

Aus der Klinik und Polikliniken für
Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der
Universität Würzburg

Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Reuther

**Osteoinduktion durch gentechnisch modifizierte Bone Morphogenetic
Proteins (BMPs)**
**- Eine tierexperimentelle Studie zur Knocheninduktion im heterotopen
Implantatlager -**

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

vorgelegt von
Florian Eichelsbacher
aus Aschaffenburg

Würzburg, September 2004

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. J. Reuther

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. B. Klaiber

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2004

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)	1
1.1.1	Entdeckung und Charakterisierung	1
1.1.2	Beschreibung des BMP-2 Wildtyps	3
1.2	BMP-2- Varianten	4
1.2.1	EHBMP-2	4
1.2.2	T3/ T4	5
1.3	Rezeptoren	5
1.4	Die extrazelluläre Matrix (EZM)	9
1.4.1	Aufbau der extrazellulären Matrix	9
1.4.2	Funktion der extrazellulären Matrix	10
1.5	Die Bindung von BMPs an Heparin	11
1.6	Osteoinduktion	12
2	Fragestellung	14
3	Material und Methoden	16
3.1	Herstellung extrahierter xenogener Knochenkollagen- Träger (EXKK- Herstellung)	16
3.2	Versuchsaufstellung und Herstellung der BMP- Assays	18
3.3	Dotierung der Kollagen- Zylinder mit BMPs	19
3.4	Versuchstiere, Tierhaltung, Tierfütterung	19
3.5	Implantation	20
3.6	Röntgen- Verlaufskontrolle	21
3.7	Explantation der Kollagenträger	21
3.8	Messung der Knochenzylinder am pQCT	22
3.9	Herstellung der histologischen Präparate	23
3.9.1	Trenndünnschlifftechnik	23
3.9.2	Färbungen für die Trenndünnschliffe	24
3.10	Calciumbestimmung	26
3.11	Auswertung	27
3.11.1	Röntgen- Verlaufskontrolle	27
3.11.2	Röntgen- Explantatmessung	27
3.11.3	Computertomographie (pQCT)- Messung	28
3.11.4	Histologische Schnitte	28
3.11.5	Calciummessung	28
3.11.6	Statistik	29

4	Ergebnisse	30
4.1	Röntgenverlaufskontrolle zur Bestimmung der Knochenneubildung	30
4.2	Röntgenologische Bestimmung der Knochenfläche und der Knochendichte am Explantatzylinder	34
4.3	Computertomographische Messung	41
4.4	Histologische Auswertung	45
4.5	Mikroradiographische Darstellung	58
5	Diskussion	61
5.1	Einflussgrößen auf die Knochenbildung bei rekombinanten BMPs	61
5.2	BMP-2- Varianten	63
5.3	Pleiotrope Eigenschaft der BMPs	63
5.4	Vergleich der einzel- eingesetzten Proteine mit der Kombination der Proteine	64
6	Zusammenfassung	69
7	Literaturverzeichnis	71
Anhang		
	A Material	A-1
	B Herstellung der Lösungen für die Färbungen	B-1
	C Signifikanzniveaus der Messungen	C-1

1 Einleitung

1.1 Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

1.1.1 Entdeckung und Charakterisierung

Von Urist wurde 1965 entdeckt, dass demineralisierte Knochenmatrix, nach Implantation in die Muskulatur der vorderen Bauchwand, eine Knochenneubildung induziert. Diese osteoinduktive Komponente in der Matrix wurde von ihm später als Bone Morphogenetic Protein (BMP) bezeichnet. [55; 56; 58; 59]

1981 wurde durch Sampath und Reddi induktive Knochenmatrix mittels chaotroper Agenzien extrahiert und so inaktiviert, nach Zusammenfügen des Extraktes mit der inaktiven Knochenmatrix konnte die osteoinduktive Potenz der Matrix wieder hergestellt werden. [49]

Erstmals im Jahre 1988 gelang es Wozney, ein heterogenes Proteingemisch aus Rinderknochenextrakten zu isolieren, das in vivo knorpel- und knocheninduzierende Aktivität zeigte. [64]

Daraufhin begann die Isolierung, Sequenzierung und die Exprimierung verschiedener Bone Morphogenetic Proteins. [3]

BMP-1 bis BMP-7 sind in der humanen Knochenmatrix in einer Menge von ungefähr 1 µg pro 1 kg Kortikalis zu finden [50; 61], wobei zunächst für die Proteine BMP-2, BMP-4 mit BMP-7 osteoinduktive Aktivitäten nachgewiesen werden konnten. [3]

BMP-2, 3, 4, 6 und 7 spielen auch eine Rolle bei der Embryonalentwicklung. Sie werden bei der Entwicklung der Gliedmaßen [10] und vieler Organe wie Lunge, Nieren, Herz, Zähne, Darm, Augen und Haut benötigt, da sie in diesen Geweben die frühen Interaktionen zwischen Mesenchym- und Epithelzellen modulieren sowie Zellteilung und Zelltod beeinflussen. [9; 60] Die verschiedenen BMPs werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten in bestimmten Skelettabschnitten exprimiert. [65]

Die gentechnische Herstellung der BMPs erfolgt nach Klonierung entweder in CHO-Zellen [19; 62] oder in einem bakteriellen Expressionssystem. [24; 47] Alle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) außer BMP-1, welches eine Prokollagen- C- Proteinase darstellt und keine induktiven Eigenschaften besitzt, gehören zur TGF- β - Familie. (siehe **Abbildung 1**) Diese Gruppe von multifunktionellen Zytokinen umfasst mehr als 25 in ihrer Struktur ähnliche Wachstumsfaktoren, die von ca. 45 Genen kodiert werden. [16; 32] Charakteristisches Merkmal der TGF- β ähnlichen Proteine sind sieben konservierte Cysteinreste am C-terminalen Ende. [17; 18; 20]

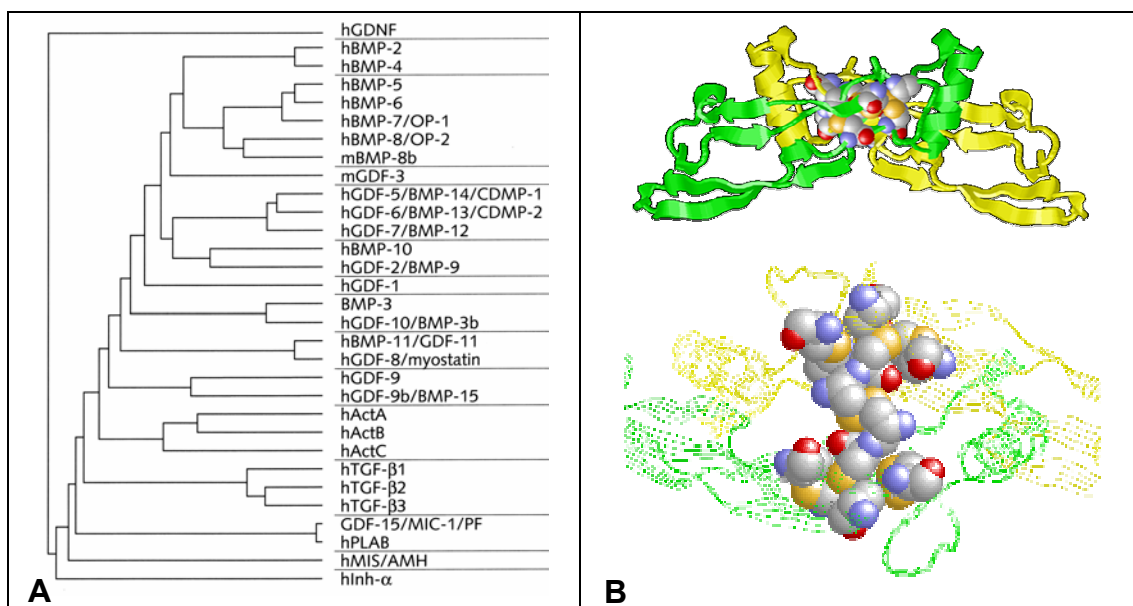


Abbildung 1 A: Die TGF- β Superfamilie; B: Molekulare Struktur der BMPs, Cysteine als Kugeln dargestellt: Cystein- Knoten

Alle BMPs mit Ausnahme von BMP-1 sind aus zwei identischen Peptidsträngen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, aufgebaut. [36]

Das Vorläufermolekül besteht aus einer 15-25 Aminosäuren (AS)- großen Signalsequenz, einer Prodomäne von 50-375 Aminosäuren und einer carboxyterminalen Domäne, bestehend aus 110-140 Aminosäuren, aus der, nach Abspaltung der Propeptids, das reife homodimere BMP entsteht.

Am C- terminalen Ende befinden sich die sieben konservierten Cystein-Bindungen (C).

Das N- terminale Ende der reifen Region, von der Prozessierungsstelle bis zum ersten invarianten Cystein, ist auffallend reich an basischen Aminosäuren (BAS), und enthält eine Heparin- Bindungsstelle. [47] (siehe **Abbildung 2**)

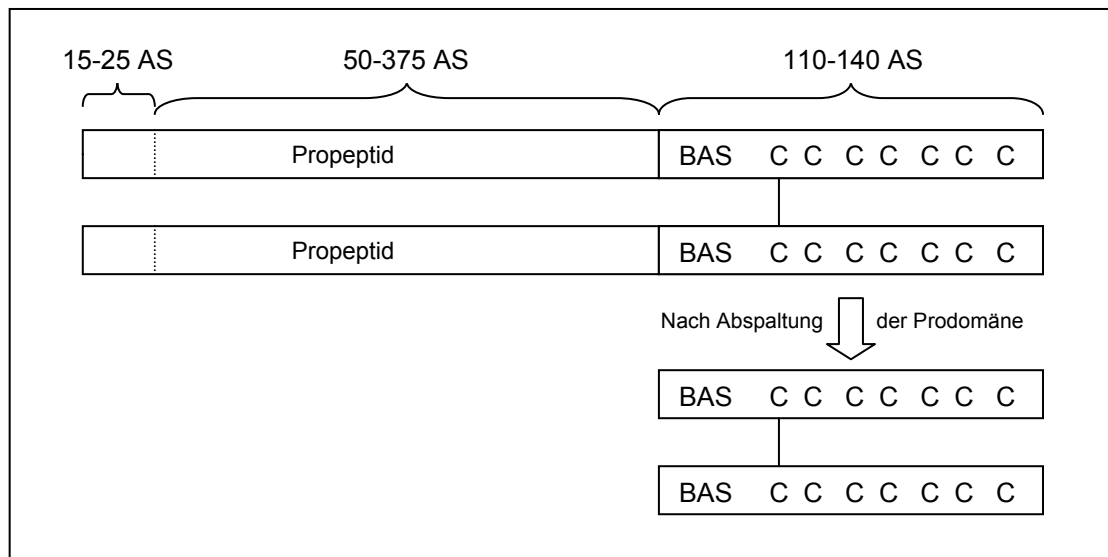


Abbildung 2 Schematische BMP- Proteinstruktur: Vom Vorläufermolekül zum reifen, biologisch aktiven Protein

1.1.2 Beschreibung des BMP-2 Wildtyps

BMP-2 als reifes, homodimeres Protein besteht aus zwei gleich großen Untereinheiten, welche ihrerseits aus 114 carboxyterminalen Aminosäuren des Proproteins aufgebaut sind. [51] Das nicht aktive Proprotein, das aus 453 Aminosäuren besteht, wird glykosyliert und proteolytisch gespalten.

Jedes der BMP-2 Monomere enthält einen Cystein- Knoten, der durch sechs Cysteinreste, die zusammen drei Disulfidbrücken ausbilden, entsteht. Der Cystein- Knoten ist strukturell wenig variabel. [51]

Der durch die Dimerisierung entstehende hydrophobe Kern sowie der Cystein-Knoten stabilisieren das Protein.

Im Zentrum des Proteins befinden sich zwei Höhlen. Beide N- Termini befinden sich in der ersten Höhle. Die erste Höhle befindet sich auf der konvexen Seite

des Proteins und hat eine große Anzahl an positiver Ladungen: Zehn der zwölf geladenen Reste in diesem Bereich haben eine Seitenkette. Die ersten acht Aminosäurereste am N- Terminus beider Monomere enthalten auf jeder Kette zusätzlich fünf positive Ladungen. [51] Diese hohe Konzentration an positiven Ladungen, die durch die große Zahl basischer Aminosäuren zustande kommt, erklärt die Heparin- Affinität des N- Terminus des Proteins. [47]

Diese Bindungsstellen sind verantwortlich für die unspezifische, nicht- kovalente Bindung des BMP-2 an die negativ geladene extrazelluläre Matrix (EZM). [36]

Die zweite Höhle befindet sich auf der konkaven Seite des Proteins. Es dominieren negative Ladungen. [51] (siehe **Abbildung 1**)

1.2 BMP-2- Varianten

Die vorliegenden BMP- Varianten wurden am N- Terminus modifiziert, um auf das Bindungsverhalten an die extrazelluläre Matrix direkt Einfluss zu nehmen und damit die biologische Aktivität zu modulieren.

Der Arbeitsgruppe von Prof. W. Sebald, Physiologische Chemie II an der Universität Würzburg, gelang es neben der Herstellung von BMP-2 und BMP-4 auch die rekombinanten BMP-2- Varianten in Escherichia coli zu exprimieren. [35; 47]

1.2.1 EHBMP-2

Bei der BMP-2- Varianten EHBMP-2 wurden die ersten 12 N- terminalen Aminosäuren durch die ersten 13 Aminosäuren von humanem Interleukin- 2, einer Dummy- Sequenz vergleichbarer Länge und Polarität, substituiert. Der N- Terminus dieser Varianten enthält damit nur noch zwei basische Reste.

Durch diese Substitution am N- Terminus kann EHBMP-2 keine hochaffine Bindung mit der extrazellulären Matrix mehr eingehen. (siehe **Abbildung 3**)

Das bedeutet, dass EHBMP-2 weniger stark ortsständig ist als z.B. BMP-2. Es diffundiert dadurch in vivo vom Implantationsort schneller in das umliegende Gewebe ab. [25; 47]

1.2.2 T3/ T4

Die BMP-2- Variante T3 besitzt am N- Terminus drei, die Variante T4 besitzt vier zusätzliche basische Tripletts. Durch die Erhöhung der Anzahl der positiven Ladungen am N- Terminus der Varianten wurde eine im Vergleich zu BMP-2 und EHBMP-2 erhöhte Bindung an die negativ geladene extrazelluläre Matrix erzielt. (siehe **Abbildung 3**) Die Ortsständigkeit der Varianten am Implantationsort wurde damit erhöht. [36]

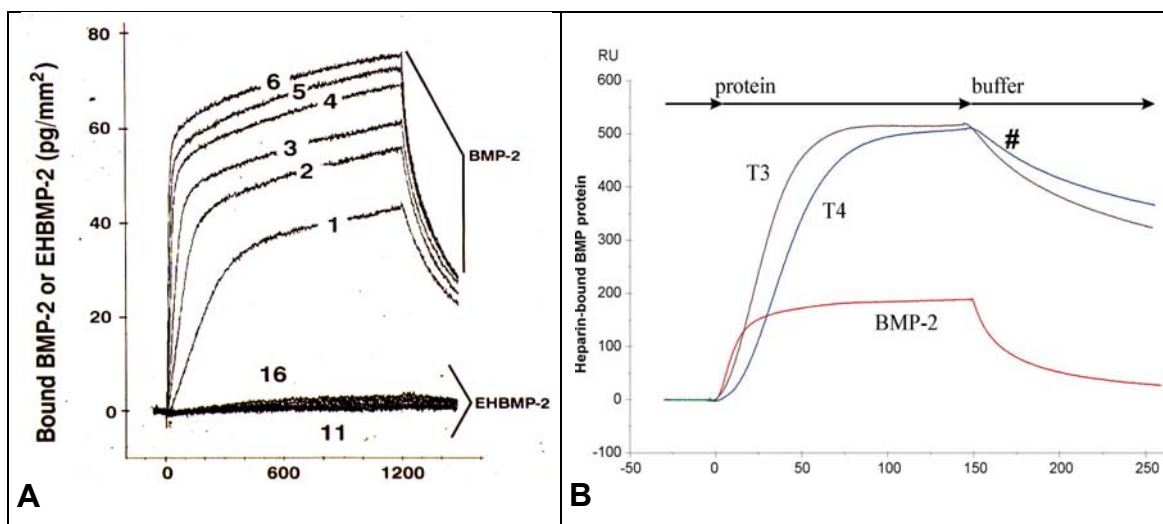


Abbildung 3 BIASensor- Analyse der Heparinbindung der verwendeten BMPs (Wildtyp und Mutanten): **A** Nahezu vollständige Aufhebung der Bindung an Heparin bei EHBMP-2; **B** Deutliche Verstärkung der Heparinbindung, prolongierte Off- Rate (#) (Mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Sebald, Physiologische Chemie II, Universität Würzburg)

1.3 Rezeptoren

BMPs üben ihren zellulären Effekt über die Bindung an transmembranöse Rezeptoren der pluripotenten, mesenchymalen Zielzellen aus.

Man unterscheidet Typ I- und Typ II- Rezeptoren, die zusammen, durch Ausbildung eines spezifischen heteromeren Komplexes, für die erfolgreiche Signalweiterleitung verantwortlich sind. [16; 21; 28; 32; 38; 46; 52; 70]

Es handelt sich dabei um zwei verwandte Serin/ Threonin- Kinase Rezeptoren [16; 32]. Ihre extrazelluläre Domäne ist glykolysiert, cysteinreich und für die Ligandenbindung verantwortlich. Über eine kurze transmembranöse Domäne ist sie mit der intrazellulären Serin/ Threonin- Kinase Domäne verbunden. [16; 27; 32]

Man unterscheidet insgesamt 12 Typ I- und 7 Typ II- Rezeptoren in der TGF- β - Familie. Aktuell wurden drei Typ I- Rezeptoren der BMPs in Säugetieren beschrieben:

1. Activin receptor- like kinase (ALK) 2
2. BMPR-IA (ALK 3)
3. BMPR-IB (ALK 6)

Der ALK 2- Rezeptor ist für die Signaltransduktion von BMPs am wichtigsten [21; 29; 52], wobei die Bindungsaffinität der einzelnen BMPs unterschiedlich ist. Drei Typ II- Rezeptoren sind an der Signaltransduktion von BMPs beteiligt:

1. BMPR-II
2. Activin type II receptor (ActR-II)
3. ActR-IIB [38; 46; 70]

Neben diesen Rezeptoren, gibt es noch andere Zelloberflächenproteine, die TGF- β binden. Möglicherweise dienen diese Proteine als Verstärkung des Signals durch Bindung freier Liganden. In ungebundener Form bewirken sie eine kompetitive Hemmung der Ligandenbindung. [6; 7]

Bildung des BMP- Rezeptorkomplexes

Nachdem der Ligand an die extrazelluläre Domäne des Typ II- Rezeptors gebunden hat, geht dieser mit dem Typ I- Rezeptor einen ternären Komplex ein. Es erfolgt die Aktivierung des Typ I- Rezeptors, indem dieser durch Übertragung von Serinresten phosphoryliert wird. [31] Der Typ II- Rezeptor

besitzt eine Liganden- unabhängige konstitutive Aktivität, die auf intrazelluläre Phosphorylierung durch Kinasen und/ oder auf Autophosphorylierung beruht. [4] Durch den aktivierten Typ I- Rezeptor kommt die Signalweiterleitung im Zytosol zustande. [1; 34]

Aktivierung des BMP- Signalweges im Zytosol

Die Faktoren, welche an der Signaltransduktionskaskade beteiligt sind, werden durch die Rezeptorkomplexe phosphoryliert. Die wichtigsten Mediatoren sind sogenannte Smads und TAK-1 (TGF- β - activated kinase- 1). [1]

SMADs werden direkt von den Rezeptorkomplexen phosphoryliert und translozieren dann in den Zellkern. [40; 66]

Man unterscheidet 3 Gruppen von Smads, die nicht nur Unterschiede in ihrem Aufbau sondern auch in ihrer Funktion aufweisen.

Die Mitglieder der ersten Gruppe sind direkte Substrate der Rezeptorkomplexe und werden als receptor- regulated Smads (R- Smads) bezeichnet. [39]

Die zweite Gruppe bilden die common- mediator Smads (Co- Smads), die mit den R- Smads assoziiert sind und daher indirekte Substrate der Rezeptorkomplexe sind. Sogenannte inhibitorische Smads (I- Smads) inhibieren die Aktivierung von R- und Co- Smads. [15; 22] (siehe **Abbildung 4**)

Die R- Smads 1, 5 und 8 werden vom Typ I- Rezeptor phosphoryliert und bilden dann einen heteromeren Komplex mit Co- Smads. Diese Komplexe translozieren in den Zellkern. [16; 32] Hier interagieren die Komplexe mit Transkriptionsfaktoren und nehmen so Einfluss auf die Transkription der Zielgene. [12; 33; 48; 53; 71]

Da die Affinität der Smads zur DNA schwach ist, benötigen Smads andere DNA- Bindungsfaktoren, wie z.B. das 30- Zinkfinger- Kernprotein, um effektiv an die Promotoren der Zielgene zu binden. [8; 14; 33; 53]

Die Wirkungsweise von aktivierten Smads ist noch weitgehend ungeklärt, diskutiert werden jedoch zwei Möglichkeiten der Genaktivierung:

1. Smads spielen als Co- Aktivatoren eine Rolle bei der Genaktivierung, indem sie mit Transkriptionsfaktoren interagieren.
2. Smads wirken direkt auf die Genexpression. [8]

TAK-1 ist eine MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), die durch TGF- β oder BMP-4 aktiviert wird und Promotoren reguliert. [69]

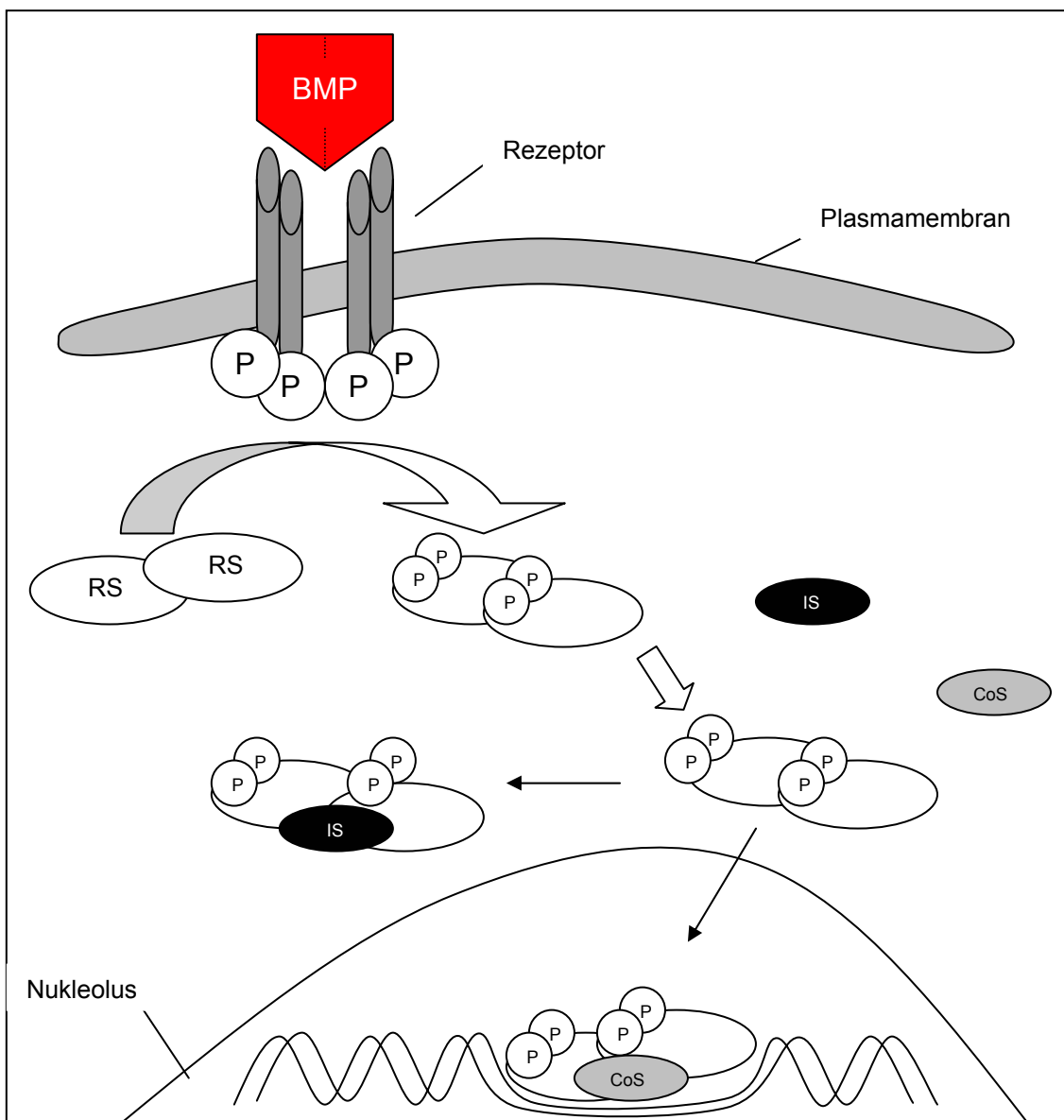


Abbildung 4 Schematischer Aufbau der Ausbildung des BMP- Rezeptorkomplexes und der Signaltransduktion im Zytosol.

1.4 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix spielt eine wichtige Rolle in der Modulation der biologischen Aktivität von BMPs. Über eine unspezifische Bindung an die extrazelluläre Matrix, werden die BMPs den mesenchymalen Zielzellen präsentiert. Veränderungen an dieser Bindung haben daher Auswirkungen auf die biologische Aktivität der BMPs und somit auf die erzielte Osteoinduktion.

1.4.1 Aufbau der extrazellulären Matrix

Gewebe bestehen aus Zellen und einem extrazellulären Raum. Dieser extrazelluläre Raum besteht aus Polysacchariden und Proteinen und wird als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet.

In den verschiedenen Bindegeweben ist der Anteil an EZM unterschiedlich verteilt: Knochen und Sehnen enthalten viel EZM, Muskel, Gehirn und Epidermis dagegen nur wenig EZM.

Die EZM besteht aus Glykosaminoglykanen (GAGs), die bis auf Hyaluronan, alle an Proteine gebunden sind (Proteoglykane) und aus Proteinen die Strukturproteine, wie Kollagen und Elastin, und Multiadhäsionsproteine, wie Fibronectin und Laminin, beinhalten.

Gebildet wird die Matrix von den in den jeweiligen Geweben vorliegenden Bindegewebszellen: In Haut und Sehnen durch Fibroblasten, in Knochen durch Osteoblasten, in Knorpelgewebe durch Chondroblasten.

GAGs sind lange, unverzweigte Polymere bestimmter Disaccharide. Einer der Zucker ist ein Aminozucker (N- Acetylglucosamin oder N- Acetylgalactosamin), der zweite Zucker ist meist eine D- Glucuronsäure oder L- Iduronsäure. Aufgrund einer Sulfatgruppe, die meist einem der Zucker angeheftet ist, und den Carboxylgruppen, trägt die Glykosaminoglykankette zahlreiche negative Ladungen. Die EZM ist somit stark negativ geladen.

Man unterscheidet vier Klassen von GAGs, die durch Polymerisation bestimmter Disaccharide sowie Veränderungen in Anzahl und Anordnung der Sulfatgruppen und Stellung der Carboxylgruppe entstehen: Es sind Hyaluronan,

Chondroitinsulfat und Dermatan-sulfat, Heparansulfat und Heparin sowie Keratansulfat.

Hyaluronan ist ein Hauptbestandteil der EZM und bildet bereits in kleiner Konzentration ein visköses, hydratisiertes Gel aus.

Kollagene sind Faserproteine und stellen den Hauptanteil aller Proteine dar. Die tripelhelikale Struktur kommt durch hohe Vorkommen von Glycin, Prolin und Hydroxyprolin zustande. Sie sind unlöslich und lagern sich in der EZM zu Kollagenfibrillen zusammen, die einen Durchmesser von 10 – 300 nm und eine Länge von mehreren μm besitzen.

Die elastischen Fasern bestehen hauptsächlich aus Elastin, einem stark hydrophoben Protein, das anders als Kollagen nur reich an Prolin und Glycin ist.

Die löslichen Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin, Laminin) sind lange flexible Moleküle, die mehrere spezifische Bindungsstellen für verschiedene Kollagentypen, andere Matrixproteine, Polysaccharide, Zelloberflächenproteine und Signalmoleküle, wie Wachstumsfaktoren oder Hormone, enthalten.

1.4.2 Funktion der extrazellulären Matrix

Die Aufgaben der EZM sind vielfältig. In den einzelnen Geweben hat sie Stützfunktion und gibt wasserlöslichen Molekülen die Möglichkeit der schnellen Diffusion. Über den Kontakt zu den Zellen beeinflusst sie Entwicklung, Bewegung und Form. Als Speicher für zahlreiche Proteine regelt sie die Proliferation, Differenzierung und den Tod von Zellen.

Proteoglykane sind nicht nur Strukturbestandteil der EZM und können Gele mit unterschiedlicher Porengröße und verschiedener Ladungsdichte bilden, sondern binden auch zahlreiche Wachstumsfaktoren und modulieren dadurch deren Wirkung auf unterschiedliche Weise:

1. Das Protein wird an seinem Entstehungsort immobilisiert und damit in seinem Wirkungsradius eingeschränkt.
2. Die Aktivität des Proteins wird sterisch behindert.

3. Es bildet sich ein Reservoir von Proteinen, aus dem eine langsame Freisetzung folgt. (siehe auch 1.2)
4. Das Protein wird vor proteolytischem Abbau geschützt, und so eine Wirkungsverlängerung erzielt.
5. Das Protein oder seine Konzentration werden verändert um die Präsentation für die Zelloberflächenrezeptoren zu optimieren.

