



Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Universität des Saarlandes, Homburg / Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Laschke

NLRP3-Knockout stimuliert die Expression von AIM2 im murinen Frakturheilungsmodell

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

Homburg/Saar 2025

vorgelegt von: Rouven Speicher

geb. am: 08.10.1991 in Kaiserslautern

Tag der Promotion: 05.Mai.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Menger

Prof. Dr. Henning Madry

Für Opa

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Zusammenfassung	11
1.1 Zusammenfassung	11
1.2 <i>Summary</i>	12
2 Einleitung	13
2.1 Knochen	13
2.1.1 Makroskopische Anatomie	13
2.1.2 Mikroskopische Anatomie	14
2.1.3 Funktion	16
2.2 Frakturheilung	17
2.2.1 Inflammationsphase	18
2.2.2 Proliferationsphase	18
2.2.3 Remodeling	19
2.3 Inflammasome	19
2.3.1 Aufbau und Funktion	20
2.3.2 NLRP3-Inflammasom in der Skelettentwicklung	22
2.3.3 Inflammasome in der Frakturheilung	23
2.4 Ziel und Fragestellung der Dissertation	25
3 Material und Methodik	26
3.1 Ethikantrag und Tiere	26
3.2 Studienprotokoll	27
3.3 Operationstechnik	27
3.3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	31
3.4 Biomechanik	32
3.5 Computertomographie	34
3.5.1 Zielgrößen	34
3.5.2 Geräte und Software	34
3.5.3 CT-Aufnahmen	34
3.5.4 Bearbeitung der Datensätze	35
3.5.5 Kallus Analyse	35
3.6 Histologische und immunohistochemische Analyse	36

3.6.1	Probenaufbereitung	36
3.6.2	Färbungen	37
3.6.2.1	Safranin O - Färbung	38
3.6.2.2	TRAP - Färbung.....	39
3.6.2.3	MPO - Färbung.....	40
3.6.2.4	CD68 – Färbung	41
3.6.2.5	CD31 – Färbung	42
3.6.3	Mikroskopische Arbeiten.....	43
3.6.3.1	Geräte und Software.....	43
3.6.3.2	Hellfeldmikroskopie.....	43
3.6.3.3	Fluoreszenzmikroskopie	44
3.6.4	Auswertung.....	45
3.6.4.1	Safranin O - Färbung	45
3.6.4.2	TRAP - Färbung.....	47
3.6.4.3	Myeloperoxidase - Färbung	48
3.6.4.4	Cluster of Differentiation 68 - Färbung.....	49
3.6.4.5	Cluster of Differentiation 31 - Färbung.....	50
3.7	Western Blot	51
3.7.1	Vorbereiten der Proben	51
3.7.2	Proteindarstellung.....	51
3.7.3	Auswertung.....	53
3.8	Statistische Methoden	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Biomechanik.....	54
4.2	Computertomographie	56
4.3	Histologie.....	58
4.4	Proteinbiochemie	64
5	Diskussion	68
5.1	Hintergründe.....	68
5.2	Diskussion der Methoden und Limitierungen der Arbeit	69
5.3	Diskussion der Ergebnisse	71
5.3.1	Frakturheilung von NLRP3 ^{-/-} -Tieren im Vergleich zum Wildtyp.....	71
5.3.2	Gibt es eine Kompensation des NLRP3 Knock-Outs auf Inflammasomeebene?.....	74
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	76
6	Literatur	78

7	Publikationen	85
8	Danksagung	86
9	Lebenslauf	87
	Tabellenverzeichnis	89
	Abbildungsverzeichnis	90

Abkürzungsverzeichnis

μA.....	Mikroampere
μCT.....	Mikrocomputertomographie
μm.....	Mikrometer
ABC.....	avidin biotin complex
AIM2.....	absent in melanoma 2
Aq. dest.	Aqua destillata
ASC.....	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP.....	Adenosintriphosphat
BDm.....	bone diameter
BMP4.....	bone morphogenic protein-4
BV.....	bone volume
ca.	circa
CARD.....	caspase recruitment domain
CD.....	cluster of differentiation
CAr.....	total callus area
CDm.....	callus diameter
CgAr.....	cartilage area
CLR.....	C-type lectin receptor
CT.....	Computertomographie
Cyr61.....	cysteine-rich angiogenic inducer 61
DAMP.....	damage-associated molecular patterns
DNA.....	Deoxyribonucleic acid
dsDNA.....	Doppelstrang Deoxyribonucleic acid
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure

Fab.....antigen-binding Fraction

Fc.....constant Fraction

FTAr.....fibrous tissue area

G.....G-Kraft

g.....Gramm

GSDMD.....Gasdermin-D

HCl.....Hydrogenchlorid

HPF.....High Power Field

kF.....Korrekturfaktor

kV.....Kilovolt

LmBAr.....lamellar bone area

LRR.....leucin-rich repeat domain

M-CSF.....makrophagen-colony stimulating factor

mg.....Milligramm

mL.....Milliliter

mm.....Millimeter

MPO.....Myeloperoxidase

ms.....Millisekunden

M.sc.....Master of Science

MTA.....Medizintechnische/r Assistent/-in

MW.....Mittelwert

N.....Newton (Einheit)

n.....Anzahl

NaCl.....Natriumchlorid

NLRC4.....NLR family CARD domain-containing protein 4

NOD.....nucleotid-binding oligomerization domain

NOMID.....neonatal-onset multisystem inflammatory disease

NLR.....NOD-like receptor

NLRP.....NLR Protein

OPG.....Osteoprotegerin

PAMP.....pathogen-associated molecular patterns

PBSphosphat-buffered saline

PCNA.....proliferating-cell-nuclear-antigen

pH.....pondus Hydrogenii

PRR.....pattern recognition receptor

PVDF.....Polyvinylidenfluorid-Folie

PYD.....Pyrin domain

RANKL.....receptor activator of nuclear factor kappaB ligand

mRNA.....messenger ribonucleic acid

ROI.....region of interest

RUNX.....runt-related transcription factor

SDS-PAGE.....sodium dodecy sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

SEM.....standard error of mean

shRNA.....short-hairpin ribonucleic acid

SIK1.....salt inducible kinase 1

SREBF1.....sterol regulatory element binding transcription factor 1

TbNb.....trabecular number

TbSp.....trabecular separation

TbTh.....trabecular Thickness

TIP.....target-intensity-pixel

TLR.....toll-like receptor

TOTAr.....total osseous tissue area

TRAP.....tatrte-resistant acid phosphatase

TV.....tissue Volume

U/min.....Umdrehungen pro Minute

USA.....Unitet States of America
VEGF.....vascular endothelial growth factor
VOI.....volume of interest
WoBAr.....woven bone area
z.B.....zum Beispiel

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Behandlungsoptionen führen Frakturen auch heute noch in 5-10% der Fälle zu einer gestörten Knochenheilung. Dies stellt nicht nur für die betroffenen Patienten, sondern auch für das Gesundheitssystem eine enorme Belastung dar. So häufig wie Frakturen sind, so komplex ist auch deren Heilungsprozess. Gerade die am Anfang stehende inflammatorische Phase lässt, trotz intensiver Forschung, mit ihrer komplexen Orchestrierung verschiedenster Zellen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren noch viele Fragen offen.

Das *nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD)-like receptors (NLRs) protein 3 (NLRP3)* - Inflammasom ist in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Es erkennt zahlreiche *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* und *damage-associated molecular patterns (DAMPs)*, wie sie bei einer Fraktur vorkommen, und ist ein potenter Treiber der Inflammation. Eine adäquate inflammatorische Reaktion ist für eine erfolgreiche Frakturheilung unabdingbar, bedarf allerdings einer strengen Regulierung. So konnten bisherige Forschungen bereits einen schädlichen Einfluss einer vermehrten NLRP3-Expression auf die Skelettentwicklung zeigen. Darüber hinaus konnte eine Inhibierung des vermehrt exprimierten NLRP3 im diabetischen Rattenmodell die Knochenregeneration verbessern.

Ein potentieller Einfluss des NLRP3 auf die Frakturheilung in einem nicht inflammatorischen Umfeld war bislang noch nicht bekannt und wurde in dieser Arbeit vergleichend zwischen *Wildtyp*- (WT) und NLRP3^{-/-}-Mäusen unter Anwendung des MouseScrew-Modells untersucht. Dabei zeigte sich bei NLRP3 knockout Mäusen eine verminderte Angiogenese sowie eine Reduktion der zellulär-inflammatorischen Antwort. Die Frakturheilung der NLRP3^{-/-}-Mäusen zeigte sich dennoch nur geringfügig beeinträchtigt. Entgegen der Erwartung hatte der NLRP3 Knockout keinen signifikanten Einfluss auf dessen Effektorzytokine IL-1 β oder IL-18. Allerdings konnte eine Überexpression von *absent in melanoma 2 (AIM2)* bei den NLRP3^{-/-}-Tieren nachgewiesen werden, welche den Knock-out funktionell zu kompensieren schien.

1.2 Summary

Despite numerous treatment options, fractures still lead to delayed healing or non-union failed bone regeneration in 5-10% of cases. This represents an enormous burden not only for the patients affected, but also for the healthcare system. As common as fractures are, their healing process is just as complex. Despite intensive research, the inflammatory phase in particular, with its complex orchestration of various cells, cytokines and growth factors, still leaves many questions unanswered.

The nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD)-like receptors (NLRs) protein 3 (NLRP3) - inflammasome is of particular interest in this context. It recognises numerous *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* and *damage-associated molecular patterns (DAMPs)*, as they occur in a fracture, and is a potent driver of inflammation. The inflammatory response is essential for adequate fracture healing, but requires strict regulation. Previous research has already shown a detrimental effect of increased NLRP3 expression on skeletal development. Furthermore, inhibition of the increased expression of NLRP3 in the diabetic rat model was able to improve bone regeneration.

A potential influence of NLRP3 on fracture healing in a non-inflammatory environment was not yet known and was investigated in this study by comparing *wild-type (WT)* and *NLRP3^{-/-}* mice using the mouse-screw model. The NLRP3 knockout resulted in a reduced angiogenesis and a reduction of the cellular-inflammatory response. Nevertheless, the fracture healing of the *NLRP3^{-/-}*-mice was only slightly impaired. Contrary to expectations, the NLRP3 knockout had no significant influence on its effector cytokines IL-1 β or IL-18. However, an overexpression of *absent in melanoma 2 (AIM2)* found in the *NLRP3^{-/-}* animals, appeared to functionally compensate for the NLRP3 knockout.

2 Einleitung

2.1 Knochen

2.1.1 Makroskopische Anatomie

Auf Grund der Unterschiedlichkeit der Knochen ist eine systematische Einteilung derer sinnvoll. Anhand ihrer Form werden sie, je nach Quelle, in fünf [5] oder sieben [3] Gruppen eingeteilt.

1. Ossa longa (lange- auch Röhrenknochen) – z.B. Femur
2. Ossa brevia (kurze Knochen) - z.B. Ossa carpi
3. Ossa plana (platte Knochen) - z.B. Sternum
4. Ossa pneumatica (luftgefüllte Knochen) - z.B. Processus mastoideus
5. Ossa irregularia (irreguläre Knochen) - z.B. Vertebra
6. Ossa sesamoidea (Sesambeine) - z.B. Os pisiforme
7. Ossa accessoria (akzessorische Knochen) - z.B. Os trigonum

Die Röhrenknochen sind hierbei von besonderem Interesse, nicht zuletzt da sie in Deutschland die höchste Frakturrate aufweisen [81] (Stand 2019). Als gemeinsamen Aufbau zeigen sie mittig eine Diaphyse und an den proximalen und distalen Enden eine Epiphyse, welche sich vom Gelenkknorpel bis zur Epiphysenfuge erstreckt. Letztgenannte ist als Ort des Längenwachstums von besonderer Bedeutung und verbleibt im ausgewachsenen Alter als Epiphysenlinie. Die Metaphyse verbindet Epi- und Diaphyse [3,5]. (Abbildung 1)

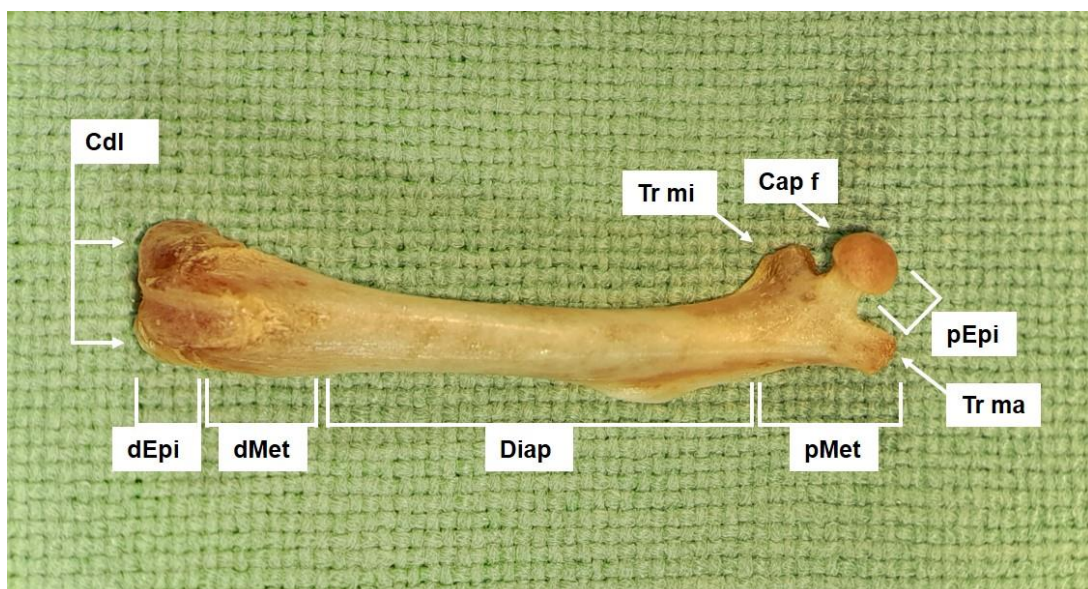


Abbildung 1 - Femur Übersicht. Linkes Femur (Maus). **dEpi** distale Epiphyse, **dMet** distale Metaphyse, **Diap** Diaphyse, **pMet** proximale Metaphyse, **pEpi** proximale Epiphyse, **Cdl** Condylus medialis et lateralis, **Tr mi** Trochanter minor, **Tr ma** Trochanter major, **Cap f** Caput femoris.

Knochen kann abgesehen von seiner Form auch anhand seiner Art in Geflecht- und Lamellenknochen unterschieden werden [95].

Der Geflechtknochen zeichnet sich durch einen unregelmäßigen Aufbau aus, ist im Vergleich zum Lamellenknochen weniger mineralisiert und entsprechend weniger stabil. Er wird auch als Primärer Knochen bezeichnet, da er in der fetalen Entwicklung aus mesenchyalem Bindegewebe direkt entsteht. Im Verlauf erfolgt der Umbau zu Lamellenknochen [95]. Im adulten Alter findet sich Geflechtknochen lediglich an den Suturen des Schädels, dem Labyrinth der Pars petrosa des Os temporale und den Alveolarwänden von Maxilla und Mandibula. Im Rahmen der Frakturheilung entsteht ebenfalls Geflechtknochen [2].

Der Lamellenknochen ist im Gegensatz dazu hoch organisiert und entsteht nach dem Abbau des Geflechtknochens, weshalb er auch Sekundärer Knochen genannt wird. Der an die Belastungen angepasste Aufbau und die höhere Mineralisierung sorgen für eine bessere Stabilität gegenüber dem Geflechtknochen. Lamellenknochen sind auf ihrer Außenseite zum größten Teil von Periost bedeckt. Darunter liegt die Kortikalis, welcher die Spongiosa im Knocheninneren folgt. Das Endost bedeckt alle innen liegenden Knochenflächen wie die Spongiosatrabekel [1]. Der durch die Trabekulae der Spongiosa freigelassene Raum bildet die Markhöhle, welche durch das Knochenmark ausgefüllt ist [3,5]. Die Trabekel ordnen sich trajektorieell entsprechend der Belastung des Knochens an, was dessen Anpassungsfähigkeit zum Ausdruck bringt [5,55].

2.1.2 Mikroskopische Anatomie

Das knöcherne Gewebe besteht aus der Knochengrundsubstanz (auch Knochenmatrix genannt) und Zellen [5,95]. Die Knochenmatrix setzt sich im Feuchtgewicht aus folgenden Anteilen zusammen [55,95]:

30% Organisches Material: v.a. Kollagen Typ I, Proteine, Proteoglykane und Glykoproteine

45% Anorganisches Material: v.a. Hydroxyapatit und weitere anorganische Ionen wie Magnesium oder Fluorid und Carbonat

25% Wasser

Die verschiedenen Zelltypen des Knochengewebes sind [55,95]:

Osteoprogenitorzellen: Im Periost und Endost lokalisierte Vorläuferzellen der Osteoblasten, welche bei Bedarf (z.B. Fraktur) aktiviert werden.

Osteoblasten: Bilden das Osteoid (noch nicht mineralisierte Knochenmatrix) und werden zu Osteozyten, wenn sie in der Knochensubstanz eingemauert werden.

Osteozyten: Komplette von Knochenmatrix umgebene ausdifferenzierte Osteoblasten. Sie besitzen viele in den Canaliculi liegende Ausläufer, über welche sie mittels Gap-junctions mit anderen Osteozyten und –blasten kommunizieren.

Osteoklasten: Bauen mineralisierte Knochenmatrix ab und sind unabdingbar für Knochenabbau und –umbau.

Das den Lamellenknochen bedeckende Periost setzt sich aus zwei Schichten zusammen [55]. Das äußere Stratum fibrosum besteht aus straffem und elastischem Bindegewebe. Von ihm aus ziehen sogenannte Sharpey-Fasern in die Kortikalis und verankern das Periost am Knochen. Das innen liegende Stratum osteogenicum, von welchem das Dickenwachstum ausgeht, liegt dem Knochen direkt an und beinhaltet vor allem inaktive Osteoblasten (sogenannte Saumzellen) und Osteoklastenvorläuferzellen. Das Periost ist gut vaskularisiert und innerviert [55,95].

Die Kortikalis wird außen von mehreren kontinuierlich verlaufenden Generallamellen begrenzt, welche auch innenseitig vorkommen können [5,55]. Zwischen den Generallamellen wird die Kortikalis von zahlreichen längs verlaufenden Osteonen gebildet. In diesen Einheiten verläuft mittig der Havers-Kanal mit seinem den Knochen versorgenden Gefäßen und Nerven. Dieser wird von mehreren Speziallamellen kreisförmig umgeben. Die Kollagenfasern dieser Lamellen verlaufen konzentrisch mit wechselnden Drehrichtungen. Zwischen den Speziallamellen liegen in Lakunen die Osteozyten. Schaltlamellen füllen den Raum zwischen den Osteonen und sind Reste solcher [55]. Die Blutversorgung erfolgt über aus dem Periost senkrecht auf die Havers-Gefäße ziehenden Volkmann-Gefäße [5]. Die Trabekel der Spongiosa sind avaskulär und werden, wie das Knochenmark, durch Arteriae nutriciae versorgt, welche -ohne sich zu verzweigen- direkt in den Markraum ziehen [95]. Die Lamellen verlaufen zur Trabekeloberfläche größten Teils parallel [55].

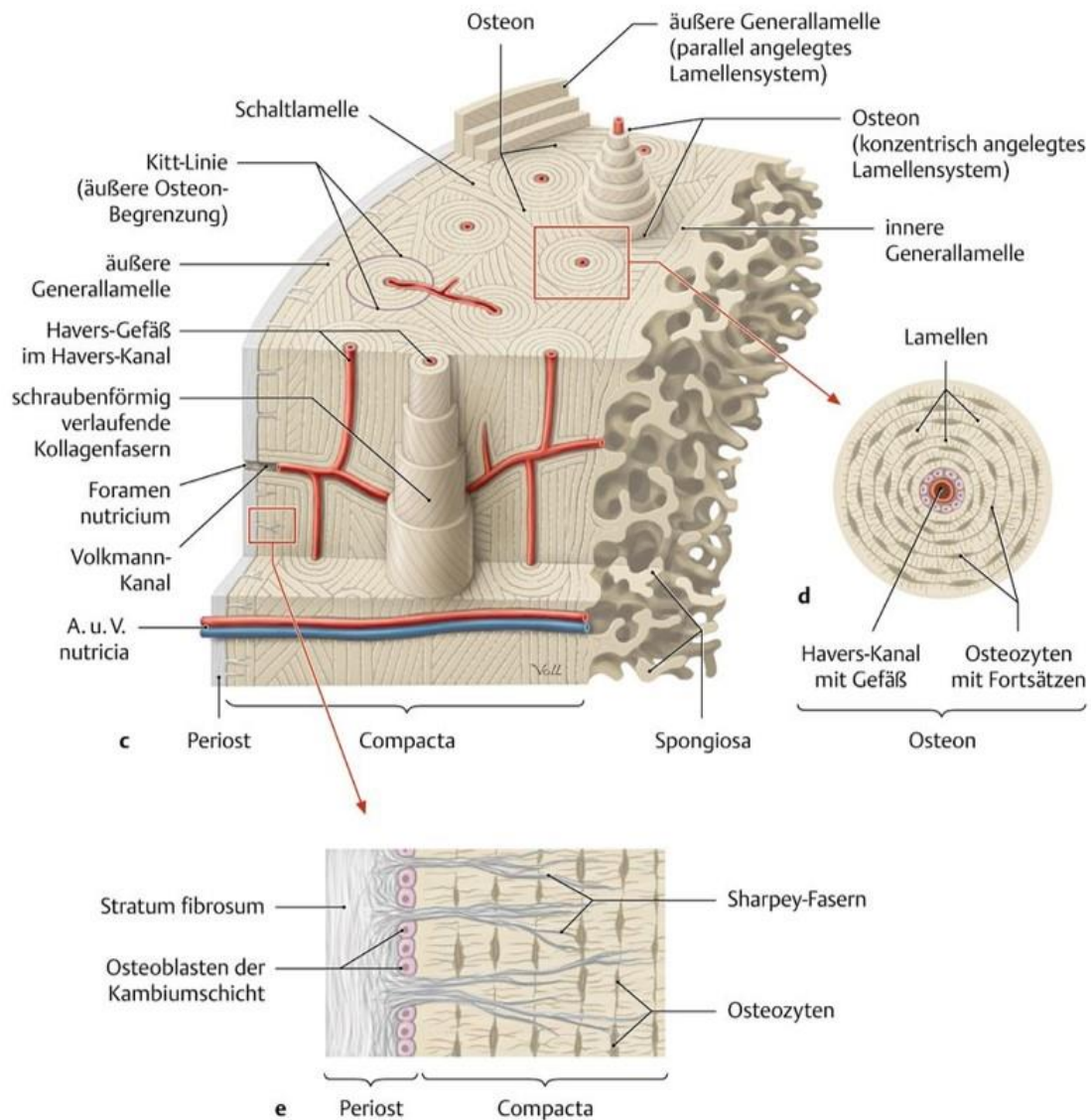


Abbildung 2 - Bau eines typischen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs. (c) Darstellung der Kortikalis mit den Osteonen und Lamellenverläufen. **(d)** Darstellung eines Osteons mit dem mittig liegenden Havers-Kanal. **(e)** Aufbau des Periosts. © Thieme: 4.1 Knöchernes Skelett und Bau eines Röhrenknochens. Aus: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K, Hrsg. Prometheus LernAtlas - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme, 2014 Stuttgart. Seite 41. Mit freundlicher Genehmigung von Georg Thieme Verlag KG.

2.1.3 Funktion

Die 223 Knochen des Menschen bilden zusammen das Skelettsystem, welches den passiven Teil des Bewegungsapparates darstellt. Hierfür ist ihre Stützfunktion maßgeblich. Die Stabilität des Knochengewebes bietet Organen darüber hinaus Schutz vor Verletzung, wie z.B. der Schädel dem Gehirn oder der knöcherne Thorax der Lunge und dem Herzen [5,95]. Darüber hinaus sind 99% des Kalziums im Knochen gebunden, sodass diese als Kalziumreservoir dienen. Nicht zuletzt beinhalten sie auch das für die Blutbildung verantwortliche rote Knochenmark [3].

2.2 Frakturheilung

Frakturen sind eine Kontinuitätsunterbrechung des Knochens auf Grund einer mechanischen Überlastung. Die Art der Gewalteinwirkung, der Ort auf den diese wirkt, sowie deren Intensität sind wichtige Einflussfaktoren und veranschaulichen bereits, dass es sich um ein sehr breites Feld handelt [90]. Aufgrund ihrer Vielfalt hat sich die Einteilung von Frakturen nach den AO-Klassifikationen etabliert [63]. Bei der sich anschließenden Frakturheilung kann eine primäre von einer sekundären Heilung unterschieden werden [24]. Dabei verläuft die primäre Heilung zwar schneller und ohne Kallusbildung, jedoch kann diese nur unter der Bedingung stattfinden, dass die Frakturrenden unter Ausschluss von Bewegung und Belastung direkt aneinanderliegen [74]. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, heilt der Bruch unter Bildung eines Kallus aus. Diese deutlich häufiger vorkommende sekundäre Frakturheilung ist komplex und wird in verschiedene Phasen eingeteilt (Abbildung 3), wobei sich deren Anzahl und Benennung zwischen den Quellen unterscheiden [56,74,90]. Zu beachten ist ebenfalls, dass sich die unterschiedlichen Phasen zum Teil erheblich überlappen, beziehungsweise nicht eindeutig abgrenzen lassen [6,85]. Dennoch bietet es sich zur besseren Übersichtlichkeit an, die komplexen Vorgänge der Frakturheilung anhand dieser zu beschreiben.

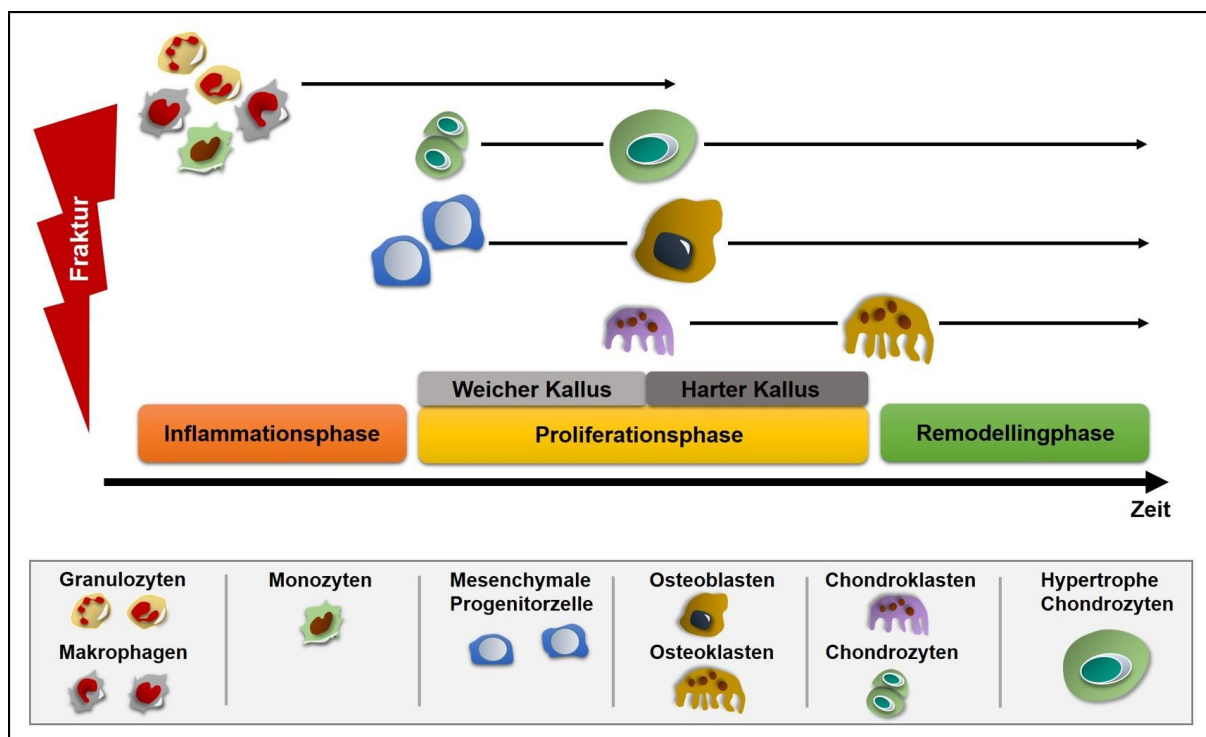


Abbildung 3 - Phasen der Frakturheilung. In Anlehnung an Menger et al. [66] und Schindeler et al. [85] wurden die Phasen der Frakturheilung mit den beteiligten Zelltypen im zeitlichen Verlauf skizziert.

2.2.1 Inflammationsphase

Bei einer Fraktur kommt es durch die damit einhergehenden Gefäßverletzungen zur Hämatombildung und zur Hypoxie im betroffenen Gebiet auf Grund der gestörten Gefäßversorgung. Dabei werden durch die Degranulation von Thrombozyten und durch nekrotisches Gewebe Zytokine freigesetzt, welche eine Migration von Lymphozyten, Makrophagen sowie eosinophilen- und neutrophilen Granulozyten zur Folge haben [6,29,74]. Unter diesen hypoxischen Bedingungen induziert die *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und somit eine Endothelzellmigration sowie eine Angiogenese. Ebenso bewirkt die PI3K eine gesteigerte Gefäßpermeabilität, welche die Zellmigration erleichtert [44,59]. Das Zusammenspiel inflammatorischer Zellen und deren Auswirkung auf die Frakturheilung wird maßgeblich durch die Freisetzung von Zytokinen orchestriert und ist nach wie vor in vielen Bereichen noch nicht abschließend verstanden [6,69]. Die wichtigsten von ihnen sind der *Tumor-Nekrosefaktor- α* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1), IL-6, IL-11 und IL-18 [30]. Freigesetzte Wachstumsfaktoren regen *Mesenchymale Stammzellen* (MSC) und Progenitorzellen zur Proliferation und Differenzierung in Fibro-, Chondro-, Angio- und Osteoblasten an [74]. Diese stammen aus dem Knochenmark, dem Peri- und Endost [19]. Auch wenn die Inflammation am Anfang der Frakturheilung unabdingbar ist und eine Inhibierung dessen zur Verzögerung führt [6], so zeigt sich bei Untersuchungen an diabetischen Tieren als Ausdruck chronischer Inflammation eine verminderte Knochenbildung und –stabilität [45]. Ebenso konnte im Frakturmodell am alten Tier im Vergleich zur jüngeren Kontrollgruppe eine gesteigerte Inflammation beobachtet werden, welche mit einer schlechteren Knochenbildung und einer Beeinträchtigung des Knochenremodelings assoziiert war [67]. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die steigende Inzidenz von Frakturen mit zunehmendem Alter von Bedeutung [81].

