

# Osteoblasten

## Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen in der Frakturheilung

**Das Knochengewebe besitzt eine einzigartige Fähigkeit zur Regeneration und ist in der Lage, mechanische und metabolische Stimuli in biologische Antwort umzuwandeln. Die fortwährenden Regenerationsprozesse ermöglichen einerseits eine ständige Erneuerung und Anpassung des Knochengewebes an die aktuelle Belastungssituation und andererseits eine unter optimalen Voraussetzungen mögliche narbenfreie Heilung und Remodelling nach einer Verletzung. Die posttraumatischen Regenerationsprozesse weisen in vielerlei Hinsicht Parallelen zu zellulären und molekularen Regulationsprogrammen der embryonalen Knochenbildung auf [3]. Dabei wird einer Vielzahl von Stimuli die Fähigkeit zugeschrieben, undifferenzierte mesenchymale Stammzellen (MSC) des Knochengewebes zu aktivieren [57]. Dieses Phänomen, auch bekannt als „Osteoinduktion“, ist definiert als der Prozess, der die Proliferation der MSC und deren Differenzierung zu Osteoprogenitorzellen mit nachfolgender De-novo-Knochenbildung (auch an heterotopen Stellen) zu induzieren vermag [3, 53].**

Der Begriff der Osteoinduktion wurde von Marshall R. Urist [53] in den 1970er Jahren nach der Entdeckung der osteoinduktiven Eigenschaften der demineralisierten Knochenmatrix und des „bone

morphogenetic proteins“ (BMP) definiert [54, 55].

Das Knochenremodelling unterliegt jedoch nicht nur einer lokalen auto- und parakrinen Regulation, sondern auch der endokrinen und der neuroendokrinen Steuerung.

■ Die Sexualhormone, das Parathormon, die Schilddrüsenhormone und das Cortisol gehören zu den am besten erforschten Regulatoren des Knochenstoffwechsels.

Das von den Fettzellen gebildete Hormon Leptin steuert die Knochenbildung und Knochenmasse indirekt über die hypothalamische Achse [10]. Die Entdeckung dieses Zusammenhangs in der jüngsten Vergangenheit hat neue Aspekte in der Osteoporoseforschung eröffnet. Die Kenntnisse der Aktivierung, der Differenzierung und der Funktion der knochenbildenden Zellen ist von enormer Bedeutung für das Verständnis der gesunden Entwicklung des Skeletts, der Knochenbruchheilung und der Möglichkeiten der Behandlung von Knochenerkrankungen wie der Osteoporose. In den letzten Jahrzehnten hat die Erforschung dieser Vorgänge in den Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen zu einer enormen Entwicklung auf den Gebieten der Biomaterialforschung und der regenerativen Medizin geführt.

Dieser Artikel beschreibt die wichtigsten Erkenntnisse über die Regulation der Differenzierungsvorgänge in den Osteo-

blasten unter besonderer Berücksichtigung des kanonischen WNT-Signalweges in der Frakturheilung.

### Osteoblasten – Herkunft und Differenzierung

Osteoblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen. In der Zellkultur lassen sich die Osteoblasten mithilfe üblicher lichtmikroskopischer Verfahren nicht von den Fibroblasten unterscheiden, da sie auch eine spindel- oder sternförmige Morphologie annehmen und Kolonien vom Fibroblastentyp bilden (morphologische Charakteristika ■ Abb. 1, [36]). Ein charakteristisches Zeichen der Osteoblasten ist ihre Fähigkeit, die Mineralisation der sezernierten Extrazellulärmatrix zu induzieren [12]. Dieser Vorgang kann in vitro mithilfe geeigneter Färbemethoden (z. B. Alizarin-Rot- und von Kossa-Färbungen) visualisiert werden und stellt ein wesentliches Unterscheidungskriterium zu Fibroblasten dar (■ Abb. 1f).

Abgesehen von wenigen Ausnahmen finden sich auf der Genexpressionsebene bis heute nur zwei Faktoren, die selektiv in den Zellen exprimiert werden, die zur Mineralisation der Extrazellulärmatrix befähigt sind (Osteoblasten und Odontoblasten) – der Transkriptionsfaktor RUNX2 (ehemals als „core binding factor α1“, CBFA1 bezeichnet [13]) und das

Gefördert durch Stiftung für Innovation Rheinland Pfalz (15202–38 62 61/577) und Deutsche Forschungsgesellschaft HO 4309/1–1.

### A. Hofmann · S.G. Mattyasovszky · C. Brüning · U. Ritz · I. Mehling · A. Meurer · P.M. Rommens **Osteoblasten. Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen in der Frakturheilung**

#### Zusammenfassung

Das Knochengewebe besitzt eine einzigartige Fähigkeit zur Regeneration und ist in der Lage, mechanische und metabolische Stimuli in biologische Antwort umzuwandeln. Die korrekte Regulation der Osteoblastendifferenzierung während der Frakturheilung ist komplex und in ihrer Gesamtheit noch nicht verstanden. Die Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SP7 sind von besonderer Bedeutung und können als Mastergene der Osteoblastendifferenzierung betrachtet werden. Der kanonische WNT-Signalweg spielt sowohl während des Knochenwachstums als auch in der Frakturheilung eine essenzielle Rolle für die Aktivierung der osteoblastären Differenzierungsvorgänge. Experimentelle Studien konnten nachweisen, dass eine Suppression des WNT-Signalweges während der Frakturheilung eine signifikante Reduktion der Kno-

chenbildung zur Folge hat. Die BMP2-vermittelte Aktivierung der Osteogenese ist ebenfalls von der korrekten WNT-Signalgebung abhängig. Die Patienten mit therapierefraktären Pseudarthrosen weisen nicht nur eine reduzierte Anzahl und Differenzierungskapazität der Osteoprogenitorzellen auf, sondern zeigen auch eine signifikant reduzierte Genexpression zahlreicher Faktoren der WNT-Signalkaskade auf. Die Erforschung des WNT-Signalweges könnte neue Perspektiven in der Behandlung der Knochenbruchheilungsstörungen und für das „tissue engineering“ des Knochengewebes eröffnen.

#### Schlüsselwörter

Osteoblast · Frakturheilung · Differenzierung · RUNX2 · WNT

### **Osteoblasts. Cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing**

#### Abstract

Bone tissue possesses a unique regeneration ability, translating mechanical and metabolic stimuli into a biological response. The perpetual regeneration processes allow continuous self-renewal and adaptation to prevailing mechanical forces. The complex regulation of osteoblastic differentiation during fracture repair has not been completely defined. Two different transcription factors – RUNX2 and SP7 – are considered to be master genes of osteoblastic differentiation. Furthermore, the canonical WNT pathway plays an essential role in the activation of osteoblastic differentiation during both bone growth and fracture healing. Studies of fracture healing have revealed that downregulation of the WNT pathway causes a significant reduction

in new bone formation. Moreover, correct WNT signalling is also required for BMP2-induced bone formation. There is increasing evidence that patients who develop recalcitrant fracture nonunions exhibit not only reduced numbers and differentiation capacity of osteogenic progenitors but also a significant downregulation of numerous factors in the WNT pathway. Therefore, better understanding of the WNT regulatory mechanisms could reveal new strategies for the treatment of delayed fracture healing and for the tissue engineering of bone.