Die Kollagene der EZM wirken Zugkräften entgegen, während das Elastin den Geweben Elastizität verleiht.

Die Multiadhäsionsproteine nehmen Einfluss auf die Organisation der Matrix d.h. im Anheften der Zellen an die Matrix und auf die Wanderung der Zellen.

1.5 Die Bindung von BMPs an Heparin

Die Heparin- Bindung kommt zwischen BMP bzw. dessen Varianten und der extrazellulären Matrix (EZM) zustande.

Ruppert et al. (1996) konnten zeigen, dass der N- Terminus für die unspezifische Bindung des BMP-2 und dessen Varianten an die extrazelluläre Matrix verantwortlich ist. Die Heparin- Bindungsstelle ist aus zwei Triplets basischer Aminosäuren aufgebaut.

Die positiven Ladungen der vielen basischen Reste am N- Terminus des Proteins scheinen mit den negativ geladenen Carboxylat- und Sulfatgruppen des Heparins (EZM) ionische Bindungen einzugehen.

Man geht davon aus, dass die Aufgabe dieser Heparin- Bindungsstelle darin besteht, das Protein am Wirkort zu immobilisieren und eine mögliche Abdiffusion zu verhindern bzw. zu verzögern.

Durch die Veränderung der N- Termini verschiedener BMP-2- Varianten konnte die Bindungsaffinität dieser Proteine an die extrazelluläre Matrix moduliert werden.

Bei der Varianten EHBMP-2 wurde, durch die Elimination von basischen Seitenketten, d.h. positiver Ladungen, keine messbare Affinität der Varianten an

die extrazelluläre Matrix erreicht. (siehe **Abbildung 3**) Dies geschah durch Substitution der ersten 12 Aminosäuren des N- Terminus von BMP-2. (vgl.1.2) Die T3- Variante besitzt an ihrem N- Terminus drei, die T4- Variante besitzt vier zusätzliche basische Triplets. Durch diese Erhöhung der basischen Seitenketten, d.h. positiver Ladungen, kommt es zu einer erhöhten Bindung der Varianten an die extrazelluläre Matrix. (siehe **Abbildung 3**) Dadurch wird die Verweildauer am Wirkort erhöht und eine Verstärkung der osteogenen Wirkung erhofft. (vgl.1.2)

1.6 Osteoinduktion

Wie bereits von Urist 1965 beschrieben, kommt die knochenbildende Eigenschaft durch BMPs über eine Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Zellen in knorpel- und knochenbildende Vorläuferzellen zustande. [55] Der Mechanismus der Knochenbildung entspricht hierbei den Vorgängen bei der enchondralen Ossifikation.

Die mesenchymalen Zielzellen befinden sich im Weichgewebe, d.h. im subkutanen Gewebe, im Periost, in der Muskulatur und im Knochenmark (Stammzellen).

Erst die Charakterisierung und gentechnische Herstellung vieler osteoinduktiv wirksamer BMPs, macht eine externe Zuführung von BMPs auf z.B. Kollagenmatrix möglich. Zu beachten ist jedoch bei Einsatz von gentechnisch hergestelltem BMP-2, dass um den Faktor 500- 1000 geringere Mengen benötigt werden, um einen gleichwertigen induktiven Prozess auszulösen, wie z.B. mit Knochenmatrixextrakten.

BMP-2 weist in heterotopen und in orthotopen Implantatlagern eine starke osteoinduktive Aktivität auf. [13; 54; 64]

Reddi bewies, dass die postnatale Osteoinduktion nach dem Prinzip der enchondralen Knochenbildung verläuft. [41]

Die Osteoinduktion verläuft in einem kaskadenartigen Prozess: Innerhalb von vier Tagen, nach BMP- Implantation, kommt es zu einer Migration pluripotenter, mesenchymaler Zellen aus dem umliegenden Weichgewebe und Knochenmark

an den Ort der BMP- Implantation. Dieser erste Schritt wird als Chemotaxis bezeichnet. Darauf folgen die Proliferation der Zellen und die Differenzierung in Chondroblasten. Diese bilden dann extrazelluläre Matrixkomponenten und hypertrophieren. Zusammen mit der Angiogenese wird das gebildete Knorpelgewebe gemäß der enchondralen Ossifikation durch neugebildetes Knochengewebe ersetzt. Bereits ab der zweiten Woche nach Implantation beginnt die Kalzifizierung der Matrix. Es bildet sich Geflechtknochen aus. [2; 41] Untersuchungen mit BMP-2 zeigen, dass die Knochenneubildung direkt proportional zur eingesetzten BMP-2- Menge ist.

Diese Differenzierungs- und Umbauvorgänge sind abhängig vom Implantationsort, der Spezies und dem Alter des Versuchstieres.

Die beschriebenen Vorgänge gleichen sich sowohl bei orthotoper als auch bei heterotoper Implantation. [11; 30; 37; 57]

2 Fragestellung

Rekombinante humane BMPs sind in der Lage de novo Knochenbildung zu induzieren und spielen deshalb in der rekonstruktiven Knochenchirurgie eine immer wichtigere Rolle.

Diese osteoinduktive Potenz wurde bereits in vielen Untersuchungen nachgewiesen. Bewiesen ist, dass rhBMP-2, gebunden an einen EXKK- (extrahiertes, xenogenes Knochenkollagen) Träger als Freisetzungssystem, quantitativ die größtmögliche Knochenneubildung aufweist.

Neben rhBMP-2 konnten auch verschiedene andere BMP-2- Varianten von Sebald et al. in einem bakteriellen Expressionssystem (*E. coli*) hergestellt werden.

Bei den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Varianten wurde Einfluss auf die unspezifische Bindung des Proteins mit der extrazellulären Matrix (EZM) genommen. Bei den Varianten T3 und T4 wurde die Bindung an die EZM verstärkt, bei EHBMP-2 die Affinität zur EZM aufgehoben.

Die einzelnen Wachstumsfaktoren sowie ihre Kombinationen wurden in dieser Arbeit bezüglich der erzielten Knochenneubildungsrate im heterotopen Implantatlager (Oberschenkelmuskulatur der Ratte) verglichen.

Es wurden dazu der BMP-2 Wildtyp oder die Varianten alleine mit einer Kombination mit EHBMP-2 untersucht.

Durch den Einsatz der Proteinkombinationen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Knochenneubildung durch Kombinieren einer kaum an die extrazelluläre Matrix bindenden Varianten (EHBMP-2) mit einem normal (BMP-2) bzw. verstärkt (T3, T4) an die extrazelluläre Matrix bindenden Morphogen verbessert werden könnte:

BMP-2 regt durch den Aufbau eines biologisch wirksamen Konzentrationsgradienten, im umliegenden Gewebe als Induktor die Chemotaxis und die darauf folgende Migration pluripotenter mesenchymaler Zellen an, und ist am Implantationsort für die Proliferation und Differenzierung der Zielzellen verantwortlich.

Durch Kombination der zwei verschiedenen Proteine mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften an die EZM sollte dieser pleiotrope Effekt der BMPs näher erforscht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung extrahierter xenogener Knochenkollagen- Träger (EXKK- Herstellung)

Vorbereitung homogen strukturierter Spongiosa- Scheiben

Die Spongiosa- Träger wurden von Kondylen des Femurs männlicher Mastbullen im Alter von 8- 12 Monaten gewonnen. Für die weitere Verarbeitung wurden die Kondylen der Rinder bei -80° C tief gefroren.

Zuerst wurden die bovinen Femur- Kondylen in gefrorenem Zustand mit der Knochensäge dekortikiert und in Scheiben von 10 mm Dicke geschnitten.

Nach dem Einlegen in ca. 50° C warmes Wasser, wurde das Knochenmark mittels Wasserdampfstrahler und Druckluft entfernt und mit aqua destillata gespült.

Entfettung und Demineralisation der Spongiosa- Scheiben

Die markfreien Spongiosa- Scheiben wurden in einer 3:1- Lösung von Chloroform und Methanol vollständig entfettet. Dazu wurden die Scheiben in ein 5 l- Becherglas mit Tefloneinsatz und 4 l Volumen unter ständigem Rühren durch Rührfisch und Magnetrührer bei Raumtemperatur eingelegt; die Lösung wurde insgesamt viermal alle 24 h gewechselt.

Die Spongiosa- Scheiben wurden in aqua destillata gespült, und für 10 min unter leichtem Rühren mit einer 3 %igen H_2O_2 - Lösung gebleicht. Anschließend wurden die Scheiben in einer 0,5 M HCl- Lösung vollständig demineralisiert. Dazu wurden die Spongiosa- Scheiben viermal in 3 l Volumen unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur eingelegt.

Danach wurden die Spongiosa- Scheiben in aqua destillata gespült.

Herstellung vollständig demineralisierter Spongiosa- Zylinder

Mit Hilfe eines speziell angefertigten Stanzbohrers wurden aus den demineralisierten Spongiosa- Scheiben Zylinder mit einem Durchmesser von

5 mm und einer Höhe von 10 mm gestanzt. Aus den 40 Spongiosa- Scheiben konnten ca. 400 Zylinder gewonnen werden.

Um eine vollständige Demineralisation der einzelnen Zylinder sicherstellen zu können, wurden die Zylinder erneut in ein Becherglas gegeben und in eine 0,5 M HCl- Lösung eingelegt. Dazu wurden die Spongiosa- Zylinder in 3 l Volumen unter ständigem Rühren mit Rührfisch und Magnetprüher bei Raumtemperatur eingelegt; die Lösung wurde insgesamt dreimal alle 24 h gewechselt. Danach wurden die Zylinder in aqua destillata gespült.

Nach erfolgter Röntgenkontrolle (Faxitron Röntgengerät und Kodak Film) mit den Einstellungen 25 kV/ 35 s konnte eine vollständige Demineralisation der Zylinder festgestellt werden.

Extraktion der löslichen Proteine

Die löslichen Proteine wurden in 4 M GuHCl und 50 mM Tris HCl, eingestellt auf einen pH- Wert von 7.4, extrahiert. Dazu wurden die Spongiosa- Zylinder in ein Becherglas in 3 x 2 l für 12 h bei 4° C eingelegt. Danach wurden die Zylinder wieder in aqua destillata gewaschen.

Sterilisation der Spongiosa- Zylinder

In einem Liter einer 1:1- Lösung aus Chloroform und Methanol wurden die Zylinder in einem Becherglas für 24 h bei Raumtemperatur eingelegt.

Danach wurden sie auf einer sterilen Nierenschale für 12 h unter die Abzugshaube gelegt.

Lyophilisieren der Spongiosa- Zylinder

Die in mehrere Zentrifugengläser abgefüllten Zylinder wurden mit sterilem aqua destillata gespült. Mittels Vakuumpumpe wurde das Wasser abgesaugt und die Zylinder bei -80° C eingefroren. Nach 24 h wurden die Spongiosa- Zylinder für 24 h lyophilisiert (Lyophilisator).

3.2 Versuchsaufstellung und Herstellung der BMP-Assays

Jede Versuchsgruppe bestand aus fünf Versuchstieren, wobei jeweils in den rechten und linken Oberschenkel implantiert wurde. Tabelle 1 zeigt die Proteindosierung der Implantate.

Aus Stammlösungen von BMP-2, T3, T4 und EHBMP-2 (1µg/ µl), wurden unter sterilen Bedingungen die unterschiedlichen Konzentrationen in Reaktionsgefäße (2,0 ml) pipettiert (Pipetten Research).

Anzahl der Implantate	Proteinkonzentration gesamt [µg]	Proteinkonzentration einzel [µg]	Protein
5	2	1	T3
		1	EHBMP-2
5	2	1	T4
		1	EHBMP-2
5	2	1	BMP-2
		1	EHBMP-2
5	2	2	T3
5	2	2	T4
5	2	2	BMP-2
5	2	2	EHBMP-2
5	4	2	T3
		2	EHBMP-2
5	4	2	T4
		2	EHBMP-2
5	4	2	BMP-2
		2	EHBMP-2
5	4	3	T3
		1	EHBMP-2
5	4	3	T4
		1	EHBMP-2
5	4	3	BMP-2
		1	EHBMP-2
5	4	4	T3
5	4	4	T4
5	4	4	BMP-2
5	4	4	EHBMP-2
5	0	0	-

Tabelle 1 Proteinverteilung der Implantate

3.3 Dotierung der Kollagen- Zylinder mit BMPs

Zuerst wurden die Zylinder in sterilem aqua destillata für 15 min rehydriert. Nach Abtupfen der Implantate auf sterilen Filterpapieren und sterilen OP-Tüchern wurden diese in sterile Multi- Well- Platten überführt.

Auf jeden Zylinder wurden jeweils 50 µl Protein- Lösung gemäß der Ansätze der Versuchsaufstellung (siehe 3.2) pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass jedes Implantat in der Mitte des Zylinders benetzt wurde und es so zu einer gleichmäßigen Benetzung des Trägers kommen konnte. Das aufzutragende Flüssigkeitsvolumen der Proteinfraction (50 µl) wurde so gewählt, dass der gesamte Zylinder gleichmäßig durchfeuchtet wurde, es aber zu keinem Austreten von Flüssigkeit aus dem Träger kam.

Anschließend wurden die Implantate lyophilisiert (Lyophilisator) und bei 4° C gelagert.

3.4 Versuchstiere, Tierhaltung, Tierfütterung

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague- Dawley- Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 348 g. Die Tiere wurden in Makrolon- Käfigen Typ III, vor der Operation in Gruppenhaltung (2) und nach der Operation einzeln, auf Weichholzgranulat im halboffenen Barriere- System gehalten.

Nach der Implantation wurden die Tiere für zwei Tage auf Zellstoffbahnen gehalten, um einer möglichen Infektion der Wunde durch Granulat vorzubeugen. Die durchschnittliche Haltungstemperatur lag bei 22°C, die durchschnittliche Luftfeuchtigkeit im Zeitraum von Implantation und Tötung betrug 62 %. Das Lichtprogramm wechselte alle 12 h automatisch vom Hell- in den Dunkelzustand. Der Luftaustausch wurde über eine Klimaanlage geregelt.

Während der gesamten Versuchsdauer bekamen die Tiere Altromin Haltdiät und Leitungswasser ad libitum. Einen Tag vor der Implantation erhielten die Tiere kein Futter.

3.5 Implantation

Vorbereitung der Ratten für die Operation

Zwölf Stunden vor Operationsbeginn wurden die Versuchstiere nüchtern gesetzt, wobei sie weiterhin Flüssigkeit bekamen. Unmittelbar vor Operationsbeginn wurden die Versuchstiere mit einem Forene®-Sauerstoffgemisch für ca. 45 s ansediert, und eine subkutane Anästhesie mit Ketavet 100 mg/ ml (Dosierung: 100 mg/ kg Körpergewicht) und Rompun 2% (Dosierung: 5 mg/ kg Körpergewicht) appliziert. Die OP- Felder wurden mit einem Langhaarschneider und Einmalrasierer enthaart.

Implantation der mit Protein dotierten Kollagenträger

Die Ratte wurde in Bauchlage auf einem steril abgedeckten beheizten OP-Tisch fixiert. Nun wurde mit einem Skalpell ein ca. 0,8 mm langer Horizontalschnitt in der Mitte der Hinterseite des rechten Oberschenkels gesetzt. Danach wurde ca. in einer Tiefe von 1,5 cm, mit Hilfe einer Präparierschere, eine Tasche für die Aufnahme des Kollagenträgers stumpf präpariert, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Blutgefäße verletzt wurden. Der Kollagenzylinder wurde mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette zwischen dem M. biceps femoris und dem M. gluteus superficialis, parallel zum Femur ausgerichtet. Nach Verschließen der Schnittwunde mit drei Einzelknopfnähten, wurde diese mit Nebacetin und Nobecutanspray, als antiseptischen Sprühverband, versorgt.

Die Implantation in den kontralateralen Oberschenkel erfolgte in analoger Weise.

Abschließend wurden 2 ml Catosal verdünnt mit 4 ml aqua destillata injectabile in Höhe der Brustwirbelsäule des Versuchstieres subkutan injiziert. Für die zwei folgenden Tage nach der Implantation wurden dem Trinkwasser ca. 3 Hübe Tramaltropfen beigegeben.

3.6 Röntgen- Verlaufskontrolle

Um den Verlauf der Knochenneubildung der Kollagenträger dokumentieren zu können, wurde jede Ratte am Implantationstag, am 5., 11., 17., 23. und 28. Tag geröntgt. (siehe **Abbildung 5**)

Geröntgt wurde mit einem Faxitron- Röntgengerät mit den Einstellungen von 33 kV/ 30 s. Dabei wurde die Ratte auf einem Styroporformstück positioniert und an den Hinterbeinen in Extension fixiert. Am Explantationstag wurde nach Tötung der Ratte geröntgt.

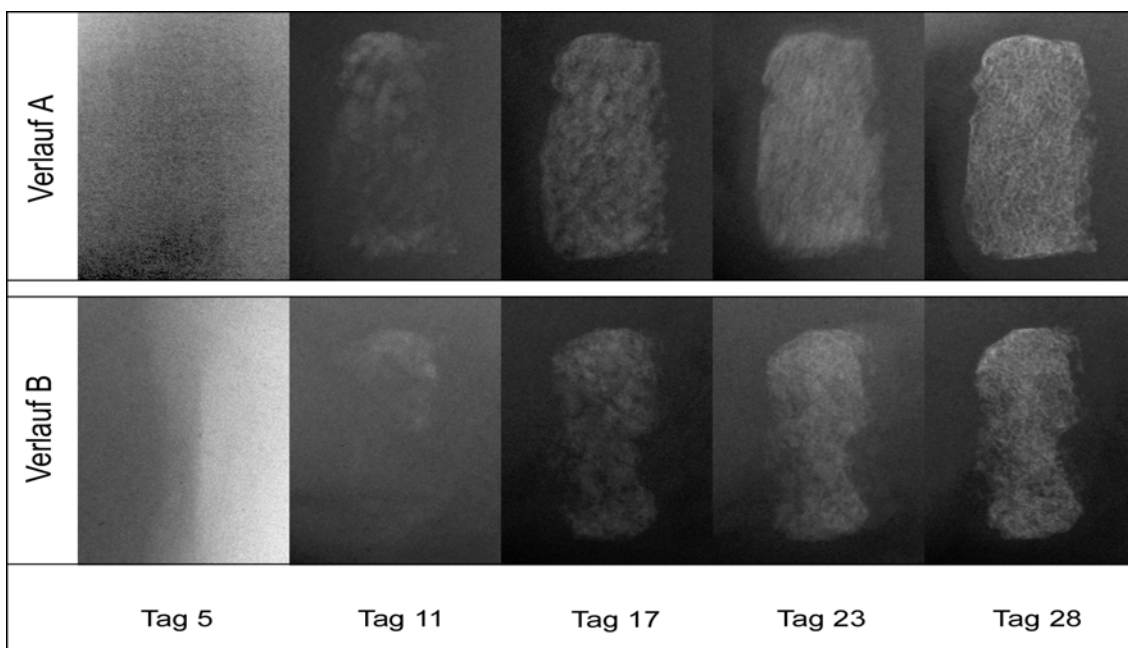


Abbildung 5 Beispiel für eine postoperative Röntgen- Verlaufskontrolle. (Tag 5, 11, 17, 23, 28) **Verlauf A**: Träger mit 2 µg BMP-2. **Verlauf B**: Träger mit 1 µg BMP-2 und 1 µg EHBMP-2.

3.7 Explantation der Kollagenträger

Am 28. Tag post OP wurden die Tiere mittels CO₂- Asphyxie getötet und die Proben explantiert. Das Weichgewebe wurde mit dem Skalpell entfernt. Unmittelbar nach der Entnahme wurde der Träger mit den Einstellungen 22 kV/ 27 s geröntgt (Faxitron Röntgengerät) und in neutral- gepuffertem 10%igem

Formalin fixiert. Die Röntgenbilder wurden gerahmt und bei einer Auflösung von 72 pixel/ inch eingescannt.

3.8 Messung der Knochenzylinder am pQCT

Das Knochenvolumen und die Knochendichte wurden am Lehrstuhl für Nuklearmedizin der Universität Würzburg mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT, XCT 2000) bestimmt.

Für die Messung wurde eine Vorrichtung aus Lego®- Bauteilen konstruiert. Auf der einen Seite wurde das Explantat mit zwei flexiblen Kunststoffnoppen fixiert, auf der anderen Seite diente ein Gipszylinder zur Aufnahme in die bewegliche CT- Vorrichtung. (siehe **Abbildung 6**)

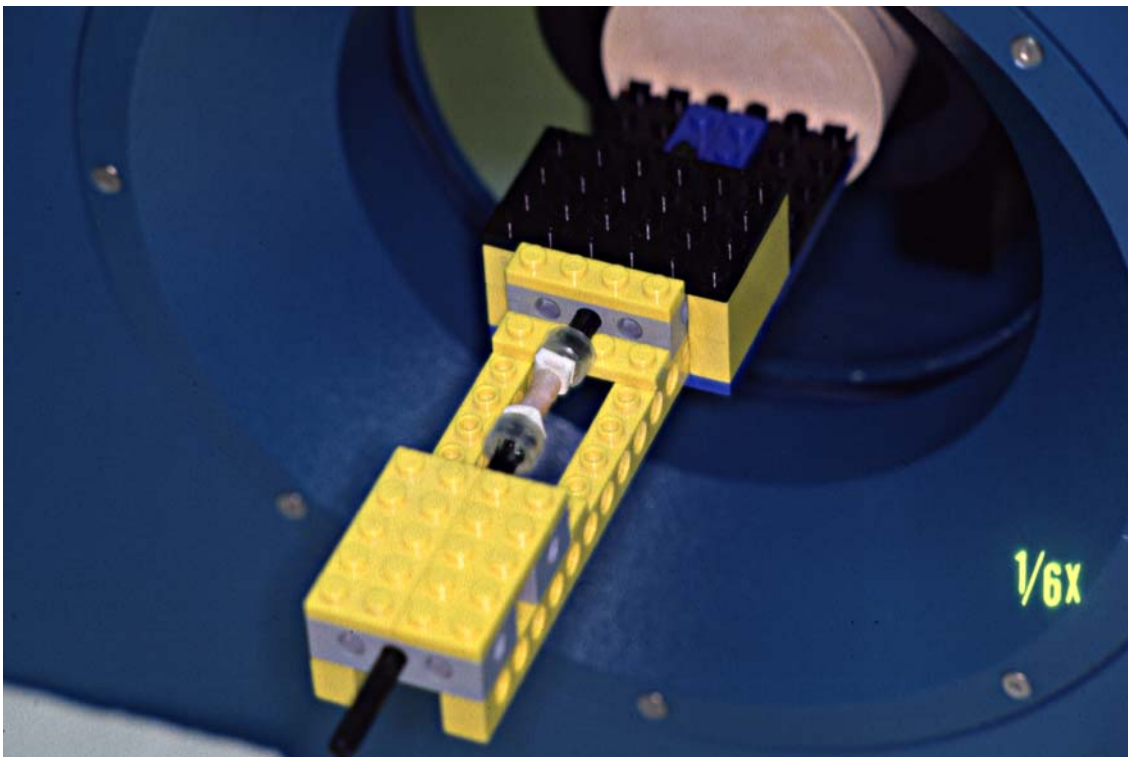


Abbildung 6 Halterungsvorrichtung zur Aufnahme des zu messenden Probenzylinders.

Die für die Auswertung benötigten Bilddateien wurden zur weiteren Verarbeitung auf Speichermedien (ZIP) gesichert.

3.9 Herstellung der histologischen Präparate

3.9.1 Trenndünnschlifftechnik

Infiltration der Knochenzylinder mit Glycolmethacrylat (GMA)

Nachdem die Probenzylinder in den Einmal- Kulturröhrchen mit aqua destillata gespült worden waren, wurden sie mit Glycolmethacrylat in aufsteigender Konzentration (siehe **Tabelle 2**) in Zentrifugenröhrchen entwässert und danach mit Technovit, als Einbettmedium, infiltriert. Die Proben wurden im Dunkeln gelagert.

STUFE	MENGE	VERHÄLTNIS
I	10 ml GMA +10 ml aqua destillata	1: 1
II	14 ml GMA +6 ml aqua destillata	7: 3
III	18 ml GMA +2 ml aqua destillata	9: 1
IV	20 ml GMA	
V	10 ml VLC +10 ml GMA	1: 1
VI	20 ml VLC	
VII	20 ml VLC	
VIII	20 ml VLC	
IX	20 ml VLC	
X	20 ml VLC	

Tabelle 2 Entwässerung und Infiltration der Probenzylinder

Planparallele Einbettung der Probenzylinder

Nach Infiltration wurden die Zylinder in der Mitte des Bodens einer lichtdurchlässigen Einbettform mit einem Tropfen Präzisionskleber (Technovit 7210) fixiert und die Einbettform mit einem lichthärtenden Kunststoff (Technovit 7200) blasenfrei aufgefüllt. Die Aushärtung des Mediums erfolgte im EXAKT-Photopolymerisationsgerät für 10 h bei einem Wellenbereich von 400- 500 nm.

Herstellung der Trenndünnschliffe

Es wurden Präparate von <12 µm Dicke in der von Donath beschriebenen Trenndünnschlifftechnik angefertigt.

Um Mikroradiographien anzufertigen, wurden die Schnitte auf eine Dicke von 100 µm (+-10 µm) poliert. Geröntgt wurde mit dem Faxitron- Röntgengerät mit den Einstellungen 17 kV/ 32 s. Nach Entwicklung (Agfa Curix) wurden die Filme gerahmt und mit dem Diascanner Nikon Scan 32 bei einer Auflösung von 2000 pixel/ inch gescannt.

3.9.2 Färbungen für die Trenndünnschliffe

Van Kossa- Giemsa- Färbung

Bei der van Kossa- Silberfärbung werden alle mineralisierten, kalziumphosphathaltigen Gewebeanteile braun- schwarz gefärbt.

Um ebenfalls die zellulären Gewebeanteile darstellen zu können, wird eine Gegenfärbung nach Giemsa durchgeführt.

Die einzelnen Strukturen werden wie folgt dargestellt:

FÄRBUNG	STRUKTUR	FARBE
Van Kossa	Knorpel- und Knorpelgewebe	braun- schwarz
	Zone der Mineralisation	schwarz granuliert
Giemsa	Mineralisierte Matrix	rosa- zartrosa
	Mastzellen, Knorpelmatrix	rotviolett
	Eosinophile Granula	rot
	Kollagen, Osteoid	blassblau
	Zellen, Zellkerne	blau (unterschiedlich)

Nach Reinigung des Schnittes mit 70%iger Ethanollösung wurde 5%ige Silbernitratlösung mit einer Glaspipette aufgebracht. Dabei wurde auf eine gleichmäßige Benetzung des Präparates geachtet, um eine gleiche Farbintensität an jeder Stelle zu erreichen.

Für ca. 3- 5 min wurde das Präparat unter die UV- Lampe der Präzisionsklebepresse gelegt. Die Farbintensität des Präparates wurde unter dem Mikroskop (Leitz DMR) bei Durchlichteinstellung kontrolliert. Danach wurde der Schnitt mit 5%iger Natriumthiosulfatlösung fixiert und mit aqua destillata abgespült.

Darauf folgte die Gegenfärbung nach Giemsa. Die frisch angesetzte Giemsa-Färbelösung wurde vor Gebrauch zweimal filtriert und dann in einen Färbekasten gefüllt. Die Präparate wurden für 30 min in die Färbelösung getaucht und danach mit aqua destillata abgespült. Danach wurden die Präparate kurz in 3%iger Essigsäure geschwenkt, erneut mit aqua destillata gespült, getrocknet und mit lichthärtendem Kunststoff eingedeckt.

Masson- Trichrom- Goldner- Färbung

Die Masson- Trichrom- Goldner- Färbung ist eine Standardfärbung für die Knochenmorphometrie, da nicht nur die zellulären Gewebeanteile, sondern auch mineralisierte und nicht- mineralisierte Knochenmatrix klar unterschieden werden können.

Die verschiedenen Strukturen werden wie folgt angefärbt:

STRUKTUR	FARBE
Mineralisiertes Knochengewebe, Kollagen	grün- blau
Verkalkte Knorpelmatrix	hellgrün
Zellkerne	blau- schwarz
Zytoplasma, Osteoid	rot
Erythrozyten	orange

Die Beschreibung über die Herstellung der Lösungen befindet sich im Anhang.
(unter B)

Das Präparat wurde für 20 Minuten in Eisenhämatoxylin- Lösung gelegt. Nach fünfminütigem Spülen in Leitungswasser, wurde das Präparat für sieben Minuten in Masson- Lösung (Goldner I), für 5 min in Orange- G- Lösung und für 15 min in Lichtgrün- Lösung gelegt. Nach jedem Färbeschritt folgte ein kurzes Spülen der Präparatoberfläche mit 2%iger Essigsäure. Anschließend wurde der Trenndünnschliff in aqua destillata gespült und nach dem Trocknen eingedeckt.

Toluidinblau- Färbung

Bei dieser Färbung entstehen die Differenzierungsmöglichkeiten durch metachromatische Farbeffekte.

Die Strukturen werden in folgenden charakteristischen Farben angefärbt:

STRUKTUR	FARBE
Knochengewebe	ungefärbt- blasblau
Zellen, Zellkerne	blau
Kollagen, Osteoidsäume	blau
Knorpelgewebe, Mastzellengranula	rotviolett

Die Beschreibung über die Herstellung der Lösung befindet sich im Anhang.
(unter B)

Das Präparat wurde drei Minuten in 3%ige Essigsäure gelegt, danach zwei Minuten in Leitungswasser gespült und getrocknet. Nach zehn- minütigem Agitieren in 10%iger H₂O₂- Lösung, wurde das Präparat 5 min in Toluidinblau- Lösung gelegt, danach ca. 20 s in 70%iger Ethanollösung gespült und nach dem Trocknen eingedeckt.