2.2.2 Proliferationsphase

Diese in der Literatur sehr inhomogen benannte Phase bezeichnet die Differenzierung der MSC, der Kallusbildung in seinen verschiedenen Stadien und die Revaskularisierung [6,74,85]. Das von den Makrophagen freigesetzte IL-1 stimuliert die Bildung eines knorpeligen Kallus, die Angiogenese durch Aktivierung der IL-1R Rezeptoren sowie die IL-6 Freisetzung aus Osteoblasten [56]. IL-6 stimuliert wiederum die Freisetzung von VEGF und somit ebenfalls die Angiogenese, sowie die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten [97]. Chondrozyten gehen aus MSC bzw. Progenitorzellen des Periosts hervor und bilden Knorpel [19], welcher zusammen mit dem durch Fibroblasten gebildeten Bindegewebe den weichen Kallus bildet [7,85]. Knorpelareale sind nicht vaskularisiert [85]. Für die Revaskularisierung des Kallus exprimieren hypertrophe Chondrozyten, welche sich während der enchondralen

Ossifikation bilden, VEGF, das maßgebend für die Angiogenese ist [28]. Während der enchondralen Ossifikation wachsen Gefäße in den Geflechtknochen ein [85]. Gleichzeitig wird durch eine subperiostal ablaufende intramembranöse Ossifikation Geflechtknochen gebildet, welcher die beiden Frakturenden im Verlauf verbindet [33]. Diese geht von ruhenden Osteoprogenitorzellen und MSC des Periosts aus [24] und baut zusammen mit der enchondralen Ossifikation den weichen Kallus zum mechanisch stabileren harten Kallus um, welcher aus Geflechtknochen besteht [7,24].

2.2.3 Remodeling

Die Geflechtknochenstruktur im harten Kallus ist unregelmäßig und wird im weiteren Verlauf in den deutlich stabileren Lammellenknochen umgebaut [24]. Osteoklasten sind bei diesem Vorgang von zentraler Bedeutung. Sie resorbieren den zuvor gebildeten Geflechtknochen und ermöglichen so nachfolgenden Osteoblasten die Bildung von Lamellenknochen [78]. *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand* (RANKL) und *makrophagen-colony stimulating factor* (M-CSF) sind wichtige Regulatoren der Osteoklastenentstehung [94]. Dem Osteoklasten aktivierenden RANKL steht das *Osteoprotegerin* (OPG) gegenüber. Es verhindert durch Bindung an RANKL dessen Interaktion mit RANK und so die Differenzierung zu Osteoklasten [91]. Die Differenzierung der für das Remodelling benötigten Osteoblasten erfolgt unter anderem durch den Wachstumsfaktor *bone morphogenic protein* (BMP), v.a. BMP-2 und-4 [7].

2.3 Inflammasome

Die Inflammation stellt eine Reaktion auf exogene Noxen wie Infektionen sowie Verletzungen dar und geht mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen einher [62]. Dabei ist es ungemein wichtig, ein breites Feld an Noxen erkennen zu können. *Pattern recognition receptors* (PRRs) sind bereits in der Keimbahn kodierte Rezeptoren, welche bestimmte pathogene Muster von Mikroorganismen, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen [93]. *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) sind hingegen Muster, die einen endogenen Schaden anzeigen, wie z.B. *Adenosintriphosphat* (ATP) oder Harnsäure. Sie werden ebenfalls größtenteils durch PRRs erkannt [47]. Diese kommen sowohl membrangebunden als *toll-like receptors* (TLRs) und C-type lectin receptors (CLRs) vor als auch im Zytosol, dort unter anderem *Absent in melanoma 2* (AIM2) als Sensor für *Doppelstrang deoxyribonucleic acid* (dsDNA) und *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like receptors (NLRs). Einige *pattern recognition receptors* PRRs können

hochmolekulare Konstrukte bilden, welche durch Aktivierung von Caspase-1 zur Prozessierung und Sekretion von proinflammatorischen Interleukinen führen, sogenannte Inflammasome [86].

Die adaptive bzw. erworbene Immunabwehr bietet ebenfalls einen wichtigen Schutz gegen exogene Noxen [48], diese soll hier aber nicht näher thematisiert werden.

2.3.1 Aufbau und Funktion

Inflammasome sind große Multiproteinkomplexe. Erkennt ein PRR ein PAMP oder DAMP, so geht von ihm die Oligomerisierung aus, welche schlussendlich Pro-Caspase-1 bindet und aktiviert. Diese fungiert als *interleukin-converting-enzyme* (ICE) und prozessiert Pro-IL-1 und Pro-IL-18 in deren aktive Form. Darüber hinaus wird durch Caspase-1 auch *Gasdermin D* (GSDMD) in seine aktive Form überführt, welches zum pyroptotischen Zelltod führen kann. Auch wenn die unterschiedlichen Inflammasome dieses Grundprinzip gemein haben, so ist deren Aufbau in Abhängigkeit des PRRs unterschiedlich [12].

PRRs der NLR Familie haben als Gemeinsamkeit eine zentral gelegene *nucleotid-binding and oligomerization* (NACHT) Domain (*Ursprüngliche Bezeichnung: Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), major histocompatibility complex class II transcription activator (CIITA), incompatibility locus protein from Podospora anserina (HET-E), telomerase-associated protein (TP1) - NACHT* [20]). Diese besitzt eine ATPase Aktivität, welche die Oligomerisation ermöglicht. An deren N-terminalen Ende findet sich eine *caspase recruitment domain* (CARD) oder eine *Pyrin domain* (PYD), am C-terminalen Ende hingegen üblicherweise *leucine-rich repeats* (LRRs). Die NACHT-Domänen erlauben eine weitere Differenzierung in die Subfamilie der NODs, der *NLR proteins* (NLRPs) und der *ICE protease-activating factor* (IPAF) Subfamilie [48,86].

NLRP1 setzt sich zusammen aus einem N-Terminalen PYD gefolgt von der NACHT Domäne, den LRRs, der *Function to find* (FIIND) Domäne und der CARD [15] (Abbildung 4-A). Die FIIND ist ein Alleinstellungsmerkmal des NLRP1 zu den weiteren hier genannten. Eine autolytische Prozessierung innerhalb dessen ist für die Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms unabdingbar [26].

NLRP3 besitzt am N-Terminalen Ende eine PYD-, eine zentrale NACHT-Domäne und C-Terminale LRRs. Es wird von zahlreichen PAMPs und DAMPs aktiviert [89] (Abbildung 4-B).

NLRP6 wird vor allem im Gastrointestinaltrakt, der Lunge und der Leber exprimiert. Es erkennt PAMPs und ist ebenso wie NLRP3 aus den Untereinheiten PYD-NACHT-LRR aufgebaut [100].

NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) wurde ursprünglich als IPAF bezeichnet und nach Bekanntwerden seiner Struktur umbenannt. Es besitzt eine N-Terminale CARD-, sowie eine zentrale NACHT-Domäne mit den LRRs am C-Terminale Ende [23] (Abbildung 4-C).

AIM2 ist ein dsDNA Sensor und besteht aus dem an der DNA bindenden *hematopoietic interferon-inducible nuclear protein with a 200-amino-acid repeat* (HIN 200) Domäne und einer PYD Domäne [80] (Abbildung 4-D).

NLRP1 und NLRC4 besitzen eine eigene CARD Domäne und sind so in der Lage, über deren gleichsinnige Bindung an die CARD-Domäne von Pro-Caspase-1 diese direkt zu rekrutieren und zu aktivieren. NLRP3, NLRP6, NLRC4 und AIM2 sind hingegen auf ein Adapterprotein angewiesen das *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC). Dieses setzt sich aus einer PYD und einer CARD Domäne zusammen und vermittelt so zwischen den ASC-abhängigen Sensoren und dem Effektor; der Caspase-1 [89].

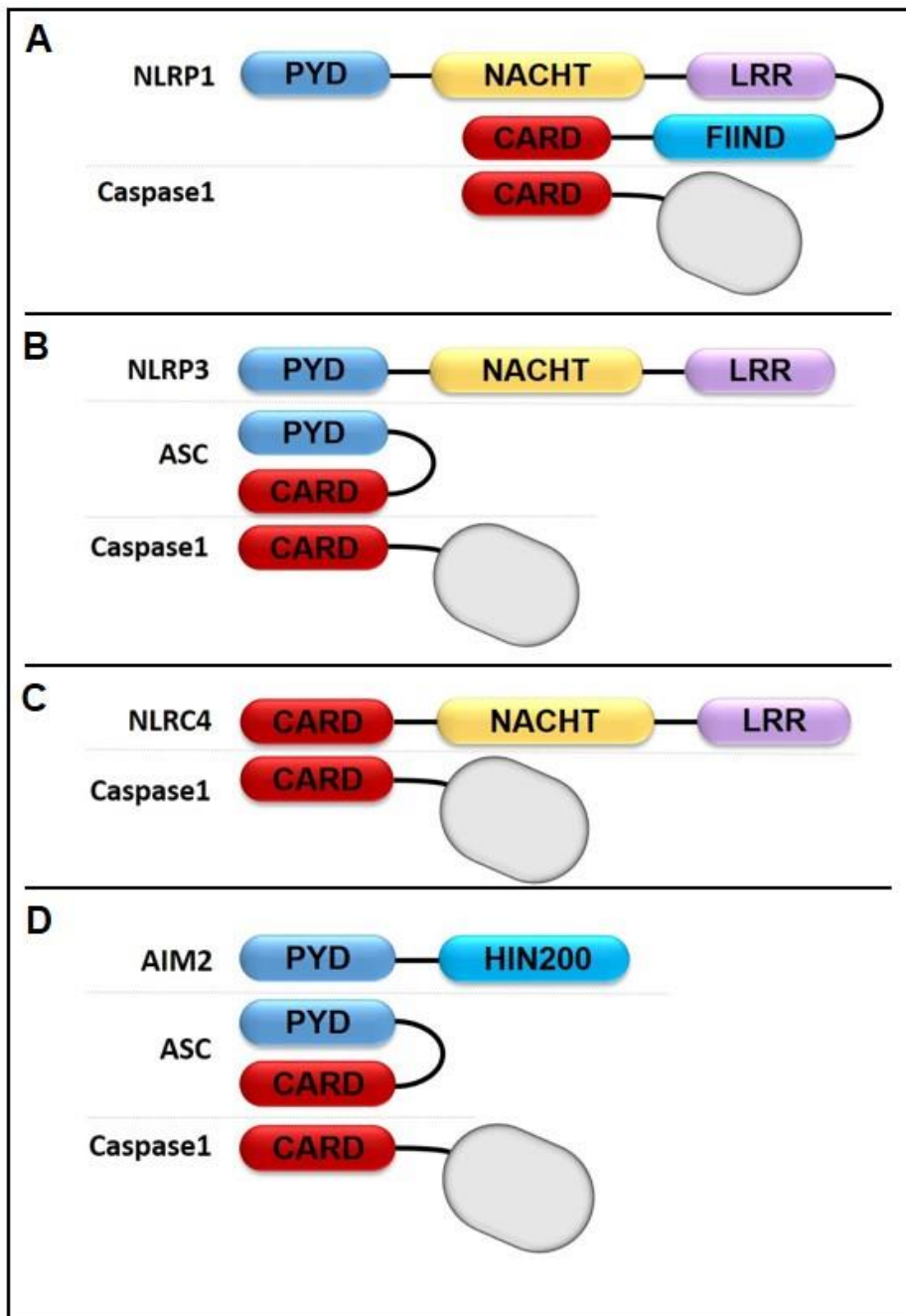


Abbildung 4 – Inflammasome. Schematische Darstellung der minimalen Grundstruktur einiger Inflammasome. (A) ASC-unabhängiges NLRP1-Inflammasom. In der ASC-abhängigen Form wären zwei ASC zwischen der CARD Domäne des NLRP1 und der Caspase 1 (B) NLRP3-Inflammasom (C) ASC-unabhängiges NLRC4-Inflammasom. In der ASC-abhängigen Form wären zwei ASC zwischen der CARD Domäne des NLRC4 und der Caspase 1. (D) AIM2-Inflammasom. Abbildung in Anlehnung an [86,89].

2.3.2 NLRP3-Inflammasom in der Skelettentwicklung

Nach Beobachtungen von abnormen Skelettveränderungen und reduzierter Knochenmasse bei *neonatal-onset multisystem inflammatory disease* (NOMID), welcher eine NLRP3-Mutation zu Grunde liegt, konnte Bonar et al. [9] den Zusammenhang der Inflammasomaktivität auf die gestörte skelettale Entwicklung in NLRP3-Knock-in Mäusen zeigen. Dabei waren die

inflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-18 bei NOMID-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht [9]. IL-1 stimulierte dabei die RANKL Expression durch Osteoblasten, wodurch die Osteoklastenentwicklung gefördert wurde. Dadurch entstand ein Ungleichgewicht im Knochenmetabolismus und es kam zu einer erhöhten Knochenresorption [82]. Der Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf das Skelettsystem bzw. seiner Entwicklung wurde von Detzen et al. [21] vergleichend in NLRP3^{-/-} und NLRP3^{+/-}-Tieren untersucht. Bei diesen Untersuchungen zeigten die Knock-out Mäuse nach vier Wochen ein vermindertes Längenwachstum, welches auf Veränderungen der Wachstumsfuge zurückgeführt werden konnte, bei der die Differenzierung von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten zu reifen mineralisierenden Osteoblasten gestört war [21]. Die Expressierung von NLRP3 in Osteoblasten [60] und in hypertrophen Chondrozyten ist für deren normale Funktion und den Knochenstoffwechsel von großer Bedeutung, was nicht zuletzt am osteopenischen Phänotyp der Knock-out Tiere gesehen werden konnte. Interessanterweise schien die Osteoklastenaktivität der NLRP3^{-/-}-Tieren nicht beeinträchtigt zu sein [21], obwohl die NLRP3-Expressierung in Makrophagen als Osteoklastenvorläufer ausgeprägter ist als in Osteoblasten [2]. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich bestehende Unterschiede im Phänotyp der NLRP3^{-/-}-Tieren -wie der kürzeren Körperlänge, des kürzeren sowie schmalere Femurs und der gestörten trabekulären Struktur- nach 16 Wochen denen des Wildtyps ganz oder teilweise angleichen. Dieser Vorgang war bei weiblichen Mäusen ausgeprägter als bei männlichen Tieren [21].

2.3.3 Inflammasome in der Frakturheilung

Inflammation stellt bei der Frakturheilung einen wichtigen Regulator und Aktivator verschiedener Prozesse dar [25,69] und leitet zusammen mit dem Frakturhämatom die Frakturheilung ein. Es stellt sich allerdings die Frage, ob bzw. welchen Einfluss Inflammasome auf die initiale Inflammation nach einer Fraktur haben und ob der Heilungsprozess hierdurch beeinflusst wird. Letztendlich stehen die Prozessierung von Pro-IL-1 β , Pro-IL-18 und GSDMD in deren aktive Metaboliten durch die Caspase-1 am Ende der Inflammasomaktivität [12]. Während ein Einfluss von IL-1 β und GSDMD auf die Frakturheilung bereits durch Untersuchungen aufgezeigt werden konnte [49,92], bleibt die Bedeutung von IL-18 während der Heilungsphase noch zum größten Teil unklar [92].

In einer Studie von Ni et al. [72] schien IL-18 die Differenzierung von MSC des Knochenmarks hin zu Knochen bildenden Zellen zu fördern. Ob aus diesem Zusammenhang ein Einfluss auf die Frakturheilung besteht, bleibt unklar [72].

Das proinflammatorische IL-1 β ist an zahlreichen Prozessen beteiligt wie der Angiogenese, Förderung der cartilaginären Kallusbildung [56], Steigerung der Differenzierung von Osteoblasten und deren Mineralisierung sowie Hemmung der MSC Proliferation in vitro. Interessanterweise konnten Lange et al. [49] im Tiermodell allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Frakturheilung bei loss-of- bzw. gain-of-function des IL-1 β aufzeigen, abgesehen von Veränderungen des Knorpelanteils im Kallus. Die Autoren vermuten ein Kompensationsmechanismus durch den in seiner Funktion dem IL-1 β ähnlichen TNF- α , was allerdings in der vorliegenden Studie nicht direkt nachgewiesen wurde [49]. Im Gegensatz dazu konnte Li et al. in seiner Studie bei Tieren mit einem Knock-out des IL-1-Rezeptors eine verzögerte Frakturheilung mit verminderter Kallusgröße aufzeigen [92].

GSDMD wird ebenso wie die zuvor genannten Interleukine durch Caspase-1 in seine aktive Form überführt. Es bildet Poren in der Zellmembran, über welche IL-1 und IL-18 die Zelle verlassen können. So kann die Erkennung eines PAMPs oder DAMPs durch Inflammasomaktivierung zu einer potenten extrazellulären Inflammation führen. Zudem kann das Aufheben der Barrierefunktion der Membran mit nachfolgender Störung von Ionen- und Wasserflüssen zur Pyroptose führen [14]. Nach einer Fraktur konnten niedrigere IL-1 β und IL-18 Konzentrationen bei GSDMD^{-/-}-Tieren festgestellt werden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Dies führte zu einer verzögerten Frakturheilung und zu einer reduzierten Stabilität sowie Kallusbildung. Zudem konnten Hinweise auf ein positives Feedback durch die GSDMD-vermittelte Interleukinfreisetzung auf deren mRNA-Expression aufgezeigt werden [92].

Durch die aufgezeigten Effekte der Inflammasomeffektoren auf die Frakturheilung scheint eine Betrachtung der Inflammasome an sich und deren Einflüsse auf die Frakturheilung lohnenswert. NLRP3 und AIM2 werden nach Frakturen vermehrt exprimiert [92]. Bei anderen Erkrankungen, welche mit einer chronischen Inflammation einhergehen, ist NLRP3 ebenfalls beteiligt [22,41,87,99]. Da sich eine chronische bzw. überschießende Inflammation schädlich auf die Frakturheilung zeigt [69], liegt die Inhibierung des NLRP3 zur Therapie nahe [18]. Li et al. [51] untersuchten die Frakturheilung an diabetischen Ratten unter Inhibierung des NLRP3 mittels *short-hairpin ribonucleic acid* (shRNA). Dafür wurden an den Maxillae der Ratten beidseitig 3,0 x 1,5 x 1,5mm große Defekte operativ generiert und entsprechend der Gruppen die Trägerlösung mit oder ohne NLRP3-shRNA lokal injiziert. Dabei konnte nach Inhibierung des NLRP3 bei diabetischen Ratten eine Verbesserung der Frakturheilung gezeigt werden [51]. Der Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die normale Frakturheilung im nicht-chronisch-inflammatorischen Modell wurde meines Wissens nach bislang noch nicht untersucht.

2.4 Ziel und Fragestellung der Dissertation

In dieser Forschungsarbeit wurde die Frakturheilung von NLRP3^{-/-}-Tieren vergleichend mit der Frakturheilung des Wildtyps untersucht werden. Dabei ergaben sich aus der Literaturrecherche folgend Hypothese für die Studie:

1. Es zeigen sich Unterschiede in der Frakturheilung von NLRP3^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp
2. Es gibt keine Kompensation des NLRP3 Knock-Outs auf Inflammasomeebene

3 Material und Methodik

3.1 Ethikantrag und Tiere

Die notwendigen Tierversuche dieser Arbeit wurden durch den Tierschutz des saarländischen

Landesamtes für Verbraucherschutz

GB3: Amtstierärztlicher Dienst

Lebensmittelüberwachung

FB 3.2 – Tierschutz

Konrad-Zuse-Str. 11

66115 Saarbrücken

im Rahmen des Ethikantrages (12/20) genehmigt.

Die Haltung der Tiere sowie die Eingriffe der Studie wurden durchgeführt im

Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Universität des Saarlandes

66421 Homburg

Es wurde die Frakturheilung von transgenen NLPR3^{-/-}-Mäusen (B6.129S6-Nlrp3tm1Bhk/J) mit der Frakturheilung des Wildtyps (C57BL/6) vergleichend untersucht. **Insgesamt wurden 47 Mäuse (23 NLPR3^{-/-}, 24 Wildtyp) behandelt und in die Studie eingeschlossen.** Die Tiere waren zum OP-Zeitpunkt $4,6 \pm 0,8$ Monate (MW \pm SD) alt und hatten ein Gewicht von $24,0 \pm 3,15$ g (MW \pm SD).

Die Mäuse waren hierfür in Kleintierkäfigen, sofern möglich, in Gruppen in der konventionellen Tierhaltung des Institutes untergebracht. Dort herrschte ein 12 stündiger Tag-/Nachtrhythmus unter klimatisierten Bedingungen bei 22°C und einer 60%-igen Luftfeuchtigkeit. Wasser und Futter in Pelletform (1320 Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) stand den Tieren jederzeit frei zur Verfügung.

3.2 Studienprotokoll

Um einen potentiellen Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die Frakturheilung feststellen zu können, musste zunächst eine Fraktur geschaffen werden. Hierfür wurde eine Femurschaftfraktur unter Narkose herbeigefügt und mittels Mouse Screw (siehe 3.3.1) osteosynthetisch versorgt. Dabei sollten nach 2 Wochen je n=10 Tiere aus beiden Studiengruppen zur Gewinnung derer Femora verwendet werden, sowie nach 5 Wochen erneut n=10 Tiere aus beiden Studiengruppen. Zur Gewinnung des Materials für die Western Blot-Analysen sollten nach 2 Wochen zusätzlich n=8 Tiere aus beiden Studiengruppen verwendet werden. Auf eine möglichst ausgewogene Geschlechterverteilung in den Gruppen wurde geachtet.

Bedingt durch Ausfälle, wie perioperatives Versterben, Mehrfragmentfrakturen oder inadäquate Osteosynthese, konnten die in [Tabelle1](#) stehenden Gruppengrößen für die Studie genutzt werden:

Versuchsgruppe	2 Wochen	5 Wochen	Western Blot
Wildtyp	n=8	n=9	n=7
NLRP3 ^{-/-}	n=8	n=10	n=5

Tabelle1 – Versuchsgruppengrößen.

Nach Operation der Tiere sollten deren frakturierten Femora sowie deren Femora der Gegenseite nach den entsprechenden Zeiträumen zu weiterführenden Untersuchungen gewonnen werden. Diese beinhalten biomechanische, radiologische, histologische und immunhistochemische Untersuchungen sowie Western Blot Analysen.

3.3 Operationstechnik

Für diese Studie wurde das Mouse Screw Modell nach *Holstein et al. 2008* [42] als Operationsverfahren verwendet.

Zur präoperativen Analgesie wurde den Tieren am Vortag tramalhaltiges Trinkwasser mit 1mg/mL (Tramal Tropfen 100mg/ml Lösung zum Einnehmen – Grunenthal GmbH, Stolberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt und bis zum dritten Tag postoperativ belassen.

Der Eingriff erfolgte bei allen Tieren in Narkose mittels intraperitonealer Gabe von 100mg/kg Körpergewicht Ketanest (Ursostamin® 100 mg – Serumwerke Bernburg, Bernburg, Deutschland) und 12 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun® 2 % Xylazinhydrochlorid als Xylazin, Elanco-GmbH, Cuxhaven, Deutschland). Zudem wurde präoperativ den in Narkose liegenden Tieren 10mg/kg Körpergewicht Caprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Carprofen, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) subkutan verabreicht. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen wurden auf diese Dexpanthenol Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe – Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Das Operationsfeld wurde durch Rasur und Enthaarungscreme (asid-med® – ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) vorbereitet, anschließend dann desinfiziert (Octeniderm® – Schulke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). An den Arbeitsplätzen wurden Heizmatten verwendet, um einer Hypothermie der Versuchstiere vorzubeugen. Nach dem ca. 4 mm langen Hautschnitt in Höhe des rechten Kniegelenks mittels 11er Klinge (Skalpellklingen aus Karbonstahl – Figur 11, Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg, Deutschland) erfolgte die Mobilisierung der Patella nach lateral, sodass sich bei flektiertem Knie die Femurkondylen gut darstellten (Abbildung 5-A bis -C).

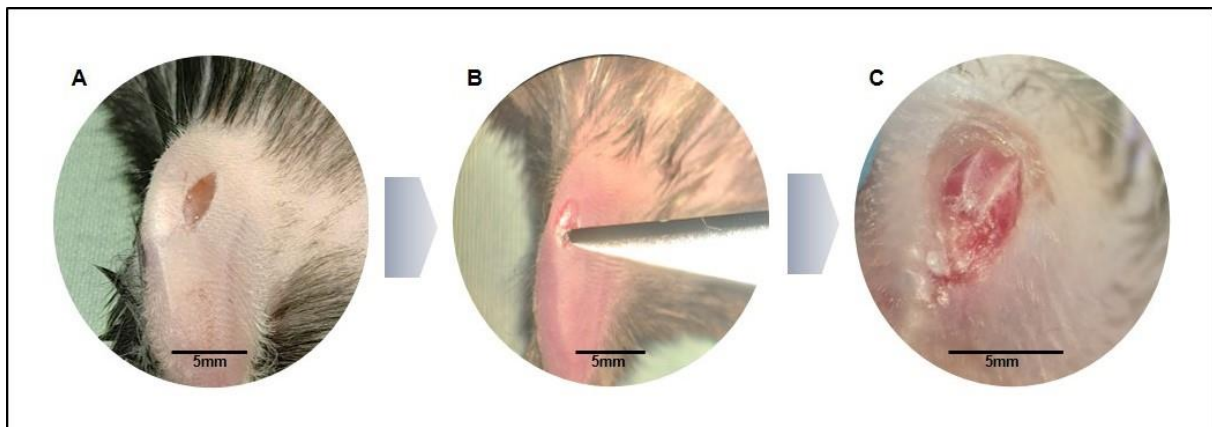


Abbildung 5 - OP Zugang. MouseScrew-OP rechtes Bein. (A) Hautschnitt. (B) Eröffnung des Kniegelenkes (C) Blick auf die Femurkondylen.

Zwischen den Femurkondylen erfolgte die Eröffnung des Markraums mittels Drehbewegung einer 24 G Kanüle (BD Microlance 3™ - 24 G 1" – Nr. 17, Ø 0,55x25 mm – BD Drogheda, Irland). Anschließend wurde eine 27 G Kanüle (Sterican®– Größe 30/42 – G 27x1 1/2 / Ø 0,40x40 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) eingebracht, mit welcher der Trochanter major retrograd durchbohrt wurde. Das nun an beiden Enden eröffnete Femur ermöglichte die Einlage des Führungsdrahtes (GuideTube 0.30/0.20 mm – RISystem AG, Davos, Schweiz) von distal, welcher hüftseitig nach Stichinzision ausgeleitet werden konnte. Die korrekte intramedulläre Lage wurde mittels Röntgen (MX-20 – Faxitron X-ray Corporation, Wheeling,

IL, USA; Faxitron Sr 1.4.1 – Faxitron X-ray Corporation, Wheeling, IL, USA, 24kV Spannung) kontrolliert (Abbildung 6-A bis -C).

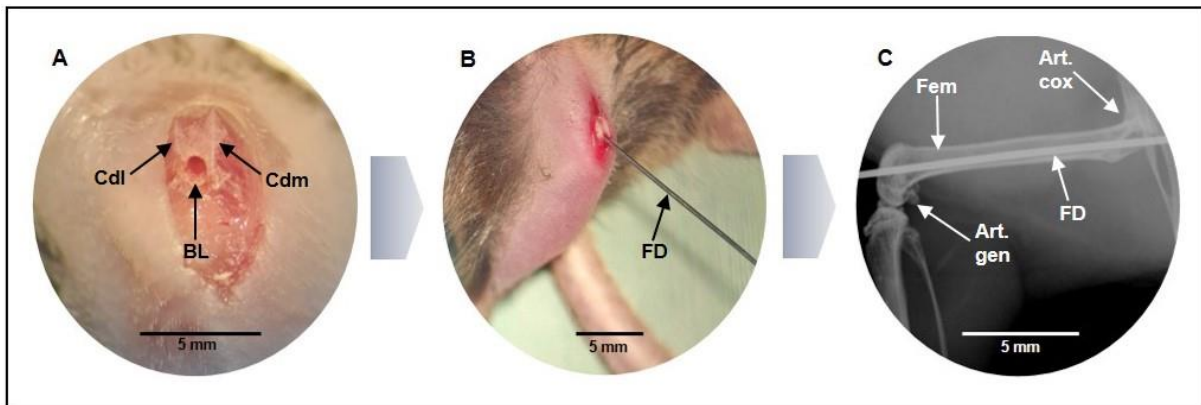


Abbildung 6 - OP Drahteinlage. MouseScrew-OP rechtes Bein. (A) Eröffnetes Femur. **Cdl** Condylus lateralis, **Cdm** Condylus medialis, **BL** Bohrloch. (B) In den Femur eingebrachter **FD** Führungsdraht. (C) Radiologische Lagekontrolle des intramedullären Führungsdrahtes. **Fem** Femur, **Art. cox** Articulatio coxae, **Art. gen.** Articulatio genus, **FD** Führungsdraht.

Im nächsten Schritt erfolgte die Fraktur des Femurs mittels einer stumpfen Drei-Punkt Guillotine [10] im Schaftbereich (Typ A2- A3 Fraktur nach AO-Klassifikation [63]). Jede Fraktur wurde radiologisch dokumentiert (Abbildung 7-A und -B). Im Anschluss daran wurde die Fraktur durch die intramedulläre Einbringung der Mouse Screw (MouseScrew™ – RISystem AG; Länge: 17,2 mm, Ø 0,5 mm) über den Leitdraht versorgt (Abbildung 8-A und -B) und durch deren longitudinalen Zug stabilisiert (Abbildung 9). Der korrekte Sitz sowie eine ausreichende Fixierung wurde radiologisch abermals gesichert, sodass die Schraube an der Sollbruchstelle abgebrochen werden konnte (Abbildung 8-C). Die Patella wurde nach medial rückverlagert, und das Kniegelenk mit Kapselnaht und Hautnaht (5-0 Prolene®, Ethicon Inc., Somerville, USA) verschlossen.

