

## 1. Titel und Laufzeit des Vorhabens.

### **Untersuchungen zur ausbleibenden Knochenheilung nach Arbeitsunfällen am Beispiel der Kahnbeinpseudarthrose der Handwurzel**

Laufzeit: 01.06.2012 bis 31.10.2014

## 2. Problemstellung.

Skaphoidpseudarthrosen der Hände stellen ein ungelöstes Problem in der Behandlung von Skaphoidfrakturen dar, die lange Arbeitsausfälle, hohe Rehabilitationskosten und Berentungen nach sich ziehen können. Das Skaphoid ist mit ca. 70% der am häufigsten frakturierte Knochen der Handwurzelreihe [1]. Die Prävalenz der durch die DGUV erfassten meldepflichtigen Frakturen der Handwurzelreihe (ambulant und stationär) liegt bei ca. 2.900 pro Jahr (Quelle: DGUV). Im Bereich der stationär (operativ) versorgten Skaphoidfrakturen (S62.0) zeigte sich in Deutschland in den Jahren 2000-2008 eine konstante Prävalenz von etwa 3.800 Patienten jährlich, wobei ambulant operierte oder konservativ behandelte Skaphoidfrakturen nicht berücksichtigt sind (Quelle: Statistisches Bundesamt). Man rechnet bei 10-13% der Fälle mit einer ausbleibenden knöchernen Heilung, also der Ausbildung einer Pseudarthrose (Falschgelenkbildung), wobei es auch Nennungen bis 50% gibt [2-5]. Frakturen am proximalen Skaphoidpol zeigen sogar eine deutlich höhere Pseudarthrosenrate [6]. Betrachtet man die Diagnose M84.14 (Nichtvereinigung der Frakturenden [Pseudarthrose]: Hand [Finger, Handwurzel, Mittelhand, Gelenke zwischen diesen Knochen]) im Jahr 2009, so zeigten sich insgesamt 3.100 stationäre Fälle, wobei der mit Abstand größte Anteil dieser Diagnosegruppe auf Pseudarthrosen des Skaphoids zurückzuführen ist (Quelle: Statistisches Bundesamt). In den letzten Jahren gab es seitens der handchirurgischen Zentren einige Aktivitäten zur Verbesserung der Resultate nach Skaphoidfrakturen. So wurde immer wieder die frühe Diagnostik in den Vordergrund gestellt. Trotzdem zeigt sich nach wie vor eine hohe Inzidenz von Skaphoidpseudarthrosen, die ein großes Problem für die Rehabilitation der Patienten darstellt. Interessanterweise ist über die molekularen Eigenschaften und Unterschiede zwischen pseudarthrotischen und gesundem Knochen sehr wenig bekannt.

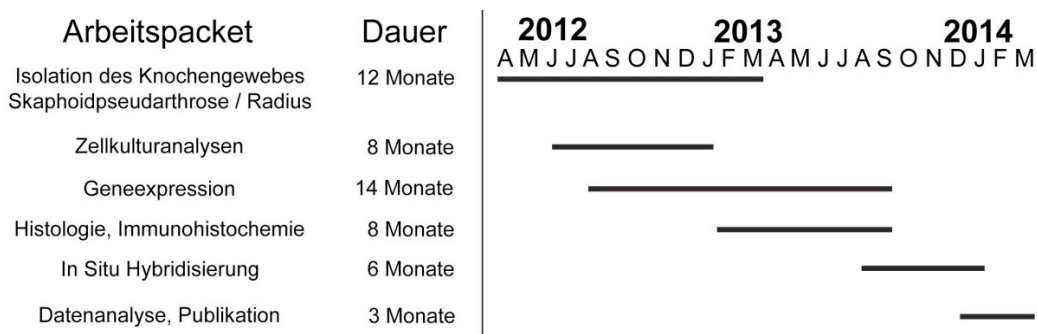
## 3. Forschungszweck/-ziel.

Ziel dieser Studie war die Identifikation fehlregulierter Mechanismen und Moleküle in humanen Skaphoidpseudarthrosen im Vergleich zum gesunden Radius. Skaphoidpseudarthrosen die trotz adäquater handchirurgischer Therapie von Skaphoidfrakturen auftreten, werden möglicherweise durch einen Mangel von Wachstumsfaktoren verursacht. Insbesondere stand die Angiogenese (Gefäßneubildung) im Fokus, um hier eventuell mit Wachstumsfaktoren neben der Knochenneubildung auch die Gefäßneubildung zu fördern. In diesem Forschungsvorhaben sollte anhand von humanen Gewebeproben erfasst werden, welche Gene und Mechanismen in der Skaphoidpseudarthrose fehlreguliert sind beziehungsweise pathologische Veränderungen aufweisen. Als Vergleich dient hier Knochenmaterial vom gut perfundierten unverletzten Radius. Um sicherzustellen, dass sich die Genexpressionsprofile, sowie das Wachstumsverhalten von Knochenzellen aus unverletzten Radius und unverletzten Skaphoid nicht per se signifikant unterscheiden, sollten von zehn frisch verstorbenen

Körperspendern in Kooperation mit dem Anatomischen Institut der Universität Heidelberg jeweils eine Knochenprobe aus Radius und Skaphoid entnommen und auf die gleichen Parameter untersucht werden. Durch Identifikation und intraoperativer Applikation der Wachstumsfaktoren ließe sich die knöcherne Heilungsrate und Gefäßneubildung von Frakturen und Pseudarthrosen des Skaphoids verbessern.

4. Methodik mit schematischer Darstellung der geplanten und tatsächlichen Arbeits- und Zeitabläufe. Bei Forschungsk Kooperationen Zuordnung der Arbeiten zu den Kooperationspartnern.

**Geplante Arbeits- und Zeitabläufe:**



**Tatsächliche Arbeitsabläufe:**

Aufgrund anfänglicher Schwierigkeiten bei der Gewebeaufarbeitung für RNA-Gewinnung verlängerte sich der Zeitraum der Genexpressionsanalysen von 14 Monaten auf 18 Monate. Ein weiterer Grund für die initiale Verzögerung lag in dem Wechsel von Antragssteller und Forschungsleiter innerhalb des Klinikverbundes der gesetzlichen Unfallversicherung an das Universtätsklinikum Bergmannsheil Bochum. Die Isolation von RNA aus Pseudarthrosen, aber auch insbesondere aus Radiusspungiosa stellte sich als große Herausforderung aufgrund der teilweise sehr geringen Gewebemenge dar. Uns gelang es aber durch eine Kombination von TRIzol und anschließender Aufreinigung über Säulen die Qualität zu verbessern und die RNA-Isolierung zu standardisieren (siehe Abschnitt 5.2.4. und 5.2.5). Die Genexpressionsexperimente wurden an die Ergebnisse angepasst und erweitert.

Die Gewinnung von Zellen in vitro konnte erfolgreich etabliert und für die Expressionanalyse Osteogenese-relevanter Gene genutzt werden. Zudem wurden die Kulturbedingungen so angepasst, dass auch eine Differenzierung der Zellen möglich war und untersucht werden konnte (siehe Abschnitt 5.2.2).

Histologische Analysen wurden ebenso erfolgreich an beiden Geweben durchgeführt und für die Charakterisierung genutzt (siehe Abschnitt 5.2.3). Die Proben wurden mitunter randomisiert auf die verschiedenen Analysen aufgeteilt wurden. Aufgrund von geringem Ausgangsmaterial wurde zunächst von einer Etablierung der in situ-Hybridisierung abgesehen. Bei der derzeitigen Datenlage wird eine in-situ Hybridisierung als nicht notwendig erachtet.

Die Analyse in Relation zu den frischen Körperspendern (n=10) wurde begonnen, allerdings stellte sich in Voruntersuchungen heraus, dass sich die Genexpression zwischen den Kollektiven massiv unterschied. Körperspender erschienen damit zum Vergleich nicht geeignet, da sich ihr Durchschnittsalter um mehrere Jahrzehnte von dem Durchschnittsalter der Skaphoidpseudarthrosenpatienten unterschied und somit keine Vergleichbarkeit gewährleistet war.

Das Patientenkollektiv konnte über die geplante Anzahl hinaus vergrößert werden. Die Datenanalyse erfolgte größtenteils im angegebenen Zeitraum, muss aber noch in den folgenden sechs Wochen finalisiert werden.

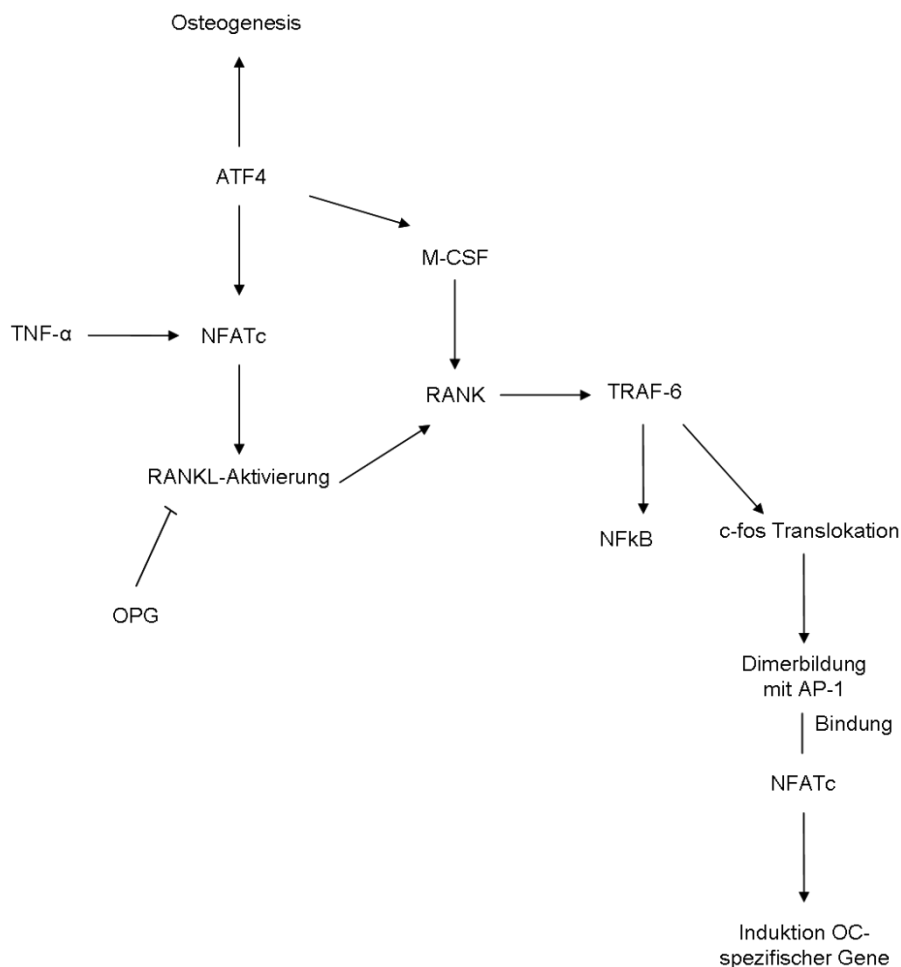
- 5. Ergebnisse des Gesamtvorhabens.** Bei Forschungs Kooperationen Zuordnung der Teilergebnisse zu den Kooperationspartnern. Auflistung relevanter Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilter Schutzrechte (erfolgt oder geplant).

