

Rolle der Parodontalligamentzellen im Rahmen des gestörten Zahndurchbruchs bei
Patienten mit Cleidocranialer Dysplasie

Inaugural-Dissertation
zur Erhaltung des Doktorgrades
der hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Bassel Abou Jamra
aus Damaskus (Syrien)

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Jäger
2. Gutachter: Prof. Dr. James Deschner

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.07.2011

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
des Universitätsklinikums Bonn

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1 Klinische Überblick	6
1.2 Genetische Übersicht	7
1.3 Funktion von RUNX2	7
1.4 Beziehung zur Kieferorthopädie	8
1.5 Mechanismen der Osteoklasten-Differenzierung	9
1.6 Rolle der Parodontalligamentzellen	9
1.7 Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Charakterisierung der untersuchten CCD-Patienten	11
2.2 PDL-Zellkultur	14
2.3 Molekulargenetische Untersuchungen	14
2.4 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation und Gewinnung von konditioniertem Medium	15
2.5 RNA Isolation und reverse Transkription	15
2.6 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.7 Monozyten/Makrophagen-Zellkultur und Osteoklastenformationsassay	16
2.8 Kokultur von PDL-Zellen und Monozyten/Makrophagen	17
2.9 Statistische Analyse	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Molekulargenetische Untersuchungen	18
3.2 Zellkulturexperimente	18
4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	34
7. Danksagung	42

Abkürzungsverzeichnis

°C	=	Grad Celsius
µl	=	Mikroliter
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	=	1,25-dihydroxyvitamin D ₃
Abb.	=	Abbildung
ALP	=	Alkalische Phosphatase
Arg	=	Arginin
bp	=	Basenpaar
C	=	Cytosin
CBF β	=	core binding factor β
CCD	=	cleidocraniale Dysplasie
cDNA	=	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (copy deoxyribonucleic acid)
CLS	=	cardiolipin synthase
CO ₂	=	Kohlendioxid
CSF-1	=	Kolonie stimulierende Faktor 1
Ct	=	comparative threshold
DFG	=	deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagles-Medium
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
EGF	=	Epidermale Wachstumsfaktor
<i>et al.</i>	=	und Mitarbeiter (et alteri)
G	=	Guanin
GAPDH	=	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HDGM	=	Human gene mutation Database
Ile	=	Isoleucin
KFO	=	Kieferorthopädie
Ki67	=	Antigen KI-67

M	=	molar
M-CSF	=	colony stimulating factor 1 (macrophage)
ml	=	Milliliter
mRNA	=	Messenger-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NF- κ B	=	Nuklearfaktor-kappa B
ng	=	Nanogramm
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
OPG	=	Osteoprotegerin
Ost	=	Osterix
PCR	=	Polymerasekettenreaction (polymerase chain reaction)
PDL	=	periodontales Ligament
PTHrP	=	Parathormon related Protein
RANK	=	Receptor activator of nuclear factor kappaB
RANKL	=	Receptor activator of nuclear factor kappaB Liganden
RHD	=	Runt-homologe Domäne
RNA	=	Ribonukleinsäure
RNAse	=	Ribonuklease
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase Realtime-Polymerasekettenreaction
Runt	=	runt-related transcription factor
RUNX2	=	RUNT-Related transcription factor 2
Ser	=	Serin
T	=	Thymidin
Tab.	=	Tabelle
TRAP	=	Tartrat-resistente saure Phosphatase
Trp	=	Tryptophan
U	=	Unit
VitD ₃	=	Vitamin D ₃

1. Einleitung

1.1 Klinische Überblick

Bei der Cleidocranialen Dysplasie (CCD; Synonym: Dysostosis cleidocranialis) handelt es sich um ein autosomal-dominant vererbtes Fehlbildungssyndrom, das mit einer Häufigkeit von ca. eins zu einer Million auftritt (Baumert *et al.*, 2006; Chitayat *et al.*, 1992; Mehta und Verma, 1992; Shaikh und Shusterman, 1998). Die klinischen und radiologischen Merkmale bei der CCD wurden in den letzten Jahrzehnten an Hand von über 700 Patienten beschrieben (Baumert *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2001; Golan *et al.*, 2004). Sie weisen eine hohe Variabilität in der Ausprägung auf und betreffen neben Schlüsselbeinanomalien sowie Störungen der Schädel- bzw. Zahnentwicklung auch Thorax, Wirbelsäule, Becken und Extremitäten.

Neben den Schlüsselbeinanomalien, die bei fast allen Patienten aufzutreten scheinen (Jensen und Kreiborg, 1990; Quack *et al.*, 1999), gehören Veränderungen im Zahn-, Mund- und Kieferbereich zu den auffälligsten und häufigsten Pathologien im Rahmen der CCD. Speziell die kraniofaziale Morphologie weist bei den Betroffenen einige Besonderheiten auf. So ist die Länge der Maxilla zwar unauffällig, jedoch ist ihre anteriore und posteriore Höhe reduziert. Auch der Sinus maxillaris ist im Vergleich zu Gesunden verkleinert. Der Gaumen wird als hoch, eng und stark bogenförmig gewölbt beschrieben (Kargul *et al.*, 1997). Im Bereich der Mandibula kann hinsichtlich der Länge und der posterioren Höhe eine Verkleinerung festgestellt werden. Außerdem findet sich eine Inklination der Mandibula nach anterior und ein verspäteter Verschluss der Symphysis mandibularis (Jensen, 1994). Beinahe immer kommt es zu einer Retention der Milchzähne verbunden mit einem verzögerten Durchbruch der bleibenden Zähne, die oftmals eine verzögerte Entwicklung der Zahnwurzel aufweisen. Ein weiteres eindruckliches Merkmal ist das Vorhandensein von überzähligen Zähnen, die die Lage und den Durchbruch der normalen Zähne beeinträchtigen. In Einzelfällen ist von bis zu 30 zusätzlichen (Mundlos, 1999) oder bis zu 63 nicht durchgebrochenen Zähnen (Yamamoto *et al.*, 1989) berichtet worden.

1.2 Genetische Übersicht

Vor ca. 10 Jahren identifizierten verschiedene Autoren mit Hilfe von Kopplungsanalysen und Hybridisierungsexperimenten den Lokus des für CCD verantwortlichen Gens auf Chromosom 6p21 beim Menschen (Feldman *et al.*, 1995; Gelb *et al.*, 1995; Mundlos *et al.*, 1995). Nach einer weiteren Eingrenzung des betroffenen Bereiches konnte das Gen, welches für RUNX2 kodiert, als verantwortlich für die Entstehung der CCD identifiziert werden.

Dabei ist die Runt-homologe Domäne (RHD) für die wohl wichtigste Funktion von RUNX2, die Bindung an die DNA, verantwortlich. Sie wird von Exon 2, 3 und 4 kodiert und vermittelt die Bindung an das entsprechende DNA-Motiv (Konsensussequenz: TGYGGT), welches auf allen Promotoren von Genen mit Runx2-Bindungsstellen zu finden ist. Des Weiteren zeichnet sich die RHD für die Heterodimerisierung mit *CBF β* verantwortlich. Die Heterodimerisierung mit *CBF β* erhöht die Affinität der DNA-Bindung, wobei *CBF β* selber nicht an die DNA bindet (Lee *et al.*, 1997; Mundlos *et al.*, 1997; Quack *et al.*, 1999; Zhang YW *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1999).

Bisher wurden allerdings nur in ca. 40-70 % aller klinisch diagnostizierten CCD-Patienten Mutationen in kodierenden Bereichen des *RUNX2*-Gens gefunden (Lee *et al.*, 1997; Mundlos *et al.*, 1997; Quack *et al.*, 1999; Zhang YW *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 1999), die unterschiedliche "Mutationsarten" umfassten. Es wurden chromosomale Translokationen, Deletionen, Insertionen, Missence "-Nonsense-" und so genannte "splice-site" Mutationen beschrieben. Als häufigste Gruppe der Mutationen wurden Missense-Mutationen identifiziert, die in den allermeisten Fällen im Bereich der RHD lokalisiert waren. Allerdings bleibt auch festzustellen, dass fast 50-% der an CCD erkrankten Patienten keine Mutationen in *RUNX2*-kodierenden Bereichen aufweisen.

1.3 Funktion von RUNX2

Die wichtigsten Daten zur Funktion von RUNX2 lieferten zwei zeitgleich generierte *RUNX2*-defiziente Mausstämme (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). Zur Analyse der

Funktion von RUNX2 wurde Knochen- und Knorpelgewebe in unterschiedlichsten Entwicklungsstadien von *RUNX2*-defizienten Mäusen mit denen von Wildtyp-Mäusen verglichen. Hierbei wurde neben der Histologie insbesondere auf das Expressionsmuster von knochenspezifischen Faktoren wie alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteokalzin, Osteopontin und Bone morphogenetic protein geachtet. Es konnte gezeigt werden, dass in *RUNX2*-defizienten Mäusen eine totale Blockierung der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten vorliegt. Es findet außerdem keine Verknöcherung und Vaskularisierung des angelegten Knorpels statt. Das Ausbleiben der Expression von Proteinen der Knochenmatrix wie Bone sialoprotein, Osteokalzin und Osteopontin deutet auf einen durch *RUNX2*-Defizienz ausgelösten Arrest der Osteoblastendifferenzierung in einem frühen Stadium hin. Die nachgewiesene reduzierte Expression von sehr frühen Markergenen wie *Kollagen-I* und *alkalischer Phosphatase* präzisieren den Zeitpunkt dieses Arrestes. Auch die heterozygoten *RUNX2*-defizienten Mausmutanten weisen einen eindrucklichen Phänotyp auf, der große Ähnlichkeit mit dem Phänotyp der CCD beim Menschen aufweist (Mundlos *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997).

1.4 Beziehung zur Kieferorthopädie

Für die Kieferorthopädie sind die alveolären und dentalen morphologischen Auffälligkeiten sowie der häufig verzögerte Zahndurchbruch von besonderem Interesse. Untersuchungen des Alveolarknochens zeigen bei Patienten mit CCD dichte und kompakte Knochenstrukturen mit groben, ungenauen Trabekulae als Ausdruck von Geflechtknochen (Camilleri und McDonald, 2006; Lukinmaa *et al.*, 1995). Bei Betrachtung der Zahnmorphologie der permanenten Dentition imponiert das Fehlen einer zellulären Zementschicht im Bereich der Zahnwurzel (Gundlach und Buurman, 1978; Lukinmaa *et al.*, 1995; Smith, 1968). Stattdessen ist die Wurzel vorwiegend von azellulärem Zement bedeckt, der zur Tiefe hin immer dicker wird. Diese histologischen Merkmale finden sich jedoch nicht beim Zement der Milchzähne.

