe Abbildung 26).

Auch im Falle der Makrophagen wurde eine Quantifizierung zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Untersuchungsgruppen angestrebt. Dabei zählten wir am Tag 4 der Frakturheilung in den Wildtyp-Tieren durchschnittlich mehr Zellen pro mm^2 als in den *Mdk*-defizienten Tieren.

Es ließ sich damit ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Makrophagen zwischen den beiden Genotypen am Tag 4 der Knochenheilung feststellen, wobei es zu einem häufigeren Auftreten von Makrophagen in den Gewebsschnitten der Wildtypen im Vergleich zu den *Mdk*-defizienten Tieren kam.

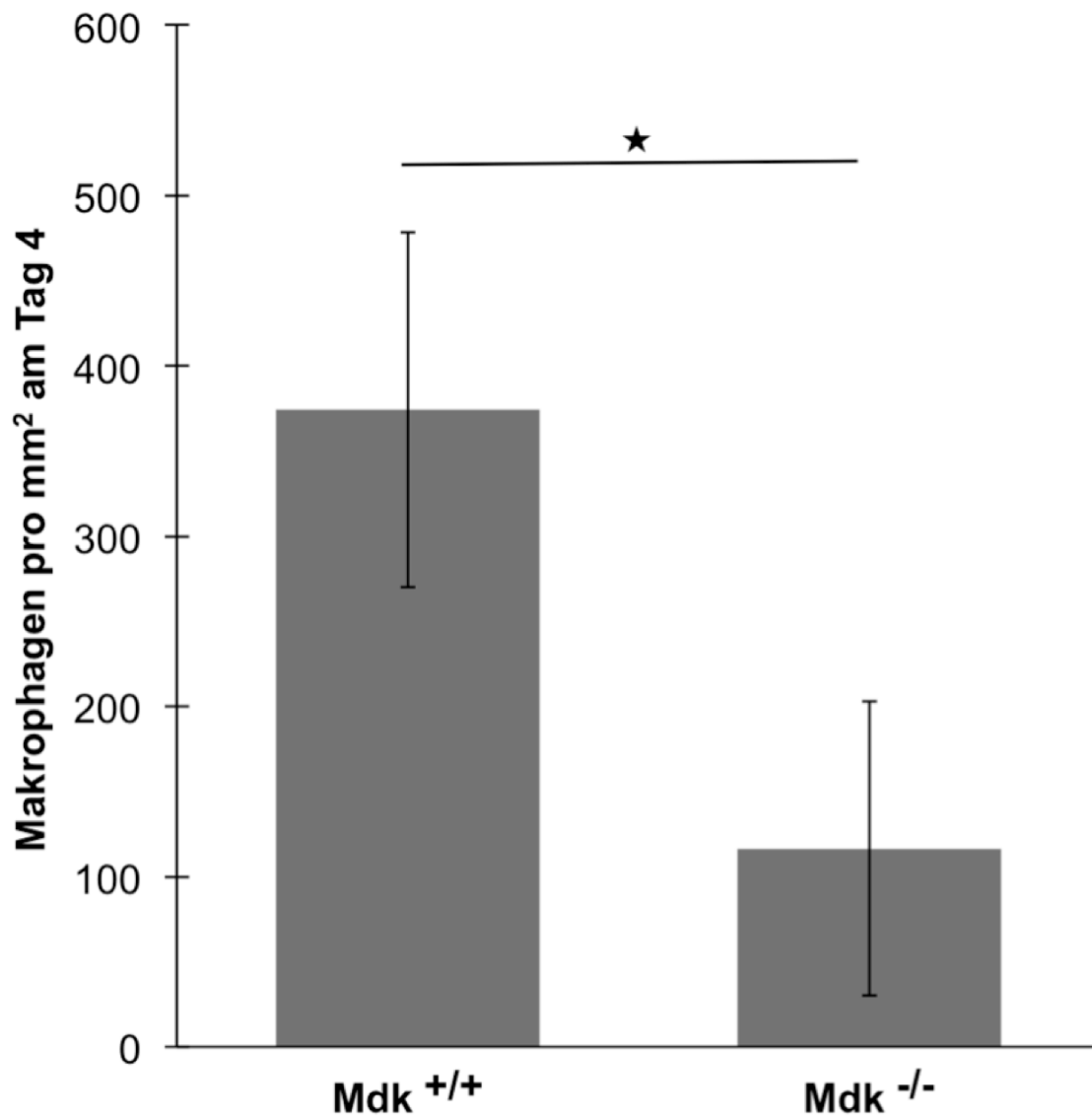


Abbildung 27: Anzahl an Makrophagen pro mm² endostalen Gewebes eines murinen Femurs am Tag 4 nach Osteotomie.

Mdk ^{+/+} (Wildtyp): Mittelwert 374 Zellen/mm², Standardabweichung 104; Zahl der Tiere n=5.

Mdk ^{-/-} (Mdk-Defizienz): Mittelwert 116 Zellen/mm², Standardabweichung 86; Zahl der Tiere n=4.

* Signifikanzwert p<0,05

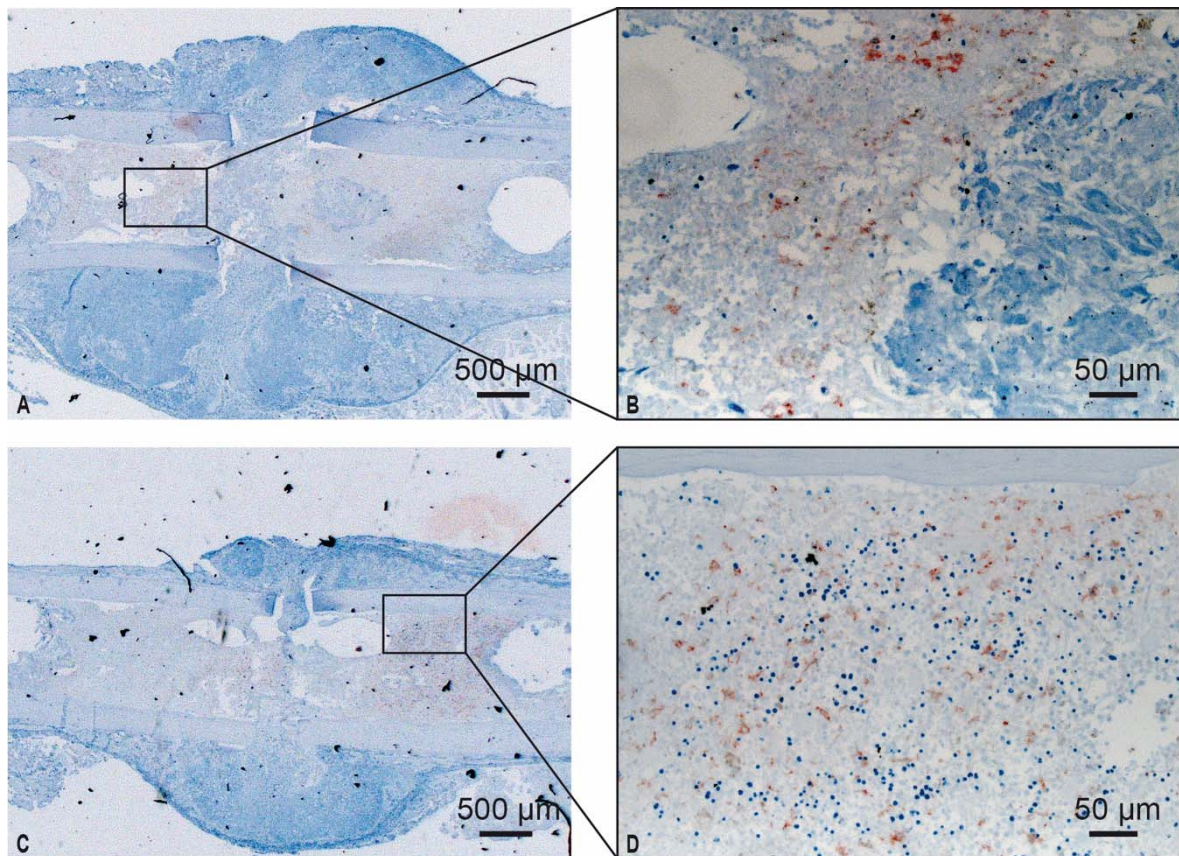


Abbildung 28: Immunhistologische Färbung mit Anti-F4/80-Antikörper des Frakturkallus eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie. F4/80-Antigen bräunlich gefärbt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

(A,B) Wildtyp-Maus; (C,D) Midkine-defiziente Maus.

(A,C) 12,5x Vergrößerung; (B,D) 200x Vergrößerung.

Am Tag 10 der Frakturheilung beobachteten wir ein ähnliches Verteilungsmuster der F4/80-positiven Zellen wie am Tag 4, es war weiterhin die überwiegende Mehrheit der positiven Zellen im Markraum zu identifizieren. Jedoch überwog die Anzahl der gefärbten Makrophagen in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere (siehe Abbildung 28).

In unserer Auszählung bestätigte sich dieser Eindruck, so zählten wir am Tag 10 der Frakturheilung durchschnittlich weniger F4/80-positive Zellen in der Gruppe der Wildtypen als in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere. Damit ließ sich auch am Tag 10 ein signifikanter Unterschied in der Anzahl F4/80-positiver Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigen. Im Gegensatz zu unserer Auswertung an Tag 4 konnten wir am Tag 10 jedoch mehr Makrophagen in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere beobachten.