### 5.1 Stand der Forschung

Die Frakturheilung ist typischerweise nach 6-8 Wochen soweit fortgeschritten, dass der Knochen voll belastet werden kann. Während der Heilung einer Knochenfraktur wird teilweise die embryonale und postnatale Knochenentwicklung rekapituliert, wobei normalerweise der Knochen ohne Ausbildung einer fibrösen Narbe ausheilt. Verschiedene Umstände können allerdings zu verzögerter oder ausbleibender Knochenheilung und damit zu einer sogenannten Pseudarthrose führen, beispielsweise durch Instabilität der Fraktur, Unterbrechung der Blutversorgung oder Zystenbildung. Die genauen Mechanismen, die zur Ausbildung einer Pseudarthrose führen, wurden allerdings bisher kaum beschrieben. Skaphoidfrakturen heilen zu 90-95% aus. Beträgt der Frakturspalt jedoch über 1mm, so liegt die Inzidenzrate bei 55% [6]. Skaphoidpseudarthrosen sind überwiegend atrophisch und durch Hypovaskularisierung, ausbleibende Callusbildung und fibröses Gewebe im Frakturspalt charakterisiert. Die Behandlung atrophischer Pseudarthrosen ist komplex und beinhaltet drei Schritte: Resektion des Narbengewebes, Transplantation von autologem Knochen und knöcherne Fixierung.

Kontinuierlicher Auf- und Abbau charakterisiert Knochengewebe. Am ständig stattfindende Knochenumbau sind hauptsächlich knochenbildende Osteoblasten (OBs), die aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks differenzieren und an der Knochenoberfläche lokalisiert sind, und von monozytären Zellen des Blutes stammende knochenresorbierende Osteoclasten (OCs) beteiligt. Die Differenzierung von OCs wird hauptsächlich durch Cytokine und Wachstumsfaktoren reguliert, die auch an der Differenzierung von Makrophagen und anderen Immunzellen beteiligt sind, wie beispielsweise die Mitglieder der TNF-Superfamilie RANKL und TNF- $\alpha$ . Beide Faktoren werden im gesunden Knochen von OBs und Stromazellen sezerniert. Die Aktivierung von RANK durch RANKL führt zur Translokation von c-Fos in den Nukleus, Bildung von AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex, der zusammen mit NFATc OC-spezifische Gene aktiviert [7] und somit OC Differenzierung fördert. Osteoprotegerin hingegen ist ein Inhibitor der OC-Differenzierung, der durch Bindung an RANKL die Aktivierung von RANK verhindert [8, 9]. Die Differenzierung von OCs wird zudem durch M-CSF gesteuert [10], wodurch RANK [11] sowie NF- $\kappa$ B und AP-1 induziert wird. Des Weiteren trägt TNF- $\alpha$  entscheidend zur OC-Differenzierung bei [12]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von TNF- $\alpha$  zu chronischer Polyarthritits [13] führt, was auf eine erhöhte Anzahl OC Vorläuferzellen im Blut und OCs im betroffenen Knochen zurückzuführen ist [14]. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und T-Zellen exprimiert, aber auch durch OCs selbst sezerniert, wodurch c-Fos-Expression in OC-Vorläuferzellen induziert und die Ausdifferenzierung von OCs reguliert wird [15]. Zum Knochenaufbau aber auch -abbau trägt zudem TGF- $\beta$ 1 bei, was einerseits Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen stimuliert [16], andererseits aber auch OC-Differenzierung fördert [17]. Eine Zusammenfassung der genannten Mechanismen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Die beschriebenen Mechanismen sind, zumindest teilweise, nicht nur an der Entwicklung entscheidend beteiligt, sondern auch an der Frakturheilung und müssen strikt reguliert sein. Während der Knochenregeneration folgt vereinfacht beschrieben nach anfänglicher lokaler Inflammation, die auch durch Proliferation von Knochenvorläuferzellen und die Resorption von Knochen debris gekennzeichnet ist, die Ausbildung fibröses Gewebes, das anschließend durch stabilisierenden Knorpel ersetzt wird. Durch Ossifikation und Knochenumbau (‘bone remodelling’) wird der Knochen weiter stabilisiert und erlangt seine vollständige Funktion zurück. Vergleicht man die Knochenheilung nach Tibiafraktur mit gesundem Knochen im Mausmodell, so ist festzustellen, dass die Expression von RANKL, M-CSF und OPG 24h nach Fraktur signifikant erhöht ist und während des gesamten Beobachtungszeitraums (28 Tage) über der Grundexpression des gesunden Knochens liegt [18]. TNF- $\alpha$  ist ebenfalls während des gesamten Zeitraums erhöht und während der Phase der akuten Inflammation und des Knochenumbaus maximal exprimiert. Des Weiteren reguliert TNF- $\alpha$  die Einwanderung mesenchymaler Vorläuferzellen und Apoptose hypertropher Chondrozyten während der endochondralen Frakturheilung [19].



**Abbildung 1: Regulation physiologischer Osteoclastogenese.**

Fehlregulationen in der Knochenregeneration involvierter Mechanismen, die letztlich zu Ausbildung einer Pseudarthrose führen, wurden bislang nur wenig untersucht. Ein

entscheidender Faktor für die Regeneration scheint BMP-2 zu sein. Reguliert man BMP-2 experimentell herunter, so ist die Knochenheilung schon zu frühen Zeitpunkten blockiert [20]. Vergleicht man die BMP-2-Expression ausheilender Frakturen mit Pseudarthrosen, so ist BMP-2 signifikant herunterreguliert, wohingegen die Expression der BMP-Inhibitoren Chordin und Noggin nicht verändert ist [21]. In einer experimentellen Studie mit Ratten, bei denen atrophische Pseudarthrosen simuliert wurden, sind hingegen BMP-2 und dessen Antagonisten herunterreguliert [22]. Es ist damit unklar, ob die Fehlregulation von BMP-2 oder dessen Antagonisten zur ausbleibenden Knochenregeneration führt. Zudem ist die Detektion von BMP immer vom Zeitpunkt der Analyse sowie Art der Knochenfraktur abhängig [23]. Nicht nur die Differenzierung von OBs und Knochenaufbau scheinen während ausbleibender Frakturheilung fehlreguliert zu sein, sondern auch die Differenzierung von OCs. Bioinformatische Analysen zeigten, dass OC regulierende Gene im Vergleich zu normal ausheilendem Knochen in Pseudarthrosen differenziell reguliert sind [24]. Interessanterweise zeigen Patienten mit atrophischer Pseudarthrose eine erhöhte Menge OPG im Serum auf, allerdings ist bisher unklar, ob der erhöhte RANKL-Inhibitor auch zu einer verminderten OC-Differenzierung führt [25].

Die Untersuchung humaner atrophischer Pseudarthrosen des Scaphoids im Vergleich zum angrenzenden gesunden Knochen des Radius sollte Aufschluss über Osteogenese und Osteoclastogenese sowie Vaskularisierung im späten Stadium ausbleibender Knochenheilung geben, so dass auf Fehlregulationen während der frühen Phase der fehlenden Knochenheilung geschlossen werden kann. Durch direkten Vergleich von Skaphoidpseudarthrose und autologem gesunden Knochen konnten interindividuelle Unterschiede ausgeschlossen werden.

## **5.2 Ergebnisse**

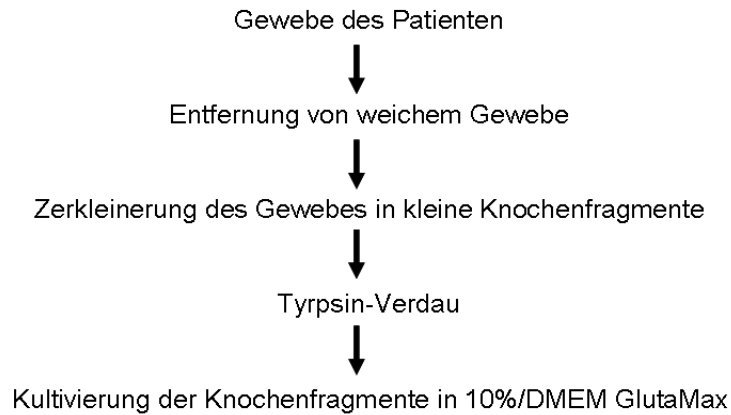
### **5.2.1 Patientenkollektiv**

Es wurden 72 (Ludwigshafen) bzw. 12 (Bochum) Patienten mit Skaphoidpseudarthrose, die sich einer Rekonstruktion mit Radiuspongiosa und Mini-Herbertschraube unterzogen haben, rekrutiert. Als Definition diente eine Zeit nach Unfall von mindestens drei Monaten. Im weiteren Verlauf wurde das Kollektiv ferner unterteilt in Patienten, die innerhalb der ersten 12 Monate nach Unfall oder 12 Monate nach Unfall rekonstruiert wurden.

