

**Ist die Cyclin-abhängige Kinase 5 ein Target zur Therapie  
des Knochenmasseverlusts und der gestörten Frakturheilung  
unter Glukokortikoidtherapie?**

von Benjamin Thilo Krüger

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Ist die Cyclin-abhängige Kinase 5 ein Target zur Therapie  
des Knochenmasseverlusts und der gestörten Frakturheilung  
unter Glukokortikoidtherapie?**

von Benjamin Thilo Krüger  
aus Berlin

München 2022

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt am:

Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm

Mentor:

Univ.-Prof. Dr. Anita Ignatius

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Susanne Lauer

Tag der Promotion: 30. Juli 2022

*Everything will be okay in the end.*

*If it's not okay, it's not the end!*

*John Lennon*

*Für meine Mutter Gitta und meine beiden Väter Ernst und Carlo*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>I EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>II LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>3</b>
1.    GLUKOKORTIKOID-INDUZIERTER OSTEOPOROSE.....	3
1.1    Pathogenese der GIO.....	4
1.1.1    Einfluss von GK auf Osteoblasten .....	5
1.1.2    Einfluss von GK auf Osteoklasten .....	6
1.1.3    Einfluss von GK auf Osteozyten .....	6
1.2    Pharmakotherapie der GIO.....	7
1.2.1    Antiresorptiva – Bisphosphonate .....	7
1.2.2    Antiresorptiva – RANKL-Inhibitor – Denosumab.....	8
1.2.3    Osteoanabolika – Parathormon Analogon – Teriparatid .....	9
1.2.4    Osteoanabolika – Sklerostin Inhibitor – Romosuzumab .....	10
2.    DIE FRAKTURHEILUNG .....	11
2.1    Hämatombildungsphase .....	11
2.2    Inflammationsphase.....	12
2.3    Fibrovasculäre Phase.....	13
2.4    Knochenbildungsphase.....	14
2.5    Remodelingphase .....	15
3.    FRAKTURHEILUNG UNTER GK-THERAPIE.....	16
4.    IDENTIFIKATION EINES NEUEN OSTEOANABOLEN TARGETS – DIE CDK 5 .....	17
4.1    In-vitro-Identifikation von Suppressoren der Osteoblasten-differenzierung.....	18
4.2    Die Rolle der Cdk5 im Organismus .....	19
4.3    Roscovitin als pharmakologisches Target zur Hemmung der Cdk5 .....	20
5.    HYPOTHESEN .....	20
<b>III PUBLIKATION</b> .....	<b>21</b>
<b>IV DISKUSSION</b> .....	<b>54</b>
<b>V ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>59</b>
<b>VI SUMMARY</b> .....	<b>60</b>
<b>VII LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>61</b>
<b>VIII DANKSAGUNG</b> .....	<b>82</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

GK	Glukokortikoide
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
GIO	Glukokortikoid induzierte Osteoporose
RANKL	Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand
Cdk5	Cyclin-abhängige Kinase 5
Pred	Prednisolon
GR	Glukokortikoid Rezeptor
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
AP-1	activator protein 1
IRF3	interferon regulatory factor 3
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Runx2	Runt-related transcription factor 2
PPAR $\gamma$ 2	peroxisome-proliferator activator gamma 2
C/EBP $\alpha$	CCAAT enhancer binding protein alpha
Wnt	wingless int-1
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
DKK1	dickkopf-related protein 1
SFRP1	secreted frizzled-related protein 1
OPG	Osteoprotegerin
NO	Stickstoffmonoxid
PGE2	Prostaglandin E2
BP	Bisphosphonate
PTH	Parathormon
FDA	U.S. Food & Drug Administration
MSC	mesenchymale Stammzellen
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
IL	Interleukin
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
FGF	fibroblast growth factor
PDGF	platelet derived growth factor
TGF- $\beta$	transforming growth factor beta
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
C5aR1	C5 anaphylatoxin chemotactic receptor 1

---

EPC	Endotheliale Progenitorzellen
VEGF	vascular endothelial growth factor
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SDF-1-R	stromal cell-derived factor-1 receptor
Sox 9	SRY-Box Transcription Factor 9
BMU	basic multicellular unit
M-CSF	monocyte/macrophage colony-stimulating factor
MMP	Matrix-Metalloproteasen
siRNA	small interfering RNA
Alp	Alkalische Phosphatase
Nck	Cdc2-like kinase
Dex	Dexamethason
Erk	extracellular signal-regulated kinase
GC	glucocorticoid



## I EINLEITUNG

Seit 1948 das erste Mal die entzündungshemmende Wirkung von Glukokortikoiden (GK) am Menschen entdeckt wurde, wird diese Wirkstoffklasse für die Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt (GERABEK, 1990). GK spielen nach wie vor eine zentrale Rolle in der Behandlung entzündlicher Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) sowie in der Therapie verschiedenster Tumorerkrankungen (OFFERMANN, 2016). Weltweit wurde ungefähr 1 % aller Erwachsenen schon einmal über längere Zeit, das heißt drei Monate oder länger, mit GK behandelt (OVERMAN et al., 2013; ADAMI und SAAG, 2019). Im Schnitt entwickeln von diesen Patienten ungefähr 30 – 50 % eine sekundäre Osteoporose (MCDONOUGH et al., 2008). Da die initiale Erkrankung meist nicht anders zu therapieren ist, muss diese bisweilen gravierende Nebenwirkung in Kauf genommen werden. Die GK-induzierte Osteoporose (GIO) führt zu einem stark erhöhten Frakturrisiko, vor allem der Hüfte und Wirbelkörper (VAN STAA et al., 2000; AMICHE et al., 2016). Auslöser ist ein Ungleichgewicht in der Knochenhomöostase, das zu verstärkter Resorption bei gleichzeitig verringerter Knochenbildung führt (VAN STAA, 2006; LANE, 2019). Diesem Effekt liegt einerseits eine gesteigerte Lebensdauer und Aktivität der knochenabbauenden Osteoklasten und andererseits eine reduzierte Proliferation und Reifung der knochenaufbauenden Osteoblasten zugrunde. Zusätzlich führen GK zu einer gesteigerten Apoptose ausgereifter Osteoblasten (WEINSTEIN, 2010). Des Weiteren kommt es auch in der Osteozytenpopulation vermehrt zu Apoptosen, was zu einer Destruktion des mechanosensitiven osteozytären Kanal-Netzwerkes führt (CIANI et al., 2018). In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass der osteoanabole Effekt mechanischer Stimulation bei osteoporotischen Patienten verminderte Wirksamkeit zeigt (CARINA et al., 2020).

Derzeit gibt es verschiedene klinische Ansätze zur Senkung des Frakturrisikos. Die Erforschung von Therapieansätzen zur Verbesserung der Frakturheilung, die bei GIO gestört ist, beschränkt sich bisher im Wesentlichen auf präklinische Studien. Generell kann die medikamentöse

Therapie osteoporotischer Erkrankungen auf zwei Arten erfolgen und sollte im Idealfall durch nutritive Supplementation von Calcium, Vitamin D und K<sub>2</sub> unterstützt werden (KIDD, 2010; FISCHER et al., 2018). Der älteste und am weitesten verbreitete Ansatz ist die Verwendung antiresorptiver Pharmaka, zu denen Bisphosphonate und Denosumab, ein Antikörper gegen den Schlüssel-Osteoklasten-Aktivator Receptor Activator of Nuclear factor-kappa B Ligand (RANKL), gehören (ALLEN et al., 2016b; YANBEIY und HANSEN, 2019). Obwohl beide Medikamente in klinischen Studien eine gute Wirksamkeit zeigen, bringen sie eine große Zahl an Nebenwirkungen mit sich. Bisphosphonate beispielsweise führen oft zu gastrointestinalen Komplikationen und zeigen in einzelnen Fällen erhöhte Inzidenzen atypischer Femurfrakturen, Osteonekrosen und kardiovaskuläre Komplikationen (SCHILCHER et al., 2011a). Ein neuerer Ansatz ist die Verwendung osteoanaboler Pharmaka, wie das rekombinante Parathormon-Analogon Teriparatid oder der Sclerostin-Antikörper Romosuzumab. Die bisherigen Ergebnisse der osteoanabolen Therapien sind vielversprechend, obgleich die Medikamente relativ teuer und noch nicht langjährig klinisch erprobt sind (TAYLOR und SAAG, 2019).

In Vorarbeit zu dieser Dissertation konnte im Mausmodell der osteoanabole Effekt des Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) - Inhibitors Roscovitin (auch Seliciclib) sowohl im Knochen als auch in der Knochenregeneration gezeigt werden (AHMAD et al., 2021).

Ziel dieser Doktorarbeit war es folglich zu untersuchen, ob die negativen Effekte einer GIO auf den Knochen und die Frakturheilung durch Inhibition der Cdk5 kompensiert werden können. Dafür wurde ein Mausmodell der Prednisolon (Pred) induzierten GIO etabliert und in diesem Modell die negativen Auswirkungen einer GK Therapie auf den Knochen und die Frakturheilung nachgewiesen. Anschließend wurde versucht, diese Effekte durch systemische Applikation des Cdk5 Inhibitors Roscovitin aufzuheben.

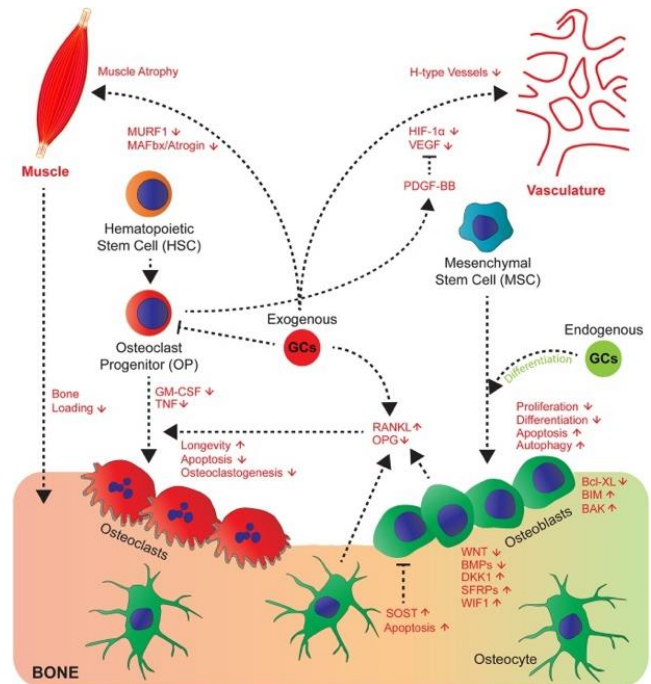
## II LITERATURÜBERSICHT

### 1. Glukokortikoid-induzierte Osteoporose

Glukokortikoide gehören seit langem zu einer der meistverwendeten Medikamentenklassen weltweit und sind für die Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen indiziert. Diese umfassen immunologische, rheumatologische, lungenassoziierte, gastrointestinale und tumoröse Ursachen (RHEN und CIDLOWSKI, 2005a). Die vielen positiven Effekte der GK bringen allerdings auch eine Vielzahl an Nebenwirkungen mit sich. Neben dem Cushing-ähnlichen Phänotyp, d.h. peripherer Insulinresistenz, Typ-2-Diabetes und Stammfettsucht, kann eine Langzeitbehandlung mit GK auch kardiovaskuläre Komplikationen wie Bluthochdruck, Herzinfarkte und Schlaganfälle bedingen (MCDONOUGH et al., 2008). Die mit einer Prävalenz von 30 – 50 % aller Behandelten aber häufigste Nebenwirkung ist die GIO (MCDONOUGH et al., 2008). Der Begriff Osteoporose beschreibt eine degenerative Erkrankung des Knochens, die sich in einem verstärkten Knochenabbau manifestiert. Charakteristisch sind eine Erniedrigung der Knochendichte und Zerstörung der Knochenstruktur, die in Folge zu einer signifikanten Erhöhung des Frakturrisikos führen (COMPSTON, 2018b). Das Frakturrisiko bei der GK induzierten, sekundären Osteoporose ist alters- und geschlechtsunabhängig und steigt dosisabhängig, vor allem während der ersten Behandlungsmonate, rapide an. Die höchste Prävalenz mit durchschnittlich 160 % höherem Risiko in Bezug auf nicht behandelte Kontrollen weisen die Wirbelkörper auf, gefolgt von Hüftfrakturen mit durchschnittlich 60 % erhöhtem Risiko und anderen Frakturen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von 30 % (VAN STAA et al., 2000; VAN STAA et al., 2001). Nach Absetzen der Therapie ist eine weitgehende Normalisierung der Knochenmasse innerhalb von ungefähr einem Jahr beschrieben (STAA et al., 2002; KANIS et al., 2004).

## 1.1 Pathogenese der GIO

GK weisen lipophile Eigenschaften auf, die es ihnen ermöglichen, die Zellmembran zu passieren. Im Zytoplasma binden sie an den GK-Rezeptor (GR), der inaktiviert in einem Multiprotein-Komplex, gebunden an Hitzeschockproteine und Chaperone, vorliegt (PRATT, 1993). Nach erfolgter Rezeptorinteraktion kann der GR entweder als Rezeptor-Dimer oder in seiner monomeren Form wirken. In seiner dimerisierten Form transloziert der Rezeptor in den Nucleus und bindet an der DNS an glucocorticoid response elements (GRE), wodurch durch Aktivierung der Gentranskription diverse Stoffwechselprozesse entweder verstärkt oder unterdrückt werden (TSAI et al., 1988). Die monomere Form des GR ist als ‚entzündungshemmende Form‘ bekannt, da sie durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie dem nuclear factor-kappa B (NF-κB), activator protein 1 (AP-1) oder interferon regulatory factor 3 (IRF3) die Transrepression entzündungsfördernder Gene auslöst (RHEN und CIDLOWSKI, 2005b; DE BOSSCHER et al., 2014). Mittlerweile gilt es allerdings als bewiesen, dass auch die Dimerisierung unabdingbar für die antiinflammatorische Wirkung ist (HÜBNER et al., 2015). Eine andere Form des GR liegt membrangebunden vor und beeinflusst vorrangig den mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg, der wiederum weitere Regulationsmechanismen ermöglicht (SUYEMITSU und TERAYAMA, 1975; BARTHOLOME et al., 2004). Neben den rezeptorassoziierten Mechanismen können GK auch mit Plasmamembranen



**Abbildung 1:** Exogene GK (rot) vermindern Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und induzieren Apoptose in Osteoblasten und Osteozyten über Beeinflussung des RANKL/OPG-Verhältnisses, sowie des Wnt-Signalweges. Sie hemmen auch die Differenzierung von Osteoklasten, verlängern aber deren Lebensspanne. Aus Ahmad M, Hachemi Y, Paxian K, Mengele F, Koenen M, Tuckermann J. A Jack of All Trades: Impact of Glucocorticoids on Cellular Cross-Talk in Osteoimmunology. Front Immunol 2019; 10: 2460 (AHMAD et al., 2019).

response elements (GRE), wodurch durch Aktivierung der Gentranskription diverse Stoffwechselprozesse entweder verstärkt oder unterdrückt werden (TSAI et al., 1988). Die monomere Form des GR ist als ‚entzündungshemmende Form‘ bekannt, da sie durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie dem nuclear factor-kappa B (NF-κB), activator protein 1 (AP-1) oder interferon regulatory factor 3 (IRF3) die Transrepression entzündungsfördernder Gene auslöst (RHEN und CIDLOWSKI, 2005b; DE BOSSCHER et al., 2014). Mittlerweile gilt es allerdings als bewiesen, dass auch die Dimerisierung unabdingbar für die antiinflammatorische Wirkung ist (HÜBNER et al., 2015). Eine andere Form des GR liegt membrangebunden vor und beeinflusst vorrangig den mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg, der wiederum weitere Regulationsmechanismen ermöglicht (SUYEMITSU und TERAYAMA, 1975; BARTHOLOME et al., 2004). Neben den rezeptorassoziierten Mechanismen können GK auch mit Plasmamembranen

interagieren und deren Funktion beeinflussen (ORCHINIK et al., 1991; BARTHOLOME et al., 2004). Über diese Wirkungsmechanismen greifen sie z.B. in den Calciumhaushalt ein, regulieren den Sexualsteroid-Hormonstatus und führen zu verstärkter Muskelatrophie (KLEIN et al., 1977; BIKLE et al., 1993; SATO et al., 2017). Diese Effekte leisten ihren Beitrag zur Entstehung einer GIO, doch sind es wohl die direkten Einflüsse auf die Knochenhomöostase, die den rapiden Abbau von Knochensubstanz bedingen.

### **1.1.1 Einfluss von GK auf Osteoblasten**

Die Applikation hoher exogener GK-Dosen führt zu verringerter Proliferation und Differenzierung sowie zur Apoptose reifer Osteoblasten, vermittelt über den monomeren GR und unter Beeinflussung des Transkriptionsfaktors Runt-related transcription factor 2 (Runx2) (WEINSTEIN et al., 1998; RAUCH et al., 2010a; MORIMOTO et al., 2017). Weiterhin lenken hohe GK Dosen die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen durch eine gesteigerte Expression der peroxisome-proliferator activator gamma 2 (PPAR $\gamma$ 2) und CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ) Signalwege in Richtung der adipogenen Linie und reduzieren so die Zahl an ausdifferenzierten Osteoblasten (LI et al., 2013; CONTADOR et al., 2015). Zusätzlich hemmen GK den wichtigen osteoanabolen wingless int-1 (Wnt) Signalweg (Abbildung 1), indem sie die Degradation der Wnt-Aktivatoren beta-Catenin und T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) stimulieren und zu erhöhter Expression der Wnt-Inhibitoren dickkopf-related protein 1 (DKK1) und secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) beitragen (SMITH und FRENKEL, 2005; WANG et al., 2005; WANG et al., 2008). Neben diesen osteoblastenspezifischen Effekten hemmen GK auch die Osteoprotegerin (OPG) Expression, stimulieren dessen Antagonisten RANKL und lösen so ein Ungleichgewicht im RANKL/OPG-Verhältnis aus (Abbildung 1) (HOFBAUER et al., 1999). Dies führt zu einer vermehrten Osteoklastenaktivierung und steigert so zusätzlich die verheerenden Effekte auf den Knochen.

### **1.1.2 Einfluss von GK auf Osteoklasten**

Neben den pro-apoptotischen Effekten auf Osteoblasten und deren Vorläuferzellen lösen GK auch in den Vorläuferzellen der Osteoklasten Apoptose aus (Abbildung 1) (WEINSTEIN et al., 2002). Im Gegensatz zu den Osteoblasten verlängern sie jedoch die Lebenszeit reifer Osteoklasten und nehmen damit direkten Einfluss auf das Verhältnis von Knochenauf- und -abbau zugunsten des Abbaus (JIA et al., 2006). Zusätzlich erhöhen sie über eine erhöhte RANKL-Expression die Osteoklastenaktivität und -differenzierung (HOFBAUER et al., 1999) und verändern deren normalerweise intermittierende Resorptionsaktivität hin zu einer kontinuierlichen, sodass schneller mehr Knochen abgebaut wird (SØE und DELAISSÉ, 2010).

### **1.1.3 Einfluss von GK auf Osteozyten**

Osteozyten sind die Mechanosensoren des Knochens (CROCKETT et al., 2011). Sie liegen eingebettet in Lakunen in der Knochenmatrix vor, stehen über dendritische Prozesse miteinander in Verbindung (PALUMBO et al., 1990; BENO et al., 2006) und greifen über die Expression von RANKL und OPG aktiv in die Knochenhomöostase ein (NAKASHIMA et al., 2011; WIJENAYAKA et al., 2011; XIONG et al., 2011). Sie regulieren die Osteoblastogenese über die Sekretion der Wnt Inhibitoren Sclerostin (WINKLER et al., 2003) und DKK1 (LI et al., 2006) sowie über die Aktivatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E2 (PGE2) (BAKKER et al., 2001). Hohe GK-Dosen verstärken die Expression der Inhibitoren und greifen auch über diesen Weg negativ in die Differenzierung der Osteoblasten ein (Abbildung 1). Des Weiteren induzieren GK Apoptose in den Osteozyten und hemmen damit zusätzlich auch die osteoanabolen Effekte der Mechanotransduktion (JILKA et al., 2013). Interessanterweise führen niedrige, eher physiologische Dosen zu einer verstärkten Autophagie und damit Protektion der Zellen (JIA et al., 2011).

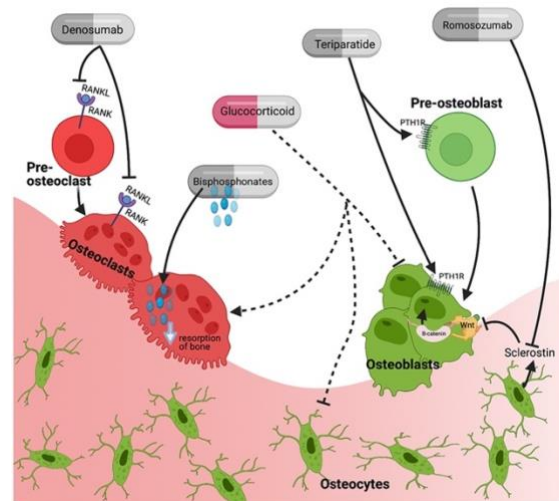
Zusammenfassend ist herauszustellen, dass die Applikation höherer GK Dosen die empfindliche Knochenhomöostase stört und zu einem massiven Knochenabbau durch stark erhöhte Resorption bei einer gleichzeitig verminderten Knochenneubildung führt.

## 1.2 Pharmakotherapie der GIO

Der GK vermittelten Knochenresorption kann medikamentös im Wesentlichen auf zwei verschiedene Arten entgegengewirkt werden. Die antiresorptive Therapie greift an der überschüssigen Aktivität der knochenabbauenden Osteoklasten an, während die osteoanabole Therapie auf den Aufbau der Knochensubstanz durch Stärkung der knochenaufbauenden Osteoblasten abzielt. Es ist ratsam, die Pharmakotherapie durch Dosisreduktion, Supplementation von Mineralstoffen und Vitaminen sowie Änderung der Lebensumstände zu unterstützen (LEIPE et al., 2021). Auch eine eventuell auftretende GK-induzierte Hyperglykämie steigert das Frakturrisiko und sollte entsprechend behandelt werden (COMPSTON, 2018a). Nutritiv sollten vor allem Calcium und Vitamin D supplementiert werden, denn die gemeinsame Applikation von 1000 mg/Tag Calcium mit 50.000 I.E. Vitamin D kann den GK-induzierten Knochenmasseverlust anfänglich reduzieren (ADACHI et al., 1996). Eine zusätzliche Supplementation von Vitamin K<sub>2</sub> begünstigt die Calciumaufnahme in den Knochen (KIDD, 2010). Obgleich keine klinischen Studien zur nutritiven Supplementation während der Frakturheilung unter GK-Therapie existieren, zeigt sich eine adäquate Calcium- und Vitamin D-Versorgung zumindest während der postmenopausalen Osteoporose als förderlich für die Knochenregeneration (FISCHER et al., 2017). Im Folgenden sollen die derzeit klinisch relevanten Pharmaka zur Behandlung der GIO dargestellt werden.

### 1.2.1 Antiresorptiva – Bisphosphonate

Bisphosphonate (BP) sind die am weitesten verbreiteten Medikamente zur Behandlung der überschießenden osteoklastenbedingten Knochenresorption.



**Abbildung 2:** Pharmazeutika zur Behandlung der GIO wirken entweder antiresorptiv (Bisphosphonate, Denosumab) und hemmen die Aktivität der Osteoklasten oder osteoanabol (Teriparatid, Romosuzumab) und stimulieren die Aktivität der Osteoblasten. Aus Kobza AO, Herman D, Papaioannou A, Lau AN, Adachi JD. Understanding and Managing Corticosteroid-Induced Osteoporosis. Open Access Rheumatol 2021; 13: 177-90 (KOBZA et al., 2021).

