

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

**Vergleich der induzierten Knochenbildung durch
rhBMP-2 und zwei seiner Varianten mit verstärkter
Heparinbindung
- Eine radiologische und histologische Untersuchung -**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Andreas Schmich
aus Mannheim

Würzburg, September 2007

Referent: Privatdozent Dr. Dr. K. Würzler

Korreferent: Professor Dr. F. Jakob

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2008

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Knochenregeneration und Induktion.....	1
1.1.1	Die Superfamilie der TGF- β -ähnlichen Moleküle.....	3
1.1.2	Rekombinante BMPs.....	4
2	Zielsetzung / Versuchsaufbau	5
3	Material und Methoden.....	6
3.1	Rekombinante BMPs und deren Varianten.....	6
3.2	Herstellung der Implantate	6
3.3	Versuchstiere und Operation.....	7
3.3.1	Anzahl und Haltung der Tiere.....	7
3.3.2	Narkose.....	7
3.3.3	Intramuskuläre Implantation	7
3.3.4	Schmerzmanagement und Postoperative Behandlung	8
3.3.5	Opferung und Explantation	8
3.4	Histologische Aufbereitung und Dokumentation.....	9
3.5	Radiographie	9
3.6	Computergestützte Flächenberechnung der Röntgenaufnahmen.....	10
4	Ergebnisse	12
4.1	Röntgenverlauf.....	12
4.2	Histologie	14
5	Diskussion.....	21
6	Zusammenfassung.....	27
7	Literatur	28
8	Anhang.....	33

1 Einleitung

1.1 Knochenregeneration und Induktion

Knochen besitzt als einziges Gewebe des menschlichen Körpers die Fähigkeit zur vollständigen funktionellen Regeneration. So heilen beispielsweise Extraktionsalveolen von entfernten Zähnen „narbenlos“ ab. Es bildet sich ein funktionell ausgerichteter Kieferknochen mit peripherer Kompakta und zentralen Markanteilen. Unter adäquater Therapie kommt es nach Frakturen ebenfalls zu einer vollständigen Wiederherstellung der Kontinuität. Nach einer entsprechenden Heilungszeit ist der Knochen wieder uneingeschränkt belastbar.

Die molekularen Regelmechanismen, welche die embryonale Skelettentwicklung steuern, ähneln den Prozessen bei der Knochenheilung im Erwachsenenalter. Hierbei spielen sog. BMPs (bone morphogenetic proteins) eine entscheidende Rolle. Die Knochenneubildung bzw. -regeneration durch Wachstumsfaktoren ist Gegenstand intensiver Forschung weltweit. Hier sollen neue Konzepte zur Behandlung von Knochendefekten und Frakturen für die rekonstruktive Knochenchirurgie entwickelt werden.

Auch außerhalb des Skelettsystems kann es zu einer Knochenneubildung kommen. Neben pathologischen Verknöcherungsprozessen, wie beispielsweise der periimplantären Ossifikation nach Einbringung von Hüftendoprothesen, lassen sich heterotope (d.h. skelettferne) Ossifikationen auch experimentell erzielen: Durch die intramuskuläre Injektion alkoholischer Extrakte aus Knochen erzielte Levander 1930 eine Knochenbildung im Kaninchen (Levander 1938). Huggins (1931) beschrieb eine heterotope Knochenbildung bei Hunden nach intramuskulärer Implantation von autologem Übergangsepithel der Blase (Huggins 1931). Marshall Urist beobachtete, dass demineralisierter Knochen nach intramuskulärer Implantation zur Knochenneubildung führt (Urist 1965). Durch intensive Untersuchungen an unterschiedlichen Knochenextrakten kam er zu dem Schluss, dass die knocheninduzierenden Eigenschaften auf einen Proteinkomplex, bzw. eine Gruppe von Proteinen zurückzuführen seien, welche er zunächst „Bone inducing principle“ und später „**Bone morphogenetic protein**“ nannte. (Urist und Strates 1971). 1981 gelang es der Arbeitsgruppe von A.H. Reddi durch Extraktion induktiver Knochenmatrix, diese zu inaktivieren (Sampath und Reddi 1981). Durch erneutes Zusammenführen des Extraktes und der inaktiven Matrix, konnte wiederum die Osteoinduktivität hergestellt werden. Diese

Beobachtung ließ darauf schließen, dass die osteoinduktiven Eigenschaften der demineralisierten Knochenmatrix auf löslichen Proteinen / Proteinkomplexen beruht.

In den folgenden Jahren konnte eine Reihe von Proteinen dargestellt werden, von denen einige eine heterotope Ossifikation induzieren und weiterhin als Bone Morphogenetic Proteins (**BMPs**) bezeichnet wurden. 1987 publizierte die Arbeitsgruppe von A.H. Reddi die erfolgreiche Reinigung und Charakterisierung eines induktiven Faktors und nannten ihn Osteogenin (später BMP-7, bzw. OP-1) (Sampath, Muthukumar et al. 1987). Nahezu zeitgleich konnten J. Wozney und seine Mitarbeiter weitere osteoinduktive Faktoren (BMP-2, BMP-4, BMP-3, BMP-5, BMP-6, BMP-7) isolieren, sequenzieren und als rekombinante Faktoren exprimieren (Wozney, Rosen et al. 1988; Celeste, Iannazzi et al. 1990).

Mittels neuer molekularbiologischer Techniken gelangen die Identifizierung weiterer Wachstumsfaktoren und ihre Zuordnung in Expressionsmustern unterschiedlicher Organsysteme während der Embryogenese (Nomura 1994; Vukicevic, Latin et al. 1994; Helder, Ozkaynak et al. 1995). So konnten unterschiedliche BMPs identifiziert werden, welche nicht nur an der Entwicklung von Knorpel und Knochen, sondern auch von Niere, Auge, Hoden, Zähnen, Haut und Herz beteiligt sind.

Die subkutane oder intramuskuläre Implantation von BMPs induziert eine Kaskade zellulärer Effekte, welche zur Bildung von neuem Knochen mit Knochenmarkelementen führt. Hierbei rekrutieren BMPs ortsnahe mesenchymale Stammzellen (Chemotaxis) und stimulieren diese zur Proliferation und Differenzierung. Nach fünf bis sieben Tagen sind Chondrozyten und Knorpelformationen zu beobachten. Auf die sich anschließende Kapillareinsprossung antworten die Chondrozyten mit reaktiver Hypertrophie und Kalzifizierung. Die nachfolgend erscheinenden Osteoblasten bilden nach ca. 9-12 Tagen erste Knochenformationen, welche den physiologischen Knochenumbauprozessen (remodelling) unterliegen und so nach 14-21 Tagen in Knochenmark enthaltende Ossikel umgewandelt werden. Dieser Mechanismus der Knochenbildung wird ebenfalls im Rahmen der Embryogenese und Frakturheilung beobachtet und als enchondrale Ossifikation bezeichnet (Reddi und Huggins 1972; Vukicevic, Luyten et al. 1989; Carrington und Reddi 1991; Sampath, Maliakal et al. 1992; Reddi 1994; Sampath TK 1994).

BMPs bewirken auch eine direkte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in knochenbildende Zellen, wobei das Knorpelstadium übersprungen wird. Es kommt zur sog. desmalen oder direkten Ossifikation (Reddi und Huggins 1972; Reddi 1994).

Die Knochenbildung ist somit ein Prozess, der während der Embryonalzeit beginnt und sich nach der Geburt zeitlebens in Umbau- und Wiederherstellungsprozessen fortsetzt und u.A. durch Wachstumsfaktoren gesteuert wird.

1.1.1 Die Superfamilie der TGF- β -ähnlichen Moleküle

BMPs sind Mitglieder der sog. Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Superfamilie, zu der mehr als 45 Gene zählen (Rueger 2002, Reddi 1998, Sakou 1998, Ramoshebi et al. 2002, Wozney 1998). Die Proteine sind an der Steuerung der embryonalen Entwicklung von Organsystemen (Knochen, Zähne, Knorpel, Muskel, Herz, Niere, Haut, Reproduktiv-Trakt) beteiligt. Sie übernehmen wichtige Induktions- und Steuerungsaufgaben bei der Wundheilung und Regeneration von Geweben indem sie die Proliferation und Differenzierung von Stammzellen stimulieren (Alberts, Bray et al. 2002; Nickel, Dreyer et al. 2002; Paralkar, Grasser et al. 2002; Rueger 2002).

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie besitzen eine einheitliche chemische Grundstruktur (Heldin, Miyazono et al. 1997; Massague 1998). Die aktive Form besteht aus zwei miteinander über eine Disulfid-Brücke verbundenen Monomeren von ca. 120-140 Aminosäuren (Nickel, Dreyer et al. 2002). Es kommen fast ausschließlich Homodimere vor (Rueger 2002).

Jedes Monomer enthält sieben konservierte Cystein-Domänen, die ausgehend vom ersten Cystein-Rest für alle Proteine der Superfamilie an identischen Positionen lokalisiert sind (Wozney, Rosen et al. 1988; Nickel, Dreyer et al. 2002; Rueger 2002). Durch Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken entsteht die typische Tertiärstruktur mit dem sog. „Cystein-Knoten“ im Zentrum des Proteins. Der Cystein-Knoten enthält weiterhin die kovalente intermolekulare (Disulfid-) Bindung beider Peptide. Diese Konfiguration ist das typische Strukturmerkmal der TGF- β -ähnlichen Proteine und ist für alle Verwandten der TGF- β -Superfamilie identisch (Daopin, Piez et al. 1992; Schlunegger und Grutter 1992; Griffith, Keck et al. 1996; Mittl, Priestle et al. 1996; Heldin, Miyazono et al. 1997; Massague 1998; Scheufler, Sebald et al. 1999).

Aufgrund ihrer Sequenzhomologie wurden mittlerweile annähernd 20 BMPs identifiziert (Kawabata 2000). Strukturell sehr nah verwandte Proteine werden in weitere Untergruppen zusammengefasst. So bilden BMP-2 und BMP-4, BMP-6, BMP-7 und BMP-8 sowie GDF-5, GDF-7 und GDF-6 jeweils eigene Untergruppen (Korchynsky 2002).

Die Proteine zeigen eine hohe evolutionäre Konstanz, d.h. ihre Aminosäuresequenzen stimmen auch zwischen verschiedenen Spezies weitgehend überein.

1.1.2 Rekombinante BMPs

BMPs liegen nur in sehr geringen Konzentrationen in den natürlichen Geweben vor (ca. 1µg / kg Kortikalis). Um eingehende Untersuchungen zur Biochemie und Wirkung der BMPs durchzuführen war es daher notwendig, diese Proteine in größeren Quantitäten gentechnisch herzustellen.

Als einer der ersten gelang es der Arbeitsgruppe von Prof. Sebald, Physiologische Chemie II, Biozentrum der Universität Würzburg, die humanen Faktoren BMP-2 und BMP-4 in einem bakteriellen Expressionssystem herzustellen. Nach Transformation von *E. coli* wurden die monomeren Proteinformen in Einschlusskörperchen gefunden und extrahiert. Nach Denaturierung gelang die Rückfaltung und Dimerisierung. Anschließend wurden die biologisch aktiven Proteine chromatographisch aufgereinigt (Ruppert, Hoffmann et al. 1996). Ebenso gelang die Herstellung der ersten aktiven BMP-2 Mutante (EHBMP-2), bei der die Bindung an Heparin durch den Ersatz der N-Terminus mit einer Nonsens-Sequenz aus humanem Interleukin aufgehoben war (Ruppert, Hoffmann et al. 1996; Kübler, Würzler et al. 1999).