Der Vorgang des Zahndurchbruchs vollzieht sich in zwei Phasen. In der ersten wird durch Knochenresorption der erforderliche Durchbruchsweg vorbereitet. In der zweiten Phase

findet dann die vertikale Bewegung des Zahnes statt (Wise *et al.*, 2002). Für die erste Phase ist vor allem die Aktivität der Knochen resorbierenden Osteoklasten erforderlich. Diese wird nach aktueller Erkenntnis maßgeblich durch das Signalsystem bestehend aus Receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK), seinem Liganden RANKL (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG) (Suzuki *et al.*, 2004) kontrolliert. Weiterhin spielen der Kolonie stimulierende Faktor 1 (CSF-1), der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Interleukin 1 α , das Parathormon related Protein (PTHrP) sowie c-Fos und NF-kB eine wichtige regulatorische Rolle (Heinrich *et al.*, 2005; Wise *et al.*, 2002).

1.5 Mechanismen der Osteoklasten-Differenzierung

RANKL, das auf der Zellmembran von Osteoblasten lokalisiert ist (Kartsogiannis *et al.*, 1999), interagiert mit seinem physiologischen Rezeptor RANK, der als trans-membraner Rezeptor vom Typ I auf Osteoklasten und deren hämatopoetischen Vorläuferzellen der Monozyten-/Makrophagenlinie exprimiert wird. Eine Bindung von RANKL an seinen Rezeptor führt zu einer gesteigerten Differenzierung von Vorläuferzellen sowie zu einer Aktivierung reifer Osteoklasten. Die biologische Aktivität von RANKL wird durch den von den Osteoblasten sezernierten Decoy-Rezeptor Osteoprotegerin (OPG), der RANKL bindet und sequestriert, reguliert. Folglich ist das Verhältnis von OPG zu RANKL ausschlaggebend dafür, ob eher die Hartgewebsformation oder -resorption begünstigt wird. Durch die Steuerung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität durch einen Faktor, der von Osteoblasten exprimiert wird, werden somit die Knochenresorption und Knochenneubildung miteinander verknüpft und es wird ein lokaler regulatorischer Mechanismus für das Remodeling des Knochens ausgebildet.

1.6 Rolle der Parodontalligamentzellen

Auch die Zellen des parodontalen Ligamentes (PDL) weisen einen osteoblastären Phänotyp (Basdra und Komposch, 1997; Chou *et al.*, 2002) und ein den Osteoblasten analoges Verhalten bei hormoneller Stimulation auf (Lossdorfer *et al.*, 2005; Lossdorfer *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c), was eine Beteiligung der PDL-Zellen an der Regulation der Um-

bauvorgänge des Alveolarknochens während des Zahndurchbruches impliziert. Der Nachweis der Expression von osteoblastären Differenzierungsparametern (Lossdorfer *et al.*, 2006c) und der Faktoren OPG und RANKL durch PDL-Zellen konnte in zahlreichen *in vitro*-Versuchen erbracht werden (Hasegawa *et al.*, 2002; Kanzaki *et al.*, 2001; Zhang D *et al.*, 2004).

Eine Expression von RUNX2 während der Zahnentwicklung und -eruption wurde in allen Geweben des Parodontiums nachgewiesen (Bronckers *et al.*, 2001; Ducy *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999). Gleichzeitig findet man eine Kommunikation zwischen den Zellen des Zahnkeims und den umgebenden knochenbildenden und -resorbierenden Zellen (Ohazama *et al.*, 2004). Die Expression von RUNX2 durch Zellen des PDL könnte daher eine ähnliche Funktion besitzen, wie die durch Osteoblasten im Bereich des Knochens (Ducy *et al.*, 1999).

1.7 Fragestellung

Kann der verzögerte Zahndurchbruch bei den CCD Patienten durch eine gestörte Aktivität des *RUNX2* und/oder bei der Kontrolle der RANK/RANKL/OPG-Signalwege verursacht werden, was letztlich in einer insuffizienten Resorption des Alveolarknochens resultieren könnte?

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten in der vorliegenden Untersuchung zunächst humane PDL-Zellen von gesunden Spendern und von solchen mit CCD vergleichend bezüglich des Auftretens von osteoblastären Differenzierungsparametern und bezüglich der Expression von lokalen Faktoren, die für die Differenzierung und Aktivität von Knochen resorbierenden Osteoklasten verantwortlich sind, charakterisiert werden. Des weiteren sollte überprüft werden, ob eine verminderte basale Expression und/oder Induzierbarkeit der Osteoklasten-kontrollierenden Faktoren OPG und RANKL Auswirkungen auf die Differenzierung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen haben und damit für den erschwerten Zahndurchbruch bei Patienten mit CCD mitverantwortlich sein könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Charakterisierung der untersuchten CCD-Patienten

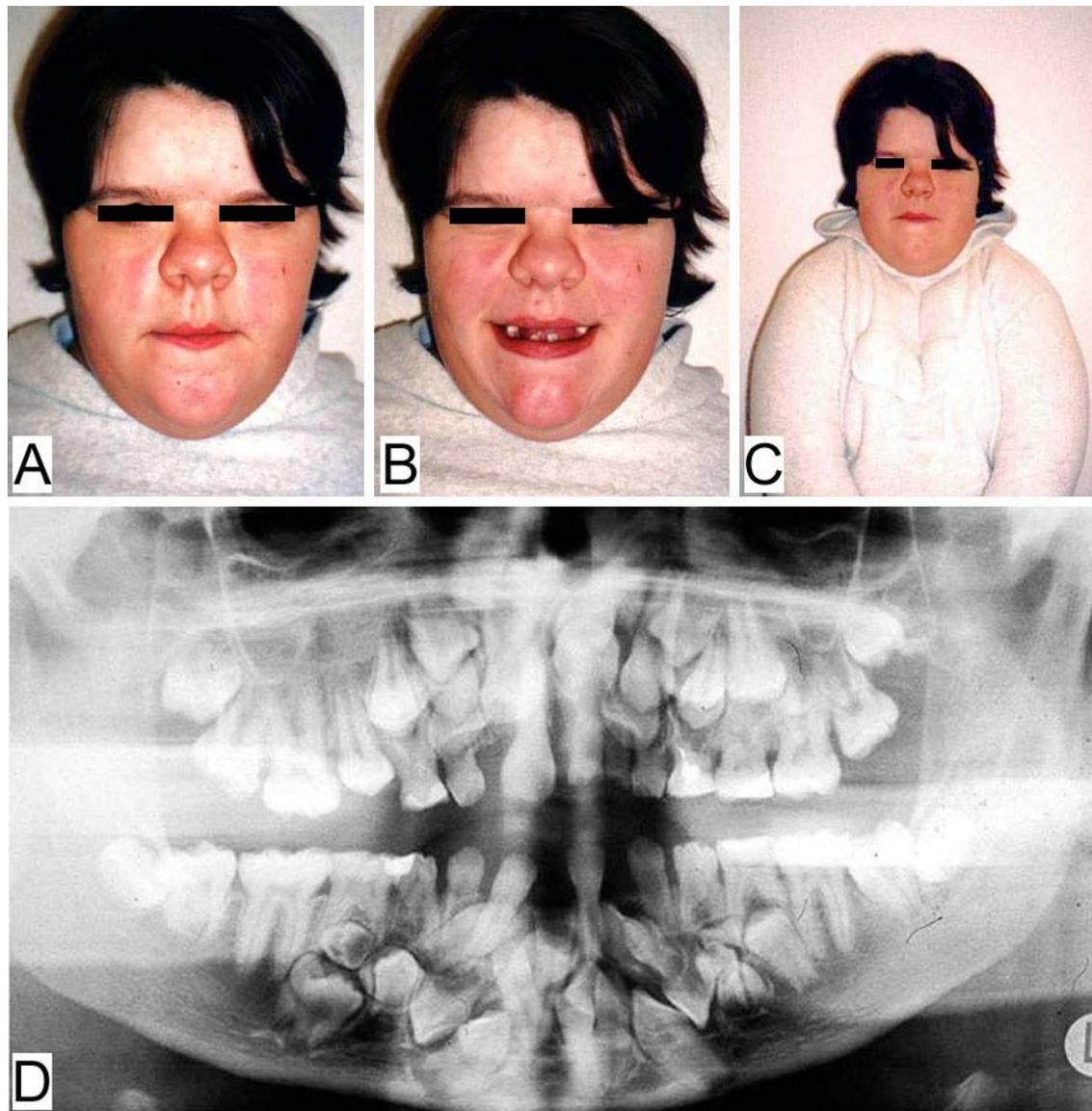
Die beiden CCD-Patienten, deren PDL-Zellen von extrahierten Zähnen für die im Folgenden beschriebenen Zellkulturexperimente eingesetzt wurden, wurden bezüglich der Parameter Alter, Geschlecht, Familienanamnese, Auftreten von überzähligen Zähnen und Zahndurchbruchstörungen, Körpergröße, sowie dem Vorliegen einer flachen Stirn, einer Mittelgesichtshypoplasie und einer Hypermobilität der Schultern charakterisiert. Die drei letztgenannten Merkmale wurden jeweils klassifiziert als: nicht vorhanden (0), geringe Ausprägung (1) und starke Ausprägung (2) (Abb. 1,2 und Tab. 1).