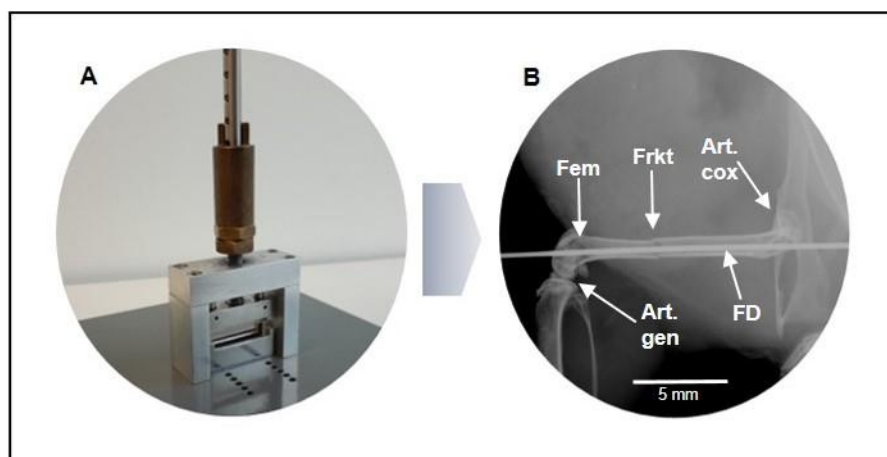


Abbildung 7- OP Fraktur. MouseScrew-OP rechtes Bein (A) Stumpfe Guillotine zur Herbeiführung der Fraktur. (B) Radiologische Kontrolle der Femurschaftfraktur mit einliegendem Führungsdraht. **Fem** Femur, **Art. cox** Articulatio coxae, **Art. gen.** Articulatio genus, **FD** Führungsdraht, **Frkt** Fraktur.

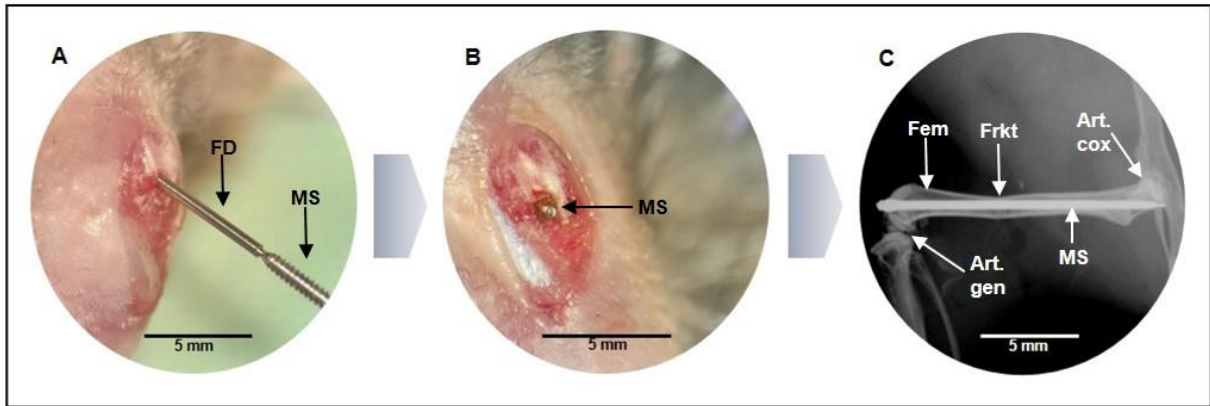


Abbildung 8 - OP Einbringung der MouseScrew. MouseScrew-OP rechtes Bein. (A) In den Führungsdraht eingesteckte Schraube. **FD** Führungsdraht, **MS** MouseScrew. (B) Blick auf das eröffnete Knie nach Einbringung der intramedullären Schraube. **MS** MouseScrew. (C) Radiologische Kontrolle des korrekten Schraubensitzes, **Fem** Femur, **Frkt** Fraktur, **MS** MouseScrew, **Art. gen** Articulatio genus, **Art. cox** Articulatio coxae.

Postoperativ erhielten die Tiere 10mL/kg Körpergewicht NaCl-Lösung 0,9% (Isotone Kochsalzlösung 0,9% - Braun) subkutan injiziert, um den operationsbedingten Flüssigkeitsverlust zu kompensieren. Bis zum Abklingen der Narkose wurden sie in ihren Käfigen neben Infrarot-Wärmelampen beobachtet und anschließend in einen Wärmeschrank verbracht und ihnen eingeweichtes Futter im Käfig angeboten. In der ersten Woche erfolgte die Kontrolle der Tiere täglich mittels Score Sheets; in der zweiten Woche jeden zweiten Tag und darüber hinaus einmal wöchentlich. Hierbei wurden neben der Wundkontrolle vor allem der Allgemeinzustand sowie eventuell bestehende Schmerzen erkannt und beurteilt. Bei Bedarf wurden supportive Maßnahmen, wie Verbringung im Wärmeschrank, Anbieten von eingeweichtem Futter im Käfig, subkutane Flüssigkeitssubstitution oder Analgetika Gabe, ergriffen.

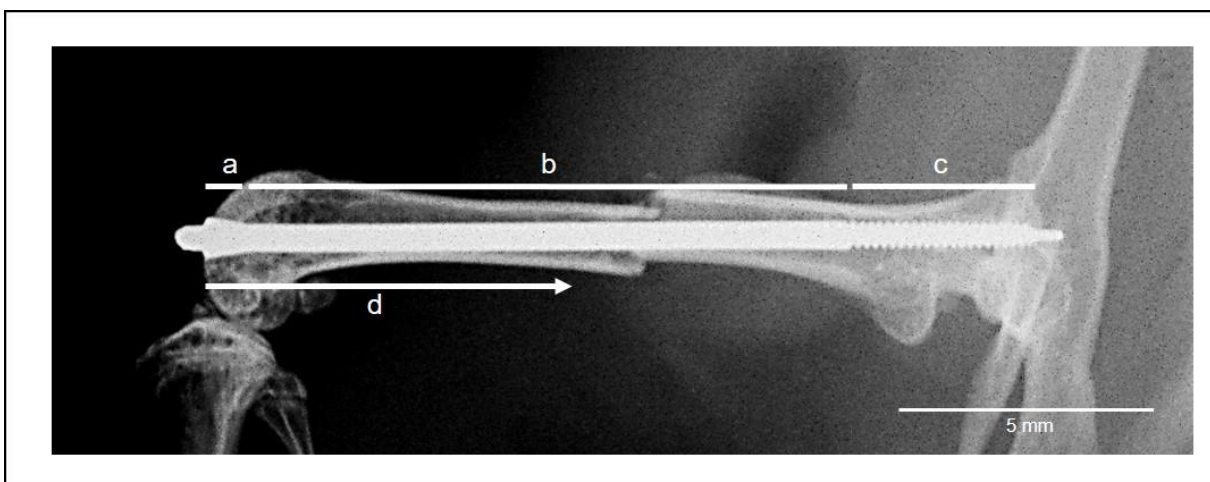


Abbildung 9 – MouseScrew. Rechter Femur nach Fraktur mit MouseScrew in situ. (a) Konischer Schraubenkopf. Durch seine Form wird das distale Femurfragment an das proximale gepresst (b) Schraubenschaft (c) Gewinde zum Aufbau des longitudinalen Schraubenzuges (d) Zugrichtung.

3.3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Je nach Gruppe wurden die Tiere für die Gewinnung der Femora 2 beziehungsweise 5 Wochen postoperativ wiederum in Narkose gelegt und eine Röntgenaufnahme der zuvor operierten Femora angefertigt (Abbildung 10-A bis -D).

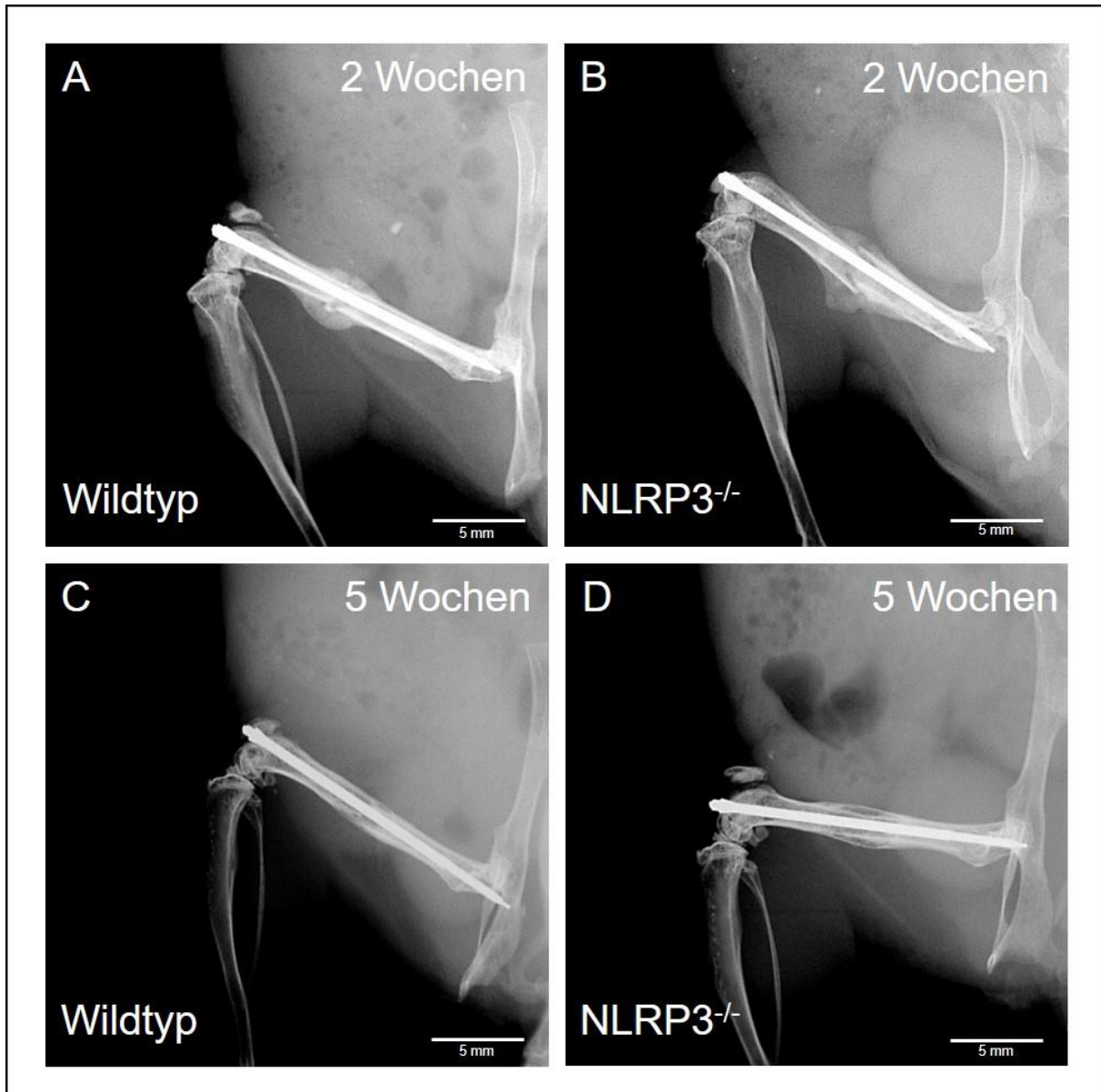


Abbildung 10 - Kallus in vivo. Beispielhafte Röntgenkontrollen rechter Femora vor deren Gewinnung. (A, B) Kallus nach 2 Wochen (C, D) Kallus nach 5 Wochen.

Die Gewinnung des benötigten Materials für die feingeweblichen und biochemischen Untersuchungen erforderte die Tötung der Versuchstiere. Nach erfolgter Narkose und zervikalen Dislokation konnten beide Femora gewonnen werden. Gewebe, welches sich noch an diesen befand, wurde unter Schonung des Knochens und insbesondere des Kallus vorsichtig abpräpariert.

Für die Gewinnung des Kallusmaterials für Western Blot Analysen wurde die intramedulläre Schraube belassen, das Kallus-Gewebe mit einer anatomischen Pinzette herauspräpariert und umgehend in einen auf Eis stehenden Lyse-Puffer gegeben.

Dieser musste zuvor wie folgt angesetzt werden:

1. 100 µL TRIS 1M pH7,5 (Art.-Nr. 0188.3, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
2. 20 µL NaCl 5M (27810.364, VWR International bvba, Leuven, Belgien)
3. 4µL *Ethylendiamintetraacetat* (EDTA) 250mM (Art.-Nr. CN06.3, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
4. 500 µL Triton-x-100 10% (Art. 3051.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)
5. 50 µL NaN₃ 4% (71290-100G, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
6. ad 10 mL Aq. dest.

Nach vollständiger Entfernung wurde das gewonnene Material mitsamt dem Puffer in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.4 Biomechanik

Direkt nach Entnahme der Femora wurde die Mouse Screw aus dem damit versorgten Knochen mittels des dafür vorgesehenen Schraubendrehers durch Herausdrehen entfernt und die Stabilität der Fraktur und die des nicht operierten Femurs gemessen. Hierzu wurde eine Drei-Punkt-Biegung (Mini-Zwick Z 2.5 – Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) verwendet, welche die Biegesteifigkeit in Newton pro Millimeter Biegung erfasste. Die Femora wurden stets mit der proximalen Seite nach rechts und ventralen Seite nach oben zeigend aufgelegt. Der Abstand der Auflageflächen betrug 6 mm (Abbildung 11).

Die zerstörungsfreie Testung war essentiell für die sich anschließende histologische Untersuchung. Aufgrund der interindividuellen Unterschiede in der Frakturheilung konnten die Messungen der einzelnen Knochen allerdings nicht mit einer pauschalen Krafteinwirkung erfolgen. Sobald das abgeleitete Kraft-Weg-Diagramm [N/mm] um mehr als 1% von seinem linearen Verlauf abwich wurde die Messung gestoppt. Die Biegesteifigkeit wurde am linearen Bereich des Diagramms bestimmt [68] (Abbildung 12-A bis -D).

Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Knochen bei -80°C eingewickelt in mit 0,9%-igen NaCl getränkten Kompressen.

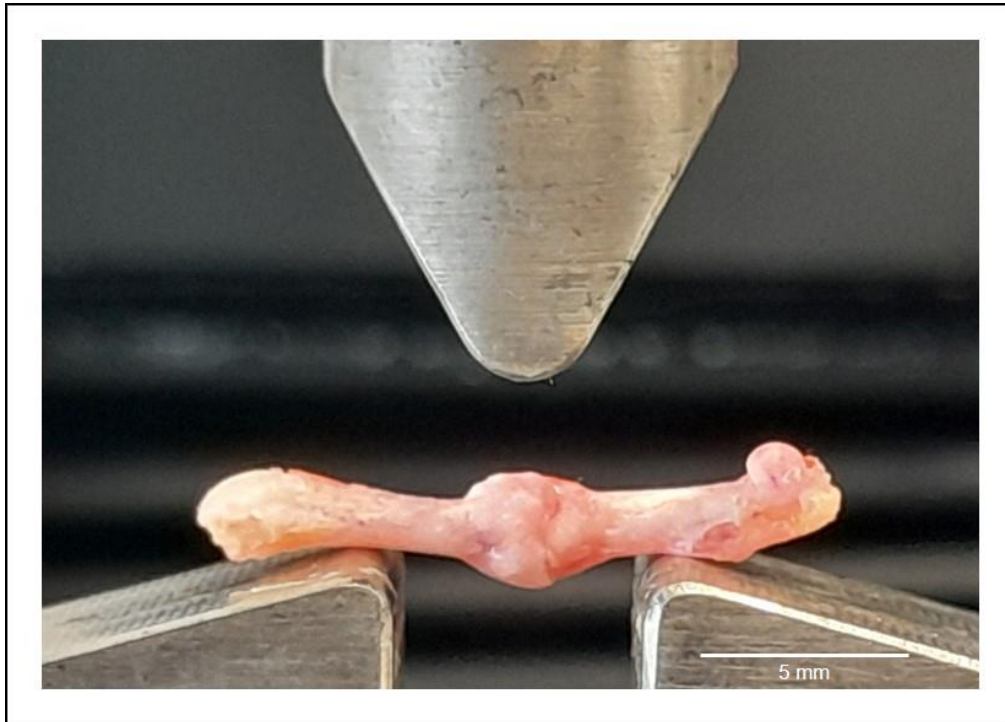


Abbildung 11 – Biomechanik. Testung eines frakturierten Femurs aus der 2-Wochen Gruppe mittels 3-Punkt-Biegung.

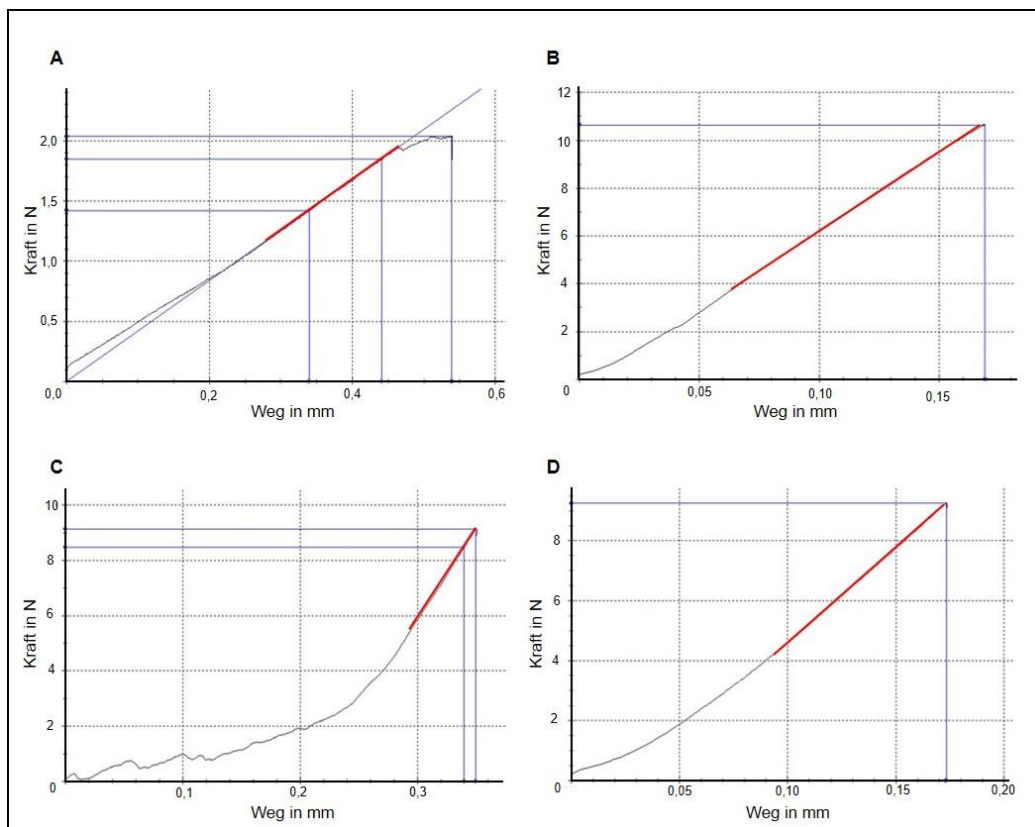


Abbildung 12 - Biomechanikkurve. Aufgetragen ist die Kraft [N] pro Weg [mm]. Messbereich exemplarisch rot markiert (A) OP-Seite eines Tieres der 2 Wochen Gruppe (B) Unfrakturierte Gegenseite des gleichen Tieres der 2 Wochen Gruppe (C) OP-Seite eines Tieres der 5 Wochen Gruppe (D) Unfrakturierte Gegenseite des gleichen Tieres der 5 Wochen Gruppe.

3.5 Computertomographie

3.5.1 Zielgrößen

Mittels der Computertomographie sollte der Kallus radiologisch dargestellt und ausgewertet werden. Erhoben wurden für die Morphometrie des Knochen standardisierte Zielgrößen [75] im Bereich des Kallus:

- Knochenvolumen [mm^3] – (Bone Volume, BV)
- Kallusvolumen [mm^3] – (Tissue Volume, TV)
- Anteil des Knochenvolumens am Kallus Volumen [%] – (BV/TV)
- Trabekeldicke [mm] – (Trabecular Thickness, TbTh)
- Trabekelabstand [mm] – (Trabecular Separation, TbSp)
- Trabekelanzahl [$1/\text{mm}$] – (Trabecular Number, TbNb)
- Trabekel Konnektivitätsindex [$1/\text{mm}$] – (Trabecular Bone Pattern Factor, TBPf)

3.5.2 Geräte und Software

Für die Untersuchungen wurde der *Mikrocomputertomograph* (μCT) (Skyscan High-Resolution in-vivo X-Ray microtomograph, Bruker CT SkyScan Serie 1176, RJL Micro&Analytic GmbH, Karlsdorf-Neuthard, Deutschland) des Institutes verwendet. Die Auswertung der generierten Datensätze erfolgte mit der dazugehörigen Software (CT Analyser, Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) sowie NRecon (Version 1.6.10.6, Bruker, USA).

3.5.3 CT-Aufnahmen

Zunächst erfolgte die Einstellung der gewünschten Parameter. Die Anfertigung der Nativaufnahmen wurden in High Resolution unter Verwendung des 0,5 mm Aluminiumfilters mit einer Belichtungszeit von 3600 ms und einer Spannung von 50 kV bei einer Stromstärke von 200 μA durchgeführt. Die Schichtdicke betrug 9 μm .

Nach Auswahl der Einstellungen folgte der Weißabgleich mit Styroporschale ohne Proben.

Anschließend konnten die Femora nach dem Auftauen aus den mit 0,9%-igen NaCl getränkten Kompressen genommen und in beschriftete Eppendorfgefäße verbracht werden. Diese wurden in die auf der μCT -Tisch befindliche Styroporhalbröhre gelegt und festgeklemmt um ein Verrutschen der Proben während der Aufnahme zu vermeiden. Eine Aluminiummarkierung wurde rechtsseitig außerhalb des Messbereiches angebracht, sodass diese in der

Übersichtsaufnahme als rechte Seite identifiziert werden konnte, um die Femora sicher zuteilen zu können. Für einen Scannerdurchlauf wurden maximal drei Knochen gleichzeitig untersucht. Mittels einer zunächst angefertigten Übersichtsaufnahme konnte der Zielbereich festgelegt sowie die eigentliche Aufnahme gestartet werden.

3.5.4 Bearbeitung der Datensätze

Der generierte Datensatz aus umlaufenden Röntgenbildern wurde mittels der NRecon Software prozessiert (Einstellungen: Smoothing 2, Beam-hardening correction 20%, Output mit maximal value (in allen coeff.): 0,100000.), sodass die einzelnen Femora aus dem Datensatz separiert wurden und als jeweils eigener CT-Datensatz zur Analyse vorlag.

3.5.5 Kallus Analyse

Mit Hilfe des „CT Analyser“ wurden die Bereiche des Knochens ausgewählt, die Kalusgewebe enthielten, das sogenannte „*Volume of Interest*“ (VOI). In diesen wurden dann im Programm händisch alle 50 Bilder der Kallus, unter Auslassung des Markraums und kortikaler Anteile, umfahren. Das Programm führte bei den restlichen Bildern eine automatische Markierung des Kallus durch, welche kontrolliert angepasst wurden. Der so entstandene Datensatz ist die „*Region of Interest*“ (ROI) und stellt den Kallus dar, der nachfolgend mittels „BATch MANager“ des „CT Analyser“ ausgewertet wurde. Dabei wurden jeweils das Histogramm [Bone mineral density], die 3-Dimensionale Analyse mit einer Schwelle von 68-255 und eine mit einer Schwelle von 68-97 eingestellt. (Abbildung 13-A und -B)

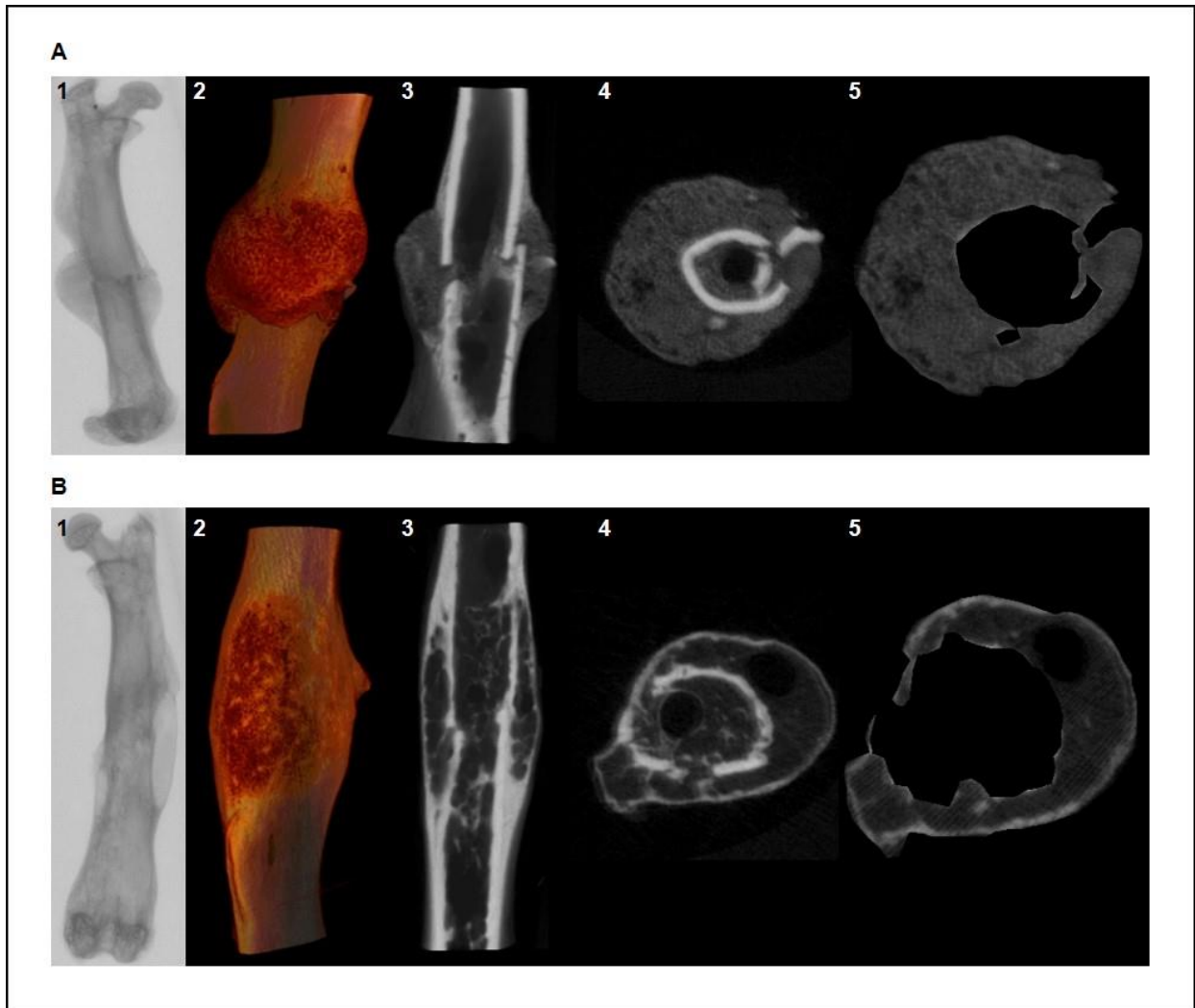


Abbildung 13 - Radiologische Kallusdarstellung. (A) Darstellung eines frakturierten Femurs nach 2 Wochen und (B) nach 5 Wochen. 1 CT-Übersichtsaufnahme 2 3D Volumenrekonstruktion 3 CT Frontalschnitt 4 CT Transversalschnitt 5 ROI.

3.6 Histologische und immunohistochemische Analyse

3.6.1 Probenaufbereitung

Nach stattgehabter biomechanischer und μ CT-graphischer Analyse erfolgte die histologische Untersuchung der Femora. Die bislang bei -80°C gelagerten Femora mussten zunächst für die histologische Aufarbeitung vorbereitet werden. Dafür stellte die Fixierung einen zentralen Schritt dar, da hierbei die Zellaktivitäten gestoppt und ein Erhalt der Zellstrukturen erzielt werden konnte [71]. Die Femora wurden hierzu für 24 Stunden bei 4°C in 4%-igem Paraformaldehyd (REF 11762.02500, MORPHISTO GmbH, Offenbach, Deutschland) gelegt. Es folgte eine 30-minütige Spülung mit PBS (BioWhittaker® 17-517Q, Lonza, Walkersville, Maryland, USA), welcher sich die Dekalzifizierung über 14 Tage mittels EDTA-Puffer-Lösung

(wie in 3.6.2.3 MPO-Färbung beschrieben) anschloss. Die Lösung wurde nach zwei Wochen durch 30-minütiges Spülen mit Leitungswasser entfernt. Im nächsten Schritt folgte die Gewebereinbettung (MTM, SLEE medical GmbH, Nieder-Olm, Deutschland) beginnend mit einer Stunde Wasser, weiterführend in Ethanol (85033.320, VWR International bvba) zu je einer Stunde in 70%, 80%, 90%, sowie drei Stunden in 100% Ethanol, drei Stunden mit Xylol (X/0200/17, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) und abschließend drei Stunden mit Paraffin (ROTI®Plast Art.-Nr. 6642.6, Carl Roth GmbH + Co. KG). Die so behandelten Femora wurden in Paraffin (Carl Roth GmbH + Co. KG) ausgeblockt. Für die spätere Auswertung sollten die Schnitte möglichst parallel zur Längsachse des Knochens verlaufen und den Kallus an der breitesten Stelle abbilden. Das Mikrotom (RM2265, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) wurde auf eine 3µm dicke Schnittführung eingestellt. Die Objektträger, auf welche die so gewonnenen Proben gezogen wurden, waren mit Poly-L-Lysin (CAS-No: 25988-63-0, Merck KGaA) benetzt, was die Probe am Objektträger hielt und eine Ablösung bei den nachfolgenden Färbungen verhinderte [71]. Nach dem Aufbringen der Proben auf die Objektträger lagerten diese über Nacht im Trockenschrank bei 60°C und konnten für die anschließenden Färbungen verwendet werden.

