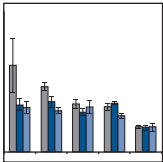


GDF-5 und BMP-2 steuern in vitro die Differenzierung von Knochenzellen über die Genexpression von MSX1, MSX2, Dlx5 und Runx2 und beeinflussen die OCN-Genexpression



Felix Peter Koch, MD, DDS, MBA*/Christoph Weinbach, DMD*
 Elisabeth Huster, PhD**/Bilal Al-Nawas, MD, DDS***
 Wilfried Wagner, MD, DDS***

Rekombinanter humaner Growth and Differentiation Factor 5 (rhGDF-5) und rekombinantes humanes Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2) beeinflussen als Mitglieder der Transforming-growth-factor- β -Familie die Knochenneubildung und -differenzierung. In dieser In-vitro-Studie an Zellkulturen von Osteoblasten wurden die molekularbiologischen Effekte dieser Wachstumsfaktoren auf die Expression von Regulatorgenen der Homebox-Proteine MSX1 und MSX2 sowie auf die Distal-less Homebox 5 (Dlx5) und den Runt-related Transcription Factor 2 (Runx2/Cbfa1) untersucht. Bezüglich der Effektorgene wurden die Messenger-Ribonukleinsäuren von Osteocalcin (OCN) mittels reverse Transkriptase/Real-time-Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert. Die Osteoblasten wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen stimuliert und am ersten, zweiten, fünften, 10. und 15. Tag analysiert. In Konzentrationen von 100, 500 und 1000 ng/ml wurden rhGDF-5 und rhBMP-2 eingesetzt. Bei der niedrigeren rhGDF-5-Konzentration (100 ng/ml) zeigten sich dosisabhängig in den ersten 48 Stunden eine vermehrte Genexpression von MSX1 und MSX2 und eine marginal erhöhte Genexpression von Runx2 und OCN. Die rhBMP-2-Stimulation erhöhte die Expression von MSX1 und MSX2 mit Spitzenwerten nach 24 und 240 Stunden. Runx2 und OCN wurden durch die Konzentration von 100 ng/ml stärker exprimiert als in der nicht stimulierten Kontrolle. Offenbar stimuliert rhGDF-5 die frühe Differenzierung der Osteoblasten und die Produktion von extrazellulärer Matrix, während rhBMP-2 die frühe und späte Differenzierung der Osteoblasten zu verstärken scheint. Niedrige Konzentrationen der Wachstumsfaktoren führten effektiver zu einer vermehrten Genexpression. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2012;32:273–281.)

* Wissenschaftler, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinik der Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Deutschland.

** Leiterin der Abteilung für Urheberrechte, Sciil Technology, Martinsried, Deutschland.

*** Professor, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinik der Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Deutschland.

Korrespondenz an: Dr. Felix Peter Koch, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Augustusplatz 2, 55131 Mainz, Deutschland. Fax: +49 6131 176602. E-Mail: koch@facialplastics.de

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) sind Differenzierungsfaktoren, die die mesenchymalen Stammzellen dazu veranlassen, die Knochenregenerationszone zu infiltrieren und sich in knochen- oder knorpelbildende Zellen zu differenzieren¹. BMP-2 gehört zu den potentesten Stimulatoren der Osteogenese² und wurde bereits klinisch bei Knochenrekonstruktionen eingesetzt^{3–5}. Seit der Entdeckung der BMPs im Jahr 1965 wurden noch mehrere andere Wachstumsfaktoren identifiziert. In dieser vielversprechenden experimentellen In-vitro-Studie wurde ein weiteres Mitglied der Transforming-growth-factor- β -Superfamilie, der rekombinante humane Growth and Differentiation Factor 5 (rhGDF-5), untersucht⁶. GDF-5 ist ein wichtiger Regulator bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und des Bindegewebes sowie bei der Angiogenese^{7–10}. Außerdem ist GDF-5 bei Menschen und Mäusen essenziell für die normale Skelett- und Gelenkentwicklung. Die erstmals 1994 von Storm beschriebene Mutation des GDF-5-Gens führt zum Brachypodismus mit kürzeren Röhrenknochen und reduzierter Fußgröße^{11–13}.

Der in dieser Studie untersuchte rhGDF-5 ist ein Homodimer aus zwei Aminosäureketten mit 120 Elementen. Die Signale werden über



Serin-Threonin-Rezeptorkinase und smad-abhängige Signalwege übertragen¹⁴⁻¹⁷. Außerdem übertragen smad-unabhängige Signalwege ROR2-vermittelt das rhGDF-5-Signal. Das rhGDF-5 ist an der Entwicklung von Nervengewebe, Knorpel, Haut und Knochen beteiligt¹⁸.

