

Aus der Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Reuther

**Die osteoinduktive Potenz verschiedener gentechnisch modifizierter
Bone Morphogenetic Proteins**

- Eine vergleichende Untersuchung im Rattenmodell -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg

vorgelegt von
Rita Depprich
aus Ingolstadt

Würzburg, September 2003

Referent: Prof. Dr. Dr. J. Reuther

Koreferent: Prof. Dr. A. Renk

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2004

Die Promovendin ist Zahnärztin

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Demineralisierte Knochenmatrix	1
1.2. Die TGF- β Superfamilie	2
1.3. Die BMP-Familie	3
1.4. Die BMP-Rezeptoren	5
1.5. Signaltransduktion durch Smad-Proteine	7
1.6. Osteoinduktion durch BMPs	11
2. Fragestellung	12
3. Material und Methode	13
3.1. Verwendete Proteine	13
3.2. Morphogenmenge und Gruppenstärke der Versuchstiere	13
3.3. ICBM als Träger- und Freisetzungssystem	14
3.4. Dotierung der ICBM-Träger mit den Proteinen	16
3.5. Versuchstiere	16
3.5.1. Tierart	16
3.5.2. Tierhaltung	17
3.5.3. Fütterung	17
3.6. Operation	17
3.6.1. Anästhesie	17
3.6.2. Kalottenoperation	19
3.7. Vitalfärbung und Röntgenkontrolle	20
3.8. Opferung	21
3.9. Computergestützte Auswertung der Radiographien	21
3.10. Trenn-Dünnschliff-Technik	22
3.11. Mikroradiographie	23
3.12. Histologie	23
3.12.1. Fluoreszenzmikroskopie	23
3.12.2. Färbungen	24

3.12.2.1. van-Kossa-Giemsa Färbung	24
3.12.2.2. Masson-Trichrom-Goldner Färbung	25
3.12.3. Eindeckung	27
3.12.4. Histologische Auswertung	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Anästhesieverträglichkeit und OP-Toleranz	28
4.2. Einheilung	28
4.3. Radiologische Beurteilung	30
4.4. Computergestützte Auswertung der Radiographien	33
4.5. Histologische Ergebnisse	34
5. Diskussion	39
5.1. Der Critical Size Defect (CSD)	39
5.2. Narkoseverfahren	41
5.2.1. Injektionsnarkose	41
5.2.2. Inhalationsnarkose	43
5.3. Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit von BMPs	46
5.3.1. Implantatlager	46
5.3.2. Trägermaterial	47
5.3.3. Extrazelluläre Matrix	47
5.4. BMP-2 Varianten (Wildtypen und Mutanten)	50
5.4.1. T3 und T4	50
5.4.2. K12E	51
5.4.3. GDF-5 und GDF-5 Chimär	52
5.4.4. BMP-6 und BMP-2-6	55
5.4.5. CHO-BMP-2	56
6. Zusammenfassung	57
7. Literaturverzeichnis	58

8. Anhang	80
8.1. Tabellen	80
8.2. Materialien	81
8.2.1. Trägerherstellung	81
8.2.2. Tierhaltung	82
8.2.3. Anästhesie	82
8.2.4. Kalottenoperation	82
8.2.5. Kalottenentnahme	83
8.2.6. Vitalfärbung und Röntgenkontrolle	84
8.2.7. Computerauswertung	84
8.2.8. Trenn-Dünnschliff-Technik	84
8.2.9. Mikroradiographie	85
8.2.10. van-Kossa-Giemsä Färbung	85
8.2.11. Masson-Trichrom-Goldner Färbung	86

Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone Morphogenetic Protein
CDMP	Cartilage Derived Morphogenetic Protein
CHO	Chinese Hamster ovary cells
CO ₂	Kohlendioxid
Co-Smad	common partner Smad
CSD	Critical Size Defect
GDF-5	Growth and Differentiation Factor-5
GMA	Glycolmethacrylat-Reihe
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICBM	insoluble collagenous bone matrix
I-Smads	inhibitory Smad
k. A.	keine Angabe
OP	Osteogenic Protein
post-op.	postoperativ
rhBMP	rekombinantes BMP-2
RPM	rounds per minute
R-Smad	receptor activated Smad
RT	Raumtempertaur
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Vgr	Vegetal (Protein) Related

1. Einleitung

Knochen besitzt eine hohe regeneratorsche Potenz. Die Knochenbildung ist ein kontinuierlicher Prozess, der während der Embryonalzeit beginnt und sich nach der Geburt in Umbau- und Wiederherstellungsprozessen fortsetzt. Die molekularen Regelmechanismen, welche die embryonale Skelettentwicklung steuern, wiederholen sich bei der Knochenheilung im Erwachsenenalter. Hierbei spielen BMPs (bone morphogenetic proteins) eine entscheidende Rolle (Ripamonti und Tasker 2000, Reddi 1994, Reddi 1998, Ripamonti 1998, Ferguson 1998). Bis zum heutigen Tage ist die Knochenneubildung bzw. -regeneration Gegenstand intensiver Forschung, mit dem Ziel therapeutische Wege zur Behandlung von Knochendefekten, Knochenstoffwechselerkrankungen und zur Anwendung im orthopädischen und kieferchirurgischen Bereich zu finden.

1.1. Demineralisierte Knochenmatrix als Ausgangssubstanz für BMPs

Demineralisierte Knochenmatrix diente als Ausgangsmaterial für die Isolation, Reinigung und Identifizierung der BMPs (Reddi 2001). Bereits vor über einem Jahrhundert verwendete Senn vom Rush Medical College, Chicago, in Salzsäure vollständig demineralisierten Knochen zur Wiederherstellung von Schädeldefekten und zur Auffüllung von Knochenhöhlen. Dabei stellte er fest, dass der entkalkte Knochen teilweise durch neuen Knochen ersetzt wurde (Senn 1889). Erst 1945 wurden Senns Experimente von Lacroix wiederaufgegriffen, der mit „acid alcohol bone extracts“ in Kaninchenmuskulatur heterotope Knochenneubildung erzielte (Lacroix 1945). Diese Extrakte bezeichnete er als Osteogenin (Lacroix 1951). 1965 implantierte Urist demineralisierte Knochenmatrix in die Muskulatur von Kaninchen, Ratten, Mäusen und Meerschweinchen und konnte somit eine heterotope Knochenneubildung induzieren (Urist 1965). Urist und seine Mitarbeiter vermuteten einen aus der Knochenmatrix diffundierbaren Induktor und nannten ihn Bone Induction Prinzipale (BIP) (Urist et al.

1967), später bezeichneten Urist und Strates ihn als Bone Morphogenetic Protein (BMP) (Urist und Strates 1971).

1.2. Die TGF- β Superfamilie

Mittlerweile wurde durch die Weiterentwicklung molekular-biologischer Techniken eine genauere Differenzierung der BMPs ermöglicht. BMPs sind Mitglieder der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Superfamilie, zu der bis jetzt 45 Gene zählen (Rueger 2002, Reddi 1998, Sakou 1998, Ramoshebi et al. 2002, Wozney 1998).

Die TGF- β Superfamilie besteht aus einer großen Gruppe von Signalmolekülen, die für vielfältige morphogenetische Prozesse der Gewebe- und Organentwicklung verantwortlich sind. Wahrscheinlich existieren diese Gene in allen Lebewesen. Neben den TGF- β s selbst und den BMPs gehören weitere Polypeptide zur TGF- β Superfamilie: die Mullerian Inhibiting Substance (MIS), verantwortlich für die Zurückbildung des Müllerschen Ganges bei der Entwicklung der männlichen Fortpflanzungsorgane, Inhibine und Activine, die zusammen die Freisetzung des Follikel-Stimulierenden-Hormons aus der Hypophyse regulieren und die Growth and Differentiation Factors (GDFs), die an der Gewebeentwicklung beteiligt sind (Rueger 2002, Korchynsky und ten Dijke 2002, Ramoshebi et al. 2002, Massagué 1990).

Die TGF- β Superfamilien-Gene kodieren große Vorläuferproteine, die aus einem N-terminalen Sequenzsignal, einer Prodomäne und einer reifen Domäne am C-terminalen Ende bestehen. Erst nach Proteolyse und Prozessierung gehen die Proteine in die eigentliche, viel kürzere, reife Form über (Rueger 2002).

Das strukturelle Kennzeichen der reifen Domäne ist eine aus sieben Zysteinresten bestehende Sequenz. Diese Zysteinreste befinden sich bei allen TGF- β Superfamilien-Mitgliedern an identischen Positionen (Rueger 2002, Nickel 2002, Wozney 1998). Sechs Zysteinreste bilden intramolekulare Disulfid-Brücken, deren typisches Muster im reifen Monomer als „cysteine knot“ bezeichnet wird. Der siebte Zysteinrest ist an der Bildung der einzigen intermolekularen Disulfid-Brücke beteiligt (Nickel 2002). Zusätzlich befindet sich N-terminal des ersten Zysteinrestes eine in Länge und

Zusammensetzung sehr variable Aminosäuresequenz, die Rezeptorbindung sowie Interaktion mit anderen Molekülen beeinflusst (Rueger 2002, Nickel 2002).

1.3. Die BMP-Familie

BMPs sind dimere Moleküle, die aus zwei, über eine intermolekulare Disulfid-Brücke verbundene, Polypeptidketten bestehen. Jeder monomere Strang wird als Vorläufer-Polypeptid von über 400 Aminosäuren biosynthetisiert. Der reife Proteinstrang besteht aus 120 bis 140 Aminosäuren (Reddi 2001).

Aufgrund ihrer Sequenzhomologie wurden mittlerweile annähernd 20 BMPs identifiziert (Kawabata und Miyazono 2000). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des C-terminalen Endes mit der Sequenz von BMP-7/OP-1 als Referenzwert (100%) ergibt für BMP-5 88% und BMP-6 87% Übereinstimmung, für BMP-2 und BMP-4 60% bzw. 58%. Für GDF-5 finden sich lediglich 51% der Aminosäuresequenz übereinstimmend (siehe Tabelle 1.3.1.) (Rueger 2002).

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 und ten Dijke 2002).

Die Proteine zeigen eine hohe evolutionäre Konstanz, d.h. ihre Aminosäuresequenzen stimmen auch zwischen verschiedenen Spezies weitgehend überein. So findet sich für BMP-2 eine identische Sequenz bei Mensch, Maus und Ratte, BMP-4 stimmt bei Maus und Ratte überein, BMP-10 und BMP-11 bei Mensch und Rind. BMP-3 ist bei Mensch und Ratte zu 98% identisch. Bei Mensch und Maus sind BMP-3B in 97%, BMP-5 in 96% und BMP-7 in 98% übereinstimmend (Ibelgauft 1999). Die Bezeichnung der BMPs ist nicht einheitlich, teilweise werden verschiedene Bezeichnungen für gleiche Proteine verwendet (Tabelle 1.3.1.).

Tabelle 1.3.1.: Übersicht über BMPs (Ramoshebi et al. 2002, Rueger 2002)

Name	Alternative Bezeichnung	Potentielle Funktion	AS-Sequenz Identität in %
BMP-1			
BMP-2	BMP-2A	Knochen- und Knorpelmorphogenese	60
BMP-3	Osteogenin	Knochenbildung	k. A.
BMP-3B	GDF-10	Knochenbildung	k. A.:
BMP-4	BMP-2B	Knochen- und Knorpelmorphogenese	58
BMP-5	-	Knochenmorphogenese	88
BMP-6	Vgr-1	Knorpelhypertrophie	87
BMP-7	OP-1	Knochendifferenzierung	100
BMP-8	OP-2	Knochenbildung	74
BMP-8B	OP-3	nicht untersucht	67
BMP-9	GDF-2	nicht untersucht	51
BMP-10	-	nicht untersucht	47
BMP-11	GDF-11	nicht untersucht	36
BMP-12	GDF-7, CDMP-3	Bänder- und Sehnenentwicklung	k. A.
BMP-13	GDF-6, CDMP-2	Knorpelentwicklung- und hypertrophie	53
BMP-14	GDF-5, CDMP-1, CDMP-2	Mesenchymverdichtung und Chondrogenese	51
BMP-15	CDMP-1	nicht untersucht	k. A.
BMP-16	-	nicht untersucht	k. A.
TGF-β1	-	nicht untersucht	35
TGF-β2	-	nicht untersucht	36

BMP: Bone Morphogenetic Protein
 OP: Osteogenic Protein
 CDMP: Cartilage Derived Morphogenetic Protein

TGF-β: Transforming Growth Factor β
 Vgr: Vegetal (Protein) Related
 k. A.: keine Angabe

BMP-1 ist kein Bone Morphogenetic Protein im eigentlichen Sinne, sondern eine Prokollagen-C-Proteinase, die als Metalloproteinase bei der Bildung der extrazellulären Matrix eine Rolle spielt (Hofbauer 1996).

Obwohl die BMPs ursprünglich im Knochen gefunden wurden, wurden sie inzwischen in den meisten anderen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen. Untersuchungen an gentechnisch erzeugten Nullmutationen (sog. „Knock outs“), bei denen gezielt BMP-Gene ausgeschaltet wurden, zeigen, dass BMPs multifunktionale Proteine sind, die auch in der Embryogenese eine zentrale Rolle spielen. Ihre Wirkung ist nicht nur auf die Knochen- und Knorpelmorphogenese beschränkt, sondern schließt auch viele andere Gewebe wie z. B. epitheliale Zellen, Monozyten oder neuronale Gewebe mit ein (Cunningham et al. 1992, Hogan 1996, Korchynsky und ten Dijke 2002, Goumans 2000, Martinovic et al.).

1.4. Die BMP-Rezeptoren

Ihre biologische Wirkung erzielen Mitglieder der TGF- β Superfamilie durch die Bindung an zwei transmembranöse Serin/Threonin-Kinase Rezeptoren, die als Typ I und Typ II Rezeptoren bezeichnet werden (Yamashita 1996, Korchynsky und ten Dijke 2002, Rueger 2002, Nickel 2002, Aoki 2001, Reddi 2001, Ripamonti 2001).

Bis jetzt wurden 12 Typ I Rezeptoren und 7 Typ II Rezeptoren für die TGF- β Superfamilie ermittelt. Sowohl von den Typ I Rezeptoren, als auch den Typ II Rezeptoren binden jeweils drei ein oder mehrere BMPs. Bei den Typ I Rezeptoren handelt es sich dabei um ActR-1, BMPR-IA und BMPR-IB, bei den Typ II Rezeptoren um ActR-II, ActR-IIB und BMPR-II (Rueger 2002, Massagué 2001, Heldin 1997). Ähnlich den BMPs besitzen auch die Typ I Rezeptoren teilweise mehrere Bezeichnungen (siehe Tabelle 1.4.1.).

Tabelle 1.4.1.: Rezeptoren der TGF- β Superfamilie bei Säugetieren (Rueger 2002)

Typ I Rezeptor	Typ II Rezeptor
ALK-1	
ActR-1 (ALK-2)	BMPR-II
BMPR-IA (ALK-3)	TBR-II
ActR-IB (ALK-4)	ActR-IIB
TBR-I (ALK-5)	ActR-II
BMPR-IB (ALK-6)	

grau unterlegt: BMP-Rezeptoren

Die BMPs binden mit nur geringer Affinität die einzelnen Rezeptoren, mit hoher Affinität jedoch einen heteromeren Komplex aus Typ I und Typ II Rezeptor (ten Dijke et al. 1994, Nohno et al. 1995, Rosenzweig et al. 1995, Liu et al. 1995, Koenig et al. 1994, Yamashita et al. 1995, Korchynsky und ten Dijke 2002). Man nimmt an, dass aufgrund von Affinitätsunterschieden zuerst der Typ I Rezeptor, der eine höhere Affinität besitzt, gebunden und danach der Typ II Rezeptor mit in den Liganden-Rezeptor-Komplex miteinbezogen wird (Gilboa 2000). Im Gegensatz zu den BMPs binden TGF- β s und Activine zuerst den Typ II Rezeptor und rekrutieren dann den Typ I Rezeptor (Wrana et al. 1992, Ebner et al. 1993, Attisano et al. 1993, Franzén et al. 1993, Korchynsky und ten Dijke 2002). Unterschiedliche BMPs bevorzugen unterschiedliche Rezeptortypen, wobei die Rezeptoraffinität von der Zellart und der Anzahl der Rezeptoren abhängig ist. So bindet BMP-2 vor allem ALK-6, BMP-4 vor allem ALK-3 und/oder ALK-6 und BMP-6 bzw. BMP-7 vor allem ALK-2 (ten Dijke et al. 1994, Nishitoh et al. 1996, Yamashita 1996, Macías-Silva et al. 1998, Ebisawa et al. 1999, Aoki et al. 2001). Zusätzlich kann die Rezeptorbindung der BMPs durch deren Bindungsfähigkeit an extrazelluläre Matrixkomponenten wie Heparansulfat oder Kollagen IV oder durch die Bindung an BMP-Antagonisten wie Noggin, Chordin oder DAN-Familienmitglieder wie z. B. Gremlin unterbunden werden (Hsu 1998, Zimmermann 1996, Kübler et al. 1999, Reddi 1994, Reddi 2001, Rueger 2002).

1.5. Signaltransduktion durch Smad-Proteine

Nomenklatur der Smad-Proteine

Nach Bildung des heteromeren Komplexes aus Rezeptoren und BMPs wird eine Reaktionskaskade initiiert, bei welcher der Typ I Rezeptor „stromabwärts“ des Typ II Rezeptors an der Signalübertragung mitwirkt (Rueger 2002, Carcamo et al. 1994, Massagué 1998). Der aktivierte Typ II Rezeptor aktiviert den Typ I Rezeptor durch Phosphorylierung, wodurch dieser ebenfalls durch Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen, sog. Smads, die intrazelluläre Signalübertragung initiiert (Cárcamo et al. 1994, Korchynsky und ten Dijke 2002, Reddi 2001).

Die Bezeichnung Smad ist eine Verschmelzung der Bezeichnungen Sma (small body size), einem Gen, das in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde (Savage et al. 1996) und Mad (mothers against decapentaplegic), einem ähnlichen Gen, das in *Drosophila melanogaster* gefunden wurde (Sekelsky et al. 1995). Beide Gene zeigten sich an durch BMPs aktivierten Signalübertragungen beteiligt. Nachdem homologe Gene in Vertebraten identifiziert wurden, wurde eine gemeinsame Nomenklatur gesucht. Smad wurde als Bezeichnung für zytoplasmatische Proteine vorgeschlagen, die durch Proteine der TGF- β Superfamilie aktiviert werden (Heldin 1997, Reddi 2001, Korchynsky und ten Dijke 2002).

Mittlerweile wurden in Säugetieren acht verschiedene Smad-Proteine entdeckt, die sich aufgrund ihrer Funktion in drei Untergruppen unterteilen lassen:

R-Smads (receptor activated Smads), Co-Smads (common partner Smads) und I-Smads (inhibitory Smads). Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 und Smad8 gehören zu den R-Smads, Smad4 ist ein Co-Smad und Smad6 und Smad7 sind I-Smads (Reddi 2001, Rueger 2002, Korchynsky und ten Dijke 2002).

Funktion der R-Smads und Co-Smads

Die R-Smads Smad1, Smad5 und Smad8 werden von BMP Typ I Rezeptoren durch Phosphorylierung aktiviert und dienen somit der BMP Signalübertragung, während TGF- β und Activin Rezeptoren die R-Smads Smad2 und Smad3 phosphorylieren (Attisano 2002, Korchynsky und ten Dijke 2002, Heldin 1997, Massagué 1998, Ebisawa 1999). Dabei unterstützen die zytoplasmatischen Proteine SARA (Smad anchor for receptor activation) (Tsukazaki et al. 1998) und Hrs (Hepatic growth factor regulated tyrosine kinase) (Miura et al. 2000) die Präsentation und somit die Rekrutierung der Smad-Proteine durch Typ I Rezeptoren (Attisano 2002, Carcamo 1994, Rueger 2002).

Die aktivierten R-Smads bilden mit Smad4, einem im Zytoplasma lokalisierten Co-Smad, heteromere, bevorzugt trimere Komplexe, die in den Zellkern eindringen und dort akkumulieren (Lagna 1996, Correia 2001, Kawabata 1998, Shi 1997, Rueger 2002, Massagué 1998, Heldin 1997, Ebisawa 1999, Nishimura 1998). Dort regulieren die R-Smad/Co-Smad Komplexe direkt oder mit Unterstützung anderer Faktoren die Transskription bestimmter Zielgene (Massagué 2000, ten Dijke 2000, Paralker et al. 2002).