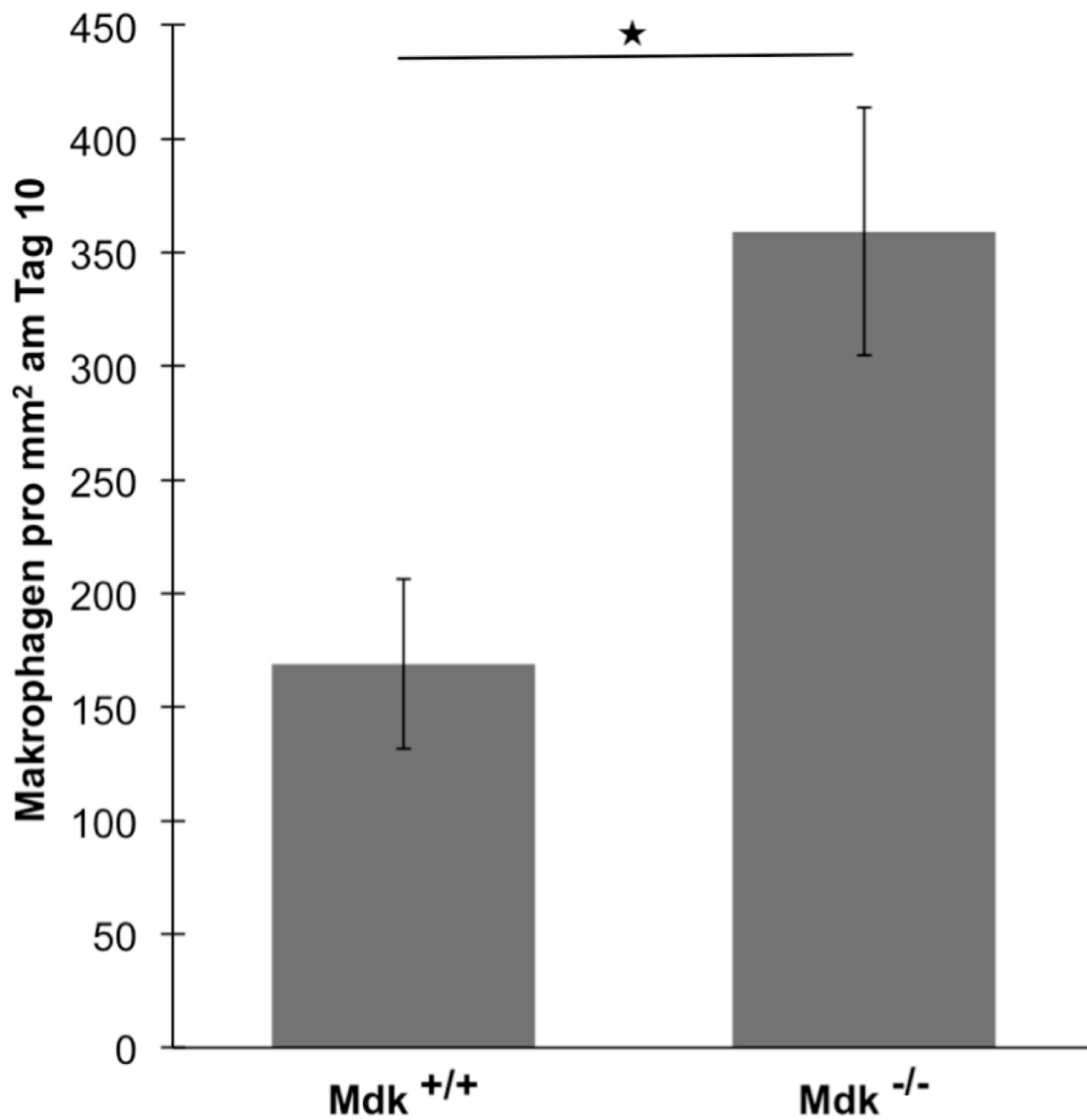


Abbildung 29: Anzahl an Makrophagen pro mm² endostalen Gewebes eines murinen Femurs am Tag 10 nach Osteotomie.

Mdk ^{+/+} (Wildtyp): Mittelwert 167 Zellen/mm², Standardabweichung 37; Zahl der Tiere n=5.

Mdk ^{-/-} (Mdk-Defizienz): Mittelwert 359 Zellen/mm², Standardabweichung 55; Zahl der Tiere n=4.

* Signifikanzwert p<0,05

3.6 Expression möglicher MDK-Rezeptoren während der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

In vorausgegangenen *in-vitro* Studien konnten bereits verschiedene Rezeptormoleküle für MDK identifiziert werden [69, 77]. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit mesenchymale Zellen während ihrer Differenzierung auf die Veränderung der Expression der Rezeptoren PTPR ζ , LRP6, LRP1, Integrine α 4, Integrine α 6, Integrine β 1, Syndecan-3 und ALK zu analysieren.

Dargestellt (siehe Abbildung 30) ist die relative Genexpression verschiedener Zielgene an Tag 5 und Tag 14 der Differenzierung mesenchymaler Zellen der Zelllinie C3H10T1/2. Die abgebildete relative Genexpression am jeweiligen Untersuchungstag wurde dabei auf das interne Kontrollgen β -Actin normierte. Im Laufe der Differenzierung der mesenchymalen Zellen ist für die Mehrheit der untersuchten Rezeptormoleküle ein Anstieg der relativen Expression zu beobachten. Ein statistisch signifikanter Unterschied ließ sich hierbei allerdings nicht feststellen. Auffallend ist die im Vergleich zum Kontrollgen β -Actin höhere relative Expression der Gene *Lrp1* und *Alk*. Im Falle von *Lrp1* scheint die Expression im Laufe der Differenzierung von Tag 5 zu Tag 14 sogar noch weiter anzusteigen. In der statistischen Auswertung ließ sich dieser Unterschied jedoch nicht bestätigen. *Alk* zeigte hingegen eher eine tendenzielle Abnahme der Expression während der Differenzierung. Die Expression des Gens *Integrin α 6* stellte sich im Vergleich zu den untersuchten Genen eher vermindert dar.

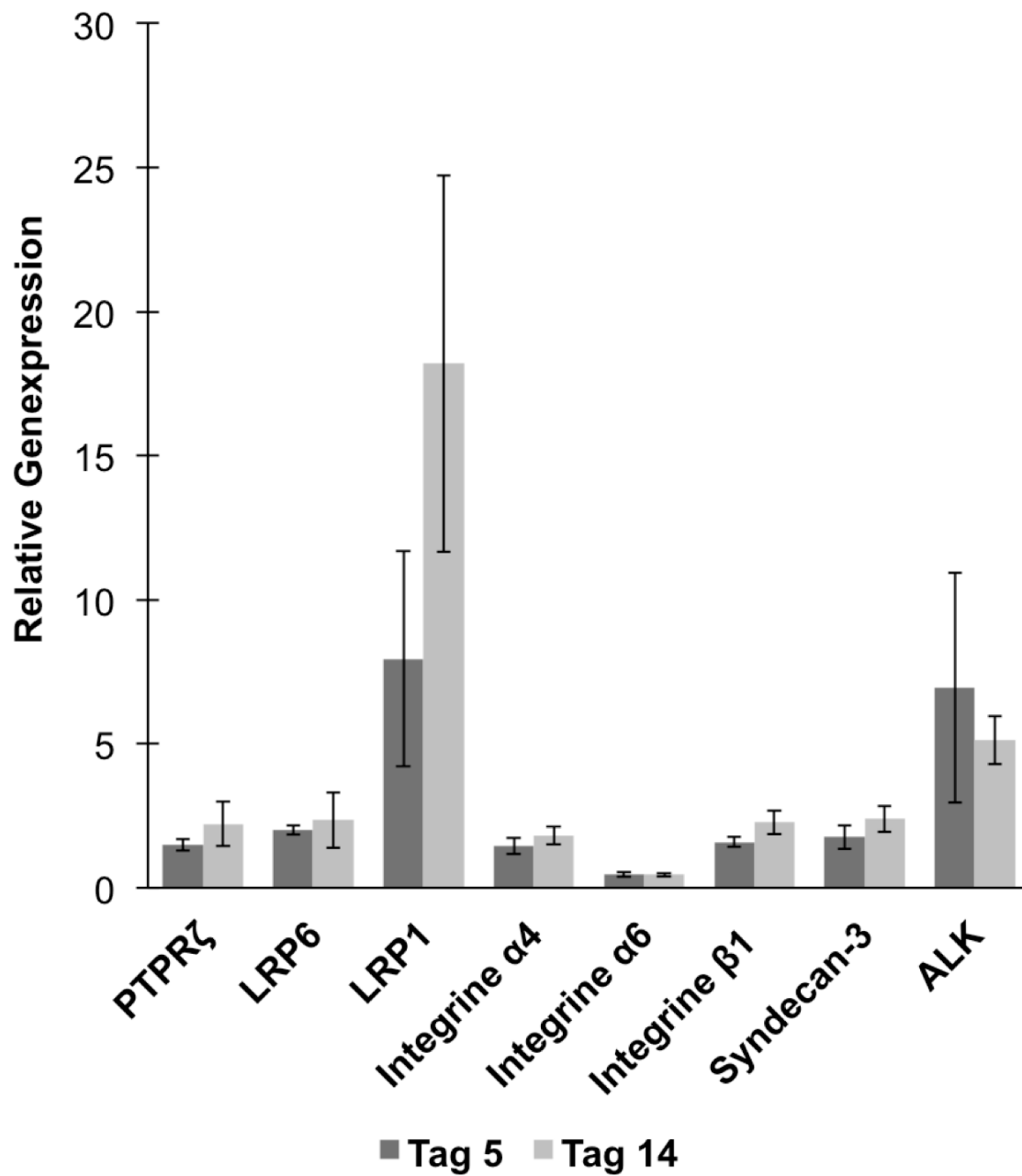


Abbildung 30: Darstellung der relativen Genexpression der Rezeptoren Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor Typ ζ (PTPR ζ), *lipoprotein receptor-related protein 6* (LRP6), *lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), Integrine $\alpha 4$, Integrine $\alpha 6$, Integrine $\beta 1$, Syndecan-3 und *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) am Tag 5 und Tag 14 der Differenzierung mesenchymaler Zellen (C3H10T1/2) normiert auf das Kontrollgen β -Actin.

3.7 Einfluss von rekombinanten Midkine auf die Genexpression von mesenchymalen Stammzellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es einen möglichen Einfluss von exogenem MDK *in-vitro* auf die Expression von Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mesenchymaler Zellen zu untersuchen. Hierzu wurden Zellen der Zelllinie C3H10T1/2 mit rekombinantem MDK für eine Stunde bzw. 6 Stunden stimuliert und anschließend die Veränderung der relativen Genexpression im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen gemessen. Untersucht wurden die Gene *cMyc* und *Alpl*. β -Actin diente auch bei diesem Versuch als internes Kontrollgen.