Die positiven Effekte von rhGDF-5 auf die Knochenregeneration wurden in zahlreichen Tierstudien belegt^{14, 19, 20}. Weniger bekannt ist die Rolle von rhGDF-5 bei der frühen und späten Ossifikation sowie sein Einfluss auf wichtige molekularbiologische Signalwege. Daher wurde in der vorliegenden Studie untersucht, welchen Einfluss rhGDF-5 auf die Schlüsselregulatoren der Osteoblastendifferenzierung hat. Außerdem wurde über einen Zeitraum von 15 Tagen die Effektivität verschiedener rhGDF-5-Konzentrationen im Verhältnis zu rhBMP-2 betrachtet.

Material und Methode

Zellkultur

Mit einer Dichte von 200000 Zellen/Well wurden auf sechs Well-Platten menschliche Osteoblasten aus dem Hüftbein (HOB-c, PromoCell) einer Zelllinie kultiviert. Sie konnten zwei Tage lang mit einem osteoblastenspezifischen Medium (10 % fetal calf serum/Dulbecco Modified Eagle Medium, Invitrogen) mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin/Neomycin, 1 % Ascorbinsäure und 20 µg/ml Dexamethason anheften. Anschließend wurden die Zellen durch ein osteoblastenspezifisches Serum mit rhGDF-5 in Konzentrationen von 100, 500 und 1000 ng/ml stimuliert. Als Kontrolle diente ein osteoblastenspezifisches Zellkulturmedium ohne rhGDF-5. Die Medien und Wachstumsfaktoren wurden 15 Tage

lang alle vier Tage erneuert, um eine konstante Stimulation und Nährstoffversorgung über die Studienphase sicherzustellen.

mRNA-Extraktion und Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Am ersten, zweiten, fünften, 10. und 15. Tag wurden die Osteoblasten mit einer 0,05 % Trypsin-Ethylendiamintetraacetat-Lösung (Invitrogen) abgelöst und einzeln abgeerntet. Die Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) wurde mithilfe eines Silikatgelverfahrens extrahiert (Qiagen RNeasy extraction kit). Dazu erfolgte eine DNase-Digestion. Die Menge der extrahierten mRNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt und die Proteinkontamination anhand des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm/280 nm.

Zum Nachweis der mRNA von MSX1, MSX2, Dlx5, Runx2 und Osteocalcin (OCN) wurden anhand der National Center for Biotechnology Information – nucleotide database und Primer3 design²¹ Primer hergestellt (Tabelle 1). Als Haushaltsgene wurden Actin, GAPDH und RPS18 ausgewählt. Die stabilste Expression dieser GAPDH- und RPS18-Gene in den mit rhGDF-5 stimulierten und nicht stimulierten Zellkulturen wurde mit einer spezialisierten Freeware ermittelt (GeNorm, PrimerDesign).

Zur quantitativen Real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erfolgte eine SYBR Green Real-time PCR (einstufige RT-PCR, Bio-Rad). Dieses Verfahren erlaubt eine reverse Transkription unter Verwendung der jeweiligen Primer unmittelbar vor der PCR-Amplifikation und SYBR-Green-Fluoreszenzmessung zur Quantifizierung der Genexpression. Die Proben wurden in 96-Well-Mikroplatten in ei-

Tabelle 1 Oligonukleotid-Primer-Sequenzen der Real-time Polymerase-Kettenreaktion		
	Sense	Antisense
MSX1	AAACACAAGACGAACCGTAA	GTACATGCTGTAGCCCACAT
MSX2	AGTCGGAAAATTCAGAAGAT	CATGGAGTCTATTGATCTG
Dlx5	AGCCAGAGAAAAGAAGTGACC	TGAAACCAGATTTTCACCTG
Runx2	CCCACGAATGCACTATCC	GGACATACCGAGGGACAT
OCN	GCAAAGGTGCAGCCTTTGTG	GGCTCCCAGCCATTGATACAG
GAPDH	AAAAACCTGCCAAATATGAT	CAGTGAGGGTCTCTCTCTTC
RPS18	TCGGAAGTGGGCCATGA	GAACCTCCGACTTTCGTTT

nem iQ5 Cycler (Bio-Rad) mit einer Anlagerungstemperatur von 56 °C und einer Elongationstemperatur von 71 °C über 40 Zyklen amplifiziert. Jede Probe einer spezifischen Stimulationsphase und Wachstumsfaktorkonzentration durchlief im Dreifachansatz eine PCR. Der Hintergrund wurde über drei bis 10 Zyklen bestimmt und die Schwelle über dieser Fluoreszenz angesetzt, sodass die SYBR-Green-Fluoreszenzkurve am Exponentialpunkt gekreuzt wurde. Dieser Punkt wurde für die Quantifizierung zur Berechnung der Zyklenzahl und des Schwellenzyklus (C_T) herangezogen. Außerdem wurden die C_T -Werte der GAPDH- und RPS18-Haushaltsgene und die Effektivität der einzelnen Primer berücksichtigt. Die Produktbildung wurde jeweils durch eine Schmelzpunktanalyse bestätigt. Der Schwellenzyklus für die Genexpression lag bei 22 bis 30 Zyklen. Als Negativkontrolle diente Wasser statt mRNA.