#### Keywords

Osteoblast · Fracture healing · Differentiation · RUNX2 · WNT

Osteokalzin (BGLAP, Bone-GLA-Protein, **Abb. 1d, g, j**). Osteokalzin ist ein extrazelluläres Protein, das die Funktion der Osteoblasten inhibiert [11]. Alle anderen Marker der Osteoblasten wie z. B. die alkalische Phosphatase (ALP), Osteopontin und Osteonektin (**Abb. 1**) sind nicht spezifisch, da sie auch in anderen Geweben und Zellen exprimiert werden.

Unter dem Begriff der „Osteoblastenfunktion“ wird in vivo die Bildung neuen Knochengewebes verstanden. Der Begriff der Knochenneubildung umfasst die Differenzierung und Proliferation der Osteoblasten sowie die Bildung neuen Osteoids während der embryonalen Entwicklung und auch im Rahmen der Frakturheilung. Beides sind Vorgänge, die letztlich das Knochenwachstum, die Mineralisation und das Remodelling ermöglichen und unter In-vitro-Bedingungen in Ihrer Gänze nicht vollständig zu erfassen sind [12].

#### — Die Osteoblastenfunktion ist unzertrennbar mit ihrem Gegenspieler, dem Osteoklasten, verknüpft.

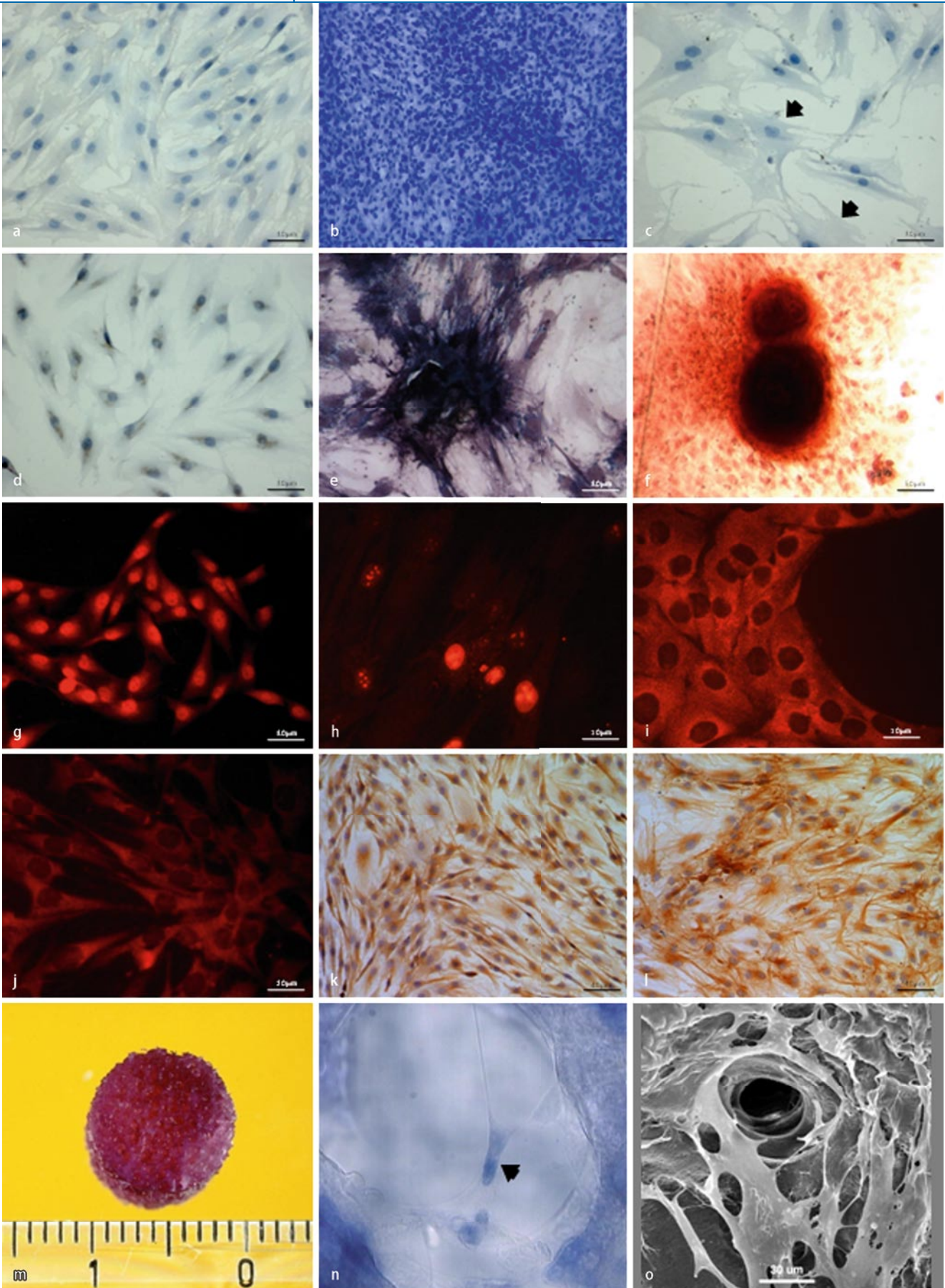
Während der Skelettentwicklung und auch während des gesamten Lebens steuern die Osteoblasten das Gleichgewicht zwischen Knochenan- und -abbau durch Sekretion bestimmter Proteine, welche die Differenzierung und die Funktion der Osteoklasten regulieren (z. B. RANKL, „receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand“ und OPG, Osteoprotegerin).

Mesenchymale Stammzellen können aus unterschiedlichsten Geweben wie z. B. Knochenmark, Periost, umgebende Weichteilgewebe, Fettgewebe, Blutgefäße, Blut etc. isoliert und kultiviert werden und sind in der Lage, sich osteoblastär zu differenzieren. Detaillierte Informationen über den Verlauf der osteoblastären Proliferation und Differenzierung wurden in einem In-vitro-Modell gewonnen [42]. In diesem Modell wurde eine Mischzellpopulation aus den Schädelkalotten von Ratten 21 Tage lang kultiviert. Ab dem 9. Tag waren Areale zu sehen, die sich bis zum 21. Tag zu mineralisierten knochenähnlichen Inseln („bone nodules“, BN) entwickelten (**Abb. 1e, f**). Im Querschnitt zeigten diese BN viele Charakteristika des Knochengewebes: fibroblastenähnliche

Hier steht eine Anzeige.