Tabelle 1:

Charakterisierung der untersuchten CCD-Patienten

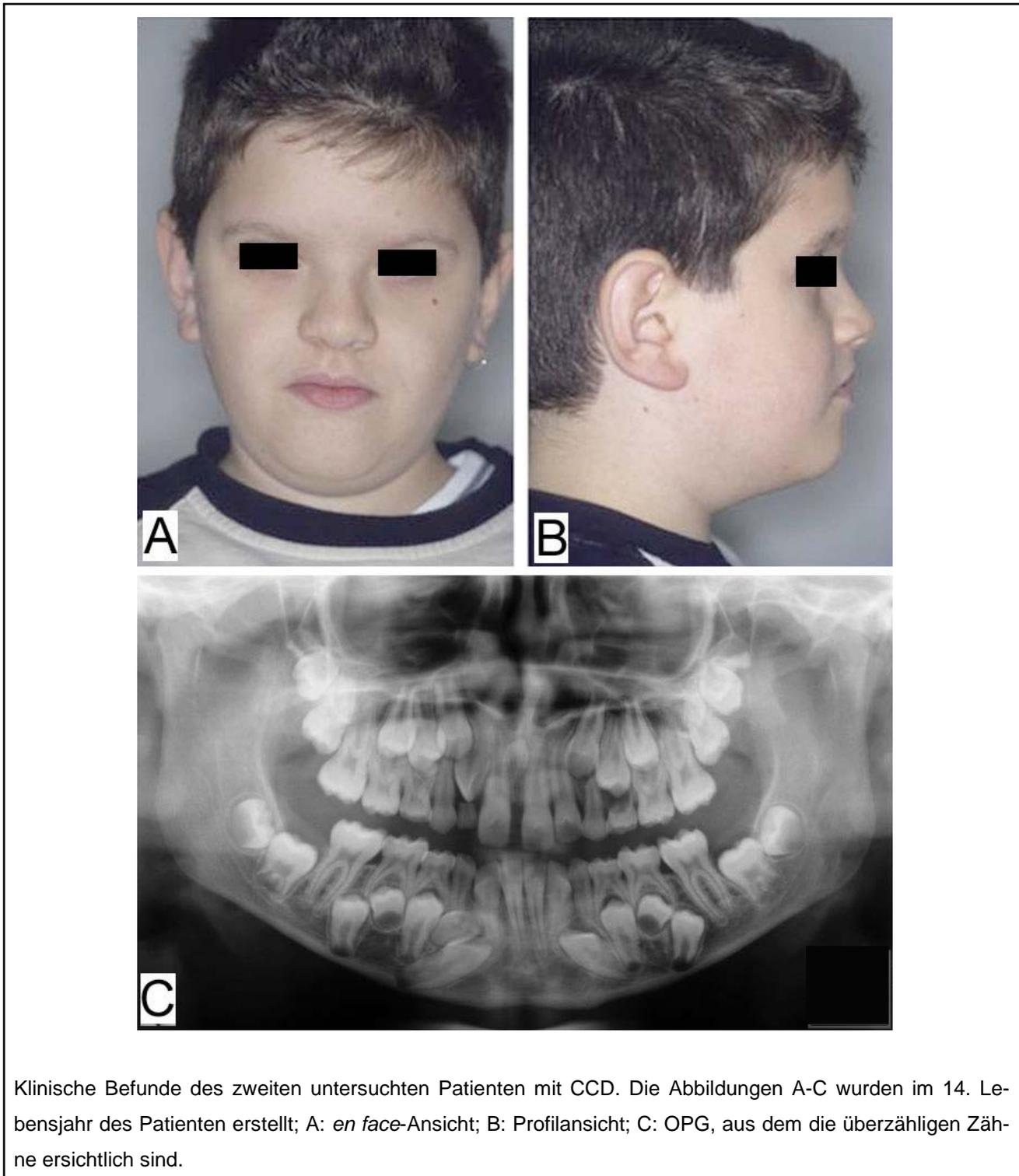
	Alter	Geschlecht	Familienanamnese	Überzählige Zähne (n)	Störungen des Zahndurchbruchs (n)	Körpergröße (cm)	Flache Stirn	Mittelgesichtshypoplasie	Hypermobilität der Schulter
Patient 1	17	w	negative	11	11	156	2	1	1
Patient 2	17	m	positive	4	7	163	1	1	1

Abbildung 1:



Klinische Befunde der ersten untersuchten Patientin mit CCD. Die Abbildungen A-C wurden erstellt, als die Patientin 15 Jahre alt war. Das Orthopanthomogramm wurde in ihrem 14. Lebensjahr angefertigt. A,B: *en face*-Ansicht, C: Hypermobilität der Schultern deutlich erkennbar; D: OPG, aus dem die zahlreichen überzähligen Zähne ersichtlich sind.

Abbildung 2:



2.2 PDL-Zellkultur

Humane PDL-Zellen wurden vom mittleren Zahnwurzel Drittel von Prämolaren sowohl von den beiden CCD-Patienten als auch von vier verschiedenen gesunden Spendern im Alter von 12-14 Jahren gewonnen, ebenso von drei Zähnen der beiden CCD-Patienten aus derselben Altersgruppe. Alle Spender wiesen keine klinischen Anzeichen für das Vorliegen einer Parodontitis auf. Die Zähne waren aus kieferorthopädischen Gründen mit elterlichem Einverständnis und gemäß einem von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigten Protokoll (Referenznummer 029/08) extrahiert worden. Die Zellen wurden in DMEM, das mit 10% fetalem Kälberserum sowie 0.5% Antibiotika supplementiert war (verdünnt aus einer Stammlösung von 5000 U/ml Penicillin und 5000 U/ml Streptomycin; Biochrom AG, Deutschland), bei 37°C in einer Atmosphäre von 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

2.3 Molekulargenetische Untersuchungen

Aus den kultivierten PDL-Zellen der 2 Patienten mit CCD wurde mit Hilfe des Qiagen Genomic DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach Angaben des Herstellers genomische DNA extrahiert. Anschließend wurden die 9 kodierenden Exons des *RUNX2*-Gens samt Spleiß-Donoren und -Akzeptoren unter Verwendung jeweils von flankierenden Primerpaaren in den Introns (Tabelle 2) amplifiziert (insgesamt ca. 3700 Basenpaare). Die amplifizierten Fragmente wurden mit Hilfe der rechten und linken Primer (Double-Strand Sequencing) mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit sequenziert und auf dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer getrennt (ABI, Foster City, USA). Die erhaltenen Sequenzen wurden von 2 erfahrenen Wissenschaftlern mit Hilfe des Programms SeqMan II™ (DNASTAR, Madison, USA) ausgewertet und die FASTA-Sequenzen mit den öffentlichen Datenbanken (UCSC, freeze March 2006, Build 129) verglichen.

Tabelle 2:

Primersequenzen zur Amplifikation der neun Exons im Bereich des *RUNX2*-Gens

Exon	Name	Forward-Primer	Name	Reverse-Primer	Länge
0-1	RUNX2-1F	GGTAGGCAGTCCCACCTTACT	RUNX2-1R	CATATCCTCACCTCTATAACTCTAGAA	861bp
2	RUNX2-3F	CTGGACTGCTGAACCCACAC	RUNX2-3R	GGCAGGAGGTCTTGGAGGA	922bp
3	RUNX2-4F	CTGGACTGGACTAGAACACTAAG	RUNX2-4R	CTTATATGCTCACACCCAGTG	532bp
4	RUNX2-5F	CATTGCCTCCTTAGAGATGC	RUNX2-5R	CTCTGAAGTTTGACTAACTCTCCCT	380bp
5	RUNX2-6F	TCCTTGGCTTAAACTCCCAGTT	RUNX2-6R	GTGAACACATCTCCTCTGGTAGC	355bp
6	RUNX2-7F	GGGTTGCATGTTTCTAAGGCT	RUNX2-7R	CTTGCCACATGCCTCTAATAG	345bp
7	RUNX2-8F	CAGACTCTGGGAAATACTAATGAGG	RUNX2-8R	TCGGACAGTAACAACCAGACAG	284bp
8	RUNX2-9F	GTGACTGGTGCATTTGAAG	RUNX2-9R	GCTGCAAGATCATGACTGA	792bp

2.4 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation und Gewinnung von konditioniertem Medium

Jeweils 10.000 PDL-Zellen der 4. Passage wurden in 24-well Kulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert, ehe sie dann für sechs Tage 10^{-7}M $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma Aldrich, Deutschland) als Stimulus für die osteoblastäre Differenzierung und zur verstärkten Expression von RANKL exponiert wurden. Ethanol-behandelte Kulturen dienten für jede experimentelle Gruppe als Vehikel-Kontrolle.

Zur Ernte wurde der Zellkulturüberstand einer jeden experimentellen Gruppe gesammelt und bei -20°C für spätere Versuche in der Monozyten/Makrophagen-Zellkultur eingefroren.

2.5 RNA Isolation und reverse Transkription

Zur Charakterisierung der PDL-Zellen von gesunden Spendern und solchen mit CCD sowie zur Quantifizierung des Einflusses der $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation auf die gewählten Parameter wurde die Gesamt-RNA mittels des RNeasy mini kit (Qiagen) isoliert. Anschließend wurden $1\mu\text{g}$ RNA mit 200ng des jeweiligen Antisense-Primers für GAPDH, Ki67, RUNX2, Osterix, ALP, Osteokalzin, OPG und RANKL in $15\mu\text{l}$ Gesamtvolumen mit Hilfe des Amersham-Pharmacia-Biotech RT kit (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) revers transkribiert. Die Primer zur Amplifikation der humanen cDNA wurden bei der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) erworben.

2.6 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Optimale Oligonukleotidprimer wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland) erworben. Die Real-time PCR wurde auf einem Light Cycler (Roche, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung der Light Cycler Software 3.5.3 durchgeführt. PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μ l in dem PCR Mastermix ausgeführt, der 10 μ l Sybergreen, 2 μ l des 10x QuantiTect Primerassays sowie 2 μ l des Produkts der reversen Transkription enthielt und mit RNase-freiem H₂O auf 20 μ l aufgefüllt wurde. Die Amplifikation wurde für jede Probe doppelt bei einer optimalen Annealingtemperatur von 55 °C für 40 Zyklen ausgeführt. Zur Quantifizierung des Gehaltes des jeweiligen Zielgens in den cDNA Proben fand die comparative threshold (Ct) cycle Methode Anwendung, bei der eine Normalisierung der Anzahl der Zielgenkopien im Vergleich zu einem endogenen Referenzgen wie *GAPDH* erfolgt. Ct ist dabei als diejenige fraktionale Zyklenzahl definiert, bei der die Fluoreszenz, die bei der Spaltung der Sonde entsteht, einen bestimmten Basisschwellenwert überschreitet, wenn die Amplifikation des PCR-Produkts erstmalig detektiert wird. Zur vergleichenden Analyse der Genexpression wurden die Daten nach der $\Delta\Delta$ Ct -Methode, die sich von einer mathematischen Gleichung ableitet, erhoben. Im Zuge dieser Berechnung werden die Proben einer unbehandelten Kontrollgruppe als Kalibrator eingesetzt, um die relativen Genexpressionslevel der Zielgene wiederzugeben.

