

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors CBFA1
im Rahmen der Unterkieferentwicklung
bei der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Franziska Kroll
aus Werne

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. *Gutachter:* Prof. Dr. A. Jäger
2. *Gutachter:* Prof. Dr. J. Deschner

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.02.2010

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

Direktor: Prof. Dr. A. Jäger

Meinen Eltern,
Frau Gabriele Kroll und
Herrn Manfred Kroll

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Transkriptionsfaktor CBFA1	8
1.2 <i>Cbfa1</i> insuffiziente Mäuse	12
1.3 Unterkieferentwicklung des Menschen	15
1.4 Cleidocraniale Dysplasie	17
1.5 Bisherige Studien	20
1.6 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methode	22
2.1 Material	22
2.1.1 Untersuchte Mäuse	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Geräte	23
2.1.4 Chemikalien	23
2.2 Methode	24
2.2.1 Bestimmung der Mäuse mittels PCR	24
2.2.2 Präparation	29
2.2.3 Röntgen	30
2.2.4 Auswertung	31
3 Ergebnisse	36
3.1 Mandibula Strecken	36
3.2 Mandibula Flächen	41
3.3 Mandibula Winkel	42
3.4 Tibia Strecken	45
4 Diskussion	47
4.1 Einordnung in den Kontext	47
4.2 Analyse der Ergebnisse	49

4.2.1	Mandibula Strecken	49
4.2.2	Mandibula Winkel	52
4.2.3	Tibia Strecken	54
4.3	Fazit	55
5	Zusammenfassung	56
6	Anhang	57
6.1	Übersicht über die Versuchstiere	57
6.2	Ergebnisse der Polymerasenkettenreaktion	58
	Abbildungsverzeichnis	59
	Tabellenverzeichnis	61
	Literaturverzeichnis	62
	Danksagung	67
	Lebenslauf	68

Abkürzungsverzeichnis

AML3	Acute Myeloid Leukemia 3
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
CBFA1	Core Binding Factor Alpha 1
CCD	Cleidocraniale Dysplasie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
NEO5	Neomycin Phosphotransferase Gen 5
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEBP2 α A	Polyoma Enhancer-Binding Proteine 2 α A
RFU	Relative Fluorescence Units
RUNX2	Runt related transcription factor 2

1 Einleitung

1.1 Transkriptionsfaktor CBFA1

Ziel dieser Doktorarbeit ist die Klärung der Rolle des Transkriptionsfaktors CBFA1 (core binding factor alpha 1) – aktuell als RUNX2 (runt related transcription factor 2) bezeichnet – in Bezug auf die Wachstumsentwicklung von Mandibula und Tibia bei Mäusen. Ein Gendefekt des *CBFA1* Gens verursacht sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen die gleichen Symptome: Eine Cleidocraniale Dysplasie (CCD). Folglich erlaubt eine Analyse von Mandibula und Tibia bei mutierten Mäusen Schlussfolgerungen auf den Menschen zu ziehen. Bis dato ist nicht bekannt, warum bei der Cleidocranialen Dysplasie das Wachstum der Maxilla defizient ist, die Mandibula sich jedoch scheinbar normal entwickelt.

Der Transkriptionsfaktor CBFA1 – auch als RUNX2, AML3 oder PEBP2 α A bekannt – beeinflusst die Osteoblastenreifung und die Chondrozytenhypertrophie. In dieser Doktorarbeit wird zur Vereinheitlichung mit dem Ausdruck CBFA1 gearbeitet. Die Rolle des CBFA1 konnte neben der desmalen Ossifikation auch im Rahmen des chondralen Wachstums aufgezeigt werden (Ducy et al., 1997; Kim et al., 1999; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Er wurde in den 90er Jahren auf der Suche nach osteoblastenspezifischen Transkriptionsfaktoren entdeckt und gilt heute als einer der zentralen Steuerungsfaktoren in der Chondro- und Osteogenese sowie in der Zahnentwicklung. Es ist bekannt, dass die Wirkung von CBFA1 auf Fibroblasten- und Myoblastenzellkulturen zu einer Expression von knochenzelltypischen Genprodukten wie Osteocalcin, Osteopontin und dem Knochensialoprotein (BSP) führt (Ducy et al., 1997). Betroffene Patienten mit einer Mutation des Gens weisen ein verlangsamtes Körperwachstum und eine verspätet einsetzende skelettale Entwicklung, entsprechend einer Cleidocranialen Dysplasie, auf (Jensen, 1994). Speziell im Bereich des mandibulären Condylus wurde bei der Ratte die Expression von *Cbfa1* während des Wachstums nachgewiesen (Rabie et al., 2004), was für den Einfluss auch auf das chondrale Wachstum in diesem Bereich spricht.

Der Transkriptionsfaktor CBFA1 gehört zur Familie der CBF (core binding factor) Transkriptionsfaktoren. Darunter fallen heterodimere Proteine, die aus zwei separaten Untereinheiten bestehen: Die α Untereinheit bindet die DNS, die β Untereinheit bindet sie nicht. Die CBF α Untereinheiten werden von drei verschiedenen Genen kodiert: Den Genen *Cbfa1*, *Cbfa2* und *Cbfa3*. Die CBF β Untereinheit wird vom *Cbfb* Gen kodiert. Die Zerstörung der *Cbfa2* und *Cbfb* Gene resultiert in einem letalen Phänotyp. Die Mäuse sterben in Folge von Blutungen innerhalb des zentralen Nervensystems. Zudem weisen die Embryonen keine Hämatopoese in der Leber auf (Otto et al., 1997).

Das *CBFA1* Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 6 (6p21) (siehe Abbildung 1), bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert. Allen *CBFA1* Genen gemeinsam ist die Existenz einer so genannten hochkonservierten – also evolutionsbiologisch alten – Region, der “Runt Domäne”, welche für die Bindung an DNS verantwortlich ist (Otto et al., 1997). Diese DNS Bindung ist Voraussetzung für die Transkriptionsaktivitäten von CBFA1. CBFA1 Proteine beeinflussen über ihre Bindung an Promoterregionen bestimmte Zielgene und regulieren somit deren Expression. Zu den bekannten Zielgenen gehören osteoblastenspezifische Gene, wie die des Kollagen Typs I, des Osteocalcins oder des Osteopontins, aber auch des Ameloblastins, welches bei der Zahnentwicklung von großer Bedeutung ist. Relativ wenig bekannt ist, wie *CBFA1* selbst von anderen Genen beeinflusst wird. Nachgewiesen sind aktivierende Einflüsse, vor allem durch Wachstumsfaktoren wie die Transforming Growth Factors oder die Fibroblast Growth Factors. Zudem existieren negative Regulatoren, wie beispielsweise Vitamin D oder Glucocorticoide. Es wird ferner angenommen, dass verschiedene Regulationen auf Proteinebene stattfinden (Franceschi und Xiao, 2003).

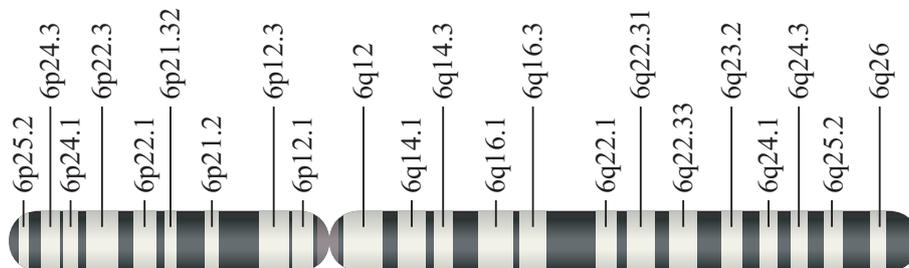


Abbildung 1: Ideogramm des menschlichen Chromosoms 6 (Genetics Home Reference (2009)).

Im Mausmodell zeigt das *Cbfa1* ein Expressionsmaximum während der pränatalen Skelettentwicklung bis zum 14. Tag postnatal. Anschließend sinkt das Expressionslevel ab, wobei es jedoch weiterhin an der Regulation der postnatalen Differenzierungsvorgänge der Osteoblasten beteiligt ist. Um die postnatale Expression und Wirkungsweise von *Cbfa1* auf die Knochenformation zu untersuchen wurden transgene Mäuse erzeugt, die erst postnatal eine künstlich veränderte *Cbfa1* DNS Bindungsdomäne aufweisen. Diese Mäuse zeigen bei ihrer Geburt ein normal entwickeltes Skelett, im weiteren Wachstum weisen sie jedoch einen osteopenischen Phänotyp auf (Ducy et al., 1997). Die *Cbfa1* Expression kann bei Wildtyp Mäusen mittels in situ Hybridisierung in allen Verknöcherungszentren in den mesenchymalen Zellen und in späteren Entwicklungsstadien auch in den Osteoblasten nachgewiesen werden (Komori et al., 1997). Die Wirkung von CBFA1 auf die Osteoblastendifferenzierung während der prä- und postnatalen Entwicklung anhand humaner Zellkulturen ist inzwischen zumindest teilweise geklärt.

CBFA1 nimmt pränatal Einfluss auf die Differenzierungsvorgänge von Mesenchymzellen zu reifen Osteoblasten. Postnatal beeinflusst CBFA1 bei differenzierten Osteoblasten die Knochenformationsrate, indem es die Aktivität der Gene steuert, welche die Auf- und Abbauprozesse der extrazellulären Knochenmatrix regulieren. CBFA1 wirkt ebenfalls im Rahmen der chondralen Wachstumsvorgänge auf die Hypertrophie der Chondrozyten (Kim et al., 1999). Diese Wirkungsansätze des Transkriptionsfaktors CBFA1 veranschaulicht die schematische Darstellung in Abbildung 2 auf der folgenden Seite. Bisher wurden drei Isoformtypen des CBFA1 beschrieben: Typ I (PEBP2 α A Isoform), Typ II (TIL-1 Isoform) und Typ III (OSF2 Isoform), die für die unterschiedlichen Ausprägungsgrade der CCD verantwortlich gemacht werden (Sudhakar et al., 2001).

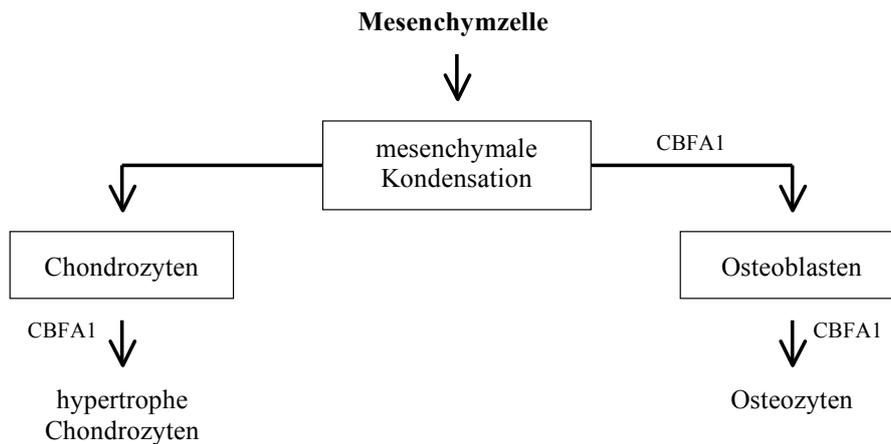


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkungsansätze des Transkriptionsfaktors CBFA1 bei der Knochenentwicklung des Menschen.

In vitro konnte gezeigt werden, dass nach Beeinflussung durch BMP7 (bone morphogenetic protein 7) Myoblasten, die normalerweise keine *CBFA1* Expression zeigen, *CBFA1* abhängige Markergene exprimieren. Dies lässt vermuten, dass CBFA1 ein Bindeglied der BMP Signalkaskade darstellt. Pluripotente C3H10T1/2 Fibroblasten, die nicht Bestandteil der Osteoblastenreifungskaskade sind, zeigen unter der Einwirkung von *CBFA1* cDNS eine Expression von Osteocalcin und des Knochensialoproteins (BSP) (Katagiri et al., 1990; Lee et al., 1999). Diese Experimente weisen nach, dass CBFA1 die Osteoblastendifferenzierung aus Stammzellen induziert.

CBFA1 ist zu den morphogenetischen Faktoren und Wachstumsfaktoren zu rechnen, die Einfluss auf die Entwicklung und das postnatale Wachstum des Condylenknorpels haben. Dieser nimmt unter den Gelenkknorpeln aufgrund entwicklungsgeschichtlicher, struktureller und funktioneller Besonderheiten – beispielsweise im Rahmen der sekundären Bildung, der bindegewebigen Bedeckung, der persistierenden proliferierenden Chondrozyten sowie der Funktion als “Wachstumszentrum” – eine Sonderstellung ein (Ten Cate und Nanci, 2003). Zur Klärung der Rolle des CBFA1 bei der prä- und postnatalen Entwicklung des Gesichtsschädels und insbesondere des Kiefergelenks besteht weiterer Forschungsbedarf.

1.2 *Cbfa1* insuffiziente Mäuse

Im Mausmodell konnte bereits sehr früh eine künstliche Cleidocraniale Dysplasie induziert werden: Dies gelang als erstes durch Röntgenstrahlen, die bei Mäusen eine CCD in Folge einer Genmutation verursachten (Sillence et al., 1987). Die Wirkungsweise des Transkriptionsfaktors CBFA1 auf die Knochenentwicklung lässt sich heutzutage in Knockout Mäusemodellen erforschen. In diesen Modellen wird das *Cbfa1* Gen durch experimentell induzierte Genveränderung expressionsunfähig. Anhand der *Cbfa1* Knockout Maus – bei der das *Cbfa1* Gen mutiert vorliegt – kann die Wirkungsweise des CBFA1 Transkriptionsfaktors bei der Skelettentwicklung erforscht werden (Otto et al., 1997). Homozygote *Cbfa1* ($-/-$) Mäuse versterben unmittelbar nach der Geburt. Die heterozygoten *Cbfa1* ($+/-$) Tiere sind lebensfähig und zeigen die typischen Symptome einer CCD (Otto et al., 1997).