Die R-Smads Smad1, Smad3, Smad5, und Smad8 und das Co-Smad Smad4 erkennen bestimmte Sequenzen in der Promotorgegend ihrer Zielgene, wobei die Affinität von Smad3 und Smad4 zur DNA deutlich größer ist, als die der BMP R-Smads (Dennler 1998, Jonk et al. 1998, Yingling et al. 1997).

In vitro Experimente zeigten die größte Bindungsaffinität von Smad3 und Smad4 zu GTCT-Sequenzen der DNA, die als SBE (Smad binding element) bezeichnet werden (Zawel 1998). Eine geringere Affinität besitzen BMP R-Smads und auch Smad3 und Smad4 zu GC-reichen Sequenzen bzw. GCAT-Sequenzen (Henningfeld et al. 2000, Ishida et al. 2000, Kim et al. 1997). Durch gentechnische Anreicherung von GTCT-Sequenzen in der Promotorregion der Zielgene konnte eine deutliche Verstärkung der durch TGF- β Superfamilienmitglieder hervorgerufenen Genexpression erreicht werden (Dennler 1998, Jonk et al. 1998, Zawel et al. 1998). Andererseits reduzierten gentechnische Mutationen der GC-reichen Sequenzen bzw. GCAT-Sequenzen die BMP-induzierte Genantwort (Ishida et al. 2000, Kusanagi et al. 2000).

Da die alleinige Affinität der Smad-Proteine, insbesondere der BMP-Smads, zur DNA zu gering ist, um eine effiziente Bindung an die Promotorregion zu ermöglichen, werden weitere DNA-bindende Transskriptionsfaktoren benötigt (Massagué 2000, ten Dijke 2000, Derynck 1998). Dazu gehören das 30-Zink-Finger-Protein OAZ (Derynck 1998, Hata 2000), Mitglieder der CBF-Familie (core binding factor family of transcriptional factors) (Hanai et al. 1999, Pardali et al. 2000, Komori et al. 1997, Ducy et al. 1999, Mundlos et al. 1995, Zhang et al. 2000), sowie die Acetyltransferasen P300 und CBP, die durch Reduktion der Chromosomenkondensation den Zugriff der Smads und weiterer Transskriptionspolymerasen auf die DNA erleichtern (Pouponnot 1998, Nakashima et al. 1999).

Funktion der I-Smads

Die I-Smads unterbinden die intrazelluläre Signalübertragung indem sie mit den R-Smads um den aktivierten Typ I Rezeptor konkurrieren. Während Smad7 sowohl die durch TGF- β , Aktivin oder BMP initiierte Signalübertragungen unterbindet, hemmt Smad6 selektiv die durch BMPs hervorgerufene Signalübertragung (Hayashi et al. 1997, Imamura et al. 1997, Nakao et al. 1997).

Zusätzlich vermittelt Smad7 durch Komplexbildung mit den im Zytoplasma vorkommenden Ligasen Smurf1 und Smurf2 (Smad ubiquitination regulatory factor) bzw. Smad6 durch Komplexbildung mit Smurf2, die proteosomale und lysosomale Degradation der TGF- β - bzw. BMP-Rezeptorkomplexe (Zhu 1999, Kavsak et al. 2000, Ebisawa et al. 2001).

Eine weitere Aufgabe von Smurf1 ist die Regulation der Stabilität der Smad-Proteine. Smurf1 degradiert Smad1 und Smad5 unabhängig von ihrer Aktivierung durch Liganden auf proteosomalem Wege, ebenso führt eine Zunahme an Smurf1 zu einer selektiven Abnahme von BMP R-Smads (Zhu et al. 1999).

Weiterhin wird angenommen, dass Smad6 mit dem Co-Smad Smad4 um die Bindung an R-Smads konkurriert (Hata 1998), als direkter Co-Repressor bei der Gentransskription wirkt (Bai 2000) und die TAK1-p38 Kinase hemmt, welche die BMP induzierte Apoptose reguliert (Kimura 2000).

Weitere Proteine, wie das Transskriptions Co-Repressor Protein Ski oder das antiproliferative Protein Tob können mit den R-Smads bzw. dem Co-Smad eine Bindung eingehen und somit eine negative Regulation der Transskription bewirken (Yoshida et al. 2000, Luo et al. 1999, Wang 2000).

Mittlerweile wurden Signalübertragungen stromabwärts des BMP- Rezeptorkomplexes nachgewiesen, die ohne Mitwirkung von Smad Proteinen ablaufen (Fujii et al. 1999). Dabei spielt vor allem TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) eine wichtige Rolle, die durch TAB1 (TAK1 binding protein) nach Aktivierung durch den Typ I Rezeptors aktiviert wird (Yamaguchi et al. 1995, Yamaguchi et al. 1999).

BMP Zielgene

Zielgene der BMPs kodieren für Matrixproteine, Wachstumsfaktoren, Enzyme und Transskriptionsfaktoren. Teils wirken die BMPs direkt, teils indirekt auf die Zielgene ein (Korchynsky und ten Dijke 2002). Kollagen Typ I wird direkt, Osteocalcin und Osteopontin indirekt und erst nach längerer Exposition durch BMPs induziert. Alkalische Phosphatase, ein häufig für BMP-induzierte Osteoblastendifferentiation verwendeter Marker, steigt erst nach längerer Exposition an (Ahrens et al. 1993, Katagiri et al. 1994, Malialkal 1994, Lee et al. 2000, Fujii et al. 1999). Weitere direkte Zielgene sind neben den Transskriptionsfaktoren Msx-2, Dlx-5, Id1, JunB, Cbfa1, die an der Bildung vieler Gewebearten beteiligt sind (Korchynsky und ten Dijke 2002), auch Osteoprotegrin, ein von Osteoblasten sezernierter Faktor, der die Osteoklastenausreifung hemmt (Wan 2001), sowie Connective tissue growth factor (CTGF), ein von Chondroblasten sezerniertes Zytokin, das die Chondrozytenproliferation und -differenzierung, die Expression osteoblastenspezifischer Gene und die Knochenmineralisation steuert (Sakou et al. 1999, Nakanishi et al. 1997, Nishida et al. 2000). Auch die inhibitorischen Smads Smad6 und Smad7 werden im Sinne einer negativen Rückkopplung durch BMPs gesteuert und kontrollieren somit die Dauer und Intensität der BMP-Signalantwort (Nakao et al. 1997, Afrakhte et al. 1998, Takase et al. 1998).

1.6. Osteoinduktion durch BMPs

Untersuchungen konnten zeigen, dass die postnatale Osteoinduktion durch BMPs dem Mechanismus der enchondralen Ossifikation entspricht und damit die Vorgänge bei der embryonalen Skelettentwicklung bzw. der Frakturheilung rekapituliert (Urist 1981). Dieser mehrstufige kaskadenförmige Vorgang ist charakterisiert durch:

- Chemotaxis mesenchymaler Stammzellen
- Proliferation als Antwort auf den mitogenen Stimulus
- Differenzierung in Chondroblasten und Bildung von extrazellulärer Matrix
- Hypertrophie der Chondroblasten
- Initiierung der Angiogenese und beginnende Resorption
- Bildung von Knochengewebe mit blutbildendem Knochenmark

(Reddi et al. 1987; Carrington und Reddi 1991; Reddi 1994; Martinovic et al. 2002)

BMPs sind weiterhin an der Entwicklung vieler anderer Organe und Gewebe beteiligt, die durch mesenchymale-epitheliale Interaktionen entstehen. Sie sind jedoch die einzigen Wachstumsfaktoren, die eine Knochenneubildung induzieren können (Hogan 1996, Hogan 1996, Reddi 2000).

2. Fragestellung

Bis heute ist die Suche nach weiteren Proteinen mit knocheninduzierender Wirkung nicht abgeschlossen.

Die lokale Bioverfügbarkeit bestimmt die osteoinduktiven Eigenschaften der BMPs. Eine Möglichkeit der Beeinflussung der osteoinduktiven Potenz der BMPs besteht z.B. in ihrer gentechnischen Manipulation. So lässt sich durch Modifikationen der N-terminalen Sequenz das Bindungsverhalten der BMPs an extrazelluläre Matrixbestandteile gezielt beeinflussen (Nickel 2002, Ruppert 1996).

Eine Schwierigkeit in der Entwicklung neuer BMPs ist, dass die alleinige biochemische Strukturanalyse und *in vitro*-Testung keine verlässliche Aussage über das biologische Verhalten und die osteoinduktive Potenz *in vivo* zulassen.

In dieser Studie soll deshalb die osteoinduktive Potenz unterschiedlicher BMP Wildtypen (rhBMP-2, CHO-BMP-2, rhBMP-6, GDF-5) und ihrer gentechnisch hergestellten Mutanten (rhBMP-2-6 [B2BMP-6], T3, T4, K12E, GDF-5 Chimär [B2GDF-5]) im Rattenmodell überprüft und untereinander bzw. mit rhBMP-2 verglichen werden.

3. Material und Methode

3.1. Verwendete Proteine

Die für die Studie verwendeten Proteine wurden in einem bakteriellen Expressionssystem (*E. coli*) am Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. W. Sebald hergestellt und freundlicherweise bereitgestellt. Im Gegensatz zu dem in einem eukaryonten System hergestellten CHO-BMP-2, das vom Genetics Institute (Genetics Institute, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge MA 02140-2387, USA) bezogen wurde, findet sich bei den bakteriell hergestellten Proteinen keine Glykosylierung der Proteine.

RhBMP-2, BMP-6 und GDF entsprechen in ihren Sequenzen den natürlich vorkommenden Proteinen (sog. Wildtypen).

T3 und T4 sind BMP-2 Varianten, die ein bzw. zwei zusätzliche Triplets basischer Reste im N-terminalen Segment und somit eine veränderte Heparin-Bindungsstelle besitzen.

K12E ist eine BMP-2 Mutante, bei der Lysin 12 gegen Glutamat ausgetauscht und somit der basische Charakter im Proteinstrang reduziert wurde.

Die Varianten rhBMP-2-6 (B2BMP-6) und GDF-5 Chimär (B2GDF-5) sind Fusionen aus BMP-2 und BMP-6 bzw. GDF-5. Sie enthalten die N-terminale Sequenz von BMP-2 bis einschließlich Lysin 12, danach folgt die Sequenz von BMP-6 (beginnend mit Ala-Cys...) bzw. GDF-5 (beginnend mit Ha-Arg-Cys...).

3.2. Morphogenmenge und Gruppenstärke der Versuchstiere

Pro zu untersuchendes Protein wurden jeweils sieben, in der Kontrollgruppe vier Tiere operiert. Einheitlich wurden 5 µg Protein pro Träger (Aufnahmevermögen 20 µl) verwendet. Lediglich GDF-5 wurde höher dosiert (50 µg/20 µl), da eigene Vorversuche gezeigt haben, dass GDF-5 erst in höherer Dosierung osteoinduktiv wirkt (siehe Tabelle 3.2.1.)

Tabelle 3.2.1.: Übersicht über Morphogenmenge pro Träger und Gruppenstärke der Versuchstiere

Protein	Proteinmenge ($\mu\text{g}/20\text{ ml}$)	Anzahl der Tiere (n=)
Kontrolle	-	4
rhBMP-2	5	7
CHOBMP-2	5	7
rhBMP-6	5	7
rhBMP-2-6	5	7
GDF-5	50	7
GDF-5 Chimär	50	7
K12E	5	7
T3	5	7
T4	5	7

3.3. ICBM als Träger- und Freisetzungssystem

In der vorliegenden Studie wurde als Träger- und Freisetzungssystem für die verwendeten Proteine aus Pferdepatellae gewonnene ICBM (insoluble collagenous bone matrix) verwendet. Die Herstellung der 1 mm dicken, 8 mm durchmessenden runden Spongiosa-Träger mit einem Volumen von ca. 50 mm³ erfolgte analog der für bovine ICBM geltenden Anleitung in Anlehnung an die Patentschrift von Kuberasampath und Ridge, US Pat. Nr. 5171574 (Kuberasampath 1992). Die wesentlichen Schritte sind dabei folgende:

1. Aufbereitung und Zuschnitt der Spongiosa

- Pferdepatellae von Muskelansätzen und Periost befreien
- Einfrieren bei -80°C für ca. 24 h in der Tiefkühltruhe
- Zuschnitt der tiefgefrorenen Patellae in 1 mm dicke Spongiosa Scheiben mit der Bandsäge, dabei gleichzeitig Entfernen der Kortikalis
- Entfernen des Knochenmarkes mit Wasserdampfstrahler und Druckluft

2. Entfernung der fettlöslichen Bestandteile:

Entfetten der Spongiosa-Scheiben durch dreimaliges Einlegen in Chloroform-Methanol-Lösung (Verhältnis 3:1) für jeweils 19 h unter ständigem Rühren

Waschen der Scheiben in 5 l Aqua destillata bei RT für 30 min

3. Bleichen

Bleichen der Scheiben durch Einlegen in 3%iges H₂O₂ für ca. 15 min

Waschen in Aqua destillata und Lufttrocknen

4. Demineralisierung und Ausstanzen der runden Spongiosa-Scheiben

Demineralisation der Spongiosa-Scheiben durch dreimaliges Einlegen in 0,5 M HCL-Lösung für 1,5 h unter ständigem Rühren

Waschen der Scheiben in 5 l Aqua destillata bei RT für 30 min

Ausstanzen der 8 mm durchmessenden runden Spongiosa-Scheiben mittels eines selbstgefertigten Stanzrohres (Abbildung 3.4.1.)

Waschen der ausgestanzten Scheiben in Aqua destillata

5. Guanidinextraktion zur Inaktivierung der osteoinduktiven Matrixproteine

Extraktion löslicher, induktiver Matrixproteine durch Einlegen der Spongiosa-Scheiben in 1 l 4M Guanidin-HCl/50mM Tris-HCl, pH 7,0, für 16 h bei 4°C unter ständigem Rühren

6. Waschen der Matrix:

Zweimaliges Einlegen der Spongiosa-Scheiben in 1 l 0,05 M Tris-hydroxymethylaminmethan-Puffer/0,15M NaCl für 4 h bei 4°C

Waschen der Scheiben in 5 l Aqua destillata bei RT für 30 min

7. Lyophilisieren

Einfrieren der Spongiosa-Scheiben für mind. 24 h bei -80°C

Lyophilisieren der Spongiosa-Scheiben für 24 h bei -4°C und 0,05 mbar

Lagerung der Träger +4°C

3.4. Dotierung der ICBM-Träger mit den Proteinen

Vor der Implantation wurden die Träger mit sterilem Aqua destillata rehydriert und überschüssiges Wasser abgepresst. Die entsprechende Proteinmenge wurde in einem Volumen von 20 μl aufgebracht. Anschließend wurden die Träger erneut lyophilisiert. Danach erfolgte die Lagerung der fertiggestellten Implantate bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank (Abbildung 3.4.1.).



Abbildung 3.4.1.: ICBM-Träger (Schrumpfung bedingt durch Lyophilisation)

3.5. Versuchstiere

3.5.1. Tierart

Für die vorliegende Studie wurden ausgewachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet (Bezugsquelle: Charles River Deutschland GmbH, Sanhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, sowie eigene Zucht). Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug 424 g.

3.5.2. Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte paarweise in Makrolonkäfigen Typ III auf Weichholzgranulat. Postoperativ wurden zusätzlich Zellstoffbahnen in die Käfige gelegt, um einen besseren Schutz der frischen Operationswunden zu gewähren. Zusätzlich wurden die Tiere in Zellstoff eingewickelt, um ein übermäßiges postoperatives Auskühlen zu verhindern.

Die Raumtemperatur lag bei 22±2°C, die Luftfeuchtigkeit bei 40-55%. Der Luftaustausch erfolgte etwa 12 x pro Stunde. Der Hell-/Dunkel-Rhythmus betrug jeweils 12 Stunden.

3.5.3. Fütterung

Während der gesamten Versuchszeit erfolgte die Fütterung der Tiere mit Altromin® Haltungsdiät 1324, sowie Leitungswasser ad libitum.

Bis zum dritten postoperativen Tag wurde das Trinkwasser (500ml) mit fünf Hüben Tramal® Tropfen, entsprechend 62,5 mg Tramal®, versetzt.

3.6. Operation

Für die vorliegende Studie wurde ein Kalottendefekt von 8 mm Durchmesser kritischer Größe (sog. CSD, critical size defect) gewählt. Darunter versteht man im Tiermodell einen Defekt, der ohne therapeutische Intervention nicht aus sich heraus selbstständig verheilt (Schmitz und Hollinger 1986).

3.6.1. Anästhesie

Alle Tiere wurden unmittelbar vor der Operation gewogen.

Die Sedierung der Tiere erfolgte mittels Inhalation von Isofluran für ca. 15-20 Sekunden in einer Inhalationsbox. Danach wurden die sedierten Tiere in Bauchlage auf dem mit steriler Abdeckfolie beklebten Narkose-Operationstisch (Eigenbau) gelagert und mit ihrer Schnauze in der Inhalationsmaske positioniert. Diese Maske bestand aus einer umgearbeiteten, mit Watte ausgelegten 20 ml Spritze (Braun, Melsungen), deren Rand durch einen angeklebten weichen Silikonkatheter gepolstert war. Die Tiere wurden mit Schlaufen an den Läufen fixiert. Eine weitere Fixierung erfolgte durch eine in der Inhalationsmaske angebrachte Schlaufe, die um die beiden OK-Frontzähne festgezogen wurde. Eine modifizierte Kindermess-Sonde des Pulsoximeters (Nellcor® Puritan Bennett 40, Nellcor, Pleasanton CA 94588, USA) wurde mit braunem Pflaster (Leukoplast®, Beiersdorf) an der Schwanzwurzel befestigt (siehe Abbildung 3.6.1.).

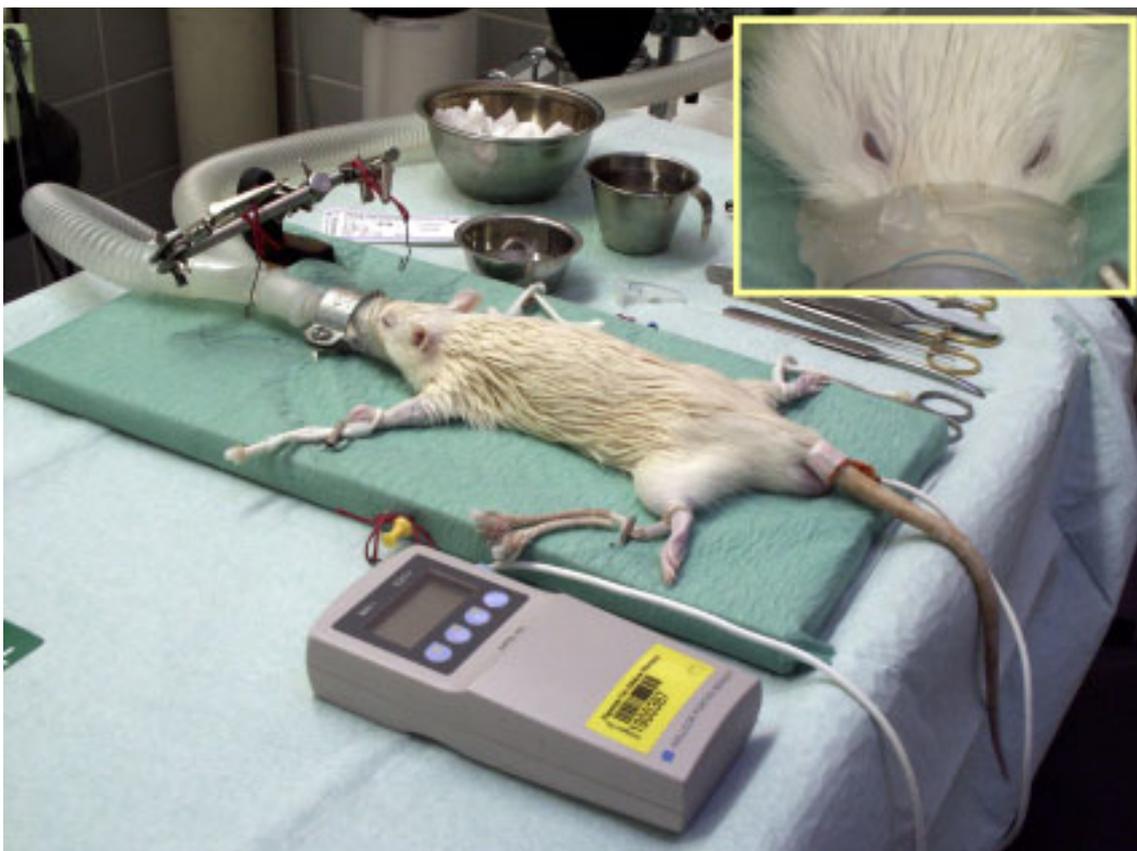


Abbildung 3.6.1.: Gelagertes Versuchstier auf Narkose-Operationstisch, Detailansicht: Narkosemaske

Unter Verwendung eines Durchflussverdampfers am Narkosegerät (Stephens-Narkosegerät, Eickmeier, Tuttlingen) wurde die Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (150-200 ml/min Flow, 50% Inhalationsgas) unter ständiger Kontrolle der Herzfrequenz und der O₂-Sättigung durch Pulsoximetrie durchgeführt. Bevor die Tiere vollständig aus der Narkose erwacht waren, wurde zur Vermeidung perioperativer Schmerzen eine Analgetikakombination aus 5 mg Tramal® und 10 mg Novalgin® in die Nackenpartie injiziert.