Statistische Auswertung

Die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) der jeweiligen Zellexperimente wurde im Dreifachansatz mittels PCR analysiert. Die statistische Auswertung der Schwellenzyklen (C_T) erfolgte mit dem $\Delta\Delta C_T$ -Verfahren^{22,23}. Die Effizienz von jedem Primer und Real-time PCR wurde aus den SYBR-Green-Fluoreszenzkurven und aus Standardverdünnungsreihen abgeleitet. Das relative Niveau der Genexpression wurde auf die Werte der nicht stimulierten Kontrolle standardisiert, deren Wert mit 100 % gleichgesetzt wurde. Jeder Datenpunkt der relativen mRNA wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Ergebnisse

Für jede rhGDF-5- und rhBMP-2-Konzentration wurde über die Studiendauer von 15 Tagen das Genexpressionsniveau der vier Transkriptionsfaktoren (MSX1, MSX2, Dlx5, Runx2)

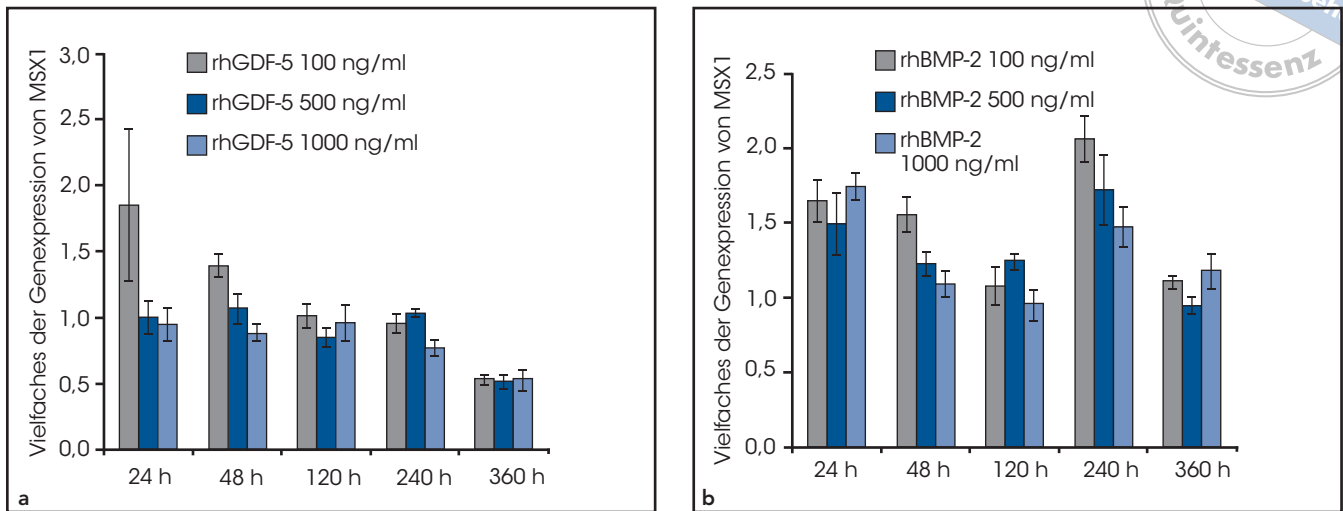


Abb. 1a und 1b Relativer Wert der Genexpression von MSX1 nach Stimulation mit 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml (a) rhGDF-5 und (b) rhBMP-2 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

sowie des Effektorgens von OCN bestimmt.

Bei der Stimulation mit 100 ng/ml rhGDF-5 wurde MSX1 am ersten und zweiten Stimulationstag stärker exprimiert als in der Kontrolle ohne Stimulation. Nach einer Stimulationsphase von fünf Tagen lag das mRNA-Genexpressionsniveau von MSX1 nicht höher oder war genauso hoch wie das der Kontrollgruppe. Die Konzentration von 500 ng/ml führte an Tag 1 und 10 zu einer höheren MSX1-Genexpression, aber zu einem reduzierten Genexpressionsniveau 48, 120 und 360 Stunden nach Stimulation. Die Stimulation durch 1000 ng/ml rhGDF-5 über 48 Stunden hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen positiven Einfluss auf die MSX1-Genexpression. Stattdessen sank das Expressionsniveau im Lauf der 15 Tage (Abb. 1a). Während der gesamten Versuchsphase wurde die MSX1-Genexpression durch mit 100 ng/ml rhBMP-2 erhöht. Die stärkste Genexpression wurde nach 240 Stunden ermittelt

(206 % des Expressionsniveaus der Kontrolle). Allerdings führten höhere Konzentrationen des Wachstumsfaktors zu niedrigeren Niveaus der MSX1-Genexpression (Abb. 1b).