3.10 Calciumbestimmung

Um die Knochenneubildung der Explantate im Hinblick auf deren Mineralisierungsgrad vergleichen zu können, wurde eine quantitative, kolorimetrische Bestimmung von Calcium bei insgesamt zehn Explantatzylindern durchgeführt.

Das angewandte Calciumbestimmungsverfahren von Sigma Diagnostics basiert auf einer photometrischen Farbintensitätsmessung des aus Calcium und o- Kresophthalein gebildeten Farbkomplexes. Der rote Farbkomplex bildet sich bei einem pH- Wert von 10- 12 mit einem Absorptionsmaximum bei 575 nm.
(siehe **Abbildung 7**)

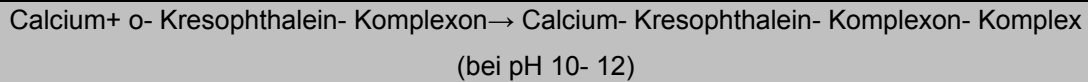


Abbildung 7 Entstehung des Farbkomplexes bei pH 10- 12

Die bei einer Wellenlänge von 575 nm gemessene Farbintensität ist der Calciumkonzentration der Probe direkt proportional.

Nach Zerkleinerung der Proben in eine Partikelgröße von ca. 1 mm³ wurde das Probenpulver mit 1 ml 0,5 M HCl homogenisiert. Nach Spülung des Homogenisator- Kolbens entstand ein Volumen von 4 ml. Anschließend wurde die Suspension für 24 h agitiert, um das vorhandene Calcium vollständig in Lösung zu bringen.

Nach zweimaligem Zentrifugieren wurde der Calciumgehalt nach Herstellerangaben im klaren Überstand bestimmt.

3.11 Auswertung

3.11.1 Röntgen- Verlaufskontrolle

Mit den Röntgenfilmen als Vorlage wurden die verknöcherten Areale (grau-weiß) der Probenzylinder mit einem schwarzen Folienschreiber auf eine transparente Schreibfolie übertragen. Nach Einscannen der Mineralisationsverläufe jedes Zylinders, wurde die schwarz markierte Fläche mit dem Programm Scion Image for Windows berechnet. Mit Hilfe des Programms Stat view wurden die Diagramme für die Verlaufsmessung erstellt.

3.11.2 Röntgen- Explantatmessung

Die Auswertung der Bilddateien erfolgte mit dem Programm Scion Image for Windows und einem selbst erstellten Macro. Nach mehreren Vergleichstests mit Hilfe der Kontrollzylinder wurden zwei Grauwertintervalle festgelegt, die einmal den mineralisierten Knochen (Grauwertintervall des Knochenfensters 0- 145) und das noch nicht mineralisierte Weichgewebe im und um den Zylinder (Grauwertintervall des Weichteilfensters 146- 225) beschrieben. Mit einem

selbst erstellten Macro wurden die Fläche des Knochens/ Weichgewebes, die Mittlere Dichte des Knochens/ Weichgewebes und die Standardabweichung berechnet.

3.11.3 Computertomographie (pQCT)- Messung

Die Auswertung der Bilddateien erfolgte mit dem Programm Scion Image for Windows und einem selbst erstellten Macro. Jeder Probenzylinder wurde in 9-11 Schnitten gescannt. Mit Hilfe der Kontrollzylinder wurde das Knochenfenster bestimmt. Die im Bereich von 0- 110 liegenden Grauwerte wurden als nicht mineralisiertes Weichgewebe und die im Intervall von 110- 255 liegenden Grauwerte wurden als mineralisiertes Knochengewebe beschrieben.

Nach dieser Festlegung wurden bei jedem Probenzylinder die Anzahl der Knochenpixel, das Knochenvolumen und der Calciumgehalt ermittelt.

3.11.4 Histologische Schnitte

Anhand der histologischen Trenndünnschliffe wurde die Osteo- oder Chondroneogenese qualitativ nachgewiesen.

Die Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop (Leitz DMR) mit einer Polarisationseinrichtung und integrierter Photokamera. Die Diapositive wurden gerahmt und mit dem Scanner bei einer Auflösung von 1200 pixel/ inch eingescannt.

3.11.5 Calciummessung

Wie unter Punkt 3.10 beschrieben, wurde von insgesamt zehn Knochenzylindern der Calciumgehalt chemisch bestimmt.

Diese Werte wurden den Werten der computertomographischen Dichtemessung zugeordnet und es wurde eine Eichkurve erstellt. (siehe **Abbildung 8**)

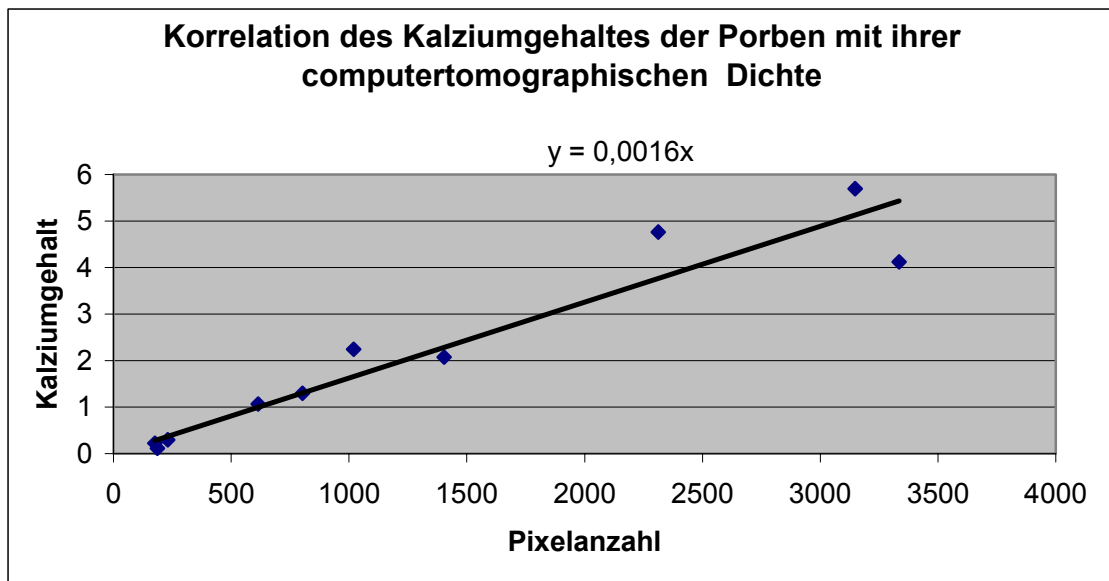


Abbildung 8 Korrelation des Calciumgehaltes der Träger mit ihrer Knochendichte

3.11.6 Statistik

Die quantitative Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels t- Test für ungepaarte Stichproben mit $p < 0,05$. Alle Berechnungen wurden mit StatView für Windows durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Röntgenverlaufskontrolle zur Bestimmung der Knochenneubildung

Die Knochenneubildung nahm nach dem fünften Tag post OP bei allen eingesetzten Proteinfractionen stetig zu. Der Einsatz von EHBMP-2 führte zur geringsten Knochenneubildung. Detaillierte Signifikanzniveaus befinden sich im Anhang. (unter C)

4.1.1 Vergleich von BMP-2 und der Kombination von BMP-2 und EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.1.1.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg

Der Einsatz von BMP-2 zeigte quantitativ eine höhere Knochenneubildung als die Kombination BMP-2/ EHBMP-2 gefolgt von EHBMP-2. Im Hinblick auf die Knochenneubildung weist die Kombination aus BMP-2/ EHBMP-2 tendenziell höhere Werte als EHBMP-2 auf. An Tag 17, 23, 28 weist BMP-2 eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Knochenneubildung als EHBMP-2 auf. (siehe **Abbildung 9**)

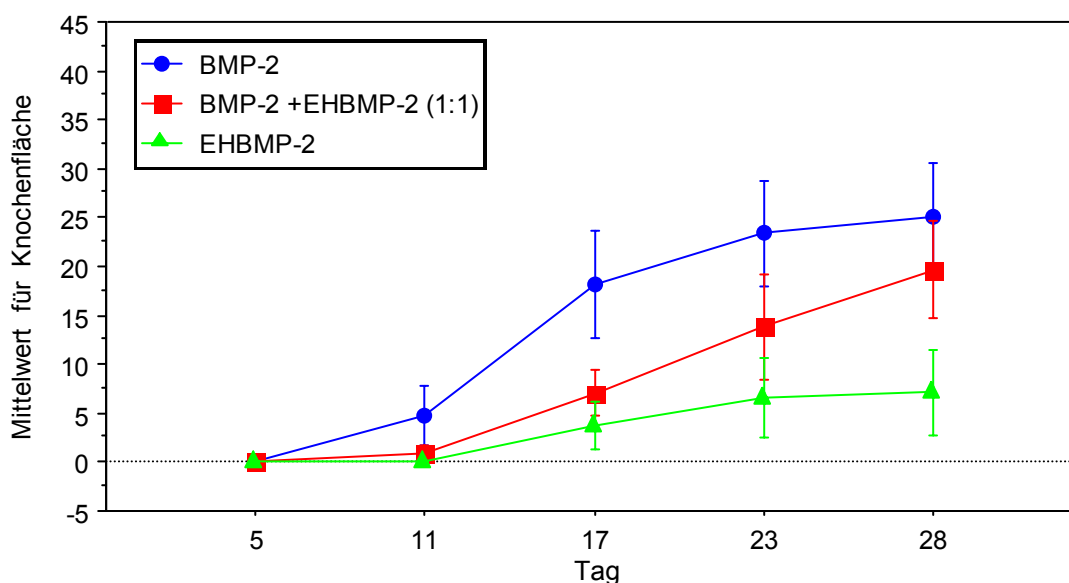


Abbildung 9 Röntgenverlaufskontrolle: BMP-2, dessen Kombination mit EHBMP-2 (1:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 2 μg

4.1.1.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μg

Es konnte eine höhere Knochenneubildungsrate bei Einsatz von BMP-2 Wildtyp und den Kombinationen aus BMP-2/ EHBMP-2 jeweils in den Verhältnissen 1:1 und 3:1 im Vergleich zu EHBMP-2 gezeigt werden. Signifikante Unterschiede zwischen BMP-2 Wildtyp und dessen Kombinationen mit EHBMP-2 konnten nicht nachgewiesen werden. BMP-2 Wildtyp und die Kombinationen aus BMP-2/ EHBMP-2 wiesen eine signifikant höhere Knochenneubildungsrate jeweils an den Tagen 17, 23, 28 als EHBMP-2 auf. Die Knochenneubildungsrate nahm bei allen Proteinen ab dem 17. Tag deutlich ab. (siehe **Abbildung 10**)

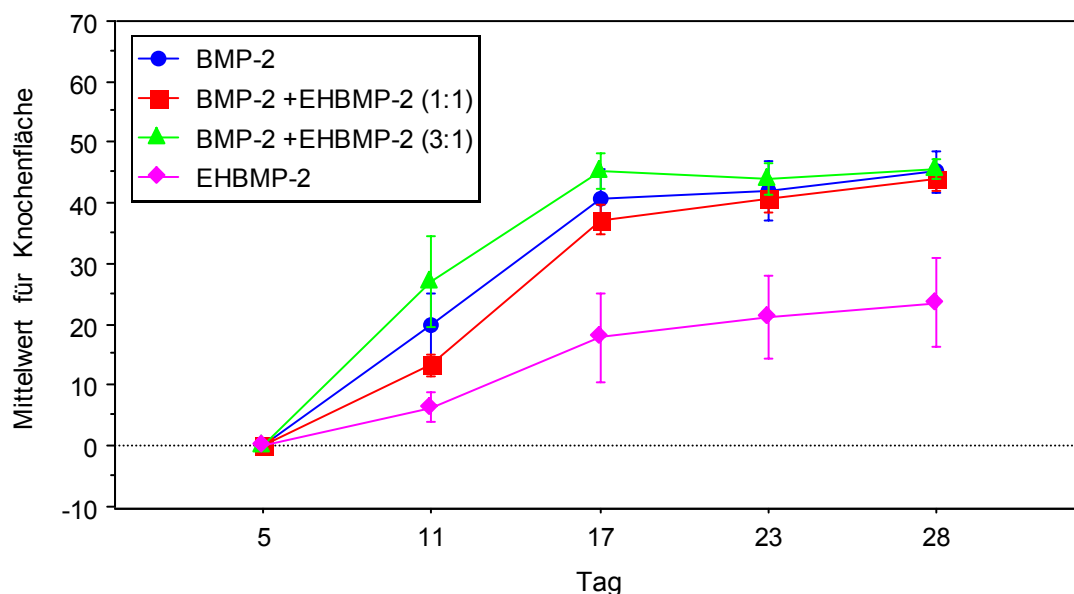


Abbildung 10 Röntgenverlaufskontrolle: BMP-2, dessen Kombinationen mit EHBMP-2 (1:1, 3:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 4 μg

4.1.2 Vergleich von T3 und der Kombination von T3/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.1.2.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg

Die Knochenneubildung war bei T3 an den Tagen 17 und 28 signifikant ($p < 0,05$) höher als bei der Proteinkombination aus T3/ EHBMP-2 und an den Tagen 11, 17, 23, 28 signifikant höher als bei EHBMP-2. Die Kombination aus

T3/ EHBMP-2 und die Variante EHBMP-2 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. (siehe **Abbildung 11**)

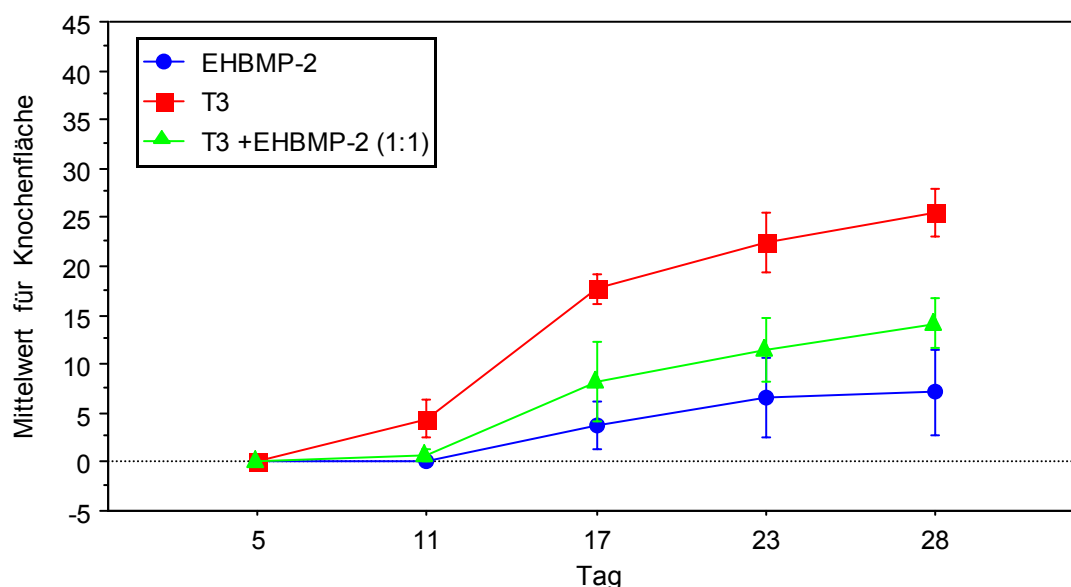


Abbildung 11 Röntgenverlaufskontrolle: T3, dessen Kombination mit EHBMP-2 (1:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 2 μ g

4.1.2.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μ g

Die Proteinkombination aus T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 führt tendenziell zu einer höheren Knochenneubildung als T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1, gefolgt von T3 und EHBMP-2. An den Tagen 17, 23, 28 weist T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Knochenbildung als T3 und EHBMP-2 auf.

Bei allen Proteinen nimmt die Knochenneubildungsrate nach dem 17. Tag ab. (siehe **Abbildung 12**)

4.1.3 Vergleich von T4 und der Kombination von T4/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.1.3.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μ g

Die Variante T4, gefolgt von der Proteinkombination aus T4/ EHBMP-2 und EHBMP-2 wies tendenziell die größte Knochenneubildung auf, wobei sich

sowohl T4 und EHBMP-2 als auch T4/ EHBMP-2 und EHBMP-2 jeweils an den Tagen 17, 23, 28 signifikant ($p < 0,05$) unterschieden. (siehe **Abbildung 13**)

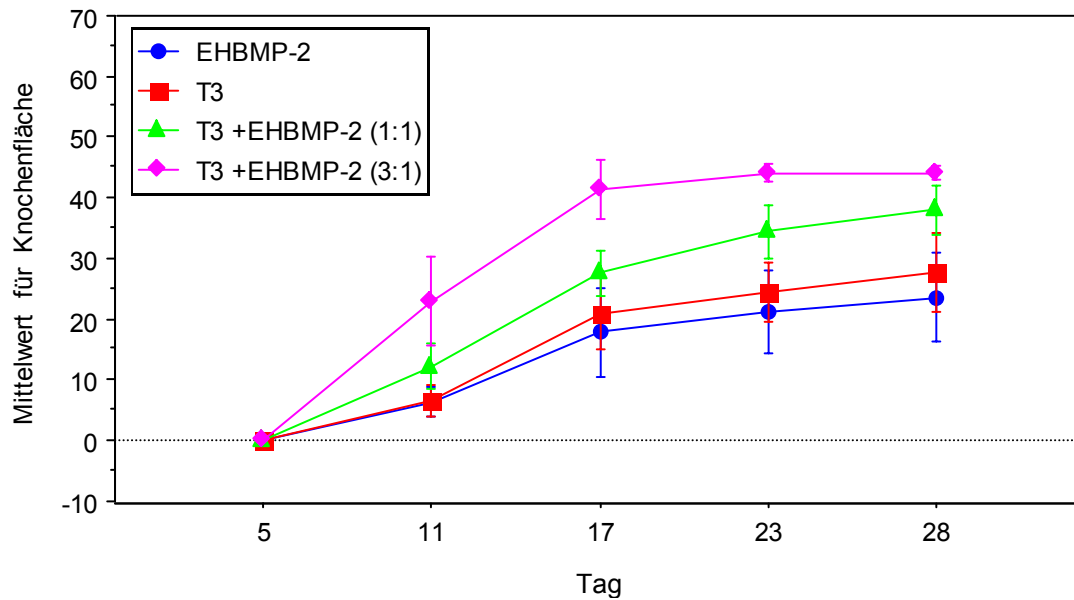


Abbildung 12 Röntgenverlaufskontrolle: T3, dessen Kombinationen mit EHBMP-2 (1:1, 3:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 4 μ g

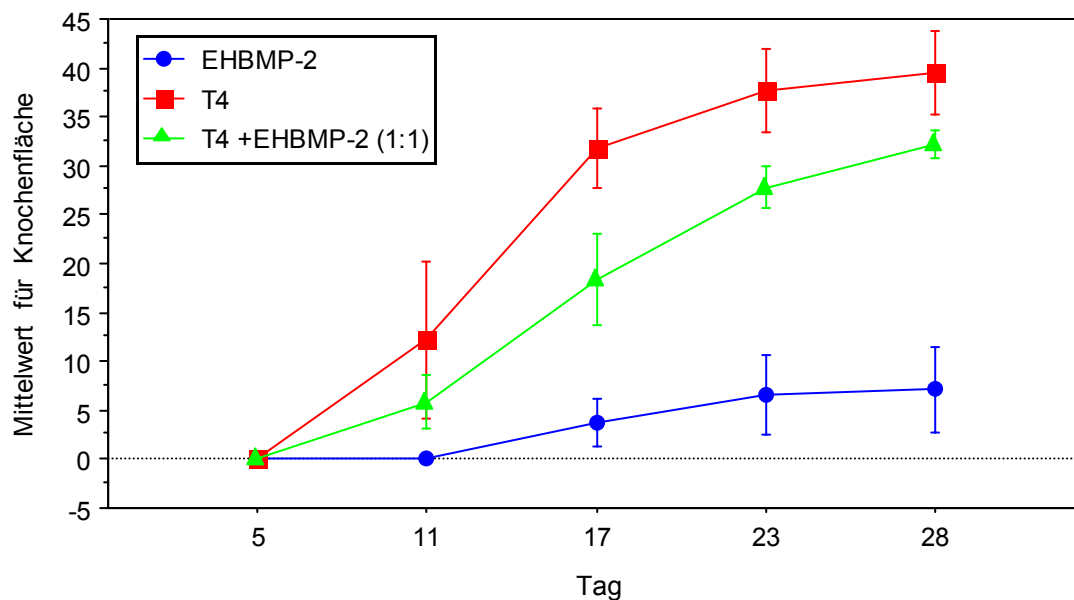


Abbildung 13 Röntgenverlaufskontrolle: T4, dessen Kombination mit EHBMP-2 (1:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 2 μ g

4.1.3.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μg

Die Variante T4, die Proteinkombinationen aus T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Knochenneubildungsrate auf. Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bestand zwischen T4 und EHBMP-2, T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und EHBMP-2 sowie T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 und EHBMP-2 jeweils an den Tagen 11, 17, 23, 28. (siehe **Abbildung 14**)

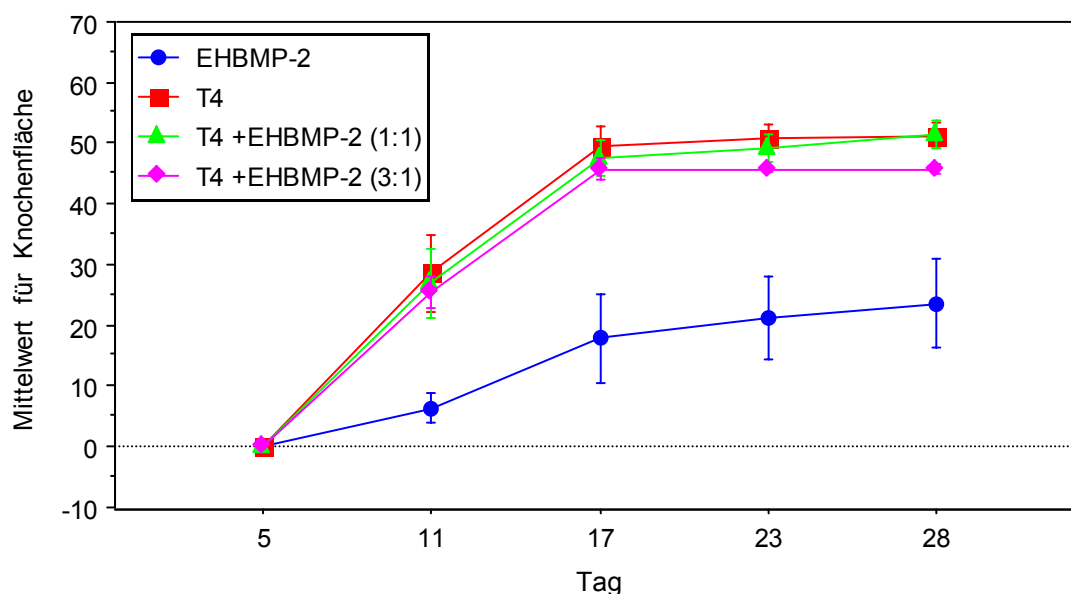


Abbildung 14 Röntgenverlaufskontrolle: T4, dessen Kombinationen mit EHBMP-2 (1:1, 3:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 4 μg

4.2 Röntgenologische Bestimmung der Knochenfläche und der Knochendichte am Explantatzylinder

Die Variante EHBMP-2 wies bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg und 4 μg die niedrigste Knochenneubildung und Knochendichte auf. Detaillierte Statistiken befinden sich im Anhang. (unter C)

4.2.1 Vergleich von BMP-2 und der Kombination von BMP-2/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.2.1.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg

Am Explantationstag wies BMP-2 eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Knochenneubildung als die Kombination BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und EHBMP-2 auf. Durch den Einsatz der Kombination BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 wurde eine höhere Knochenbildung als durch EHBMP-2 erreicht. Die mittlere Knochendichte war bei BMP-2 und der Kombination BMP-2/ EHBMP-2 tendenziell höher als bei EHBMP-2. (siehe **Abbildung 15**)

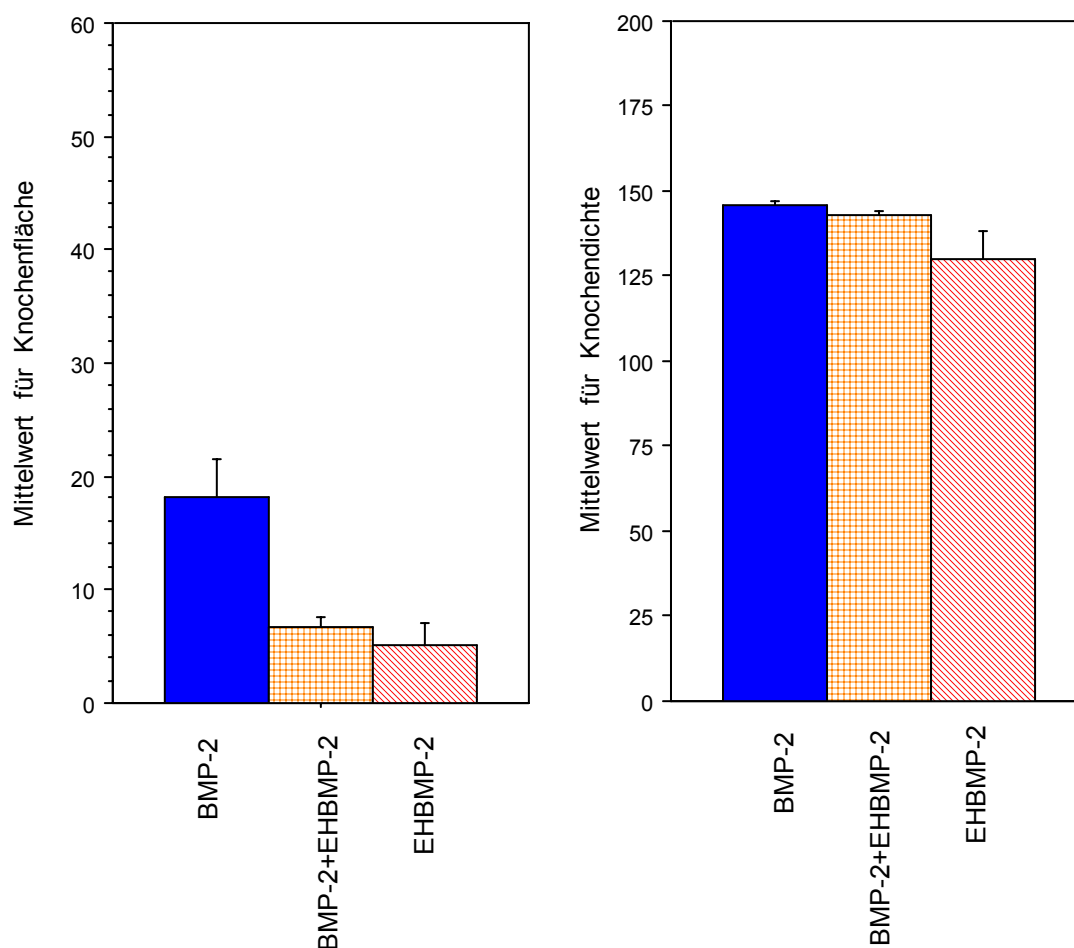


Abbildung 15 Knochenfläche und Knochendichte: BMP-2, dessen Kombination mit EHBMP-2 (1:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 2 μg

4.2.1.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μg

BMP-2 wies am Explantationstag tendenziell die höchste Knochenneubildung auf; darauf folgen die Proteinkombinationen BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1, die sich nicht signifikant unterscheiden. EHBMP-2 wies signifikant ($p < 0,05$) die niedrigste Knochenneubildung auf.