Homozygote *Cbfa1* ($-/-$) Mäuse

Homozygote *Cbfa1* ($-/-$) Knockout Mäuse weisen eine komplett fehlende desmale und chondrale Ossifikation auf (siehe Abbildung 3 auf der folgenden Seite). Die desmale Ossifikation erscheint besonders anfällig, da auch die heterozygoten *Cbfa1* ($+/-$) Mäuse spezifische Defekte bei der Gestaltung der Clavicula und der Schließung der cranialen Fontanelle zeigen. Die Osteoblastendifferenzierung aus dem Mesenchym ist fehlerhaft: Es findet keine desmale Ossifikation statt (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten sind die wichtigsten Zelltypen, die bei der Skelettbildung mitwirken. Histologische Untersuchungen von homozygoten *Cbfa1* ($-/-$) Mäusen zeigen ein Ausbleiben der Osteoblastendifferenzierung und eine fehlende Vaskularisation des Knochenmarks. Trotz der fehlenden Ossifikation bildet sie ein, von der Mutation unbeeinflusstes, knorpeliges Grundskelett. Die homozygoten *Cbfa1* ($-/-$) Knockout Mäuse sind kleiner und leichter als andere Mäuse aus demselben Wurf. Die homozygoten ($-/-$) Knockout Mäuse sterben bei der Geburt an einer Ateminsuffizienz, obwohl die bronchioalveoläre Entwicklung normal ist (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

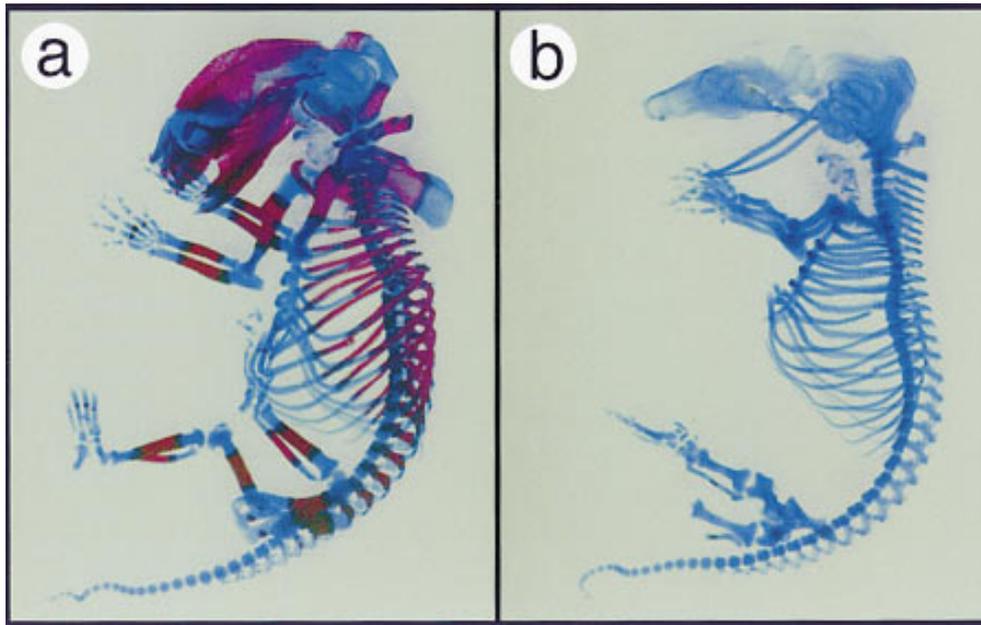
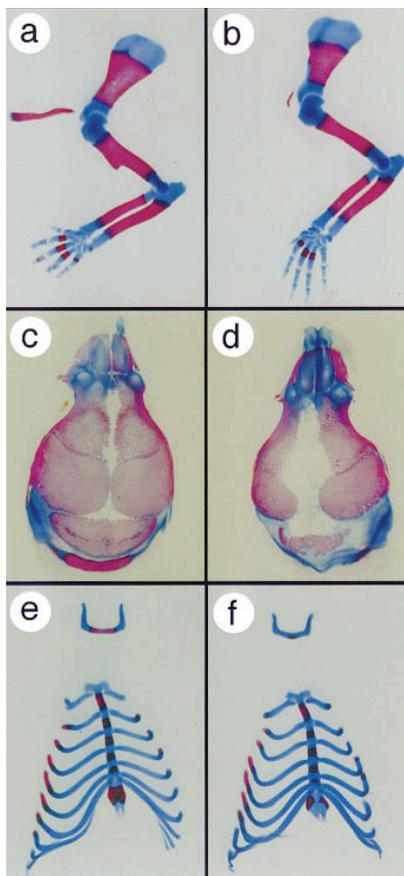


Abbildung 3: Gegenüberstellung der Ossifikation des Skeletts von (a) Wildtyp Mäusen und (b) mutierten *Cbfa1* (-/-) Mäusen (Otto et al., 1997). Tag 17,5 post coitum: (a) Wildtyp und (b) homozygote Mutante wurden mit Alcian blau/ Alizarin rot gefärbt. Desmale und chondrale Ossifikation fehlt bei mutierten *Cbfa1* (-/-) Mäusen. Konchen rot angefärbt, Knorpel blau.

Heterozygote *Cbfa1* (+/-) Mäuse

Heterozygote *Cbfa1* (+/-) Mäuse zeigen für die Cleidocraniale Dysplasie spezifische Knochendefekte. Analysen des Skeletts lassen Abnormalitäten erkennen. Die Hypoplasie der Clavicula und die verzögerte Entwicklung von Knochen der desmalen Ossifikation gehören zu den signifikantesten Defekten. Bei neugeborenen heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen ist die Clavicula im Vergleich zu den Wildtyp (+/+) Mäusen desselben Wurfs kaum sichtbar. Auch zeigen die heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäuse eine verspätete Ossifikation der Schädelknochen, was zu einer offenen vorderen und hinteren Fontanelle, sowie weiten cranialen Suturen führt. Andere nennenswerte skelettale Defekte sind die Hypoplasie des Zungenbeins und ein weiter Processus Xyphoideus. Os Pubis und Os Ischia sind separiert und hypoplastisch. Die Anlage der Zähne erfolgt verzögert aber strukturell normal. Abbildung 4 auf der folgenden Seite zeigt eine Gegenüberstellung der Ossifikation bei Wildtyp Mäusen und mutierten *Cbfa1* (+/-) Mäusen (Otto et al., 1997).

Die CCD Maus ist eine durch Strahlung induzierte Mutante mit einem Phänotyp, der den menschlichen CCD Patienten sehr ähnelt. Die heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Knockout Mäuse sind zwar nicht kleiner als Wildtyp Mäuse desselben Wurfs, sie spiegeln jedoch sonst alle Symptome der Cleidocranialen Dysplasie wieder. Weil der Phänotyp der heterozygoten CCD Mäuse so gut wie nicht zu unterscheiden ist von den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen, wurde untersucht ob das *Cbfa1* Gen in CCD Mäusen mutiert vorliegt. Es wurde gezeigt, dass das *Cbfa1* Gen innerhalb des Segmentes liegt, welches bei der CCD Maus gelöscht wurde. Dies spricht für die Vermutung, dass das *CBFA1* Gen auch bei der menschlichen CCD mutiert vorliegt (Otto et al., 1997).



a) und b): *Clavicula, Scapula und vordere Extremität* bei *Cbfa1* +/+ (a) und +/- (b) Mäusen.

Auffällig ist die rudimentäre Clavicula und die fehlende Tuberositas Deltoidea bei den heterozygoten Mäusen.

c) und d): *Neurocranium* bei *Cbfa1* +/+ (c) und +/- (d) Mäusen.

Bei den heterozygoten Mäusen sind Suturen und Fontanellen erweitert. Die parietalen und interparietalen Knochen sind hypoplastisch.

e) und f): *Zungenbein und Sternum mit Rippen* bei *Cbfa1* +/+ (e) und +/- (f) Mäusen.

Bei den heterozygoten Mäusen ist das Hyoid hypoplastisch mit verzögerter Ossifikation. Ein weiter Processus Xiphoideus mit zwei separaten Ossifikationszentren.

Abbildung 4: Gegenüberstellung der Ossifikation von (a und b) Clavicula, Scapula und vorderer Extremität, (c und d) Neurocranium und (e und f) Zungenbein und Sternum mit Rippen bei Wildtyp Mäusen und mutierten *Cbfa1* (+/-) Mäusen (Otto et al., 1997).

1.3 Unterkieferentwicklung des Menschen

Der Unterkiefer stellt einen interessanten Teil des Gesichtsschädels dar. Zahlreiche Forschungsarbeiten bemühen sich daher, durch entwicklungsgeschichtliche, histologische und cephalometrische Untersuchungen nicht nur morphologische Zusammenhänge zu klären, sondern zudem Hinweise auf die vielfältigen Relationen der Form des Unterkiefers mit dem Aufbau des gesamten Gesichtsschädels zu gewinnen (Hausser, 1973).

Der Unterkiefer entwickelt sich aus dem ersten Kiemenbogen: Dem Mandibularbogen. Mit dem Einwachsen des Nervus Mandibularis in das Bindegewebe der späteren ersten Kiemenbogenregion startet die Mandibulaentwicklung. Innerhalb der Anlage der Mandibula entwickelt sich der Meckelknorpel als Knorpelspange. Der Meckelknorpel dient als Leitschiene für die Verknöcherung. Die Entwicklung der Mandibula beginnt als Kondensation von Mesenchym neben dem Meckelknorpel und schreitet voran als desmale Ossifikation (Proffit et al., 2006). Der Mandibulakörper unterliegt ausschließlich der desmalen Ossifikation. In den Condylen findet enchondrale Ossifikation statt (Lee et al., 2001).

Am posterior cranialen Rand der entstehenden Mandibula werden ab der siebten Woche der Processus Coronoideus und der Processus Condylaris in Ansätzen sichtbar. Beide Fortsätze werden prominenter, wobei der Processus Condylaris in der neunten Woche das Anlagegebiet der späteren Fossa Articularis erreicht, welche zu der Zeit auch schon in Ansätzen erkennbar ist. Der Meckelknorpel baut sich ab und wird durch Knochen ersetzt – er fungiert als Platzhalter. Bis zur 24. Woche wird sein Hauptanteil resorbiert. Überreste des Meckelknorpels können im Mittelohr als Bestandteil der Ossikel wiedergefunden werden. Sein Perichondrium persistiert als das sphenomandibuläre Ligament (Proffit et al., 2006).

Der Unterkiefer eines Neugeborenen zeichnet sich durch einen niedrigen, breiten Ramus aus – der Corpus ist muschelartig. Es sind ein großer Processus Coronoideus und ein unterentwickelter Condylus vorzufinden. Der Kieferwinkel ist groß, die Fossa flach und man findet eine mandibuläre Retrognathie.

Während der Entwicklung verändert sich die Mandibula von einer breiten V-Form über eine schmale V-Form zu einer mehr abgerundeten U-Form (Radlanski et al., 1994). Die Mandibula wird in sechs skelettale Einheiten unterteilt, jede mit einer eigenen funktionellen Matrix:

(1) Der Kieferwinkel (Musculus Masseter und Musculus Pterygoideus Medialis), (2) der Alveolarfortsatz (Mandibulardentition), (3) der Kieferbasis (Neurovaskuläres Bündel), (4) dem Processus Condylaris (Kiefergelenk und Musculus Pterygoideus Lateralis), (5) dem Processus Coronoideus (Musculus Temporalis) und (6) der Symphyse (Fazialer Muskel) (Moss und Rankow, 1968).

Die Mandibula unterliegt während des Wachstums einer Remodellierung, einem primären und sekundären Displacement sowie einem horizontalen Wachstum des Ramus Ascendens. Sie wird nach unten und vorne versetzt. Während dieses Vorgangs wächst sie nach oben und hinten. Die Mandibula wächst im Condylus und entlang der posterioren Oberfläche des Ramus. Zudem kommt es zur Resorption an der anterioren Fläche des Ramus (Proffit et al., 2006). Bei der Entwicklung der Mandibula nimmt der Kieferwinkel ab. Es kommt zu einer Längenzunahme bei gleichzeitig geringerer Breitenentwicklung, sowie einer Vergrößerung des Kiefergelenks. Der Corpus Mandibulae gewinnt an Höhe. Die Mandibula folgt, gemäß individueller Unterkieferrotation, dem anterioren oder posterioren Wachstumsmuster.

Der Condylus unterliegt chondraler Ossifikation. Zu seinen Besonderheiten zählt, dass er sekundär auf einer desmalen Knochenanlage entsteht. Er wächst appositionell unter einer Bindegewebsbedeckung. Undifferenzierte Bindegewebszellen differenzieren sich zu proliferierenden Chondrozyten. Rabie et al. (2004) haben im Bereich des mandibulären Condylus die Expression von *Cbfa1* während des Wachstums nachgewiesen. Dies lässt darauf schließen, dass der Transkriptionsfaktor CBFA1 das chondrale Wachstum in diesem Bereich beeinflusst.

1.4 Cleidocraniale Dysplasie

Die Cleidocraniale Dysplasie (Cleidocranial Dysplasia oder CCD) ist eine autosomal dominant vererbte Skelettdysplasie. Typisch sind vielfältige klinische und radiologische Symptome. Patienten mit dieser Erkrankung weisen, bei einem scheinbar normalem Unterkieferwachstum, eine gestörte Entwicklung des Oberkieferkomplexes auf (Ishii et al., 1998; Jensen, 1994). Bei der CCD ist eine generalisierte Skelettdysplasie anzunehmen. Patienten haben ein verzögertes Wachstum des Körpers und die skelettale Entwicklung setzt verspätet ein (Jensen, 1994). Signifikantestes Merkmal der Cleidocranialen Dysplasie ist eine Hypo- oder Aplasie der Claviculae mit einer dadurch verursachten Hypermobilität der Schultern, wie Abbildung 5 beispielhaft zeigt.

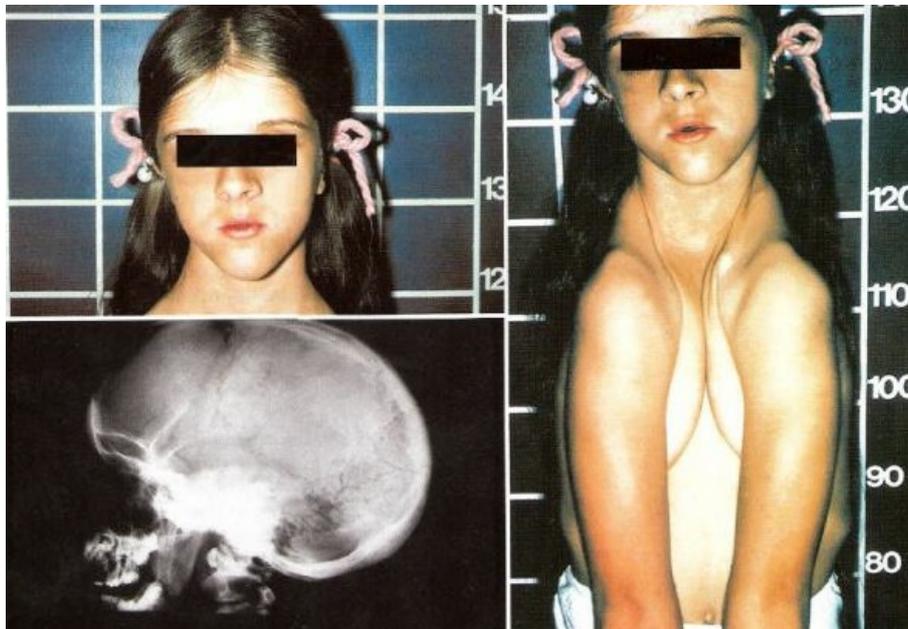


Abbildung 5: Mädchen mit Cleidocranialer Dysplasie: (*rechts*) Foto mit Hypermobilität der Schultern, (*links oben*) Foto mit Frontalaufnahme des Kopfes, (*links unten*) Röntgenbild des Schädels zeigt Hypoplasie des Mittelgesichts (Charité Berlin, 2007).

Bei der Entwicklung des Schädels sind zahlreiche Merkmale zu erkennen: Eine verspätete Ossifikation der Schädelknochen mit ebenfalls zeitlich verspätetem Verschluss der Schädel-suturen und der anterioren Fontanelle. Eine Hypo- oder Aplasie der Nasenknochen. Eine verkleinerte Ausbildung der frontalen- sowie sonstigen paranasalen Sinus. Hypertelorismus,

Makrocephalie, Brachycephalie, sowie eine generalisierte Unterentwicklung des maxillären Komplexes bei scheinbar normaler Entwicklung des Unterkiefers und eine daraus folgende relative Prognathie der Mandibula, sind weitere Ausprägungen. Es ist eine hohe Dunkelziffer an nicht diagnostizierten Fällen Cleidocranialer Dysplasie zu vermuten, da sich die allgemeinmedizinischen Symptome bei der CCD, im Gegensatz zu anderen skelettalen Dysplasien, weniger stark abzeichnen (Golan et al., 2004). Ein gehäuftes Auftreten von Zahnanomalien gehört ebenfalls zu den Symptomen der CCD (Bronckers et al., 2003; Ishii et al., 1998; Richardson und Deussen, 1994). Dazu zählen ein verspäteter Zahndurchbruch der ersten und zweiten Dentition, eine Hyperodontie mit bis zu 30 zusätzlichen Zahnanlagen, eine ausbleibende Exfoliation der Milchzähne, multiple Zahnretentionen und -ektopien, follikuläre Zysten, Ankylosen, sowie Malokklusionen (Mundlos, 1999).

Der verspätete Zahndurchbruch und die Hyperodontie werden weiterhin erforscht (Aberg et al., 2004; Bronckers et al., 2001, 2003; Zou et al., 2003). In Abbildung 6 ist eine Hyperodontie beispielhaft zu erkennen.