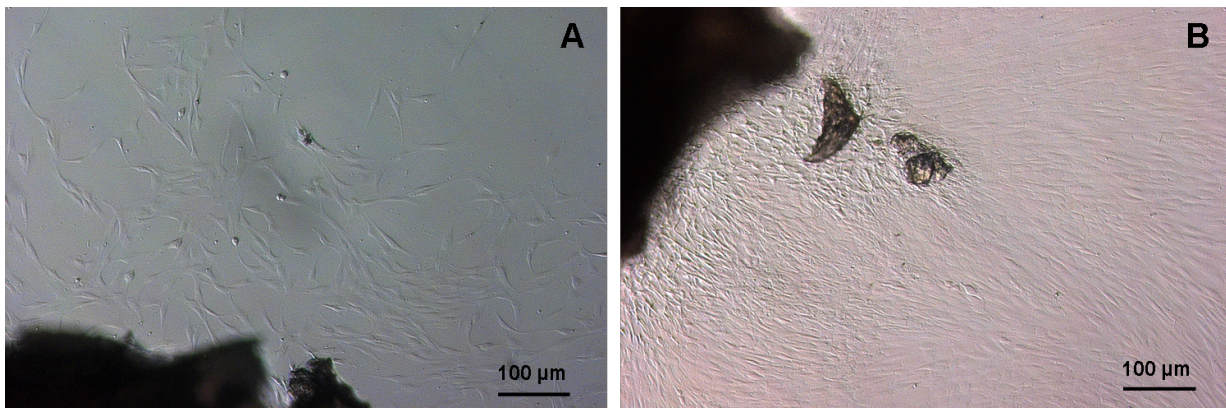
### **5.2.2 Gewinnung und Kultivierung von Zellen aus Pseudarthrosen und Radiuspongiosa**

Zur Charakterisierung von in Pseudarthrosen lokalisierten Zellen wurden die Wachstums- und Differenzierungseigenschaften aus Pseudarthrosen und Radiuspongiosa isolierter Zellen untersucht. Die Zellen wurden nach einem publizierten Protokoll [26] aus frischem Gewebe gewonnen, indem kleine Knochenfragmente nach Trypsin-Verdau kultiviert wurden (Abb. 2), aus denen nach einer Kultivierungszeit von 2-3 Tagen Zellen migrierten und dichte Zellrasen bildeten (Abb. 3).

## Work flow

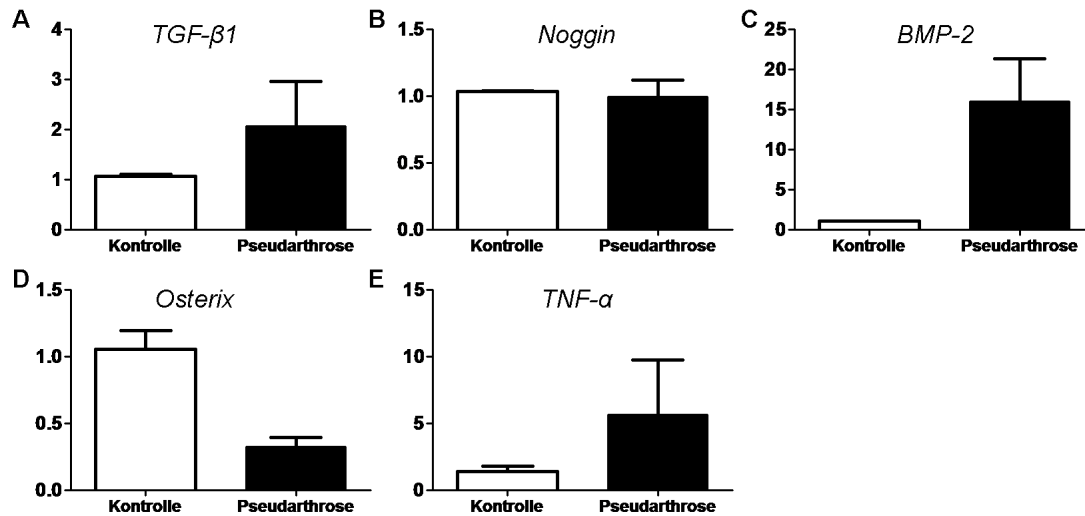


**Abbildung 2: Workflow für die Gewinnung von Zellen aus Patientengeweben.**



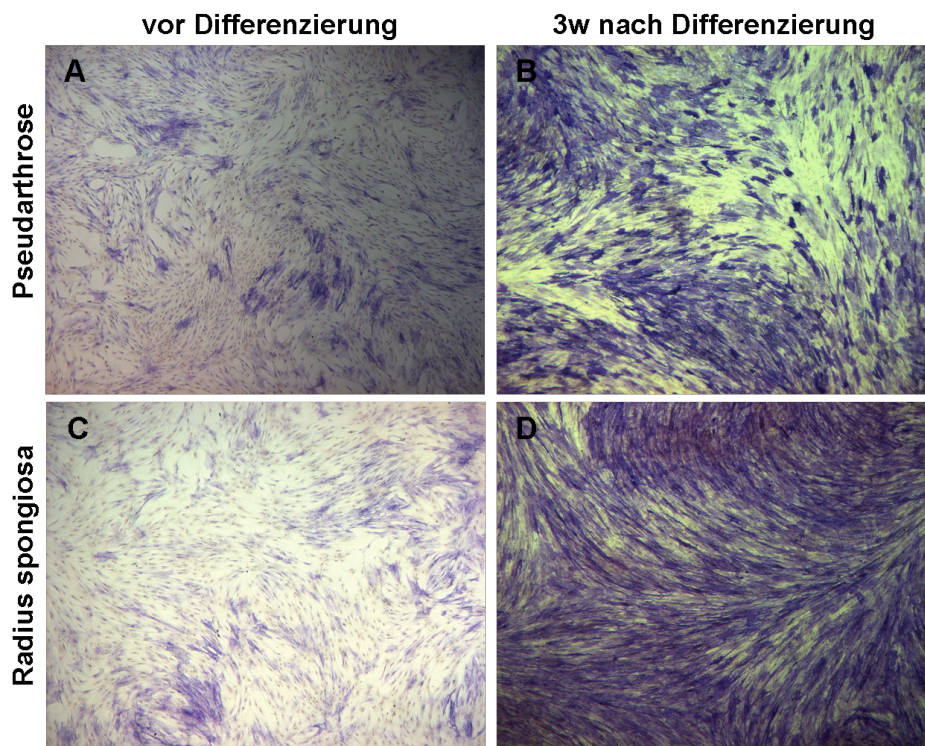
**Abbildung 3: Kultivierung von Knochenfragmenten von Radius spongiosa (A) und Pseudarthrose (B).** Bei beiden Kulturen migrierten adhärenente Zellen aus dem Knochenfragment und bildeten dichte Zellrasen. Die Zellpopulationen unterschieden sich morphologisch nicht voneinander (14 Tage in Zellkultur).

Analysen mittels quantitativer RT-PCR von dicht gewachsenen Kulturen beider Gewebe in Passage 1 wiesen Unterschiede in der Expression von TGF- $\beta$ 1, BMP-2, Osterix und TNF- $\alpha$  auf (Abb. 4). Der für Knochenregeneration entscheidende Faktor BMP-2 scheint in Pseudarthrosen-Kulturen induziert zu sein, wohingegen die Expression von Noggin, bekannt als Antagonist von BMP-2, keine Unterschiede aufwies. Allerdings ist der Transkriptionsfaktor Osterix, der entscheidend für die Differenzierung von OBs ist, in Pseudarthrosenkulturen herunter reguliert, was zum einen auf eine gestörte osteogene Differenzierung hindeuten, zum anderen aber auf unterschiedliche Zellpopulationen zurückzuführen sein könnte. Interessanterweise sind die immunregulatorischen Gene TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$  in Pseudarthrosenkulturen induziert. Da die Kulturen keine Immunzellen beinhalteten, könnte die erhöhte Expression auf eine Fehlregulation dieser Gene zurückzuführen sein.



**Abbildung 4: quantitative RT-PCR kultivierter Zellen von Radius spongiosa (Kontrolle) und Pseudarthrose.**

Um Differenzierungseigenschaften zu untersuchen, wurden Zellen beider Gewebe für 21d in Differenzierungsmedium (10 mM Glycerophosphat, 0,25 µM Ascorbinsäure, α-MEM, 10% FCS) inkubiert und anschließend gegen Alkaline Phosphatase (ALP, Osteoblasten-Differenzierungsmarker) gefärbt. Im Vergleich zu undifferenzierten Zellen ist nach Inkubation mit Differenzierungsmedium sowohl bei Zellen von Skaphoidpseudarthrosen als auch bei Zellen des Radius die ALP-Expression deutlich erhöht (Abb. 5), so dass davon auszugehen ist, dass die Kulturen zumindest teilweise osteogene Vorläuferzellen enthielten. Erkennbar ist auch, dass nicht alle Zellen ALP-positiv sind, wobei es sich hierbei um Fibroblasten (Morphologie, adhärentes Wachstum) handeln könnte.



**Abbildung 5: Färbung Alkaliner Phosphatase (ALP) vor und nach osteogener Differenzierung.** Dichte Zellrasen von Pseudarthrosen (A, B) und Radius (C, D) vor und nach Induktion der Differenzierung, die gegen ALP gefärbt wurden. Radius-Kulturen scheinen mehr ALP zu exprimieren, was für ein besseres Differenzierungspotential der Kulturen spricht.

Eine Quantifizierung ALP-positiver Zellen zeigte, dass in Skaphoidpseudarthrosenkulturen sowohl vor, als auch nach osteogener Differenzierung weniger Zellen ausdifferenzieren, was zum einen auf einen größeren Anteil fibroblastoider Zellen und zum anderen auf ein geringeres Differenzierungspotential von Pseudarthrosenzellen zurückzuführen sein könnte.

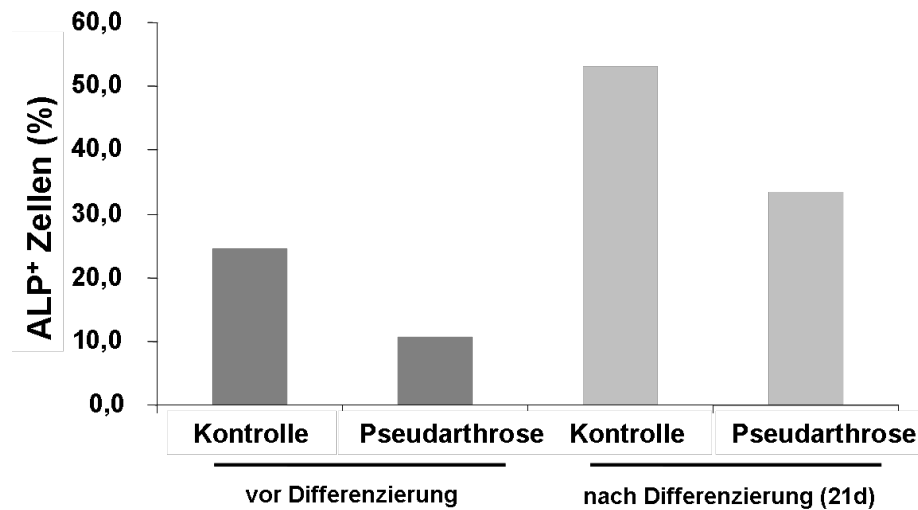
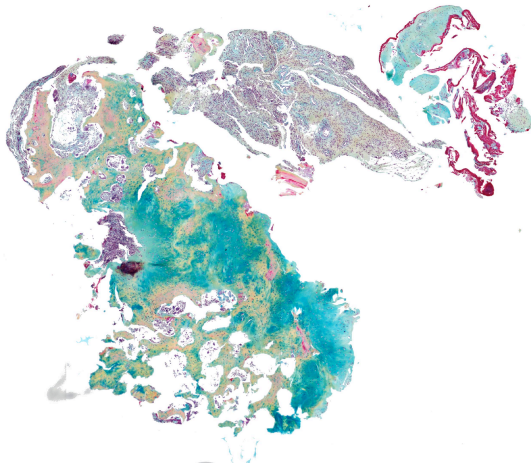


Abbildung 6: Quantifizierung ALP-positiver Zellen vor und nach osteogener Differenzierung.