3.6.2. Kalottenoperation

Nach Lagerung und Anästhesie erfolgte zunächst die Rasur der Nackenpartie und des Hinterkopfes mit einem Kurzhaarschneider (Fa. Kuno Moser, Unterkirnach). Nach desinfizierender Abwaschung erfolgte die Schnittführung nuchal von Ohr zu Ohr. Haut und Subkutangewebe wurden stumpf abpräpariert und nach kranial mobilisiert. Die Hautlappen wurden mit jeweils zwei Häkchen nach kranial bzw. kaudal fixiert. Das Periost wurde auf einer Fläche von ca. 12x15mm zwischen den beiden Ursprüngen der Mm. temporales reseziert und entfernt, um eine Beeinflussung der Osteoinduktion durch periostale Regeneration zu vermeiden (Abbildung 3.6.2.). Die Blutstillung erfolgte durch 3%iges H₂O₂. Unter Wasserkühlung und mit geringer Drehzahl (< 6000 RPM) erfolgte die Trepanation der Kalotte in der Mitte der Sutura sagittalis mit dem 8mm Trepanbohrer (Howmedica Leibinger, Freiburg) (Abbildung 3.6.2.). Dabei wurde darauf geachtet, dass der Sinus sagittalis und die Dura mater nicht eröffnet wurden. Das Knochensegment wurde mit einem Heidemannspatel entfernt. Im Fall einer Blutung erfolgte die Blutstillung mit 3%igem H₂O₂. Nach sorgfältiger Spülung und Trocknung wurde das scheibenförmige sterile Implantat in den kreisförmigen Knochendefekt eingesetzt (Abbildung 3.6.3.).

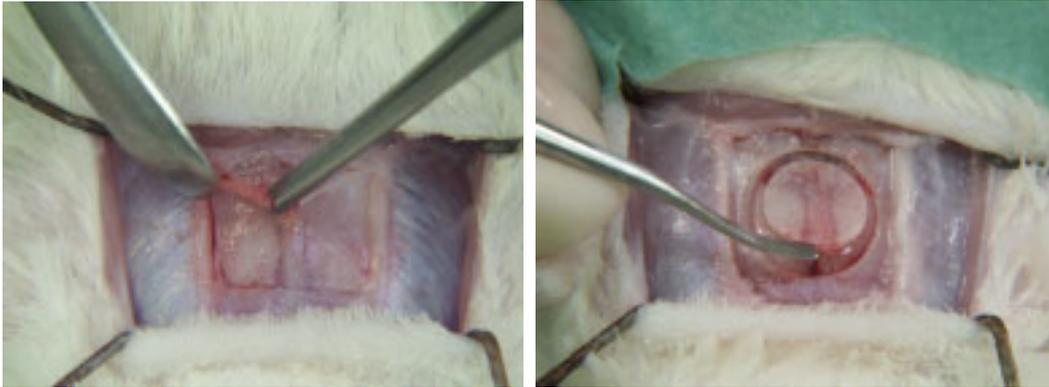


Abbildung 3.6.2.: Abpräparierte, nach kranial und kaudal fixierte Hautlappen, Entfernen des Periostes (links), Entnahme der Kalotte (rechts)

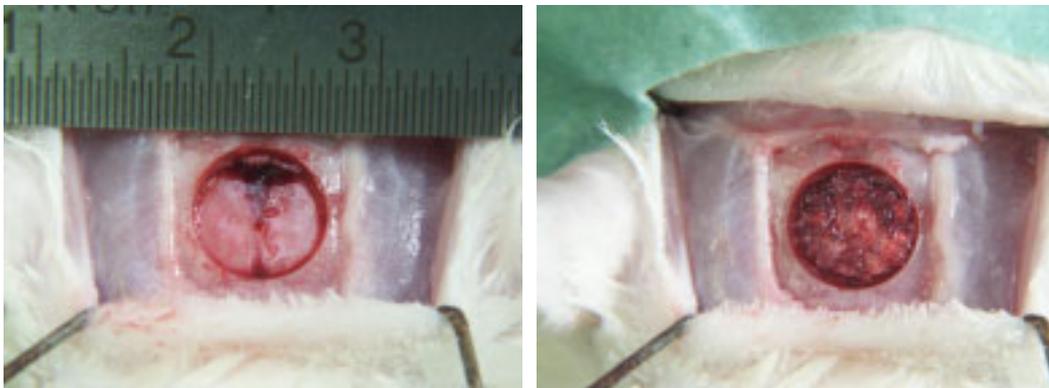


Abbildung 3.6.3.: Trepanationsdefekt (links), eingesetzter ICBM-Träger (rechts)

Nach Reposition des Hautlappens erfolgte der Wundverschluss mit fortlaufender Vicryl®-Naht (Vicryl 4/0 Ethicon, Norderstedt). Abschließend wurden ein Nobecutan® Sprühverband (Astra Chemicals, Wedel/Holstein) aufgebracht und die in Zellstoffbahnen eingewickelten Tiere in den Käfig zurückgelegt.

3.7. Vitalfärbung und Röntgenkontrolle

Um Knochenumbauvorgänge fluoreszenzmikroskopisch darstellen zu können, wurde eine intravitale polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt.

Nach Sedierung durch Ätherinhalation erfolgte am fünften postoperativen Tag die subkutane Injektion in den Nackenbereich von Xylenorange, danach jeweils eine

Röntgenkontrolle des Schädels im Faxitron (50kV/15s) und nachfolgend die subkutane Injektion von Calcein, Alizarin und Rolitetracyclin (siehe Tabelle 3.7.1.) Die Injektion der Farbstoffe erfolgte jeweils als 3%ige Lösung in 2% NaHCO₃ durch einen Sterilfilter (0,45 µm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel). Im Fluoreszenzmikroskop erscheint Xylenolorange orange, Calcein grün, Alizarin rot und Rolitetracyclin gelb.

Tabelle 3.7.1.: Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe, Farbgebung im Fluoreszenzmikroskop

Farbstoff	Applikation	Dosierung	Farbe
Xylenolorange	5. post-op. Tag	90 mg/kg KG	Orange
Calcein	11. post-op. Tag	15 mg/kg KG	Grün
Alizarin	17. post-op. Tag	30 mg/kg KG	Rot
Rolitetracyclin	23. post-op. Tag	20 mg/kg KG	Gelb

3.8. Opferung

Nach einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen erfolgte die Opferung der Versuchstiere durch CO₂-Asphyxie. Nach Abpräparation der Haut wurde die probentragende Schädeldecke mit der Trennscheibe (Aesculap, Tuttlingen) osteotomiert und in 10%iger Formalinlösung fixiert.

3.9. Computergestützte Auswertung der Radiographien

Unmittelbar nach der Explantation wurden von den unfixierten Proben Röntgenaufnahmen im Faxitron (20kV/30s) angefertigt. Nach Entwicklung der Röntgenfilme wurden diese mit einem Diascanner (Diascanner Nikon® Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf) bei 1350 dpi als 8 bit Graustufenbilder gescannt. Mit Hilfe eines

eigenen, in die Bildbearbeitungs und -analyse Software Scion® Image Beta 4.0.2 integrierten Makros, wurde die Fläche des gebildeten Knochens im Defektareal dargestellt und gemessen. Die erhaltenen Werte der verschiedenen Proteingruppen wurden mit der Statistik-Software StatView® 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, USA) ausgewertet und untereinander verglichen.

3.10. Trenn-Dünnschliff-Technik

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden die zunächst in 10%iger Formalinlösung fixierten Kalotten in einer aufsteigenden Glycolmethacrylat-Reihe (GMA) entwässert und anschließend mit einem Gemisch aus Glycolmethacrylat und dem lighthärtenden Einbettmedium Technovit® 7200 VLC bzw. reinem Technovit® 7200 VLC infiltriert (siehe Tabelle 3.10.1.). Ein Wechsel der Substanzen erfolgte alle 72 h, die Proben wurden dunkel gelagert.

Tabelle 3.10.1: Entwässerung und Kunststoffinfiltration

Stufe	Substanzen	Verhältnis
1	GMA + Aqua destillata	50 : 50
2	GMA + Aqua destillata	70 : 30
3	GMA + Aqua destillata	90 : 10
4	GMA	1
5	GMA + Technovit® 7200 VLC	50 : 50
6 - 10	Technovit® 7200 VLC	1

Nach Abschluss der Infiltration wurden die Proben, planparallel zum Boden der Einbettmulden, mit einem Tropfen Technovit® 7230 VLC Fixationskleber in EXACT-Einbettmulden fixiert und die Mulden blasenfrei mit Technovit® 7200 VLC aufgefüllt. Danach erfolgte die Aushärtung im EXAKT-Lichtpolymerisationsgerät bei einer Wellenlänge von 400 bis 500 nm über 10 h.

Anschließend wurden die Proben nach der von Donath und Breuner beschriebenen Methode (Donath und Breuner 1982) weiterverarbeitet. Es wurden Trenndünnschliffe von 100µm Dicke für die Mikroradiographie, von 30µm Dicke für die Fluoreszenzmikroskopie und von 3-5µm Dicke für die Histologie hergestellt.

3.11. Mikroradiographie

Von den 100µm dicken Dünnschliffen wurden im Faxitron Röntgenaufnahmen (17kV/22s) angefertigt. Nach Entwicklung der Röntgenfilme (Entwicklungsautomat Agfa® Curix 242 S, Agfa, München) wurden diese zerschnitten, als Diapositive gerahmt und gescannt. Die so hergestellten Mikroradiographien sollten einen direkten Vergleich zwischen der radiologisch erkennbaren und histologisch darstellbaren Knochenbildung ermöglichen.

3.12. Histologie

3.12.1. Fluoreszenzmikroskopie

Um eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung im UV-Auflicht zu ermöglichen wurden die Präparate auf eine Dicke von $30\pm 5\mu\text{m}$ heruntergeschliffen und poliert. Die Auswertung erfolgte in einem Leitz Orthoplan-Mikroskop (Typ DM RBD) unter Verwendung eines Fluoreszenzfilters (Leitz Typ I3) - bestehend aus Erregerfilter (BP390-49), Strahlenteiler (RKP 510) und Sperrfilter (LP 515) - sowie eines Quecksilber-Höchstdruckbrenners (Typ HB50). Entscheidend für eine gute Darstellung mit hohem Kontrast der fluoreszierenden Bereiche ist eine hohe numerische Apertur der verwendeten Objektive.

Zur Fotodokumentation wurde ein Kodakfilm Ektachrome® 100HC (ISO 100/21°) verwendet. Nach der Entwicklung wurden die gerahmten Diapositive mit einem Nikon® Diascanner (Diascanner Nikon® Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf) gescannt.

3.12.2. Färbungen

Um unterschiedliche Zell- bzw. Gewebestandteile lichtmikroskopisch voneinander unterscheiden zu können, wurden in dieser Studie eine van-Kossa-Giemsa sowie eine Masson-Trichrom-Goldner Färbung angewandt. Hierzu wurden die zu färbenden Präparate auf eine Dicke von $5\pm 2\mu\text{m}$ heruntergeschliffen und sorgfältig poliert.

3.12.2.1. van-Kossa-Giemsa Färbung

Die van-Kossa-Silberfärbung, eine Kalziumsalz-Nachweisfärbung bewirkt eine einheitliche Schwärzung aller mineralisierten insbesondere der kalziumphosphathaltigen Gewebeanteile. Zur Darstellung der zellulären und nicht mineralisierten Anteile wird mit Giemsa gegengefärbt. Die Farbgebung der gefärbten Strukturen findet sich in Tabelle 3.12.1.:

Tabelle 3.12.1: Farbliche Darstellung der Zell-/Gewebestrukturen nach sukzedaner van-Kossa-Giemsa Färbung

Zell-/Gewebestruktur	Färbung mit van-Kossa-Giemsa
Zytoplasma	schwach blau
Zellkerne	blau
Eosinophile Granula	rot
ICBM-Träger	hellbraun
Von Matrixproteinen besetzter ICBM-Träger	braun
Osteoid	braun
Knochen	dunkelbraun, schwarz

Herstellung der Färbelösungen:

A: 5%ige Silbernitratlösung:

Lösen von 5 g Silbernitrat in 100 ml Aqua destillata

B: 5%ige Natriumthiosulfatlösung:

Lösen von 5 g Natriumthiosulfat in 100 ml Aqua destillata

C: Giemsa-Färbelösung:

Mischen der gebrauchsfertigen Giemsa-Lösung im Verhältnis von 1:1 mit Aqua destillata

Verfahren/Färbevorschrift:

Nach Reinigung des Präparates mit 70%igem Ethanol Auftragen von einigen Tropfen 5%iger Silbernitratlösung

Belichtung unter der UV-Lampe (EXAKT Polymerisationspresse) für 5 min

Spülen mit Aqua destillata

Fixierung mit einigen Tropfen 5%iger Natriumthiosulfatlösung für 1 min

Sorgfältiges Spülen mit Aqua destillata für 5 min

Gegenfärbung mit Giemsa-Lösung für 20 min im Färbekasten

Spülen mit Aqua destillata

Kurzes Schwänken in 3%iger Essigsäure

Spülen mit Aqua destillata, Lufttrocknung

3.12.2.2. Masson-Trichrom-Goldner Färbung

Durch die Masson-Trichrom-Goldner Färbung lassen sich mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix in Knochenproben besonders deutlich farblich voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 3.12.2.).

Tabelle 3.12.2: Farbliche Darstellung der Zell-/Gewebestrukturen nach Masson-Trichrom-Goldner Färbung

Zell-/Gewebestruktur	Färbung mit Masson-Trichrom-Goldner
Zytoplasma, Osteoid	rot
Zellkerne	blau/schwarz
Knochen/Kollagen	grün
Erythrozyten	orange

Herstellung der Färbelösungen:

A: Weigerts Eisenhämatoxylin:

Mischung der gebrauchsfertigen Weigerts Lösung A (alkoholische Hämatoxylin-Lösung) und Weigerts Lösung B (salzsaure Eisen(III)nitrat-Lösung) unmittelbar vor der Färbung im Verhältnis 1:1

B: Goldner I (Masson-Lösung)

Lösen von 1 g Säurefuchsin und 1 ml 0,2%iger Essigsäure in 100 ml Aqua destillata (Lösung 1)

Lösen von 1 g Xylidin-Ponceau und 1 ml 0,2%iger Essigsäure in 100 ml Aqua destillata (Lösung 2)

Lösen von 0,5 g Azophloxin und 0,2 ml 0,2%iger Essigsäure in 100 ml Aqua destillata (Lösung 3)

Mischen von 33 ml Lösung 1 mit 66 ml Lösung 2 (=Lösung 4)

Mischen von 100 ml Lösung 4 mit 20 ml Lösung 3 und 880 ml 0,2%iger Essigsäure

C: Orange-G:

Lösen von 10 g Orange-G in 500 ml Aqua destillata

Lösen von 15 g Molybdatophosphorsäure in der oben beschriebenen Lösung
Filtrieren unmittelbar vor dem Färben

D: Lichtgrün

Lösen von 0,5 g Lichtgrün und 1 ml 0,2%iger Essigsäure in 500 ml Aqua destillata

Verfahren/Färbevorschrift:

Einlegen in Weigerts Eisenhämatoxylin für 20 min

Sorgfältiges Spülen mit Leitungswasser für 5 min

Einlegen in Goldner I (Masson-Lösung) für 7 min

Kurzes Schwänken in 2%iger Essigsäure

Einlegen in Orange-G für 5 min
Kurzes Schwänken in 2%iger Essigsäure
Einlegen in Lichtgrün für 15 min
Kurzes Schwänken in 2%iger Essigsäure
Spülen mit Aqua destillata, Lufttrocknung

3.12.3. Eindeckung

Alle gefärbten und getrockneten Schriffe wurden sofort mit Technovit® 7200 VLC eingedeckt. Das Deckglas wurde mit leichtem Druck aufgebracht und der Schliff 7 min unter der EXAKT Polymerisationspresse ausgehärtet.

3.12.4. Histologische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Foto-Mikroskop mit Polarisations-einrichtung (Leitz® DMR, Leica Camera AG, Solms).

Die zunächst nur mit van Kossa versilberten Dünnschliffe wurden fotodokumentiert bevor die Gegenfärbung mit Giemsa erfolgte.

Zur Fotodokumentation wurden ein Kodakfilm Ektachrome® 100HC (ISO 100/21°) verwendet und die Bilder mit dem Nikon® Diascanner (Diascanner Nikon® Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf) gescannt.

4. Ergebnisse

4.1. Anästhesieverträglichkeit und OP-Toleranz

Von allen operierten Tieren wurde die Kalottentrepanation gut toleriert. Durch die angewandte Inhalationsnarkose wachten die Tiere unmittelbar nach Operationsende wieder auf und zeigten kein abnormales Verhalten oder verstörte Aktivität. Auch die postoperative Nahrungsaufnahme war ungestört.

Lediglich bei einem Tier zeigte sich am ersten postoperativen Tag ein Versagen der Naht, so dass eine Sekundärnaht notwendig wurde. Dieses Tier wurde als einziges mit 0,4 ml Langzeitpenicillin i.m. antibiotisch abgeschirmt und zeigte im weiteren Verlauf eine gute Wundheilung.

4.2. Einheilung

Nach 28 Tagen wiesen alle Tiere eine vollständig verheilte, reizlose Wunde nuchal auf. Nach Abpräparation der Haut zeigte sich das Implantat bei allen Versuchstieren reizfrei eingeheilt (Abbildung 4.3.1.). Nach Explantation der probentragenden Schädeldecke ließ sich die vollständige Einheilung der Implantate von allen Seiten verifizieren (Abbildungen 4.3.2. und 4.3.3.).