Die mittlere Knochendichte von BMP-2, der Kombination BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 und der Kombination BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. EHBMP-2 wies signifikant ($p < 0,05$) die niedrigste Knochendichte auf. (siehe **Abbildung 16**)

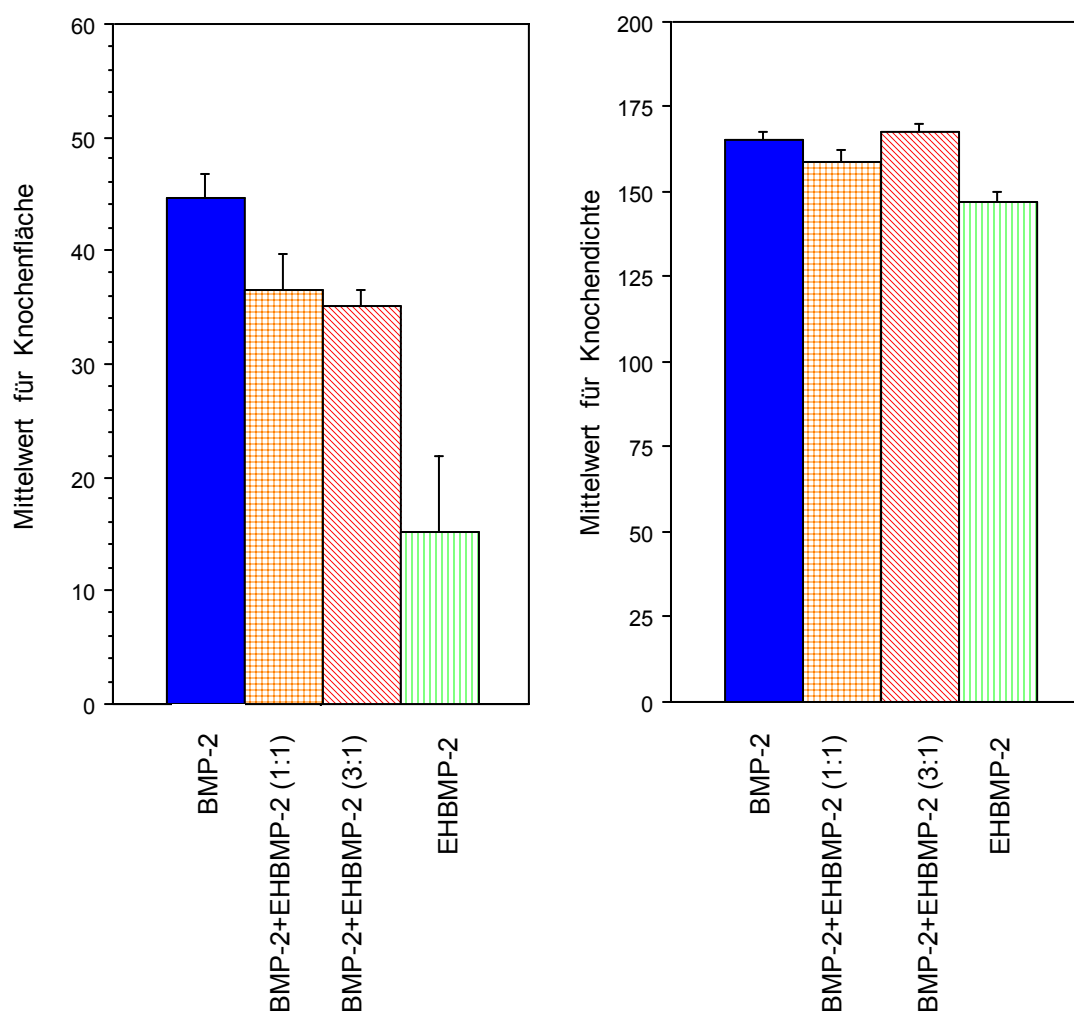


Abbildung 16 Knochenfläche und Knochendichte: BMP-2, dessen Kombinationen mit EHBMP-2 (1:1, 3:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 4 μg

4.2.2 Vergleich von T3 und der Kombination von T3/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.2.2.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg

T3 erreicht eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Knochenneubildungsrate und eine höhere berechnete mittlere Dichte als die Proteinkombination T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1. Zwischen der Proteinkombination T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und EHBMP-2 ist kein signifikanter Unterschied festzustellen. (siehe **Abbildung 17**)

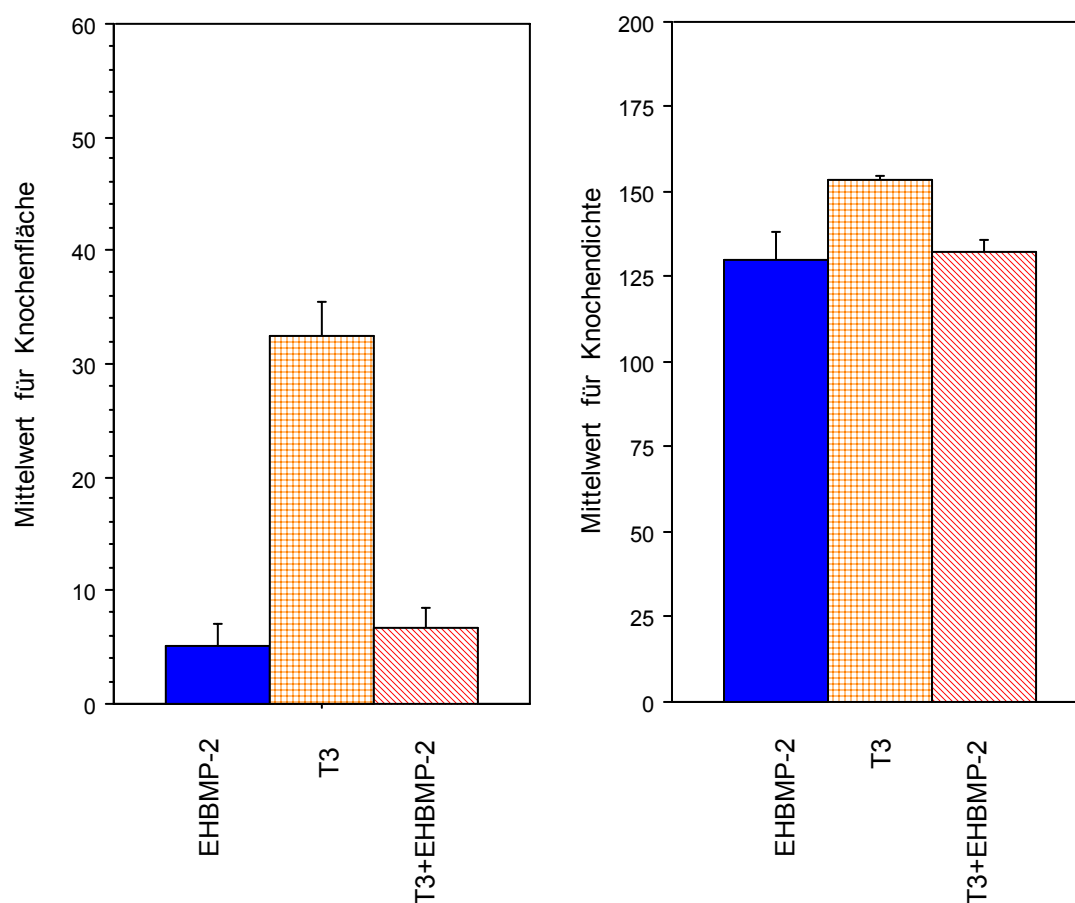


Abbildung 17 Knochenfläche und Knochendichte: T3, dessen Kombination mit EHBMP-2 (1:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 2 μg

4.2.2.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μg

Die Proteinkombination T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 wies gefolgt von der Proteinkombination T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und T3 tendenziell die höchste Knochenneubildung und die höchste mittlere Knochendichte auf. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bestehen zwischen der Proteinkombination T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1, T3 und EHBMP-2. (siehe **Abbildung 18**)

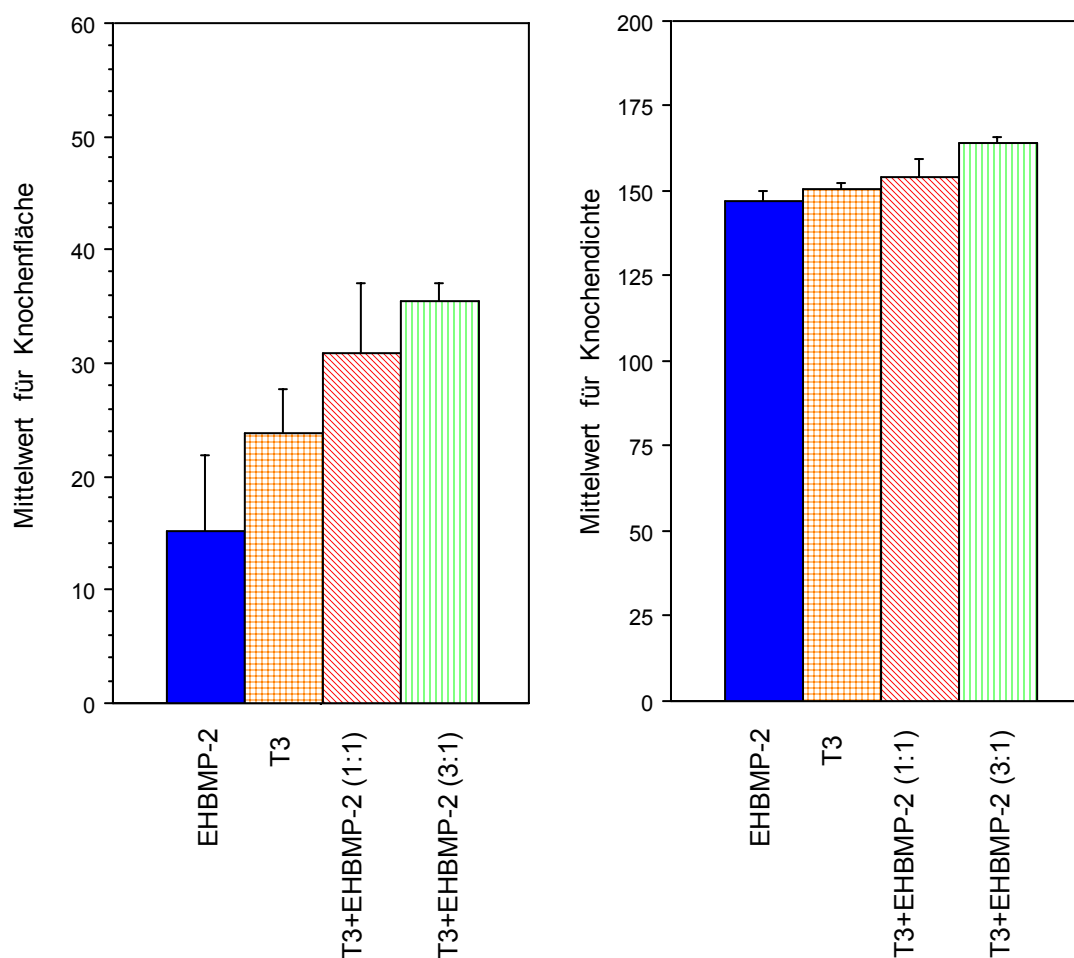


Abbildung 18 Knochenfläche und Knochendichte: T3, dessen Kombinationen mit EHBMP-2 (1:1, 3:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 4 μg

4.2.3 Vergleich von T4 und der Kombination von T4/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.2.3.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg

T4 weist signifikant ($p < 0,05$) die höchste Knochenneubildung auf, gefolgt von der Proteinkombination T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und EHBMP-2.

T4 weist tendenziell die höchste mittlere Knochendichte auf. Die Kombination T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 führt signifikant ($p < 0,05$) zu einer höheren Knochendichte als EHBMP-2. (siehe **Abbildung 19**)

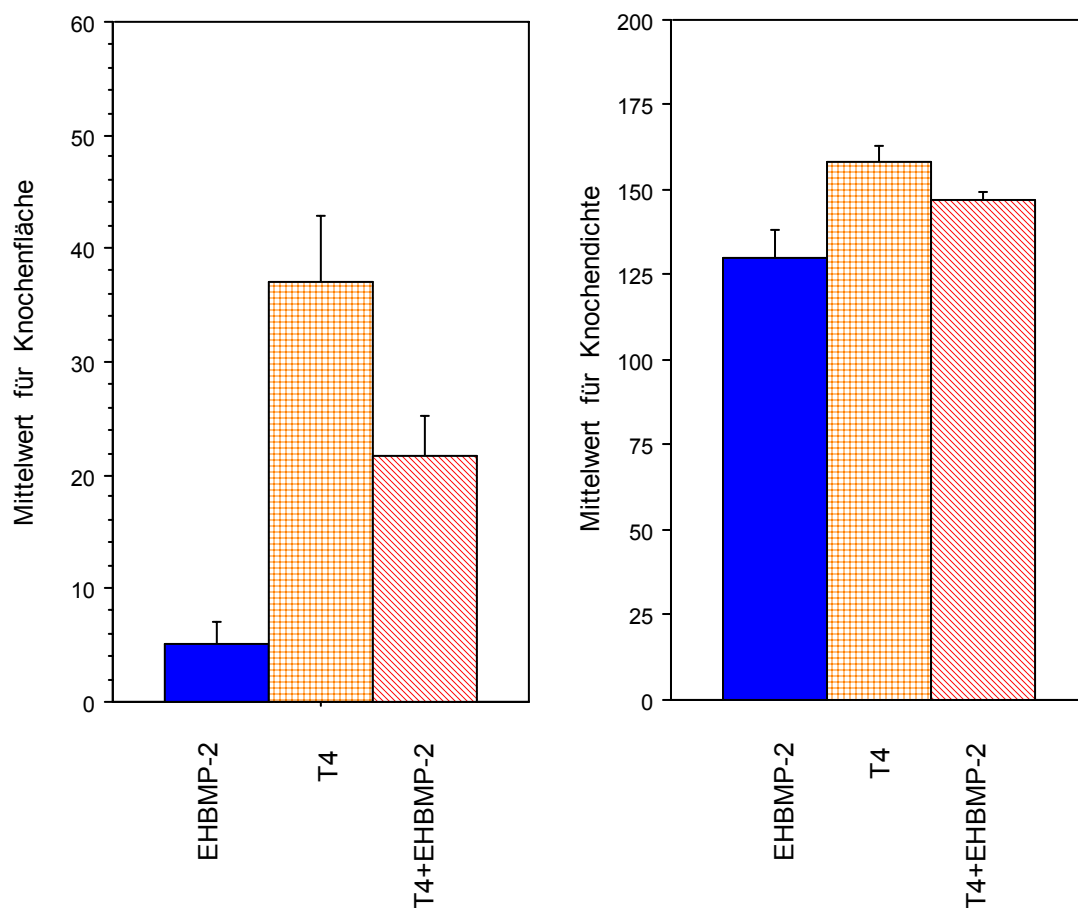


Abbildung 19 Knochenfläche und Knochendichte: T4, dessen Kombination mit EHBMP-2 (1:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 2 μg

4.2.3.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μg

T4 besitzt gefolgt von der Proteinkombination T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 tendenziell die höchste Knochenneubildung. T4 und die Proteinkombinationen erreichen signifikant ($p < 0,05$) eine höhere Knochenbildung als EHBMP-2.

Die mittlere Knochendichte ist bei der Kombination T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1, gefolgt von T4 und der Kombination T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 höher als bei Einsatz von EHBMP-2. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) bestehen zwischen T4 und den Proteinkombinationen gegenüber EHBMP-2. (siehe **Abbildung 20**)

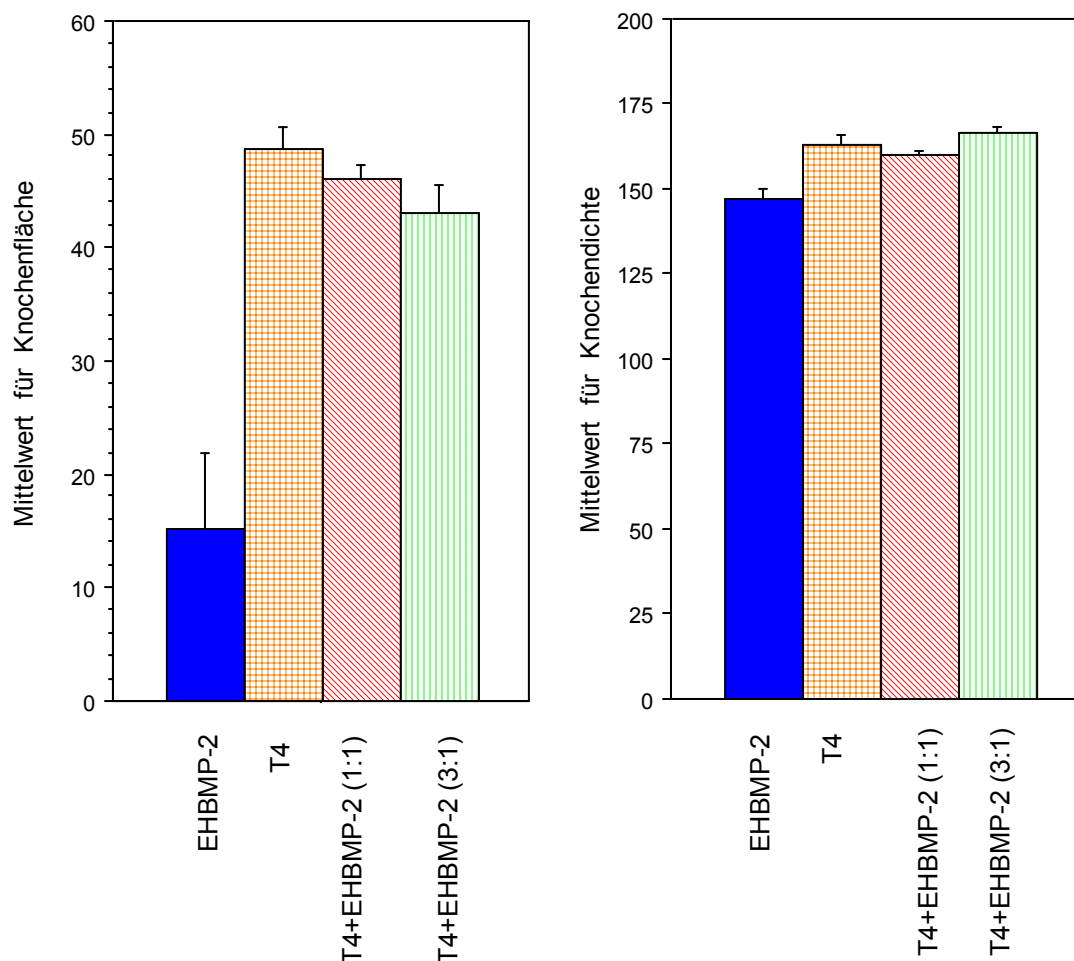


Abbildung 20 Knochenfläche und Knochendichte: T4, dessen Kombinationen mit EHBMP-2 (1:1, 3:1) und EHBMP-2, Gesamtproteinmenge 4 μg

4.3 Computertomographische Messung

Nach computertomographischer Messung und Festlegung des Knochen- und Weichteilfensters, wurden die Summe der Knochenpixel und das relative Knochenvolumen bezogen auf das berechnete Normzylindervolumen für jeden Zylinder bestimmt. Mit Hilfe der Eichkurve konnte der Kalziumgehalt errechnet werden. Die Signifikanzniveaus entsprechen jeweils denen der Flächenbestimmung der Explantatzylinder und befinden sich detailliert im Anhang. (unter C)

4.3.1 Vergleich von BMP-2 und der Kombination von BMP-2/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.3.1.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg

BMP-2 wies gefolgt von der Proteinkombination BMP-2/ EHBMP-2 und dem Protein EHBMP-2 die höchste Summe an Knochenpixel, das höchste relative Knochenvolumen und den höchsten mittleren Kalziumgehalt der Proteingruppen auf.

Die Summe der Knochenpixel und der Kalziumgehalt bei BMP-2 in Kombination mit EHBMP-2 (576/ 0,922 mg) weisen ca. 42% von dem des Proteins BMP-2 (1378/ 2,205 mg) auf. (siehe **Tabelle 3**)

	Summe der Knochenpixel		relatives Knochenvolumen des Normzylindervolumens [%]		Kalziumgehalt der Proben [mg]	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
BMP-2 +EHBMP-2	576,000	114,005	13,009	2,573	0,922	0,182
BMP-2	1378,000	262,548	31,106	5,926	2,205	0,420
EHBMP-2	441,000	119,125	9,962	2,689	0,706	0,191

Tabelle 3 Messwerte der computertomographischen Auswertung, Gesamtproteinmenge 2 μg

4.3.1.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg

BMP-2 wies gefolgt von der Proteinkombination BMP-2/ EHBMP-2 (1:1), der Proteinkombination BMP-2/ EHBMP-2 (3:1) und EHBMP-2 die höchste Summe an Knochenpixel, das höchste relative Knochenvolumen und den höchsten mittleren Kalziumgehalt der Proteingruppen auf. Der Unterschied zwischen BMP-2 und BMP-2/ EHBMP-2 ist wesentlich geringer als bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg.

Die Summe der Knochenpixel und der Kalziumgehalt bei BMP-2 in Kombination mit EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und 3:1 (3379/ 5,406 mg und 3291/ 5,266 mg) weisen zwischen 93% und 95% von dem des Proteins BMP-2 (3539/ 5,662 mg) auf. (siehe **Tabelle 4**)

	Summe der Knochenpixel		relatives Knochenvolumen des Normzylindervolumens [%]		Kalziumgehalt der Proben [mg]	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
BMP-2 +EHBMP-2 (1:1)	3379,000	64,316	76,256	1,452	5,406	0,103
BMP-2 +EHBMP-2 (3:1)	3291,000	150,469	74,277	3,396	5,266	0,241
BMP-2	3539,000	147,961	79,863	3,339	5,662	0,237
EHBMP-2	1683,000	488,439	37,985	11,024	2,693	0,782

Tabelle 4 Messwerte der computertomographischen Auswertung, Gesamtproteinmenge 4µg

4.3.2 Vergleich von T3 und der Kombination von T3/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.3.2.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg

Die Variante T3 wies gefolgt von der Proteinkombination T3/ EHBMP-2 und dem Protein EHBMP-2 die höchste Summe an Knochenpixel, das höchste relative Knochenvolumen und den höchsten mittleren Kalziumgehalt der Proteingruppen auf.

Die Summe der Knochenpixel und der Kalziumgehalt bei T3/ EHBMP-2 (663/ 1,061 mg) weisen ca. 29% von dem des Proteins T3 (2296/ 3,674 mg) auf. (siehe **Tabelle 5**)

	Summe der Knochenpixel		relatives Knochenvolumen des Normzylindervolumens [%]		Kalziumgehalt der Proben [mg]	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
T3 +EHBMP-2	663,000	285,998	14,968	6,455	1,061	0,458
T3	2296,000	243,116	51,825	5,487	3,674	0,389
EHBMP-2	441,000	119,125	9,962	2,689	0,706	0,191

Tabelle 5 Messwerte der computertomographischen Auswertung, Gesamtproteinmenge 2 μ g

4.3.2.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μ g

Bei der Gesamtproteinmenge von 4 μ g erreichte die Kombination T3/ EHBMP-2 (3:1) gefolgt von der Kombination T3/ EHBMP-2 (1:1), der Varianten T3 und EHBMP-2 die höchsten Werte in Bezug auf die Summe der Knochenpixel, dem relativen Knochenvolumen und dem Kalziumgehalt.

Die Summe der Knochenpixel und der Kalziumgehalt bei T3 (2348/ 3,756 mg) weisen zwischen 72% und 89% von dem der Proteinkombination T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und 3:1 (2639/ 4,222 mg und 3256/ 5,210 mg) auf. (siehe **Tabelle 6**)

	Summe der Knochenpixel		relatives Knochenvolumen des Normzylindervolumens [%]		Kalziumgehalt der Proben [mg]	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
T3 +EHBMP-2 (1:1)	2639,000	288,725	59,553	6,516	4,222	0,462
T3 +EHBMP-2 (3:1)	3256,000	120,756	73,487	2,725	5,210	0,193
T3	2348,000	372,434	52,988	9,398	3,756	0,666
EHBMP-2	1683,000	488,439	37,985	11,024	2,693	0,782

Tabelle 6 Messwerte der computertomographischen Auswertung, Gesamtproteinmenge 4 μ g

4.3.3 Vergleich von T4 und der Kombination von T4/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

4.3.3.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg

Die Variante T4 wies gefolgt von der Proteinkombination T4/ EHBMP-2 und EHBMP-2 die höchste Summe an Knochenpixel, das höchste relative Knochenvolumen und den höchsten mittleren Kalziumgehalt der Proteingruppen auf.

Die Summe der Knochenpixel und der Kalziumgehalt bei der Kombination T4/ EHBMP-2 (1757/ 2,812 mg) weisen ca. 65% von dem des Proteins T4 (2684/ 4,294 mg) auf. (siehe **Tabelle 7**)

	Summe der Knochenpixel		relatives Knochenvolumen des Normzylindervolumens [%]		Kalziumgehalt der Proben [mg]	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
T4 +EHBMP-2	1757,000	211,757	39,660	4,779	2,812	0,339
T4	2684,000	391,034	60,573	8,826	4,294	0,626
EHBMP-2	441,000	119,125	9,962	2,689	0,706	0,191

Tabelle 7 Messwerte der computertomographischen Auswertung, Gesamtproteinmenge 2µg

4.3.3.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg

Die Variante T4 wies gefolgt von der Proteinkombination T4/ EHBMP-2 (1:1), der Proteinkombination T4/ EHBMP-2 (3:1) und EHBMP-2 die höchste Summe an Knochenpixel, das höchste relative Knochenvolumen und den höchsten mittleren Kalziumgehalt der Proteingruppen auf.

Die Summe der Knochenpixel und der Kalziumgehalt bei T4 in Kombination mit EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und 3:1 (3511/ 5,617 mg und 3341/ 5,346 mg) weisen zwischen 93% und 98% von dem des Proteins T4 (3586/ 5,738 mg) auf. (siehe **Tabelle 8**)

	Summe der Knochenpixel		relatives Knochenvolumen des Normzylindervolumens [%]		Kalziumgehalt der Proben [mg]	
	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler	Wert	Standardfehler
T4 +EHBMP-2 (1:1)	3511,000	100,093	79,238	2,259	5,617	0,160
T4 +EHBMP-2 (3:1)	3341,000	113,721	75,415	2,567	5,346	0,182
T4	3586,000	205,457	80,944	4,637	5,738	0,329
EHBMP-2	1683,000	488,439	37,985	11,024	2,693	0,782

Tabelle 8 Messwerte der computertomographischen Auswertung, Gesamtproteinmenge 4 μ g

4.4 Histologische Auswertung

4.4.1 Vergleich von BMP-2 Wildtyp und der Kombination von BMP-2/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μ g

BMP-2 gefolgt von der Kombination aus BMP-2/ EHBMP-2 und der Varianten EHBMP-2 wies die höchste Knochenneubildung auf. (siehe **Abbildung 21a- c**)

Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 μ g

BMP-2 gefolgt von der Kombination aus BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1, und der Kombination aus BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 zeigte die höchste Knochenneubildung. Bei EHBMP-2 kam es zur niedrigsten Knochenbildung. (siehe **Abbildung 22a- d**)

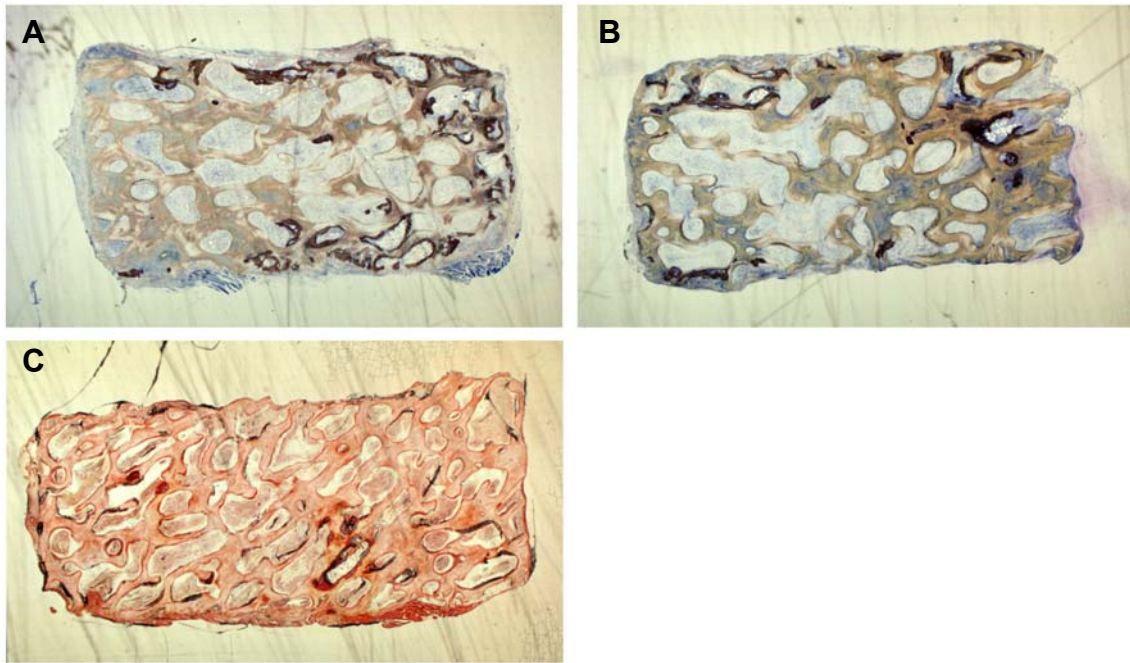


Abbildung 21a- c Übersicht der Träger, 28 Tage postoperativ, Vergrößerung 1:1,6. 2 µg BMP-2 (a), 1 µg BMP-2 und 1 µg EHBMP-2 (b): mineralisierter Knochen braun/ schwarz, nicht mineralisiertes Kollagen leicht bräunlich dargestellt, Van- Kossa- und Giemsa- Färbung; 2 µg EHBMP-2 (c): mineralisierter Knochen blau- grün, nicht mineralisiertes Kollagen leicht rötlich/ orange, Osteoid rot/ orange dargestellt; Masson- Trichrom- Goldner- Färbung

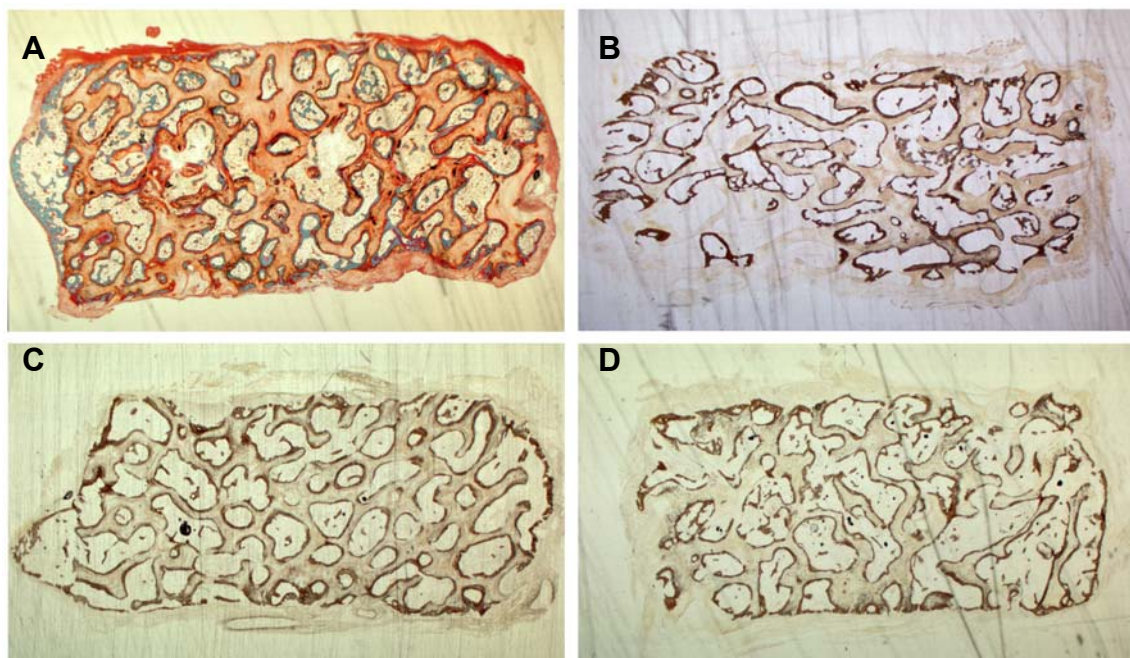


Abbildung 22a- d Übersicht der Träger, 28 Tage postoperativ, Vergrößerung 1:1,6. 4 µg BMP-2 (a), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung; 2 µg BMP-2 und 2 µg EHBMP-2 (b), 3 µg BMP-2 und 1 µg EHBMP-2 (c), 4 µg EHBMP-2 (d), Van- Kossa- Färbung

