

**Norbert R. Kübler**

**Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs)**

**Rekonstruktionsverfahren bei der Behandlung von Knochendefekten und die Hypothese der Osteoinduktion**

Medizinische Abhandlungen berichten bereits im 17. Jahrhundert von Knochenrekonstruktionen im Schädelbereich. Als Knochenersatz wurden verschiedenartigste allogene oder xenogene Materialien verwendet, die meist aus humanem oder tierischem Knochen bestanden. Mit fortschreitender chirurgischer Technik wurde es möglich, autogene Knochentransplantationen am Patienten vorzunehmen. Hierdurch wurden die Heilungschancen wesentlich verbessert, da zum einen körpereigene vitale Zellen verpflanzt werden konnten und zum anderen keine immunologisch bedingten Abstoßungsreaktionen auftraten. Durch die Entwicklung synthetischer Knochenersatzmaterialien konnte das Spektrum der behandelbaren Fälle in den letzten Jahrzehnten deutlich erweitert werden, jedoch ist auch noch heute der Ersatz von fehlendem Knochen bei allen Behandlungsmethoden mit medizinischen Risiken verbunden.

In der Vergangenheit wurden verschiedenartigste Mechanismen der Knochenregeneration postuliert. Anfang des 20. Jahrhunderts kristallisierte sich heraus, dass die Anwesenheit von vitalen körpereigenen Knochenzellen, den Osteoblasten, eine der Voraussetzungen für die Heilung von Knochendefekten darstellt. Diese Zellen können auch aus defektfernen Skelettabschnitten stammen und an den Ort des Defektes verpflanzt werden. Eine weitere akzeptierte Lehrmeinung stellt die Osteokonduktion dar, bei der aus dem umgebenden intakten Knochengewebe die erforderlichen Zellen in eine operativ eingebrachte poröse Leitstruktur (Implantat bzw. Knochenersatzmaterial) einwachsen und dadurch eine Überbrückung bzw. knöcherne Konsolidierung von beschränkt ausgedehnten Knochendefekten und -defiziten bewirken können. Beide Mechanismen sind auch heute noch in der Osteologie allgemein anerkannt und spiegeln sich in den verschiedenen Operationstechniken wider.

Zusätzlich wurde in den 1960er Jahren eine Beobachtung gemacht, die mit den oben genannten Wirkungsmechanismen nicht erklärt werden konnte: Im Tierversuch gelang Urist<sup>1</sup> durch die Implantation von demineralisiertem allogenen Knochen (derselben Spezies) die Bildung von Knochengewebe in der Muskulatur und im subkutanem Gewebe, d. h. weit entfernt von anderen skeletalen Strukturen. Aufgrund der Demineralisation, die für die Knochen bildenden Eigenschaften Voraussetzung ist, enthält der Knochen keine vitalen Osteoblasten. Hitzeeinwirkung zerstört die Knochen bildenden Eigenschaften des demineralisierten Knochens. Gestützt auf umfangreiche Untersuchungen stellte Urist die

---

<sup>1</sup> Vgl. Urist (1965).

Hypothese auf, dass demineralisierter Knochen hitzeempfindliche Faktoren enthält, die durch die Demineralisation aus dem Knochengewebe diffundieren können und allein für die Knochenneubildung in Muskelgewebe ausreichend sind. Er bezeichnete diese Art der Knochenneubildung als Osteoinduktion.

Die Identifizierung der einzelnen Faktoren wurde in den folgenden Jahren weiter vorangetrieben. Mit einem chemischen Extrakt aus Knochengewebe hielt Urist schließlich ein Proteingemisch in Händen, das die gleichen induktiven Eigenschaften wie demineralisierte Knochenmatrix besaß und das die Ursache für die Knochenneubildung sein musste.

## **Einblick in die molekularbiologischen Abläufe bei der Knochenheilung: die Identifizierung von Wachstumsfaktoren**

Die weitere Auftrennung des induktiven Knochenmatrixextraktes in seine Komponenten führte Wang<sup>2</sup> und Mitarbeiter zu einer Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von 30.000 Dalton. Schließlich konnten in der Arbeitsgruppe von Wozney<sup>3</sup> die Aminosäuresequenzen und nachfolgend auch die kodierenden Gene mehrerer osteoinduktiver Proteine entschlüsselt werden. Aufgrund der Ähnlichkeiten der nun als *bone morphogenetic proteins* (BMPs) bezeichneten Gruppe von Knochen induzierenden Proteinen mit dem früher entdeckten TGF- $\beta$  wurden sie der TGF- $\beta$ -Superfamilie zugeordnet. Später wurden andere Funktionen von BMPs bei der Embryonalentwicklung entdeckt, die Namensgebung blieb jedoch bei der historischen Bezeichnung für die Gruppe.

