

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTS-
CHIRURGIE

PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES KOLLAGEN
TYP I-GEHALTS DER GINGIVA BEI DYSOSTOSIS
CLEIDOCRANIALIS**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Ach
aus Windischeschenbach

2008

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTS-
CHIRURGIE

PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG DES KOLLAGEN
TYP I-GEHALTS DER GINGIVA BEI DYSOSTOSIS
CLEIDOCRANIALIS**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Ach
aus Windischeschenbach

2008

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. T. E. Reichert

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. P. Proff

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Februar 2009

**Meiner Familie
in Dankbarkeit gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Dysostosis cleidocranialis	S. 1
1.1.1 Historische Entwicklung	S. 1
1.1.2 Makroskopische Pathologie	S. 1
1.1.3 Mikroskopische Pathologie	S. 5
1.1.4 Genetik	S. 6
1.2 Histologie der oralen Mukosa	S. 12
1.3 Fragestellung	S. 14
2. Material und Methode	S. 15
2.1 Patientenkollektiv	S. 15
2.2 Fixation, Einbettung und Schneiden	S. 16
2.2.1 Fixation und Einbettung	S. 16
2.2.2 Schneiden	S. 17
2.3 Immunhistochemische Färbung	S. 18
2.3.1 Allgemeines	S. 18
2.3.2 Färbung	S. 19
2.4 Digitale Bildanalyse	S. 23
2.5 Statistische Verfahren	S. 25
3. Ergebnisse	S. 27
3.1 Patienten mit Dysostosis cleidocranialis	S. 27
3.1.1 Einzelbefunde	S. 27
3.1.2 Gesamtbefund	S. 33
3.2 Normalkollektiv	S. 34
3.2.1 Einzelbefunde	S. 34
3.2.2 Gesamtbefund	S. 46

3.3 Vergleich der Kollagen Typ-I Verteilung zwischen Patienten mit Dysostosis cleidocranialis und Gesunden	S. 48
3.3.1 Graphische Darstellung	S. 48
3.3.2 Statistische Berechnungen	S. 49
4. Diskussion	S. 51
4.1 Diskussion von Material und Methode	S. 51
4.1.1 Material	S. 51
4.1.2 Methode	S. 51
4.2 Diskussion der Ergebnisse	S. 55
4.3 Ausblick	S. 62
5. Zusammenfassung	S. 64
6. Anhang	S. 66
6.1 Literaturverzeichnis	S. 66
6.2 Patientenkollektiv	S. 76
6.2.1 Patienten mit Dysostosis cleidocranialis	S. 76
6.2.2 Patienten der Kontrollgruppe	S. 77
6.3 Rohdaten	S. 79
6.3.1 Dysostosis cleidocranialis	S. 79
6.3.2 Normalkollektiv	S. 81
6.4 Danksagung	S. 82
6.5 Lebenslauf	S. 83

1. Einleitung

1.1 Dysostosis cleidocranialis

1.1.1 Historische Entwicklung

Bei der Dysostosis cleidocranialis handelt es sich um eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, deren früheste Manifestationen sich bereits an einem Neandertalerschädel nachweisen ließen [Greig 1933]. Die für dieses Krankheitsbild typischen Entwicklungsstörungen an den Claviculae im Sinne einer Hypo- bzw. Aplasie wurden bereits im 18. Jahrhundert von Martin beschrieben [Martin 1765]. Die ersten umfassenden Darstellungen der Symptomatik gehen jedoch auf Scheuthauer [Scheuthauer 1871] bzw. Marie und Sainton [Marie und Sainton 1898] zurück.

Letztgenannte schilderten folgende charakteristische Veränderungen:

- Übergroßer Transversaldurchmesser des Schädels verbunden mit einer verspäteten Verknöcherung der Fontanellen
- Aplasie der Claviculae
- Stark gewölbter Gaumen
- Störung der Zahnentwicklung
- Erbliche Übertragung der Defekte

1.1.2 Makroskopische Pathologie

Zusätzlich zu den oben erwähnten Auffälligkeiten bei der Dysostosis cleidocranialis wurden in den darauf folgenden Jahrzehnten alles in allem ungefähr 100 Symptome an Hand von über 700 Patienten ermittelt [Cooper 2001, Golan 2004, Baumert 2006], die sich nicht nur auf die Skelett- bzw. Zahnentwicklung bezogen, sondern nachstehende Körperregionen betreffen können:

Schädel

Männliche Patienten mit Dysostosis cleidocranialis zeigen eine normale Länge der Schädelkalotte, bei Patientinnen ist sie jedoch verkürzt. Die Breite der Schädelkalotte ist bei beiden Geschlechtern vergrößert [Jensen 1994]. Im Verhältnis zum Gesichtsschädel resultiert daraus eine brachycephale Form des Schädels [Behlfelt und Gundlach 1986].

Des Weiteren ist der Schluss der Fontanellen und auch der Schädelnähte verzögert, die in einzelnen Fällen sogar lebenslang persistieren können. Gelegentlich sind auch Schaltknochen zu beobachten [Schurch und Fleischer-Peters 1967].

Die Ausmaße der Schädelbasis sind bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis signifikant kleiner als bei Gesunden. Auch die Länge des knöchernen Nasenskeletts ist verkürzt. Teilweise tritt sogar eine Aplasie der Nasenknochen auf. Außerdem finden sich hohe und enge Öffnungen der Orbitahöhlen und ein Hypertelorismus [Jensen 1994].

Zusätzlich kann es auch zu einer Unterentwicklung des Os lacrimale und des Os zygomaticum kommen [Kargul et al. 1997].

Thorax

2

Ein weiteres Charakteristikum der Dysostosis cleidocranialis ist die Hypo- bzw. in seltenen Extremfällen sogar Aplasie der Claviculae. Häufig handelt es sich hierbei um eine Hypoplasie der Extremitas acromialis der Clavicula, aber auch ein Fehlen der Extremitas sternalis oder eine Zweiteilung der Clavicula kann beobachtet werden. Die eben angeführten Pathologien der Claviculae im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis betreffen in der Regel sowohl die linke, als auch die rechte Clavicula. Klinisch imponiert bei einigen Patienten die Fähigkeit, beide Schultern vor dem Brustkorb zu vereinigen [Mundlos 1999].

Der Thorax selbst wird als eng und glockenförmig beschrieben, der Verlauf der Rippen als kurz und schräg. Auch überzählige oder fehlende Rippen sind nicht ungewöhnlich. Zudem kommt es gelegentlich zu einer Hypoplasie der Skapulae und zu einer Schwäche der Thoraxmuskulatur, was zu Atemwegsproblemen vor allem im Kindesalter führen kann [Mundlos 1999].

Obere Extremität

Auch im Bereich der Hände zeigen sich charakteristische Veränderungen. Dazu gehört vor allem eine Verlängerung der Ossa metacarpalia II. Alle anderen Knochen im Handbereich sind verkürzt, insbesondere die medialen und distalen Phalangen der zweiten und fünften Finger [Mundlos 1999].

Wirbelsäule

Eine Skoliose tritt bei Patienten, die an Dysostosis cleidocranialis leiden, signifikant gehäuft auf [Cooper et al. 2001].

Ferner wurden kyphotische Fehlstellungen, Spaltbildungen der Wirbel mit daraus resultierender Spondylolisthesis oder eine Spina bifida occulta dokumentiert [Buurman et al. 1978].

Becken

3

Im Beckenbereich zeigen sich bei der Dysostosis cleidocranialis eine erweiterte Symphysis pubica, was auf eine verzögerte Ossifikation zurückgeführt wird, und eine Hypoplasie und Vorwärtsrotation der Beckenschaufeln mit konsekutiver Verbreiterung der Articualtio sacroiliaca. Ebenso kann eine Coxa vara häufig beobachtet werden. Dies führt dazu, dass – wie unten erwähnt - bei Patientinnen mit Dysostosis cleidocranialis eine vaginale Geburt oft nicht möglich ist [Mundlos 1999].

Untere Extremität

Bei der Dysostosis cleidocranialis finden sich gehäuft Genu valgum und Pes planus [Cooper et al. 2001].

Im Fußbereich imponieren die gleichen Veränderungen wie im Handbereich, nämlich eine Verlängerung der Ossa metatarsalia II und eine Verkürzung aller anderen Knochen, in erster Linie der medialen und distalen Phalangen der zweiten und fünften Zehe [Mundlos 1999].

Körpergröße

Patienten mit Dysostosis cleidocranialis weisen eine geschlechtsunabhängige signifikante Reduzierung ihrer Körpergröße auf [Cooper et al. 2001].

Atemwege

Aus den bereits oben erläuterten pathologischen Veränderungen im Thoraxbereich resultieren im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis gehäuft rezidivierende Sinusitiden und Infekte der oberen Atemwege [Cooper et al. 2001].

Gehörsystem

Patienten mit Dysostosis cleidocranialis berichten vermehrt über teilweisen Hörverlust und rezidivierende Ohrinfektionen vor allem in der Kindheit [Cooper et al. 2001].

Intellektuelle Entwicklung

Bezüglich der geistigen Entwicklung zeigen Dysostosis cleidocranialis-Patienten keinen Unterschied zu Gesunden [Cooper et al. 2001].

Schwangerschaft

Bei Schwangeren, die an Dysostosis cleidocranialis erkrankt sind, ist lediglich die Häufigkeit an Kaiserschnitten erhöht. Hinsichtlich der Zahl an Fehl- respektive Frühgeburten konnte kein Unterschied zu gesunden Schwangeren festgestellt werden [Cooper et al. 2001].

Zahn-, Mund- und Kieferbereich

Veränderungen im Zahn-, Mund- und Kieferbereich gehören zu den auffälligsten und häufigsten Pathologien im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis. Dabei kommt es beinahe immer zu einer Retention der Milchzähne verbunden mit einem verzögerten Durchbruch der bleibenden Zähne. Dieses Phänomen tritt im Jugendlichenalter auf und führt dazu, dass die betroffenen Patienten teilweise mehrere Jahre lang über ein Fehlen von Zähnen klagen.

Die bleibenden Zähne zeigen oftmals eine verzögerte Entwicklung der Zahnwurzel.

Ein weiteres eindrückliches Merkmal ist das Vorhandensein von überzähligen Zähnen, die natürlich die Lage und den Durchbruch der normalen Zähne stören. Es gibt Fälle, in denen von bis zu 30 zusätzlichen [Mundlos 1999] oder bis zu 63 nicht durchgebrochenen Zähnen [Yamamoto et al. 1989] berichtet wird.

Die Länge der Maxilla ist unauffällig, jedoch ist ihre anteriore und posteriore Höhe reduziert. Auch der Sinus maxillaris ist im Vergleich zu Gesunden verkleinert.

Im Bereich der Mandibula kann hinsichtlich Länge und posteriorer Höhe eine Verkleinerung festgestellt werden. Außerdem findet sich eine Inkliniation der Mandibula nach anterior [Jensen 1994] und ein verspäteter Verschluss der Symphysis mandibularis.

Der Gaumen wird als hoch, eng und stark bogenförmig gewölbt beschrieben [Kargul et al. 1997].

1.1.3 Mikroskopische Pathologie

Im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich befassten sich histologische Untersuchungen zur Dysostosis cleidocranialis in der Vergangenheit fast ausschließlich mit den Zähnen und dem Alveolarknochen (Tabelle 1).

Dabei zeigte sich im Zahnschmelz eine Hypoplasie [Yamamoto et al. 1989, Fukuta 2001] und im Bereich des Dentins verstärkt Interglobulardentin [Fukuta 2001].

Deutliche Auffälligkeiten treten im Bereich des Zements zu Tage. Bei den bleibenden Zähnen fällt das Fehlen der zellreichen Zementschicht im Bereich der Zahnwurzel auf [Lukinmaa et al. 1995, Smith 1968]. Stattdessen ist die Wurzel von azellulärem Zement bedeckt, der zur Tiefe hin immer dicker wird. Diese histologischen Merkmale finden sich jedoch nicht in der Zementschicht der Milchzähne, die somit normal zu sein scheint.

Untersuchungen des Alveolarknochens zeigen dichte und kompakte Knochenstrukturen mit groben ungenauen Trabekulae. Geflechtknochen ist in großem Ausmaß vorhanden [Lukinmaa *et al.* 1995].

Literatur	Fallzahl	Untersuchte Strukturen	Immunhistochemische Färbung	Histologisches Bild
Yamamoto (1989)	1	Schmelz	Hämatoxylin-Eosin	Schmelzhypoplasie
Fukuta (2001)	1	Schmelz	N. g.	Schmelzhypoplasie
Lukinmaa (1995)	4	Dentin	N. g.	Unverändertes Dentin
Fukuta (2001)	1	Dentin	N. g.	Vorwiegend Interglobulardentin
Gundlach (1978)	1	Zement	N. g.	Mangel an zellulärem Zement
Lukinmaa (1995)	4	Zement	N. g.	Fehlen von zellulärem Zement bei Hyperplasie des azellulären Zements
Counts (2001)	1	Zement	Van Gieson	Kein signifikanter Unterschied in der Zementverteilung
Fukuta (2001)	1	Zement	N. g.	Fehlen von zellulärem Zement
Zou (2003)	11	Zement	Hämatoxylin-Eosin	Kein signifikanter Unterschied in der Zementverteilung
Dard (1993)	N. g.	Alveolar-knochen	N. g.	Fehlende Knochenresorption während der Dentition
Lukinmaa (1995)	4	Alveolar-knochen	N. g.	Überschuss an Geflechtknochen

Tabelle 1: Bisherige histologische Untersuchungen von Zähnen und Kieferknochen bei Dysostosis cleidocranialis. N. g.: nicht genannt

1.1.4 Genetik

Bei der Dysostosis cleidocranialis handelt es sich - wie bereits in Gliederungspunkt 1.1.1 erwähnt - um eine autosomal dominant vererbte Krankheit. Jedoch sind auch schon vereinzelt Fälle mit rezessivem Erbgang beobachtet worden [Goodman *et al.* 1975]. Die Häufigkeit ihres Vorkommens kann nur schwer angegeben werden, da die Dysostosis cleidocranialis wegen ihrer im Vergleich zu anderen Skelettdysplasien relativ milden

Krankheitssymptome nicht immer diagnostiziert wird. Trotzdem wird ihre Prävalenz auf eins zu einer Million geschätzt [Chitayat *et al.* 1992, Mehta und Verma 1992, Shaikh und Shusterman 1998, Baumert 2006].

1.1.4.1 Meilensteine in der Entdeckung der genetischen Ursachen der Dysostosis cleidocranialis

Lange Zeit war die genaue Ursache des der Dysostosis cleidocranialis zu Grunde liegenden Gendefekts unklar. Erst im letzten Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts kristallisierte sich die zentrale Rolle des RUNX2-Gens bei der Entwicklung einer Dysostosis cleidocranialis heraus. Mit Hilfe der Fortschritte der modernen Molekularbiologie war es möglich, Patienten mit Dysostosis cleidocranialis und deren Familienangehörige auf Veränderungen im Erbgut hin zu untersuchen. Die dabei festgestellten Deletionen gaben keinerlei Hinweis auf eine Heterogenität der jeweiligen defekten Genloci. Somit konnte der für die Entstehung der Dysostosis cleidocranialis entscheidende Genabschnitt auf ein zwei Megabasen langes Segment zwischen dem TCTE1- und dem MUT-Gen begrenzt werden. Damit war es verschiedenen Forschergruppen unabhängig voneinander möglich, den für die Dysostosis cleidocranialis verantwortlichen Gendefekt auf Chromosom 6p21 zu lokalisieren, wobei dieser definierte DNA-Abschnitt für den RUNX2-Transkriptionsfaktor codiert [Mundlos *et al.* 1995, Feldman *et al.* 1995, Gelb *et al.* 1995, Ramesar *et al.* 1996].

Darüber hinaus konnten Otto und Mitarbeiter nachweisen, dass bei RUNX2-knock-out-Mäusen eine Umwandlung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Osteoblasten vollständig fehlt und somit sowohl die intramembranöse, als auch die enchondrale Ossifikation komplett ausbleibt. Bezüglich des RUNX2-Gens heterozygote Mäuse zeigten hingegen charakteristische Skelettanomalien, die mit denen der Dysostosis cleidocranialis identisch waren [Otto *et al.* 1997].

Zusätzlich wurde bei Mäusen, deren Erbgut durch Strahleneinwirkung verändert war, und die danach die Symptome der Dysostosis cleidocranialis aufwiesen, ebenfalls eine Deletion in einem RUNX2-Allel als Ursache für die Symptome ermittelt [Otto *et al.* 1997].

Daraufhin war es Mundlos möglich, eine heterozygote Mutation des RUNX2-Gens als Ursache für die Dysostosis cleidocranialis zu identifizieren [Mundlos *et al.* 1997].

1.1.4.2 Struktur, Funktion und Regulation des RUNX2-Transkriptionsfaktors

Der RUNX2-Transkriptionsfaktor wird zu den so genannte CBF (= core binding factor)-Transkriptionsfaktoren gezählt. Darunter versteht man eine Gruppe von heterodimeren Proteinen bestehend aus zwei Untereinheiten, das bedeutet einer DNA-bindenden α -Einheit und einer nicht DNA-bindenden β -Einheit. Die α -Untereinheit wird bei Säugetieren von drei verschiedenen Genen codiert, nämlich dem Cbfa1- (= RUNX2), Cbfa2- und Cbfa3-Gen. Die daraus synthetisierten Genprodukte haben eine 128 Aminosäuren lange runt-Domäne gemeinsam [Mundlos 1999] und erfüllen verschiedene Aufgaben:

- Cbfa1/RUNX2 spielt eine wichtige Rolle unter anderem bei der Osteogenesis [Otto et al. 1997]
- Cbfa2 ist wichtig im Rahmen der Hämatopoiesis [Okuda et al. 1996, Wang et al. 1996]
- Cbfa3 ist bedeutend für die Organogenesis und Funktion des Gastrointestinaltrakts [Li et al. 2002]

Im Folgenden wird auf die Struktur und die Funktion ausschließlich des RUNX2-Genprodukts eingegangen, da nur dieses bei der Dysostosis cleidocranialis von Relevanz ist.

Struktur

Beim RUNX2-Protein handelt es sich um ein 528 Aminosäuren langes Molekül, dessen Aufbau in der folgenden Schemaskizze veranschaulicht werden soll.

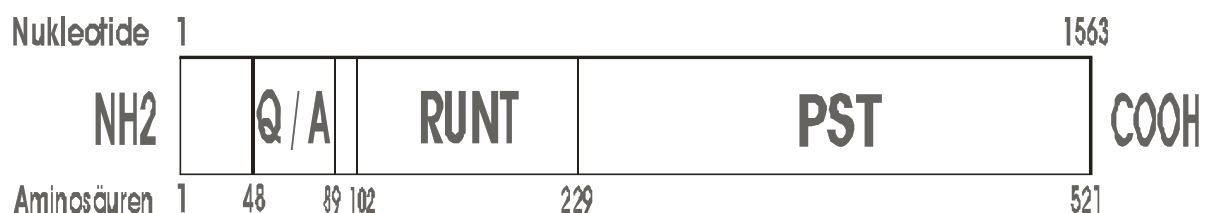


Abb. 1: Schemazeichnung des RUNX2-Proteins

Abbildung 1 verdeutlicht, dass das RUNX2-Protein am N-terminalen Ende eine so genannte Q/A-Domäne bestehend aus Polyglutamin- und Polyalanin-Wiederholungen besitzt. Anschließend folgt die allen Cbfa-Transkriptionsfaktoren gemeinsame runt-Domäne. Am C-terminalen Ende befindet sich schließlich eine aus Prolin, Serin und Threonin bestehende PST-Domäne [Zhou *et al.* 1999].

Die Q/A-Domäne sowie die ersten 19 N-terminalen Aminosäuren fungieren als Aktivatoren. Die runt-Domäne ist in der Lage, DNA zu binden. Die C-terminale PST-Domäne wirkt sowohl als Aktivator, als auch als Inhibitor, wohingegen die letzten C-terminalen Aminosäuren, der so genannte VWRPY-Abschnitt, ausschließlich die Aufgabe eines Repressors erfüllen [Thirunavukkarasu *et al.* 1998].