2.7 Monozyten/Makrophagen-Zellkultur und Osteoklastenformationsassay

Mononukleäre Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie (RAW 264.7 cells, CLS cell line services, Eppelheim, Deutschland) wurden in Anwesenheit von 20 ng/ml M-CSF (BioCat, Heidelberg, Deutschland) und 30 ng/ml RANKL (Axxora, Lörrach, Deutschland) kultiviert. Der Nachweis, dass sich diese Zellen nach fünf Tagen in Kultur zu multinukleären osteoklastischen Zellen formieren, wurde mittels einer Färbung für die Tartrat-resistenten sauren Phosphatase erbracht (TRAP, gemäß Barka und Anderson 1962 (Bronckers *et al.*, 2001)). Um der Frage nachzugehen, ob das konditionierte Medium von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -stimulierten PDL-Zellen von gesunden Spendern und solchen mit CCD die Differenzierung von osteoklastären Vorläuferzellen zu multinukleären Zellen beeinflusst, wurden RAW

264.7-Zellen in 24-well Kulturschalen in einer Dichte von 20.000 Zellen/well ausgesät und für sieben Tage in Anwesenheit von 50 % normalem RAW-Zellkulturmedium, das 20 ng/ml M-CSF und 30 ng/ml RANKL enthielt, und 50 % konditioniertem Medium von PDL-Zellen von gesunden und CCD-Spendern, die dem $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ exponiert worden waren, kultiviert. Zur Ernte wurde nach TRAP-Färbung eine histomorphometrische Quantifizierung der reaktiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl durchgeführt.

2.8 Kokultur von PDL-Zellen und Monozyten/Makrophagen

Zur Überprüfung der Hypothese, dass PDL-Zellmembranständiges RANKL durch $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in seiner Expression modifiziert wird und damit die Differenzierung von multinukleären, osteoklastischen Zellen beeinflusst, wurden PDL-Zellen (30.000/well) von gesunden Spendern und von solchen mit CCD für neun Tage mit RAW Zellen (30.000/well) ko-kultiviert und während dieser Zeitdauer einer kontinuierlichen 10^{-7} M $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation unterzogen. Zur Ernte wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und anschließend erfolgte die Quantifizierung der Expression von *TRAP*, *Vitronectin-Rezeptor* und *Kathepsin K* als typische Marker für eine osteoklastäre Differenzierung mittels realtime PCR wie oben beschrieben. In Vorversuchen wurde der Nachweis erbracht, dass die gewählten Primer kein Produkt in den PDL-Zellen erbringen, sondern nur in den RAW-Zellen.

2.9 Statistische Analyse

Aufgrund des geringen Probenaufkommens bei den PDL-Zellen von Spendern mit Cleidokranialer Dysplasie wurde lediglich eine deskriptive statistische Analyse der erhobenen Daten durchgeführt. Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt und separat analysiert. Beide experimentellen Durchläufe ergaben vergleichbare Ergebnisse und deshalb werden nur die Daten eines Experimentes präsentiert.

3. Ergebnisse

3.1 Molekulargenetische Untersuchungen

Als Ergebnis der molekulargenetischen Analyse konnte für beide CCD-Patienten jeweils eine Missense-Mutation im Bereich der Runt-Domäne nachgewiesen werden. Unter Verwendung des Coding-Systems der Human Gene Mutation Database (HDGM) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>) wies der erste Patient einen Austausch im Exon 2 c353 mit einem Basenaustausch von Guanin durch Thymidin auf (c.353G>T), was einen Austausch der Aminosäure Serin durch Isoleucin zur Folge hat (p.Ser118Ile). Für den zweiten Patienten ergab die molekulargenetische Analyse einen Basenaustausch im Bereich c568 (C>T), welcher einen Austausch der Aminosäure Arginin durch Tryptophan an dieser Stelle bewirkt (p.Arg190Trp)

3.2 Zellkulturexperimente

Sowohl die PDL-Zellen von gesunden Spendern als auch die von Patienten mit CCD exprimierten *RUNX2* mRNA mit einer erhöhten basalen Expression bei CCD-Patient 1. Es zeigte sich eine leicht reduzierte Induzierbarkeit von *RUNX2* mRNA durch $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei beiden CCD-Patienten im Vergleich zu den gesunden Donoren (Abb. 3).

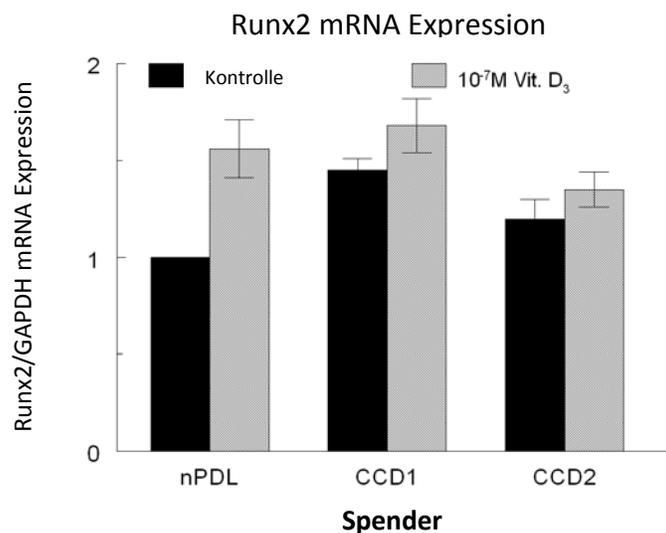
Bezüglich der mitogenen Aktivität resultierte eine $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation in einer vergleichbaren Hemmung der *Ki67* mRNA Expression sowohl bei den normalen als auch bei den CCD-PDL-Zellen (Abb. 4A). Dabei war die Proliferationsrate bei den Zellen des CCD-Patienten 2 mit und ohne VitD_3 -Stimulation auffällig reduziert.

Die mRNA für den Transkriptionsfaktor *Osterix* wurde in allen Kulturen vergleichbar exprimiert. Eine $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Exposition der normalen PDL-Zellen führte zu einem Anstieg dieses Parameters, dessen Ausmaß bei CCD-Patient 1 noch deutlicher ausfiel, während bei CCD-Patient 2 eine geringere Erhöhung als Folge der Stimulation zu verzeichnen war (Abb. 4B).

Die basale *ALP* mRNA Expression war bei den Zellen der CCD-Patienten deutlich verringert und auch der Anstieg infolge der $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation fiel deutlich geringer aus als bei den Kulturen von gesunden PDL-Zellen (Abb. 4C).

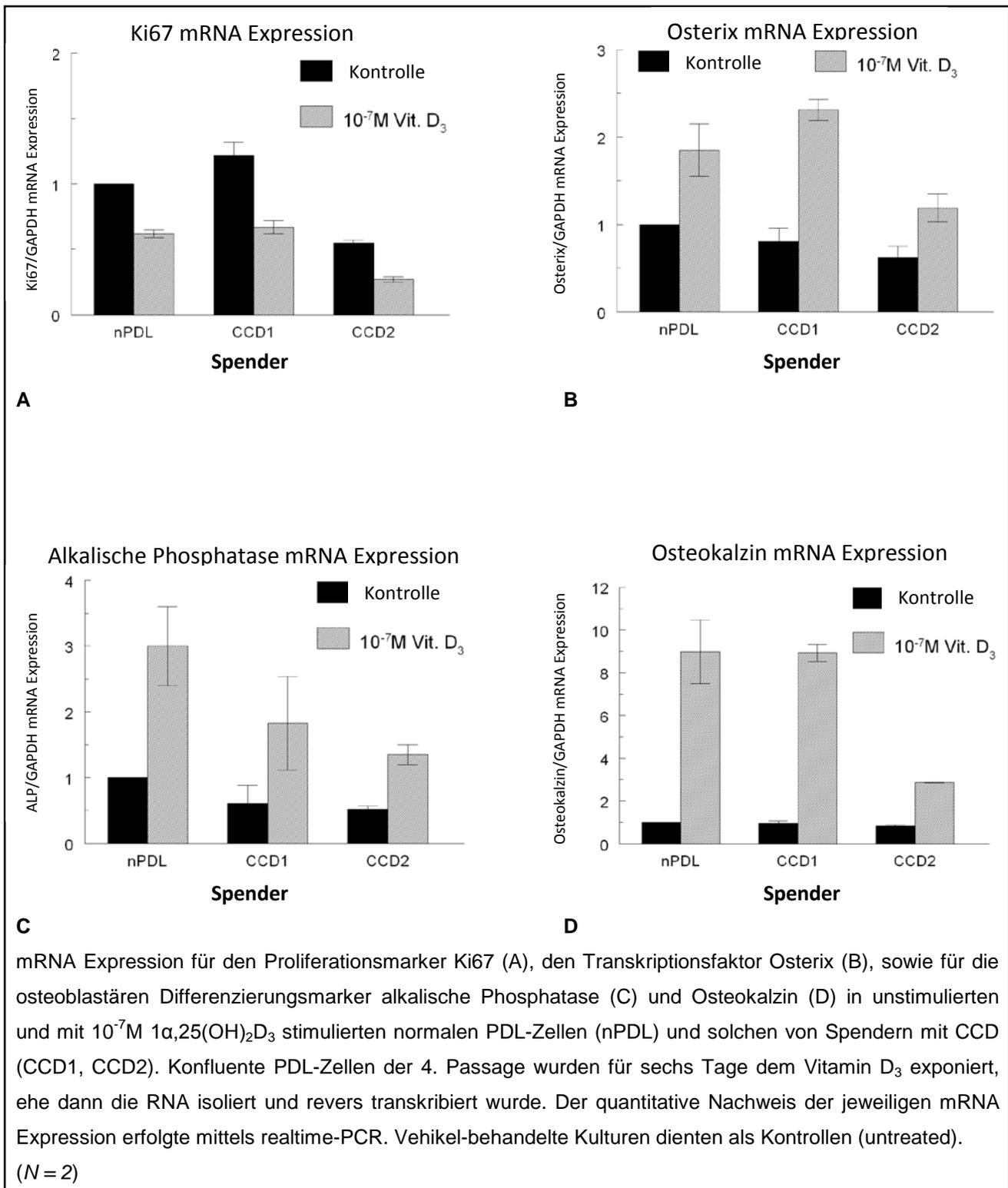
Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die *Osteokalzin* mRNA Expression, wobei die verminderte Induzierbarkeit dieses Parameters besonders bei CCD-Patient 2 auffiel (Abb. 4D).