Leitthema



Zellen in der Außenschicht, darunter kubische osteoblastenähnliche und weiter innen osteozytenähnliche Zellen, die komplett in kollagenöse extrazelluläre Matrix eingebettet waren und in ihrer Umgebung Hydroxylapatitablagerungen aufwiesen. Dieser Vorgang der BN-Bildung wird durch ein dreidimensionales (3D-)Zellwachstum begünstigt [4]. Die terminale Differenzierung der Osteoblasten findet dabei erst bei abnehmender Proliferati-

onsrate statt. Nach heterotoper In-vivo-Implantation der kultivierten Osteoblasten sind diese Zellen in der Lage, an der Implantationsstelle vaskularisiertes Knorpelgewebe zu bilden [52]. Dieser Vorgang der direkten Knochenbildung weist viele Parallelen zur desmalen Ossifikation auf. Die Fähigkeit der Osteoblasten zur direkten Knochenbildung hat ihre Verwendung zur Herstellung artifizierender Knochenkonstrukte im Rahmen des „tissue engineering“ überhaupt erst ermöglicht (■ **Abb. 1m, n, o**).

**Abb. 1** ◀ Morphologische Charakteristika der kultivierten Osteoblasten. Alle Teilabbildungen von Abb. 1 außer i zeigen Primärkulturen der humanen Osteoblasten **a** Monolayerkultur, die Zellen weisen alle Charakteristika des Fibroblastentyps auf. Zellkernfärbung mit Hämalaun **b** Nach längerer Kultivierung wachsen die Osteoblastenkulturen im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen mehrschichtig übereinander. Zellkernfärbung mit Hämalaun. **c** Nach mehreren Passagen finden sich in der Kultur vermehrt terminal differenzierte (seneszente) Zellen mit flachem, ausgebreitetem Zellkörper und sternförmigen Zellausläufern (Pfeile). **d** Immunhistochemischer Nachweis von Osteokalzin (Braunfärbung). Subkonfluente Kulturen niedriger Passagen sind häufig nur schwach positiv für diesen späten Marker. **e** Histochemischer Nachweis der alkalischen Phosphatase (blau, früher Marker der osteoblastären Differenzierung). Die Aktivität dieses Enzyms ist sehr stark ausgeprägt im Bereich der „bone nodules“. **f** Histochemischer Nachweis der Mineralisation in der Extrazellulärmatrix mittels Alizarin-Rot. Nach langer Kultivierung (3–5 Wochen) zeigt sich eine besonders intensive Färbung im Bereich der „bone nodules“. **g** Immunhistochemischer Nachweis der RUNX2-Expression. **h** Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 (Zellkerne). Die Primärkulturen weisen eine hohe Proliferationsaktivität auf. **i** MG-63-Osteoblasten (humane Osteosarkomzelllinie). Immunhistochemischer Nachweis der Cyclooxygenase-2-Expression. COX2 ist ein wichtiges Enzym für die Homeostase der Osteoblasten und spielt für die Frakturheilung eine bedeutende Rolle. **j** Immunhistochemischer Nachweis der Osteokalzinexpression. **k** Immunhistochemischer Nachweis der Osteonektinexpression. **l** Immunhistochemischer Nachweis der Osteopontinexpression. **m** „Tissue engineering“ des Knorpelgewebes. Kultivierung der Osteoblasten auf humaner demineralisierter Knochenmatrix. Nachweis der ALP-positiven Zellen (makroskopische Aufnahme, blau). Die Zellen haben den Träger vollständig besiedelt. **n** Mikroskopische Aufnahme eines ALP-positiven Osteoblasten (Pfeil) in einer Pore der demineralisierten Knochenmatrix. **o** Scannerelektronenmikroskopische (SEM) Aufnahme der Osteoblasten innerhalb der demineralisierten Knochenmatrix

## RUNX2 – Mastergen der Knochenbildung

Die Erforschung der desmalen Ossifikation hat zur Entdeckung des bereits erwähnten Transkriptionsfaktors *RUNX2*, des „Masterregulators“ der osteoblastären Differenzierung, geführt [13]. *RUNX2* bindet an OSE-2, eines der beiden osteoblastenspezifischen cis-Elemente innerhalb des Promotors des Osteokalzins und steuert damit seine Transkription. Die Expression von *RUNX2* findet sich während der Embryonalentwicklung selektiv in den mesenchymalen Stammzellen wieder, die sich zu Osteoblasten, Odontoblasten [7] und Chondrozyten [28] differenzieren (■ **Abb. 2**). Dabei nimmt die Expressionsintensität in den Chondrozyten während der terminalen Differenzierung und Hypertrophie ab (■ **Abb. 2**, [28]).

### ◉ RUNX2: spezifischer Marker der osteoblastischen Differenzierung

Auch während der Transdifferenzierung der Myoblasten und Fibroblasten zu Osteoblasten wird *RUNX2* selektiv exprimiert [13] und stellt somit einen spezifischen Marker der osteoblastischen Differenzierung dar. Eine Überexpression des Gens in unterschiedlichsten Zellen kann die Expression osteoblastentypischer Gene, wie ALP und Osteokalzin, induzieren.

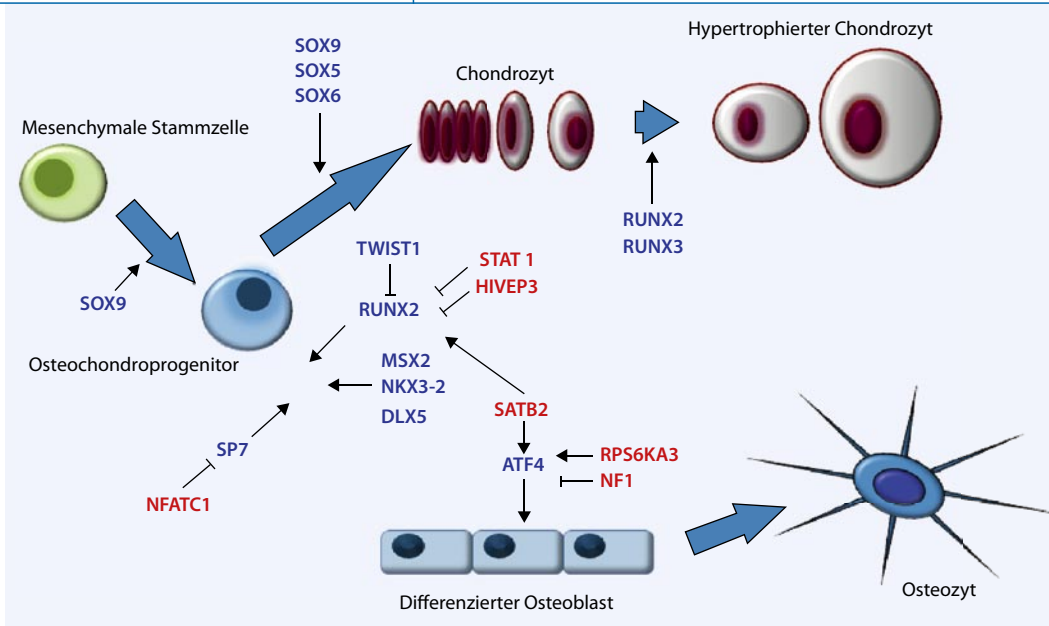
Die homozygote Deletion des *RUNX2*-Gens im Mausmodell führt zum kompletten Fehlen der Osteoblasten bei normal angelegtem knorpeligen Skelett [31, 41]. Diese Mäuse besitzen auch keine Osteoklasten, da deren Bildung durch die Osteoblasten gesteuert wird. Die hetero-

zygote Deletion des *RUNX2*-Gens beeinträchtigt vor allem die desmale Ossifikation und somit die Entwicklung der Schlüsselbeine und einiger Knochen des Schädelskeletts, was dem klinischen Bild der kleidokranelen Dysplasie (CCD) entspricht [38].