Funktion

Das RUNX2-Protein ist in der Lage, OSE2 (= aktivierende Elemente des Osteocalcin-promotors) zu binden [Ducy und Karsenty 1995]. Diese OSE2-Struktur wurde in den Promotorregionen von allen wichtigen Osteoblastengenen gefunden, wie zum Beispiel dem Osteocalcin-Gen, dem BSP-Gen, dem Osteopontin-Gen und auch dem Kollagen Typ I-Gen [Ducy *et al.* 1999]. In verschiedenen Experimenten konnte der Einfluss des RUNX2-Transkriptionsfaktors auf die Expression dieser Gene und auch auf die Differenzierung von Osteoblasten nachgewiesen werden. Es zeigte sich beispielsweise, dass durch erzwungene Expression von RUNX2-Protein Osteocalcin und BSP (bone specific protein) auch in nichtosteoblastischen Zellen wie Fibroblasten exprimiert wird. Zudem konnte eine RUNX2-Expression nicht nur in den Osteoblasten, sondern auch in ihren Vorläuferzellen ermittelt werden [Ducy *et al.* 1997].

Aus diesen Erkenntnissen lässt sich die zentrale Rolle des RUNX2-Proteins bei der Differenzierung der Osteoblasten und somit bei der Osteogenesis ableiten [Ducy 2000].

Die Rolle des RUNX2-Proteins beschränkt sich jedoch nicht nur auf die ausdifferenzierenden Osteoblasten. Auch in bereits ausgereiften Osteoblasten konnte eine Expression von RUNX2-Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden [Ducy *et al.* 1997]. Außerdem beeinflusst das RUNX2-Protein – wie bereits oben erwähnt – auch das Osteocalcin, ein bedeutender Marker von ausgereiften Osteoblasten.

Somit ist der RUNX2-Transkriptionsfaktor auch entscheidend an der Aufrechterhaltung der Osteoblastenfunktion beteiligt [Ducy 2000].

Des Weiteren wird dem RUNX2-Protein auch eine Mitwirkung an der Differenzierung von Chondrozyten zugesprochen. Bei RUNX2-knock-out-Mäusen fehlten in den proximalen Extremitätenknochen wie Humerus und Femur die für die enchondrale Ossifikation typischen hypertrophen Chondrozyten. Auch das von diesen Zellen normalerweise synthetisierte Kollagen Typ X war nicht vorhanden. In den distalen Extremitätenknochen (Radius, Ulna, Tibia, Fibula) konnten zwar hypertrophe Chondrozyten und Kollagen Typ X nachgewiesen werden, jedoch war ihre Zahl bzw. Menge im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert [Ducy 2000].

Überdies beeinflusst der RUNX2-Transkriptionsfaktor nicht nur die Neusynthese, sondern auch den Abbau des Kollagens. Dies geschieht über die Kollagenase 3, eine Metalloproteinase, da sich die oben bereits angeführten OSE2-Elemente auch in der Promotorregion des Kollagenase 3-Gens befinden [Pendás *et al.* 1997]. Es konnte herausgefunden werden, dass RUNX2-knock-out-Mäuse keine nennenswerten Mengen an Kollagenase 3 exprimieren, und somit der Kollagenabbau reduziert ist [Jiménez *et al.* 1999].

Regulation

10

Auf der Ebene der RUNX2-Expression gibt es verschiedene Regulationsfaktoren:

- Mäuse, denen die Transkriptionsfaktoren Msx2 und Bapx1 fehlen, zeigen auch eine sehr geringe RUNX2-Expression [Tribiolo und Lufkin 1999, Satokata *et al.* 2000].
- Mäuse, denen der Transkriptionsfaktor Hoxa-2 fehlt, zeigen eine überschießende RUNX2-Expression, was zu der Vermutung führt, dass Hoxa-2 die RUNX2-Expression hemmt [Kanzler *et al.* 1998].
- Mäuse mit einer Mutation des FGF-Rezeptors 1 zeigen Charakteristika des Pfeiffer-Syndroms, nämlich einen vorzeitigen Schluss der Schädelnähte. Dieser Defekt ist wiederum verbunden mit einer erhöhten RUNX2-Expression [Zhou *et al.* 2000].

Für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie dem RUNX2 ist aber nicht nur deren Expression, sondern auch deren posttranskriptionelle Modifikation von entscheidender Bedeutung.

Im Falle des RUNX2-Proteins scheint eine Phosphorylierung mittels der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) eine wichtige Rolle zu spielen [Xiao *et al.* 2000]. Diese Reaktionskaskade wird möglicherweise durch Kollagen Typ I über $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 1\beta 1$ -Integrine in Gang gebracht. Dadurch erhöht sich die Affinität des RUNX2-Faktors zur DNA [Xiao *et al.* 1998].

Andererseits wird über eine Aktivierung des cAMP-Reaktionswegs eine Proteolyse induziert, was den RUNX2-Spiegel in Osteoblasten reduziert [Tintut *et al.* 1999].

Des Weiteren kann eine Abnahme der DNA-Bindungsfähigkeit des RUNX2-Proteins nach Gabe von Glukokortikoiden beobachtet werden [Wieser *et al.* 1995], was mit den Osteoporose auslösenden Fähigkeiten von Glukokortikoiden durchaus vereinbar ist.

Auch Protein-Protein-Wechselwirkungen müssen bei der Regulation des RUNX2-Transkriptionsfaktors in Betracht gezogen werden. Zum einen hemmt TLE2 über die VWRPY-Sequenz die RUNX2-Aktivität [Thirunavukkarasu *et al.* 1998], zum anderen inhibiert HES1 die RUNX2-Aktivität über den PST-Abschnitt [Stifani *et al.* 1992, McLarren *et al.* 2000], wobei diese beiden Kontrollmechanismen miteinander konkurrieren.

1.2 Histologie der oralen Mukosa

Die orale Mukosa kleidet kontinuierlich die Mundhöhle aus, und geht im Bereich der Lippen in die Dermis und im Bereich des Isthmus faucium in die Pharynxschleimhaut über. Mit Ausnahme der Zunge, die entodermaler Herkunft ist, entwickelt sich die orale Mukosa aus ektodermalem Gewebe [*Schroeder 1992*].

Die Mundschleimhaut wird in drei Untergruppen aufgeteilt:

- Mastikatorische Schleimhaut an Gingiva und hartem Gaumen
- Auskleidende Schleimhaut an Lippen, Wangen, Mundboden, Zungenunterseite und weichem Gaumen
- Spezialisierte Schleimhaut an der dorsalen Zungenoberfläche [*Orban und Sicher 1945, Melfi 1994*]

Die Schleimhaut der Mundhöhle besteht normalerweise aus einer epithelialen Schicht und einer subepithelialen Bindegewebsschicht.

Dabei ist das Epithel mehrschichtig und besitzt an Gingiva und am harten Gaumen ein Stratum corneum. An der Oberfläche des Gingivaepithels finden sich platte Zellen mit Resten pyknotischer Kerne. Hierbei spricht man von Parakeratinisation. Am harten Gaumen zeigt das Epithel an seiner Oberfläche kernfreie Zellen (Orthokeratinisation).

Zelluläre Bestandteile des Epithels sind Melanozyten, Merkelzellen, Langerhanszellen und auch Lymphozyten [*Schiebler 1996*].

Das subepitheliale Bindegewebe - die Lamina propria - besteht zu 60-65 % aus Kollagen, insbesondere Kollagen Typ I, aber auch Kollagen Typ III, V und VI. Die kollagenen Fasern bilden hierbei charakteristische Bündel aus.

Im Bereich der Gingiva unterscheidet man eine Haupt- und eine Nebengruppe. Zur Hauptgruppe gehören die

- dentogingivalen Fasern (vom supraalveolären Wurzelzement radiär zur Gingiva)
- alveologingivalen Fasern (vom Alveolarknochen zur Gingiva)
- dentoperiostalen Fasern (vom supraalveolären Wurzelzement über Alveolarkamm hinweg zum Periost)
- zirkulären Fasern (umgeben kreisförmig den supraalveolären Abschnitt der Zahnwurzel)

- transseptalen Fasern (verbinden in mesiodistaler Richtung die supraalveolären Zementabschnitte der Zahnwurzel) [*Hassell 1993, Schroeder 1992*].

Die Nebengruppe bilden die

- periostogingivalen Fasern (vom Periost in darüberliegende Gingiva)
- interpapillären Fasern (verbinden linguale/palatinale und vestibuläre Gingivapapillen)
- transgingivalen und intergingivalen Fasern (unterstützen die zirkulären Fasern)
- interzirkulären Fasern (verknüpfen zirkuläre Fasern benachbarter Zähne)
- semizirkulären Fasern (umgeben halbkreisförmig den supraalveolären Abschnitt der Zahnwurzel) [*Hassell 1993, Schroeder 1992*].

Der übrige Teil der Lamina propria setzt sich zusammen aus Fibroblasten (ca. 5 %), anderen Zellen (Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen, Erythrozyten usw.), Gefäßen, Nerven und Grundsubstanz wie beispielsweise Glykoproteine und Proteoglykane [*Narayanan und Page 1983, Schroeder et al. 1973*].

Unter den zellulären Bestandteilen der Lamina propria nehmen die Fibroblasten eine herausragende Stellung ein, da sie zwei Drittel der Zellen ausmachen. Ihre Hauptaufgabe ist die Synthese von Kollagen und von Grundsubstanz. Zusätzlich produzieren sie auch Kollagenasen, die in der Lage sind, die extrazelluläre Matrix wieder abzubauen [*Birkedal-Hansen 1976*]. Sie nehmen also eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ein.

1.3 Fragestellung

Im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis sind Veränderungen im Zahn-, Mund- und Kieferbereich besonders ausgeprägt. Neben den schon unter Gliederungspunkt 1.1.2 angeführten Auffälligkeiten imponiert vor allem die derbe wachsartige Konsistenz der oralen Mukosa [*Buurmann 1978*].

Wie bereits unter Gliederungspunkt 1.1.3 erläutert wurde, konzentrierten sich in der bisherigen Literatur histologische Untersuchungen zur Dysostosis cleidocranialis ausschließlich auf mögliche Veränderungen von Zähnen und Knochengewebe (Tabelle 1). Es finden sich jedoch keinerlei Analysen zur Zusammensetzung der derben, offensichtlich pathologisch veränderten Mundschleimhaut.

Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, dass der RUNX2-Transkriptionsfaktor sowohl Synthese, als auch Abbau des Kollagen Typ I, dem Hauptbestandteil der oralen Mukosa, beeinflusst, wurde in dieser als Pilotstudie ausgelegten Arbeit der Gehalt an Kollagen Typ I in der oralen Mukosa von Patienten mit Dysostosis cleidocranialis an Hand von immunhistochemischen Färbungen ermittelt und mit dem Gehalt an Kollagen Typ I von Gesunden verglichen. Damit soll eruiert werden, ob die wachsartige Konsistenz der Gingiva mit einem erhöhten Anteil an Kollagen Typ I korreliert.

2. Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Untersuchung wurden insgesamt 27 Gewebeproben von Patienten mit Dysostosis cleidocranialis mit 17 Gewebeproben von Gesunden verglichen. Als Auswahlkriterium für die Zuordnung in das Kontrollkollektiv galt dabei das Nichtvorliegen einer Dysostosis cleidocranialis.

Die Gruppe der Dysostosis cleidocranialis-Patienten bestand aus sechs Personen (drei weiblich und drei männlich) im Alter zwischen 10 und 22 Jahren (Durchschnittsalter 17 Jahre), das Normalkollektiv aus zwölf Personen (fünf weiblich und sieben männlich) im Alter zwischen 10 und 75 Jahren (Durchschnittsalter 32 Jahre).

Bei den untersuchten Gewebeproben handelte es sich um Proben der Gingiva aller vier Quadranten und des harten Gaumens (siehe Anhang 6.2). Alle Proben wurden im Rahmen von Operationen an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. Reichert) zwischen November 2000 und Juli 2003 gewonnen.

2.2 Fixation, Einbettung und Schneiden

2.2.1 Fixation und Einbettung

Jede Gewebeprobe enthält nur eine gewisse Menge an Antigen, das vom jeweiligen Antikörper erkannt und somit angefärbt werden kann. Da jeder Arbeitsschritt einen Teil des Antigens irreversibel schädigt, ist bei immunhistochemischen Färbungen ein besonders schonendes Vorgehen von Bedeutung. Auch die Fixation muss in diesem Zusammenhang betrachtet werden.

Vornehmliches Ziel der Fixation ist es, das Antigen im Gewebe zu binden, um damit ein Auswaschen aus dem Gewebe zu verhindern, was eine immunhistochemische Anfärbung unmöglich machen würde. Außerdem soll die Fixation dafür sorgen, dass das Antigen für den Antikörper zugänglich gemacht wird [Bourne 1989]. Jedoch sollen durch die Fixation nicht nur das Antigen, sondern auch die in der Probe vorhandenen Zellstrukturen fixiert werden. Nur so kann die Färbung mit der Morphologie in Einklang gebracht werden.

Aber nicht nur zu schwaches, sondern auch zu starkes Fixieren kann eine Färbung durch Maskierung des Antigens unmöglich machen. Des Weiteren besteht die Gefahr, dass vor allem größere und komplexere Antigene durch das Fixieren in ihrer Struktur verändert werden, und somit der Antikörper nicht mehr an das Antigen binden kann.

Aus diesen Vorüberlegungen ergeben sich einige wichtige Hinweise, die bei einer optimalen Fixation beachtet werden müssen [Bourne 1989]:

- Die Gewebeproben sollten so schnell wie möglich in die Fixationslösung eingelegt werden.
- Die Gewebeproben sollten nicht größer als 2 x 4 cm sein, um eine komplette Penetration der Gewebestücke mit der Fixationslösung zu ermöglichen.
- Überschüssige Fixationslösung muss nach der Fixation sorgfältig abgewaschen werden, um Färbeartefakte zu vermeiden.

In der vorliegenden Untersuchung fiel bei der Suche nach einem geeigneten und schonenden Fixativum die Wahl auf die Schaffer'sche Lösung (9 % Paraformaldehyd, 60 % Ethanol in 150 mM PBS). Darin wurden die zu untersuchenden Gewebeproben sofort nach der Entnahme für 24 Stunden eingelegt, und anschließend in Paraffin eingebettet.

2.2.2 Schneiden

Zuerst wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte der Firma Kunz instruments bis auf - 20 °C abgekühlt und anschließend mit einem Mikrotom der Firm Mikrom GmbH (Typ HM 400 R) bei einer eingestellten Dicke von einem Mikrometer insgesamt sechs Schnitte angefertigt.

Die Schnitte wurden kurz in ein warmes Wasserbad gelegt, auf Objektträger Typ SuperFrost®Plus der Firma Menzel-Gläser aufgebracht und später im Inkubationsschrank bei 37 °C über Nacht fixiert.

2.3 Immunhistochemische Färbung

2.3.1 Allgemeines

Für die Beantwortung der oben erläuterten Fragestellung eignet sich besonders die immunhistochemische Färbung mit Hilfe von präformierten löslichen Enzym-anti-Enzym-Immunkomplexen bestehend aus dem Enzym/Antigen und den dagegen gerichteten Antikörpern. Da als Enzym alkalische Phosphatase eingesetzt wurde, wurde nach der so genannte APAAP (= alkalische Phosphatase – anti – alkalische Phosphatase) – Technik vorgegangen.

Diese Enzym-anti-Enzymkomplex-Methoden gehören zu den empfindlichsten immunhistochemischen Techniken überhaupt und liefern bei paraffineingebetteten Proben bemerkenswerte Resultate [Boenisch 1989]. Vorteile dieses Verfahrens sind zum einen das schonende Anfärben der Gewebeproben im Vergleich zur chemischen Konjugation, da die natürliche Affinität zwischen dem Antigen und seinem spezifischen Antikörper ausgenutzt wird, und zum anderen die höhere Sensitivität durch die große Anzahl an Enzymmolekülen, die pro Antigen verfügbar sind.

Allen diesen Enzym-anti-Enzymkomplex-Techniken liegt folgende Reaktionsabfolge zu Grunde:

1. Unkonjugierter Primärantikörper
2. Unkonjugierter Sekundärantikörper (auch Brückenantikörper genannt)
3. Löslicher Enzym-anti-Enzymkomplex
4. Substratlösung [Boenisch 1989]

Wichtig dabei ist, dass der Primärantikörper und der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes von derselben Spezies stammen. Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass der Sekundärantikörper gegen diese Spezies gerichtet ist, um Primärantikörper und Enzym-Immunkomplex miteinander verbinden zu können. Außerdem ist es zwingend erforderlich, dass der Sekundärantikörper im Überschuss vorliegt, damit jeweils ein Fab-Fragment den Primärantikörper und ein Fab-Fragment den Enzym-Immunkomplex binden kann.

Der schematische Aufbau des so erhaltenen Reaktionsproduktes ist aus Abbildung 2 ersichtlich.

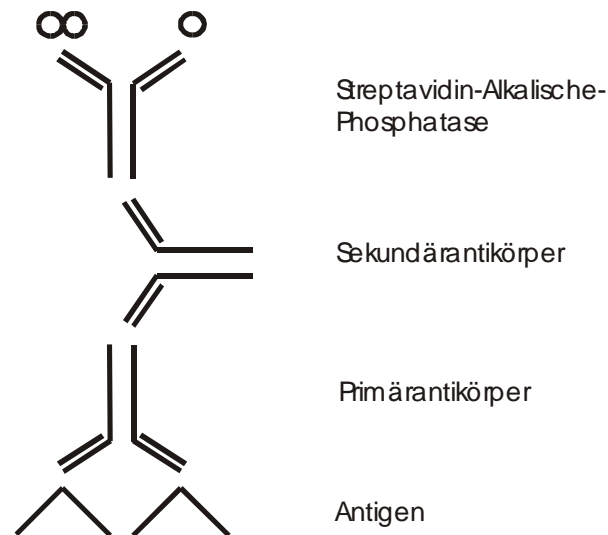


Abb. 2: Schemaskizze des APAAP-Komplexes

2.3.2 Färbung

Um das zu bestimmende Kollagen Typ I lichtmikroskopisch sichtbar zu machen, wurden die Schnitte nach der APAAP-Technik mit Fast Red nach folgendem Färbeprotokoll angefärbt:

19

1. Entparaffinierung: Zweimal Xylol (Art.-Nr.: 8.18754.1000, Firma Merck, Darmstadt) für jeweils 10 Minuten
2. Rehydratisierung mittels Ethanol (Art.-Nr. K928.1, Firma Roth, Karlsruhe)
 - a, Zweimal 100 %iger Ethanol für jeweils 5 Minuten
 - b, Zweimal 96 %iger Ethanol für jeweils 5 Minuten
 - c, Zweimal 70 %iger Ethanol für jeweils 5 Minuten
3. Objektträger mit PBS-Puffer (Art.-Nr. P 4417, Firma Sigma Taufkirchen) waschen und 5 Minuten stehen lassen
4. Enzymaktivierung: Pepsin (Art.-Nr.: 401602599, Firma Quartett, Berlin) für 117 Minuten bei 37 °C im Brutschrank
5. Dreimal waschen mit Leitungswasser für jeweils 5 Minuten
6. Einmal waschen mit PBS-Puffer und 5 Minuten stehen lassen
7. Blockierung der unspezifischen Proteinbindung: 2 Tropfen Proteinblockierungs-Reagenz pro Schnitt, Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
8. Einmal mit PBS-Puffer waschen und Flüssigkeit vom Objektträger abtropfen

9. Primärantikörper (Art.-Nr.: 031510101, Firma Quartett, Berlin): Verdünnung 1 : 20 mit BSA-PBS-Puffer (Art.-Nr. BIO 15-M 35, Firma Manfred Fremdling, Furth/ Ndb.), 50 µl pro Schnitt, Inkubation bei Raumtemperatur in feuchter Kammer über Nacht
10. Dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer waschen, Flüssigkeit abtropfen
11. Sekundärantikörper: 2 Tropfen pro Schnitt, Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
12. Dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer waschen, Flüssigkeit abtropfen
13. Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex: 2 Tropfen pro Schnitt, Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
14. Dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer waschen, Flüssigkeit abtropfen
15. Sekundärantikörper: Verdünnung 1 : 2 mit BSA-PBS-Puffer, 50 µl pro Schnitt, Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
16. Dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer waschen, Flüssigkeit abtropfen
17. Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex: 2 Tropfen pro Schnitt, Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
18. Dreimal 5 Minuten mit PBS-Puffer waschen, Flüssigkeit abtropfen
19. Fast Red-Chromogen-Lösung (Art.-Nr.: 300140300, Firma Quartett, Berlin)
 - a, Muss als Arbeitslösung frisch angesetzt werden:
 - * Eine Fast Red-Tablette in 2 ml Puffer für Chromogen lösen
 - * 1 bis 3 Minuten schütteln
 - * Ungelöste Partikel durch Whatman-Papier filtern
 - b, Ist innerhalb von 30 Minuten zu verwenden
 - c, Fast Red ist giftig => unter dem Abzug arbeiten
 - d, 100 µl pro Schnitt, Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Kammer
20. Dreimal mit Millipore-Wasser waschen, Flüssigkeit abtropfen
21. Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Lösung (Art.-Nr. GHS-3-32, Firma Sigma, Taufkirchen), Verdünnung 1 : 50 auf 100 ml mit Millipore-Wasser, Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Küvette
22. Mehrmals mit Millipore-Wasser spülen
23. Eindeckeln der Schnitte mit Entellan (Art.-Nr. 1.07960.0500, Firma Merck, Darmstadt)

Der hierbei zur Anwendung kommende ABC-AP Kit mit Fast Red der Firma Quartett (Berlin) stellte die markierten Strukturen rot dar (Abbildung 3a). Als Primärantikörper wurde ein

monoklonaler Mausantikörper gegen Kollagen Typ I ebenfalls von der Firma Quartett (Berlin) eingesetzt.