Sie binden irreversibel an den Knochen, werden so im Zuge des Resorptionsprozesses von den Osteoklasten aufgenommen und induzieren Apoptose (Abbildung 2) (MÖNKKÖNEN et al., 2001; ROELOFS et al., 2006). Weiterhin ist beschrieben, dass BP Osteoblasten vor GK-induzierter Apoptose schützen und somit möglicherweise auch an diesem Punkt dem Knochenabbau entgegenwirken (WEINSTEIN et al., 2002). Oral applizierte BP wie Etidronat, Alendronat oder Risedronat stabilisieren bei gleichzeitig niedrigen Behandlungskosten verlässlich die Knochenmineraldichte und stehen an erster Stelle zur Behandlung der GIO (ADACHI et al., 1997; SAAG et al., 1998; COHEN et al., 1999; LEIPE et al., 2021). Auch bei optimaler Darreichung weisen orale BP jedoch eine geringe Absorption auf und führen in vielen Fällen zu gastrointestinalen Nebenwirkungen, was die Patientencompliance wesentlich reduziert (SIRIS et al., 2016). Eine Weiterbehandlung kann dann durch intravenöse Applikation eines parenteralen BP wie Zoledronsäure erfolgen, dessen Nebenwirkungen sich im Allgemeinen auf Fieber und grippeähnliche Symptome beschränken (KUNZMANN et al., 1999; LI und DAVIS, 2003; ROELOFS et al., 2009). Schwere Nebenwirkungen während der BP-Therapie treten selten auf und umfassen die Osteonekrose des Kiefers und atypische Femurfrakturen (CAPSONI et al., 2006; SCHILCHER et al., 2011b). In einer systematischen Studie über die Wirksamkeit von BP in der Behandlung der GIO wird ein reduziertes Risiko um 43 % in Bezug auf Wirbelkörperfrakturen, sowie 21 % bezogen auf nicht-wirbelkörperassoziierte Frakturen beschrieben. Außerdem zeigte sich eine Verbesserung der Knochenmasse in der lumbalen Wirbelsäule und dem Oberschenkelhals (ALLEN et al., 2016a).

### **1.2.2 Antiresorptiva – RANKL-Inhibitor – Denosumab**

GK stimulieren die Osteoklastogenese, indem sie die RANKL-Expression verstärken und zu verringerter Expression des Gegenspielers OPG beitragen (HOFBAUER et al., 1999). Denosumab ist ein humaner, monoklonaler Antikörper gegen RANKL und blockiert auf diesem Weg die verheerenden GK-Effekte auf den Knochen (Abbildung 2) (HOFBAUER et al., 2009). Verglichen mit der Wirksamkeit eines Placebos bzw. dem BP Risedronat erreicht die Behandlung mit Denosumab während GIO eine signifikant verbesserte Knochenmineraldichte



(24 Monate nach Behandlungsbeginn: 6,2 % vs. 1,7 % in der Lendenwirbelsäule; 3,1 % vs. 0,0 % in der Hüfte), jedoch nur eine mäßige Verringerung des Frakturrisikos im Behandlungszeitraum (8,8 % vs. 9,1 %) (SAAG et al., 2019). Risiken in der Behandlung bestehen vor allem im Absetzen der Therapie. Neben einer Hyperkalziämie (SØLLING et al., 2016) ist ein sogenannter ‚Rebound Effekt‘ beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen rapiden Abfall der Knochenmasse nach Absetzen des Medikaments, der sich im schlimmsten Fall in Wirbelkörper- bzw. Oberschenkelhalsfrakturen manifestiert (LAMY et al., 2017; MCCLUNG et al., 2017). Um diesen Effekt zu erkennen und rechtzeitig entgegenzuwirken, soll nach Empfehlung der European Calcified Tissue Society eine Reevaluation nach spätestens fünf Jahren erfolgen und bei Hochrisikopatienten eine alternative, antiresorptive Behandlung angeschlossen werden (TSOURDI et al., 2017).

### **1.2.3 Osteoanabolika – Parathormon Analogon – Teriparatid**

Ein ganz anderer Ansatz zur Stabilisierung der Knochenmasse unter GK-Therapie ist die Stimulation der Osteoblastogenese, um dem Knochenabbau mit verstärktem Aufbau entgegenzuwirken. Einer der ersten Ansätze für ein solches Medikament war die pharmazeutische Anwendung des Nebenschilddrüsenhormons Parathormon (PTH). Vor ungefähr 90 Jahren wurde das erste Mal der osteoanabole Einfluss des PTH auf den Knochen beschrieben (SELYE, 1932). In den USA wurde 2002 erstmals eine rekombinante Form des Hormons, das Teriparatid, als Medikament zur Behandlung der Osteoporose zugelassen. In einer ersten klinischen Studie mit Patienten, die unter GIO litten, konnte gezeigt werden, dass das rekombinante PTH 1-34 die negativen Effekte einer GIO aufheben kann (Abbildung 2) (LANE et al., 1998). Weitere randomisierte, klinische Studien haben Teriparatid mit einem BP verglichen und zeigten eine signifikante Verbesserung der Knochenmineraldichte in der lumbalen Wirbelsäule und Hüfte sowie eine verringerte Inzidenz für Wirbelkörperfrakturen (SAAG et al., 2007; SAAG et al., 2009; DEVOGELAER et al., 2010; GLÜER et al., 2013). Die wesentliche Hürde für eine breite Verwendung von Teriparatid stellt der hohe Preis im Vergleich zu anderen, vor allem antiresorptiven Pharmaka dar. Als Nebenwirkungen sind zentralnervöse Störungen wie

Kopfschmerzen, Müdigkeit und Benommenheit sowie in sehr seltenen Fällen die Bildung von Osteosarkomen beschrieben (HARPER et al., 2007; SUBBIAH et al., 2010), was die U.S. Food & Drug Administration (FDA) dazu veranlasste, eine Anwendungszeit von nicht mehr als zwei Jahren zu empfehlen (U.S. FOOD & DRUG ADMINISTRATION, 2009). Im Zwischenbericht einer 15-Jahresstudie konnte nach den ersten sieben Jahren allerdings kein kausaler Zusammenhang zwischen einer Teriparatid-Behandlung und der Bildung von Osteosarkomen festgestellt werden (ANDREWS et al., 2012).

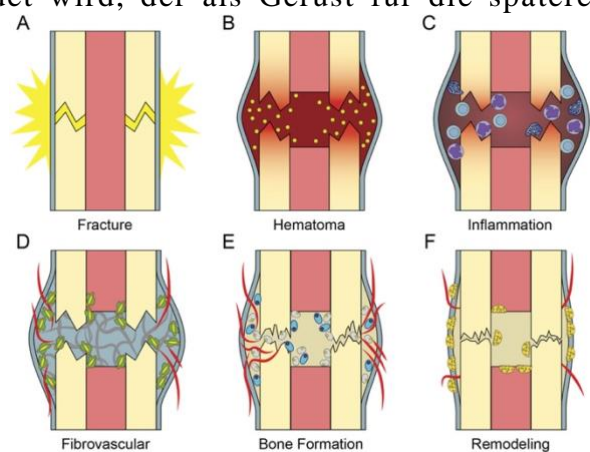
#### **1.2.4 Osteoanabolika – Sklerostin Inhibitor – Romosuzumab**

Ein anderer osteoanaboler Ansatz ist die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs. Wnt fungiert als Ligand für einen Rezeptorkomplex, an dessen Ende eine Reihe von Genen stehen, die zur Aktivierung und Differenzierung von Osteoblasten beitragen und damit einen essentiellen Einfluss auf die Knochenbildung haben. Sklerostin wirkt als Inhibitor dieses wichtigen Signalweges und damit als Upstream-Inhibitor der Osteoblastogenese (CANALIS, 2013). Eine Mutation im Sklerostin-Gen SOST resultiert in der Erkrankung Sklerostose bzw. dem Van-Buchem-Syndrom. Sie sind von einem pathologisch starken Anstieg der Knochenmineraldichte gekennzeichnet, der sich in einer Osteosklerose des Schädels und der Schädelkalotte sowie einer Syndaktylie manifestiert (SEBASTIAN und LOOTS, 2018). Das Interesse für einen therapeutischen Nutzen entstand, nachdem Li et al. in einer SOST defizienten Mauslinie eine Zunahme der Knochenmasse über 50 % und eine über 9-fach höhere Knochenformationsrate beobachtet hatten (LI et al., 2008). Romosuzumab ist ein monoklonaler Antikörper mit starker Affinität zu Sklerostin. Er bindet den Wnt-Inhibitor und hemmt dessen Aktivität, was zu einer signifikant verstärkten Osteogenese, Knochenmineraldichte und schlussendlich Knochenstärke führt (Abbildung 2) (PADHI et al., 2011). Derzeitige Phase-2- und Phase-3-Studien zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose zeigen eine bis zu 75 % geringere Inzidenz für Wirbelkörperfrakturen (MCCLUNG et al., 2014; COSMAN et al., 2016; LANGDAHL et al., 2017). Saag et al. beobachteten während der Therapie vermehrt kardiovaskuläre Nebenwirkungen (SAAG et al., 2017). Obwohl

derzeit noch keine Studien zu GIO vorliegen, ist die Verstärkung des Wnt-Signalweges auch hier ein vielversprechendes Target.

## 2. Die Frakturheilung

Die Frakturheilung lässt sich im Wesentlichen in die primäre oder direkte und die sekundäre oder Kallus-Heilung, die endochondrale und intramembranöse Knochenbildung umfasst, unterteilen (MARSELL und EINHORN, 2011). Bei der intramembranösen Ossifikation gehen knochenbildende Osteoblasten direkt aus mesenchymalen Stammzellen hervor und bilden Knochenmatrix (THOMPSON et al., 2002). Die endochondrale Ossifikation läuft über eine Zwischenstufe ab, bei der ein weicher, knorpeliger Kallus gebildet wird, der als Gerüst für die spätere Synthese von Knochenmatrix dient (HU et al., 2017). In der Literaturübersicht dieser Dissertation wird lediglich auf die sekundäre Frakturheilung eingegangen, da die Mehrzahl der klinisch auftretenden Frakturen auf diese Weise heilen und ein Frakturmodell für die Kallusheilung verwendet wurde (RÖNTGEN et al., 2010). Die sekundäre Frakturheilung läuft in fünf ineinander übergehenden Phasen ab und wird im Folgenden kurz beschrieben (BAHNEY et al., 2019).



**Abbildung 3:** Der initialen Fraktur (A) folgt die Bildung eines Frakturhämatoms (B). Aus dem Hämatom werden Chemokine freigesetzt und es kommt lokal zur Inflammation (C). Nach Abklingen der Entzündungsreaktion wandern MSCs ein und bilden ein weiches Kallusgerüst (D). Anschließend kommt es zur Formation von Geflechtknochen, vorwiegend durch endochondrale Ossifikation (E). Final erfolgt ein Remodeling von Geflecht- zu Lamellenknochen (F). Aus Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD. Cellular biology of fracture healing. J Orthop Res 2019; 37: 35-50 (BAHNEY et al., 2019).

### 2.1 Hämatombildungsphase

Das initiale Trauma führt zur Verletzung von Gefäßen und Kapillaren, wodurch es lokal zum Austritt von peripherem und intramedullärem Blut kommt. Durch die einsetzende Koagulation formt sich ein Hämatom, das die Frakturrenden verschließt und weiteren Blutfluss unterbindet (Abbildung 3) (MA et al., 2019). Ein frühes, bis zu vier Tage altes Hämatom ist

unabdingbar für eine funktionierende Frakturheilung, weist aber noch kaum osteoinduktive Eigenschaften auf (GRUNDNES und REIKERÅS, 1993; PARK et al., 2002). Ein älteres Hämatom hingegen enthält erste eingewanderte mesenchymale Stammzellen (MSC) und zeigt osteoinduktive Eigenschaften (MIZUNO et al., 1990; OE et al., 2007). Die Differenzierung der MSCs wird maßgeblich durch die metabolischen Bedingungen, beispielsweise die Sauerstoffsättigung, bestimmt (BURKE et al., 2013). Im frakturierten Knochen kommt es bis zu sieben Tage nach dem Trauma zu einem bis zu 50 % reduzierten Blutfluss (GRUNDNES und REIKERÅS, 1992). Die so entstandene Hypoxie bedingt eine Differenzierung von Osteochondroprogenitorzellen in Richtung der chondrogenen Linie und begünstigt die endochondrale Ossifikation (BURKE et al., 2013). Normoxie hingegen vermindert die chondrogene Differenzierung der MSCs, hemmt damit die endochondrale Heilung und unterstützt die intramembranöse Ossifikation (BURKE et al., 2013). Während der Hämatombildung kommt es zu einer Ausschüttung einer Vielzahl an Immunzellen und Mediatoren, die die Inflammationsphase initiieren.

## **2.2        Inflammationsphase**

Ein funktionierendes Immunsystem ist essentiell für den Frakturheilungsprozess (RAPP et al., 2016). Das initial gebildete Hämatom entfaltet eine chemotaktische Wirkung und rekrutiert durch Freisetzung diverser Zytokine, wie zum Beispiel dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) RANKL oder dem monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) Zellen des Immunsystems zum Ort der Fraktur (Abbildung 3) (KON et al., 2001; CHU et al., 2014). Die erste Welle der zellulären Antwort bilden neutrophile Granulozyten, die nach kurzer Zeit durch Makrophagen unterstützt bzw. ersetzt werden (ANDREW et al., 1994; CHUNG et al., 2006). Ihre Funktion ist zunächst das Wund-Debridement und der Abtransport von zellulärem Detritus. Weiterhin setzen vor allem Makrophagen eine Vielzahl von Zytokinen frei und beeinflussen damit Chemotaxis, Vaskularisation und letztendlich den Erfolg der Frakturheilung (WU et al., 2013). Die ersten detektierbaren Faktoren sind die Wachstumsfaktoren fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )

(BARNES et al., 1999), gefolgt von IL-1, 6 und dem granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (EINHORN et al., 1995). Sie spielen zusammen mit TNF $\alpha$  eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von Osteoprogenitorzellen, der Proliferation von Osteoblasten sowie der Kollagensynthese (RODAN, 1998; PRYSTAZ et al., 2018; PFEIFFENBERGER et al., 2021).

Neben der zellulären Immunantwort spielt auch die humorale Komponente, vor allem das Komplementsystem, eine wesentliche Rolle in der Frakturheilung (IGNATIUS et al., 2011). Mäuse mit einer Defizienz in den Schlüsselmolekülen C3 und C5 zeigen eine beeinträchtigte Frakturheilung, wobei dieser Effekt vor allem auf die Komplementkomponente C5 zurückzuführen ist (EHRNTHALLER et al., 2013). Der Rezeptor C5 anaphylatoxin chemotactic receptor 1 (C5aR1) ist ebenfalls notwendig für eine funktionierende Frakturheilung, da ein Knockout zu einer insuffizienten Knorpel-Knochen-Transformation und damit zu einer verzögerten Frakturheilung führt (KOVTUN et al., 2017). Interessanterweise kann die pharmakologische Antagonisierung des Rezeptors die überschießende Immunreaktion während eines schweren Traumas regulieren und die Beeinträchtigung der Frakturheilung aufheben (RECKNAGEL et al., 2012).

Den Abschluss der Inflammation bildet eine IL-6 vermittelte Umwandlung von M1- zu M2-Makrophagen, die zum Abklingen der Inflammation führt und den Übergang in die fibrovaskuläre Phase initiiert (MAUER et al., 2014).

### **2.3 Fibrovaskuläre Phase**

Sobald die inflammatorischen Prozesse abklingen, rückt die Wiederherstellung einer intakten Gefäßversorgung in den Vordergrund. Sie ist unabdingbar für den Abtransport zellulärer Abfallprodukte und der Perfusion des Frakturkallus mit Sauerstoff (LU et al., 2006). Um die Blutversorgung wiederherzustellen, sprießen Kapillare entweder aus anderen intakten Blutgefäßen aus (Angiogenese) oder werden de novo durch Endotheliale Progenitorzellen (EPC) gebildet (Vaskulogenese) (ISNER und ASAHARA, 1999). Die Ursprünge der Vorläuferzellen sind vielfältig und

umfassen u.a. das Periosteum (YUASA et al., 2014), das Knochenmark (MATSUMOTO et al., 2008) oder frei zirkulierende EPCs (TEPPER et al., 2005). Sowohl Angio- als auch Vaskulogenese werden entscheidend über die Expression des vascular endothelial growth factor (VEGF) reguliert (JAKEMAN et al., 1993). Mäuse, die mit einem VEGF-Inhibitor behandelt werden, zeigen eine stark beeinträchtigte Frakturheilung (JACOBSEN et al., 2008), während die Applikation von rekombinantem VEGF die Knochenheilung signifikant verbessert (ECKARDT et al., 2005). Die Revaskularisierung bringt eine Invasion von MSCs aus Periosteum, Endosteum und Knochenmark mit sich, die nischenspezifisch chondrogene und osteogene Einflüsse auf die Frakturheilung haben (Abbildung 3) (COLNOT, 2009). Die molekulare Regulation der MSC Rekrutierung obliegt verschiedenen Zytokinen, besonders aber dem stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) und dessen Rezeptor SDF-1-receptor (SDF-1-R) (KITAORI et al., 2009). Eine Inhibition des Faktors oder dessen Rezeptors führt zu einer gehemmten MSC-Chemotaxis und beeinträchtigter Knochenbildung (KITAORI et al., 2009), während die Applikation von SDF-1 einen stimulierenden Effekt auf die Frakturheilung zeigt (LI et al., 2011).

Während des Prozesses der endochondralen Ossifikation bilden besonders die Periosteum-assoziierten MSCs die Grundlage der SRY-Box Transcription Factor 9 (Sox9) positiven Chondrozyten, die über Synthese von Kollagen 2 (BELL et al., 1997; LEFEBVRE et al., 1997) und Aggrecan (HAN und LEFEBVRE, 2008) den weichen Frakturkallus als avaskuläres, knorpeliges Gerüst formen (Abbildung 3) (HATTORI et al., 2010).

#### **2.4 Knochenbildungsphase**

Zu Beginn der Knochenbildungsphase vollziehen Sox9-positive Chondrozyten ihre terminale Differenzierung und erreichen durch eine massive Volumenvergrößerung einen hypertrophen Zustand (COOPER et al., 2013; HU et al., 2017). Hypertrophe Chondrozyten sind hochgradig angiogen und führen erneut zu einer VEGF-vermittelten Revaskularisierung des Kallus (GERBER et al., 1999; COLNOT und HELMS, 2001). In diesem Zustand verlieren die Chondrozyten ihr Sox9-Expressionsprofil, was die Repression der osteoinduktiven Faktoren Runx2 und  $\beta$ -Catenin aufhebt (DY et al., 2012) und die Expression osteogener Promotoren wie Osterix,

Osteopontin und Osteocalcin anregt (GERSTENFELD und SHAPIRO, 1996). In Konsequenz kommt es zur Kalzifizierung des Kallusgerüsts und Bildung von Geflechtknochen durch Transdifferenzierung hypertropher Chondrozyten zu Osteoblasten und Osteozyten (Abbildung 3) (GERSTENFELD et al., 2002; YANG et al., 2014a; YANG et al., 2014b; LUI et al., 2019).

Ein anderes Modell (KRONENBERG, 2003) erklärt die endochondrale Knochenneubildung beginnend mit der Apoptose hypertropher Chondrozyten. In den so entstandenen Leerräumen siedeln sich Osteoprogenitorzellen an, die durch die Revaskularisierung in den Kallus migriert sind. Dort angekommen differenzieren sie zu Osteoblasten und beginnen mit der Synthese von Geflechtknochen, sodass es zu einer sukzessiven knöchernen Durchbauung des knorpeligen Kallus kommt (KRONENBERG, 2003).

Beide Modelle haben ihre Berechtigung und auch die Migration osteoblastärer Progenitorzellen ist beschrieben (MAES et al., 2010). Vermutlich existieren beide Mechanismen nebeneinander.

## **2.5 Remodelingphase**

Im letzten Schritt der Frakturheilung wird der provisorisch gebildete Geflechtknochen in einen stabilen, maturen Lamellenknochen umgewandelt. Dieser Prozess ähnelt dem physiologischen Knochenremodelling und ist im Wesentlichen durch die Aktivität der Osteoklasten bestimmt, die in enger Verbindung mit den Osteoblasten in einer sogenannten ‚basic multicellular unit‘ (BMU) arbeiten (FROST, 1990). Die BMU definiert einen engen Bereich, an dessen Beginn der osteoklastengesteuerte Knochenabbau und an dessen Ende der osteoblastengesteuerte Knochenaufbau stattfindet (HATTNER et al., 1965). Zu Beginn werden Osteoklasten-Progenitorzellen zur Knochenoberfläche rekrutiert und aktiviert, was im Wesentlichen durch RANKL und monocyte/macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) induziert und durch  $TNF\alpha$ , IL1 und Notch2 reguliert wird (YOSHIDA et al., 1990; LAM et al., 2000; FUKUSHIMA et al., 2008; JULES et al., 2012). Am Knochen angekommen beginnen die Osteoklasten mit der Resorption. Sie formen einen Faltsaum und schließen den Bereich um ihre

Resorptionslakune mit einer sogenannten ‚sealing zone‘ ein (VÄÄNÄNEN et al., 2000). In der so gebildeten Howship-Lakune erfolgt die Demineralisierung der Knochenmatrix über ein saures Milieu, das über eine vakuoläre Protonenpumpe hergestellt wird (BLAIR et al., 1989). Die verbliebene Kollagenmatrix wird anschließend von Proteasen aus der Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Cathepsin K degradiert (DELAISSÉ et al., 2003). Das finale Schicksal des Osteoklasten ist die Apoptose, was zum Ende des Resorptionsprozesses führt (XING und BOYCE, 2005). Der Abbau der Matrix sowie die Apoptose der Osteoklasten setzen wiederum osteoinduktive Faktoren frei und koppeln den Knochenabbau eng mit dem Aufbau von Lamellenknochen in den Resorptionslakunen (Abbildung 3) (SIMS und MARTIN, 2014).

### **3. Frakturheilung unter GK-Therapie**

Bisher ist klinisch sehr wenig über die Frakturheilung unter GK-Einfluss bekannt. Studien beschränken sich im Wesentlichen auf das Risiko, eine Fraktur zu erleiden und weniger auf die anschließende Heilung. Präklinische Studien beschreiben einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung sowohl in Mäusen (SANDBERG und ASPENBERG, 2015; LIU et al., 2018), als auch in Ratten (NEWMAN et al., 1987) und Kaninchen (LYRITIS et al., 1975; WATERS et al., 2000). In den analysierten Tiermodellen ist die Knorpel-Knochen-Transformation und damit die Formation neuen, qualitativ hochwertigen Knochens gestört. Dies resultiert in schlechteren biomechanischen Eigenschaften der Frakturkalli und schlussendlich in einer schlechteren Frakturheilung. Die molekularen Mechanismen der kompromittierten Frakturheilung sind bisher allerdings weitestgehend unklar.

Die genannten Studien zeigen konsistent, dass exogen applizierte GK einen negativen Einfluss auf die Frakturheilung haben. Die Rolle physiologisch vorkommender, endogener GK wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein globaler, induzierbarer Knockout des GR zu einer verzögerten Frakturheilung führt. Ursächlich hierfür waren eine überschießende Immunantwort und eine gestörte Knorpel-Knochen-Transformation (RAPP et al., 2018).



Zellspezifische Knockouts des GK-Signalwegs zeigen, dass eine osteoblastenspezifische Deletion keinen Einfluss auf die Knochenregeneration hat (WEBER et al., 2010), wohl aber eine chondroblastenspezifische (TU et al., 2014). Die antiinflammatorischen GK-Effekte werden maßgeblich über die Dimerisierung des GR vermittelt. Wir konnten zeigen, dass eine beeinträchtigte Dimerisierung des GR keinen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung hat, in einem Modell der Hyperinflammation (Fraktur kombiniert mit Thoraxtrauma) jedoch die Immunantwort signifikant reduziert und damit die kompromittierte Frakturheilung verbessert (HACHEMI et al., 2021).

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass endogene GK notwendig für eine funktionierende Frakturheilung sind, indem sie Inflammation und Knorpel-Knochen-Transformation modulieren. Strapaziert man dieses filigrane Gleichgewicht jedoch durch Zufuhr exogener GK weit oberhalb der physiologischen Konzentrationen, wird die Frakturheilung schwer beeinträchtigt. Patienten, die längere Zeit auf exogene GK angewiesen sind, benötigen deshalb pharmakologische Therapien, um den negativen Effekten auf den Knochen und dessen Heilung nach Frakturen entgegenzuwirken.