4.4.2 Vergleich von T3 und der Kombination von T3/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg

T3 gefolgt von der Kombination aus T3/ EHBMP-2 und der Varianten EHBMP-2 führte zur höchsten Knochenneubildung. (siehe **Abbildung 23a- c**)

Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg

Die Kombination aus T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1, gefolgt von der Kombination aus T3/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1, und T3 wies die höchste Knochenneubildung auf. Die niedrigste Knochenneubildung zeigte EHBMP-2. (siehe **Abbildung 24a- d**)

4.4.3 Vergleich von T4 und der Kombination von T4/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg

T4 gefolgt von der Kombination aus T4/ EHBMP-2 und der Varianten EHBMP-2 wies die höchste Knochenneubildung auf. (siehe **Abbildung 25a- c**)

Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg

T4 gefolgt von der Kombination aus T4/ EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und der Kombination aus BMP-2/ EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 zeigte die höchste Knochenneubildung. Die Variante EHBMP-2 führte zur niedrigsten Knochenneubildung. (siehe **Abbildung 26a- d**)

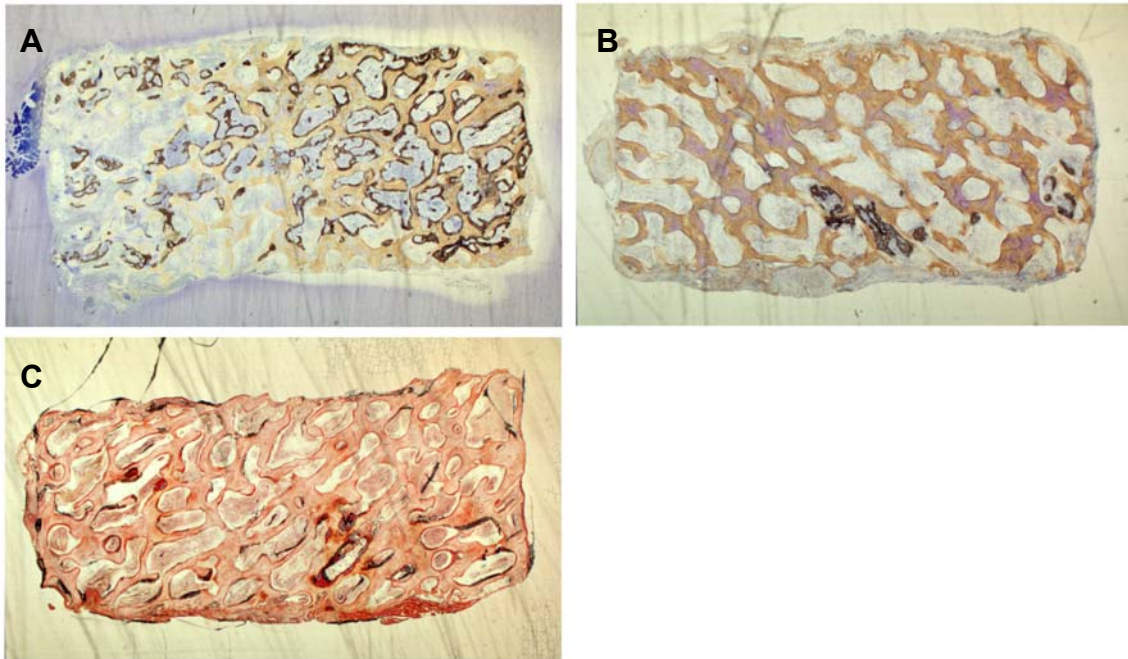


Abbildung 23a- c Übersicht der Träger, 28 Tage postoperativ, Vergrößerung 1:1,6. 2 μ g T3 (a), 1 μ g T3 und 1 μ g EHBMP-2 (b), Van- Kossa- und Giemsa- Färbung; 2 μ g EHBMP-2 (c), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung

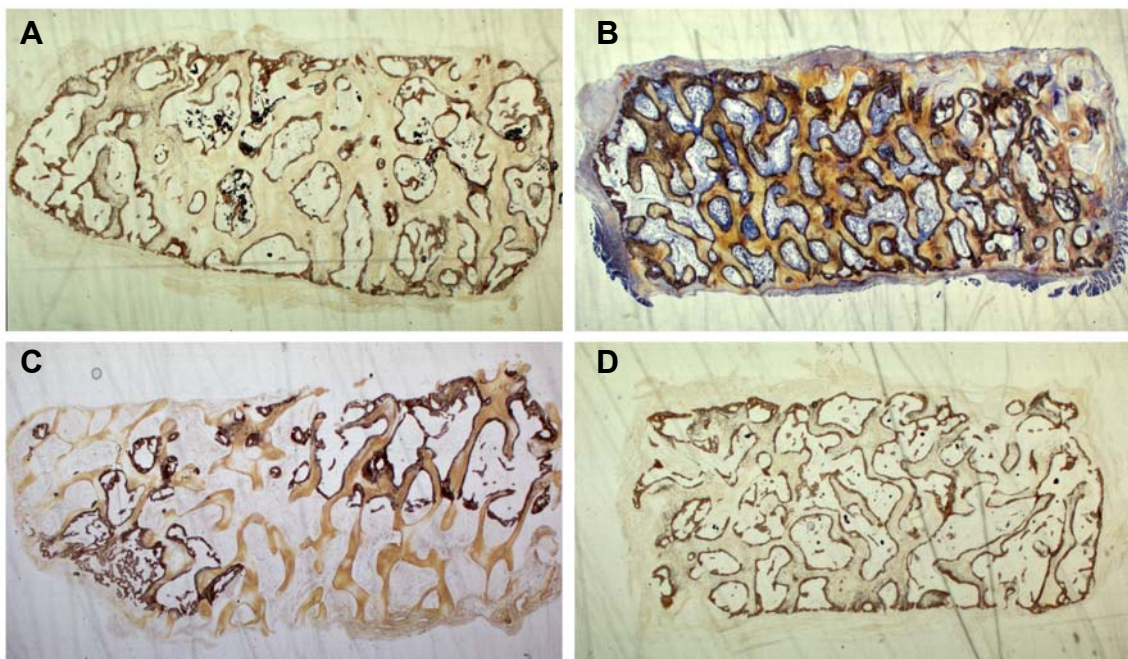


Abbildung 24a- d Übersicht der Träger, 28 Tage postoperativ, Vergrößerung 1:1,6. 3 μ g T3 und 1 μ g EHBMP-2 (a), 4 μ g T3 (c), 4 μ g EHBMP-2 (d), Van- Kossa- Färbung; 2 μ g T3 und 2 μ g EHBMP-2 (b), Van- Kossa- und Giemsa- Färbung

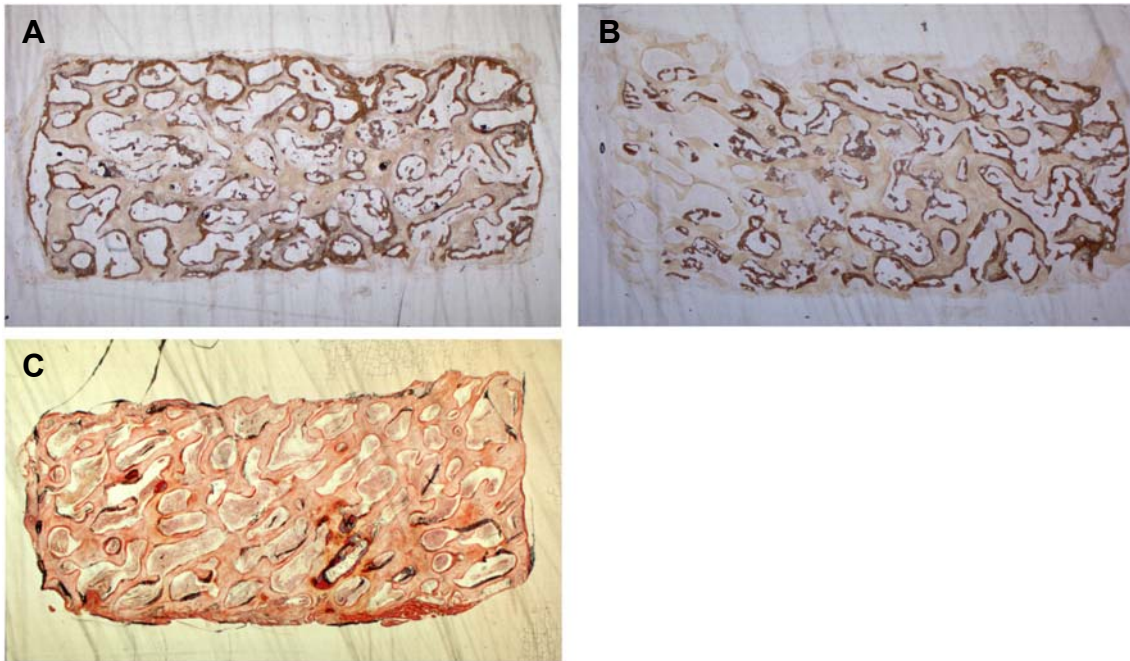


Abbildung 25a- c Übersicht der Träger, 28 Tage postoperativ, Vergrößerung 1:1,6. 2 µg T4 (a), 1 µg T4 und 1 µg EHBMP-2 (b), Van- Kossa- Färbung; 2 µg EHBMP-2 (c), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung

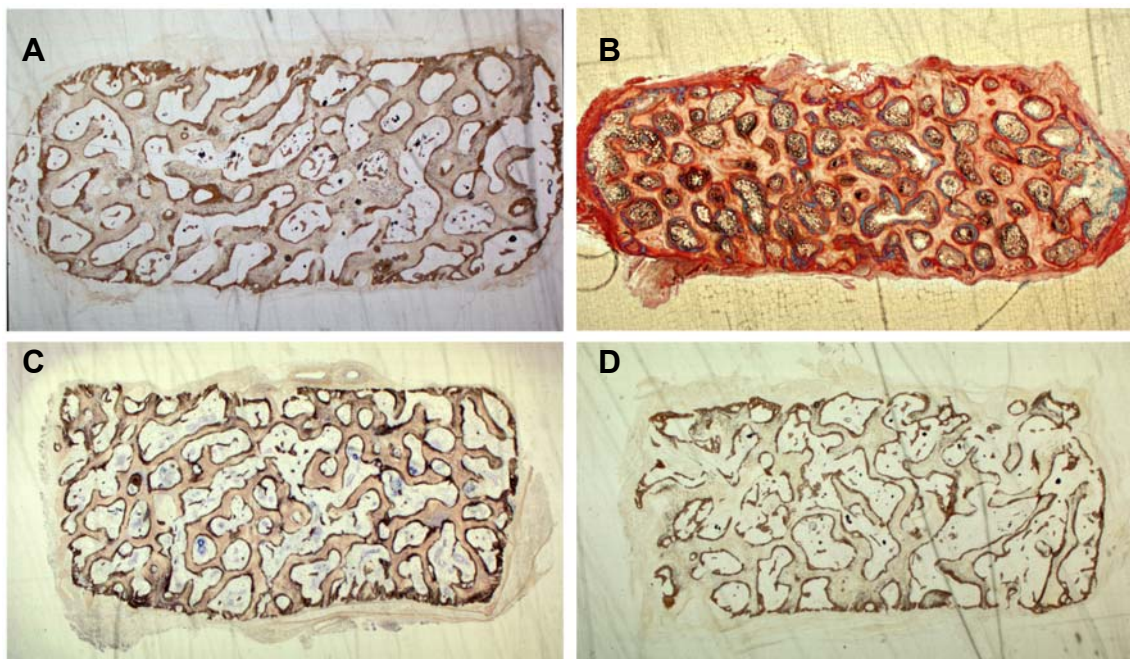


Abbildung 26a- d Übersicht der Träger, 28 Tage postoperativ, Vergrößerung 1:1,6. 4 µg T4 (a), 4 µg EHBMP-2 (d), Van- Kossa- Färbung; 2 µg T4 und 2 µg EHBMP-2 (b), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung; 3 µg T4 und 1 µg EHBMP-2 (c), Van- Kossa- und Giemsa- Färbung

4.4.4 Allgemeine histologische Beobachtungen

Sowohl die Art der Mineralisation wie auch der strukturelle Aufbau des gebildeten Knochens verlaufen bei allen eingesetzten Proteinen nach dem gleichen Prinzip. Gemäß den vorangegangenen Untersuchungen bestehen jedoch deutliche Unterschiede im Ausmaß der Knochenneubildung.

Vom Interstitium her war eine direkte Mineralisation des Trägers zu beobachten, wobei die Knochenneubildung entlang der Trabekelstruktur des Kollagenträgers verlief. (siehe **Abbildungen 27, 28**)

Häufig zu beobachten war eine spritzerförmige Mineralisation des Kollagenträgers. (siehe **Abbildungen 29a, b- 32**)

Bei den Schliffen, die mit der Trichromfärbung nach Masson- Goldner gefärbt wurden, lässt sich zwischen neugebildetem Knochen und Kollagenmatrix eine deutliche Osteoidschicht, die rot/ orange angefärbt ist, erkennen. (siehe **Abbildungen 31- 33**)

Im Osteoid und im bereits mineralisierten Knochengewebe fanden sich Osteoblasten sowie eingemauerte Osteozyten. Osteoklasten waren gelegentlich an der Oberfläche des mineralisierten Knochengewebes zu erkennen. (siehe **Abbildungen 32, 27**) Die Markräume, die sich zwischen neugebildetem Knochen und der Kollagenmatrix befanden enthielten unterschiedliche Anteile von Fettzellen und hämatopoetischen Elementen.

Das Ausmaß der Knochenneubildung war abhängig von der Dosis der eingesetzten Proteinfractionen.

In den Leerproben, die nicht mit Protein dotiert wurden, war keine Knochenneubildung zu erkennen. Bei der van Kossa- und Giemsa- Färbung stellte sich das Kollagen des Trägers durchgehend leicht bräunlich dar. (siehe **Abbildung 35**) In den Zwischenräumen befand sich mäßig fibröses Bindegewebe. (siehe **Abbildungen 36a, b**) Es gab keine Anzeichen auf Osteoneogenese.

Die qualitative histologische Untersuchung der Trenndünnschliffe bestätigte die Ergebnisse der röntgenologischen Auswertung in Bezug auf die Verlaufskontrolle, die Messungen am explantierten Träger, die Ergebnisse der computertomographischen Messung und die Bestimmung des Calciumgehaltes.

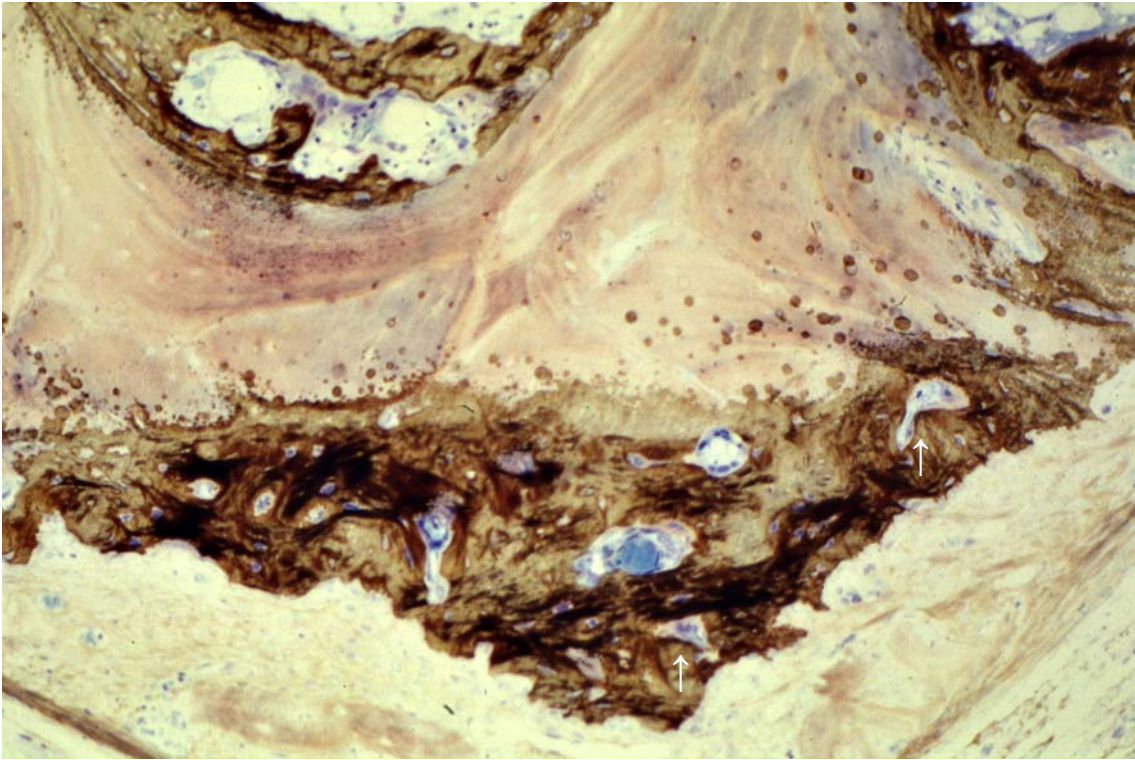


Abbildung 27 3 μg T4 und 1 μg EHBMP-2, 28 Tage postoperativ, gebildeter Knochen stellt sich braun/ schwarz dar, spritzerartige Mineralisation des Trägers. Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten (\uparrow), Van- Kossa- und Giemsa- Färbung, Vergrößerung 1:20

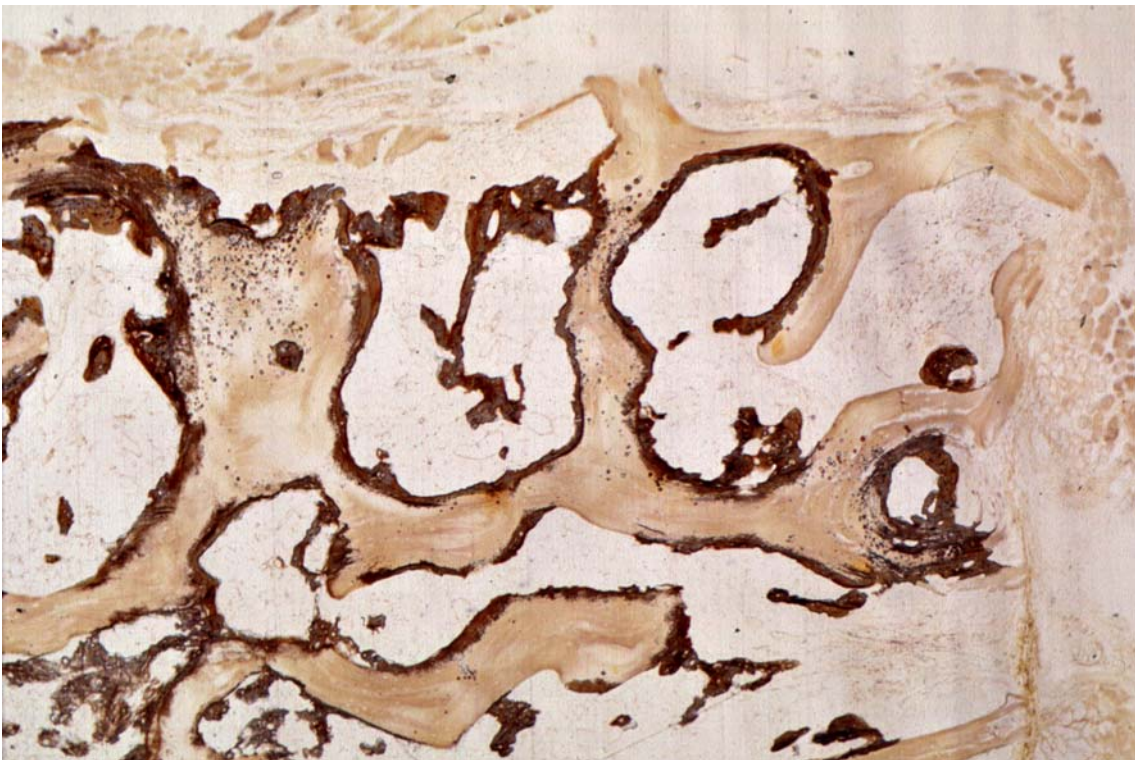


Abbildung 28 Kombination aus 2 μg BMP-2 und 2 μg EHBMP-2, 28 Tage postoperativ, Knochenneubildung entlang der Trabekelstruktur des Kollagenträgers, Van- Kossa- und Giemsa- Färbung, Vergrößerung 1:5

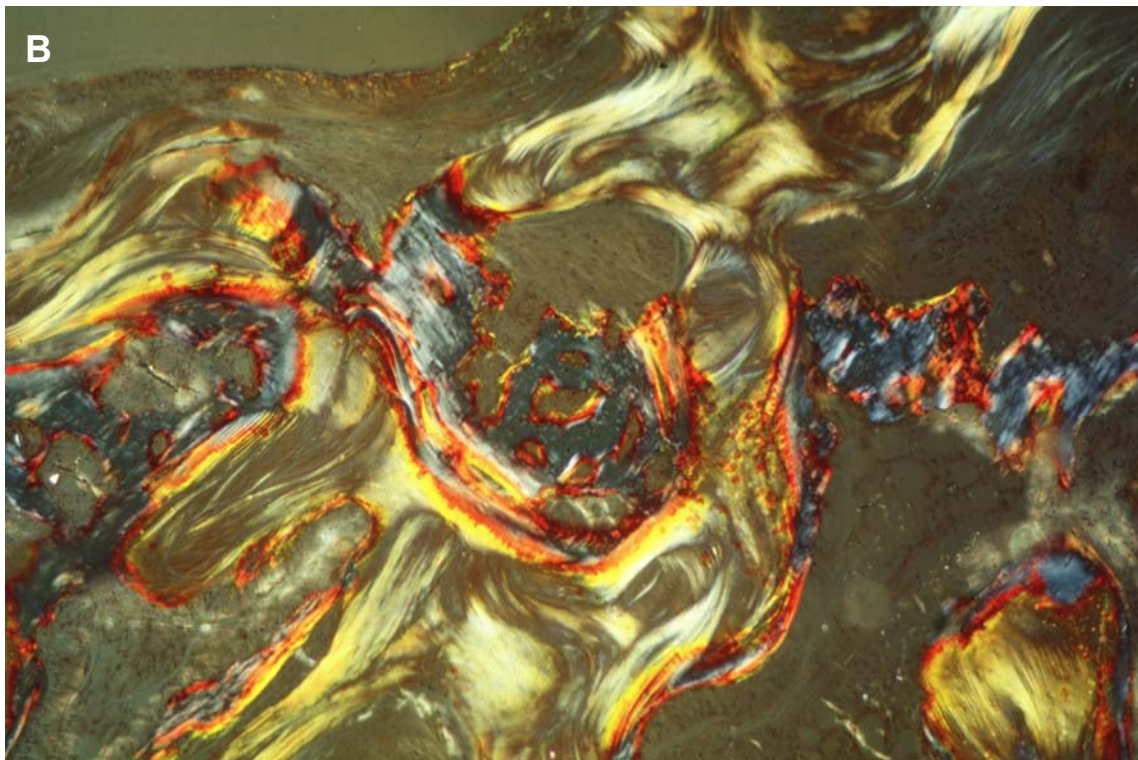
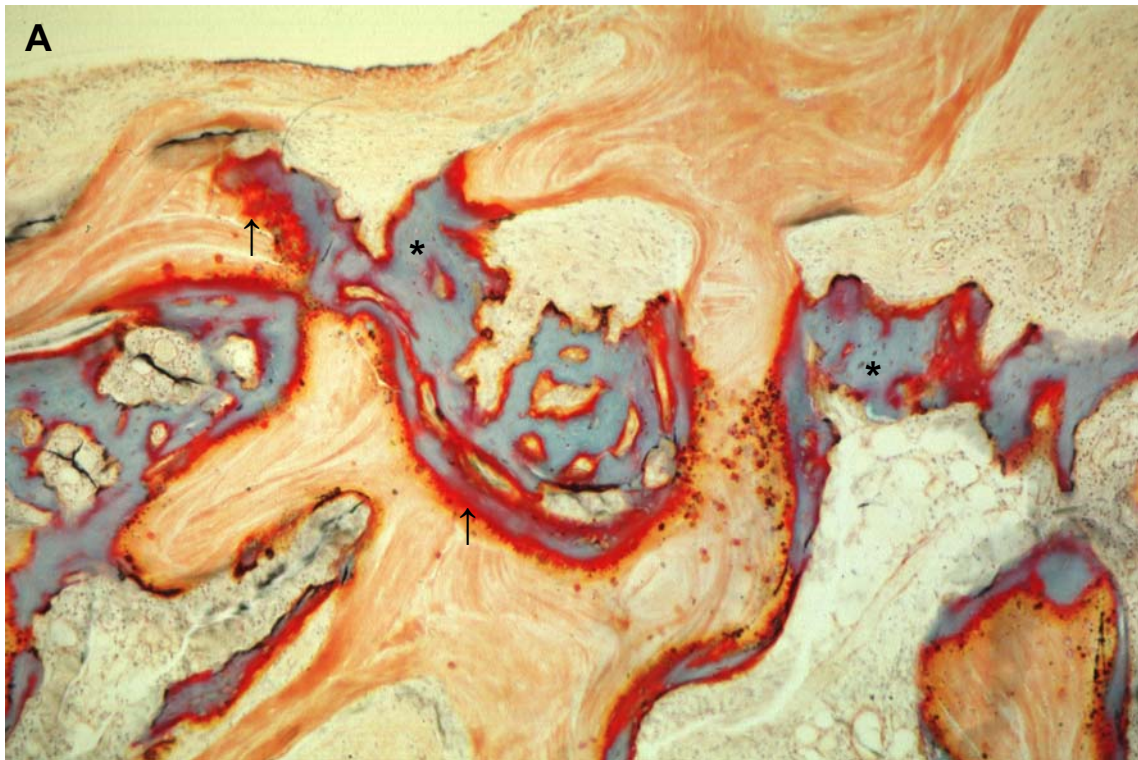


Abbildung 29a, b 2 μ g T3, 28 Tage postoperativ, beginnende Mineralisation des Trägers: gebildeter Knochen (*), Osteoid (\uparrow), spritzerartige Mineralisation, Masson-Trichrom-Goldner-Färbung, Vergrößerung 1:10 (**a**); Präparat anpolarisiert: Struktur und beginnende Mineralisation des Kollagenfasergeflechts deutlich zu erkennen (**b**)