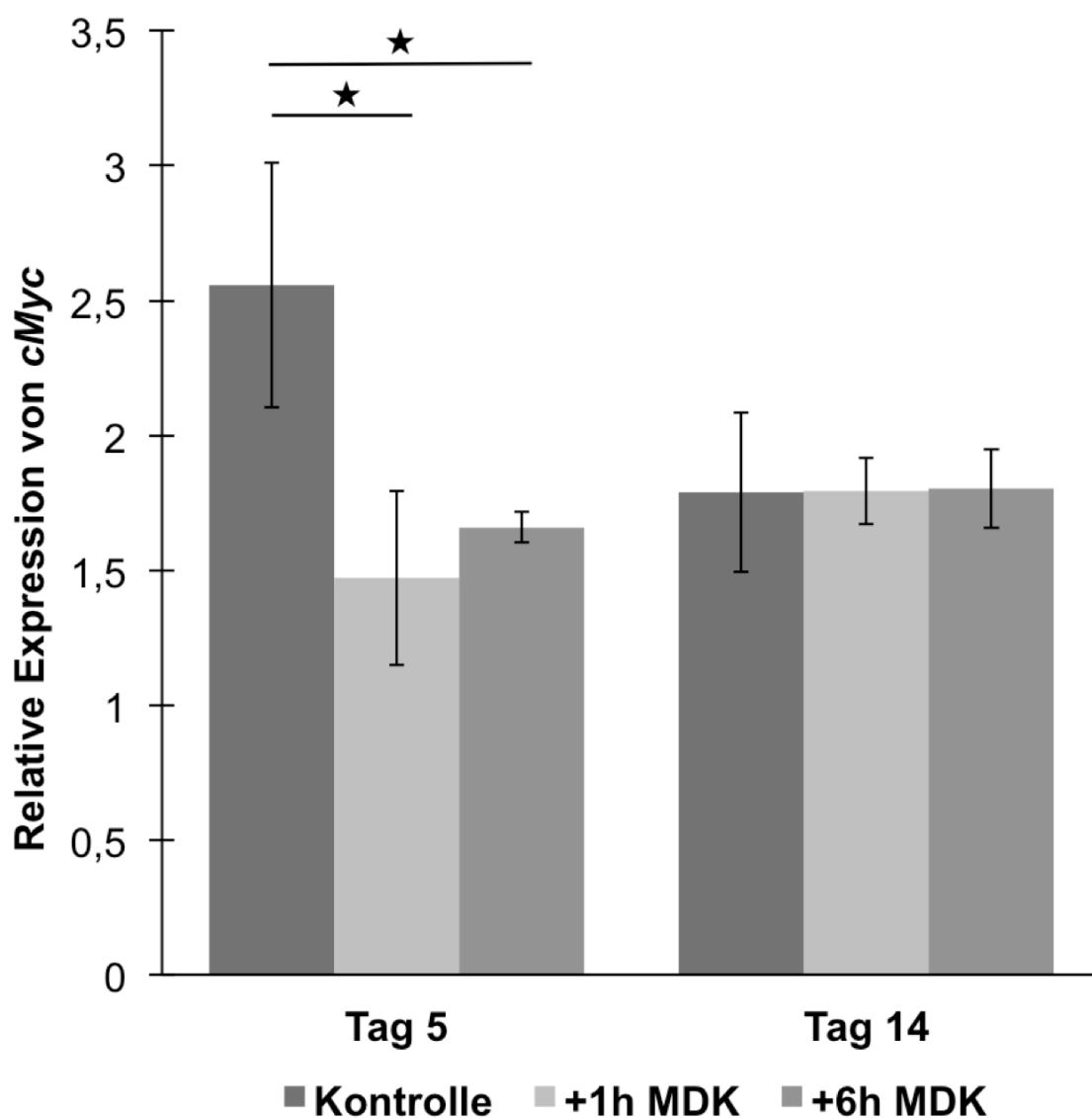


Abbildung 31: Relative Expression von *cMyc* in mesenchymalen Zellen der Linie C3H10T1/2 nach Stimulation mit rekombinantem Midkine (MDK) für 1 Stunde bzw. 6 Stunden an Tag 5 und Tag 14 der Differenzierung. * Signifikanzwert $p < 0,05$

Im Vergleich der beiden unstimulierten Kontrollen an Tag 5 und Tag 14 der Differenzierung konnten wir eine signifikant reduzierte Expression von *cMyc* am Tag 14 feststellen. Weiterhin konnten wir am Tag 5 der Differenzierung sowohl nach 1 Stunde also auch nach 6 Stunden Stimulation mit rekombinantem MDK eine signifikante Verminderung der relativen Expression von *cMyc* beobachten. Dieser Effekt von exogenem MDK auf die *cMyc*-Expression war am Tag 14 der Differenzierung jedoch nicht mehr festzustellen.

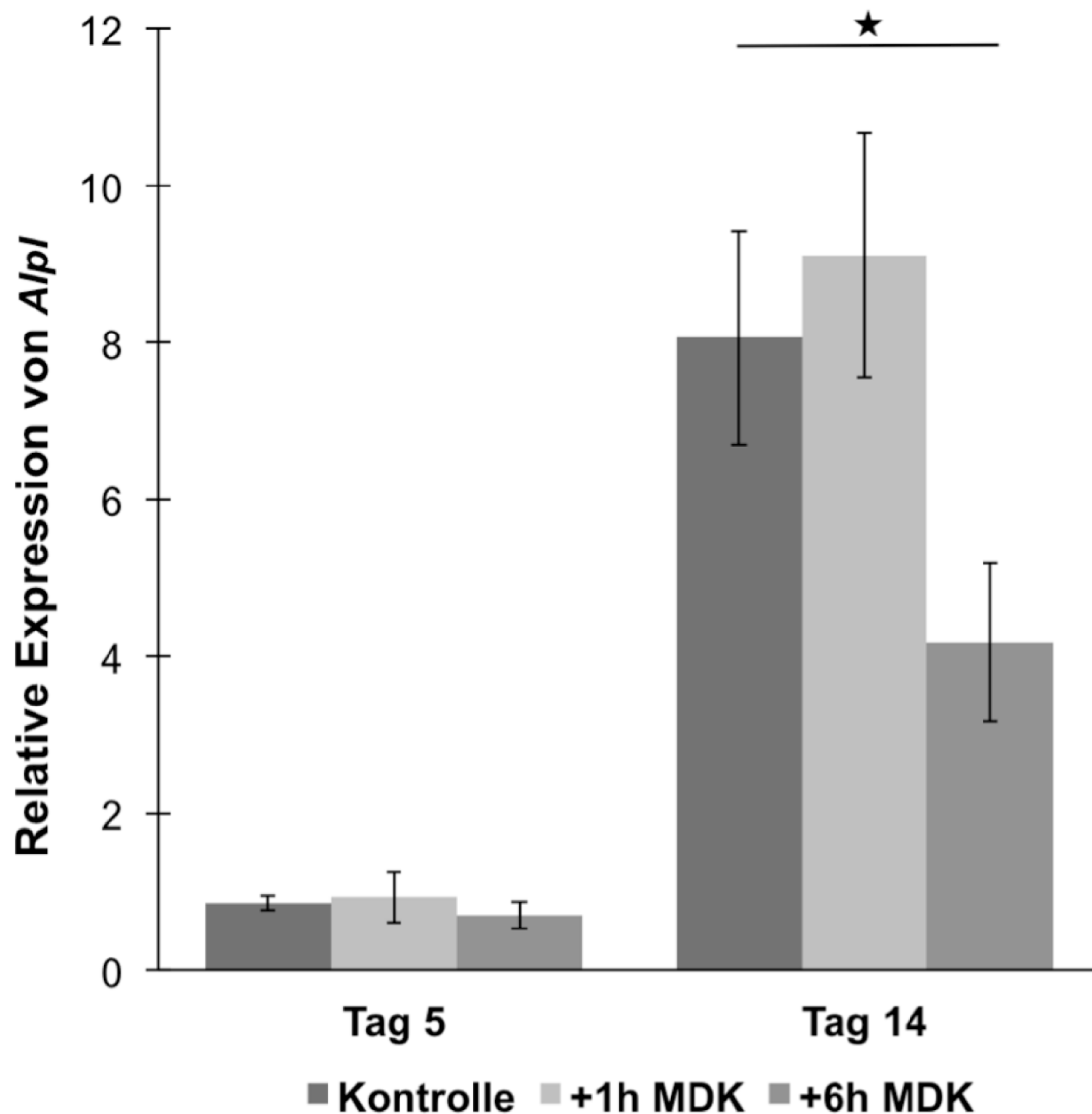


Abbildung 32: Relative Expression von *human alkaline phosphatase gene (Alpl)* mesenchymaler Zellen der Linie C3H10T1/2 nach Stimulation mit rekombinantem Midkine (MDK) für 1 Stunde bzw. 6 Stunden an Tag 5 und Tag 14 der Differenzierung. * Signifikanzwert $p < 0,05$.

Die Daten der Expressionsanalysen des Gens *Alpl* zeigten zwischen Tag 5 und Tag 14 der Differenzierung der mesenchymalen Zelllinie einen signifikanten Anstieg der relativen Expression. Während wir am Tag 5 in Abhängigkeit der

Dauer der Stimulation mit rekombinantem MDK keine Veränderung der *Alpl*-Expression beobachten konnten, stellten wir am Tag 14 der Differenzierung nach 6 Stunden Stimulation mit rekombinantem MDK eine statistisch signifikante Reduktion der Genexpression fest.

4 Diskussion

Der Wachstumsfaktor MDK greift in die Regulation unterschiedlichster Prozesse ein, so wird u.a. ein Einfluss auf die Migration von inflammatorischen Zellen, die Regulation der Gefäßneubildung und die Regulation apoptotischer Vorgänge beschrieben [80, 106]. In anderen Studien konnte ein Einfluss des Wachstumsfaktors auf die Regeneration von Skelettmuskulatur nachgewiesen werden [42]. Bezüglich des Knochengewebes konnte gezeigt werden, dass der Mangel des Wachstumsfaktors *Mdk in-vivo* zu einer erhöhten trabekulären Knochenmasse in 12 und 18 Monate alten *Mdk*-defizienten Mäusen führt [84]. Weiterhin hatte die *Mdk*-Defizienz *in-vivo* einen anabolen Effekt auf das mechanisch induzierte kortikale Knochenremodeling [61]. Darüber hinaus ließ sich eine Expression von *Mdk in-vivo* auch während der Frakturheilung von Wildtyp-Mäusen nachweisen [86].

Ziel dieser Arbeit war es nun, aufbauend auf die oben genannten Studien, den Effekt der *Mdk*-Defizienz auf die Knochenheilung zu untersuchen. Hierfür wurde ein murines Frakturheilungsmodell verwendet, dessen Versuchstiere in einem standardisierten Verfahren in der Mitte der rechten Femurdiaphyse osteotomiert und anschließend mit einem Fixateur externe versorgt wurden. Dabei wurden sowohl Wildtyp-Tiere als auch *Mdk*-defiziente Tiere an verschiedenen postoperativen Untersuchungszeitpunkten auf mögliche Unterschiede in der Frakturheilung untersucht.

In den histomorphometrischen Auswertungen des Frakturheilungsmodells konnten wir keinen Hinweis auf eine veränderte Knochenbildung während der Frakturheilung *Mdk*-defizienter Mäuse feststellen [32]. So konnte an Tag 10 und 21 der Knochenheilung kein signifikanter Unterschied im Knochengewebsanteil zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Ebenso wenig unterschieden sich die Anzahl der Osteoblasten und Osteoklasten am Tag 21 der Knochenheilung. Allerdings konnten wir eine Verzögerung der Chondrogenese *Mdk*-defizienter Mäuse beobachten, die sich zunächst in einem geringeren Anteil an Knorpelgewebe an Tag 10 und später in einem erhöhten Knorpelgewebsanteil am Tag 21 der Frakturheilung der *Mdk*-defizienten Mäuse widerspiegelte. Dieser erhöhte Knorpelanteil am Tag 21 machte sich auch in den schlechteren biomechanischen Eigenschaften des Frakturkallus der *Mdk*-defizienten Tiere bemerkbar. Im weiteren Verlauf hatten diese Unterschiede in der Chondrogenese

jedoch keinen Einfluss auf die spätere Phase (Tag 28) der Frakturheilung, in der wir keine Unterschiede bzgl. der Histomorphometrie und Biegesteifigkeit des Kallusgewebes mehr zwischen den beiden Genotypen feststellen konnten [32]. Damit deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass sich die *Mdk*-Defizienz in unserem Frakturheilungsmodell möglicherweise weniger auf die osteogenen als auf die chondrogenen Prozesse während der Knochenheilung auswirkt.