Das Problem der unspezifischen Hintergrundfärbung durch Anlagerung von Proteinen an stark geladene Kollagen- oder Bindegewebsbestandteile wurde durch Zugabe eines Proteinblockierungs-Reagenz, das im Färbekit der Firma Quartett (Berlin) enthalten ist, gelöst. Dabei handelt es sich um eine neutrale Proteinlösung, die noch vor dem Primärantikörper zugegeben wird. Diese bindet sich an die geladenen Strukturen und verhindert somit eine Anlagerung des Primärantikörpers an eben diese. Die Gefahr einer weiteren unerwünschten Hintergrundfärbung durch Bindung des Sekundärantikörpers an das Proteinblockierungs-Reagenz wird dadurch gebannt, dass Sekundärantikörper und Proteinblockierungs-Reagenz von derselben Spezies stammen.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden alle Schnitte gegengefärbt. Dafür eignet sich bei der APAAP-Methode besonders die Hämatoxylin-Gegenfärbung [*Rainbow 1996*].

Das oben beschriebenen Vorgehen bei der hier zur Anwendung gekommenen immunhistochemischen Färbung nach der APAAP-Methode entwickelte sich aus einer gezielten Modifikation des von der Firma Quartett (Berlin) vorgeschlagenen Färbeschemas. Im Einzelnen wurden folgende Schritte des Färbeprotokolls modifiziert:

- Die Dauer der Enzymdauung mit Pepsin wurde in 15 Minuten-Schritten zwischen 15 und 120 Minuten variiert. Eine weitere Eingrenzung der optimalen Einwirkzeit in 5-Minuten-Schritten zwischen 105 und 120 Minuten erbrachte die bestmögliche Färbung bei Enzymdauung mit 115 und 120 Minuten, so dass letztendlich die Einwirkzeit des Pepsins auf 117 Minuten festgesetzt wurde.
- Die Verdünnung des Primärantikörpers wurde mit Verdünnungen 1:10, 1:20 und 1:30 getestet. Dabei wurden bei den Verdünnungen 1:10 und 1:20 zusammen mit einer Inkubationszeit über Nacht die besten Ergebnisse erzielt. Auf Grund des hohen Preises des Primärantikörpers fiel die Entscheidung zu Gunsten der Verdünnung 1:20.
- Durch zweimaliges Zupipettieren des Sekundärantikörpers und des Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplexes konnte die Färbung intensiviert werden.
- Die Einwirkzeit der Fast Red-Chromogen-Lösung wurde von fünf auf 20 Minuten ausgedehnt.

Von den insgesamt sechs Schnitten einer Gewebeprobe wurden fünf nach der APAAP-Methode gefärbt. Der sechste Schnitt wurde anstatt mit dem Primärantikörper nur mit BSA-PBS-Puffer inkubiert und fungierte somit als Negativprobe (Abbildung 3b).

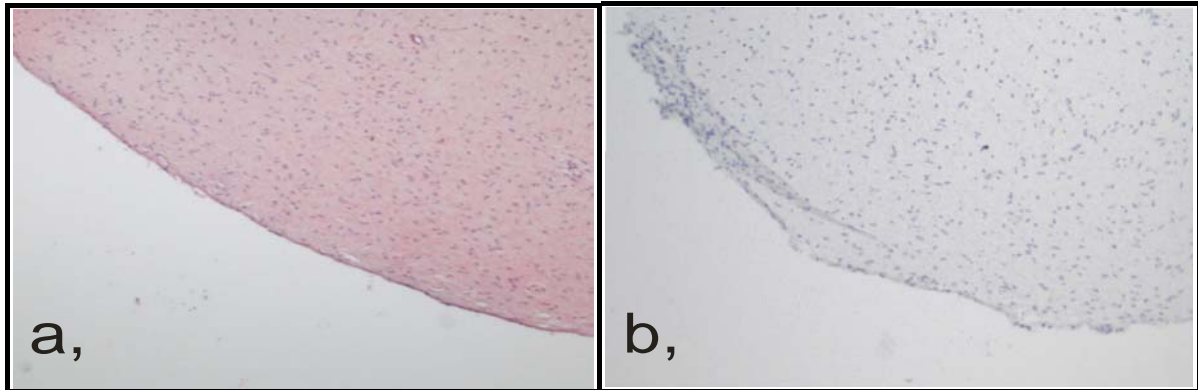


Abb. 3: a, Färbung mit Fast Red nach Inkubation mit dem Primärantikörper.
b, Negativkontrolle

Alle sechs Schnitte einer Probe wurden zeitgleich mit denselben Reagenzien bzw. Färbelösungen unter denselben Reaktionsbedingungen inkubiert, um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

2.4 Digitale Bildanalyse

Die einzelnen Schnitte wurden mit Hilfe folgender Komponenten abfotografiert und vermessen:

- Mikroskop BX 61 der Firma Olympus (Hamburg)
- Automatischer Motortisch L-Step 12 der Firma Märzhäuser (Wetzlar)
- CCD-Kamera CC-12 der Firma Soft Imaging Systems (Münster)
- Handelsüblicher PC
- Bildanalysesoftware analySIS® Version 3.2 der Firma Soft Imaging Systems (Münster)



Abb. 4: Foto des Bildaufnahmesystems

Zuerst wurde jeder Schnitt unter dem Mikroskop mit dem Objektiv (vierfache Vergrößerung) betrachtet und seine Mitte im Sichtfeld des Mikroskops zentriert.

Die eigentliche Bildaufnahme erfolgte dank des Motortisches und der Bildanalysesoftware vollautomatisch. Nachdem ein Weißabgleich durchgeführt wurde, musste dem System nur noch vorgegeben werden, in wie viele Einzelbilder der Schnitt abhängig von seiner Größe zerlegt werden sollte. Die Funktion MIA (Multiple Image Alignment) der Bildanalysesoftware war zusammen mit dem Motortisch der Firma Märzhäuser (Wetzlar) nun in der Lage, die bis zu 30 Einzelbilder unter standardisierten Bedingungen selbsttätig abzufotografieren und zu einem Gesamtbild zusammenzusetzen.

Da die zu untersuchenden Strukturen durch die hier zur Anwendung kommende immunhistochemische Färbung nach der APAAP-Fast Red-Methode rot dargestellt wurden, musste mit Hilfe des Programms analySIS® der Firma Soft Imaging Systems (Münster) der Rotkanal des Gesamtbildes extrahiert und in ein Grauwertbild mit 256 Graustufen konvertiert werden.

Im nächsten Schritt wurde in dem jeweiligen Grauwertbild ein geeigneter Abschnitt definiert, und anschließend die Verteilung der Grauwerte für diesen Bereich mittels eines Histogramms bestimmt. Dadurch konnten etwaige Färbeartefakte, die die Messung verfälschen könnten, ausgeschaltet werden. Gleichzeitig wurde die Fläche der markierten Abschnitte in μm^2 ermittelt. Somit war es möglich, die absolute Verteilung der Grauwerte in eine relative Verteilung der Grauwerte pro 100 000 μm^2 zu überführen, was für die Vergleichbarkeit der Schnitte essentiell ist.

Weil für die zu untersuchende Fragestellung nur die aus der immunhistochemischen Färbung resultierenden Grauwerte von Interesse sind, und nicht die durch die Gegenfärbung zustande gekommenen, mussten letztere eliminiert werden. Dazu eigneten sich die Negativkontrollen, die von jeder Gewebeprobe angefertigt wurden. Da bei diesen die Inkubation mit dem Primärantikörper durch eine Inkubation nur mit BSA-PBS-Puffer ersetzt wurde (siehe Gliederungspunkt 2.3.2), stammten deren Grauwerte auch ausschließlich aus der Gegenfärbung. Infolgedessen wurde von der relativen Grauwertverteilung jedes einzelnen Schnittes die relative Grauwertverteilung der zugehörigen Negativkontrolle subtrahiert, um auf diesem Wege die relative Grauwertverteilung eines Schnittes, die ausnahmslos aus der immunhistochemischen Färbung hervorgeht, zu erhalten.

Nun wurde nur noch für jeden einzelnen Schnitt aus der relativen Verteilung der 256 Grauwerte die Summe dieser gebildet und somit ein vergleichbares Maß für den Gehalt an Kollagen Typ I pro 100 000 μm^2 erzielt.

2.5 Statistische Verfahren

Statistische Berechnungen kommen in der Wissenschaft zum Einsatz, um zu überprüfen, ob ein aufgetretener Mittelwertsunterschied zwischen zwei oder mehr Stichproben zufällig entstanden ist oder nicht.

Zu diesem Zweck werden zwei Hypothesen formuliert, die so genannte Nullhypothese und die Alternativhypothese. Die Nullhypothese besagt, dass beide Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, also der Unterschied zufällig ist. Der Alternativhypothese liegt zu Grunde, dass beide Stichproben nicht aus der gleichen Grundgesamtheit stammen, was bedeutet, dass der Unterschied nicht zufällig ist.

Wann die Nullhypothese nun im einzelnen Fall angenommen (Annahmebereich) bzw. verworfen wird (Ablehnungsbereich), ergibt sich aus der Wahl des α -Fehlers. Ein α -Fehler liegt vor, wenn man sich für die Alternativhypothese entscheidet, obwohl eigentlich die Nullhypothese zutrifft. In den Biowissenschaften hat sich dafür ein Schwellenwert von 5 % eingebürgert. Ist nun eine berechnete Fehlerwahrscheinlichkeit p kleiner als α , so kann das Ergebnis als signifikant bezeichnet werden.

Allen hier zur Anwendung gekommenen Testverfahren liegen nachstehende Hypothesen zu Grunde:

Nullhypothese H_0 : Der Gehalt an Kollagen Typ I bei Dysostosis cleidocranialis-Patienten unterscheidet sich nicht vom Gehalt an Kollagen Typ I bei Gesunden, d. h. die gefundenen Unterschiede sind rein zufälliger Art.

Alternativhypothese H_1 : Der Gehalt an Kollagen Typ I bei Dysostosis cleidocranialis-Patienten unterscheidet sich vom Gehalt an Kollagen Typ I bei Gesunden, d. h. die gefundenen Unterschiede sind nicht zufälliger Art.

Die Alternativhypothese ist somit zweiseitig respektive ungerichtet formuliert.

Das α -Fehlerniveau bzw. Signifikanzniveau wurde – wie üblich - auf $\alpha = 5 \%$ festgelegt.

Aus der Vielzahl von statistischen Testverfahren wurden zwei Methoden ausgewählt:

- U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon
- Fischer's exakter Test

Der U-Test bildet eine Alternative zum t-Test für zwei unverbundene Stichproben, allerdings mit wesentlich schwächeren Bedingungen. Zum einen basiert der U-Test nicht auf Symmetrie oder Normalverteilung, da die beiden Stichproben nur ähnlich verteilt sein müssen, zum anderen müssen die Stichprobenumfänge nicht gleich sein [Weiß 2001].

Beim exakten Test nach Fischer handelt es sich um eine Alternative zum nach Yates korrigierten χ^2 -Test, der besonders bei sehr kleinen Stichproben, die für die Anwendung des χ^2 -Tests nicht ausreichend sind, Anwendung findet [Altman 1992].

Da es sich bei der Dysostosis cleidocranialis um eine sehr seltene Erkrankung handelt, konnten nur sehr wenige Patienten in die Untersuchung einbezogen werden. Um dennoch ein verwertbares Ergebnis zu erhalten, wurden pro Patient bis zu 55 Schnitte gefärbt und von jedem Schnitt der Gehalt an Kollagen Typ I pro 100 000 μm^2 gemessen. Um jedem Patienten einen Mittelwert für den Gehalt an Kollagen Typ I pro 100 000 μm^2 zuordnen zu können, wurden die bis zu 55 Einzelwerte, die pro Patient pro Schnitt bestimmt wurden, gemittelt.

Mit diesen Mittelwerten wurden anschließend die oben angeführten Testverfahren mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS Version 10.0 (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

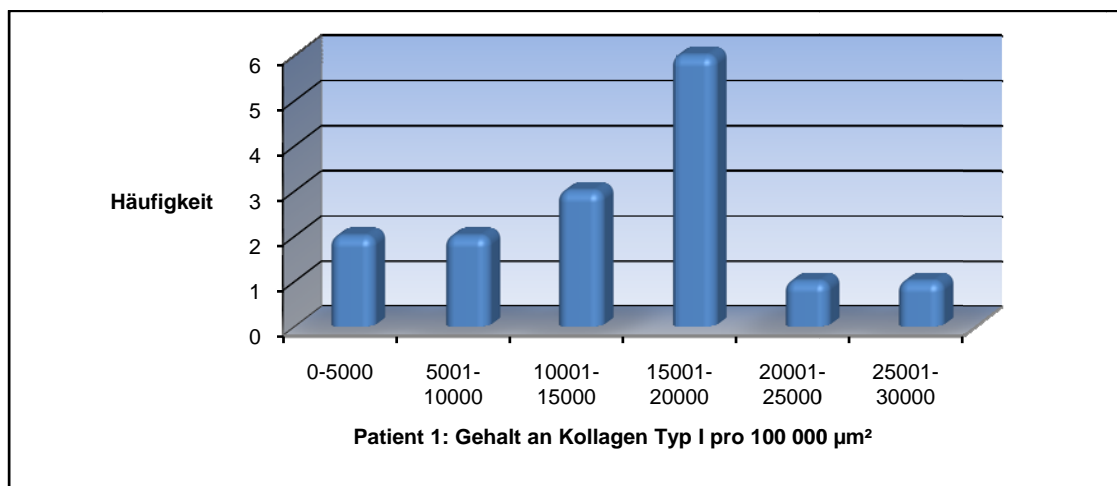
3.1 Patienten mit Dysostosis cleidocranialis

3.1.1 Einzelbefunde

Patient 1

Alter: 22 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestellen: Regio 21, 38, 48



27

Abb. 5: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 1

Die höchsten Mengen an Kollagen Typ I pro 100 000 µm² fanden sich vor allem bei den Proben aus Regio 21 (Mittelwert 19914,60), die geringsten Mengen bei den Proben aus Regio 38 und 48 (Mittelwert 10787,40 bzw. 10845,20).

Insgesamt erstreckten sich die gemessenen Werte für den Gehalt an Kollagen Typ I über alle sechs Messbereiche mit einer deutlichen Häufung im Wertebereich zwischen 15 001 und 20 000, wie Abbildung 5 zeigt.

Patient 1

Mittelwert	13849,07
Standardabweichung	6319,81
Minimum	3690,00
Median	15724,00
Maximum	26783,00

Patient 2

Alter: 14 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestellen: Regio 11, harter Gaumen

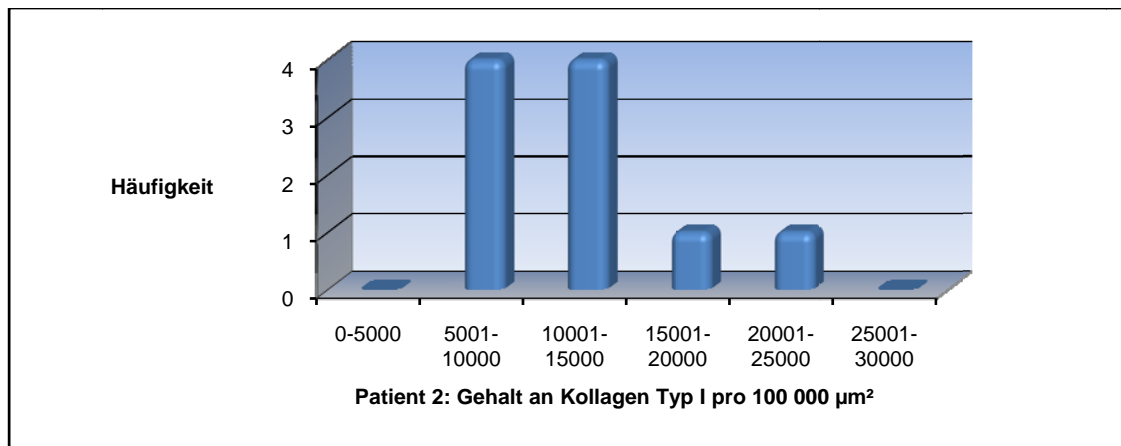
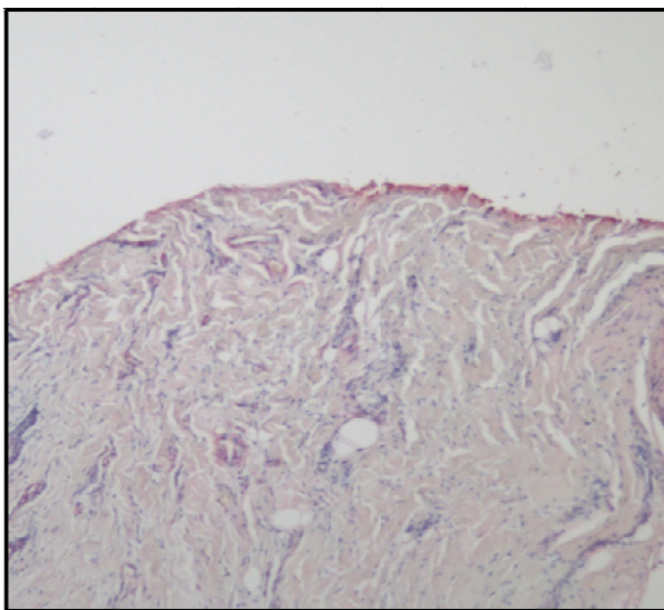


Abb. 6: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 2

Die Proben aus Regio 11 (Abb. 7) enthielten relativ geringe Mengen an Kollagen Typ I (Mittelwert 8887,80) im Vergleich mit anderen Proben von Dysostosis cleidocranialis-Patienten. Die Gaumenbiopsien zeigten demgegenüber höhere Werte für den Anteil an Kollagen Typ I (Mittelwert 14931,40).