### 5.2.3 Histomorphometrische Analysen

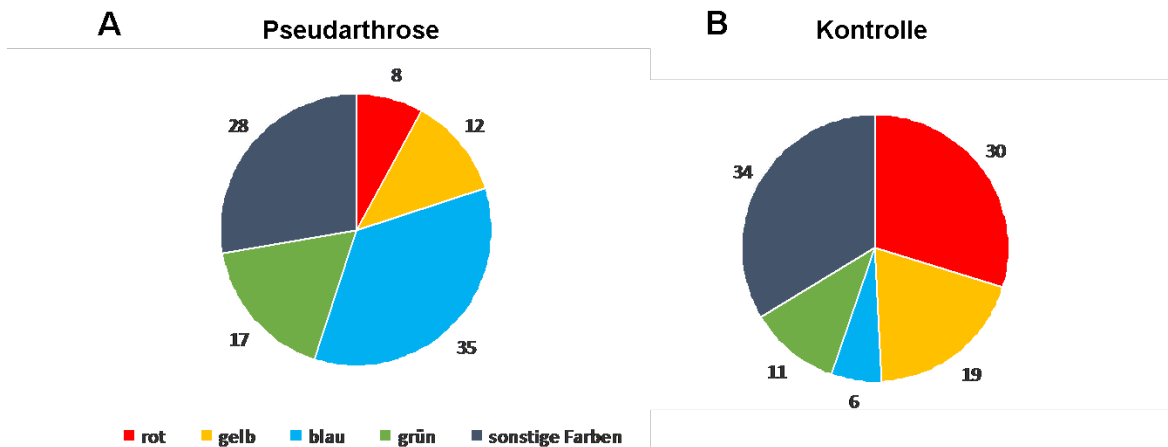
Für eine genauere Charakterisierung von Skaphoidpseudarthrosen wurden Gewebeschnitte angefertigt und diese histomorphometrisch nach Pentachromfärbung im Vergleich zu Radius spongiosa untersucht. Deutlich wurde der hohe Bindegewebsanteil und geringe Knochenanteil in Pseudarthrosen (Abb. 7A) im Vergleich zum Kontrollgewebe (Abb. 7B), bei dem der Geflechtknochen deutlich erkennbar ist.



**A****B**

**Abbildung 7: Vergleich von Gewebe der Skaphoidpseudarthrose und Radius spongiosa.** Nach Entnahme der Gewebe wurden diese Formalin-fixiert, entkalkt, dehydriert und Paraffin-eingebettet. Gewebeschnitte (9 µm) wurden mittels Pentachrom gefärbt. Deutlich erkennbar ist das großflächig verteilte Binde- sowie Knorpelgewebe (gelb/blau) einer repräsentativen Pseudarthrose (A). Radius spongiosa (B) ist hingegen durch Schwammknochen (rot) geprägt.

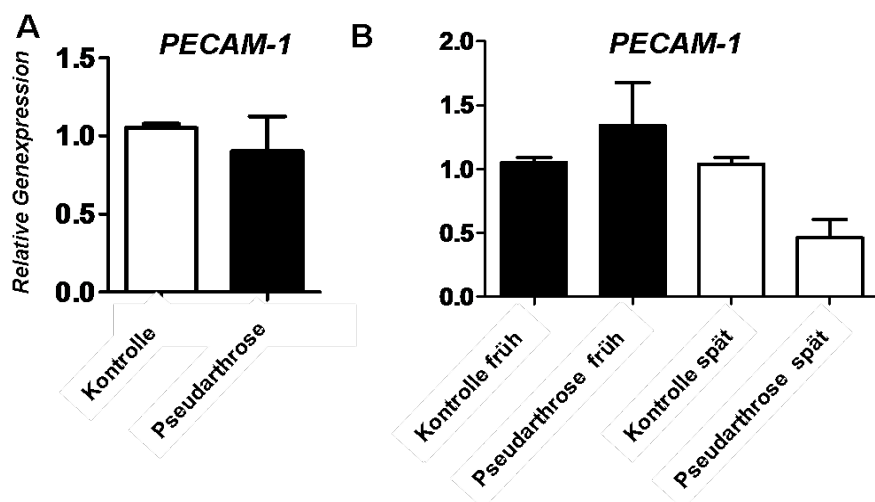
Eine Quantifizierung der verschiedenen Gewebeanteile in Pseudarthrosen und Radius spongiosa bestätigte den Eindruck eines hohen Bindegewebeanteils in Pseudarthrosen (Abb. 8).



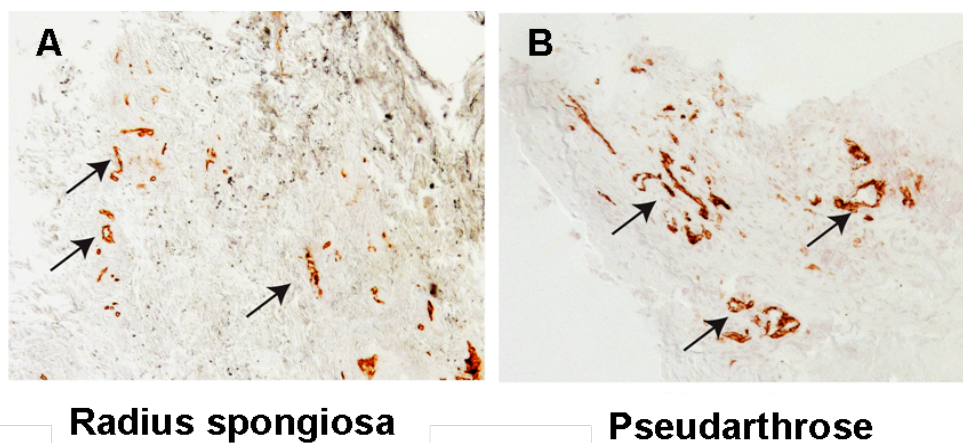
**Abbildung 8: Quantifizierung Pentachrom-gefärbter Gewebeanteile bei Pseudarthrosen (A) und Radius spongiosa (B).** In Pseudarthrosen-Geweben ist ein deutlich höherer Anteil Bindegewebe (blau/grün) vorhanden. In Kontrollgeweben hingegen ist der Knochenanteil (gelb/rot) deutlich höher als bei Pseudarthrosen.

## 5.2.4 Blutversorgung atrophier Pseudarthrosen

Zur Entstehung von Pseudarthrosen wird eine mangelnde Blutversorgung diskutiert, die zu einer Unterversorgung von Nährstoffen und einer geringeren Einwanderung von Osteoblasten-Vorläufern sowie schlechterem Abbau von Knochendebris führen könnte. Hinsichtlich der Gefäßversorgung konnten wir allerdings keine Unterschiede in der Expression von PECAM-1 (Gefäßmarker) feststellen (Abb. 9A). Auch Gewebefärbungen zur Untersuchung der Gefäßsituation wiesen keine Unterschiede zwischen den Gewebetypen auf (Abb. 10). Interessanterweise zeigte sich jedoch ein Trend zu einer geringeren PECAM-1 Expression in Scaphoidpseudarthrosen bei Patienten, die erst >12 Monate nach Fraktur operiert wurden.



**Abbildung 9: Untersuchung der PECAM-1 Genexpression.** Über alle mittels quantitativer RT-PCR untersuchten Gewebe konnte kein Unterschied in der PECAM-1-Expression festgestellt werden. Unterteilt man jedoch das Patientenkollektiv in operiert < 12 Monate nach Fraktur („früh“) und > 12 Monate nach Fraktur operiert („spät“) zeigte sich ein Trend, bei der die PECAM-1 Expression in „späten“ Patienten abnimmt.



**Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von PECAM-1.** Die Gefäßsituation scheint zu einem frühen Zeitpunkt nach Fraktur (10 Monate) in beiden Geweben ähnlich zu sein.

### 5.2.5 Quantitative RT-PCR-Analyse von Geweben.

Um mögliche Fehlregulationen für die Knochenregeneration wichtiger Faktoren zu detektieren, wurden detaillierte Genexpressionsanalysen von Pseudarthrosen und den zugehörigen Kontrollen durchgeführt. Es wurde nur RNA verwendet, die nach Aufarbeitung quantitativ und qualitativ für die Analysen ausreichend war. Es wurde die Genexpression von Osteogenese- sowie Osteoclastogenese-Markern und pro- bzw. anti-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren analysiert und über alle untersuchten Patienten bewertet. Zudem erfolgte eine Aufteilung der Patienten auf den Zeitraum `Unfallzeitpunkt-Operation` (< 12 Monate (früh), > 12 Monate (spät)), um zeitabhängige Veränderungen zu detektieren. Eine Übersicht der gemessenen Gene findet sich in Tabelle 1.

