



Damhirsch (*Cervus dama*) mit fertig ausgebildetem Geweih. Die eingetrocknete Haut wird vom Tier abgestreift. Darunter kommt ein blanker Knochen zum Vorschein, der gut durchblutet und »lebendig« ist

Hirschgeweihe haben die ungewöhnliche Fähigkeit, sich innerhalb kürzester Zeit zu regenerieren und zu einem stabilen neuen Knochen zu wachsen. Wissenschaftler der Universität Göttingen arbeiten daran, das Geheimnis ihres Wachstums zu entschlüsseln und kommen zu dem Ergebnis, dass eine abgestimmte Mischung verschiedener Zelltypen für diese besondere Leistungsfähigkeit verantwortlich ist. Damit leisten die Forscher der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Bereichs Humanmedizin einen bedeutenden Beitrag auf dem Gebiet des Tissue Engineering. Ziel ist es letztlich, menschliche Knochen als Ersatzgewebe im Labor zu züchten. Menschen, die durch Tumore oder Unfälle gravierende Gesichtsverletzungen erlitten haben, könnten so besser geholfen werden.

Das Geweih des Hirsches hat eine erstaunliche Fähigkeit. Es ist das einzige Organ bei einem Säugetier, das sich bei erwachsenen Individuen dieser Spezies vollständig regenerieren kann. Die Geschwindigkeit, mit der sich dieser Prozess bei einigen Hirscharten vollzieht, ist dabei mehr als ungewöhnlich: Im Verlauf von drei bis vier Monaten werden mehrere Kilogramm Knochen mit Wachstumsraten von bis zu zwei Zentimetern pro Tag produziert. Eine Hauptfunktion des Geweihknochens ist seine Verwendung als Stirnwaffe bei den Brunftkämpfen der Hirsche im Herbst jedes Jahres. Nicht zuletzt deshalb wächst er zu einem der härtesten und stabilsten Knochen heran, die bei Wirbeltieren gefunden werden. Angesichts dieser rekordverdächtigen Daten ist es verständlich, dass Geweihknochen in den letzten Jahrzehnten verstärkt Gegenstand biomedizinischer Forschungen wurden. Das Spektrum der weltweiten Untersuchungen reicht dabei von Studien zur Gewebedifferenzierung und Knochenregeneration bis hin zu Knochenwachstum (Osteogenese) und Mineralisation. An der Georg-August-Universität Göttingen ist die zelluläre Geweihknochenforschung an der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Bereichs Humanmedizin angesiedelt und beschäftigt sich heute weniger mit den morphologischen Aspekten des Geweihknochens, sondern mit den molekularen Mechanismen, die hinter der ungewöhnlichen Regenerationsfähigkeit dieses Gewebes stehen. Im Rahmen eines von der Deut-

Wachstum ohne Tempolimit

Geweihknochenzellen als Modellsystem
für die Knochenzüchtung

Hans Joachim Rolf, Henning Schliephake,
Karl Günter Wiese

schen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts mit dem Titel: »*In vitro*-Untersuchungen zur Regulation der Osteogenese durch lokale und systemische Faktoren – Stammzellen aus regenerierenden Geweihknochen als Modellsystem für die *in vitro*-Osteogenese im Rahmen des Tissue Engineering« werden vor allem die an diesem Organsystem beteiligten Zellen isoliert und ihre regenerativen Fähigkeiten und Eigenschaften ermittelt. Eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe untersucht in Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern aus Deutschland,

Kanada und der Tschechischen Republik die Einflüsse von Hormonen und Wachstumsfaktoren auf die Geweihknochenzellen sowie Aspekte der Strukturbildung im Labor. Zu den Kooperationspartnern gehören dabei neben Medizinern auch Veterinärmediziner, Zoologen und Wildbiologen.