28



Patient 2

Mittelwert	11909,60
Standardabweichung	4682,32
Minimum	6198,00
Median	11126,50
Maximum	21503,00

Abb. 7: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 3

Alter: 11 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestellen: Regio 15, 17/18, 44, 48, harter Gaumen

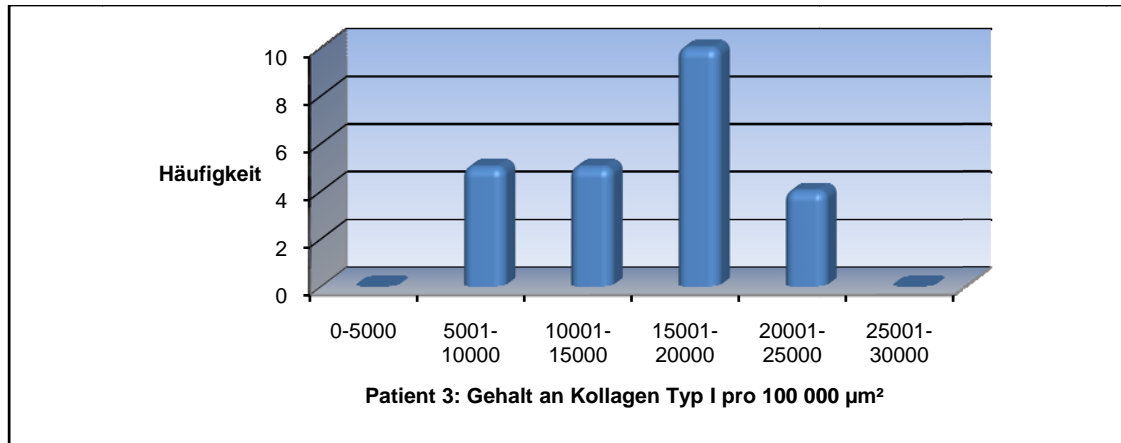


Abb. 8: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 3

Die Schleimhaut des harten Gaumens lieferte – anders als bei Patient 2 - niedrige Kollagen Typ I-Werte (Mittelwert 9571,40). Die Proben aus Regio 15, 17/18, 44 und 48 zeigten Mittelwerte von 14348,40 bis 20318,75.

In Regio 44 zeigten sich hierbei durchschnittlich die höchsten Mengen an Kollagen Typ I (Mittelwert 20318,75), der Spitzenwert für den Gehalt an Kollagen Typ I stammte jedoch aus Regio 48 (23645,00).

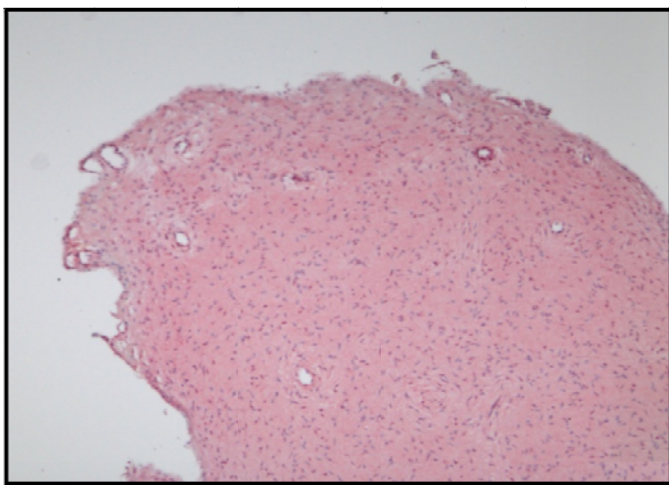


Abb. 9: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 3

Mittelwert	15319,17
Standardabweichung	4941,78
Minimum	5878,00
Median	15992,50
Maximum	23645,00

Patient 4

Alter: 21 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Regio 17

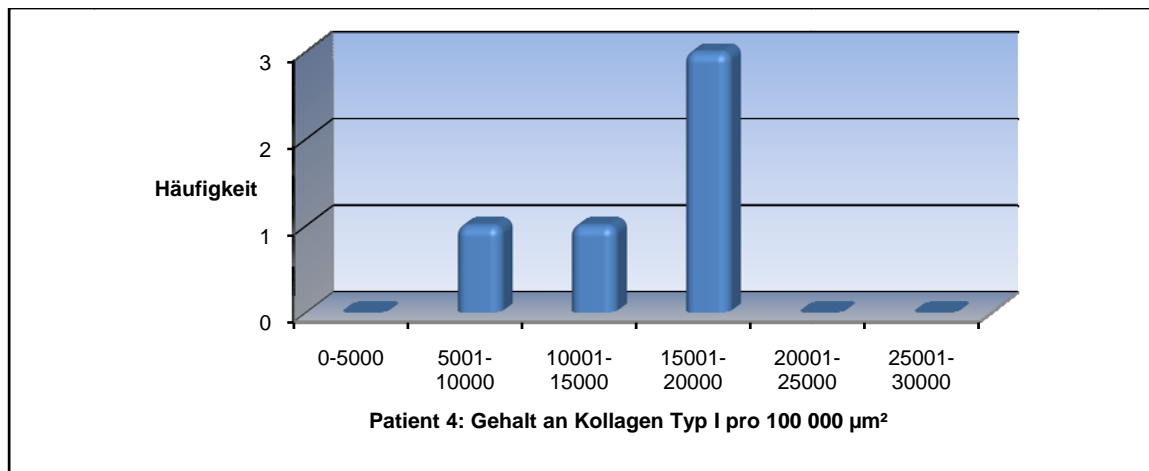
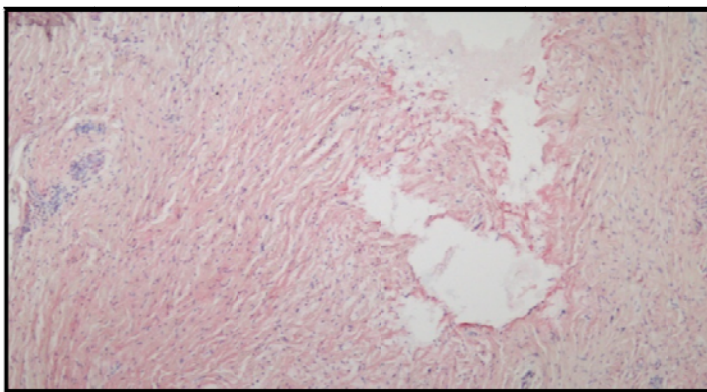


Abb. 10: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 4

Bei diesem Patienten konnten nur Proben aus einer Regio analysiert werden. Der daraus bestimmte Mittelwert der Kollagen Typ I-Verteilung lag trotz der nur geringen Anzahl an Schnitten auf ähnlichem Niveau wie der Mittelwert des Gesamtkollektivs der Dysostosis cleidocranialis-Patienten.

30



Patient 4

Mittelwert	14842,20
Standardabweichung	4435,39
Minimum	9811,00
Median	16410,00
Maximum	19410,00

Abb. 11: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 5

Alter: 20 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestellen: 13, 17, 21, 23, 25b, 27, 42b, 43

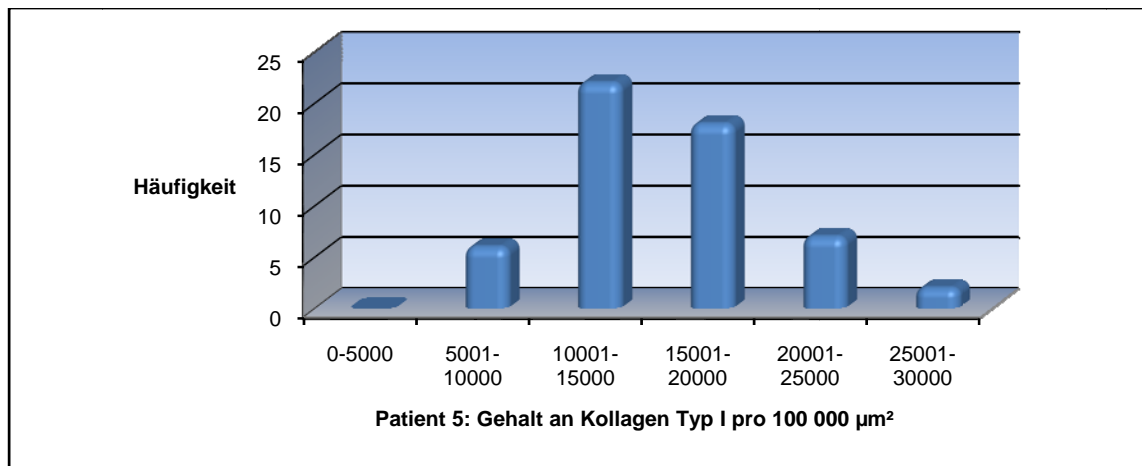
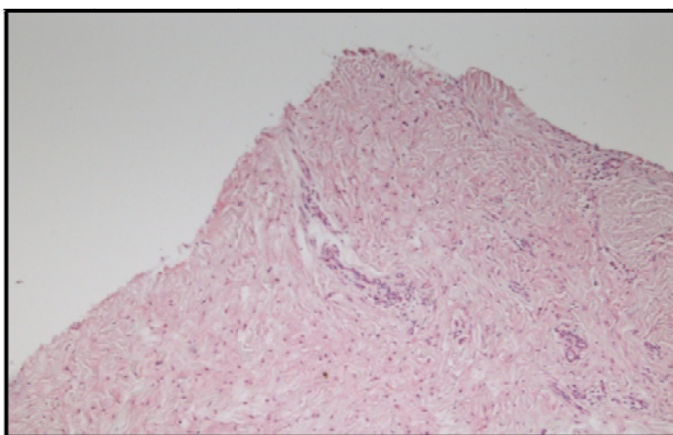


Abb. 12: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 5

Bei dieser Patientin wurden insgesamt 55 Schnitte aus acht verschiedenen Regionen analysiert, sodass dadurch die Streuung der Messwerte relativ gering gehalten werden konnte. Regio 25b wies dabei bei dieser Patientin den höchsten Gehalt an Kollagen Typ I auf (Mittelwert 19733,60), der niedrigste fand sich in Regio 21 (Mittelwert 11189,40).

Zusammenfassend betrachtet lag der Mittelwert für den Anteil an Kollagen Typ I bei dieser Patientin etwas über dem Mittelwert des Gesamtkollektivs der Dysostosis cleidocranialis-Patienten.



Patient 5

Mittelwert	15130,40
Standardabweichung	4800,54
Minimum	6261,00
Median	14484,00
Maximum	28690,00

Abb. 13: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 6

Alter: 14 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestellen: Regio 24b, 43/44, 47, 48

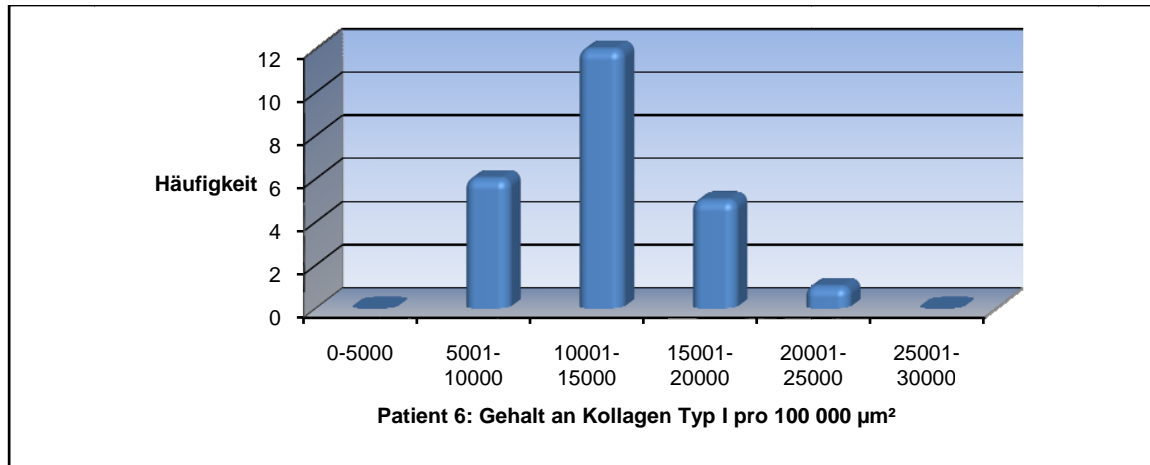
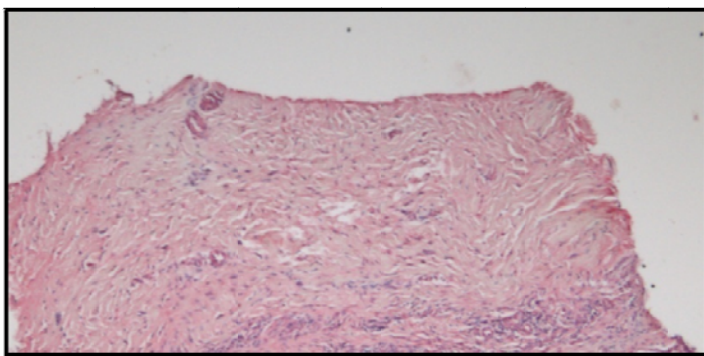


Abb. 14: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 6

Bei diesem Patienten wurden Proben aus vier Regionen untersucht. Die höchsten Messwerte für den Gehalt an Kollagen Typ I fanden sich in Regio 48 (13465,40). Alles in allem war die Diskrepanz zwischen den Mittelwerten der einzelnen Regionen nur marginal.

32



Patient 6

Mittelwert	12696,33
Standardabweichung	3594,92
Minimum	7730,00
Median	12087,00
Maximum	20797,00

Abb. 15: Ausschnitt aus histologischer Färbung

3.1.2 Gesamtbefund

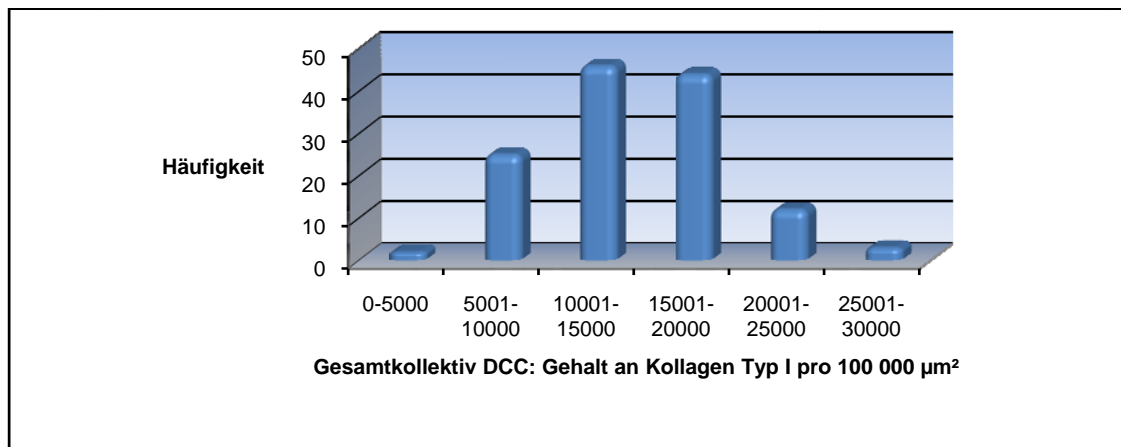


Abb. 16: Kollagen Typ I-Verteilung des Gesamtkollektivs DCC

Bei den Dysostosis cleidocranialis-Patienten konnte eine starke Anhäufung der Messwerte im Bereich zwischen 10 001 und 15 000 bzw. zwischen 15 001 und 20 000 beobachtet werden, da in diesem Bereich insgesamt 67,7 % der Messwerte (90 von 133) lagen.

	Schnitte	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Median	Maximum
Patient 1	15	13849	6319	3690	15724	26783
Patient 2	10	11909	4682	6198	11126	21503
Patient 3	24	15319	4941	5878	15992	23645
Patient 4	5	14842	4435	9811	16410	19410
Patient 5	55	15130	4800	6261	14484	28690
Patient 6	24	12696	3594	7730	12087	20797
Gesamt	133	14327	4865	3690	14090	28690

Tabelle 2: Grauwertsumme bezogen auf die Referenzfläche bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis

3.2 Normalkollektiv

3.2.1 Einzelbefunde

Patient 7

Alter: 47 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Regio 31-41

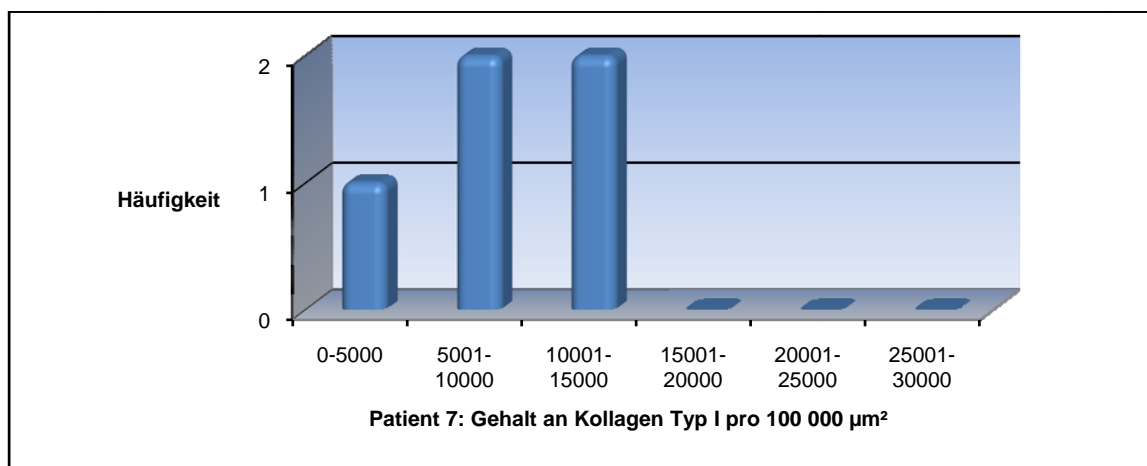
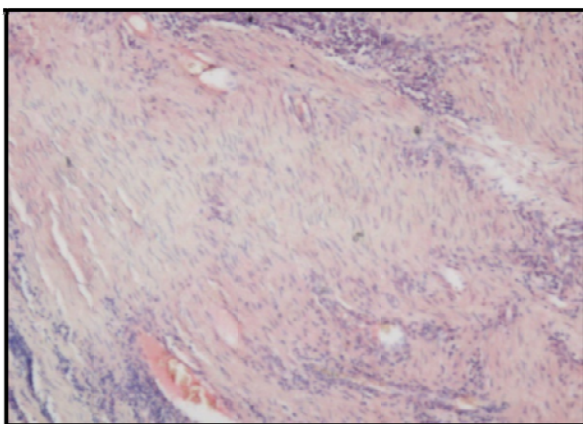


Abb. 17: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 7

Der für Patient 7 errechnete Mittelwert der Kollagen Typ I-Verteilung lag über dem für das Kontrollkollektiv bestimmten Mittelwert.



Patient 7

Mittelwert	8897,40
Standardabweichung	3893,12
Minimum	4721,00
Median	8453,00
Maximum	14148,00

Abb. 18: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 8

Alter: 14 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Harter Gaumen

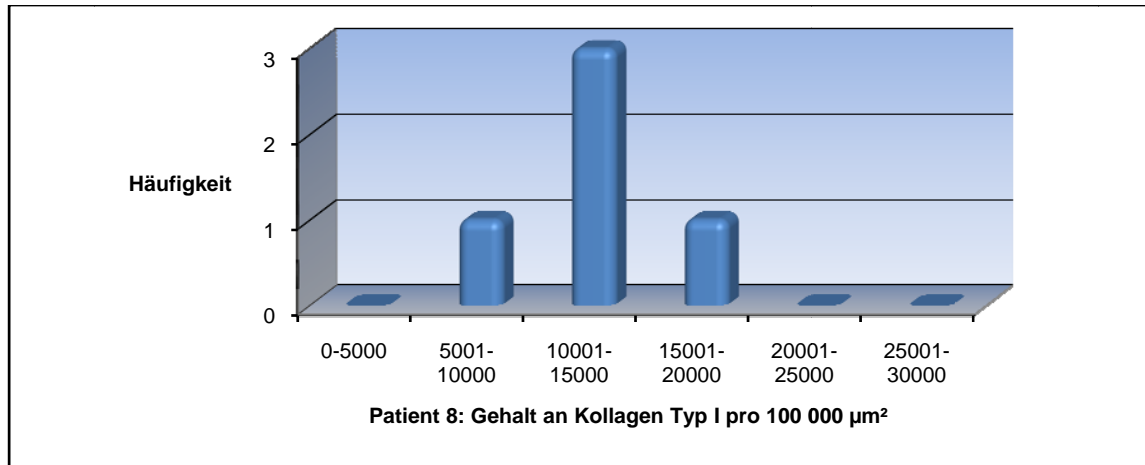
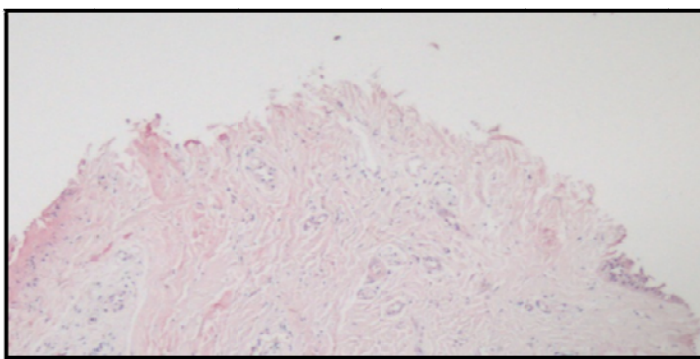


Abb. 19: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 8

Der berechnete Mittelwert für den Gehalt an Kollagen Typ I lag mit 12556,20 – verglichen mit den Mittelwerten der Gesunden – sehr hoch.