Abbildung 4.3.1.: Reizfrei verheilte OP-Wunde (links), vollständig eingeeiltes Implantat (rechts)

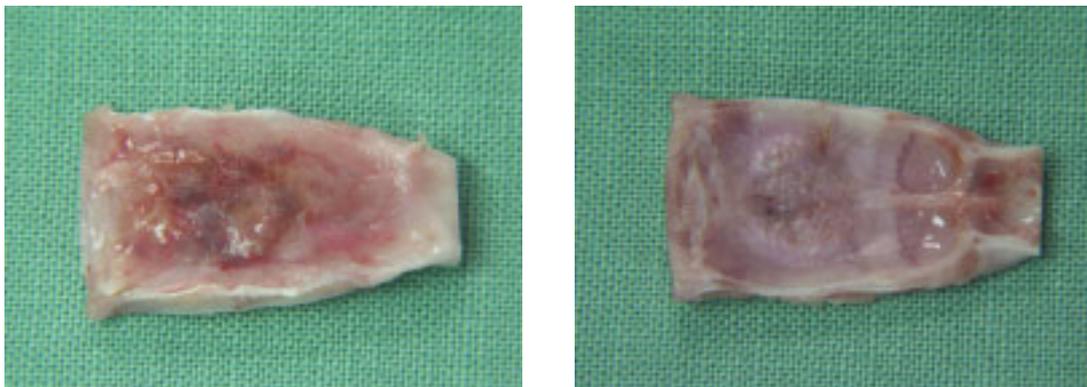


Abbildung 4.3.2.: Explantierte implantattragende Kalotte, Ansicht von oben (links) und unten (rechts)

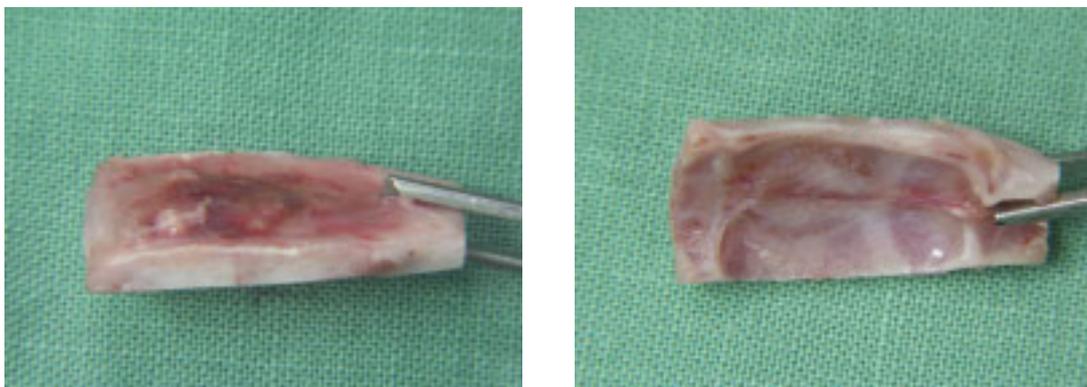


Abbildung 4.3.3.: Explantierte implantattragende Kalotte, Ansicht von der Seite (links) und schräg unten (rechts)

4.3. Radiologische Beurteilung

Nach Explantation der probentragenden Kalotten wurden diese geröntgt und auf ihre Knochenneubildung im Bereich des Trepanationsdefektes untersucht (Tabelle 4.3.1.).

In der Kontrollgruppe fand sich eine geringe Knochenneubildung am Defektrand. Ebenfalls spärliche, vom Defektrand ausgehende Knochenbildung, fand sich in den Trepanationsdefekten, in die BMP-6 oder BMP-2-6 haltige Träger implantiert wurden (Abbildung 4.3.1.).

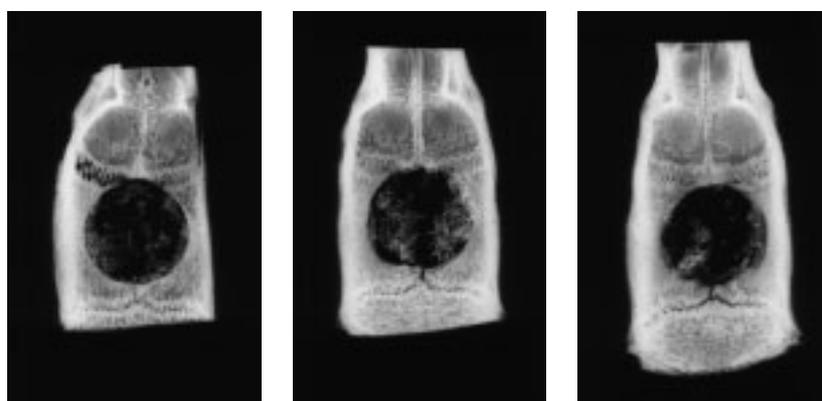


Abbildung 4.3.1.: Kalottendefekt nach Implantation von ICBM-Kontrolle, BMP-6 und BMP-2-6 (von links).

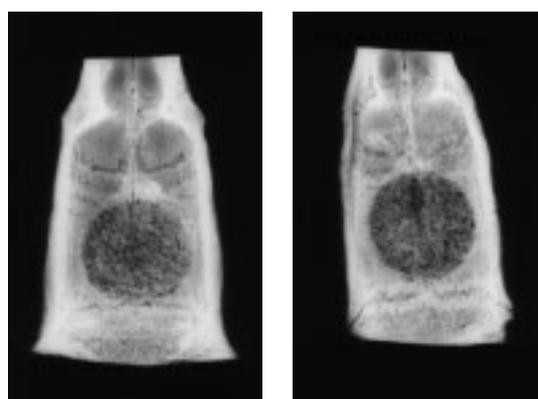


Abbildung 4.3.2.: Kalottendefekt nach Implantation von T3 (links) und T4

Eine sehr gute, gleichmäßige, den Defekt fast vollständig ausfüllende Knochenbildung, ließ sich radiologisch bei T3 und T4 erkennen (Abbildung 4.3.2.).

Ebenfalls eine sehr gute, den Defekt ausfüllende Knochenneubildung fand sich bei rhBMP-2 und CHO-BMP-2. Im Gegensatz zu T3 und T4 erschien der gebildete Knochen jedoch gröber und weniger homogen.

Auch mit K12E wurde eine beinahe vollständige Verknöcherung erreicht. Der Knochen erschien weniger homogen als bei T3 und T4, jedoch nicht so unregelmäßig wie bei BMP-2 und CHO-BMP-2 (Abbildung 4.3.3.)

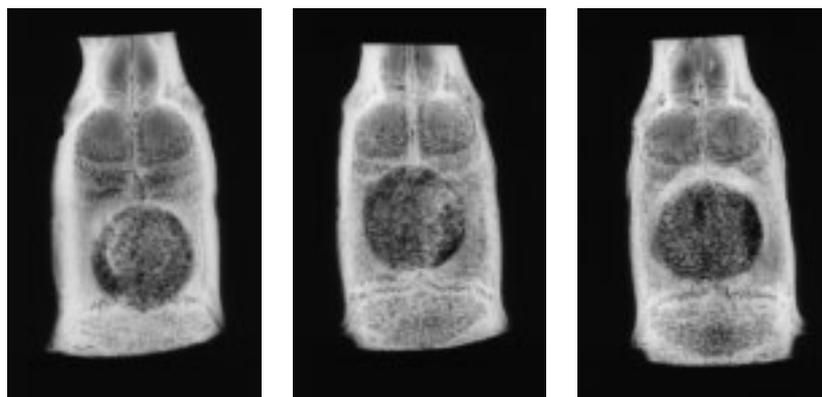


Abbildung 4.3.3.: Kalottendefekt nach Implantation von rhBMP-2, CHO-BMP-2 und K12E (von links)

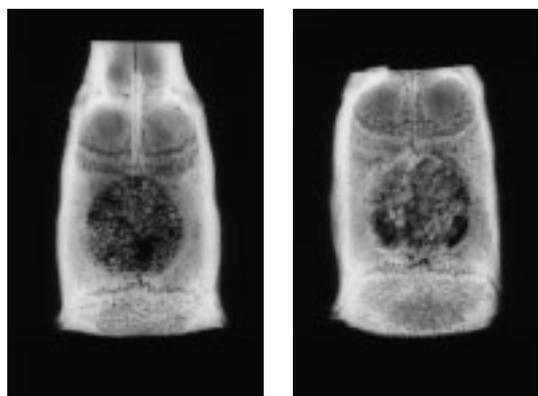


Abbildung 4.3.4.: Kalottendefekt nach Implantation von GDF-5CH (links) und GDF-5W

Geringere Knochenneubildung fand sich bei GDF-5. Hier erschien der Trepanationsdefekt nicht vollständig knöchern durchbaut. Die Struktur des gebildeten Knochens war nicht homogen, sondern eher grob und unregelmäßig (Abbildung 4.3.4.).

Tabelle 4.3.1: Radiologisch erkennbare Knochenbildung nach 28 Tagen

Protein	Knochenbildung	Struktur des gebildeten Knochens
Kontrolle	-	-
rhBMP-2	+ / +++	regelmäßig, mittel
CHOBMP-2	+ / +++	regelmäßig, mittel
rhBMP-2-6	-	unregelmäßig
rhBMP-6	-	unregelmäßig
GDF-5 Chimär	+	unregelmäßig, grob
GDF-5 Wildtyp	+	unregelmäßig, grob
K12E	+	regelmäßig, mittelfein
T3	++	homogen, fein
T4	++	homogen, fein

4.4. Computergestützte Auswertung der Radiographien

Mit Hilfe des Computers wurden die Flächen des neu gebildeten Knochens im Defektareal der Kalotte dargestellt und vermessen. Die geringsten Werte fanden sich in der Kontrollgruppe, gefolgt von BMP-2/6 und BMP-6. Die höchsten Werte fanden sich bei K12E ($44,272 \pm 4,577$), gefolgt von T4 ($43,864 \pm 2,881$) und T3 ($41,292 \pm 3,544$). Auffällig ist die große Streuung der Messwerte in den einzelnen Untersuchungsgruppen (siehe Abbildung 4.4.1.). Die beobachteten Unterschiede zwischen BMP-2, CHOBMP-2, T3, T4 und K12E sind jedoch nicht signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben mit $\alpha < 0.05$; berechnet mit StatView 5.0 für Windows, detaillierte Aufstellung der Signifikanzen im Anhang).

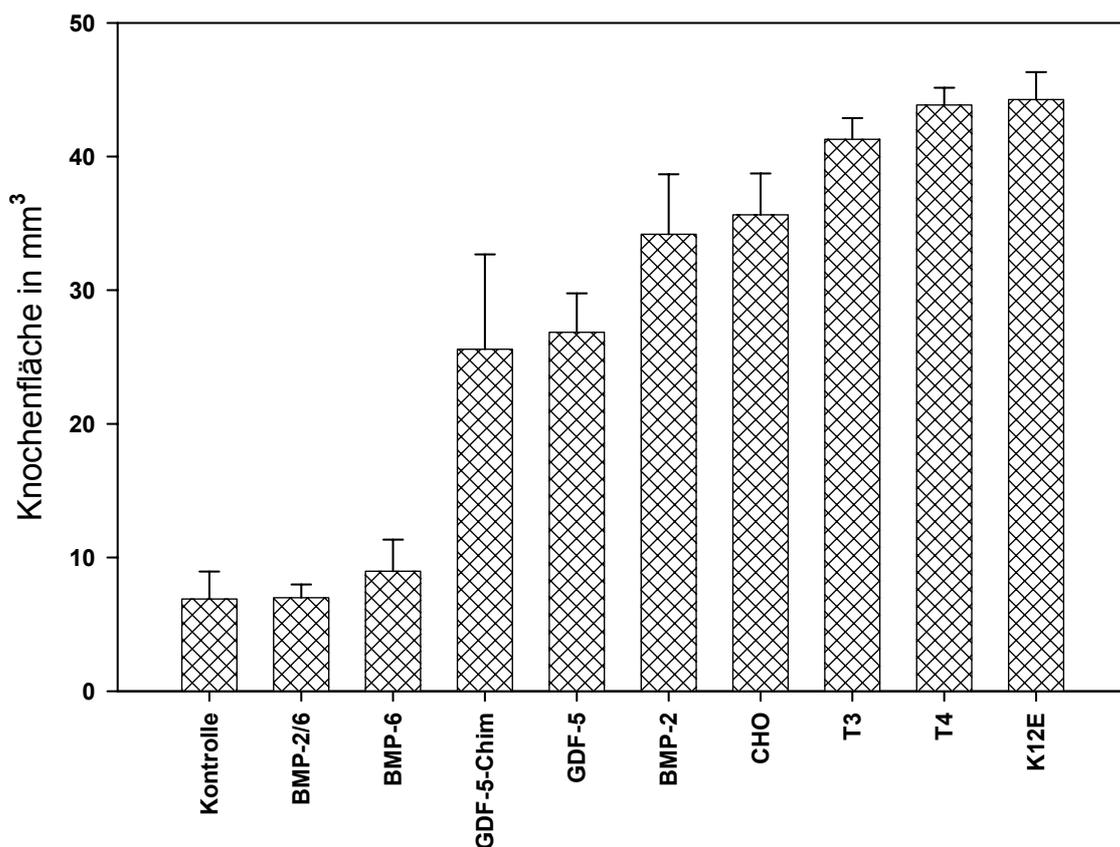


Abbildung 4.4.1.: Messwerte der Knochenflächen (n=7)

4.5. Histologische Ergebnisse

In der Kontrollgruppe zeigte sich histologisch Trägermaterial ohne Fremdkörperreaktion. Nur vereinzelt wurden Inseln geringer Knochenbildung im Randbereich gefunden, die auch in der Mikroradiographie dargestellt werden konnten (Abbildung 4.5.1.). Der ICBM-Träger wies hauptsächlich leere Poren, ohne Knochenformation zwischen den Kollagensträngen auf. Areale des Trägers, die an die neugebildeten Knochenbälkchen angrenzten, wurden von diesen in geringem Umfang tropfenförmig oder korallenstockartig mineralisiert (Abbildung 4.5.2.).

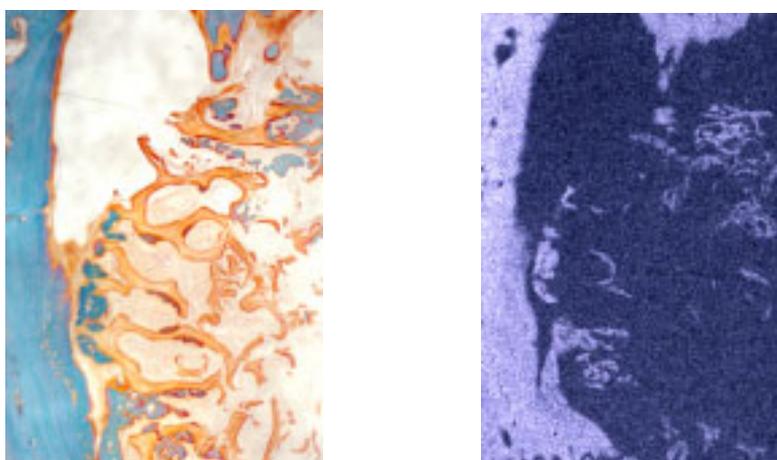


Abbildung 4.5.1.: Kalottendefekt nach Implantation von ICBM-Kontrolle. Geringe Knochenbildung am Defektrand. Masson-Goldner-Trichrom, Mikroradiographie

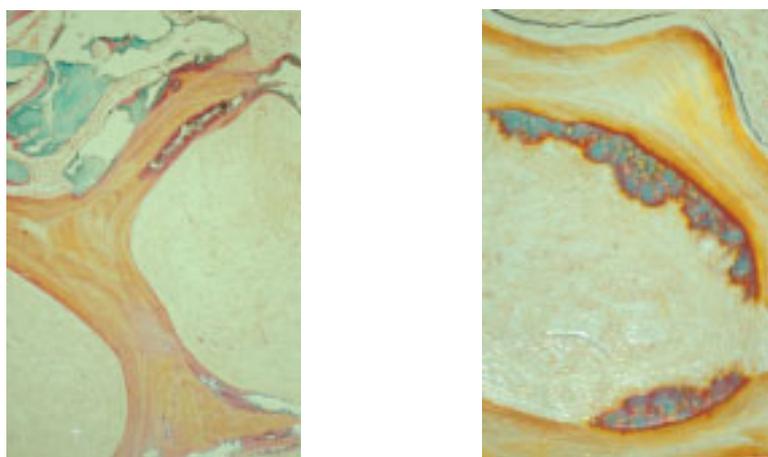


Abbildung 4.5.2.: Kalottendefekt nach Implantation von ICBM-Kontrolle. Geringe, tropfenförmige Mineralisation der ICBM-Matrix. Masson-Goldner-Trichrom

Auch die BMP-2-6- und BMP-6-haltigen Träger ließen histologisch eine gute Einheilung erkennen. Die Träger fanden sich reaktionslos in Bindegewebe eingeschlossen. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigte sich die spärliche Knochenbildung nicht hauptsächlich vom Defektrand ausgehend, sondern vor allem zentral. Im Vergleich zu BMP-6 fand sich bei BMP-2-6 ein deutlich größerer Bereich, in dem der Träger von geflechtartigem Knochen eingeschlossen wurde (Abbildung 4.5.3.).

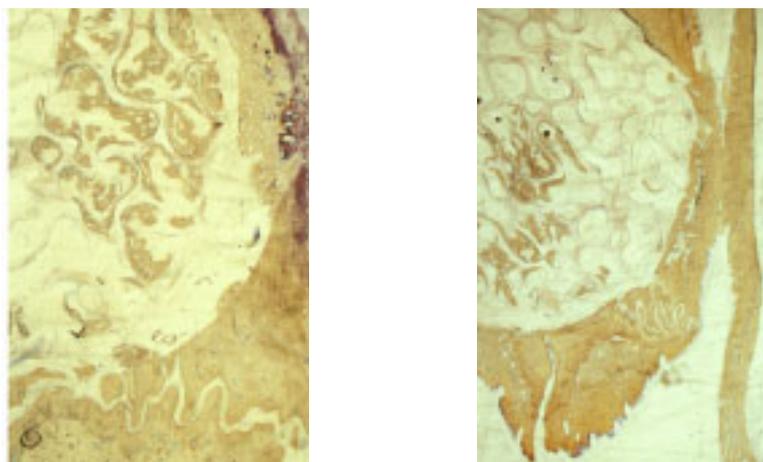


Abbildung 4.5.3.: Kalottendefekt nach Implantation von ICBM mit BMP2-6 und BMP6 (von links). Spärliche Bildung von Geflechtknochen am Defektrand und zentral. Van Kossa-Giemsa

Vollständig knöchern überbrückte Defekte fanden sich in den Kalotten, in die rhBMP-2-, CHO BMP-2-, K12E-, T3- oder T4-haltige ICBM-Träger implantiert wurden. Die histologischen Bilder zeigten große Ähnlichkeit. In den meisten Abschnitten war das Trägermaterial noch deutlich erkennbar, jedoch vollständig von geflechtartigem Knochen eingeschlossen. Teilweise fanden sich breite, in einem dichten Geflecht miteinander verbundene Knochenbälkchen. Vor allem bei T4 zeigte sich eine beginnende Integration und Mineralisation des Trägers (Abbildung 4.5.4. und 4.5.5.).

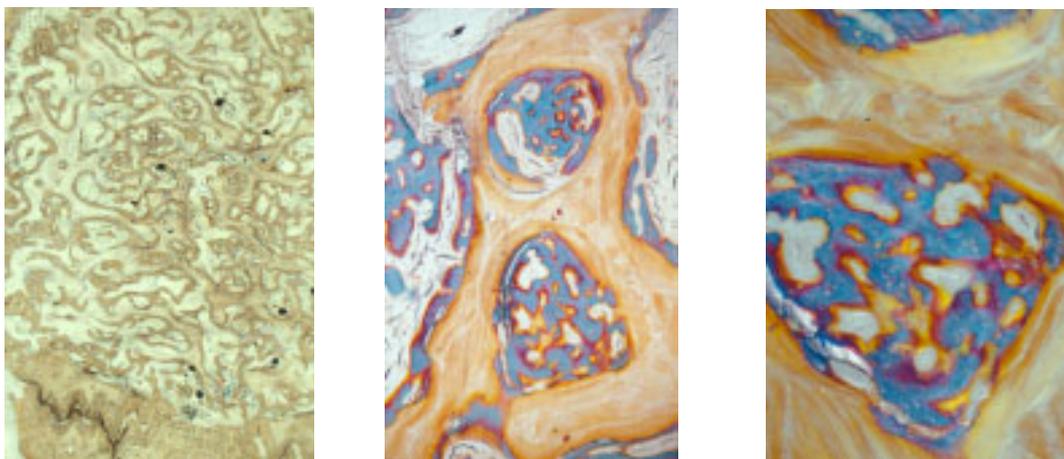


Abbildung 4.5.4.: Kalottendefekt nach Implantation von CHO-BMP-2 (links) und BMP-2 (Mitte, rechts). Bildung von teilweise dichtem Geflechtknochen, ICBM-Träger noch deutlich erkennbar. Rechts Ausschnittvergrößerung aus Mitte. Van Kossa-Giemsa, Masson-Goldner-Trichrom

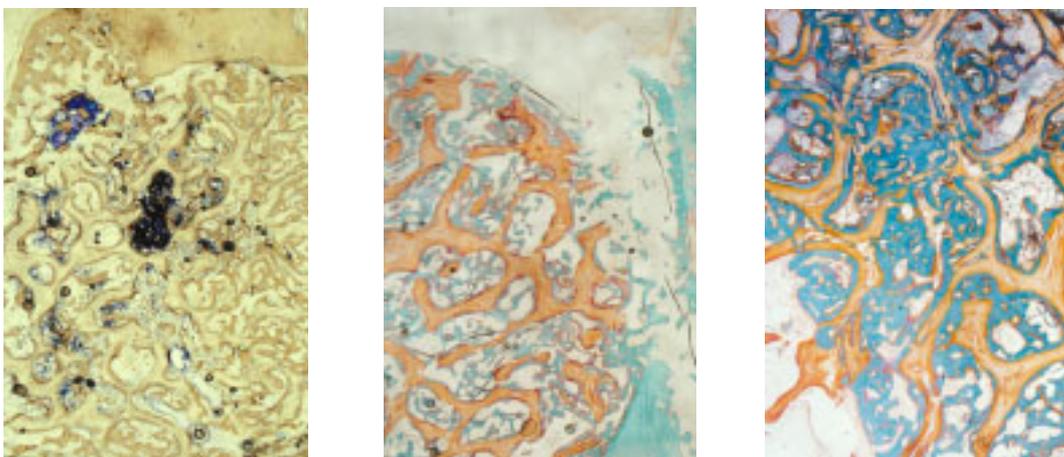


Abbildung 4.5.5.: Kalottendefekt nach Implantation von K12E, T3 und T4 (von links). Bildung von teilweise dichtem Geflechtknochen, ICBM-Träger noch deutlich erkennbar. Beginnende Integration und Mineralisation des ICBM-Trägers bei T4 (rechts). Van Kossa-Giemsa, Masson-Goldner-Trichrom

Auch nach der Implantation von GDF-5 konnte histologisch Geflechtknochen nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich jedoch eine spärlichere Knochenbildung. An verschiedenen Stellen waren die Träger zwar von geflechtartigem Knochen eingeschlossen, eine Überbrückung der Defekts wurde aber nicht erreicht (Abbildung 4.5.6.).