Im internationalen Vergleich ist die Anzahl der in Deutschland arbeitenden Geweihforscher bis heute sehr gering geblieben. Die Universität Göttingen hat schon in der Vergangenheit bedeutende Beiträge zu diesem Forschungsgebiet geleistet. Bis vor wenigen Jah-

Abbildung 1:
Kurze Zeit nach dem Abfallen des alten Geweihs wächst sehr rasch ein neuer Geweihknochen am Schädel des Hirsches nach.



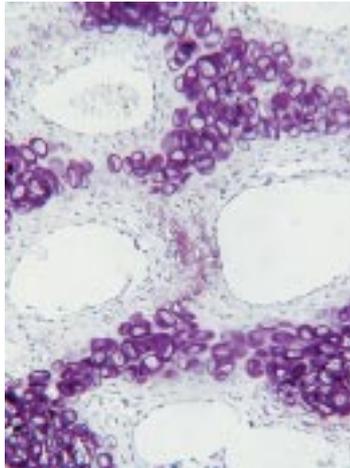


Abbildung 2:
Histologischer Schnitt
durch die Spongiosa
eines regenerierenden
Geweihknochens nach
vier Wochen Wachstum.
Es sind Knorpelzellen zu
sehen, die Strukturen
aufbauen.

ren wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Fischer vom I. Zoologischen Institut das bundesweit einzige Forschungsgehege für Damhirsche (*Cervus dama*) betrieben. Die stark auf interdisziplinäre Zusammenarbeit ausgerichtete Arbeitsgruppe Fischer erlangte internationale Anerkennung und legte den Grundstein für die Forschungsprojekte, die aktuell zum Thema Geweihknochen in Göttingen bearbeitet werden. In Kooperation mit dieser Arbeitsgruppe wurden zwischenzeitlich die ersten Experimente zur Kultivierung von Geweihknochenzellen an der Abteilung Orthopädie des Bereichs Humanmedizin unter der Leitung von Prof. Dr. Hans Willert und Prof. Dr. Alfred Enderle durchgeführt. Im Jahr 2000



Abbildung 3:
Nach vier Wochen sind
in den Kulturschalen
deutliche Strukturen zu
erkennen, die von den
Geweihknochenzellen
gebildet wurden.

wurde das Forschungsgebiet in die Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie überführt.

Stammzellen und Tissue Engineering

Die Gewebe der Wirbeltiere lassen sich in Weich- und Hartgewebe einteilen. Das Hartgewebe besteht vornehmlich aus Knochen, das als Skelett hauptsächlich die Stützfunktionen des Körpers übernimmt. Im Gegensatz zu den Insekten, bei denen das Stützgewebe die Außenhülle bildet und die Weichgewebe, wie Muskeln und innere Organe, umhüllt und schützt, ist das Stützgewebe bei Wirbeltieren immer von Weichgewebe umgeben. Bei den Säugetieren sind nur die Zähne und bei den Hirschen (*Cerviden*) außerdem noch die Geweihe nicht von Weichgewebe bedeckt. Die Zähne wachsen aus embryonal angelegten Zahnkeimen nur einmal aus – dies gilt sowohl für Milchzähne als auch für die bleibenden Zähne; dagegen wird der Geweihknochen immer wieder neu gebildet. Während Architektur und Physiologie der Weichgewebe besser erforscht sind, gibt es beim Knochen auch heute noch erhebliche Wissenslücken. Dies liegt sicher zum Teil daran, dass Weichgewebe histologisch besser verarbeitet werden kann und sich in Zellkulturen leichter anzüchten lässt als dies beim harten Knorpelgewebe der Fall ist.

Die Frage, ob humane Stammzellen benutzt werden können, um defekte Gewebe im menschlichen Körper zu reparieren, oder ob man sogar mit ihrer Hilfe im Labor komplette Organstrukturen nachzüchten könnte, wird im Augenblick in vielen Laboren untersucht und unter dem Begriff Tissue Engineering (Geweibetechnik) zusammengefasst. Auch an der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen beschäftigen sich im Bereich der klinischen Forschung verschiedene Arbeitsgruppen schwerpunktmäßig mit den

Möglichkeiten zur Organ- beziehungsweise Geweberegeneration.