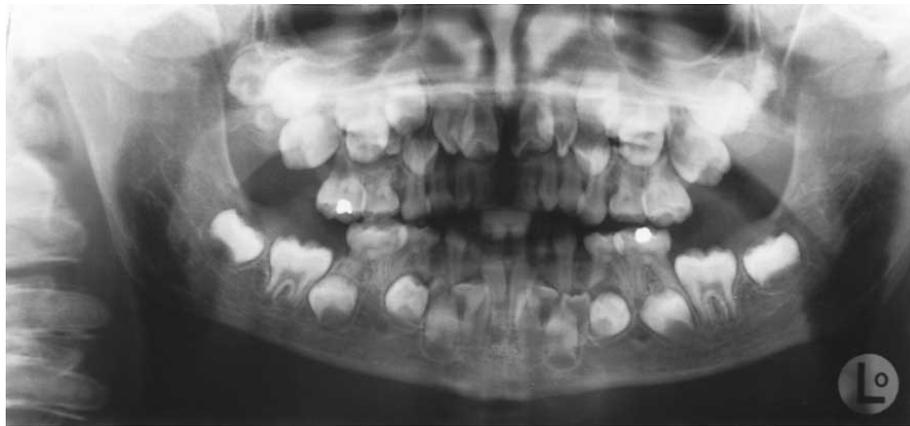


Abbildung 6: Röntgenbild mit Hyperodontie bei Cleidocranialer Dysplasie (Sándor et al., 2001).

Eine Entwicklungsstörung des zellulären Wurzelzements sowie eine verringerte Resorptionsaktivität an den Milchzahnwurzeln werden zu den Ursachen der Zahndurchbruchsstörungen gezählt. In der frühen Dentinogenese wird *CBFA1* sowohl von Odontoblasten, als auch von unreifen Ameloblasten exprimiert. Forschungen an homozygoten *Cbfa1* ($-/-$) Knockout Mäusen (D'Souza et al., 1999) zeigten den Zusammenhang von fehlender *Cbfa1* Expression und Zahnfehlbildungen auf. Weiterhin wird Gehörverlust zu den Symptomen gezählt. Auch Skoliose, Plattfuß, Sinusinfektionen, Atemprobleme und Mittelohrentzündungen werden einzeln beobachtet. Die Kaiserschnitttrate liegt deutlich über dem Durchschnitt (Cooper et al., 2001).

Es wurde bereits früh begonnen die verantwortliche Mutation zu lokalisieren. Dies ist dadurch begünstigt, dass eine Mutation familiär gehäuft auftritt. Sie wurde auf dem Chromosom 6p21 lokalisiert (Mundlos et al., 1995). Zuerst wurde eine Deletion im *CBFA1* Gen für die Entwicklung der CCD verantwortlich gemacht. Inzwischen sind verschiedene Mutationen bekannt, welche jedoch alle auf dem Chromosom 6 liegen. Patienten mit einer CCD weisen ein großes Maß an Variabilität in den Mutationen auf. Frameshift- und Missensmutationen gehören zu den am häufigsten notierten Mutationsformen (Quack et al., 1999).

1.5 Bisherige Studien

Die Details der cranoskelettalen Fehlentwicklungen, die typisch für die Cleidocraniale Dysplasie sind, sind bis dato wenig erforscht. Dabei besteht hohe kieferorthopädische Relevanz in diesem Gebiet. Es ist immer noch nicht ausreichend erforscht, in welcher Weise cranoskelettale Entwicklungsvorgänge bei einer Mutation des *CBFA1* Gens verändert sind oder ausbleiben (Bronckers et al., 2003). Die Mutation, die zu den CCD typischen dentalen Problemen führt, wurde bereits erforscht (Aberg et al., 2004; Golan et al., 2002). Die ersten Untersuchungen in Bezug auf die Wirkung von *Cbfa1* auf das Schädelwachstum wurden an Wildtyp Ratten durchgeführt. Dabei wurde belegt, dass postnatal eine erhöhte Expression der Typ II *Cbfa1* Isoform im Condylenknorpel auftritt (Rabie et al., 2004).

Ein klinisch interessanter Forschungsschwerpunkt befasst sich mit der Regulierung der *CBFA1* Expression. Erhofft wird, dass mit Hilfe der erbrachten Ergebnisse, Therapieformen für genetisch bedingte *CBFA1* Insuffizienzen – wie der CCD – entwickelt werden können. Durch Medikamentengabe soll die Expression einer nicht mutierten *CBFA1* Isoform gesteigert werden. Eine positive Wirkung auf die Expression von *CBFA1* zeigen Beta Glycerophosphat (Abbas et al., 2003), BMP-2 (Nishimura et al., 2002), Parathormon und Nebenschilddrüsenhormonverwandte Peptide (Iwamoto et al., 2003; Krishnan et al., 2003). Der Einfluss auf die Genexpression ist abhängig von Zeitpunkt und Dosis der Einnahme (Skillington et al., 2002; Viereck et al., 2002; zur Nieden et al., 2003).

Widersprüchlich sind in der Literatur Angaben zur Entwicklung und zum Wachstum des Unterkiefers von CCD Patienten. Es wurde eine anteriore Rotation und eine mangelhafte kaudale oder goniale Resorption beschrieben (Jensen und Kreiborg, 1995). Daneben gibt es auch Patienten mit einer verlängerten, verkürzten oder verbreiterten Mandibula. In vielen Fällen finden sich bei CCD Patienten keine abweichenden Befunde am Unterkiefer.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Rolle von CBFA1 im Rahmen der Entwicklung von Mandibula und Tibia anhand eines Mausmodells untersucht werden. Da der Gendefekt des *CBFA1* Gens bei Mensch und Maus vergleichbare Symptome im Sinne der Cleidocranialen Dysplasie hervorruft, kann eine Analyse der Entwicklung bei Mäusen als Modell dienen. Bis dato wurden nur wenige Untersuchungen über den Einfluss des Transkriptionsfaktors CBFA1 auf die Mandibula durchgeführt. Es ist nicht geklärt, ob bei der Cleidocranialen Dysplasie, bei einem defizienten Wachstum der Maxilla die Entwicklung der Mandibula ungestört abläuft. Es scheint, als ob der Transkriptionsfaktor CBFA1 trotz hohem Einfluss auf die Maxilla, kaum Einfluss auf die Mandibula hat.

Um zu klären, inwieweit das fehlende *Cbfa1* Allel sich auf Wachstumsvorgänge an Mandibula und postcranialem Skelett auswirkt, wurden Form und Größe der Mandibula und der linken Tibia an 22 ausgewachsenen Wildtyp Mäusen (C57BL/6) mit 22 ausgewachsenen heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen verglichen. Die Identifikation des Phänotyps der Mäuse erfolgte mittels einer Polymerasekettenreaktion. Nach Präparation der Knochen wurde die Mandibula mittig entlang der Symphyse geteilt. Die präparierte Tibia und die zwei Mandibulahälften wurden mit Hilfe eines mobilen Geräts, ORALIX 65 (Philips Healthcare), geröntgt. Die angefertigten Röntgenbilder wurden eingescannt und anhand von, in früheren Untersuchungen definierten Strecken, Flächen und Winkeln, vermessen (Everett et al., 2003; Ramirez-Yanez et al., 2005; Rizos et al., 2001; Singelton et al., 2006; Vandeberg et al., 2004). Eine angepasste Version des Programms OnyxCephTM des Unternehmens Image Instruments wurde für die Vermessung verwendet.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Untersuchte Mäuse

Für die Vermessung von Mandibula und Tibia zur Untersuchung des Vorhandenseins eines Größenunterschieds zwischen gesunden Mäusen und jenen mit Symptomen einer Cleidocranialen Dysplasie wurden Wildtyp Mäuse und heterozygote *Cbfa1* (+/−) Mäuse verwendet. Es wurden jeweils 22 Wildtyp Mäuse (C57BL/6) und jeweils 22 heterozygote *Cbfa1* (+/−) Mäuse untersucht. Die Tiere stammten aus der Arbeitsgruppe “Development & Disease” des Max Planck Instituts für Molekulargenetik in Berlin und sind freundlicherweise von Prof. Dr. Mundlos, dem Leiter des Instituts, zur Verfügung gestellt worden. Der Aufbau einer entsprechenden Zucht in den tierexperimentellen Einrichtungen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Universität Bonn (unter der Leitung von Prof. Dr. Schilling) wurde durch die Verpaarung zweier heterozygoter männlicher *Cbfa1* (+/−) Knockout Mäuse bewerkstelligt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sind die Mäuse in einem ersten Arbeitsschritt auf eine Mutation des *Cbfa1* Gens untersucht worden. Dies geschieht durch Nachweis des Gens *Neo5* mit Hilfe einer Polymerasenkettenreaktion (Otto et al., 1997).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Röhrchen
- 1 *cm* langer gerader Draht
- 44 Becher
- Einmalskalpelle
- Spitze Schere
- Spitze und stumpfe Pinzette
- 22 Röntgenfilme des Typs Kodak INSIGHT Size 4 occlusal 6 x 8 *cm*

2.1.3 Geräte

- Mobiles Röntgengerät ORALIX 65 von Philips Healthcare
- Programm OnyxCeph™ des Unternehmens Image Instruments
- Thermoblock
- Pipetten
- Zentrifuge
- I Cycler – Real time PCR Gerät der Firma Bio-Rad

2.1.4 Chemikalien

- PCR Puffer, bestehend aus Trischlorid PH 8,3 und 5 *mmolar* MgCl
- 25% Triton X-100
- Proteinase K (10 *mg/ml*)
- dH₂O (deionisiertes Wasser)
- EcoR1 High Concentration 40 *U/μl* (Escherichia Coli)
- Primer (vorwärts- und rückwärtsläufig) mit einer Konzentration von 0,0001 *molar*
 Vorwärtsläufige Sequenz: 5'-ATG GAC GAC AGC ACG TTG CGC-3'
 Rückwärtsläufige Sequenz: 5'-CTA GAA GAA CTC GTC GAG AAG CTG G-3'
- 2X SYBER Green Supermix, bestehend aus:
 100 *mM* KCl, 40 *mM* Tris-HCl mit PH 8,4, 0,4 *mM* von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) iTaq DNS Polymerase, 50 *U/ml*, 6 *mM* MgCl₂, SYBER Green I, 20 *nM* Fluoreszenz und Stabilisator

2.2 Methode

2.2.1 Bestimmung der Mäuse mittels PCR

Molekularbiologische Grundlagen

Die Methode der Polymerasenkettenreaktion (PCR) ist als analytisches Verfahren in der medizinischen Diagnostik etabliert. Mittels der PCR ist es möglich die *in vitro* Vervielfältigung einer spezifischen DNS Sequenz aus nur wenigen Ausgangsmolekülen vorzunehmen. Hierbei werden elementare Eigenschaften der biologischen DNS Replikation gezielt ausgenutzt: DNS Polymerasen nutzen eine Einzelstrang DNS als Matrize zur Synthese eines neuen, komplementären DNS Stranges (semikonservative Replikation).

Vorgehen

Die Durchführung der Polymerasenkettenreaktion gliedert sich in drei, aufeinander folgende Teile: (1) Verdauung der Mäuseschwanzspitzen mit Proteinase K, (2) Restriktionsverdauung und (3) Polymerasenkettenreaktion.

1.Tag: Verdauung der Mäuseschwanzspitzen mit Proteinase K

Jede Mäuseschwanzspitze befand sich in einem separaten Röhrchen. Durch Zugabe von Triton X-100 wurden Haut und Zellmembran aufgelöst. Durch weitere Zugabe von Proteinase K wurden zudem Kollagen und Proteine der Zellen gelöst. Nun lagen die Chromosomen als freie DNS Stränge vor.

Pro Probe wurde hinzugegeben:

- 20 μ l 10xPCR Puffer bestehend aus Trischlorid PH 8,3 und 5 *mmolar* MgCl
- 0,8 μ l 25% Triton X-100
- 5 μ l Proteinase K (10 *mg/ml*)
- 174,2 μ l dH₂O

Die Proben wurden über Nacht im Thermoblock bei 55°C gelagert – dem Temperatur-optimum der Proteinase K. Anschließend wurden die Proben auf 95°C erhitzt, um die Proteinase K zu zerlegen und somit unwirksam zu machen. Dieses Vorgehen verhindert, dass sie das, im folgenden Arbeitsschritt zugegebene, Escherichia Coli Restriktionsenzym 1 angreift.

2.Tag: Restriktionsverdauung

Die DNS wurde über Nacht mit Escherichia Coli Restriktionsenzym 1 zerlegt. Lediglich in den mutierten Mäusen ist das Gen *Neo5* (Neomycin Phosphotransferase Gene) zu finden, welches im Rahmen des gezielten Knockouts in das *Cbfa1* Gen eingeschleust wurde. Dies weist keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym auf. Folglich wird es nicht zerlegt und bleibt erhalten.

Die Basensequenz von Gen *Neo5* lautet:

```

1   cgcggcggccc gcgccgccag ctccggcgggg cggaccggga cccggccgcc gaggtcctcg
61  ccgccgaccg ggaggcgtcg gcctcgccgc cgaagaccgc cgtcctgctg cggctcacgg
121 aggcgtacct ctgcacctgc gcgcgggcct tcgacccgc cgggacctcc ggaccgggc
181 ccgcgggcga cgcggggcgc accgggtcca ccggcgcccc cccacccgc acagaatgtc
241 cgaaacccct acgggccccg acgaaaggcg cggaacggcg tctcgcctc tgccatgatg
301 ccgcccattg acgacagcac gttgcgccgg aagtaccgc accacgagtg gcacgcagtg
361 aacgaaggag actcgggcgc cttcgtctac cagctcaccg gcggccccga gccccagccc
421 gagctctacg cgaagatcgc cccccgcgc cccgagaact ccgccttcga cctgtccggc
481 gaggccgacc ggctggagtg gctccaccgc cacgggatcc ccgtccccg cgtcgtcgag
541 cgcggtgccg acgacaccgc cgcgtggctc gtcacggagg ccgtccccg cgtcgcggcg
601 gccgaggagt ggcccagca ccagcggttc gccgtggtcg aggcgatggc ggagctggcc
661 cgcgccctcc acgagctgcc cgtggaggac tgcccctcgc accggcgctt cgacgcggcg
721 gtcgccgagg ccggcggaa cgtcgccgag ggcttggtgg acctcgacga cctgcaggag
781 gagcgggccc ggtggaccgg cgaccagctc ctggcggagc tcgaccgcac ccgtcccag
841 aaggaggacc tggctgtctg ccatggcgac ctgtgcccc acaacgtcct gctcgacccc
901 gggacctgcc gggtcaccgg cgtgatcgac gtcggccgcc tcggggtcgc cgaccgccac
961 gccgacatcg ccttgccgc cgcgagctg gagatcgac aggaccctg gttcggcccc
1021 gcctaccgag agcggttcct ggagcggtac ggccccacc gcgtcgacaa ggagaagctg
1081 gccttctacc agcttctcga cgagttctc tagaccgcc ccgcaggcg ctcgcaggc
1141 cgcttcgga cactccgga agcggccgtg cggtcggagg nacccggccg ccttgagag
1201 cggcggccc cccccctt cgcggcntg gccggagccg tcagaggccg tggtagggg
1261 tggcggcgag gtaccggct

```

Pro Probe wurde hinzugegeben:

- 1 μl EcoR1 High Concentration
- 2 μl Puffer
- 12 μl dH₂O
- 5 μl Probe (aus 1. Tag)

Alle Proben wurden zentrifugiert und anschließend bei 37°C über Nacht im Thermoblock gelagert.

3. Tag: Polymerasenkettenreaktion

Für 30 Proben wurde gemischt:

- 341,25 μl dH₂O
- 3,75 μl Primer (vorwärts- und rückwärtsläufig) mit einer Konzentration von 0,0001 *molar*
 Vorwärtsläufige Sequenz: 5'-ATG GAC GAC AGC ACG TTG CGC-3'
 Rückwärtsläufige Sequenz: 5'-CTA GAA GAA CTC GTC GAG AAG CTG G-3'
- 375 μl 2X SYBER Green Supermix aus:
 100 *mM* KCl, 40 *mM* Tris-HCl, PH 8,4, 0,4 *mM* von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) iTaq DNS Polymerase, 50 *U/ml*, 6 *mM* MgCl₂, SYBER Green I, 20 *nM* Fluoreszenz und Stabilisator

In jedes Röhrchen wurden 24 μl der Mischung pipettiert. Dazu wurde jeweils 1 μl DNS gegeben. Zusätzlich wurde eine Negativprobe mit dH₂O und eine Positivprobe mit *Neo5* angesetzt. Die Proben wurden im I Cycler platziert. Anschließend wurde zentrifugiert und die eigentliche PCR begann.