#### **4. Identifikation eines neuen osteoanabolen Targets – Die Cdk 5**

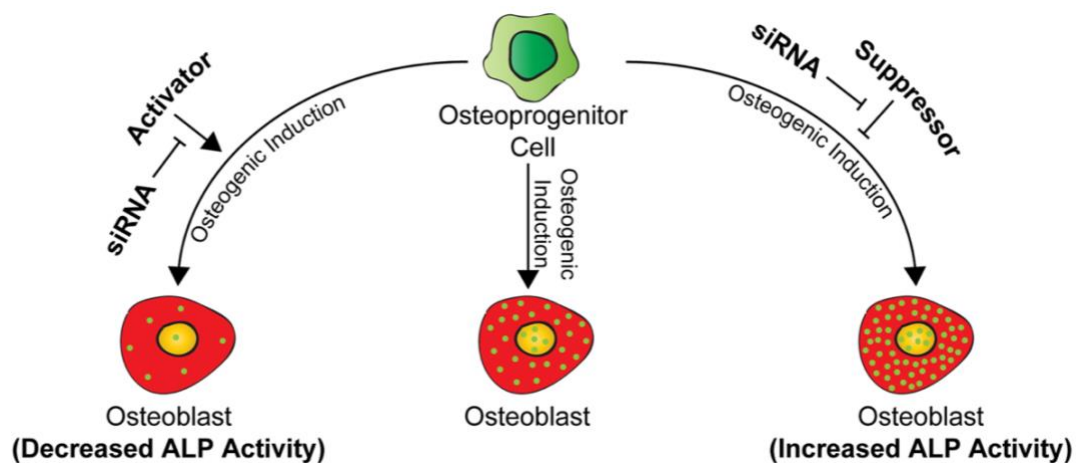
Die Behandlung osteoporotischer Erkrankungen findet wie beschrieben im Wesentlichen durch Antiresorptiva statt. Sie stellen eine zuverlässige Möglichkeit dar, die Knochenmasse zu stabilisieren und das Frakturrisiko zu senken, können verlorene Knochenqualität aber nur unwesentlich wiederherstellen. Eine Alternative sind Osteoanabolika, die dem erhöhten Knochenabbau durch eine gesteigerte Osteoblastenproliferation und -differenzierung entgegenwirken. Die derzeit vielversprechendsten Wirkstoffe Teriparatid und Romosuzumab zeigen in ersten Studien eine überlegene Regenerationskapazität, bringen allerdings das wenn auch geringe Risiko von Osteosarkomen sowie hohe Produktionskosten bei geringer Produktstabilität mit sich (SUBBIAH et al., 2010; LYU, 2017). Des Weiteren sind Ergebnisse bezüglich Verbesserungen in der Knochenregeneration kontrovers und in Bezug auf Romosuzumab wenig

erfolgsversprechend (SHI et al., 2016; BHANDARI et al., 2020; SCHEMITSCH et al., 2020; GORTER et al., 2021; NIEVES et al., 2021).

Die Identifikation neuer pharmakologischer Targets mit osteoanaboler Wirkung stellt also ein wesentliches Ziel in der Erforschung der Osteoporose und Knochenregeneration dar.

#### 4.1 In-vitro-Identifikation von Suppressoren der Osteoblastendifferenzierung

Eine Möglichkeit, die Osteoblastogenese zu steigern, ist das pharmakologische Targetting osteoblastärer Suppressoren. Die Grundlage dieser Dissertation bilden Ergebnisse eines auf small interfering RNA (siRNA) basierenden Screeningverfahrens, das über einen neuartigen Ansatz die Möglichkeit zur Identifikation wesentlicher Suppressoren bietet (AHMAD et al., 2018).



**Abbildung 4:** Primäre Osteoblasten werden mit siRNA gegen bekannte Regulatorgene der Osteoblastendifferenzierung transfiziert und osteogen differenziert. Der Knockdown eines Aktivators führt zu verringerter, der Knockdown eines Suppressors zu gesteigerter Alp-Aktivität. Die Quantifizierung der Aktivität erfolgt kolorimetrisch. Aus Ahmad M, Kroll T, Jakob J, Rauch A, Ploubidou A, Tuckermann J. Cell-based RNAi screening and high-content analysis in primary calvarian osteoblasts applied to identification of osteoblast differentiation regulators. *Scientific Reports* 2018; 8: 14045 (AHMAD et al., 2018).

Neonatale Osteoblasten aus der Schädelkalotte wurden hierfür mit siRNAs gegen wesentliche Regulatoren der Osteoblastogenese transfiziert und anschließend osteogen differenziert (Abbildung 4) (JONASON und O'KEEFE, 2014). Anschließend wurde ein high-content Screening-Verfahren genutzt (KROLL et al., 2016), um über die Identifikation eines der wesentlichen Markerproteine des differenzierten Osteoblasten, der Alkalischen Phosphatase (Alp) (VIMALRAJ, 2020), die Differenzierung zu quantifizieren (Abbildung 4).

Final erfolgte eine computergestützte Analyse der Färbeintensitäten. So konnten 320 potentielle Regulatoren der Osteoblastogenese auf ihre Funktion hin untersucht und fünf potentielle Suppressoren identifiziert werden (AHMAD et al., 2018). Die Cdk5 stellt als einer dieser Inhibitoren einen bislang vollkommen unbekanntem Regulator der Osteoblastogenese dar.

#### 4.2 Die Rolle der Cdk5 im Organismus

Die Cdk5 bzw. Cdc2-like kinase (Nck1) wurde 1992 erstmals von Hellmich und Kollegen entdeckt und ein Jahr später als Cdk5 beschrieben (HELLMICH et al., 1992). Im Gegensatz zu allen anderen Zyklus-abhängigen Kinasen ist sie nicht direkt am Zellzyklus beteiligt, kann aber verschiedene Komponenten modulieren (CHANG et al., 2012). Weiterhin wird die Cdk5 nicht über eine Zyklusstruktur aktiviert, sondern durch Bindung der Proteine p35 und p39 (LEW et al., 1994; TANG et al., 1995). Ihre pharmakologische Inhibition mit dem kleinen Molekül Roscovitin stellt für die Behandlung verschiedener Tumorarten (CICENAS et al., 2015) sowie der zystischen Fibrose (MEIJER et al., 2016) und rheumatoiden Arthritis (SIEBERT et al., 2020) einen vielversprechenden Therapieansatz dar und wird bereits in klinischen Studien erforscht (BENSON et al., 2007; LE TOURNEAU et al., 2010).

Eine Analyse der mRNA-Expression im murinen Gewebe konnte herausstellen, dass Cdk5 auch im Knochengewebe eine hohe Expression aufweist (DIEZ-ROUX et al., 2011; AHMAD et al., 2021). In einem ersten Validierungsschritt konnte anschließend gezeigt werden, dass ein siRNA-Knockdown der Cdk5 in murinen und humanen Osteoblasten zu einer erhöhten osteoblastären Differenzierung führt (AHMAD et al., 2021). Weiterhin zeigten Ahmad et al., dass auch *in vivo* ein osteoblastenspezifischer Knockout über ein Cre-loxP-System zu einer erhöhten Expression an frühen (*Sp7*, *Alpl*) sowie späten (*Bglap*, *Ibsp*) Markern der Osteoblastogenese und zu einer Zunahme der Knochenmasse führt.

### 4.3 Roscovitin als pharmakologisches Target zur Hemmung der Cdk5

Nach der erfolgreichen molekularbiologischen Blockade der Cdk5 sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, wurde auch die Wirkung des pharmakologischen Cdk5-Inhibitors Roscovitin überprüft (AHMAD et al., 2021). In ersten *in-vitro* Versuchen an murinen Osteoblasten führte eine Roscovitin Applikation zu einer signifikant erhöhten Expression osteoblastenspezifischer Differenzierungsmarker. Die anschließende *in-vivo* Verifizierung in der Maus zeigte eine signifikante Erhöhung der Osteoblastenzahl und -aktivität in den analysierten Knochen. Dies führte zu einer Zunahme des Kochenvolumens im trabekulären wie auch kortikalen Knochenkompartiment. Diesen Ergebnissen zugrundeliegend haben wir die Frakturheilung in einem murinen Femurfrakturmodell analysiert und konnten auch hier eine signifikante Steigerung der Knochenbildung nach 14 und 23 Tagen beobachten (AHMAD et al., 2021).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Hemmung der Cdk5 mit Roscovitin einen positiven Effekt auf die Osteoblastogenese hatte, die Knochenmasse signifikant erhöhte und die Frakturheilung deutlich verbesserte. Damit könnte die Cdk5 ein neues osteoanaboles Target darstellen.

## 5. Hypothesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen überprüft:

1. Die systemische Hemmung der Cdk5 mit deren Inhibitor Roscovitin hebt die negativen Effekte einer GIO auf das Skelett auf.
2. Die Cdk5 Inhibition mit Roscovitin verbessert die Frakturheilung unter dem negativen Einfluss einer systemischen GK-Therapie.

### III PUBLIKATION

Die Ergebnisse, aus denen diese Dissertation hervorgegangen ist, wurden im Jahr 2022 im Journal Biomedicines publiziert (KRÜGER et al., 2022). Teile dieser Studie wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

- **Krüger BT**, Steppe L, Haffner-Luntzer M, Lee S, Tuckermann J, Ignatius A, Ahmad M. Inhibition of Cdk5 ameliorates bone loss but does not improve fracture healing in glucocorticoid-treated mice. 68th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS); February 04-08th; 2022.
- **Krüger BT**, Ahmad M, Steppe L, Haffner-Luntzer M, Lee S, Tuckermann J, Ignatius A. Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 improves fracture healing in mice. 3 MuSkITYR Symposium; 08.–09.11.2021; Göttingen: Osteologie; 2021. p. 337.
- **Krüger BT**, Ahmad M, Steppe L, Haffner-Luntzer M, Tuckermann J, Ignatius A. Systemic inhibition of cyclin-dependent kinase 5 increases fracture healing in mice. DGOU, DGU & BVOU Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie Vereinte Vielfalt; 26.-29.10.2021; Berlin 20.

## **Inhibition of Cdk5 Ameliorates Skeletal Bone Loss in Glucocorticoid-Treated Mice**

**Benjamin Thilo Krüger**, Lena Steppe, Sabine Vettorazzi, Melanie Haffner-Luntzer, Sooyeon Lee, Ann-Kristin Dorn, Anita Ignatius, Jan Tuckermann and Mubashir Ahmad

**Abstract:** Glucocorticoids (GCs) are widely used to treat inflammatory diseases. However, their long-term use leads to glucocorticoid-induced osteoporosis, increasing morbidity and mortality. Both anabolic and anti-resorptive drugs are used to counteract GC-induced bone loss, however, they are expensive and/or have major side effects. Therefore, identifying new targets for cost-effective, small-molecule inhibitors is essential. We recently identified cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) as a suppressor of osteoblast differentiation and showed that its inhibition with roscovitine promoted osteoblastogenesis, thus improving the skeletal bone mass and fracture healing. Here, we assessed whether Cdk5 knockdown or inhibition could also reverse the GC-mediated suppression of osteoblast differentiation, bone loss, and fracture healing. We first demonstrated that *Cdk5* silencing abolished the dexamethasone (Dex)-induced downregulation of alkaline phosphatase (Alp) activity, osteoblast-specific marker gene expression (*Runx2*, *Sp7*, *Alpl*, and *Bglap*), and mineralization. Similarly, Cdk5 inhibition rescued Dex-induced suppression of Alp activity. We further demonstrated that Cdk5 inhibition reversed prednisolone (Pred)-induced bone loss in mice, due to reduced osteoclastogenesis rather than improved osteoblastogenesis. Moreover, we revealed that Cdk5 inhibition failed to improve Pred-mediated impaired fracture healing. Taken together, we demonstrated that Cdk5 inhibition with roscovitine ameliorated GC-mediated bone loss but did not reverse GC-induced compromised fracture healing in mice.

**Keywords:** osteoblasts; osteoclasts; osteocytes; bone; cyclin-dependent kinase 5; roscovitine; glucocorticoids; glucocorticoid-induced osteoporosis; fracture healing

## 1. Introduction

Glucocorticoids (GCs) are potent anti-inflammatory agents to treat inflammatory diseases including rheumatoid arthritis, chronic obstructive pulmonary disease, and inflammatory bowel disease [1–5]. However, long-term GC therapy is associated with glucocorticoid-induced osteoporosis (GIO), the most prevalent form of secondary osteoporosis [6,7]. The adverse effects of long-term GC therapy on bone increase the risk for fragility fractures in a dose-dependent manner, which exacerbates the cause of disability and mortality [8,9]. Supraphysiological GC levels reduce bone mass primarily by decreasing osteoblast function and bone formation [10–17]. In addition, high-dose GCs increase the receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and reduce osteoprotegerin (OPG) levels, thus inducing osteoclastogenesis and bone resorption [14,18,19].

In addition to their well-known negative effects on bone mass, GCs also influence the complex process of bone fracture healing that includes the consecutive phases of inflammation, soft and hard callus formation, and remodeling until the restoration of the original bone structure and shape [20]. Recently, endogenous GC signaling was shown to be essential for effective bone regeneration [21–23]. However, exogenous treatment with supraphysiological GC doses significantly reduces bone formation after fracture and the quality of the newly formed bone [24–28].

Current treatment regimens for GIO include anti-resorptive and osteoanabolic drugs, including oral and intravenous bisphosphonates (BPs), denosumab, human parathyroid hormone 1–34 (hPTH 1–34), and supplementation of calcium and vitamin D [29–37]. Indeed, these treatments have proven to ameliorate bone loss in GIO and reduce the burden of GC-mediated fractures [38–40]. Similarly, BP treatment reversed GC-mediated, compromised fracture healing in a pre-clinical study in rats [41]. Contrarily, osteoanabolic therapy with hPTH 1–34 failed to improve fracture healing in GC-treated mice [42]. Although some anti-osteoporotic drugs show a promising outcome in both GC-mediated GIO and impaired fracture healing, they either are expensive or have major side effects [43–47]. Therefore, the identification of targets for cost-effective, small-molecule inhibitors with minimal side effects is of utmost importance.

Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5), a member of the proline-directed serine/threonine cyclin-dependent kinase family, largely controls a number of neuronal functions and is known to be a major player in the pathogenesis of neurodegenerative diseases [48–52]. Recently, we identified Cdk5 as a strong suppressor of osteoblast differentiation and showed that its inhibition with the small-molecule inhibitor, roscovitine, increased bone mass and improved fracture healing in skeletally healthy mice [53]. On the basis of these observations, we here investigated whether Cdk5 inhibition with roscovitine could also reverse GC-induced bone loss and compromised fracture healing.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Isolation of Primary Murine Calvarial Osteoblasts

Primary calvarial osteoblast isolation was performed using neonatal mouse calvaria of 2–5-day-old pups as previously described [54,55]. Briefly, the calvariae were isolated in 1 ml digestion solution (0.2% w/v each of collagenase A and dispase II (Roche, Basel, Switzerland)) and incubated at 37 °C for 10 min at 700 rpm on a shaker. The digestion was performed five times, and all but the first supernatant were collected in 15 mL falcons containing 500 µL fetal bovine serum (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). The collected supernatant was centrifuged ( $252 \times g$ ; 5 min; room temperature (RT)), resuspended in 3 mL complete  $\alpha$ -minimum essential medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and placed in a six-well plate. Following overnight incubation (37 °C; 5% CO<sub>2</sub>), the medium was replaced with a fresh medium. The experiments were performed at an 80% confluency as previously described [53,54].

### 2.2. Small Interfering RNA (siRNA) Transfection

SMARTpool non-targeting siRNA control (siNT) and *Cdk5*-specific siRNA (si*Cdk5*) were purchased from Horizon Discovery (Waterbeach, UK). The transfection was performed using a final concentration of 20 nM siRNA with 0.125% Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), as previously described [54]. The siRNA sequences used are listed in Table 1.



**Table 1.** Mouse siRNA sequences used in this study.

Gene symbol	Gene name	Gene ID	Reverse primer (5'–3')
<i>Non-targeting</i>	-	-	UAAGGCUAUGAAGAGAUAC
			AUGUAAUUGGCCUGUAAUUAG
			AUGAACGUGAAUUGCUCAA
			UGGUUUACAUGUCGACUAA
<i>Cdk5</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>	12568	GGAGAUCUGUCUACUCAAA
			UAUAAGCCCUACCCAAUGU
			GCAACGUGCUACAUAGGGA
			CAACAUCCUUGGUGAACGU

### 2.3. Murine Primary Calvarial Osteoblast Differentiation

For experiments with primary murine calvarial osteoblasts, the cells were seeded at a confluency of 12,000 cells/cm<sup>2</sup>. After 48 h, the cells were differentiated by adding an osteogenic induction medium (100 µg/mL (+)-sodium L-ascorbate and 5 mM β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)). The osteogenic induction medium was refreshed every third day.

Treatment with roscovitine (0.16 µM) (Selleckchem, Houston, TX, USA) was performed in an osteogenic induction medium, as previously described [53]. An ethanol vehicle was used at a concentration of 0.01% as a control. Treatment with roscovitine was performed every third day until the termination of the experiment.

### 2.4. PrestoBlue Cell Viability Assay

Cell viability was tested using the PrestoBlue cell viability reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3.2 mL of the medium were removed from 60 mm dishes, followed by the addition of 200 µL cell viability reagent. In parallel, in a 96-well plate, the medium and the cell viability reagent were mixed in a volume ratio of 9:1 to obtain a final volume of 100 µL that served as a blank. After incubating the plates (37 °C; 5% CO<sub>2</sub>) for 30 min, 100 µL aliquots were measured against the blank at a 570 nm absorbance using a Dynex Opsys MR microplate reader (Aspect Scientific, Cheshire, UK).

### 2.5. Alkaline Phosphatase (Alp) and Alizarin Red S (ARS) Staining

For quantitative Alp, primary murine calvarial osteoblasts were reversely transfected and seeded in a 384-well plate. The cells were differentiated by adding an osteogenic induction medium, fixed and stained with ELF 97 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for Alp, and DRAQ5 (BioStatus Ltd., Loughborough, the UK) for nuclei, and were analyzed as previously described [54]. For Cdk5 inhibition *in vitro*, primary murine calvarial osteoblasts were treated with either a vehicle or roscovitine (0.16  $\mu$ M) for six days as previously described [53].

For qualitative and quantitative ARS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) staining, the primary calvarial osteoblasts were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (10 min; RT) and incubated with 1% ARS (1 h; RT). The excessive ARS was removed by washing with 1x phosphate-buffered saline (PBS), and stereomicroscopic images were obtained using a Leica microscope (Leica Camera AG, Wetzlar, Germany). For quantitative evaluation, the ARS stain was extracted by the acetic acid method and neutralization with ammonium hydroxide as previously described [56]. The colorimetric measurement of the extracted solution was performed using a Dynex Opsys MR microplate reader (Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Germany) at an absorption of 405 nm. Finally, the measurements were normalized to the cell viability.

### 2.6. RNA isolation, cDNA Synthesis, and Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RNA isolation was performed using a RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Following the isolation procedure, 1  $\mu$ g RNA was used for reverse transcription using a RevertAid H Minus reverse transcriptase kit (Fermentas, Waltham, MA, USA) or a high-capacity cDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). RT-PCR was performed using a ViiA 7 PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), and relative mRNA concentrations were normalized to  $\beta$ -actin (*Actb*) using the  $\Delta\Delta$ Ct method. The mouse primer sequences used in this study are listed in Table 2.

**Table 2.** Oligonucleotide primer sequences from mice used in real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Gene symbol	Gene ID	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>Cdk5</i>	12568	TGGACCCTGAGATTGTGAAGT	GACAGAATCCCAGGCCTTTC
<i>Runx2</i>	12393	TGTTCTCTGATCGCCTCAGTG	CCTGGGATCTGTAATCTGACTCT
<i>Sp7</i>	170574	CCCACCCITCCCTCACTCAT	CCTTGTACCACGAGCCATAGG
<i>Alpl</i>	11647	GCTGATCATTCCCACGTTTT	CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT
<i>Bglap</i>	12096	TCTGACAAAGCCTTCATGTCCA	CGGTCTTCAAGCCATACTGGTC
<i>Rankl</i>	21943	TCACCATTTCGGATGAGTCTG	ACTTGTGGCTCTGATGTTCC
<i>Opg</i>	18383	CCTGAGGCCAGCCATT	CTTGCCAGCCTCGAT
<i>Actb</i>	11461	CCTTGCCCTGACCACTCTTA	ACACTGGGCTGCAATACACA

### 2.7. Protein Isolation, Quantification, and Western Blotting

The whole cell protein was isolated using a radioimmunoprecipitation assay buffer and quantified using a Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). We used 30 µg protein from each sample and subjected them to western blotting as previously described [54]. We used antibodies against Cdk5 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) and  $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The band intensities of western blots were quantified using Fiji ImageJ [57].

### 2.8. Animals

All mouse experiments were in compliance with the international regulations for the care and use of laboratory animals with the approval of the local ethical committee (No.1245/1402 Regierungspräsidium Tübingen, Germany). Eleven- and 13-week-old wild-type female and male BALB/cAnNCrl mice were separately maintained in single house units under controlled standard conditions (Makrolon type II long; 530 cm<sup>2</sup>), with a 12 h light and dark circadian rhythm with water and food (Ssniff, Soest, Germany) ad libitum at 23 °C and a humidity of 55%  $\pm$  10%) in a pathogen-free animal facility at Ulm University. To reduce the number of mice, we followed the replace, reduce, refine (3Rs) principle for the ethical use of animals. Therefore, we here used the control group (sham/vehicle) derived from our previous study [53], as these experiments were run in parallel.

### 2.9. GIO Model

Eleven-week-old wild-type female BALB/cAnNCrl mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) received a subcutaneous slow-release sham- or prednisolone (Pred)-pellet (12 mg/kg/day) (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) at the neck, as previously described [58]. The mice were injected intraperitoneally (i.p.) with either a vehicle (5% dimethyl sulfoxide (DMSO), 10% kolliphor EL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), 85% 1x PBS), or roscovitine (150 mg/kg) (LC Laboratories, Woburn, MA, USA), three times a week for two weeks, as previously described [53]. The surgery was performed under general anesthesia (2 volume percent (vol%) isoflurane (Baxter, Unterschleißheim, Germany)). After two weeks, the mice were euthanized by an overdose of isoflurane, and the femora were collected for further analyses.

### 2.10. Fracture Healing Model

To study fracture healing, we used a standardized osteotomy model as previously described [59]. The osteotomy was performed at the right femur diaphysis of 12-week-old wild-type male BALB/cAnNCrl mice (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA). All surgeries were performed under general anesthesia (2 vol% isoflurane). The mice first received clindamycin (45 mg/kg) (MIP Pharma Holding GmbH, Blieskastel, Germany) as an anti-infective treatment just prior to the surgery, and tramadol-hydrochloride in the drinking water (25 mg/L) (Grünenthal, Aachen, Germany) as pain medication one day prior until day three post-surgery, as previously described [59]. During the procedure, the right femur was exposed and stabilized using a semi-rigid external fixator with an axial stiffness of 3 N/mm and four mini-Schanz screws (RISystem, Davos, Switzerland). A midshaft osteotomy was performed using a gigli wire saw (0.4 mm in diameter). Additionally, the mice received a subcutaneous slow-release sham- or prednisolone-pellet (12 mg/kg/day) [10,58] and were further injected i.p. with either a vehicle (5% DMSO, 10% kolliphor EL, and 85% 1x PBS) or roscovitine (150 mg/kg) (Selleckchem, Houston, TX, USA), every second day for 14 or 23 days. After the respective time-points, the mice were euthanized by an overdose of isoflurane, and osteotomized femora were collected for further analyses.

### *2.11. Biomechanical Testing of the Fractured Femurs*

At day 23 post-surgery, fractured femurs were subjected to biomechanical testing using a non-destructive three-point bending test in a universal material testing machine, Zwick Z10 (Zwick Roell, Ulm, Germany), to assess the functional healing outcome, as previously described [59]. Briefly, after the fixation of the proximal end of the femur into a hinge joint of the testing setup, an increasing load up to a maximum of 2 N was applied to the middle of the callus (2 mm/minute). Flexural rigidity was calculated using the slope ( $k$ ) of the load–displacement curve in the linear region [59].