Mittelwerte über 10 000 fanden sich sonst nur bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis.

35



Patient 8

Mittelwert	12556,20
Standardabweichung	1775,16
Minimum	10934,00
Median	12360,00
Maximum	15185,00

Abb. 20: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 9

Alter: 18 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestelle: Harter Gaumen

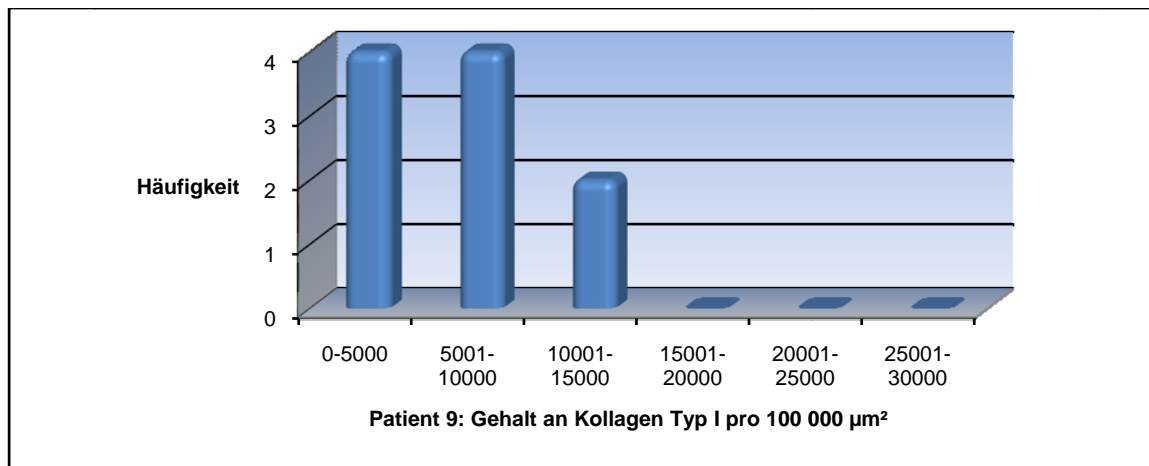
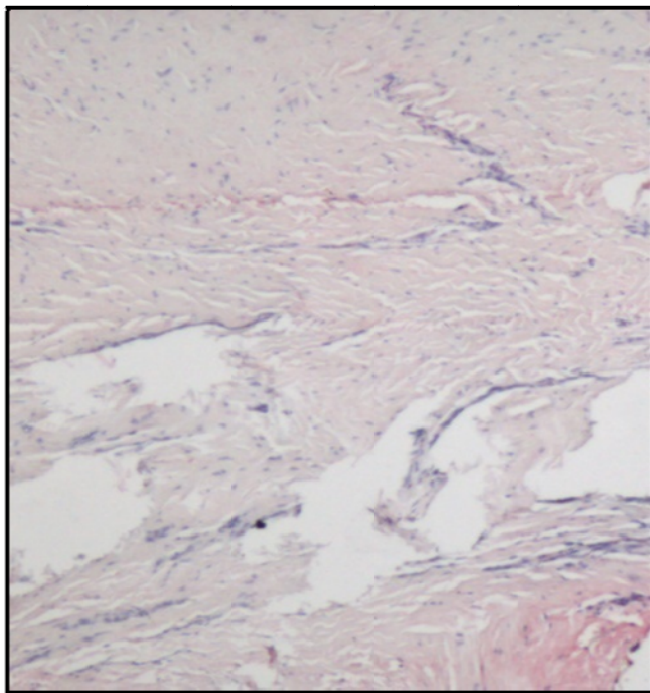


Abb. 21: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 9

Der Mittelwert für die Kollagen Typ I-Verteilung lag etwas unter dem Mittelwert für den Gehalt an Kollagen Typ I des Normalkollektivs.

36



Patient 9

Mittelwert	6965,50
Standardabweichung	3168,84
Minimum	2143,00
Median	6220,00
Maximum	11803,00

Abb. 22: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 10

Alter: 75 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestellen: Regio 16, 47

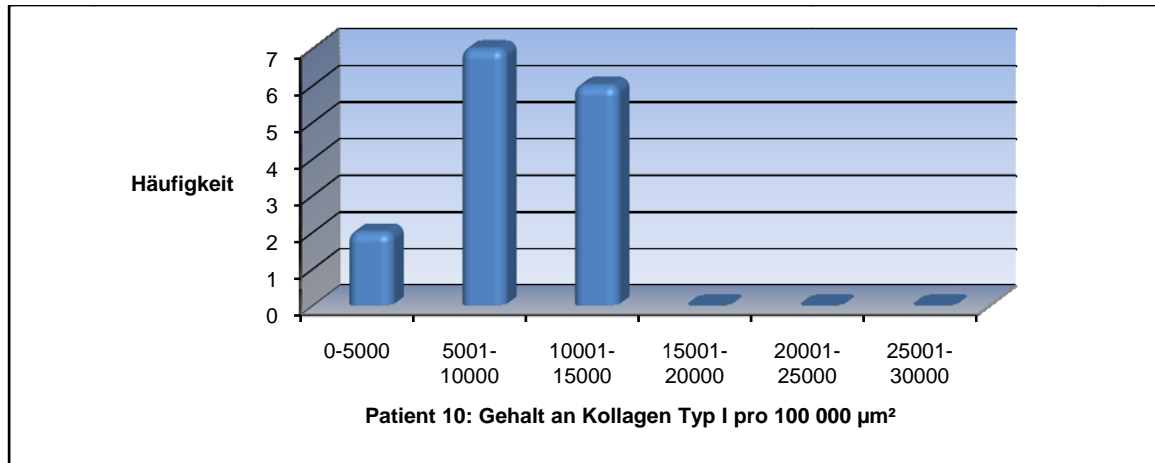
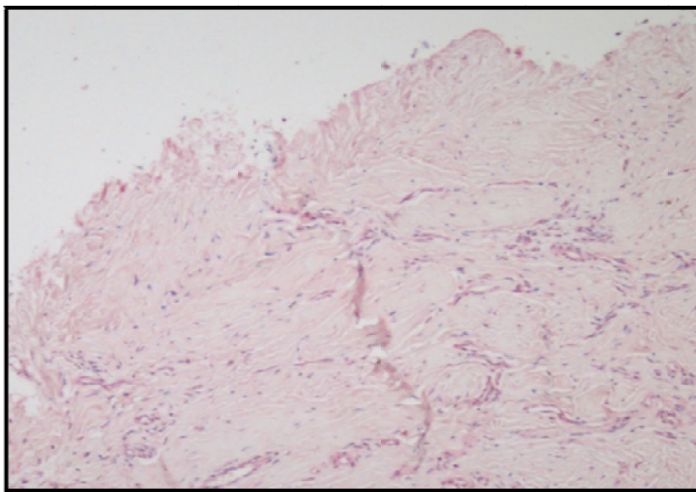


Abb. 23: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 10

Bei diesem Patienten stammten die höheren Messwerte für den Gehalt an Kollagen Typ I vor allem aus Regio 16, die niedrigeren aus Regio 47.

37



Patient 10

Mittelwert	8590,33
Standardabweichung	3007,15
Minimum	3779,00
Median	8961,00
Maximum	13333,00

Abb. 24: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 11

Alter: 10 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Harter Gaumen

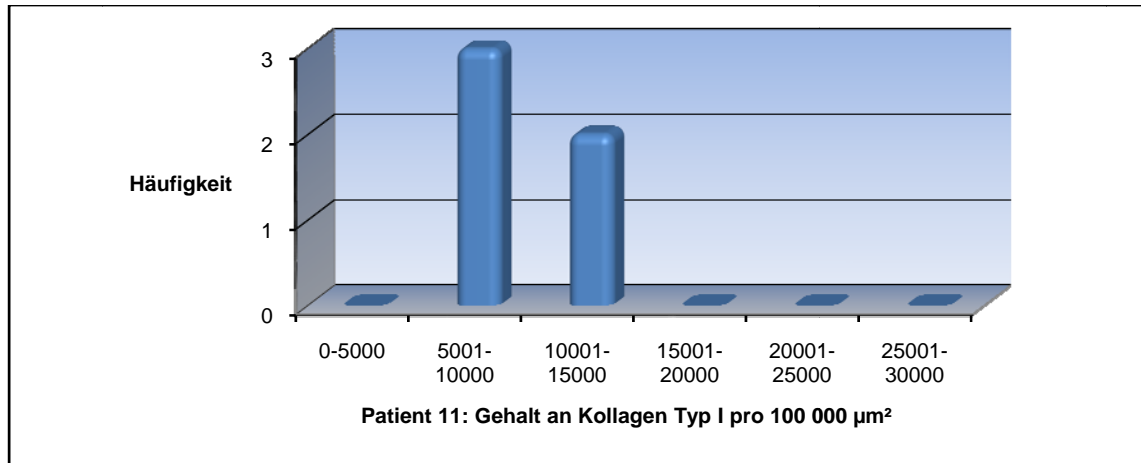


Abb. 25: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 11

In den Gewebeschnitten dieses Patienten fand sich der zweithöchste Mittelwert für den Kollagen Typ I-Gehalt bei Gesunden.

38

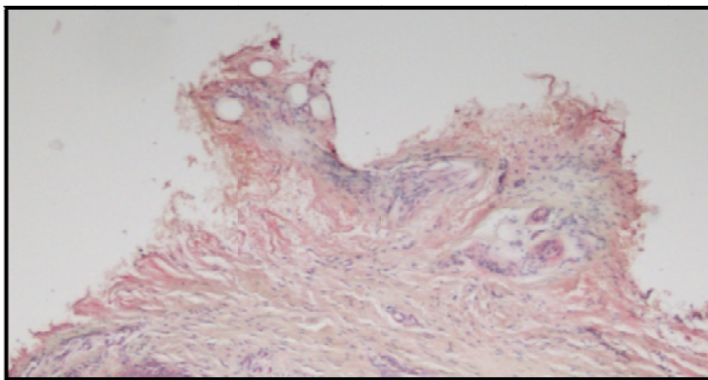


Abb. 26: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 11

Mittelwert	9648,60
Standardabweichung	1769,65
Minimum	7674,00
Median	9399,00
Maximum	12042,00

Patient 12

Alter: 29 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestelle: Harter Gaumen

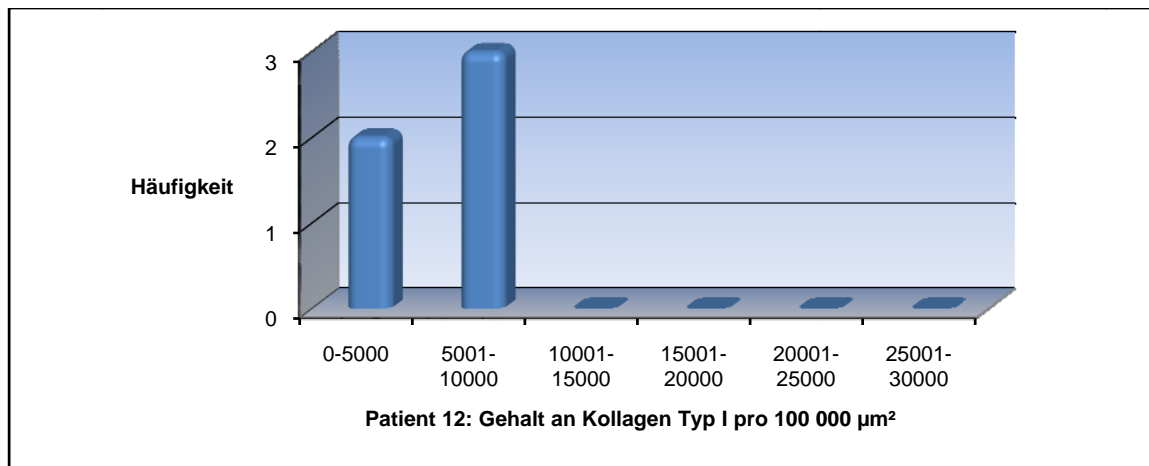


Abb. 27: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 12

Bei dieser Patientin fand sich ein relativ geringer Mittelwert für den Gehalt an Kollagen Typ I.

39

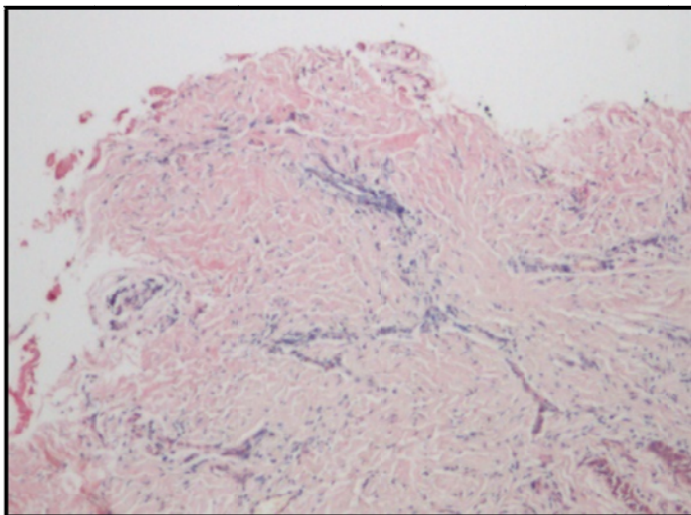


Abb. 28: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 12

Mittelwert	5767,60
Standardabweichung	1551,66
Minimum	3984,00
Median	6277,00
Maximum	7242,00

Patient 13

Alter: 13 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Harter Gaumen

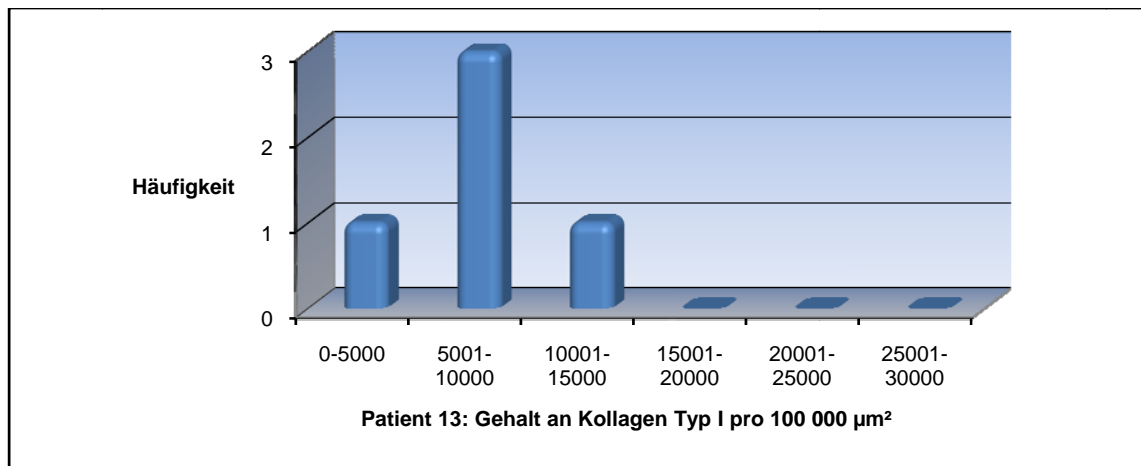
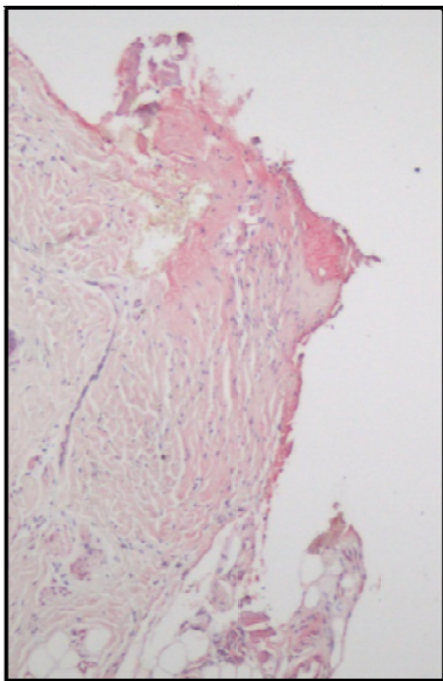


Abb. 29: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 13

Bezüglich der Kollagen Typ I-Verteilung lag der Mittelwert dieses Patienten in einem ähnlichen Wertebereich wie der Mittelwert des Normalkollektivs.

40



Patient 13

Mittelwert	7695,60
Standardabweichung	2984,31
Minimum	4996,00
Median	7680,00
Maximum	12492,00

Abb. 30: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 14

Alter: 16 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Harter Gaumen

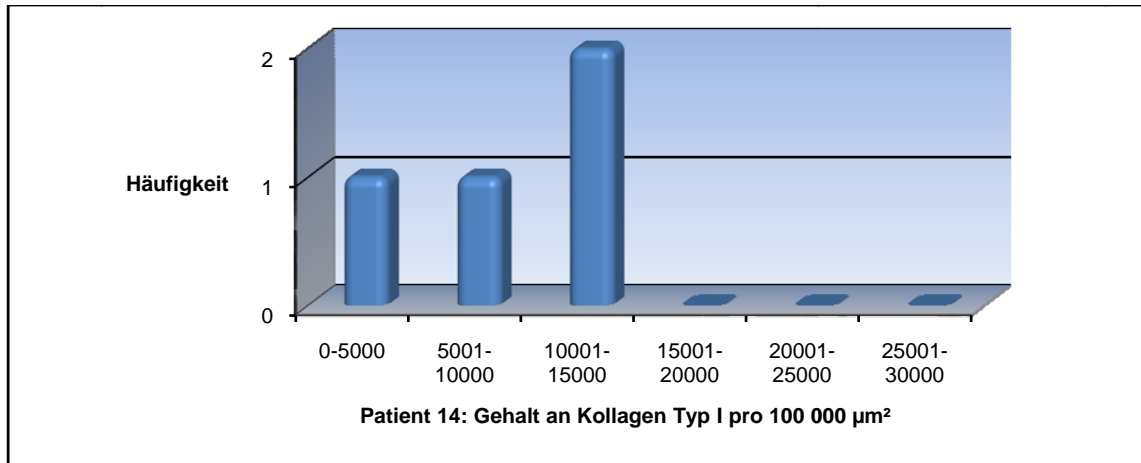


Abb. 31: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 14

Der bei diesem Patienten bestimmte Mittelwert für den Gehalt an Kollagen Typ I war der zweithöchste in der Gruppe der Gesunden.