Abbildung 3:



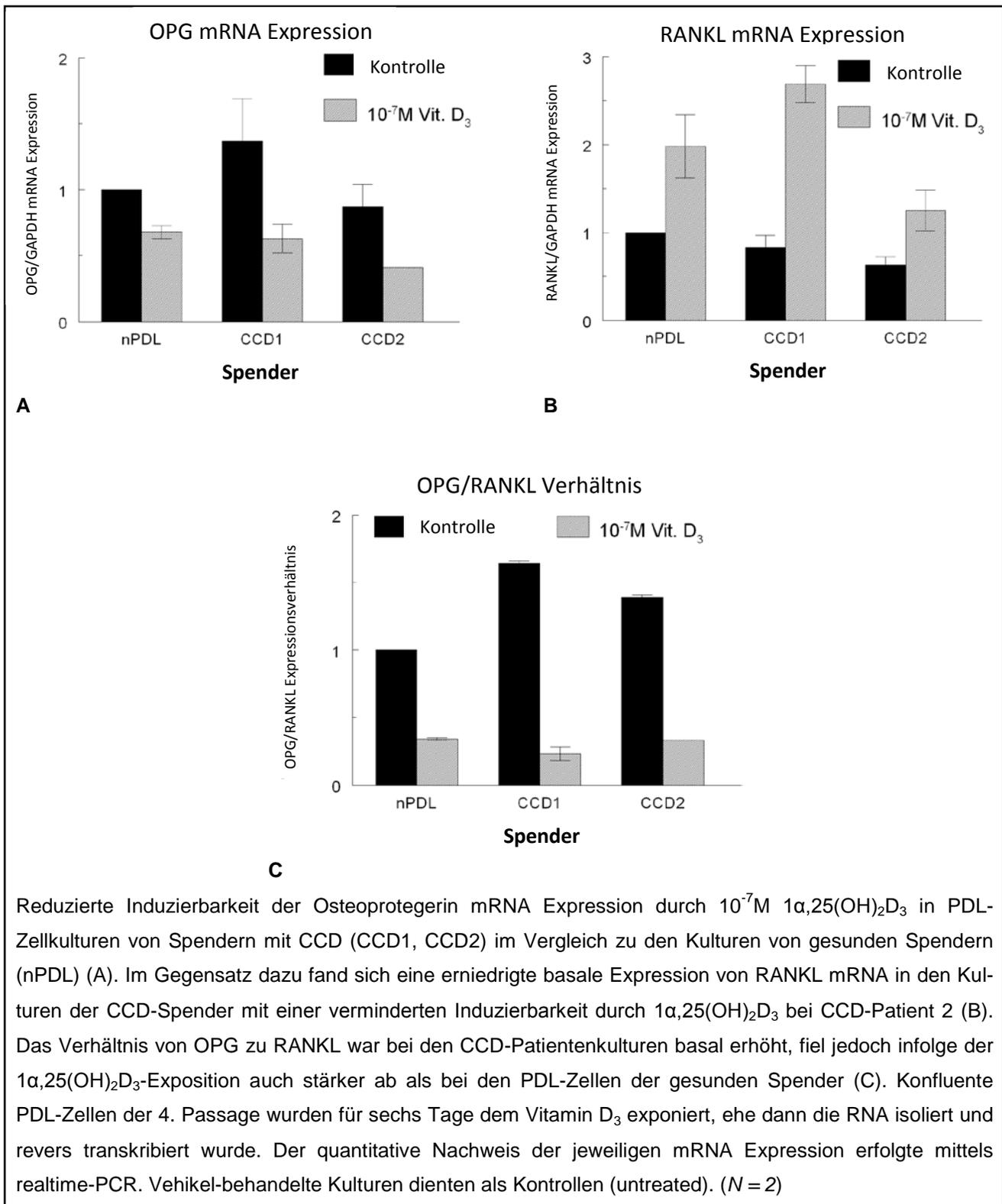
RUNX2 mRNA Expression in unstimulierten und mit $10^{-7}\text{M } 1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimulierten normalen PDL-Zellen (nPDL) und solchen von Spendern mit CCD (CCD1, CCD2). Konfluente PDL-Zellen der 4. Passage wurden für sechs Tage dem Vitamin D_3 exponiert, ehe dann die RNA isoliert und revers transkribiert wurde. Der quantitative Nachweis der RUNX2-Expression erfolgte mittels realtime-PCR. Vehikel-behandelte Kulturen dienten als Kontrollen (untreated). ($N = 2$)

Abbildung 4:



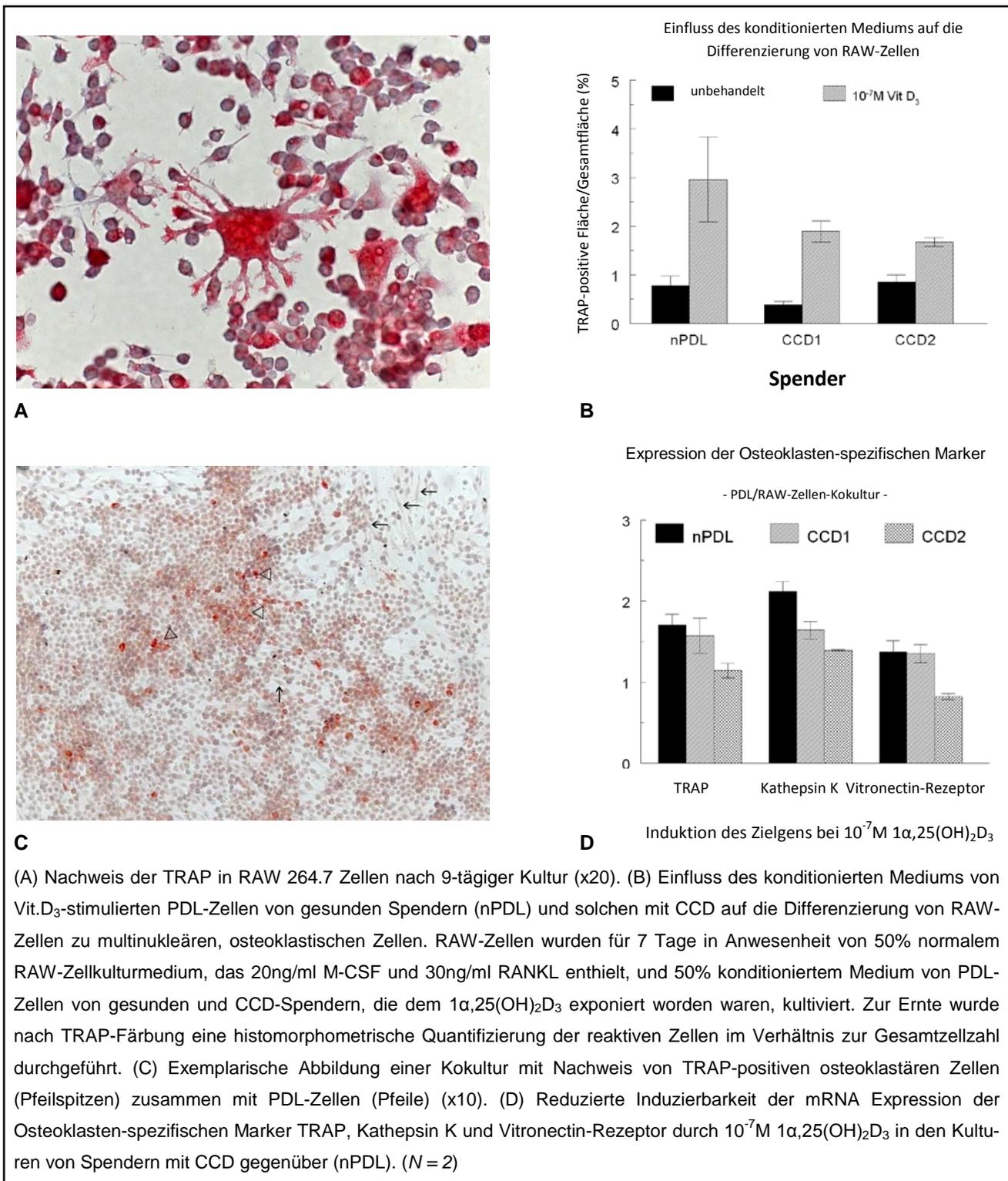
OPG mRNA wurde in allen Kulturen in vergleichbarer Menge exprimiert. Eine $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Administration resultierte jeweils in einer Hemmung der Expression, die bei den CCD-Patienten deutlicher ausfiel als bei den Zellen der gesunden Spender (Abb. 5A). Umgekehrt zeigte sich eine leicht reduzierte basale Expression von *RANKL* mRNA bei den CCD-Kulturen mit einer verminderten Induzierbarkeit durch $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei CCD-Patient 2. Demgegenüber zeigte sich bei CCD-Patient 1 eine verstärkte *RANKL* Expression nach $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Stimulation gegenüber den normalen PDL-Zellen (Abb. 5B). Das Verhältnis von *OPG* zu *RANKL* war bei den CCD-Patientenkulturen basal erhöht, fiel jedoch infolge der $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Exposition auch stärker ab als bei den PDL-Zellen der gesunden Spender (Abb. 5C).

Abbildung 5:



In Gegenwart des konditionierten Mediums, das von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -stimulierten gesunden PDL-Zellen gesammelt wurde, differenzierten sich deutlich mehr TRAP-positive multinukleäre osteoklastische Zellen als in Anwesenheit des konditionierten Mediums von stimulierten PDL-Zellen der CCD-Patienten (Abb. 6 A,B). In der Kokultur von PDL-Zellen und RAW-Zellen, die in Abb. 6C exemplarisch dargestellt ist, ergab sich eine verminderte Induzierbarkeit der mRNA Expression der Osteoklasten-spezifischen Marker *TRAP*, *Kathepsin K* und *Vitronectin-Rezeptor* durch $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bei den Kulturen der CCD-Patienten, die bei CCD-Patient 2 noch geringer ausfiel als bei CCD-Patient 1 (Abb. 6 C,D).