Die TGF- $\beta$ -Superfamilie ist in den letzten Jahren kontinuierlich um weitere Mitglieder erweitert worden, die unter anderem in der Gewebedifferenzierung wichtige Rollen spielen. Allen gemeinsam ist die molekulare Struktur: ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten, die über eine Cysteinbrücke kovalent miteinander verbunden sind. Die übrigen Cysteine in den beiden Untereinheiten bilden je drei weitere Disulfidbrücken aus, die durch ihre räumliche Nähe zueinander ein komplexes Faltungsmuster ausbilden und deshalb als Cysteinoknoten bezeichnet werden. Diese räumliche Anordnung wird in eukaryontischen Zellen in einem Vorläufermolekül ausgebildet, das am aminoterminalen Ende eine zusätzliche Sequenz enthält. Das biologisch aktive BMP wird nach der Faltung durch die Abspaltung dieses Propeptids, das wohl für das Erreichen der korrekten Struktur erforderlich ist, freigesetzt.

## **BMPs sind Signalmoleküle, die molekulare Kaskaden auslösen**

Wie alle anderen Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie binden auch BMPs an Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen, wobei sie an zwei verschiedene Rezeptortypen binden und es hierdurch zur Bildung von Heterodimeren dieser Rezeptoren kommt. Der Ablauf der Bindung wurde für BMP-2 etwas anders beschrieben als für TGF- $\beta$ , da BMP-2 zuerst an einen Typ-I-Rezeptor bindet, gefolgt von einer Bindung an einen Typ-II-Rezeptor. Die Wirkung dieser ligandenvermittelten Rezeptordimerisierungen führt unabhängig von der Reihenfolge in allen Fällen zur Phosphorylierung des Typ-I-Rezeptors durch den Typ-II-Rezeptor. Die Stöchiometrie der Rezeptoruntereinheiten wird als äquimolares Verhältnis postuliert, wobei es starke Hinweise auf das Vorliegen von Tetrameren der Rezeptoren

<sup>2</sup> Vgl. Wang *et al.* (1988).

<sup>3</sup> Vgl. Wozney *et al.* (1988).

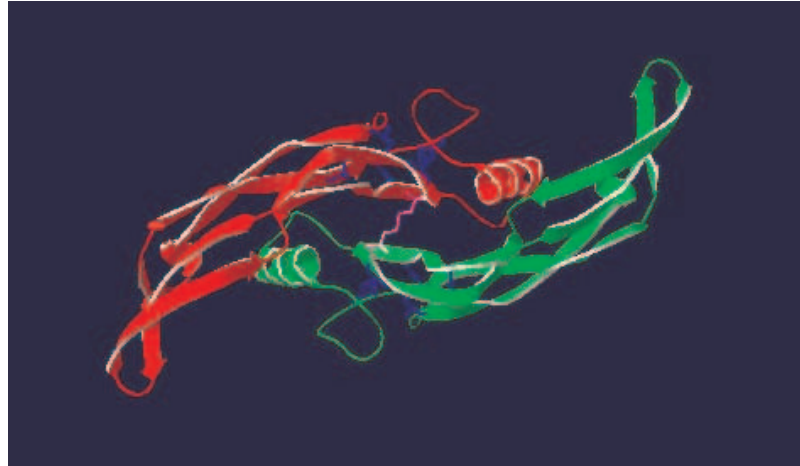


Abb. 1: Struktur von BMP-2: Disulfid-verbrücktes Homodimer.

gibt. Aktivierte Typ-I-Rezeptoren sind in der Lage, cytoplasmatische Faktoren, genauer gesagt die rezeptorregulierten Smads 1, 5 und 8, zu phosphorylieren. Sobald diese schließlich an das Co-Smad 4 binden, werden sie als Komplex in den Kern transloziert, wo sie als Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Expression einer Reihe von Genen beteiligt sind.<sup>4</sup> Die Weiterleitung des Signals vom Rezeptor über die Smads unterliegt weiteren Regulationsmechanismen, die unter anderem über inhibitorische Smads vermittelt werden. Die Bezeichnung Smad wurde in Anlehnung an die Nomenklatur von zuerst bei *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* entdeckten Proteinen vergeben.

Wie neue Untersuchungen von Genexpressionsprofilen durch Microarrayanalysen zeigen, sind viele Gene gleichzeitig von den regulativen Prozessen betroffen, die durch BMP-vermittelte Signalkaskaden eingeleitet werden.

Die Veränderungen, die letztlich durch das BMP-vermittelte Signal ausgelöst werden, führen zur Differenzierung von Vorläuferzellen der Osteoblasten (Osteoprogenitorzellen), die für die Knochenneubildung verantwortlich sind.

## **BMPs sind in der embryonalen Entwicklung an Differenzierungsprozessen beteiligt**

Die Anwesenheit von BMP-Transkripten konnte durch Hybridisierungsstudien in verschiedenen embryonalen Geweben nachgewiesen werden. Die Entwicklung der Gliedmaßen aus den entsprechenden Anlagen wird in erheblichem Maß durch das Zusammenspiel verschiedener BMPs und einer Reihe antagonistisch wirkender Faktoren gesteuert. Die Signalwirkung der BMPs ist nicht auf osteoinduktive Prozesse beschränkt, sondern auch bei der Musterbildung in der embryonalen Entwicklung anzutreffen. Die Beteiligung von BMP-4 bei der Ausbildung der dorso-ventralen Achse konnte sowohl bei Arthropoden als auch bei Wirbeltieren nachgewiesen werden.<sup>5</sup>

Die starke Homologie der Sequenzen von BMPs und mindestens zwei Genen aus *Drosophila* weisen darauf hin, dass diese Moleküle bereits vor der Divergenz von Arthropoden

<sup>4</sup> Vgl. Miyazono *et al.* (2001).