MSX2-mRNA wurde durch Stimulation mit 100 ng/ml rhGDF-5 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle in den ersten 48 Stunden überexprimiert. Im Lauf der 15 Tage erreichte das Genexpressionsniveau einen Höchstwert von 267 %. Höhere Konzentrationen von rhGDF-5 erreichten nach 15 Tagen Werte, die mit der nicht stimulierten Kontrolle vergleichbar waren (Abb. 2a). Die Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP-2 erhöhte die MSX2-Genexpression in den ersten 48 Stunden und an Tag 10. Die höchste Genexpression betrug 161 % in der Kontrolle nach 24 Stunden. Höhere Konzentrationen von 500 ng/ml und 1000 ng/ml rhBMP-2 führten zu einer niedrigeren MSX2-Genexpression, die an Tag 2, 5 und 15 unter dem Niveau der Kontrolle lag (Abb. 2b).

Dlx5 wurde nach Stimulation mit 100 ng/ml rhGDF-5 in den ersten 10 Tagen überexprimiert und erreichte einen Höchstwert von 279 % im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. rhGDF-5-Konzentrationen von 500 ng/ml und 1000 ng/ml erhöhten das Niveau der Genexpression von Dlx5 an Tag 5 und 10 (Abb. 3a). Die Osteoblastenstimulation durch rhBMP-2 erhöhte die Dlx5-Genexpression über den gesamten Studienverlauf von 15 Tagen. Bei den mit 500 ng/ml rhBMP-2 stimulierten Osteoblasten sank die Genexpression nach 15 Tagen, und Dlx5 wurde geringer exprimiert als bei nicht stimulierten Osteoblasten. Mit Höchstwerten an Tag 5 und 10 erhöhte rhBMP-2 während der gesamten Versuchsphase die Genexpression von Dlx5 (Abb. 3b).

Die Runx2-Genexpression zeigte keine einheitliche Reaktion auf eine rhGDF-5-Stimulation. Nach einem ersten Spitzenwert der Genexpression nach 24 Stunden nach der Stimulation

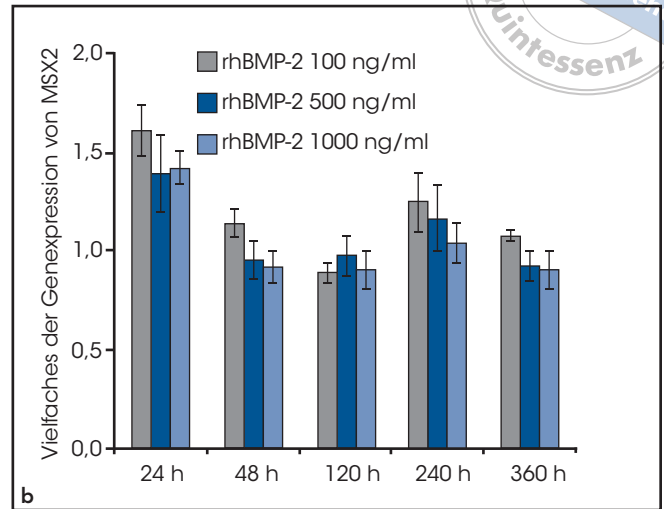
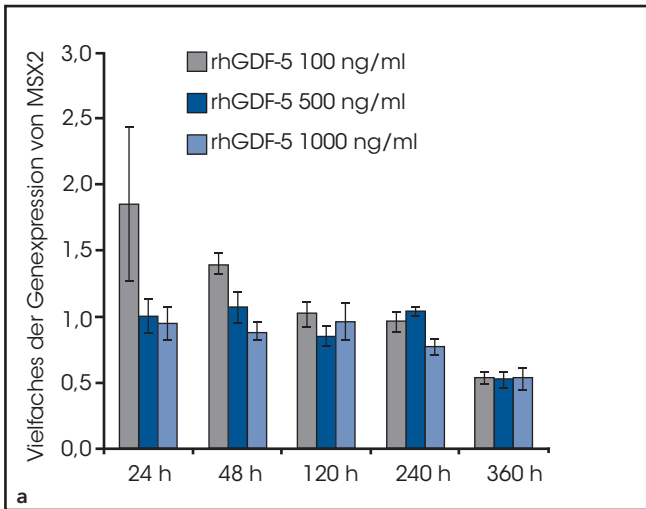


Abb. 2a und 2b Relativer Wert der Genexpression von MSX2 nach Stimulation mit 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml (a) rhGDF-5 und (b) rhBMP-2 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