### *2.12. Microcomputed Tomography ( $\mu$ CT) Analysis*

Intact femurs were analyzed using a high-resolution  $\mu$ CT Skyscan 1176 scanner (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Images at a 9  $\mu$ m voxel resolution were acquired using a 50 kV X-ray voltage, a 200  $\mu$ A current, and a 0.5 mm aluminum filter with a 1° rotation step. Following reconstruction using NRecon and DataViewer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA), the trabecular and cortical bone analysis was performed at the 0.215 and 1.935 mm proximal of the growth plate using 1.29- and 0.43-mm regions of interest, respectively. The structural analysis was performed using the CTAn software (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Three-dimensional images were created using CTVox (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA).

In the fractured femora, the region of interest was set as the periosteal callus between both inner pinholes. The bone volume fraction (BV/TV) was measured under a global threshold of 642 mg hydroxyapatite/cm<sup>3</sup> as previously described [60]. All the measurements were performed in accordance with the guidelines of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) [61].

### *2.13. Histomorphometry*

For static bone histomorphometry, femurs were isolated, fixed in 4% PFA for three days and decalcified with 15% ethylenediamine tetraacetic acid for 10 days followed by paraffin embedding, as previously described [53,62]. Femur sections of seven micrometers were cut and stained for tartrate-

resistant acid phosphatase (TRAP) as previously described [63]. Osteoclasts were counted as multinucleated TRAP-positive cells, whereas osteoblasts were counted as cubic-shaped cells with visible cytoplasm. The following cellular parameters were measured: osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS), osteoclast number per bone perimeter (Oc.N/B.Pm), osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS), and osteoblast number per bone perimeter (Ob.N/B.Pm), using Osteomeasure software (Osteometrics, Decatur, IL, USA) according to the ASBMR guidelines [64,65].

Fractured femora were stained with Safranin-O/Fast Green to analyze the callus, bone, cartilage, and soft tissue areas, using Leica LASX image analysis software (Leica, Heerbrugg, Switzerland).

For dynamic bone histomorphometry, the mice received i.p. calcein injections nine and two days prior to sacrifice as previously described [63,64,66]. Femurs were fixed in 4% PFA and embedded in methyl methacrylate as previously described [64,66]. Femur sections of seven micrometers were cut to determine the bone formation rate (BFR) and the mineral apposition rate (MAR) using the Osteomeasure software (Osteometrics, Decatur, IL, USA).

#### *2.14. N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) and C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX-I) ELISAs*

The blood of the mice was collected in heparin-coated tubes and centrifuged at  $2000 \times g$  for 10 minutes at RT to collect the plasma. ELISAs for PINP and CTX-I (Immunodiagnostic Systems, East Boldon, UK) were performed according to the manufacturer's instructions.

#### *2.15. Statistical Analysis*

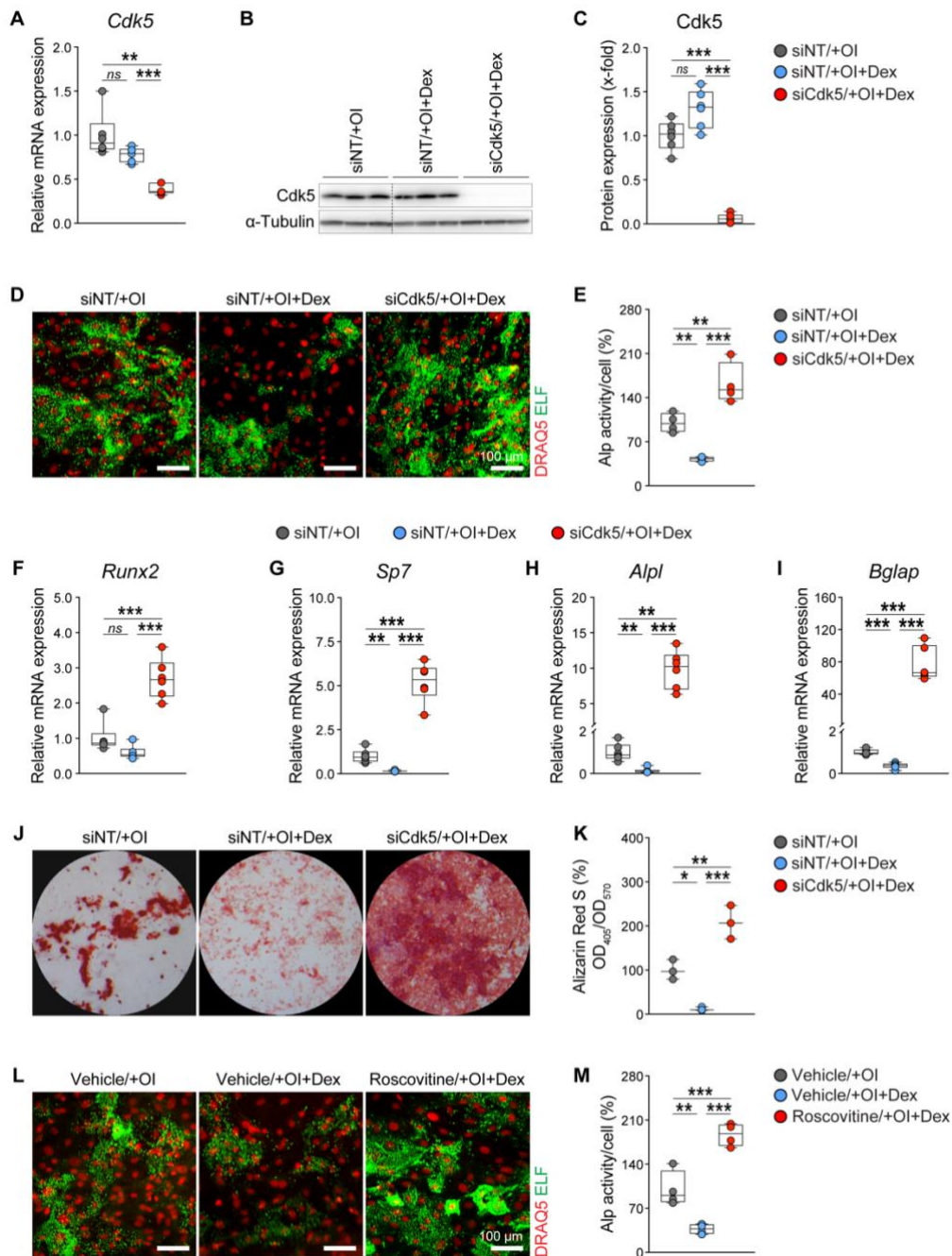
Data are represented as box and whisker plots with the minimum to the maximum as well as superimposing all of the data points. Statistical differences between the groups were determined by ordinary one-way ANOVA using Tukey's multiple comparison test. A  $p$ -value less than 0.05 was considered to be statistically significantly different (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3. Results

#### 3.1. *Cdk5* Deletion or Inhibition Antagonizes Suppressive Effects of GCs on Osteoblast Differentiation and Mineralization

Dexamethasone (Dex), a widely used synthetic GC, was shown to suppress osteogenic differentiation and mineralization [10,67,68]. To investigate whether *Cdk5* depletion can affect Dex-mediated osteoblast suppression, we transfected primary murine calvarial osteoblasts with non-targeting siRNA (siNT) or *Cdk5*-specific siRNA (si*Cdk5*) and induced them into the osteogenic lineage in the presence or absence of 1  $\mu$ M Dex. First, we found that *Cdk5* mRNA and protein expression was not regulated by Dex treatment and that it was significantly reduced upon siRNA knockdown (Figure 1A–C). We further showed that the Dex treatment significantly reduced cellular Alp activity, while the co-treatment with si*Cdk5* abrogated the GC-induced suppression of Alp activity (Figure 1D,E). Furthermore, Dex treatment reduced the expression of osteoblast-specific transcription factors and marker genes such as *Runx2*, *Sp7*, *Alpl*, and *Bglap*, whereas the co-treatment with si*Cdk5* rescued their expression (Figure 1F–I). Moreover, as demonstrated by Alizarin red staining, *in vitro* matrix mineralization was significantly reduced by Dex treatment, whereas this was ameliorated by co-treatment with si*Cdk5* (Figure 1J,K).

Recently, we reported that *Cdk5* inhibition with roscovitine enhances osteoblast differentiation and bone formation [53]. Therefore, to determine whether *Cdk5* inhibition with roscovitine can also affect Dex-induced osteoblast suppression, we treated primary murine calvarial osteoblasts with either a vehicle or roscovitine (0.16  $\mu$ M) in the presence or absence of 1  $\mu$ M Dex. Consistent with the siRNA data (Figure 1A–K), we showed that the roscovitine treatment reversed the GC-mediated suppression of osteoblast function (Figure 1L,M). Taken together, these results confirmed that *Cdk5* deletion or inhibition counteracted the Dex-mediated suppression of osteoblast differentiation and mineralization *in vitro*.



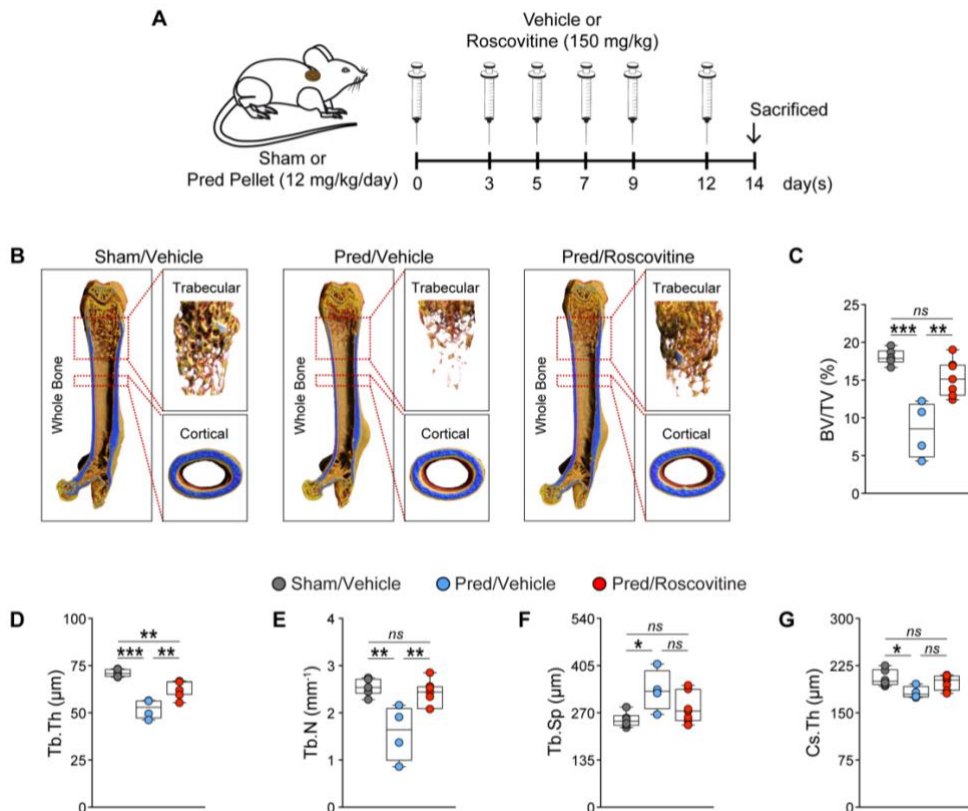
**Figure 1.** Glucocorticoid (GC)-mediated suppression of osteoblast differentiation and mineralization is reversed by *Cdk5* deletion or inhibition. Primary murine calvarial osteoblasts were transfected either with non-targeting siRNA (siNT) or *Cdk5*-specific siRNA (si*Cdk5*) for eight days in the presence or absence of 1  $\mu$ M dexamethasone (Dex): (A) *Cdk5* mRNA expression (n = 6); (B,C) *Cdk5* protein levels and its quantification (the si*Cdk5*/+OI group was cropped out as shown with the dotted line. For the original, see Figure S1) (n = 6); (D,E) representative microscopic images of nuclear (DRAQ5 in red) and Alp (ELF 97 in green) staining upon different treatments and their quantification (n = 4); (F–I) mRNA expression of osteoblast-specific marker genes *Runx2*, *Sp7*, *Alpl*, and *Bglap* (n = 6); (J,K) qualitative and quantitative Alizarin Red S staining in primary murine calvarial osteoblasts after 20 days of transfection with siNT or si*Cdk5*, in the presence or absence of 1  $\mu$ M Dex (n = 3); (L,M) representative microscopic images of nuclear (red) and Alp (green) staining upon different treatments and their quantification



in primary murine calvarial osteoblasts after six days of treatment with a vehicle (EtOH) or roscovitine (0.16  $\mu\text{M}$ ), in the presence or absence of 1  $\mu\text{M}$  Dex ( $n = 4$ ). Data are represented as box and whisker plots with the minimum to the maximum as well as superimposing all of the data points. Statistical differences between two groups were determined by one-way ANOVA and Tukey's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.2. *Cdk5* Inhibition Antagonizes GC-Mediated Bone Loss by Reducing Osteoclastogenesis

To investigate whether roscovitine treatment affects GC-mediated bone loss *in vivo*, we implanted a sham or Pred pellet in wild-type mice and treated them with either a vehicle or roscovitine for 14 days (Figure 2A). The  $\mu\text{CT}$  analysis revealed a significant loss of bone mass in the distal femurs of Pred-treated mice. This was due to decreases in trabecular thickness and number, but increased trabecular separation (Figure 2B–F). Importantly, the roscovitine treatment abrogated these Pred-mediated deleterious effects on bone mass (Figure 2B–F). In addition, the crosssectional thickness was significantly reduced in the Pred-treated mice, which was reversed by roscovitine co-treatment (Figure 2G).



**Figure 2.** Inhibition of *Cdk5* with roscovitine ameliorates GC-mediated loss of bone mass in mice. (A) Experimental setup for the implantation of a sham or

prednisolone (Pred)-pellet, followed by treatment with a vehicle or roscovitine (intraperitoneally (i.p.); 150 mg/kg; three times per week) for 14 days. **(B)** Representative micro-computed tomography ( $\mu$ CT) images of whole, trabecular and cortical bone upon different treatments. The calculated femoral trabecular and cortical parameters include the following: **(C)** bone volume fraction (BV/TV; %); **(D)** trabecular thickness (Tb.Th;  $\mu$ m); **(E)** trabecular number (Tb.N;  $\text{mm}^{-1}$ ); **(F)** trabecular separation (Tb.Sp;  $\mu$ m); and **(G)** cross-sectional thickness (Cs.Th;  $\mu$ m) ( $n = 4-6$ ). Data are represented as box and whisker plots with the minimum to the maximum as well as superimposing all of the data points. Statistical differences between two groups were determined by one-way ANOVA and Tukey's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

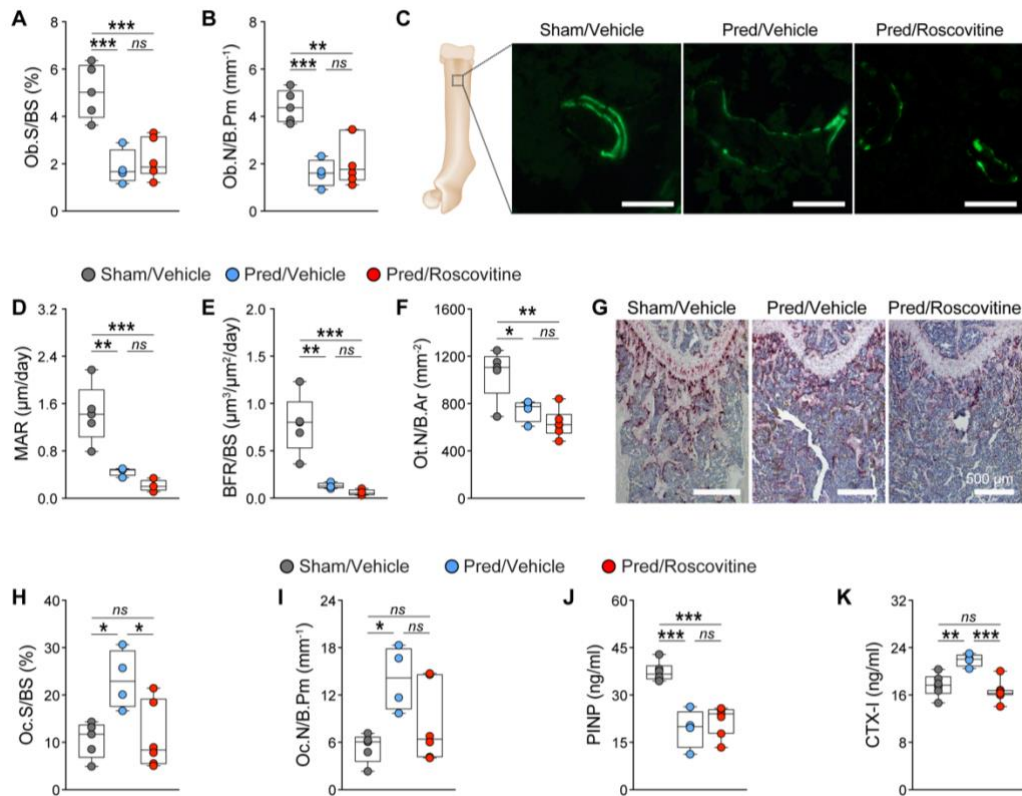
To determine the effect of the roscovitine treatment on bone cells *in vivo*, we performed static and dynamic bone histomorphometry. We observed significant decreases in the osteoblast surface and number in both trabecular and cortical bone in Pred-treated mice, which was not reversed by the roscovitine co-treatment (Figure 3A,B; Figure S2A,B). The dynamic bone histomorphometry confirmed these findings: MAR and BFR were reduced in Pred-treated mice, and this was not reversed by co-treatment with roscovitine (Figure 3C-E; Figure S2C-E). In addition, the decreased osteocyte number induced by the Pred treatment was not rescued by synergistic treatment with roscovitine (Figure 3F; Figure S2F). By contrast, the osteoclast surface and number, which were significantly increased after the Pred treatment in both trabecular and cortical bone, were reduced to control levels by the roscovitine co-treatment (Figure 3G-I; Figure S2G,H). These results were further confirmed by reduced plasma PINP levels and increased CTX-I levels in the Pred-treated mice, indicating reduced bone formation and increased bone resorption, respectively (Figure 3J,K). However, only the CTX-I levels returned to control levels in mice that received both Pred and roscovitine treatments (Figure 3J,K).

These results suggested that the rescue of GC-mediated bone loss in the combinatorial treatment group was due to a reduced osteoclastogenesis rather than an improved osteoblastogenesis.

Because osteoclastogenesis is indirectly regulated by osteoblasts via the expression of *Rankl* and *Opg* [69,70], we also investigated whether the *Rankl/Opg* axis is modulated in primary murine calvarial osteoblasts by Dex and *siCdk5*. Indeed, we observed a significant increase in the *Rankl/Opg* expression ratio upon Dex treatment, which was reduced by the co-treatment

with si*Cdk5* (Figure S3), suggesting a possible mechanism of the reduction in GC-induced osteoclastogenesis upon Cdk5 inhibition *in vivo*.

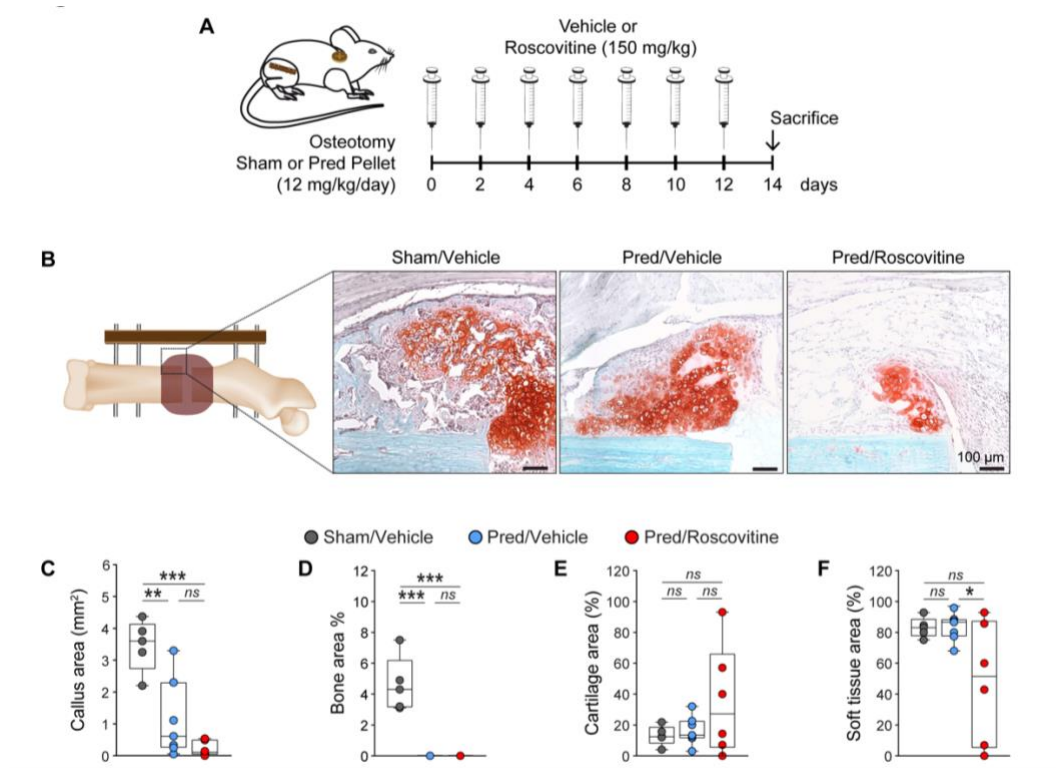
In conclusion, we demonstrated that GC-mediated bone loss is ameliorated by Cdk5 inhibition with roscovitine through a reduction in osteoclastogenesis.



**Figure 3.** Inhibition of Cdk5 with roscovitine alleviates GC-mediated bone loss by reducing osteoclastogenesis. Static and dynamic bone histomorphometry were performed from different treatments, and the following parameters were calculated from trabecular bone: (A) osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS; %); (B) osteoblast number per bone parameter (Ob.N/B.Pm; mm<sup>-1</sup>); (C) representative images of dual calcein labeling (green) (scale: 100 μm); (D) mineral apposition rate (MAR; μm/day); (E) bone formation rate (BFR/BS; μm<sup>3</sup>/μm<sup>2</sup>/day); (F) osteocyte number per bone area (Ot.N/B.Ar; mm<sup>-2</sup>); (G) representative images of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining for osteoclasts (purple) (scale: 500 μm); (H) osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS; %); and (I) osteoclast number per bone parameter (Oc.N/B.Pm; mm<sup>-1</sup>) (n = 4–6). Analysis of bone formation and resorption markers: (J) N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP; ng/mL); and (K) C-terminal telopeptides of type I collagen (CTX-I; ng/mL) (n = 4–6). Data are represented as box and whisker plots with the minimum to the maximum as well as superimposing all of the data points. Statistical differences between two groups were determined by one-way ANOVA and Tukey's test. \* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01; \*\*\* *p* < 0.001.