41

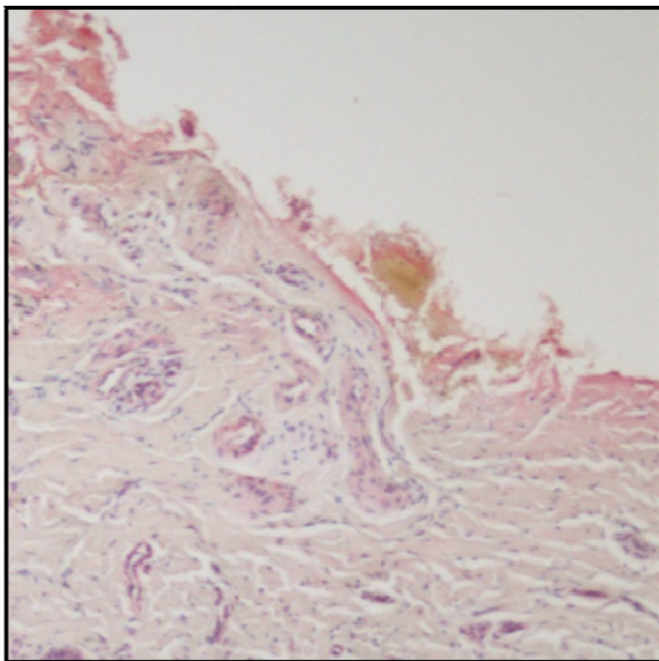


Abb. 32: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 14

Mittelwert	9576,00
Standardabweichung	3928,34
Minimum	4505,00
Median	9977,50
Maximum	13844,00

Patient 15

Alter: 16 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestellen: Regio 15, 35, 45

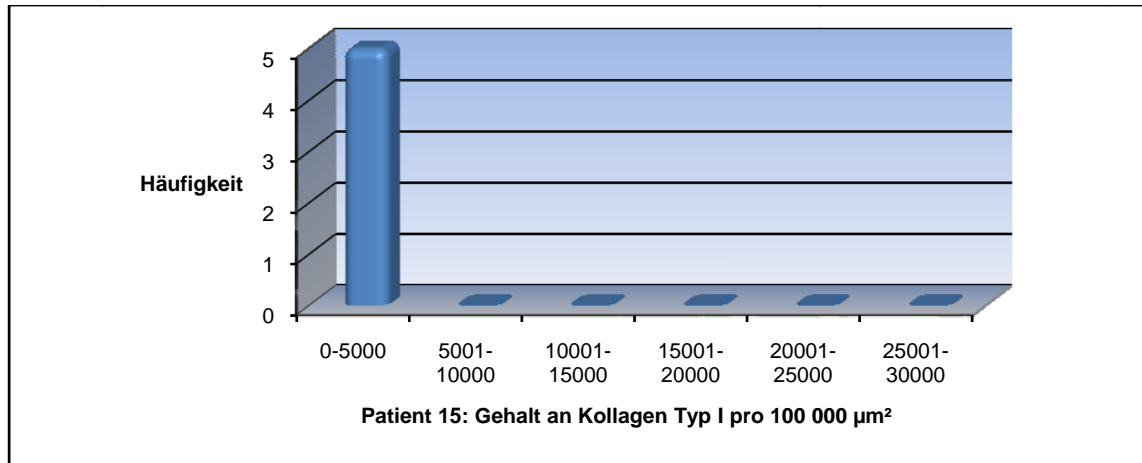


Abb. 33: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 15

Wie aus Abbildung 33 abzulesen ist, fanden sich bei dieser Patientin besonders kleine Messwerte für den Gehalt an Kollagen Typ I, woraus der geringste Messwert für die Kollagen Typ I-Verteilung im Kollektiv der Gesunden resultierte.

42

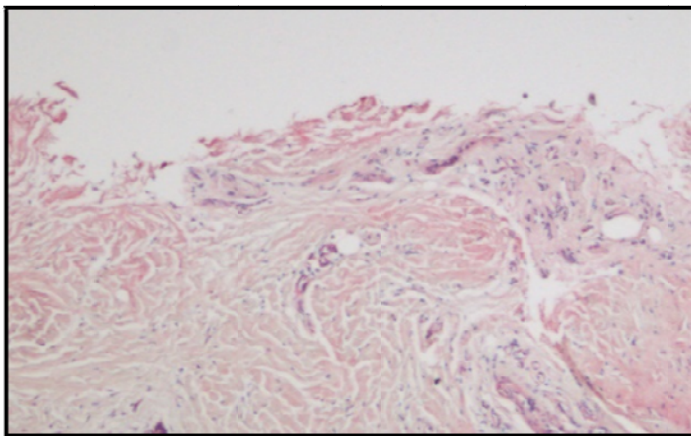


Abb. 34: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 15

Mittelwert	2752,80
Standardabweichung	1472,76
Minimum	1123,00
Median	3113,00
Maximum	4701,00

Patient 16

Alter: 66 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Regio 45

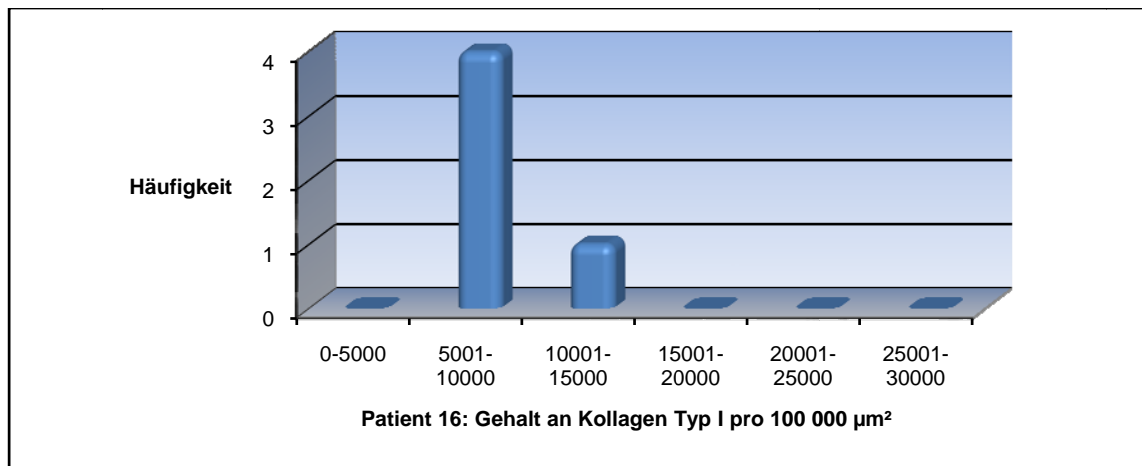


Abb. 35: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 16

Im Hinblick auf die Kollagen Typ I-Verteilung lag der Mittelwert bei diesem Patienten in einem ähnlichen Wertebereich wie der Mittelwert des Normalkollektivs.

43

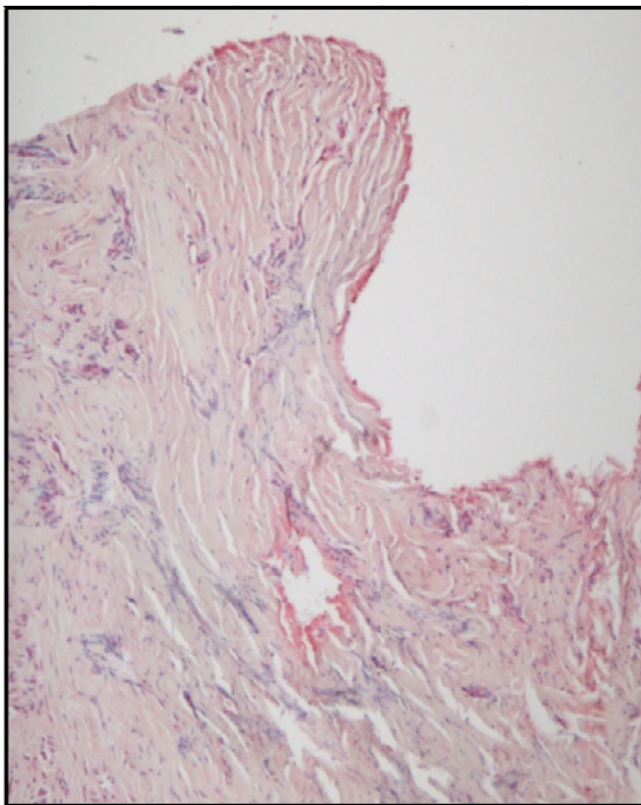


Abb. 36: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 16

Mittelwert	7220,80
Standardabweichung	2271,05
Minimum	5338,00
Median	6243,00
Maximum	10693,00

Patient 17

Alter: 67 Jahre Geschlecht: männlich

Entnahmestelle: Regio 37

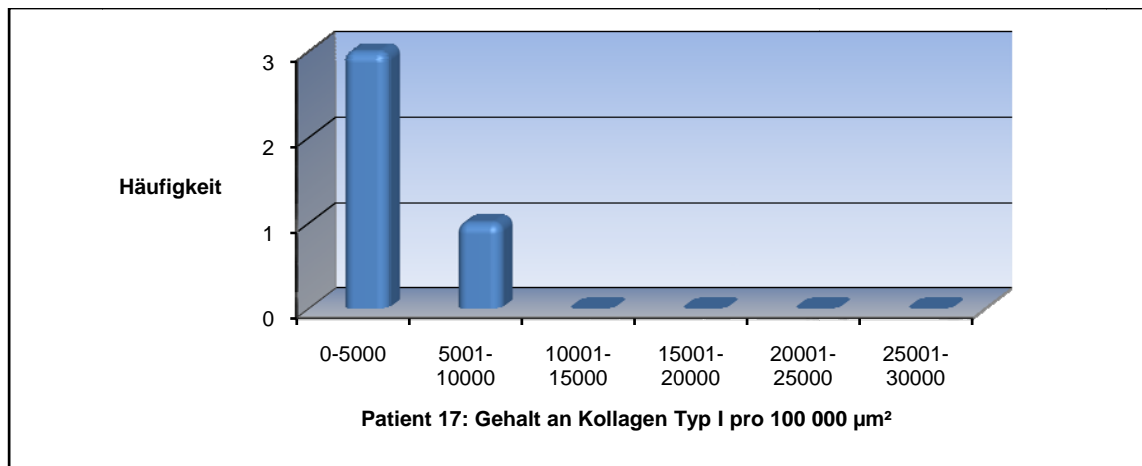
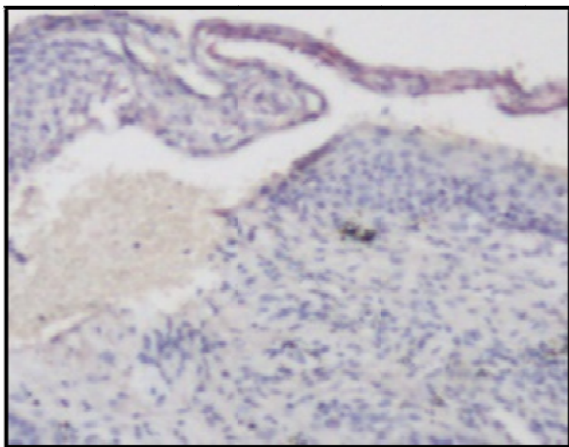


Abb. 37: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 17

Bei diesem Patienten lagen die Messwerte für den Gehalt an Kollagen Typ I vor allem im Wertebereich bis 5000. Daraus resultierte der drittniedrigste Mittelwert in der Gruppe der Gesunden.

44



Patient 17

Mittelwert	5410,25
Standardabweichung	1840,89
Minimum	4006,00
Median	4765,00
Maximum	8105,00

Abb. 38: Ausschnitt aus histologischer Färbung

Patient 18

Alter: 16 Jahre Geschlecht: weiblich

Entnahmestelle: Gingiva

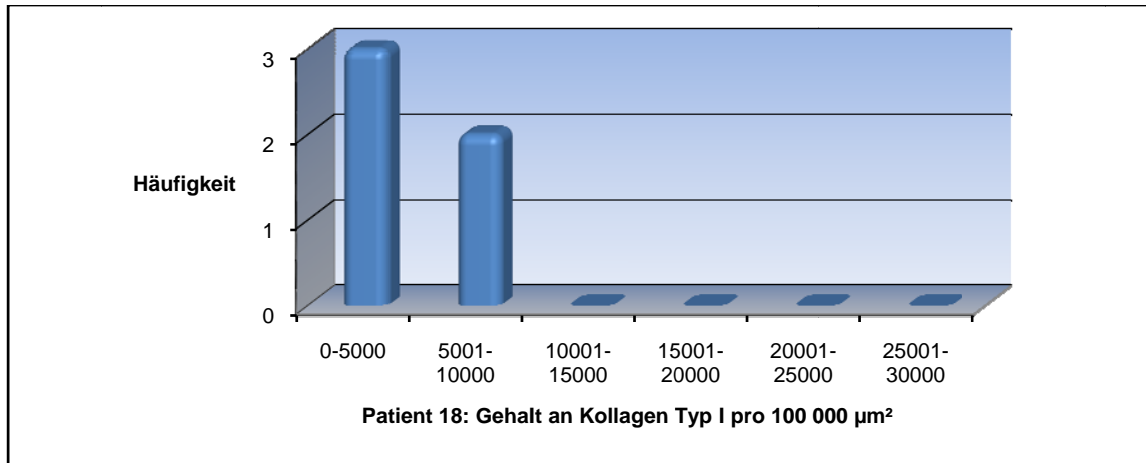
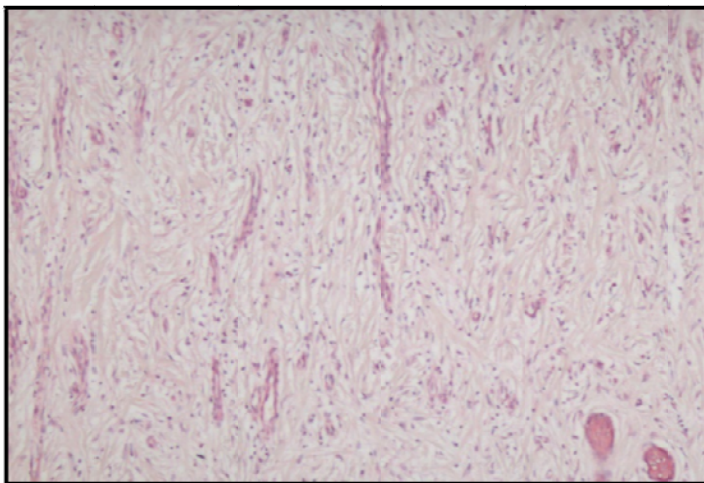


Abb. 39: Kollagen Typ I-Verteilung bei Patient 18

Auch hier lagen die gemessenen Werte für die Kollagen Typ I-Verteilung vor allem im Wertebereich bis 5000. Dies hatte zur Folge, dass bei dieser Patientin der zweittiefste Mittelwert im Kontrollkollektiv bestimmt wurde.

45



Patient 18

Mittelwert	4992,20
Standardabweichung	1495,40
Minimum	3436,00
Median	4624,00
Maximum	7110,00

Abb. 40: Ausschnitt aus histologischer Färbung

3.2.2 Gesamtbefund

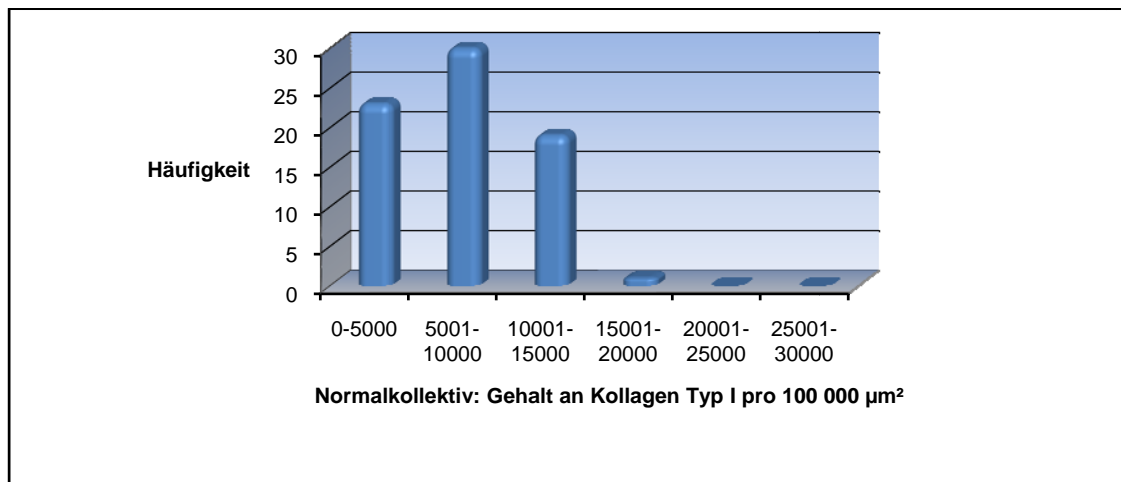


Abb. 41: Kollagen Typ I-Verteilung des Normalkollektivs

98 % der Messwerte (72 von 73) lagen im Messbereich zwischen 0 und 15 000. Höhere Messwerte wurde bis auf eine Ausnahme nicht ermittelt.

	Schnitte	Mittelwert	Standard- abweichung	Minimum	Median	Maximum
Patient 7	5	8897	3893	4721	8453	14148
Patient 8	5	12556	1775	10934	12360	15185
Patient 9	10	6965	3168	2143	6220	11803
Patient 10	15	8590	3007	3779	8961	13333
Patient 11	5	9648	1769	7674	9399	12042
Patient 12	5	5767	1551	3984	6277	7242
Patient 13	5	7695	2984	4996	7680	12492
Patient 14	4	9576	3928	4505	9977	13844
Patient 15	5	2752	1472	1123	3113	4701
Patient 16	5	7220	2271	5338	6243	10693
Patient 17	4	5410	1840	4006	4765	8105
Patient 18	5	4992	1495	3436	4624	7110
Gesamt	73	7565	3346	1123	7081	15185

Tabelle 3: Grauwertsumme bezogen auf die Referenzfläche bei Gesunden

3.3 Vergleich der Kollagen Typ I-Verteilung zwischen Patienten mit Dysostosis cleidocranialis und Gesunden

3.3.1 Graphische Darstellung

Abbildung 42 verdeutlicht, dass sich in der Gingiva von Patienten mit Dysostosis cleidocranialis im Vergleich zu Gesunden ein erhöhter Gehalt von Kollagen Typ I nachweisen ließ.

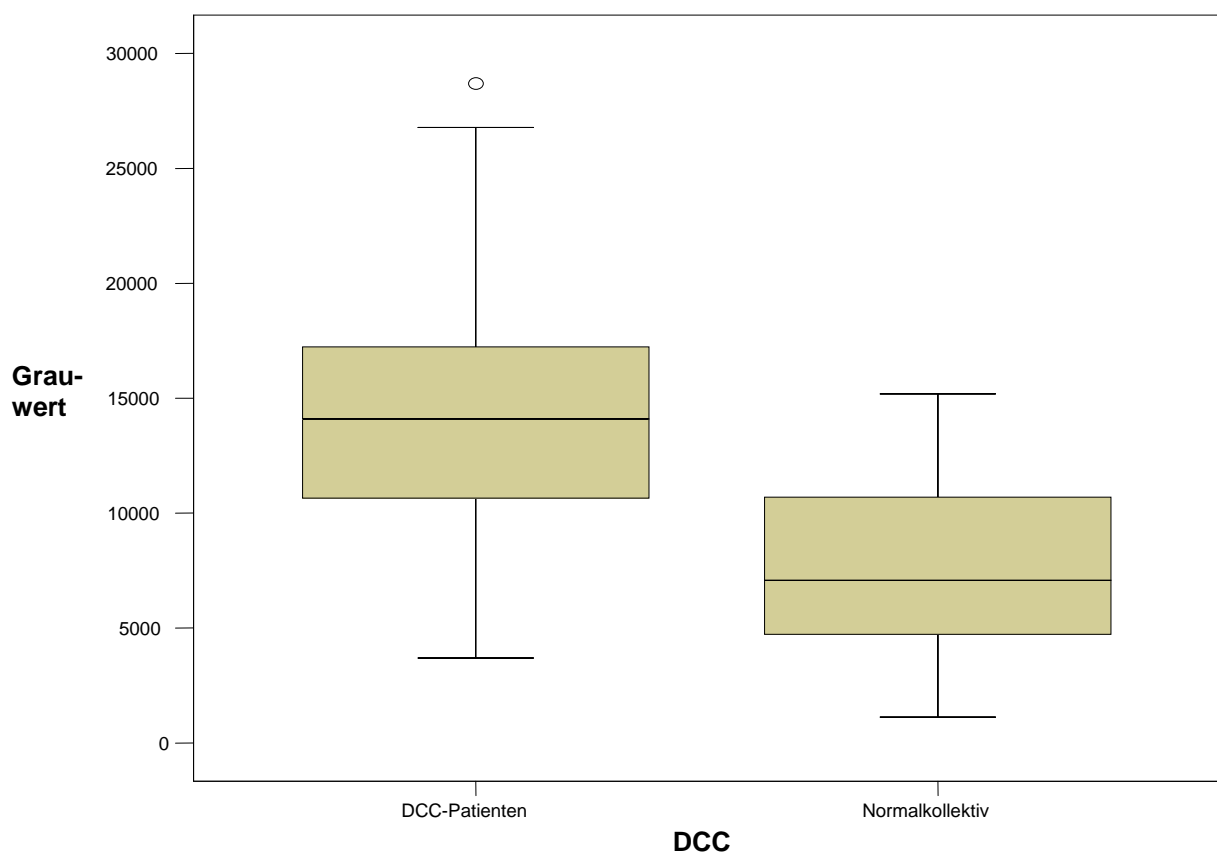


Abb. 42: Vergleichsdarstellung der Grauwertsummen von DCC-Patienten und Gesunden. Hierbei markiert der Kreis in der Gruppe der DCC-Patienten einen oberen Ausreißer, d. h. einen Wert, der weiter als 1,5 Boxlängen oberhalb vom 75%-Quantil liegt.