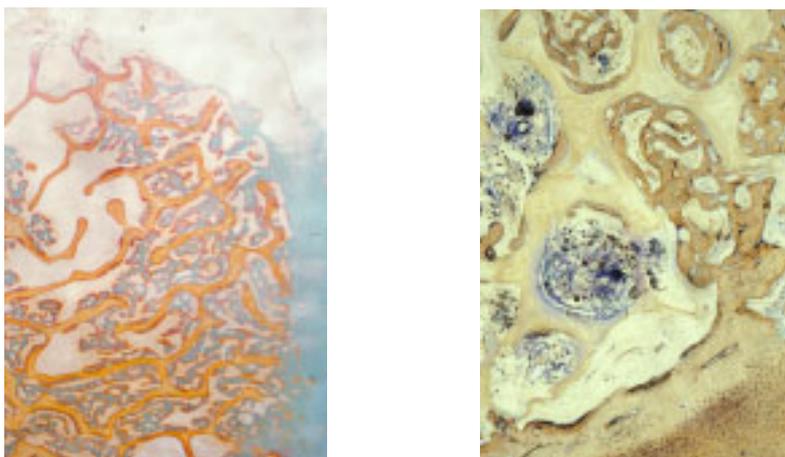


Abbildung 4.5.6.: Kalottendefekt nach Implantation von ICBM mit GDF-5CH und GDF-5W (von links). Bildung von Geflechtknochen, ICBM-Träger noch deutlich erkennbar. Masson-Goldner-Trichrom, Van Kossa-Giemsa

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnte die fortschreitende Mineralisation der neugebildeten Knochenmatrix und auch der ICBM-Träger sichtbar gemacht werden.

Die bereits nach fünf Tagen applizierten Fluorochrome (orange) traten dabei kaum in Erscheinung. Deutlich erkennbar waren hingegen grüne (Injektion am 11. post-op. Tag), rote (Injektion am 17. post-op. Tag) und gelbe (Injektion am 23. post-op. Tag) Banden, die den Fortschritt der Mineralisationsfront zum jeweiligen Zeitpunkt anzeigten (Abbildung 4.5.7.).

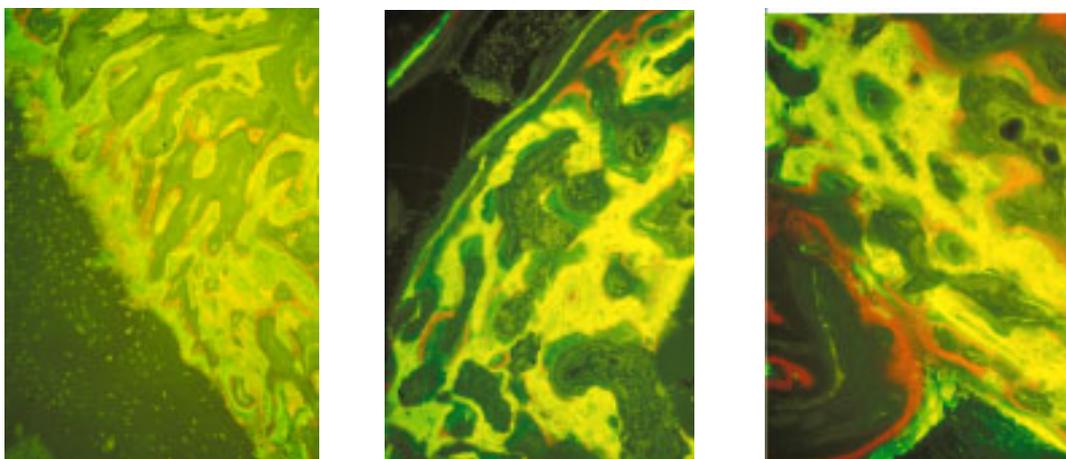


Abbildung 4.5.7.: Kalottendefekt nach Implantation von ICBM mit CHO BMP-2, T3 und T4 (von links). Schichtweise Knochenapposition. Auflichtfluoreszenz

ähneln sich Schädeldach und Gesichtsknochen, da sie durch desmale Ossifikation direkt aus Bindegewebe entstehen, anatomisch gleicht die Kalotte der Mandibula, da sie aus zwei Kortikalisplatten mit dazwischenliegendem spongiösen Knochen besteht. Sogar physiologisch soll die Kortikalis des Schädeldaches an einen atrophierten Unterkieferknochen erinnern (Bays 1983).

Neben Ratten (Turnbull und Freemann 1974, Tagaki und Urist 1982) wurden auch Kaninchen (Kramer et al. 1968) und Hunde (Prolo et al. 1982) für Kalottentrepanationsdefekte eingesetzt. Ratten und Kaninchen bieten den Vorteil, dass sie unkompliziert zu halten sind, eine wenig aufwendige Narkose erfordern und die Durchführung großer Versuchsserien erlauben.

Die klinische Übertragbarkeit der im Ratten- und Kaninchenversuch gewonnenen Ergebnisse wird dadurch gemindert, dass bei beiden Spezies hinsichtlich der Knochenbildung ein Zeitraffereffekt auftritt, andererseits können dadurch Untersuchungen innerhalb eines kürzeren Zeitraumes durchgeführt werden.

Je größer der Zeitraffereffekt, desto größer ist der Unterschied zum menschlichen Stoffwechsel. So ist der metabolische Aktivitätsindex (MAI) des Hundes mit 1,58 dem des Menschen mit 1,0 deutlich näher als der von Ratten mit 5,15 (Sato und Urist 1985, Coulson 1983). Trotzdem sind Ratten die mit am meisten verwendeten Versuchstiere für die Untersuchung von Knochenersatzmaterialien.

Schmitz und Hollinger (Schmitz und Hollinger 1986) empfehlen eine schrittweise Anwendung des CSD zur Untersuchung von potentiellen kieferchirurgischem Knochenregenerationsmaterialien. Die erste Stufe bildet hierbei der 8 mm durchmessende Kalottentrepanationsdefekt bei adulten Ratten, als zweite Stufe wird der 15 mm durchmessende Kalottentrepanationsdefekt beim Kaninchen und erst als letzte Stufe der Unterkieferkontinuitätsdefekt bei Hunden oder Affen empfohlen.

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde der Kalottentrepanationsdefekt bei adulten Ratten als geeignetes Verfahren angesehen, um so mit angemessenem Aufwand die Effektivität der neuen Substanzen zu evaluieren. Zusätzlich bieten Ratten den Vorteil, dass sie gut zu handhaben und in großer Anzahl einsetzbar sind und die Ergebnisse ohne größere Schwierigkeiten evaluiert werden können. Außerdem werden

für den 8 mm durchmessenden Kalottentrepanationsdefekt nur geringe Mengen an Testsubstanz benötigt und der Träger kann sicher in das operativ gut zugängliche Implantatlager eingebettet werden.

5.2. Narkoseverfahren

Eine adäquate Vorgehensweise während eines Tierexperimentes erfordert Methoden, die sicherstellen, dass Schmerzen und Belastung der Versuchstiere minimiert werden und schließen den gebührenden Umgang mit Anästhetika, Analgetika und Tranquilizern mit ein (Wixson et al. 1987b).

Die Durchführung einer Narkose kann durch Inhalationsnarkotika und Injektionsnarkotika erfolgen. Beide Verfahren finden in der Tiermedizin und bei der Durchführung von Tierexperimenten Anwendung. Wichtig bei letzteren ist es, die Wirkungsweisen der eingesetzten Pharmaka genau zu kennen, um einerseits den Versuchstieren Leiden zu ersparen und andererseits eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse zu vermeiden.

5.2.1. Injektionsnarkose

Obwohl sich bereits frühere Untersucher mit der Inhalationsnarkose bei zu Versuchszwecken verwendeten kleinen (Nage-) Tieren beschäftigten (Mauderly 1975, Levy et al. 1980, Alexander und Clark 1980) konnte sie sich nicht gegen die breit angewendete Injektionsnarkose durchsetzen. Auch in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Würzburg wurde bis dato bei Mäusen und Ratten der Injektionsnarkose mit Ketavet® (Ketamin-Hydrochlorid) und Rompun® (Xylazin-Hydrochlorid) der Vorzug gegeben.

Ketamin ist ein injizierbares Kurzzeitnarkotikum mit großer therapeutischer Breite, dass einen kataleptoiden Zustand mit Bewusstlosigkeit und Analgesie hervorruft, selbst jedoch keine muskelrelaxierende Wirkung besitzt. Nachteilig ruft es eine starke

Salivation, teilweise auch Urination und Defäkation der Versuchstiere hervor (Green et al. 1981, Wright 1982).

Xylazin ist ein potentes Hypnotikum mit starker zentral muskelrelaxierender Wirkung. Sein größter Nachteil ist seine arrhythmogene Wirkung (Green et al. 1981).

Vorteil der Injektionsnarkose ist die leichte Handhabung ohne zusätzliche Gerätschaften, sowie die Möglichkeit, die Versuchstiere in jeder erforderlichen Position zu lagern. Nachteil ist einerseits die Gefahr einer fehlerhaften Injektion, die u. U. zu einer hohen Mortalitätsrate bzw. zu einem Narkoseversagen führen kann. Andererseits kann durch die notwendige Umverteilung des Narkotikums im Körper ein verzögerter Narkoseeintritt oder eine zu geringe Narkosetiefe verursacht werden. Oftmals erlauben die angewendeten Substanzen bei unzureichender Narkose keine Nachinjektionen, da sonst die Toxizität zu stark erhöht werden würde.

In einer breit angelegten Untersuchungsreihe Ende der Achtziger Jahre beschäftigten sich Wixson und Mitarbeiter mit der Anwendung von verschiedenen Injektionsnarkotika bei erwachsenen männlichen Ratten (Wixson et al. 1987a-d). Neben den unterschiedlichen Effekten von Pentobarbital, Fentanyl-Droperidol (Innovar-Vet®), Ketamin-Xylazin und Ketamin-Diazepam auf Schmerzreize, Puls, Blutdruck und Blutgase untersuchten sie den Einfluss auf die Regulation der Körpertemperatur und die Narkosewirkung.

Ihre Ergebnisse zeigten, dass Ketamin-Xylazin die beste Anästhesietiefe und im Gegensatz zu Ketamin-Diazepam keine Hyperakusis und Muskelrigidität hervorrief (Wixson et al. 1987a).

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Atem- und Kreislaufdepression fanden sich bei der Anwendung von Ketamin-Diazepam, lediglich Pentobarbital zeigte einen geringeren bradykarden Einfluss auf die Herzfrequenz. Obwohl Ketamin-Xylazin geringe vorübergehende Atemdepression und in höheren Dosen langandauernde Hypotension und Bradykardie hervorrief, schnitt es besser ab als Pentobarbital und Fentanyl-Droperidol (Wixson et al. 1987c).

Beide Ketamin-Kombinationen schalteten den Schmerz zwar besser aus als Pentobarbital, aber schlechter als Fentanyl-Droperidol (Innovar-Vet®) (Wixson et al. 1987c).

Da Pentobarbital und die Ketamin-Kombinationen einen starken dosisabhängigen Temperaturabfall hervorrufen, sollten sie nicht bei längerandauernden Narkosen ohne externe Wärmezufuhr angewendet werden (Wixson et al. 1987d).

Gardner und Mitarbeiter (Gardner et al. 1995) verglichen verschiedene Injektionsnarkotika und das Inhalationsnarkotikum Methoxyflurane hinsichtlich ihrer Wirkung auf Temperatur und Aktivität bei Mäusen, zusätzlich untersuchten sie die Zeit bis zum Wirkungseintritt und die Dauer einer adäquaten Narkosetiefe. Neben einem direkten Zusammenhang zwischen Immobilität und Temperaturabfall, stellten sie teilweise erhebliche Schwankungen bezüglich der Zeit bis zum Narkoseeintritt und der Narkosedauer fest. Die besten und konstantesten Resultate lieferte Methoxyfluran, obwohl die Wirkung nicht bei allen Mäusen gleich war. Gute Resultate fanden sich auch bei einer Kombination aus Telazol™ (Tiletamin+Zolazepam) (45 mg/kg) und Xylazin (7,5 mg/kg), obwohl 4 von 19 Mäusen keine adäquate Narkosetiefe erreichten. Die umgekehrte Dosierung von Telazol™ (7,5 mg/kg) und Xylazin (45 mg/kg) führte zu einer erheblich verlängerten Narkosezeit mit Atemdepression und teilweise komatösen Zustand, der bei einem Tier sogar 14 h andauerte. Die lange Immobilisationszeit ging mit einem deutlichen Temperaturabfall einher.

5.2.2. Inhalationsnarkose

Im Gegensatz zu injizierbaren Narkotika bietet die Inhalationsnarkose durch schnelleren Narkoseeintritt bzw. -elimination eine gut Narkosesteuerbarkeit und eine kontinuierliche Kontrollmöglichkeit der Narkosetiefe. Zusätzlicher Vorteil ist die nicht durch die Narkose eingeschränkte Dauer des operativen Eingriffes (Levy et al. 1980). Mauderly findet sogar eine durch die Anwendung von Inhalationsnarkotika signifikant gesenkte Mortalitätsrate (Mauderly 1975).

Ein geeignetes Inhalationsnarkotikum ist Isofluran, ein geometrisches Isomer zum Enfluran. Es besitzt eine gering muskelrelaxierende, stark analgetische, in höherer Dosierung atemdepressive Wirkung. Zusätzlich wirkt es negativ inotrop und hypotensiv. Isofluran zeichnet sich durch seine geringe Blutlöslichkeit und damit verbundene rasche Anflutung bzw. Elimination aus. Weniger als 0,2% des eingeatmeten Isoflurans werden als harnpflichtige Metaboliten wiedergefunden, was einer Reduktion der Metabolisierungsrate auf ein Zehntel gegenüber Enfluran und auf ein Hundertstel gegenüber Halothan entspricht (Forth et al. 1992).

Raper und Mitarbeiter (Raper et al. 1987) untersuchten die Wirkung von Isofluran im Vergleich zu Pentobarbital und Diethylether auf Blutgasparameter, Hepatozyten-Ultrastruktur und Stoffwechselenzymaktivität bei Sprague Dawley Ratten. Sie stellten fest, dass Isofluran die geringste hypoxische Wirkung und im Gegensatz zu Pentobarbital und Diethylether keine negative Wirkung auf die Lebermikrosomen und Leberzellultrastruktur aufwies. Sie kommen zu dem Schluss, dass Isofluran ein empfehlenswertes Inhalationsnarkotikum für Tierversuche ist und sich besonders für Experimente eignet, die Leberstruktur und -funktion untersuchen.

Ein Nachteil der Inhalationsnarkose ist eine mögliche Belastung der Operateure durch entweichende Narkosegase. In einer von Smith und Bolon (Smith und Bolon 2002) durchgeführten Untersuchung wurden minimale Isofluranemissionen auch bei Verwendung von gutgewarteten Verdampfern und konventionellen (Kalk-) Absorbern festgestellt, wobei als Schwachstelle die Narkosemaske ermittelt wurde. Sie empfahlen zur vollständigen Vermeidung von Gasemissionen das Durchführen einer Low-flow Anästhesie, sowie eine optimierte Konfiguration des Narkosegerätes und der Arbeitsumgebung.

Auch Li und Mitarbeiter beschäftigten sich mit der Konstruktion eines einfachen Gerätes zur Durchführung einer emissionsfreien Kleintiernarkose (Li et al. 2001). Sie installierten zur Elimination unerwünschter Gasentweichung eine Pumpe an den ableitenden Schlauch und konnten hiermit gute Ergebnisse erzielen.

In der vorliegenden Studie wurde eine Inhalationsnarkose mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch in einem halboffenen Überschußsystem durchgeführt. Zur Kontrolle der Sauerstoffsättigung und der Pulsfrequenz diente ein Pulsoximeter mit einer Kindermess-Sonde, die an der Schwanzwurzel befestigt wurde. Bei keinem der Versuchstiere zeigte sich ein Narkoseversagen oder eine auf die Narkose zurückzuführende Mortalität.

Um eine möglichst geringe Belastung durch entweichendes Narkosegas zu erhalten, verwendeten wir eine selbst konstruierte Atemmaske, deren Rand mit einem weichen Silikonkatheter abgepolstert war. Dadurch wurde eine gute und bequeme Passform, aber auch ein dichter Sitz der Maske erzielt.

Einen weiteren Vorteil boten sowohl die Gestaltung der Atemmaske als auch die Fixierung des Versuchstieres mit einer um die Frontzähne geschlungenen Ligatur. Hierdurch wurde eine optimale Lagerung der Ratte für die Schädelreparation ermöglicht.

Vender und Mitarbeiter (Vender et al. 1995) fanden in ihrer vergleichenden Untersuchung zur Übereinstimmung von Pulsoximetrie und arterieller Blutgasmessung im Rattenexperiment eine sehr gute Korrelation zwischen den gemessenen Werten. Als besonderen Vorteil der Pulsoximetrie werteten sie die Noninvasivität und die Möglichkeit, kontinuierliche Messwerte zu erhalten, die dem Operateur rechtzeitig den Trend der Sauerstoffsättigung anzeigen, bevor ein hypoxischer Insult auftritt.

Auch in der vorliegenden Studie erwies sich die angewendete Pulsoximetrie als geeignetes Überwachungssystem, sowohl für die Vitalkontrolle als auch zur Kontrolle der Narkosetiefe. Eine Beschleunigung der Herzfrequenz beim Hautschnitt bzw. während der Operation wurde als zu geringe Narkosetiefe, ein Abfall der Sauerstoffsättigung bzw. der Herzfrequenz als zu tiefe Narkose interpretiert und entsprechend die Zufuhr des Narkosegases reguliert.

Die in der vorliegenden Untersuchung angewendete Inhalationsnarkose mit Isofluran erwies sich als ein gut steuerbares Narkoseverfahren, das apparativ aufwendiger ist als herkömmliche Injektionsnarkosen. Isofluran ist ein nebenwirkungsarmes, rasch anflutendes bzw. eliminierbares Narkosegas, mit dem ausreichende Narkosetiefen

erreicht werden können. Durch eine selbst konstruierte Atemmaske wurde eine gute Passform, eine Minimierung entweichender Gase sowie eine gute Lagerung der Versuchstiere erreicht. Die eingesetzte Pulsoximetrie bietet eine effektive, wenig aufwendige Möglichkeit, die Narkose adäquat zu überwachen.