<sup>5</sup> Vgl. Hogan (1996).

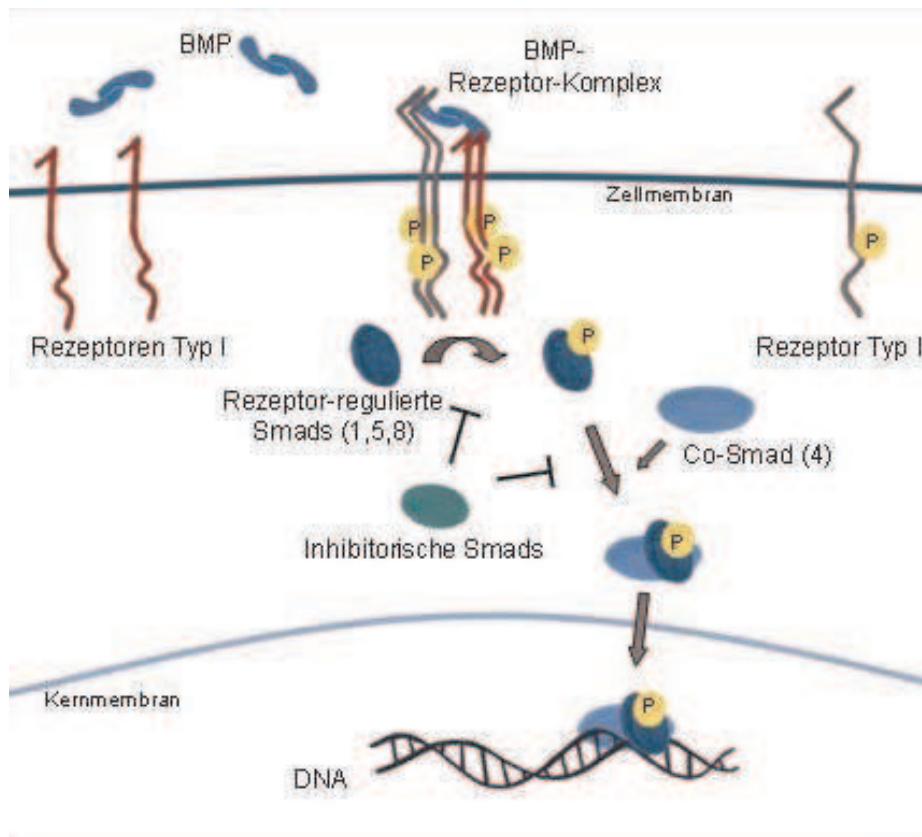


Abb. 2: BMP-vermittelte Signalkaskade.

und Wirbeltieren existiert haben müssen. Die Implantation von *Decapentaplegic*, einem dieser Drosophilaproteine, führt in Nagetieren ebenfalls zu Knorpel- und Knochenbildung.

Bisher konnte die Osteoinduktivität für die Proteine BMP-2 bis BMP-7 nachgewiesen werden, wobei die Bedeutung der einzelnen Vertreter variiert. Transgene Mäuse mit Mutationen in BMP-5 wiesen zwar skeletale Abnormitäten auf, waren jedoch überlebensfähig, während der vollständige Defekt von BMP-2 oder BMP-4 zum Absterben der Föten *in utero* führte.

Für die normale Entwicklung von Augen und Nieren ist BMP-7 unerlässlich, wie in transgenen Mäusen mit Nullmutationen gefunden wurde. Diese Tiere wurden mit verkümmerten Augen, Nierenfehlbildungen und Polydaktylien geboren und überlebten durch die schwer beeinträchtigte Nierenfunktion nur kurze Zeit.<sup>6</sup>

Zusammengefasst sind BMPs als Vermittler einer Reihe von Differenzierungsvorgängen in verschiedenen Entwicklungsabschnitten zu finden, wo sie zentrale Rollen übernehmen.

## Das BMP besitzt chemotaktische Eigenschaften für mesenchymale Stammzellen

Der Nachweis des osteoinduktiven Potentials von BMPs war zwar bereits in den Versuchen von Urist erbracht worden, doch fehlte zu der Vermutung, dass es sich bei den differenzie-

<sup>6</sup> Vgl. Kingsley (1994).

renden Zellen um mesenchymale Vorläuferzellen handelte, eine Identifizierung der vorliegenden Zelltypen. In den Arbeiten von Cunningham *et al.*<sup>7</sup> wurden die ersten spezifischen Aktivierungen von Monozyten gezeigt. Zu dieser Zeit war es bereits gelungen, rekombinante BMPs herzustellen und damit erste Versuche in Zellkulturen durchzuführen. Ein Vergleich der Ausbeuten bei der Gewinnung von BMPs mit Hilfe verschiedener Methoden zeigt, dass der anfangs limitierende Faktor der zu geringen verfügbaren Proteinmenge schließlich durch die Methode des genetischen Engineering überwunden werden konnte. Während aus einem Kilogramm Rinderknochen im günstigen Fall ein Mikrogramm an gereinigten BMPs isoliert werden konnte, erhöhte sich die Ausbeute bei eukaryontischen Zellkulturen um ein Vielfaches. Die Ermittlung der Struktur von BMP-7, das als erstes Mitglied der BMP-Familie kristallisiert und einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen werden konnte, wurde hierdurch erst möglich.