2 Zielsetzung / Versuchsaufbau

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Wahl eines geeigneten Trägermaterials die lokale Freisetzung der Wachstumsfaktoren prolongiert und so ihre Wirkung gesteigert werden kann. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der osteoinduktiven Potenz der BMPs besteht in ihrer gentechnischen Manipulation. Durch gezielte Modifikation des Moleküls wurden Varianten geschaffen, deren Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix (Heparin) verstärkt ist. Die hieraus resultierende verlängerte Verweildauer am Implantationsort sollte eine Verbesserung der osteoinduktiven Eigenschaften dieser Mutanten bewirken.

Ziel der Untersuchungen war die Evaluation der biologischen Aktivität dieser BMP-2 Varianten (T3 und T4), deren gentechnisch veränderte Pharmakokinetik eine Verstärkung der osteoinduktiven Eigenschaften verglichen mit dem Wildtyp bewirken sollte.

Die Proteine sollten in zwei Konzentrationen (5 µg, 10 µg) an einen Kollagen-Träger gebunden in die vordere Bauchwandmuskulatur von Ratten implantiert werden. Die Implantation in gut vaskularisiertes Muskelgewebe liefert detaillierte Aufschlüsse über das biologische Verhalten und die Verträglichkeit des untersuchten Materials. In Kombination mit BMP stellt sie die osteoinduktiven Eigenschaften des Implantates unter Beweis. Über einen Beobachtungszeitraum von 35 Tagen sollten in Intervallen von 7 Tagen die Proben explantiert und radiologisch sowie histologisch auf die erzielte Knochenneubildung hin untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 *Rekombinante BMPs und deren Varianten*

Die Herstellung der verwendeten Morphogene erfolgte am Lehrstuhl für physiologische Chemie II der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. W. Sebald (Ruppert, Hoffmann et al. 1996).

Rekombinantes BMP-2 und seine Varianten (T3 und T4) wurden in *E. coli* produziert. T3 und T4 sind BMP-2 Varianten, die ein bzw. zwei zusätzliche Triplets basischer Reste im N-terminalen Segment und somit eine verstärkte Heparin-Bindungsstelle besitzen.

Die Bindung der rekombinanten Varianten von BMP-2 an ihre zellulären Rezeptoren wurde mittels der BIASensor Technologie überprüft. So konnte nachgewiesen werden, dass die Rezeptorbindung durch die Modifikationen der Moleküle in keiner Weise beeinflusst wurden, also die Rezeptorbindungsstelle völlig unverändert blieb (Ruppert, Hoffmann et al. 1996).

Die Proteine wurden in lyophilisiertem, pulverförmigen Zustand in 2,0 ml Reaktionsgefäßen bis zu ihrer Verwendung bei einer Temperatur von $T=-80^{\circ}\text{C}$ in der Tiefkältetruhe gelagert.

3.2 *Herstellung der Implantate*

Das aus bovinen Achilles-Sehnen gewonnene Kollagen Typ-I der Fa. Innocoll, Saal an der Donau, wird als 0,6%ige Dispersion in 2 mmol/l Essigsäure, pH 4,5 geliefert. Es besteht zu 95% aus Typ I Kollagen mit einem Rest von Typ III Kollagen. Durch die ausgeprägte Fibrillenstruktur und den hohen Quervernetzungsgrad ist dieses Kollagen unlöslich in Wasser. Nach der Lyophilisation ist dieses Material ein zusammenhängendes, watteähnliches Substrat. Der Abbau erfolgt enzymatisch.

Die Morphogene wurden in sterilem aqua ad injectabilia gelöst und in gewünschter Konzentration (5 μg , bzw. 10 μg pro Implantat) der Kollagensuspension (jeweils 1 ml) zugesetzt. Anschließend wurde das Gemisch in sterilen Einmalspritzen (5 ml) lyophilisiert. Durch leichten Druck auf den Spritzenstempel wurden Scheiben von ca. 12 mm Durchmesser und einer Höhe von ca. 1 mm geformt und anschließend über Nacht in einer gesättigten Chloroformatmosphäre sterilisiert. Nach einer Entgasungszeit von 6 Stunden wurden die Implantate bis zur weiteren Verwendung bei -20°C steril gelagert.

3.3 Versuchstiere und Operation

3.3.1 Anzahl und Haltung der Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten (3-4 Monate, Körpergewicht 300-350g). Jedes Tier erhielt 2 Implantate unterschiedlicher Gruppen in zufälliger Kombination (BMP-2, T3, T4, Leerprobe). Pro Untersuchungszeitpunkt standen somit 5 Proben pro Gruppe zur Verfügung.

Die Ratten wurden in Gruppen von 2-4 Tieren in Makrolonkäfigen auf Weichholzgranulat bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-55% und einem hell/dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Die Tiere erhielten während der gesamten Versuchszeit Wasser und Altromin Haltungsfutter ad libitum. Zwölf Stunden präoperativ wurden die Tiere nüchtern gesetzt.

3.3.2 Narkose

Die nüchternen (12h) Tiere wurden gewogen und zur Narkoseeinleitung durch Inhalation eines Isofluran-Sauerstoff-Gemisches in einer begasten Box ansediert. Durch subkutane Injektion von 120mg/kg KG Ketavet und 5 mg/kg KG Rompun als Mischspritze wurde eine ca. 2-3 Stunden anhaltende Narkose erzielt.

3.3.3 Intramuskuläre Implantation

Nach Rasur und Desinfektion des OP-Feldes wurden die Tiere in Rückenlage auf dem steril abgedeckten OP-Tisch fixiert. Es erfolgte ein Hautschnitt in der Medianen der Bauchwand und die Darstellung des M. rectus abdominis. Beidseits der Linea alba wurden in den obersten Muskelschichten zwei Taschen präpariert und anschließend die Proben eingebracht (**Abb. 1**). Es folgte der schichtweise Verschluss der Muskeltaschen mit Vicryl 5/0 und der Haut mit Seide 4/0 (Ripamonti, Schnitzler et al. 1989; Kübler und Urist 1991; Kübler, Reuther et al. 1993).

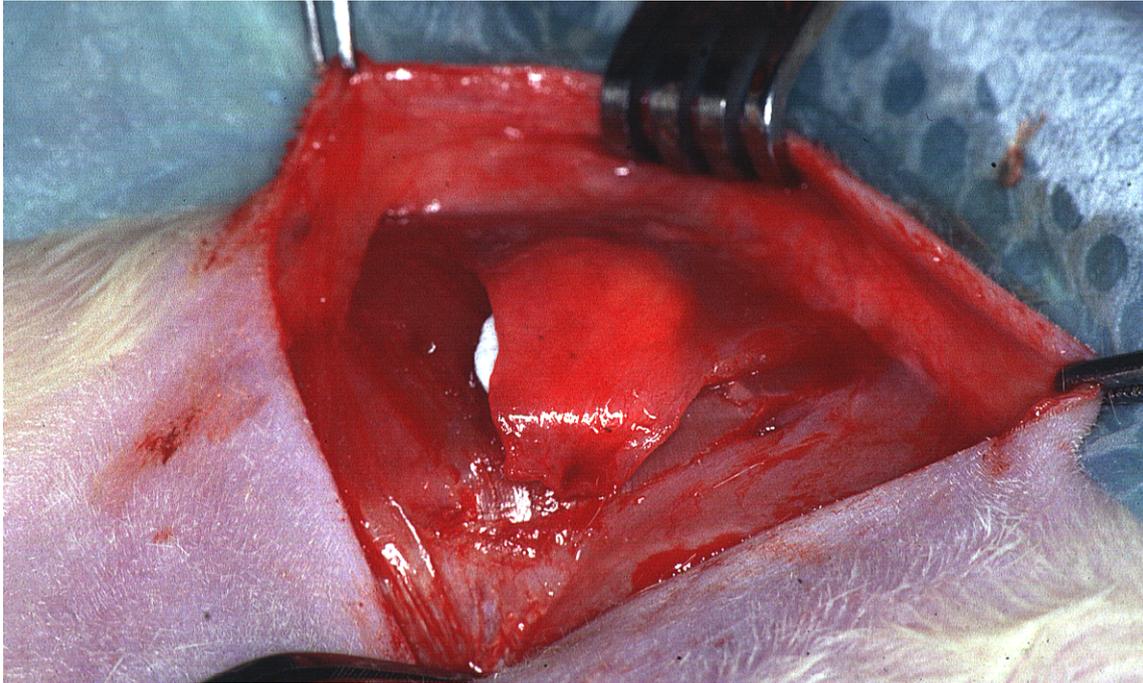


Abbildung 1: Intramuskuläre Implantation eines Trägers in die vordere Bauchwand

3.3.4 Schmerzmanagement und Postoperative Behandlung

Die Versuchstiere erhielten eine subkutane Injektion von 2ml Catosal (10%), 5mg Tramal, 10mg Novalgin und 4ml Aqua ad iniectabilia zur Stoffwechselstimulation und postoperativen Analgesie. Die Käfige wurden mit Zellstoffbahnen ausgelegt, um ein Eindringen von Granulatsplittern in die frischen Operationswunden zu vermeiden. Um eine Unterkühlung der Tiere zu verhindern, wurden diese in Zellstoff gehüllt und bis zum vollständigen Erwachen unter Wärmelampen gelagert.

Als orale Schmerzmedikation wurde in den ersten zwei postoperativen Tagen dem Trinkwasser Tramadol zugesetzt. (62,5 mg auf 500ml Wasser).

3.3.5 Opferung und Explantation

Nach Ablauf des entsprechenden Beobachtungszeitraumes erfolgte die Opferung der Versuchstiere durch CO₂-Asphyxie. Die probentragende Muskulatur wurde explantiert und in 10%iger Formalinlösung fixiert.

3.4 Histologische Aufbereitung und Dokumentation

Nach Fixierung und Demineralisation erfolgte die histologische Aufbereitung und Färbung mittels Giemsa im Pathologischen Institut der Universität Würzburg (Direktor. Prof. Dr. Müller-Hermelink).

Diese metachromatische Färbung bietet eine gute Differenzierung von Knorpel und Knochengewebe: Mineralisierte Matrix stellt sich rosa bis zartrosa, Kollagen/ Osteoid blassblau dar. Durch den hohen Anteil an sauren Mucopolysacchariden weist Knorpelmatrix eine starke Metachromasie auf (rot-violett). Zellen und Zellkerne kommen in unterschiedlichen Blautönen zur Darstellung.

Die Auswertung erfolgte mit einem Foto-Mikroskop (Leitz DMR der Firma Leica). Zur Fotodokumentation wurde ein Kodak Ektachrome 100HC (ISO 100/21°), ein Agfa Extrachrom oder ein Fuji 64II (19°) verwendet. Die Diapositive wurden mit einem Nikon 35 mm Film Scanner LS-1000 eingescannt.

3.5 Radiographie

Unmittelbar nach der Explantation wurden von den fixierten Proben Röntgenaufnahmen angefertigt. Die Proben wurden hierfür direkt auf den Film (Kodak X-OMAT MA) gelegt, wodurch eine dimensionstreue Abbildung erzielt wird. Die Belichtung erfolgte im Faxitron (Model 43855B) mit 3,0mA, 17kV und 22s. Die Filme wurden im Entwicklungsautomat Agfa Curix 242S nach Herstellerangaben entwickelt. **Abbildung 2** zeigt einen exemplarischen Röntgenverlauf.