Aus der Sicht der Knochenforschung ist das System der regenerierenden Geweihknochenzellen vor allem im Vergleich zu den entsprechenden menschlichen Zellen – den mesenchymalen Stammzellen – von Interesse. So sind der Knochenzüchtung im Labor (*in vitro*) aus diesen mesenchymalen Stammzellen zur Zeit noch enge Grenzen gesetzt, beispielsweise durch den programmierten Zelltod (Apoptose), der bei ausdifferenzierten Zellen eintritt, oder durch die bei humanen Knochenzellen fehlende Fähigkeit, *in vitro* dreidimensionale Strukturen auszubilden. Die Entschlüsselung der Mechanismen der Geweihknochenentwicklung könnte helfen, diese Grenzen zu überwinden. Mit den Experimenten möchten die Forscher einen Beitrag sowohl zur Grundlagenforschung als auch zur anwendungsorientierten Forschung leisten, mit dem Ziel, langfristig die Versorgung von Patienten – deren Gesichtsknochen beispielsweise durch Tumore oder Unfälle zerstört wurden – zu verbessern.

Einen wichtigen Schritt beim Vergleich der Wachstums- und Differenzierungsleistung von Geweihknochenzellen mit humanen Stammzellen stellt die Isolierung von so genannten multipotenten Stammzellen aus Geweihzellkulturen dar. Dies ist der Forschergruppe Anfang 2005 unter der Anwendung spezieller Antikörper in Zusammenarbeit mit der Abteilung Hämatologie und Onkologie im Bereich Humanmedizin erstmals gelungen. Dabei konnten aus Zellkulturen von regenerierenden Geweihknochen bis zu vier Prozent Zellen isoliert werden, die aufgrund der aktuellen Definition als multipotente Stammzellen bezeichnet werden können. Diese Zellen befinden sich in einem sehr ursprünglichen Entwicklungsstadium und können sich auch im erwachsenen Indivi-

duum unter bestimmten Bedingungen noch in verschiedene Zell- und Gewebetypen differenzieren. In ähnlichen Größenordnungen können aus dem menschlichen Knochenmark ebenfalls Zellen isoliert werden, die den Charakter multipotenter Stammzellen besitzen. Hier bietet sich an, diese Zellen mit Stammzellen aus dem Geweihknochen in vergleichenden Experimenten auf ihre Eigenschaften hin zu testen.

Von der Zelle zur Struktur

Der strukturelle Aufbau der regenerierenden Cerviden-Geweih ist histologisch dem humanen Röhrenknochen sehr ähnlich. Allerdings sind unter den Bedingungen der Zellkultur erhebliche Unterschiede im Wachstums- und Differenzierungsverhalten zwischen den Knochenzellen des Geweihs und den Stammzellen des menschlichen Knochenmarks zu beobachten. Obwohl die Wachstums- und Entwicklungsmöglichkeiten beider Zelltypen *in vitro* von verschiedenen Wachstumsfaktoren abhängen, die den Zellen über das Nährmedium zugeführt werden können, sind die mesenchymalen Stammzellen aus dem menschlichen Knochenmark nur in vergleichsweise begrenztem Ausmaß zur längerfristigen Kultivierung und Weiterentwicklung befähigt. Im Gegensatz dazu können Zellen aus regenerierenden Geweihknochen über einen Zeitraum von mehr als 27 Monaten in ein und derselben Kulturflasche kultiviert werden, ohne die Zellen in bestimmten Abständen bei Erreichung hoher Zelldichten auf neue Kulturgefäße verteilen zu müssen (so genannte Passagierung). Die regelmäßige Passagierung ist bei den meisten Zell- und Gewebekulturen notwendig, um ein frühzeitiges Absterben der Kulturen zu verhindern. Eine den Geweihzellen vergleichbare Langlebigkeit *in vitro* ist in der Zellforschung bislang nur von Tumorzellkulturen bekannt.