4.1 Ergebnisse des immunhistologischen Nachweises von Midkine im Frakturheilungsmodell

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war die Detektion von MDK *in-vivo* im Verlauf der Frakturheilung. Dafür führten wir einen immunhistologischen Nachweis von MDK in unserem Frakturheilungsmodell am 4., 10. und 21. postoperativen Tag durch.

Dabei beobachteten wir am Tag 4 der Frakturheilung in wenigen Versuchstieren eine positive MDK-Immunreaktion. Der schwach positive Nachweis beschränkte sich dabei auf spindelförmige Zellen, vermutlich mesenchymalen Ursprungs, im periostalen Gewebe in näherer Umgebung des Frakturspalt. Im Verlauf der Frakturheilung konnte eine deutliche Zunahme an MDK-positiven Zellen beobachtet werden. So zeigten am Tag 10 der Frakturheilung vor allem die reifen bzw. hypertrophen Chondrozyten in dem sich ausbildenden Kallus eine starke *Mdk*-Expression. Mit zunehmender Ossifikation des knorpeligen Kallus reduzierte sich die Anzahl der MDK-positiven chondrozytären Zellen. Am Tag 21 der Frakturheilung fanden sich dementsprechend nur noch vereinzelt MDK-positive Chondrozyten in den Bereichen, in denen die Ossifikation noch nicht vollständig abgeschlossen war.

Damit konnten wir die Ergebnisse einer Frakturheilungsstudie der Arbeitsgruppe um Ohta et al. an 10 Wochen alten Mäusen mit einer intramedullär versorgten Tibiafraktur bestätigen. Denn auch Ohta et al. konnten eine starke *Mdk*-Expression in Chondrozyten am Tag 7 der Frakturheilung feststellen, die sich am Tag 14 deutlich reduzierte bis sie am Tag 28 schließlich kaum noch nachzuweisen war. Auch während der frühen Phase der Knochenheilung (Tag 4) konnten Ohta et al. MDK immunhistologisch nur in einigen spindelförmigen Zellen nachweisen [86]. Insbesondere durch die Beobachtung des Expressionsmusters von *Mdk* in differenzierten und hypertrophen Chondrozyten konnten beide Arbeiten zeigen,

dass MDK eine wichtige Rolle in der Chondrogenese während der Frakturheilung spielt.

Andere Studien beobachteten ebenfalls eine verstärkte Expression von *Mdk* als Reaktion auf Gewebsverletzungen, z.B. im Rahmen von Ischämie des Herzmuskels, des Gehirns oder der Nieren [38, 107]. Die Expression von *Mdk* wird dabei durch verschiedene Faktoren reguliert. So erklärt man sich beispielsweise die verstärkte *Mdk*-Expression nach ischämischen Reperfusionsschäden bzw. die *Mdk*-Überexpression in malignen Tumoren zum Teil durch das Vorhandensein eines Hypoxie-Response-Elements in der Promotorregion von *Mdk* [100]. In Regionen des Frakturkallus mit enchondraler Ossifikation liegen ebenfalls hypoxische Bedingungen vor [16], sodass die beobachtete, starke *Mdk*-Expression in hypertrophen Chondrozyten durch einen ähnlichen Mechanismus bedingt sein könnte.

Wie schon beschrieben ist MDK an der Regulation einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt. Eine zentrale Funktion von MDK im Bezug auf die Knochenheilung könnte dabei v.a. der Einfluss auf das Überleben von Zellen, die MDK-abhängige Migration verschiedener Zellpopulationen, z.B. osteoblastärer und inflammatorischer Zellen und die Regulation der Expression von Mineralisationsproteinen sein [61, 84, 107]. Diese Funktionen werden u.a. über den Rezeptor PTPR ζ vermittelt, einer der am besten beschriebenen Komponente des MDK-Rezeptorkomplexes. PTPR ζ vermittelt u.a. die MDK-abhängige Migration von osteoblastären Zellen und die anti-apoptotische Wirkung von MDK [92, 105]. Im Zusammenspiel mit Molekülen der LRP-Familie bildet sich möglicherweise ein Rezeptorkomplex, der u.a. auch modulierenden Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin-Signalweg nehmen könnte. Auf diesem Wege könnte beispielsweise die Differenzierung osteoblastärer Zellen durch MDK beeinflusst werden [61]. Dies ist besonders interessant, da auch wir eine starke Expression von *Mdk* v.a. im Bereichen des knorpeligen Kallus fanden, wo im weiteren Verlauf der Knochenheilung osteoblastäre Zellen die Mineralisation der EZM vorantrieben. Die am Tag 4 der Frakturheilung registrierte *Mdk*-Expression innerhalb des reaktiv verdickten Periosts könnte ebenfalls zur Migration osteoblastärer und inflammatorischer Zellen beitragen.

4.2 Ergebnisse der Expression von Mineralisationsproteinen im Frakturheilungsmodell

In vorangegangenen Studien konnte bereits ein anaboler Effekt der *Mdk*-Defizienz auf den kortikalen Knochen nachgewiesen werden. Eine wichtige Rolle für die gesteigerte Osteoblastenfunktion der *Mdk*-defizienten Zellen könnte dabei die Beeinflussung des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs spielen [61]. Andere Studien konnten osteoblastäre Mineralisationsproteine, wie z.B. *Enpp1*, *Dmp1* und *Ank*, durch genomweite Expressionsanalysen an primären Osteoblasten aus Mauskalvarien als MDK-induzierte Gene identifizieren. Weiterhin wurde festgestellt, dass *Mdk*-defiziente mesenchymale Zellen während der Differenzierung eine geringere Expression von *Ank* und *Enpp1* aufwiesen [84]. Daher war es ein Ziel dieser Studie den Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf die Expression wichtiger Mineralisationsproteine *in-vivo* während der Frakturheilung zu analysieren.

Untersucht wurde hierfür das örtliche und zeitliche Verteilungsmuster der DMP1- bzw. ENPP1-Expression in diaphysären Femurfrakturen im Mausmodell von Wildtyp-Tieren und *Mdk*-defizienten Tieren.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass DMP1 *in-vitro* die Formation von Hydroxylapatit durch Bindung von Kalzium begünstigt und damit die Bildung von mineralisiertem Gewebe initiieren kann [34]. Außerdem führt eine Überexpression von *Dmp1* *in-vitro* zu einer beschleunigten Mineralisationsrate osteoblastärer Zellen, woraufhin postuliert wurde, dass DMP1 auch *in-vivo* eine wichtige Rolle in der Mineralisation von Knochengewebe spielen könnte [83]. Eine Studie von Toyosawa et al. berichtete, dass *Dmp1* (mRNA) im Knochengewebe hauptsächlich in Osteozyten und nicht in Osteoblasten nachzuweisen sind [118]. Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass auch Osteoblasten und hypertrophe Chondrozyten *Dmp1* (mRNA) exprimieren [24].

Wir konnten in unseren immunhistologischen Untersuchungen DMP1 ebenfalls in Osteozyten und ihrer umliegenden EZM nachweisen. Dabei zeigte sich eine besonders starke Expression des Proteins in den Osteozyten des neugebildeten Geflechtknochens, der sich damit deutlich stärker positiv färbte als das Gewebe der Femurkortikalis. Daneben färbten sich auch vereinzelt osteoblastäre Zellen und Chondroblasten an. Damit bestätigten wir im Wesentlichen die Ergebnisse einer weiteren Frakturheilungsstudie von Toyosawa et al., die das

Verteilungsmuster von DMP1 in Tibiafrakturen an 5 Wochen alten Mäusen durch *Northern-blotting*, *In-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie untersuchten [117]. Auch Toyosawa et al. wiesen eine starke DMP1-Immunreaktion in Osteozyten und der neuformierten Knochenmatrix während Tag 7 und 14 der Knochenheilung nach. Ein ähnliches Expressionsmuster konnte während der folgenden Phase des *Remodelings* allerdings mit deutlich reduzierter Intensität beobachtet werden [117]. Diese Ergebnisse tragen weiterhin unterstützend dazu bei, dass DMP1 an der Regulation der Mineralisation in der Phase des *Remodelings* der Frakturheilung beteiligt ist.

Im Gegensatz zu DMP1 hat ENPP1 sowohl einen hemmenden als auch einen fördernden Einfluss auf die Bildung von Hydroxylapatit [115]. ENPP1 wird dabei im Knochen hauptsächlich auf der Oberfläche von Osteoblasten und Chondrozyten sowie der Membranen ihrer Matrixvesikel exprimiert [114]. Es wird angenommen, dass ENPP1 ebenfalls essentiell für die normale Knochenentwicklung und die Regulation der physiologischen Mineralisation ist. So zeigten Mäuse mit *Enpp1-loss-of-function*-Mutationen in der Folge Erkrankungen mit ektopen Gewebsskalzifikationen und Hyperostosen [63, 68, 87]. Jedoch wurde in diesen Mäusen auch ein Verlust der trabekulären Knochendichte sowie eine Reduktion des zirkulierenden Phosphat- und Kalziumspiegels dokumentiert [67]. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf eine ebenfalls verstärkte Expression von FGF23 in den *Enpp1*-defizienten Mäusen zurückzuführen. FGF23 wird von Osteozyten exprimiert und ist ein Regulator der Phosphatreabsorption und der Vitamin-D-Synthese im proximalen Tubulus der Niere [64].

Auch wir konnten in unserer Frakturheilungsstudie die Expression von *Enpp1* im Bereich der Zellmembranen von Osteoblasten und Chondrozyten und in ihrer EZM nachweisen. Dabei zeigte sich eine besonders starke Färbung im Bereich osteoblastärer Zellen am Rande der neugebildeten Knochenmatrix am Tag 10 und 21 der Frakturheilung. Dagegen konnte in der kortikalen Matrix des Femurschaftes unserer Versuchstiere keine Expression von *Enpp1* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu *Dmp1*, das hauptsächlich durch Osteozyten exprimiert wird, lässt sich ENPP1 jedoch vor allem in der Umgebung von Osteoblasten und Chondrozyten nachweisen. Hier könnte es u.a. für die geregelte Bildung von HA in der EZM verantwortlich sein. Dafür spricht, dass sich ENPP1 vor allem in der EZM an der Oberfläche der neuen Knochentrabekel wiederfindet, die sich durch appositionelles Wachstum auszeichnen.