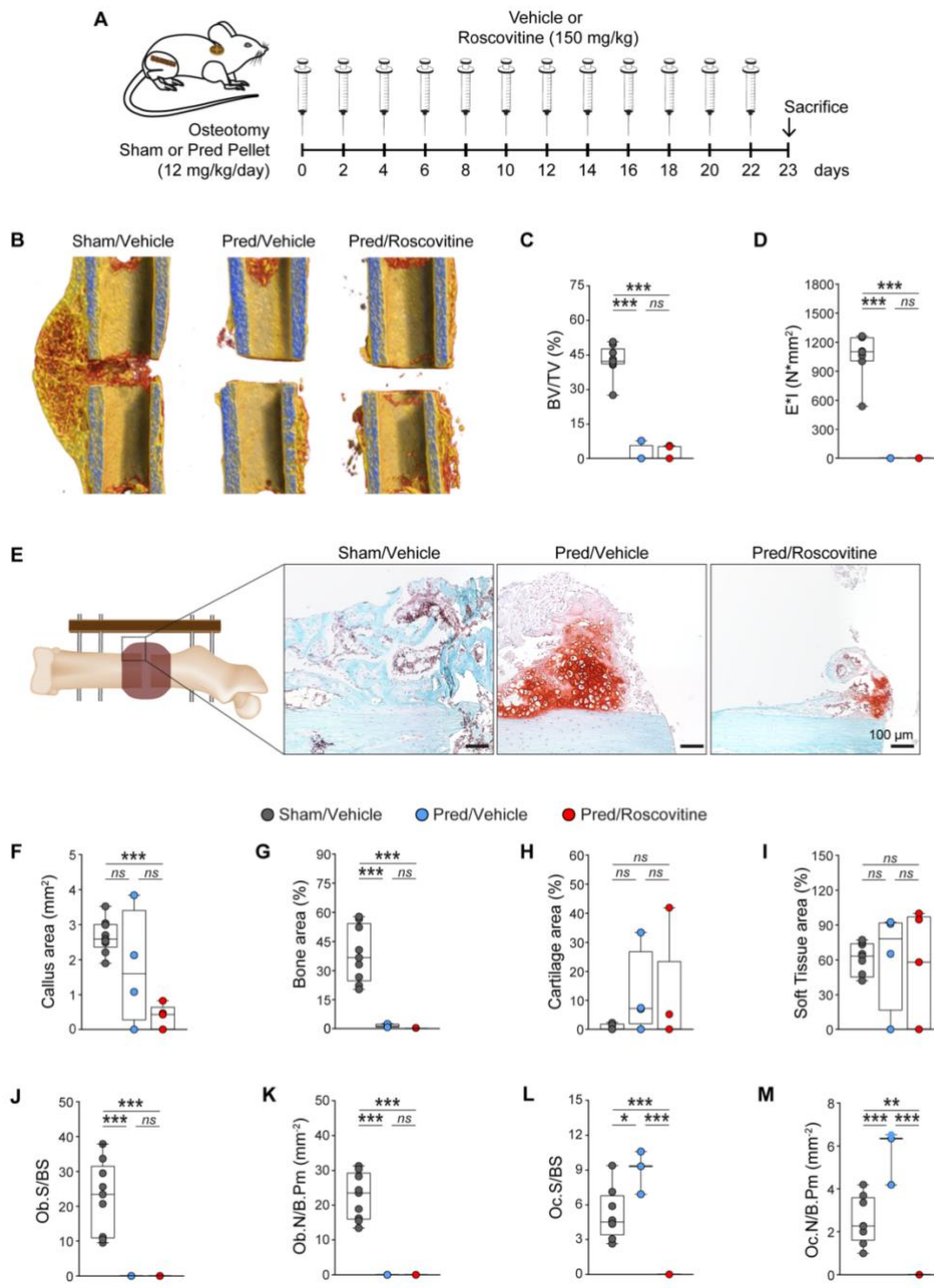
### 3.3. *Cdk5* Inhibition Does not Reverse GC-Mediated Impaired Fracture Healing

To investigate GC-mediated impaired fracture healing under roscovitine treatment, we performed an open femur osteotomy, implanted a sham or Pred pellet and treated the mice with either a vehicle or roscovitine for 14 days (Figure 4A). Our results showed that after 14 days, a time point of extensive endochondral bone formation in murine fracture healing, the Pred treatment decreased the callus size and the bone area in the fracture callus, which were not reversed by the combinatorial treatment with roscovitine (Figure 4B-D). In addition, we did not observe any changes in cartilage or soft tissue areas upon Pred treatment alone or in combination with roscovitine (Figure 4B,E,F).



**Figure 4.** GC-mediated delayed fracture healing is not reversed by Cdk5 inhibition with roscovitine during soft callus formation. (A) Experimental setup for the osteotomy and implantation of a sham or Pred pellet, followed by treatment with a vehicle or roscovitine (i.p.; 150 mg/kg; every second day) for 14 days, to evaluate soft callus formation. (B) Representative images of Safranin O/Fast Green staining of the fracture callus after different treatments (scale: 100  $\mu$ m). The following parameters were calculated: (C) callus area (mm<sup>2</sup>); (D) bone area (%); (E) cartilage area (%); and (F) soft tissue area (%) (n = 5–7). Data are represented as box and whisker plots with the minimum to maximum as well as superimposing all of the data points. Statistical differences between two groups were determined by one-way ANOVA and Tukey's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

At a later healing stage of 23 days, the Pred treatment (Figure 5A) resulted in significantly impaired hard callus formation, as shown by a greatly reduced BV/TV and bending stiffness, which was not reversed by the combinative treatment with roscovitine (Figure 5B–D). These findings were further confirmed by the histological evaluation. While the callus area was not significantly affected, the bone area was significantly reduced in the Pred-treated mice compared to the control group. The co-treatment with Pred and roscovitine significantly reduced both the callus size and the bone content (Figure 5E–G), while the cartilage and soft tissue areas remained unaffected by the treatments (Figure 5E,H,I). The Pred treatment significantly decreased the osteoblast number and surface, whereas the osteoclast number and surface were significantly increased in the newly formed bone of the fracture callus (Figure 5J–M). In the combinatorial treatment, the bone formation in the callus was abrogated, and no osteoblasts and osteoclasts were present (Figure 5G,J–M).



**Figure 5.** GC treatment delays fracture healing through decreased osteoblastogenesis, which could not be rescued by roscovitine application. (A) Experimental setup for the osteotomy and implantation of a sham or Pred pellet, followed by treatment with a vehicle or roscovitine (i.p.; 150 mg/kg; every second day) for 23 days, to evaluate hard callus formation. (B) Representative  $\mu$ CT images of fractured femurs from different treatments. The calculated parameters include the following: (C) bone volume fraction (BV/TV; %) ( $n = 4-9$ ); and (D) bending stiffness ( $E \cdot I$ ;  $N/mm^2$ ) ( $n = 4-7$ ). (E) Representative images of the Safranin O/Fast Green staining of fracture callus after different treatments (scale: 100  $\mu$ m). The following parameters were calculated: (F) callus area ( $mm^2$ ); (G) bone area (%); (H) cartilage area (%); (I) soft tissue area (%); (J) osteoblast surface per bone surface (Ob.S/BS; %); (K) osteoblast number per bone parameter (Ob.N/B.Pm;  $mm^{-1}$ ) ( $n = 4-9$ ); (L) osteoclast surface per bone surface (Oc.S/BS; %); and (M), osteoclast number per bone parameter (Oc.N/B.Pm;  $mm^{-1}$ ) ( $n = 4-$

8). Data are represented as box and whisker plots with the minimum to the maximum as well as superimposing all of the data points. Statistical differences between two groups were determined by one-way ANOVA and Tukey's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

In summary, we conclude that Cdk5 inhibition with roscovitine was unable to ameliorate the deleterious effects of GCs on bone fracture healing.

#### 4. Discussion

Common side effects of GC treatment in the context of bone biology are GIO and impaired fracture healing [1,13,27,28,71]. Recently, we identified Cdk5 as a promising target to increase osteoblast differentiation and bone mass and improve fracture healing in skeletally healthy mice [53]. Here, we assessed whether the pharmacological inhibition of Cdk5 with roscovitine has the potential to ameliorate the adverse effects of GCs on bone and in impairing fracture healing. Indeed, Cdk5 inhibition rescued GC-induced skeletal bone loss through reduced osteoclastogenesis, however; it did not reverse GC-mediated compromised fracture healing.

Cdk5 is known to be involved in neuronal differentiation [72], and its aberrant activity contributes to the pathogenesis of neurodegenerative disorders, including amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's, Alzheimer's, and Parkinson's diseases [50–52]. Additionally, there is growing evidence that Cdk5 plays a role in T cell activation and cancer biology [73–75]. Recently, our group reported for the first time a crucial role of Cdk5 in bone biology [53]. Cdk5 strongly suppresses osteoblast differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway, and Cdk5 inhibition with the small-molecule inhibitor, roscovitine, induces osteoanabolic effects on bone mass and formation during fracture healing in skeletally healthy mice [53]. On the basis of these findings, we here determined whether Cdk5 inhibition has the potential to counteract GC-induced bone loss and impaired fracture healing.

It is well established that high-dose GC treatment inhibits osteoblast differentiation and mineralization *in vitro* and reduces trabecular and cortical bone mass *in vivo* [1,3,10,16,17,19,67,68,76–79]. This GC-mediated bone loss phenotype is mainly attributed to decreased osteoblastogenesis and osteocyte number that subsequently reduce bone formation, but also to



increased osteoclastogenesis, which consequently enhances bone resorption [10,19,76–78,80]. In the present study, we confirmed the negative effects of high-dose GCs both *in vitro* and *in vivo*.

Our *in vitro* results showed that Cdk5 deletion or inhibition with roscovitine not only completely abolished the GC-mediated detrimental effects on osteoblast differentiation, but even increased osteoblast activity compared to untreated cells. This effect can be explained by a possible crosstalk between GC- and Cdk5-regulated pathways. For example, it is well-known that the extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2) pathway is crucial for osteoblastogenesis [81], and exogenous GCs have been shown to inhibit this pathway [82]. Moreover, we recently reported that Cdk5 depletion in osteoblasts activates the Erk1/2 pathway [53], suggesting one of the possible mechanisms through which Cdk5 depletion counteracts the GC-mediated inhibition of the Erk1/2 pathway and consequently the osteoblast differentiation.

Importantly, our *in vivo* results demonstrated that Cdk5 inhibition with roscovitine ameliorated GC-mediated bone loss in mice. Of note, we here observed that Cdk5 inhibition prevented GC-mediated bone loss through a reduction of osteoclastogenesis rather than by promoting osteoblastogenesis and new bone formation. This is in contrast to our previous study with skeletally healthy mice, where we observed a significant osteoanabolic effect of Cdk5 inhibition caused by the induction of osteoblastogenesis [53]. Although this was unexpected, similar findings have been reported with other osteoblast-stimulating drugs under GC therapy. For example, the osteoanabolic effect of intermittent PTH and abaloparatide treatment was blunted by high-dose GCs [77,83]. Obviously, even if our *in vitro* results implicate a rescue through osteoblastogenesis, osteoblast function cannot completely be reversed by Cdk5 inhibition in the presence of GCs *in vivo*.

The reduction of osteoclastogenesis observed in GC-treated mice by Cdk5 inhibition could be explained by the modulation of the ratio of *Rankl/Opg* expression. Generally, osteoblasts proportionately express *Rankl*, which regulates the differentiation of precursor cells into multinucleated osteoclasts, and *Opg*, a decoy receptor for *Rankl* that protects



the skeleton from excessive bone resorption [84–87]. However, supraphysiological GC doses are known to modulate the *Rankl/Opg* axis by upregulating *Rankl* expression levels and downregulating *Opg* expression levels, which consequently promotes osteoclastogenesis and eventually bone resorption [3,19,78]. To this end, we here observed a similar effect on the *Rankl/Opg* axis after treating primary murine calvarial osteoblasts with Dex. Interestingly, *Cdk5* deletion reversed this GC-mediated effect on the *Rankl/Opg* ratio, suggesting a possible crosstalk between osteoblasts and osteoclasts, which eventually reduces GC-mediated increased osteoclastogenesis *in vivo*.

Bone fracture healing is a multifactorial process, which involves overlapping phases of inflammation, soft- and hard-callus formation, during which bone is generated by intramembranous and endochondral ossification, and the remodeling of the initially formed woven bone until the original bone structure is restored [88–90]. Disruption at any stage of this highly complex healing cascade can delay or even prevent the healing success [20,88]. GCs have a strong effect on many cell types participating in fracture healing, including immune and mesenchymal cells [21,22], and long-term administration is proposed to induce detrimental effects on all stages of fracture repair [27,28]. To determine the role of *Cdk5* in GC-mediated impaired fracture healing, we used the same femur fracture model as in our recent study, where we observed osteoanabolic effects of *Cdk5* inhibition and improved fracture healing in healthy mice [53]. As expected from the literature, the healing process was considerably impaired upon GC treatment, both at the early and late phases, as indicated by the significantly reduced bone fraction and osteoblast number and activity in the fracture callus [27,28]. *Cdk5* inhibition was not able to reverse these negative effects. This supports our observation that in the GIO model, *Cdk5* inhibition rescued increased osteoclastogenesis rather than improved osteoblastogenesis. However, there could be additional reasons for the failure of roscovitine to improve GC-induced impaired bone healing. For example, because *Cdk5* is known to regulate inflammation [91–94], its inhibition could possibly exacerbate GC effects on the immune response upon fracture, which is essential for downstream regenerative processes

[22,88,89,95]. Another possible reason could be that Cdk5 inhibition or high-dose GCs adversely affects angiogenesis [16,96–101], a process that is essential for uneventful fracture healing [89,95].

## 5. Conclusions

In conclusion, our results demonstrated that, even if the pharmacological inhibition of Cdk5 with roscovitine did not reverse GC-induced compromised fracture healing in mice, it ameliorated GC-mediated bone loss in the skeleton. Together with our previous data [53], this indicates that Cdk5 could be a potential therapeutic target to treat GIO. However, further studies are necessary to elucidate the role of Cdk5 in bone, particularly in inflammatory bone disorders.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: [www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10020404/s1](http://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10020404/s1), Figure S1: Complete western blot related to Figure 1; Figure S2: Inhibition of Cdk5 with roscovitine alleviates GC-mediated bone loss by reducing osteoclastogenesis; Figure S3: Cdk5 siRNA knockdown modulates the GC-mediated *Rankl/Opg* ratio.

**Author Contributions:** Conceptualization: B.T.K., A.I., J.T., and M.A.; methodology: B.T.K., L.S., S.V., M.H.-L., and M.A.; formal analysis: B.T.K., L.S., S.V., S.L., A.-K.D., and M.A.; data curation: B.T.K. and M.A.; writing—original draft preparation: B.T.K., A.I., J.T., and M.A.; writing—review and editing: B.T.K., A.I., J.T., and M.A.; visualization: B.T.K. and M.A.; supervision: A.I., J.T., and M.A.; project administration: A.I., J.T., and M.A.; funding acquisition: A.I. and J.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by a grant from the DFG in the framework of Collaborative Research Center CRC1149 “Danger Response, Disturbance Factors and Regenerative Potential after Trauma” (No. 251293561-CRC 1149, INST 40/492-1, and INST 40/492-2) and Tu220/14-1 (“A novel function of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) in bone integrity—a potential therapeutic target to treat osteoporosis”).

**Institutional Review Board Statement:** The animal experiments were approved by the local ethical committee, Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg, Germany (No.: 1245/1402).

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We are grateful to acknowledge the animal facility at Ulm University, in particular the expert assistance of B. Widmann. We thank U. Burret for ordering the mice, U. Kelp, K. Karremann, T. Hieber, A. Boehmler, and Y. Aydogdu, for their assistance with the sample preparation for bone histomorphometry and I. Baum for the preparation of roscovitine for *in vivo* treatment.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Hartmann, K.; Koenen, M.; Schauer, S.; Wittig-Blaich, S.; Ahmad, M.; Baschant, U.; Tuckermann, J.P. Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 409–447. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2015>.
2. Agusti, A.; Fabbri, L.M.; Singh, D.; Vestbo, J.; Celli, B.; Franssen, F.M.E.; Rabe, K.F.; Papi, A. Inhaled corticosteroids in COPD: Friend or foe? *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1801219. <https://doi.org/10.1183/13993003.01219-2018>.
3. Ahmad, M.; Hachemi, Y.; Paxian, K.; Mengele, F.; Koenen, M.; Tuckermann, J. A Jack of All Trades: Impact of Glucocorticoids on Cellular Cross-Talk in Osteoimmunology. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2460. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02460>.
4. Bruscoli, S.; Febo, M.; Riccardi, C.; Migliorati, G. Glucocorticoid Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Clinical Practice. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 691480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.691480>.
5. Buttgereit, F.; Burmester, G.R.; Lipworth, B.J. Optimised glucocorticoid therapy: The sharpening of an old spear. *Lancet* **2005**, *365*, 801–803. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)17989-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)17989-6).
6. Mazziotti, G.; Angeli, A.; Bilezikian, J.P.; Canalis, E.; Giustina, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: An update. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **2006**, *17*, 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.03.009>.

7. Mazziotti, G.; Giustina, A.; Canalis, E.; Bilezikian, J.P. Treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis.* **2009**, *1*, 27–34. <https://doi.org/10.1177/1759720x09343222>.
8. Saag, K.G.; Koehnke, R.; Caldwell, J.R.; Brasington, R.; Burmeister, L.F.; Zimmerman, B.; Kohler, J.A.; Furst, D.E. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: An analysis of serious adverse events. *Am. J. Med.* **1994**, *96*, 115–123. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90131-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90131-7).
9. Adami, G.; Saag, K.G. Glucocorticoid-induced osteoporosis update. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2019**, *31*, 388–393. <https://doi.org/10.1097/bor.0000000000000608>.
10. Rauch, A.; Seitz, S.; Baschant, U.; Schilling, A.F.; Illing, A.; Stride, B.; Kirilov, M.; Mandic, V.; Takacz, A.; Schmidt-Ullrich, R.; et al. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.* **2010**, *11*, 517–531. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.005>.
11. Hofbauer, L.C.; Zeitz, U.; Schoppet, M.; Skalicky, M.; Schuler, C.; Stolina, M.; Kostenuik, P.J.; Erben, R.G. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 1427–1437. <https://doi.org/10.1002/art.24445>.
12. Ishida, Y.; Heersche, J.N. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 1822–1826. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.12.1822>.
13. Canalis, E.; Mazziotti, G.; Giustina, A.; Bilezikian, J.P. Glucocorticoid-induced osteoporosis: Pathophysiology and therapy. *Osteoporos. Int.* **2007**, *18*, 1319–1328. <https://doi.org/10.1007/s00198-007-0394-0>.
14. Frenkel, B.; White, W.; Tuckermann, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis. In *Glucocorticoid Signaling*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 179–215.
15. Weinstein, R.S.; Jilka, R.L.; Parfitt, A.M.; Manolagas, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 274–282. <https://doi.org/10.1172/jci2799>.
16. Weinstein, R.S.; Hogan, E.A.; Borrelli, M.J.; Liachenko, S.; O'Brien, C.A.; Manolagas, S.C. The Pathophysiological Sequence of Glucocorticoid-Induced

- Osteonecrosis of the Femoral Head in Male Mice. *Endocrinology* **2017**, *158*, 3817–3831. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00662>.
17. Manolagas, S.C. Steroids and osteoporosis: The quest for mechanisms. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 1919–1921. <https://doi.org/10.1172/jci68062>.
  18. Humphrey, E.L.; Williams, J.H.; Davie, M.W.; Marshall, M.J. Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone* **2006**, *38*, 652–661. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.10.004>.
  19. Piemontese, M.; Xiong, J.; Fujiwara, Y.; Thostenson, J.D.; O'Brien, C.A. Cortical bone loss caused by glucocorticoid excess requires RANKL production by osteocytes and is associated with reduced OPG expression in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2016**, *311*, E587–E593. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00219.2016>.
  20. Wildemann, B.; Ignatius, A.; Leung, F.; Taitsman, L.A.; Smith, R.M.; Pesántez, R.; Stoddart, M.J.; Richards, R.G.; Jupiter, J.B. Non-union bone fractures. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2021**, *7*, 57. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00289-8>.
  21. Rapp, A.E.; Hachemi, Y.; Kemmler, J.; Koenen, M.; Tuckermann, J.; Ignatius, A. Induced global deletion of glucocorticoid receptor impairs fracture healing. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2018**, *32*, 2235–2245. <https://doi.org/10.1096/fj.201700459RR>.
  22. Hachemi, Y.; Rapp, A.E.; Picke, A.K.; Weidinger, G.; Ignatius, A.; Tuckermann, J. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**, *61*, R75–R90. <https://doi.org/10.1530/jme-18-0024>.
  23. Hachemi, Y.; Rapp, A.E.; Lee, S.; Dorn, A.K.; Krüger, B.T.; Kaiser, K.; Ignatius, A.; Tuckermann, J. Intact Glucocorticoid Receptor Dimerization Is Deleterious in Trauma-Induced Impaired Fracture Healing. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 628287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.628287>.
  24. Waters, R.V.; Gamradt, S.C.; Asnis, P.; Vickery, B.H.; Avnur, Z.; Hill, E.; Bostrom, M. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop. Scand.* **2000**, *71*, 316–321. <https://doi.org/10.1080/000164700317411951>.
  25. Lyritis, G.; Papadopoulou, Z.; Nikiforidis, P.; Batrinos, M.; Varonos, D. Effect of cortisone and an anabolic steroid upon plasma hydroxyproline during fracture healing in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* **1975**, *46*, 25–30. <https://doi.org/10.3109/17453677508989188>.

26. Newman, R.J.; Francis, M.J.; Duthie, R.B. Nuclear magnetic resonance studies of experimentally induced delayed fracture union. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1987**, Volume 216, 253–261.
27. Liu, Y.Z.; Akhter, M.P.; Gao, X.; Wang, X.Y.; Wang, X.B.; Zhao, G.; Wei, X.; Wu, H.J.; Chen, H.; Wang, D.; et al. Glucocorticoid-induced delayed fracture healing and impaired bone biomechanical properties in mice. *Clin. Interv. Aging* **2018**, *13*, 1465–1474. <https://doi.org/10.2147/cia.s167431>.
28. Sandberg, O.H.; Aspenberg, P. Glucocorticoids inhibit shaft fracture healing but not metaphyseal bone regeneration under stable mechanical conditions. *Bone Jt. Res.* **2015**, *4*, 170–175. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.410.2000414>.
29. Allen, C.S.; Yeung, J.H.; Vandermeer, B.; Homik, J. Bisphosphonates for steroid-induced osteoporosis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, *10*, Cd001347. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001347.pub2>.
30. Bultink, I.E.; Baden, M.; Lems, W.F. Glucocorticoid-induced osteoporosis: An update on current pharmacotherapy and future directions. *Expert Opin. Pharm.* **2013**, *14*, 185–197. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.761975>.
31. Saag, K.G.; Shane, E.; Boonen, S.; Marin, F.; Donley, D.W.; Taylor, K.A.; Dalsky, G.P.; Marcus, R. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 2028–2039. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071408>.
32. Saag, K.G.; Wagman, R.B.; Geusens, P.; Adachi, J.D.; Messina, O.D.; Emkey, R.; Chapurlat, R.; Wang, A.; Pannacciulli, N.; Lems, W.F. Denosumab versus risedronate in glucocorticoid-induced osteoporosis: A multicentre, randomised, double-blind, active-controlled, double-dummy, non-inferiority study. *Lancet. Diabetes Endocrinol.* **2018**, *6*, 445–454. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(18\)30075-5](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(18)30075-5).
33. Reginster, J.Y.; Kuntz, D.; Verdickt, W.; Wouters, M.; Guillemin, L.; Menkès, C.J.; Nielsen, K. Prophylactic use of alfacalcidol in corticosteroid-induced osteoporosis. *Osteoporos. Int.* **1999**, *9*, 75–81. <https://doi.org/10.1007/s001980050118>.
34. Amin, S.; LaValley, M.P.; Simms, R.W.; Felson, D.T. The role of vitamin D in corticosteroid-induced osteoporosis: A meta-analytic approach. *Arthritis Rheum.* **1999**, *42*, 1740–1751. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199908\)42:8<1740::Aid-anr25>3.0.Co;2-e](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199908)42:8<1740::Aid-anr25>3.0.Co;2-e).
35. Homik, J.; Suarez-Almazor, M.E.; Shea, B.; Cranney, A.; Wells, G.; Tugwell, P. Calcium and vitamin D for corticosteroid-induced osteoporosis. *Cochrane*

- Database Syst. Rev.* **2000**, 1998, Cd000952.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.Cd000952>.
36. Raterman, H.G.; Bultink, I.E.M.; Lems, W.F. Current Treatments and New Developments in the Management of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. *Drugs* **2019**, *79*, 1065–1087. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01145-6>.
37. Lane, N.E.; Sanchez, S.; Modin, G.W.; Genant, H.K.; Pierini, E.; Arnaud, C.D. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 1627–1633. <https://doi.org/10.1172/jci3914>.
38. Amiche, M.A.; Lévesque, L.E.; Gomes, T.; Adachi, J.D.; Cadarette, S.M. Effectiveness of Oral Bisphosphonates in Reducing Fracture Risk Among Oral Glucocorticoid Users: Three Matched Cohort Analyses. *J. Bone Miner. Res.* **2018**, *33*, 419–429. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3318>.
39. Murphy, D.R.; Smolen, L.J.; Klein, T.M.; Klein, R.W. The cost effectiveness of teriparatide as a first-line treatment for glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis patients in Sweden. *BMC Musculoskelet Disord.* **2012**, *13*, 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-13-213>.
40. Hsu, E.; Nanes, M. Advances in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2017**, *24*, 411–417. <https://doi.org/10.1097/med.0000000000000368>.
41. Kawano, T.; Miyakoshi, N.; Kasukawa, Y.; Hongo, M.; Tsuchie, H.; Sato, C.; Fujii, M.; Suzuki, M.; Akagawa, M.; Ono, Y.; et al. Effects of combined therapy of alendronate and low-intensity pulsed ultrasound on metaphyseal bone repair after osteotomy in the proximal tibia of glucocorticoid-induced osteopenia rats. *Osteoporos Sarcopenia* **2017**, *3*, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2017.11.001>.
42. Doyon, A.R.; Ferries, I.K.; Li, J. Glucocorticoid attenuates the anabolic effects of parathyroid hormone on fracture repair. *Calcif Tissue Int.* **2010**, *87*, 68–76. <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9370-3>.
43. Kennel, K.A.; Drake, M.T. Adverse effects of bisphosphonates: Implications for osteoporosis management. *Mayo Clin. Proc.* **2009**, *84*, 632–637; quiz 638. [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(11\)60752-0](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(11)60752-0).
44. Vahle, J.L.; Long, G.G.; Sandusky, G.; Westmore, M.; Ma, Y.L.; Sato, M. Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH(1-34)] are dependent on duration

- of treatment and dose. *Toxicol. Pathol.* **2004**, *32*, 426–438. <https://doi.org/10.1080/01926230490462138>.
45. Miller, P.D. Safety of parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis. *Curr. Osteoporos Rep.* **2008**, *6*, 12–16. <https://doi.org/10.1007/s11914-008-0003-y>.
46. Otto, S.; Pautke, C.; Van den Wyngaert, T.; Niepel, D.; Schiødt, M. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Prevention, diagnosis and management in patients with cancer and bone metastases. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *69*, 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.06.007>.
47. Hildebrand, G.K.; Kasi, A. Denosumab. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2021.
48. Dhavan, R.; Tsai, L.H. A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 749–759. <https://doi.org/10.1038/35096019>.
49. Chang, K.H.; Vincent, F.; Shah, K. Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 5124–5137. <https://doi.org/10.1242/jcs.108183>.
50. Nguyen, M.D.; Julien, J.P. Cyclin-dependent kinase 5 in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosignals* **2003**, *12*, 215–220. <https://doi.org/10.1159/000074623>.
51. Paoletti, P.; Vila, I.; Rife, M.; Lizcano, J.M.; Alberch, J.; Gines, S. Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington’s disease neurodegeneration: The role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 10090–10101. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3237-08.2008>.
52. Lopes, J.P.; Agostinho, P. Cdk5: Multitasking between physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* **2011**, *94*, 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.03.006>.
53. Ahmad, M.; Krüger, B.T.; Kroll, T.; Vettorazzi, S.; Dorn, A.-K.; Mengele, F.; Lee, S.; Nandi, S.; Yilmaz, D.; Stolz, M.; et al. Inhibition of Cdk5 increases osteoblast differentiation, bone mass and improves fracture healing. *Bone Res.* **2021**. <https://doi.org/10.1038/boneres.01886>.
54. Ahmad, M.; Kroll, T.; Jakob, J.; Rauch, A.; Ploubidou, A.; Tuckermann, J. Cell-based RNAi screening and high-content analysis in primary calvarian osteoblasts applied to identification of osteoblast differentiation regulators. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32364-8>.
55. Jonason, J.H.; O’Keefe, R.J. Isolation and culture of neonatal mouse calvarial osteoblasts. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1130*, 295–305. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-989-5_22).