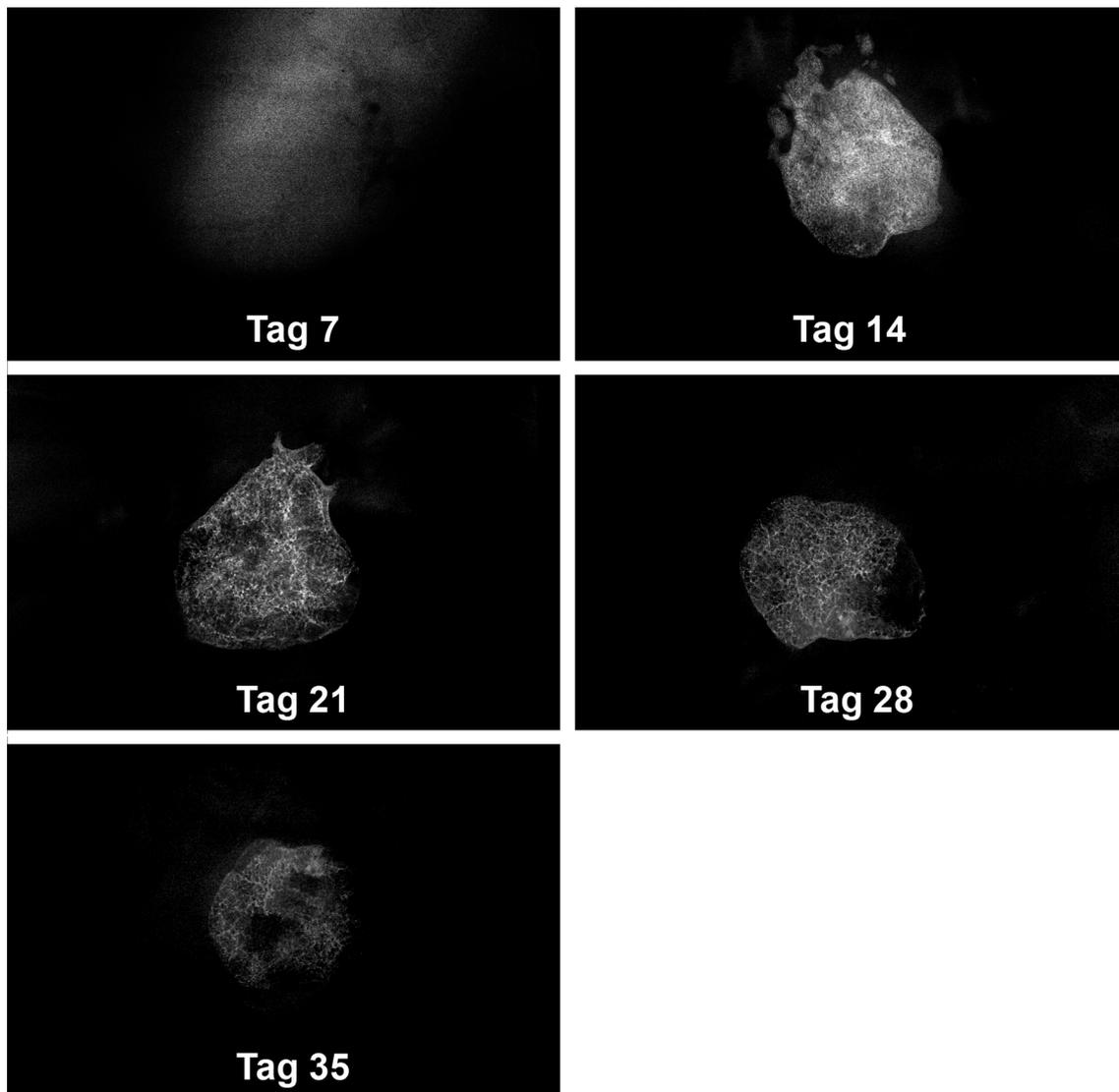
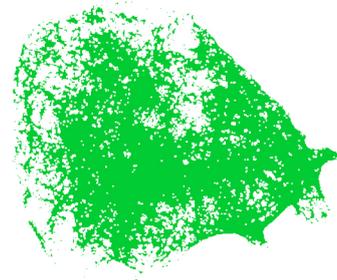
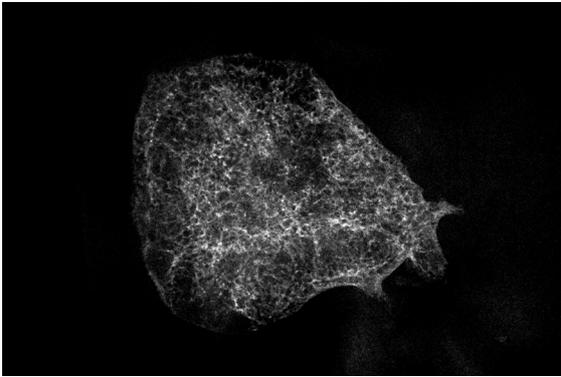


Abbildung 2: Röntgenverlauf, exemplarisch (T4, 10 µg)

3.6 Computergestützte Flächenberechnung der Röntgenaufnahmen

Die entwickelten Röntgenfilme wurden zugeschnitten und mit einem Diascanner (Diascanner Nikon® Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf) bei 1200 dpi als 8 Bit Graustufenbilder gescannt. Mit Hilfe der Bildanalyse Software Scion® Image (Release Beta 4.0.2) wurde die Fläche des gebildeten Knochens dargestellt und bestimmt. Hierzu wurden aus den Graustufenbildern mittels Schwellensetzung die knochendichten Areale extrahiert, in ein binäres Bild überführt und die markierten Pixel ausgezählt (**Abb. 3**). Aus der Anzahl der Pixel lässt sich dann die korrespondierende Fläche berechnen. Die erhaltenen Werte der verschiedenen

Versuchsgruppen wurden mit der Statistik-Software StatView® 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) ausgewertet und untereinander verglichen.



Fläche 83.34 mm²

Abbildung 3: Flächenbestimmung des neugebildeten Knochens

4 Ergebnisse

4.1 Röntgenverlauf

Dosis und morphogen-abhängig kommt es in den ersten 3 Wochen zu einer Knochenneubildung unterschiedlicher Ausprägung.

Auffällig ist bei allen verwendeten Morphogenen und Dosierungen, dass die erzielte Knochenfläche in ihrer Ausdehnung nicht der ursprünglichen in Geometrie des Trägers entspricht. Bei einem Träger-Durchmesser von 12 mm resultiert eine Fläche von circa 113 mm². Die maximal erzielte Knochenfläche in den Radiographien beträgt jedoch nur $83,9 \pm 5,7$ mm² (T3, 10 µg, Tag 14). Dieser Effekt ist damit zu erklären, dass das watteähnliche Trägermaterial bei Kontakt mit Blut und Körperflüssigkeiten kollabiert und insgesamt strukturell zusammenfällt.

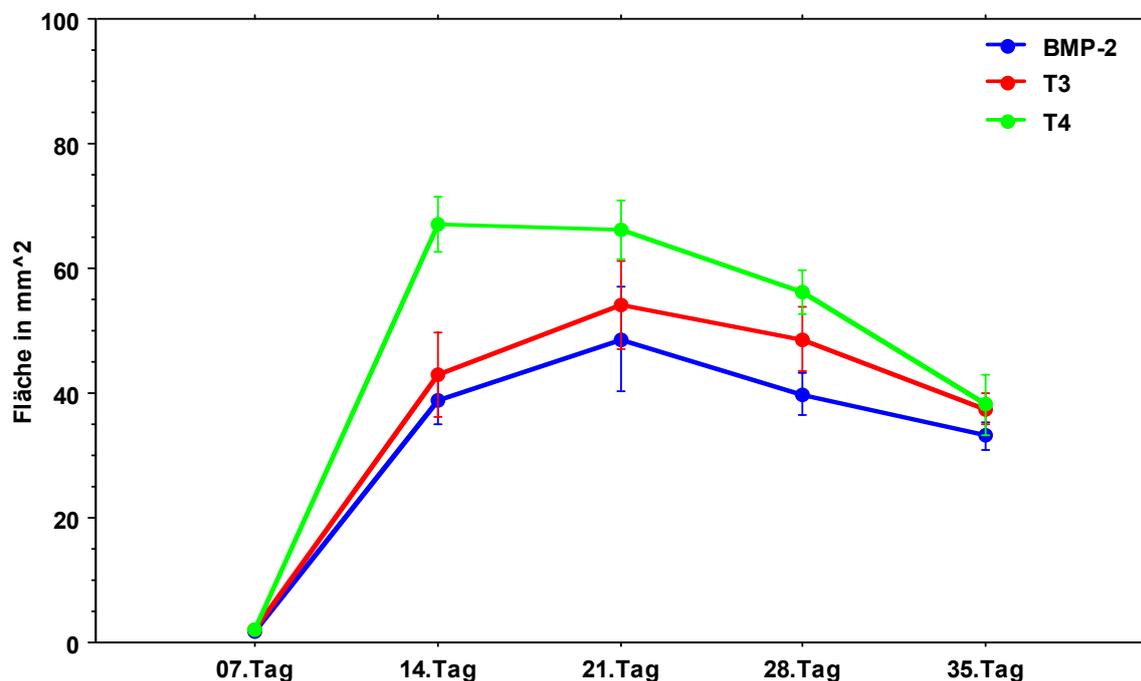


Abbildung 2: Röntgenverläufe für 5 µg Morphogen

In der 5 mg Dosierung zeigt T4 die besten osteoinduktiven Eigenschaften (Abb. 4). Hier kommt es bereits am 14. Tag zur signifikant stärksten Knochenneubildung mit $67,1 \pm 4,4$ mm², gefolgt von einer Plateauphase bis zum 21. Tag. Es folgt eine Reduktion des Knochens

bedingt durch den nun einsetzenden osteoklastären Abbau. Im Gegensatz hierzu verhalten sich die beiden Morphogene BMP-2 und T3. Aufgrund ihrer geringeren Osteoinduktivität kommt es zu einer Knochenneubildung die ihr Maximum erst an Tag 21 (BMP-2: $48,6 \pm 8,4$ mm²; T3: $54,1 \pm 6,9$ mm²) erreicht und signifikant niedriger ist als die durch T4 induzierte Knochenmenge ($p < 0,05$). Für alle Morphogene gilt, dass nach Erreichen der maximalen Knochenfläche (Tag 14 – 21) im weiteren Verlauf der Knochen schnell wieder abgebaut wird. Die führt dazu, dass bis zu Tag 35 die ursprünglich erzielte maximale Knochenmenge deutlich reduziert wird (31% Reduktion bei BMP-2 und T3, 43% Reduktion bei T4).