18S	ATF4	Axin2	BGLAP (OCN)	BMP2	BMP7	CCND1 (CyclinD1)	CSF1
DKK1	EMX2	FGF18	FGF2	FGF9	FOXC1	IFNG	IL1B
MMP9	MMP13	NFATc1	NFKB1	Noggin	OPG	Osterix	PECAM1
RUNX2	SSP1	TGFbeta	TNF	RANK	RANKL	Wnt3a	Wnt5a

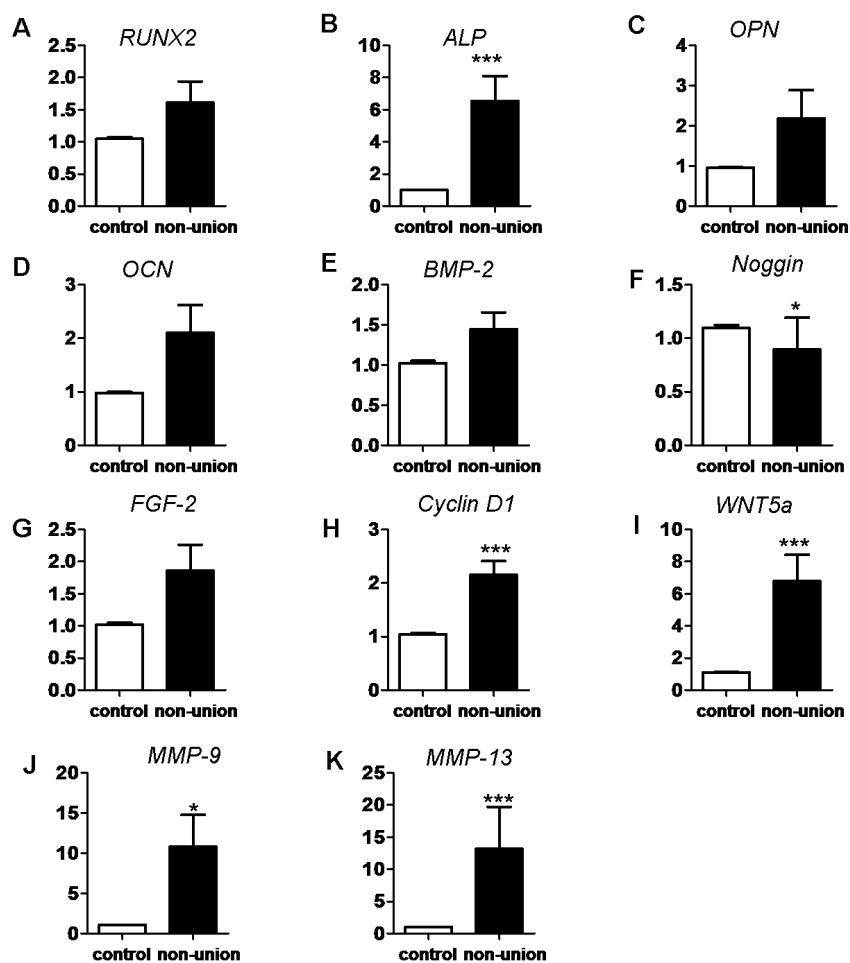
#### 5.2.5.1 Expression Osteogenese- und Knochenumbau-relevanter Gene

RUNX-2, bekannt als wichtiger Osteogenese und Chondrogenese regulierender Transkriptionsfaktor, war über alle Patienten in Pseudarthrosen leicht, allerdings nicht signifikant, induziert (Abb. 10A). Auch nach Aufteilung in früh und spät operierte Patienten schien RUNX-2 zu beiden Zeiträumen (Abb. 11A) leicht hoch reguliert zu sein. Hingegen war der Osteogenese-regulierende Transkriptionsfaktor Osterix als bekanntes Downstream Target von RUNX-2 in beiden Geweben kaum detektierbar (nicht gezeigt). Der osteogene Differenzierungsmarker Alkaline Phosphatase (ALP) wurde in Pseudarthrosen stark induziert gefunden (Abb. 11B, Abb. 12B), was prinzipiell auf die Differenzierungsfähigkeit von in Pseudarthrosen befindlichen Osteoblasten hindeutet. Auch die späteren osteogenen Differenzierungsmarker OPN (Abb. 11C, Abb. 12C) und OCN (Abb. 11D, Abb. 12D) waren in Pseudarthrosen leicht hoch reguliert. Das für die frühe Phase der Knochenregeneration wichtige pleiotrophe Morphogen BMP-2 war leicht, aber nicht signifikant induziert und spiegelt damit die Expression von BMP-2 in vitro wider (Abb. 11E, Abb. 12E). Der BMP-2 Antagonist Noggin war hingegen in Pseudarthrosen herunter reguliert (Abb. 11F), so dass eine gesteigerte Knochenregeneration zu erwarten wäre. Interessanterweise ist Noggin bei Patienten, die erst >12 Monate nach Fraktur operiert wurden (Abb. 12F), signifikant induziert, so dass ein Ungleichgewicht zwischen BMP und Noggin eine Rolle bei der Entwicklung von Skaphoidpseudarthrosen spielen könnte. Der Wachstumsfaktor FGF-2, beschrieben als positiver Regulator der Proliferation von osteogenen Progenitoren [27], ist in Pseudarthrosen leicht, aber nicht signifikant, induziert (Abb. 11G, Abb. 12G). Die Hochregulation von BMP-2, FGF-2 und ALP sowie der späteren osteogenen Differenzierungsmarkern OPN und OCN spricht für ein gewisses Regenerationspotential des frakturierten Skaphoids, das aber zu einem gewissen Zeitpunkt inhibiert zu sein scheint, so dass der Knochen nicht ausheilt.

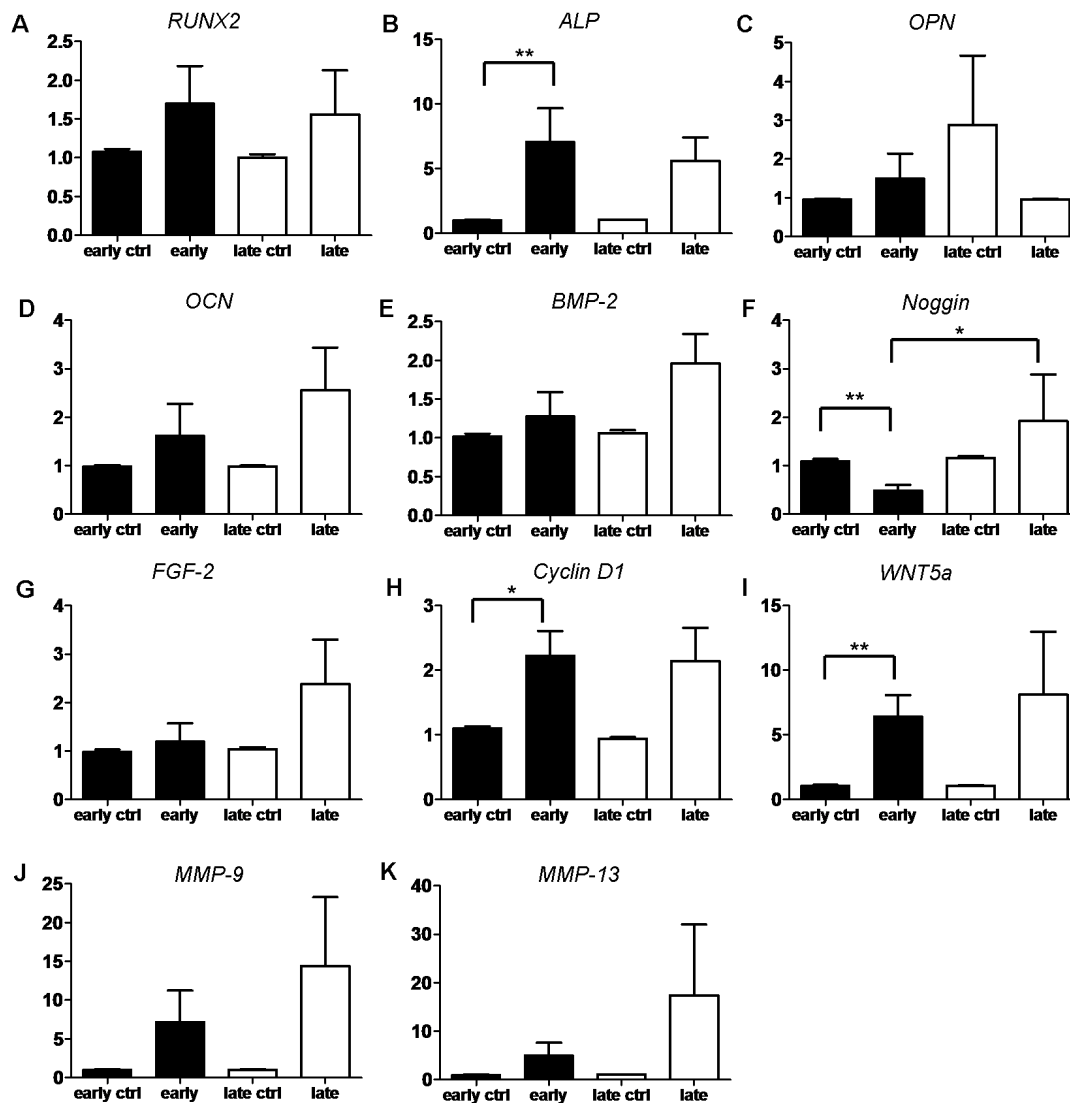
Der kanonische Wnt-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Knochenentwicklung und koordiniert sowohl beim kontinuierlichen Knochenumbau als auch bei der Knochenregeneration die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen sowie Reifung von Osteoblasten. Interessanterweise war Wnt3a in beiden Geweben nicht detektierbar, so dass Wnt3a in einer etablierten Pseudarthrose nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Es ist aber nicht auszuschließen, dass Wnt3a in der frühen

Entstehungsphase einer Pseudarthrose entscheidend sein könnte. Der Wnt-Antagonist DKK1 [28, 29] war ebenfalls kaum detektierbar (nicht gezeigt), so dass eine Inhibition der Knochenregeneration durch DKK1 auszuschließen ist. Zu den Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs zählt CyclinD1, welches auch in Pseudarthrosen stark exprimiert wird (Abb. 11H, Abb. 12H). Da Wnt5a, welches nicht-kanonische Signalwege (Wnt/Ca<sup>2+</sup>-abhängiger oder Wnt/JNK-Signalweg) reguliert, auch mit dem kanonischen Signalweg interagieren kann, könnte die erhöhte Wnt5a-Expression in Pseudarthrosen (Abb. 11I, Abb. 12I) zur Induktion von CyclinD1 führen. Möglicherweise kann die erhöhte CyclinD1-Expression auch auf eine erhöhte Seneszenzrate im Gewebe hindeuten [30].