56. Gregory, C.A.; Gunn, W.G.; Peister, A.; Prockop, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **2004**, *329*, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002>.
57. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
58. Thiele, S.; Baschant, U.; Rauch, A.; Rauner, M. Instructions for producing a mouse model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *BoneKEy Rep.* **2014**, *3*, 552. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.47>.
59. Röntgen, V.; Blakytyn, R.; Matthys, R.; Landauer, M.; Wehner, T.; Göckelmann, M.; Jermendy, P.; Amling, M.; Schinke, T.; Claes, L.; et al. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2010**, *28*, 1456–1462. <https://doi.org/10.1002/jor.21148>.
60. Morgan, E.F.; Mason, Z.D.; Chien, K.B.; Pfeiffer, A.J.; Barnes, G.L.; Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Micro-computed tomography assessment of fracture healing: Relationships among callus structure, composition, and mechanical function. *Bone* **2009**, *44*, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.10.039>.
61. Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; Christiansen, B.A.; Guldberg, R.E.; Jepsen, K.J.; Muller, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* **2010**, *25*, 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>.
62. Najafova, Z.; Liu, P.; Wegwitz, F.; Ahmad, M.; Tamon, L.; Kosinsky, R.L.; Xie, W.; Johnsen, S.A.; Tuckermann, J. RNF40 exerts stage-dependent functions in differentiating osteoblasts and is essential for bone cell crosstalk. *Cell Death Differ.* **2020**. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00614-w>.
63. Liu, P.; Lee, S.; Knoll, J.; Rauch, A.; Ostermay, S.; Luther, J.; Malkusch, N.; Lerner, U.H.; Zaiss, M.M.; Neven, M.; et al. Loss of menin in osteoblast lineage affects osteocyte-osteoclast crosstalk causing osteoporosis. *Cell Death Differ.* **2017**, *24*, 672–682. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.165>.
64. Parfitt, A.M.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry

- Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* **1987**, *2*, 595–610. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>.
65. Dempster, D.W.; Compston, J.E.; Drezner, M.K.; Glorieux, F.H.; Kanis, J.A.; Malluche, H.; Meunier, P.J.; Ott, S.M.; Recker, R.R.; Parfitt, A.M. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* **2013**, *28*, 2–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>.
66. Amling, M.; Priemel, M.; Holzmann, T.; Chapin, K.; Rueger, J.M.; Baron, R.; Demay, M.B. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: Formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* **1999**, *140*, 4982–4987. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7110>.
67. Li, J.; Zhang, N.; Huang, X.; Xu, J.; Fernandes, J.C.; Dai, K.; Zhang, X. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e832. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.348>.
68. Luppen, C.A.; Smith, E.; Spevak, L.; Boskey, A.L.; Frenkel, B. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 1186–1197. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.7.1186>.
69. Martin, T.J.; Ng, K.W. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 357–366. <https://doi.org/10.1002/jcb.240560312>.
70. Thomas, G.P.; Baker, S.U.; Eisman, J.A.; Gardiner, E.M. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J. Endocrinol.* **2001**, *170*, 451–460. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700451>.
71. Compston, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Horm. Res.* **2003**, *60* (Suppl. 3), 77–79. <https://doi.org/10.1159/000074506>.
72. Tsai, L.H.; Takahashi, T.; Caviness, V.S., Jr.; Harlow, E. Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system. *Development* **1993**, *119*, 1029–1040.
73. Sharma, S.; Zhang, T.; Michowski, W.; Rebecca, V.W.; Xiao, M.; Ferretti, R.; Suski, J.M.; Bronson, R.T.; Paulo, J.A.; Frederick, D.; et al. Targeting the cyclin-dependent kinase 5 in metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 8001–8012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912617117>.

74. Dorand, R.D.; Nthale, J.; Myers, J.T.; Barkauskas, D.S.; Avril, S.; Chirieleison, S.M.; Pareek, T.K.; Abbott, D.W.; Stearns, D.S.; Letterio, J.J.; et al. Cdk5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity. *Science* **2016**, *353*, 399–403. <https://doi.org/10.1126/science.aae0477>.
75. Askew, D.; Pareek, T.K.; Eid, S.; Ganguly, S.; Tyler, M.; Huang, A.Y.; Letterio, J.J.; Cooke, K.R. Cyclin-dependent kinase 5 activity is required for allogeneic T-cell responses after hematopoietic cell transplantation in mice. *Blood* **2017**, *129*, 246–256. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-702738>.
76. Ersek, A.; Santo, A.I.; Vattakuzhi, Y.; George, S.; Clark, A.R.; Horwood, N.J. Strain dependent differences in glucocorticoid-induced bone loss between C57BL/6J and CD-1 mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36513. <https://doi.org/10.1038/srep36513>.
77. Brent, M.B.; Thomsen, J.S.; Brüel, A. Short-term glucocorticoid excess blunts abaloparatide-induced increase in femoral bone mass and strength in mice. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12258. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91729-8>.
78. Thiele, S.; Ziegler, N.; Tsourdi, E.; De Bosscher, K.; Tuckermann, J.P.; Hofbauer, L.C.; Rauner, M. Selective glucocorticoid receptor modulation maintains bone mineral density in mice. *J. Bone Miner. Res.* **2012**, *27*, 2242–2250. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1688>.
79. Yao, W.; Cheng, Z.; Pham, A.; Busse, C.; Zimmermann, E.A.; Ritchie, R.O.; Lane, N.E. Glucocorticoid-induced bone loss in mice can be reversed by the actions of parathyroid hormone and risedronate on different pathways for bone formation and mineralization. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 3485–3497. <https://doi.org/10.1002/art.23954>.
80. Hildebrandt, S.; Baschant, U.; Thiele, S.; Tuckermann, J.; Hofbauer, L.C.; Rauner, M. Glucocorticoids suppress Wnt16 expression in osteoblasts in vitro and in vivo. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8711. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26300-z>.
81. Matsushita, T.; Chan, Y.Y.; Kawanami, A.; Balmes, G.; Landreth, G.E.; Murakami, S. Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis. *Mol. Cell Biol.* **2009**, *29*, 5843–5857. <https://doi.org/10.1128/mcb.01549-08>.
82. Kassel, O.; Sancono, A.; Kratzschmar, J.; Kreft, B.; Stassen, M.; Cato, A.C. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7108–7116. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7108>.

83. Postnov, A.; De Schutter, T.; Sijbers, J.; Karperien, M.; De Clerck, N. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing mice is not prevented by simultaneous intermittent PTH treatment. *Calcif. Tissue Int.* **2009**, *85*, 530–537. <https://doi.org/10.1007/s00223-009-9301-3>.
84. Boyce, B.F.; Xing, L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2007**, *5*, 98–104. <https://doi.org/10.1007/s11914-007-0024-y>.
85. Boyce, B.F.; Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *473*, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018>.
86. Udagawa, N.; Takahashi, N.; Yasuda, H.; Mizuno, A.; Itoh, K.; Ueno, Y.; Shinki, T.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J.; Higashio, K.; et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* **2000**, *141*, 3478–3484. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7634>.
87. Baron, R.; Chakraborty, M.; Chatterjee, D.; Horne, W.C.; Lomri, A.; Ravesloot, J.H. Biology of the Osteoclast. *Handb. Exp. Pharmacol.* **1993**, *107*, 111–147.
88. Claes, L.; Recknagel, S.; Ignatius, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 133–143. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.1>.
89. Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11*, 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>.
90. Loi, F.; Córdova, L.A.; Pajarinen, J.; Lin, T.H.; Yao, Z.; Goodman, S.B. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* **2016**, *86*, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>.
91. Do, P.A.; Lee, C.H. The Role of CDK5 in Tumours and Tumour Microenvironments. *Cancers* **2020**, *13*. <https://doi.org/10.3390/cancers13010101>.
92. Cicenas, J.; Kalyan, K.; Sorokinas, A.; Stankunas, E.; Levy, J.; Meskinyte, I.; Stankevicius, V.; Kaupinis, A.; Valius, M. Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann. Transl. Med.* **2015**, *3*, 135. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.61>.
93. Kino, T.; Ichijo, T.; Amin, N.D.; Kesavapany, S.; Wang, Y.; Kim, N.; Rao, S.; Player, A.; Zheng, Y.L.; Garabedian, M.J.; et al. Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: Clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Mol. Endocrinol.* **2007**, *21*, 1552–1568. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0345>.

94. Pfänder, P.; Fidan, M.; Burret, U.; Lipinski, L.; Vettorazzi, S. Cdk5 Deletion Enhances the Anti-inflammatory Potential of GC-Mediated GR Activation During Inflammation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1554. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01554>.
95. Schmidt-Bleek, K.; Kwee, B.J.; Mooney, D.J.; Duda, G.N. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2015**, *21*, 354–364. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0677>.
96. Liebl, J.; Zhang, S.; Moser, M.; Agalarov, Y.; Demir, C.S.; Hager, B.; Bibb, J.A.; Adams, R.H.; Kiefer, F.; Miura, N.; et al. Cdk5 controls lymphatic vessel development and function by phosphorylation of Foxc2. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7274. <https://doi.org/10.1038/ncomms8274>.
97. Merk, H.; Zhang, S.; Lehr, T.; Muller, C.; Ulrich, M.; Bibb, J.A.; Adams, R.H.; Bracher, F.; Zahler, S.; Vollmar, A.M.; et al. Inhibition of endothelial Cdk5 reduces tumor growth by promoting non-productive angiogenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 6088–6104. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6842>.
98. Liebl, J.; Weitensteiner, S.B.; Vereb, G.; Takacs, L.; Furst, R.; Vollmar, A.M.; Zahler, S. Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 35932–35943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126177>.
99. Liebl, J.; Krystof, V.; Vereb, G.; Takacs, L.; Strnad, M.; Pechan, P.; Havlicek, L.; Zatloukal, M.; Furst, R.; Vollmar, A.M.; et al. Anti-angiogenic effects of purine inhibitors of cyclin dependent kinases. *Angiogenesis* **2011**, *14*, 281–291. <https://doi.org/10.1007/s10456-011-9212-6>.
100. Peng, Y.; Lv, S.; Li, Y.; Zhu, J.; Chen, S.; Zhen, G.; Cao, X.; Wu, S.; Crane, J.L. Glucocorticoids Disrupt Skeletal Angiogenesis Through Transrepression of NF- $\kappa$ B-Mediated Preosteoclast Pdgfb Transcription in Young Mice. *J. Bone Miner. Res.* **2020**, *35*, 1188–1202. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3987>.
101. Tuckermann, J.; Adams, R.H. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2021**, *17*, 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00682-3>.

## IV DISKUSSION

***Die systemische Hemmung der Cdk5 mit dem Inhibitor Roscovitin hebt die negativen Effekte einer GIO auf das Skelett auf.***

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die pharmakologische Hemmung der Cdk5 mit Roscovitin den hohen Knochenmasseverlust während der GK Therapie stoppen und die Knochenmasse wiederherstellen kann.

In dieser Arbeit wurde ein durch GK-Applikation induzierbares Osteoporosemodell verwendet, da GK zu den häufigsten angewendeten Pharmaka weltweit zählen und die Therapie auch schon nach wenigen Monaten zu einem signifikant gesteigerten Frakturrisiko führt (VAN STAA et al., 2000; VAN STAA et al., 2001; STAA et al., 2002; RHEN und CIDLOWSKI, 2005b). Es gilt als gesichert, dass GK in hohen Dosen *in vitro* einen negativen Einfluss auf die Osteoblastendifferenzierung und deren Mineralisationsverhalten haben und *in vivo* zu einer starken Beeinträchtigung der trabekulären sowie kortikalen Knochenmasse führen (LUPPEN et al., 2003; RAUCH et al., 2010b; THIELE et al., 2012; LI et al., 2013; HARTMANN et al., 2016; PIEMONTESE et al., 2016; WEINSTEIN et al., 2017; AHMAD et al., 2019; BRENT et al., 2021b). Ursächlich hierfür ist vor allem eine beeinträchtigte Osteoblastogenese und ein verstärktes Zugrundegehen von Osteozyten sowie eine gesteigerte Osteoklastogenese, was sukzessive zu einer verringerten Knochenmasse führt (RAUCH et al., 2010b; THIELE et al., 2012; PIEMONTESE et al., 2016; HILDEBRANDT et al., 2018; BRENT et al., 2021a). Unsere Versuche an murinen Osteoblasten konnten die negativen GK Effekte auf die Differenzierung und das Mineralisierungsverhalten bestätigen. So war die Alp Expression nach Zugabe von Dexamethason (Dex) signifikant verringert und im Alizarin Rot Assay konnten signifikant weniger Mineralisationsherde dargestellt werden. Auch auf RNA Ebene zeigte sich der suppressive Effekt von Dex auf die Expression wesentlicher Osteoblasten Proliferationsmarker (*Runx2*, *Sp7*, *Alpl*, *Bglap*). Um *in vivo* eine GIO zu induzieren, wurden Mäusen s.c. Pred Retardpellets in den Nacken implantiert (THIELE et al., 2014). Die Pred Therapie löste nach schon 14 Tagen eine schwerwiegende Osteoporose aus,

die sich an signifikant verringertem Knochenvolumen sowie verringerter Trabekelanzahl, -dicke und -dichte erkennen ließ. Dies bestätigen ebenfalls die *in vivo* Ergebnisse der Literatur (LUPPEN et al., 2003; RAUCH et al., 2010b; THIELE et al., 2012; LI et al., 2013; HARTMANN et al., 2016; PIEMONTESE et al., 2016; WEINSTEIN et al., 2017; AHMAD et al., 2019; BRENT et al., 2021b).

Eine Dysregulation der Cdk5 ist bisher vor allem in Verbindung mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Chorea Huntington, Parkinson, amyotropher Lateralsklerose sowie verschiedenen Tumorgenesen bekannt (NGUYEN und JULIEN, 2003; PAOLETTI et al., 2008; LOPES und AGOSTINHO, 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals eine Verbindung zwischen Cdk5 und der Osteoblastendifferenzierung herstellen und nachweisen, dass die Cdk5 im Knochengewebe exprimiert wird (AHMAD et al., 2021). Sie agiert dort als negativer Regulator der Osteoblastogenese über den MAPK Signalweg und beeinträchtigt damit einen der wesentlichen Osteoblasten Regulatoren Runx2 (LEE et al., 2002; AHMAD et al., 2021). Hemmt man die Cdk5 pharmakologisch mit Roscovitin, zeigt sich ein starker osteoanaboler Effekt (AHMAD et al., 2021). In der GIO Therapie wurde ein solcher Effekt durch ein systemisch verabreichtes Pharmakon klinisch bisher nur nach einer Therapie mit Parathormonanaloga beschrieben (LANE et al., 1998; DEVOGELAER et al., 2010). Um auch Roscovitin als osteoanaboles Pharmakon zu etablieren, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Cdk5 Deletion bzw. Inhibition auch unter der Herausforderung eines Knochenmasseverlusts durch GIO osteoanabol wirkt.

*In vitro* konnte sowohl der siRNA vermittelte Knockdown, als auch die Roscovitin vermittelte Inhibition der Cdk5 die negativen Dex Effekte auf die Osteoblastendifferenzierung vollständig aufheben. Dies ließ sich anhand der Alp Aktivität quantifizieren und manifestierte sich auch im Mineralisierungsverhalten der Osteoblasten in der Alizarin Rot Färbung. Auf RNA Ebene zeigte sich der stimulierende Einfluss des Cdk5 Knockdowns, indem die Expression wesentlicher Osteoblasten Proliferationsmarker (*Runx2*, *Sp7*, *Alpl*, *Bglap*) nach Repression durch Dex wieder im Normalbereich lag. Dieser Effekt begründet sich möglicherweise

in einer Kommunikation der GK und Cdk5 Signalwege. Exogene GK hemmen beispielsweise den extracellular signal-regulated kinase (ERK) Signalweg, der als wesentlicher Aktivator der Osteoblastogenese fungiert (KASSEL et al., 2001; MATSUSHITA et al., 2009) und durch Cdk5 Deletion stimuliert wird.

Nach diesen vielversprechenden *in vitro* Versuchen wurde *in vivo* ein Pred Retardpellet s.c. implantiert (THIELE et al., 2014) und dreimal wöchentlich Roscovitin i.p. appliziert (AHMAD et al., 2021). Der starken Pred induzierten Osteoporose konnte durch regelmäßige Roscovitin Applikation entgegengewirkt werden und es kam bei den behandelten Tieren zu keiner Reduktion der Knochenmasse und Trabekelstruktur. Überraschenderweise zeigte die histologische Auswertung, dass die verbesserte Knochenmineraldichte in den mit Roscovitin behandelten Tieren ein Resultat verringerter Osteoklastogenese und nicht, wie erwartet (AHMAD et al., 2021), verstärkter Osteoblastogenese ist. So zeigte diese mit Roscovitin behandelte Gruppe eine reduzierte Osteoklastenzahl und -aktivität im Vergleich zu Mäusen, die ausschließlich mit Pred behandelt wurden. Die Osteblastenzahl blieb jedoch unverändert reduziert. Obgleich diese Ergebnisse unerwartet waren, zeigen Studien mit anderen Osteoanabolika einen ähnlichen Effekt. So wurde z.B. der osteoanabole Effekt von Parathormon durch eine hochdosierte GK Therapie deutlich verringert (POSTNOV et al., 2009; BRENT et al., 2021a). Die Osteoblastogenese konnte in unserer *in vivo* Studie nicht wiederhergestellt werden, auch wenn dies durch die *in vitro* Ergebnisse anzunehmen war. Dem könnte eine Modulation der RANKL/OPG Expression zugrunde liegen. Im physiologischen Zustand existiert ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen der RANKL Expression durch Osteoblasten, um Osteoklastogenese zu stimulieren, und der OPG Expression zum Schutz vor exzessiver Resorption (UDAGAWA et al., 2000; BOYCE und XING, 2007, 2008). GK Therapie stimuliert die RANKL- und vermindert die OPG Expression und führt so zu überschießender Knochenresorption (THIELE et al., 2012; PIEMONTESE et al., 2016; AHMAD et al., 2019). Der Einfluss auf dieses Gleichgewicht zeigt sich ebenfalls in den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit. Interessanterweise kehrt die Cdk5 Deletion dieses negative



Verhältnis um und stellt ein RANKL/OPG Verhältnis zugunsten von OPG ein. Diese Verknüpfung könnte ursächlich für die durch Roscovitin reduzierte Osteoklastogenese unter GK Therapie sein.

Zusammenfassend lässt sich somit herausstellen, dass die Applikation von Pred im Mausmodell zu einer schwerwiegenden Osteoporose führt und damit ein gut funktionierendes GIO Modell darstellt. Weiterhin kann eine systemische Roscovitin Applikation die negativen Effekte einer GIO auf den Knochen durch Hemmung der Osteoklastogenese verhindern.