3.6.2 Färbungen

Für die Färbungen wurden Chemikalien in unterschiedlichen Konzentrationsstufen verwendet. Diese wurden aus deren konzentrierten Formen mit den entsprechenden Anteilen Aq. dest. beziehungsweise mit PBS (Lonza) bei den Antikörpern hergestellt. Die Herstellerangaben zu den Substanzen entspricht den konzentrierten Formen.

Färbung haben zum Ziel an unterschiedliche Strukturen des Gewebeschnittes zu binden und diese so darzustellen. Dabei hängt es von den Farbstoffen und deren physikochemischen Eigenschaften ab, wie und mit welchen Strukturen diese interagieren. So kann es sich auch lediglich um unterschiedliche Verteilungen in den Kompartimenten handeln, ohne dass es sich um eine direkte Bindung an das Gewebe handelt. [71] Für die Darstellung des Kallus und zu dessen histomorphometrischen Beurteilung wurde eine Färbung mittels Safranin O verwendet. Des Weiteren erfolgte eine Färbung der *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), wodurch Osteoklasten stark anfärbt wurden und so deren Darstellung erlaubte [38].

Immunhistochemische Färbungen ermöglichten es hingegen gezielt bestimmte Proteine und Glycoproteine untersuchen zu können. Dazu wurden spezifische Antikörper gegen die Antigene des darzustellenden Makromoleküls verwendet, wobei als Technik die direkte von der indirekten Immunmarkierung unterschieden werden musste. Bei der direkten Methode werden bereits markierte Primärantikörper verwendet, welche somit bereits direkt sichtbar sind. Bei der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Methode mussten die nicht markierten

Primärantikörper in einem zweiten Schritt durch Bindung von markierten Sekundärantikörpern an dessen Fc-Segment sichtbar gemacht werden. Dies bot den Vorteil der Signalverstärkung durch Mehrfachbindungen von Sekundär- an Primärantikörpern. Eine weitere Prozessierung der Markierung konnte zur Visualisierung notwendig sein.

Die verwendeten Färbungen der *Myeloperoxidase*- (MPO), die *Cluster of differentiation* (CD) 68- und CD31-Färbung wurden mittels indirekter Immunhistochemie angefertigt.

3.6.2.1 Safranin O - Färbung

Die Färbung der histologischen Schnitte mittels Safranin O erforderten zunächst die Herstellung einer **Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert**:

1. Stammlösung A mit 1g Hämatoxylin (REF 1.04302.0025, Merck KGaA) in 100 mL 96% Ethanol aus 99,5% Ethanol (85033.320, VWR International bvba) und destilliertem Wasser. Die Lösung eine Woche reifen lassen.
2. Stammlösung B aus 2,48g Eisenchlorid (803945, MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland), 100 mL destilliertem Wasser und 1 mL Salzsäure (REF 1.00314.1000, Merck KGaA).

Die anschließende **Safranin O - Färbung** wurde entsprechend des nachfolgenden Protokolls durchgeführt:

1. 3 mal 5 Minuten in Xylol (X/0200/17, Fisher Scientific GmbH) entparaffinieren und Verbringen in Aq. dest.
2. 1-minütiges Tauchen in Eisenhämatoxylin nach Weigert
3. Spülen mit Aq. dest.
4. Differenzieren in HCl-Alkohol aus 1% konzentrierte HCl (REF 1.00314.1000, Merck KGaA) und 99% 70%-iges Ethanol-Lösung aus Ethanol (85033.320, VWR International bvba) und Aq. dest.
5. 5 Minuten Bläuen mit Leitungswasser
6. Spülen mit Aq. dest.
7. 4-minütiges Tauchen in 0,02% Fast Green (F7258-25G, Merck KGaA)
8. Spülen mit 1%-iger Essigsäure (20104.334, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich)
9. 5 Minute in 0,1% Safranin O (S884, Merck KGaA) tauchen
10. Entwässern ab 90 % Ethanol (VWR International bvba)
11. Tauchen in Xylol (Fisher Scientific GmbH)
12. 2 Tropfen ROTI®Histokitt (Art-Nr. T160.2, Carl Roth GmbH + Co. KG) und eindecken.

3.6.2.2 TRAP - Färbung

Die Anfärbung der TRAP erforderte zunächst das Ansetzen mehrerer Lösungen:

TRAP Basic Inkubationsmedium

1. 9,2g Natriumacetat anhydrous (S2889, Merck KGaA)
2. 11,4g Natriumtartrat dibasisch dihydrat (S4797-100G, Merck KGaA)
3. 950mL Aq. dest.
4. 2,8mL Eisessig (VWR International S.A.S)
5. auf pH 4,8 bis 5,0 einstellen mit Eisessig beziehungsweise Titrisol® Sodium hydroxide solution (1.09956.0001, Merck KGaA) mit Aq. dest auf 1000mL auffüllen

Naphtol AS-MX Phosphat Substrat Mix

1. 20 mg Naphtol AS-MX Phosphat (N4875-1G, Merck KGaA)
2. 1mL 2-Ethoxyethanol (Art.-Nr.: 5127.3, Carl Roth GmbH + Co. KG)

TRAP Färbelösung

1. 200mL TRAP Basic Inkubationsmedium
2. 120mg Echviolettsalz LB (F3381, Merck KGaA)
3. 1mL Naphtol AS-MX Phosphat Substrat Mix

Die Durchführung der **TRAP-Färbung** verlief nach Vorbereitung entsprechend des folgenden Protokolls:

1. Vorwärmen der TRAP Färbelösung auf 37°C im Wasserbad
2. Die Schnitte entparaffinieren
3. 45 Minuten bei 37°C mit der TRAP Färbelösung inkubieren
4. Spülen mit Aq. dest.
5. Färbung der Kerne mittels Mayers Hämalaunlösung (REF 1.09249.1000, Merck KGaA) für 5 Sekunden
6. 5 Minuten Bläuen mit Leitungswasser
7. Spülen mit Aq. dest.
8. Eindecken mit Glyceringelatine (REF 1.08635.0100, Merck KGaA)

3.6.2.3 MPO - Färbung

Zunächst wurde eine **EDTA-Puffer-Lösung** angesetzt (für 5L):

1. 1,85g EDTA (Art.-Nr. 8040.2, Carl Roth GmbH + Co. KG)
2. 6,05g Tris-Base (Art.-Nr. 4855.2, Carl Roth GmbH + Co. KG)
3. Destilliertes Wasser

Anschließend konnte die Färbung der MPO entsprechend des folgenden Protokolls angefertigt werden:

1. Mit 3 mal 5 Minuten in Xylol (Fisher Scientific GmbH) entparaffinieren und Verbringen in Aq. dest.
2. Rehydrieren mittels absteigender Ethanolreihe (VWR International bvba):
 - i. 100% Ethanol 2 mal 3 Minuten
 - ii. 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol je 3 Minuten
3. 5 Minuten in Aq. dest. tauchen
4. Epitopdemaskierung mittels EDTA-Puffer pH 9,0 für 17 Stunden bei 60°C im Brutschrank
5. Spülen mit Aq. dest.
6. Blockieren endogener Peroxidasen mit einer Lösung aus 3% Wasserstoffperoxid (PZN 07284667, OTTO FISCHAR GmbH & CO. KG, Saarbrücken, Deutschland) und 97% Methanol (20847.320, VWR International S.A.S.)
7. Spülen mit Aq. dest.
8. Spülen mit PBS (Lonza)
9. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mittels 3%-igem Ziegenserum (005-000-121, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ely, Vereinigtes Königreich) in PBS (Lonza) für 30 Minuten
10. Auftragen von 2 Tropfen Avidin-Blockierlösung (REF R37627, Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon, USA) für 15 Minuten
11. Auftragen von Biotin-Blockierlösung (REF R37627, Life Technologies Corporation) für 15 Minuten
12. 2 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
13. Inkubation mit polyklonalem Kaninchen anti-Human MPO-Antikörper (ab9535, Abcam plc., Cambridge, Vereinigtes Königreich) 1:100 über Nacht bei Raumtemperatur
14. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
15. Inkubation mit Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper (ab64256, Abcam plc.) für 45 Minuten bei Raumtemperatur

16. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
17. Inkubation mit Streptavidin HRP (ab64269, Abcam plc.) für 15 Minuten bei Raumtemperatur
18. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
19. Inkubation mit PolyDetector Liquid ACE (BSB 0014, Bio SB Inc., Santa Barbara, Kalifornien, USA) für 2-5 Minuten
20. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
21. Spülen mit Aq. dest
22. Färbung der Kerne mittels Mayers Hämalaunlösung (REF 1.09249.1000, Merck KGaA)
23. Spülen mit Aq. dest.
24. 10 Minuten Bläuen mit Leitungswasser
25. Spülen mit Aq. dest.
26. Eindecken mit Glyceringelatine (Merck KGaA)

3.6.2.4 CD68 – Färbung

Die CD68-Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Mit 3 mal 5 Minuten in Xylol (Fisher Scientific GmbH) entparaffinieren und Verbringen in Aq. dest.
2. Rehydrieren mittels absteigender Ethanolreihe (VWR International bvba):
 - i. 100% Ethanol 2 mal 3 Minuten
 - ii. 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol je 3 Minuten
3. 5 Minuten in Aq. dest. tauchen
4. Epitopdemaskierung mittels EDTA-Puffer pH 9,0 für 17 Stunden bei 60°C im Brutschrank
5. Spülen mit Aq. dest.
6. Blockieren endogener Peroxidasen mit einer Lösung aus 3% Wasserstoffperoxid (PZN 07284667, OTTO FISCHAR GmbH & CO. KG) und 97% Methanol (20847.320, VWR International S.A.S.)
7. Spülen mit Aq. dest.
8. Spülen mit PBS (Lonza)
9. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mittels 3%-igem Ziegenserum (005-000-121, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) in PBS (Lonza) für 30 Minuten
10. Auftragen von 2 Tropfen Avidin-Blockierlösung (REF R37627, Life Technologies Corporation) für 15 Minuten

11. Auftragen von Biotin-Blockierlösung (REF R37627, Life Technologies Corporation) für 15 Minuten
12. 2 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
13. Inkubation mit polyklonalem Kaninchen anti-Maus CD68-Antikörper (ab125212, Abcam plc.) 1:300 über Nacht bei Raumtemperatur
14. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
15. Inkubation mit Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper (ab64256, Abcam plc.) für 45 Minuten bei Raumtemperatur
16. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
17. Inkubation mit Streptavidin HRP (ab64269, Abcam plc.) für 15 Minuten bei Raumtemperatur
18. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
19. Inkubation mit PolyDetector Liquid ACE (Bio SB Inc.) für 2-5 Minuten
20. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
21. Spülen mit Aq. dest
22. Färbung der Kerne mittels Mayers Hämalaunlösung (REF 1.09249.1000, Merck KGaA)
23. Spülen mit Aq. dest.
24. 10 Minuten Bläuen mit Leitungswasser
25. Spülen mit Aq. dest.
26. Eindecken mit Glyceringelatine (Merck KGaA)

3.6.2.5 CD31 – Färbung

Die Anfertigung der CD31-Fluoreszenzfärbung erfolgte entsprechend des nachfolgenden Protokolls:

1. Mit 3 mal 5 Minuten in Xylol (Fisher Scientific GmbH) entparaffinieren und Verbringen in Aq. dest. rehydrieren mittels absteigender Ethanolreihe (VWR International bvba):
 - i. 100% Ethanol 2 mal 3 Minuten
 - ii. 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol je 3 Minuten
2. 5 Minuten in Aq. dest. tauchen
3. Epitopdemaskierung mittels EDTA-Puffer pH 9,0 für 17 Stunden bei 60°C im Brutschrank
4. Spülen mit Aq. dest.
5. Spülen mit PBS (Lonza)

6. Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des Sekundärantikörpers mittels 3%-igem Ziegenerum (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) in PBS (Lonza) für 30 Minuten
7. Inkubation mit monoklonalem Kaninchen anti-Maus CD31-Antikörper (ab182981, Abcam plc.) 1:200 bei Raumtemperatur über Nacht
8. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
9. Inkubation mit polyklonalem Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper (A21429, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) 1:200 bei Raumtemperatur für 60 Minuten
10. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
11. Kernfärbung mittels 2µg/mL bisBenzimid H33342 (B2261, Merck KGaA) für 5 Minuten
12. 10 Minuten mit PBS (Lonza) spülen
13. Spülen mit Aq. dest.
14. Eindecken mit Glyceringelatine (Merck KGaA)

3.6.3 Mikroskopische Arbeiten

3.6.3.1 Geräte und Software

Die Mikroskopie der CD31-Färbungen und die Aufnahmen zu deren Auswertung wurde mit einem Keyence Fluoreszenzmikroskop (BZ-X810, Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) angefertigt unter Nutzung der BZ-X800 Viewer Software (Keyence Deutschland GmbH).

Die restlichen Färbungen wurden mit einem Gerät der Firma Olympus (BX60, Olympus, Tokyo, Japan) mikroskopiert. Zum Anfertigen der Aufnahmen wurden dessen Kamera (D37, Olympus) und das Programm „cellSens Dimensions“ (Version 1.18, Olympus) verwendet.

Die Auswertung der Aufnahmen wurden mit der Software „ImageJ“ (U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) vorgenommen.

3.6.3.2 Hellfeldmikroskopie

Für die Aufnahmen wurden die Femora mit der proximalen Seite nach rechts zeigend aufgelegt.

Von den Safranin O gefärbten Knochen wurde je eine Übersichtsaufnahme in 12,5-facher Vergrößerung angefertigt, anhand welcher die histomorphometrischen Untersuchungen erfolgten.

Bei den restlichen Färbungen wurden von den Femora der 2-Wochen-Gruppen je elf Aufnahmen des Kallus entsprechend des Aufnahmen Schemas Histologie (Abbildung 14-A) angefertigt; von den Knochen der 5-Wochen-Gruppe, wegen des kleineren Kallus, hingegen je sieben Aufnahmen, wie im Aufnahmen Schema Histologie (Abbildung 14-B) gezeigt. Die Bilder wurden in einer 400-fachen Vergrößerung angefertigt, sodass sie als High Power Field vorlagen und eine Fläche von ca. 0,1 mm² abbildeten. Somit konnte das Vorkommen bestimmter Zellen beziehungsweise deren Häufigkeit untersucht werden. Die positiv gefärbten Zellen pro HPF wurden gezählt und für jeden Knochen ein entsprechender Mittelwert als Zellen pro HPF gebildet.

Die über den Kallus entsprechend des in Abbildung 14 gezeigten Aufnahmeschemas verteilten Auszählungsbereiche sollten einen repräsentativen Mittelwert und eine gute Vergleichbarkeit gewährleisten.

3.6.3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Ebenso wie in der Hellfeldmikroskopie wurden bei den Fluoreszenzaufnahmen das im Aufnahmen Schema Histologie (Abbildung 14-A und -B) gezeigte Schema für die jeweiligen Gruppen verwendet. In der CD31-Färbung wurden pro Aufnahmepunkt je ein Bild der mittels bisBenzimid H33342 (Merck KGaA) gefärbten Kerne und ein Bild der CD31 Signale angefertigt und übereinander gelagert. Die Bilder wurden in einer 400-fachen Vergrößerung angefertigt, sodass sie als *high power field* (HPF) vorlagen und eine Fläche von ca. 0,1 mm² abbildeten. Die Ergebnisse wurden als Gefäße pro HPF angegeben.

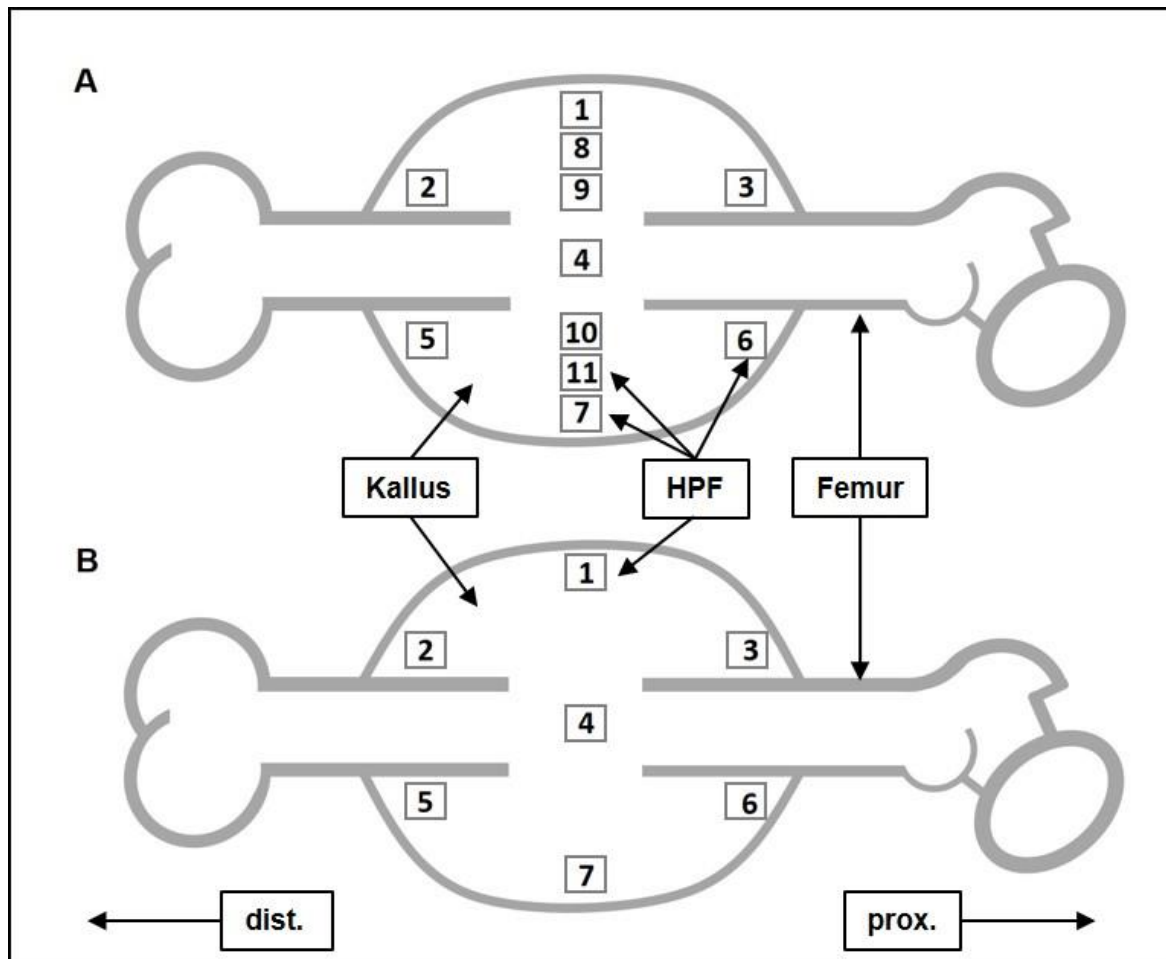


Abbildung 14 - Aufnahmen Schema Histologie. Schematische Darstellung eines histologischen Femurpräparates nach Frakturierung und Kallusbildung. Gezeigt werden die Position der **HPF** High Power Fields für die Auswertung nach **(A)** 2 Wochen (1-11) und nach **(B)** 5 Wochen (1-7). **dist.** distal, **prox.** proximal.

3.6.4 Auswertung

3.6.4.1 Safranin O - Färbung

Die Histomorphometrie des Kallus erfolgte an den Schnitten der Safranin O - Färbung (Abbildung 15) und wurde unter Verwendung des Programms „ImageJ“ ausgewertet. Erhoben wurden folgende standardisierten Zielgrößen des Kallus [32,75]:

- Femurdurchmesser - *B_{Dm}* (bone diameter) [mm]
- Kallusdurchmesser – *C_{Dm}* (callus diameter) [mm]
- Kallusfläche – *C_{Ar}* (total callus area) [mm²]
- Knöcherne Kallusfläche – *TOT_{Ar}* (total osseus tissue area) [mm²]
- Fläche Geflechtknochen – *WoB_{Ar}*. (Woven bone area) [mm²]
- Fläche Lamellenknochen – *LmB_{Ar}* (Lamellar bone area) [mm²]
- Fläche Bindegewebe - *FT_{Ar}* (fibrous tissue area) [mm²]
- Fläche Knorpel – *Cg_{Ar}* (Cartilage area) [mm²]

Aus den ermittelten Werten ließen sich folgende Anteile bilden:

- Kallusdurchmesser zu Femurdurchmesser – CDm/BDm [%]
- Kallusfläche zu Femurdurchmesser – CAr/BDm [%]
- Anteilig knöcherne Fläche am Kallus – $TOTAr/CAr$ [%]
- Anteilig Geflechtknochenfläche am knöchernen Kallus – $WoBAr/TOTAr$ [%]
- Anteilig Lamellenknochenfläche am knöchernen Kallus – $LmBAr/TOTAr$ [%]
- Anteil Bindegewebe am Kallus – $FTAr/CAr$ [%]
- Anteil Knorpel am Kallus – $CgAr/CAr$ [%]

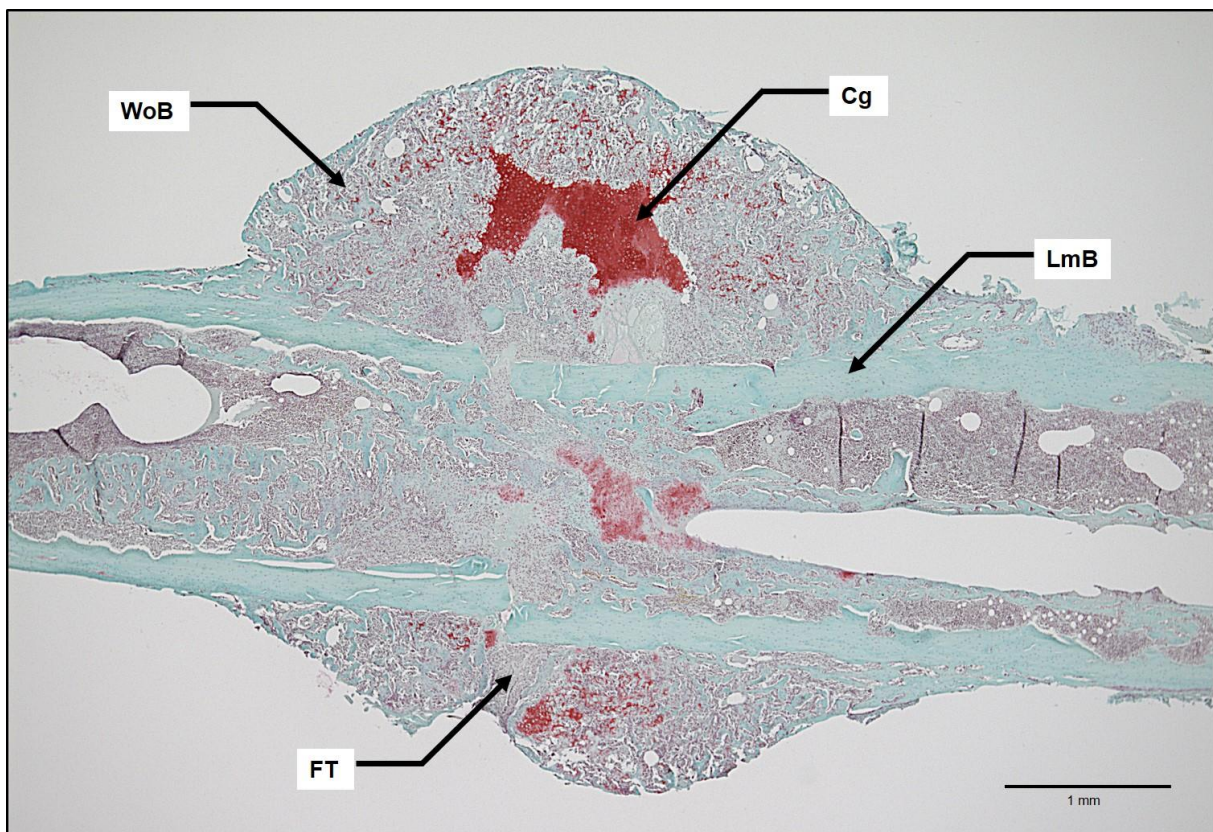


Abbildung 15 - Safranin O-Färbung. Sagittalschnitt durch ein frakturiertes Femur 20-fache Vergrößerung. **Cg** Knorpel, **FT** Bindegewebe, **LmB** Lamellenknochen, **WoB** Geflechtknochen.

3.6.4.2 TRAP - Färbung

Die Anfärbung des reichlich in Osteoklasten vorkommenden Enzyms sorgt für eine gute Darstellung derer gegenüber dem restlichen Gewebe [38]. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen mit vielen Vakuolen im aktiven Zustand, welche der knöchernen Fläche anliegen [78]. In der TRAP-Färbung stellten sie sich lila dar (Abbildung 16).

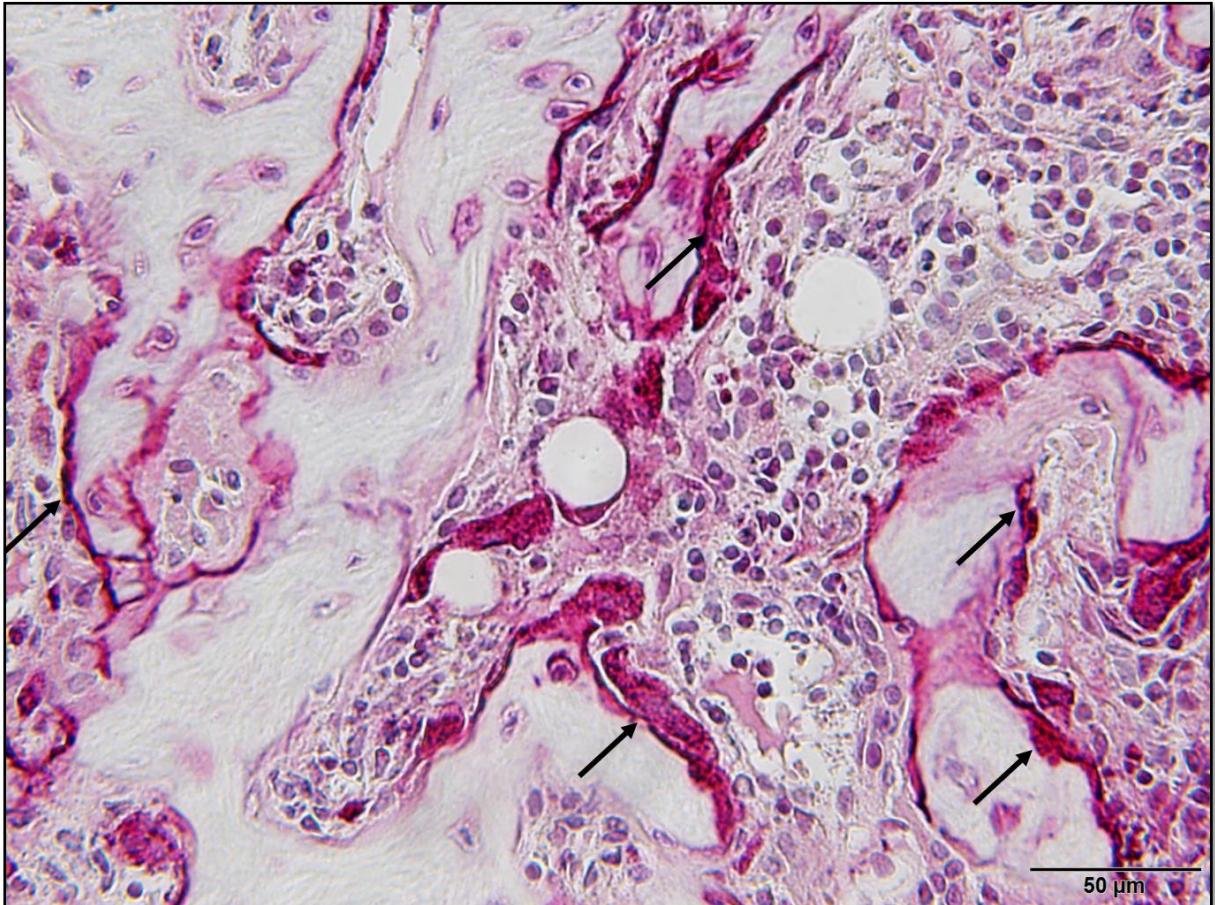


Abbildung 16 - TRAP-Färbung. Kallus 400-fache Vergrößerung. TRAP- positive Zellen beispielhaft mit einem Pfeil markiert.

3.6.4.3 Myeloperoxidase - Färbung

Die MPO ist ein stark in neutrophilen Granulozyten exprimiertes Protein. Es dient zur Produktion von oxidativen Spezies, welche durch ihre starke antibakterielle Eigenschaft eine wichtige Rolle bei deren Abwehr einnimmt [96]. In der durchgeführten Färbung stellten sich die markierten Zellen braun dar und konnten so ausgezählt werden (Abbildung 17).