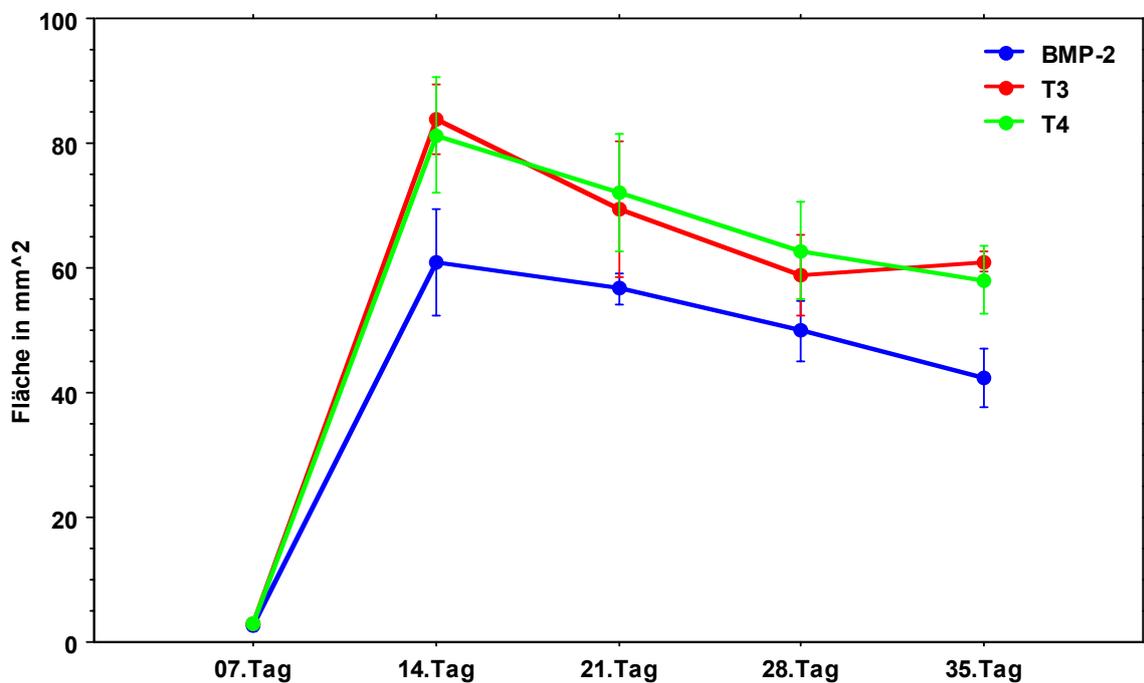


Abbildung 3: Röntgenverläufe für 10 µg Morphogen

In der höheren Dosierung (10 µg Morphogen je Träger) zeigt sich ein deutliches Sättigungsverhalten. Hier sieht man keinen Unterschied zwischen den Morphogenen T3 und T4. Beide Morphogene erzielen eine maximale Knochenfläche von über 80 mm² an Tag 14 (T3: $83,9 \pm 5,7$ mm², T4: $81,3 \pm 9,4$ mm²) gefolgt von einem deutlichen Abbau bis zu Tag 35 (**Abb. 5**). BMP-2 bleibt in dieser Untersuchung mit einer maximaler Knochenfläche von $60,9 \pm 8,6$ mm² hinter den beiden Varianten zurück. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Für alle Morphogenese gilt auch in der 10 µg Dosierung, dass nach Erreichung der maximalen Knochenfläche der osteoklastäre Abbau zu einer Reduktion des Ossikels um ca. 30% bis zum Tag 35 führt.

Während T3 in niedriger Dosierung (5 µg) einen nahezu identischen Verlauf mit BMP-2 auf geringfügig höherem Niveau (kein signifikanter Unterschied) aufweist, zeigt es bei hoher Dosierung (10 µg) einen mit T4 synchronen Verlauf. Die Unterschiede der Morphogene sind jedoch bei einer Dosierung von 10 µg nicht signifikant.

Bei Betrachtung der Knochenflächendiagramme (**Abb. 4 und Abb. 5**) zeigt sich für die untersuchten Morphogene eine deutliche Dosisabhängigkeit. Eine überschießende Knochenbildung in Form von Exostosen, d.h. eine Knochenfläche größer 113 mm², wird nicht beobachtet.

Bei einer Konzentration von 5µg kommt es in der T4-Gruppe zu dem stärksten und schnellsten Knochenzuwachs verglichen mit den anderen Gruppen. Diese rasche und ausgeprägte Osteoneogenese spiegelt sich in einem steilen Anstieg der T4-Kurve wider. T3 bietet hier keinen signifikanten Vorteil gegenüber dem Wildtyp.

In der hohen Dosierung finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Proteinen. T3 und T4 zeigen ein nahezu identisches Verhalten und weisen tendenziell eine höhere Osteoinduktivität als BMP-2 auf.

Grundsätzlich kommt es bei allen Morphogenen und Konzentrationen nach Erreichen der maximalen Knochenmenge (Tag 14-21) im weiteren Verlauf zum Abbau des induzierten Knochens um 30-40% (Endpunkt der Untersuchungen an Tag 35).

4.2 Histologie

In den histologischen Schnitten der Implantate mit BMP-2, T3 und T4 sind im angewandten Versuchsmodell keine strukturellen Unterschiede des neu gebildeten Knochens zu erkennen. Bereits 7 Tage nach Implantation sind keinerlei Reste des eingebrachten Kollagenträgers mehr nachweisbar. In keiner der Leerproben finden sich Zeichen einer Knochenbildung oder Mineralisationen.

Das histologische Bild an Tag 7 zeigt mesenchymale Zellkondensationen, die durchsetzt sind von knorpelähnlichen Zellen. Diese sind umgeben von einer metachromatischen Matrix und besitzen nur blass gefärbte, große Zellkerne (**Abb. 6**).

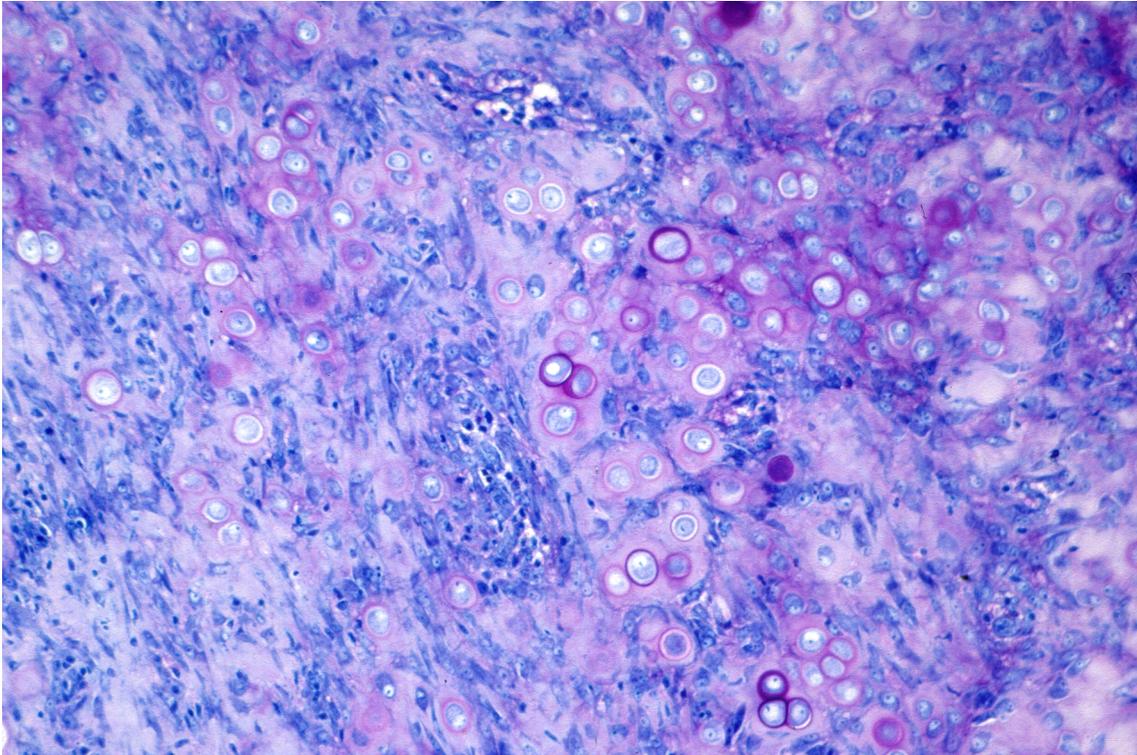


Abbildung 4: Knorpelähnliche Zellen in metachromatischer Matrix (5µg BMP-2, Tag 7, 100x, Giemsa)

In den nächsten sieben Tagen kommt es zur Ausbildung von kleinen Knocheninseln, indem die beschriebenen Zellen sich weiter in Matrix einbauen und diese mineralisieren. Sie werden so zu Osteozyten.

Mit Einsetzung der Mineralisation werden auch die ersten Osteoklasten aktiviert in **Abbildung 7** sieht man deutlich das Nebeneinander der Knochenneubildung (gut zu erkennen an den hypertrophen Zellen in einer blassroten Matrix und den Osteoklasten, welche die neu gebildeten Knochen trabekel bereits abbauen.

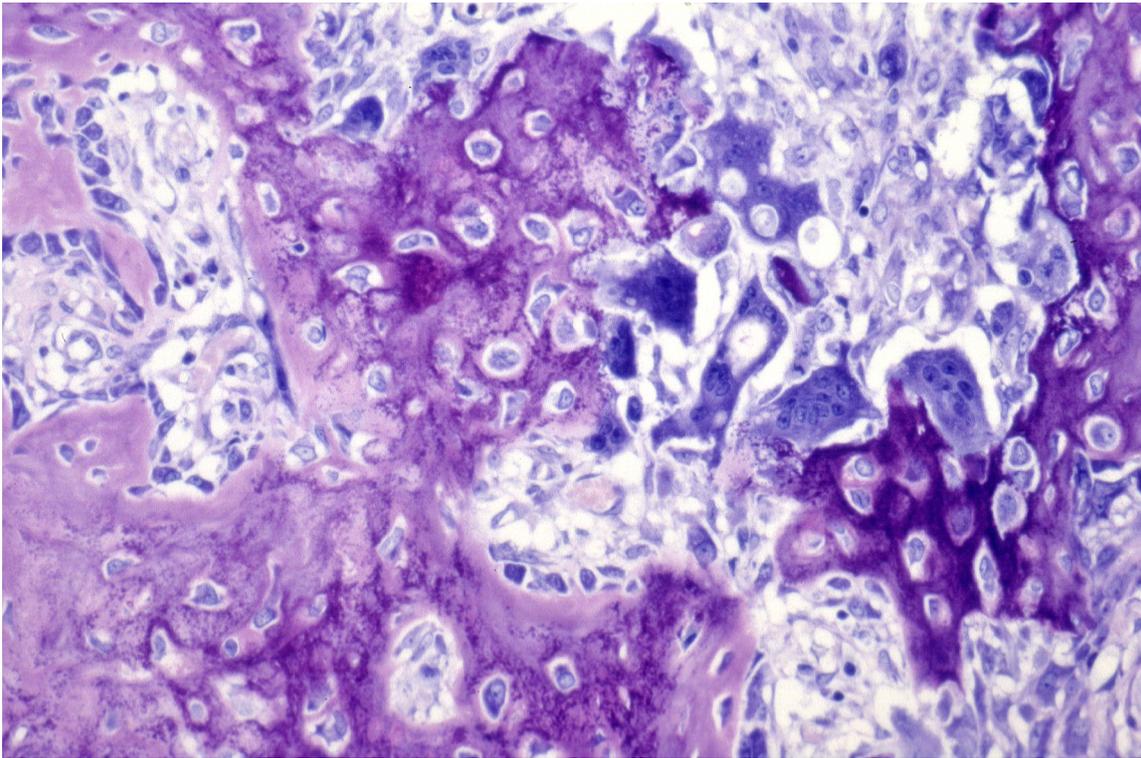


Abbildung 5: Knochenbälkchen mit Osteozyten, Osteoklasten (5 μ g T4, Tag 14, 100x, Giemsa)

In der nächsten Phase (**Abb. 8**) kommt es zur Ausbildung eines hämatopoetischen Knochenmarks, welches im weiteren Verlauf durch Fettmark ersetzt wird. Die ersten kleinen Fettvakuolen zwischen den einzelnen Trabekeln in einer zellreichen Markmatrix sind deutlich zu erkennen. Hämatopoetische Sinus mit Erythrozyten komplettieren das Bild.