5.3. Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit von BMPs

5.3.1. Implantatlager

Die durch BMPs induzierte Knochenbildung ist die Folge kaskadenförmig ablaufender zellulärer Prozesse. BMPs rekrutieren durch Chemotaxis ortsnahe, mesenchymale Stammzellen und stimulieren diese zur Proliferation. Nach fünf bis sieben Tagen differenzieren diese sich in Chondrozyten und die Bildung von Knorpel ist zu beobachten. Nach Einsprossung von Kapillaren zeigt sich eine reaktive Hypertrophie der Chondrozyten und eine Kalzifikation des Chondroids. Nach ca. neun bis zwölf Tagen finden sich Osteoblasten und es bildet sich Geflechtknochen. Umbauvorgänge führen nach ca. 14-21 Tagen zur Ausbildung von sphärischen Ossikeln mit zentral blutbildenden Knochenmarksanteilen. Die Bildung von Knochen kann auch ohne Knorpelbildung ablaufen, dabei differenzieren sich die mesenchymalen Stammzellen direkt in Osteoblasten (Reddi und Cunningham 1990, Cunningham et al. 1992, Sampath 1992, Reddi 1994, Lind et al. 1996, Rueger 2002, Kübler 1997, Kübler et al. 1999, Kübler und Würzler 2002).

Das Ausmaß der BMP-induzierten Knochenbildung wird maßgeblich durch die perivaskulär lokalisierten mesenchymalen Zielzellen der BMPs im Implantatlager beeinflusst, deren Anzahl von der Spezies, dem Lebensalter und insbesondere von der Vaskularisation abhängig ist. Während diese Parameter bereits vorgegeben sind, kann der Umfang der Knochenbildung jedoch noch durch die Wahl des geeigneten Trägermaterials sowie durch die Bindung der BMPs an die extrazelluläre Matrix entscheidend beeinflusst werden (Kübler et al. 2000).

Würzler und Mitarbeiter untersuchten die Rolle des Periostes auf die Wirkung osteoinduktiver Implantate (Würzler et al. 2000). Sie stellten fest, dass die Kortikalis bei der Knochenneubildung bei der orthotopen Implantation von osteoinduktivem Material nur eine untergeordnete Rolle spielt. Vielmehr ausschlaggebend ist das umgebende gut vaskularisierte Weichgewebe. Aufgrund der guten Gefäßversorgung und des hohen Gehaltes an Vorläuferzellen besitzt das Periost eine hohe regeneratorsche Potenz und ist durch induktive Matrixproteine stark stimulierbar.

5.3.2. Trägermaterial

Ein geeignetes Trägermaterial muss biologisch gut verträglich sowie resorbierbar sein. Es darf keine wesentlichen Änderungen des lokalen Milieus hervorrufen und soll die osteoinduktiven Proteine kontrolliert freisetzen. Kollagen ist ein ideales Trägermaterial, wobei Untersuchungen von Kübler und Mitarbeitern zeigten, dass durch die Kombination von BMP-2 und ICBM die ausgeprägteste Knochenbildung erzielt werden konnte. Hierfür verantwortlich scheinen die in der ICBM zusätzlich enthaltenen Wachstumsfaktoren zu sein (Kübler et al. 2000).

Neuere Untersuchungen messen der geometrischen Struktur der Trägermaterialien eine bedeutsame Rolle zu. Mahmood und Mitarbeiter stellten fest, dass die Kombination von BMP mit mineralischen Trägermaterialien, deren Geometrie eine Gefäßinvasion zulässt, eine direkte Knochenbildung hervorruft, während bei Trägermaterialien deren Geometrie keine Gefäßinvasion zulässt zuerst eine Knorpelbildung beobachtet wird (Mahmood et al. 2001).

5.3.3. Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einem Netzwerk von Faserproteinen wie z.B. Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin und aus Heteropolysacchariden, die als

Glycosaminoglycane bezeichnet werden. Neben Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat gehören auch Heparin bzw. Heparansulfat zu den Glycosaminoglycanen. Glycosaminoglycane sind lineare Polymere, die sich aus wiederkehrenden Disaccharideinheiten zusammensetzen. Diese bestehen aus alternierenden Uronsäure- und Aminosuckerresten mit Sulfatestern an mehreren Positionen. Durch die ionisierten Carboxylat- und Sulfatgruppen erhalten die Polymere ihre charakteristische negative Ladung, wobei Heparin die höchste negative Ladungsdichte aller bekannten biologischen Makromoleküle aufweist (Nelson und Cox 20001). Heparansulfat ähnelt in der Struktur Heparin, weist aber eine geringere Anzahl N-sulfatierter Glucosamine und Sulfatreste auf (Yanagishita 1993).

Proteoglycane wie z.B. Aggrecan (Knorpelgewebe), Decorin (Bindegewebe), Perlecan (Glomerulusbasalmembran) sind Glycosaminoglycan-haltige Makromoleküle der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix. Die Grundeinheit besteht aus einem sog. Core-Protein mit kovalent gebundenen Glycosaminoglycanen. Viele Proteoglycane werden in die extrazelluläre Matrix sezerniert, einige sind integrale Membranproteine.

Bei praktisch allen Säugetieren finden sich Heparansulfat-Proteoglycane als Bestandteil der Plasmazellmembran. Sie sind entweder durch eine transmembrane Domäne des Core-Proteins in der Membran verankert (Syndecan-Familie) oder an einen sog. Glycosylphosphatidylinositol Membran-Anker gebunden (Glypican-Familie). Manche Heparansulfat-Proteoglycane befinden sich indirekt, durch andere Oberflächenmoleküle, an die Zelloberfläche gebunden (Yanagishita 1993).

Heparansulfat-Proteoglycane interagieren mit vielen Molekülen wie z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen, extrazellulären Matrixproteinen, Enzymen und Protease-Inhibitoren. Sie besitzen eine entscheidende Funktion bei vielen verschiedenen fundamentalen Zellfunktionen und spielen eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen den Zellen, Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix, sowie der Zelladhäsion und vielen anderen Interaktionen (Yanagishita 1993, Bernfield et al. 1999, Perrimon und Bernfield 2000).

Die besondere Bedeutung der Heparansulfat-Proteoglycane wird durch Untersuchungen unterstrichen, die zeigen, dass durch Mutationen in der Biosynthese von Heparansulfat-

Proteoglycanen ausgedehnte Entwicklungsstörungen bei Drosophila und bei Menschen hervorgerufen werden (Paine-Saunders et al. 2000).

Welche bedeutsame Rolle die Interaktion von Wachstumsfaktoren mit Heparansulfat-Proteoglycanen spielt, konnten Richard und Mitarbeiter in einer Studie über Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) zeigen (Richard et al. 1995). Sie stellten die Hypothese auf, dass die Bindung von FGF-2 (basic FGF) an Heparansulfat folgende biologische Vorteile beinhaltet:

- 1.) an Heparin bzw. Heparansulfat gebundener FGF-2 wird vor Proteolyse und thermischer Denaturierung geschützt;
- 2.) an Heparansulfat gebundener FGF-2 dient als Reserve und kann nach kurzer Exposition des Wachstumsfaktors langandauernde Antworten unterhalten;
- 3.) zellgebundenes Heparansulfat ist ein probates Mittel um FGF-2 an einer bestimmten Stelle zu halten und seine Wegdiffusion zu verhindern;
- 4.) sezerniertes Heparansulfat kann als Carrier dienen und sicherstellen, dass FGF-2 über den Ort der Freisetzung hinaus weiterverbreitet wird, indem es die Interaktion mit zellgebundenem Heparansulfat unterbindet;
- 5.) durch die Interaktion zwischen FGF-2 und zellgebundenem Heparansulfat wird ein Überschuß an FGF-2 an der Zelloberfläche verhindert, um so eine überschießende Antwort zu verhindern;
- 6.) Heparin oder Heparansulfat können die Rezeptoraffinität von FGF-2 erhöhen, indem sie die Dissoziationsrate des FGF-2-Rezeptorkomplexes reduzieren.

Untersuchungen von Reddi bestätigen ebenfalls den Stellenwert der extrazellulären Matrix als struktureller und funktionaler Lieferant der Morphogene. Er führt einen zusätzlichen Aspekt an: durch die Bindung an die extrazelluläre Matrix kann die Wirkung eines Morphogens beendet und somit ein negativ regulierter Entwicklungsweg eröffnet werden (Reddi 2000).

Ähnliche Überlegungen lagen den Untersuchungen von Paine-Saunders und Mitarbeitern zugrunde (Paine-Saunders et al. 2002). Sie untersuchten die Bindung des BMP-Antagonisten Noggin an Heparansulfat-Proteoglycane und stellten fest, dass

durch die Bindung von Noggin an Heparansulfat-Proteoglycane das zelluläre Antwortverhalten reguliert wird.

5.4. BMP-2 Varianten (Wildtypen und Mutanten)

5.4.1. T3 und T4

BMP-2 besitzt eine Heparin-Bindungsstelle im N-terminalen Segment, die aus zwei Triplets basischer Reste mit einer hohen Dichte an positiven Ladungen besteht (Nickel 2002).

Bindung von BMPs an die extrazelluläre Matrix und Heparin konnte bereits früher durch Studien an Zellkulturen und die starke Bindung von BMP-2 und anderen BMPs an Heparin-Sepharose gezeigt werden. Proteolytische Spaltung hebt die Bindung an die extrazelluläre Matrix auf. Die Substitution der N-terminalen Sequenz durch eine gleich große Dummy-Sequenz ergibt eine BMP-2 Variante (EHBMP-2), die nicht mehr an Heparin bindet. Diese Variante besitzt eine fünf- bis zehnfach höhere biologische *in vitro* Aktivität in embryonalen Chicken-limb-bud-Zellen, aber eine verringerte *in vivo* Aktivität im ektopen Lager (Ruppert et al. 1996, Kübler et al. 1999, Nickel 2002).

In der vorliegenden Studie wurden zwei BMP-Varianten mit einem (T3) bzw. zwei (T4) zusätzlichen basischen Triplets im N-terminalen Segment verwendet. Beide zeigten in den vorliegenden Untersuchungen sowohl quantitativ als auch qualitativ eine etwas bessere Knochenbildung als BMP-2. Hierein stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Nickel (Nickel 2002) überein. Er fand für beide BMP-Varianten eine geringere *in vitro* Aktivität in der Zellkultur und postulierte eine bessere *in vivo* Aktivität, da die BMPs durch die verstärkte Heparin-Bindung länger an ihren Applikationsort verweilen.

Kübler und Mitarbeiter (Kübler et al. 1999) untersuchten die *in vivo* Aktivität der BMP-Mutante EHBMP-2. Sie stellten fest, dass EHBMP-2 im Vergleich zum natürlichen BMP-2 *in vitro* eine höhere biologische Aktivität besitzt. Interessanterweise zeigte nur

die alleinige Implantation von EHBMP-2 eine deutlich geringere *in vivo*-Osteoinduktivität als BMP-2. Unter Verwendung eines geeigneten Trägermaterials glich sich die unterschiedliche *in vivo* Aktivität zunehmend an. Es zeigte sich eine eindeutige Korrelation zwischen Ausmaß der Knochenbildung und Menge an eingesetztem EHBMP-2, obwohl von EHBMP-2 insgesamt höhere Proteinmengen als von BMP-2 verwendet werden mussten. Die Ursache sehen die Untersucher in einem forcierten Abbau und Abtransport des alleinig implantierten EHBMP-2, dem durch die physikalische Bindung an ein geeignetes Trägersystem entgegengewirkt werden konnte.

In der vorliegenden Studie wurden einheitlich ICBM-Träger verwendet, was die gefundenen geringen Unterschiede der Knochenneubildung erklären kann. Interessant ist jedoch, dass durch gleiche Mengen an Proteinen annähernd gleich gute Ergebnisse erzielt wurden. Anscheinend bewirkt das postulierte längere Verweilen der BMPs am Applikationsort letztendlich doch eine bessere biologische Aktivität, so dass keine höheren Proteinmengen erforderlich sind.

Inwieweit die Heparinbindung einen Einfluss auf die Rezeptorbindung besitzt bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären.

5.4.2. K12E

In der vorliegenden Untersuchung wurde das beste Ergebnis mit der BMP-2 Mutante K12E erzielt. Bei dieser Variante wurde Lysin 12 gegen Glutamat ausgetauscht, mit dem Ziel den Einfluss von Lysin 12 auf die Heparinbindung zu untersuchen (Prof. Sebald, persönliche Mitteilung). Lysin ist im Gegensatz zur Glutaminsäure eine essentielle Aminosäure mit basischem Charakter. Ein Austausch von Lysin gegen Glutamat reduziert den basischen Charakter im Proteinstrang.

Uns liegen keine Untersuchungen über die *in vitro* Aktivität von K12E vor. Es ist anzunehmen, dass bei K12E lediglich eine gering reduzierte Heparinbindung vorliegt. Die Ursache für die gute Knocheninduktion durch K12E mag darin liegen, dass der Ersatz von Lysin 12 die biologische Aktivität *in vivo* nicht oder nur gering beeinflusst

und/oder ein vorhandener geringer Unterschied durch den verwendeten Träger überdeckt wird oder die Interaktion mit einem anderen regulierenden Matrixprotein moduliert wird. Obwohl zwar die Bindung der BMPs an Heparansulfat bis jetzt am besten untersucht ist, gibt es noch andere extrazelluläre Komponenten, welche die biologische Aktivität der BMPs beeinflussen können. Untersuchungen von Zebboudj und Mitarbeitern konnten zeigen, dass Matrix GLA Protein (MGP) einen regulierenden Effekt auf BMP-2 hat (Zebboudj 2002).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit BMP-Varianten, die einen Einfluss auf die Rezeptorbindung haben. Es wurde ein großes Epitop 1 für eine hohe Bindungsaffinität zum Typ-I-Rezeptor und ein kleineres Epitop 2 für die niedrige Bindungsaffinität zum Typ-II-Rezeptor entdeckt. Mutationen in beiden Epitopen reduzierten die biologische Aktivität der BMPs *in vitro*, Veränderungen im Epitop 2 verursachten sogar einen kompetitiven Antagonismus am BMP-Rezeptor (Kirsch et al. 2000, Nickel et al. 2001).

Eine Beeinflussung der Rezeptorbindung durch unsere Variante K12E ist nicht wahrscheinlich, da die entscheidenden Epitope räumlich zu weit entfernt liegen.

5.4.3. *GDF-5 und GDF-5 Chimär*

GDF-5 (BMP14/Cartilage-derived morphogenetic protein 1 [CDMP-1]) ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie und besitzt ca. 40-50% Sequenzhomologie mit BMP-2 (Spiro et al. 2001). Im N-terminalen Segment finden sich vier bis fünf basische, aber keine sauren Residuen (Nickel 2002).

GDF-5 stimuliert die Knorpelbildung und wird für eine regelrechte Skelett- und Gelenkentwicklung benötigt, Nullmutationen verursachen bei Mensch und Tier Brachydaktylie-Syndrome und abnorme Gelenkbildungen (Storm und Kingsley 1996, Storm und Kingsley 1999, Merino et al 1999, Francis-West et al. 1999, Edwards und Francis-West 2001, Buxton et al. 2001, Micic et al. 2002).

GDF-5 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zum BMPR-II/BMPRI (ALK-6) Rezeptorkomplex. Analog den BMPs wird durch dessen Bindung die Serin/Threonin-

Kinase Funktion des Typ-I Rezeptors aktiviert und die intrazelluläre Reaktionskaskade über SMAD-Proteine in Gang gesetzt (Nishitoh et al. 1996).

Obwohl sich die meisten Untersuchungen mit der Funktion von GDF-5 bei der Knorpel- und Skelettbildung beschäftigen (Storm und Kingsley 1996, Storm und Kingsley 1999, Merino et al. 1999, Francis-West et al. 1999, Edwards und Francis-West 2001, Buxton et al. 2001, Mikic et al. 2001, Mikic et al. 2002, Tsumaki et al. 2002) konnten einige Studien zeigen, dass GDF-5 osteoinduktives Potential besitzt.

Hötten und Mitarbeiter (Hötten et al. 1996) implantierten teilweise gereinigtes humanes GDF-5 in die Muskulatur von Nagetieren und erzielten somit Knorpel- und Knochenneubildung. In der Zellkultur mit MC3T3-E1 Zellen konnte im Gegensatz zu BMP-2 keine osteoinduktive Wirkung festgestellt werden. Die Untersucher folgerten daraus, dass GDF-5 eine relativ spezifische Wirkung auf die Chondrogenese während der enchondralen Knochenbildung besitzt.

Untersuchungen von Erlacher und Mitarbeiter (Erlacher et al. 1998) bestätigten die Ergebnisse von Hötten et al.. Auch sie konnten eine dosisabhängige de novo Knorpel- und Knochenbildung im ektopen Implantatlager nachweisen. In der Zellkultur (ADTC5, ROB-C26, MC3T3-E1 Zellen) konnten sie jedoch, verglichen mit OP-1 (BMP-7), eine deutlich geringere osteoinduktive Wirkung feststellen.

Auch in Experimenten von Spiro et al. (Spiro et al. 2000) wurde eine ektope Knorpel- und Knochenbildung durch die subkutane oder intramuskuläre Implantation rhGDF-5-haltiger Träger gezeigt. Im *in vivo* Versuch wurde rhGDF-5-haltige mineralisierte Kollagenmatrix in Röhrenknochen- und Wirbeldefekte non humaner Primaten implantiert. Der gebildete Knochen entsprach weitgehend autologem Knochen und die Knochenbildung war hauptsächlich dosisabhängig. Wider Erwarten zeigte eine dreifache Dosiserhöhung von GDF-5 bei der Wirbelfusion eine deutliche Abnahme des gebildeten Knochens. Die Autoren führten dies auf die komplexen Vorgänge des Knochenheilungsprozesses hinsichtlich Zellzusammensetzung und der zeitlichen Abfolge von Knochenbildung und Matrixresorption zurück.

In einer neueren Studie untersuchten Spiro und Mitarbeiter (Spiro et al. 2001) die osteoinduktive Wirkung von drei GDF-5 Zubereitungen bei Wirbelfusionen im Kaninchenmodell und verglichen sie mit autologen Knochentransplantaten vom Beckenkamm, sowie mineralisierter Kollagenmatrix mit/ohne Knochenmark. Die besten Ergebnisse wurden mit $1,0 \text{ mg/cm}^3$ rhGDF-5 auf nicht quervernetzten, mineralisierten Kollagenträgern erzielt. Keine positiven Resultate fanden sich bei mineralisierter Kollagenmatrix mit/ohne Knochenmark.

Spiro und Mitarbeiter (Spiro et al. 2001) führten drei Gründe für die geringere Osteoinduktivität von GDF-5, verglichen mit anderen BMPs, an:

- 1.) GDF-5 besitzt im Gegensatz zu BMP-2 oder BMP-7 ein eingeschränktes Rezeptorbindungsprofil, zusätzlich sind die Rezeptoren nur begrenzt im Gewebe verteilt. Die Antwortzellen von Seiten des Implantatlagers entsprechen nur einem Teil derjenigen Zellen, die auf andere Mitglieder der BMP-Familie antworten.
- 2.) Die zelluläre Antwort auf rhGDF-5, nicht aber anderer Mitgliedern der TGF- β Superfamilie, wird durch Typ I Kollagen-haltige Matrices signifikant verstärkt.
- 3.) Es besteht eine enge Korrelation zwischen durch rhGDF-5 induzierte Angiogenese und Knochenneubildung.

In der vorliegenden Studie lieferten GDF-5 und GDF-5 Chimär (B2GDF-5) ähnliche Ergebnisse und wiesen beide, sowohl quantitativ als auch qualitativ, eine deutlich geringere Knochenbildung auf als BMP-2. Somit bestätigen die vorliegenden Ergebnisse frühere Autoren hinsichtlich der osteoinduktiven Potenz von GDF-5 und machen deutlich, dass GDF-5 zwar osteoinduktive Wirkung besitzt, diese im Gegensatz zu BMP-2 jedoch deutlich geringer ist und höhere Proteindosen erfordert.

Die Variante B2GDF-5 besitzt die N-terminale Sequenz von BMP-2 bis einschließlich Lysin, fusioniert mit GDF-5. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass die Fähigkeit Knochen zu induzieren nicht durch eine Veränderung der N-terminalen Sequenz signifikant verändert werden kann. Diese Beobachtung wird durch weitere Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstrichen. Auch die durch BMP-2-6 (B2BMP-6), eine Kombination aus N-terminalem BMP-2 und BMP-6, induzierte Knochenbildung unterschied sich nicht signifikant von derjenigen, die durch den Wildtyp BMP-6 erzielt

wurde. Es ist also anzunehmen, dass eine Veränderung der N-terminalen Sequenz und somit der Heparinbindungsstelle sowohl bei GDF-5 als auch BMP-6 keinen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität bewirkt.