Einige weitere Transkriptionsfaktoren, die dem *RUNX2* vor- oder nachgeschaltet sind oder unabhängig davon reguliert werden, wurden ebenfalls beschrieben. Dazu gehören einige Homeoboxproteine (Transkriptionsfaktoren, die mit einer ca. 180 bp langen Homeodomäne an die DNA binden können) wie *DLX5*, *MSX2*, *NKX3-2* (ehemals *BAPX1*), und *HOXA2* (■ **Abb. 2**, [12]). Zu den bedeutendsten Inhibitoren des *RUNX2* gehören der nukleäre Faktor *TWIST1* und *STAT1* (■ **Abb. 2**). Die Haploinsuffizienz des Gens *TWIST1* führt zu einer Entthemmung der *RUNX2*-Expression und verursacht eine gesteigerte Knochenbildung mit dem klinischen Bild der Kraniosynostose, des Saethre-Chatzen-Syndroms [14]. Die Expression von *RUNX2* wird darüber hinaus durch einige Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , BMP und „Indian hedgehog“ (HH) gesteuert.

### SP7 – ein RUNX2-abhängiger Transkriptionsfaktor mit essentieller Funktion für die Knochenbildung

Ein weiterer für die Differenzierung der Osteoblasten essenzieller Transkriptionsfaktor ist *SP7* [ehemals Osterix (*OSX*) genannt, ■ **Abb. 2**, [39]]. *RUNX2* reguliert die Genexpression von *SP7* durch die Bindung an seinen Promoter [40]. Genetische Mausmodelle konnten nachweisen, dass eine Deletion von *RUNX2* zum kompletten Fehlen der *SP7*-Genexpression führt. Im Gegensatz hierzu weisen *SP7*-defiziente Mäuse eine normale Expression von *RUNX2* auf [39]. Das Fehlen von *SP7* blockiert vollständig die Entwicklung des mineralisierten Knorpelgewebes als Funktion der Osteoblasten, wobei die Kalzifizierung des hypertrophierten Knorpels davon unberührt bleibt [39]. *SP7* interagiert mit dem nukleären Faktor der aktivierten T-Zellen 1 (*NFATc1*) und bildet einen Komplex, der den Promotor des  $\alpha$ (I)-Kollagens kontrolliert und somit



**Abb. 2** ◀ Schematische Darstellung der transkriptionellen Kontrolle der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung (spitze Pfeile Induktion, stumpfe Pfeile Inhibition, blau Kontrolle auf der Transkriptionsebene, rot posttranslato-nale Kontrolle)

für die Funktion der Osteoblasten essen-tiell ist [30].

### Die kanonische WNT-Transduktionskaskade

WNT-Proteine sind sezernierte Glyko-proteine, die für die normale Entwicklung und Homöostase von unterschiedlichen Geweben, u. a. auch des Knochengewebes, von besonderer Bedeutung sind. „WNT“ (sprich „wint“) setzt sich zusammen aus dem „WG“ für „wingless“ und „INT1“. Die Bezeichnung „wingless“ stammt aus den Studien an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, in der Mutationen im Wingless-Gen zu einer flügellosen Vari-ante der Fliegen führen. Die Aktivierung des *INT1*-Gens (heute *WNT1*) fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs.

Die WNT-Transduktionskaskade hat 3 wichtige Funktionen in der Knochenbil-dung, nämlich die Festlegung der Osteo-und Chondroprogenitordifferenzierung, die Stimulierung der Osteoblastenproli-feration und die Blockierung der Apopto-se in den Osteoblasten und Osteoklas-ten (Abb. 3). Die Entwicklung der Oste-oklasten wird dabei indirekt beeinflusst, indem WNT die Expression der Faktoren RANKL und OPG in den Osteoblasten reguliert (Abb. 3, [50]). Der WNT-Si-gnalweg ist in allen zellulären Entwick-lungsstufen der Osteoblasten, der „Bone-lining-Zellen“ und der Osteozyten [19] ak-tiv und wird zusätzlich verstärkt aktiviert

während der mechanischen Belastung des Knochens und während der Frakturheilung [5, 44].

WNT-Proteine aktivieren unterschiedliche Signaltransduktionswege durch die Bindung an die Rezeptoren LRP5 (LDL-receptor-related protein 5) oder LRP6 und eines der 10 bekannten Proteine namens Frizzled (FZD) [56].

#### Der kanonische Signaltransduktionsweg ist einer der 3 Wege der WNT-vermittelten Aktivierung und ist bis dato am besten untersucht (Abb. 4).

Dieser Weg beinhaltet die LRP5/6-FZD-vermittelte Stabilisierung des zytoplas-matischen Proteins  $\beta$ -Catenin, das infolge in den Nukleus transponiert wird und unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, darunter TCF7 (T-cell factor 7) und LEF1 (lymphoid enhancer factor 1) sowie TCF7/LEF2, aktiviert.

Experimentelle Studien konnten klar belegen, dass die Inaktivierung des WNT-Rezeptors LRP5 zu einer signifikanten Reduktion der Knochenmasse führt, wäh-rend eine Verstärkung der LRP5-Rezep-torfunktion das Gegenteil bewirkt, näm-lich eine verstärkte Differenzierung der MSC zu Osteoblasten, eine Reduktion der osteoblastären und osteozytären Apoptoserate und eine signifikante Steige-rung der Knochenmasse [1, 27, 35]. In ähn-licher Form wurden auch andere Bestand-