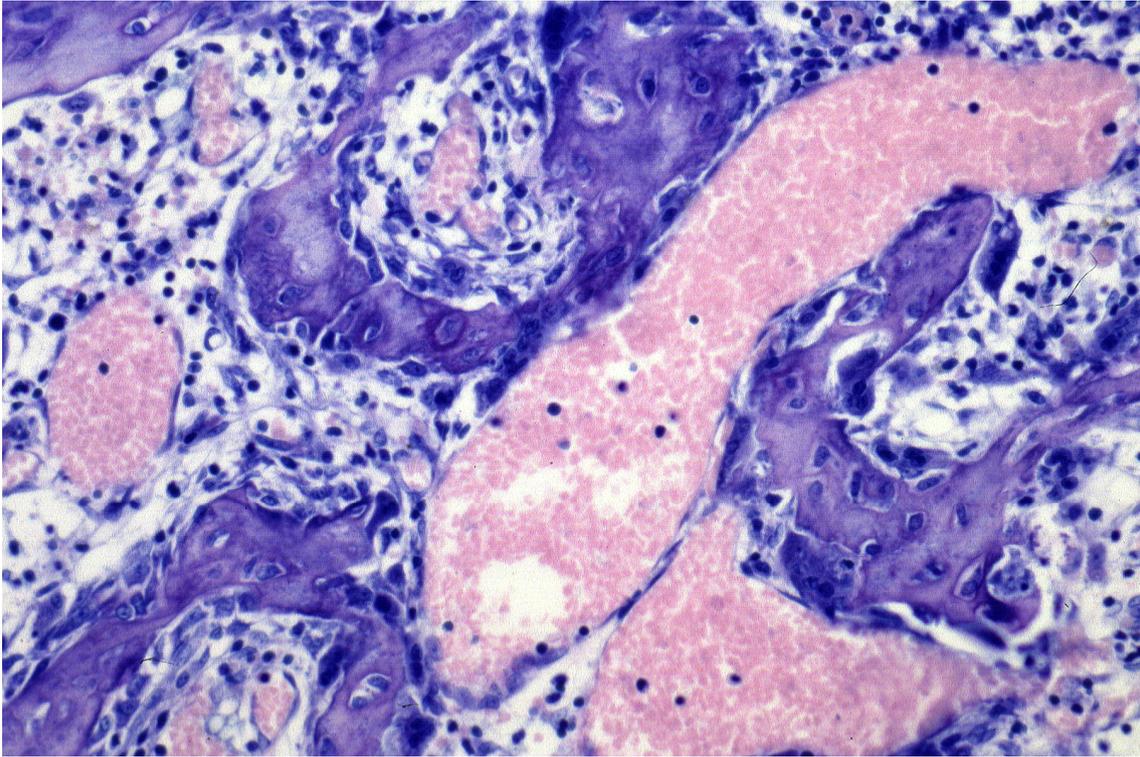


Abbildung 6: Zellreiches Knochenmark: Mit Erythrozyten gefüllte Sinus (5 μ g T4, Tag 21, 100x, Giemsa)

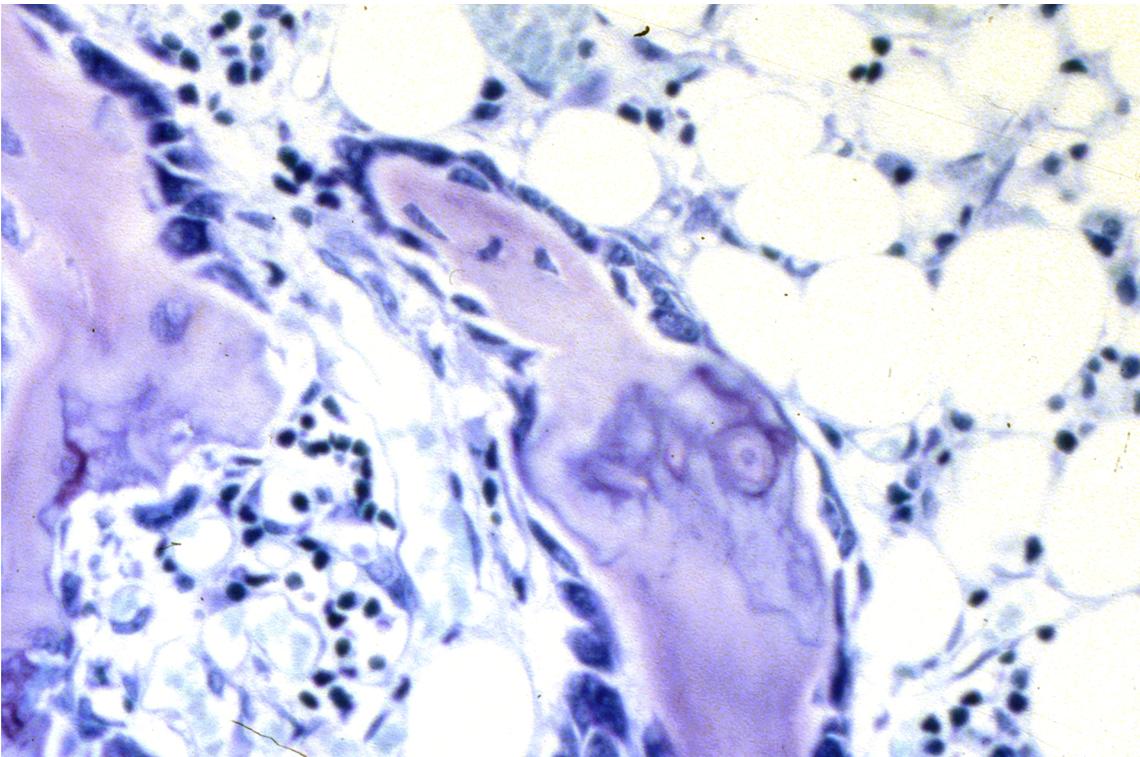


Abbildung 7: Trabekel mit „bone lining cells“, Fettmark (10 μ g T3, Tag 28, 100x, Giemsa)

Chondrozyten wurden zu den späteren Untersuchungszeitpunkten (ab Tag 21 nach Implantation) nur noch spärlich gefunden.

Zahlreiche Osteoblasten (sog. Bone lining cells) säumen neu gebildete mineralisierte Matrix. Eingemauert in die Grundsubstanz liegen sich reichlich Osteozyten. Vereinzelt sind Osteoklasten an der Oberfläche der mineralisierten Trabekel zu finden. Die von mineralisiertem Gewebe umgebenen Markräume weisen Knochenmark mit großen Anteilen von Fett auf. (**Abb. 9 und 10**)

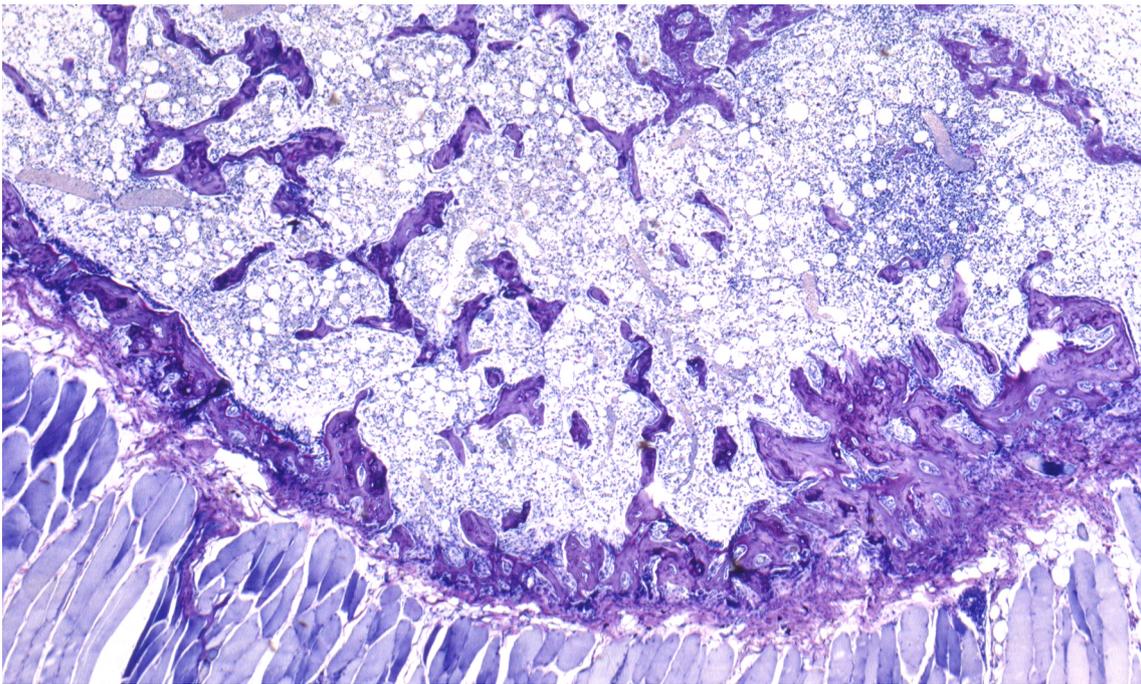


Abbildung 8: Ossikel mit feinem Trabekelwerk und peripherer Knochenlamelle (5µg T3, Tag 28, 10x, Giemsa)

Durch einen weiteren osteoklastären Abbau kommt es zur zunehmenden Auflockerung der gebildeten knöchernen Strukturen, so dass diese letztendlich zur Formation eines blasenförmigen Ossikles führen. Dieser sphärische Körper besitzt eine äußere dünne kortikalisähnliche Lamelle und ist mit reichlich Fettmark ausgefüllt. (**Abb. 11 und 12**)

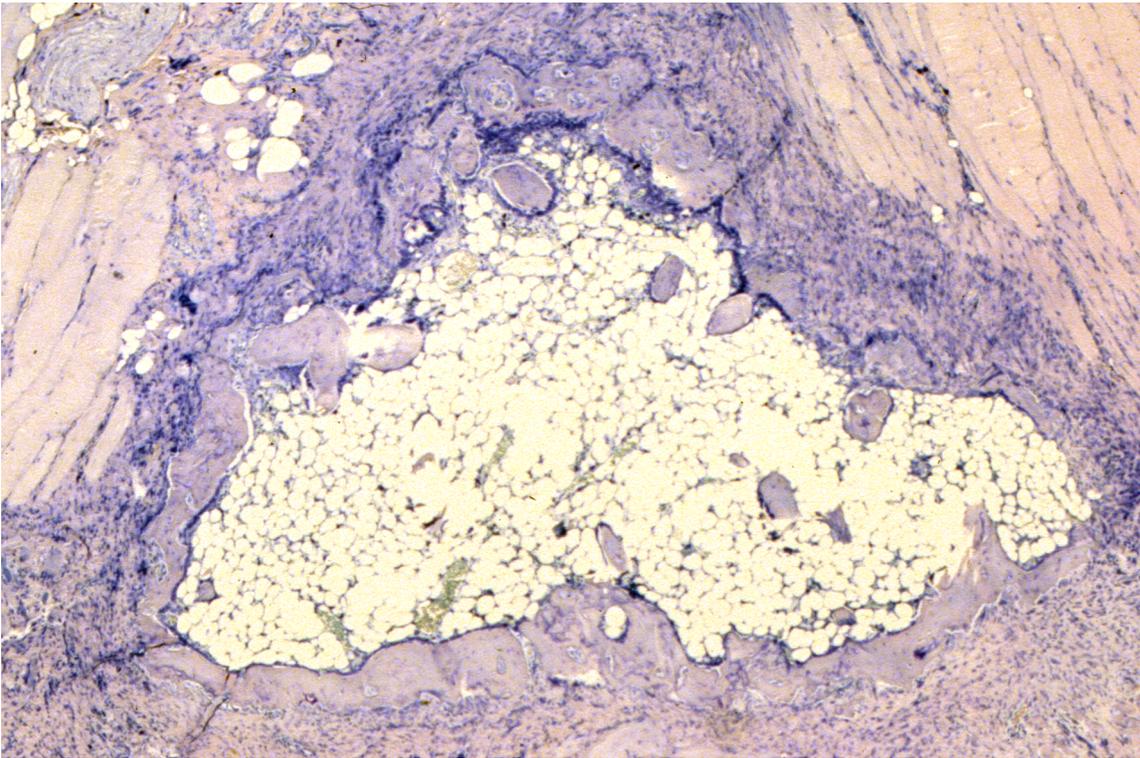


Abbildung 9: Mit Fettmark gefüllter Ossikel (10 μ g BMP-2, Tag 35, 10x, Giemsa)