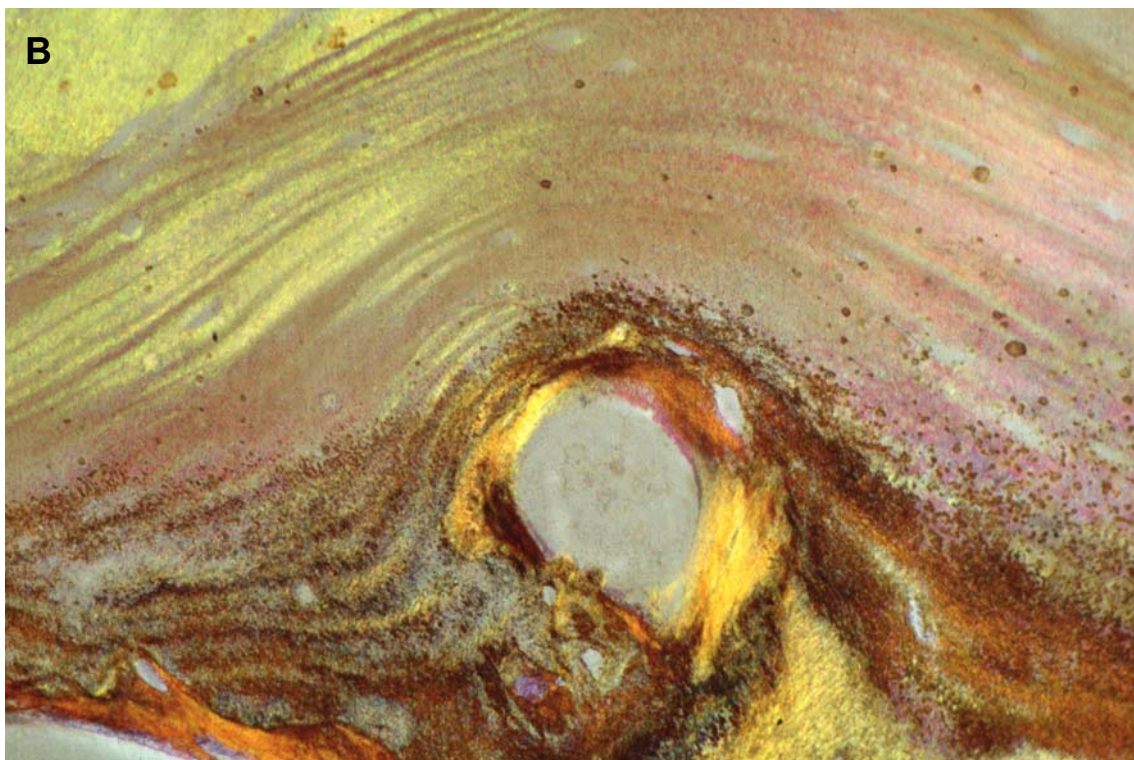
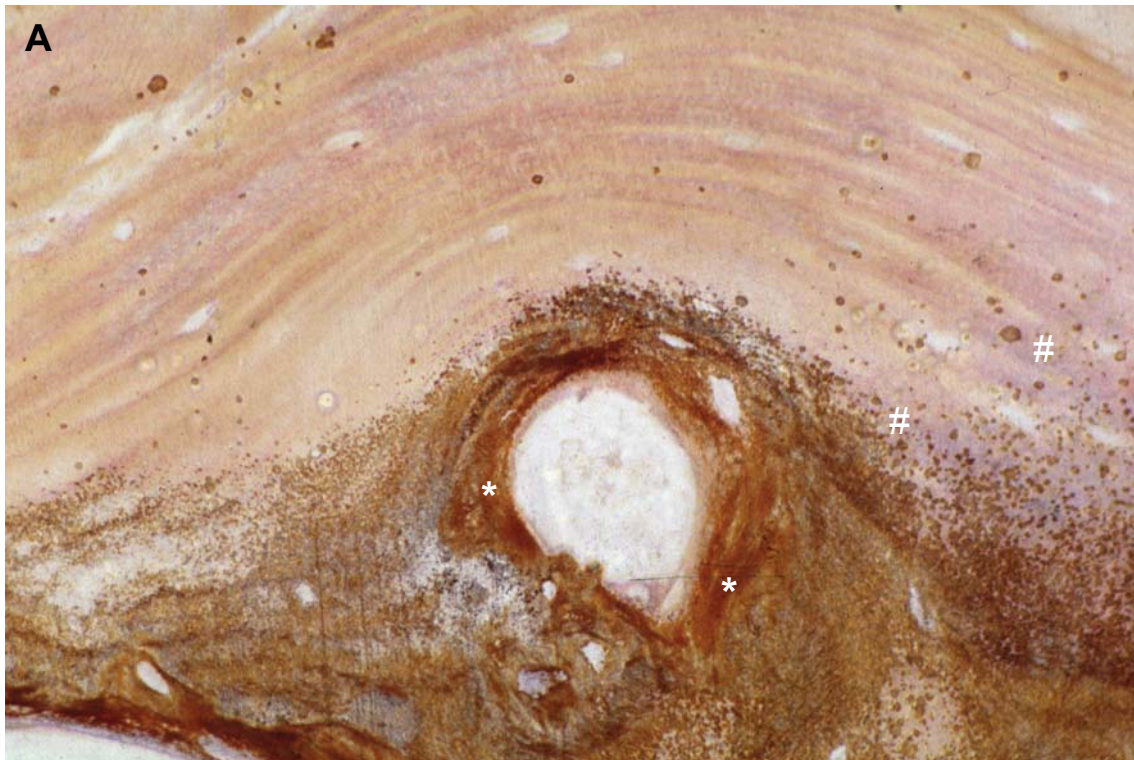


Abbildung 30a, b Kombination aus 1 μg T4 und 1 μg EHBMP-2, 28 Tage postoperativ: gebildeter Knochen (*), spritzerartige Mineralisation des Trägers (#), Van- Kossa- und Giemsa-Färbung, Vergrößerung 1:40 (**a**); Präparat anpolarisiert: Struktur und beginnende Mineralisation des Kollagenfasergeflechts, gebildeter Knochen braun/ schwarz dargestellt (**b**)

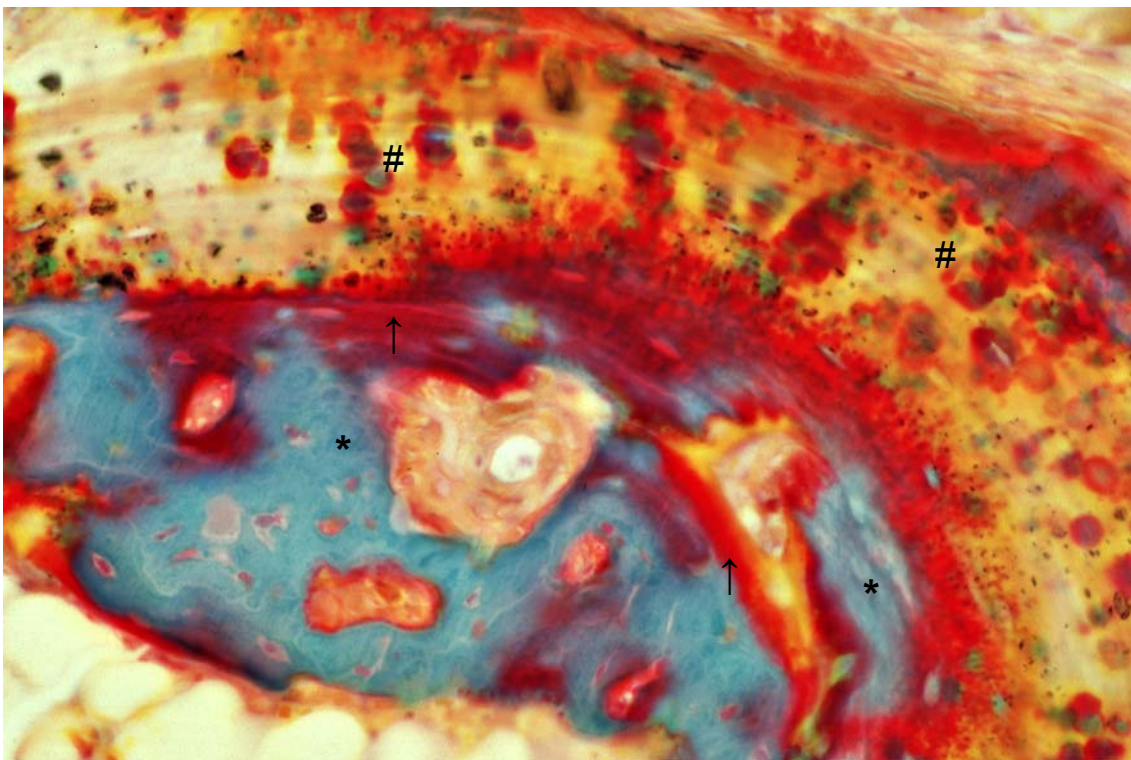


Abbildung 31 4 µg T4, 28 Tage postoperativ, Mineralisation des Trägers, gebildeter Knochen (*), Osteoid (↑), spritzerartige Mineralisation (#), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung, Vergrößerung 1:40

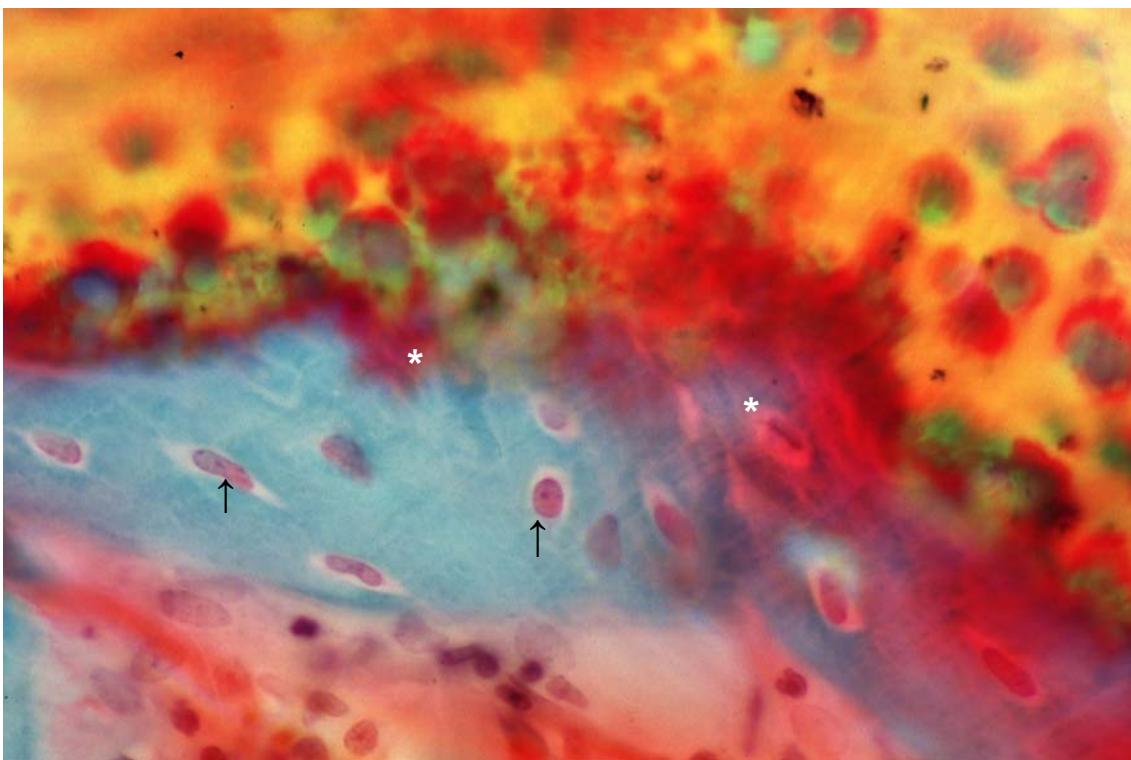


Abbildung 32 4 µg T4, 28 Tage postoperativ, Mineralisation des Trägers, Osteozyten (↑) und Osteoblasten (*), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung, Vergrößerung 1:40 Zoom 2,5

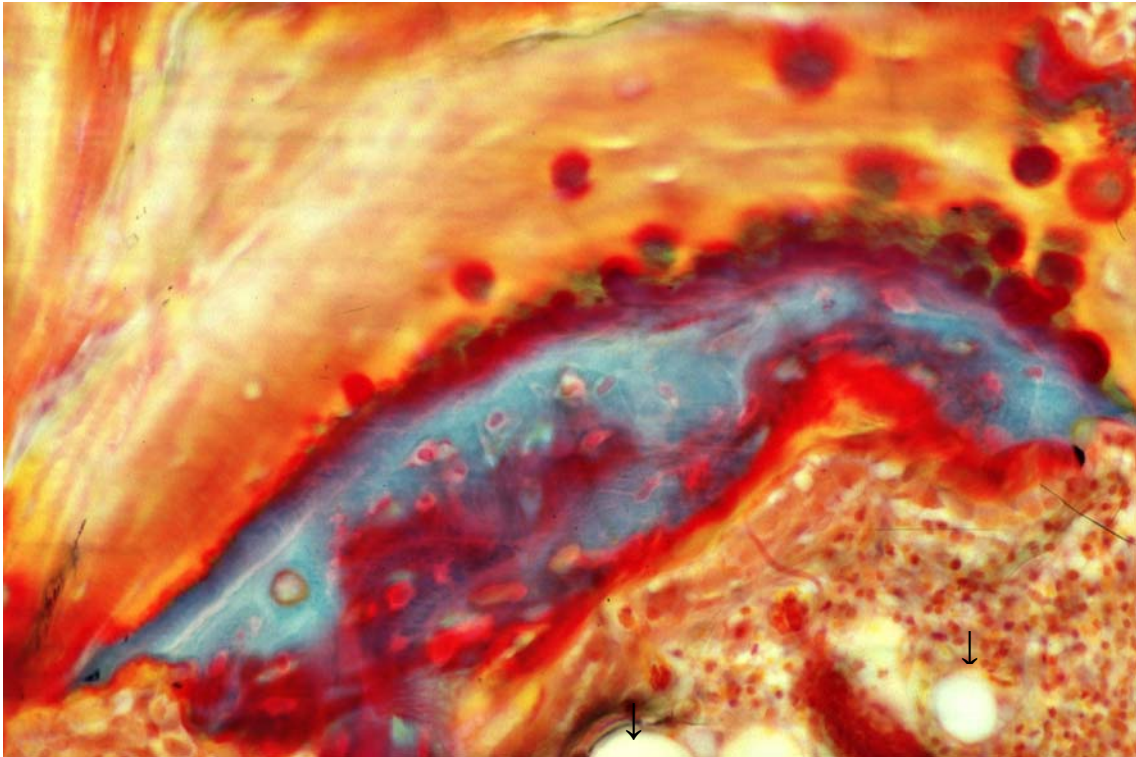


Abbildung 33 Kombination aus 2 μg T4 und 2 μg EHBMP-2, 28 Tage postoperativ, Mineralisation, Markräume teilweise gefüllt mit Fettzellen (\downarrow) und hämatopoetischen Knochenmarkselementen, Masson- Trichrom- Goldner- Färbung, Vergrößerung 1:40

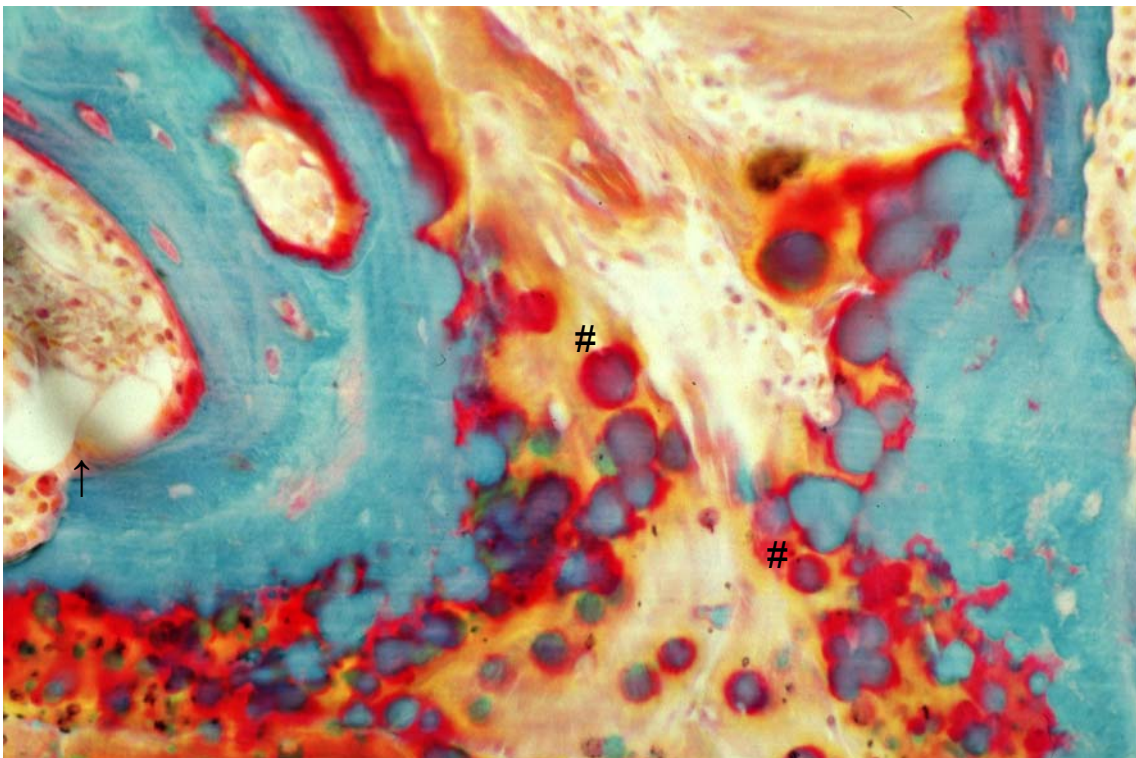


Abbildung 34 Kombination aus 3 μg T4 und 1 μg EHBMP-2, 28 Tage postoperativ, beginnende Mineralisation (#), Masson- Trichrom- Goldner- Färbung, Vergrößerung 1:40

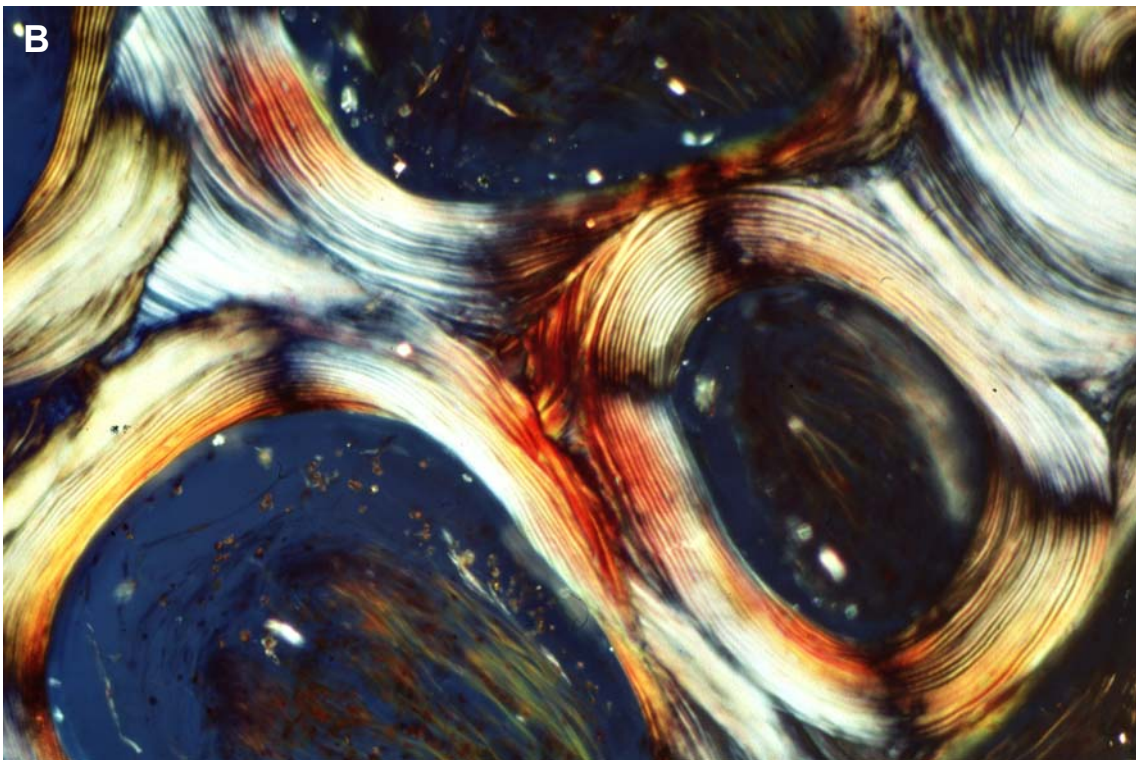
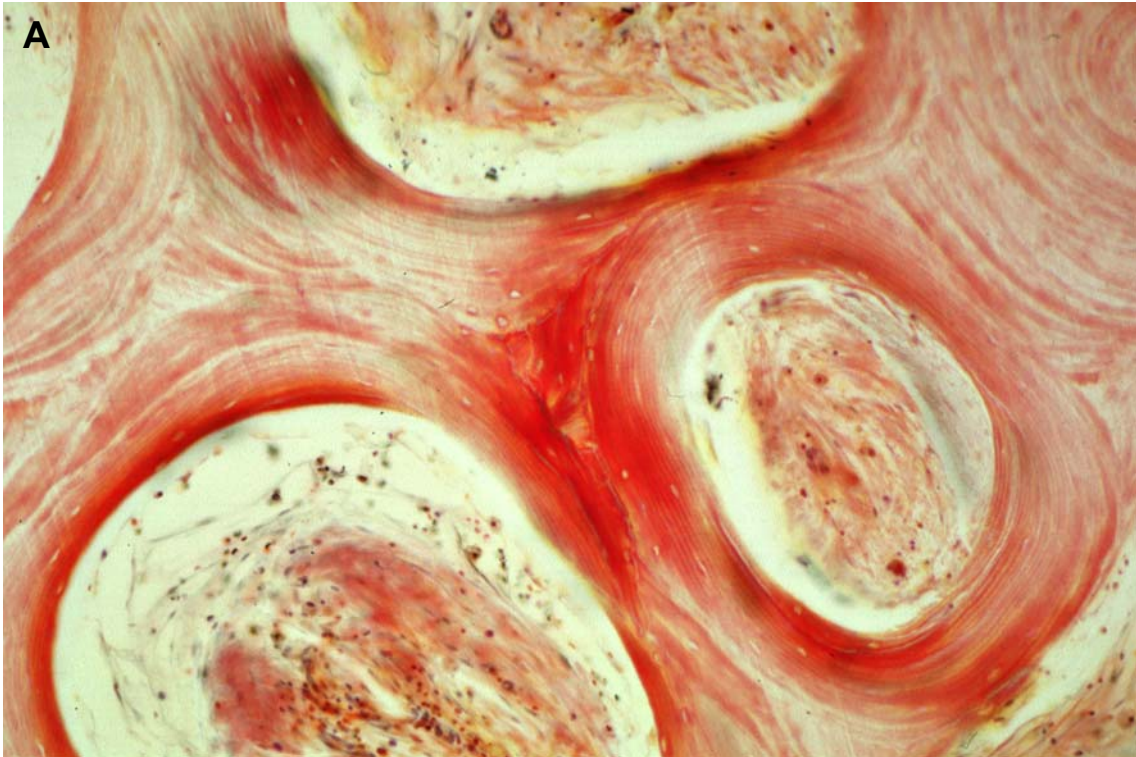


Abbildung 36a, b Leerprobe, 28 Tage postoperativ, leicht rot/ orange gefärbtes Kollagen, fibröses Bindegewebe, keine Mineralisation, keine Knochenbildung, Masson- Trichrom- Goldner- Färbung, Vergrößerung 1:20 (a); Präparat anpolarisiert, Faserstruktur des Kollagens deutlich erkennbar (b)

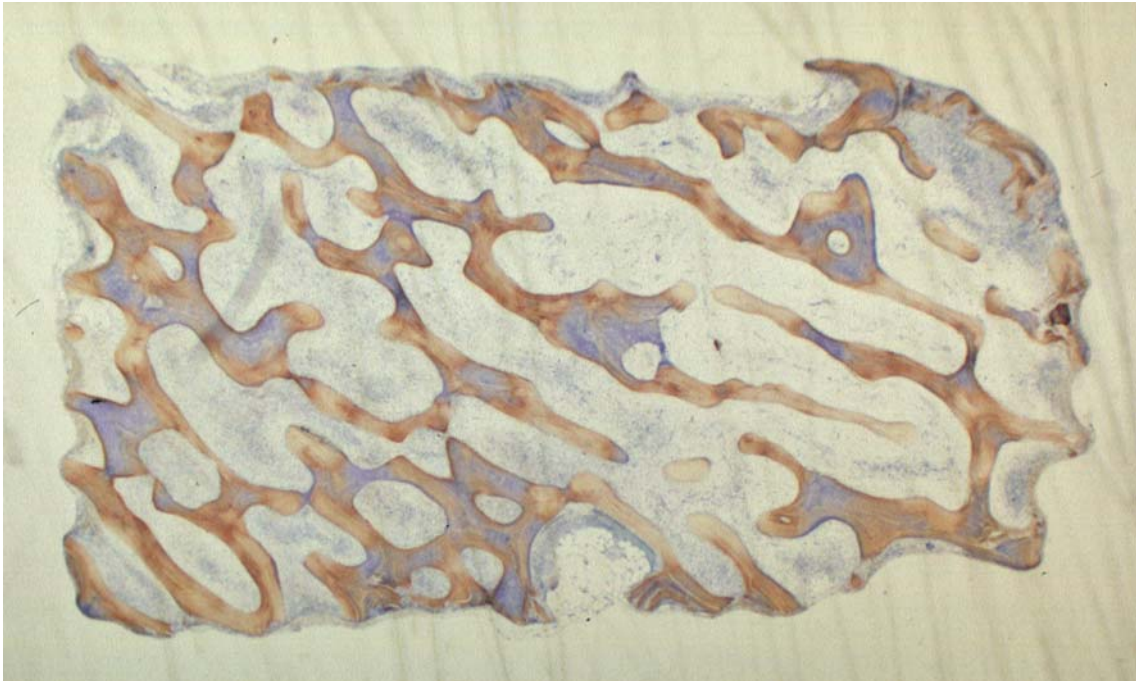


Abbildung 35 Übersicht einer Leerprobe; 28 Tage postoperativ; gleichmäßige Braunfärbung des Kollagens, keine Hinweise auf Knochenbildung; Van- Kossa- und Giemsa- Färbung; Vergrößerung 1:1,6

4.5 Mikroradiographische Darstellung

Eine Übereinstimmung zwischen den Histologien und den entsprechenden Mikroradiographien besteht bezüglich der Fläche von mineralisiertem Knochen. Die Abbildungen 37- 41 zeigen eine repräsentative Auswahl von Mikroradiographien bei einer Gesamtproteinmenge von 2 μg bzw. 4 μg an Tag 28.

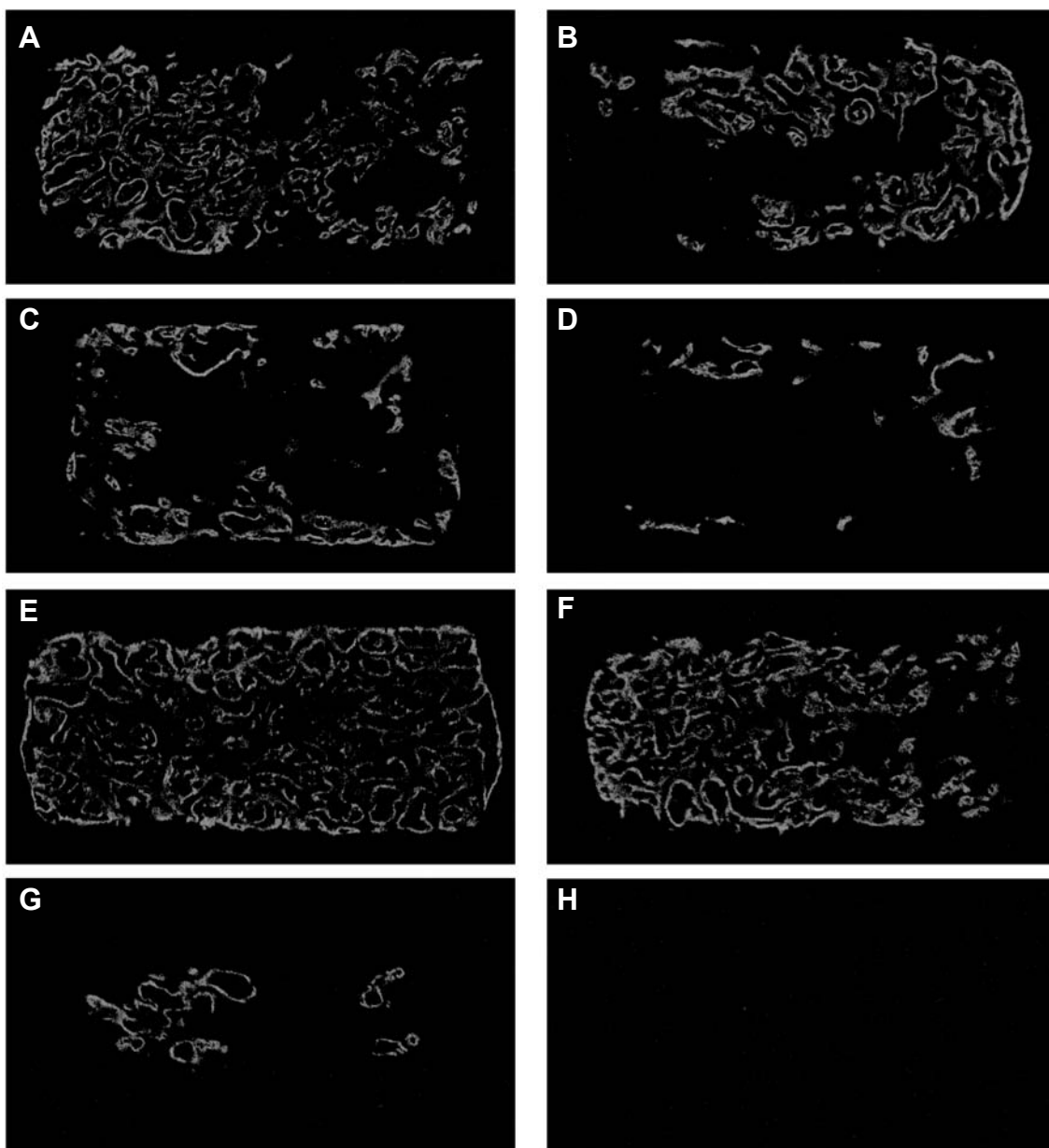
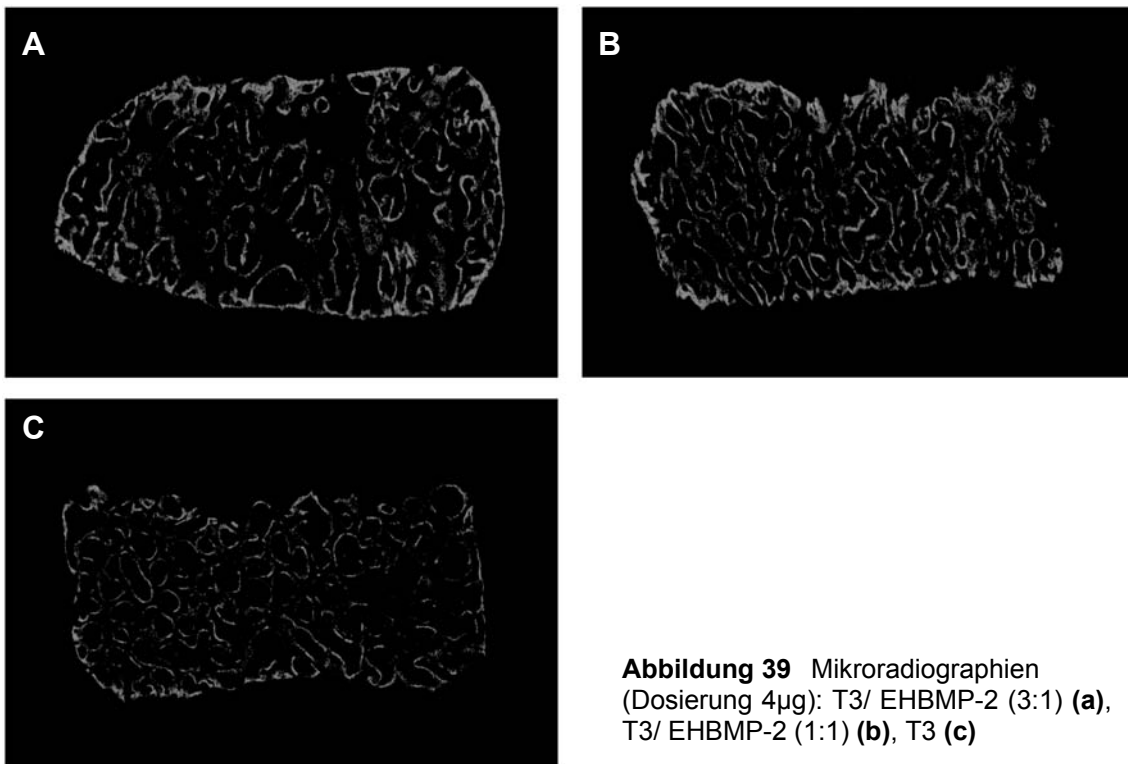
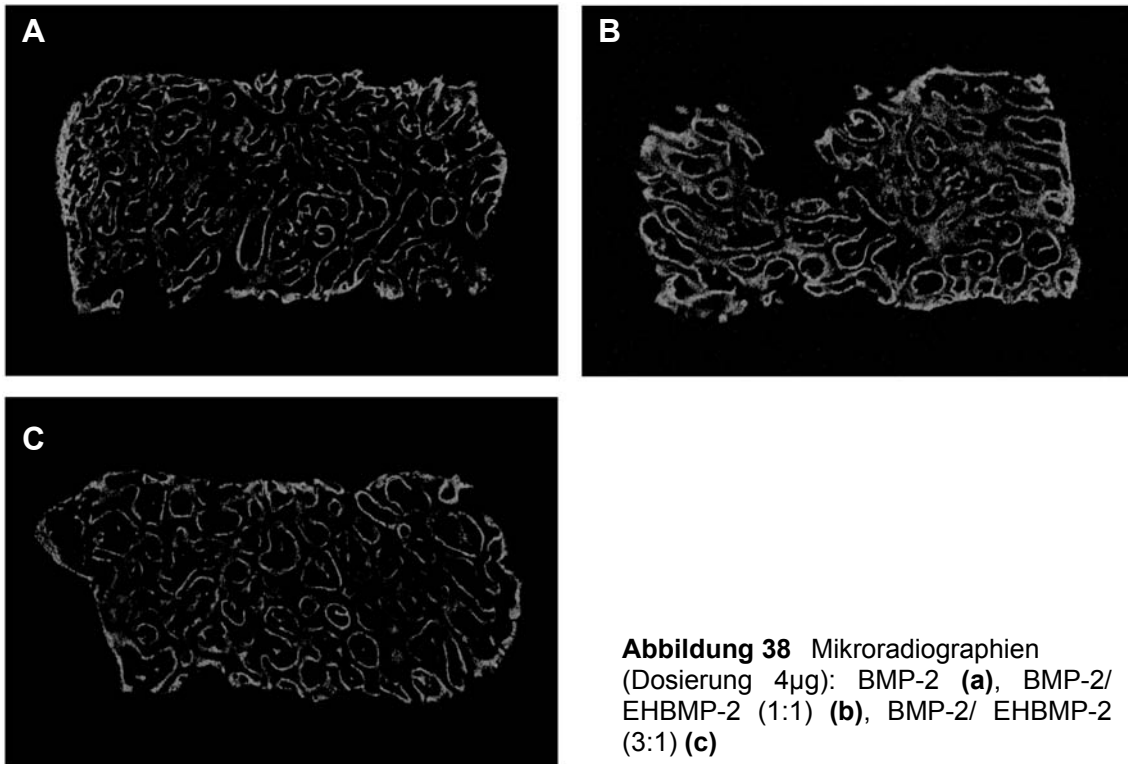