3.3.2 Statistische Berechnungen

Um zu ermitteln, ob sich der Gehalt an Kollagen Typ I bei Dysostosis cleidocranialis-Patienten vom Gehalt an Kollagen Typ I bei Gesunden unterscheidet, kamen die unter Gliederungspunkt 2.5 beschriebenen statistischen Verfahren zum Einsatz.

Dabei wurde mit den jeweiligen Mittelwerten eines Patienten gerechnet, um die Streuung innerhalb der Proben eines Patienten möglichst gering zu halten.

U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon:

Dabei ergab sich für die Patienten mit Dysostosis cleidocranialis eine Rangsumme von 91,50 und für die Kontrollgruppe eine Rangsumme von 79,50.

Damit konnte ein Z-Wert von 3,246 berechnet werden.

Mit Hilfe geeigneter Tabellen konnte man nun für diesen Z-Wert die p-Werte für die Normal- und für die t-Verteilung ermitteln. Im Einzelnen ergaben sich bei $Z = 3,246$:

- für die Normalverteilung: $p = 0,001$
- für die t-Verteilung: $p = 0,005$

49

Fischer`s exakter Test

Der exakte Test nach Fischer ergab für die eingesetzten Mittelwerte folgenden p-Wert:

$$p = 0,0003$$

Alle errechneten p-Werte lagen somit unter dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$.

Damit kann der Unterschied in der Kollagen Typ I-Verteilung bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis im Vergleich zum Normalkollektiv als signifikant bezeichnet werden.

Allerdings muss in diesem Zusammenhang auf die geringe Zahl an untersuchten Patienten mit Dysostosis cleidocranialis hingewiesen werden, die aus der Seltenheit der Krankheit und der

Tatsache, dass sich viele Betroffene bei Erstdiagnose bereits im Erwachsenenalter befinden und somit nicht mehr operiert werden, resultiert.

4. Diskussion

4.1 Diskussion von Material und Methode

4.1.1 Material

Bei der Dysostosis cleidocranialis handelt es sich – wie bereits in der Einleitung erläutert - um eine sehr seltene Erkrankung mit einer geschätzten Prävalenz von eins zu einer Million [Chitayat et al. 1992, Mehta und Verma 1992, Shaikh und Shustermann 1998, Baumert 2006]. Daher ist es sehr schwierig, für eine geeignete Fallzahl zu sorgen. Obwohl für die vorliegende Arbeit alle Patienten mit Dysostosis cleidocranialis Berücksichtigung fanden, die in einem Zeitraum von annähernd drei Jahren an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg operiert worden waren, konnten nur Gewebeproben von insgesamt sechs Betroffenen analysiert werden.

Allerdings wurden von den meisten Patienten mehrere Gewebeproben (bis zu elf) entnommen, und von jeder Gewebeprobe wiederum bis zu fünf Schnitte angefärbt und vermessen. Anschließend wurden die einzelnen Messwerte (bis zu 55) pro Patient gemittelt. Dadurch konnte man – trotz etwaiger Streuung der Messwerte eines Patienten – die Streuung zwischen den Patienten klein halten. Dies erlaubte es, auch mit der vorliegenden relativ geringen Patientenzahl auszukommen, obwohl natürlich mit zunehmender Fallzahl die Sicherheit der aus der Untersuchung resultierenden Aussage noch zu steigern wäre.

4.1.2 Methode

Die Entwicklung der enzymmarkierten Immunhistochemie gab der Wissenschaft eine Möglichkeit an die Hand, mit Hilfe sowohl mono-, als auch polyklonaler Antikörper verschiedenste Antigene – beispielsweise Genprodukte, Hormone, Zellrezeptoren, Zytoskelettproteine und auch Gewebsbestandteile wie Kollagene – lichtmikroskopisch sichtbar zu machen [Rainbow 1996].

Obwohl sich die bei der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommene enzymimmunochemische Färbung nach der APAAP-Methode durch eine besonders hohe Sensitivität auszeichnet [Rainbow 1996], kann ganz allgemein keine Färbemethode als absolut ideal

geeignet und fehlerfrei bezeichnet werden [Cote *et al.* 2003]. Daher müssen die erzielten Ergebnisse kritisch nach folgenden Gesichtspunkten hinterfragt werden:

Fixation und Einbettung

In Kapitel 2 (Gliederungspunkt 2.2.1) wurde bereits ausgeführt, dass die Vorbehandlung der Gewebeproben durch Fixation und Einbettung für den Erhalt der antigenen Struktur und damit für die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von entscheidender Bedeutung ist [Cote *et al.* 2003].

Daher wurde als Fixativum die besonders gewebeschonende Schaffer'sche Lösung eingesetzt, um den Verlust an Antigen möglichst gering zu halten.

Die Einbettung erfolgte im immunhistochemisch erfahrenen Routinelabor des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. Hofstädter). Dadurch konnte eine Gleichbehandlung der einzelnen Gewebeproben gewährleistet werden.

Schnittdicke

52

Auch die Dicke der angefärbten Schnitte hat einen Einfluss auf das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung. Je dicker der Schnitt ist, umso mehr Antigen findet sich in diesem, was die Anfärbung verstärkt. Dies ist vor allem problematisch, wenn die Paraffinblöcke vor dem Schneiden abgekühlt werden, was in dieser Arbeit der Fall war (siehe Gliederungspunkt 2.2.2). Diese dehnen sich dann sofort wieder aus, wenn sie von der Kühlplatte entfernt werden.

Um diese Fehlerquelle möglichst klein zu halten, wurde von jedem Paraffinblock binnen Sekunden, nachdem er von der Kühlplatte entfernt worden war, mit dem Mikrotom ein Schnitt angefertigt. Anschließend wurde der Paraffinblock wieder auf der Kühlplatte vollständig abgekühlt, und nach demselben Verfahren weitere fünf Schnitte pro Block gewonnen.

Auf diese Weise wurde die Dicke der Schnitte konstant gehalten, um die Vergleichbarkeit der daraus gewonnenen Messergebnisse zu gewährleisten.

Unspezifische Hintergrundfärbung

Bei der immunhistochemischen Färbung nach der APAAP-Methode besteht die Gefahr einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch endogene alkalische Phosphatase. Endogene alkalische Phosphatase bzw. Isoenzyme der alkalische Phosphatase finden sich in diversen menschlichen Geweben, vor allem aber im Dünndarmepithel und in den proximalen Tubuli der Niere. Sie kommen jedoch auch vor in Knochen, Leber, neutrophilen Granulozyten, arteriellen und kapillaren Endothelzellen, Harnblasenepithel und in Trophoplasten der Plazenta [Noll et al. 2000].

Dieses Problem kann jedoch durch die Einbettung der Gewebeproben umgangen werden. Endogene alkalische Phosphatase, mit Ausnahme der im intestinalen Epithel, wird durch Einbettung in Paraffin zerstört, und ist somit nur in Gefrierschnitten oder Zellausstrichen von Relevanz [Bancroft et al. 1994].

Zusätzlich wurde die endogene alkalische Phosphatase durch die Hitzedemaskierung irreversibel geschädigt.

Spezifität

53

Um den Beweis anzutreten, dass die zur Anwendung kommende immunhistochemische Färbung spezifisch ist, ist es notwendig zu zeigen, dass es zu keiner Anfärbung kommt, wenn der Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper entfällt (Negativkontrolle). Auch bei der vorliegenden Untersuchung kam es bei Durchführung der Negativkontrolle – wie erforderlich war - zu keiner Rotfärbung des Gewebes (Abbildung 3b).

Für den Nachweis der Spezifität ist jedoch ein weiterer Reaktionsschritt notwendig, um zu zeigen, dass es zwischen dem Antikörper und dem zu untersuchenden Antigen zu einer Reaktion kommt. Dabei handelt es sich um Geltechniken wie Western blot, RIA (Radioimmunoassay) oder ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [Rainbow 1996]. Letzteres Verfahren wurde von der Herstellerfirma des Antikörpers (Firma Quartett, Berlin) angewandt, um die Spezifität zu belegen.

Alles in allem ist es jedoch beinahe unmöglich, die Spezifität einer immunhistochemischen Färbung zu beweisen, da der jeweilige Antikörper – ob mono- oder polyklonal – immer nur einen ganz bestimmten Teil der zu untersuchenden Struktur markiert. Findet sich dieser Abschnitt auch in bis dato unbekannten Molekülen, so kommt es auch hier zu einer

Anfärbung, die aber fälschlicherweise der zu untersuchenden Struktur zugeschrieben wird [Rainbow 1996].

Bildanalyse

Von besonderer Bedeutung für die Vergleichbarkeit der Messwerte war die Bildaufnahme unter standardisierten Bedingungen. Das vollautomatische Mikroskop BX 61 der Firma Olympus war zusammen mit der Bildanalysesoftware in der Lage, alle Schnitte unter exakt den gleichen Bedingungen aufzunehmen. Dabei war insbesondere eine identische Belichtungsstärke und Belichtungszeit essentiell. Des Weiteren erfolgte die Bildaufnahme in einem abgedunkelten Raum, um den Einfluss von Streulicht zu minimieren.

Beim Zusammenfügen der Einzelbilder zum jeweiligen Gesamtbild durch die Bildanalysesoftware (siehe Gliederungspunkt 2.4) musste in den Überlappungsbereichen eine leichte Verdunklung festgestellt werden. Dies erforderte, sich bei der Messung der Grauwerte nur auf die zentralen Regionen der jeweiligen Einzelbilder, die von dieser Verschattung nicht betroffen waren, zu konzentrieren, um einer Verfälschung der Messergebnisse entgegen zu wirken.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die bereits in Kapitel 3 dargelegten Ergebnisse dieser Arbeit können folgendermaßen kurz zusammengefasst werden:

Der Gehalt an Kollagen Typ I in der Gingiva ist bei den hier untersuchten Patienten mit Dysostosis cleidocranialis signifikant höher als bei einem gesunden Normalkollektiv.

Damit in Einklang zu bringen sind auch Beobachtungen von Buurman, der bereits 1978 neben einer schon damals bekannten Eburnisation im Bereich des Alveolarknochens auch das Fehlen zellulären, sekundären Zements beschrieb. Auf Grund weiterer histologischer Untersuchungen an Weichgewebe führte Buurmann diese charakteristische derbe Konsistenz der Gingiva im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis auf fibrotische Umbauprozesse zurück. Leider finden sich in seinen Ausführungen keine expliziten Aussagen zum Gehalt einzelner kollagener Strukturen in der oralen Mukosa von Patienten mit Dysostosis cleidocranialis, wie insbesondere der des Kollagen Typ I. Trotzdem stellten für Buurmann die pathologischen Veränderungen, die er sowohl am Alveolarknochen, als auch an der oralen Mukosa beobachten konnte, ein mechanisches Hindernis für den Durchbruch der Zähne dar [*Buurman et. al 1978*].

Auch bei histologischen Arbeiten von Hitchin und Fairley fanden sich ähnliche Ausführungen. Dort zeigte sich ebenso eine dichte Beschaffenheit des Alveolarknochens, der wiederum von einer derben fibrotischen Mukosa bedeckt war [*Hitchin und Fairley 1974*]. Auf die exakte Zusammensetzung der offensichtlich pathologisch veränderten Mundschleimhaut wurde jedoch nicht weiter eingegangen.

Des Weiteren erwähnte Pospieszynska im Rahmen einer Untersuchung an einer 17jährigen Patientin mit Dysostosis cleidocranialis eine Volumenzunahme der Gingiva in Kombination mit einer Retention von zahlreichen überzähligen Zahnanlagen, ohne jedoch genauer mögliche Ursachen dieser morphologischen Besonderheit zu erläutern, oder gar histologische Untersuchungen anzustellen [*Pospieszynska 1998*].

Diese drei Schilderungen sind dessen ungeachtet deckungsgleich mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, in der sich im Vergleich zum Kontrollkollektiv bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis ein signifikant erhöhter Gehalt an Kollagen Typ I in der oralen Mukosa zeigte. Dies kann unter anderem ursächlich für den festen wachsartigen Charakter der Gingiva sein und – wie bereits Buurmann vermutete – ein mechanisches Hindernis für den

Zahndurchbruch darstellen und somit die verzögerte respektive ausbleibende Dentition miterklären.

Wie schon im Einleitungskapitel zu lesen ist, gibt es jedoch in der Literatur im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis keinerlei Untersuchungen zur Zusammensetzung und vor allem zum Kollagengehalt der oralen Mukosa, obwohl diese bei diesem Krankheitsbild offensichtlich pathologisch verändert ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können daher im folgenden Abschnitt nur verglichen werden mit einerseits Erkenntnissen zur Dysostosis cleidocranialis aus dem Gebiet der Genetik, und andererseits mit weiteren Erkrankungen, denen eine pathologische Vermehrung der kollagenen Fasern zu Grunde liegt, und die eine ähnliche klinische Symptomatik wie die Dysostosis cleidocranialis präsentieren. Dazu bietet sich in besonderer Weise die hereditäre gingivale Fibromatosis an, was später noch detaillierter dargelegt werden soll.

Grundsätzlich könnte der in der vorliegenden Studie bestimmte vermehrte Kollagen Typ I-Gehalt der oralen Mukosa von Dysostosis cleidocranialis-Patienten auf zwei unterschiedlichen Wegen zu Stande kommen: Einerseits durch eine erhöhte Kollagensynthese der Fibroblasten, und andererseits durch einen verminderten Kollagenabbau.

56

Während in Knochenzellen eine erhöhte Menge des RUNX2-Transkriptionsfaktors mit einer Erhöhung der Kollagen I-Synthese korreliert, beobachteten Tsuji und Mitarbeiter in Mäusefibroblasten hingegen eine Suppression der Kollagen I-mRNA bei forcierter Expression des RUNX2-Transkriptionsfaktors. Aus diesem Phänomen schlossen sie auf einen negativ verstärkenden Effekt des RUNX2-Transkriptionsfaktors auf die Kollagen I-Synthese in Fibroblasten [Tsuji 1998].

In der Regel wirken die heterozygoten Mutationen des RUNX2-Gens bei Dysostosis cleidocranialis durch Haploinsuffizienz. Dies bedeutet, dass bedingt durch eine Mutation im RUNX2-Gen die vorhandene Menge an nicht-mutiertem, funktionalem RUNX2-Transkriptionsfaktor im heterozygoten Zustand nicht mehr ausreicht, um seine physiologischen Funktionen in ausreichendem Maße zu gewährleisten [Lee 1997, Mundlos 1999, Quack 1999].

In ausgewachsenen, transgenen Mäusen führt die Reduktion des Spiegels an aktivem RUNX2-Transkriptionsfaktor in Osteoblasten zu einer Reduktion der Expression diverser Proteine wie beispielsweise der knochenspezifischen Matrixproteine BSP (bone specific

protein), Osteocalcin, Osteopontin und auch Kollagen Typ I. Ein signifikant erhöhter Gehalt an RUNX2-Transkriptionsfaktor manifestiert sich hingegen in einer verstärkten Expression der eben genannten Proteine, und belegt den positiv verstärkenden Effekt des RUNX2-Transkriptionsfaktors auf Osteoblasten [Ducy 1997]. Demgegenüber postulieren Tsuji und Mitarbeiter – wie bereits oben ausgeführt wurde - einen negativ verstärkenden Effekt des RUNX2-Transkriptionsfaktors auf die Kollagen I-Synthese in Fibroblasten [Tsuji 1998]. Daher könnte der bei der Dysostosis cleidocranialis typischerweise zu beobachtende verminderte Gehalt an physiologischem, funktionalem RUNX2-Transkriptionsfaktor in Fibroblasten über den negativ verstärkenden Einfluss zu einer Forcierung der Kollagen I-Synthese beitragen und damit die in der vorliegenden Arbeit beschriebene signifikant erhöhte Kollagen I-Menge der Gingiva erklären.

Der Abbau kollagener Strukturen durch Fibroblasten vollzieht sich auf zwei unterschiedlichen Wegen. Zum einen wird Kollagen intrazellulär abgebaut, zum anderen extrazellulär mittels unter anderem von Fibroblasten synthetisierten Kollagenasen [Everts *et al.* 1989]. Damit spielt die Enzymgruppe der Kollagenasen unter anderem eine wichtige Rolle im Rahmen der Ausformung und Umgestaltung von diversen Geweben. Dabei ist aus dieser Enzymfamilie vor allem die Kollagenase 3 von besonderem Interesse. Dieses Enzym weist zum einen ein breites Wirkungsspektrum hinsichtlich des Kollagenabbaus auf, und steht zum anderen unter dem Einfluss des RUNX2-Transkriptionsfaktors.

Dies erklärt sich über die Tatsache, dass in der Promotorregion des Kollagenase 3-Gens in Position 133 bis 139 Sequenzen lokalisiert sind, die vom RUNX2-Transkriptionsfaktor spezifisch gebunden und aktiviert werden können, wie Jiménez sowohl in Zellkulturversuchen, als auch im Tiermodell nachweisen konnte [Jiménez *et al.* 1999]. So führte die Inkubation von verschiedenen Zellkulturen mit erhöhten Mengen an RUNX2-Transkriptionsfaktor immer zur deutlich forcierten Expression der Kollagenase 3, wenngleich auch in unterschiedlichem Ausmaß. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe belegen, dass sich bei Mäusen, die einen der Dysostosis cleidocranialis entsprechenden heterozygoten Defekt des RUNX2-Gens besaßen, im Vergleich zu Mäusen mit physiologischem RUNX2-Gen ein identisches Verteilungsmuster der Kollagenase 3-Expression ergab, allerdings mit signifikant geringerer Intensität. RUNX2-knock-out-Mäuse zeigten hingegen keinerlei Kollagenase 3-Expression [Jiménez *et al.* 1999]. Somit konnten die in Zellkulturversuchen gewonnenen Ergebnisse auch im Tiermodell reproduziert werden und bestätigten auch hier deutlich die

Abhängigkeit der Kollagenase 3-Expression und damit auch des Kollagenabbaus vom RUNX2-Transkriptionsfaktor.

Darüber hinaus zeigten auch Selvamurugan und Mitarbeiter, dass sowohl in skelettalen, als auch in nicht-skelettalen Zellen neben anderen Molekülen der RUNX2-Transkriptionsfaktor den Kollagenabbau über die Kollagenase 3-Genexpression entscheidend mit beeinflusst [Selvamurugan 2000].

Analog zu diesen von mehreren Arbeitsgruppen angestellten Überlegungen kann daher der bei Dysostosis cleidocranialis typische Mangel an funktionsfähigem physiologischem RUNX2-Transkriptionsfaktor eine verminderte Expression der Kollagenase 3 bedingen, woraus eine Reduktion des Kollagenabbaus resultiert. Dadurch würde bei diesen Patienten das fein austarierte Gleichgewicht zwischen einerseits Kollagenabbau und andererseits Kollagenneusynthese zu Gunsten der Kollagenneubildung verschoben, was den in der eigenen Studie ermittelten signifikant gesteigerten Anteil von Kollagen Typ I in der oralen Mukosa von Patienten mit Dysostosis cleidocranialis erklärt.

Diese Überlegungen werden unterstrichen durch Beobachtungen von pathologischen Mechanismen im Rahmen der Leberzirrhose. Auch dieser Erkrankung liegt bekanntermaßen eine Vermehrung der kollagenen Fasern zu Grunde.

In verschiedenen Untersuchungen wurde klar, dass der Zuwachs an kollagenen Fasern bei der Leberzirrhose nicht nur auf eine Steigerung der Kollagensynthese, sondern auch auf eine Reduzierung der interstitiellen Kollagenasenaktivität zurückzuführen ist, wobei der Kollagenabbau sowohl auf Ebene der Kollagenasensynthese, als auch auf Ebene der Kollagenaseninhibition gestört sein kann. Insbesondere bei einer verminderten Kollagenasenaktivität konnte ein Voranschreiten der Leberzirrhose beobachtet werden [Arthur 1994].