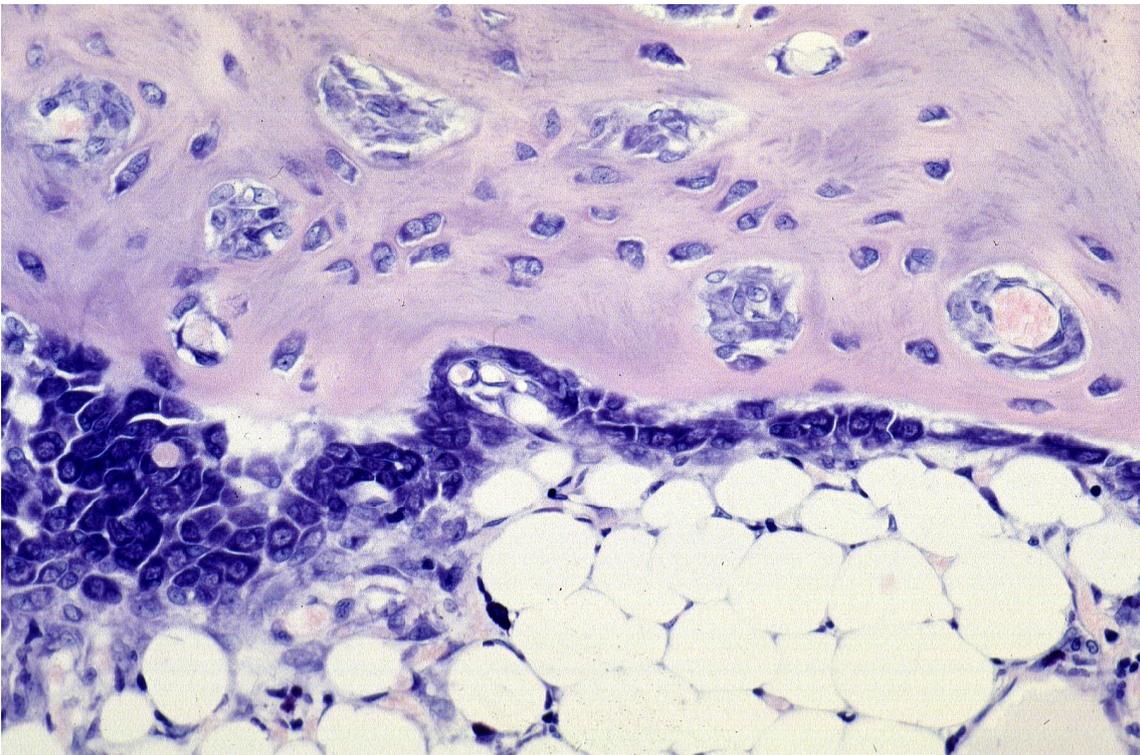


Abbildung 10: Ossikelwand mit Osteozyten, Fettmark (10 μ g BMP-2, Tag 35, 100x, Giemsa)

Diese histologischen Beobachtungen erklären somit sehr gut die röntgenologischen Ergebnisse der Flächenberechnungen. Hier kommt es nach Tag 14 bzw. 21 zu einem

kontinuierlichen Rückgang der Knochenfläche des neu gebildeten Ossikels. Die histologisch erkennbare Auflockerung der Knochenstruktur und die Zunahme des Fettmarkes führen zur Reduktion der Röntgendichte und bedingen den Rückgang der Knochenfläche in der Radiographie.

5 Diskussion

In der rekonstruktiven Knochenchirurgie stehen verschiedene Materialien zur Verfügung: autogene, allogene, xenogene und alloplastische Knochen- bzw. Knochenersatzmaterialien. Allen haften jedoch Nachteile an. So bedeutet die Verpflanzung von körpereigenem (autogenen) Knochen einen Zweiteingriff mit den zusätzlichen Risiken einer Operation (Wundinfektion, Schmerzen, Gewebedefekte, Nervenläsionen). Allogene (z. B. tierische) Materialien besitzen ein Restrisiko der Übertragung von Infektionskrankheiten und der Unverträglichkeit. Die alloplastischen (z.B. synthetisches Hydroxylapatit, Trikalziumphosphate) Knochenersatzmaterialien sind teilweise nicht resorbierbar und persistieren im Empfängerorganismus als Fremdkörper.

Mit Hilfe der Induktion von Knochengewebe durch BMPs wird es künftig möglich sein, in vielen Fällen auf den Einsatz von Knochentransplantaten bzw. -ersatzmaterialien zu verzichten. Die Möglichkeit, in der Muskulatur eine Knochenneubildung zu induzieren, scheint neue therapeutische Möglichkeiten in der rekonstruktiven Knochenchirurgie zu bieten. Die Präfabrikation von maßgeschneiderten Knochentransplantaten rückt somit in greifbare Nähe (Terheyden, Knak et al. 2001; Arander, Westermarck et al. 2006). Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen jedoch, dass im heterotopen Implantatlager der induzierte Knochen stark von fettigem Knochenmark durchsetzt wird und somit von eher minderer biomechanischer Wertigkeit ist. Man kann eine große Aktivität der Osteoklasten beobachten, welche die neu gebildete mineralisierte Matrix unmittelbar wieder abbauen. Dies wird von einigen Autoren u. A. den BMPs zugeschrieben, welche die Differenzierung von Osteoklasten aus undifferenzierten Vorstufen fördern können (Koide, Murase et al. 1999; Udagawa 2002).

Bei der Induktion von Knochen in Muskelgewebe handelt es sich um einen durch eine lokale Applikation von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren erzwungenen unphysiologischen Prozess. Der Organismus reagiert entsprechend mit der Beseitigung des intramuskulär induzierten Knochengewebes durch einen massiven osteoklastären Angriff. Bei Betrachtung der Kinetik des Knochenauf- und abbaus wird deutlich, dass die Wahl des Zeitpunktes der Knochenentnahme nach Induktion entscheidend ist. Für die Knochenrekonstruktion mit einem intramuskulär präfabriziertem Transplantat sollte das Implantat vor Einsetzen der starken Resorptionsvorgänge entnommen werden. Nur so kann sichergestellt werden, dass der Knochen noch nicht vollständig von minderwertigen Fettmark durchsetzt ist. Die zwangsläufig stattfindenden Umbauprozesse könnten dann in einer zielgerichteten Weise am Implantationsort erfolgen.

Um die osteogene Potenz von BMP-2 weiter zu steigern wurden Mutanten von humanem BMP-2 hergestellt, die eine gesteigerte Affinität zur extrazellulären Matrix aufweisen. Zu diesem Zweck wurden in das BMP-2-Molekül zusätzliche, für die Anheftung an die extrazelluläre Matrix verantwortliche Heparinbindungsstellen eingefügt. Die Modifikationen des BMP-2-Moleküls führen zu einer verlängerten Verweildauer des Proteins am Implantationsort. Durch die langsame Abdiffusion wird der wirksame Konzentrationsgradient im Implantatlager länger aufrechterhalten. Dieser BMP-2-Konzentrationsgradient ist für die Osteoinduktion erforderlich. Während niedrige BMP-Konzentrationen in der Peripherie eine chemotaktisch vermittelte Migration zum Implantationsort bewirken, führen die lokal höheren BMP-Konzentrationen am Ort der Implantation zu einer Proliferation und Differenzierung der eingewanderten BMP-Zielzellen (sog. pleiotroper Effekt der BMPs) (Cunningham, Paralkar et al. 1992; Reddi und Cunningham 1993; Reddi 1994).

In vivo ist die Ortsständigkeit eines Wachstumsfaktors entscheidend für seine Wirkung; hier entfaltet ein Molekül, welches eine (nicht kovalente) Bindung mit der extrazellulären Matrix eingeht, eine bessere Wirkung, da es nicht so schnell abdiffundiert. So sollte ein Molekül mit stärkerer Bindung an z.B. Heparin in vivo eine gesteigerte Osteoinduktivität besitzen. Zaho et al. berichten weiterhin, dass die simultane Applikation von BMP-2 und Heparin zu einer Steigerung des induktiven Effektes in vitro und in vivo kommt und führen dies auf einen geringeren Abbau und Schutz vor Antagonisten des Morphogens zurück (Zhao, Katagiri et al. 2006).

Durch Replikation der N-terminalen Bindungssequenzen für Heparin entstanden so zwei Mutanten mit einer deutlich stärkeren Affinität zu Heparin (T3, T4). Vorversuche in Mäusen bestätigten die Hypothese der gesteigerten Osteoinduktivität aufgrund der verstärkten Heparinbindung von T3 und T4. Die hier untersuchte hohe Dosis (10 µg) liegt bereits im Sättigungsbereich für die Varianten T3 und T4, in dem selbst durch weitere Steigerungen der Osteoinduktivität (durch höhere Dosis bzw. stärkere Heparinbindung) nur noch geringe lokale Zunahmen der Knochenbildung erzielt werden können. Hier ist die maximale Gewebeantwort ausgeschöpft.

Die niedrige Dosierung (5µg) eignet sich besser zur Beurteilung der Osteoinduktivität der untersuchten Morphogene. Hier erwweist sich T4 als das überlegene Protein, welches in kürzerer Zeit mehr Knochen induziert und bereits bei dieser Dosis ein Sättigungsverhalten zeigt. Das Maximum der Ossifikation wurde hier bereits am 14 Tag erreicht. T3 bietet bei 5µg

keinen Vorteil gegenüber BMP-2. In hoher Dosierung weisen T3 und T4 eine tendenziell gesteigerte Osteoinduktivität auf (nicht signifikant).

Bereits in den Jahren 1995/1996 wurde über die erfolgreiche Herstellung von BMP4/7 Heterodimeren berichtet, welche eine gesteigerte Osteoinduktivität besitzen sollen (Aono, Hazama et al. 1995; Hazama, Aono et al. 1995; Israel, Nove et al. 1996). Das Konzept, durch gentechnische Modifikationen der Bindungsfähigkeit der BMPs an Komponenten der extrazellulären Matrix zu verstärken wurde jedoch von keiner anderen Arbeitsgruppe verfolgt. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, wie lange BMPs am Implantationsort verweilen müssen, um eine Knochenbildung zu induzieren. Aus Beobachtungen vergleichender Studien mit verschiedenen Trägersystemen kann geschlossen werden, dass eine verlängerte Ortständigkeit der implantierten Morphogene auch zu einer gesteigerten Osteoinduktion führt, da Träger mit einer prolongierten Freisetzungskinetik zu besseren Ergebnissen führen. Woo et al (2001) implantierten unterschiedliche Formulierungen osteoinduktiver Implantate aus mit BMP-2 beschickten PLGA Mikrosphären in einer Carboxymethylzellulose-Matrix in Kalotten-Trepanationsdefekte bei Kaninchen. Das Implantat mit einer verzögerten Freisetzungskinetik für BMP-2 führte hier zur besten Knochenbildung (Woo, Fink et al. 2001). In einer in vitro Studie mit Osteoblasten fanden Oldham et al (2000) keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe, die mit einer wässrigen BMP-2 Lösungen supplementiert wurde, und Gruppen die mit in Mikrosphären eingekapseltem BMP behandelt wurden. Die Exposition mit langsam freigesetzten BMP-2 scheint also unter den statischen Kulturbedingungen in vitro kein elementarer Faktor für die osteoblastäre Differenzierung zu sein (Oldham, Lu et al. 2000).

Der Einsatz einer Kombination aus einem resorbierbaren Träger mit einer osteoinduktiven Wirksubstanz wird von zahlreichen Autoren empfohlen (Rueger 1998; Stutzle, Hallfeldt et al. 1998). Das Trägermaterial übernimmt die Funktion als Freisetzungssystem für das Morphogen. Es kann die schnelle Abdiffusion in das umliegende Gewebe verhindern und somit den lokalen Wirkspiegel länger aufrechterhalten.