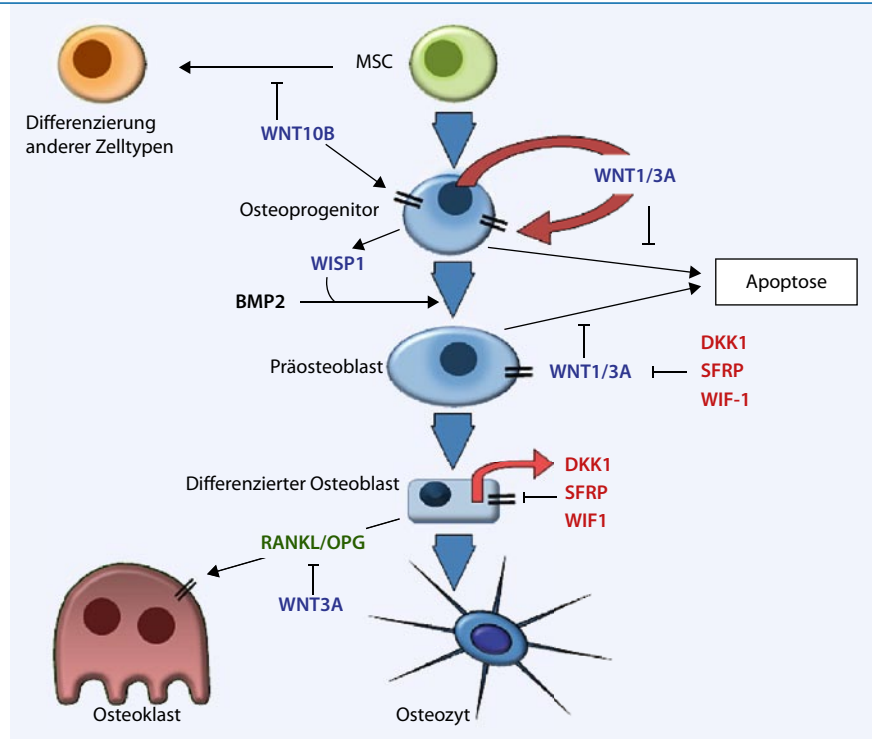
teile der WNT-Transduktionskaskade [z. B. *WNT10b*,  $\beta$ -Catenin, TCF1, APC, Axin-2, „secreted frizzled-related protein 1“ (SFRP1), SFRP4 und Dickkopf-homolog 1 (DKK1)] untersucht und haben ein einheitliches Bild der Funktion dieses Si-gnaltransduktionsweges in der Knochen-bildung heraus kristallisiert. Zudem haben sich einige neue Hinweise über die syner-gistische Interaktion des WNT-Weges und der bereits beschriebenen Transkriptions-faktoren *RUNX2* und *SP7* ergeben [9, 21, 24, 45]. Der kanonische WNT-Signalweg kann durch Interferenz mit dem Rezep-torkomplex LRP5/FZD inhibiert werden. Die Faktoren DKK1 und Sklerostin kont-rollieren auf diese Weise die Differenzie-rung der Osteoblasten und die Knochen-masse (Abb. 3, [34, 37]). Auf ähnliche Art und Weise verhindert der lösliche Li-gand SFRP1 durch extrazelluläres Abfan-gen des WNT sein Andocken an den Re-zeptorkomplex (Abb. 3, 4) LRP5/FZD.

### Der WNT-Signalweg in der Frakturheilung

Viele Forscher widmeten sich bereits der Erkundung der Pathogenese der Pseud-arthrosen und konnten einige allgemein anerkannte Ursachen der defizienten Knochenbruchheilung identifizieren [18]. Morphologisch werden Pseudarthrosen in 3 unterschiedliche Typen unterteilt [46]. Hypertrophe Pseudarthrosen sind durch eine vitale periostale und endosta-

le Knochenbildung charakterisiert, ohne dass der Frakturspalt knöchern überbrückt werden kann. Die Tatsache, dass diese Pseudarthrosen nach suffizienter Frakturspaltkompression und Stabilisierung in der Regel ausheilen, spricht für die unzureichende Stabilität als wesentlichen pathogenetischen Faktor dieser Pseudarthrosenform [22]. Oligotrophie oder atrophe Pseudarthrosen sind durch unzureichende Kallusbildung gekennzeichnet und kommen meistens im Zusammenhang mit einer lokalen Gewebezzerstörung durch ein Hochrasanztrauma oder einer anderen Ursache (z. B. Rauchen) vor. Frühere Annahmen, atrophe Pseudarthrosen könnten durch eine unzureichende lokale Durchblutungssituation zustande kommen, wurden durch neuere Untersuchungen z. T. widerlegt, denn atrophe und hypertrophe Pseudarthrosen weisen die gleiche Kapillardichte auf [43]. Die Gruppe der Defektpseudarthrosen nimmt eine Sonderstellung ein, da sie durch ungenügenden Kontakt der Frakturenden mit der Unfähigkeit des Kallusgewebes den Defekt zu überbrücken (Defekt kritischer Größe) charakterisiert ist. Die infektierten Pseudarthrosen lassen sich nicht ohne weiteres in dieses morphologische Schema einordnen, da sie morphologisch unterschiedliche Erscheinungsformen aufweisen können.

Außer den bereits bekannten und gut untersuchten Erkrankungen mit einer Prädisposition zur Ausbildung von Pseudarthrosen (Osteogenesis imperfecta, Neurofibromatose, fibröse Dysplasie, lokalisierte kongenitale Pseudarthrosen) gibt es andere Faktoren, die durch die Veränderung des physiologischen Genexpressionsprofils der lokalen Zellen die Entstehung von Pseudarthrosen begünstigen können. Dazu gehören solche Substanzen wie COX2-Inhibitoren [51], Nikotin [49] und Kortikosteroide [47]. Interessanterweise gibt es hartnäckige Pseudarthrosen, die erst nach mehreren operativen Behandlungen und sehr langer Therapiedauer (operative Verbesserung der Stabilität, autologe Transplantation und Applikation von Wachstumsfaktoren) ausheilen [8]. In diesem Zusammenhang entsteht nun die Frage, ob systemische Störungen der Funktion bestimmter Zelltypen für die Beeinträchtigung der Osteo-



**Abb. 3** ▲ Einfluss des kanonischen WNT-Signalweges auf die Differenzierung der Osteoblasten. Die WNT-Signalgebung ist essentiell für die Proliferation und die Differenzierung der osteoblastären Vorstufen und wirkt antiapoptisch. DKK1, SFRP und WIF1 sind natürliche Antagonisten der WNT-Proteine

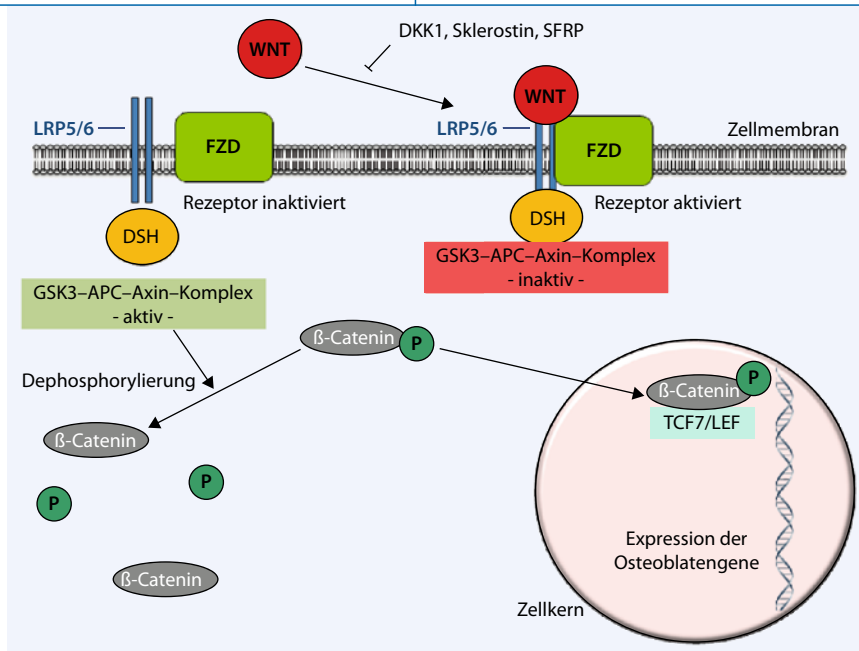
genese bei sonst phänotypisch gesunden Patienten verantwortlich sein könnten.