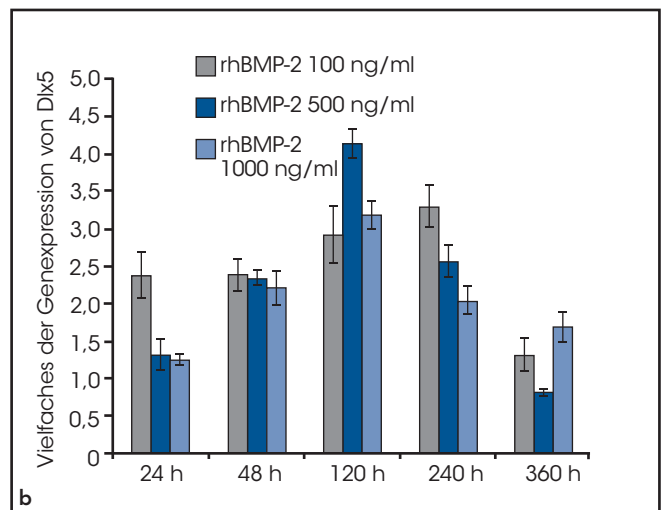
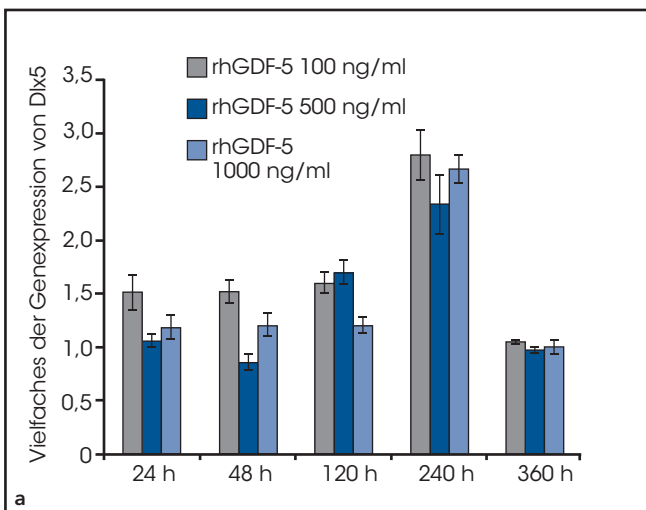


Abb. 3a und 3b Relativer Wert der Genexpression von Dlx5 nach Stimulation mit 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml (a) rhGDF-5 und (b) rhBMP-2 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

mit 100 ng/ml rhGDF-5 wurde Runx2 in den Testgruppen geringer exprimiert als in der Kontrollgruppe mit nicht stimulierten Osteoblasten. Lediglich an den Tagen 5 und 10 wurde ein stimulatorischer Effekt registriert. Die verschiedenen Konzentrationen der Wachstumsfaktoren hatten

ähnliche Effekte auf die Runx2-Genexpression (Abb. 4a). Die Stimulation mit 100 ng/ml rhBMP-2 erhöhte das Niveau der Genexpression von Runx2 an allen Messzeitpunkten. Höhere Konzentrationen von rhBMP-2 führten zu einer niedrigeren Genexpression von Runx2 (Abb. 4b).

Das Effektorgen von OCN wies bei niedrigen Konzentrationen von 100 ng/ml rhGDF-5 an den Tagen 1, 5 und 10 eine leicht erhöhte Genexpression auf. Höhere Konzentrationen von 500 ng/ml und 1000 ng/ml führten zu einer niedrigeren Genexpression, die sogar noch unter der

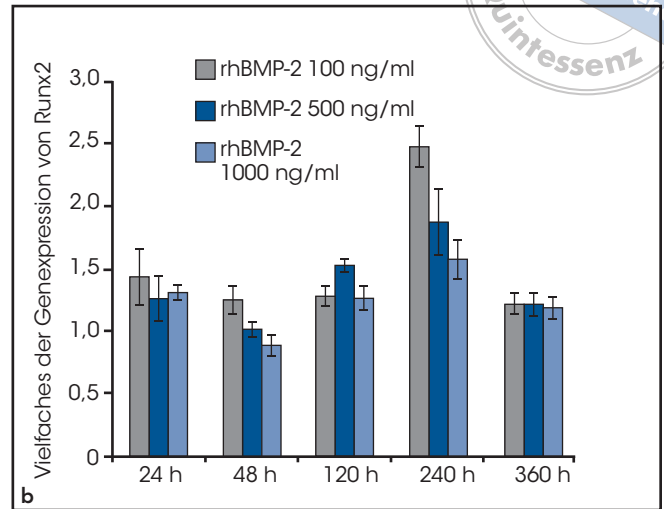
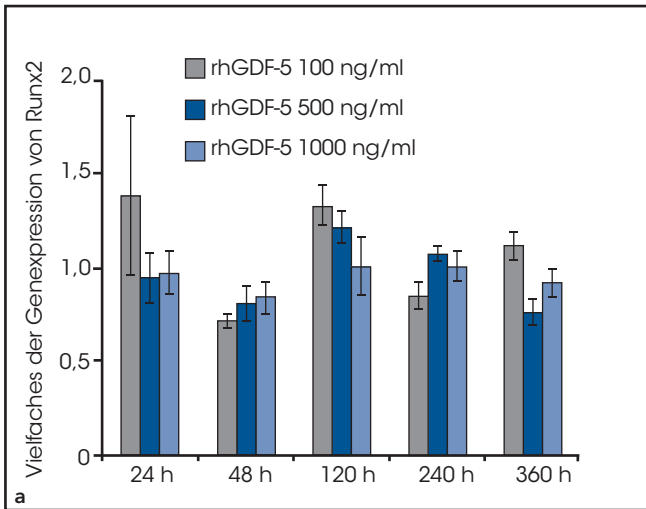