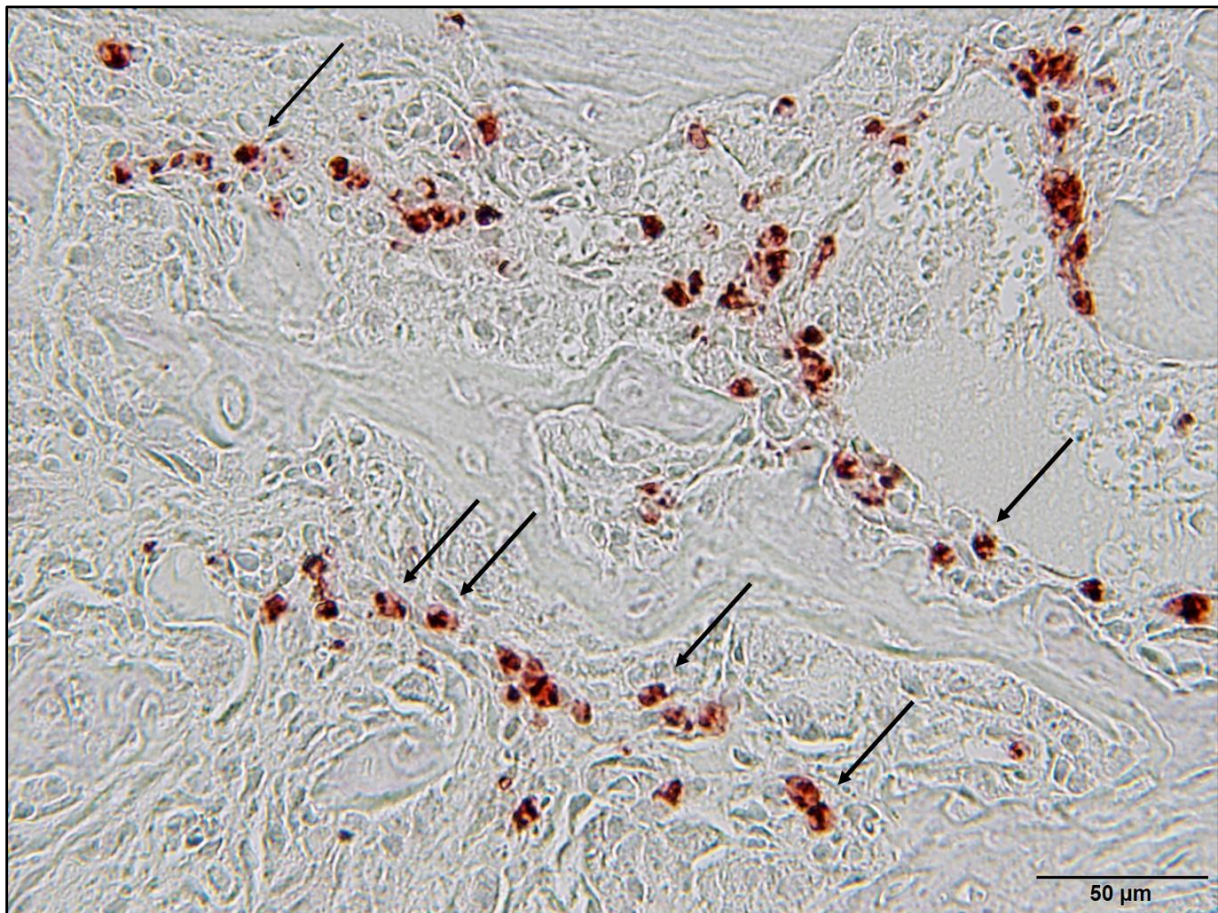


Abbildung 17 - MPO-Färbung. Kallus 400-fache Vergrößerung. MPO positive Zellen beispielhaft mit einem Pfeil markiert.

3.6.4.4 Cluster of Differentiation 68 - Färbung

Makrosialin (CD68) ist ein stark glykosyliertes Transmembranprotein, welches vor allem in Makrophagen exprimiert wird, weshalb es sich als immunhistochemischer Marker für diese Zellen etabliert hat [16]. In der durchgeführten Färbung stellten sich die positiven Zellen rot-bräunlich dar (Abbildung 18).

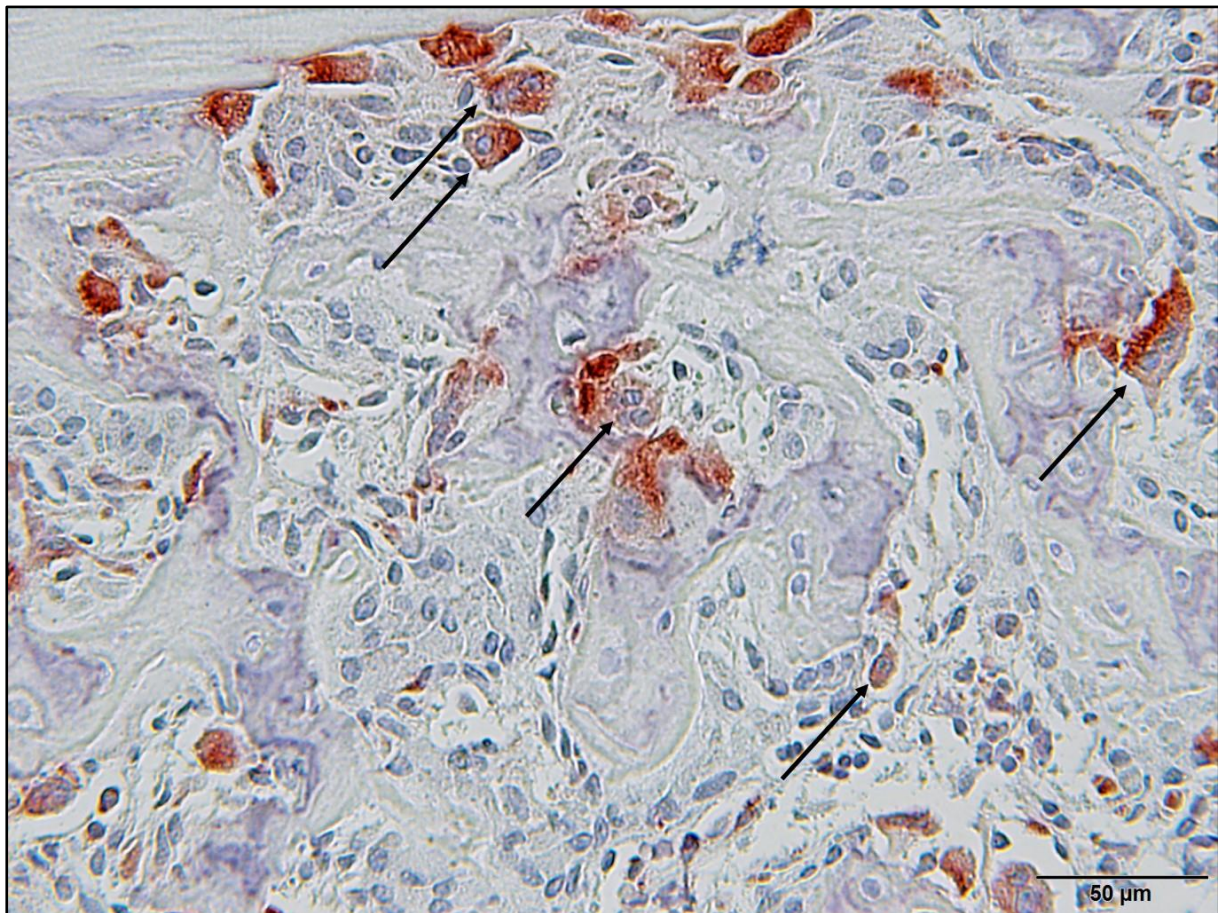


Abbildung 18 - CD68-Färbung. Kallus 400-fache Vergrößerung. CD68 positive Zellen beispielhaft mit einem Pfeil markiert.

3.6.4.5 Cluster of Differentiation 31 - Färbung

CD31 ist das im Endothel exprimierte transmembrane Glykoprotein *Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)*, welches entscheidend für die Adhäsion und Migration inflammatorischer Zellen am Endothel ist [79]. In der Fluoreszenzaufnahme stellten sich positive CD31 Signale rot und Zellkerne blau dar. CD31 Signale, welche mit Kernen assoziiert waren und ein Lumen zeigten, wurden als Gefäße identifiziert (Abbildung 19).

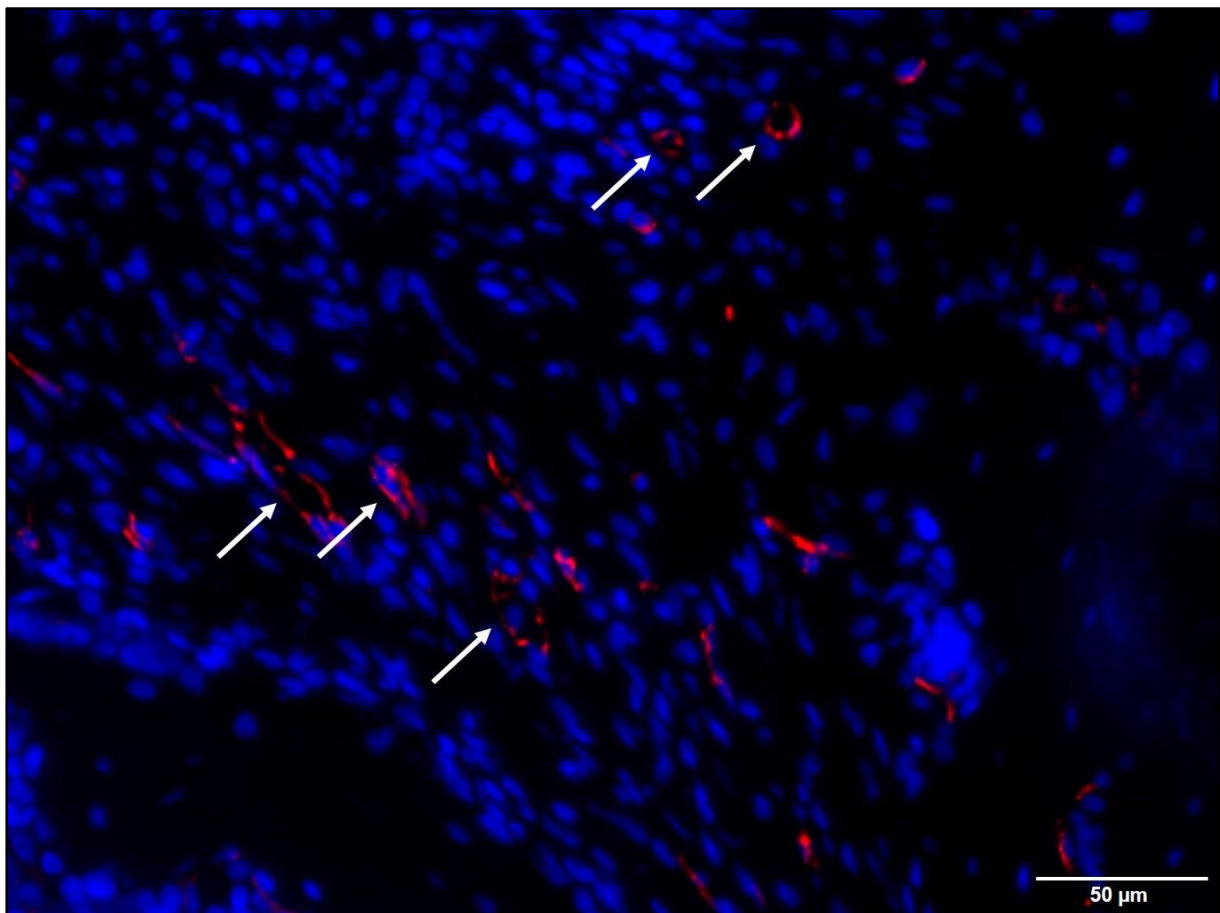


Abbildung 19 - CD31-Färbung. Kallus 400-fache Vergrößerung. CD31-Signale rot. Gefäße beispielhaft mit einem Pfeil markiert.

3.7 Western Blot

3.7.1 Vorbereiten der Proben

Die Proteine der im Lyse-Puffer gelagerten Proben wurden zunächst mittels *Sodium Dodecyl Sulfate* - *Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Zur Verwendung kam ein 10%-iges Trenngel, welches zuvor wie folgt angesetzt und gegossen wurde:

1. 4 mL Aq. dest.
2. 3,3 mL Acrylamid 30% (Cat. Nr. 1610156, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Californien, USA)
3. 2,5 mL TRIS 1,5M (Art.-Nr. 0188.3, Carl Roth GmbH + Co. KG)
4. 100 µL SDS 10% (Art.-Nr. CN30.0, Carl Roth GmbH + Co. KG)
5. 100 µL Ammonium Persulfat 10% (A3678-100G, Merck KGaA)
6. 15 µL TEMED (Art.-Nr. 2367.1, Carl Roth GmbH + Co. KG)

An das beladene Gel wurde eine Spannung von 100 V gelegt. Nach 10 min erhöhte sich diese auf 140 V und wurde für 60 min gehalten.

Die Übertragung der so aufgetrennten Proben im Gel auf eine *Polyvinylidenfluorid-Folie* (PVDF) (Bio-Rad Laboratories Inc.) erfolgte im Semi-Dry-Blotter (Trans-Blot®Turbo™, Bio-Rad Laboratories Inc.) für 7 min bei 25 V und 0,4 A. Anschließendes Schwenken der Folie in 5%-iger Milchpulverlösung (Art.-Nr. T145.2, Carl Roth GmbH + Co. KG) blockierte unspezifische Bindungsstellen. Um mehrere Zielproteine pro Probe untersuchen zu können, wurden die Folien entsprechend zugeschnitten. Ein beidseitig im Gel mitgelaufener vorgefärbter Größenmarker (REF 26617, Thermo Fisher Scientific Inc.) erlaubte die Auswahl der Zielbereiche und ein gerades Zuschneiden der Folien.

3.7.2 Proteindarstellung

Die verwendeten Primärantikörper mussten vor der Inkubation mit der probenbeladenen Folie mit TBST-Puffer im Verhältnis 1:30 verdünnt werden. Hierfür wurde der TBST-Puffer zunächst wie folgt angesetzt:

1. 10 mL TBS
 - i. 24,2 g TRIS (Carl Roth GmbH + Co. KG)
 - ii. 80 g NaCl
 - iii. ad 1000 mL Aq. dest.
 - iv. 14mL HCl 37% (Merck KGaA)

2. 90 mL Aq. dest.
3. 1 ml Tween (Art.-Nr. 9127.1, Carl Roth GmbH + Co. KG)

Die bereits beladenen Folien wurden anschließend mit den jeweiligen verdünnten Primärantikörpern bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Folgende Primärantikörper wurden in dieser Studie verwendet:

- β -Actin – Maus anti-Maus β -Actin Antikörper (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA)
- NLRP1 – Maus anti-Maus NALP1 Antikörper (sc-390133, Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- OPG - Maus anti-Maus OPG Antikörper (sc-390518, Santa Cruz Biotechnology Inc.)
- NLRC4 – Kaninchen anti-Maus NLRC4 Antikörper (ab201792, Abcam plc.)
- M-CSF - Kaninchen anti-Maus M-CSF Antikörper (ab233387, Abcam plc.)
- TNF- α – Kaninchen anti-Maus TNF- α Antikörper (ab34674, Abcam plc.)
- IL-18 – Kaninchen anti-Maus IL-18 Antikörper (ab207323, Abcam plc.)
- *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) – Kaninchen anti-Maus RUNX2 Antikörper (ab236639, Abcam plc.)
- VEGF – Kaninchen anti-Maus VEGF Antikörper (ab214424, Abcam plc.)
- IL-1 β – Maus anti-Maus IL-1 β Antikörper (Cat. Nr.12242, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, Massachusetts, USA)
- NLRP3 – Kaninchen anti-Maus NLRP3 Antikörper (Cat. Nr. 15101, Cell Signaling Technology Inc.)
- Aim2 – Kaninchen anti-Maus AIM2 Antikörper (Cat. Nr. 63660, Cell Signaling Technology Inc.)
- RANKL – Kaninchen anti-Maus RANKL Antikörper (Cat no: 23408-1AP, Proteintech Group Inc., Rosemont, Illinois, USA)
- *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) – Maus anti-Maus PCNA Antikörper (cat no: HRP-60097, Proteintech Group Inc.)
- BMP4 – Ziege anti-Human BMP4 Antikörper (AF355, R&D Systems Inc., Minneapolis, Minnesota, USA)
- *Cysteine-rich angiogenic inducer 61* (Cyr61) – Schaf anti-Maus Cyr61 Antikörper (AF4055, R&D Systems Inc.)
- NLRP6 – Kaninchen anti-Maus NLRP6 Antikörper (PA5-110033, Thermo Fisher Scientific Inc.)

Die Primärantikörper wurden nach der Inkubation mit TBST abgewaschen und anschließend der Sekundärantikörper aufgetragen. Entsprechend des Primärantikörpers waren diese:

- Kaninchen anti-Ziege Immunglobulin HRP (P0449, Aglient Technologies Inc., Santa Clara, Californien, USA)
- Ziege anti-Maus Immunglobuline HRP (P0447, Aglient Technologies Inc.)
- Ziege anti-Kaninchen IgG HRP-conjugated Antibody (HAF008, R&D Systems Inc.)
- Kaninchen anti-Schaf Immunglobuline HRP (P0163, Aglient Technologies Inc.)

3.7.3 Auswertung

Die Folien wurden nach der Sekundärantikörper-Inkubation 3-mal für 5 min in TBST gewaschen. Die Darstellung der Proteinexpression erfolgte zuletzt nach Auftragung von 250 μ L *Enhance Chemiluminescence (ECL)*-Reagenz-1 und -2 (Cat. No. 1705061, Bio-Rad Laboratories Inc.) im ECL ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Quantifizierung erfolgte mittels der dazugehörigen ChemoStar Software (INTAS Science Imaging Instruments GmbH).

3.8 Statistische Methoden

Die in dieser Forschungsarbeit erhobenen Daten wurden mit Hilfe eines Statistikprogramms (SigmaPlot 13.0, Systat Software Inc., San José, Californien, USA) analysiert. Die Werte wurden zunächst auf ihre Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und deren Varianzgleichheit (Brown-Fosythe-Test) hin untersucht. Bei Vorliegen einer Normalverteilung und Varianzgleichheit fand der Gruppenvergleich unter Verwendung des Student's t-Test statt. War diese Voraussetzung nicht gegeben, wurde der Mann-Whitney-U-Test zum Gruppenvergleich herangezogen. Die statistischen Daten werden als *Mittelwert* (MW) \pm *Standardfehler* (SEM) angegeben. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

4 Ergebnisse

4.1 Biomechanik

Die biomechanische Testung der Femora mittels 3-Punkt-Messung erlaubte die Darstellung der Biegesteifigkeit als Absolutwerte in N/mm (Abbildung 20-A und -B) und als relative Biegesteifigkeit in Prozent (Abbildung 21-A und -B). Für letztere wurde die Stabilität des frakturierten Femurs mit der jeweiligen intakten Gegenseite ins Verhältnis gesetzt. So konnte bei den operativ versorgten Knochen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp gegenüber NLRP3^{-/-} sowohl nach 2 als auch nach 5 Wochen beobachtet werden.

Bei der Vergleichsanalyse der nicht operierten Femora wurden die unfrakturierten Knochen des Wildtyps mit denen der NLRP3^{-/-}-Tiere gegenübergestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Biegesteifigkeit des Wildtyps im Vergleich zu den NLRP3^{-/-}-Tiere signifikant ($p=0,014$) erhöht war (Abbildung 22).

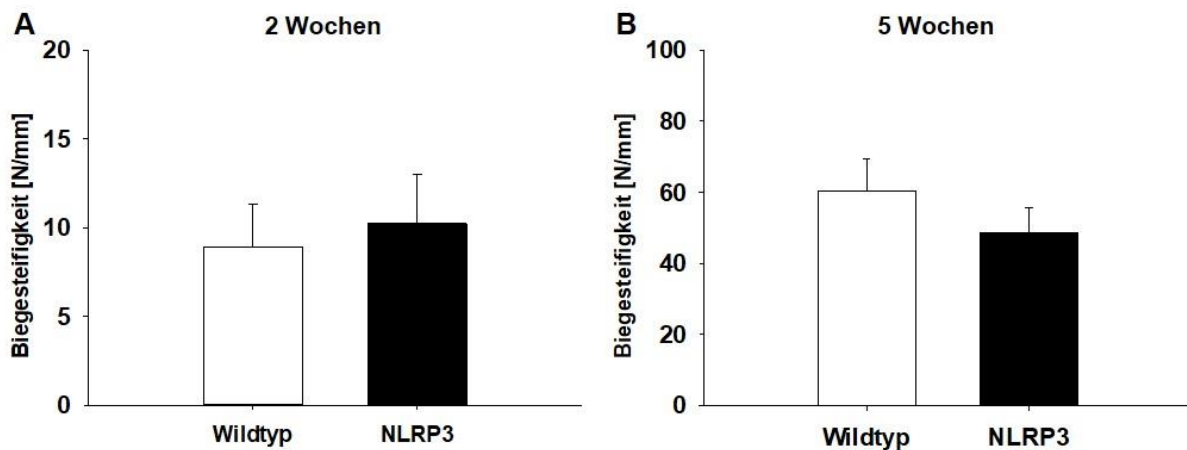


Abbildung 20 - Absolute Biegesteifigkeit. Angegeben als absolute Biegesteifigkeit in [N/mm] 2 Wochen (A) und 5 Wochen (B) nach Fraktur, vergleichend zwischen Wildtyp-Mäusen (weiße Balken mit $n=8$ nach 2 Wochen und $n=9$ nach 5 Wochen) und NLRP3^{-/-}-Mäusen (schwarze Balken mit $n=8$ nach 2 Wochen und $n=10$ nach 5 Wochen). MW \pm SEM.

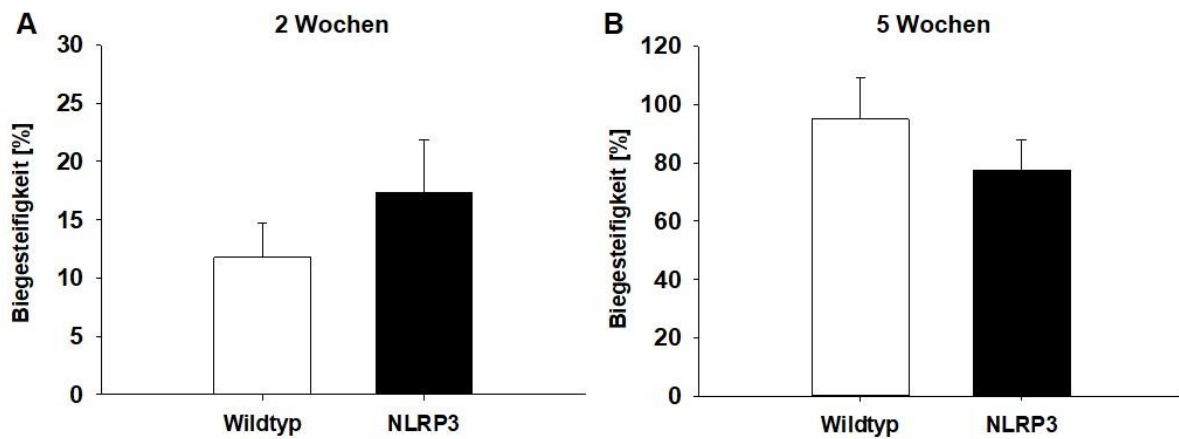


Abbildung 21 - Relative Biegesteifigkeit. Angegeben als relative Biegesteifigkeit in [%] bezugnehmend auf das intakte Femur der jeweiligen Gegenseite 2 Wochen (**A**) und 5 Wochen (**B**) nach Fraktur, vergleichend zwischen Wildtyp-Mäusen (weiße Balken mit n=8 nach 2 Wochen und n=9 nach 5 Wochen) und NLRP3^{-/-}-Mäusen (schwarze Balken mit n=8 nach 2 Wochen und n=10 nach 5 Wochen). MW ± SEM.

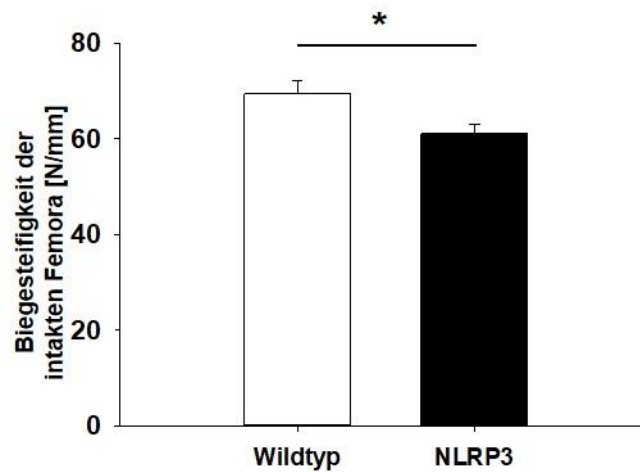


Abbildung 22 - Biegesteifigkeit der intakten Femora. Angegeben als Absolutwerte in [N/mm] vergleichend zwischen Wildtyp-Mäusen (weißer Balken mit n=17) und NLRP3^{-/-}-Mäusen (schwarzer Balken mit n=18). MW ± SEM. *p=0.014.

4.2 Computertomographie

Die radiologische Untersuchung des Kallus mittels μ CT zeigten nach 2 Wochen (Abbildung 23-A und-B) und nach 5 Wochen (Abbildung 23-C und -D) einen Kallus um die Frakturzone, wobei sich der Kallus nach 2 Wochen größer und weniger mineralisiert darstellte. Nach 5 Wochen zeigten sich eine knöchernen Überbrückung des Frakturspaltes und die Kalli stellten sich röntgendichter dar, passend zu remodeling Prozessen der enchondralen Frakturheilung. Bezüglich des Verhältnisses von Knochen zu Gesamtvolumen des Kallus (BV/TV) ergaben sich weder nach 2 Wochen noch nach 5 Wochen signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen (Abbildung 23-E). Bei der Analyse des Trabekelnetzwerkes zeigte sich die TbTh in der 2 Wochen Gruppe bei den NLRP3^{-/-}-Tieren signifikant dünner als bei den Wildtyp-Tieren (Abbildung 23-H). Die Analyse der Trabekelanzahl (Abbildung 23-F), des Trabekelabstands (Abbildung 23-G), und des Trabekel-Konnektivitätsindex (Abbildung 23-I) konnten keine signifikanten Unterschiede aufzeigen.

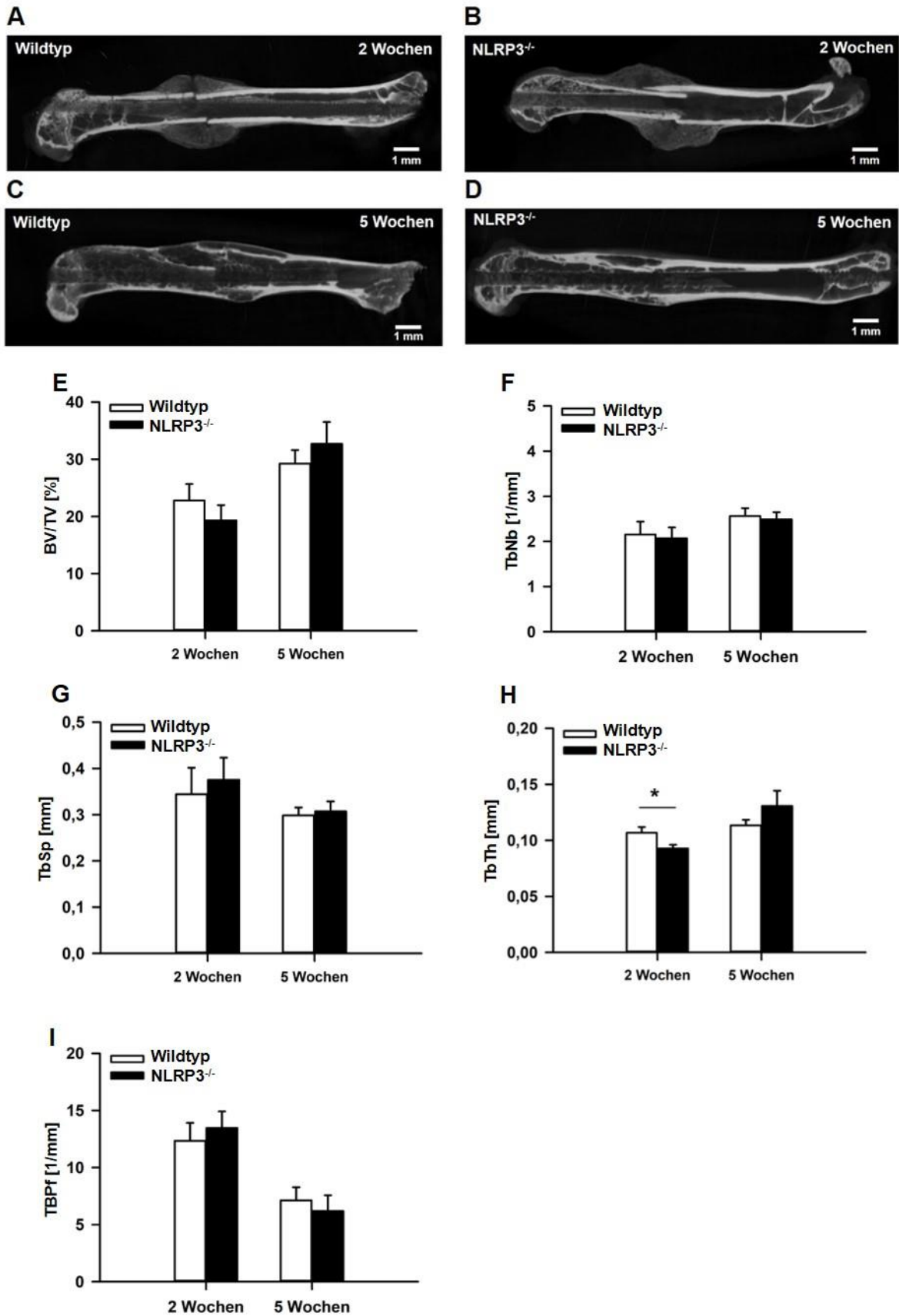


Abbildung 23 - μ CT Auswertung. Exemplarische μ CT Aufnahmen des zuvor frakturierten Femur (Sagittalebene) eines Wildtyp-Tieres (A,C) und eines NLRP3^{-/-}-Tieres (B,D) nach 2 Wochen (A,B) und nach 5 Wochen (C,D). (E) Knöcherner Kallusanteil (F) Trabekelzahl pro mm (G) Trabekelabstand in mm (H) Trabekeldicke in mm (I) Trabekel Konnektivitätsindex. MW \pm SEM. Maßstäbe: 1 mm. MW \pm SEM. *p=0,037.