Auch die für Vaskularisierung, Abbau von Knorpel [31] und Degradation von extrazellulärer Matrix relevanten Matrix-Metalloproteinasen MMP-9 und MMP-13 sind in Pseudarthrosen im Vergleich zu Radius spongiosa vor allem zu späten Zeitpunkten stark induziert (Abb. 11J / K, Abb. 12 J / K). Die erhöhte MMP Expressionsrate könnte zum einen auf einen potentiellen Gewebeumbau hindeuten, zum anderen aber auch Hinweise auf ein Ungleichgewicht zugunsten von Knochenresorption geben.



**Abbildung 11: Expression Osteogenese- und Knochenumbau-relevanter Gene in Skaphoidpseudarthrosen.** Gezeigt ist die relative Genexpression normalisiert auf die Expression des Housekeeping-Gens 18S.

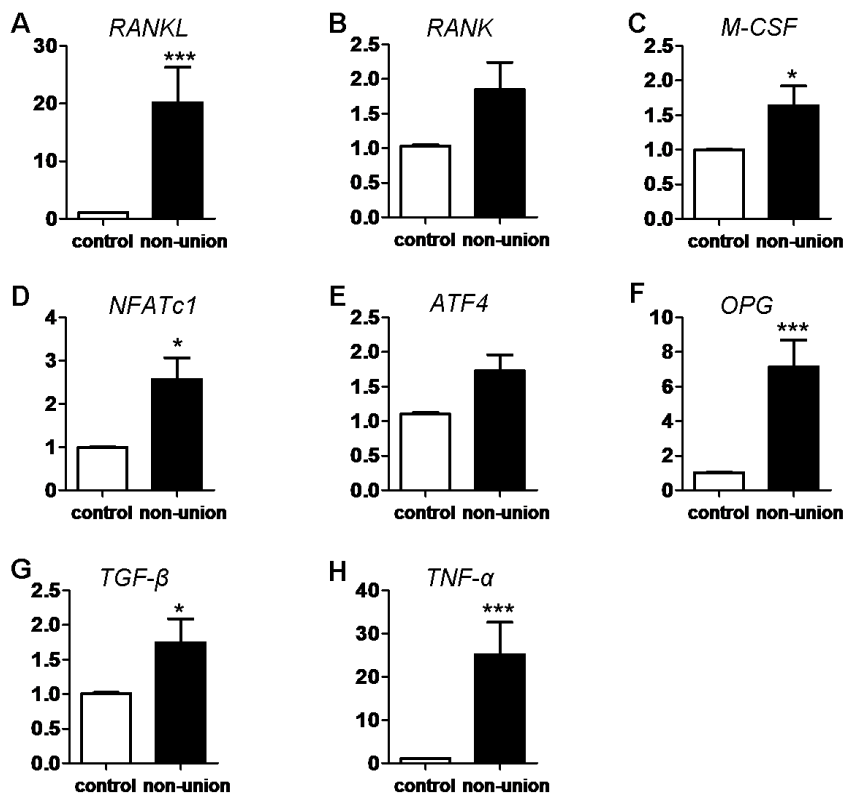


**Abbildung 12: Expression Osteogenese- und Knochenumbau-relevanter Gene in Skaphoidpseudarthrosen (früh / spät).** Unterteilung des Patientenkollektivs in < 12 Monate nach Fraktur („früh“) und > 12 Monate nach Fraktur („spät“).

### 5.2.5.2 Expression Osteoclastogenese-relevanter und immunregulatorischer Gene

Osteoclastogenese wird hauptsächlich durch RANKL reguliert, welches die Differenzierung von Osteoclasten-Vorläuferzellen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor-activated T-cells c1 (NFATc1) steuert. Quantitative RT-PCRs zeigten, dass in Pseudarthrosen für die Osteoclastogenese wichtige Gene induziert waren. RANKL (Abb. 13A, Abb. 14A) und dessen Rezeptor RANK (Abb. 13B, Abb. 14B) wurden in Pseudarthrosen stark hochreguliert gefunden, wobei RANKL

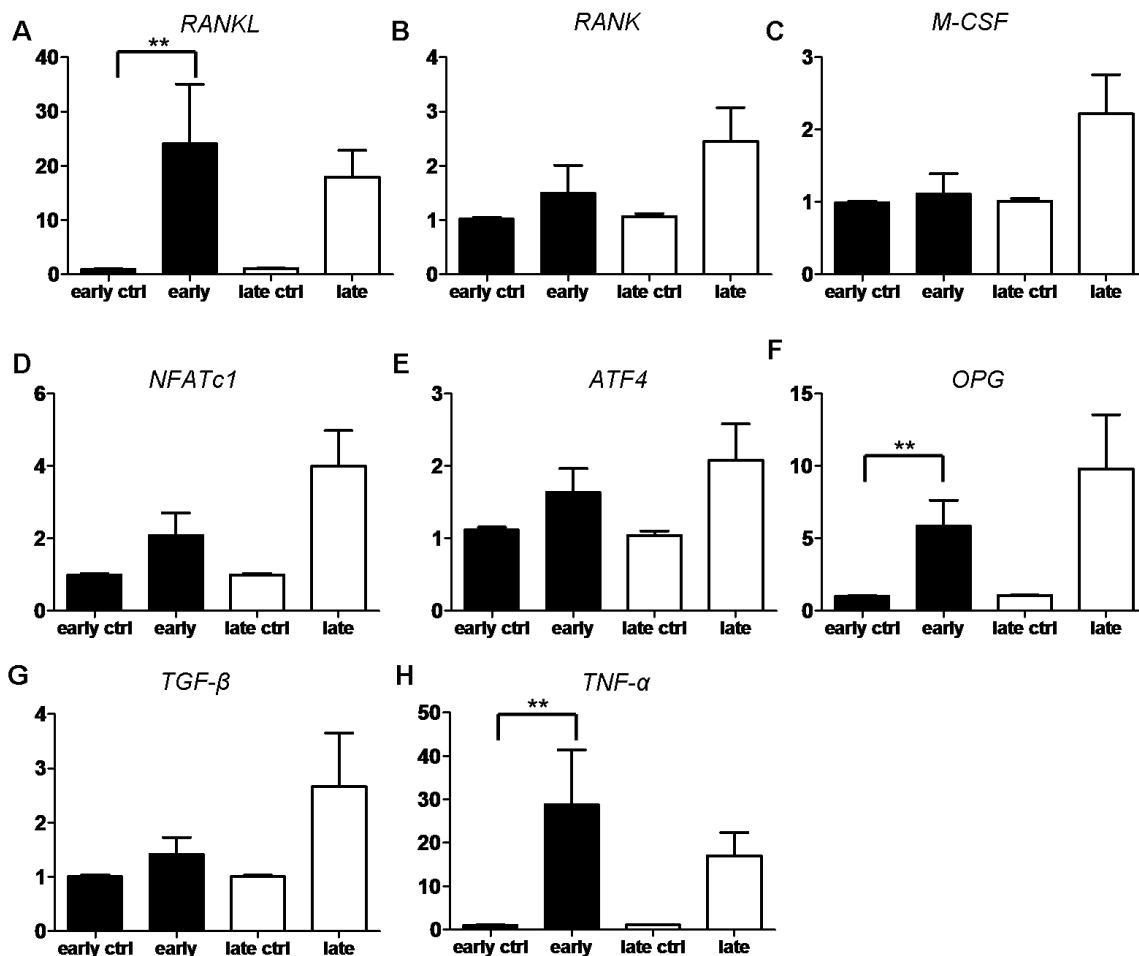
zwanzigfach induziert war im Vergleich zur Kontrolle. Auch M-CSF (Abb. 13C, Abb. 14C), welches die Proliferation von Osteoclasten-Vorläufern fördert, war in Pseudarthrosen erhöht detektierbar. Ebenfalls lag das RANKL nachgelagerte Zielgen NFAT1c in Pseudarthrosen deutlich erhöht vor (Abb. 13D, Abb. 14D). Besonders auffällig sind die erhöhte Expression von RANKL, M-CSF und NFAT1c auch zu späteren Zeitpunkten nach Fraktur, was für eine fortwährend erhöhte Osteoclastogenese-Aktivität spricht. Des Weiteren wird die RANKL-Aktivierung durch ATF4 gesteuert, welches zudem kritisch für die Induktion von RANK über M-CSF ist [32]. ATF4 ist in Pseudarthrosen ebenfalls leicht erhöht detektierbar (Abb. 13E, Abb. 14E), was für eine verstärkte Osteoclastogenese spricht. Interessanterweise ist auch der RANKL Antagonist OPG, der schon in Serum von Patienten mit atrophischen Pseudarthrosen als erhöht nachgewiesen wurde [25], in Pseudarthrosengewebe signifikant um das siebenfache hochreguliert (Abb. 13F, Abb. 14F). Warum OPG die Osteoclastogenese-Aktivität nicht oder nur bedingt hemmt und ob eine Fehlregulation von OPG zur Pseudarthrose führen kann, ist bislang unbekannt.



**Abbildung 13: Expression Osteoclastogenese-relevanter und immunregulatorischer Gene in Skaphoidpseudarthrosen.**

Des Weiteren wurde die Expression Osteoclastogenese co-aktivierender pro-inflammatorischer Zytokine und Faktoren analysiert. TGF-β beispielweise steigert das Differenzierungspotential von OC-Vorläufern [17] und konnte wie auch in vitro in Pseudarthrosen als erhöht detektiert werden (Abb. 13G, Abb. 14G). Auch TNF-α war in Pseudarthrosen mit in vitro Kulturen vergleichbar signifikant um das ca. 25-fache hochreguliert (Abb. 13H, Abb. 14H), wodurch es zu einer gesteigerten Osteoclastogenese

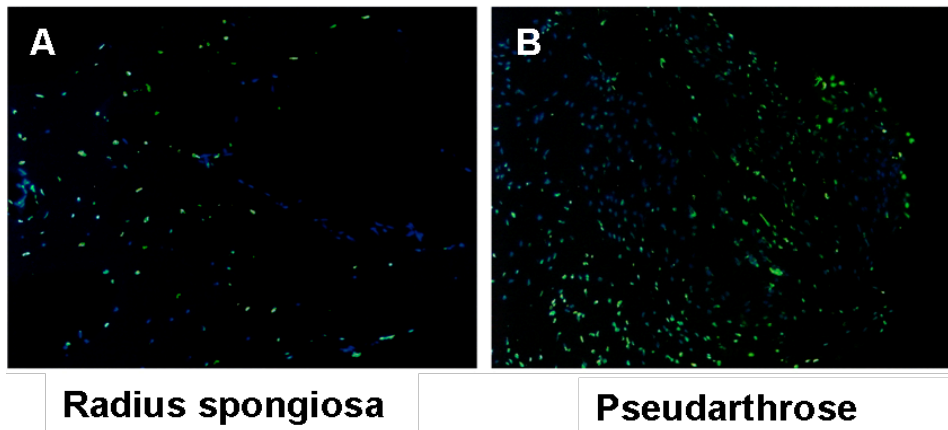
kommen kann. Im Gegensatz dazu konnten weder das TNF- $\alpha$  Zielgen NF $\kappa$ B noch die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 and IFN- $\gamma$  in beiden Geweben detektiert werden. Die Expression co-aktivierender pro-inflammatorischer Faktoren war nicht nur zu frühen Zeitpunkten nach Fraktur stark induziert, sondern auch zu späten Zeitpunkten, was auf eine fortwährende inflammatorische Reaktion und gesteigerte OC-Aktivität hindeuten könnte.