Die Proben wurden 4 Minuten auf 95°C erhitzt. Bei dieser Temperatur denaturiert die DNS. Anschließend wurde folgender Temperaturzyklus 40 Mal wiederholt: (1) 15 Sekunden bei 95°C, (2) anschließend folgte die Anlagerung der Primer bei 61°C für 30 Sekunden,

(3) letztlich wurde die Temperatur für weitere 30 Sekunden auf 72°C konstant gehalten, bevor der Zyklus erneut begann. Alle genannten Zwischenschritte werden in der Folge detaillierter beschrieben. Zuletzt wurden die Proben noch einmal auf 95°C erhitzt und für die Schmelzkurve auf 55°C abgekühlt.

(1) Denaturierung

Im Denaturierungsschritt wurde das PCR Reaktionsgemisch für 15 Sekunden auf eine Temperatur von 95°C erhitzt, wodurch alle doppelsträngigen Nukleinsäuren in Einzelstränge getrennt wurden.

(2) Anlagerung

Für diesen Schritt wurde die Temperatur möglichst rasch auf 61°C abgesenkt und für 30 Sekunden gehalten. Dies ermöglichte die Anlagerung (Hybridisierung) der Oligonukleotidprimer an ihre Zielsequenz und den Beginn der Neusynthese des komplementären DNS Stranges.

(3) Verlängerung

Danach erfolgte eine Inkubation des Reaktionsgemisches bei 72°C für 30 Sekunden, um eine optimale Verlängerung der neuen DNS Stränge während der Synthesephase zu gewährleisten. Die Temperatur von 72°C stellt das Temperaturoptimum der verwendeten Taq Polymerase dar. Dieses Enzym wurde aus, in heißen Quellen lebenden, Bakterien isoliert. Der neue DNS Strang wurde in $3'-5'$ Richtung verlängert, während die DNS Polymerase am Matrizenstrang in $5'-3'$ Richtung arbeitete.

Das SYBER Green bindet an doppelsträngige DNS. Es absorbiert blaues Licht ($\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$). Das Absorptions- und Emissionsverhalten wird während der Anlagerungs- und Verlängerungsprozesse gemessen. Je mehr doppelsträngige DNS vorhanden war, desto mehr grünes Licht wurde detektiert. Im Verlauf der Wiederholung des oben beschriebenen Temperaturzyklus, findet eine exponentielle Replikation der DNS statt. Dieses exponentielle Wachstum spiegelt sich in der Intensität des fluoreszierten Lichts wieder. Wenn ab dem circa 36. Zyklus ein definierter Schwellenwert überschritten wurde, konnte eindeutig darauf geschlossen werden, dass die untersuchte DNS von einer Mutante stammt.

Nach Abschluss der PCR wurde eine Schmelzkurve aller Proben erstellt, um die DNS Zuordnung (Mutante bzw. Wildtyp) nach obigem Verfahren zu verifizieren. Die Proben wurden 1 Minute bei einer Temperatur von 55°C gehalten und anschließend alle 10 Sekunden um $0,5^{\circ}\text{C}$ zusätzlich erhitzt. Ein frühzeitiges Auftrennen doppelsträngiger DNS ließ auf nicht verwendbare Fragmente schließen. Diese entstehen beispielsweise durch Dimerbildung der Primer: Die Primer lagern sich dabei an nicht genau passende DNS Abschnitte an, wodurch kürzere doppelsträngige Fragmente, als bei ordentlicher Replikation des Gens *Neo5*, entstehen. Diese trennen sich bereits bei niedrigerer Temperatur wieder auf.

Ergebnis der Polymerasenkettenreaktion

Das Überschreiten des Schwellenwerts ließ auf heterozygote *Cbfa1* (+/-) Mäuse schließen. Bei diesen Mäusen ist das Gen *Neo5* nachweislich vorhanden. Bei Tieren, bei denen das Gen nicht vorliegt, wird der Schwellenwert nicht überschritten – es handelt sich folglich um den nicht mutierten Wildtyp. Eine Schwellenwertüberschreitung wurde in der Regel ab der 36. Wiederholung des oben beschriebenen Temperaturzyklus verzeichnet. Abbildung 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer Polymerasenkettenreaktion.

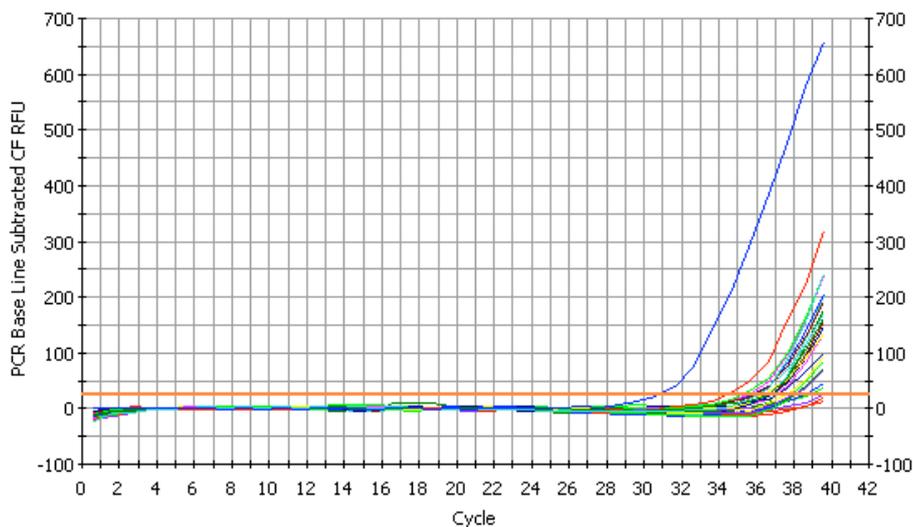


Abbildung 7: Beispielhaftes Ergebnis einer Polymerasenkettenreaktion: Relative Lichtemission unter Verwendung eines Farbfilters, bei mehrfacher Wiederholung des auf Seite 26ff. beschriebenen Temperaturzyklus. Wird ab dem circa 36. Zyklus ein definierter Schwellenwert (orangene Horizontale) überschritten, kann die zugehörige Probe einer *Cbfa1* (+/-) mutierten Maus zugewiesen werden.

2.2.2 Präparation

Die Köpfe und Beine der toten Tiere wurden abgetrennt und in Formalin eingelegt. Um die Mandibulae freizupräparieren wurde zunächst die Haut komplett entfernt. Mit Hilfe einer spitzen Schere wurde ein Schnitt entlang der Linea Mediana des Kopfes gemacht. Anschließend konnte die Muskulatur abpräpariert werden. Sobald die Mandibula vollständig von Muskulatur, Bändern und Sehnen befreit war, wurde sie mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig aus dem Kiefergelenk gehoben. Die Mandibula wurde entlang der Symphyse mittig in zwei Hälften geteilt. Zur Vermessung der Tibiae wurde von jeder Maus die linke Tibia frei präpariert. In Abbildung 8 sind Mandibula und Tibia einer Maus exemplarisch abgebildet.



Abbildung 8: Fotografische Darstellung der Präparation von (*links*) Tibia, (*rechts oben*) linker Mandibulahälfte und (*rechts unten*) rechter Mandibulahälfte einer Versuchsmaus. Der 1 cm Maßstab zur Größenorientierung ist mittig zu erkennen.

2.2.3 Röntgen

Die Mandibulae und Tibiae wurden mit Hilfe des mobilen Geräts ORALIX 65 geröntgt. Für die Röntgenaufnahmen sind Filme der Firma Kodak verwendet worden: Kodak INSIGHT Size 4 occlusal 6 x 8 cm. Die Mäuse wurden bei einer Einstellung von 64 kV, 0,08 ms und einem Tubusabstand von 15 cm geröntgt. Mittig wurde ein 1 cm langer, gerader Draht als Maßstab platziert. Die Knochen zweier Mäuse wurden jeweils rechts und links davon angeordnet, so dass auf jeder Aufnahme beide Mandibulahälften zweier Mäuse, sowie jeweils die linke Tibia zu sehen war. Die Innenflächen der Mandibulahälften zeigten zum Röntgenfilm. Nach der Entwicklung sind die Aufnahmen gemäß der zugehörigen Mausidentifikationsnummer bezeichnet worden. Eines der angefertigten Röntgenbilder ist beispielhaft in Abbildung 9 zu sehen. Mittig ist der 1 cm lange Maßstab gesetzt.

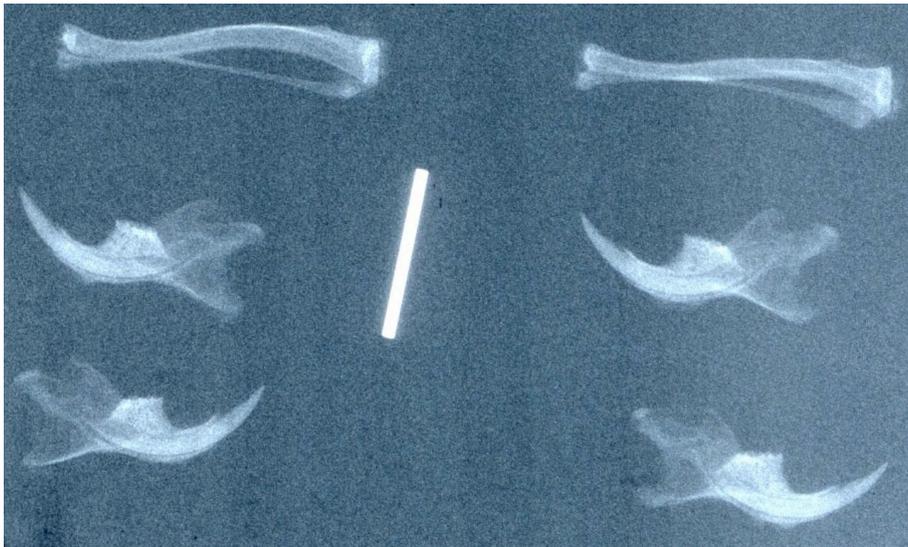


Abbildung 9: Röntgenbild von Mandibulae und Tibiae zweier Versuchsmäuse. Jeweils *oben* sind die Tibiae, *mittig* die linken Mandibulahälften und *unten* die rechten Mandibulahälften zu erkennen. Der 1 cm Maßstab zur Größenorientierung ist *zentral* platziert.

2.2.4 Auswertung

Zur Auswertung der präparierten Mäuse sind die Röntgenaufnahmen eingescannt worden. Sowohl an den Mandibula- als auch an den Tibiapräparaten sind verschiedene Referenzpunkte gesetzt worden. Bei der Mandibula erfolgte die Punktsetzung bei der rechten Hälfte analog zur linken Hälfte und vice versa.

Die Mouse Phenome Database (2006), Ramirez-Yanez et al. (2005), Rizos et al. (2001), Singleton et al. (2006) und Vandenberg et al. (2004) sind als Referenzquellen bei der Berechnung von Strecken, Flächen und Winkeln zwischen den Punkten herangezogen worden. Auch hier wurde für Streckenbestimmungen ein 1 *cm* langer, gerader Draht als Referenzwert genommen.

Abbildung 10 stellt die Messpunkte der linken Mandibulahälfte und der Tibia vergrößert dar.

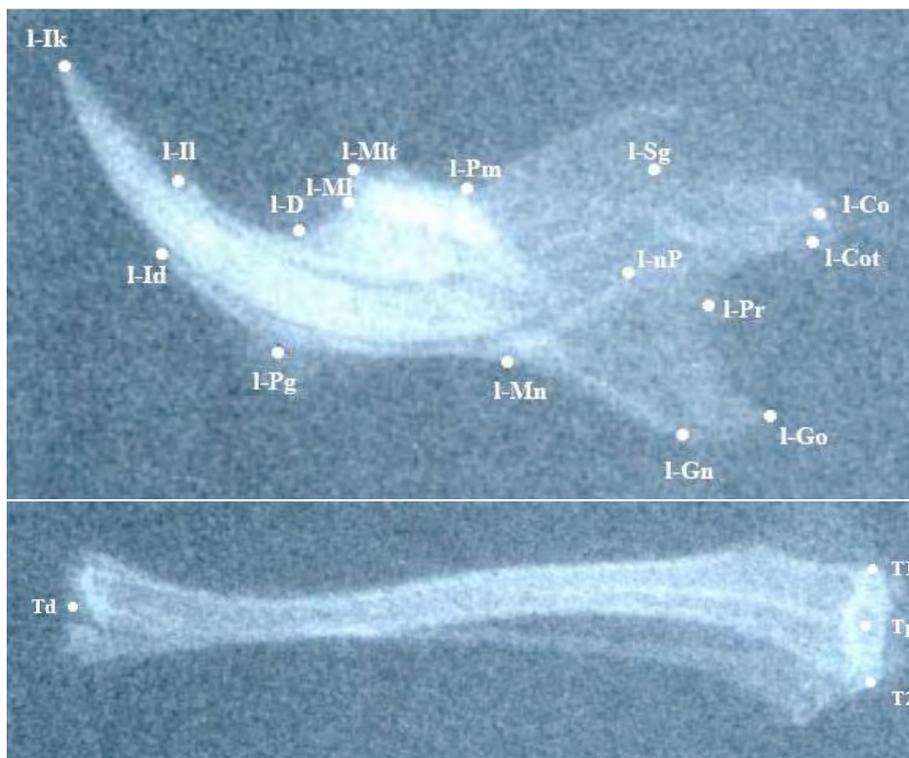


Abbildung 10: Röntgenbild der linken (l) Mandibula (*oben*) und Tibia (*unten*) einer Versuchsmaus mit eingezeichneten Referenzpunkten (siehe folgende Seite).

Referenzpunkte*Mandibula*

- | | | |
|----|-----|---|
| 1 | Co | Höchster und hinterster Punkt am Condylus |
| 2 | Cot | Tiefster Punkt am Condylus |
| 3 | D | Diastema |
| 4 | Gn | Gnathion (Unterster Punkt des Ramus, senkrecht der Halbierung Go-Mn) |
| 5 | Go | Gonion (Hinterster Punkt am Ramus) |
| 6 | Id | Infradentaler Punkt |
| 7 | Ik | Inzisalkante |
| 8 | Il | Vorderster und höchster Punkt des Corpus |
| 9 | Ml | Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren |
| 10 | Mlt | Höchster Punkt des ersten Molaren |
| 11 | Mn | Knotenpunkt zwischen Ramus und Corpus |
| 12 | Pg | Pogonion (Vorderster, unterster Punkt des unteren Mandibularrandes) |
| 13 | Pm | Posteriorer Molar |
| 14 | Pr | Posteriorer Ramus |
| 15 | Sg | Sigmoid |
| 16 | uP | Unbenannter Punkt |

Tibia

- | | | |
|----|----|---|
| 17 | Td | Mittelpunkt der Breite an der distalen Oberfläche der Tibia |
| 18 | Tp | Nächster Punkt zur Epiphyse |
| 19 | T1 | Oberer Tibiamesspunkt an der Epiphyse |
| 20 | T2 | Unterer Tibiamesspunkt an der Epiphyse |

Maßstab

- | | | |
|----|----|----------------------|
| 21 | M1 | Messpunkt am Maßstab |
| 22 | M2 | Messpunkt am Maßstab |

Stecken (in mm)

Durch Verbinden der einzelnen Punkte ergaben sich folgende Strecken:

Mandibula

1	Go-Mn	11	Co-Go
2	Ml-Il	12	Go-Pg
3	Co-Il	13	Pg-Co
4	Co-Gn	14	Pg-Pm
5	Pm-Co	15	Ml-Pm
6	D-Pg	16	Id-Pg
7	Mn-Sg	17	Id-Pr
8	Gn-Pg	18	Id-Co
9	Pg-Mlt	19	Id-Go
10	Ik-uP		

Tibia

- 1 Tp-Td: Tibialänge
- 2 T1-T2: Tibiabreite

Maßstab

- 1 M1-M2: Maßstablänge (1 cm)

Flächen (in mm²)

Durch Verbinden der einzelnen Punkte ergaben sich die folgend aufgelisteten Flächen, jeweils für die rechte und linke Mandibulahälfte:

- 1 Vordere Fläche: Mn-Pg-Id-Il-D-Ml-Pm
- 2 Hintere Fläche: Go-Gn-Mn-Pm-Sg-Co-Cot-Pr
- 3 Zahnraum (Konkavität vom Inzisivus zum vorderen Molar): Il-D-Ml
- 4 Ramusraum (Konkavität am hinteren Ramus): Cot-Pr-Go

Winkel (in °)

Durch Verbinden bestimmter Referenzpunkte ergaben sich, jeweils für die rechte und linke Mandibulahälfte folgende Winkel:

- | | | | |
|---|----------|---|----------|
| 1 | Co-Go-Pg | 5 | Pg-Co-Gn |
| 2 | Pg-Co-Go | 6 | Gn-Pg-Co |
| 3 | Go-Pg-Co | 7 | Ik-Pg-uP |
| 4 | Co-Gn-Pg | | |

Vermessung

Die Vermessung der Mandibulahälften und der Tibiae erfolgte mit Hilfe des Programms OnyxCeph™ des Unternehmens Image Instruments. Das Programm unterstützt alle Aufgaben zur Verwaltung, Bearbeitung und Auswertung digitaler Bildvorlagen im Rahmen kieferorthopädischer und kieferchirurgischer Behandlungen.