Inwieweit MDK einen Einfluss auf die Expression von *Dmp1* und *Enpp1* hat, untersuchten Neunaber et al. in ihren Experimenten. So zeigten primäre Osteoblasten aus Mauskalvarien eine signifikant höhere Expression von *Dmp1* und *Enpp1* bei gleichzeitiger Reduktion der *Alpl*-Expression nach Stimulation der Zellen mit rekombinantem MDK [84]. In weiteren Genexpressionsanalysen untersuchten Neunaber et al. primäre, osteoblastäre Knochenmarksvorläuferzellen aus *Mdk*-defizienten Mäusen. Diese *Mdk*-defizienten Zellen zeigten im Laufe ihrer Differenzierung eine signifikant höhere Expression von *Alpl* bei unveränderter *Dmp1*- und *Enpp1*-Expression und sogar verminderter *Ank*-Expression. Neunaber et al. sehen in der reduzierten Expression der korrespondierenden Proteine in den *Mdk*-defizienten Osteoblasten eine mögliche Erklärung für den Knochenphänotyp der *Mdk*-defizienten Mäuse [84].

Aufgrund dieser Erkenntnisse aus *in-vitro* Experimenten, untersuchten wir in dieser *in-vivo* Frakturheilungsstudie *Mdk*-defiziente Mäuse hinsichtlich des *Dmp1*- bzw. *Enpp1*-Expressionsmusters. Dabei konnten wir jedoch im Vergleich zu den untersuchten Wildtypen in den immunhistologischen Färbungen zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied in der Expression der beiden Proteine feststellen. Damit ließ sich keine Schlüsselrolle von MDK in der komplexen Regulation dieser Mineralisationsproteine in unserem Frakturheilungsmodell nachweisen. Jedoch muss man berücksichtigen, dass der immunhistologische Nachweis der Proteine nur eine begrenzte Aussage über die quantitativen Unterschiede bezüglich der Expression der untersuchten Proteine zulässt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass während der Frakturheilung eine starke Expression der Mineralisationsproteine DMP1 und ENPP1 festzustellen ist. Der in dieser Frakturheilungsstudie durchgeführte immunhistologische Nachweis der beiden Mineralisationsproteine war besonders während der Phase der Kallusbildung und der frühen Phase des Knochenremodelings stark positiv. Dabei beobachteten wir die Expression von DMP1 in unserem Frakturmodell vor allem in Osteozyten und ihrer umliegenden EZM, während ENPP1 hauptsächlich von osteoblastären und chondrogenen Zellen exprimiert wurde. Beide Mineralisationsproteine scheinen auf Grund des beobachteten spatio-temporalen Expressionsmusters in der Frakturheilung eine wichtige Rolle zu spielen, jedoch konnten wir keinen Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf die Expression dieser beiden Mineralisationsproteine in unserem murinen Frakturheilungsmodell feststellen.

4.3 Ergebnisse des Nachweises inflammatorischer Zellen im Frakturheilungsmodell

Weiterhin von Interesse für diese Studie war der Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf die Zellen der inflammatorischen Phase der Knochenheilung, wie z.B. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Sie sind die ersten Zellen, die innerhalb der frühen Stunden nach Fraktur in großer Zahl in das Frakturhämatom einwandern [14]. Zum einen initiieren und verstärken sie die lokale Entzündungsreaktion, u.a. durch die Sezernierung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, zum anderen fördern sie die Migration von osteoblastären und chondrozytären Zellen [16].

Eine Reihe von Studien untersuchte bereits den Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die Frakturheilung [5, 14, 95]. Dabei konnte man eine verzögerte Frakturheilung bei erhöhter Anzahl neutrophiler Granulozyten beobachten. Beispielsweise zeigten Ratten im Rahmen einer systemischen Inflammation nach Thoraxtrauma eine eingeschränkte Knochenheilung im Vergleich zu Ratten mit isolierter Fraktur ohne begleitendes Thoraxtrauma [96]. Andere Studien beschäftigten sich wiederum mit den Folgen einer Neutrophilen-Depletion auf die Knochenheilung [31, 65]. Chung et al. konnten so durch ihre Arbeit zeigen, dass eine Depletion der neutrophilen Granulozyten zu einer verstärkten Osteoblastogenese und einer reduzierten Chondrogenese führt [14]. Schließlich konnte in Studien an ischämisch bzw. toxisch-geschädigtem Nierengewebe ein fördernder Einfluss von MDK auf die Migration neutrophiler Granulozyten gezeigt werden [49, 107].

Neben den neutrophilen Granulozyten spielen auch die Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Frakturheilung. So zeigte eine Frakturheilungsstudie an Mäusen mit einer Defizienz des Chemokinrezeptor Typ 2, der für die Rekrutierung von Makrophagen verantwortlich ist, eine verzögerte Frakturheilung [120]. Welchen Einfluss schließlich MDK auf die Migration von Makrophagen haben könnte, zeigte eine weitere Studie. Untersucht wurde die Degeneration und Regeneration nach Traumata der Skelettmuskulatur. Dabei scheint die *Mdk*-Defizienz nicht nur eine verzögerte Regeneration des Muskelgewebes sondern auch eine verzögerte Migration von Makrophagen zur Folge zu haben [42]. So beobachteten Ikutomo et al. an Tag 3 nach Trauma eine signifikant geringer

Anzahl von Makrophagen im Bereich der Verletzung in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe [42].

Da wir in dieser Studie ebenso wie Ohta et al. bereits eine gewisse *Mdk*-Expression in der frühen Phase der Knochenheilung nachweisen konnten, war es ein Ziel dieser Arbeit den Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf die Anzahl inflammatorischer Zellen wie z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen zu untersuchen. Dabei beobachteten wir in den *Mdk*-defizienten Mäusen am Tag 4 der Knochenheilung signifikant weniger und an Tag 10 signifikant mehr Makrophagen als in den Wildtyp-Tieren. Damit bestätigten wir die Ergebnisse von Ikutomo et al., der in der Gruppe *Mdk*-defizienter Tiere ebenfalls eine verzögerte Migration von Makrophagen im Rahmen von Traumata der Skelettmuskulatur beobachten konnten [42].

Im Falle der neutrophilen Granulozyten beobachteten wir am Tag 4 der Knochenheilung tendenziell mehr neutrophile Granulozyten in den *Mdk*-defizienten Mäusen als in den Wildtyp-Tieren. Diese Beobachtung scheint zunächst im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kawai et al. und Sato et al. zu stehen, die einen positiven Effekt von MDK auf die Migration von neutrophilen Granulozyten feststellen konnten [49, 107]. Jedoch handelt es sich hierbei lediglich um die Betrachtung zu einem einzigen Untersuchungszeitpunkt, womit keine Aussage bezüglich einer Veränderung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Verlauf der Knochenheilung gemacht werden kann. Darüber hinaus handelt es sich um einen vergleichsweise späten Zeitpunkt in der Frakturheilung. So beobachteten beispielsweise Recknagel et al. am Tag 3 nach Trauma bereits eine deutlich rückläufige Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu früheren Untersuchungszeitpunkten [95, 96]. Die Neutrophilenanzahl pro mm² in den *Mdk*-defizienten Tieren am Tag 4 unserer Studie war eher mit der Zellzahl der Wildtyp-Mäuse anderer Studien zu früheren Zeitpunkten der Frakturheilung vergleichbar [65]. Es könnte somit durchaus sein, dass wir genau wie im Falle der Makrophagen auch bei den neutrophilen Granulozyten eine verzögerte Migration der neutrophilen Granulozyten in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Mäuse beobachteten. Ein weiterer, früherer Untersuchungszeitpunkt wäre zu Unterstützung dieser These sinnvoll gewesen.

Möglicherweise ist die verspätete Rekrutierung der inflammatorischen Zellen auch eine Erklärung für die in dieser Studie beobachtete verzögerte frühe

Frakturheilung in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Mäuse. So konnte in anderen Frakturheilungsstudien eine Unterstützung der Knochenheilung durch Makrophagen nachgewiesen werden [2]. Eine Studie zur Heilung von Knorpelverletzungen der Wachstumsfuge konnte auch für die neutrophilen Granulozyten einen Einfluss auf die Regulation von Zielgenen der Chondrogenese und Osteogenese feststellen. So konnte nach systemischer Reduktion der neutrophilen Granulozyten eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *cbf-alpha1* und des Mineralisationsproteins *Osteocalcin* sowie eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors *Sox-9* und von Kollagen-II nachgewiesen werden [14].

Zusammengefasst beobachteten wir eine durch die *Mdk*-Defizienz bedingte verzögerte Migration inflammatorischer Zellen während der frühen Phase der Frakturheilung.

4.4 Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchungen mesenchymaler Zellen

Es konnten bereits eine Vielzahl von Funktionen von MDK in unterschiedlichen Geweben festgestellt werden. Hierfür werden verschiedene Rezeptormoleküle verantwortlich gemacht, wie z.B. *Ptprζ*, *Alk*, *Notch2*, *Lrp1* und *Nucleolin*. MDK könnte so durch Bindung an diese Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder im Zytoplasma der Zellen wirken [47]. Liedert et al. konnten z.B. einen negativen Effekt von rekombinantem MDK auf Zielgene des Wnt/β-Catenin-Signalwegs feststellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor PTPRζ in diesem Zusammenhang einen modulierenden Einfluss auf den Wnt/β-Catenin-Signalweg hat [61]. Auch auf chondrogene Zellen scheint MDK einen Einfluss zu haben. So konnte durch Knockdown von *Mdk* eine verzögerte Differenzierung chondrogener Zellen festgestellt werden, während eine Überexpression von *Mdk* zu einer verbesserten Chondrogenese führte [32, 86]. Experimente an ATDC5-Zellen, die durch exogen hinzugefügtes, rekombinantes MDK stimuliert wurden, zeigten jedoch keine Verbesserung der Chondrogenese [86]. Auf der anderen Seite konnte in neueren Studien durch rekombinantes MDK die Proliferation von Gelenkknorpelzellen *in-vitro* gesteigert werden [121]. Genaue Wirkmechanismen, die diese Effekte erklären bleiben jedoch unbekannt.

In unseren immunhistologischen Untersuchungen beobachteten wir ebenso wie Ohta et al. eine gewisse MDK-Expression auch in mesenchymalen Vorläuferzellen. Ziel unserer in-vitro Experimente war es daher mesenchymale Zellen der Zelllinie C3H10T1/2 bezüglich der Expression potentieller MDK-assoziiierter Rezeptoren zu untersuchen. Darüber hinaus sollte der Einfluss von rekombinantem MDK auf die Expression möglicher Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beleuchtet werden.

Auffallend war bei unserer Analyse der Expression möglicher Rezeptormoleküle vor allem die starke Expression der Gene *Lrp1* und *Alk* in den mesenchymalen Zellen. LRP1 konnte bereits in vorangegangenen Studien als potentieller MDK-Rezeptor identifiziert werden. So konnte gezeigt werden, dass MDK durch Bindung an LRP1 und das Shuttle-Protein Nucleolin anti-apoptotische Effekte reguliert [109]. Dabei scheint LRP1 nicht nur eine Rolle in der Steuerung von anti-apoptotischen Signalen eine Rolle zu spielen, sondern auch in der Chondrogenese. So gibt es Hinweise, dass LRP1 zusammen mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg entscheidend zur Reifung der Chondrozyten während der enchondralen Knochenheilung beiträgt. Dabei scheint LRP1 eine Schlüsselrolle im Zusammenspiel mit WNT und PTPR ζ zu spielen [50]. Auch ALK wurde bereits als einer der möglichen MDK-Rezeptoren beschrieben [110]. In Zusammenhang mit MDK wurde ALK bisher vor allem mit der Proliferation von neurogenen Zellen gebracht. So beschreiben Reiff et al. sowohl durch Knockdown von *Alk* als auch von *Mdk* eine unterdrückte Proliferation sympathischer Nervenfasern [99]. Die genaue Beziehung zwischen MDK und ALK bzw. deren Signalkaskaden bleiben jedoch weiterhin unbekannt.