Abbildung 37 Mikroradiographien (Gesamtproteinmenge 2 μg): BMP-2 (a), BMP-2/ EHBMP-2 (Verhältnis 1:1) (b), T3 (c), T3/ EHBMP-2 (Verhältnis 1:1) (d), T4 (e), T4/ EHBMP-2 (Verhältnis 1:1) (f), EHBMP-2 (g), Kontrolle (h)



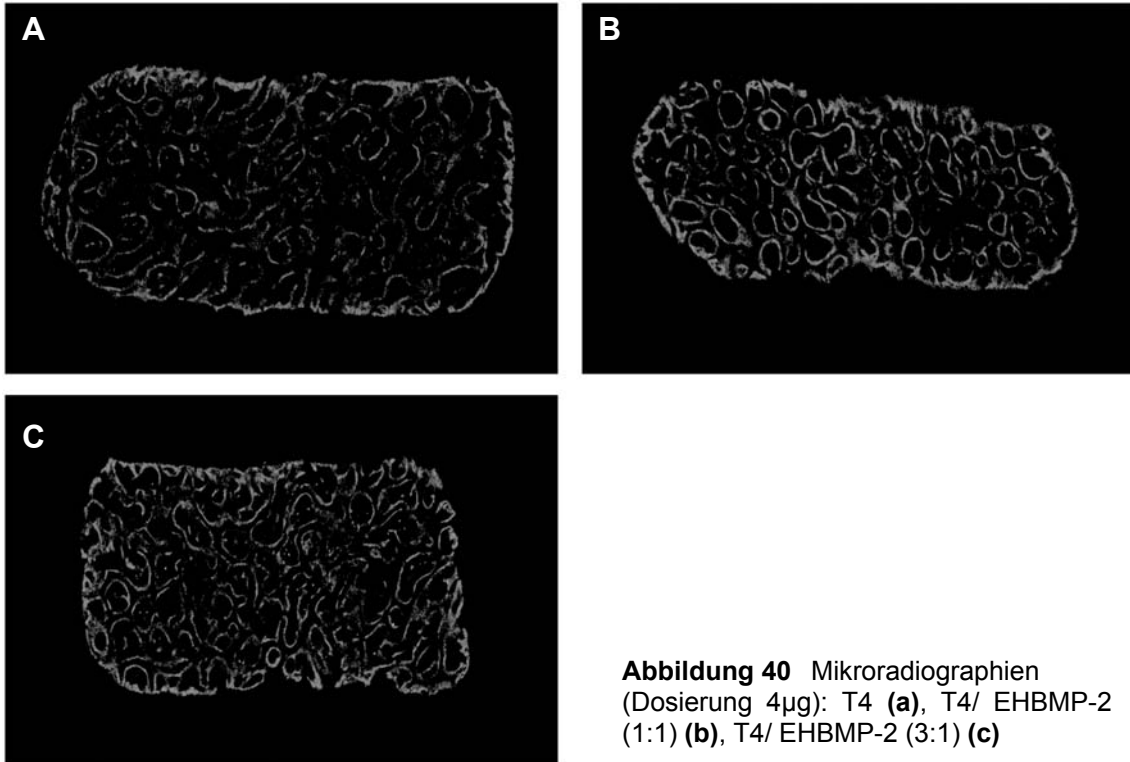


Abbildung 40 Mikroradiographien (Dosierung 4 μ g): T4 (**a**), T4/ EHBMP-2 (1:1) (**b**), T4/ EHBMP-2 (3:1) (**c**)

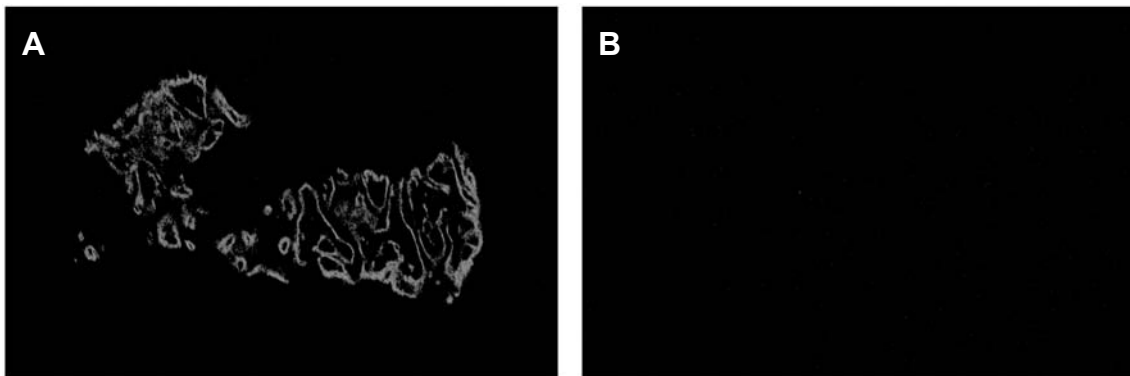


Abbildung 41 Mikroradiographien: 4 μ g EHBMP-2 (**a**), Kontrolle (**b**)

5 Diskussion

5.1 Einflussgrößen auf die Knochenbildung bei rekombinanten BMPs

Verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf das Ausmaß der induzierten Knochenneubildung.

Eine wenig veränderbare Einflussgröße stellt die Anzahl der mesenchymalen Zielzellen der BMPs im Implantatlager dar. Diese ist abhängig von der Vaskularisation des Empfängergewebes, vom Gewebetyp (z.B. Fett, Muskel), von der Spezies und dem Alter des Lebewesens.

Im Gegensatz dazu ist das Freisetzungssystem für die BMP- Moleküle eine veränderbare Einflussgröße. An das Freisetzungssystem sind zwei wichtige Anforderungen zu stellen:

Es muss biokompatibel sein und sollte eine kontrollierte Freisetzung der BMPs garantieren.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde als Freisetzungssystem der Kollagenträger (EXKK- Träger= extrahiertes xenogenes Knochenkollagen) verwendet. Es handelt sich um kollagene Rinderknochenmatrix, die aus Diaphysen boviner Röhrenknochen hergestellt wird und keine osteoinduktiven Eigenschaften mehr besitzt.

Bereits seit 1981 wird das System aus ICBM- (insoluble collagenous bone matrix) Träger und BMP im heterotopen und orthotopen Implantatlager am Tiermodell erforscht.

BMP-2 in Kombination mit dem ICBM- Träger führt durchschnittlich zu einem 5-mal höheren Knochenvolumen als bei Kombination mit einer Kollagensuspension (bovines Kollagen Typ I). Im Vergleich zu anderen Knochenersatzmaterialien ist der Unterschied geringer. [26]

Kübler et al. stellten fest, dass die alleinige Implantation von EHBMP-2 in einer Konzentration von 5 µg bzw. 10 µg in die Oberschenkelmuskulatur von Mäusen nur zu einer geringen Knochenneubildung führt (in 3 von 10 Proben). Im

Gegensatz dazu, konnte durch Kombination von EHBMP-2 mit einem bovinen Kollagenträger die Menge der Knochenneubildung um den Faktor 15 gesteigert werden. [25]

Auch im orthotopen Implantatlager wurde durch den Einsatz von EHBMP-2 mit boviner Kollagenmatrix eine knöcherne Rekonstruktion bei „critical size defects“ mit einem Durchmesser von 5 mm im Kieferwinkel von Ratten erreicht. Bei einer Konzentration von 10 µg EHBMP-2 und 20 mg ICBM kam es zur vollständigen Reossifikation. [25]

Ein Träger aus Knochenkollagen (EXKK- Träger) besitzt bezüglich Freisetzungskinetik und Resorptionsverhalten optimale Eigenschaften. [67]

Woo et al. wies nach, dass ein Implantat mit einer prolongierten Freisetzungskinetik für BMP-2 die beste Knochenneubildung hervorbringt. [63]

Eine weitere modulierbare Einflussgröße ist das unspezifische BMP-Bindungsverhalten an die extrazelluläre Matrix (EZM), wofür die BMPs natürliche Bindungsstellen besitzen. [47]

Das unspezifische Bindungsverhalten der BMPs bezieht sich in dieser Arbeit auf die Bindung des BMP- Moleküls an den EXKK- Träger (Kolyophilisation/ physikalische Bindung) und auf die Bindung des BMP- Moleküls an die extrazelluläre Matrix im benachbarten Gewebe des Implantationsortes.

Diese Bindung beeinflusst den Konzentrationsgradienten der BMP- Moleküle, der für die osteoinduktive Wirksamkeit verantwortlich ist. Man geht davon aus, dass dieser biologisch wirksame Gradient eine Kaskade in Gang setzt, die letztendlich mit der Proliferation und Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Vorläuferzellen in knorpel- und knochenbildende Zellen endet. [43]

Neben der Suche nach einem optimalen Freisetzungssystem, wurde versucht, die unspezifische Bindung von BMP-2 an die extrazelluläre Matrix zu verändern, und so Varianten herzustellen, die eine verstärkte oder nicht mehr messbare Affinität zur extrazellulären Matrix besitzen.

5.2 BMP-2- Varianten

Sebald et al. gelang es, neben der gentechnischen Herstellung von humanem BMP-2 und BMP-4, sogenannte BMP- Varianten herzustellen und zu exprimieren. Wie bereits beschrieben, wurden die Varianten T3 und T4 durch zusätzliches Einfügen von Basentriplets am N- Terminus des BMP-2 Wildtyps hergestellt und zeichnen sich dadurch mit einer im Vergleich zu BMP-2 verstärkten Bindung an die extrazelluläre Matrix aus. [36]

T4 besitzt eine signifikant höhere osteoinduktive Potenz. Das neugebildete Knochengewebe ist durch Einsatz von T4 aufgrund der stärkeren Durchbauung mit Knochen trabekeln auch dichter. [26] Verantwortlich dafür wird die längere Halbwertszeit des Proteins im Implantatlager sein.

Die BMP- Variante EHBMP-2, die ebenfalls in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt wurde, zeichnet sich aufgrund der Substitution der N- terminalen Heparin- Bindungsstelle, durch eine nicht mehr messbare Affinität zur extrazellulären Matrix aus. Dadurch besitzt die Variante in vitro eine höhere biologische Aktivität. [19; 47] Untersuchungen in vivo hingegen zeigen, dass EHBMP-2 hier eine wesentlich geringere osteoinduktive Potenz ausweist als BMP-2. Erklärung dafür ist die schnelle Abdiffusion der Varianten vom Wirkort und daraus folgend eine zu schnelle Abnahme des biologisch wirksamen Konzentrationsgradienten, der wie bereits beschrieben, für die Migration und Proliferation/ Differenzierung der BMP- Zielzellen unabdingbar ist. [5; 43]

5.3 Pleiotrope Eigenschaft der BMPs

BMPs werden als pleiotrop bezeichnet, weil sie bei unterschiedlichen Konzentrationen an verschiedenen zellbiologischen Vorgängen mitwirken. BMPs steuern die drei wichtigen Schritte der Knochenbildung: Chemotaxis und Proliferation der BMP- Zielzellen, die Differenzierung und Bildung von Knorpelgewebe und das Ersetzen des Knorpelgewebes durch Knochengewebe gemäß der enchondralen Ossifikation. [42; 45]

In vitro wiesen Cunningham et al. die Chemotaxis von humanen Monozyten bereits bei einer Konzentration der BMPs im Femtomolar- Bereich (10^{-15}) nach. Die proliferative Antwort erfolgt bei einer Konzentration von 100 pM und die Differenzierung der Zellen beginnt bei einer Konzentration im Nanomolar-Bereich.

Niedrige BMP- Konzentrationen im peripheren Gewebe führen zur Chemotaxis und höhere BMP- Konzentrationen am Implantationsort sind verantwortlich für die Proliferation und Differenzierung der Zielzelle. [5; 44]

Dabei ist jedoch zu beachten, dass BMPs in vivo an extrazelluläre Matrixkomponenten, wie Kollagen Typ I und Typ IV, Heparansulfat, Heparin und Hydroxylapatit gebunden sind und die Konzentration biologisch aktiver BMPs daher schwierig zu bestimmen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Einsatz von BMP-2 und dessen Varianten, der Einfluß der Heparin- Bindungsstelle auf die osteoinduktive Potenz konzentrationsabhängig untersucht.

Mit verschiedenen Proteinkombinationen, aus „normal“ (BMP-2) bzw. verstärkt (T3, T4) an die extrazelluläre Matrix bindenden Proteinen und einem nur sehr schwach bindenden (EHBMP-2) Protein, wurde versucht, den pleiotropen Effekt der BMPs zu optimieren und die knochenbildende Potenz zu verstärken.

5.4 Vergleich der einzel- eingesetzten Proteine mit der Kombination der Proteine

Wie sich anhand des Röntgenverlaufs zeigt, nimmt die Knochenneubildung bei allen Varianten ab dem 5. Tag stetig zu.

Bei einer Gesamtproteinkonzentration von 2 µg erreicht der Anstieg der Knochenneubildung sein Maximum zwischen dem 11. und 23. Tag, bei einer Gesamtproteinkonzentration von 4 µg zwischen dem 5. und 17. Tag.

Zwischen dem 9.- 12. Tag ist die alkalische Phosphatase als Ausdruck einer erhöhten Osteoblastentätigkeit maximal. [23; 44]

Bei Vergleich der Gesamtproteinkonzentrationen wurden bei Einsatz von 4 µg die Knochenneubildungsrate und das Ausmaß der Knochenneubildung bei allen Proteinen und Varianten signifikant gesteigert. Die Proteine T4 und BMP-2 in Verbindung mit dem Kollagenträger nähern sich asymptotisch einem Maximum der Knochenneubildung, entsprechend der maximal induzierbaren Gewebeantwort.

Im Vergleich dazu ist bei einer Proteingesamtkonzentration von 2 µg auch am 28. Tag das lokale Potential zur Knochenneubildung nicht erschöpft. In niedrigen Dosen steigt die Knochenneubildung weitestgehend linear.

Der alleinige Einsatz von EHBMP-2 führte signifikant zur geringsten Knochenbildung. Die erhöhte biologische Aktivität dieser Varianten in vitro [47] führte zu keiner erhöhten Knochenneubildung in vivo, da der für die Proliferation und Differenzierung notwendige lokale BMP- Konzentrationsgradient [5; 43] aufgrund der schnellen Abdiffusion der Varianten offensichtlich zu früh abnimmt. [25] In vitro ist hingegen keine Abdiffusion möglich.

Dies deckt sich mit Untersuchungen von Würzler et al., die belegen, dass es bei Einsatz von EHBMP-2 sowohl im heterotopen als auch im orthotopen Implantatlager zu einer geringeren Knochenneubildung im Vergleich zu BMP-2 Wildtyp und den Varianten T3 und T4 kommt. [68]

Die EXKK- Träger der Kontrollgruppe, die nicht mit Protein dotiert wurden, zeigten radiologisch und histologisch keine knöcherne Durchbauung. Es zeigte sich lediglich bindegewebige Einsprossung. [26]

5.4.1 Vergleich von BMP-2 Wildtyp und der Kombination von BMP-2/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

5.4.1.1 *Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg*

Durch die Proteinkombination konnte die Knochenbildung im Vergleich zu EHBMP-2 zwar gesteigert werden, erreichte aber nur 41,8 % von BMP-2. Die

Wirkung von nur 1 µg BMP-2 bei der Proteinkombination scheint für die Proliferation/ Differenzierung der Zielzellen am Implantationsort nicht auszureichen.

5.4.1.2 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg

Der Einsatz von BMP-2 Wildtyp alleine wirkt sich besser auf die Knochenneubildung aus als die Kombination aus BMP-2 und EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 oder einer Kombination aus BMP-2 und EHBMP-2 im Verhältnis 3:1.

Der Stimulus des relativ schnell vom Implantationsort abdiffundierenden EHBMP-2 auf die Chemotaxis der BMP- Zielzellen scheint bei beiden Proteinkombinationen Wirkung zu zeigen, jedoch reicht dabei die niedrigere Konzentration des normal- ortsständigen Proteins (BMP-2) nicht für eine genügende Proliferation/ Differenzierung der BMP- Zielzellen am Implantationsort aus. Ein höherer Anteil an EHBMP-2 zu Lasten des normal- ortsständigen BMP-2, führt wahrscheinlich zu einer höheren Chemotaxis der Zielzellen, die lokale Konzentration für Proliferation/ Differenzierung der Zielzellen reicht jedoch nicht für eine maximale Knochenneubildung aus.

Der alleinige Einsatz des normal- ortständigen Proteins (BMP-2) scheint effektiver zu sein.

5.4.2 Vergleich von T3 und der Kombination von T3/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

5.4.2.1 Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg

Durch Einsatz der Proteinkombination konnte die Knochenbildung im Vergleich zu EHBMP-2 zwar gesteigert werden, erreichte aber nur 29 % von T3. Die Wirkung auf Proliferation und Differenzierung der BMP- Zielzellen ist bei nur 1 µg T3 bei der Proteinkombination weniger groß als bei T3 alleine.

5.4.2.2 *Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg*

Die Kombination aus T3 und EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 wirkt sich besser auf die Knochenneubildung aus als der Einsatz einer Kombination aus T3 und EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 oder der Varianten T3 alleine.

Bei der Kombination ist durch den geringen Anteil an EHBMP-2 die Chemotaxis der BMP- Zielzellen in der Peripherie und durch den Anteil an T3 die Proliferation/ Differenzierung der BMP- Zielzellen am Implantationsort maximal aktiviert. Ein höherer Einsatz von EHBMP-2 zu Lasten des verstärkt-ortsständigen T3 im Verhältnis (1: 1), führt bei dieser Varianten tendenziell immer noch zu einer höheren Knochenbildung als der Einsatz der Varianten T3 alleine.

Diese Variante scheint durch die zu starke Bindung an die extrazelluläre Matrix eine nur geringe Chemotaxis der Zielzellen auslösen zu können.

5.4.3 Vergleich von T4 und der Kombination von T4/ EHBMP-2 sowie EHBMP-2

5.4.3.1 *Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 2 µg*

Durch die Proteinkombination konnte die Knochenneubildung im Vergleich zum Einsatz von EHBMP-2 zwar signifikant gesteigert werden, erreichte aber nur 65% von T4. Trotz der stärkeren Matrixbindung scheint der biologisch wirksame Konzentrationsgradient von nur 1 µg T4 bei der Proteinkombination für die Proliferation und Differenzierung der Zielzellen im Vergleich zum alleinigen Einsatz von T4 zu schnell abzunehmen.

5.4.3.2 *Vergleich bei einer Gesamtproteinmenge von 4 µg*

Histologisch lassen sich in dieser Proteingruppe und bei dieser Proteinkonzentration Exostosen an den explantierten Trägern nachweisen.

Zwischen der Varianten T4 alleine, der Kombination aus T4 und EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 und der Kombination aus T4 und EHBMP-2 im Verhältnis 3:1 lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Der Einfluss der relativ schnell vom Implantationsort abdiffundierenden Varianten EHBMP-2 auf die Chemotaxis und der Anteil an T4 auf die Proliferation und Differenzierung der BMP- Zielzellen am Implantationsort scheint maximal aktiviert zu sein. Die Wirkung der Varianten T4 alleine bezüglich Chemotaxis und Proliferation/ Differenzierung der Zielzellen scheint ebenfalls optimiert zu sein.

Die Variante T4 besitzt das höchste Potenzial zur Knochenneubildung. Es ist davon auszugehen, dass auch durch eine höhere Dosis bzw. durch weiteres Modulieren der Heparinbindung nur geringe Steigerungen der Knochenneubildung erreicht werden können.

Die herausragende Rolle der Varianten T4 in Bezug auf die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Knochenneubildung wurde ebenfalls durch Untersuchungen von Würzler et al. bewiesen. [68]

6 Zusammenfassung

Die lokale Bioverfügbarkeit von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren hat einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Knochenbildung. Die Affinität der Proteine zu Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) beeinflusst ihre Ortsständigkeit und damit ihre biologische Aktivität am Implantationsort.

In der vorliegenden Arbeit wurden BMP-2 und seine gentechnologisch hergestellten Varianten mit verstärkter (T3, T4) und aufgehobener (EHBMP-2) Bindung an die EZM untersucht.

Die Wachstumsfaktoren wurden einzeln sowie in Kombination mit EHBMP-2 in Bezug auf die erzielbare Knochenneubildungsrate im heterotopen Implantatlager (Oberschenkelmuskulatur der Ratte) verglichen. Durch den Einsatz der Proteinkombinationen wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Knochenneubildung durch die Mischung einer kaum an die extrazelluläre Matrix bindenden Varianten (EHBMP-2) mit einem „normal“ (BMP-2 Wildtyp) bzw. verstärkt (T3, T4) an die extrazelluläre Matrix bindenden Morphogen verbessert werden kann. Mittels röntgenologischer, biochemischer und histologischer Untersuchungen wurden die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Knochenneubildung analysiert.

Bei allen Proteinen bzw. Proteinkombinationen wurde eine direkte Abhängigkeit der Knochenneubildung von den eingesetzten Proteinmengen beobachtet. In niedriger Konzentration (2 µg) kommt es zu einer mäßigen Knochenneubildung über den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Bei dieser Konzentration waren BMP-2 bzw. die Varianten T3 und T4 den Proteinkombinationen mit EHBMP-2 immer überlegen. Der alleinige Einsatz von T4 führte -gefolgt von BMP-2 und T3- zur größten Knochenneubildung. Die Variante T4 näherte sich in kürzerer Zeit einem Maximalwert an und zeigte bereits bei niedriger Dosis ein „Sättigungsverhalten“ auf hohem Niveau.

Bei einer Konzentration von 4 µg nahm die Knochenneubildung bei allen Proteinen ab dem 5. Tag nach Implantation stetig zu und näherte sich schon am 17. Tag ihrem Maximalwert. Das Ausmaß der Knochenneubildung war

gegenüber der niedrigeren Konzentration bei allen Proteinen bzw. Proteinkombinationen signifikant erhöht.

Der Einsatz von BMP-2 alleine wirkt sich tendenziell besser auf die Knochenneubildung aus als die Kombination aus BMP-2 und EHBMP-2 im Verhältnis 1:1 bzw. 3:1.

Bei T3 war ein positiver Effekt einer Kombination mit dem weniger ortsständigen EHBMP-2 zu finden. Die Kombination im Verhältnis 3:1 wirkte sich besser auf die Knochenneubildung aus als der Einsatz einer Kombination im Verhältnis 1:1 oder der Varianten T3 alleine.

Die Variante T4 besitzt das höchste Potenzial zur Knochenneubildung. Da sich die Knochenbildung bei dieser Dosis bereits im Sättigungsbereich befindet, können keine signifikanten Unterschiede zwischen der Varianten alleine und den Kombinationen mit EHBMP-2 festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass auch durch eine höhere Dosis bzw. durch weiteres Modulieren der Heparinbindung nur geringe Steigerungen der Knochenneubildung erreicht werden können.

Die Variante T4 scheint als Induktor für Chemotaxis, Proliferation und Differenzierung weitestgehend optimiert zu sein. Sie induziert die größte Knochenneubildungsrate. Die verstärkte extrazelluläre Matrixbindung dieser Varianten bewirkt durch Aufbau eines biologisch wirksamen Konzentrationsgradienten ein optimales Zusammenspiel zwischen Chemotaxis in der Peripherie und Proliferation/ Differenzierung der Zielzellen am Implantationsort.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Attisano L, et al (1996). Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7(327-339).
- 2 Carrington JL, Reddi AH (1991). Parallels between development of embryonic and matrix-induced endochondral bone. *Bioessays* 13(403-408).
- 3 Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24):9843-7.
- 4 Chen Fea (1995). Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth-factor- β receptor kinases. *PNAS* 92(1565-1569).
- 5 Cunningham NS, Paralkar V, Reddi AH (1992). Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(24):11740-4.
- 6 Derynck R (1994). TGF- β -receptor-mediated signaling. *TIBS* 19(548-553).
- 7 Derynck R (1997). TGF- β receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 133(F105-F150).
- 8 Derynck R, Zhang Y, Feng X-H (1998). Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95(737-740).
- 9 Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9(22):2795-807.
- 10 Duprez D, Bell EJ, Richardson MK, Archer CW, Wolpert L, Brickell PM, Francis-West PH (1996). Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev* 57(2):145-57.
- 11 Ferguson D, Davis WL, Urist MR, Hurt WC, Allen EP (1987). Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction-induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin Orthop* 219:251-8.
- 12 Flanders KC, Kim ES, Roberts AB (2001). Immunohistochemical expression of Smads 1-6 in the 15-day gestation mouse embryo: signaling by BMPs and TGF-betas. *Dev Dyn* 220(2):141-54.

- 13 Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E (1993). Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293:317-26.
- 14 Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J (2000). OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100(2):229-40.
- 15 Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu Y, Grinnell B, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana J (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).
- 16 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF- β signalling from cell membrane to nucleus via Smad proteins. *Nature* 390(465-471).
- 17 Hogan BL, Blessing M, Winnier GE, Suzuki N, Jones CM (1994). Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev Suppl*:53-60.
- 18 Hoodless PA, Wrana J (1998). Mechanism and function of signaling by TGF- β superfamily; Protein molecules in signal transduction. *Current topics in microbiology and immunology* 228(235-272).
- 19 Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ (1992). Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* 7(2):139-50.
- 20 Kingsley DM (1994). The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Development* 8(133-146).
- 21 Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, et al. (1994). Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 14(9):5961-74.
- 22 Kretzmar M, al. e (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF- β signaling. *Current Opinion in Genetics and Development* 8(103-111).
- 23 Kübler N (1995). Osteoinduktive Implantate - experimentelle Grundlagen und klinische Anwendung in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.
- 24 Kübler NR, Moser M, Berr K, Faller G, Kirchner T, Sebald W, Reuther JF (1998). [Biological activity of E. coli expressed BMP-4]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2 Suppl 1(S149-52).
- 25 Kübler NR, Würzler K, Reuther JF, Faller G, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (1999). [EHBMP-2. Initial BMP analog with osteoinductive properties]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3 Suppl 1(S134-9).
- 26 Kübler NR, Würzler KK, Reuther JF, Sieber E, Kirchner T, Sebald W (2000). [Effect of different factors on the bone forming properties of recombinant BMPs]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 Suppl 2(S465-9).