Die gescannten Röntgenbilder wurden in das Programm importiert. Um die Software zur Vermessung von Mandibula und Tibia zu verwenden, wurde sie an die spezifischen Größenverhältnisse der Mäuse angepasst. Nach manueller Festlegung der Referenzpunkte auf den gescannten Röntgenbildern, berechnete OnyxCeph™ die oben definierten Strecken, Flächen und Winkel. Abbildung 11 zeigt einen Screenshot der Arbeitsumgebung in OnyxCeph™.

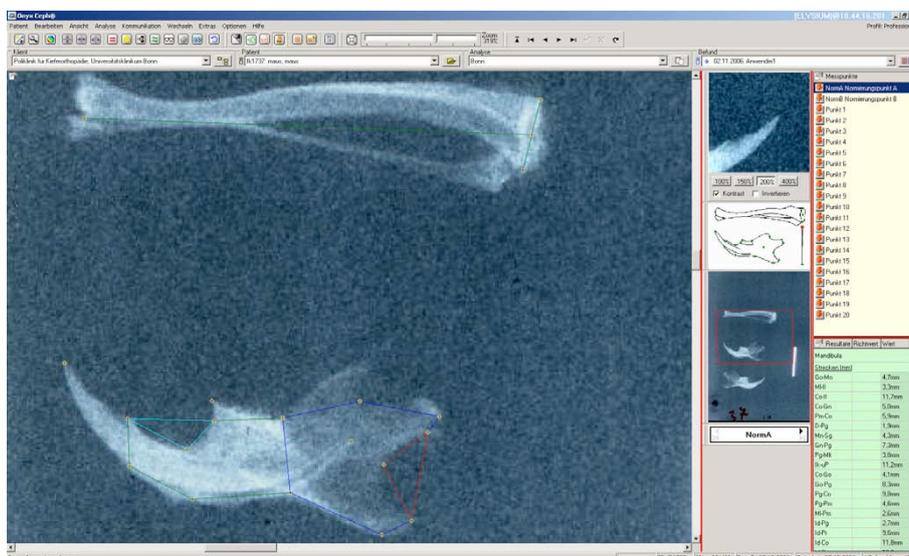


Abbildung 11: Beispielhafter Screenshot der Arbeitsumgebung des Programms OnyxCeph™, welches zur Vermessung von Strecken, Winkeln und Flächen der Mandibulae und Tibiae verwendet wurde.

Statistik

Zur Auswertung der Mandibulahälften und Tibiae wurden die Mittelwerte der definierten Strecken, Flächen und Winkel bestimmt und die zugehörigen Standardabweichungen errechnet. Ein zweiseitiger t-Test wurde verwendet, um die Abweichung zwischen den Wildtypen und den Mutanten auf ihre Signifikanz zu prüfen (Berry und Lindgren, 1995). Der Nullhypothese (H_0 : Zwei Mittelwerte sind identisch, ihre Differenz ist 0) steht die Alternativhypothese (H_1 : Zwei Mittelwerte sind nicht identisch) gegenüber. Alle Tests werden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt.

Zu Beachten ist, dass ein t-Test nur Anwendung finden kann, wenn alle zugrunde liegenden Größen unabhängig und normalverteilt angenommen werden.

3 Ergebnisse

Es ließen sich für die Tibiae ein geringer, für die verschiedenen Dimensionen der Mandibulae kaum auffällige Größen- oder Winkelabweichungen zwischen den Wildtypen und den genetisch veränderten Tieren nachweisen. Die folgenden Tabellen geben die Ergebnisse der Vermessung der Mäusemandibulae und -tibiae wieder. Es sind Mittelwert und Standardabweichung sowohl der Wildtypen als auch der mutierten *Cbfa1* (+/-) Mäuse aufgelistet. Der aufgeführte p-Wert wird verwendet um die Nullhypothese, beide Mittelwerte sind identisch, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu testen. Ist der Wert kleiner als 0,05 weist der t-Test auf einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte hin: Die Nullhypothese wird verworfen.

3.1 Mandibula Strecken

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte (μ) und zugehörige Standardabweichungen (σ) aller definierter Mandibula Strecken der untersuchten Mutanten und Wildtyp Mäuse einschließlich des Ergebnisses des t-Tests (p-Wert).

	Go-Mn	Ml-II	Co-II	Co-Gn	Pm-Co	D-Pg
μ Wildtyp	4,86	3,28	11,90	5,01	6,35	2,08
σ Wildtyp	0,27	0,22	0,42	0,30	0,19	0,14
μ Mutante	4,75	3,26	11,90	4,97	6,30	1,99
σ Mutante	0,26	0,15	0,37	0,24	0,27	0,11
p-Wert	0,45	0,69	0,74	0,97	0,10	0,01

	Mn-Sg	Gn-Pg	Pg-Mlt	Ik-uP	Co-Go	Go-Pg
μ Wildtyp	4,26	7,51	3,73	11,15	4,16	8,53
σ Wildtyp	0,29	0,35	0,19	0,34	0,30	0,36
μ Mutante	4,25	7,32	3,69	11,26	4,01	8,42
σ Mutante	0,28	0,39	0,18	0,33	0,26	0,39
p-Wert	0,51	0,04	0,65	0,08	0,12	0,47

	Pg-Co	Pg-Pm	MI-Pm	Id-Pg	Id-Pr	Id-Co	Id-Go
μ Wildtyp	10,01	4,48	2,31	2,80	9,76	12,04	11,13
σ Wildtyp	0,35	0,20	0,17	0,31	0,31	0,40	0,45
μ Mutante	9,96	4,43	2,36	2,82	9,79	12,05	11,06
σ Mutante	0,38	0,25	0,18	0,36	0,30	0,36	0,42
p-Wert	0,73	0,90	0,02	0,58	0,45	0,71	0,35

Tabelle 1: Mittelwert (μ), Standardabweichung (σ) und zugehöriges Ergebnis des t-Tests (p-Wert) aller definierter Mandibula Strecken der untersuchten Mutanten (n Mutante = 22) und Wildtyp Mäuse (n Wildtyp = 22).

- Co* Höchster und hinterster Punkt am Condylus
- Cot* Tiefster Punkt am Condylus
- D* Diastema
- Gn* Gnathion (Unterster Punkt des Ramus, senkrecht der Halbierung Go-Mn)
- Go* Gonion (Hinterster Punkt am Ramus)
- Id* Infradentaler Punkt
- Ik* Inzisalkante
- Il* Vorderster und höchster Punkt des Corpus
- Ml* Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren
- Mlt* Höchster Punkt des ersten Molaren
- Mn* Knotenpunkt zwischen Ramus und Corpus
- Pg* Pogonion (vorderster, unterster Punkt des unteren Mandibularrandes)
- Pm* Posteriorer Molar
- Pr* Posteriorer Ramus
- Sg* Sigmoid
- uP* Unbenannter Punkt

Im Folgenden werden lediglich jene Strecken der Mandibula aufgeführt, bei denen der t-Test ergab, dass die Mittelwerte der Wildtypen signifikant von jenen der mutierten Tiere abwichen. Dies war bei drei der 19 bestimmten Strecken der Fall: Bei der Strecke zwischen Diastema und Pogonion (D-Pg), zwischen Gnathion und Pogonion (Gn-Pg) sowie bei der Strecke zwischen dem Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren und dem posterioren Molaren (Ml-Pm).

Strecke D-Pg

Der Mittelwert für die Strecke vom Diastema bis zum Pogonion (siehe Abbildung 12) betrug für die Wildtyp Mäuse 2,1 mm, für die Mutanten 2,0 mm. Der p-Wert der Differenz betrug 0,01: Der t-Test zeigt somit einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäuse war die Strecke also im Durchschnitt um 0,1 mm kürzer als bei den Wildtyp Mäusen.

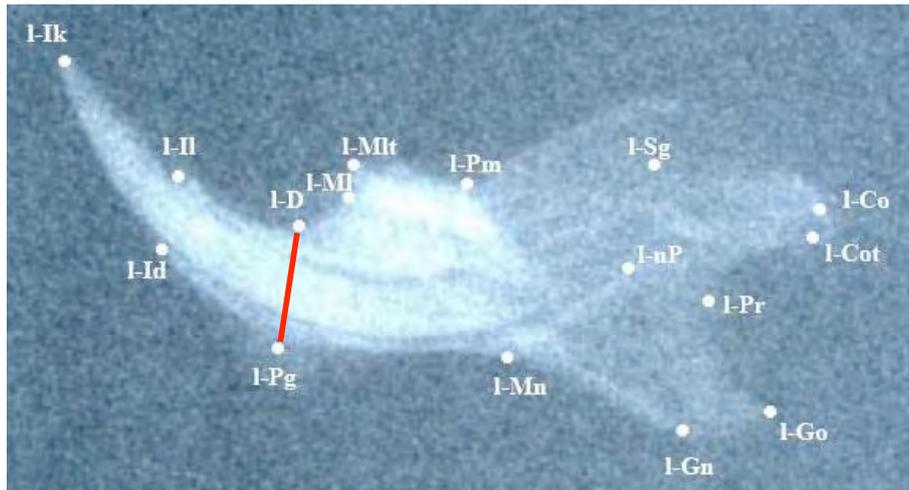


Abbildung 12: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus mit eingezeichneter Strecke von Diastema bis Pogonion (D-Pg).

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

Strecke Gn-Pg

Der Mittelwert für die Strecke vom Gnathion bis Pogonion (siehe Abbildung 13) betrug für die Wildtyp Mäuse $7,5\text{ mm}$ und für die Mutanten $7,3\text{ mm}$. Der p-Wert der Differenz betrug $0,04$: Der t-Test zeigt somit einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% . Bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäuse war die Strecke folglich im Durchschnitt um $0,2\text{ mm}$ kürzer als bei den Wildtyp Mäusen.

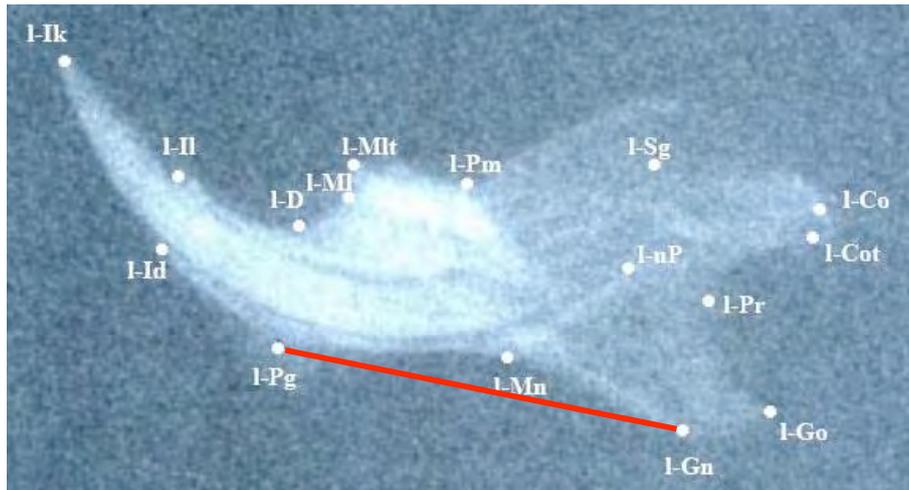


Abbildung 13: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus mit eingezeichneter Strecke von Gnathion bis Pogonion (Gn-Pg).

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

Strecke MI-Pm

Der Mittelwert für die Strecke vom Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren bis zum posterioren Molaren (siehe Abbildung 14) betrug für die Wildtyp Mäuse 2,3 *mm* und für die Mutanten 2,4 *mm*. Der p-Wert der Differenz betrug 0,02: Der t-Test zeigt somit einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/–) Mäuse war die Strecke also im Durchschnitt um 0,1 *mm* länger als bei den Wildtyp Mäusen.

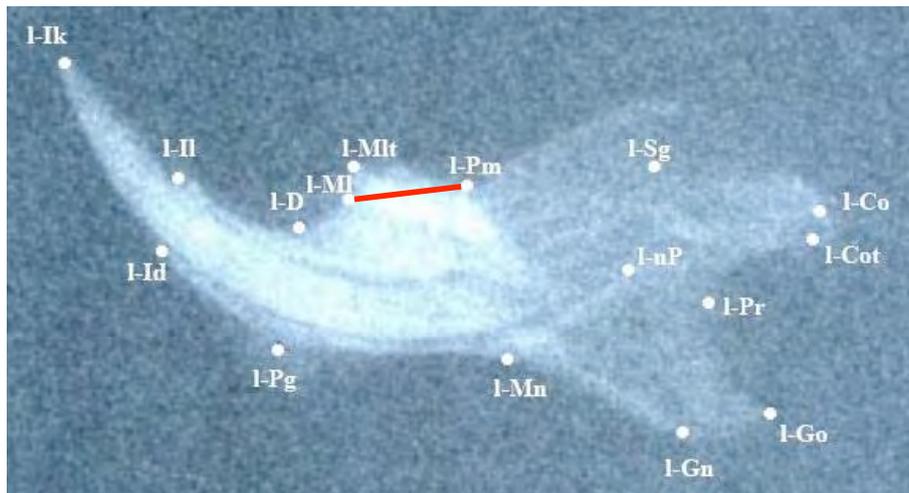


Abbildung 14: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus mit eingezeichneter Strecke vom Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren bis zum posterioren Molaren (MI-Pm).
Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

3.2 Mandibula Flächen

Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte (μ) und zugehörige Standardabweichungen (σ) aller definierter Mandibula Flächen der untersuchten Mutanten und Wildtyp Mäuse einschließlich des Ergebnisses des t-Tests (p-Wert).

	Vordere Fläche	Zahnraum	Hintere Fläche	Ramusraum
μ Wildtyp	16,13	1,57	20,12	2,65
σ Wildtyp	0,97	0,31	1,56	0,40
μ Mutante	16,06	1,56	19,55	2,46
σ Mutante	1,01	0,21	1,20	0,29
p-Wert	0,91	0,83	0,05	0,05

Tabelle 2: Mittelwert (μ), Standardabweichung (σ) und zugehöriges Ergebnis des t-Tests (p-Wert) aller definierter Mandibula Flächen der untersuchten Mutanten (n Mutante = 22) und Wildtyp Mäuse (n Wildtyp = 22).

Vordere Fläche: Mn-Pg-Id-Il-D-Ml-Pm

Hintere Fläche: Go-Gn-Mn-Pm-Sg-Co-Cot-Pr

Zahnraum (Konkavität vom Inzisivus zum vorderen Molar): Il-D-Ml

Ramusraum (Konkavität am hinteren Ramus): Cot-Pr-Go

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32f.).