5.4.4. BMP-6 und BMP-2-6

Israel und Mitarbeiter (Israel et al. 1996) konnten in einer experimentellen Studie zeigen, dass es möglich ist, BMP Heterodimere zu exprimieren und dass diese eine erhöhte biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo* besitzen. Während rhBMP-5, rhBMP-6 und rhBMP-7 *in vitro* (W-20-17 Zellen) eine zehnfach geringere biologische Aktivität aufwiesen als rhBMP-2, zeigten die Heterodimere eine drei- bis achtmal höhere *in vitro* Aktivität.

Obwohl Israel et al. in ihrer experimentellen Studie eine bis zu zehnfach bessere *in vivo* Wirksamkeit von BMP-2/7 Heterodimer und ähnliche Ergebnisse für BMP-2/6 Heterodimer nachweisen konnten, ließ sich dies in der vorliegenden Untersuchung für BMP-2-6 (B2BMP-6) nicht zeigen. Dies mag daran liegen, dass in der vorliegenden Studie fusionierte Proteine und keine echten Heterodimere aus zwei verschiedenen Proteinsträngen verwendet wurden und somit eine Verstärkung der zellulären Aktivität ausblieb.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse stimmen zwar mit denen von Israel und Mitarbeitern darin überein, dass BMP-6 Homodimere eine deutlich geringere Osteoinduktivität besitzen als BMP-2, aber entgegen der Erwartungen schnitt die sowohl durch BMP-6 als auch durch BMP-2/6 erzielte Knochenbildung qualitativ und quantitativ am schlechtesten ab.

Eine Erklärung hierfür kann sein, dass sowohl BMP-6 und auch BMP-2/6 zum ersten Mal verwendet wurden und keine Ergebnisse aus Vorversuchen vorliegen. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass den vorliegenden Untersuchungsergebnissen eine geringe Aktivität der Proteine zu Grunde liegt.

5.4.5. *CHOBMP-2*

Die Herstellung von rekombinantem BMP-2 wurde bereits in den Neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben und kann entweder mit Hilfe von Säugetierzellen oder durch Expression in Bakterienzellen erfolgen (Wang et al. 1990, Israel et al. 1992). Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Herstellungsmöglichkeiten ist die fehlende Renaturierung und Glykosilierung in prokaryonten Expressionssystemen. Diese Schritte müssen, nach Extraktion der monomeren Proteinstränge aus den bakteriellen Einschlusskörperchen, mit Hilfe anderer Methoden vollzogen werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde neben rhBMP-2, das in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt wurde, auch die Osteoinduktivität von in eukaryonten Zellen hergestelltem CHOBMP-2 untersucht. Die Ergebnisse zeigten geringe Unterschiede hinsichtlich der quantitativen als auch qualitativen Knochenneubildung. Eine Ursache hierfür kann darin liegen, dass die im prokaryonten Expressionssystem fehlende Glykosilierung keinen entscheidenden Einfluss auf die osteoinduktive Wirkung des Proteins besitzt. Eine andere Erklärung mag sein, dass mittlerweile die gentechnischen Herstellungsverfahren soweit verfeinert wurden, dass funktionsfähige, hoch gereinigte Proteine auch mit bakteriellen Expressionssystemen erzeugt werden und sich somit auch die biologische Aktivität kaum mehr von eukaryont hergestellten BMPs unterscheidet.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Studie wurden verschiedene BMP-Wildtypen und gentechnisch modifizierte Bone Morphogenetic Proteins *in vivo* im Kalottentrepanationsdefekt bei adulten Ratten hinsichtlich ihrer osteogenen Potenz untersucht. Für alle Proteine wurde ein equiner ICBM-Träger verwendet.

Sowohl quantitativ als auch qualitativ die beste Knochenbildung im Vergleich zu rhBMP-2 lieferte die BMP-2 Mutante K12E, bei der die Aminosäure Lysin 12 gegen Glutamat ausgetauscht und somit der basische Charakter im Proteinstrang reduziert wurde. Auch T3 und T4, die jeweils durch ein bzw. zwei zusätzliche basische Triplets im N-terminalen Segment eine verstärkte Heparinbindungsaffinität besitzen, zeigten *in vivo* eine größere osteogene Potenz als rhBMP-2.

Eine deutlich geringere osteogene Potenz ließ sich sowohl bei GDF-5 als auch BMP-6 feststellen. Die Varianten GDF-5 Chimär (B2GDF-5) und BMP-2-6 (B2BMP-6), die jeweils die N-terminale Sequenz von BMP-2 bis Lysin 12 fusioniert mit GDF-5 bzw. BMP-6 enthalten, zeigten keine veränderte biologische Aktivität im Vergleich zu GDF-5 bzw. BMP-6.

In eukaryonten Zellen exprimiertes CHO-BMP-2 zeigte quantitativ sowie qualitativ vergleichbare Knochenbildung wie rhBMP-2.

Die angewendete Inhalationsnarkose mit Isofluran erwies sich als ein gut steuerbares Narkoseverfahren, das apparativ etwas aufwendiger ist als herkömmliche Injektionsnarkosen. Mit Isofluran, einem nebenwirkungsarmen, rasch anflutendem bzw. eliminierbarem Narkosegas konnten ausreichende Narkosetiefen erreicht werden. Durch eine selbst konstruierte Atemmaske ließ sich eine gute Passform, eine Minimierung entweichender Gase sowie eine gute Lagerung der Versuchstiere erzielen. Die eingesetzte Pulsoximetrie erwies sich als eine effektive, wenig aufwendige Möglichkeit, die Narkose adäquat zu überwachen.

7. Literaturverzeichnis

Afrakhte, M., Morén, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermark, B., Heldin, C-H., Heldin, N-E., ten Dijke, P. (1998): Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- β family members. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 505-511

Ahrens, M., Ankenbauer, T., Schroder, D., Hollnagel, A., Mayer, H., Gross, G. (1993): Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol* 12: 871-880

Alexander, D.J., Clark, G.C. (1980): A simple method of oral endotracheal intubation in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab Anim Sci* 30 (5), 871-875

Aoki, H., Fujii, M., Imamura, T., Yagi, K., Takehara, K., Kato, M., Miyazono, K. (2001): Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci*, 114: 1483-1489

Attisano, L., Cárcamo, J., Ventura, F., Weis, F.M., Massagué, J., Wrana, J.L. (1993): Identification of human activin and TGF- β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75: 671-680

Attisano, L., Wrana, J.L. (2002): Signal Transduction by the TGF- β Superfamily. *Science* 296: 1646-1647. Review.

Bai, S., Shi, X., Yang, X., Cao, X. (2000): Smad6 as a transcriptional corepressor. *J Biol Chem* 275: 8267-8270

Bays, R.A. (1983): Current concepts in Bone Grafting. In: Irby, W.B., Shelton, D.W. (eds.): Current advances in Oral and Maxillofacial Surgery, vol 4. St. Louis, C. V. Mosby, 183

Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerlad, M.L., Lincecum, J. Zako, M. (1999): Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68: 729-77

Buxton, P., Edwards, C., Archer, C.W., Francis-West, P. (2001): Growth/Differentiation Factor-5 (GDF-5) and skeletal development. *J Bone Joint Surg* 83 A (Suppl. 1): 23-30

Cárcamo, J., Weis, F.M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J.L., Attisano, L., Massagué, J. (1994): Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor β and activin. *Mol Cell Biol* 14 (6):3810-3821

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

Correia, J.J., Chacko, B.M., Lam, S.S., Lin, K. (2001): Sedimentaion studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad3:Smad4 homo- and hetero-trimerization. *Biochemistry* 40: 1473-1482

Coulson, R.A. (1983): Relationship between fluid flow and O₂ demand in tissues in vivo and in vitro. *Perspect Biol Med* 27: 121

Cunningham, N.S., Paralkar, V., Reddi A.H. (1992): Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor β 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11740-11744

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., Gauthier, J.M. (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promotor of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17: 3091-3100

Derynck, R., Zhang, Y., Feng, X-H. (1998): Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95: 737-740

Donath, K., Breuner, G. (1982): A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *J Oral Path* 11: 318-326

Ducy, P., Starbuck, M., Priemel, M., Shen, J., Pinero, G., Geoffroy, V., Amling, M., Karsenty, G. (1999): A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13: 1025-1036

Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Imamura, T. (1999): Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci* 112: 3519-3527

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., Miyazono, K. (2001): Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276: 12477-12480

Ebner, R., Chen, R.H., Shum, L., Lawlwer, S., Zioncheck, T.F., Lee, A., Lopez, A.R., Derynck, R. (1993): Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β binding to the type II receptor. *Science* 260: 1344-1348

Ekelund, A., Brosjö, O., Nilsson, O.S. (1991): Experimental Induction of heterotopic bone. *Clin Orthop* 263: 102-112

Erlacher, L., McCartney, J., Piek, E., ten Dijke, P., Yanagishita, M., Oppermann, H., Luyten, F.P. (1998): Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *J Bone Miner Res* 13 (3): 383-392

Ferguson, C.M., Mielau, T., Hu, D., Alpern, E., Helms, J.A. (1998): Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Oct. 23, 857, 33-42. Review.

Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., (Hrsg.) (1992): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: 6. völlig neu bearbeitete Auflage: 242-243

Francis-West, P.H., Abdelfattah, A., Chen, P., Allen, C., Parish, J., Ladher, R., Allen, S., McPherson, S., Luyten, F.P., Archer, C.W. (1999): Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126 (6): 1305-1315

Edwards, C.J., Francis-West, P.H. (2001): Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin Arthritis Rheum* 31 (1): 33-42

Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.-H., Miyazono K. (1993): Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell* 75: 681-692

Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata, M., Kato, M., Ichijo, H., Miyazono, K. (1999): Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* 10: 3801-3813

Gardner, D.J., Davis, J.A., Weina, P.J., Theune, B. (1995): Comparison of Tribromoethanol, Ketamine/Acetylpromazine, TelazolTM/ Xylazine, Pentobarbital and Methoxyflurane anaesthesia in HSD:ICR mice. *Lab Anim Sci* (45) 2: 199-204

Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis Y.I., Knaus, P. (2000): Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11:1023-1035

Goumans, M.J., Mummery, C. (2000): Functional analysis of the TGF- β receptor/smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44: 253-265

Green, C.J., Knight, J., Precious, S., Simpkin, S. (1981): Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals. A 10 year experience. *Lab Anim* 15: 163-170

Hanai, J-I., Chen, L.F., Kanno, Z., Ohtani-Fujita, N., Kim, W.Y., Guo, W.H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M.J., et al. (1999): Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline C promoter. *J Biol Chem* 274: 31577-31582

Hata, A., Lagna, G., Massagué, J., Hemmati-Brivanlou, A. (1998): Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12: 186-197

Hata, A., Seoane, J., Lagna, G., Montalvo E., Haemmati-Brivanlou, A., Massagué, J. (2000): OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100: 229-240

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Wrana, J.L. (1997): The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* 89: 1165-1173

Heldin, C-H., Miyazono, K., ten Dijke, P. (1997): TGF- β signaling from cell membrane to nucleus via Smad proteins. *Nature* 390: 465-471

Henningfeld, K.A., Rastegar, S., Adler, G., Knochel, W. (2000): Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter. *J Biol Chem* 275: 21827-21835

Hofbauer, L.C., Heufelder, A.E. (1996): Updating the metalloprotease nomenclature: bone morphogenetic protein 1 identified as procollagen C proteinase. *Eur J Endocrin* 135: 35-36

Hogan, B.L. (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10 (13): 1580-1594. Review.

Hogan, B.L. (1996): Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6: 432-438

Hötten, G.C., Matsumoto, T., Kimura, M., Bechthold, R.F., Kron, R., Ohara, T., Tanaka, H., Satoh, Y., Okazaki, M., Shrai, T., Pan, H., Kawai, S., Pohl, J.S., Kudo, A. (1996): Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors* 13 (1-2): 65-74

Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M. (1998): The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1: 673-683

Ibelgauff, H. (August 1999): Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. Hypertext Information Universe of Cytokines, Version 4.0

Imamura, T. Takase., M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J-I., Kawabata, M., Miyazono K. (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* 389: 622-626

Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Moutsatsos, I.K., Kaufman, R.J. (1992): Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 7 (2): 139-150

Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A., Wozney, J.M. (1996): Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13 (3-4): 291-300

Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M., Miyazono, K. (2000): Smad6 is a Smad1/5-induced Smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 275: 6075-6079

Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C-H., ten Dijke, P., Kruijer, W. (1998): Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor- β , activin and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 273: 21145-21152

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., Wrana, J.L. (2000): Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol Cell* 6: 1365-1375

Kawabata, M, Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T., Miyazono, K. (1998): Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *EMBO J* 17: 4056-4065

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

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., Suda, T. (1994): Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127: 1755-1766

Kim, J., Johnson, K., Chen, H.J., Carrol, S., Laughon, A. (1997): Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 388: 304-308

Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya H., Nakashima, K., Taga, T. (2000): BMP-2 induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem* 275: 17647-17652

Kirsch, T., Nickel, J., Sebald, W. (2000): BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *Eur Mol Biol Org* 19 (13): 3314-3324

Koenig, B.B, Cook, J.S., Wolsing, D.H., Ting, J., Tiesman, J.P., Correa, P.E., Olson, C.A., Pecquet, A.L., Ventura, F., Grant, R.A., et al. (1994): Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14: 5961-5974

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M. (1997): Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764

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

Kramer, I.R., Kelly, H.C., Wright, H.C. (1968): A histological and radiological comparison of the healing of defects of the rabbit calvarium with and without implanted heterogenous anorganic bone. Arch Oral Biol 13, 1095

Kuberasampath, T., Ridge, R.J. (1992): US Pat. Nr. 5171574

Kübler, N.R. (1997): Osteoinduktion und -reparation. Mund Kiefer GesichtsChir 1: 2-25

Kübler, N.R., Würzler, K., Reuther, J.F., Faller, G., Sieber, E., Kirchner, T., Sebald, W. (1999): EHBMP-2: Erstes BMP-Analog mit osteoinduktiven Eigenschaften. Mund Kiefer GesichtsChir 3 [Suppl 1]: 134-139

Kübler, N.R., Würzler, K., Reuther, J.F., Sieber, E., Kirchner, T., Sebald, W. (2000): Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die knochenbildenden Eigenschaften von rekombinanten BMPs. Mund Kiefer GesichtsChir 4 [Suppl 2]: 465-469

Kübler, N.R., Würzler, K. (2002): Bone morphogenetic proteins. Implantologie, 10/2: 177-192

Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., Mishima, H.K., Kawabata, M., Miyazono, K. (2000): Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. Mol Biol Cell 11: 555-565

Lacroix, P. (1945): Recent investigations on the growth of bone. Nature 156. 576

Lacroix, P. (1951): The organization of bones. Blakiston Co, Philadelphia, USA

Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., Massagué, J. (1996): Partnership between DPC 4 and SMAD proteins in TGF- β signalling pathways. Nature, 383: 832-836

Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M. et al. (2000): Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20: 8783-8792

Levy, D.E., Zwies, A., Duffy, T.E. (1980): A mask for delivery of inhalation gases to small laboratory animals. *Lab Anim Sci* 30 (5): 868-870

Li, W., Tse, J.Y., James, A.E., Lik-Wang, L., Chi-Kwan, Y., Man-Po, C., Chung, S.C. (2001): Delivery and scavenging system for small animal inhalational anaesthesia. *J Surg Res*, 99 (2): 175-178

Lind, M., Eriksen, E.F., Bünger, C. (1996): Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts and U2-OS cells. *Bone*, 18/1: 53-57

Liu, F., Ventura, F., Doody, J., Massagué, J. (1995): Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15: 3479-3486

Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., Zhou, Q. (1999): The ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev* 13: 2196-2206

Macías-Silva, M., Hoodless, P.a., Tang, S.J., Buchwald, M., Wrana, J.L. (1998): Specific activation of Smad 1 signaling pathways by the BMP-7 type I receptor, ALK-2. *J Biol Chem* 273: 1745-1754

Mahmood, J., Takita, H., Ojima, Y., Kobayashi, M., Kohgo, T., Kuboki Y. (2001): Geometric effect of matrix upon cell differentiation: BMP-induced osteogenesis using a new bioglass with a feasible structure. *J Biochem* 129: 163-171

Maliakal, J.C., Asahina, I., Hauschka, P.V., Sampath, T.K. (1994): Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblast phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. *Growth Factors* 11: 227-234

Martinovic, S., Borovecki, F., Sampath, K.T, Vukicevic, S.(2002): Biology of bone morphogenetic proteins. In: Vukicevic, S., Sampath, K. T. (Hrsg.): *Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice.* Birkhäuser Verlag, Basel 2002: 87-119

Massagué, J. (1990): The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641

Massagué, J., Wotton, D. (2000): Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J* 19: 1745-1754

Mauderly, J.L. (1975): An anaesthetic system for small laboratory animals. *Lab Anim Sci* 25 (3): 331-333

Merino, R., Macias, D., Gañan, Y., Economides, A.N., Wang, X., Wu, Q., Stahl, N., Sampath, K.T., Varona, P., Hurle, J.M. (1999): Expression and function of GDF-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chicken leg bud. *Develop Biol* 206: 33-45

Mikic, B., Schalet, B.J., Ckark, R.T., Gaschen, V., Hunziker, E.B. (2001): GDF-5 deficiency in mice alters the ultrastructure, mechanical properties and composition of the Achilles tendon. *J Orthop Res* 19 (3): 365-371

Mikic, B., Battaglia, C., Taylor, E.A., Clark, R.T. (2002): The effect of growth/differentiation factor-5 deficiency on femoral composition and mechanical behaviour in mice. *Bone* 30 (5): 733-737

Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J.I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J.L. et al. (2000): Hgs (hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9346-9355

Mundlos, S., Mulliken, J.B., Abramson, D.L., Warman, M.L., Knoll, J.H., Olsen, B.R. (1995): Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum Mol Genet* 4: 71-75

Nakanishi, T., Kimura, Y., Tamura, T., Ichikawa, H., Yamaai, Y., Sugimoto, T., Takigawa, M. (1997): Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 234: 206-210

Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N-E., Heldin, C-H., et al. (1997): Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 389: 631-635

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Taga, T. (1999): Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284: 479-482

Nelson, D., Cox, M. (2001): *Lehninger Biochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001, 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage: 324-337

Nickel, J., Dreyer, M.K., Kirsch, T., Sebald, W. (2001): The crystal structure of the BMP-2:BMPr-IA complex and the generation of BMP-2 antagonists. *J Bone Joint Surg* 83 (Suppl. 1): 7-14

Nickel, J., Dreyer, M., Sebald, W. (2002): Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. In: Vukicevic, S., Sampath, K. T. (Hrsg.): Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice. Birkhäuser Verlag, Basel 2002: 61-85

Nishida, T, Nakanishi, T., Asano, M., Shimo, T., Takigawa, M. (2000): Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro.

J Cell Physiol 184: 197-206

Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R., Yoneda, T. (1998): Smad5 and DPC4 are the key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. J. Biol. Chem. 273: 1872-1879

Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., Makishima, F., Yamaguchi, A., Yamashita, H., Enomoto, S., Miyazano, K. (1996): Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. J Biol Chem 271: 21345-21352

Nohno, T., Ishikawa, T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D.H., Rosenbaum, J.S. (1995): Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. Biol Chem 270: 22522-22526

Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., Zupicich, J., Skarnes, W.C., Saunders, S. (2000): Glypican-3 controls cellular responses to BMP-4 in limb patterning and skeletal development. Develop Biol 225: 178-187

Paine-Saunders, S., Viviano, B.L., Economides, A.N., Saunders, S. (2002): Heparan sulfate proteoglycans retain noggin at the cell surface. A potential mechanism for shaping bone morphogenetic gradients. J Biol Chem 277 (3):2089-2096

Paralker, V.M., Grasser, W.A., Baumann, A.P., Castleberry, T.A., Owen, T.A., Vukicevic, S. (2002): Prostate-derived factor and growth and differentiation factor-8: newly discovered members of the TGF- β superfamily. In: Vukicevic, S., Sampath, K. T. (Hrsg.): Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice. Birkhäuser Verlag, Basel 2002: 19-30

Pardali, E., Xie, X.Q., Tsapogas, P., Itoh, S., Arvanitidis, K., Heldin, C-H., ten Dijke, P., Grundstrom, T., Sideras, P. (2000): Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor β 1 responsiveness to human germ-line IgA genes. *J Biol Chem* 275: 3552-3560

Perrimon, N., Bernfield, M. (2000): Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404: 725-728

Pouponnot, C., Jayaraman, L., Massagué, J. (1998): Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem* 273: 22865-22868

Prolo, D.J., Pedrotti, P.W., Burres, K.P., Oklund, S. (1982): Superior osteogenesis in transplanted allogenic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop* 108: 230-242

Ramoshebi, L.N., Matsaba, T., Teare, J., Renton, L., Patton, J., Ripamonti, U. (2002): Tissue engineering; TGF- β superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Exp. Rev. Mol. Med.* Sept. 2: 1-11

Raper, S.E., Barker, M.E., Burwen, S. J., Jones, A.L. (1987): Isoflurane as an anaesthetic for experimental animal surgery. *Anat Rec* 218: 116-122

Reddi, A.H., Wientroub, S., Muthukumar, N. (1987): Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18(2): 207-12

Reddi, A.H., Cunningham, N.S. (1990): Bone induction by osteogenin and bone morphogenetic proteins. *Biomaterials*, 11: 33-34

Reddi, A.H. (1994): Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4 (5): 737-744. Review.