***Die Cdk5 Inhibition mit Roscovitin verbessert nicht die Frakturheilung unter dem negativen Einfluss einer systemischen GK-Therapie.***

Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, die therapeutische Anwendbarkeit des Cdk5 Inhibitors Roscovitin zur Stimulation der verzögerten Frakturheilung unter GK Therapie zu evaluieren. Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess mit sich überlagernden Phasen von Inflammation, weicher und harter Kallusbildung und Kallusremodeling (CLAES et al., 2012; EINHORN und GERSTENFELD, 2015; LOI et al., 2016). Wird dieser komplexe Prozess durch äußere Einflüsse gestört, kommt es zu verzögerter oder gänzlich ausbleibender Heilung (CLAES et al., 2012; WILDEMANN et al., 2021). GK beeinflussen eine Vielzahl der an der Knochenregeneration beteiligten Zellen, vor allem Immun- und mesenchymale Zellen (RAPP et al., 2018; HACHEMI et al., 2021). Eine Langzeitbehandlung mit GK führte zu einer signifikant beeinträchtigten Frakturheilung in verschiedenen Tiermodellen (LYRITIS et al., 1975; NEWMAN et al., 1987; WATERS et al., 2000; SANDBERG und ASPENBERG, 2015; LIU et al., 2018). In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte ein positiver Einfluss der Cdk5 Hemmung mit Roscovitin und der Knochenbildung während der Frakturheilung gezeigt werden (AHMAD et al., 2021). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Cdk5 und einer beeinträchtigten Frakturheilung unter GK Therapie zu evaluieren, wurde in dieser Arbeit ein etabliertes Femurfrakturmodell in der Maus verwendet (RÖNTGEN et al., 2010) und eine konstante GK Applikation durch s.c. Implantation eines Pred Retardpellets sichergestellt (THIELE et al., 2014). Kongruent mit der Literatur (LYRITIS et al., 1975; NEWMAN et al., 1987; WATERS et al., 2000; SANDBERG und ASPENBERG, 2015; LIU

et al., 2018) beeinträchtigte Pred die Frakturheilung stark, was an einer signifikant verringerten Kallusbildung und Knochenregeneration sowie stark reduzierten Osteoblastenzahlen sowohl 14 als auch 23 Tage nach der Fraktur zu erkennen war. Somit resultierte diese Therapie per Definitionem in einer Pseudarthrose (FRÖLKE und PATKA, 2007). Die gleichzeitige Applikation von Roscovitin konnte den starken Effekt der GK Gabe nicht aufhalten oder gar umkehren. Diese Erkenntnis spiegelt die Beobachtungen im intakten Knochen wider. So zeigte sich auch hier eine Reduktion der Osteoklastogenese aber kein Anstieg in den Osteoblastenzahlen, sodass die wichtigsten Zellen des Knochenaufbaus für die Frakturheilung fehlen bzw. stark beeinträchtigt sind (BAHNEY et al., 2019). Weiterhin spielt die Cdk5 auch in der Inflammation eine wesentliche Rolle (KINO et al., 2010; CICENAS et al., 2015; PFÄNDER et al., 2019; DO und LEE, 2020) und es ist derzeit noch unklar, ob und in welcher Form eine verminderte Inflammation durch GK Applikation und die zeitgleiche Hemmung der Cdk5 miteinander interagieren. Denkbar wäre eine Promotion der anti-inflammatorischen GK Effekte und damit eine Beeinträchtigung der nachfolgenden Frakturheilungsprozesse (CLAES et al., 2012; EINHORN und GERSTENFELD, 2015; SCHMIDT-BLEEK et al., 2015; HACHEMI et al., 2018). Die Hemmung der Cdk5 ist außerdem ein wesentliches pharmakologisches Target zur Bekämpfung der Neoangiogenese in der Tumorthherapie (LIEBL et al., 2010; LIEBL et al., 2011; MERK et al., 2016) und könnte damit einen Einfluss auf die Angiogenese haben, die vor allem während der initialen Inflammation sowie der fibrovaskulären Phase der Frakturheilung essentiell ist (BAHNEY et al., 2019; PENG et al., 2020; TUCKERMANN und ADAMS, 2021).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Hemmung der Cdk5 mit Roscovitin als möglicher Ansatz zur systemischen GIO Therapie beschrieben werden. Jedoch war die Roscovitin Therapie ausschließlich in nicht-frakturiertem Knochen erfolgreich. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse sind weitere Studien notwendig, um den Einfluss der Cdk5 auf den Knochen vor allem in Zusammenhang mit einem inflammatorischen Geschehen zu erforschen.

## V ZUSAMMENFASSUNG

### **Ist die Cdk5 ein Target zur Therapie des Knochenmasseverlusts und der gestörten Frakturheilung unter GK-Therapie?**

Die anti-inflammatorische Wirkung von GK ist unerlässlich zur Behandlung einer Vielzahl von entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen. Sie führen in der Langzeittherapie jedoch oft zu GIO, der häufigsten Form der sekundären Osteoporose. Dieser Nebenwirkung kann mit Antiresorptiva oder Osteoanabolika begegnet werden, welche jedoch teuer sind und/oder diverse, teils schwere Nebenwirkungen mit sich bringen. Folglich ist die Erforschung neuer Targets für osteoanabole Medikamente von entscheidender Bedeutung. Wir konnten in früheren Arbeiten die Cdk5 als Suppressor der Osteoblastogenese identifizieren und zeigen, dass deren Hemmung mit Roscovitin die Osteoblastendifferenzierung, Knochenbildung und Frakturheilung signifikant verbessert. Ziel dieser Doktorarbeit war es herauszufinden, ob die Cdk5 auch ein Target für die Verbesserung der negativen Effekte exogener GK auf den Knochen und die Frakturheilung ist.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass ein siRNA Knockdown der *Cdk5* in primären, murinen Osteoblasten unter GK-Behandlung (Dex) zu einer verbesserten Expression der Alp, spezifischer osteogener Markergene (*Runx2*, *Sp7*, *Alpl*, *Bglap*) und einer verstärkten Mineralisierung führt. Diese Ergebnisse konnten auch mit Roscovitin erzielt werden. *In vivo* wurden im Mausmodell die negativen GK-Effekte (Pred) auf den Knochen durch Roscovitin-Applikation aufgehoben. Interessanterweise lag diesem Effekt eine reduzierte Osteoklastogenese und nicht eine, wie aufgrund der *in vitro* Versuche vermutet, erhöhte Osteoblastogenese zugrunde. Als letztes konnte gezeigt werden, dass Roscovitin die GK vermittelte verzögerte Frakturheilung nicht verbesserte.

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation lässt sich schlussfolgern, dass die Cdk5-Inhibition mit Roscovitin *in vitro* die Osteoblastogenese unter GK-Behandlung signifikant verbessert und *in vivo* GK-vermittelten Knochenmasseverlust durch Hemmung der Osteoklastogenese aufhebt. Jedoch ist Roscovitin nicht in der Lage, die GK-vermittelte verzögerte Frakturheilung zu verbessern.

## VI SUMMARY

### **Can the Cdk5 function as a therapeutic target to ameliorate the deleterious effects of glucocorticoids on bone and fracture healing?**

Glucocorticoids (GC) are widely used, anti-inflammatory drugs. Although, they are of utmost importance for the treatment of many diseases, their long-term use leads to glucocorticoid-induced osteoporosis, which is the most common type of secondary osteoporosis. The majority of pharmacological treatment regimen against these deleterious effects are anti-resorptive and just few osteoanabolic treatments are available so far. However, these pharmaceuticals are costly and/or have major side effects. Consequently, identification of novel drug targets for cost-effective osteoanabolic treatments are of eminent importance. We have recently determined Cdk5 as a suppressor of osteoblastogenesis and showed that targeting Cdk5 with the small molecule inhibitor roscovitine increases osteoblast differentiation, stimulates osteogenesis and improves bone fracture healing. Here, we investigated whether Cdk5 deletion or inhibition is able to ameliorate the deleterious effects of GCs on osteoblast differentiation, bone mass and fracture healing.

We first indicated that silencing *Cdk5* in primary murine osteoblasts using siRNA, reverses Dex induced downregulation of osteoblast differentiation, as seen by an improved alkaline phosphatase activity, osteoblast specific marker gene expression and mineralization. Furthermore, we could show that Cdk5 inhibition with roscovitine was able to improve osteoblastogenesis during Dex treatment. *In vivo*, we treated mice with Pred and successfully ameliorated its detrimental effects on bone through Cdk5 inhibition. Intriguingly, these effects were based on a reduced osteoclastogenesis instead of an enhanced osteoblastogenesis as expected from the *in vitro* results. Last, we assessed that roscovitine application was not able to improve GC-mediated delayed fracture healing in mice.

In summary, we showed that systemic inhibition of Cdk5 using the small molecule inhibitor roscovitine increased osteoblastogenesis during Dex treatment *in vitro* and reversed GC induced bone loss by inhibition of osteoclastogenesis *in vivo*, with the limitation to non-fractured bone.

## VII LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi JD, Bensen WG, Bianchi F, Cividino A, Pillersdorf S, Sebaldt RJ, Tugwell P, Gordon M, Steele M, Webber C, Goldsmith CH. Vitamin D and calcium in the prevention of corticosteroid induced osteoporosis: a 3 year followup. *J Rheumatol* 1996; 23: 995-1000.
- Adachi JD, Bensen WG, Brown J, Hanley D, Hodzman A, Josse R, Kendler DL, Lentle B, Olszynski W, Ste-Marie LG, Tenenhouse A, Chines AA. Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 382-7.
- Adami G, Saag KG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: 2019 concise clinical review. *Osteoporos Int* 2019; 30: 1145-56.
- Ahmad M, Kroll T, Jakob J, Rauch A, Ploubidou A, Tuckermann J. Cell-based RNAi screening and high-content analysis in primary calvarian osteoblasts applied to identification of osteoblast differentiation regulators. *Scientific Reports* 2018; 8: 14045.
- Ahmad M, Hachemi Y, Paxian K, Mengele F, Koenen M, Tuckermann J. A Jack of All Trades: Impact of Glucocorticoids on Cellular Cross-Talk in Osteoimmunology. *Front Immunol* 2019; 10: 2460.
- Ahmad M, Krüger BT, Kroll T, Vettorazzi S, Dorn A-K, Mengele F, Lee S, Nandi S, Yilmaz D, Stolz M, Tangudu NK, Vázquez DC, Pachmayr J, Cirstea IC, Spasic MV, Ploubidou A, Ignatius A, Tuckermann J. Inhibition of Cdk5 increases osteoblast differentiation and bone mass and improves fracture healing. *Bone Research* 2021;
- Allen CS, Yeung JHS, Vandermeer B, Homik J. Bisphosphonates for steroid-induced osteoporosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016a;
- Allen CS, Yeung JH, Vandermeer B, Homik J. Bisphosphonates for steroid-induced osteoporosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2016b; 10: Cd001347.
- Amiche MA, Albaum JM, Tadrous M, Pechlivanoglou P, Lévesque LE, Adachi JD, Cadarette SM. Fracture risk in oral glucocorticoid users: a Bayesian meta-regression leveraging control arms of osteoporosis clinical trials. *Osteoporos Int* 2016; 27: 1709-18.
- Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR. Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 1994; 65: 462-6.
- Andrews EB, Gilsenan AW, Midkiff K, Sherrill B, Wu Y, Mann BH, Masica D. The

- US postmarketing surveillance study of adult osteosarcoma and teriparatide: study design and findings from the first 7 years. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 2429-37.
- Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Miclau T, Marcucio RS, Hankenson KD. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res* 2019; 37: 35-50.
- Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech* 2001; 34: 671-7.
- Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 1805-15.
- Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb j* 2004; 18: 70-80.
- Bell DM, Leung KK, Wheatley SC, Ng LJ, Zhou S, Ling KW, Sham MH, Koopman P, Tam PP, Cheah KS. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 1997; 16: 174-8.
- Beno T, Yoon YJ, Cowin SC, Fritton SP. Estimation of bone permeability using accurate microstructural measurements. *J Biomech* 2006; 39: 2378-87.
- Benson C, White J, De Bono J, O'Donnell A, Raynaud F, Cruickshank C, McGrath H, Walton M, Workman P, Kaye S, Cassidy J, Gianella-Borradori A, Judson I, Twelves C. A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-Roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days. *Br J Cancer* 2007; 96: 29-37.
- Bhandari M, Schemitsch EH, Karachalios T, Sancheti P, Poolman RW, Caminis J, Daizadeh N, Dent-Acosta RE, Egbuna O, Chines A, Miclau T. Romosozumab in Skeletally Mature Adults with a Fresh Unilateral Tibial Diaphyseal Fracture: A Randomized Phase-2 Study. *J Bone Joint Surg Am* 2020; 102: 1416-26.
- Bikle DD, Halloran B, Fong L, Steinbach L, Shellito J. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1993; 76: 456-61.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a

- polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989; 245: 855-7.
- Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep* 2007; 5: 98-104.
- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 139-46.
- Brent MB, Thomsen JS, Brüel A. Short-term glucocorticoid excess blunts abaloparatide-induced increase in femoral bone mass and strength in mice. *Sci Rep* 2021a; 11: 12258.
- Brent MB, Thomsen JS, Brüel A. Short-term glucocorticoid excess blunts abaloparatide-induced increase in femoral bone mass and strength in mice. *Scientific Reports* 2021b; 11: 12258.
- Burke D, Dishowitz M, Sweetwyne M, Miedel E, Hankenson KD, Kelly DJ. The role of oxygen as a regulator of stem cell fate during fracture repair in TSP2-null mice. *J Orthop Res* 2013; 31: 1585-96.
- Canalis E. Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 575-83.
- Capsoni F, Longhi M, Weinstein R. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: the rheumatologist's role. *Arthritis Research & Therapy* 2006; 8: 219.
- Carina V, Della Bella E, Costa V, Bellavia D, Veronesi F, Cepollaro S, Fini M, Giavaresi G. Bone's Response to Mechanical Loading in Aging and Osteoporosis: Molecular Mechanisms. *Calcif Tissue Int* 2020; 107: 301-18.
- Chang KH, Vincent F, Shah K. Deregulated Cdk5 triggers aberrant activation of cell cycle kinases and phosphatases inducing neuronal death. *J Cell Sci* 2012; 125: 5124-37.
- Chu HX, Arumugam TV, Gelderblom M, Magnus T, Drummond GR, Sobey CG. Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 1425-9.
- Chung R, Cool JC, Scherer MA, Foster BK, Xian CJ. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 1272-80.
- Ciani A, Toumi H, Pallu S, Tsai EHR, Diaz A, Guizar-Sicairos M, Holler M, Lespessailles E, Kewish CM. Ptychographic X-ray CT characterization of the osteocyte lacuno-canalicular network in a male rat's glucocorticoid induced osteoporosis model. *Bone Rep* 2018; 9: 122-31.
- Cicenas J, Kalyan K, Sorokinas A, Stankunas E, Levy J, Meskinyte I, Stankevicius V,

- Kaupinis A, Valius M. Roscovitine in cancer and other diseases. *Ann Transl Med* 2015; 3: 135.
- Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 133-43.
- Cohen S, Levy RM, Keller M, Boling E, Emkey RD, Greenwald M, Zizic TM, Wallach S, Sewell KL, Lukert BP, Axelrod DW, Chines AA. Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2309-18.
- Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 274-82.
- Colnot CI, Helms JA. A molecular analysis of matrix remodeling and angiogenesis during long bone development. *Mech Dev* 2001; 100: 245-50.
- Compston J. Type 2 diabetes mellitus and bone. *J Intern Med* 2018a; 283: 140-53.
- Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Endocrine* 2018b; 61: 7-16.
- Contador D, Ezquer F, Espinosa M, Arango-Rodriguez M, Puebla C, Sobrevia L, Conget P. Dexamethasone and rosiglitazone are sufficient and necessary for producing functional adipocytes from mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015; 240: 1235-46.
- Cooper KL, Oh S, Sung Y, Dasari RR, Kirschner MW, Tabin CJ. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature* 2013; 495: 375-8.
- Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbini CA, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD, Libanati C, Grauer A. Romosozumab Treatment in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 2016; 375: 1532-43.
- Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124: 991-8.
- De Bosscher K, Beck IM, Dejager L, Bougarne N, Gaigneaux A, Chateauvieux S, Ratman D, Bracke M, Tavernier J, Vanden Berghe W, Libert C, Diederich M, Haegeman G. Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF- $\kappa$ B and AP-1. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 143-63.
- Delaisé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix



- metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 504-13.
- Devogelaer JP, Adler RA, Recknor C, See K, Warner MR, Wong M, Krohn K. Baseline glucocorticoid dose and bone mineral density response with teriparatide or alendronate therapy in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Rheumatol* 2010; 37: 141-8.
- Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, Pagani M, Peluso I, Lin-Marq N, Koch M, Bilio M, Cantiello I, Verde R, De Masi C, Bianchi SA, Cicchini J, Perroud E, Mehmeti S, Dagand E, Schrunner S, Nürnberger A, Schmidt K, Metz K, Zwingmann C, Brieske N, Springer C, Hernandez AM, Herzog S, Grabbe F, Sieverding C, Fischer B, Schrader K, Brockmeyer M, Dettmer S, Helbig C, Alunni V, Battaini MA, Mura C, Henrichsen CN, Garcia-Lopez R, Echevarria D, Puelles E, Garcia-Calero E, Kruse S, Uhr M, Kauck C, Feng G, Milyaev N, Ong CK, Kumar L, Lam M, Semple CA, Gyenesei A, Mundlos S, Radelof U, Lehrach H, Sarmientos P, Reymond A, Davidson DR, Dollé P, Antonarakis SE, Yaspo ML, Martinez S, Baldock RA, Eichele G, Ballabio A. A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol* 2011; 9: e1000582.
- Do PA, Lee CH. The Role of CDK5 in Tumours and Tumour Microenvironments. *Cancers (Basel)* 2020; 13
- Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock RT, Lefebvre V. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 2012; 22: 597-609.
- Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87: 1434-8.
- Ehrnthaller C, Huber-Lang M, Nilsson P, Bindl R, Redeker S, Recknagel S, Rapp A, Mollnes T, Amling M, Gebhard F, Ignatius A. Complement C3 and C5 deficiency affects fracture healing. *PLoS One* 2013; 8: e81341.
- Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1272-81.
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 2015; 11: 45-54.
- Fischer V, Haffner-Luntzer M, Prystaz K, Vom Scheidt A, Busse B, Schinke T, Amling M, Ignatius A. Calcium and vitamin-D deficiency marginally impairs fracture

- healing but aggravates posttraumatic bone loss in osteoporotic mice. *Sci Rep* 2017; 7: 7223.
- Fischer V, Haffner-Luntzer M, Amling M, Ignatius A. Calcium and vitamin D in bone fracture healing and post-traumatic bone turnover. *Eur Cell Mater* 2018; 35: 365-85.
- Frölke JP, Patka P. Definition and classification of fracture non-unions. *Injury* 2007; 38 Suppl 2: S19-22.
- Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec* 1990; 226: 414-22.
- Fukushima H, Nakao A, Okamoto F, Shin M, Kajiya H, Sakano S, Bigas A, Jimi E, Okabe K. The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6402-12.
- Gerabek WEua (1990) Enzyklopädie Medizingeschichte. Oldenbourg Wissenschaftsverlag
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623-8.
- Gerstenfeld LC, Shapiro FD. Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 1996; 62: 1-9.
- Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA. Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 221-30.
- Glüer CC, Marin F, Ringe JD, Hawkins F, Mörnicke R, Papaioannu N, Farahmand P, Minisola S, Martínez G, Nolla JM, Niedhart C, Guañabens N, Nuti R, Martín-Mola E, Thomasius F, Kapetanos G, Peña J, Graeff C, Petto H, Sanz B, Reisinger A, Zysset PK. Comparative effects of teriparatide and risedronate in glucocorticoid-induced osteoporosis in men: 18-month results of the EuroGIOPs trial. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 1355-68.
- Gorter EA, Reinders CR, Krijnen P, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. The effect of osteoporosis and its treatment on fracture healing a systematic review of animal and clinical studies. *Bone Rep* 2021; 15: 101117.
- Grundnes O, Reikerås O. Blood flow and mechanical properties of healing bone. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop Scand* 1992; 63: 487-91.

- Grundnes O, Reikerås O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1993; 64: 340-2.
- Hachemi Y, Rapp AE, Picke AK, Weidinger G, Ignatius A, Tuckermann J. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture. *J Mol Endocrinol* 2018; 61: R75-r90.
- Hachemi Y, Rapp AE, Lee S, Dorn A-K, Krüger BT, Kaiser K, Ignatius A, Tuckermann J. Intact Glucocorticoid Receptor Dimerization Is Deleterious in Trauma-Induced Impaired Fracture Healing. *Frontiers in Immunology* 2021; 11
- Han Y, Lefebvre V. L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 4999-5013.
- Harper KD, Kregge JH, Marcus R, Mitlak BH. Osteosarcoma and teriparatide? *J Bone Miner Res* 2007; 22: 334.
- Hartmann K, Koenen M, Schauer S, Wittig-Blaich S, Ahmad M, Baschant U, Tuckermann JP. Molecular Actions of Glucocorticoids in Cartilage and Bone During Health, Disease, and Steroid Therapy. *Physiol Rev* 2016; 96: 409-47.
- Hattner R, Epker BN, Frost HM. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature* 1965; 206: 489-90.
- Hattori T, Müller C, Gebhard S, Bauer E, Pausch F, Schlund B, Bösl MR, Hess A, Surmann-Schmitt C, von der Mark H, de Crombrughe B, von der Mark K. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 2010; 137: 901-11.
- Hellmich MR, Pant HC, Wada E, Battey JF. Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10867-71.
- Hildebrandt S, Baschant U, Thiele S, Tuckermann J, Hofbauer LC, Rauner M. Glucocorticoids suppress Wnt16 expression in osteoblasts in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 2018; 8: 8711.
- Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of Osteoprotegerin Ligand and Inhibition of Osteoprotegerin Production by Glucocorticoids in Human Osteoblastic Lineage Cells: Potential Paracrine Mechanisms of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis1. *Endocrinology* 1999; 140: 4382-9.
- Hofbauer LC, Zeitz U, Schoppet M, Skalicky M, Schüler C, Stolina M, Kostenuik PJ, Erben RG. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition

- of RANKL. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1427-37.
- Hu DP, Ferro F, Yang F, Taylor AJ, Chang W, Mclau T, Marcucio RS, Bahney CS. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development* 2017; 144: 221-34.
- Hübner S, Dejager L, Libert C, Tuckermann JP. The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough. *Biological Chemistry* 2015; 396: 1223-31.
- Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 $\beta$ . *J Cell Biochem* 2011; 112: 2594-605.
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103: 1231-6.
- Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, Cole RM, Gilbert SR, Clemens TL, Morgan EF, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 596-609.
- Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993; 133: 848-59.
- Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. *Endocrinology* 2006; 147: 5592-9.
- Jia J, Yao W, Guan M, Dai W, Shahnazari M, Kar R, Bonewald L, Jiang JX, Lane NE. Glucocorticoid dose determines osteocyte cell fate. *Faseb j* 2011; 25: 3366-76.
- Jilka RL, Noble B, Weinstein RS. Osteocyte apoptosis. *Bone* 2013; 54: 264-71.
- Jonason JH, O'Keefe RJ. Isolation and culture of neonatal mouse calvarial osteoblasts. *Methods Mol Biol* 2014; 1130: 295-305.
- Jules J, Zhang P, Ashley JW, Wei S, Shi Z, Liu J, Michalek SM, Feng X. Molecular basis of requirement of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B signaling for interleukin 1-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287: 15728-38.
- Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, de Laet C, Melton IL, Tenenhouse A, Reeve J, Silman AJ, Pols HA, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D. A meta-

- analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 893-9.
- Kassel O, Sancono A, Krätzschar J, Kreft B, Stassen M, Cato AC. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo j* 2001; 20: 7108-16.
- Kidd PM. Vitamins D and K as pleiotropic nutrients: clinical importance to the skeletal and cardiovascular systems and preliminary evidence for synergy. *Altern Med Rev* 2010; 15: 199-222.
- Kino T, Jaffe H, Amin ND, Chakrabarti M, Zheng YL, Chrousos GP, Pant HC. Cyclin-dependent kinase 5 modulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor and regulates expression of brain-derived neurotrophic factor. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 941-52.
- Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, Nakano M, Fujii N, Nagasawa T, Nakamura T. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 813-23.
- Klein RG, Arnaud SB, Gallagher J, Deluca HF, Riggs BL. Intestinal calcium absorption in exogenous hypercortisonism: role of 25-hydroxyvitamin D and corticosteroid dose. *The Journal of clinical investigation* 1977; 60: 253-9.
- Kobza AO, Herman D, Papaioannou A, Lau AN, Adachi JD. Understanding and Managing Corticosteroid-Induced Osteoporosis. *Open Access Rheumatol* 2021; 13: 177-90.
- 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.
- Kovtun A, Bergdolt S, Hägele Y, Matthes R, Lambris JD, Huber-Lang M, Ignatius A. Complement receptors C5aR1 and C5aR2 act differentially during the early immune response after bone fracture but are similarly involved in bone repair. *Scientific Reports* 2017; 7: 14061.
- Kroll T, Schmidt D, Schwanitz G, Ahmad M, Hamann J, Schlosser C, Lin YC, Böhm KJ, Tuckermann J, Ploubidou A. High-Content Microscopy Analysis of Subcellular Structures: Assay Development and Application to Focal Adhesion Quantification. *Curr Protoc Cytom* 2016; 77: 12.43.1-12.43.4.
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; 423:3326.