Bei den verschiedenen gemessenen Mandibulaflächen war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Bei allen vier Flächen wich die Größe bei heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen nicht signifikant vom Wildtyp ab.

3.3 Mandibula Winkel

Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte (μ) und zugehörige Standardabweichungen (σ) aller definierter Mandibula Winkel der untersuchten Mutanten und Wildtyp Mäuse einschließlich des Ergebnisses des t-Tests (p-Wert).

	Co-Go-Pg	Pg-Co-Go	Go-Pg-Co	Co-Gn-Pg
μ Wildtyp	98,29	57,49	24,24	104,61
σ Wildtyp	3,71	3,48	1,66	3,02
μ Mutante	100,21	56,45	23,33	106,46
σ Mutante	3,67	3,30	1,70	3,33
p-Wert	0,14	0,39	0,06	0,01

	Pg-Co-Gn	Gn-Pg-Co	Ik-Pg-uP
μ Wildtyp	46,50	28,90	113,05
σ Wildtyp	3,11	1,45	1,75
μ Mutante	44,81	28,65	113,37
σ Mutante	2,70	1,49	2,45
p-Wert	0,02	0,50	0,79

Tabelle 3: Mittelwert (μ), Standardabweichung (σ) und zugehöriges Ergebnis des t-Tests (p-Wert) aller definierter Mandibula Winkel der untersuchten Mutanten (n Mutante = 22) und Wildtyp Mäuse (n Wildtyp = 22).

Co Höchster und hinterster Punkt am Condylus

Gn Gnathion (Unterster Punkt des Ramus, senkrecht der Halbierung Go-Mn)

Go Gonion (Hinterster Punkt am Ramus)

Ik Inzisalkante

Pg Pogonion (Vorderster, unterster Punkt des unteren Mandibularrandes)

uP Unbenannter Punkt

Im Folgenden werden lediglich die Winkel dargestellt, bei denen der t-Test ergab, dass die Mittelwerte der Wildtypen signifikant von jenen der mutierten Tiere abwichen. Dies war bei zwei der sieben bestimmten Winkel der Fall: Dem Winkel zwischen dem höchsten, hintersten Punkt am Condylus, dem Gnathion und dem Pogonion (Co-Gn-Pg) sowie dem Winkel zwischen dem Pogonion, dem höchsten, hintersten Punkt am Condylus und dem Gnathion (Pg-Co-Gn).

Winkel Co-Gn-Pg

Der Mittelwert des Winkels zwischen dem höchsten, hintersten Punkt am Condylus, dem Gnathion und dem Pogonion (siehe Abbildung 15) betrug bei den Wildtyp Mäusen $104,6^\circ$, bei den Mutanten $106,5^\circ$. Der p-Wert der Differenz betrug 0,01: Der t-Test zeigt somit einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen war der Winkel folglich im Durchschnitt $1,9^\circ$ stumpfer als beim Wildtyp.

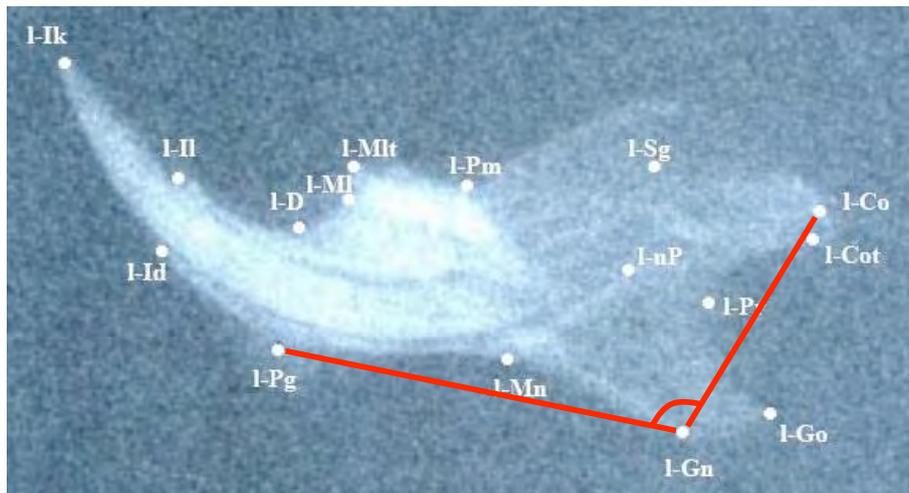


Abbildung 15: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus mit eingezeichnetem Winkel vom höchsten, hintersten Punkt am Condylus, über Gnathion bis Pogonion (Co-Gn-Pg).

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

Winkel Pg-Co-Gn

Der Mittelwert des Winkels zwischen dem Pogonion, dem höchsten, hintersten Punkt am Condylus und dem Gnathion (siehe Abbildung 16) betrug bei den Wildtyp Mäusen $46,5^\circ$, bei den Mutanten $44,8^\circ$. Der p-Wert der Differenz betrug 0,02: Der t-Test zeigt somit einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen war der Winkel also im Durchschnitt $1,7^\circ$ spitzer als beim Wildtyp.

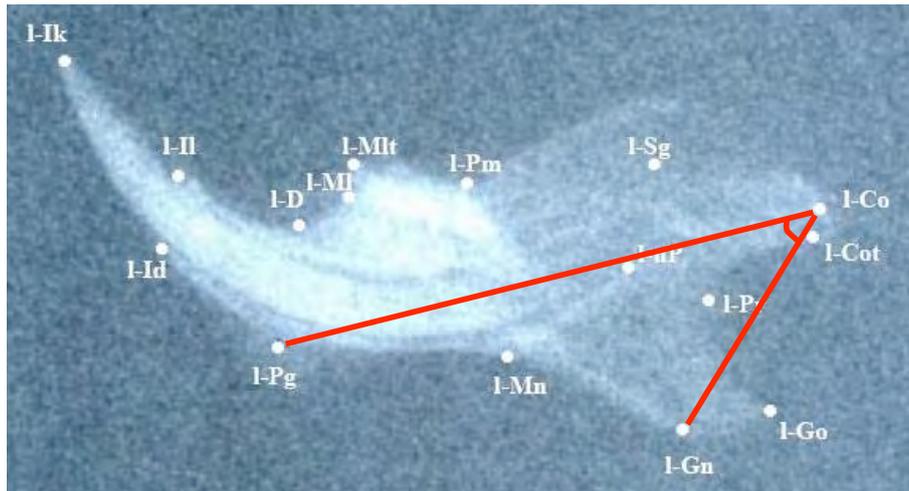


Abbildung 16: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus mit eingezeichnetem Winkel von Pogonion, über den höchsten, hintersten Punkt am Condylus bis Gnathion (Pg-Co-Gn).

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

3.4 Tibia Strecken

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte (μ) und zugehörige Standardabweichungen (σ) beider definierter Tibia Strecken der untersuchten Mutanten und Wildtyp Mäuse einschließlich des Ergebnisses des t-Tests (p-Wert).

	Tp-Td	T1-T2
μ Wildtyp	17,15	2,64
σ Wildtyp	0,36	0,12
μ Mutante	16,87	2,62
σ Mutante	0,41	0,14
p-Wert	0,02	0,66

Tabelle 4: Mittelwert (μ), Standardabweichung (σ) und zugehöriges Ergebnis des t-Tests (p-Wert) aller definierter Tibia Strecken der untersuchten Mutanten (n Mutante = 22) und Wildtyp Mäuse (n Wildtyp = 22).

Td Mittelpunkt der Breite an der distalen Oberfläche der Tibia

Tp Nächster Punkt zur Epiphyse

T1 Oberer Tibiamesspunkt an der Epiphyse

T2 Unterer Tibiamesspunkt an der Epiphyse

Im Folgenden wird lediglich die Strecke erläutert, bei welcher der t-Test ergab, dass der Mittelwert der Wildtypen signifikant von jenem der mutierten Tiere abwich. Dies war nur bei einer der zwei bestimmten Strecken der Fall: Der Tibialänge (Tp-Td).

Strecke Tp-Td

Der Mittelwert für die Strecke zwischen dem nächsten Punkt zur Epiphyse und dem Mittelpunkt der Breite an der distalen Oberfläche der Tibia (siehe Abbildung 17) betrug für die Wildtyp Mäuse $17,2\text{ mm}$, für die Mutanten $16,9\text{ mm}$. Der p-Wert der Differenz betrug $0,02$: Der t-Test zeigt somit einen signifikanten Unterschied bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% . Bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäuse war die Strecke im Durchschnitt um $0,3\text{ mm}$ kürzer als bei den Wildtyp Mäusen.



Abbildung 17: Röntgenbild der Tibia einer Maus mit eingezeichneter Strecke vom Mittelpunkt der Breite an der distalen Oberfläche der Tibia bis zum nächsten Punkt zur Epiphyse (Tp-Td).

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

4 Diskussion

4.1 Einordnung in den Kontext

Entwicklungsbiologische und molekularbiologische Forschungen der letzten Jahre und Jahrzehnte zeigten, dass Entwicklung und Wachstum des Skeletts von zahlreichen Transkriptionsfaktoren kontrolliert und reguliert werden. Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen in der Ätiologie und Pathogenese von Fehlbildungen, bei Wachstumsstörungen, bei degenerativen Erkrankungen, bei Neubildungen des Skelettsystems, aber auch bei Regenerations- und Reparationsvorgängen, geraten sie zunehmend in das Zentrum klinischen Interesses.

Eine Vielzahl kieferorthopädischer Erkrankungen umfasst biologische und pathologische Prozesse, bei denen diese Transkriptionsfaktoren von großer Bedeutung sind: Entwicklungsanomalien und Wachstumsstörungen des Schädel- und Gesichtsskeletts, biomechanische Einflussnahme auf biologische Vorgänge am Skelett, sowie Reaktionen des skelettalen Gewebes auf kieferorthopädische Behandlungen sollen an dieser Stelle beispielhaft genannt werden.

Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren im Bereich des Knochens gehört das *CBFA1*. Die Rolle dieses Faktors konnte sowohl in der desmalen Ossifikation, als auch im Rahmen des chondralen Wachstums aufgezeigt werden. *CBFA1* nimmt Einfluss auf die Osteoblastenreifung und die Chondrozytenhypertrophie (Ducy et al., 1997; Kim et al., 1999; Komori et al., 1997). Es beeinflusst die Differenzierungsvorgänge von Mesenchymzellen zu reifen Osteoblasten und wirkt auf die Knochenformationsrate differenzierter Osteoblasten ein. Bei chondralen Wachstumsvorgängen wirkt es auf die Hypertrophie der Chondrozyten (Kim et al., 1999).

Mutationen im *CBFA1* Gen sind verantwortlich für die Ausbildung der Cleidocranialen Dysplasie. Typisches Merkmal ist eine Hypo- oder Aplasie der Claviculae, welche zu einer Hypermobilität der Schultern führt. Patienten weisen ein verzögertes Körperwachstum auf und die skelettale Entwicklung setzt verspätet ein (Jensen, 1994). Weitere Merkmale sind eine verspätete Ossifikation der Schädelknochen mit zeitlich verspätetem Verschluss der Schädelsturen und der anterioren Fontanelle, eine Hypo- oder Aplasie der Nasenknochen, sowie eine generalisierte Unterentwicklung des maxillären Komplexes. Zahnanomalien gehören ebenfalls

zu den Symptomen der CCD (Bronckers et al., 2003; Ishii et al., 1998; Richardson und Deussen, 1994): Verspäteter Zahndurchbruch, Hyperodontie, ausbleibende Exfoliation der Milchzähne, Zahnretentionen und -ektopen, folliculäre Zysten, Ankylosen und Malokklusionen werden gehäuft verzeichnet (Mundlos, 1999).

Bis dato sind die Details der cranoskelettalen Fehlentwicklungen, welche typisch für die Cleidocraniale Dysplasie sind, nur wenig erforscht. Dabei besteht in diesem Bereich hohe kieferorthopädische Relevanz. Es ist noch immer nicht ausreichend erforscht in welcher Weise cranoskelettale Entwicklungsvorgänge bei einer Mutation des *CBFA1* Gens verändert sind (Bronckers et al., 2003). Insbesondere sind bisher erst wenige Untersuchungen über den Einfluss des Transkriptionsfaktors CBFA1 auf die Mandibula durchgeführt worden. Es ist nicht geklärt, ob bei der Cleidocranialen Dysplasie bei einem defizienten Wachstum der Maxilla die Entwicklung der Mandibula ungestört abläuft (Golan et al., 2004). Angaben zur Entwicklung und zum Wachstum des Unterkiefers sind in der Literatur widersprüchlich. Es wurde eine anteriore Rotation und eine mangelhafte kaudale oder goniale Resorption beschrieben (Jensen und Kreiborg, 1995). Häufig finden sich bei CCD Patienten jedoch keine abweichenden Befunde am Unterkiefer.

4.2 Analyse der Ergebnisse

Diese Arbeit untersuchte die Rolle von CBFA1 im Rahmen der Entwicklung von Mandibula und Tibia anhand eines Mausmodells. Da der Defekt des *CBFA1* Gens bei Mensch und Maus vergleichbare Symptome, im Sinne der Cleidocranialen Dysplasie hervorruft, konnte eine Analyse von Mandibula und Tibia der Maus als Modell dienen. Um zu klären, inwieweit das defekte Gen sich auf Wachstumsvorgänge an Mandibula und postcranialem Skelett auswirkt, wurden Form und Größe der Mandibula und der linken Tibia von 22 ausgewachsenen Wildtyp Mäusen (C57BL/6) und 22 heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Knockout Mäusen verglichen.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigten, dass für die Tibia geringe, für die verschiedenen Dimensionen der Mandibula kaum auffällige Größen- oder Winkelabweichungen zwischen dem Wildtyp und den genetisch veränderten Tieren nachzuweisen waren. Im Bereich der Mandibula ergab der t-Test bei drei der 19 gemessenen Stecken und bei zwei der sieben gemessenen Winkel einen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyp und den *Cbfa1* (+/-) Mäusen. Bei den gemessenen Flächen war kein signifikanter Unterschied nachweisbar. Bei der Tibia war bei einer der zwei gemessenen Strecken ein signifikanter Unterschied festzustellen.

4.2.1 Mandibula Strecken

Bei der Mandibula der *Cbfa1* Knockout Mäuse waren zwei der 19 gemessenen Stecken signifikant kleiner (D-Pg und Gn-Pg) und eine signifikant größer (Ml-Pm) als beim Wildtyp. Diese Strecken (D-Pg, Gn-Pg und Ml-Pm) sind in Abbildung 18 auf der folgenden Seite dargestellt.

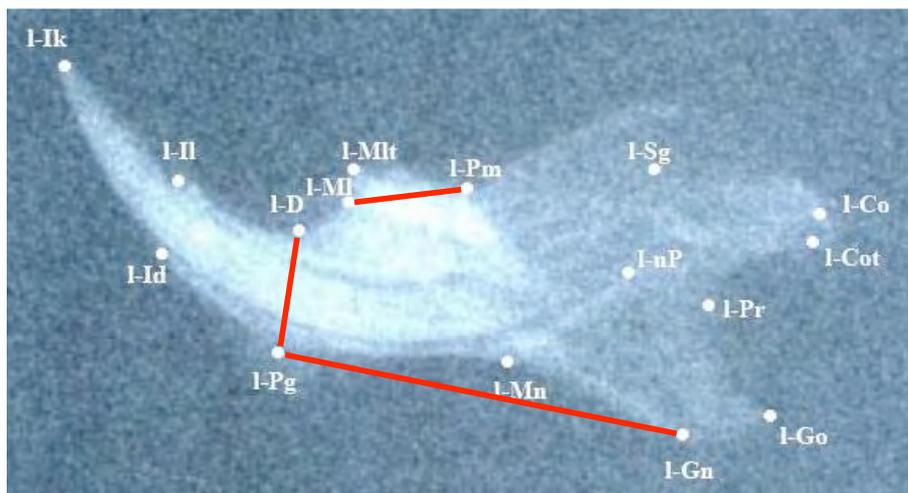


Abbildung 18: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus. Eingezeichnet sind jene Strecken, bei denen ein t-Test auf einen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (D-Pg, Gn-Pg und MI-Pm). Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

Strecke D-Pg

Die Strecke vom Diastema bis Pogonion betrug für die Wildtyp Mäuse durchschnittlich 2,1 mm, für die Mutanten 2,0 mm. Die vertikale Ausdehnung zwischen Diastema und Pogonion ist folglich bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen geringer als beim Wildtyp. Die Mandibula ist in diesem Bereich graziler ausgebildet.