4.3 Histologie

Anhand der Safranin O - gefärbten Schnitte wurde die Histomorphometrie des Kallus untersucht (Abbildung 24-A bis -D). Dabei konnte bei der Analyse der Kallusgröße (Abbildung 25-A und -B) und dessen Gewebeanteile (Abbildung 25-C bis -D) weder nach 2 Wochen noch nach 5 Wochen signifikante Unterschiede zwischen den beiden <versuchsgruppen festgestellt werden. Die unterschiedlichen Bestandteile des knöchernen Kallus (Lamellenknochen vs. Geflechtknochen) (Abbildung 25-E und -F) zeigten ebenfalls sowohl nach 2 Wochen als auch nach 5 Wochen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Von einer Darstellung des Knorpelanteils der 5-Wochen Gruppe wurde abgesehen, da deren Anteil am Kallus lediglich bei ca. 0,02% lag und keinen signifikanten Unterschied zeigte.

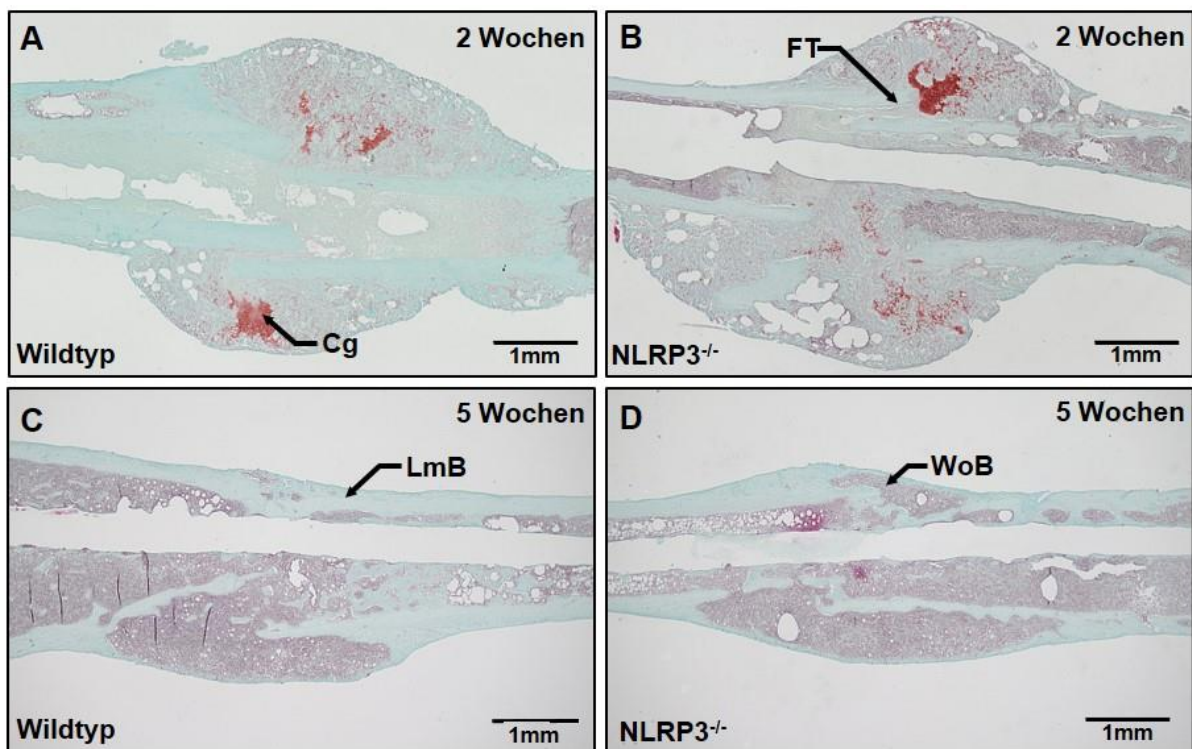


Abbildung 24 - Histomorphometrie Bilder. Safranin O gefärbte Kalluspräparate nach 2 Wochen (A,B) und 5 Wochen (C,D). Knorpelflächen (Cg), Bindegewebe (FT), Lamellenknochen (LmB) und Geflechtknochen (WoB) wurden exemplarisch markiert.

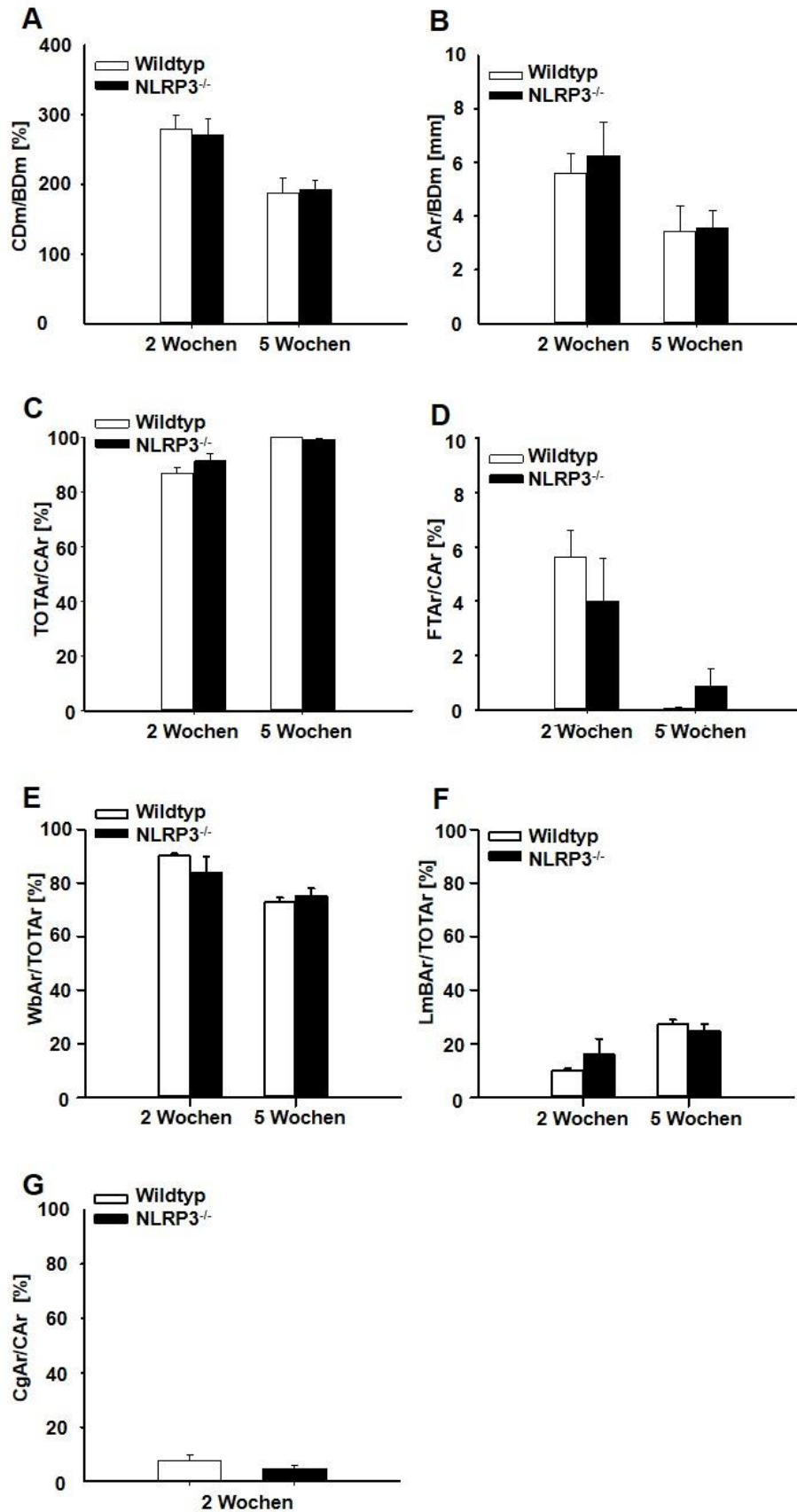


Abbildung 25 - Histomorphometrie. Ergebnisse zu den Safranin O - gefärbten Kalluspräparaten aus *Histomorphometrie Bilder* (Abbildung 24) **(A)** Kallus-Femurdurchmesser-Verhältnis **(B)** Kallusfläche-Femurdurchmesser-Verhältnis **(C)** Knöcherner Anteil am Kallus **(D)** Bindegewebiger Anteil am Kallus **(E)** Anteil des Geflechtknochens am Kallus **(F)** Anteil des Lamellenknochens am Kallus **(G)** Anteil der Knorpelfläche am Kallus. MW ± SEM.

Die Auszählung der TRAP-positiven Zellen blieb ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 26-E).

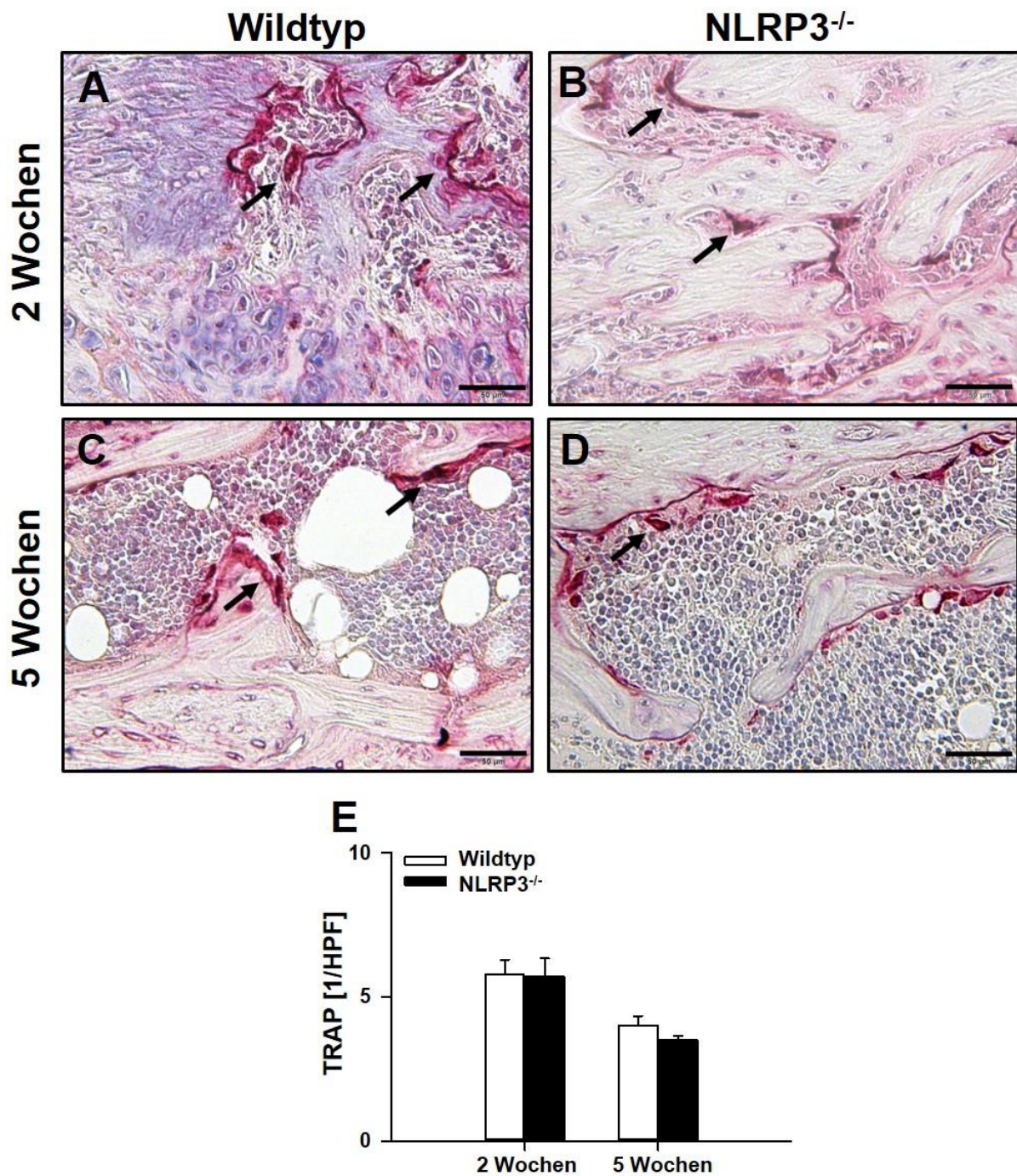


Abbildung 26 - Histologie TRAP. Exemplarische Bereiche des Kallus eines Wildtyp-Tieres (A,C) und eines NLRP3^{-/-}-Tieres (B,D) nach 2 Wochen (A,B) und nach 5 Wochen (C,D) mit TRAP-positiven Osteoklasten (Pfeile). (E) Zeigt die durchschnittliche Anzahl TRAP-positiver Zellen pro HPF. MW ± SEM. Maßstäbe: 50 µm.

Im Gegensatz dazu zeigten sowohl nach 2 Wochen ($p=0,001$) als auch nach 5 Wochen ($p=0,022$) die transgenen $NLRP3^{-/-}$ -Tiere pro HPF signifikant weniger Gefäße als die Wildtyp-Tiere (Abbildung 27-E).

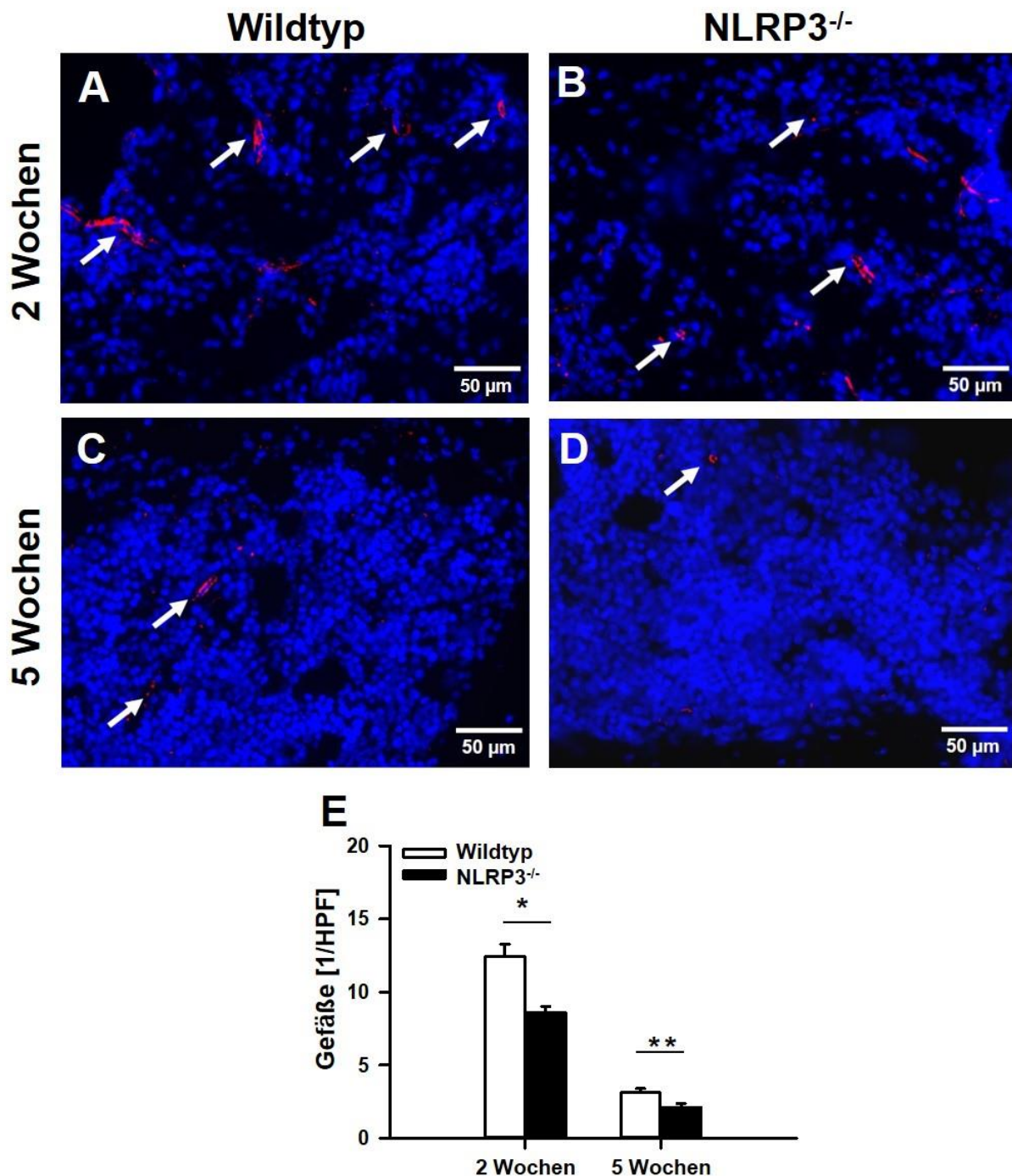


Abbildung 27 - Immunhistochemie CD31. Exemplarische Bereiche des Kallus eines Wildtyp-Tieres (A,C) und eines $NLRP3^{-/-}$ -Tieres (B,D) nach 2 Wochen (A,B) und nach 5 Wochen (C,D). Darstellung der Gefäße (Pfeile) in der CD31-Färbung. (E) Zeigt die durchschnittliche Anzahl der Gefäße pro HPF. * $p=0,001$, ** $p=0,022$. MW \pm SEM. Maßstäbe: 50 μ m.

In der Auswertung der CD68-gefärbten Schnitte konnten bei den NLRP3^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp zum 2 Wochen Zeitpunkt signifikant weniger CD68-positive Zellen nachgewiesen werden ($p=0,038$) (Abbildung 28-E). Nach 5 Wochen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet werden.

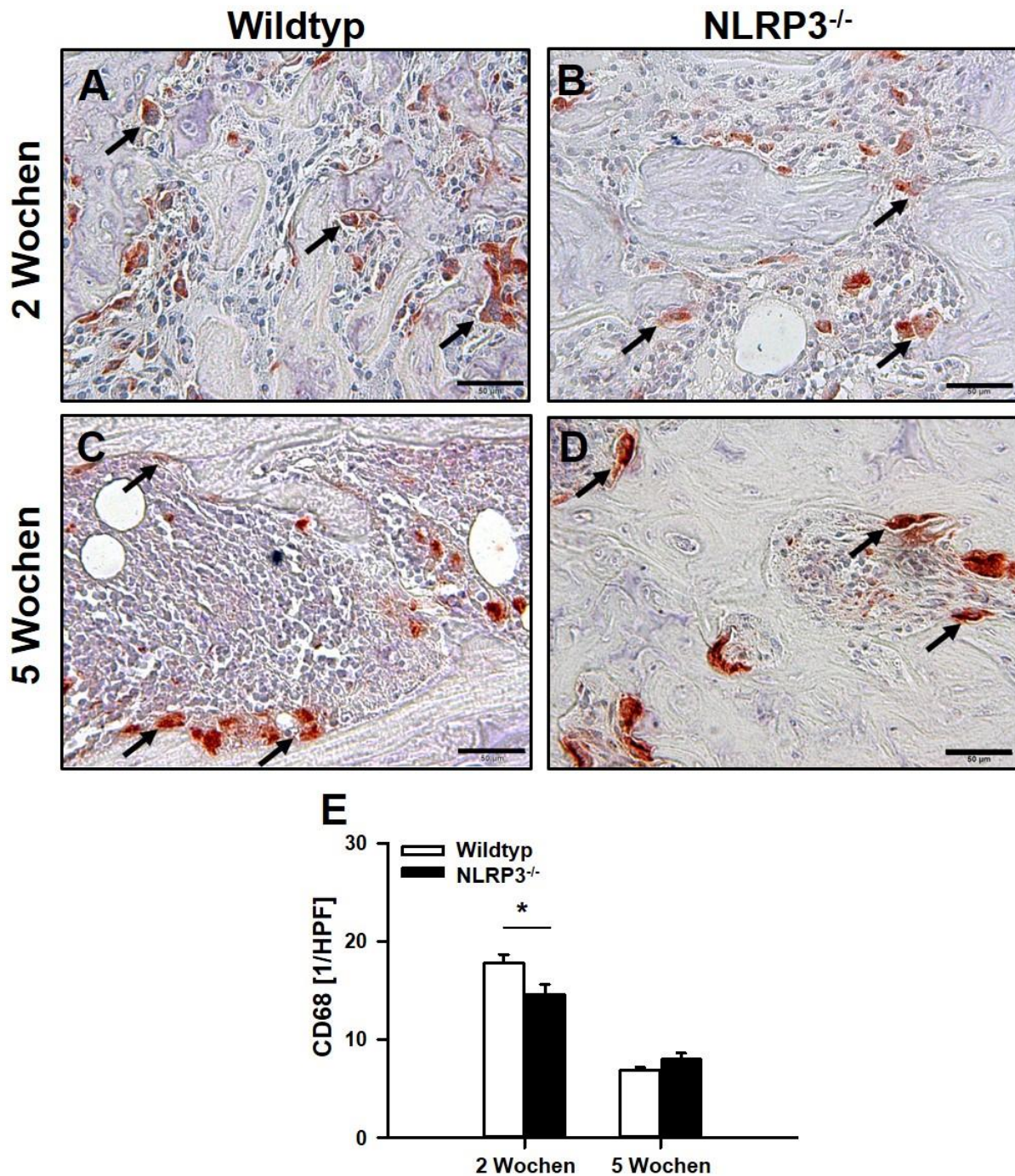


Abbildung 28 - Immunhistochemie CD68. Exemplarische Bereiche des Kallus eines Wildtyp-Tieres (A,C) und eines NLRP3^{-/-}-Tieres (B,D) nach 2 Wochen (A,B) und nach 5 Wochen (C,D). Darstellung der CD68-positiven Zellen pro HPF. (E) Zeigt die durchschnittliche Anzahl CD68-positiven Zellen pro HPF. * $p=0,038$. MW ± SEM. Maßstäbe: 50 µm

Die Auswertung der MPO-positiven Zellen zeigte wiederum zum 2 Wochen Zeitpunkt im Kallus von transgenen NLRP3^{-/-}-Tieren signifikant mehr solcher Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ($p=0,038$). Zum 5 Wochen Zeitpunkt zeigte sich hingegen kein Unterschied mehr (Abbildung 29-E).

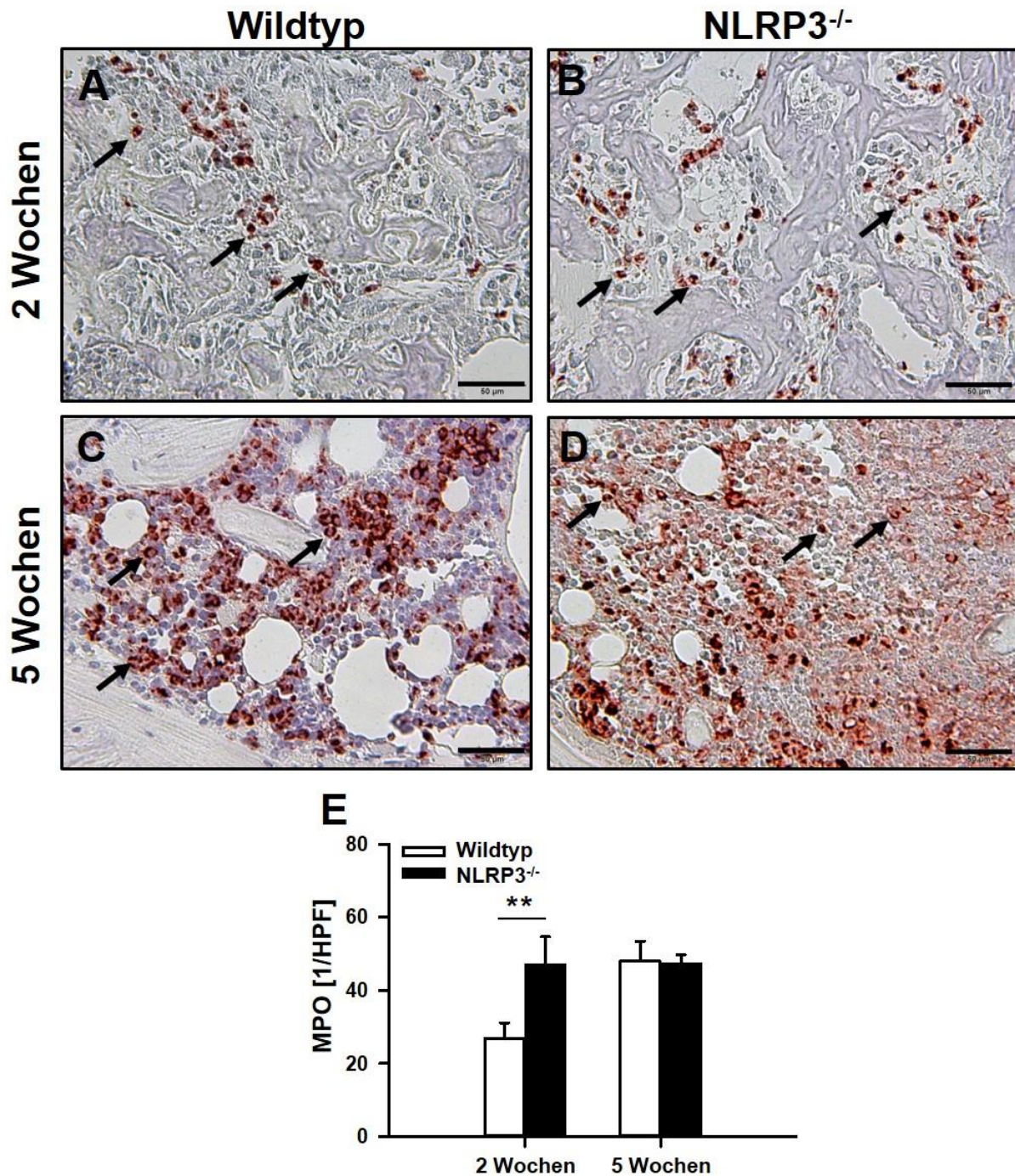


Abbildung 29 - Immunhistochemie MPO. Exemplarische Bereiche des Kallus eines Wildtyp-Tieres (A,C) und eines NLRP3^{-/-}-Tieres (B,D) nach 2 Wochen (A,B) und nach 5 Wochen (C,D). Darstellung der MPO-positiven Zellen pro HPF. (E) Zeigt die durchschnittliche Anzahl MPO-positiven Zellen pro HPF. * $p=0,038$. MW \pm SEM. Maßstäbe: 50 μ m

4.4 Proteinbiochemie

Die Graphische Darstellungen zeigt die Ergebnisse der Western Blot Untersuchungen der Kalli als $MW \pm SEM$ der transgenen $NLRP3^{-/-}$ -Tiere und der Wildtyps-Tiere mit den entsprechenden Western Blot Folien.

Auf Grund des Einschlusses transgener Tiere in diese Studie wurde deren Knockout des $NLRP3$ mittels Western Blot der Kalli zunächst kontrolliert. Dabei konnte bei den $NLRP3^{-/-}$ -Tieren der Knockout bestätigt werden (Abbildung 30-A und -B). $NLRP6$, $NLRC4$, $AIM2$ und $NLRP1$ sind wie $NLRP3$ dazu in der Lage Inflammasome zu bilden [86]. Die Untersuchung der Proben auf die Expression von $NLRP6$ und $NLRP1$ lieferte keine auswertbaren Ergebnisse. $NLRC4$ zeigte sich in der Versuchsgruppe im Vergleich zum Wildtyp etwas geringer exprimiert, wenn auch nicht signifikant (Abbildung 30-A und -C). Im Gegensatz dazu zeigte sich $AIM2$ in den transgenen $NLRP3^{-/-}$ -Tieren signifikant stärker exprimiert (Abbildung 30-A und -D).

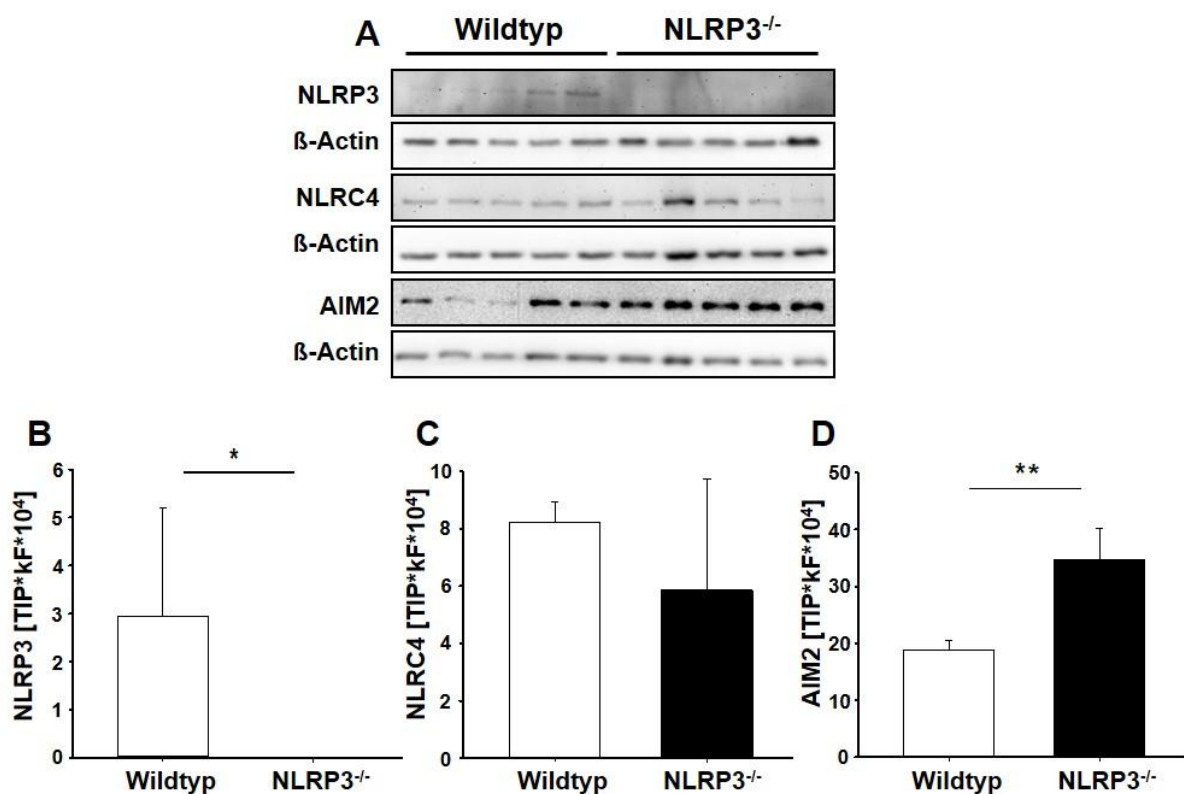


Abbildung 30 - Western Blots Inflammasome. (A,B) $NLRP3$ Expression (A,C) $NLRC4$ Expression (A,D) $AIM2$ Expression. $MW \pm SEM$. * $p=0,014$, ** $p=0,015$.