Abb. 4a und 4b Relativer Wert der Genexpression von Runx2 nach Stimulation mit 100 ng/ml, 500 ng/ml, und 1.000 ng/ml (a) rhGDF-5 und (b) rhBMP-2 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

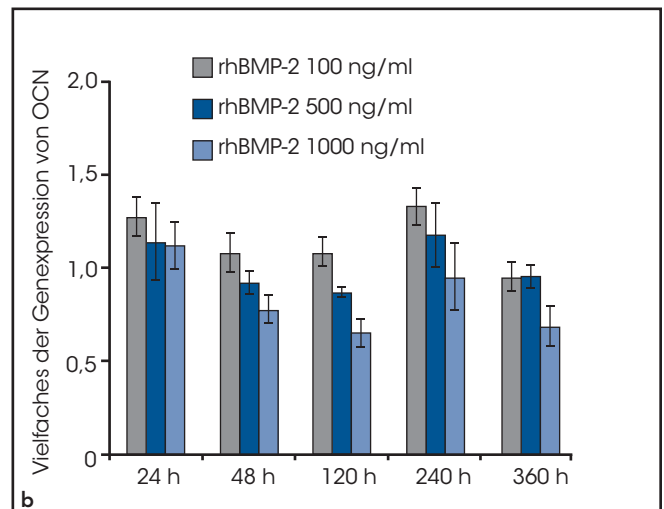
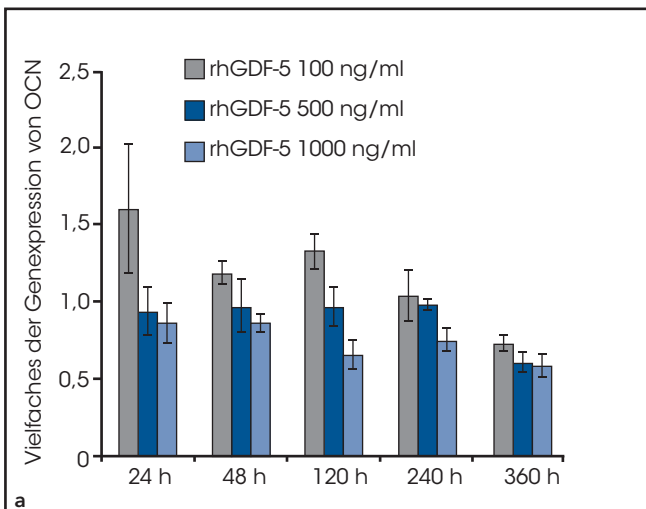


Abb. 5a und 5b Relativer Wert der Genexpression von OCN nach Stimulation mit 100 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml (a) rhGDF-5 und (b) rhBMP-2 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

jenigen der Kontrolle lag (Abb. 5a). Die Stimulation mit rhBMP-2 in einer Konzentration von 100 ng/ml führte zu einer höheren OCN-Genexpression als in der Kontrolle. An Tag 10 wurde ein Höchstwert von 132 % für die Genexpression im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Höhere Konzentrationen von 500 ng/ml und 1000 ng/ml führten an allen Mess-

zeitpunkten außer an Tag 1 und 10 zu einer niedrigeren Genexpression als in der Kontrolle (Abb. 5b).

Diskussion

BMPs sollen die Knochenentwicklung sowie den Metabolismus im ausgereiften Gewebe kontrollieren.

In dieser Studie wurde der Einfluss von rhGDF-5 auf die Osteoblastendifferenzierung mithilfe der Genexpression untersucht.

Die vier Phasen der Knochenentwicklung sind durch Migration, epithelial-mesenchymale Interaktion, Kondensation und Differenzierung gekennzeichnet. In der Kondensationsphase des sich entwickelnden

Knochens wird rhGDF-5 exprimiert, während rhBMP-2 in der Spätphase der Osteoblasten-Differenzierung und Mineralisierung interagiert.

Die Transkriptionsfaktoren der frühen osteogenen Differenzierung sind MSX1 und MSX2. MSX1 scheint das kraniofaziale Wachstum zu beeinflussen. Mutationen führen zu nicht syndromalen Lippenspalten mit oder ohne Gaumenspalte und autosomal-dominanter Hypodontie mit Gaumenspalte^{15-17, 24}. Im Gegensatz zu Runx2 wirkt MSX1 nicht direkt auf osteogene Proteine, sondern indirekt über die Regulation der für Bone Morphogenic Protein 4 (BMP-4) und Fibroblast Growth Factor 3 (FGF-3) kodierenden Gene. In dieser Studie wurde in den ersten 48 Stunden nach der Stimulation mit rhGDF-5 und rhBMP-2 in Konzentrationen von 100 ng/ml ein Anstieg der MSX1-Genexpression ermittelt. Dabei war der Einfluss von rhBMP-2 stärker als der von rhGDF-5. Außerdem wurde nach einer fünftägigen Stimulation mit 1000 ng/ml rhGDF-5 eine Herabregulation der MSX1-Genexpression beobachtet, während die Stimulation mit rhBMP-2 die MSX1-Genexpression nicht unter die Werte in der nicht stimulierten Kontrollgruppe absenkte.