Einblicke in das Wirkungsgefüge der verschiedenen Zelltypen, die sich aus Biopsie-Stanzen des regenerierenden Geweihknochens gewinnen lassen, lieferten bereits Experimente mit so genannten Langzeitkulturen aus Geweihgewebe. Hierzu wurden Gewebebiopsien aus dem wachsenden Geweih mit einem Skalpell in zirka ein Millimeter große Stücke zerteilt und in Kulturschalen mit Nährmedium versorgt. Nach der Kultivierung im Brutschrank konnte man beobachten, wie aus den Gewebestückchen bereits nach wenigen Tagen unterschiedliche Zelltypen herauswuchsen und sich rasch vermehrten. Nach wenigen Wochen waren nicht nur die Kulturschalen mit mehrschichtigen Lagen von Geweihknochenzellen überwachsen, sondern die Zellen hatten darüber hinaus begonnen, sich zu organisieren und deutlich sichtbare Strukturen auszubilden. Überraschend waren dabei nicht unbedingt die zahlreich entstandenen Zellaggregate (im angloamerikanischen Sprachgebrauch als *nodules* bezeichnet), sondern vielmehr der Zusammenschluss von Zellen zu lang gestreckten, dreidimensionalen Gebilden, die in ihrer gesamten Ausprägung dem Betrachter den Eindruck einer spongiosa-(schwamm-)ähnlichen Grundstruktur vermittelten. Beim Knochen besteht die so genannte Spongiosa aus verkalkten Knochenbälkchen (*Trabekel*) und bildet das innere Grund-

gerüst sowohl beim menschlichen Röhrenknochen als auch beim Geweihknochen. Die Tatsache, dass die von Geweihzellkulturen gebildeten dreidimensionalen Trabekelstrukturen auch im Röntgenbild sichtbar waren, lieferte die ersten deutlichen Hinweise auf fortgeschrittene Mineralisierungspro-

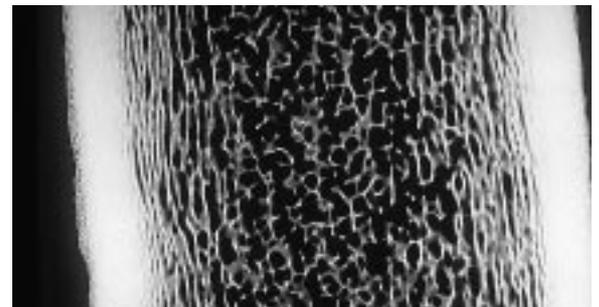


Abbildung 4: Längsschnitt durch einen Geweihknochen. Die Mikroröntgenaufnahme zeigt die Spongiosastruktur im Inneren des Knochens.

zesse in den Kulturschalen. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen konnte dann in weiteren Experimenten nachgewiesen werden, dass die Verkalkungen beziehungsweise Kalziumeinlagerungen in den Geweihzellkulturen hauptsächlich im Bereich der Zellaggregate und der dreidimensionalen »Trabekel« stattfinden.

In Langzeitkulturen, die über mehrere Monate angelegt waren, entstanden auf diese Weise nicht nur großflächige, spongiosa-ähnliche Strukturen, sondern teilweise auch »Geweibeknötchen« bis zu einer Größe von 0,8 mal ein Zentimeter. Erstaunlich war dabei, dass diese gezüchteten Gewebe ohne strukturelle Hilfsmittel, wie zum Beispiel dreidimensionale