Die Kristallstruktur von BMP-2 wurde ebenfalls mit rekombinant erzeugtem Protein gelöst, das von der Würzburger Gruppe um Sebald jedoch aus bakteriell exprimiertem Material gewonnen wurde. Die bereits erwähnte Struktur der TGF- $\beta$ -ähnlichen Proteine kann in Bakterienzellen im Cytoplasma nicht ausgebildet werden und erfordert eine nachträgliche Faltung der Polypeptidketten in definierten Pufferbedingungen. Von dieser Arbeitsgruppe weiter durchgeführte Studien mit mutierten BMP-2-Molekülen führten zur Identifizierung der Bindungsepitope, die von den extrazellulären Anteilen der zwei unterschiedlichen Rezeptortypen gebunden werden können.<sup>8</sup>

Die chemotaktische Anlockung von Monozyten durch die BMPs führt zur Konzentration dieser Zellen, aber auch zur Expression von TGF- $\beta$ 1, das unter anderem die Produktion von extrazellulärer Matrix stimuliert. Es wird demzufolge eine Reihe von Prozessen ausgelöst, die zur Kaskade der Knochenbildung beitragen.

## Die Osteoinduktion entspricht der Wiederholung von Abläufen bei der Skelettentwicklung

Anhand des Modells der enchondralen Knochenbildung lassen sich die molekularbiologischen Vorgänge bei der Knochenheilung im adulten Organismus wie folgt darstellen:

Entlang eines BMP-Gradienten kommt es zunächst zur chemotaktischen Anlockung mesenchymaler Stammzellen. Die Ausbildung von Zellclustern, die über Adhäsionsmoleküle an den Zelloberflächen erfolgt, wird als Kondensation bezeichnet. Die Expression von BMP-2 und BMP-5 in solchen Zellclustern wurde *in vivo* nachgewiesen, ebenso das Protein Noggin, ein Antagonist der BMPs, der für die Regulation der Clustergröße zuständig zu sein scheint. Der Proliferation von mesenchymalen Stammzellen folgt die Differenzierung in Chondroblasten und die Ausbildung von extrazellulärer Matrix. Eine Reihe von weiteren Cytokinen wird als Folge dieser Prozesse sezerniert, was zur weiteren Entwicklung des Gewebes beiträgt. Das knorpelige Gewebe kalzifiziert, es kommt zum Einsprossen von Blutkapillaren und die extrazelluläre Matrix wird entsprechend den funktionellen Anforderungen umgebaut. Aus Vorläuferzellen neu gebildete Osteoblasten bilden Knochenmatrix, die durch ihre trabekulären Strukturen alle Charakteristika primärer Spongiosa aufweist.

---

<sup>7</sup> Vgl. Cunningham *et al.* (1992).

<sup>8</sup> Vgl. Kirsch *et al.* (2000).

## Osteoinduktion mit Knochenextrakten *in vivo*

In eigenen Versuchen wurden, in Anlehnung an das Verfahren von Urist *et al.*<sup>9</sup> kombiniert mit einigen Modifikationen, verschiedene osteoinduktive Matrixextrakte aus humanem Knochen, Knochen tierischen Ursprungs und aus humanem Osteosarkomgewebe isoliert. Die Elektrophoresemuster der isolierten Proteine stimmten mit den Beschreibungen osteoinduktiver Extrakte überein.<sup>10</sup> Nach einigen Vorversuchen *in vitro* wurden Implantationen des isolierten Materials in die Oberschenkelmuskulatur von Mäusen vorgenommen. Die drei Wochen nach Implantation ausgebildeten intramuskulären, heterotopen Ossikel wurden histologisch untersucht, wobei sich folgender Aufbau nachweisen ließ: Im Zentrum der Ossikel findet sich hämatopoetisch aktives Knochenmark, das alle Differenzierungsstufen der Blutbildung aufweist und dessen Zellen später zu Fettzellen degenerieren. Die kugelig geformten Ossikel sind von lamellärem Knochen umgeben, wobei sich die Menge an neu gebildetem Knochen direkt proportional zur Menge des implantierten Materials verhält.<sup>11</sup>



Abb. 3: Röntgenbefund einer Ossikelbildung mit hämatopoetisch aktivem Knochenmark drei Wochen nach Implantation von 5 mg osteoinduktivem Knochenmatrixextrakt.

Der bisher seltene klinische Einsatz humaner Knochenmatrixextrakte bei Patienten ist durch die nicht abzuschätzende induktive Wirkung verschiedener Chargen induktiver Extrakte zu begründen. Zudem ist die Verfügbarkeit humaner Extrakte aufgrund der äußerst geringen Konzentration an natürlich vorkommenden BMPs in der Knochenmatrix sehr beschränkt, und Infektionsrisiken sind nicht auszuschließen. Bei der Verwendung boviner (xenogener) Knochenmatrixextrakte darf die Gefahr einer Prionenübertragung nicht außer Acht gelassen werden. Da inzwischen jedoch gentechnisch erzeugte BMPs eukaryontischen oder bakteriellen Ursprungs, wie bereits erwähnt, in ausreichenden Mengen verfügbar sind, wurden weitere Untersuchungen mit dem löslichen Protein und inzwischen auch mit modifizierten BMPs durchgeführt.