Die in der histologischen Auswertung festgestellte unterschiedliche Anzahl von Gefäßen im Kallus veranlasste zur Testung der VEGF-Expression. Diese stellte sich in der Gruppe der NLRP3^{-/-}-Tiere signifikant schwächer ausgeprägt dar (Abbildung 31-A und -B). Die Expression von Cyr61 zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 31-A und -C). IL-1 β und IL-18 waren in der Versuchsgruppe etwas stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 32-A bis -C). Ebenso fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in der Expression von RUNX2 und PI3K (Abbildung 33-A bis -C). PCNA zeigte hingegen eine signifikant höhere Expression in der NLRP3^{-/-}-Gruppe (Abbildung 33-A und -D).

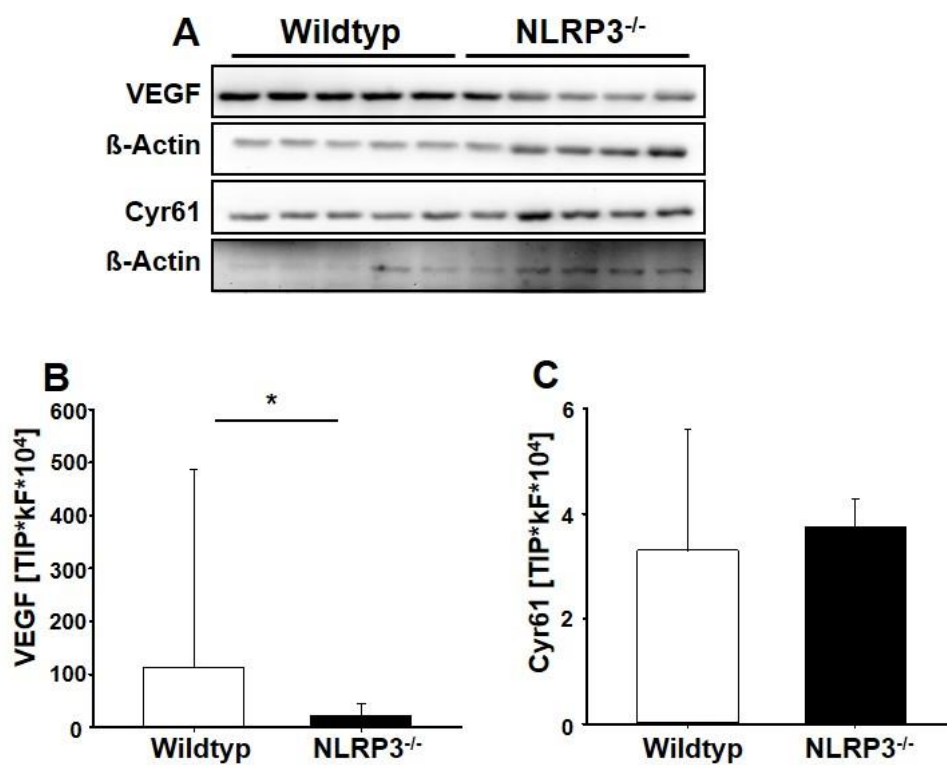


Abbildung 31 - Western Blots VEGF und Cyr61. (A,B) VEGF-Expression (A,B) Cyr61-Expression. MW \pm SEM. *p=0,008.

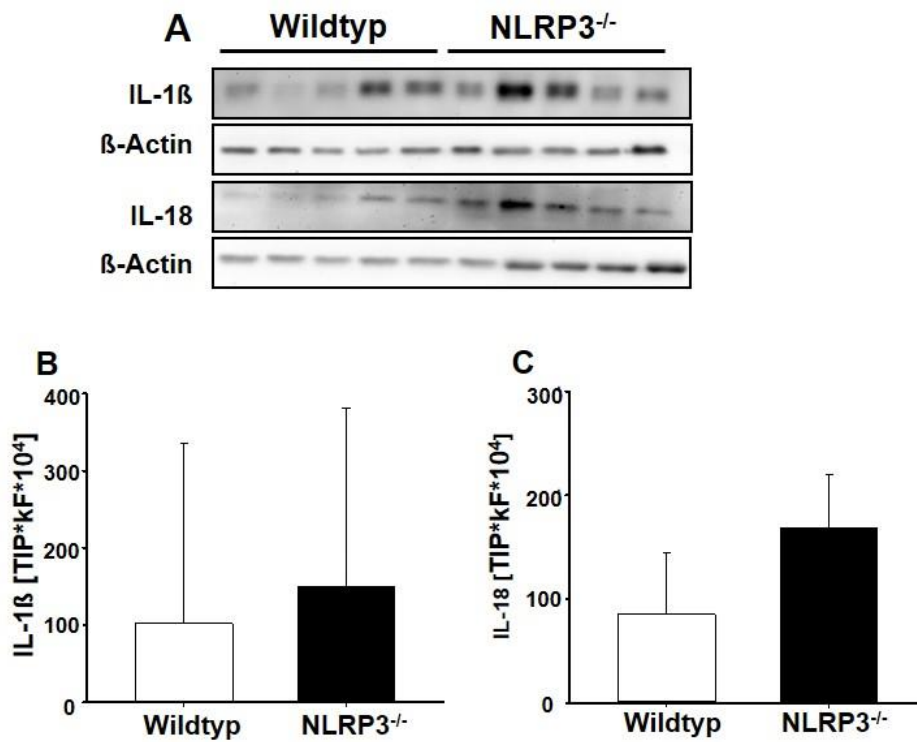


Abbildung 32 - Western Blots IL-1 β und IL-18. (A,B) IL-1 β -Expression (A,B) IL-18-Expression. MW \pm SEM.

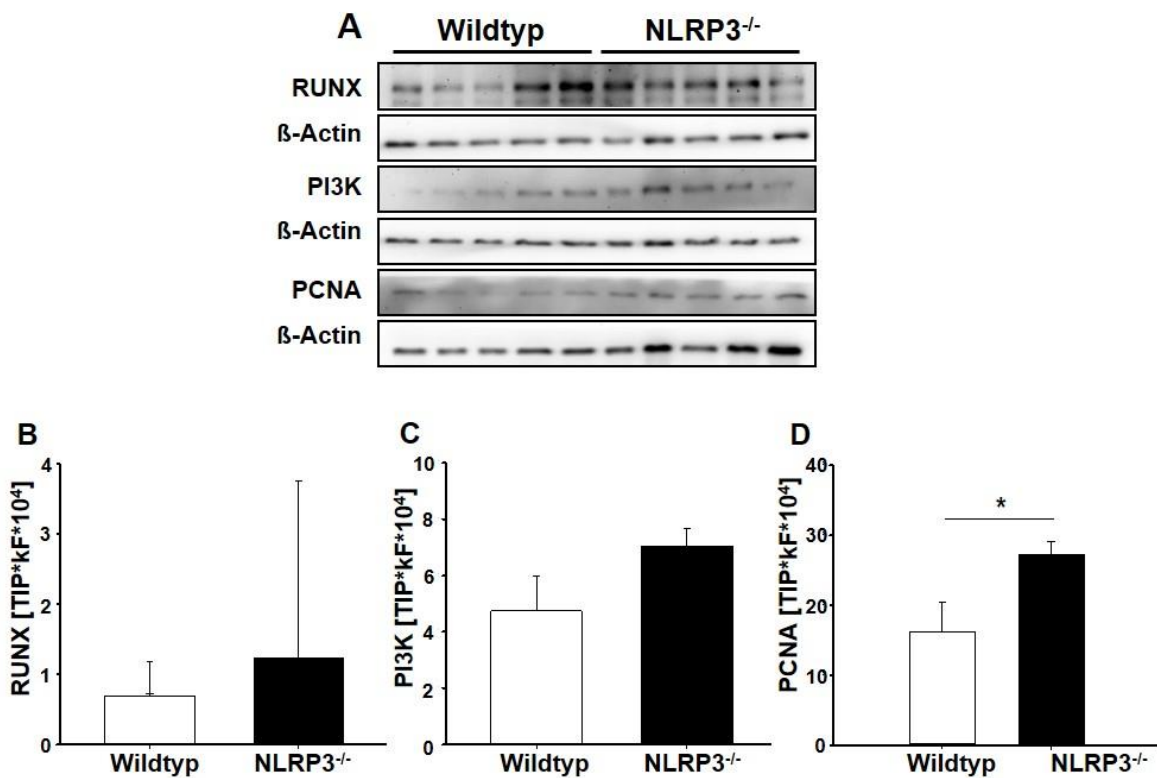


Abbildung 33 - Western Blots RUNX, PI3K und PCNA. (A,B) RUNX-Expression (A,C) PI3K-Expression (A,D) PCNA-Expression. MW \pm SEM. *p=0,041.

Die Auswertung der M-CSF Expression zeigte keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abbildung 34-A und -B). Die RANKL-Expression war in den NLRP3^{-/-}-Tieren gering, aber nicht signifikant vermindert exprimiert (Abbildung 34-A und -C). Die OPG-Expression zeigte sich gegenläufig zur RANKL-Expression. Allerdings war sie auch nicht signifikant vermehrt bei den transgenen Tieren (Abbildung 34-A und -D). Die untersuchte TNF- α Expression ergab keine auswertbaren Ergebnisse.

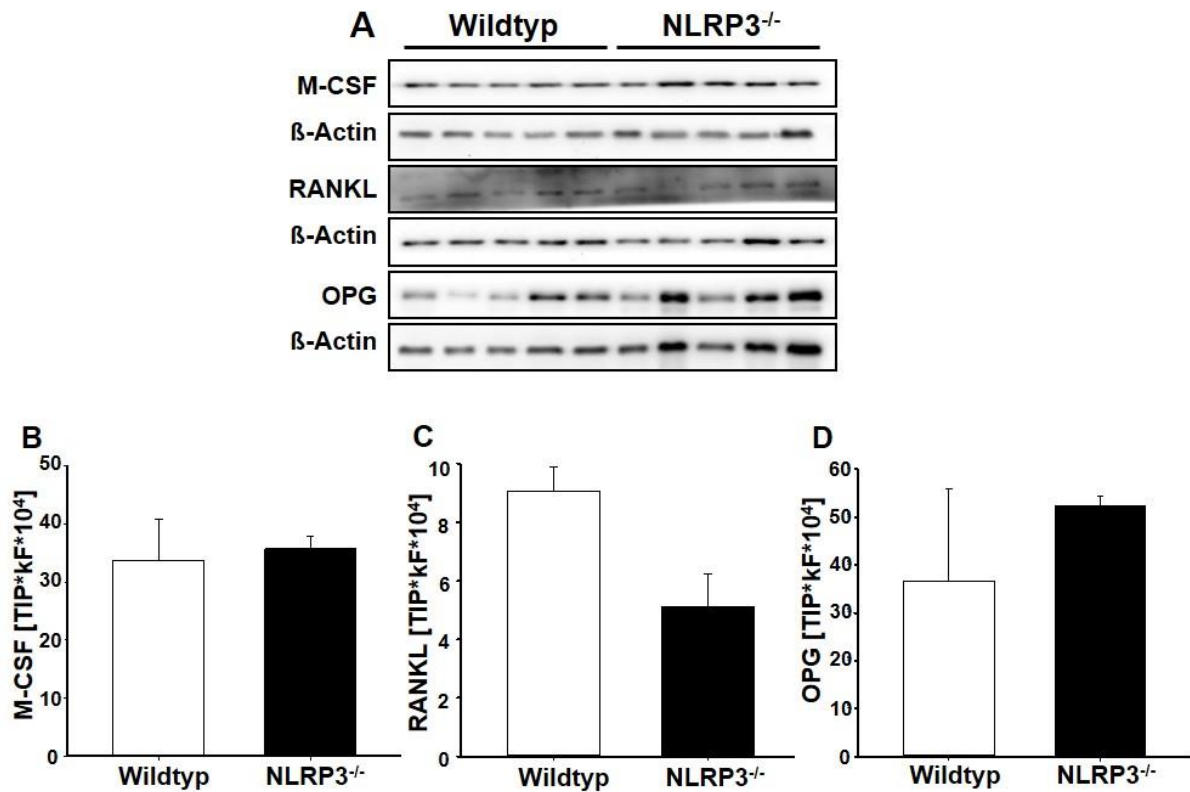


Abbildung 34 - Western Blots M-CSF, RANKL und OPG. (A,B) M-CSF-Expression **(A,C)** RANKL-Expression **(A,D)** OPG-Expression. MW \pm SEM.

5 Diskussion

5.1 Hintergründe

Alleine in Deutschland wurden 2019 insgesamt 688 403 Frakturen registriert. Das entsprach einer Inzidenz von 1014 pro 100 000 Einwohnern. Auch wenn prinzipiell alle Altersstufen von ihnen betroffen sind, so steigt das Risiko mit dem höheren Lebensalter an, nicht zuletzt auf Grund osteoporotisch veränderten Knochenstruktur. Die Behandlung reicht dabei von konservativen Verfahren wie Gipsverbänden bis zu den vielen verschiedenen operativen Versorgungsmöglichkeiten wie der Plattenosteosynthese, Marknagelversorgung oder Fixateur externe-Anlage. Dabei stellt die Frakturheilung insgesamt einen komplexen Prozess dar und unterliegt einer Vielzahl regulatorischer Mechanismen [1,30]. Obwohl sie prinzipiell dazu in der Lage ist, den entstandenen Defekt vollkommen ohne Narbenbildung ausheilen zu lassen [69], kommt es dennoch bei 5-10% der Frakturen zu einer gestörten Knochenkonsolidierung [34,81]. Dabei sind die Gründe bzw. Risiken, die hierzu führen, vielseitig [84] und reichen von einer verzögerten Heilung bis zu den verschiedenen Formen der Non-Union (wie z.B. atrophisch und hypertrophisch), welche durch sklerotischen Umbau der Frakturrenden unter Ausbildung eines synovialen Gelenkes bei lang bestehender Non-union entstehen [13].

Da die gestörte Frakturheilung mit einer zum Teil enormen Belastung für den Patienten aber auch für das Gesundheitssystem einhergeht [34,84], sind weitere Forschungen unabdingbar, um diese zu verbessern. Eines der Hauptaugenmerke richtet sich dabei auf die am Anfang der Frakturheilung stehende Inflammation [6,25,52,69]. Das NLRP3-Inflammasom ist in diesem Rahmen von besonderem Interesse, da es zahlreiche PAMPs und DAMPs erkennt [89] und einen wichtigen Treiber der Inflammation darstellt [46]. Diese ist für eine adäquate Frakturheilung unabdingbar [77], bedarf allerdings einer strengen Regulierung [52]. Bonar et al. [9] zeigten die schädliche Wirkung einer Überexpression des NLRP3 und der daraus resultierenden systemischen Inflammation auf das skelettale System auf [9]. Entsprechend dieser Erkenntnis wurde das NLRP3 in Versuchen von Li et al. [51] in einem Modell mit diabetischen Ratten lokal im herbeigeführten Knochendefekt mittels shRNA inhibiert. Die Expression proinflammatorischer Zytokine und des NLRP3-Inflammasoms konnten hierdurch gesenkt werden, was die Knochenheilung verbesserte [51]. Dabei geht der Diabetes mellitus mit einer chronischen Inflammation einher [53], an welcher das NLRP3-Inflammasom beteiligt ist [22], was auch in den Versuchen von Li et al. [51] durch die vermehrte NLRP3-Expression in den diabetischen Tieren bestätigt wurde. Folglich qualifizierte sich NLRP3 als potentielles Ziel einer Therapie. Dessen Inhibierung mittels Glyburid im diabetischen Frakturmodell konnte die Frakturheilung, wie angenommen, verbessern [98].

Fraglich bleibt ein Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die Frakturheilung in einem nicht inflammatorischen Umfeld, wie es in dieser Studie untersucht wurde.

5.2 Diskussion der Methoden und Limitierungen der Arbeit

Die Heilung von Frakturen ist und war ein viel beforschtes Feld. Es gibt zahlreiche Fraktur Modelle von offenen Osteotomiemodellen über geschlossene Frakturmodelle [76], Pseudarthrose-Modelle [27] sowie verschiedenste Fixationsmöglichkeiten. Dabei ist die Wahl des Modells entscheidend von der Fragestellung abhängig [39]. Da ein Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die Frakturheilung untersucht werden sollte, war es wünschenswert andere Einflüsse auf diese möglichst gering zu halten. Die Verwendung des geschlossenen Frakturmodells mittels stumpfer Guillotine nach Bonnarens und Einhorn sollte dabei das Weichteiltrauma so gering wie möglich halten [10], da sich ein solches negativ auf die Frakturheilung auswirken kann [17]. In Kombination mit der MouseScrew als Methode zur Frakturversorgung konnte durch das verhältnismäßig geringe Operationstrauma die eingriffsbedingte Inflammation weiter reduziert werden. Offene Frakturmodelle wie das Pin-Clip-Modell, der LockingMouseNail oder eine externe Fixierung schieden aufgrund ihrer größeren Invasivität aus. Andere geschlossene Frakturmodelle wie die Versorgung mit einem Pin oder Locking Nail boten keine ausreichende Stabilisierung und waren der MouseScrew diesbezüglich unterlegen [65]. Die adäquate Stabilisierung der Fraktur hat großen Einfluss auf deren Heilung. So konnte durch den longitudinalen Zug der intramedullären Schraube sowohl eine rotatorische als auch eine axiale Stabilität erreicht werden [39,42]. Daher schien das MouseScrew-Modell als Methode für diese Studie als am besten geeignet.

Die Wahl der Spezies Maus bot für diese Arbeit mehrere Vorteile. Sie waren gut handhabbar, vergleichsweise einfach zu halten und es gab, wie bereits aufgezeigt, viele etablierte Frakturmodelle je nach Fragestellung. Vor allem aber die gut bekannte Genetik der Mäuse und die Vielzahl der zur Verfügung stehenden transgenen Modelle sowie die breite Verfügbarkeit von Antikörpern ermöglichten die Untersuchung einzelner Proteine und deren Bedeutung [11,39]. Generell muss allerdings beachtet werden, dass Tierversuche nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden können [36]. Eben die gut bekannte Genetik von Mäusen in der Forschung und die Anwendung humanisierter Modelle erlaubten es allerdings, Unterschiede bestmöglich beachten zu können [11]. Die Verwendung von *Nlrp3^{-/-}*-Mäusen zeigte im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte Expression des AIM2. Der dazugehörige Stoffwechselweg dieser beiden Inflammasom-Sensorproteine wurde erst kürzlich aufgedeckt [64] und war zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt. Ob dieser Zusammenhang beim Menschen ebenso besteht, bleibt offen.

Eine potentielle Limitation dieser Arbeit ist die geringe Gruppengröße. Auf Grund der individuellen Heilung der Tiere lassen sich in kleinen Gruppen statistisch signifikante Unterschiede schwieriger detektieren [58]. Dem steht allerdings das Interesse entgegen, im Sinne des Tierschutzes die Anzahl der eingesetzten Tiere auf das nötige Mindestmaß zu begrenzen [35]. Die Gruppengröße der vorliegenden Arbeit stellte einen entsprechenden Kompromiss dar. Eine ausgewogene Geschlechterverteilung wurde bestmöglich versucht umzusetzen, war, bedingt durch organisatorische Gründe und der aktuellen Verfügbarkeit der Tiere, allerdings limitiert.

Am Operationstag und am ersten Tag postoperativ erhielten die Tiere gemäß Protokoll, zusätzlich zur Analgesie durch tramalhaltiges Trinkwasser, eine subcutane Gabe von 10mg/kgKG Caprofen zur Schmerzkontrolle. Caprofen hat als *Non-steroidal anti-inflammatory drug* (NSAID), wie es der Name schon impliziert, eine antiinflammatorische Wirkung. Durch Dämpfung der initialen Inflammatorischen Phase nach der Fraktur kann eine potentiell negative Auswirkung auf die Frakturheilung durch die Caprofengabe vorgelegen haben [25,31,73]. Allerdings ist eine Verzerrung der Ergebnisse zwischen den untersuchten Gruppen nicht zu erwarten, da sowohl die NLRP3^{-/-} als auch die WT-Tiere das NSAID in der gleichen Dosierung und zu den gleichen Zeitpunkten erhalten haben. Zudem ist die Studienlage bezüglich eines Einflusses von NSAID auf die Frakturheilung an sich heterogen [39] und die Caprofengabe erfolgte in dieser Studie nur zur OP und am ersten postoperativen Tag. Das zur Analgesie bis zum dritten postoperativen Tag verwendete Tramadol hat keinen bekannten schädlichen Einfluss auf die Frakturheilung bei gleichzeitig guter Analgesie [39].

Entsprechend des durch Holstein et al. [42] etablierten Frakturmodells wurden die Femora und deren Heilungsfortschritte nach 2 und 5 Wochen untersucht [42]. Die Gewinnung der Kalli für die Western Blot Analysen erfolgte ebenfalls 2 Wochen postoperativ. Durch die gleiche Heilungszeit der Western Blot- und der 2-Wochen-Gruppe konnten die Ergebnisse der Untersuchungen (Biomechanik, μ CT, Histologie und Western Blot) für diesen Zeitpunkt zusammen beurteilt werden. Die inflammatorische Phase steht am Anfang der Frakturheilung [74], erreicht ihren Höhepunkt nach ca. 1 Tag und dauert bis zu 7 Tagen an [56]. Untersuchungen der Zytokinexpression in der Inflammationsphase hätte eine entsprechend zeitnahe Untersuchung der Tiere postoperativ notwendig gemacht. Dies wäre allerdings mit einem höheren Einsatz an Versuchstieren einhergegangen und eine Untersuchung der frakturierten Femora bezüglich der Biomechanik und Histologie wäre auf Grund des zu diesem Zeitpunkt noch zu instabilen Kallus nicht möglich gewesen [39]. Letztendlich ist die Beantwortung der Frage ob es Unterschiede der Frakturheilung zwischen den Gruppen gibt vor allem durch die Stabilität des Knochens nach der Heilung und die dafür nötige Zeit zu beantworten. Die notwendige Stabilität des Kallus für eine Biomechanische Testung ist erst

nach ca. zwei Wochen gegeben, weshalb dieser Zeitpunkt für die Untersuchungen gewählt wurde [39]. Unter Anwendung des geschlossenen Frakturmodells und Versorgung mittels MouseScrew kann nach 5 Wochen eine relative Biegesteifigkeit von ca. 90% erreicht werden [40], was eine gute Vergleichbarkeit der Gruppen zu diesem Zeitpunkt bot.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Frakturheilung von NLRP3^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp

Die Frakturheilung der untersuchten Tiere zeigte keine signifikanten Unterschiede der biomechanischen Stabilität im 3-Punkt-Biegeverfahren nach 2 beziehungsweise 5 Wochen (Abbildung 20-A und -B & Abbildung 21-A und -B). Im Gegensatz dazu zeigten die NLRP3^{-/-}-Tiere eine leicht, aber signifikant geringere Stabilität der nicht operierten Femora, wie in *Biegesteifigkeit der intakten Femora* (Abbildung 22) gezeigt. Diese Beobachtung lässt sich mit dem von Detzen et al. [21] beschriebenen osteopenischen Phänotypen der NLRP3^{-/-}-Tieren in Einklang bringen. Bezüglich des NLRP3^{-/-}-Phänotyps finden sich unterschiedliche Beobachtungen in der Literatur. Während Alippe et al. [2] bei 3 Monate alten Tieren noch keine Unterschiede sahen, stellten sie bei 8 Monate alten Tieren der NLRP3^{-/-}-Gruppe eine signifikant höhere Knochendichte und BV/TV im Vergleich zum WT fest. Im Gegensatz dazu beobachteten Detzen et al. [21] bei der skelettalen Entwicklung von NLRP3^{-/-}-Tieren im Vergleich zum WT eine signifikant verminderte Körperlänge, BV/TV, TbNb und TbTh nach 4 Wochen. Interessanterweise glich sich der Phänotyp der NLRP3^{-/-}-Tiere mit zunehmendem Alter dem des WT an. So konnten bei 16 Wochen alten männlichen Tieren nur noch eine leicht verminderte Körperlänge sowie eine verminderte BV/TV und TbNb als signifikante Unterschiede beobachtet werden. Weibliche Tiere zeigten nach 16 Wochen keine Unterschiede mehr [21]. In der hier durchgeführten Studie konnte in den μ CT-Analysen ebenfalls eine signifikant geringere TbTh nach Frakturheilung bei den NLRP3^{-/-}-Tiere der 2 Wochen Gruppe im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abbildung 23-H). Das Durchschnittsalter der Tiere zum Zeitpunkt der Femoraentnahme lag in dieser Studie in beiden Gruppen bei über 16 Wochen (siehe 3.1). Eine altersbedingte Anpassung der Phänotypen der Versuchs- an die Kontrollgruppe, wie von Detzen et al. [21] beschrieben, würde somit bereits vorgelegen haben. Da der von Ihnen festgestellte Unterschied der TbTh zwischen den Versuchsgruppen bei 16 Wochen alten Tieren nicht mehr vorlag, lässt sich der festgestellte Unterschied der TbTh in dieser Studie auch tatsächlich auf die unterschiedliche Frakturheilung rückführen und nicht nur auf ohnehin vorliegende Unterschiede des Phänotyps dieses Alters.

Die übrigen μ CT-Auswertungen des Frakturkallus beider Gruppen konnten in dieser Arbeit keine weiteren signifikanten Unterschiede aufzeigen (Abbildung 23-E; -F; -G und -I).

In der Histomorphometrie zeigten sich in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen (Abbildung 24 & 25). Im diabetischen Rattenmodell von Li et al. [51] konnte hingegen, unter der bestehenden systemischen Inflammation, eine verminderte Knochenneubildung im zuvor herbeigeführten Defekt im Vergleich zum nicht diabetischen Tier beobachtet werden. Die Inhibierung des NLRP3 verbesserte die Knochenbildung, was einen schädlichen Effekt dessen bei einer chronischen Inflammation auf die Fraktuheilung nahelegt [51]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Yang et al. [98] durch Inhibierung des NLRP3 mittels Glyburid im diabetischen Mausmodell. Durch diese konnte die biomechanische Stabilität gesteigert werden. Das Kallusvolumen sowie der knöcherne und bindegewebige Anteil waren unter NLRP3 Suppression gesteigert, während sich der Anteil des Knorpels geringer zeigte [98]. Diese beiden Studien zeigen durchaus einen positiven Effekt der NLRP3 Inhibierung auf die Frakturheilung unter diabetischen Bedingungen auf. Im Gegensatz dazu hat ein NLRP3-Knock-Out ohne Vorliegen einer chronischen Inflammation, wie er in dieser Arbeit untersucht wurde, wohl keine solche positiven Effekte auf die Frakturheilung. Es muss aber berücksichtigt werden, dass bei Li et al. [51] und Yang et al. [98] keine transgenen Tiere verwendet wurden, sondern eine Inhibierung des NLRP3 vorlagen.

In der weiteren feingeweblichen Untersuchung konnten bei den NLRP3^{-/-}-Tieren zum 2 Wochen Zeitpunkt weniger Makrophagen im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abbildung 28-E). Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass Makrophagen die Vaskularisierung sowie die Differenzierung von Chondrozyten beeinflussen [74]. Zudem sind sie die Vorläuferzellen der Osteoklasten und exprimieren NLRP3 [2]. Das Osteoklastenvorkommen im Kallus beider Gruppen zeigte in der TRAP-Färbung hier allerdings keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 26-E), was mit den Ergebnissen von Detzen et al. [21] vereinbar ist. Darüber hinaus konnten Bonar et al. [9] bei NLRP3 Überexpression, wie in deren NOMID-Modell, eine erhöhte Osteoklastenzahl beobachten, welche mit einer vermehrten Knochenresorption einherging [9]. Zusammen mit den Beobachtungen in der hiesigen Studie legt dies einen positiven Effekt einer NLRP3-Inhibierung auf die Knochenresorption lediglich bei bestehender Überexpression dessen nahe, so wie sie zum Beispiel bei chronischen inflammatorischen Erkrankungen vorliegt [22,41,87,99].

In der MPO-Färbung zeigten sich bei NLRP3^{-/-}-Tieren 2 Wochen nach der Fraktur vermehrt MPO-positive Zellen (Abbildung 29-E), bei welchen es sich maßgeblich um neutrophile Granulozyten handelte [96]. Nach einer Fraktur stellen neutrophile Granulozyten eine der ersten Zellarten vor Ort dar, welche durch Zytokinfreisetzung wie IL-6 die Rekrutierung von

Makrophagen induzieren [43,52]. Da bei den NLRP3^{-/-}-Mäusen die Anzahl der Makrophagen im Vergleich zum WT signifikant geringer war bei gleichzeitig signifikant vermehrt neutrophilen Granulozyten, weist dies am ehesten auf eine verzögerte zellulär-inflammatorische Reaktion bei bestehendem NLRP3 Knock-out hin. Zudem beeinflussen neutrophile Granulozyten die Differenzierung von Chondrozyten positiv, wohingegen sie die Osteoblastendifferenzierung aus mesenchymalen Stammzellen dämpfen. Zusätzlich zu diesen Erkenntnissen aus einer Arbeit von Oryan et al. [74] zeigten diese, wenn auch nicht signifikant, dass bei einer Neutralisierung der neutrophilen Granulozyten mittels Antiserum eine Minderung der Knorpelfläche sowie eine Vermehrung von trabekulären Knochen vorlagen [74]. Letzteres konnte auch in der hiesigen NLRP3^{-/-}-Gruppe nach 2 Wochen beobachtet werden. Bei vermehrter Anzahl von neutrophilen Granulozyten pro HPF im Kallusgewebe (Abbildung 29-E) zeigte sich eine signifikant niedrigere TbTh der NLRP3^{-/-}-Tiere gegenüber der WT-Gruppe (Abbildung 23-H). Auch wenn die Infiltration neutrophiler Granulozyten nach einer Verletzung und deren Zytokinfreisetzung sowie Debridierung allgemein beschrieben sind [8,70], so wirkt sich nach aktuellen Erkenntnissen deren Abwesenheit (ebenso wie die von Makrophagen) nicht nachteilig auf die Wundheilung aus. Allerdings stammen diese Erkenntnisse aus Versuchen mit Weichgewebsverletzungen von PU.1 Null Mäusen, welche keine funktionsfähigen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen besaßen [57]. Eine Übertragung auf das hier verwendete Frakturheilungsmodell ist sicherlich kritisch zu sehen. Darüber hinausgehend stellten Bastian et al. [8] die Hypothese auf, wonach sogar einen schädlichen Effekt auf die Frakturheilung durch vermehrt vorkommende neutrophile Granulozyten bei Vorliegen einer systematischen Inflammation ausgehen könnte. Diese Schlussfolgerung zogen sie auf Grund einer verbesserten Frakturheilung nach systematischer Reduktion der neutrophilen Granulozyten [8]. Eine Neutrophilie konnte auch bei der NLRP3 Überexpression von NOMID Mäusen beobachtet werden, welche einen osteopenischen Phänotyp zeigten [9]. Daher lässt sich ableiten, dass eine Reduktion der Anzahl neutrophiler Granulozyten lediglich bei einer bestehenden systematischen Inflammation einen vorteiligen Effekt auf die Frakturheilung zu hat.