Ein weiterer wichtiger, funktionell redundanter Mediator der normalen kraniofazialen Entwicklung ist das MSX2-Gen. Die Synostose vom Typ Boston durch eine MSX2-Mutation bewirkt die vorzeitige Beendigung der Knochenentwicklung²⁵. Mutationen des für rhGDF-5 kodierenden Gens führen zur akromesomelen Dysplasie Hunter-Thompson, die mit kurzen Unterarmen und Händen einhergeht²⁶⁻²⁸. Nach einem Vorschlag von Dodig et al.²⁹ bleiben die Osteoblasten durch MSX2 für kurze Zeit im Proliferationsstadium, was die Osteoblasten-Differenzierung hinauszögert und den Osteoblasten-Pool für das

Längenwachstum der Knochen erhöht. Dieser osteoinduktive Effekt von MSX2 über die BMPs wurde bereits beschrieben³⁰. Er verhindert den vorzeitigen Schluss der kraniofazialen Suturen und einen Stillstand des Röhrenknochenwachstums^{29, 30}. In dieser Studie wurde gezeigt, dass der Einfluss von rhGDF-5 auf die MSX2-Genexpression dosis- und zeitabhängig ist. In niedrigen Konzentrationen von 100 ng/ml erhöhte rhGDF-5 die MSX2-Genexpression stärker am ersten und zweiten Tag als rhBMP-2. In Konzentrationen von 1000 ng/ml reduzierten rhBMP-2 und rhGDF-5 die MSX2-Genexpression unter das Niveau in der Kontrolle.

Um zu klären, welches Potenzial rhGDF-5 bei der späten Osteoblasten-Differenzierung hat, wurde auch die Genexpression von Dlx5 und Runx2 untersucht. Runx2 gilt weithin als wichtigster osteogener Transformationsfaktor, der zur Genexpression von OCN und zur Knochenmineralisierung führt³⁰. Runx2 wird von Dlx5 durch die Promotoraktivierung heraufreguliert³¹. Der Molekularmechanismus der Dlx5-Transkription durch die BMP-2-Behandlung erfolgt über die Aktivierung des BMP-Rezeptors und eine Überexpression von smad1 und smad5^{2, 32}.

Obwohl rhGDF-5^{7, 33} dieselben Rezeptorsignalwege nutzt, führte die rhBMP-2-Stimulation in der vorliegenden Studie zu einer höheren Genexpression von Dlx5 als die rhGDF-5-Stimulation. Außerdem werden die nachgeschalteten Gene Runx2 und OCN durch die BMP-vermittelte Zunahme von Dlx5 verstärkt³⁴, sodass auch die Genexpression von Runx2 und OCN in den ersten 10 Tagen nach der rhBMP-2-Stimulation anstieg. Die niedrigere rhBMP-2-Konzentration stimulierte die Runx2-Genexpression am stärksten. Nach rhGDF-5-Stimulation über 24 Stunden und 10 Tagen lagen die Runx2-Spiegel

um 50 % bzw. 30 % über denen der Kontrolle. Im restlichen Studienverlauf führte rhGDF-5 zur Herabregulation der Runx2-Genexpression im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle.

BMP-2 und die nachgeschalteten Gene Dlx5 und Runx2 regulieren einen späteren Schritt der Differenzierung und Mineralisierung. Durch rhGDF-5 wird hingegen eher die frühe Osteoblasten-Differenzierung beeinflusst. Weiterhin wirkt rhGDF-5 nur schwach stimulatorisch auf die Dlx5-, aber stark auf die MSX2-Genexpression. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Dodig et al. überein, die MSX2 in vitro als transkriptionalen Repressor der Osteoblasten-spezifischen Genexpression vorschlugen²⁹. Hassan et al. stellten die Vermutung auf, dass diese antagonistische Wirkung durch die Bildung eines Dlx5/MSX2-Proteinkomplexes entsteht, der transkriptionell aktiv ist³⁵. Außerdem kompetitieren Dlx5 und MSX2 vermutlich um die Binding Response Elements der für die knochenspezifischen Marker kodierenden Gene, wie OCN^{22, 23, 31}. Die gegenseitige Regulation von Dlx5 und MSX2 könnte durch folgende Ergebnisse bestätigt werden: In den ersten 10 Tagen sank die MSX2-Genexpression, während die Dlx5-Genexpression gleichzeitig anstieg.

Im Gegensatz zu diesen In-vitro-Ergebnissen scheint rhGDF-5 in vivo eine starke Induktionswirkung auf die Knochenneubildung zu haben^{14, 36}. In der vorliegenden Studie wurde bei niedrigen rhGDF-5-Konzentrationen eine eher höhere OCN-Genexpression beobachtet, sodass rhGDF-5 die Knochendifferenzierung dosisabhängig zu beeinflussen scheint.