<sup>9</sup> Vgl. Kübler und Urist (1993).

<sup>10</sup> Vgl. Urist *et al.* (1987).

<sup>11</sup> Vgl. Kübler *et al.* (1991).

## Perspektiven für die Behandlung von Knochendefekten

Für die definierte dreidimensionale Strukturbildung durch Osteoinduktion müssen unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse der Forschung drei zentrale Komponenten verfügbar sein.

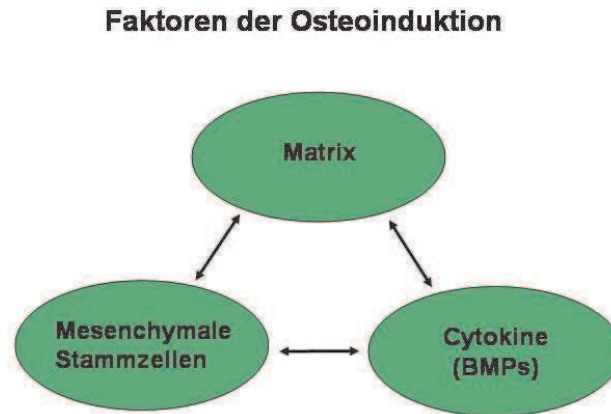


Abb. 4: Diagramm Zielzellen-Wachstumsfaktor-Leitstruktur: gegenseitige Beeinflussung der Einzelfaktoren für die Osteoinduktion.

Eine dieser Voraussetzungen ist die so genannte Leitschiene bzw. Matrix, die als poröser Träger der BMPs für die Formgebung des induzierten Knochengewebes verantwortlich ist. Bezüglich seiner Stabilität muss das verwendete Trägermaterial dem Druck des umgebenden Weichgewebes sowie der biomechanischen Belastung des zu rekonstruierenden Knochenabschnitts bis zur funktionellen Adaptation des neu gebildeten Knochengewebes standhalten. Durch die Implantation von geeigneten Materialien ist es möglich, auch Defekte kritischer Größe (*critical size defects*) zur Verknöcherung zu bringen, die keine spontane Heilung zeigen. Ohne diese Hilfestellung sind die induzierten Knochen bildenden Zellen nicht in der Lage, die biomechanisch erforderlichen makroskopischen Strukturen zu bilden.

Im Unterschied dazu werden bei der embryonalen Entwicklung des Skelettes Zellmuster angelegt (*patterning*), die bei der Entstehung von Gliedmaßen bereits alle benötigten Anteile repräsentieren. So sind beispielsweise die Vorläuferzellen für die Entwicklung des Oberarmes, des Unterarmes und der Finger bereits in determinierten Positionen angeordnet. Der Bezug dieser Anteile zueinander ist entweder durch direkten Zellkontakt oder durch sezernierte Faktoren stets gegeben. Im erwachsenen Körper ist diese graduelle Entwicklung nicht mehr möglich, doch auch die embryonalen Entwicklungsschritte führen nur zur Ausbildung definierter Strukturen, wenn die Kontinuität dieser Wechselbeziehungen gewährleistet ist.<sup>12</sup>

Als weitere Voraussetzung für die Induktion von Knochengewebe im adulten Organismus bedarf es pluripotenter, undifferenzierter Vorläuferzellen. Für die Kaskade der enchondralen Ossifikation, die über ein knorpeliges Zwischenstadium zu Knochenbildung führt, ist die Differenzierung einer Reihe von Zellarten erforderlich. Hierzu zählen u. a. Chondroblasten, Osteoblasten und Osteoklasten. Ohne die dafür notwendigen pluripotenten mesenchymalen Stammzellen, die im erwachsenen Organismus als Ursprungszellen

<sup>12</sup> Vgl. Hall und Miyake (2000).

nur noch in sehr geringer Anzahl vorhanden sind, kann eine Knocheninduktion nicht erfolgen.

Um mesenchymale Stammzellen im Körper an den Implantationsort zu bringen, muss ein entsprechend starker chemotaktischer Stimulus von den BMPs ausgehen. Die physiologischen Konzentrationen, die bei embryonalen Differenzierungsprozessen freigesetzt werden, liegen weit unter den Dosierungen, die für die Induktion von Knochengewebe im adulten Organismus erforderlich sind. Doch auch diese vergleichsweise hohen Proteinmengen bewegen sich im Bereich von wenigen Mikrogramm.

In eigenen Untersuchungen an Schweinen wurden Unterkieferkontinuitätsdefekte kritischer Größe durch rekombinantes BMP-2 in Kombination mit einem neu entwickelten Kollagenträger funktionsstabil rekonstruiert. Die Bildreihe zeigt den Verlauf bis zwölf Wochen nach der Operation.



Abb. 5: Knöcherne Überbrückung eines Unterkieferkontinuitätsdefekts kritischer Größe (5 cm) beim Schwein durch Implantation von BMP-2 und eines Kollagenträgers. BMP-2-haltiger Kollagenträger *in situ*.