Hernigou u. Beaujean [20] belegten in diesem Zusammenhang anhand einer Untersuchung an 35 Patienten mit Pseudarthrosen eindrucksvoll, dass in den stromalen und hämatopoetischen Kompartimenten des Knochenmarks die Anzahl der Progenitorzellen, die als Ursprung der knochenbildenden Zellen gelten, im Vergleich zum Normalkollektiv sowohl im Bereich der Pseudarthrose, als auch im Bereich der nicht frakturierten Beckenschaukeln signifikant erniedrigt ist. Seebach et al. [48] wiesen später ebenfalls nach, dass die Anzahl und die Proliferationskapazität der mesenchymalen Stammzellen bei den Patienten mit atropen Pseudarthrosen signifikant erniedrigt sind. Darüber hinaus wurde in der histologischen Studie von Lawton et al. [32, 33] ein abnormer Phänotyp der Osteoblasten im Bereich von Pseudarthrosen nachgewiesen, der durch eine veränderte Expression des Matrix-GLA-Proteins und des Typ-III-Kollagens charakterisiert war.

Die Rolle der korrekten osteoblastären Differenzierung in der Frakturheilung wurde von Chen et al. [5] in einem Mausmodell detailliert untersucht. Die Autoren konnten den Beweis erbringen, dass die

Expression von  $\beta$ -Catenin, des Hauptbestandteils der WNT-Transduktionskaskade, während der ungestörten Frakturheilung signifikant erhöht ist. Die  $\beta$ -Catenin-induzierte Aktivierung des intranukleären TCF-Transkriptionsfaktors sowie die Expression zahlreicher WNT-Liganden waren in den Osteoblasten und Chondrozyten des Frakturkallus nachweisbar. Drei weitere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls belegen, dass die Expression zahlreicher Faktoren des WNT-Signalweges während der Frakturheilung signifikant hoch reguliert wird [17, 29, 58] und dass der „WNT-inhibitory factor“ (WIF) als negativer Feedbackmechanismus die Aktivierung der WNT-Kaskade steuert (■ Abb. 3, [29]).

Kakar et al. [26] zeigten, dass die verstärkte Kallusbildung infolge einer systemischen Behandlung mit PTH<sub>1-34</sub> mit einer signifikanten Steigerung der Expression der WNT-Signalwegfaktoren (z. B.  $\beta$ -Catenin, WNT<sub>4</sub>, WNT<sub>5A</sub>, WNT<sub>5B</sub>, WNT<sub>10B</sub>) vergesellschaftet ist und legten die Vermutung nahe, dass die PTH-induzierte Knochenneubildung aufgrund der Steigerung der WNT- und  $\beta$ -Catenin-Signalgebung zustande kommt. Chen et al. [5] konnten zusätzlich belegen, dass die



**Abb. 4** ▲ Schematische Darstellung der kanonischen WNT-Signaltransduktionskaskade: Im Zytoplasma findet der Abbau der phosphorylierten Form des  $\beta$ -Catenin durch den GSK3/Axin/APC-Komplex statt. Die Aktivierung des LRP-Rezeptors durch Andocken von WNT (und Bindung von FZD und DSH) führt zur Inaktivierung dieses Komplexes. Die aktive phosphorylierte Form des  $\beta$ -Catenin kumuliert im Zytoplasma und gelangt in den Zellkern. Hier findet die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren TCF und LEF durch spezifische Bindung von  $\beta$ -Catenin statt, die ihrerseits die Transkription der Osteoblastenmarkergene steuern

Behandlung der Mäuse mit stabilisierten Tibiafrakturen mit dem WNT-Inhibitor DKK1 zu einer Inhibierung der WNT-Transduktionskaskade und des gesamten knöchernen Heilungsprozesses führt.

Konkordante Ergebnisse wurden auch bei Mäusen mit Null- oder inaktivierten  $\beta$ -Catenin-Allelen beobachtet. Mäuse, die dagegen eine aktivierte Form des  $\beta$ -Catenin-Allels exprimierten, wiesen eine deutlich verstärkte Kallusbildung auf. Die WNT-Signalgebung induziert während der Frakturheilung auch die Expression von *WISP1* (WNT-induced protein 1 [16]). Obwohl *WISP1* per se keinen Einfluss auf die Differenzierung der Osteoblasten besitzt, stellt es eine wichtige Verbindung zum BMP2-Signalweg dar. *WISP1*-überexprimierende Zellen zeigen nach der Behandlung mit BMP2 eine 13- bis 14fach höhere Aktivität der ALP im Vergleich zur Negativkontrolle [16].

— **Somit scheinen synergistische Effekte der WNT- und BMP2-Signalgebung in der Frakturheilung eine entscheidende Rolle zu spielen.**

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalgebung für die Differenzierung der Osteoblasten während unterschiedlicher Stadien der Frakturheilung essentiell ist.

Unsere Forschungsgruppe untersuchte die osteoblastäre Differenzierungskapazität der Zellen in Patienten mit therapierefraktären Pseudarthrosen und in einer vergleichbaren Population gesunder Probanden [23]. Die Hypothese, dass osteoblastäre Zellfunktionen sich in beiden Gruppen signifikant unterscheiden, wurde anhand der Untersuchung der Zellproliferation und -vitalität, der Formation der ALP-positiven und der mineralisierten „colony forming units“ (CFU) sowie der globalen Genexpression, des so genannten Transkriptoms, untersucht. In dieser Studie konnten wir nachweisen, dass die Aktivität der ALP (früher Marker der osteoblastären Differenzierung) in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede ergab. Dagegen waren unter identischen Kulturbedingungen die Zellproliferation und die Bildung der mineralisierten CFU in den Osteoblastenkulturen von Pseudarthrosepatienten signifikant reduziert. Diese Be-

funde waren mit signifikanten Unterschieden der Expression zahlreicher Gene vergesellschaftet, die in die Signaltransduktionskaskaden der kanonischen WNT-, IGF-, TGF- $\beta$ - und FGF-Wege involviert sind (■ **Tab. 1**). Einige für die osteoblastäre Differenzierung essentielle Faktoren waren in den Osteoblastenkulturen der Pseudarthrosengruppe signifikant herunterreguliert (■ **Tab. 1**).

Unsere Ergebnisse wurden kürzlich von Bajada et al. [2] auf der Ebene der osteoblastären Vorläuferzellen ebenfalls im humanen Modell verifiziert. Die Autoren fanden heraus, dass die osteogene Differenzierungsfähigkeit der stromalen Zellen aus dem Bereich der atrophischen Pseudarthrosen (nonunion stromal cells, NUSC) im Vergleich zu den stromalen Knochenmarkzellen (BMSC) gesunder Probanden signifikant reduziert ist. Zusätzlich wurden deutlich erhöhte Raten an seneszenten Zellen in der Pseudarthrosengruppe festgestellt. Die Sekretion des WNT-Inhibitors DKK1 war in der Pseudarthrosengruppe ebenfalls signifikant erhöht. Die Behandlung der gesunden BMSC-Kulturen mit konditioniertem Medium aus den NUSC-Kulturen führte zur Inhibierung der osteoblastären Differenzierungsvorgänge, im ähnlichen Ausmaß wie die reine Behandlung mit rekombinantem DKK1. Die Blockierung des WNT-Weges durch erhöhte Sekretion von DKK1 könnte eine wichtige Erklärung der gestörten osteoblastären Differenzierung darstellen. Beide Studien legen somit nahe, dass die weitere Erforschung der Rolle des kanonischen WNT-Signalwegs in der Frakturheilung von immenser klinischer Bedeutung ist und dies neue Perspektiven für die Therapie der gestörten Frakturheilung und für das „tissue engineering“ des Knochengewebes eröffnen könnte.