In anderen Experimenten zeigte die Stimulation von osteoblastären Zellen mit exogenem MDK einen negativen Einfluss auf die Expression von Wnt-Zielgenen. So konnte eine reduzierte Expression von *Alpl* und *c-Fos* in MC3T3-Zellen nach Stimulation mit rekombinantem MDK nachgewiesen werden [61]. Diese modulierende Wirkung auf die Expression von osteoblastären Zielgenen wird in Zusammenhang mit dem Rezeptorkomplex LRP6 und PTPR ζ gebracht [56, 61]. In unseren Experimenten konnten wir ähnliche Effekte auch in unseren mesenchymalen Zellen nachweisen. So beobachteten wir eine Abnahme der Expression von *cMyc* am Tag 5 und von *Alpl* am Tag 14 der Differenzierung der Zelllinie C3H10T1/2 nach Stimulation mit rekombinantem MDK.

MDK scheint auch auf die Regulation der Chondrogenese Einfluss zu nehmen. So konnte durch *Knockdown* von *Mdk* eine reduzierte Expression der Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auch in chondrogenen Zellen nachgewiesen werden. Allerdings scheint eine exogene Stimulation mit rekombinantem MDK, im Gegensatz zu erwähnten Beobachtung bei osteoblastären Zellen, keinen Einfluss auf chondrogene Zellen zu haben [32]. Man könnte daraus schließen, dass der Einfluss von MDK auf die chondrogenen Zellen eher über das intrazelluläre Kompartiment vermittelt wird, während es im Falle der osteoblastären Zellen vor allem im extrazellulären Raum modulierend wirkt. Eine solche Theorie würde eine weitere Erklärung für die in dieser Studie beobachtete verzögerte Chondrogenese in der Gruppe der *Mdk*-defizienten Tiere liefern und ebenfalls erklären, warum kein Unterschied in der Osteogenese festgestellt werden konnte.

Es bleibt festzuhalten, dass auch mesenchymale Vorläuferzellen Rezeptormoleküle exprimieren, die in Zusammenhang mit MDK gebracht werden. Insbesondere LRP1 könnte hier eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin scheint rekombinantes MDK ebenso wie in osteoblastären Zellen auch in mesenchymalen Zellen einen negativen Einfluss auf Zielgene des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zu haben.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass der Wachstumsfaktor MDK eine wichtige Rolle in der Frakturheilung spielt. So zeigen *Mdk*-defiziente Mäuse neben ihrem veränderten Knochenphänotyp eine verzögerte frühe Phase der Frakturheilung, die sich vor allem durch eine verzögerte Chondrogenese und eine verzögerte inflammatorische Antwort auszeichnet. Demgegenüber konnte zum späteren Zeitpunkt der Frakturheilung kein Unterschied mehr zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden.

Andere Studien zeigten bereits, dass die *Mdk*-Defizienz einen positiven Einfluss auf das Knochenremodeling und auf den Knochenphänotyp hat [61, 84]. In dieser Arbeit ergaben sich Hinweise auf einen negativen Einfluss der *Mdk*-Defizienz auf die Chondrogenese und die Inflammation während der frühen Phase der Frakturheilung [32]. Diese verschiedene Wirkungsweise könnte dabei auf unterschiedlichen Expression von Rezeptorgen in den Zelltypen beruhen. Dabei scheint es auch eine Rolle zu spielen, ob sich MDK im extrazellulären oder im intrazellulären Kompartiment befindet.

Um dies genauer beurteilen zu können zeigt sich das in dieser Arbeit gewählte Frakturmodell der *Mdk*-defizienten Maus nur zum Teil geeignet. Es bedarf vielmehr weiterer Frakturheilungsstudien mit z.B. spezifischen MDK-Antagonisten um die unterschiedlichen Wirkungsweisen von MDK herausarbeiten zu können. Solche Antikörper könnten schließlich auch als Therapeutikum zur Behandlung von Patienten mit verzögerter Frakturheilung zum Einsatz kommen.

5 Zusammenfassung

Die Versorgung von Frakturen in der Medizin hat sich in den letzten Jahren stetig verbessert. Dennoch sind orthopädische Komplikationen, wie z.B. eine verzögerte Frakturheilung, eine lange Immobilität nach Fraktur oder die Ausbildung von Pseudoarthrosen in unserer alternden Gesellschaft ein weiterhin bestehendes Problem. Vor diesem Hintergrund gilt es, pharmakologische Ansatzpunkte zur Verbesserung der Frakturheilung zu identifizieren. Als einen solchen Ansatzpunkt untersuchten wir den Wachstumsfaktor Midkine während der Frakturheilung.

Hierfür verwendeten wir ein murines Frakturheilungsmodell, das in einem standardisierten Operationsverfahren im Bereich der Femurdiaphyse osteotomiert und anschließend osteosynthetisch versorgt wurde. Anschließend wurde der Frakturkallus *Midkine*-defizienter Mäuse mit dem von Wildtyp-Mäusen mit Hilfe immunhistologischer Methoden verglichen. Darüber hinaus wurden mesenchymale Zellen auf die Expression spezifischer Rezeptormoleküle sowie auf den Einfluss von rekombinanten Midkine untersucht.

Zunächst konnten wir zeigen, dass Midkine v.a. während der frühen Phase der Frakturheilung in mesenchymalen Vorläuferzellen und chondrogenen Zellen exprimiert wird. Im Vergleich der *Midkine*-defizienten Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen konnten wir hinsichtlich der Expression von Mineralisationsproteinen während der Knochenheilung keinen Unterschied feststellen. Jedoch zeigten die *Midkine*-defizienten Mäuse während der frühen Phase der Frakturheilung eine im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen verzögerte inflammatorische Antwort. Während andere Studien vor allem eine anabole Wirkung der *Midkine*-Defizienz auf den Knochen nachweisen konnten, scheint sich die *Midkine*-Defizienz in unserer Frakturheilungsstudie auf die inflammatorische Phase während der Knochenheilung auszuwirken.

In unseren *in-vitro* Versuchen an mesenchymalen Zellen konnten wir vorausgegangene Experimente an osteoblastären Zellreihen bestätigen. Darüber hinaus ergaben sich weitere Hinweise, dass spezifische Expressionsmuster der Rezeptoren auf den verschiedenen Zelltypen für die Vermittlung der intrazellulären bzw. extrazellulären Wirkung von Midkine verantwortlich sein könnten.

Es bleibt festzuhalten, dass Midkine eine wichtige Rolle während der inflammatorischen Phase der Frakturheilung spielt. Weitere Frakturheilungsstudien z.B. mit spezifischen Antikörpern werden zeigen, ob sich der Wachstumsfaktor

Midkine als therapeutischer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Knochenheilung eignen wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Ai-Aql, Z. S., Alaghl, 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)
2. Alexander, K. A., Chang, M. K., Maylin, E. R., Kohler, T., Muller, R., Wu, A. C., Van Rooijen, N., Sweet, M. J., Hume, D. A., Raggatt, L. J., & Pettit, A. R.: Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res* 26: 1517-1532 (2011)
3. Barnes, G. L., Kostenuik, P. J., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A.: Growth factor regulation of fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 1805-1815 (1999)
4. Baron, R., & Kneissel, M.: WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 19: 179-192 (2013)
5. Bastian, O., Pillay, J., Alblas, J., Leenen, L., Koenderman, L., & Blokhuis, T.: Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 89: 669-673 (2011)
6. Beck, C., Morbach, H., Stenzel, M., Schneider, P., Collmann, H., Girschick, G., & Girschick, H. J.: Hypophosphatasia. *Klinische Padiatrie* 221: 219-226 (2009)
7. Bhatia, A., Albazzaz, M., Espinoza Orias, A. A., Inoue, N., Miller, L. M., Acerbo, A., George, A., & Sumner, D. R.: Overexpression of DMP1 accelerates mineralization and alters cortical bone biomechanical properties in vivo. *J Mech Behav Biomed Mater* 5: 1-8 (2012)
8. Bourguine, A., Pilet, P., Diouani, S., Sourice, S., Lesoeur, J., Beck-Cormier, S., Khoshniat, S., Weiss, P., Friedlander, G., Guicheux, J., & Beck, L.: Mice with Hypomorphic Expression of the Sodium-Phosphate Cotransporter PiT1/Slc20a1 Have an Unexpected Normal Bone Mineralization. *PLoS One* 8: (2013)
9. Boyden, L., Insogna, K., & Lifton, R. P.: High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5 - Reply. *New England Journal of Medicine* 347: 944 (2002)
10. Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-342 (2003)

11. Chen, Y., & Alman, B. A.: Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *J Cell Biochem* 106: 353-362 (2009)
12. Cheng, H. W., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N. L., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y., & He, T. C.: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 85A: 1544-1552 (2003)
13. 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 (2002)
14. 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 (2006)
15. Civitelli, R.: Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473: 188-192 (2008)
16. Claes, L., Recknagel, S., & Ignatius, A.: Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8: 133-143 (2012)
17. Cohen, M. M., Jr.: The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140: 2646-2706 (2006)
18. Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S., & Albina, J. E.: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83: 64-70 (2008)
19. Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., & Varanasi, S. S.: The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61: 577-587 (2008)
20. de Baat, P., Heijboer, M. P., & de Baat, C.: Development, physiology, and cell activity of bone. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 112: 258-263 (2005)
21. Dimitriou, R., Tsiridis, E., & Giannoudis, P. V.: Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36: 1392-1404 (2005)
22. Einhorn, T. A.: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 355: 7-21 (1998)
23. Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., Yu, X., Rauch, F., Davis, S. I., Zhang, S., Rios, H., Drezner, M. K., Quarles, L. D., Bonewald, L. F., & White, K. E.: Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and

- identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 38: 1310-1315 (2006)
24. Feng, J. Q., Zhang, J. H., Dallas, S. L., Lu, Y. B., Chen, S., Tan, X. Y., Owen, M., Harris, S. E., & MacDougall, M.: Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene. *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 1822-1831 (2002)
25. Festing, M. H., Speer, M. Y., Yang, H. Y., & Giachelli, C. M.: Generation of mouse conditional and null alleles of the type III sodium-dependent phosphate cotransporter PiT-1. *Genesis* 47: 858-863 (2009)
26. Gartner, L. P.: Textbook of Histology. 4. Auflage. Saunders Elsevier. 149-178 (2016)
27. Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., & Ferrara, N.: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* 5: 623-628 (1999)
28. Gerstenfeld, L. C., Cho, T. J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A.: 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 (2003)
29. 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. *Journal of Cellular Biochemistry* 88: 873-884 (2003)
30. Glass, D. A., 2nd, & Karsenty, G.: In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology* 148: 2630-2634 (2007)
31. Groggaard, B., Gerdin, B., & Reikeras, O.: The polymorphonuclear leukocyte: has it a role in fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 109: 268-271 (1990)
32. Haffner-Luntzer, M., Heilmann, A., Rapp, A. E., Beie, S., Schinke, T., Amling, M., Ignatius, A., & Liedert, A.: Midkine-deficiency delays chondrogenesis during the early phase of fracture healing in mice. *PLoS One* 9: (2014)
33. Harada, S., & Rodan, G. A.: Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349-355 (2003)