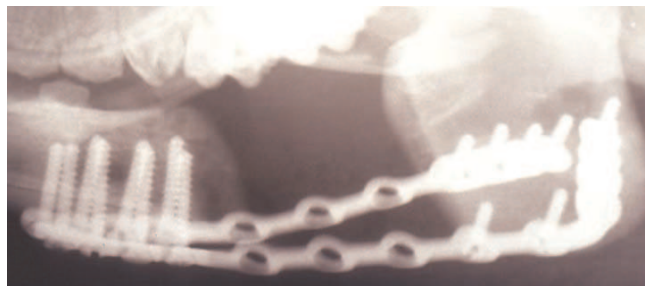


Abb. 6: Postoperativer Röntgenbefund einen Tag nach Implantation.

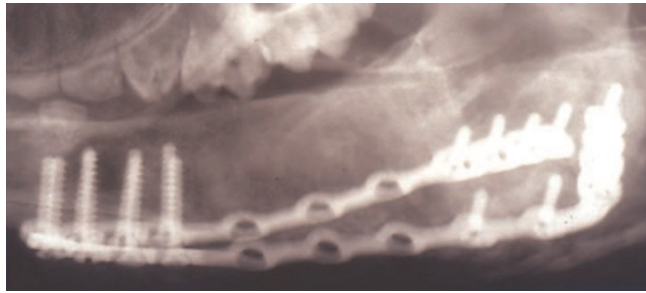


Abb. 7: Im Röntgenbild sichtbare knöcherne Überbrückung nach acht Wochen.



Abb. 8: Unterkeiferexplantat mit knöcherner Überbrückung nach zwölf Wochen.

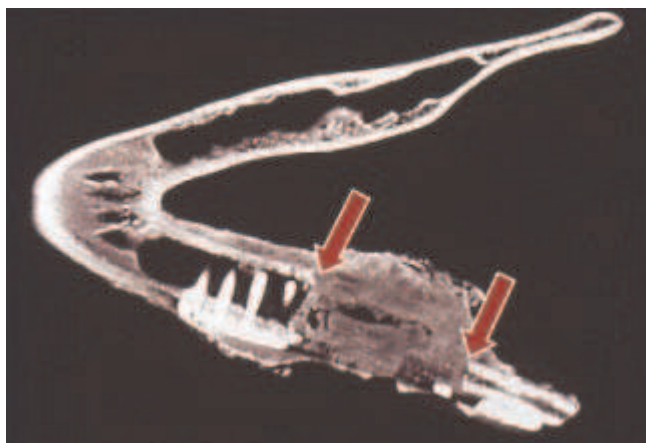


Abb. 9: Computertomogramm der BMP-2-induzierten Knochenbildung im Schweineunterkiefer nach zwölf Wochen.

Die in unserer Würzburger Arbeitsgruppe erstmalig durchgeführte gentechnische Modifizierung von rekombinantem BMP-2 führt zur Verstärkung der induktiven Eigenschaften. Dabei werden am N-terminalen Ende des reifen Proteins zusätzliche Heparinbindungsstellen eingefügt, die zu einer längeren Verweildauer am Implantationsort führen. BMP-2-Wildtyp besitzt bereits eine intrinsische Heparinbindungsstelle, wie in Deletionsstudien nachgewiesen werden konnte. Die Verstärkung dieser Bindungseigenschaften durch weitere Bindungsstellen führt zu einer höheren Affinität des Proteins zur extrazellulären Matrix und damit zum Gewebe und verhindert dadurch ein zu schnelles Abdiffundieren in benachbarte Areale. Die Überprüfung dieser Hypothese gelang tierexperimentell durch den Nachweis einer verstärkten osteoinduktiven Potenz bei gleicher Proteinkonzentration. Die verbesserte BMP-2-Mutante induziert zudem ein dichteres und damit funktionell hochwertigeres – da biomechanisch belastbareres – Knochengewebe als der Wildtyp.<sup>13</sup>

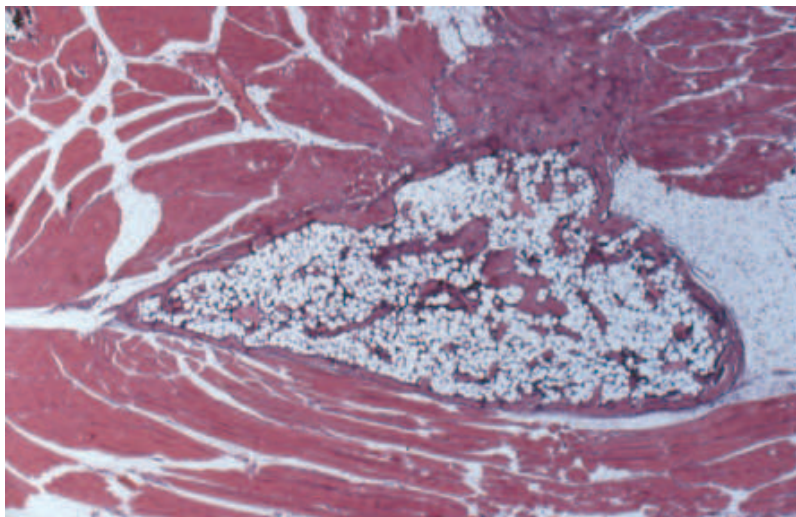


Abb. 10: Ossikelbildung nach heterotoper Implantation des BMP-2-Wildtyps: geringe mittlere Knochendichte mit Überwiegen von Knochenmarkanteilen.