Übertragen auf den Menschen könnte dies als eine Verkürzung des vertikalen Untergesichts bei CCD Patienten, im Vergleich zu nicht erkrankten Personen, gedeutet werden (Ishii et al., 1998). Jensen und Kreiborg (1995) stützen in ihren klinischen Studien die These einer verkürzten vertikalen Kieferrelation.

Strecke Gn-Pg

Die Strecke vom Gnathion bis Pogonion betrug im Durchschnitt für die Wildtyp Mäuse 7,5 mm, für die Mutanten 7,3 mm. Die Strecke war somit bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen kürzer als beim Wildtyp.

Überträgt man dieses Ergebnis auf die Mandibula des Menschen, könnte daraus geschlossen werden, dass der Mandibularkörper in der Sagittalebene bei CCD Patienten kürzer ist als bei nicht erkrankten Personen. Jensen und Kreiborg (1995) wiesen in ihrer Studie eine verkleinerte sagittale Kieferrelation nach.

Strecke MI-Pm

Die Strecke vom Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren bis zum posterioren Molaren betrug für die Wildtyp Mäuse 2,3 mm, für die Mutanten 2,4 mm. Folglich war diese Strecke bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen länger als beim nicht mutierten Wildtyp.

Diese Strecke spiegelt die sagittale Ausdehnung der Molarenregion wieder. Da auf den angefertigten Röntgenbildern aller untersuchter Tiere die Molaren lückenlos standen, scheinen sie somit bei den mutierten Mäusen in mesio-distaler Richtung breiter ausgebildet zu sein. Mundlos et al. (1996) und Zou et al. (2003) haben in ihren Studien gezeigt, dass bei Mäusen, bei denen eine Mutation des *Cbfa1* Gens vorliegt und welche Symptome einer CCD aufweisen, keine Hyperdontie vorhanden ist. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die untersuchten Mäuse – im Gegensatz zum Menschen – nur einer Dentition unterliegen (Chung et al., 2004). Auf den Menschen bezogen, könnte das Ergebnis dieses Streckenvergleichs darauf schließen lassen, dass bei CCD Patienten zusätzlich zu einer Hyperdontie (Cooper et al., 2001; Zou et al., 2003) auch eine geringfügige Makrodontie der Molaren vorliegen könnte.

4.2.2 Mandibula Winkel

Einer der sieben gemessenen Winkel war bei den genetisch veränderten Tieren signifikant größer (Co-Gn-Pg) und einer signifikant kleiner (Pg-Co-Gn) als bei den Wildtyp Mäusen. Diese beiden Winkel (Co-Gn-Pg und Pg-Co-Gn) sind in Abbildung 19 dargestellt.

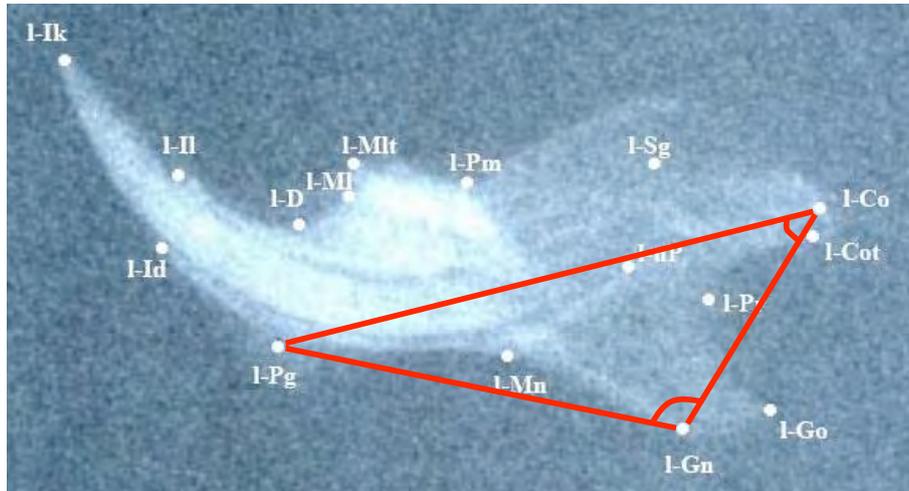


Abbildung 19: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus. Eingezeichnet sind jene Winkel, bei denen ein t-Test auf einen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (Co-Gn-Pg und Pg-Co-Gn). Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

Winkel Co-Gn-Pg

Der Mittelwert für den Winkel zwischen dem höchsten, hintersten Punkt am Condylus, dem Gnathion und dem Pogonion betrug für die Wildtyp Mäuse $104,6^\circ$ und für die Mutanten $106,5^\circ$. Der Winkel für die *Cbfa1* (+/-) Mäuse war also größer als für die Wildtyp Mäuse. Bei der menschlichen Mandibula könnte der Kieferwinkel als Analogie des Winkels Co-Gn-Pg im Mausmodell angesehen werden. Der Kieferwinkel ist zwischen Articulare, Gonion und Menton zu messen. Ein vergrößerter Kieferwinkel lässt auf eine posteriore Wachstumsrotation mit offener, vertikaler Schädelkonfiguration schließen. Ishii et al. (1998), sowie Jensen und Kreiborg (1995) haben im Gegensatz dazu, bei Untersuchungen an Menschen einen verkleinerten Kieferwinkel und eine anteriore Rotation verzeichnet.

Winkel Pg-Co-Gn

Der Mittelwert für den Winkel zwischen dem Pogonion, dem höchsten und hintersten Punkt am Condylus und dem Gnathion betrug für die Wildtyp Mäuse $46,5^\circ$ und für die Mutanten $44,8^\circ$. Er war insofern bei den heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Tieren geringfügig kleiner als bei den Wildtypen.

Dieser Befund lässt sich mit der Strecken- und Winkelkonfiguration des Dreiecks Pg-Gn-Co erklären: Wie in 3.1 *Mandibula Strecken* und 3.3 *Mandibula Winkel* gezeigt wurde, können sowohl der Winkel Co-Pg-Gn als auch die Strecken Pg-Co und Co-Gn als konstant angenommen werden. Der t-Test weist darauf hin, dass sich die Strecke Gn-Pg, sowie die Winkel Pg-Co-Gn und Co-Gn-Pg bei den mutierten Tieren signifikant vom Wildtyp unterscheiden. Eine Verkürzung der Strecke Gn-Pg geht folglich mit einer Verkleinerung des Winkels Pg-Co-Gn und einer Vergrößerung des Winkels Co-Gn-Pg einher. Die Ergebnisse der Strecken- und Winkelbetrachtung sind somit deckungsgleich und unterstützen die These einer posterioren Rotation der Mandibula. Dieses Dreieck (Pg-Gn-Co) ist mit den konstanten und variablen Strecken und Winkeln in Abbildung 20 verbildlicht.

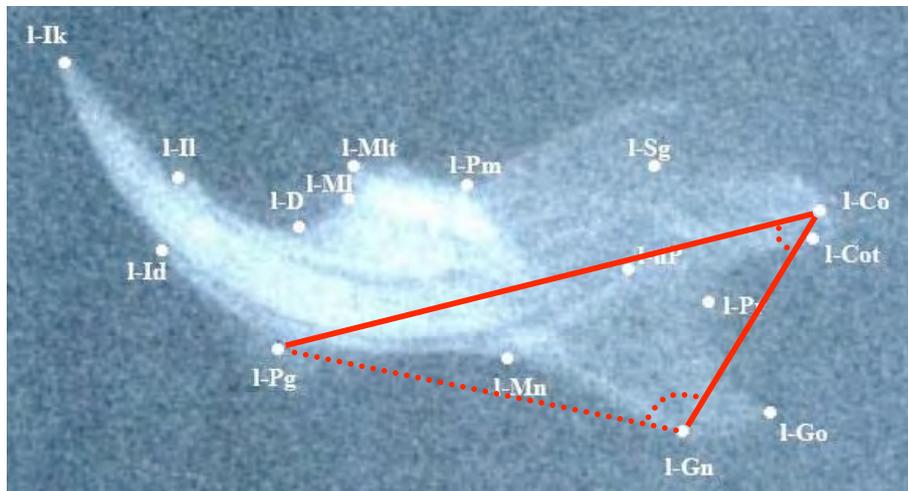


Abbildung 20: Röntgenbild der linken (l) Mandibulahälfte einer Maus. Eingezeichnet sind jene Strecken des Dreiecks Pg-Gn-Co, bei denen ein t-Test auf keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (*durchgezogene Linien*: Pg-Co und Co-Gn) und jene Strecke, bei der ein Unterschied festgestellt werden konnte (*gestrichelte Linie*: Pg-Gn). Bei den eingezeichneten Winkeln (Pg-Co-Gn und Co-Gn-Pg) konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

4.2.3 Tibia Strecken

Der durchgeführte t-Test weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen der Tibialänge (Tp-Td) bei *Cbfa1* Knockout Mäusen und dem Wildtyp hin. Diese Strecke ist in Abbildung 21 zu sehen. Bei der Untersuchung der Tibiabreite wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

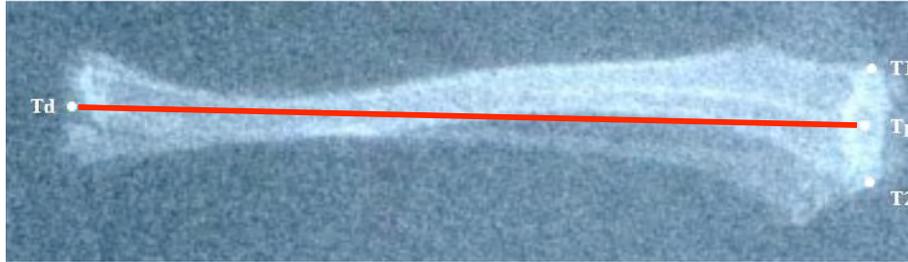


Abbildung 21: Röntgenbild der Tibia einer Maus. Eingezeichnet ist jene Strecke, bei welcher ein t-Test auf einen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (Tp-Td).

Referenzpunktbezeichnungen: Siehe *Abschnitt 2.2.4 Auswertung* (Seite 32).

Strecke Tp-Td

Der Mittelwert für die Strecke von dem Punkt Nächster Punkt zur Epiphyse bis zum Mittelpunkt der Breite an der distalen Oberfläche der Tibia betrug für die Wildtyp Mäuse 17,2 mm und für die Mutanten 16,9 mm.

Das fehlende *Cbfa1* Allel beeinflusst folglich die Längenentwicklung der Tibia. Dies untermauert die Annahme, dass bei CCD Patienten eine generalisierte Skelettdysplasie anzunehmen ist. CCD Patienten haben ein verzögertes Wachstum des Körpers und die skelettale Entwicklung setzt verspätet ein (Jensen, 1994). Otto et al. (1997) fand bei *Cbfa1* (+/-) Mäuse keine Größenunterschiede zu den Wildtypen. Das Längenwachstum der Tibia unterliegt vor allem der chondralen Ossifikation (Kim et al., 1999). Diese wird durch den Transkriptionsfaktor CBFA1 beeinflusst, indem er auf die Chondrozytenhypertrophie einwirkt. Auffällige Defizite in der Längenentwicklung der Extremitäten fanden Otto et al. (1997) vor allem bei homozygoten *Cbfa1* (-/-) Mäusen. Bei heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen scheint das zweite *Cbfa1* Allel ausreichend für die Regulationsprozesse der Chondrozytenhypertrophie zu sein. Allerdings zeigten Kim et al. (1999), dass die verschiedenen Knochen (Femur, Tibia, etc.) in unterschiedlichem Ausmaß betroffen waren.

4.3 Fazit

Diese Arbeit zeigt, dass zwar einzelne signifikante Unterschiede in Form und Größe der Mandibulae und Tibiae von Wildtyp Mäusen und heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Mäusen festgestellt werden konnten, diese aber verhältnismäßig gering ausgeprägt waren. Interessanter Weise wurde bei CCD Patienten lediglich für die Maxilla eine Hypoplasie beschrieben (Golan et al., 2004). Dieses Ergebnis untermauert also das häufige Vorkommen einer relativen mandibulären Prognathie bei CCD Patienten (Cooper et al., 2001; Ishii et al., 1998).

Auch die Veränderungen an der Tibia waren kaum auffällig. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Feststellungen vorangegangener Studien an *Cbfa1* (+/-) Mäusen (Otto et al., 1997).

In dem verwendeten Mausmodell scheint für die Wachstumsentwicklung der Mandibula und der Tibia ein einziges intaktes *Cbfa1* Allel ausreichend zu sein. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors CBFA1 auf das Mandibulawachstum ist offensichtlich geringer als auf die Entwicklung anderer Knochen, die der desmalen Ossifikation unterliegen. Ein Einfluss auf die Tibiaentwicklung war nachweisbar, jedoch vergleichsweise gering.

Diese Befunde unterstützen die These einer lokal unterschiedlichen Regulation der knöchernen Wachstumsvorgänge.

5 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor CBFA1 hat essentiellen Einfluss auf die Osteoblastenreifung und die Chondrozytenhypertrophie. Eine Mutation im Bereich des *CBFA1* Gens ist die Ursache einer Cleidocranialen Dysplasie. Ziel dieser Doktorarbeit war eine Analyse der Rolle des *Cbfa1* Gens, im Rahmen der Wachstumsentwicklung von Mandibula und Tibia.

Form und Größe der Mandibula von jeweils 22 ausgewachsenen Wildtyp Mäusen (C57BL/6) und 22 ausgewachsenen heterozygoten *Cbfa1* (+/-) Knockout Mäusen, der Arbeitsgruppe "Development & Disease" des Max Planck Instituts für Molekulargenetik (Berlin), wurden verglichen. Zur Kontrolle dienten Tibiapräparate der gleichen Tiere. Die Identifikation der Knockout Mäuse erfolgte mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion. Die Mandibulae und Tibiae der Tiere wurden freipräpariert. Anschließend wurden Röntgenbilder angefertigt und digitalisiert. Mit Hilfe des Computerprogramms OnyxCephTM des Unternehmens Image Instruments sind definierte Strecken, Flächen und Winkel vermessen worden.

Es ließen sich für die Tibiae ein geringer, für die verschiedenen Dimensionen der Mandibulae kaum auffällige Größen- oder Winkelabweichungen zwischen den genetisch veränderten Tieren und dem Wildtyp nachweisen. Bei den gemessenen Flächen war kein signifikanter Unterschied vorzufinden.

Im Bereich der Mandibula wies ein zweiseitiger t-Test, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, bei drei der 19 gemessenen Strecken und bei zwei der sieben gemessenen Winkel auf einen signifikanten Unterschied zwischen den *Cbfa1* (+/-) Mäusen und dem Wildtyp hin. Im Bereich der Tibia konnte bei einer der zwei gemessenen Strecken ein signifikanter Unterschied angenommen werden.

Im verwendeten Mausmodell scheint für die Wachstumsentwicklung der Mandibula und der Tibia ein einziges intaktes *Cbfa1* Allel ausreichend zu sein. Der Einfluss eines gestörten Transkriptionsfaktors CBFA1 auf das Mandibulawachstum ist offensichtlich geringer als auf die Entwicklung anderer Knochen. Ein Einfluss auf die Tibiaentwicklung war nachweisbar, jedoch vergleichsweise gering. Diese Befunde stützen die These einer lokal unterschiedlichen Regulation der knöchernen Wachstumsvorgänge.

6 Anhang

6.1 Übersicht über die Versuchstiere

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, standen dieser Arbeit 44 Mäuse zur Verfügung: Je 22 Wildtyp Mäuse und 22 heterozygote *Cbfa1* (+/-) Mäuse, welche ein Alter zwischen 9.5 und 12.5 Monaten erreichten.