34. He, G., Dahl, T., Veis, A., & George, A.: Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* 2: 552-558 (2003)
35. Hessle, L., Johnson, K. A., Anderson, H. C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J. W., Terkeltaub, R., & Millan, J. L.: Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9445-9449 (2002)
36. Ho, A. M., Johnson, M. D., & Kingsley, D. M.: Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289: 265-270 (2000)
37. Holmen, S. L., Giambernardi, T. A., Zylstra, C. R., Buckner-Berghuis, B. D., Resau, J. H., Hess, J. F., Glatt, V., Bouxsein, M. L., Ai, M. R., Warman, M. L., & Williams, B. O.: Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6. *Journal of Bone and Mineral Research* 19: 2033-2040 (2004)
38. Horiba, M., Kadomatsu, K., Yasui, K., Lee, J. K., Takenaka, H., Sumida, A., Kamiya, K., Chen, S., Sakuma, S., Muramatsu, T., & Kodama, I.: Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation* 114: 1713-1720 (2006)
39. Hume, D. A., Loutit, J. F., & Gordon, S.: The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of bone and associated connective tissue. *J Cell Sci* 66: 189-194 (1984)
40. Ignatius, A., Rontgen, V., Bindl, R., Recknagel, S., Wehner, T., Claes, L., Jakob, F., Schinke, T., & Amling, M.: Mouse models in fracture healing. *Osteologie* 20: 34-40 (2011)
41. Ikematsu, S., Yano, A., Aridome, K., Kikuchi, M., Kumai, H., Nagano, H., Okamoto, K., Oda, M., Sakuma, S., Aikou, T., Muramatsu, H., Kadomatsu, K., & Muramatsu, T.: Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *British Journal of Cancer* 83: 701-706 (2000)
42. Ikutomo, M., Sakakima, H., Matsuda, F., & Yoshida, Y.: Midkine-deficient mice delayed degeneration and regeneration after skeletal muscle injury. *Acta Histochem* 116: 319-326 (2014)
43. Imai, S., Heino, T. J., Hienola, A., Kurata, K., Buki, K., Matsusue, Y., Vaananen, H. K., & Rauvala, H.: Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin)

- is associated with bone formation and mechanical loading. *Bone* 44: 785-794 (2009)
44. Kaderly, R. E.: Primary Bone Healing. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery-Small Animal* 6: 21-25 (1991)
 45. Kadomatsu, K., Huang, R. P., Suganuma, T., Murata, F., & Muramatsu, T.: A Retinoic Acid Responsive Gene *Mk* Found in the Teratocarcinoma System Is Expressed in Spatially and Temporally Controlled Manner during Mouse Embryogenesis. *Journal of Cell Biology* 110: 607-616 (1990)
 46. Kadomatsu, K. J., & Muramatsu, T.: Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Letters* 204: 127-143 (2004)
 47. Kadomatsu, K., Kishida, S., & Tsubota, S.: The heparin-binding growth factor midkine: the biological activities and candidate receptors. *J Biochem* 153: 511-521 (2013)
 48. Kadomatsu, K., Tomomura, M., & Muramatsu, T.: Cdna Cloning and Sequencing of a New Gene Intensely Expressed in Early Differentiation Stages of Embryonal Carcinoma-Cells and in Mid-Gestation Period of Mouse Embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 1312-1318 (1988)
 49. Kawai, H., Sato, W., Yuzawa, Y., Kosugi, T., Matsuo, S., Takei, Y., Kadomatsu, K., & Muramatsu, T.: Lack of the growth factor midkine enhances survival against cisplatin-induced renal damage. *Am J Pathol* 165: 1603-1612 (2004)
 50. Kawata, K., Kubota, S., Eguchi, T., Moritani, N. H., Shimo, T., Kondo, S., Nishida, T., Minagi, S., & Takigawa, M.: Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 in regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Physiol* 222: 138-148 (2010)
 51. Keramaris, N. C., Calori, G. M., Nikolaou, V. S., Schemitsch, E. H., & Giannoudis, P. V.: Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury-International Journal of the Care of the Injured* 39: 45-57 (2008)
 52. Kim, H. J., Minashima, T., McCarthy, E. F., Winkles, J. A., & Kirsch, T.: Progressive Ankylosis Protein (ANK) in Osteoblasts and Osteoclasts Controls Bone Formation and Bone Remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research* 25: 1771-1783 (2010)

53. Kon, T., Cho, T. J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A.: Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappa B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 16: 1004-1014 (2001)
54. Lanyon, L. E.: Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif Tissue Int* 53: 102-107 (1993)
55. Lau, W. L., Festing, M. H., & Giachelli, C. M.: Phosphate and vascular calcification: Emerging role of the sodium-dependent phosphate co-transporter PiT-1. *Thromb Haemost* 104: 464-470 (2010)
56. Lee, K., Shin, Y., Cheng, R., Park, K., Hu, Y., McBride, J., He, X., Takahashi, Y., & Ma, J. X.: Receptor heterodimerization as a novel mechanism for the regulation of Wnt/beta-catenin signaling. *J Cell Sci* 127: 4857-4869 (2014)
57. Lee, P. Y., Wang, J. X., Parisini, E., Dascher, C. C., & Nigrovic, P. A.: Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol* 94: 585-594 (2013)
58. Lehmann, W., Edgar, C. M., Wang, K., Cho, T. J., Barnes, G. L., Kakar, S., Graves, D. T., Rueger, J. M., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A.: Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 36: 300-310 (2005)
59. Lehmann, Wolfgang, Schinke, Thorsten, Schilling, Arndt F., Catalá-Lehnen, Philip, Gebauer, Matthias, Pogoda, Pia, Gerstenfeld, Louis C., Rueger, Johannes M., Einhorn, Thomas A., & Amling, Michael: Absence of mouse pleiotrophin does not affect bone formation in vivo. *Bone* 35: 1247-1255 (2004)
60. Li, G., Bunn, J. R., Mushipe, M. T., He, Q., & Chen, X.: Effects of pleiotrophin (PTN) over-expression on mouse long bone development, fracture healing and bone repair. *Calcified tissue international* 76: 299-306 (2005)
61. Liedert, A., Mattausch, L., Rontgen, V., Blakytyn, R., Vogele, D., Pahl, M., Bindl, R., Neunaber, C., Schinke, T., Harroch, S., Amling, M., & Ignatius, A.: Midkine-deficiency increases the anabolic response of cortical bone to mechanical loading. *Bone* 48: 945-951 (2011)

62. Loisel, A. E., Paul, E. M., Lewis, G. S., & Donahue, H. J.: Osteoblast and osteocyte-specific loss of Connexin43 results in delayed bone formation and healing during murine fracture healing. *J Orthop Res* 31: 147-154 (2013)
63. Lorenz-Depiereux, B., Bastepe, M., Benet-Pages, A., Amyere, M., Wagenstaller, J., Muller-Barth, U., Badenhop, K., Kaiser, S. M., Rittmaster, R. S., Shlossberg, A. H., Olivares, J. L., Loris, C., Ramos, F. J., Glorieux, F., Vikkula, M., Juppner, H., & Strom, T. M.: DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet* 38: 1248-1250 (2006)
64. Lorenz-Depiereux, B., Schnabel, D., Tiosano, D., Hausler, G., & Strom, T. M.: Loss-of-function ENPP1 mutations cause both generalized arterial calcification of infancy and autosomal-recessive hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 86: 267-272 (2010)
65. Lu, C., Xing, Z., Wang, X., Mao, J., Marcucio, R. S., & Miclau, T.: Anti-inflammatory treatment increases angiogenesis during early fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 132: 1205-1213 (2012)
66. Lüllmann-Rauch, Renate: Taschenlehrbuch Histologie. 3. vollst. überarb. Auflage. Thieme. 94-140 (2009)
67. Mackenzie, N. C. W., Huesa, C., Rutsch, F., & MacRae, V. E.: New insights into NPP1 function: Lessons from clinical and animal studies. *Bone* 51: 961-968 (2012)
68. Mackenzie, N. C. W., Zhu, D. X., Milne, E. M., van 't Hof, R., Martin, A., Quarles, D. L., Millan, J. L., Farquharson, C., & MacRae, V. E.: Altered Bone Development and an Increase in FGF-23 Expression in Enpp1(-/-) Mice. *PLoS One* 7: (2012)
69. Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., & Noda, M.: A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTP zeta/RPTP beta binds a heparin-binding growth factor midkine - Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTP zeta. *Journal of Biological Chemistry* 274: 12474-12479 (1999)
70. Mann, H. B. , & Whitney, D. R. : On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60 (1947)

71. Manolagas, S. C.: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-137 (2000)
72. Marsell, R., & Einhorn, T. A.: The biology of fracture healing. *Injury* 42: 551-555 (2011)
73. Martin, T. J., & Seeman, E.: Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22: 701-722 (2008)
74. Matsuo, K., & Irie, N.: Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473: 201-209 (2008)
75. McKibbin, B.: The biology of fracture healing in long bones. *Journal of Bone & Joint Surgery - British Volume* 60: 150-162 (1978)
76. Miller, S. C., & Jee, W. S.: The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcif Tissue Int* 41: 1-5 (1987)
77. Muramatsu, H., Zou, K., Sakaguchi, N., Ikematsu, S., Sakuma, S., & Muramatsu, T.: LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 936-941 (2000)
78. Muramatsu, H., Zou, P., Suzuki, H., Oda, Y., Chen, G. Y., Sakaguchi, N., Sakuma, S., Maeda, N., Noda, M., Takada, Y., & Muramatsu, T.: alpha(4)beta(1)- and alpha(6)beta(1)-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J Cell Sci* 117: 5405-5415 (2004)
79. Muramatsu, T.: Midkine (MK), the product of a retinoic acid responsive gene, and pleiotrophin constitute a new protein family regulating growth and differentiation. *International Journal of Developmental Biology* 37: 183-188 (1993)
80. Muramatsu, T.: Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical & Biological Sciences* 86: 410-425 (2010)
81. Nakamura, E., Kadomatsu, K., Yuasa, S., Muramatsu, H., Mamiya, T., Nabeshima, T., Fan, Q. W., Ishiguro, K., Igakura, T., Matsubara, S., Kaname, T., Horiba, M., Saito, H., & Muramatsu, T.: Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour.

- Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 3: 811-822 (1998)
82. Nakanishi, T., Kadomatsu, K., Okamoto, T., IchiharaTanaka, K., Kojima, T., Saito, H., Tomoda, Y., & Muramatsu, T.: Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *Journal of Biochemistry* 121: 197-205 (1997)
83. Narayanan, K., Ramachandran, A., Hao, J., He, G., Park, K. W., Cho, M., & George, A.: Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store. *J Biol Chem* 278: 17500-17508 (2003)
84. Neunaber, C., Catala-Lehnen, P., Beil, F. T., Marshall, R. P., Kanbach, V., Baranowsky, A., Lehmann, W., Streichert, T., Ignatius, A., Muramatsu, T., Schinke, T., & Amling, M.: Increased trabecular bone formation in mice lacking the growth factor midkine. *Journal of Bone & Mineral Research* 25: 1724-1735 (2010)
85. Niehrs, C.: The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 767-779 (2012)
86. Ohta, S., Muramatsu, H., Senda, T., Zou, K., Iwata, H., & Muramatsu, T.: Midkine is expressed during repair of bone fracture and promotes chondrogenesis. *Journal of Bone & Mineral Research* 14: 1132-1144 (1999)
87. Okawa, A., Goto, S., & Moriya, H.: Calcitonin simultaneously regulates both periosteal hyperostosis and trabecular osteopenia in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) in vivo. *Calcif Tissue Int* 64: 239-247 (1999)
88. Parfitt, A. M.: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55: 273-286 (1994)
89. Pendleton, A., Johnson, M. D., Hughes, A., Gurley, K. A., Ho, A. M., Doherty, M., Dixey, J., Gillet, P., Loeuille, D., McGrath, R., Reginato, A., Shiang, R., Wright, G., Netter, P., Williams, C., & Kingsley, D. M.: Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis. *Am J Hum Genet* 71: 933-940 (2002)
90. Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 45 (2001)
91. Platzer, Werner: Taschenatlas Anatomie. 3. Bd, Bewegungsapparat 9. überarb. Auflage. Thieme. 10-17 (2005)

92. Qi, M. S., Ikematsu, S., Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Sakuma, S., Noda, M., Muramatsu, T., & Kadomatsu, K.: Haptotactic migration induced by midkine - Involvement of protein-tyrosine phosphatase xi, mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276: 15868-15875 (2001)
93. Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H., & Moorman, A. F.: Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339: 62-66 (2003)
94. Rauvala, H.: An 18-Kd Heparin-Binding Protein of Developing Brain That Is Distinct from Fibroblast Growth-Factors. *Embo Journal* 8: 2933-2941 (1989)
95. Recknagel, S., Bindl, R., Brochhausen, C., Gockelmann, M., Wehner, T., Schoengraf, P., Huber-Lang, M., Claes, L., & Ignatius, A.: Systemic inflammation induced by a thoracic trauma alters the cellular composition of the early fracture callus. *J Trauma Acute Care Surg* 74: 531-537 (2013)
96. Recknagel, S., Bindl, R., Kurz, J., Wehner, T., Ehrnthaller, C., Knoferl, M. W., Gebhard, F., Huber-Lang, M., Claes, L., & Ignatius, A.: Experimental Blunt Chest Trauma Impairs Fracture Healing in Rats. *Journal of Orthopaedic Research* 29: 734-739 (2011)
97. Reddi, A. H.: Bone morphogenetic proteins: From basic science to clinical applications. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 83: 1-6 (2001)
98. Reichenberger, E., Tiziani, V., Watanabe, S., Park, L., Ueki, Y., Santanna, C., Baur, S. T., Shiang, R., Grange, D. K., Beighton, P., Gardner, J., Hamersma, H., Sellars, S., Ramesar, R., Lidral, A. C., Sommer, A., do Amaral, C. M. R., Gorlin, R. J., Mulliken, J. B., & Olsen, B. R.: Autosomal dominant craniometaphyseal dysplasia is caused by mutations in the transmembrane protein ANK. *Am J Hum Genet* 68: 1321-1326 (2001)
99. Reiff, T., Huber, L., Kramer, M., Delattre, O., Janoueix-Lerosey, I., & Rohrer, H.: Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development* 138: 4699-4708 (2011)
100. Reynolds, P. R., Mucenski, M. L., Le Cras, T. D., Nichols, W. C., & Whitsett, J. A.: Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. *J Biol Chem* 279: 37124-37132 (2004)

101. Reznikoff, C. A., Bertram, J. S., Brankow, D. W., & Heidelberger, C.: Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 33: 3239-3249 (1973)
102. Röntgen, Viktoria: Frakturheilung bei beeinträchtigtem Wnt-Signalweg und dadurch hervorgerufener Osteoporose im Mausmodell. Med. Dissertation, Universität Ulm (2010)
103. Ross, Michael H., & Pawlina, Wojciech: Histology. 6. Auflage. Lippincott Williams & Wilkins. 214-253 (2011)
104. Saito, T., Shimizu, Y., Hori, M., Taguchi, M., Igarashi, T., Fukumoto, S., & Fujitab, T.: A patient with hypophosphatemic rickets and ossification of posterior longitudinal ligament caused by a novel homozygous mutation in ENPP1 gene. *Bone* 49: 913-916 (2011)
105. Sakaguchi, N., Muramatsu, H., Ichihara-Tanaka, K., Maeda, N., Noda, M., Yamamoto, T., Michikawa, M., Ikematsu, S., Sakuma, S., & Muramatsu, T.: Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res* 45: 219-224 (2003)
106. Sakamoto, K., & Kadomatsu, K.: Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathology international* 62: 445-455 (2012)
107. Sato, W., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Muramatsu, H., Hotta, N., Matsuo, S., & Muramatsu, T.: Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol* 167: 3463-3469 (2001)
108. Schindeler, A., McDonald, M. M., Bokko, P., & Little, D. G.: Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19: 459-466 (2008)
109. Shibata, Y., Muramatsu, T., Hirai, M., Inui, T., Kimura, T., Saito, H., McCormick, L. M., Bu, G. J., & Kadomatsu, K.: Nuclear targeting by the growth factor midkine. *Molecular and Cellular Biology* 22: 6788-6796 (2002)
110. Stoica, G. E., Kuo, A., Powers, C., Bowden, E. T., Sale, E. B., Riegel, A. T., & Wellstein, A.: Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *Journal of Biological Chemistry* 277: 35990-35998 (2002)

111. Suzuki, A., Ammann, P., Nishiwaki-Yasuda, K., Sekiguchi, S., Asano, S., Nagao, S., Kaneko, R., Hirabayashi, M., Oiso, Y., Itoh, M., & Caverzasio, J.: Effects of transgenic Pit-1 overexpression on calcium phosphate and bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 28: 139-148 (2010)
112. Take, M., Tsutsui, J., Obama, H., Ozawa, M., Nakayama, T., Maruyama, I., Arima, T., & Muramatsu, T.: Identification of Nucleolin as a Binding-Protein for Midkine (Mk) and Heparin-Binding Growth-Associated Molecule (Hb-Gam). *Journal of Biochemistry* 116: 1063-1068 (1994)
113. Tare, R. S., Oreffo, R. O. C., Sato, K., Rauvala, H., Clarke, N. M. P., & Roach, H. I.: Effects of targeted overexpression of pleiotrophin on postnatal bone development. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 324-332 (2002)
114. Terkeltaub, R.: Physiologic and pathologic functions of the NPP nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family focusing on NPP1 in calcification. *Purinergic Signal* 2: 371-377 (2006)
115. Terkeltaub, R. A.: Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281: 1-11 (2001)
116. Teti, A.: Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep* 9: 264-273 (2011)
117. Toyosawa, S., Kanatani, N., Shintani, S., Kobata, M., Yuki, M., Kishino, M., Ijuhin, N., & Komori, T.: Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) during fracture healing. *Bone* 35: 553-561 (2004)
118. Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Ooshima, T., Sato, A., Ijuhin, N., & Komori, T.: Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 16: 2017-2026 (2001)
119. Tsutsui, J., Uehara, K., Kadomatsu, K., Matsubara, S., & Muramatsu, T.: A New Family of Heparin-Binding Factors - Strong Conservation of Midkine (Mk) Sequences between the Human and the Mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 792-797 (1991)
120. Xing, Z., Lu, C., Hu, D., Yu, Y. Y., Wang, X., Colnot, C., Nakamura, M., Wu, Y., Miclau, T., & Marcucio, R. S.: Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Dis Model Mech* 3: 451-458 (2010)

121. Xu, H. G., Hu, C. J., Wang, H., Liu, P., Yang, X. M., Zhang, Y., & Wang, L. T.: Effects of mechanical strain on ANK, ENPP1 and TGF-beta 1 expression in rat endplate chondrocytes in vitro. *Molecular Medicine Reports* 4: 831-835 (2011)
122. Yang, X., Tare, R. S., Partridge, K. A., Roach, H. I., Clarke, N. M., Howdle, S. M., Shakesheff, K. M., & Oreffo, R. O.: Induction of human osteoprogenitor chemotaxis, proliferation, differentiation, and bone formation by osteoblast stimulating factor-1/pleiotrophin: osteoconductive biomimetic scaffolds for tissue engineering. *J Bone Miner Res* 18: 47-57 (2003)
123. Young, M. F.: Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 14: 35-42 (2003)
124. Young, M. F., Kerr, J. M., Ibaraki, K., Heegaard, A. M., & Robey, P. G.: Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res*: 275-294 (1992)
125. Zhou, X. Y., Cui, Y. Z., Zhou, X. Y., & Han, J. X.: Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Discoveries from Mouse Models. *International Journal of Biological Sciences* 8: 778-790 (2012)
126. Zöllner, Laura Diana: Bedeutung Heparin-bindender Polypeptide und des WNT/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges in der Regulation der Knochenmasse. Med. Dissertation, Universität Ulm (2008)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Anita Ignatius, Leiterin des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm, für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit diese experimentelle Arbeit anzufertigen, danken. Ebenso möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Astrid Liedert für ihre geduldige Betreuung und ihre vielen Ratschläge bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe der „Biologie der Knochenheilung“ und der „Zellbiologie“, insbesondere: Helga Bach, Iris Baum, Sevil Essig, Uschi Maile, Marion Tomo, Anna Rapp, Robin Rößler und Melanie Haffner-Luntzer.

Mein ganz besonderer Dank gilt Melanie Haffner-Luntzer für die Überlassung der zahlreichen Schnittpräparate und die Einführung in die Thematik und die vielen hilfreichen Erklärungen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Robin Rößler für die vielen gemeinsamen Stunden und die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Schließlich möchte ich auch meiner Partnerin Bianca für ihre Motivationsarbeit und das geduldige Zuhören bei größeren und kleineren Problemen danken. Dieser Dank gilt schließlich auch meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die mich während meines gesamten Lebens stets bei allen Entscheidungen unterstützten und so diese Arbeit ermöglicht haben.

Vielen Dank auch an alle, die hier nicht namentlich erwähnt sind und mir während der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben.

Lebenslauf

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.