Im Jahre 2001 erfolgte die klinische Zulassung von BMP-7 in Europa: Das Protein steht seitdem in rekombinanter Form für die Behandlung von Pseudarthrosen zur Verfügung. Ein Off-Label-Einsatz steht unter der Verantwortung des behandelnden Arztes. In den USA ist BMP-2 seit 2002 für die Fusion von Wirbelkörpern zugelassen und dort unter dem Namen InFuse<sup>TM</sup> erhältlich. Der therapeutische Einsatz von rekombinanten BMPs stellt eine wertvolle Alternative zur Verwendung von körpereigenen Knochentransplantaten bei der Knochenrekonstruktion dar. Auch beim Wiederaufbau von atrophiertem Knochengewebe können mit den BMPs in Kombination mit geeigneten Trägermaterialien ausgezeichnete klinische Ergebnisse erzielt werden. Die Entfaltung der Wirkung beschränkt sich auf den Ort der Implantation, da diese Wachstumsfaktoren dort die höchsten Konzentrationen besitzen. Eine unerwünschte Knochenbildung an anderen Stellen des Körpers ist ausgeschlossen, da sich die chemotaktische Wirksamkeit entlang eines Gradienten ausbildet, der nur vom Implantat ausgeht.

<sup>13</sup> Vgl. Würzler *et al.* (2000).



Abb. 11: Ossikelbildung mit hoher Knochendichte nach Implantation von modifiziertem BMP-2.

### **Die Wahl der Matrix: biomechanische und biochemische Aspekte**

Das ideale Trägermaterial für die BMPs bei der Knochenrekonstruktion sollte folgende Eigenschaften besitzen: In der Phase der knöchernen Konsolidierung des Defektes soll es ausreichende mechanische Stabilität bieten, bis es sukzessive durch körpereigenes Hartgewebe ersetzt wird. Ferner müssen beim Abbau der Trägermatrix die pharmakokinetisch notwendigen Mengen an Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, die für Osteoinduktion erforderlich sind.

Ein ideales Freisetzungssystem, das alle angesprochenen Eigenschaften in sich vereint, ist bisher noch nicht entwickelt worden. Es wird jedoch intensiv an geeigneten organischen und anorganischen Biomaterialien geforscht.

### **Osteogene Differenzierung von Stammzellen**

An den bisher bekannten adulten Stammzellen, die sowohl aus Knochenmark als auch aus Nabelschnurblut isoliert werden können, ist die Differenzierung in osteogene Zellen von mehreren Gruppen nachgewiesen worden. Für die Knochenbildung durch Osteoinduktion ist die Anwesenheit solcher pluripotenter Stammzellen eine unbedingte Voraussetzung. Inzwischen liegen weitere Grundlagenuntersuchungen vor, die sich mit der gesteuerten Differenzierung von omni- oder pluripotenten Stammzellen z. B. in Knorpelzellen und auch in Knochenzellen beschäftigen.<sup>14</sup>

Um die Abläufe bei der Differenzierung von Stammzellen detailliert beschreiben zu können, werden in Microarraystudien die charakteristischen Vorgänge analysiert.<sup>15</sup> Dabei werden zu verschiedenen Zeitpunkten die Änderungen der Expressionsmuster möglichst vieler Gene kartiert, um Informationen über den jeweiligen Zustand der Zellen zu erhalten. Die genaue Zusammensetzung und die zeitliche Abstimmung von extrinsischen Faktoren wie Wachstumsfaktoren und Hormonen, die für eine gesteuerte Differenzierung von Osteoblasten nötig sind, wird auf diese Weise systematisch erforscht. In Arbeiten

<sup>14</sup> Vgl. Noel *et al.* (2002).

<sup>15</sup> Vgl. Qi *et al.* (2003).

von Komori<sup>16</sup> und Otto<sup>17</sup> wurde bereits vor einigen Jahren der Transkriptionsfaktor *Cbfa1* identifiziert, der zum Erreichen des osteoblastären Zustandes als zwingend erforderlich gilt und im Fall der Knochenbildung als hilfreicher Marker zur Unterscheidung von anderen Zellarten dienen kann. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die alleinige Anwesenheit von *Cbfa1* kein ausreichendes Signal für die Differenzierung darstellt. Die Charakterisierung der Entwicklung von Stammzellen oder Vorläuferzellen zu Osteoblasten dient u. a. auch der Sicherheit für den Einsatz am Patienten, denn die osteogene Differenzierung stellt bei weitem nicht die einzige Differenzierungsmöglichkeit von Stammzellen dar. Der Nachweis bestimmter Proteine gibt jedoch Aufschluss über den Differenzierungsstand eines sich neu bildenden Gewebes.