Reddi, A.H. (1997): Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8 (1):11-20. Review.

Reddi, A.H. (1998): Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology* 16, 247-252

Reddi, A.H. (2000): Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnologie from bench to bedside. *Biochem Soc Trans* 28 (4): 345-349

Reddi, A.H. (2000): Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr Nephrol* 14: 598-601

Reddi, A.H. (2001): Bone Morphogenic Proteins: From Basic Science to Clinical Applications. *J Bone Joint Surg (Am)* 83:1-6

Richard, C., Liuzzo., J.P., Moscatelli, D. (1995): Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) can mediate cell attachment by linking receptors and heparan sulfate proteoglycans on neighbouring cells. *J Biol Chem* 270 (41): 24188-24196

Ripamonti, U., Duneas, N. (1998): Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg*, 101 (1): 227-239. Review.

Ripamonti, U., Tasker, J.R. (2000): Advances in Biotechnology for Tissue Engineering of Bone. *Curr Pharm Biotech*, Vol 1(1): 1-12

Rosenzweig, B.L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G.N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C.-H., Miyazono, K. (1995): Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. Proc Natl Acad Sci USA 92: 7632-7636

Rueger, D.C. (2002): Biochemistry of bone morphogenetic proteins. In: Vukicevic, S., Sampath, K. T. (Hrsg.): Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to clinical Practice. Birkhäuser Verlag, Basel 2002: 1-18

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

Sakou, T. (1998): Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. Bone 22: 591-603

Sakou, T., Onishi, T., Yamamoto, T., Nagamine, T., Sampath, T.K., ten Dijke, P. (1999): Localization of Smads, the TGF- β family intracellular signaling components during endochondral ossification. J Bone Miner Res 14: 1145-1152

Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V., Jones, W.K., Sasak, H., Tucker, R.F., White, J.H., Coughlin, J.E., Tucker, M.M., Pang, R.H.L., Corbett, C., Özkaynak, E., Opperman, H., Rueger, D.C. (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 differentiation in vivo. J Biol Chem 267, 20352-20362

Savage, C., Das, P., Finelli A.L., Townsend S.R., Sun, C.Y., Baird, S.E., Padgett, R.W. (1996): *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor β pathway components. Proc Natl Acad Sci USA 93: 790-794

Sato, K., Urist, M.R. (1985): Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. Clin Orthop 197: 301-311

Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibular nonunions. Clin Orthop 205: 299-308

Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., Gelbart, W.M. (1995): Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. Genetics 139: 1347-1358

Senn, N. (1889): On the healing of aseptic bone cavities by implantation of antiseptic decalcified bone. Am j Med Sci 98: 219-243

Shi, Y., Hata, A., Lo, R.S., Massagué, J., Pavletich, N.P. (1997): A structural basic for mutational inactivation of the tumor supressor Smad4. Nature 388: 87-93

Sirola, K. (1960): Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study. Ann Med Exp Biol Fin 38: Suppl. 2, 1,

Smith, J.C., Bolon, B. (2002): Atmospheric waste isoflurane concentrations using conventional equipment and rat anaesthesia protocols. Contemp Top Lab Anim Sci 41 (2): 10-17

Spiro, R.C., Liu, L., Heidarani, M.A., Thompson, A.Y., Ng, C.K., Pohl, J., Poser, J.W. (2000): Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5. Biochem Soc Trans 28 (4): 362-368

Spiro, R.C., Thompson, A.Y., Poser, J.W. (2001): Spinal fusion with recombinant human growth and differentiation factor-5 combined with a mineralized collagen matrix. Anat Rec 263: 388-395

Storm, E.E., Kingsley, D.M. (1996): Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122: 3969-3979

Storm, E.E., Kingsley, D.M. (1999): GDF-5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Develop Biol* 209: 11-27

Takase, M., Imamura, T., Sampath, T.K., Takeda, K., Ichijo, H., Miyazono, K., Kawabata, M. (1998): Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 244: 26-29

ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Esrevez, M., Riddle, D.L., Ichijo, H., Heldin, C.-H., Miyazono, K. (1994): Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269: 16985-16988

ten Dijke, Miyazono, K., Heldin, C.-H. (2000): Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *Trends Biochem Sci* 25: 64-70

Tagaki, K., Urist, M.R. (1982): The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 196: 100

Tsumaki, N., Nakase, T., Miyaji, T., Kkiuchi, M., Kimura, T., Ochi, T., Yoshikawa, H. (2002): Bone morphogenetic protein signals are required for cartilage formation and differently regulate joint development during skeletogenesis. *J Bone Miner Res* 17 (5): 898-906

Turnbull, R.S., Freeman, E. (1974): Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. *J Periodont Res* 9 (1): 39-43

Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., Wrana, J.L. (1998): SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- β receptor. *Cell* 95: 779-791

Urist, M.R. (1965): Bone formation by autoinduction. *Science* 150 (3698): 893-899

Urist, M.R., Silverman, B.F., Buring, K., Dubuc, F.L., Rosenberg J.M. (1967): The bone induction principle. *Clin Orthop* 59:59-96

Urist, M.R., Strateva, B.S. (1971): Mechanisms of growth and development: bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50: 1391-1406

Urist, M.R. (1981): New bone formation induced in postfetal life by bone morphogenetic protein. In: Becker, R. O. (Hrsg.): *Mechanisms of growth control*. Springfield, Illinois, 406-434

Vender, J.R., Hand, C.M., Sedor, D., Tabor, S.L., Black, P. (1995): Oxygen saturation monitoring in experimental surgery: a comparison of pulse oximetry and arterial blood gas measurement. *Lab Anim Sci*, 45 (2): 211-215

Wan, M., Shi, X., Feng, X., Cao, X. (2001): Transcriptional mechanisms of BMP-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* 276: 10119-10125

Wang, E.A., Rosen, V., D'Allesandro, J.S., Baudy, M., Cordes, P., et al. (1990): Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2220-2224

Wang, W., Mariani, F.V., Harland, R.M., Luo, K. (2000): Ski represses bone morphogenetic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14394-14399

Wixson, S.K., White, W.J., Hughes, H.C. Jr., Marshall, W.K., Lang, C.M. (1987a): A comparison of Pentobarbital, Fentanyl-Droperidol, Ketamine-Xylazine and Ketamine-Diazepam anaesthesia in adult male rats. *Lab Anim Sci* 37 (6): 726-730

Wixson, S.K., White, W.J., Hughes, H.C. Jr., Marshall, W.K., Lang, C.M. (1987b): The effects of Pentobarbital, Fentanyl-Droperidol, Ketamine-Xylazine and Ketamine-Diazepam on Noxious Stimulus Perception in Adult Male Rats. *Lab Anim Sci* 37 (6): 731-735

Wixson, S.K., White, W.J., Hughes, H.C. Jr., Marshall, W.K., Lang, C.M. (1987c): The effects of Pentobarbital, Fentanyl-Droperidol, Ketamine-Xylazine and Ketamine-Diazepam on Arterial Blood pH, Blood gases, Mean Arterial Blood Pressure and Heart Rate in Adult Male Rats. *Lab Anim Sci* 37 (6): 736-742

Wixson, S.K., White, W.J., Hughes, H.C. Jr., Marshall, W.K., Lang, C.M. (1987d): The effects of Pentobarbital, Fentanyl-Droperidol, Ketamine-Xylazine and Ketamine-Diazepam on Core and Body Surface Temperature Regulation in Adult Male Rats. *Lab Anim Sci* 37 (6): 743-749

Wozney, J.M. (1998): The bone morphogenetic proteins family: Multifunctional cellular regulators in the embryo and the adult. *Eur J Oral Sci* 106 (1): 160-166

Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M. Wang, X.-F., Massagué, J. (1992): TGF- β signals through a heteromeric protein kinase complex. *Cell* 71: 1003-1014

Wright, M. (1982): Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc* 180 (12): 1462-71

Würzler, K.K., Kübler, N.R., Reuther, J.F. (2000): Einfluss des Periosts auf die induzierte Knochenneubildung durch autolysierten, antigenextrahierten, allogenen Knochen. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4 [Suppl 2]: 459-464

Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., Matsumoto, K. (1995): Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science* 270: 2008-2011

Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H., Matsumoto, K. (1999): XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptor to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 18: 179-187

Yamashita, H., ten Dijke, P., Huylebroeck, D., Sampath, T.K., Andries, M., Smith, J.C., Heldin, C.-H., Miyazono, K. (1995): Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130: 217-226

Yamashita, H., ten Dijke, Heldin, C.-H., Miyazono, K. (1996): Bone Morphogenetic Protein Receptors. *Bone* 19 (6): 569-574

Yanagishita, M. (1993): Function of proteoglycans in the extracellular matrix. Review article. *Act Path Japon* 43: 283-293

Yingling, J.M., Datto, M.B., Wong, C., Frederick, J.P., Liberati, N.T., Wang, X-F. (1997): Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor β -inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17: 7019-7028

Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T. (2000): Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell* 103: 1085-1097

Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Kern, S.E. (1998): Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1: 611-617

Zebboudj, A.F., Imura, M., Boström, K. (2002): Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277 (6): 4388-4394

Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M., Harland, R.M. (1996): The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein-4. *Cell* 86: 599-606

Zhang, Y.W., Yasui, N., Ito, K., Huang, G., Fujii, M., Hanai, J., Nogami, H., Ochi, T., Miyazano, K., Ito, Y. (2000): A RUNX2/PEBP2 A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10549-10554

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., Thomsen, G.H. (1999): A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687-693

8. Anhang

8.1. Tabellen

Tabelle 1: t-Test für unabhängige Stichproben mit $\alpha < 0.05$; berechnet mit StatView 5.0 für Windows

	Kon- trolle	BMP- 2	BMP- 2/6	BMP- 6	GDF- 5- Chim	GDF- 5	CHO	T3	T4	K12E
Kontr.		,0008	>,9999	>,9999	,1107	,0420	<,0004	<,0001	<,0001	<,0001
BMP-2	,0008		<,0002	,0012	,9218	,9574	>,9999	,9649	,8004	,7590
BMP-2/6	>,9999	<,0002		>,9999	,0561	,0155	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
BMP-6	>,9999	,0012	>,9999		,1702	,0657	<,0005	<,0001	<,0001	<,0001
GDF5Ch	,1107	,9218	,0561	,1702		>,9999	,0680	,2346	,0885	,0744
GDF-5	,0420	,9574	,0155	,0657	>,9999		,8774	,2666	,0976	,0814
CHO	<,0004	>,9999	<,0001	<,0005	,8197	,8774		,9928	,9148	,8884
T3	<,0001	,9649	<,0001	<,0001	,2346	,2666	,9928		>,9999	>,9999
T4	<,0001	,8004	<,0001	<,0001	,0885	,0976	,9148	>,9999		>,9999
K12E	<,0001	,7590	<,0001	<,0001	,0744	,0814	,8884	>,9999	>,9999	

Fettgedruckte Zahlen: signifikant

Tabelle 2: Computergestützte Flächenauswertung

	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler
Kontrolle	6,900	4,128	2,253
BMP-2	34,184	10,063	4,500
BMP-2/6	6,995	2,412	0,985
BMP-6	8,974	5,305	2,373
GDF-5-Chimär	25,590	14,198	7,099
GDF-5	26,856	6,530	2,920
CHO	35,640	6,926	3,098
T3	41,292	3,544	1,585
T4	43,864	2,881	1,289
K12E	44,272	4,577	2,047

8.2. Materialien

8.2.1. Trägerherstellung

Bandsäge Typ FK 22, Bizerba Waagen- und Maschinenfabriken, Koblenz

Wasserdampfstrahler Plyno GV, Girbach Dental, Pforzheim

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

Methanol J.T. Baker; Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Netherlands

Salzsäure rauchend 37%, Merck KG, Darmstadt

Guanidin-HCl (Guanidinehydrochloride), Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane), Carl Roth GmbH, Karlsruhe

TBS (Tris Buffered Saline Tablets), 50 Tabletten, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Wasserstoffperoxid 3%, Apotheke des Klinikum der Universität, Würzburg

Aqua destillata, Universitätsversorgung

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

Glaspipetten, Disposable Pasteur Pipettes Cat. No. 93, Chase Instruments, New York, USA

Konische Zentrifugengläser, Cat-No. 000-2083-STR, Polystyrene 15 ml, Elkay, Boston Tumpike, Shrewsbury, USA

Multi-Well-Platte, 96 Well, Corning Costar, Bodenheim

PH-Meter pH 523, Ser.-Nr. 19060154, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

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

Tefloneinsatz, Teflonscheibe mit Bohrungen, Eigenanfertigung Universitätswerkstätten Würzburg

Stanzrohr, Eigenanfertigung aus Messing, Innendurchmesser 7mm

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

8.2.2. Tierhaltung

Makrolonkäfig Typ III, EBECO & Co, Castrop-Rauxel
Altromin Haltungsdiät 1324, Weimann, Würzburg
Trinkflasche, EBECO & Co, Castrop-Rauxel
Weichholzgranulat, Weimann, Würzburg
Zellstoffbahnen, Weimann, Würzburg

8.2.3. Anästhesie

Narkose-Operationseinheit, Eigenbau, Würzburg
Stephens-Narkosegerät, Eickmeier, Tuttlingen
Isofluran Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden
Tramal, Grünwald, München
Novalgin, Bayer, Leverkusen
Einmalspritze, 10ml, Braun, Melsungen
Pulsoximeter Nellcor® Puritan Bennett 40, Nellcor, 4280 Hacienda Drive, Pleasanton
CA 94588, USA
Wattevlies, Paul Hartmann AG, Heidenheim

8.2.4. Kalottenoperation

Klinidrape Abdeckfolie steril, Mölnlycke Health Care OY, Homantsi, Finnland
Elektrische Hundehaarschneidemaschine, Kuno Moser GmbH, Unterkirnach

Dibromol farblos, Trommsdorff GmbH & Co. KG Arzneimittel, Alsdorf
Suctor lang, Sherwood Medical, Tullamore , Irland
Disposable Scalpel 15 er, PMF Köln
Schere fein BC 210, Aesculap AG, Tuttlingen
Anatomische Pinzette fein 31-19386, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Anatomische Pinzette mittel 31-19150, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Raspatorium 45-40325, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Trepanbohrer ∴ 7mm, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Blaues Winkelstück, Kavo AG, Bieberach
Motor, Elan-E, Aesculap AG, Tuttlingen
Nadelhalter 36-06500, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Vicrylnaht 4/0 1,0 metric, Ethicon GmbH, Norderstedt
Nobecutan-Spray, Astra Chemicals GmbH, Wedel/Holstein

8.2.5. Kalottenentnahme

Klinidrape Abdeckfolie steril, Mölnlycke Health Care OY, Homantsi, Finnland
Suctor lang, Sherwood Medical, Tullamore, Irland
Disposable Scalpel 15 er, PMF Köln
Schere fein BC 210, Aesculap AG, Tuttlingen
Anatomische Pinzette fein 31-19386, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Anatomische Pinzette mittel 31-19150, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Raspatorium 45-40325, Howmedica Leibinger GmbH, Freiburg
Mandrell und Trennscheibe 19 mm, Aeskulap AG, Tuttlingen
Handstück W&H SL 11, W&H Dental, Laufen/Obb.
Motor, Elan-E, Aesculap AG, Tuttlingen

8.2.6. Vitalfärbung und 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

8.2.7. Computerauswertung

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

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

8.2.8. Trenn-Dünnschliff-Technik

Einbettmulden 4140, PSI Grünewald GmbH & Co KG, Laudenbach

Glycolmethacrylat (GMA), Methacryliacid-hydroxylester, PSI Grünewald GmbH & Co KG, Laudenbach

Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

Technovit 7230VLC Fixationskleber, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

EXAKT Lichtpolymerisationsgerät Histolux, Exakt Apparatebau, Norderstedt

EXAKT Polymerisationspresse, Exakt Apparatebau, Norderstedt

Ethanol 70 %, Apotheke der Universität, Würzburg

Aqua destillata, Universitätsversorgung

Pasteurpipetten aus Glas PP06, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Schleifpapier

Plexiglas-Objektträger, 50x100mm, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Mikrometerschraube mit Digitalanzeige

Disposable Scalpel 10 er, PMF Köln

8.2.9. Mikroradiographie

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

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

Diascanner Nikon Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf

8.2.10. van-Kossa-Giemsa Färbung

Aqua destillata, Universitätsversorgung

Ethanol 70 %, Apotheke der Universität, Würzburg

Watte, Apotheke der Universität, Würzburg

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

Silbernitrat, Merck KG, Darmstadt

Natriumthiosulfat, Merck KG, Darmstadt

Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung), Merck KG, Darmstadt

Pasteurpipetten aus Glas PP06, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

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

EXAKT Polymerisationspresse, Exakt Apparatebau, Norderstedt

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

Färbekästen, Sonderanfertigung, Noras Röntgen- und Medizintechnik GmbH, Würzburg

Färbewannen, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Deckgas 18x18 mm, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

8.2.11. Masson-Trichrom-Goldner Färbung

Weigerts Lösung A (alkoholische Hämatoxylin-Lösung), Merck KG, Darmstadt
Weigerts Lösung B (salzsaure Eisen(III)nitrat-Lösung), Merck KG, Darmstadt
Säurefuchsin 25g, Merck KG, Darmstadt
Xylidin-Ponceau 25g, Fluka
Azophloxin 25g, Fluka
Essigsäure, 100% p.a., Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Orange-G 25g, Merck KG, Darmstadt
Molybdätosphorsäure 25g, Merck KG, Darmstadt
Lichtgrün 25g, Merck KG, Darmstadt
Aqua destillata, Universitätsversorgung
Bechergläser, Schott Duran, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Pasteurpipetten aus Glas PP06, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Pipetten Research, 20 –200µl, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Waage ABS 120-4, Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Faltenfilter 595 ½, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
EXAKT Polymerisationspresse, Exakt Apparatebau, Norderstedt
Färbekästen, Sonderanfertigung, Noras Röntgen- und Medizintechnik GmbH,
Würzburg
Färbewannen, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Deckgas 18x18 mm, Laborbedarf A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Reuther danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und Übernahme des Referates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. K. Würzler für die Idee, die unermüdliche Anleitung und freundliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Kübler bedanke ich mich für die Bereitstellung seines Labors, sowie die hilfreiche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. A. Renk danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. W. Sebald danke ich für das Bereitstellen der verwendeten Wachstumsfaktoren sowie seiner fachlichen Unterstützung in biochemischen Fragestellungen.

Bein besonderer Dank gilt Frau M. Schleyer für die unermüdliche und tatkräftige Unterstützung in allen labortechnischen Belangen.

Personalien

Name: Dr. Rita Antonia Depprich
Geburtstag und -ort: 5. Juni 1970
Eltern: Albert Depprich, Studiendirektor
Terry Depprich, geb. Eberle, Oberstudienrätin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schule

1976-80 Grundsule auf der Schanz, Ingolstadt
1980-89 Reuchlin Gymnasium, Ingolstadt
1987 6 Monate Monte Sant' Angelo Highschool,
Sydney/Australien
24. Juni 1989 Abitur

Nach dem Abitur

1989/90 Freiwilliges Soziales Jahr, Chirurgische Intensiv-
station, Klinikum Ingolstadt

Studium

SS 1990-WS 1996/97 Studium der Medizin an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
6. April 1992 Ärztliche Vorprüfung
23. März 1993 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
4. April 1995 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24. Oktober 1996 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 1996/97-SS 2000 Studium der Zahnmedizin an der Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
16. Mai 2000 Zahnärztliche Prüfung