Dass nach einer Fraktur eine adäquate Gefäßversorgung für die Heilung notwendig ist, ist bereits lange bekannt [61]. In der vorliegenden Studie zeigten sich sowohl zum 2 Wochen als auch zum 5 Wochen Zeitpunkt signifikant weniger Gefäße im Frakturkallus der NLRP3^{-/-}-Tiere (Abbildung 27-E). Als Folge unzureichender Vaskularisierung wurde in der Literatur eine Persistenz des Knorpels beschrieben, welcher erst unter ausreichender Oxygenierung zu Knochen umgewandelt wurde [28,61]. In der vorliegenden Arbeit konnte trotz unterschiedlicher Gefäßanzahl im Kallus keine verzögerte Frakturheilung beobachtet werden. Die Anzahl der Gefäße in NLRP3^{-/-}-Tiere gewährleistet folglich trotz Minderung derer gegenüber des WT noch eine ausreichende Oxygenierung.

Die Angiogenese wird von zahlreichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren gefördert, darunter unter anderem TGF- β , BMP, IL-1 und TNF- α [69,70,83]. Ein weiterer wichtiger Regulator der Angiogenese ist das von hypertrophen Chondrozyten stammende VEGF. Durch dieses werden Endothelzellen rekrutiert, wodurch Blutgefäße entstehen können [28]. Western Blot Analysen des Kallus zeigten, passend zur unterschiedlichen Anzahl der Gefäße in den beiden Gruppen, eine signifikant niedrigere Expression von VEGF in der NLRP3^{-/-}-Gruppe (Abbildung 31-A und -B). Eine Erklärung für diesen Unterschied kann eine Reduktion von hypertrophen Chondrozyten in NLRP3^{-/-}-Tieren sein [21]. Vorangegangene Arbeiten konnten einen positiven Effekt auf die Frakturheilung durch eine VEGF-vermittelte gesteigerte Cyr61-Expression in Osteoblasten zeigen. Diese hatte eine gesteigerte Migration von Endothelzellen zur Folge [4]. Entgegen diesen Beobachtungen konnte in der vorliegenden Studie trotz unterschiedlicher VEGF-Expression im Kallus keine signifikant verminderte Cyr61-Expression in der NLRP3^{-/-}-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 31-A und -C). Untersuchungen zur Cyr61-Expression bei Ratten im zeitlichen Verlauf nach einer Fraktur zeigten sich am 7. und 10. Tag um den Faktor 10 am stärksten gesteigert. Ab dem 14. Tag nahm die Cyr61-Expression ab [37]. Da die Western Blot Analysen des Kallusgewebes in dieser Arbeit 14 Tage nach der Fraktur durchgeführt wurden, wäre demnach eine gesteigerte Cyr61-Expression noch zu erwarten gewesen. Nichtsdestotrotz war die Angiogenese in der NLRP3^{-/-}-Gruppe weniger ausgeprägt im Vergleich zur WT, unabhängig von der Cyr61-Expression.

Auch wenn sich bei der Untersuchung der Frakturheilung einzelne Unterschiede zwischen den Gruppen beobachten ließen, so hatten diese keinen maßgeblichen Einfluss auf die Frakturheilung. Die Stabilität des Knochens nach einer Fraktur stellt das härteste Kriterium für den Erfolg der Heilung dar und zeigte sich bezüglich der Frakturheilung im Vergleich beider Gruppen in dieser Arbeit ohne signifikante Unterschiede.

5.3.2 Gibt es eine Kompensation des NLRP3 Knock-Outs auf Inflammasomeebene?

Wie bereits in der Einleitung (2.4 „Inflammasome“) beschrieben wurde, können aus verschiedenen PRRs Inflammasome hervorgehen. Diese haben als Gemeinsamkeit in deren Endstrecke die Prozessierung von GSDMD, Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 zu deren aktiven Metaboliten [12,50]. Damit Ergebnisse auf das Fehlen des NLRP3-Inflammasoms zurückgeführt werden konnten und nicht etwa auf kompensatorische Änderungen anderer Sensormoleküle war es notwendig, auch andere PRRs als nur das NLRP3 in beiden Gruppen auf eventuelle Unterschiede hin zu untersuchen. Zunächst wurde das Vorliegen des NLRP3-

Knock-outs durch den dazugehörigen Western Blot bestätigt (Abbildung 30-A und -B). Zudem wurde eine signifikante Hochregulierung der AIM2-Expression bei den NLRP3^{-/-}-Tieren ca. um den Faktor 2 beobachtet (Abbildung 30-A und -D). Im Laufe dieser Forschungsarbeit veröffentlichten Meng et al. [64] ihre Ergebnisse zu Untersuchungen des Einflusses von NLRP3 auf die experimentelle autoimmune Uveitis und die experimentelle autoimmune Enzephalitis. Dabei stellten Sie ebenfalls eine AIM2 Überexpression in NLRP3^{-/-}-Tieren fest und konnten einen Zusammenhang der beiden aufzeigen. Demnach fördert NLRP3 die Phosphorylierung von *Salt inducible kinase 1* (SIK1), welche seinerseits die Expression von *Sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBF1) inhibiert. Experimentell zeigte ein Silencing des SREBF1 ein vermindertes Vorkommen von AIM2 mRNA und dessen Protein. Folglich postulierten Meng et al. [64] einen neu entdeckten Stoffwechselweg, wonach über eine NLRP3/phosphoryliertes-SIK1/SREBF1/AIM2-Achse NLRP3 die Transkription von AIM2 hemmen kann [64]. Folglich lässt sich die höhere AIM2 Expression durch den fehlenden inhibierenden Effekt von NLRP3 in dessen Knock-out erklären. In der Literatur beschriebene Veränderungen der Knochenentwicklung und der Frakturheilung von NLRP3^{-/-}-Tieren wie z.B. eine verzögerte enchondrale Ossifikation [21], eine verminderte IL-1 β Expression, gesteigerte Knochenmasse [2] und weniger trabekulärer Knochen mit weniger und dünneren Trabekeln [21] konnten in der vorliegenden Studie nicht, oder nur zum Teil beobachtet werden. Eine Kompensation des NLRP3 Knock-outs durch die im Vergleich zum WT hochregulierte AIM2 Expression (Abbildung 30-A und -D) liegt als Erklärung für die beobachteten Ergebnisse nahe. Bei den von Alippe et al. [2] und Detzen et al. [21] festgestellten Unterschieden der NLRP3^{-/-}-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ist allerdings fraglich, inwiefern eine AIM2-Kompensation auch dort Einfluss auf die Ergebnisse genommen hatte. Gleiches gilt für die Versuche von Li et al. [51] im diabetischen Rattenmodell, bei welchem sich das lokale Silencing des NLRP3 im verursachten Defekt bei diabetischen Tieren positiv auf die Frakturheilung auswirkte [51]. Fraglich bleibt das Zusammenspiel von NLRP3 und AIM2, beziehungsweise deren Expression lokal im Knochendefekt sowie systemisch. Es lässt sich mutmaßen, dass eine NLRP3 Überexpression, wie sie oft bei systemischer Inflammation vorliegt [22,41,87,99], entsprechend der NLRP3/phosphoryliertes-SIK1/SREBF1/AIM2-Achse zu einer verminderten AIM2 Expression führen könnte. Allerdings sind ebenso chronisch-inflammatorische Erkrankungen bekannt, bei welchen das AIM2 maßgeblich beteiligt ist [88]. Festzuhalten ist, dass künftige Forschungen zu Inflammasomen, insbesondere bei Verwendung von transgenen NLRP3^{-/-}-Tieren, Kompensationsmechanismen vor allem im Hinblick auf AIM2 mitberücksichtigen müssen.

Interessant ist dabei eine potentielle Möglichkeit, die zytokinvermittelten Effekte des NLRP3- und AIM2-Inflammasoms gleichzeitig zu reduzieren. Sun et.al [92] untersuchten die Frakturheilung von GSDMD^{-/-}-Mäusen, welche in Folge einer Inflammasomaktivierung keine

Gasdermin-Poren bilden konnten. Dadurch war im Vergleich zum WT die IL-1 β und IL-18 Freisetzung gestört, was mit einer verzögerten Frakturheilung einherging. Dabei beobachteten sie einen Tag nach der Fraktur eine vermehrte Expression sowohl von NLRP3 als auch von AIM2 in beiden Gruppen. Bei GSDMD^{-/-}-Tiere zeigte sich die AIM2-Expression in nicht frakturierten Knochen niedriger als beim WT, wohingegen sie in den frakturierten Knochen in beiden Gruppen ähnlich war. Eine frakturbedingte Veränderung der Expression von NLRC4 wurde nicht beobachtet [92] und blieb auch in der vorliegenden Arbeit ohne signifikanten Unterschied (Abbildung 30-A und -C). Diese effektive Reduktion der IL-Freisetzung durch die fehlenden Gasdermin-Poren [92] qualifiziert das GSDMD als potentielles Ziel einer Inhibierung.

Die Funktion des AIM2 als dsDNA-Sensor bei viralen und bakteriellen Infektionen ist bereits gut untersucht [54]. Im Gegensatz dazu sind die genauen Einflüsse des AIM2-Inflammasoms auf die Skelettentwicklung und die Frakturheilung bislang nicht zufriedenstellend bekannt und bedürfen weiterer Forschungen.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Frakturheilung bezüglich der Stabilität von NLRP3^{-/-}-Tieren nicht signifikant von der des WT unterscheidet. Obwohl einzelne Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet wurden, muss festgehalten werden, dass diese auf Grund der Ergebnisse der Biomechanik keinen, beziehungsweise nur einen leichten Einfluss auf die Frakturheilung hatten. Erwartete Unterschiede der NLRP3^{-/-}-Gruppe im Vergleich zum WT, welche sich aus der Literaturrecherche ergaben, konnten überraschenderweise größten Teils nicht beobachtet werden. Als naheliegende Erklärung für die fehlenden Unterschiede beider Gruppen könnte eine Kompensation des NLRP3-Knock-outs durch die festgestellte Überexpression von AIM2 der NLRP3^{-/-}-Tiere sein, da das AIM2- und NLRP3-Inflammasom die gleiche Endstrecke haben [54,89]. Die Überexpression lässt sich durch die Inhibierung der AIM2-Expression durch das NLRP3 [64] erklären, welche folglich bei NLRP3^{-/-}-Tiere entfällt. Dies muss bei künftigen Verwendungen dieser transgenen Tiere berücksichtigt werden. Ebenso muss diese noch relativ neue Erkenntnis mit einer kritischen Bewertung bisheriger Ergebnisse aus Versuchen mit NLRP3^{-/-}-Tieren einhergehen, welche diesen Mechanismus noch nicht berücksichtigen konnten. Unabhängig davon kann eine Inhibierung des NLRP3-Inflammasoms bei Frakturen und gleichzeitigem Vorliegen einer chronischen Inflammation die Heilung fördern [51,98]. In welchem Maße die AIM2-Expression durch eine NLRP3-Inhibierung (lokal und/oder systemisch) betroffen ist, bleibt bislang unbekannt. Allerdings ergibt sich aus der von Meng et al. [64] neu entdeckten

NLRP3/phospholyliertes-SIK1/SREBF1/AIM2-Achse gegebenenfalls das AIM2 als neuer Angriffspunkt für eine effektivere antiinflammatorische Therapie im Sinne einer dualen Inflammasom-Inhibierung zusammen mit dem NLRP3.

6 Literatur

1. Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2008) Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J Dent Res* 87:107–118
2. Alippe Y, Kress D, Ricci B, Sun K, Yang T, Wang C, Xiao J, Abu-Amer Y, Mbalaviele G (2021) Actions of the NLRP3 and NLRC4 inflammasomes overlap in bone resorption. *FASEB J* 35(9):e21837
3. Arnold WH, Bechmann IJ, Böckers A, Bräuer L, Dehghani F, Deller T (2019) *Anatomie: Das Lehrbuch*. 2. edition. Elsevier, München, Germany
4. Athanasopoulos AN, Schneider D, Keiper T, Alt V, Pendurthi UR, Liegibel UM, Sommer U, Nawroth PP, Kasperk C, Chavakis T (2007) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced Up-regulation of CCN1 in osteoblasts mediates proangiogenic activities in endothelial cells and promotes fracture healing. *J Biol Chem* 282:26746–26753
5. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spaniel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch H-G (2017) *Anatomie*. 3. edition. Thieme, Stuttgart, Germany
6. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD (2019) Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res* 37:35–50
7. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999) Growth Factor Regulation of Fracture Repair. *J Bone Miner Res* 14:1805–1815
8. Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T (2011) Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 89:669–673
9. Bonar SL, Brydges SD, Mueller JL, McGeough MD, Pena C, Chen D, Grimston SK, Hickman-Brecks CL, Ravindran S, McAlinden A, Novack DV, Kastner DL, Civitelli R, Hoffman HM, Mbalaviele G (2012) Constitutively activated NLRP3 inflammasome causes inflammation and abnormal skeletal development in mice. *PLoS ONE* 7:e35979
10. Bonnarens F, Einhorn TA (1984) Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* 2:97–101
11. Bouabe H, Okkenhaug K (2013) *Gene Targeting in Mice: A Review*. Humana Press, Totowa, NJ. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-601-6_23
12. Broz P, Dixit VM (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16:407–20
13. Buckley RE, Moran CG, Apivatthakakul T (2017) *AO Principles of Fracture Management: Vol. 1: Principles, Vol. 2: Specific Fractures*. Thieme, Stuttgart, Germany
14. Burdette BE, Esparza AN, Zhu H, Wang S (2021) Gasdermin D in pyroptosis. *Acta Pharm Sin B* 11:2768–2782
15. Chavarría-Smith J, Vance RE (2015) The NLRP1 inflammasomes. *Immunol Rev* 265(1):22-34

16. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2017) CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97:4–13
17. Claes L, Maurer-Klein N, Henke T, Gerngross H, Melnyk M, Augat P (2006) Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *J Orthop Res* 24:1178–1185
18. Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Núñez G, Latz E, Kastner DL, Mills KHG, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LAJ (2015) A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 21:248–255
19. Colnot C (2009) Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 24:274–282
20. Damiano JS, Oliveira V, Welsh K, Reed JC (2004) Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem J* 381:213–219
21. Detzen L, Cheat B, Besbes A, Hassan B, Marchi V, Baroukh B, Lesieur J, Sadoine J, Torrens C, Rochefort G, Bouchet J, Gosset M (2021) NLRP3 is involved in long bone edification and the maturation of osteogenic cells. *J Cell Physiol* 236:4455–4469
22. Ding S, Xu S, Ma Y, Liu G, Jang H, Fang J (2019) Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes. *Biomolecules* 9:850
23. Duncan JA, Canna SW (2018) The NLRC4 inflammasome. *Immunol Rev* 281:115–123
24. Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing: *Clin Orthop* 355S:S7–S21
25. ElHawary H, Baradaran A, Abi-Rafeh J, Vorstenbosch J, Xu L, Efanov JI (2021) Bone healing and inflammation: principles of fracture and repair. *Semin Plast Surg* 35:198–203
26. Finger JN, Lich JD, Dare LC, Cook MN, Brown KK, Duraiswami C, Bertin JJ, Gough PJ (2012) Autolytic proteolysis within the function to find domain (FIIND) is required for NLRP1 inflammasome activity. *J Biol Chem* 287:25030–25037
27. Garcia P, Holstein JH, Maier S, Schaumlöffel H, Al-Marrawi F, Hannig M, Pohlemann T, Menger MD (2008) Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 147:84–91
28. Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5:623–628
29. Geris L, Gerisch A, Solten JV, Weiner R, Van Oosterwyck H (2008) Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model. *J Theor Biol* 7;251(1):137-58
30. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 1;88(5):873-84
31. Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, Cullinane D, Einhorn TA (2003) Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res* 21(4):670-5

32. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA (2005) Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 20:1715–1722
33. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, Bauer M, Kayal R, Graves DT, Jepsen KJ, Einhorn TA (2006) Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem* 54:1215–1228
34. Gómez-Barrena E, Padilla-Eguiluz NG, Rosset P (2020) Frontiers in non-union research. *EFORT Open Rev* 5:574–583
35. Gross D, Tolba RH (2015) Ethics in Animal-Based Research. *Eur Surg Res* 55:43–57
36. Hackam DG, Redelmeier DA (2006) Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA* 296:1727
37. Hadjiargyrou M, Ahrens W, Rubin CT (2000) Temporal expression of the chondrogenic and angiogenic growth factor CYR61 during fracture repair. *J Bone Miner Res* 15:1014–1023
38. Hayman AR (2008) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41:218–223
39. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagl S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD (2011) Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 49(4):591-9
40. Histing T, Stenger D, Scheuer C, Metzger W, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Pohlemann T, Menger MD (2012) Pantoprazole, a proton pump inhibitor, delays fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int* 90:507–514
41. Holbrook JA, Jarosz-Griffiths HH, Caseley E, Lara-Reyna S, Poulter JA, Williams-Gray CH, Peckham D, McDermott MF (2021) Neurodegenerative Disease and the NLRP3 Inflammasome. *Front Pharmacol* 12:643254
42. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Meier C, Pohlemann T, Menger MD (2009) Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *J Surg Res* 153:71–75
43. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001) IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *immunity* 14:705–714
44. Karar J, Maity A (2011) PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Front Mol Neurosci* 2;4:51
45. Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, Leone CW, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Graves DT (2007) Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res* 22:560–568
46. Kelley N, Jeltama D, Duan Y, He Y (2019) The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci* 20:3328

47. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12:860–875
48. Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157:1013–1022
49. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Mclau T, Marcucio RS (2010) Action of IL-1 β during fracture healing. *J Orthop Res* 28:778–784
50. Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13:397–411
51. Li H, Zhong X, Chen Z, Li W (2019) Suppression of NLRP3 inflammasome improves alveolar bone defect healing in diabetic rats. *J Orthop Surg* 14:167
52. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T, Yao Z, Goodman SB (2016) Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 86:119–130
53. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha TE, Kengne AP (2013) Diabetes mellitus and inflammation. *Curr Diab Rep* 13:435–444
54. Lugrin J, Martinon F (2018) The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunol Rev* 281:99–114
55. Lüllmann-Rauch R, Asan E (2019) Taschenlehrbuch Histologie. 6. edition. Thieme, Stuttgart, Germany
56. Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555
57. Martin P, D’Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR (2003) Wound healing in the PU.1 null mouse-tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 13:1122–1128
58. Mascha EJ, Vetter TR (2018) Significance, Errors, Power, and Sample Size: The blocking and tackling of statistics. *Anesth Analg* 126:691–698
59. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ (1997) Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 90:3322–3331
60. McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley CS, Duncan JA, Ting JP-Y, Marriott I (2007) Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J Bone Miner Res* 23:30–40
61. McKibbin B (1978) The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B(2):150-62
62. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428–435
63. Meinberg E, Agel J, Roberts C, Karam M, Kellam J (2018) Fracture and dislocation classification compendium—2018. *J Orthop Trauma* 32:S1–S10
64. Meng J, Li N, Liu X, Qiao S, Zhou Q, Tan J, Zhang T, Dong Z, Qi X, Kijlstra A, Mao L, Yang P, Hou S (2022) NLRP3 attenuates intraocular inflammation by inhibiting AIM2-mediated

pyroptosis through the phosphorylated salt-inducible kinase 1/sterol regulatory element binding transcription factor 1 pathway. *Arthritis Rheumatol* 75(5):842-855

65. Menger MD, Vollmar B (2004) Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch Surg* 389:475–484
66. Menger MM, Laschke MW, Nüssler AK, Menger MD, Histing T (2022) The vascularization paradox of non-union formation. *Angiogenesis* 25:279–290
67. Menger MM, Laschke MW, Scheuer C, Bauer D, Bleimehl M, Später T, Rollmann MF, Braun BJ, Herath SC, Raza A, Menger MD, Histing T (2022) Establishment of a reliable model to study the failure of fracture healing in aged mice. *J Gerontol Ser A* 77:909–917
68. Menger MM, Stutz J, Ehnert S, Nüssler AK, Rollmann MF, Herath SC, Braun BJ, Pohlemann T, Menger MD, Histing T (2022) Development of an ischemic fracture healing model in mice. *Acta Orthop* 93:466–471
69. Mountziaris PM, Mikos AG (2008) Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14:179–186
70. Mountziaris PM, Spicer PP, Kasper FK, Mikos AG (2011) Harnessing and modulating inflammation in strategies for bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 17:393–402
71. Mulisch M, Welsch U (2015) *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, Germany
72. Ni F, Zhang T, Xiao W, Dong H, Gao J, Liu Y, Li J (2021) IL-18-mediated SLC7A5 overexpression enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via the c-MYC pathway. *Front Cell Dev Biol* 9:748831
73. O Research Institute Davos, AO Foundation, Clavadelerstrasse 8, 7270 Davos Platz, Switzerland, Burch M-A, Keshishian A, Wittmann C, Nehrbass D, Styger U, Muthukrishnan G, Arens D, Stadelmann V, Richards R, Moriarty T, Thompson K (2021) The non-steroidal anti-inflammatory drug carprofen negatively impacts new bone formation and antibiotic efficacy in a rat model of orthopaedic-device-related infection. *Eur Cell Mater* 41:739–755
74. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A (2015) Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Env Sci* 28:57–71
75. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (2009) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units: report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res* 2:595–610
76. Park SH, O'Connor K, Sung R, MCKellop H, Sarmiento A (1999) Comparison of healing process in open osteotomy model and closed fracture model. *J Orthop Trauma* 13(2):114-20
77. Phillips AM (2005) Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36:S5–S7
78. Pierce AM, Lindskog S, Hammarström L (1991) Osteoclasts: structure and function. *Electron Microsc Rev* 4:1–45
79. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT (2006) Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 54(4):385-95

80. Rathinam VAK, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E, Hornung V, Vogel SN, Szomolanyi-Tsuda E, Fitzgerald KA (2010) The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nat Immunol* 11:395–402
81. Rupp M, Walter N, Pfeifer C, Lang S, Kerschbaum M, Krutsch W, Baumann F, Alt V (2021) The incidence of fractures among the adult population of Germany. *Dtsch Arztebl Int* 8;118(40):665-669
82. Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Zazzeroni F, Di Benedetto P, Berardicurti O, Alesse E, Giacomelli R (2015) The role of IL-1 β in the bone loss during rheumatic diseases. *Mediators Inflamm* 2015:1–10
83. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S (2014) Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys* 561:109–117
84. Saul D, Menger MM, Ehnert S, Nüssler AK, Histing T, Laschke MW (2023) Bone healing gone wrong: pathological fracture healing and non-unions - overview of basic and clinical aspects and systematic review of risk factors. *Bioengineering* 10:85
85. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19:459–466
86. Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140:821–832
87. Schunk SJ, Kleber ME, März W, Pang S, Zewinger S, Triem S, Ege P, Reichert MC, Krawczyk M, Weber SN, Jaumann I, Schmit D, Sarakpi T, Wagenpfeil S, Kramann R, Boerwinkle E, Ballantyne CM, Grove ML, Tragante V, Pilbrow AP, Richards AM, Cameron VA, Doughty RN, Dubé M-P, Tardif J-C, Feroz-Zada Y, Sun M, Liu C, Ko Y-A, Quyyumi AA, Hartiala JA, Tang WHW, Hazen SL, Allayee H, McDonough CW, Gong Y, Cooper-DeHoff RM, Johnson JA, Scholz M, Teren A, Burkhardt R, Martinsson A, Smith JG, Wallentin L, James SK, Eriksson N, White H, Held C, Waterworth D, Trompet S, Jukema JW, Ford I, Stott DJ, Sattar N, Cresci S, Spertus JA, Campbell H, Tierling S, Walter J, Ampofo E, Niemeyer BA, Lipp P, Schunkert H, Böhm M, Koenig W, Fliser D, Laufs U, Speer T, eQTLGen consortium, BIOS consortium (2021) Genetically determined NLRP3 inflammasome activation associates with systemic inflammation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J* 42:1742–1756
88. Sharma BR, Karki R, Kanneganti T (2019) Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *Eur J Immunol* 49:1998–2011
89. Sharma M, de Alba E (2021) Structure, activation and regulation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *Int J Mol Sci* 16;22(2):872
90. Siewert JR, Stein HJ (2012) *Chirurgie*. 9. edition. Springer, Berlin, Germany
91. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309–319
92. Sun K, Wang C, Xiao J, Brodt MD, Yuan L, Yang T, Alippe Y, Hu H, Hao D, Abu-Amer Y, Silva MJ, Shen J, Mbalaviele G (2022) Fracture healing is delayed in the absence of gasdermin-interleukin-1 signaling. *eLife* 11:e75753

93. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820
94. Teitelbaum SL (2007) Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol* 170:427–435
95. Welsch U, Kummer W, Deller T (2018) *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. edition. Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, Germany
96. Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 7:53–58
97. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MPG (2007) Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone* 41:928–936
98. Yang X, Qu C, Jia J, Zhan Y (2019) NLRP3 inflammasome inhibitor glyburide expedites diabetic-induced impaired fracture healing. *Immunobiology* 224:786–791
99. Zhen Y, Zhang H (2019) NLRP3 inflammasome and Inflammatory bowel disease. *Front Immunol* 10:276
100. Zheng D, Kern L, Elinav E (2021) The NLRP6 inflammasome. *Immunology* 162:281–289

7 Publikationen

Menger MM, Speicher R, Hans S, Histing T, El Kayali MKD, Ehnert S, Menger MD, Ampofo E, Wrublewsky S, Laschke MW (2024) *Nlrp3* deficiency does not substantially affect femoral fracture healing in mice. *Int J Mol Sci* Nov 2;25(21):11788. doi: 10.3390/ijms252111788.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger meinen besonderen Dank aussprechen, nicht nur für die Überlassung dieses spannenden Themas, sondern auch für die Möglichkeit im Institut für klinische Experimentelle Chirurgie forschen zu können, sowie für die großzügige Bereitstellung der Materialien.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Dr. med. M. Menger für seine gute Betreuung bedanken. Trotz der räumlichen Distanz stand er mir durch die regelmäßigen Treffen im Institut und der unkomplizierten Möglichkeit der Kontaktaufnahme jederzeit bei auftretenden Fragen und Problemen während dieser Arbeit helfend zur Seite.

Dank gilt ebenso den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Institutes für die stets unkomplizierte Hilfe und den konstruktiven und freundlichen Dialog. Besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau S. Wrublewsky für die stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Den MTAs des Institutes möchte ich für ihre Arbeit danken, insbesondere Frau J. Becker und Frau S. Hans für die Anfertigung der histologischen Präparate und der Western Blots.

Frau Dr. med. vet. C. Körbel und Frau Dr. med. vet. M. Frings danke ich für ihre Unterstützung und Expertise beim Erlernen des Umgangs mit den Mäusen und den Eingriffen.

Dem Team der Tierhaltung möchte ich für die unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit danken.

Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. W. Metzger gilt Dank für die Vermittlung der Doktorarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, welche immer ein offenes Ohr für Probleme hatten. Allen voran möchte ich mich für die Unterstützung während dieser Zeit bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie für all ihre Unterstützung und Hilfe. Insbesondere meinen Eltern, welche mir auf dem Weg in das Medizinstudium und während dessen stets zur Seite standen. Danke!

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tabellenverzeichnis

Tabelle1 – Versuchsgruppengröße.....	27
--------------------------------------	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Femur Übersicht	13
Abbildung 2 - Bau eines typischen Röhrenknochens am Beispiel des Femurs © Thieme	16
Abbildung 3 - Phasen der Frakturheilung	17
Abbildung 4 – Inflammasome	22
Abbildung 5 - OP Zugang.....	28
Abbildung 6 - OP Drahteinlage	29
Abbildung 7- OP Fraktur	29
Abbildung 8 - OP Einbringung der MouseScrew	30
Abbildung 9 – MouseScrew	30
Abbildung 10 - Kallus in vivo.....	31
Abbildung 11 – Biomechanik	33
Abbildung 12 - Biomechanikkurve	33
Abbildung 13 - Radiologische Kallusdarstellung	36
Abbildung 14 - Aufnahmen Schema Histologie	45
Abbildung 15 - Safranin O-Färbung.....	46
Abbildung 16 - TRAP-Färbung.....	47
Abbildung 17 - MPO-Färbung	48
Abbildung 18 - CD68-Färbung	49
Abbildung 19 - CD31-Färbung	50
Abbildung 20 - Absolute Biegesteifigkeit	54
Abbildung 21 - Relative Biegesteifigkeit	55
Abbildung 22 - Biegesteifigkeit der intakten Femora.....	55
Abbildung 23 - μ CT Auswertung.....	57
Abbildung 24 - Histomorphometrie Bilder	58
Abbildung 25 - Histomorphometrie	59
Abbildung 26 - Histologie TRAP	60
Abbildung 27 - Immunhistochemie CD31	61
Abbildung 28 - Immunhistochemie CD68	62
Abbildung 29 - Immunhistochemie MPO	63
Abbildung 30 - Western Blots Inflammasome	64
Abbildung 31 - Western Blots VEGF und Cyr61	65
Abbildung 32 - Western Blots IL-1 β und IL-18.....	66
Abbildung 33 - Western Blots RUNX, PI3K und PCNA.....	66
Abbildung 34 - Western Blots M-CSF, RANKL und OPG	67
	90