**Abbildung 14: Expression Osteoclastogenese-relevanter und immunregulatorischer Gene in Skaphoidpseudarthrosen (früh / spät).** Unterteilung des Patientenkollektivs in < 12 Monate nach Fraktur („früh“) und > 12 Monate nach Fraktur („spät“).

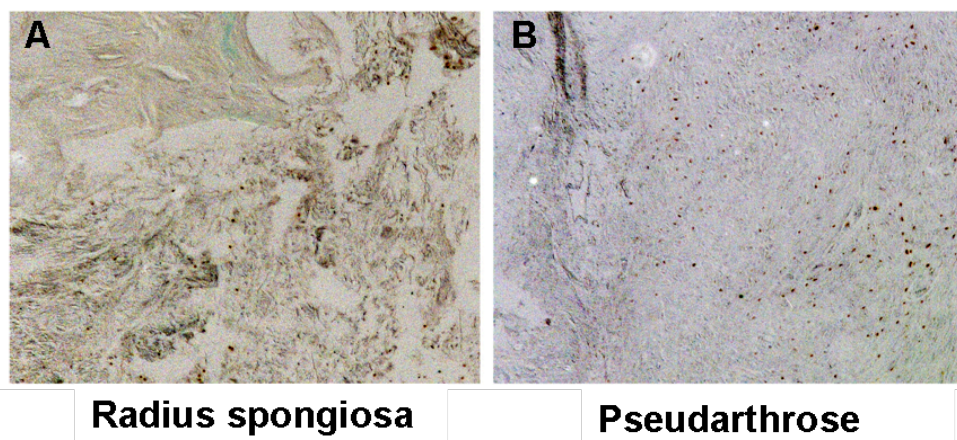
### 5.2.6 Untersuchung von Apoptose, Proliferation und Osteoclasten im Gewebe

Zur Analyse von Apoptose, Proliferation und Osteoclastogenese im Gewebe weiter zu untersuchen, wurden immunhistochemische und histologische Färbungen von Skaphoidpseudarthrosen- und Kontrollgeweben durchgeführt. TNF- $\alpha$  kann über die Aktivierung von FADD und Caspase-8 Apoptose induzieren. Die erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  in Skaphoidpseudarthrosen scheint im Zusammenhang mit einer erhöhten Apoptoserate zu stehen, denn es wurden deutlich mehr TUNEL-positive Zellen detektiert als im Kontrollgewebe (Abb. 15).



**Abbildung 15: TUNEL-Färbung zur Analyse apoptotischer Zellen in Radius spongiosa und Pseudarthrose.** (A) Im Kontrollgewebe sind nur wenige apoptotische Zellen (grüne Fluoreszenz) detektierbar. (B) In Pseudarthrosen ist die Apoptoserate hingegen deutlich erhöht. Die Gesamtzellzahl (DAPI-gefärbt) ist ebenfalls deutlich erhöht, allerdings bleibt die relative Apoptoserate im Vergleich zum Kontrollgewebe erhöht.

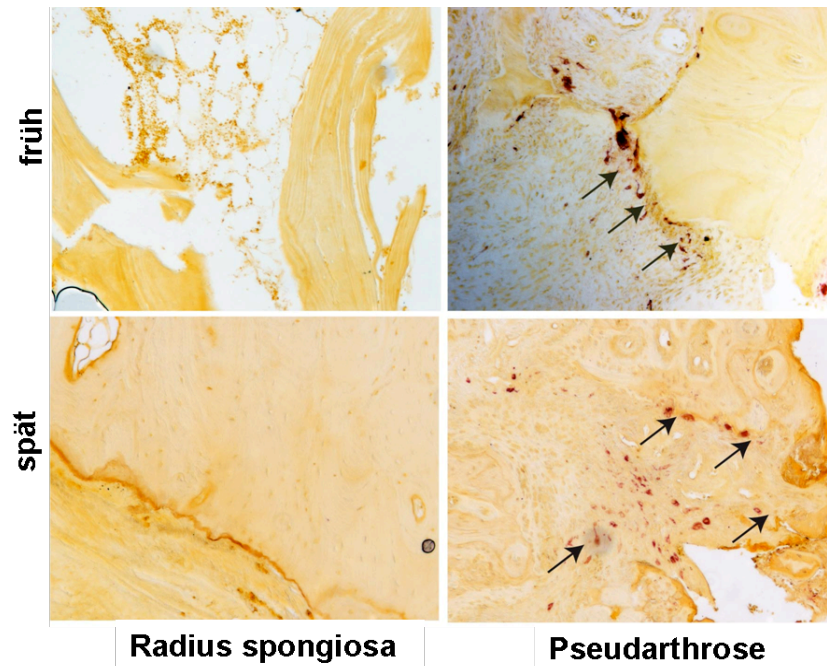
Durch immunhistochemische Färbungen von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wurde eine Vielzahl proliferierender Zellen in Skaphoidpseudarthrosen detektiert (Abb. 16). Diese Beobachtung könnte auch die erhöhte Genexpression von CyclinD1 im Vergleich zum Kontrollgewebe erklären, welches ein wichtiger Regulator für den Eintritt in den Zellzyklus und dessen erhöhte Expression in der G2-Phase des Zellzyklus die Proliferation aufrecht erhält [33].



**Abbildung 16: Immunhistochemische Färbung von PCNA zur Untersuchung von Proliferation in Radius spongiosa und Pseudarthrose.** Pseudarthrosen weisen eine deutlich erhöhte Proliferationsrate in Bereichen von Bindegewebe auf (B) im Vergleich zum Kontrollgewebe (A), was für die Proliferation von Fibroblasten spricht.



Durch histologische Färbungen des Osteoclasten-Markers TRAP (Tartrate-resistent acid phosphatase) konnten die Ergebnisse aus den quantitativen RT-PCR-Analysen bestätigt werden. Die deutlich induzierte Expression von RANKL, M-CSF und TNF- $\alpha$  führt in Skaphoidpseudarthrosen zu einer erhöhten Anzahl Osteoclasten, die sich über das gesamte Gewebe erstrecken (Abb. 17). Hingegen werden im gesunden Radius kaum Osteoclasten detektiert. Auch zu späteren Zeitpunkten nach Fraktur ist die Osteoclasten-Aktivität deutlich erhöht.



**Abbildung 17: Analyse von Osteoclasten durch TRAP-Färbungen.** Gezeigt sind Gewebeschnitte eines repräsentativen Patienten < 12 Monate nach Fraktur (früh) und eines Patienten > 12 Monate nach Fraktur (spät) im Vergleich zu Radius spongiosa. Die Anzahl Osteoclasten ist sowohl zum frühen als auch späten Zeitpunkt in Pseudarthrosen stark erhöht.

### 5.3 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden zum Teil bei der Gordon Research Conference „Bone & Teeth“ 2014 in Galveston (USA) im Rahmen einer Posterpräsentation gezeigt (Schira et al. „Human scaphoid non-unions show a differential expression pattern of intermediate osteogenic genes in comparison to intact bone from the distal radius.“). Ferner erfolgte ein Vortrag im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Plastische Chirurgie in München mit dem Titel: „Verminderte Genexpression von intermediären osteogenen Knochenwachstumsfaktoren in humanen Skaphoidpseudarthrosen im Vergleich zu Radiuspongiosa des Handgelenks“

Die Ergebnisse sollen in einem per-reviewed Journal veröffentlicht werden. Geplante Veröffentlichung in diesem Jahr mit dem Titel „**Human scaphoid non-unions exhibit increased inflammation and osteoclast activity as compared to adjacent cancellous bone.**“

## 5.4 Literatur

- [1] Hove LM. Epidemiology of scaphoid fractures in Bergen, Norway. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1999;33: 423-6.
- [2] Barton NJ. Twenty questions about scaphoid fractures. *J Hand Surg Br* 1992;17: 289-310.
- [3] Dias JJ, Brenkel IJ, Finlay DB. Patterns of union in fractures of the waist of the scaphoid. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71: 307-10.
- [4] Duppe H, Johnell O, Lundborg G, Karlsson M, Redlund-Johnell I. Long-term results of fracture of the scaphoid. A follow-up study of more than thirty years. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76: 249-52.
- [5] Herbert TJ, Fisher WE. Management of the fractured scaphoid using a new bone screw. *J Bone Joint Surg Br* 1984;66: 114-23.
- [6] Szabo RM, Manske D. Displaced fractures of the scaphoid. *Clin Orthop Relat Res* 1988: 30-8.
- [7] Yarinina A, Xu K, Chen J, Ivashkiv LB. TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108: 1573-8.
- [8] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145: 527-38.
- [9] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, 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. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89: 309-19.
- [10] Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 1990;127: 2592-4.
- [11] Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999;190: 1741-54.
- [12] Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Boyce BF, Xing L. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2004;19: 207-13.
- [13] Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J* 1991;10: 4025-31.
- [14] Li P, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Ma L, Looney RJ, Ritchlin CT, Boyce BF, Xing L. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2004;50: 265-76.
- [15] Yao Z, Xing L, Qin C, Schwarz EM, Boyce BF. Osteoclast precursor interaction with bone matrix induces osteoclast formation directly by an interleukin-1-mediated autocrine mechanism. *J Biol Chem* 2008;283: 9917-24.
- [16] Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 1990;110: 2195-207.
- [17] Fuller K, Lean JM, Bayley KE, Wani MR, Chambers TJ. A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival. *J Cell Sci* 2000;113 ( Pt 13): 2445-53.
- [18] Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J*

Bone Miner Res 2001;16: 1004-14.