Abbildung 6:



4. Diskussion

Die CCD-Patienten, von denen wir unsere PDL-Zellen gewonnen haben, wiesen gemäß der molekulargenetischen Diagnose beide eine Missense-Mutation im Bereich der Runt-homologen Domäne des *RUNX2*-Gens auf. Bei beiden Mutationen kann von der Expression eines veränderten Proteins ausgegangen werden. Die Tatsache, dass diese minimalen Veränderungen (Austausch einer Aminosäure) im Bereich der funktionell besonders wichtigen Runt-homologen Domäne (RHD) des *RUNX2*-Gens zur Ausprägung des Krankheitsbildes der CCD führen, lassen den Ort der Mutation als Region erscheinen, die essentiell für die *RUNX2*-Funktion ist.

Die von uns bei identifizierter Mutation lagen bei dem ersten Patienten in der Position c.353 (G>T; p.Ser118Ile). Diese Mutation wurde bisher in der vorhandenen Literatur noch nicht beschrieben. Allerdings wurde von Quack *et al.* (1999) bei einem Patienten mit CCD eine Missense-Mutation beschrieben, die das gleiche Codon betraf (c.354C>G; p.Ser118Arg).

Bei dem zweiten Patienten konnten wir eine Mutation in der Position c568 (C>T; p.Arg190Trp) identifizieren. Die gleiche Missense-Mutation wurde bereits erstmalig von Giannotti *et al.* (2000) und anschließend von anderen Autoren bei Patienten mit diagnostizierter CCD beschrieben (Napierala *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 1999). Diese Mutation befindet sich in einem Bereich des Proteins (β 3-L3), der für die Bindung an die DNA Konsensus-Sequenz wichtig ist (Li *et al.*, 2003; Warren *et al.*, 2000).

Einige Autoren haben verschiedene diagnostizierte Mutationen im Bereich des *RUNX2*-Gens im Rahmen von *in vitro* Tests auf ihre funktionellen Auswirkungen untersucht. Zum Einsatz kamen dabei vor allem das Verfahren des „Electromobility shift Assays“ (EMSA) zur quantitativen Analyse der Bindung von *in vitro* translatierten Proteinen an markiertes Oligonukleotid, „Hefe-Hybridassays“ zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen sowie „Luciferase Reporter Assays“ zum Nachweis der Transaktivierungsaktivität von *RUNX2*

(Matheny *et al.*, 2007; Nagata und Werner, 2001; Napierala *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 1999). Dabei wurden sowohl Mutationen identifiziert, die die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors verloren haben, spezifisch an DNA zu binden, als auch solche, die die Fähigkeit der Heterodimerisierung mit CBF β nicht mehr besaßen. In diesen Studien konnte für den Großteil der CCD-auslösenden *RUNX2*-Missense-Mutationen eine molekulare Erklärung für die Haploinsuffizienz des *RUNX2*-Gens gefunden werden. Für einige dieser Mutationen ist dies der Verlust der DNA-Bindung, für andere der Verlust der Heterodimerisierung mit CBF β .

Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten auch die Vorhersage für eine Einschränkung der Heterodimerisierung mit CBF β im Falle der von uns bei dem Patienten 1 identifizierten Mutation im Bereich c.353 (G>T; p.Ser118Ile) sowie die reduzierte Bindungskapazität an die DNA im Falle der von uns bei dem Patienten 2 identifizierten Mutation am c.568 (C>T; p.Arg190Trp).

Wie noch zu diskutieren sein wird, zeigten die PDL-Zellen der beiden CCD-Spender in unseren Versuchen teilweise deutliche Unterschiede sowohl in der basalen als auch in der induzierbaren Expression der verschiedenen gewählten Parameter, was die Frage aufwirft, ob die bei unseren zwei Patienten diagnostizierten Mutationen im Bereich des *RUNX2*-Gens mit unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern und Schweregraden der Erkrankung korrelieren. Die Variabilität in der Ausprägung der CCD führen einige Autoren zum einen auf die unterschiedlichen Prozesse zur Verknöcherung zurück, zum anderen gibt es Daten, die vermuten lassen, dass Mutationen im *RUNX2*-Gen je nach Art und Ort unterschiedliche Funktionseinbußen und damit eine unterschiedliche Ausprägung von Symptomen bewirken (sog. Phänotyp-Genotyp-Korrelation). Gezeigt werden konnte dies insbesondere für die Korrelation von biologischer Aktivität des mutierten *RUNX2* und endgültiger Körpergröße (Yoshida *et al.*, 2002). Welche Veränderungen allerdings zu schweren und welche zu leichten Funktionsverlusten führen, ist bis heute ungeklärt bzw. nicht eindeutig belegt.

In unseren *in vitro*-Untersuchungen ergab sich keine reduzierte basale Expression, wohl aber eine leicht verminderte Induzierbarkeit von *RUNX2* mRNA bei den beiden CCD Patienten im Vergleich zu den Kulturen von gesunden Spendern. Die vergleichbare basale Expression erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf die Funktion, da nicht klar ist, ob aus der entsprechenden mRNA auch ein normal funktionsfähiges Protein translatiert werden kann. Da *RUNX2* aber maßgeblich an der Regulation Osteoblastenspezifischer Zielgene wie *Osteopontin*, *Bone sialoprotein* und *Osteokalzin* beteiligt ist, kommt der Klärung dieser Frage besondere Bedeutung zu.

1,25(OH)₂D₃ kommt neben verschiedenen Glukokortikoiden eine wichtige Rolle als Regulator der *RUNX2*-Genexpression zu, da *RUNX2* in seinem proximalen Promotor ein responsives Element für 1,25(OH)₂D₃ besitzt und Mutationen in diesem Bereich zu einem Regulationsverlust führen (Drissi *et al.*, 2002). In unseren Kulturen zeigten die Zellen der CCD-Spender eine leicht reduzierte zelluläre Antwort bei 1,25(OH)₂D₃-Stimulation im Vergleich zu den gesunden Spendern. Dennoch bestätigen unsere Ergebnisse die Befunde anderer Autoren, die für Osteoblasten nach Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ für eine Stunde einen hemmenden Effekt auf die *RUNX2*-Expression nachwiesen, nach 48 Stunden jedoch eine verstärkte Expression (Lian *et al.*, 2004; Prince *et al.*, 2001; Viereck *et al.*, 2002). Weiterhin ergab eine länger dauernde Stimulation von mesenchymalen Stammzellen nach einer, zwei und vier Wochen einen Anstieg der Expression um das bis zu Achtfache (zur Nieden *et al.*, 2003). Dabei ist der langfristige Effekt wahrscheinlich eher ein indirekter, bedingt durch die zunehmende Differenzierung der Osteoblasten durch das Vitamin D₃.

Die mitogene Aktivität war bei CCD-Patient 1 vergleichbar der Kontrollgruppe, hingegen bei CCD-Patient 2 deutlich erniedrigt. Da *RUNX2* bei Osteoblasten den Ausstieg aus dem Zellzyklus induziert und *RUNX2*-defiziente Osteoprogenitorzellen eine verstärkte Proliferation zeigen (Pratap *et al.*, 2003), kann die reduzierte basale *Ki67* mRNA Expression bei CCD-Patient 2 dahingehend interpretiert werden, dass hier die anti-proliferative Wirkung

von RUNX2 erhalten zu sein scheint. Auch Chen *et al.* (2005) berichteten von einer bis zu dreifach erniedrigten proliferativen Aktivität in pulpalen Zellen von Spendern mit CCD.

In allen Kulturen war eine deutliche Reduktion der Proliferation nach $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Exposition zu beobachten. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit anderen Berichten in der Literatur, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der frühen Entwicklungsphase von Osteoblasten den Ausstieg aus dem Zellzyklus durch Hochregulation des zyklinabhängigen Kinasehemmers p21WAF/CIP1 induziert.

Bezüglich der osteoblastären Differenzierungsparameter zeigte sich in unseren Kulturen eine reduzierte basale Expression des Transkriptionsfaktors *Osterix*, von *alkalischer Phosphatase* und *Osteokalzin* mRNA bei den CCD-Patienten, die wiederum bei Patient 2 stärker ausgeprägt war als bei Patient 1. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Tu *et al.* (2008) gestützt, die bei Runx2^{+/-} Mäusen eine geringere Knochendichte fanden und gleichzeitig berichteten, dass die Osteoblasten der Tiere in der Kultur eine geringere Expression für *alkalische Phosphatase*, *Osteopontin*, *Bone Sialoprotein* und *Osteokalzin* und gleichzeitig eine verminderte *in vitro*-Mineralisationsrate aufwiesen. Auch die Daten von Xiao *et al.* (2005) unterstützen diese Beobachtungen. Die reduzierte Expression und Induzierbarkeit von *Osterix* mRNA bei CCD Patient 2 legt die Vermutung nahe, dass hier durch die Mutation im Bereich des *RUNX2*-Genes die Aktivierung der *Osterix* Expression beeinträchtigt sein könnte, da auch in Chondroprogenitorzellen demonstriert werden konnte, dass *RUNX2* an den Promotor von *Osterix* bindet und eine Aktivierung der Expression bewirkt (Nishio *et al.*, 2006).

Bei CCD-Patient 2 fiel zudem auch die verminderte Induzierbarkeit der *Osteokalzin* mRNA Expression durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf. RUNX2 spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des *Osteokalzin*-Promotors durch Vitamin D₃. Die Bindung von RUNX2 an den *Osteokalzin*-Promotor ist Voraussetzung für Veränderungen in der Chromatin-Struktur, die wiederum für die Aktivierung durch Vitamin D₃ die Voraussetzung darstellt. Daher hemmen

Mutationen von RUNX2 die Wirkung von Vitamin D₃ (Paredes *et al.*, 2004), was unseren eigenen Daten erklärt.