- Krüger BT, Steppe L, Vettorazzi S, Haffner-Luntzer M, Lee S, Dorn A-K, Ignatius A, Tuckermann J, Ahmad M. Inhibition of Cdk5 Ameliorates Skeletal Bone Loss in Glucocorticoid-Treated Mice. *Biomedicines* 2022; 10: 404.
- Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N Engl J Med* 1999; 340: 737-8.
- Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 2000; 106: 1481-8.
- Lamy O, Gonzalez-Rodriguez E, Stoll D, Hans D, Aubry-Rozier B. Severe rebound-associated vertebral fractures after denosumab discontinuation: 9 clinical cases report. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2017; 102: 354-8.
- Lane NE, Sanchez S, Modin GW, Genant HK, Pierini E, Arnaud CD. Parathyroid hormone treatment can reverse corticosteroid-induced osteoporosis. Results of a randomized controlled clinical trial. *The Journal of clinical investigation* 1998; 102: 1627-33.
- Lane NE. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: New Insights into the Pathophysiology and Treatments. *Curr Osteoporos Rep* 2019; 17: 1-7.
- Langdahl BL, Libanati C, Crittenden DB, Bolognese MA, Brown JP, Daizadeh NS, Dokoupilova E, Engelke K, Finkelstein JS, Genant HK, Goemaere S, Hyldstrup L, Jodar-Gimeno E, Keaveny TM, Kendler D, Lakatos P, Maddox J, Malouf J, Massari FE, Molina JF, Ulla MR, Grauer A. Romosozumab (sclerostin monoclonal antibody) versus teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis transitioning from oral bisphosphonate therapy: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2017; 390: 1585-94.
- Le Tourneau C, Faivre S, Laurence V, Delbaldo C, Vera K, Girre V, Chiao J, Armour S, Frame S, Green SR, Gianella-Borradori A, Diéras V, Raymond E. Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer* 2010; 46: 3243-50.
- Lee KS, Hong SH, Bae SC. Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 2002; 21: 7156-63.
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 2336-46.

- Leipe J, Holle JU, Weseloh C, Pfeil A, Krüger K. German Society of Rheumatology recommendations for management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Z Rheumatol* 2021;
- Lew J, Huang QQ, Qi Z, Winkfein RJ, Aebersold R, Hunt T, Wang JH. A brain-specific activator of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 1994; 371: 423-6.
- Li EC, Davis LE. Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. *Clinical therapeutics* 2003; 25: 2669-708.
- Li J, Sarosi I, Cattley RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M, Morony S, Adamu S, Geng Z, Qiu W, Kostenuik P, Lacey DL, Simonet WS, Bolon B, Qian X, Shalhoub V, Ominsky MS, Zhu Ke H, Li X, Richards WG. Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone* 2006; 39: 754-66.
- Li J, Zhang N, Huang X, Xu J, Fernandes JC, Dai K, Zhang X. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death Dis* 2013; 4: e832.
- Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008; 23: 860-9.
- Li X, Gao Z, Wang J. Single percutaneous injection of stromal cell-derived factor-1 induces bone repair in mouse closed tibial fracture model. *Orthopedics* 2011; 34: 450.
- Liebl J, Weitensteiner SB, Vereb G, Takács L, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S. Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285: 35932-43.
- Liebl J, Krystof V, Vereb G, Takács L, Strnad M, Pechan P, Havlíček L, Zatloukal M, Fürst R, Vollmar A, Zahler S. Anti-angiogenic effects of purine inhibitors of cyclin dependent kinases. *Angiogenesis* 2011; 14: 281-91.
- Liu YZ, Akhter MP, Gao X, Wang XY, Wang XB, Zhao G, Wei X, Wu HJ, Chen H, Wang D, Cui L. Glucocorticoid-induced delayed fracture healing and impaired bone biomechanical properties in mice. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 1465-74.
- Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone* 2016; 86: 119-30.
- Lopes JP, Agostinho P. Cdk5: multitasking between physiological and pathological

- conditions. *Prog Neurobiol* 2011; 94: 49-63.
- Lu C, Marcucio R, Miclau T. Assessing angiogenesis during fracture healing. *Iowa Orthop J* 2006; 26: 17-26.
- Lui JC, Yue S, Lee A, Kikani B, Temnycky A, Barnes KM, Baron J. Persistent Sox9 expression in hypertrophic chondrocytes suppresses transdifferentiation into osteoblasts. *Bone* 2019; 125: 169-77.
- Luppen CA, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 1186-97.
- Lyritys G, Papadopoulou Z, Nikiforidis P, Batrinos M, Varonos D. Effect of cortisone and an anabolic steroid upon plasma hydroxyproline during fracture healing in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1975; 46: 25-30.
- Lyu Q (2017) Therapeutic potential of nucleic acid aptamers against sclerostin in the treatment of osteoporosis
- Ma Y, Zhou Y, Wu F, Ji W, Zhang J, Wang X. The Bidirectional Interactions Between Inflammation and Coagulation in Fracture Hematoma. *Tissue Eng Part B Rev* 2019; 25: 46-54.
- Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 2010; 19: 329-44.
- Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42: 551-5.
- Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J Cell Physiol* 2008; 215: 234-42.
- Matsushita T, Chan YY, Kawanami A, Balmes G, Landreth GE, Murakami S. Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 5843-57.
- Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, Theurich S, Hausen AC, Schmitz J, Brönneke HS, Estevez E, Allen TL, Mesaros A, Partridge L, Febbraio MA, Chawla A, Wunderlich FT, Brüning JC. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and



- obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol* 2014; 15: 423-30.
- McClung M, Wagman RB, Miller P, Wang A, Lewiecki E. Observations following discontinuation of long-term denosumab therapy. *Osteoporosis International* 2017; 28: 1723.
- McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster J-Y, Zanchetta JR, Wasserman SM, Katz L, Maddox J, Yang Y-C, Libanati C, Bone HG. Romosozumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. *New England Journal of Medicine* 2014; 370: 412-20.
- McDonough AK, Curtis JR, Saag KG. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20: 131-7.
- Meijer L, Nelson DJ, Riazanski V, Gabdoulkhakova AG, Hery-Arnaud G, Le Berre R, Loaëc N, Oumata N, Galons H, Nowak E, Guegantou L, Dorothée G, Prochazkova M, Hall B, Kulkarni AB, Gray RD, Rossi AG, Witko-Sarsat V, Norez C, Becq F, Ravel D, Mottier D, Rault G. Modulating Innate and Adaptive Immunity by (R)-Roscovitine: Potential Therapeutic Opportunity in Cystic Fibrosis. *J Innate Immun* 2016; 8: 330-49.
- Merk H, Zhang S, Lehr T, Müller C, Ulrich M, Bibb JA, Adams RH, Bracher F, Zahler S, Vollmar AM, Liebl J. Inhibition of endothelial Cdk5 reduces tumor growth by promoting non-productive angiogenesis. *Oncotarget* 2016; 7: 6088-104.
- Mizuno K, Mineo K, Tachibana T, Sumi M, Matsubara T, Hirohata K. The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 822-9.
- Mönkkönen H, Rogers MJ, Makkonen N, Niva S, Auriola S, Mönkkönen J. The cellular uptake and metabolism of clodronate in RAW 264 macrophages. *Pharm Res* 2001; 18: 1550-5.
- Morimoto E, Li M, Khalid AB, Krum SA, Chimge NO, Frenkel B. Glucocorticoids hijack Runx2 to stimulate Wif1 for suppression of osteoblast growth and differentiation. *Journal of cellular physiology* 2017; 232: 145-53.
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; 17: 1231-4.
- Newman RJ, Francis MJ, Duthie RB. Nuclear magnetic resonance studies of experimentally induced delayed fracture union. *Clin Orthop Relat Res* 1987: 253-61.

- Nguyen MD, Julien JP. Cyclin-dependent kinase 5 in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosignals* 2003; 12: 215-20.
- Nieves JW, Cosman F, McMahon D, Redko M, Hentschel I, Bartolotta R, Loftus M, Kazam JJ, Rotman J, Lane J. Teriparatide and pelvic fracture healing: a phase 2 randomized controlled trial. *Osteoporos Int* 2021;
- Oe K, Miwa M, Sakai Y, Lee SY, Kuroda R, Kurosaka M. An in vitro study demonstrating that haematomas found at the site of human fractures contain progenitor cells with multilineage capacity. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89: 133-8.
- Offermanns S. Glucocorticoide. In: *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2016: 575-87.
- Orchinik M, Murray TF, Moore FL. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 1991; 252: 1848-51.
- Overman RA, Yeh JY, Deal CL. Prevalence of oral glucocorticoid usage in the United States: a general population perspective. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013; 65: 294-8.
- Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res* 2011; 26: 19-26.
- Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone* 1990; 11: 401-6.
- Paoletti P, Vila I, Rifé M, Lizcano JM, Alberch J, Ginés S. Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5. *J Neurosci* 2008; 28: 10090-101.
- Park SH, Silva M, Bahk WJ, McKellop H, Lieberman JR. Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *J Orthop Res* 2002; 20: 1197-204.
- Peng Y, Lv S, Li Y, Zhu J, Chen S, Zhen G, Cao X, Wu S, Crane JL. Glucocorticoids Disrupt Skeletal Angiogenesis Through Transrepression of NF- $\kappa$ B-Mediated Preosteoclast Pdgfb Transcription in Young Mice. *J Bone Miner Res* 2020; 35: 1188-202.
- Pfänder P, Fidan M, Burret U, Lipinski L, Vettorazzi S. Cdk5 Deletion Enhances the Anti-inflammatory Potential of GC-Mediated GR Activation During Inflammation. *Front Immunol* 2019; 10: 1554.

- Pfeiffenberger M, Damerau A, Ponomarev I, Bucher CH, Chen Y, Barnewitz D, Thöne-Reineke C, Hoff P, Buttgerit F, Gaber T, Lang A. Functional Scaffold-Free Bone Equivalents Induce Osteogenic and Angiogenic Processes in a Human In Vitro Fracture Hematoma Model. *J Bone Miner Res* 2021; 36: 1189-201.
- Piemontese M, Xiong J, Fujiwara Y, Thostenson JD, O'Brien CA. Cortical bone loss caused by glucocorticoid excess requires RANKL production by osteocytes and is associated with reduced OPG expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 311: E587-93.
- Postnov A, De Schutter T, Sijbers J, Karperien M, De Clerck N. Glucocorticoid-induced osteoporosis in growing mice is not prevented by simultaneous intermittent PTH treatment. *Calcif Tissue Int* 2009; 85: 530-7.
- Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 21455-8.
- Prystaz K, Kaiser K, Kovtun A, Haffner-Luntzer M, Fischer V, Rapp AE, Liedert A, Strauss G, Waetzig GH, Rose-John S, Ignatius A. Distinct Effects of IL-6 Classic and Trans-Signaling in Bone Fracture Healing. *Am J Pathol* 2018; 188: 474-90.
- Rapp AE, Bindl R, Recknagel S, Erbacher A, Müller I, Schrezenmeier H, Ehrnthaller C, Gebhard F, Ignatius A. Fracture Healing Is Delayed in Immunodeficient NOD/scid-IL2R $\gamma$ cnnull Mice. *PLoS One* 2016; 11: e0147465.
- Rapp AE, Hachemi Y, Kemmler J, Koenen M, Tuckermann J, Ignatius A. Induced global deletion of glucocorticoid receptor impairs fracture healing. *Faseb j* 2018; 32: 2235-45.
- Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R, Ostermay S, Schinke T, Spanbroek R, Zaiss MM, Angel PE, Lerner UH, David J-P, Reichardt HM, Amling M, Schütz G, Tuckermann JP. Glucocorticoids Suppress Bone Formation by Attenuating Osteoblast Differentiation via the Monomeric Glucocorticoid Receptor. *Cell Metabolism* 2010a; 11: 517-31.
- Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R, Ostermay S, Schinke T, Spanbroek R, Zaiss MM, Angel PE, Lerner UH, David JP, Reichardt HM, Amling M, Schütz G, Tuckermann JP. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab* 2010b; 11: 517-31.

- Recknagel S, Bindl R, Kurz J, Wehner T, Schoengraf P, Ehrnthaller C, Qu H, Gebhard F, Huber-Lang M, Lambris JD, Claes L, Ignatius A. C5aR-antagonist significantly reduces the deleterious effect of a blunt chest trauma on fracture healing. *J Orthop Res* 2012; 30: 581-6.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine* 2005a; 353: 1711-23.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005b; 353: 1711-23.
- Rodan GA. Bone homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13361-2.
- Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6222s-30s.
- Roelofs AJ, Jauhainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson K. Peripheral blood monocytes are responsible for gammadelta T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol* 2009; 144: 245-50.
- Röntgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Göckelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res* 2010; 28: 1456-62.
- Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, Thamsborg G, Liberman UA, Delmas PD, Malice MP, Czachur M, Daifotis AG. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 292-9.
- Saag KG, Shane E, Boonen S, Marín F, Donley DW, Taylor KA, Dalsky GP, Marcus R. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2028-39.
- Saag KG, Zanchetta JR, Devogelaer JP, Adler RA, Eastell R, See K, Krege JH, Krohn K, Warner MR. Effects of teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: thirty-six-month results of a randomized, double-blind, controlled trial. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3346-55.
- Saag KG, Petersen J, Brandi ML, Karaplis AC, Lorentzon M, Thomas T, Maddox J, Fan M, Meisner PD, Grauer A. Romosozumab or Alendronate for Fracture Prevention in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* 2017; 377: 1417-27.

- Saag KG, Pannacciulli N, Geusens P, Adachi JD, Messina OD, Morales-Torres J, Emkey R, Butler PW, Yin X, Lems WF. Denosumab Versus Risedronate in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Final Results of a Twenty-Four-Month Randomized, Double-Blind, Double-Dummy Trial. *Arthritis Rheumatol* 2019; 71: 1174-84.
- Sandberg OH, Aspenberg P. Glucocorticoids inhibit shaft fracture healing but not metaphyseal bone regeneration under stable mechanical conditions. *Bone Joint Res* 2015; 4: 170-5.
- Sato AY, Richardson D, Cregor M, Davis HM, Au ED, McAndrews K, Zimmers TA, Organ JM, Peacock M, Plotkin LI, Bellido T. Glucocorticoids Induce Bone and Muscle Atrophy by Tissue-Specific Mechanisms Upstream of E3 Ubiquitin Ligases. *Endocrinology* 2017; 158: 664-77.
- Schemitsch EH, Miclau T, Karachalios T, Nowak LL, Sancheti P, Poolman RW, Caminis J, Daizadeh N, Dent-Acosta RE, Egbuna O, Chines A, Maddox J, Grauer A, Bhandari M. A Randomized, Placebo-Controlled Study of Romosozumab for the Treatment of Hip Fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2020; 102: 693-702.
- Schilcher J, Michaëlsson K, Aspenberg P. Bisphosphonate use and atypical fractures of the femoral shaft. *N Engl J Med* 2011a; 364: 1728-37.
- Schilcher J, Michaëlsson K, Aspenberg P. Bisphosphonate Use and Atypical Fractures of the Femoral Shaft. *New England Journal of Medicine* 2011b; 364: 1728-37.
- Schmidt-Bleek K, Kwee BJ, Mooney DJ, Duda GN. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis. *Tissue Eng Part B Rev* 2015; 21: 354-64.
- Sebastian A, Loots GG. Genetics of Sost/SOST in sclerosteosis and van Buchem disease animal models. *Metabolism* 2018; 80: 38-47.
- Selye H. On the stimulation of new bone-formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology* 1932; 16: 547-58.
- Shi Z, Zhou H, Pan B, Lu L, Liu J, Kang Y, Yao X, Feng S. Effectiveness of Teriparatide on Fracture Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0168691.
- Siebert S, Pratt AG, Stocken DD, Morton M, Cranston A, Cole M, Frame S, Buckley CD, Ng WF, Filer A, McInnes IB, Isaacs JD. Targeting the rheumatoid arthritis synovial fibroblast via cyclin dependent kinase inhibition: An early phase trial. *Medicine (Baltimore)* 2020; 99: e20458.

- Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 2014; 3: 481.
- Siris ES, Fan CS, Yang X, Sajjan S, Sen SS, Modi A. Association between gastrointestinal events and compliance with osteoporosis therapy. *Bone Rep* 2016; 4: 5-10.
- Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -dependent and-independent manner. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 2388-94.
- Søe K, Delaissé JM. Glucocorticoids maintain human osteoclasts in the active mode of their resorption cycle. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 2184-92.
- Sølling AK, Harsløf T, Kaal A, Rejnmark L, Langdahl B. Hypercalcemia after discontinuation of long-term denosumab treatment. *Osteoporosis International* 2016; 27: 2383-6.
- Staa TPv, Staa TPv, Staa TPv, Leufkens HGM, Cooper C. The Epidemiology of Corticosteroid-Induced Osteoporosis: a Meta-analysis. *Osteoporosis International* 2002; 13: 777-87.
- Subbiah V, Madsen V, Raymond A, Benjamin R, Ludwig J. Of mice and men: divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma. *Osteoporosis International* 2010; 21: 1041-5.
- SUYEMITSU T, TERAYAMA H. Specific binding sites for natural glucocorticoids in plasma membranes of rat liver. *Endocrinology* 1975; 96: 1499-508.
- Tang D, Yeung J, Lee KY, Matsushita M, Matsui H, Tomizawa K, Hatase O, Wang JH. An isoform of the neuronal cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) activator. *J Biol Chem* 1995; 270: 26897-903.
- Taylor AD, Saag KG. Anabolics in the management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an evidence-based review of long-term safety, efficacy and place in therapy. *Core Evid* 2019; 14: 41-50.
- Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, Gurtner GC. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 2005; 105: 1068-77.
- Thiele S, Ziegler N, Tsourdi E, De Bosscher K, Tuckermann JP, Hofbauer LC, Rauner M. Selective glucocorticoid receptor modulation maintains bone mineral density in mice. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 2242-50.

- Thiele S, Baschant U, Rauch A, Rauner M. Instructions for producing a mouse model of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bonekey Rep* 2014; 3: 552.
- Thompson Z, Miclau T, Hu D, Helms JA. A model for intramembranous ossification during fracture healing. *J Orthop Res* 2002; 20: 1091-8.
- Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson J-Å, Tsai M-J, O'Malley BW. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* 1988; 55: 361-9.
- Tsourdi E, Langdahl B, Cohen-Solal M, Aubry-Rozier B, Eriksen EF, Guañabens N, Obermayer-Pietsch B, Ralston SH, Eastell R, Zillikens MC. Discontinuation of Denosumab therapy for osteoporosis: A systematic review and position statement by ECTS. *Bone* 2017; 105: 11-7.
- Tu J, Henneicke H, Zhang Y, Stoner S, Cheng TL, Schindeler A, Chen D, Tuckermann J, Cooper MS, Seibel MJ, Zhou H. Disruption of glucocorticoid signaling in chondrocytes delays metaphyseal fracture healing but does not affect normal cartilage and bone development. *Bone* 2014; 69: 12-22.
- Tuckermann J, Adams RH. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease. *Nat Rev Rheumatol* 2021; 17: 608-20.
- U.S. Food & Drug Administration ELea. FORTEO (retiparatide) rDNA origin Injection - Risk evaluation and mitigation strategy (REMS). USA: U.S. Food & Drug Administration 2009; August 2013: RefID: 3366073. <https://www.fda.gov/media/77492/download>.
- Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, Shinki T, Gillespie MT, Martin TJ, Higashio K, Suda T. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141: 3478-84.
- Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 2000; 113 ( Pt 3): 377-81.
- Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 993-1000.
- van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. Use of inhaled corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 581-8.
- van Staa TP. The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2006; 79: 129-37.
- Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene* 2020; 754: 144855.

- Wang F-S, Lin C-L, Chen Y-J, Wang C-J, Yang KD, Huang Y-T, Sun Y-C, Huang H-C. Secreted Frizzled-Related Protein 1 Modulates Glucocorticoid Attenuation of Osteogenic Activities and Bone Mass. *Endocrinology* 2005; 146: 2415-23.
- Wang F-S, Ko J-Y, Yeh D-W, Ke H-C, Wu H-L. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology* 2008; 149: 1793-801.
- Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, Bostrom M. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand* 2000; 71: 316-21.
- Weber AJ, Li G, Kalak R, Street J, Buttgerit F, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H. Osteoblast-targeted disruption of glucocorticoid signalling does not delay intramembranous bone healing. *Steroids* 2010; 75: 282-6.
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *The Journal of clinical investigation* 1998; 102: 274-82.
- Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 2002; 109: 1041-8.
- Weinstein RS. Glucocorticoids, osteocytes, and skeletal fragility: the role of bone vascularity. *Bone* 2010; 46: 564-70.
- Weinstein RS, Hogan EA, Borrelli MJ, Liachenko S, O'Brien CA, Manolagas SC. The Pathophysiological Sequence of Glucocorticoid-Induced Osteonecrosis of the Femoral Head in Male Mice. *Endocrinology* 2017; 158: 3817-31.
- Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One* 2011; 6: e25900.
- Wildemann B, Ignatius A, Leung F, Taitsman LA, Smith RM, Pesántez R, Stoddart MJ, Richards RG, Jupiter JB. Non-union bone fractures. *Nat Rev Dis Primers* 2021; 7: 57.
- Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo j* 2003; 22: 6267-76.



- Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Pettit AR. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *Bonekey Rep* 2013; 2: 373.
- Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 709-20.
- Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 2011; 17: 1235-41.
- Yanbeiy ZA, Hansen KE. Denosumab in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* 2019; 13: 2843-52.
- Yang G, Zhu L, Hou N, Lan Y, Wu XM, Zhou B, Teng Y, Yang X. Osteogenic fate of hypertrophic chondrocytes. *Cell Res* 2014a; 24: 1266-9.
- Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014b; 111: 12097-102.
- Yoshida H, Hayashi S-I, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S-I. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 345: 442-4.
- Yuasa M, Mignemi NA, Barnett JV, Cates JM, Nyman JS, Okawa A, Yoshii T, Schwartz HS, Stutz CM, Schoenecker JG. The temporal and spatial development of vascularity in a healing displaced fracture. *Bone* 2014; 67: 208-21.

## VIII DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Anita Ignatius für die Möglichkeit, am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik zu promovieren. Sie haben mich großzügig gefördert und jederzeit bei allen Problemen und Fragen unterstützt und mir auf diese Weise einen großartigen Start in meine wissenschaftliche Laufbahn ermöglicht.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Eckhard Wolf für die Betreuung meiner Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ich danke unseren Kooperationspartnern der AG Tuckermann, speziell Prof. Dr. Jan Tuckermann, für die allzeit fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des SFB1149 Trauma.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Melanie Haffner-Luntzer und Frau Dr. Verena Fischer, die mich unermüdlich bei allen Fragen bezüglich der Versuchsplanung, Durchführung, Auswertung und Ergebnispräsentation beraten und unterstützt haben und ohne deren Hilfe ich nicht so schnell vorangekommen wäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Kooperationspartner und jetzt Kollegen und Freund Dr. Mubashir Ahmad für seine grenzenlose Geduld beim Erstellen unserer Manuskripte, der Forderung und Förderung zur Perfektion und seinem offenen Ohr in so vielen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen, das so wesentlich bei der Entstehung dieser Dissertation geholfen hat.

Ich danke Frau Chérise Grieser, Frau Kristina Karremann, Frau Yasemin Aydogdu, Frau Tina Hieber und Frau Andrea Böhmler für die große Hilfe beim Anfertigen der histologischen Präparate, Frau Iris Baum und Frau Bettina Herde für allzeit freundliche und schnelle Hilfe in allen Fragen der Zellkultur und vielen anderen Laborarbeiten. Frau Patrizia Horny danke ich für die Hilfe bei der biomechanischen Prüfung und Herrn Werner Ohmayer für seinen exzellenten technischen Support.

Mein Dank gilt unserer Tierpflegerin Frau Birgit Widmann des Tierforschungszentrums am Zentrum für Biomedizinische Forschung für die liebevolle und immer zuverlässige Versorgung meiner Versuchstiere.

All meinen Kolleginnen und Kollegen, vor allem Herrn Jan Jansen, Herrn Morten Vogt und Herrn Jan-Moritz Ramge, möchte ich für die nette und schöne Zeit danken, die ich mit und vor allem wegen Ihnen im Institut hatte und die mich während meiner wissenschaftlichen Laufbahn immer besonders unterstützt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner OP-Partnerin Frau Lena Steppe, die so viele Stunden mit mir im OP verbracht hat und meiner Kollegin und Freundin im Tierarztbüro Frau Lena Schröter, dank derer ich so viele lustige und nette Tage hatte und die immer ein offenes Ohr für alle wissenschaftlichen wie nicht-wissenschaftlichen Belange hatte.

Ich danke besonders Herrn Dr. Ronny Bindl ohne dessen Unterstützung und Mentoring ich wohl jetzt nicht am Ende meiner Promotion stehen würde.

Der größte Dank gilt schließlich meiner gesamten Familie, die immer hinter mir steht und an mich glaubt, zu der ich auch meine liebe Freundin Frau Dr.-Ing. Laura Zengerle zähle, die mir privat immer den Rücken freihält und mir zu jederzeit eine unverzichtbare Gefährtin auf diesem Weg war.