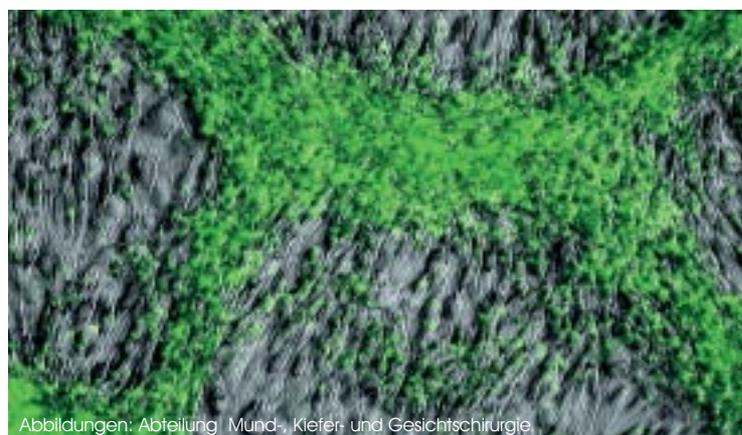


Abbildung 5: Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein wird in den von den Geweihzellen aufgebauten dreidimensionalen Strukturen eingelagert. Dies zeigt, dass die Mineralisierung auch in der Kulturschale stattfindet.

Abbildungen: Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

»Gerüste« aus biologisch verträglichen Materialien, aus vereinzelt Zellen herangewachsen sind. Menschliche Knochenzellen sind zwar in der Lage, Kulturgefäße in mehrschichtigen Lagen zu besiedeln und unter bestimmten Bedingungen auch Zellaggregate zu bilden und zu mineralisieren, die Fähigkeit, *in vitro* ohne Hilfsmittel komplexe, dreidimensionale Strukturen zu entwickeln, konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Möglichkeiten und Grenzen

Wir hoffen, dass das Modell des regenerierenden Geweihknochens dazu beitragen kann, durch vergleichende Experimente zur Regeneration und Differenzierung die Osteogenese (Knochenbildung) durch menschliche Knochenzellen besser zu verstehen und die bisher bestehenden Beschränkungen beim Kultivieren humaner Knochenzellen zu überwinden. Der Schlüssel dazu liegt möglicherweise in der Zusammensetzung der Zellkulturen, so ein wichtiges Ergebnis unserer Experimente. Im Gegensatz zu vielen Knochenzell- beziehungsweise Stammzellkulturen, wie sie zur Knochengewebezüchtung verwendet werden, beinhalten die nach unserem Verfahren angelegten Geweihzellkulturen als so genannte Mischkulturen verschiedene Zelltypen, deren abgestimmte Zusammenarbeit offensichtlich die Grundlage für die besondere Leistungsfähigkeit der Zellen bildet. Unklar ist bislang, wie die Aufgabenverteilung für die einzelnen Zelltypen bei der Ausbildung der Strukturen geregelt ist und welche Wachstumsfaktoren bei diesen Prozessen eine Schlüsselposition besitzen. Die Analyse dieser Zusammenhänge sowie Simulationsexperimente mit Hilfe humaner Zellen in der Kulturschale können so dazu beitragen, die Komplexität der Knochenneubildung zu verstehen und darüber hinaus die Erzeugung von biolo-

gisch vollwertigen knöchernen Ersatzgewebe *in vitro* zu erleichtern.

Bis dahin ist es aber noch ein weiter Weg, denn das Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Hormonen bei Knochenbildung, Knochenumbau und Knochenabbau gleicht einem äußerst komplizierten Regelwerk. Letzt-

lich wird immer zu beachten sein, dass man sich beim Experimentieren im Labor außerhalb des menschlichen Körpers befindet und dass nicht alle *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse ohne weiteres auf das biologische System des Menschen übertragen werden können. ◀



Dr. Hans Joachim Rolf, Jahrgang 1954, studierte Geologie, Biologie, Pädagogik, Publizistik- und Kommunikationswissenschaften an der Universität Göttingen. 1990 wurde er mit einer Untersuchung zur Reproduktionsbiologie des männlichen Damwildes promoviert. Nach einer Forschungstätigkeit an der Universität Tübingen wechselte er 1996 an das Universitätsklinikum Göttingen. Seit 2000 ist er Projektleiter in der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und beschäftigt sich im Rahmen von zellbiologischen Fragestellungen mit Stammzellen und dem Einfluss von Hormonen und Wachstumsfaktoren auf den Knochenstoffwechsel. Er ist Gutachter bei wissenschaftlichen Zeitschriften und Forschungsprojekten sowie unter anderem Gründungsmitglied der International Society of Antler Science and Product Technology (ASPT).