Ziel dieser systematischen Untersuchungen ist es, Stammzellen u. a. für die Regeneration solcher Gewebetypen einzusetzen, die zu einer Autoregeneration nicht mehr befähigt sind. Die bei der Osteoinduktion eingesetzten BMPs führen ausschließlich zu einer Stammzellendifferenzierung ohne Nebenwirkung auf andere Zelltypen. Der kombinierte Einsatz dieser beiden Komponenten, d. h. Stammzellen und BMPs, birgt daher außergewöhnliche Synergieeffekte.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der bestmöglichen Quelle bzw. Herkunft der BMP-Zielzellen: Adulte Stammzellen können aus Knochenmark sowie aus dem peripheren Blut von Patienten gewonnen werden, um nach Aufkonzentrierung zusammen mit den BMPs oder nach BMP-vermittelter *Ex-vivo*-Stimulation an den Ort des Knochendefektes implantiert zu werden. Bei der Verwendung solcherart autogener Stammzellen ist keine immunologische Reaktion zu erwarten, während beim Einsatz allogener Stammzellen (z. B. aus Nabelschnurblut) gegebenenfalls immunsuppressive bzw. immunmodulierende Maßnahmen notwendig sind. Die Stammzellforschung hat sich in der jüngsten Zeit rasant entwickelt, so dass Lösungsansätze auch für diese wichtigen Problemstellungen möglicherweise in naher Zukunft zu erwarten sind.

## Bibliographie

- CUNNINGHAM, N. S., V. PARALKAR und A. H. REDDI. „Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor  $\beta_1$  mRNA expression“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89 (1992), 11740-11744.
- HALL, B. K. und T. MIYAKE. „All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development“, *BioEssays* 22 (2000), 138-147.
- HOGAN, B. L. M. „Bone morphogenetic proteins in development“, *Current Opinion in Genetics & Development* 6 (1996), 432-438.
- KINGSLEY, D. M. „What do BMPs do in mammals? Clues from the mouse short-ear mutation“, *Trends in Genetics* 10 (1994), 16-21.
- KIRSCH, T., J. NICKEL und W. SEBALD. „BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II“, *EMBO Journal* 19 (2000), 3314-3324.
- KOMORI, T., H. YAGI, S. NOMURA, A. YAMAGUCHI, K. SASAKI, K. DEGUCHI, Y. SHIMIZU, R. T. BRONSON, Y. H. GAO, M. INADA, M. SATO, R. OKAMOTO, Y. KITAMURA, S. YOSHIKI und T.

<sup>16</sup> Vgl. Komori *et al.* (1997).

<sup>17</sup> Vgl. Otto *et al.* (1997).

- KISHIMOTO. „Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts“, *Cell* 89 (1997), 755-764.
- KÜBLER, N. R. und M. R. URIST. „Cell differentiation in response to partially purified osteosarcoma-derived bone morphogenetic protein *in vivo* and *in vitro*“, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 292 (1993), 321-328.
- KÜBLER, N. R., M. R. URIST und J. REUTHER. „Osteoinduktion und Knorpelbildung *in vivo* und *in vitro* durch Bone Morphogenetic Protein“, in: N. SCHWENZER (Hrsg). *Fortschritte der Kiefer- und Gesichts-Chirurgie*. Bd. XXXVI. Stuttgart 1991, 230-232.
- MIYAZONO, K., K. KUSANAGI und H. INOUE. „Divergence and convergence of TGF- $\beta$ /BMP Signaling“, *Journal of Cellular Physiology* 187 (2001), 265-276.
- NOEL, D., F. DJOUAD und C. JORGENSEN. „Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair“, *Current Opinion in Investigational Drugs* 3 (2002), 1000-1004.
- OTTO, F., A. P. THORNELL, T. CROMPTON, A. DENZEL, K. C. GILMOUR, I. R. ROSEWELL, G. W. STAMP, R. S. BEDDINGTON, S. MUNDLOS, B. R. OLSEN, P. B. SELBY und M. J. OWEN. „*Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development“, *Cell* 89 (1997), 765-771.
- QI, H., D. J. AGUIAR, S. M. WILLIAMS, A. LA PEAN, W. PAN und C. M. VERFAILLIE. „Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100 (2003), 3305-3310.
- URIST, M. R. „Bone: formation by autoinduction“, *Science* 150 (1965), 893-899.
- URIST, M. R., J. J. CHANG, A. LIETZE, Y. K. HUO, A. G. BROWNELL und R. J. DELANGE. „Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments“, in: D. BARNES und S. DAVID (Hrsg.). *Methods in Enzymology*. Bd. 146. New York 1987, 294-312.
- WANG, E. A., V. ROSEN, P. CORDES, R. M. HEWICK, M. J. KRIZ, D. P. LUXENBURG, B. S. SIBLEY und J. M. WOZNEY. „Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors“, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85 (1988), 9484-9488.
- WOZNEY, J. M., V. ROSEN, A. J. CELESTE, L. M. MITSOCK, M. J. WHITTERS, R. W. KRIZ, R. M. HEWICK, E. A. WANG. „Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities“, *Science* 22 (1988), 1528-1534.
- WÜRZLER, K. K., N. R. KÜBLER, J. F. REUTHER und W. SEBALD. „Osteoinductive properties of different BMP-2 mutants“, Abstract. International Conference on Bone Morphogenetic Proteins. Lake Tahoe 2000.