Die beiden Mutanten T3 und T4 wurden ebenso wie BMP-2 in der vorgestellten experimentellen Studie an einen Kollagen-Träger gebunden implantiert. Das Ausmaß der induzierten Knochenbildung wird neben dem Bindungsvermögen der BMPs an die extrazelluläre Matrix auch durch die Wahl eines geeigneten Trägermaterials beeinflusst. Toriumi und Robertson haben die Anforderungen an einen idealen Träger folgendermaßen

formuliert: größtmögliche Oberfläche des Implantats im Lagergewebe; gleichmäßige Freisetzung des Induktors, biodegradierbares bzw. resorbierbares Material; Geschwindigkeit der Resorption des Trägers sollte gleich der Geschwindigkeit der Knochenneubildung sein; das Material sollte formbar und dimensionsstabil sein, um es Defekten anpassen zu können. (Toriumi und Robertson 1993)

Bei allen bisher verwendeten Trägermaterialien wird die Freisetzungskinetik der BMPs durch eine physikalische Bindung der Proteine an den Träger erzielt (Kolyophilisation, Präzipitation, usw.). Dadurch kann die Resorptionszeit prolongiert werden (Kübler 1998). In der vorgelegten Studie wurde Kollagen Typ-I als Freisetzungssystem gewählt. Durch immunhistochemische Färbung mit einem monoklonalem Antikörper konnte gezeigt werden, dass die BMPs entlang von Kollagenfasern im Knochen, in Periostzellen, in mesenchymalen Knochenmarkzellen und in geringen Mengen auch in der verkalkten Knochenmatrix nachweisbar sind (Yang und Jin 1990). Durch diese Assoziation mit Kollagen scheint es naheliegend, BMPs mit einem kollagenem Träger zu kombinieren und als Implantat einzusetzen.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Kollagen wurde aus Rindersehnen gewonnen. Der Anteil an Kollagen Typ I war größer 99 %. Durch Lyophilisieren der Kollagendispersion wurde ein feinfibrilläres Geflecht, welches sich in beliebiger Gestalt formen ließ. Der verwendete Träger wird schnell resorbiert und ist bereits nach 7 Tagen histologisch nicht mehr nachweisbar. Durch seine watteartige Konsistenz ist er schwer zu handhaben und bietet den umgebenden Weichteilen keinen Widerstand. Es kommt daher zum sehr schnellen Kollaps der Trägerstruktur, wodurch das induzierte Knochenvolumen wesentlich geringer ist, als das ursprüngliche Trägervolumen. Der Träger hat durch seine sehr rasche Resorption keine ausreichende Platzhalterfunktion. Aus klinischer Sicht stellte sich der verwendete Träger als unvorteilhaft heraus, da er zu schnell resorbiert wurde und keine Formstabilität aufwies und somit in keiner Weise eine Platzhalterfunktion übernehmen konnte.

Als Träger für BMPs wurde humanes Kollagen Typ I u.a. von Deatherage und Miller 1987 eingesetzt (Deatherage und Miller 1987). Sie gingen davon aus, dass für eine erfolgreiche Osteoinduktion durch Morphogene ein Kollagen oder ein Kollagenderivat wie ICBM als Vehikel notwendig sei (Deatherage, Matukas et al. 1988). Jüngere Studien beschäftigten sich mit der Pharmakokinetik von Freisetzungssystemen aus Kollagen und rhBMP-2. Friess et al. untersuchten das Bindungsverhalten von rhBMP-2 an Kollagen, verändert durch verschiedene

Modifikationen des Trägers (Friess, Uludag et al. 1999). Durch längere Penetrationszeiten konnte der Gehalt des Induktors erhöht werden, eine Quervernetzung des Kollagenschwamms durch Formaldehyd reduzierte die Affinität von rhBMP-2 zum Träger, eine Erhöhung des pH-Wertes steigerte die rhBMP-2-Bindung. Uludag et al. verglichen unterschiedliche Trägermaterialien auf ihr Freisetzungsvermögen von rhBMP-2 (Uludag, D'Augusta et al. 1999). Kollagen hatte 3 Stunden nach heterotoper Implantation bei der Ratte mit 75 % die höchste verbliebene Konzentration an rhBMP-2 und setzte das Morphogen gleichmäßig frei. Träger auf Mineralbasis setzten das rhBMP-2 schneller frei, was auf die langsamere Resorptionsgeschwindigkeit der Calciumphosphatkeramiken zurückgeführt wurde.

Während sich diese Studien mit dem Einsatz von Kollagen Typ I als Träger beschäftigten, untersuchte die finnische Gruppe um Gao Kollagen Typ IV als Freisetzungssystem für Knocheninduktoren in einem heterotopen Modell an Mäusen (Gao, Lindholm et al. 1993). Sie gingen davon aus, dass bovines BMP kovalent an Kollagen Typ IV bindet und somit gleichmäßig mit der Resorption des Trägers freigesetzt wird. Durch das Rekonstituieren mit dem BMP-Extrakt kam es zu einem rascheren Abbau des kollagenen Netzwerkes als bei der Kontrolle ohne BMP. Andererseits führte die alleinige Implantation von BMP zu einer geringeren Knorpel- bzw. Knochenbildung als bei der Kombination mit Kollagen Typ IV. Sie führten dies auf die vom Kollagen ausgehende Chemotaxis von Osteoprogenitorzellen, die erleichterte Neovaskularisation der Trägerstruktur und die im Vergleich zu mineralischen Trägern raschere Biodegradierbarkeit des Kollagens zurück. In einer ähnlichen Studie der Gruppe kombinierten sie später Kollagen Typ IV mit Hydroxylapatit bzw. Trikalziumphosphat als Trägerkomposit und rekonstituierten das Substrat mit einem BMP-Extrakt vom Elch (Gao, Lindholm et al. 1996). Das beste Ergebnis zeigte eine Trägerkombination aus porösem Hydroxylapatit aus der Koralle, benetzt mit Kollagen Typ IV und rekonstituiert mit einem BMP-Extrakt. Eine genaue Spezifikation der BMP-Fraktion wurde jedoch nicht angegeben. Als günstig für die Osteoneogenese wurde die poröse Struktur des Trägers bewertet, welche eine Migration von Zellen aus dem Implantatlager ermöglicht und als Leitstruktur dient. Das Kollagen sollte die gleichmäßige Freisetzung des BMP-Extraktes gewährleisten. Auf der Suche nach einem geeigneten Substrat für die Osteoregeneration, die die osteokonduktiven Eigenschaften von Kalziumphosphatkeramiken mit dem BMP-bindenden Verhalten von Kollagen kombiniert, wurde Kollagen auch mit HA- und TCP-Keramikpartikeln, pyrolysiertem Rinderknochen (Terheyden, Jepsen et al. 1997)

oder porösen Strukturen auf der Basis von Rinderknochen (Takaoka, Nakahara et al. 1988) oder Korallen (Terheyden, Jepsen et al. 1997) kombiniert.

Problematisch bei der Verwendung von xenogenem Kollagen ist das Risiko einer allergischen Unverträglichkeit. Mullins et al. berichten von zwei Fällen, bei denen nach topischer Applikation von Rinderkollagen in Form von Corneaimplantaten und Nahtmaterial auf Kollagenbasis bei Augenoperationen eine IgE-vermittelte Reaktion des Organismus ausgelöst wurde (Mullins, Richards et al. 1996). Obwohl es sich dabei um sehr seltene Komplikationen handelte, wiesen sie auf die lebenslang bestehende Möglichkeit einer immunologischen Kreuzreaktion mit Nahrungseiweißen hin und der damit verbundenen Gefahr eines anaphylaktischen Schocks.

Neben den beschriebenen Faktoren beeinflussen nicht veränderbare Parameter das Ausmaß der Knochenbildung. So ist die Anzahl der perivaskulär lokalisierten, mesenchymalen Zielzellen der BMPs auch von der Spezies, dem Lebensalter und insbesondere von der Vaskularisation abhängig. Es wurde ein heterotopes Implantatlager gewählt, da hiermit eine Knochenbildung ausgehend vom Lagergewebe ausgeschlossen wird und der beobachtete Effekt nur vom Implantat stammen kann. Die untersuchten Morphogene zeigten alle einen deutlichen osteoinduktiven Effekt, welcher dosis- und proteinabhängig war. Die physiologischen Vorgänge der Knochenneubildung und -resorption sind bei allen verwendeten Morphogenen gleich. Die Induktion von Knochengewebe im Muskel ist jedoch ein unphysiologischer Vorgang, welcher ebenfalls einen schnellen Abbau der Knochenmatrix bewirkt. Die fehlende biomechanische Stimulation führt zur Formation von nur locker strukturiertem, spongiösem Knochen mit hohen Anteilen an Fettmark.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden zwei neuartige BMP-2 Varianten mit verstärkter Bindung an die extrazelluläre Matrix auf ihre Osteoinduktivität hin untersucht und mit dem Wildtyp verglichen.

Hierzu wurden die Morphogene an scheibenförmige Träger (Kollagen Typ I) gebunden in die Muskulatur der vorderen Bauchwand von Ratten implantiert. Über einen Beobachtungszeitraum von 35 Tagen wurden in Intervallen von sieben Tagen die Implantate explantiert und sowohl radiologisch als auch histologisch auf die erzielte Knochenneubildung hin untersucht. Die Morphogene wurden in zwei Konzentrationen (10 µg, 5 µg) implantiert. Bei 5 µg pro Implantat weist die Variante T4 mit vier repetitiven Heparin-Bindungsstellen am N-Terminus eine signifikant gesteigerte Osteoinduktivität gegenüber dem Wildtyp und der Variante T3 auf. Diese gesteigerte Knocheninduktion zeigt sich in einer schnelleren Knochenbildung, die bereits an Tag 14 ihr Maximum erreicht und nach einer Plateauphase von circa sieben Tagen einen osteoklastären Knochenabbau mündet. Die Variante T3 zeigt im Röntgenverlauf in der Dosierung von 5 µg keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp BMP-2. In hoher Dosierung erweisen sich die Varianten T3 und T4 als die induktiveren Morphogene. Die Variante T3 zeigt einen zu T4 nahezu identischen Verlauf. Der Wildtyp besitzt eine gegenüber den beiden Varianten deutlich reduzierte Osteoinduktivität. Der beobachtete Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Bei allen Proteinen wird die maximal erzielbare Knochenfläche bereits an Tag 14 erreicht. In der darauf folgenden Zeit kommt es durch den osteoklastären Umbau zu einer deutlichen Flächenreduktion (um ca. 30%).

In den Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass die gentechnische Modifikation des Morphogenes BMP-2 zu einer Steigerung der Osteoinduktivität führen kann. Bei Betrachtung der Röntgenverläufe fällt jedoch auf, dass die Knochenneubildung von einem Sättigungsverhalten charakterisiert wird. Auch bei weiterer Steigerung des Morphogenmenge kommt es nicht zu einer vermehrten Knochenneubildung, sondern vielmehr zu einem früheren Einsetzen des osteoklastären Abbaus.

Gentechnologisch hergestellte Modifikationen von Wachstumsfaktoren bieten daher interessante Möglichkeiten der gezielten Beeinflussung der Pharmakokinetik der Faktoren. Sie versprechen ein hohes therapeutisches Potenzial in der rekonstruktiven Knochenchirurgie.

7 Literatur

Alberts, B., D. Bray, et al. (2002). Zelldiversifizierung im frühen Tier-Embryo. Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, Wiley-VCH: 1243-1244.

Aono, A., M. Hazama, et al. (1995). "Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer." Biochem Biophys Res Commun **210**(3): 670-7.