### TGF- $\beta$ und BMP – ein Link zum WNT-Signalweg?

Der „transforming growth factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) ist ein potenter Regulator des Zellwachstums. TGF- $\beta$  wird von den Osteoblasten sezerniert und in das Osteoid eingebettet. Während der Resorptionsphase der Frakturheilung wird die aktivierte Form des TGF- $\beta$  freigesetzt und reguliert die Proliferation und die Differen-



Hier steht eine Anzeige.



**Tab. 1** Auswahl einiger differenziell exprimierter Gene in Osteoblastenkulturen von Pseudarthrosepatienten [23]. Die Zahlen geben das xfache der Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe an

<b>WNT-Pathway</b>	
<i>LRP5</i> (low density lipoprotein receptor-related protein 5)	-1,4
<i>CTTNB1</i> ( $\beta$ -Catenin)	-2,1
<i>TCF7</i> (transcription factor 7)	-2,3
<i>WISP2</i> (WNT1 inducible signaling pathway protein 2)	-2,3
<i>WISP3</i> (WNT1 inducible signaling pathway protein 3)	-13,2
<i>NOV</i> (nephroblastoma overexpressed gene)	-3,7
<b>TGF-<math>\beta</math>/BMP-Pathway</b>	
<i>TGFB2</i> (TGF- $\beta$ 2)	-2,1
<i>BMP4</i> (bone morphogenetic protein 4)	-25,9
<i>COMP</i> (cartilage oligomeric matrix protein)	-2,7
<i>TNC</i> (Tenascin C)	-2,8
<b>FGF-Pathway</b>	
<i>FGF1</i> (fibroblast growth factor 1)	-5,5
<i>FGFR2</i> (fibroblast growth factor receptor 2)	-7,5
<i>FYN</i> (FYN oncogene related to SRC)	-2,3
<b>Andere relevante Wachstumsfaktoren</b>	
<i>PDGF</i> (platelet derived growth factor)	-4,4
<i>IGF2</i> (Insulin-like growth factor 2)	-12,5
<i>IGF3</i> (Insulin-like growth factor 3)	-3,0
<i>IGF5</i> (Insulin-like growth factor 5)	-3,2
<i>OGN</i> (Osteoglycin)	-11,4
<i>VEGFB</i> (vascular endothelial growth factor B)	+2,6
<b>Gene der Gene Ontology „skeletal development“</b>	
<i>EN1</i> (engrailed homeobox 1)	+5,1
<i>TWIST1</i> (twist homolog 1)	-2,1
<i>TOB1</i> (transducer of ERBB2, 1)	-2,1
<i>CTNNA1</i> (Catenin $\beta$ 1)	-2,1
<i>TGFB2</i> (transforming growth factor, $\beta$ -2)	-2,1
<i>OPG</i> (Osteoprotegerin)	-2,3
<i>COMP</i> (cartilage oligomeric matrix protein)	-2,7
<i>HOXA11</i> (homeobox A11)	-2,9
<i>HDAC4</i> (histone deacetylase 4)	-2,9
<i>FOXC1</i> (forkhead box C1)	-3,0
<i>PTGER4</i> (Prostaglandin E receptor 4)	-4,1
<i>CLEC3B</i> (C-type lectin domain family 3, member B)	-7,5
<i>MGP</i> (matrix Gla protein)	-8,3
<i>IGF2</i> (Insulin-like growth factor 2)	-12,4
<i>BMP4</i> (bone morphogenetic protein 4)	-25,9

zierung der Osteoblasten und ihrer Vorläuferzellen.

„Bone morphogenetic proteins“ (BMP) sind eine Gruppe von Wachstumsfaktoren mit osteo- und chondroinduktiven Eigenschaften, wovon einige zur TGF- $\beta$ -Superfamilie (z. B. BMP2 bis 7) gehören. Die Regulation der TGF- $\beta$  und BMP-Signale erfolgt nach der Aktivierung spezifischer TGF- $\beta$ - und BMP-Rezeptoren (TGFBR, BMPR) intrazellulär über Smad-Proteine, von denen bis heute acht Varianten beschrieben wurden (Smad 1–8). Entspre-

chend ihrer Struktur und Funktion werden die Smad-Proteine in 3 Subgruppen eingeteilt. Extrazellulär wird die BMP-Signalkaskade über eine ganze Familie sezernierter BMP-Antagonisten (z. B. noggin, chordin, gremlin) reguliert.

Die Behandlung der Osteoblasten mit BMP2 führt nicht nur zu einer Hochregulation der Genexpression unterschiedlicher WNT-Liganden (z. B. WNT7A und WNT10B) und deren Rezeptoren (z. B. FZD und LRP10), sondern auch zu einer Steigerung der  $\beta$ -Catenin-vermit-

telten Aktivierung des Transkriptionsfaktors TCF [6]. Während der BMP2-induzierten ektopten Osteogenese in der Muskulatur führt die Suppression der kanonischen WNT-Kaskade mittels DKK1 zu einer massiven Reduktion der Knochenbildung, im ähnlichen Ausmaß wie bei einer Inaktivierung des  $\beta$ -Catenin-Allels [6]. Eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin und WNT3A in C<sub>3</sub>H<sub>10</sub>T<sub>1/2</sub>-Zellen führt während einer Behandlung mit BMP2 dagegen zu einer signifikanten Steigerung der Chondrogenese, des frühen Stadiums der Knochenneubildung [15]. Eine mögliche Verbindung zwischen der BMP- und der WNT-Transduktionskaskaden stellt (abgesehen zu WISP1, s. oben) zum einen das Molekül Smad4 dar, dessen intranukleäre Spiegel und die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin und TCF/LEF1 nach der Behandlung mit BMP2 signifikant gesteigert werden [15]. Zum anderen beschrieben Hussein et al. [25] eine wichtige Rolle der gemeinsamen Aktivierung des MSX2-Promotors durch Smad4 (BMP-Signalweg) und LEF1 (WNT-Signalweg).

## Fazit für die Praxis

Die korrekte Regulation der Osteoblastendifferenzierung während der Frakturheilung ist komplex und in ihrer Gesamtheit noch nicht vollständig verstanden. Die Transkriptionsfaktoren *RUNX2* und *SP7* sind dabei von besonderer Bedeutung und können als Mastergene der Osteoblastendifferenzierung betrachtet werden. Der kanonische WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg spielt während des Knochenwachstums und während der Frakturheilung für die Aktivierung der osteoblastären Differenzierungsvorgänge eine herausragende Rolle. Die Erforschung des WNT-Signalweges könnte neue Perspektiven in der Behandlung der Knochenbruchheilungsstörungen und für das „tissue engineering“ des Knochengewebes eröffnen.