Wildtyp			Mutante		
Nr.	Geburt	Tod	Nr.	Geburt	Tod
1701	18.08.2005	06.07.2006	1703	30.07.2005	06.07.2006
1702	18.08.2005	06.07.2006	1704	30.07.2005	06.07.2006
1705	12.08.2005	06.07.2006	1706	12.08.2005	06.07.2006
1709	12.08.2005	06.07.2006	1707	12.08.2005	06.07.2006
1711	07.07.2005	06.07.2006	1708	12.08.2005	06.07.2006
1727	18.08.2005	06.07.2006	1710	27.06.2005	06.07.2006
1728	18.08.2005	06.07.2006	1712	07.07.2005	06.07.2006
1730	18.08.2005	06.07.2006	1713	07.07.2005	06.07.2006
1737	19.08.2005	06.07.2006	1714	19.08.2005	06.07.2006
1738	19.08.2005	06.07.2006	1715	19.08.2005	06.07.2006
1739	31.07.2005	06.07.2006	1716	19.08.2005	06.07.2006
1740	31.07.2005	06.07.2006	1717	19.08.2005	06.07.2006
1743	10.08.2005	06.07.2006	1718	19.09.2005	06.07.2006
1745	19.08.2005	06.07.2006	1719	19.09.2005	06.07.2006
1746	19.08.2005	06.07.2006	1720	19.09.2005	06.07.2006
1747	17.08.2005	06.07.2006	1721	19.09.2005	06.07.2006
1749	17.08.2005	06.07.2006	1722	19.09.2005	06.07.2006
1752	06.07.2005	06.07.2006	1723	19.09.2005	06.07.2006
1755	30.07.2005	06.07.2006	1724	19.09.2005	06.07.2006
1756	24.09.2005	06.07.2006	1729	18.08.2005	06.07.2006
1757	27.06.2005	06.07.2006	1753	06.07.2005	06.07.2006
1758	27.06.2005	06.07.2006	1754	30.07.2005	06.07.2006

Tabelle 5: Identifikationsnummer, sowie Geburts- und Todesdatum aller in dieser Doktorarbeit untersuchter Wildtyp Mäuse (*links*) und Mutanten (*rechts*).

6.2 Ergebnisse der Polymerasenkettenreaktion

Um die Mäuse eindeutig als Wildtypen oder Mutanten zu identifizieren wurde eine Polymerasenkettenreaktion – wie in *Abschnitt 2.2.1 Bestimmung der Mäuse mittels PCR* beschrieben – durchgeführt.

Tabelle 6 zeigt, ab welchem Zyklus die Proben der Tiere einen definierten Schwellenwert überschritten. Ein Überschreiten des Schwellenwerts wies eindeutig auf mutierte *Cbfa1* (+/-) Mäuse hin. Proben, die mit “ - ” bezeichnet sind überschritten den Schwellenwert nicht – sie sind dem Wildtyp zuzuordnen.

<u>Maus Nr.</u>	<u>Zyklus</u>	<u>Maus Nr.</u>	<u>Zyklus</u>
1701	-	1723	36.5
1702	-	1724	36
1703	36.9	1727	-
1704	36.6	1728	-
1705	-	1729	37.4
1706	37	1730	-
1707	36.7	1737	-
1708	36.7	1738	-
1709	-	1739	-
1710	36.3	1740	-
1711	-	1743	-
1712	37.9	1745	-
1713	37.9	1746	-
1714	35.7	1747	-
1715	35.8	1749	-
1716	35.5	1752	-
1717	35.8	1753	37.7
1718	37	1754	37.1
1719	37.9	1755	-
1720	37.6	1756	-
1721	34.4	1757	-
1722	35.2	1758	-

Tabelle 6: Identifikationsnummern aller in dieser Doktorarbeit untersuchter Mäuse. “Zyklus” gibt an, ab welcher Wiederholung des Temperaturzyklus der Polymerasenkettenreaktion der Schwellenwert überschritten wurde (Mutante). Bei mit “ - ” bezeichneten Identifikationsnummern wurde der Schwellenwert nicht überschritten (Wildtyp).

Abbildungsverzeichnis

1	Ideogramm des menschlichen Chromosoms 6	9
2	Wirkungsansätze des Transkriptionsfaktors CBFA1 bei der Knochenentwicklung des Menschen	11
3	Gegenüberstellung der Ossifikation des Skeletts von Wildtyp Mäusen und mutierten <i>Cbfa1</i> ($-/-$) Mäusen	13
4	Gegenüberstellung der Ossifikation von Clavicula, Scapula, vorderer Extre- mität, Neurocranium, Zungenbein und Sternum mit Rippen bei Wildtyp Mäusen und mutierten <i>Cbfa1</i> ($+/-$) Mäusen	14
5	Mädchen mit Cleidocranialer Dysplasie	17
6	Röntgenbild mit Hyperdontie bei Cleidocranialer Dysplasie	18
7	Beispielhaftes Ergebnis einer Polymerasenkettenreaktion	28
8	Fotographische Darstellung der Präparation von Tibia und Mandibula einer Versuchsmaus	29
9	Röntgenbild von Mandibulae und Tibiae zweier Versuchsmäuse	30
10	Röntgenbild der linken Mandibula und Tibia einer Versuchsmaus mit einge- zeichneten Referenzpunkten	31
11	Beispielhafter Screenshot der Arbeitsumgebung des Programms OnyxCeph™ .	34
12	Röntgenbild Mandibula: Strecke von Diastema bis Pogonion (D-Pg)	38
13	Röntgenbild Mandibula: Strecke von Gnathion bis Pogonion (Gn-Pg)	39
14	Röntgenbild Mandibula: Strecke vom Knotenpunkt zwischen Alveolarknochen und mesialer Oberfläche des ersten Molaren bis zum posterioren Molaren (MI-Pm)	40
15	Röntgenbild Mandibula: Winkel vom höchsten, hintersten Punkt am Condylus, über Gnathion bis Pogonion (Co-Gn-Pg)	43
16	Röntgenbild Mandibula: Winkel von Pogonion, über den höchsten, hintersten Punkt am Condylus bis Gnathion (Pg-Co-Gn)	44
17	Röntgenbild Tibia: Strecke vom Mittelpunkt der Breite an der distalen Ober- fläche der Tibia bis zum nächsten Punkt zur Epiphyse (Tp-Td)	46

18	Röntgenbild Mandibula mit eingezeichneten Strecken, bei denen ein t-Test auf einen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (D-Pg, Gn-Pg und Ml-Pm)	50
19	Röntgenbild Mandibula mit eingezeichneten Winkeln, bei denen ein t-Test auf einen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (Co-Gn-Pg und Pg-Co-Gn)	52
20	Röntgenbild Mandibula: Dreieck Pg-Gn-Co	53
21	Röntgenbild Tibia mit eingezeichneter Strecke, bei welcher ein t-Test auf einen signifikanten Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp schließen ließ (Tp-Td)	54

Tabellenverzeichnis

1	Mittelwert, Standardabweichung und zugehöriges Ergebnis des t-Tests aller definierter Mandibula Strecken	37
2	Mittelwert, Standardabweichung und zugehöriges Ergebnis des t-Tests aller definierter Mandibula Flächen	41
3	Mittelwert, Standardabweichung und zugehöriges Ergebnis des t-Tests aller definierter Mandibula Winkel	42
4	Mittelwert, Standardabweichung und zugehöriges Ergebnis des t-Tests aller definierter Tibia Strecken	45
5	Geburts- und Todesdatum aller in dieser Doktorarbeit untersuchter Mäuse . .	57
6	Ergebnis der Polymerasenkettenreaktion aller in dieser Doktorarbeit untersuchter Mäuse	58

Literaturverzeichnis

Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. *Cytokine* 2003; 22: 33–41.

Aberg T, Cavender A, Gaikwad JS, Bronckers AL, Wang X, Waltimo-Siren J, Thesleff I, D'Souza RN. Phenotypic changes in dentition of RUNX2 homozygote-null mutant mice. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 131–139.

Berry DA, Lindgren BW. *Statistics: Theory and Methods*. Belmont: Duxbury Press, 1995.

Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad JS, D'Souza RN. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 2001; 101: 255–258.

Bronckers AL, Sasaguri K, Engelse MA. Transcription and immunolocalization of RUNX2/Cbfa1/Pebp2 α A in developing rodent and human craniofacial tissues: Further evidence suggesting osteoclasts phagocytose osteocytes. *Microsc Res Tech* 2003; 61: 540–548.

Charité Berlin, 2007: Patientin mit Hypermobilität der Schultern.

<http://www.charite.de/ch/medgen/forschung/my-images/osteoccdpat.jpg> (Zugriffsdatum: 10.07.2007).

Chung CJ, Tsuji K, Nifuji A, Komori T, Soma K, Noda M. Micro-CT evaluation of tooth, calvaria and mechanical stress-induced tooth movement in adult RUNX2/ Cbfa1 heterozygous knock-out mice. *J Med Dent Sci* 2004; 51: 105–113.

Cooper SC, Flaitz CM, Johnston DA, Lee B, Hecht JT. A natural history of cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 2001; 104: 1–6.

D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad JS, Cavender A, Owen M, Karsenty G, Thesleff I. Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* 1999; 126: 2911–2920.

Ducy P, Geoffroy RZV, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747–754.

Everett ET, Faust D, Hartsfield J, Ward R, 2007: Craniometric and radiographic morphology. <http://www.jax.org/phenome> (Zugriffsdatum: 20.05.2007).

Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the Osteoblast-Specific Transcription Factor, Runx2: Responsiveness to Multiple Signal Transduction Pathways. *J Cell Biochem* 2003; 88: 446–454.

Genetics Home Reference, 2009: Chromosome 6. <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=6> (Zugriffsdatum: 01.03.2009).

Golan I, Baumert U, Wagener H, Preising M, Lorenz B, Niederdellmann H, Müßig D. Evidence of intrafamilial variability of Cbfa1/RUNX2 expression in cleidocranial dysplasia – a family study. *J Orofac Orthop* 2002; 63: 190–198.

Golan I, Baumert U, Hrala BP, Müßig D. Early craniofacial signs of cleidocranial dysplasia. *J Paediatr Dent* 2004; 14: 49–53.

Hausser E. Wachstum und Entwicklung des Unterkiefers in Relation zum Gesichtsschädel. *Fortschr Kieferorthop* 1973; 34: 74–87.

Ishii K, Nielsen IL, Vargervik K. Characteristics of jaw growth in cleidocranial dysplasia. *Cleft Palate Craniofac J* 1998; 35: 161–166.

Iwamoto M, Kitagaki J, Tamamura Y, Gentili C, Koyama E, Enomoto H, Komori T, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M. RUNX2 expression and action in chondrocytes are regulated by retinoid signaling and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP). *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 6–15.

Jensen BL. Cleidocranial dysplasia: Craniofacial morphology in adult patients. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1994; 14: 163–176.

Jensen BL, Kreiborg S. Craniofacial growth in cleidocranial dysplasia – A roentgencephalometric study. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1995; 15: 35–43.

Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Suda T. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced

to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 295–299.

Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 1999; 80: 159–170.

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.

Krishnan V, Moore TL, Ma YL, Helvering LM, Frolik CA, Valasek KM, Ducy P, Geiser AG. Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/RUNX2-dependent signaling. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 423–435.

Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi JY, Rosen V, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Ryoo HM. Transient upregulation of Cbfa1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 73: 114–125.

Lee SK, Kim YS, Oh HS, Yang KH, Kim EC, Chi JG. Prenatal development of the human mandible. *Anat Rec* 2001; 263: 314–325.

Moss ML, Rankow R. The role of the functional matrix in mandibular growth. *Angle Orthod* 1968; 38: 95–103.

Mouse Phenome Database, 2007: C57BL/6. <http://phenome.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rtn=projcontent/Jax4onestrain&reqstocknum=000664&composite=yes&linktoJax4=1> (Zugriffsdatum: 10.07.2007).

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 Molec Genet* 1995; 4: 71–75.

Mundlos S, Huang LF, Selby PB. Cleidocranial dysplasia in mice. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 785: 301–302.

Mundlos S. Cleidocranial dysplasia: Clinical and molecular genetics. *J Med Genet* 1999; 36: 177–182.

Nishimura R, Hata K, Harris SE, Ikeda F, Yoneda T. Core binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone* 2002; 31: 303–312.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Bedington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen M. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89: 765–771.

Proffit WR, Fields HW, Sarver DM. *Contemporary Orthodontics*. Amsterdam: Mosby, 2006.

Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L. Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1268–1278.

Rabie AB, Tang GH, Hagg U. Cbfa1 couples chondrocytes maturation and endochondral ossification in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 109–118.

Radlanski RJ, Kjaer I, Vastardis H, Renz H. Morphometric studies on the fetal development of the human mandible. *Fortschr Kieferorthop* 1994; 55: 77–83.

Ramirez-Yanez GO, Smid RJ, Young WG, Waters MJ. Influence of growth hormone on the craniofacial complex of transgenic mice. *Eur J Orthod* 2005; 27: 494–500.

Richardson A, Deussen FF. Facial and dental anomalies in cleidocranial dysplasia: A study of 17 cases. *Int J Paediatr Dent* 1994; 4: 225–231.

Rizos M, Rocca EG, McAlarney ME, Nicolay OF, Efstratiadis S. The quantitative and qualitative analysis of the craniofacial skeleton of mice lacking the IGF-I gene. *Clin Orthod Res* 2001; 4: 206–219.

Sàndor G, Carmichael R, Coraza L, Clokie C, Jordan R. Genetic mutations in certain head and neck conditions of interest to the dentist. *J Can Dent Assoc* 2001; 67: 594–600.

Sillence DO, Ritchie HE, Selby PB. Skeletal anomalies in mice with cleidocranial dysplasia. *Am J Med Genet* 1987; 27: 75–85.

Singelton DA, Buschang PH, Behrents RG, Hinton RJ. Craniofacial growth in growth hormone-deficient rats after growth hormone supplementation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 130: 69–82.

Skillington J, Choy L, Derynck R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. *J Cell Biol* 2002; 159: 135–146.

Sudhakar S, Li Y, Katz MS, Elango N. Translational regulation is a control point in RUNX2/Cbfa1 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 616–622.

Ten Cate AR, Nanci A. Temporomandibular Joint. In: Nanci A, Hrsg. *Ten Cate's Oral Histology, Development, Structure, and Function*. St. Louis: Mosby, 2003: 376-396.

Vandeberg JR, Buschang PH, Hinton RJ. Craniofacial growth in growth hormone-deficient rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 278: 561–570.

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.

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.

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 2003; 71: 18–27.

Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit in der Kieferorthopädischen Abteilung der Zahnklinik der Universität Bonn, sowie für die immer freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der Dissertation möchte ich Herrn Prof. Dr. Jäger herzlich danken. Er stand mir in jeder Phase der Doktorarbeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Götz für seinen unterstützenden Beitrag zum Gelingen dieser Doktorarbeit. Vor allem während der praktischen Phase der Anfertigung war er mir eine unersetzliche Hilfe.

Prof. Dr. Bourauel möchte ich für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen meiner Ergebnisse herzlich danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Daratsianos. Mit seinen Ratschlägen, seinen Anregungen sowie seiner Hilfsbereitschaft und Motivation unterstützte er mich über die gesamte Zeit der Dissertation. In allen Arbeitsschritten zur Erstellung dieser Doktorarbeit war er mir eine außerordentliche Hilfe.

Für die laborchemische Unterstützung im Bereich der Identifikation des Phänotyps der Mäuse mittels Polymerasekettenreaktion möchte ich Herrn Dr. Winter ganz herzlich danken.

Herzlicher Dank gilt Frau MTA Bay für die zuvorkommende und freundliche Hilfe im Labor.

Der Firma Image Instruments danke ich für die freundliche Zusammenarbeit. Insbesondere die Anpassung des Programms OnyxCephTM an die Anatomie der verwendeten Mäuse ist dankend hervorzuheben.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir das Studium der Zahnmedizin ermöglicht haben. Ohne ihre uneingeschränkte Hilfe und ihren geduldigen Zuspruch hätte ich mein Studium nicht so erfolgreich beenden können. Da sie mir während der gesamten Studienzeit unterstützend zur Seite standen, widme ich ihnen diese Arbeit.