Schlussfolgerung

Im Vergleich zu rhBMP-2 führte rhGDF-5 nur zu einer schwachen Genexpression von Runx2 und OCN und zur Heraufregulation von MSX1 und MSX2 im Sinne einer verzögerten Mineralisierung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass rhGDF-5 während der Frühphase der Kondensation interagiert und bei der Frühphase der Osteoblasten-Differenzierung, die verlängert ist. Der Einfluss von rhGDF-5 auf die Knochendifferenzierung scheint dosisabhängig zu sein.

Danksagung

Diese experimentelle Studie wurde von Scil Technology unterstützt, die auch die Wachstumsfaktoren rhGDF-5 und rhBMP-2 bereitstellten. Dr. Hustert ist bei Scil Technology angestellt.

Literatur

- Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.
- Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, et al. Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem* 2005;280:35579-35587.
- Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:2220-2224.
- Dohzono S, Imai Y, Nakamura H, Wakitani S, Takaoka K. Successful spinal fusion by E. coli-derived BMP-2-adsorbed porous beta-TCP granules: A pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 2009;467:3206-3212.
- Boyne PJ, Marx RE, Nevins M, et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:11-25.
- Rosen V, Wozney JM. Bone morphogenetic proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology*, ed 2. San Diego: Academic Press, 2002.
- Chen X, Zankl A, Niroomand F, et al. Upregulation of ID protein by growth and differentiation factor 5 (GDF5) through a smad-dependent and MAPK-independent pathway in HUVSMC. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:26-33.
- Hurley FM, Costello DJ, Sullivan AM. Neuroprotective effects of delayed administration of growth/differentiation factor-5 in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2004;185:281-289.
- O'Keeffe G, Costello D, Hanke M, Sullivan A. 28 Growth differentiation factor-5 (GDF-5) expression in the rat brain: Developmental regulator, potential treatment? *J Anat* 2002;201:425.
- Jenner JM, van Eijk F, Saris DB, Willems WJ, Dhert WJ, Creemers LB. Effect of transforming growth factor-beta and growth differentiation factor-5 on proliferation and matrix production by human bone marrow stromal cells cultured on braided poly lactic-co-glycolic acid scaffolds for ligament tissue engineering. *Tissue Eng* 2007;13:1573-1582.
- Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 1994;368:639-643.
- Grünenberg H, Lee AJ. The anatomy and development of brachypodism in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 1973;30:119-141.
- Landauer W. Brachypodism, a recessive mutation of house-mice. *J Hered* 1952;43:293-298.
- Spiro RC, Liu LS, Heidaran MA, et al. Inductive activity of recombinant human growth and differentiation factor-5. *Biochem Soc Trans* 2000;28:362-368.
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, et al. Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *J Med Genet* 2003;40:399-407.
- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, et al. In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genet Med* 2004;6:117-125.
- Mostowska A, Biedziak B, Trzeciak WH. A novel c.581C>T transition localized in a highly conserved homeobox sequence of MSX1: Is it responsible for oligodontia? *J Appl Genet* 2006;47:159-164.
- Mikic B. Multiple effects of GDF-5 deficiency on skeletal tissues: Implications for therapeutic bioengineering. *Ann Biomed Eng* 2004;32:466-476.
- Poehling S, Pippig SD, Hellerbrand K, Siedler M, Schütz A, Dony C. Superior effect of MD05, beta-tricalcium phosphate coated with recombinant human growth/differentiation factor-5, compared to conventional bone substitutes in the rat calvarial defect model. *J Periodontol* 2006;77:1582-1590.
- Schwarz F, Rothamel D, Herten M, Ferrari D, Sager M, Becker J. Lateral ridge augmentation using particulated or block bone substitutes biocoated with rhGDF-5 and rhBMP-2: An immunohistochemical study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:642-652.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000:365-386.
- Newberry EP, Latifi T, Towler DA. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry* 1998;37:16360-16368.
- Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003;278:45969-45977.
- Mostowska A, Kobiela A, Trzeciak WH. Molecular basis of non-syndromic tooth agenesis: Mutations of MSX1 and PAX9 reflect their role in patterning human dentition. *Eur J Oral Sci* 2003;111:365-370.



25. Jabs EW, Müller U, Li X, et al. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 1993;75: 443–450.
26. Polinkovsky A, Robin NH, Thomas JT, et al. Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat Genet* 1997;17:18–19.
27. Thomas JT, Kilpatrick MW, Lin K, et al. Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat Genet* 1997;17:58–64.
28. Weinstein M, Yang X, Deng C. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:49–58.
29. Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, et al. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol* 1999;209:298–307.
30. Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 2006;366:51–57.
31. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, et al. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: Involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol* 1997;11:1681–1694.
32. Lee MH, Kwon TG, Park HS, Wozney JM, Ryoo HM. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:689–694.
33. Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, et al. Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 1996; 271:21345–21352.
34. Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 2000;20:8783–8792.
35. Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, et al. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: Temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 2004;24: 9248–9261.
36. Yoshimoto T, Yamamoto M, Kadomatsu H, Sakoda K, Yonamine Y, Izumi Y. Recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) induced bone formation in murine calvariae. *J Periodontol Res* 2006;41:140–147.