## Korrespondenzadresse

**Dr. A. Hofmann**

BiomaTiCS Group, Zentrum für Unfallchirurgie und Orthopädie, Universitätsmedizin, Johannes-Gutenberg-Universität Langenbeckstraße 1, 55101 Mainz  
Hofmann.trauma-surgery@gmx.net

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

- Babji P, Zhao W, Small C et al (2003) High bone mass in mice expressing a mutant LRP5 gene. *J Bone Miner Res* 6:960–974
- Bajada S, Marshall MR, Wright KT et al (2009) Decreased osteogenesis, increased cell senescence and elevated dickkopf-1 secretion in human fracture non union stromal cells. *Bone* 45(4):726–735
- Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS et al (1998) Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 355(Suppl):247–256
- Casser-Bette M, Murray AB, Closs El et al (1990) Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 1:46–56
- Chen Y, Whetstone HC, Lin AC et al (2007) Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* 7:249
- Chen Y, Whetstone HC, Youn A et al (2007) Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Biol Chem* 1:526–533
- D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J et al (1999) Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 13:2911–2920
- Dahabreh Z, Dimitriou R, Giannoudis PV (2007) Health economics: a cost analysis of treatment of persistent fracture non-unions using bone morphogenetic protein-7. *Injury* 3:371–377
- Day TF, Guo X, Garrett-Beal L et al (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 5:739–750
- Ducy P, Amling M, Takeda S et al (2000) Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2:197–207
- Ducy P, Desbois C, Boyce B et al (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 6590:448–452
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 5484:1501–1504
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V et al (1997) *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 5:747–754
- el Ghouzzi V, Le MM, Perrin-Schmitt F et al (1997) Mutations of the *TWIST* gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 1:42–46
- Fischer L, Boland G, Tuan RS (2002) Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J Cell Biochem* 4:816–831
- French DM, Kaul RJ, D'Souza AL et al (2004) *WISP-1* is an osteoblastic regulator expressed during skeletal development and fracture repair. *Am J Pathol* 3:855–867
- Hadjiargyrou M, Lombardo F, Zhao S et al (2002) Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J Biol Chem* 33:30177–30182
- Hayda RA, Brighton CT, Esterhai JL Jr (1998) Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res* 355(Suppl):31–40
- Hens JR, Wilson KM, Dann P et al (2005) *TOPGAL* mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res* 7:1103–1113
- Hernigou P, Beaujean F (1997) Bone marrow in patients with pseudarthrosis. A study of progenitor cells by in vitro cloning. *Rev Chir Orthop Reparat Appar Mot* 1:33–40
- Hill TP, Spater D, Taketo MM et al (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 5:727–738
- Hofmann A, Hessmann MH, Rudig L et al (2004) Intramedullary osteosynthesis of the ulna in revision surgery. *Unfallchirurg* 7:583–592
- Hofmann A, Ritz U, Hessmann MH et al (2008) Cell viability, osteoblast differentiation, and gene expression are altered in human osteoblasts from hypertrophic fracture non-unions. *Bone* 42(5):894–906
- Hu H, Hilton MJ, Tu X et al (2005) Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* 1:49–60
- Hussein SM, Duff EK, Sirard C (2003) *Smad4* and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of *Mx2*. *J Biol Chem* 49:48805–48814
- Kakar S, Einhorn TA, Vora S et al (2007) Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *J Bone Miner Res* 12:1903–1912
- Kato M, Patel MS, Levesseur R et al (2002) *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2:303–314
- Kim IS, Otto F, Zabel B et al (1999) Regulation of chondrocyte differentiation by *Cbfa1*. *Mech Dev* 2:159–170
- Kim JB, Leucht P, Lam K et al (2007) Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *J Bone Miner Res* 12:1913–1923
- Koga T, Matsui Y, Asagiri M et al (2005) *NFAT* and *Osterix* cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 8:880–885
- Komori T, Yagi H, Nomura S et al (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 5:755–764
- Lawton DM, Andrew JG, Marsh DR et al (1999) Expression of the gene encoding the matrix gla protein by mature osteoblasts in human fracture non-unions. *Mol Pathol* 2:92–96
- Lawton DM, Andrew JG, Marsh DR et al (1997) Mature osteoblasts in human non-union fractures express collagen type III. *Mol Pathol* 4:194–197
- Li J, Sarosi I, Cattle RC et al (2006) *Dkk1*-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 4:754–766
- Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG et al (2002) A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 1:11–19
- Miller SS, Wolf AM, Arnaud CD (1976) Bone cells in culture: morphologic transformation by hormones. *Science* 4246:1340–1343
- Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P et al (2006) Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 6:934–945
- Mundlos S, Otto F, Mundlos C et al (1997) Mutations involving the transcription factor *CBFA1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 5:773–779
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G et al (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor *osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 1:17–29
- Nishio Y, Dong Y, Paris M et al (2006) *Runx2*-mediated regulation of the zinc finger *Osterix/Sp7* gene. *Gene* 10(372):62–70
- Otto F, Thornell AP, Crompton T et al (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 5:765–771
- Owen TA, Aronow M, Shalhoub V et al (1990) Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 3:420–430
- Reed AA, Joyner CJ, Brownlow HC et al (2002) Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J Orthop Res* 3:593–599
- Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ et al (2006) Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem* 42:31720–31728
- Rodda SJ, McMahon AP (2006) Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 16:3231–3244
- Runkel M, Rommens PM (2000) Pseudoarthrosis. *Unfallchirurg* 1:51–63
- Ruter A, Mayr E (1999) Pseudoarthrosis. *Chirurg* 11:1239–1245
- Seebach C, Henrich D, Tewksbury R et al (2007) Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int* 4:294–300
- Silcox DH III, Boden SD, Schimandle JH et al (1998) Reversing the inhibitory effect of nicotine on spinal fusion using an osteoinductive protein extract. *Spine* 3:291–296
- Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL et al (2006) Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of *NF-kappaB* ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci Pt* 7:1283–1296
- Sudmann E, Hagen T (1976) Indomethacin-induced delayed fracture healing. *Arch Orthop Unfallchir* 2:151–154
- Uchida A, Kikuchi T, Shimomura Y (1988) Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells. *Acta Orthop Scand* 1:29–33
- Urist MR (1965) Boneformation by autoinduction. *Science* 698:893–899
- Urist MR, Mikulski A, Contas CN (1975) Reversible extinction of the morphogen in bone matrix by reduction and oxidation of disulfide bonds. *Calcif Tissue Res* 1:73–83
- Urist MR, Mikulski AJ, Nakagawa M et al (1977) A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol* 3:115–127
- Westendorff JJ, Kahler RA, Schroeder TM (2004) Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341:19–39
- Yoo JU, Johnstone B (1998) The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355(Suppl):73–81
- Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M (2006) Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone* 1:5–16