Die PDL-Zellen der CCD-Patienten zeigten gegenüber der Kontrollgruppe von gesunden Spendern eine vergleichbare mRNA Expression von *Osteoprotegerin* und ebenso einen hemmenden Effekt von 1,25(OH)₂D₃. Im Gegensatz dazu war die basale Expression von *RANKL* mRNA insbesondere bei CCD-Patient 2 erniedrigt und auch nur eingeschränkt durch 1,25(OH)₂D₃-Stimulation induzierbar. Folglich war das Verhältnis von OPG zu *RANKL* bei den Kulturen der CCD-Patienten erhöht. Da dieses Verhältnis letztlich darüber entscheidet, ob *in vivo* eher die Knochenformation oder -resorption begünstigt wird, sind diese Befunde im Sinne einer Hemmung der Knochenresorption zu interpretieren. Obwohl man nicht zwangsläufig von unseren auf Transkriptionsebene erhobenen Daten auch auf entsprechende Änderungen der Proteinexpression schließen kann, zeigten doch bereits verschiedene Autoren eine sehr gute Korrelation der Proteinlevel mit der Menge an mRNA von *OPG* und *RANKL* (Deyama *et al.*, 2000; Hofbauer, 1999a; Hofbauer *et al.*, 1999b). Unsere Ergebnisse sind zudem in Übereinstimmung mit dem Bericht von Zhang D *et al.* (2004), demzufolge PDL-Zellen unter physiologischen Bedingungen mehr *OPG* als *RANKL* mRNA exprimieren, wohingegen sich dieses Verhältnis nach Stimulation mit 1,25(OH)₂D₃ umkehrt und entsprechend in der Kokultur zu einer verstärkten Differenzierung von TRAP-positiven Osteoklasten führt.

Zahlreiche Hinweise deuten auf eine Beteiligung von RUNX2 im Rahmen der Differenzierung und Aktivität nicht nur der Osteoblasten, sondern auch der Osteoklasten über eine Regulierung des RANK/RANKL/OPG Signalweges. So wurde eine Bindungsstelle für RUNX2 auf dem Promotor des *RANKL*-Gens (Kitazawa *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2002) und des *OPG*-Gens (Thirunavukkarasu *et al.*, 2000) der Maus nachgewiesen. Weiterhin bewirkte die adenovirale Transfektion von RUNX2 in RUNX2-defiziente Calvaria-Osteoblasten eine verstärkte Expression von *RANKL* sowie eine Reduktion der *OPG*-Expression und eine Überexpression von *RANKL* in homozygoten *RUNX2* knock out-

Mäusen hatte eine Zunahme von Anzahl und Größe der Osteoklasten zur Folge (Enomoto *et al.*, 2003). In einem Zellkulturmodell, in dem Osteoblasten der Calvaria und Zellen der Milz kokultiviert und mit Dexamethason und $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelt wurden, induzierten Osteoblasten, die von homozygoten RUNX2 knock out-Mäusen gewonnen wurden, in signifikant geringerem Umfang die Differenzierung von aktiven Osteoklasten (Gao *et al.*, 1998). Dabei wurde vor allem auch eine reduzierte Vitamin D_3 -induzierte Expression von RANKL bei den knock out-Tieren nachgewiesen. Auch Xiao *et al.* (2005) zeigten, dass bei RUNX2 \pm Mäusen eine reduzierte Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten verbunden mit einer reduzierten Nachweisbarkeit von RANKL vorlag. Da also sowohl RUNX2 als auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an der Regulation verschiedener Gene, die für die Differenzierung und Aktivität von sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten von Bedeutung sind (darunter Osteokalzin, OPG und RANKL), beteiligt sind, erscheinen Wechselwirkungen der Signale von Vitamin D_3 und RUNX2 im Bereich der Promotoren der jeweiligen Zielgene für die definitive Wirkung entscheidend zu sein. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass z.B. im Osteokalzinpromotor das Vitamin D Rezeptor-Element von zwei Runx2-Bindungsstellen flankiert ist und auch der RANKL-Promotor sowohl Vitamin D Rezeptor- als auch RUNX2-Bindungsstellen enthält.

In Experimenten an heterozygoten RUNX2 knock-out Mäusen fanden Zou *et al.* (2003) im Vergleich mit Wildtyp-Tieren keinen auffälligen Unterschied bezüglich der Eruption der Dentition und schlossen daraus, dass hier offensichtlich ein gesundes Allel für einen ordnungsgemäßen Zahndurchbruch ausreichend sei. Yoda *et al.* (2004) dagegen fanden in ihren Untersuchungen zwar keine Unterschiede bezüglich der Entwicklung der Zähne, aber eine signifikante Verzögerung in der Eruption. Dies führten die Autoren auf einen Mangel an nachweisbaren am Zahndurchbruch beteiligten Osteoklasten zurück. Die physiologische Relevanz dieser Überlegungen wird durch unsere weiterführenden Experimente belegt, in denen sowohl das konditionierte Medium von Kulturen der PDL-Zellen der CCD-Patienten zu einer reduzierten Differenzierung von TRAP-positiven multinukleären Zellen führte als auch die Daten der Kokulturrexperimente eine Hemmung der Expression

von typischen Osteoklastenmarkern aufzeigen, wenn PDL-Zellen der CCD-Patienten mit RAW-Zellen kokultiviert und mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimuliert wurden. Dies galt insbesondere für die Zellen des von uns untersuchten CCD-Patienten 2.

Zusammen mit den Daten für die Differenzierungsparameter implizieren diese Befunde einen geringer gradig ausgeprägten osteoblastären Phänotyp der PDL-Zellen bei den von uns untersuchten CCD-Patienten mit einer resultierenden eingeschränkten Fähigkeit zur Unterstützung der Osteoklastogenese, die letztlich für den klinisch zu beobachteten erschweren Zahndurchbruch mitverantwortlich sein könnte.

5. Zusammenfassung

Das klinische Bild der Cleidocranialen Dysplasie (CCD), das durch Mutationen im Bereich des Transkriptionsfaktors RUNX2 verursacht wird, ist durch Schlüsselbeinanomalien, Störungen der Schädel- bzw. Zahnentwicklung sowie Veränderungen im Bereich von Thorax, Wirbelsäule, Becken und Extremitäten geprägt. Besonders auffällig und von kieferorthopädischer Relevanz sind multiple überzählige Zähne sowie ein verzögerter Zahndurchbruch. Der vorliegenden Untersuchung liegt die Hypothese zu Grunde, dass eine veränderte phänotypische Expression der Zellen der Parodontalligaments (PDL) von CCD-Patienten und daraus resultierend eine eingeschränkte Fähigkeit zur Unterstützung der Aktivität von knochenresorbierenden Osteoklasten für diesen erschwerten Zahndurchbruch mitverantwortlich sein könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden PDL-Zellen von gesunden Spendern und solchen mit klinisch und molekularbiologisch diagnostizierter CCD vergleichend bezüglich des Auftretens und der Induzierbarkeit osteoblastärer Markergene auf mRNA Ebene charakterisiert und die physiologische Relevanz dieser Befunde für die Differenzierung von Osteoklasten aus entsprechenden Vorläuferzellen in einem Osteoklastenassay sowie in einem Kokulturmodell näher untersucht.

Dabei konnte zunächst bei beiden CCD-Patienten eine Missense-Mutation im Bereich des *RUNX2*-Gens nachgewiesen werden. In den *in vitro*-Versuchen zeigte sich für die-PDL Zellen eine unveränderte Expression von *RUNX2* mRNA, jedoch insbesondere bei CCD-Patient 2 eine reduzierte basale Expression der gewählten Markergene *Osterix*, *alkalische Phosphatase*, *Osteokalzin* sowie der mRNA für das Osteoklasten-regulatorische Molekül *RANKL*. Außerdem ließen sich diese Faktoren im Vergleich zur Kontrollgruppe der gesunden Donoren nur vermindert durch Stimulation der Kulturen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzieren. In den durchgeführten Osteoklastenassays sowie in den Kokulturversuchen zeigten die PDL-Zellen der CCD-Patienten eine verringerte Potenz zur Induktion von aktiven Osteoklasten.

Die erhobenen Daten implizieren einen geringer gradig ausgeprägten osteoblastären Phänotyp der PDL-Zellen bei den untersuchten CCD-Patienten mit einer resultierenden eingeschränkten Fähigkeit zur Unterstützung der Osteoklastogenese, die letztlich für den klinisch zu beobachteten erschwerten Zahndurchbruch mitverantwortlich sein könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod* 1997;19:615-621.
2. Baumert U, Golan I, Driemel O, Reichert TE, Reicheneder C, Muessig D, Rose E. [Cleidocranial dysplasia. Description and analysis of a patient cohort]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2006;10:385-393.
3. Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza RN. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 2001;101:255-258.
4. Camilleri S, McDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 2006;114:361-373.
5. Chen S, Santos L, Wu Y, Vuong R, Gay I, Schulze J, Chuang HH, MacDougall M. Altered gene expression in human cleidocranial dysplasia dental pulp cells. *Arch Oral Biol* 2005;50:227-236.
6. Chitayat D, Hodgkinson KA, Azouz EM. Intrafamilial variability in cleidocranial dysplasia: a three generation family. *Am J Med Genet* 1992;42:298-303.
7. Chou AM, Sae-Lim V, Lim T, Schantz JT, Teoh SH, Chew CL, Hutmacher DW. Culturing and characterization of human periodontal ligament fibroblasts-a preliminary study. *Materials Science and Engineering* 2002;20:77-83.
8. Cooper SC, Flaitz CM, Johnston DA, Lee B, Hecht JT. A natural history of cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 2001;104:1-6.
9. Deyama Y, Takeyama S, Koshikawa M, Shirai Y, Yoshimura Y, Nishikata M, Suzuki K, Matsumoto A. Osteoblast maturation suppressed osteoclastogenesis in coculture with bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:249-254.
10. Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res* 2002;274:323-333.

11. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999;13:1025-1036.
12. Enomoto H, Shiojiri S, Hoshi K, Furuichi T, Fukuyama R, Yoshida CA, Kanatani N, Nakamura R, Mizuno A, Zanma A, Yano K, Yasuda H, Higashio K, Takada K, Komori T. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. *J Biol Chem* 2003;278:23971-23977.
13. Feldman GJ, Robin NH, Brueton LA, Robertson E, Thompson EM, Siegel-Bartelt J, Gasser DL, Bailey LC, Zackai EH, Muenke M. A gene for cleidocranial dysplasia maps to the short arm of chromosome 6. *Am J Hum Genet* 1995;56:938-943.
14. Gao YH, Shinki T, Yuasa T, Kataoka-Enomoto H, Komori T, Suda T, Yamaguchi A. Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:697-702.
15. Gelb BD, Cooper E, Shevell M, Desnick RJ. Genetic mapping of the cleidocranial dysplasia (CCD) locus on chromosome band 6p21 to include a microdeletion. *Am J Med Genet* 1995;58:200-205.
16. Giannotti A, Tessa A, Patrono C, Florio LD, Velardo M, Dionisi-Vici C, Bertini E, Santorelli FM. A novel CBFA1 mutation (R190W) in an Italian family with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 2000;16:277.
17. Golan I, Baumert U, Hrala BP, Müssig D. Early craniofacial signs of cleidocranial dysplasia. *Int J Paediatr Dent* 2004;14:49-53.
18. Gundlach KK, Buurman R. Cleidocranial dysplasia--histological findings in the dental cementum. *Dtsch Zahnarztl Z* 1978;33:574-578.
19. Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A, Oguchi H, Shirakawa T. Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and os-

- teoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2002;37:405-411.
20. Heinrich J, Bsoul S, Barnes J, Woodruff K, Abboud S. CSF-1, RANKL and OPG regulate osteoclastogenesis during murine tooth eruption. *Arch Oral Biol* 2005;50:897-908.
 21. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999;141:195-210.
 22. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-4389.
 23. Jensen BL, Kreiborg S. Development of the dentition in cleidocranial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 1990;19:89-93.
 24. Jensen BL. Cleidocranial dysplasia: craniofacial morphology in adult patients. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1994;14:163-176.
 25. Jiang H, Sodek J, Karsenty G, Thomas H, Ranly D, Chen J. Expression of core binding factor *Osf2/Cbfa-1* and bone sialoprotein in tooth development. *Mech Dev* 1999;81:169-173.
 26. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001;80:887-891.
 27. Kargul B, Salih IM, Yilmaz L, Dumlu A. Cleidocranial dysostosis: report of a case. *J Clin Pediatr Dent* 1997;22:83-86.
 28. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999;25:525-534.

29. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R. Vitamin D3 supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J Cell Biochem* 2003;89:771-777.
30. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755-764.
31. Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G. Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 1997;16:307-310.
32. Li Z, Yan J, Matheny CJ, Corpora T, Bravo J, Warren AJ, Bushweller JH, Speck NA. Energetic contribution of residues in the Runx1 Runt domain to DNA binding. *J Biol Chem* 2003;278:33088-33096.
33. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:1-41.
34. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res* 2005;84:634-638.
35. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Parathyroid hormone modifies human periodontal ligament cell proliferation and survival in vitro. *J Periodontal Res* 2006;41:519-526.
36. Lossdorfer S, Gotz W, Rath-Deschner B, Jäger A. Parathyroid hormone(1-34) mediates proliferative and apoptotic signaling in human periodontal ligament cells in vitro via protein kinase C-dependent and protein kinase A-dependent pathways. *Cell Tissue Res* 2006;325:469-479.
37. Lossdorfer S, Stier S, Gotz W, Jäger A. Maturation-state dependent response of human periodontal ligament cells to an intermittent parathyroid hormone exposure in vitro. *J Periodontal Res* 2006;41:62-72.

38. Lukinmaa PL, Jensen BL, Thesleff I, Andreasen JO, Kreiborg S. Histological observations of teeth and periodontal tissues in cleidocranial dysplasia imply increased activity of odontogenic epithelium and abnormal bone remodeling. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1995;15:212-221.
39. Matheny CJ, Speck ME, Cushing PR, Zhou Y, Corpora T, Regan M, Newman M, Roudaia L, Speck CL, Gu TL, Griffey SM, Bushweller JH, Speck NA. Disease mutations in RUNX1 and RUNX2 create nonfunctional, dominant-negative, or hypomorphic alleles. *EMBO J* 2007;26:1163-1175.
40. Mehta L, Verma IC. Cleidocranial dysplasia: underdiagnosed and misdiagnosed? *Indian J Pediatr* 1992;59:633-636.
41. Mundlos S, Mulliken JB, Abramson DL, Warman ML, Knoll JH, Olsen BR. Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum Mol Genet* 1995;4:71-75.
42. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997;89:773-779.
43. Mundlos S. Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Genet* 1999;36:177-182.
44. Nagata T, Gupta V, Sorce D, Kim WY, Sali A, Chait BT, Shigesada K, Ito Y, Werner MH. Immunoglobulin motif DNA recognition and heterodimerization of the PEBP2/CBF Runt domain. *Nat Struct Biol* 1999;6:615-619.
45. Nagata T, Werner MH. Functional mutagenesis of AML1/RUNX1 and PEBP2 beta/CBF beta define distinct, non-overlapping sites for DNA recognition and heterodimerization by the Runt domain. *J Mol Biol* 2001;308:191-203.
46. Napierala D, Garcia-Rojas X, Sam K, Wakui K, Chen C, Mendoza-Londono R, Zhou G, Zheng Q, Lee B. Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation. *Mol Genet Metab* 2005;86:257-268.

47. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* 2006;372:62-70.
48. O'Brien CA, Kern B, Gubrij I, Karsenty G, Manolagas SC. Cbfa1 does not regulate RANKL gene activity in stromal/osteoblastic cells. *Bone* 2002;30:453-462.
49. Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res* 2004;83:241-244.
50. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997;89:765-771.
51. Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Olate J, Zaidi K, van Wijnen A, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M. Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:8847-8861.
52. Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Vradii D, Bhat BM, Robinson JA, Choi JY, Komori T, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer Res* 2003;63:5357-5362.
53. Prince M, Banerjee C, Javed A, Green J, Lian JB, Stein GS, Bodine PV, Komm BS. Expression and regulation of Runx2/Cbfa1 and osteoblast phenotypic markers during the growth and differentiation of human osteoblasts. *J Cell Biochem* 2001;80:424-440.
54. Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, Lee PJ, Majewski F, Mulliken JB, Suri M, Zenker M, Mundlos S, Otto F.. Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 1999;65:1268-1278.
55. Shaikh R, Shusterman S. Delayed dental maturation in cleidocranial dysplasia. *ASDC J Dent Child* 1998;65:325-329, 55.
56. Smith NH. A histologic study of cementum in a case of cleidocranial dysostosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968;25:470-478.

57. Suzuki T, Suda N, Ohyama K. Osteoclastogenesis during mouse tooth germ development is mediated by receptor activator of NFKappa-B ligand (RANKL). *J Bone Miner Metab* 2004;22:185-191.
58. Tahirov TH, Inoue-Bungo T, Morii H, Fujikawa A, Sasaki M, Kimura K, Shiina M, Sato K, Kumasaka T, Yamamoto M, Ishii S, Ogata K. Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFbeta. *Cell* 2001;104:755-767.
59. Thirunavukkarasu K, Halladay DL, Miles RR, Yang X, Galvin RJ, Chandrasekhar S, Martin TJ, Onyia JE. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem* 2000;275:25163-172.
60. Tu Q, Zhang J, Paz J, Wade K, Yang P, Chen J. Haploinsufficiency of Runx2 results in bone formation decrease and different BSP expression pattern changes in two transgenic mouse models. *J Cell Physiol* 2008;217:40-47.
61. Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hufner M. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002;86:348-356.
62. Warren AJ, Bravo J, Williams RL, Rabbitts TH. Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated transcription factors AML1 and CBFbeta. *EMBO J* 2000;19:3004-3015.
63. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:323-334.
64. Xiao Z, Awad HA, Liu S, Mahlios J, Zhang S, Guilak F, Mayo MS, Quarles LD. Selective Runx2-II deficiency leads to low-turnover osteopenia in adult mice. *Dev Biol* 2005;283:345-356.
65. Yamamoto H, Sakae T, Davies JE. Cleidocranial dysplasia: a light microscope, electron microscope, and crystallographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68:195-200.

66. Yoda S, Suda N, Kitahara Y, Komori T, Ohyama K. Delayed tooth eruption and suppressed osteoclast number in the eruption pathway of heterozygous Runx2/Cbfa1 knockout mice. *Arch Oral Biol* 2004;49:435-442.
67. Yoshida T, Kanegane H, Osato M, Yanagida M, Miyawaki T, Ito Y, Shigesada K. Functional analysis of RUNX2 mutations in Japanese patients with cleidocranial dysplasia demonstrates novel genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 2002;71:724-738.
68. Zhang D, Yang YQ, Li XT, Fu MK. The expression of osteoprotegerin and the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in human periodontal ligament cells cultured with and without 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Arch Oral Biol* 2004;49:71-76.
69. Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai J, Nogami H, Ochi T, Miyazono K, Ito Y. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10549-10554.
70. Zhou G, Chen Y, Zhou L, Thirunavukkarasu K, Hecht J, Chitayat D, Gelb BD, Pirinen S, Berry SA, Greenberg CR, Karsenty G, Lee B. CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. *Hum Mol Genet* 1999;8:2311-2316.
71. Zou SJ, D'Souza RN, Ahlberg T, Bronckers AL. Tooth eruption and cementum formation in the Runx2/Cbfa1 heterozygous mouse. *Arch Oral Biol* 2003;48:673-677.
72. zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003;71:18-27.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. dent. A. Jäger, Direktor der Poliklinik für Kieferorthopädie, Geschäftsführender Direktor des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der medizinischen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Bereitstellung des Themas, für die ständige wissenschaftliche Unterstützung und für die Nutzung der Laboratorien und die Korrekturvorschläge in meiner Arbeit,

Herrn PD Dr. med. dent. S. Lossdörfer, Oberarzt der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der medizinischen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, gilt mein Dank für die Erklärungen, die Unterstützung und die Bereitstellung der wissenschaftlichen Materialien und die Korrekturvorschläge in meiner Arbeit,

Herrn PD Dr. med. R. Abou Jamra, Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik der medizinischen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die wissenschaftlichen, bereichernd wirkenden Diskussionen,

Frau K. Reifenrath, medizinisch-technische Assistentin der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der medizinischen Fakultät der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, gilt mein Dank für die technische Assistenz,

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, KFO 208, LO-1181/2-1) für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen und Preise

Publikation

Lossdörfer Stefan; Abou Jamra Bassel; Rath-Deschner Birgit; Götz Werner; Abou Jamra Rami; Braumann Bert; Jäger Andreas

The role of periodontal ligament cells in delayed tooth eruption in patients with cleidocranial dysostosis. Journal of Orofacial Orthopedics 2009; 70: 495-510.

Preis

Stefan Lossdörfer; Bassel Abou Jamra; Birgit Rath-Deschner; Werner Götz; Rami Abou Jamra; Bert Braumann; Andreas Jäger

Rolle der Parodontalligamentzellen im Rahmen des gestörten Zahndurchbruchs bei Patienten mit Cleidocranialer Dysplasie

Arnold-Biber-Preis 2009 der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie (DGKFO)