- 27 Lin HYea (1992). Expression cloning of the TGF β type II receptor, a functional transmembrane serine/ threonine kinase receptor. *Cell* 68(775-785).
- 28 Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J (1995). Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15(7):3479-86.
- 29 Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 273(40):25628-36.
- 30 Mahy PR, Urist MR (1988). Experimental heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein and recombinant human interleukin-1B. *Clin Orthop* 237):236-44.
- 31 Massague J (1996). TGF- β signaling: Receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85(947-950).
- 32 Massague J (1998). TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67(753-791).
- 33 Massague J, Wotton D (2000). Transcriptional control by the TGF- β / Smad signaling system. *Embo J* 19(1745-1754).
- 34 Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol* 187(3):265-76.
- 35 Moser M (1995). Darstellung von biologisch aktivem humanem Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) in rekombinanter Form aus E. coli. *Diplomarbeit, Universität Würzburg*.
- 36 Nickel J, Dreyer M, Sebald W (2002). Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction. In: Bone morphogenetic proteins. S Vukicevic editor. Basel: Birkenhäuser, pp. 61-86.
- 37 Nilsson O, Urist MR (1985). Response of the rabbit metaphysis to implants of bovine bone morphogenetic protein (bBMP). *Clin Orthop* 195):275-81.
- 38 Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH, Rosenbaum JS (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. *J Biol Chem* 270(38):22522-6.
- 39 Padgett RW, al. e (1993). Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *PNAS* 90(2905-2909).
- 40 Raftery LA, Sutherland DJ (1999). TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Dev Biol* 210(2):251-68.
- 41 Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N (1987). Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18(207-212).
- 42 Reddi AH (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 4(5):850-5.

- 43 Reddi AH (1994). Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4(5):737-44.
- 44 Reddi AH (2000). Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. *Biochem Soc Trans* 28(4):345-9.
- 45 Reddi AH (2001). Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1(Pt 1):S1-6.
- 46 Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7632-6.
- 47 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.
- 48 Sakou T, Onishi T, Yamamoto T, Nagamine T, Sampath T, Ten Dijke P (1999). Localization of Smads, the TGF-beta family intracellular signaling components during endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 14(7):1145-52.
- 49 Sampath TK, Reddi AH (1981). Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(7599-7603).
- 50 Sampath TK, Coughlin JE, Whetstone RM, Banach D, Corbett C, Ridge RJ, Ozkaynak E, Oppermann H, Rueger DC (1990). Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 265(22):13198-205.
- 51 Scheufler C, Sebald W, Hulsmeier M (1999). Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 287(1):103-15.
- 52 ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K (1994). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269(25):16985-8.
- 53 ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH (2000). Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-β signaling. *Trends Biochem Sci* 25(64-70).
- 54 Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA (1991). Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117(10):1101-12.
- 55 Urist MR (1965). Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150(893-899).
- 56 Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM (1967). The bone induction principle. *Clin Orthop* 53(243-283).

- 57 Urist MR, M. JJ, Dubuc FL, Strates BS (1970). Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop* 68(279-293).
- 58 Urist MR, Strates BS (1971). Mechanisms of growth and development: bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50(1391-1406).
- 59 Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA (1983). Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220(4598):680-6.
- 60 Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP (1994). Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein-3 (osteogenin). *J Histochem Cytochem* 42(7):869-75.
- 61 Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM (1988). Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(24):9484-8.
- 62 Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2220-4.
- 63 Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, DeLuca M, Vasconez HC, DeLuca PP (2001). Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 18(12):1747-53.
- 64 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885):1528-34.
- 65 Wozney JM (1992). The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32(2):160-7.
- 66 Wrana JL (2000). Regulation of Smad activity. *Cell* 100(2):189-92.
- 67 Würzler KK (2003). Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochengewebe in ausgedehnten Defekten. Universität Würzburg.
- 68 Würzler KK, Emmert J, Eichelsbacher F, Kübler NR, Sebald W, Reuther JF (2004). Evaluation der osteoinduktiven Potenz von gentechnisch modifizierten BMP-2-Varianten. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2004 Mar; 8(2): 83-92. Epub 2004 Feb 03.
- 69 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-beta signal transduction. *Science* 270(5244):2008-11.
- 70 Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130(1):217-26.

- 71 Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400(6745):687-93.

Anhang

A Material

Herstellung extrahierter xenogener Knochenkollagen- Träger
(EXKK- Herstellung)

Chemikalien

- Aqua destillata, Universitätsversorgung Würzburg
- Chloroform J.T.Baker, Best.-Nr. 7386, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Netherlands, Bezug über die Apotheke der Universität Würzburg
- Druckluft, Versorgungsanlage Universität Würzburg
- GuHCl Guanidinehydrochloride, Best.-Nr. 00037.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Methanol J.T.Baker, Best.-Nr. 8045, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Netherlands, Bezug über die Apotheke der Universität Würzburg
- Salzsäure rauchend 37%, HCl Best.-Nr. 1.00317.1000, Merck, Darmstadt
- Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane), Best.-Nr. 5429.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Wasserstoffperoxid 3%, H₂O₂, Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg

Verbrauchsmaterialien

- Bechergläser Schott Duran, 50/ 100/ 600/ 1000/ 5000ml, Schott Glas, Mainz
- Glaspipetten, Disposable Pasteur Pipettes Cat. No. 93, Chase Instruments Corp., New York, USA
- Kodak X-OMAT-MA Film 50 Ready Pack 13 x 18 cm, Kodak, Stuttgart
- Kondylen boviner Femur von 8-12 Monate alten Mastbullen, Südfleisch GmbH, Würzburg
- Zentrifugenröhrchen konisch, ZR95, 15ml, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH, Gräfeling-Locham
- Zentrifugenröhrchen konisch, ZR82, 50ml, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH, Gräfeling-Locham

Geräte

- Abzugshaube, Eigenanfertigung Universitätswerkstätten Würzburg
- Dispergiergerät Ultra- Turrax® T25, IKA®- Werke GmbH & CO.KG, Staufen
- Entwicklungsautomat Agfa Curix 242S, Agfa, München
- Faxitron Röntgengerät Modell 43855B, Hewlett Packard, Vertrieb: Rhode & Schwarz, Köln

- Knochensäge Typ FK 22, Bizerba Waagen- und Maschinenfabriken, Koblenz
- Kühlschrank Fa. Bosch, Vertrieb über Fa. Lermann, Würzburg
- Lyophilisator, Christ LDC-2, Medizinischer Apparatebau, Osterode
- Magnetrührer M32, Firma Hartenstein, Würzburg
- Rührfisch, Laborbedarf A. Hartenstein, Würzburg
- Rührwerk Framo LR20, 50-1800 U/min, Franz Morat GmbH&Co KG, Eisenach
- Stanzbohrer, Innendurchmesser: $\varnothing_{\text{innen}} = 5\text{mm}$, Wanddicke: $d = 0,3\text{ mm}$, Material: Messing, Eigenanfertigung Universitätswerkstätten Würzburg
- Tefloneinsatz, Teflonscheibe mit Bohrungen, Eigenanfertigung Universitätswerkstätten Würzburg
- Tiefkältetruhe ProfiLine ECC 6085-5, Bader Kälte- und Klimatechnik, Würzburg
- Vakuumpumpe, Typ-No. 22 AN18, Laborbedarf A. Hartenstein, Würzburg
- Waage ABS 120-4, Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern
- Wasserdampfstrahler plyno GV, Girbach Dental, Pforzheim

Versuchsaufstellung und Herstellung der BMP- Assays

Chemikalien

- Aqua ad iniectabilia, steril, pyrogenfrei, Delta-Pharma, Pfullingen
- BMP-2, Eigenherstellung Lehrstuhl für Physiologische Chemie II, Dir. Prof. Dr. Sebald, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg
- EHBMP-2, Eigenherstellung Lehrstuhl für Physiologische Chemie II, Dir. Prof. Dr. Sebald, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg
- T3, Eigenherstellung Lehrstuhl für Physiologische Chemie II, Dir. Prof. Dr. Sebald, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg
- T4, Eigenherstellung Lehrstuhl für Physiologische Chemie II, Dir. Prof. Dr. Sebald, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Universität Würzburg

Verbrauchsmaterialien

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

Geräte

- Kühlschrank Fa. Bosch, Vertrieb über Fa. Lermann, Würzburg
- Pipetten Research, 0,5-10 μl , 2-20 μl , 10-100 μl , 20-200 μl , 100-1000 μl , Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Köln
- Tiefkältetruhe Profi Line ECC 6085-5, Bader Kälte- und Klimatechnik, Würzburg

Dotierung der Kollagen- Zylinder mit BMPs

Chemikalien

- Aqua ad iniectabilia, steril, pyrogenfrei, Delta-Pharma, Pfullingen

Verbrauchsmaterialien

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

Geräte

- Kühlschrank Fa. Bosch, Vertrieb über Fa. Lermann, Würzburg
- Lyophilisator, Christ LDC-2, Medizinischer Apparatebau, Osterode
- Pipetten Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln
- Tiefkältetruhe Profi Line ECC 6085-5, Bader Kälte- und Klimatechnik, Würzburg

Versuchstiere, Tierhaltung, Tierfütterung

Verbrauchsmaterialien

- Altromin Haltungsfutter-Ratten/ Mäuse 1324, Altromin GmbH, Lage
- Sprague- Dawley- Ratten männlich, Gewicht ca 300g –350g, Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld
- Weichholzgranulat, Weimann, Würzburg
- Zellstoffbahnen, Weimann, Würzburg

Geräte

- Makrolon-Käfige Typ III, Firma EBECO & Co, Castrop-Rauxel
- Trinkflasche, EBECO&Co, Castrop-Rauxel

Implantation

Chemikalien

- Aqua ad iniectabilia, PH=5,7 bis 7,0, Delta Pharm GmbH, Pfullingen
- Äther zur Narkose, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Catosal 10%, Stoffwechselstimulans und Tonikum, Reg.-Nr.: C1268, Bayer Vital, Leverkusen
- Forene, Inhalationsnarkotikum, Wirkstoff: Isofluran, Zul.-Nr. 2594.00.00, Abort GmbH, Wiesbaden
- Ketavet, Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid, Injektionsflasche 20ml, 100mg/ml Pharmacia und Upjohn GmbH, Erlangen
- Nebacetin Puder, Reg.-Nr. N636, Yamanouchi Pharma GmbH, Heidelberg
- Neokodan-Spray, Farblos, alkoholisches Hautantiseptikum, Schülke und Mayer, Norderstedt

- Nobecutanspray, Atmungsaktiver, antiseptischer Sprühverband, Astra Chemicals GmbH, Wedl
- Rompun 2%, Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid, Injektionslösung, Reg.-Nr. R1061, Bayer Vital, Leverkusen
- Tramal- Tropfen, Wirkstoff: Tramalolhydrochlorid, Grünethal GmbH, Aachen

Verbrauchsmaterialien

- Disposable Scalpel No.15, Ref.: 02.001.30.015, PFM Produkte für Medizintechnik, Köln
- Einmal-Injektions-Kanüle, Sterican Gr.1, 16, 18, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Einmalrasierer, Kai medikal, Ref. 48.500.00.000, Kai Europe GmbH, Solingen
- Einmalspritze Injekt, 2 ml/ 10 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- Ethicon Perma-Hand Seide, schwarz, geflochten, nicht resorbierbar 4/0, 1,5 metrik Johnson & Johnson Intl, Brüssel, Belgien
- OP-Abdeckfolie, Klinidrape, steril, Mölnlycke Health Care OY, Homantsi, Finnland
- Puderfreie OP-Handschuhe aus Latex, Manex Ultra, Beiersdorf AG, Hamburg

Geräte

- Chirurgische Pinzette BD 553, 115mm, Aesculap AG, Tuttlingen
- Langhaarschneider, Moser Rex, Typ 1230, Fernwald
- Nadelhalter BM 149, 140mm, Aesculap AG, Tuttlingen
- Narkosegerät Stephens universal vaporiser, Serial-No. 1831, Cenvet, Sydney, Australia
- Präparierschere BC 259, 145mm, Aesculap AG, Tuttlingen

Röntgen- Verlaufskontrolle

Chemikalien

- Äther zur Narkose, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Forene, Inhalationsnarkotikum, Wirkstoff: Isofluran, Zul.-Nr. 2594.00.00, Abort GmbH, Wiesbaden

Verbrauchsmaterialien

- Kodak X-OMAT MA Film 50 Ready Pack 13 x 18 cm, Kodak, Stuttgart
- Watte, Apotheke der Universität Würzburg

Geräte

- Entwicklungsautomat Agfa Curix 242S, Agfa, München
- Faxitron Röntgengerät Modell 43855B, Hewlett Packard, Böblingen
- Narkosegerät Stephens universal vaporiser, Serial-No. 1831, Cenvet, Sydney, Australia

Explantation der Kollagenträger

Chemikalien

- Kohlendioxid, CO₂, Versorgungsanlage Universität Würzburg
- Formaldehyd 37%, Merck, Darmstadt
- Natrium hydrogenphosphate heptahydrate, Fa. Aldrich, Steinheim
- Natrium phosphate, monobasic monohydrate, Fa. Aldrich, Steinheim
- Natriumhydroxid, NaOH M =40,00 g/ mol, Merck KGaA, Darmstadt

Verbrauchsmaterialien

- Disposable Scalpel No.15, Ref.: 02.001.30.015, PFM Produkte für Medizintechnik, Köln
- Einmal-Kulturröhrchen mit Schraubverschluß, Bestnr. KU16, A. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Einmalrasierer, Kai medikal, Ref. 48.500.00.000, Kai Europe GmbH, Solingen

Geräte

- Chirurgische Pinzette BD 553, 115mm, Aesculap AG, Tuttlingen
- Begasungsbrutschrank B 5060 EK/ CO₂, Heraeus Instruments, Hanau
- Entwicklungsautomat Agfa Curix 242S, Agfa, München
- Faxitron Röntgengerät Modell 43855B, Hewlett Packard, Böblingen

Messung der Knochenzylinder am pQCT

Verbrauchsmaterialien

- ZIP- Speichermedium, Fuji Magnetics GmbH, Kleve
- Superhartgips GC Fujirock®, GC Europe, Interleuvenlaan, 13 Leuven, Belgien

Programme

- Softwareversion 5.40 für Computertomograph XCT 2000, Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim

Geräte

- Computertomograph XCT 2000, Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim
- Lego®- Bauteile, LEGO System A/S, Denmark

Herstellung der histologischen Präparate

Chemikalien

- Aqua destillata, Universitätsversorgung Würzburg
- Azophloxin, Best-Nr.: 11640, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

- Essigsäure (acetic acid), 100% p.a, Best.-Nr.: 3738.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Ethanol 70%, Apotheke der Universität Würzburg
- Giemsa-Lösung, Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck KGaA, Darmstadt
- Glycolmethacrylat, Methacrylicacid-hydroxyethylester, Best.-Nr. 28744, PSI Grünewald GmbH, Laudenbach
- Lichtgrün, Merck, Best.-Nr.: 1.15941.0025, Darmstadt
- Molybdätophosphorsäure, Best.-Nr.: 1.00532.0025, Merck, Darmstadt
- Natriumtetraborat (Borax), Sigma, Best.-Nr.: B-3545, St. Louis, MO 63178, USA
- Natriumthiosulfat, M=158,11 g/ mol, Merck KGaA, Darmstadt
- Orange-G, Merck, Best.-Nr.: 1.15925.0025, Darmstadt
- Pyronin G, Best.Nr.: 7518, Merck KG, Darmstadt
- Faltenfilter 595½, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
- Salzsäure, 1mol/l, Merck KGaA, Darmstadt
- Säurefuchsin, Best.-Nr.: 1.05231.0025, Merck, Darmstadt
- Sigma-Calcium-Puffer-Reagenz, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO 63178, USA
- Sigma-Calcium-Reagenz, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO 63178, USA
- Sigma-Calcium-Standardlösung, Calcium/ Phosphorus combined Standard, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO 63178, USA
- Silbernitrat, AgNO₃ M=169,87 g/ mol Merck KGaA, Darmstadt
- Technovit 7200 VLC, lighthärtender Kunststoff, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim
- Technovit 7210 VLC, Präzisionskleber; Heraeus Kulzer GmbH & Co.KG, Laudenbach
- Toluidine Blue, Sigma, Best.Nr.: T0394, St. Louis, MO 63178, USA
- Tris, (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane), Best.-Nr. 5429.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Wasserstoffperoxid 10%, Apotheke der Universität Würzburg
- Weigerts Lösung A (alkoholische Hämatoxylin- Lösung), Merck, Darmstadt
- Weigerts Lösung B (salzsaure Eisen(III)nitrat-Lösung), Merck, Darmstadt
- Xylidin Ponceau, Best.-Nr.: 81465, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Verbrauchsmaterialien

- Deckglas, 18x18, A. Hartenstein Labor- und Medizintechnik GmbH, Würzburg
- Einbettformen, 4140, PSI Grünewald GmbH & Co KG, Laudenbach
- Einmal-Kulturröhrchen mit Schraubverschluß, Bestnr. KU16, A. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Folienschreiber, Lumocolor 318-9, fein, permanent, schwarz, Staedtler, Nürnberg
- Glaspipetten, Disposable Pasteur Pipettes Cat. No. 93, Chase Instruments Corp., New York, USA

- Klingen mit Griffschutz, SIH1, A. Hartenstein Laborbedarf für die Forschung, Würzburg
- Kodak X-OMAT-MA Film 50 Ready Pack 13 cm x 18 cm, Kodak, Stuttgart
- Zentrifugenröhrchen konisch, ZR95, 15ml, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH, Gräfeling-Locham
- Zentrifugenröhrchen konisch, ZR82, 50ml, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH, Gräfeling-Locham
- Pasteurpipetten aus Glas PP06, A. Hartenstein, Würzburg
- Polierpapier Siliciumcarbid 2400/4000; Struers, Lauf an der Pegnitz
- Probengefäße, Pathologisches Institut der Universität Würzburg
- Schleifpapier K 500/1000/1200; PSI Grünewald GmbH & Co.KG, Laudenbach
- Watte, Apotheke der Universität Würzburg

Geräte

- Diascanner Nikon Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf
- Entwicklungsautomat Agfa Curix 242S, Agfa, München
- EXAKT- Lichtpolymerisationsgerät Histolux, EXAKT- Apparatebau, Norderstedt
- Faxitron Röntgengerät, Modell 43855B, Hewlett Packard, Vertrieb: Rhode & Schwarz, Köln
- Färbekästen, Sonderanfertigung, Noras Röntgen- und Medizintechnik GmbH, Würzburg
- Homogenisator mit Kolben, HOG3, A. Hartenstein Laborbedarf für die Forschung, Würzburg
- Magnetrührer M32, Firma Hartenstein, Würzburg
- Mikrometermeßschraube mit Ständer, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt
- Mikroschleifsystem EXAKT 400, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt
- Mikroskop DMRD, Leica, Ismaning
- Präzisionsklebepresse EXAKT 402, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt
- Rührwerk Framo LR20, 50-1800 U/ min, Franz Morat GmbH & Co KG, Eisenach
- Trennschleifsystem EXAKT 300, EXAKT-Apparatebau, Norderstedt

Calciumbestimmung

Chemikalien

- Aqua destillata, Universitätsversorgung Würzburg
- Salzsäure rauchend 37%, HCl Best.-Nr. 1.00317.1000, Merck, Darmstadt
- Sigma- Calcium- Puffer- Reagenz, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO 63178, USA
- Sigma- Calcium- Reagenz, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO 63178, USA
- Sigma- Calcium- Standardlösung, Calcium/ Phosphorus combined Standard, Sigma Diagnostics, Inc., St. Louis, MO 63178, USA

- Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane), Best.-Nr. 5429.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien

- Faltenfilter 595½, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel
- Klingen mit Griffschutz, SIH1, A. Hartenstein Laborbedarf für die Forschung, Würzburg
- Multi-Well-Platte, 96 Well, Corning Costar, Bodenheim
- Reaktionsgefäß, 1,5 und 2,0 ml, Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Hamburg
- Zentrifugenröhrchen konisch, ZR95, 15ml, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH, Gräfeling- Locham
- Zentrifugenröhrchen konisch, ZR82, 50ml, Falkner Consulting für Messtechnologie GmbH, Gräfeling- Locham

Programme

- easy win fitting, V6.0a, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

Geräte

- Biofuge 13, Heraeus Instruments, Hanau
- Dispergiergerät Ultra- Turrax® T25, IKA®- Werke GmbH & CO.KG, Staufen
- Homogenisator mit Kolben, HOG3, A. Hartenstein Laborbedarf für die Forschung, Würzburg
- Mikroplattenlesegerät (Photometer) Tecan Spektra Rainbow, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
- Pipetten Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Köln
- Rührwerk Framo LR20, 50- 1800 U/ min, Franz Morat GmbH & Co KG, Eisenach
- Vortexer VF 2, IKA, Vertrieb über Fa. Schubert & Weiss, München
- Waage ABS 120-4, Kern und Sohn GmbH, Balingen- Frommern
- Zentrifuge Universal 30 RF, Nr. 1402, Hettich- Zentrifugen, Tuttlingen

Auswertung

Verbrauchsmaterialien

- Diarahmen Antinewton, Gepe Management AG, Zug, Schweiz
- Film Kodak Ektachrome 100 HC (ISO 100/ 21°), Kodak, Stuttgart
- Folienschreiber, Lumocolor 318-9, fein, permanent, schwarz, Staedtler, Nürnberg
- Schreibfolie, 0,1 mm, Lumocolor Transparent Film, Nr. 63210-21, Staedtler, Nürnberg

Programme

- Scion Image for Windows for Windows, Version 4.0.2., Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA

- StatView für Windows, Version 5.0, SAS Institute Inc.

Geräte

- Diascanner Nikon Scan 32, Nikon GmbH, Düsseldorf
- Flachbrettscanner, HP Scanjet Ilcx, Hewlett Packard Company, Vertrieb:
Rhode& Schwarz, Köln
- Mikroskop Leitz DMRD, Leica, Ismaning

B Herstellung der Lösungen für die Färbungen

- Weigerts Eisenhämatoxylin
Weigerts Lösung A und Lösung B wurden unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 gemischt.
- Masson-Lösung (Goldner I)
Ansatz A: 1 g Säurefuchsin+ 1 ml Essigsäure+ 100 ml aqua destillata
Ansatz B: 1 g Xylidin-Ponceau+ 1 ml Essigsäure+ 100 ml aqua destillata
Ansatz C: 0,5 g Azophloxin+ 0,2 ml Essigsäure+ 100 ml aqua destillata
Um die Masson- Lösung herzustellen, wurden 33 ml des Ansatzes A mit 66 ml des Ansatzes B gemischt. 100 ml dieser Lösung wurden mit 20 ml des Ansatzes C sowie 880 ml 0,2 %iger Essigsäure gemischt.
- Orange G
Dazu wurden 10 g Orange- G und 15 g Molybdätophosphorsäure in 500 ml aqua destillata gelöst. Die fertige Lösung wurde vor dem Färbvorgang filtriert.
- Lichtgrün
Dazu wurden 0,5 g Lichtgrün und 1 ml Essigsäure in 500 ml aqua destillata gelöst.
- Toluidinblau- Lösung
Ansatz A: 8 g Natrium Tetraborat und 8 g Toluidin Blau wurden in 800 ml aqua destillata gelöst und für 15 min agitiert.
Ansatz B: 2 g Pyronin G wurden in 200 ml aqua destillata gelöst und für 15 min agitiert.
Um die Toluidinblau- Lösung herzustellen wurden Ansatz A und B gemischt und für 15 min agitiert, danach zweimal filtriert.

C Signifikanzniveaus der Messungen

Röntgenverlaufskontrolle zur Bestimmung der Knochenneubildung:

Angabe des Tages der Messung mit jeweiligem Signifikanzniveau

Legende: [*] p < 0,05 signifikant
 [**] p < 0,01 hoch signifikant
 [ns] p > 0,05 nicht signifikant

Dosis 2µg	BMP-2 +EHBMP-2	EHBMP-2
BMP-2	ns	17*, 23*, 28*
BMP-2 +EHBMP-2	-	ns

Dosis 2µg	T3 +EHBMP-2	EHBMP-2
T3	17*, 28*	11**, 17*, 23*, 28*
T3 +EHBMP-2	-	ns

Dosis 2µg	T4 +EHBMP-2	EHBMP-2
T4	ns	17**, 23**, 28**
T4 +EHBMP-2	-	11*, 17*, 23*, 28**

Dosis 4µg	BMP-2+EHBMP-2 (1:1)	BMP-2+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
BMP-2	ns	ns	17*, 23*, 28*
BMP-2+EHBMP-2 (1:1)	-	ns	17*, 23*, 28*
BMP-2+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	11*, 17*, 23*, 28*

Dosis 4µg	T3+EHBMP-2 (1:1)	T3+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
T3	ns	17*, 23**, 28*	ns
T3+EHBMP-2 (1:1)	-	ns	ns
T3+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	17*, 23**, 28*

Dosis 4µg	T4+EHBMP-2 (1:1)	T4+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
T4	ns	ns	11*, 17**, 23**, 28**
T4+EHBMP-2 (1:1)	-	ns	11*, 17**, 23**, 28**
T4+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	11**, 17*, 23**, 28*

Röntgenologische Bestimmung der Knochenfläche am
Explantatzylinder:

Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p

Dosis 2µg	BMP-2 +EHBMP-2	EHBMP-2
BMP-2	0,0368	0,0157
BMP-2 +EHBMP-2	-	0,5458

Dosis 2µg	T3 +EHBMP-2	EHBMP-2
T3	0,0011	0,0003
T3 +EHBMP-2	-	0,6138

Dosis 2µg	T4 +EHBMP-2	EHBMP-2
T4	0,0493	0,0021
T4 +EHBMP-2	-	0,0068

Dosis 4µg	BMP-2+EHBMP-2 (1:1)	BMP-2+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
BMP-2	0,1472	0,0603	0,0058
BMP-2+EHBMP-2 (1:1)	-	0,3739	0,0169
BMP-2+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0214

Dosis 4µg	T3+EHBMP-2 (1:1)	T3+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
T3	0,3854	0,0190	0,3070
T3+EHBMP-2 (1:1)	-	0,4838	0,1248
T3+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0132

Dosis 4µg	T4+EHBMP-2 (1:1)	T4+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
T4	0,3018	0,1398	0,0032
T4+EHBMP-2 (1:1)	-	0,2631	0,0014
T4+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0197

Röntgenologische Bestimmung der Knochendichte am
Explantatzylinder:

Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p

Dosis 2µg	BMP-2 +EHBMP-2	EHBMP-2
BMP-2	0,1996	0,1138
BMP-2 +EHBMP-2	-	0,2624

Dosis 2µg	T3 +EHBMP-2	EHBMP-2
T3	0,0008	0,0308
T3 +EHBMP-2	-	0,8293

Dosis 2µg	T4 +EHBMP-2	EHBMP-2
T4	0,0538	0,0263
T4 +EHBMP-2	-	0,0587

Dosis 4µg	BMP-2+EHBMP-2 (1:1)	BMP-2+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
BMP-2	0,1717	0,5893	0,0015
BMP-2+EHBMP-2 (1:1)	-	0,0845	0,0463
BMP-2+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0011

Dosis 4µg	T3+EHBMP-2 (1:1)	T3+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
T3	0,5131	0,0014	0,3508
T3+EHBMP-2 (1:1)	-	0,1065	0,2781
T3+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0011

Dosis 4µg	T4+EHBMP-2 (1:1)	T4+EHBMP-2 (3:1)	EHBMP-2
T4	0,2154	0,3207	0,0041
T4+EHBMP-2 (1:1)	-	0,0141	0,0016
T4+EHBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0004

Computertomographische Messung:

Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit p

Dosis 2µg	BMP-2 +EHBMP-2	EHBMP-2
BMP-2	0,0251	0,0071
BMP-2 +EHBMP-2	-	0,2736

Dosis 2µg	T3 +EHBMP-2	EHBMP-2
T3	0,0021	0,0011
T3 +EHBMP-2	-	0,5942

Dosis 2µg	T4 +EHBMP-2	EHBMP-2
T4	0,0135	0,0004
T4 +EHBMP-2	-	0,0041

Dosis 4µg	BMP-2+EBMP-2 (1:1)	BMP-2+EBMP-2 (3:1)	EBMP-2
BMP-2	0,114	0,0657	0,0134
BMP-2+EBMP-2 (1:1)	-	0,4627	0,0364
BMP-2+EBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0159

Dosis 4µg	T3+EBMP-2 (1:1)	T3+EBMP-2 (3:1)	EBMP-2
T3	0,3170	0,0232	0,3995
T3+EBMP-2 (1:1)	-	0,1157	0,0628
T3+EBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0057

Dosis 4µg	T4+EBMP-2 (1:1)	T4+EBMP-2 (3:1)	EBMP-2
T4	0,3153	0,1212	0,0054
T4+EBMP-2 (1:1)	-	0,3465	0,0028
T4+EBMP-2 (3:1)	s.o.	-	0,0045

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Reuther möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit und die Übernahme des Referates danken.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Dr. K. Würzler für die Idee der Arbeit, die unermüdliche Anleitung und Unterstützung bei der Konzeption, Durchführung und Auswertung der Untersuchungen danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau M. Schleyer für die hilfsbereite Unterstützung bei den Arbeiten im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dipl.- Biol. K. Berr, die bei den labortechnischen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. K. Julius danke ich für die Anleitung und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft bei den Operationen der Versuchstiere.

Herrn PD Dr. Schneider möchte ich für die Unterstützung bei der computertomographischen Auswertung im Institut für Nuklearmedizin danken.

Meinem Kommilitonen Carsten Janke danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. B. Klaiber für die freundliche Übernahme des Korreferates.