Prof. Dr. Dr. Henning Schliephake, Jahrgang 1960, studierte Zahnmedizin und Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). Nach Tätigkeiten als Assistenzarzt und Wissenschaftlicher Mitarbeiter wurde er 1988 und 1990 an der MHH promoviert und dort 1995 zum Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie ernannt. Im gleichen Jahr habilitierte er sich für das Fach Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Nach einem Ruf an die Universität Göttingen ist er seit 2001 Direktor der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Seine Forschungsschwerpunkte sind moderne Verfahren der Hartgeweberekonstruktion, Wachstumsfaktoren, mesenchymale Stammzellen und biomimetische Beschichtungen von Implantatoberflächen. Seit Anfang 2005 ist Prof. Schliephake unter anderem Präsident der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI).



*Prof. Dr. Dr. Karl Günter Wiese, Jahrgang 1950, studierte Medizin und Zahnmedizin im Hauptstudiengang sowie Landwirtschaft, Forstwirtschaft und Philosophie als Zweitstudium in Göttingen. Er wurde 1983 in Medizin und 1988 in Zahnmedizin promoviert. Nach zahlreichen Auslandsaufenthalten in Afrika und Südamerika sowie in den USA erwarb er 1986 die Facharztanerkennung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und die Zusatzbezeichnung »Plastische Operationen«. 1995 erfolgte die Habilitation an der Universität Göttingen mit Erteilung der *venia legendi* für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Plastische Operationen. Seine Forschungsschwerpunkte sind Knochenphysiologie, Gewebeexpansion, Eigenschaften und Biokompatibilität von klinischen Werkstoffen. Prof. Wiese ist Inhaber mehrerer weltweit anerkannter Patente und Gutachter beim wissenschaftlichen Journal »Biomaterials«.*

Deer antlers are the only mammalian bone structures that regenerate completely every year and they provide a unique natural model to study different aspects of bone regeneration. Extremely fast growth rates (up to 2 cm per day) lead to complete antler development in an adult individual within three to four months. For that reason, deer antlers have been recognized as an excellent object for a number of biomedical studies. The present article deals with the regenerative capacity of cultivated mixed cell populations derived from selected layers of antler tissue. The authors observed that primary antler cell

cultures as well as their first passages can be kept alive for up to more than 27 months without visible signs of apoptosis (= programmed cell death). After several weeks, long-term cultures begin to form complex structures which give the impression that antlerogenic cells are building up a »trabecular« structure, resembling the development of spongiosa (parts of human long bones are also made up of a spongiosa structure). Several months of cultivation lead to organised »bone« nodules up to a size of 0.8 x 1 cm. Compared to antler cell cultures, human bone cells show only limited growth rates and are not able

to form three-dimensional structures *in vitro*.

The research projects described are realized in close cooperation with scientists from different countries (Canada, Czech Republic and Germany). The main objective is to compare differentiation and regenerative capacity of antler cells with human mesenchymal stem cell cultures. These comparative studies might help to overcome limitations observed in experiments with human bone cells *in vitro*. The research on antler bone cells is supported by the German Research Foundation (DFG).





Hoch hinaus!

Sie haben konkrete Vorstellungen, wie Ihre Zukunft aussehen soll?

Praktikanten Absolventen

Sie möchten durch interessante Aufgaben gefordert werden und Ihre Ideen sowie Ihr Know-how in ein motiviertes Team einbringen.

Diplomanden Doktoranden

Wir bieten Ihnen vielversprechende Perspektiven in einem weltweit erfolgreichen Unternehmen

der chemisch-pharmazeutischen Industrie,
das innovative Produkte und Leistungen entwickelt.


come2merck.de