- [19] Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 2003;18: 1584-92.
- [20] Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, Einhorn T, Tabin CJ, Rosen V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006;38: 1424-9.
- [21] Kwong FN, Hoyland JA, Freemont AJ, Evans CH. Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J Orthop Res* 2009;27: 752-7.
- [22] Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *J Orthop Res* 2006;24: 1463-71.
- [23] Kloen P, Doty SB, Gordon E, Rubel IF, Goumans MJ, Helfet DL. Expression and activation of the BMP-signaling components in human fracture nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A: 1909-18.
- [24] Xu J, Zhang C, Song W. Screening of differentially expressed genes associated with non-union skeletal fractures and analysis with a DNA microarray. *Exp Ther Med* 2014;7: 609-614.
- [25] Marchelli D, Piodi LP, Corradini C, Parravicini L, Verdoia C, Olivieri FM. Increased serum OPG in atrophic nonunion shaft fractures. *J Orthop Traumatol* 2009;10: 55-8.
- [26] Qu G, von Schroeder HP. The osteogenic potential of pseudoarthrosis tissue and bone from human scaphoid non-unions. *J Hand Surg Eur Vol* 2008;33: 449-56.
- [27] Quarto N, Longaker MT. FGF-2 inhibits osteogenesis in mouse adipose tissue-derived stromal cells and sustains their proliferative and osteogenic potential state. *Tissue Eng* 2006;12: 1405-18.
- [28] Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, Alman BA. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* 2007;4: e249.
- [29] Kim JB, Leucht P, Lam K, Luppen C, Ten Berge D, Nusse R, Helms JA. Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *J Bone Miner Res* 2007;22: 1913-23.
- [30] Burton DG, Sheerin AN, Ostler EL, Smith K, Giles PJ, Lowe J, Rhys-Williams W, Kipling DG, Faragher RG. Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1119: 20-31.
- [31] Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S, Graves DT, Rueger JM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 2005;36: 300-10.
- [32] Cao H, Yu S, Yao Z, Galson DL, Jiang Y, Zhang X, Fan J, Lu B, Guan Y, Luo M, Lai Y, Zhu Y, Kurihara N, Patrene K, Roodman GD, Xiao G. Activating transcription factor 4 regulates osteoclast differentiation in mice. *J Clin Invest* 2010;120: 2755-66.
- [33] Hitomi M, Stacey DW. Cyclin D1 production in cycling cells depends on ras in a cell-cycle-specific manner. *Curr Biol* 1999;9: 1075-84.

6. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Ergebnisse, Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen. Ggf. Beschreibung der Konsequenzen für das Vorhaben.

entfällt

7. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen. Beschreibung der Relevanz der Ergebnisse für die gesetzliche Unfallversicherung insbesondere im Hinblick auf die Praxisverknüpfung.

Die vorliegenden Ergebnisse spiegeln ein genaues Bild der etablierten Scaphoidpseudarthrose wider. Entgegen unserer Hypothese und der gängigen Lehrmeinung ist bei atrophen Pseudarthrosen eine verminderte Gefäßneubildung nicht ausschlaggebend für eine verringerte Knochenregeneration. Vielmehr deutet die Hochregulation von TNF- $\alpha$  sowie RANKL und eine damit im Zusammenhang stehende erhöhte Anzahl Osteoclasten, also knochenabbauenden Zellen, auf eine Entzündungssituation hin. Diese Erkenntnisse erlauben diverse wichtige Schlussfolgerungen. Zum einen zeigen Scaphoidpseudarthrosen durchaus noch ein zumindest hypothetisches Regenerationspotential, was sich durch eine mit dem Kontrollgewebe vergleichbare Runx-2 (Knochenvorläuferzellen) Genexpression sowie erhöhter Expression diverser osteogener Differenzierungsmarker und einer guten Gefäßsituation zeigt. Zum anderen scheint allerdings ein Ungleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau zu Gunsten des Abbaus zu existieren, was sich am Ende in einer fehlenden Heilung niederschlägt. Eine kausale Beziehung zwischen diesem Phänomen und des erhöhten Entzündungsparameters TNF- $\alpha$  kann zwar in diesem Kontext nicht hergestellt werden, doch ist dieser Zusammenhang nicht unwahrscheinlich, wie Studien an der rheumathoiden Knochendegeneration zeigen.

Mit Hilfe dieser DGUV Forschungsförderung konnte dieser außerordentlich wichtige Zusammenhang erarbeitet werden. Bei den vorliegenden Untersuchungen handelte es sich um Grundlagenforschung am menschlichen Material. Somit ist zunächst keine schnelle Praxisverknüpfung möglich. Die Ergebnisse stellen allerdings einen wichtigen Anknüpfungspunkt sowohl für die weitere Grundlagenforschung als auch für die Umsetzung einer Inhibition der Osteoclastenaktivität in einer klinischen Studie dar.

8. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan möglichst mit Angabe der absehbaren Zeithorizonte.

Die gewonnenen Ergebnisse stellen einen großen Erkenntnisgewinn in der Beurteilung der Scaphoidpseudarthrosen sowie der atrophen Pseudarthrosen im Allgemeinen dar. Somit sollen diese Ergebnisse durch eine Publikation einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden. Ein Entwurf des Manuskriptes ist in Vorbereitung und wir gehen von der Veröffentlichung noch in diesem Jahr aus. Durch diese Studie sind viele neue Fragen entstanden: Welche Mechanismen führen zur erhöhten Entzündungsreaktion (TNF- $\alpha$ ) sowie einem erhöhten Knochenabbau (Osteoclasten) in den atrophen Pseudarthrosen? Sind atrophe Pseudarthrosen durch geeignete nicht-chirurgische Massnahmen noch reversibel und damit ohne weitere Chirurgie therapierbar? Diese und weitere auf humanen Daten basierende Fragen sollen nach der Akquise von weiteren Fördermitteln in einem dynamischen Tiermodell erforscht werden um die Therapiemöglichkeiten von Skaphoidpseudarthrosen und atrophen Pseudarthrosen im Allgemeinen zu verbessern.

## 9. Kurzfassung

Skaphoide haben nach wie vor eine hohe Prävalenz für das Auftreten von Pseudarthrosen. Auch bei hinreichender Behandlung erfolgt die Knochenregeneration mitunter nicht. Auch wenn diese Beobachtungen bekannt sind, ist bisher nur wenig über die molekularen Zusammenhänge bekannt.

In diesem Projekt wurde die Genexpression von osteogenen, inflammatorischen und angiogenen Wachstums- und Transkriptionsfaktoren in humanen Skaphoidpseudarthrosen untersucht und mit spongiösen Knochen des distalen Radius vom gleichen Patienten verglichen. 84 Patienten konnten für die Studie rekrutiert werden. Außerdem wurden histologische und immunhistochemische Analysen sowie Zellkulturexperimente durchgeführt.

Unsere Genexpressionsdaten zeigen eine signifikante Hochregulation von *TNF- $\alpha$* , *RANKL*, *ALP*, *CYCLIN D1*, *MMP-13*, *OPG*, *NFATc1*, *TGF- $\beta$*  und *WNT5a* in Skaphoidpseudarthrosen, was Hinweise auf eine bestehende chronische Inflammation und gesteigerte Osteoclastogenese (Knochenabbau) liefert. Interessanterweise zeigte sich *TNF- $\alpha$*  in sämtlichen Skaphoidpseudarthrosen erhöht (Durchschnitt: 25 -fache Steigerung). Darüber hinaus zeigte *RANKL* eine 20-fache Erhöhung in Skaphoidpseudarthrosen. Allerdings waren akute Marker der Inflammation wie IL-1 $\beta$  oder IFN- $\gamma$  in den Geweben nicht detektierbar. In Bezug auf Gene der Osteogenese war die Alkalische Phosphatase (ALP) signifikant in Skaphoidpseudarthrosen hochreguliert. Keine Unterschiede konnten für weitere Osteogenese-Marker wie *RUNX-2* oder *BMP-2* gefunden werden. Zu unserer Überraschung konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der Angiogenese zwischen diesen beiden Geweben finden. Zusammengefasst zeigen unsere Daten eine Hochregulation diverser Gene in Skaphoidpseudarthrosen im Vergleich zu Radiusknochen. Besonders deutlich ist dies bei *TNF- $\alpha$*  und *RANKL* der Fall. Des Weiteren zeigen Skaphoidpseudarthrosen weiterhin ein Regenerationspotential. Diese Daten steigern unser Verständnis für die reduzierte Knochenregeneration in Skaphoidpseudarthrosen und können Gegenstand von neuen therapeutischen Ansätzen sein um Sekundärschäden und Prävalenz dieser Unfallfolge zu senken.

## 10. Summary

Scaphoid bones remain to have a high prevalence for non-union. Even with adequate treatment, bone regeneration may not occur in certain instances. Although this condition is well described, the molecular pathology of scaphoid non-unions is still poorly defined.

In this project, gene expression of osteogenic, inflammatory and angiogenic growth and transcription factors was analyzed in human scaphoid non-unions and compared to adjacent autologous cancellous bone from the distal radius. 84 patients were recruited for the study. In addition, histology, immunohistochemistry and in vitro experiments were performed.

Our gene expression data show a significant upregulation of *TNF- $\alpha$* , *RANKL*, *ALP*, *CYCLIN D1*, *MMP-13*, *OPG*, *NFATc1*, *TGF- $\beta$*  and *WNT5a* in scaphoid non-unions, indicating chronic inflammation and increased osteoclast activity. Interestingly, *TNF- $\alpha$*  was highly upregulated in all non-union samples (mean: 25 fold increase). Moreover, *RANKL*, a marker for osteoclastogenesis was increased by 20 fold in non-unions. However, markers for acute inflammation such as *IL-1 $\beta$*  or *IFN- $\gamma$*  were not detectable in both tissues. With respect to genes related to osteogenesis, alkaline phosphatase was significantly upregulated in scaphoid non-unions. No differences were detectable for other osteogenic genes such as *RUNX-2* or *BMP-2*. To our surprise, we did not detect differences in angiogenesis between scaphoid non-unions and control bone. TRAP staining and immunohistochemistry data confirmed these observations.

Summarized, our data show a dramatic upregulation of several genes in scaphoid non-unions, particularly *TNF- $\alpha$*  and *RANKL*. Moreover, scaphoid non-unions remain to have a potential for regeneration and do not show alteration in angiogenesis as compared to control tissue. These data increase our understanding for the reduced bone regeneration capacity present in scaphoid non-unions and may translate into the identification of new therapeutic targets in order to avoid secondary damages and prevent occurrence of non-unions to scaphoid bones.