Arnander, C., A. Westermarck, et al. (2006). "Three-dimensional technology and bone morphogenetic protein in frontal bone reconstruction." J Craniofac Surg **17**(2): 275-9.

Carrington, J. L. and A. H. Reddi (1991). "Parallels between development of embryonic and matrix-induced endochondral bone." Bioessays **13**(8): 403-8.

Celeste, A. J., J. A. Iannazzi, et al. (1990). "Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9843-7.

Cunningham, N. S., V. Paralkar, et al. (1992). "Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(24): 11740-4.

Daopin, S., K. A. Piez, et al. (1992). "Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily." Science **257**(5068): 369-73.

Deatherage, J. R., V. J. Matukas, et al. (1988). "A review of matrix-induced osteogenesis with special reference to its potential use in cranio-facial surgery." Int J Oral Maxillofac Surg **17**(6): 395-9.

Deatherage, J. R. and E. J. Miller (1987). "Packaging and delivery of bone induction factors in a collagenous implant." Coll Relat Res **7**(3): 225-31.

Friess, W., H. Uludag, et al. (1999). "Characterization of absorbable collagen sponges as rhBMP-2 carriers." Int J Pharm **187**(1): 91-9.

Gao, T., T. S. Lindholm, et al. (1996). "Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics." Int Orthop **20**(5): 321-5.

Gao, T. J., T. S. Lindholm, et al. (1993). "Bone inductive potential and dose-dependent response of bovine bone morphogenetic protein combined with type IV collagen carrier." Ann Chir Gynaecol Suppl **207**: 77-84.

Griffith, D. L., P. C. Keck, et al. (1996). "Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 878-83.

Hazama, M., A. Aono, et al. (1995). "Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system." Biochem Biophys Res Commun **209**(3): 859-66.

Helder, M. N., E. Ozkaynak, et al. (1995). "Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development." J Histochem Cytochem **43**(10): 1035-44.

Heldin, C. H., K. Miyazono, et al. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature **390**(6659): 465-71.

Huggins, C. B. (1931). "The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract." Arch Surg **22**: 377-408.

Israel, D. I., J. Nove, et al. (1996). "Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo." Growth Factors **13**(3-4): 291-300.

Kawabata, M., Miyazono, K. (2000). Bone Morphogenetic Proteins. Skeletal Growth Factors. . E. Canalis. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 269-290.

Koide, M., Y. Murase, et al. (1999). "Bone morphogenetic protein-2 enhances osteoclast formation mediated by interleukin-1alpha through upregulation of osteoclast differentiation factor and cyclooxygenase-2." Biochem Biophys Res Commun **259**(1): 97-102.

Korchynsky, O., ten Dijke, P. (2002). Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice. . S. Vukicevic, Sampath, K. T. . Basel, Birkhäuser Verlag: 31-60.

Kübler, N., J. Reuther, et al. (1993). "Osteoinductive, morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogeneic human bone." J Oral Maxillofac Surg **51**(12): 1346-57.

Kübler, N. and M. R. Urist (1991). "Allogenic bone and cartilage morphogenesis. Rat BMP in vivo and in vitro." J Craniomaxillofac Surg **19**(7): 283-8.

Kübler, N. R., K. Würzler, et al. (1999). "EHBMP-2: Erstes BMP-Analog mit osteoinduktiven Eigenschaften." Mund Kiefer Gesichtschir **3 Suppl 1**: S134-9.

Kübler, N. R., Würzler, K., Biebl, S., Käding, K., Faller, G., Kirchner, T., Sebald, W., Reuther, J. F. (1998). "Die Rekonstruktion von Unterkieferdefekten mit BMP-2. Dtsch Zahnärztl Z 53: 871-875 (1998)."

Levander, G. (1938). "A study of bone regeneration." Surg Gynecol and Obst **67**: 705-714.

Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-91.

Mittl, P. R., J. P. Priestle, et al. (1996). "The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding." Protein Sci **5**(7): 1261-71.

Mullins, R. J., C. Richards, et al. (1996). "Allergic reactions to oral, surgical and topical bovine collagen. Anaphylactic risk for surgeons." Aust N Z J Ophthalmol **24**(3): 257-60.

Nickel, J., M. Dreyer, et al. (2002). Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. Bone Morphogenetic Proteins. K. T. S. Slobodan Vukicevic, Birkenhäuser Verlag, 2002, Basel, Boston, Berlin: 61-86.

Nomura, S., Hirota, S., Nakase, T., Hirakawa, K., Takaoka, K (1994). Expression and Lokalisation of BMP-4 mRNA during Embryogenesis and Fracture Healing. 1st International Conference on Bone Morphogenetic Proteins., Baltimore.

Oldham, J. B., L. Lu, et al. (2000). "Biological activity of rhBMP-2 released from PLGA microspheres." J Biomech Eng **122**(3): 289-92.

Paralkar, V. M., W. A. Grasser, et al. (2002). Prostate-derived factor and growth and differentiation factor-8: newly discovered members of the TGF- β superfamily. Bone Morphogenetic Proteins. K. T. S. Slobodan Vukicevic, Birkenhäuser Verlag, 2002, Basel, Boston, Berlin: 19-30.

Reddi, A. H. (1994). "Bone and cartilage differentiation." Curr Opin Genet Dev **4**(5): 737-44.

Reddi, A. H. and N. S. Cunningham (1993). "Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins." J Bone Miner Res **8 Suppl 2**: S499-502.

Reddi, A. H. and C. Huggins (1972). "Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(6): 1601-5.

Ripamonti, U., C. M. Schnitzler, et al. (1989). "Bone induction in a composite allogeneic bone/alloplastic implant." J Oral Maxillofac Surg **47**(9): 963-9.

Rueger, D. C. (2002). Biochemistry of bone morphogenetic proteins. Bone Morphogenetic Proteins. K. T. S. Slobodan Vukicevic, Birkenhäuser Verlag, 2002, Basel, Boston, Berlin: 1-18.

Rueger, J. M. (1998). "Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Aussichten." Orthopäde **27**: 72-79.

Ruppert, R., E. Hoffmann, et al. (1996). "Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity." Eur J Biochem **237**(1): 295-302.

Sampath, T. K., J. C. Maliakal, et al. (1992). "Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro." J Biol Chem **267**(28): 20352-62.

Sampath, T. K., N. Muthukumar, et al. (1987). "Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7109-13.

Sampath TK, R. D. (1994). "Structure, function and orthopedic applications of osteogenic protein-1 (OP-1)." Complications in Orthopedics **9**: 101-107.

Sampath, T. K. and A. H. Reddi (1981). "Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7599-603.

Scheufler, C., W. Sebald, et al. (1999). "Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution." J Mol Biol **287**(1): 103-15.

Schlunegger, M. P. and M. G. Grutter (1992). "An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2." Nature **358**(6385): 430-4.

Stutzle, H., K. Hallfeldt, et al. (1998). "[Bone regeneration stimulated by bone substitute materials]." Orthopäde **27**(2): 118-25.

Takaoka, K., H. Nakahara, et al. (1988). "Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein." Clin Orthop Relat Res(234): 250-4.

Terheyden, H., S. Jepsen, et al. (1997). "Recombinant human osteogenic protein 1 in the rat mandibular augmentation model: differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier." Mund Kiefer Gesichtschir **1**(5): 272-5.

Terheyden, H., C. Knak, et al. (2001). "Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication." Int J Oral Maxillofac Surg **30**(5): 373-9.

Toriumi, D. M. and K. Robertson (1993). "Bone inductive biomaterials in facial plastic and reconstructive surgery." Facial Plast Surg **9**(1): 29-36.

Udagawa, N. (2002). "Mechanisms involved in bone resorption." Biogerontology **3**(1-2): 79-83.

Uludag, H., D. D'Augusta, et al. (1999). "Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model." J Biomed Mater Res **46**(2): 193-202.

Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." Science **150**(698): 893-9.

Urist, M. R. and B. S. Strates (1971). "Bone morphogenetic protein." J Dent Res **50**(6): 1392-406.

Vukicevic, S., V. Latin, et al. (1994). "Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes." Biochem Biophys Res Commun **198**(2): 693-700.

Vukicevic, S., F. P. Luyten, et al. (1989). "Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenin." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8793-7.

Woo, B. H., B. F. Fink, et al. (2001). "Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix." Pharm Res **18**(12): 1747-53.

Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." Science **242**(4885): 1528-34.

Xiao, Z., X. Liu, et al. (2000). "Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3." J Biol Chem **275**(31): 23425-8.

Yang, L. J. and Y. Jin (1990). "Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions." Clin Orthop Relat Res(257): 249-56.

Zhao, B., T. Katagiri, et al. (2006). "Heparin potentiates the in vivo ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2." J Biol Chem **281**(32): 23246-53.

8 Anhang

Verwendete Materialien

Trägerherstellung

Chloroform J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Netherlands

Essigsäure, 100% p.a., Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Kollagen Typ-I, Fa. Innocoll, Saal an der Donau

Aqua destillata, Universitätsversorgung

Bechergläser, Schott Duran, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Pipetten Research, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Reaktionsgefäß 1,5 und 2,0 ml, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

Magnetrührer, M32, Fa. Hartenstein, Würzburg

Rührfisch, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Rührwerk Framo LR 20, Franz Morat GmbH & Co KG, Eisenach

Lyophilisator, Christ, LDC-2, Medizinischer Apparatebau, Osterode

Kühlschrank, Fa. Bosch, Vertrieb über Fa. Lehmann, Würzburg

Tiefkühltruhe ProfiLine ECC 6085-5, Bader Kälte- und Klimatechnik, Würzburg

Vakuumpumpe Typ-No. 22 AN18, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Waage ABS 120-4, Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern

Zentrifuge Universal 30 RF, Nr. 1402, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Tierhaltung

Makrolonkäfig Typ III, EBECO & Co, Castrop-Rauxel

Altromin Haltungsdiät 1324, Weimann, Würzburg

Trinkflasche, EBECO & Co, Castrop-Rauxel

Weichholzgranulat, Weimann, Würzburg

Zellstoffbahnen, Weimann, Würzburg

Anästhesie

Stephens-Narkosegerät, Eickmeier, Tuttlingen

Isofluran Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden

Tramal, Grünwald, München

Novalgin, Bayer, Leverkusen

Catosal 10% ad us. vet., Injektionslösung, Bayer, Leverkusen

Einmalspritze, 5ml, Braun, Melsungen

Wattevlies, Paul Hartmann AG, Heidenheim

Operation

Klinidrape Abdeckfolie steril, Mölnlycke Health Care OY, Homantsi, Finnland

Elektrische Hundehaarschneidemaschine, Kuno Moser GmbH, Unterkirnach

Dibromol farblos, Trommsdorff GmbH & Co. KG Arzneimittel, Alsdorf

Disposable Scalpel 15 er, PMF Köln

Schere fein BC 210, Aesculap AG, Tuttlingen

Anatomische Pinzette fein 31-19386, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg

Nadelhalter 36-06500, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg

Vicrylnaht 4/0 1,0 metric, Ethicon GmbH, Norderstedt

Nobecutan-Spray, Astra Chemicals GmbH, Wedel/Holstein

Röntgenkontrolle

Faxitron Röntgengerät Modell 43855 B, Hewlett Packard, Vertrieb: Rohde und Schwarz, Köln

Kodak X-OMAT-MA Film 50 Ready Pack 13x18 cm, Kodak, Stuttgart

Entwicklungsautomat Agfa Curix 242 S, Agfa, München

Computerauswertung

Diarahmen 3mm Antinewton, 24x36 mm, GEPE, Biwex N.V., Netherlands

Diascanner Nikon Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf

Scion Image for Windows, Beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA

StatView 5.0 by SAS Institute Inc., Cary, NC 27513, USA