Entsprechend zu den oben dargelegten Überlegungen ist dieses Reaktionsschema auch auf die Dysostosis cleidocranialis übertragbar, um über eine gesteigerte Kollagensynthese und auch über einen verminderten Kollagenabbau den erhöhten Gehalt an Kollagen Typ I in der oralen Mukosa zu erklären.

Mehrfach wurde bereits erwähnt, dass es in der bisherigen Literatur keinerlei histologische Untersuchungen zur Zusammensetzung und insbesondere zum Kollagen I-Gehalt der offensichtlich pathologisch veränderten oralen Mukosa bei Dysostosis cleidocranialis gibt, denen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die damit als Pilotstudie fungiert, gegenübergestellt werden könnten. Somit ist es im Rahmen der Diskussion nur möglich, die Versuchsergebnisse mit anderen Erkrankungen zu vergleichen, denen eine pathologische Vermehrung der kollagenen Fasern zu Grunde liegt und die eine ähnliche orale Symptomatik wie die Dysostosis cleidocranialis aufweisen. Wie bereits weiter oben ausgeführt wurde, bietet sich dazu die hereditäre gingivale Fibromatosis in besonderer Weise an, was im nachfolgenden Abschnitt genauer erläutert werden soll.

Bei der hereditären gingivalen Fibromatosis handelt es sich ebenso um eine vorwiegend autosomal dominant vererbte Erkrankung, wenngleich auch vereinzelt autosomal rezessive Erbgänge zu beobachten waren. Ihr Hauptcharakteristikum stellt eine Fibrosierung und Größenzunahme der oralen Mukosa im Bereich von Maxilla und Mandibula dar [Hart *et al.* 2002]. Histologisch imponieren dabei dichte kollagene Faserbündel, die der Mundschleimhaut eine derbe Konsistenz verleihen, und eine hohe Anzahl aktiver Fibroblasten [Baptista 2002]. Aus diesem erhöhten Kollagen-Gehalt resultiert neben einer Fehlstellung der Zähne auch ein signifikant verzögerter Zahndurchbruch, den die Patienten beklagen [Huang *et al.* 1997, Hart *et al.* 2002]. Da die fibrotische Beschaffenheit der oralen Mukosa ebenso wie die verzögerte Dentition sowohl bei der hereditären gingivalen Fibromatosis, als auch bei der Dysostosis cleidocranialis zu beobachten sind, ist ein Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit histologischen Erkenntnissen zur hereditären gingivalen Fibromatosis gerechtfertigt.

Auch Coletta bezeichnete die hereditäre gingivale Fibromatosis als ein geeignetes Modell, um die Regulationsmechanismen im Rahmen einer Bindegewebshyperplasie erforschen zu können [Coletta *et al.* 1999a].

Tipton konnte mittels ELISA-Untersuchungen die der Dysostosis cleidocranialis ähnlichen klinischen Manifestationen der hereditären gingivalen Fibromatosis zum einen auf eine forcierte Proliferation der Fibroblasten und zum anderen auf eine verstärkte Synthese von Kollagen Typ I und Fibronectin zurückführen. So zeigten Fibroblasten aus der Mundschleimhaut eines Patienten mit hereditärer gingivaler Fibromatosis eine Proliferationsrate von 488 %, Fibroblasten eines Gesunden hingegen nur eine Proliferationsrate von 68 %. Die Steigerung der Kollagensynthese betrug bei der gesunden

Kontrollgruppe 55 %, bei Fibroblasten aus der Mundschleimhaut eines Patienten mit hereditärer gingivaler Fibromatosis hingegen 235 % [Tipton *et al.* 1997].

Darüberhinaus bestimmte eine Forschergruppe um Huang in Zellkulturversuchen von Fibroblasten, die aus hyperplastischer Gingiva entnommen wurden, im Vergleich zu Fibroblasten aus gesunder Gingiva eine zwei- bis dreifach höhere Aktivität der Prolylhydroxylase. Da es sich bei der Prolylhydroxylase um ein Schlüsselenzym in der Kollagensynthese handelt, postulierte Huang eine intensivierte Kollagensynthese als Mitursache für den verspäteten Zahndurchbruch, der bei der hereditären gingivalen Fibromatosis typischerweise zu beobachten ist [Huang *et al.* 1997].

Des Weiteren konnte Coletta in Mundschleimhaut-Fibroblasten von Patienten mit hereditärer gingivaler Fibromatosis eine signifikant verminderte Expression von Kollagenasen im Vergleich zu einem gesunden Kontrollkollektiv nachweisen. Mit dem dadurch verminderten Kollagenabbau und dem daraus resultierenden erhöhten Kollagen-Gehalt begründete Coletta die für dieses Krankheitsbild typischen fibrotischen Veränderungen der Gingiva [Coletta *et al.* 1999b].

Ein ähnlicher Pathomechanismus des reduzierten Kollagenabbaus könnte – wie bereits oben ausgeführt wurde - auch bei der Dysostosis cleidocranialis für den erhöhten Kollagen Typ I-Gehalt in der oralen Mukosa von Bedeutung sein, da der RUNX2-Transkriptionsfaktor auch einen wesentlichen Einfluss auf die Kollagenase 3 ausübt.

Die Expression dieser Kollagenase 3 wird hierbei zusätzlich durch das TGF- β induziert, d. h. der Kollagenabbau wird bei hohen TGF- β -Spiegeln verstärkt [Uria *et al.* 1998]. Somit ergibt sich für die Kollagenase 3 eine Doppelaktivierung einerseits über TGF- β und andererseits über den RUNX2-Transkriptionsfaktor. Fehlt bei dieser Reaktionskaskade eine Größe, wie der RUNX2-Transkriptionsfaktor bei der Dysostosis cleidocranialis, so folgt daraus ein verminderter Kollagenabbau, welcher die in der vorliegenden Arbeit gemessene erhöhte Menge an Kollagen Typ I in der oralen Mukosa bei Patienten mit Dysostosis cleidocranialis erklärt.

Den gleichen Effekt des herabgesetzten Kollagenabbaus könnte auch durch eine verminderte TGF- β -Aktivität erzeugt werden, die bei der Dysostosis cleidocranialis aus folgenden Überlegungen abgeleitet werden kann: Chang *et al.* konnten nachweisen, dass der Promotorabschnitt des TGF- β -Rezeptor-Gens eine Sequenz trägt, die vom RUNX2-Transkriptionsfaktor gebunden und damit aktiviert werden kann. Damit konnten sie verdeutlichen, dass ein Mangel an RUNX2-Transkriptionsfaktor die Expression des TGF- β -

Rezeptors und somit die TGF- β -abhängigen biochemischen Effekte verringert [*Chang et al. 1998*]. Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erläutert wurde, gehört dazu auch die Forcierung des Kollagenabbaus über die Kollagenase 3, was wiederum den gesteigerten Anteil an Kollagen Typ I in der Gingiva von Dysostosis cleidocranialis-Patienten mit erklärt.

Zusammenfassend kann somit folgendes festgestellt werden:

Überträgt man die eben dargelegten Erkenntnisse bezüglich des Kollagenstoffwechsels, die an Hand der hereditären gingivalen Fibromatosis gewonnen wurden, auf die Dysostosis cleidocranialis, so kommt man zu der Erkenntnis, dass auch bei der Dysostosis cleidocranialis eine Kombination aus vermindertem Kollagenabbau und erhöhter Kollagenneubildung als Ursache für den hier immunhistochemisch nachgewiesenen erhöhten Kollagen I-Gehalt der Gingiva ausschlaggebend ist.

4.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Untersuchung geben Hinweise darauf, dass die fibrotische Beschaffenheit der Gingiva bei der Dysostosis cleidocranialis zumindest zum Teil auf einen erhöhten Gehalt an Kollagen Typ I zurückzuführen ist.

Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper war ausschließlich gegen physiologisches Kollagen Typ I gerichtet. Somit war es natürlich nur möglich, diese Art von Kollagen lichtmikroskopisch erkennbar und somit messbar zu machen. Andere Kollagenarten oder auch pathologisch verändertes Kollagen Typ I, das das Epitop, das vom Antikörper gebunden wird, nicht enthält, können durch diese Färbung nicht sichtbar gemacht werden und entziehen sich damit der lichtmikroskopischen Analyse. Folglich wäre es sinnvoll, mit den jeweils spezifischen monoklonalen Antikörpern auch die anderen in oraler Mukosa vorkommenden Kollagene immunhistochemisch zu analysieren. Aus der Gruppe der Kollagene sind im Einzelnen vor allem die Kollagene Typ III, V, VI und X von Interesse.

Zusätzlich könnte auch der Gesamtgehalt an kollagenen Strukturen mit Hilfe von Übersichtsfärbungen, die alle Kollagenarten markieren, erfasst und mit einem Normalkollektiv verglichen werden.

Des Weiteren wäre es auch sinnvoll, zusätzlich zu den kollagenen Faserbündeln auch die elastischen Fasern mittels spezieller Färbungen sichtbar zu machen. Als Färbemethoden für elastische Fasern bieten sich Resorcinfuchsin, Aldehydfuchsin oder Orcein an [Schiebler 1996]. Damit könnten Vergleiche zwischen Patienten mit Dysostosis cleidocranialis und einem gesunden Kontrollkollektiv angestellt und etwaige Unterschiede in der Vernetzung zwischen kollagenen und elastischen Faser ermittelt werden, die ja auch den wachsartigen Charakter der oralen Mukosa im Rahmen der Dysostosis cleidocranialis begründen könnten.

Darüber hinaus kann durch die bisher durchgeführten Untersuchungen nicht ermittelt werden, ob die Kollagenmoleküle, die das vom verwendeten Antikörper erkennbare Epitop besitzen, nicht noch zusätzlich pathologisch verändert sind. Es zeigte sich nämlich in Folge von ultrastrukturellen Analysen, dass vererblichen Bindegewbserkrankungen häufig ähnliche morphologische Veränderungen zu Grunde liegen. Dabei handelt es sich vor allem um miteinander vernetzte Fibrillen, Fibrillen mit zu großem oder zu kleinem Durchmesser und unverdrillte Fibrillen, die an chemisch denaturiertes Kollagen erinnern [Tilstra und Byers 1994]. Dies könnte natürlich auch einen Einfluss auf die Verbindung der einzelnen kollagenen

Faserbündel untereinander haben, und somit einen Grund für den derben Charakter der Gingiva darstellen. Ob Abweichungen dieser Art vorliegen, könnte beispielsweise mittels elektronenmikroskopischer Verfahren aufgedeckt werden.

Des Weiteren wäre es notwendig, Gewebeproben eines größeren Kollektivs an Dysostosis cleidocranialis-Patienten den oben genannten histologischen Untersuchungen zu unterziehen, um eine noch größere Aussagekraft der erzielten Erkenntnisse zu gewährleisten. Dies dürfte sich jedoch wegen der Seltenheit der Erkrankung und dem oftmals späten Diagnosezeitpunkt, an dem eine Operation meistens nicht mehr in Frage kommt und dadurch auch keine Gewebeproben gewonnen werden können, schwierig gestalten.

Aus den letzten Zeilen wird deutlich, dass histologische Untersuchungen zur zwar seltenen, aber nicht minder spannenden Erkrankung der Dysostosis cleidocranialis sich erst im Anfangsstadium befinden, und sich somit in Zukunft noch mannigfaltige Betätigungsfelder für wissenschaftliche Arbeiten bieten.

5. Zusammenfassung

Bei der Dysostosis cleidocranialis handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung mit einer geschätzten Prävalenz von eins zu einer Million, die auf einer Mutation des RUNX2-Gens auf Chromosom 6p21 beruht. Ihr Hauptmanifestationsgebiet befindet sich im Zahn-, Mund- und Kieferbereich, wo neben einem verzögerten Zahndurchbruch und der großen Anzahl an überzähligen Zähnen besonders die derbe wachsartige Konsistenz der oralen Mukosa imponiert.

Da es in der Literatur bisher keinerlei Untersuchungen zur Zusammensetzung dieser offensichtlich pathologisch veränderten Mundschleimhaut gibt, war es Ziel dieser als Pilotstudie angelegten Arbeit, mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung den Gehalt an Kollagen Typ I in der oralen Mukosa von Patienten mit Dysostosis cleidocranialis mit einem gesunden Normalkollektiv zu vergleichen.

Dazu wurden 27 Gewebeproben von sechs erkrankten Patienten und 17 Gewebeproben von zwölf gesunden Kontrollpersonen analysiert, wobei von jeder Gewebeprobe insgesamt sechs Schnitte angefertigt wurden. Das zu untersuchende Kollagen Typ I wurde anschließend durch einen monoklonalen Antikörper markiert und nach der APAAP-Technik mit Fast Red angefärbt. Danach erfolgte die Bestimmung des Kollagengehalts durch ein digitales Bildanalysesystem.

Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration an Kollagen Typ I in der Gingiva der hier untersuchten Patienten mit Dysostosis cleidocranialis im Vergleich zu einem gesunden Normalkollektiv (U-Test von Mann, Whitney und Wilcoxon: $p = 0,001$, Fischer's exakter Test: $p = 0,0003$).

Vergleiche dieser Ergebnisse mit anderen Arbeiten zum Gehalt an Kollagen Typ I in der Mundschleimhaut bei Dysostosis cleidocranialis können nicht angestellt werden, da die vorliegende Arbeit die erste ist, die sich mit dieser Thematik beschäftigt. Somit können die Resultate nur mit Erkenntnissen aus dem Gebiet der Genetik und Erkenntnissen zur hereditären gingivalen Fibromatosis verknüpft werden. Diese Erkrankung eignet sich in besonderer Weise zur Gegenüberstellung mit der Dysostosis cleidocranialis, da ihr eine pathologische Vermehrung der kollagenen Fasern zu Grunde liegt, woraus eine annähernd identische dentale Symptomatik der verdickten Gingiva und der verspäteten Dentition resultiert.

Die pathologische Vermehrung von Kollagen Typ I, die bei den hier analysierten Gewebeproben auffällig war, könnte sowohl durch eine erhöhte Kollagensynthese der Fibroblasten, als auch durch einen verminderten Kollagenabbau bedingt sein.

Während in Knochenzellen eine erhöhte Menge des RUNX2-Proteins mit einer Erhöhung der Kollagen I-Synthese korreliert, zeigt sich in Fibroblasten ein negativ verstärkender Effekt des RUNX2-Transkriptionsfaktors auf die Kollagen I-Synthese. In ausgewachsenen, transgenen Mäusen führt die Reduktion des Spiegels an aktivem RUNX2-Transkriptionsfaktor zu einer Reduktion der Expression der knochenspezifischen Matrixproteine BSP (bone specific protein), Osteocalcin, Osteopontin und Kollagen Typ I in Osteoblasten. Somit könnte der für die Dysostosis cleidocranialis charakteristische reduzierte RUNX2-Spiegel in den Fibroblasten über diesen negativ verstärkenden Einfluss eine Forcierung der Kollagen I-Synthese induzieren. Zusätzlich finden sich in der Promotorregion des Kollagenase 3-Gens Sequenzen, an die der RUNX2-Transkriptionsfaktor spezifisch bindet und damit die Kollagenase 3-Genexpression aktiviert. Daher könnte der bei Dysostosis cleidocranialis dezimierte RUNX2-Spiegel über die verminderte Kollagenase 3-Expression eine Reduktion des Kollagenabbaus und somit den in der eigenen Studie ermittelten erhöhten Gehalt an Kollagen Typ I in der Gingiva bedingen.

Ein ähnlicher Pathomechanismus aus verstärkter Kollagensynthese und reduziertem Kollagenabbau wurde bereits als Ursache der hereditären gingivalen Fibromatosis identifiziert, deren Symptomatik im Zahn-, Mund- und Kieferbereich deckungsgleich mit der der Dysostosis cleidocranialis ist.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. **Altman DG (1992)** Practical statistics for medical research. Chapman & Hall, London. 256
2. **Arthur MJP (1994)** Degradation of matrix proteins in liver fibrosis. Path Res Pract 190: 825-833
3. **Bancroft J, Cook H (1994)** Manual of histological techniques and their diagnostic application. Churchill Livingstone, Edinburgh London, 265–266
4. **Baptista IP (2002)** Hereditary gingival fibromatosis: a case report. J Clin Peridontol 29: 871-874
5. **Baumert U, Golan I, Driemel O, Reichert TE, Reicheneder C, Müssig D, Rose E (2006)** Dysostosis cleidocranialis – Beschreibung und Analyse einer Patientengruppe. Mund Kiefer GesichtsChir 10: 385-393
6. **Behlfelt KM, Gundlach KK (1986)** Dysplasia cleidocranialis. Symptome im Kieferbereich und deren Behandlung. Fortschr Kiefer Gesichtschir 31: 175-178
7. **Boenisch T (1989)** Färbemethoden. In: Naish S (Hrsg.) Handbuch immunohistochemischer Färbemethoden. DAKO Corporation, Carpinteria, California 22–27
8. **Birkedal-Hansen H (1976)** Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts. J Biol Chem. 251: 3162-3168
9. **Bourne JA (1989)** Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethoden. DAKO Corporation, Carpinteria, California, 26-28

10. **Buurman R, Gundlach K, Schmidt-Hoberg W, Vogel H (1978)** Die Dysplasia cleidocranialis – Zwei Beobachtungen. ROFO Fortschr Geb Rontgenstr Nuklearmed Jan 128: 60-66

11. **Chang DJ, Ji C, Kim KK, Casinghino S, McCarthy TL, Centrella M (1998)** Reduction in transforming growth factor β receptor I expression and transcription factor cbfa1 on bone cells by glucocorticoid. J Biol Chem 273: 4892-4896

12. **Chitayat D, Hodgkinson KA, Azouz M (1992)** Intrafamilial variability in cleidocranial dysplasia: a three generation family. Am J Med Genet 42: 298-303

13. **Coletta RD, Almeida OP, Ferreira LR, Reynolds MA, Sauk JJ (1999a)** Increase in expression of Hsp47 and collagen in hereditary gingival fibromatosis is modulated by stress and terminal procollagen N-propeptides. Connect Tissue Res 40: 237-249

14. **Coletta RD, Almeida OP, Reynolds MA, Sauk JJ (1999b)** Alteration expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF-beta autocrine stimulation. J Periodontal Res 34: 457-463

15. **Cooper SC, Flaitz CM, Johnston DA, Lee B, Hecht JT (2001)** A Natural History of Cleidocranial Dysplasia. Am J Med Genet 104: 1-6

16. **Cote RJ, Hawes D, Taylor CR (2003)** Immunohistochemistry. In: Cote RJ, Suster S, Weidner N, Weiss LM (Hrsg.): Modern surgical pathology, Volume 1. Saunders, Philadelphia, 57–60

17. **Counts AL, Rohrer MD, Prasad H, Bolen P (2001)** An assessment of root cementum in cleidocranial dysplasia. Angle Orthod 71: 293-298

18. **Dard M (1993)** Histology of alveolar bone and primary tooth roots in a case of cleidocranial dysplasia. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol 36: 101-107

19. **Ducy P, Karsenty G (1995)** Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. Mol Cell Biol 15: 1858-1869

20. **Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997)** *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89: 747-754*
21. **Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999)** *A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev 13: 1025-1036*
22. **Ducy P (2000)** *Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. Dev Dyn 219: 461-471*
23. **Everts V, Hembry RM, Reynolds JJ, Beertsen W (1989)** *Metalloproteinases are not involved in the phagocytosis of collagen fibrils by fibroblasts. Matrix Vol.9: 266-276*
24. **Feldman GJ, Robin NH, Brueton LA (1995)** *A gene for cleidocranial dysplasia maps to the short arm of chromosome 6. Am J Hum Genet 56: 938-943*
25. **Fukuta Y, Totsuka M, Fukuta Y, Takeda Y, Yoshida Y, Niitsu J, Yamamoto H (2001)** *Histological and analytical studies of a tooth in a patient with cleidocranial dysostosis. J Oral Sci 43: 85-89*
26. **Gelb BD, Cooper E, Schevell M, Desnick RJ (1995)** *Genetic mapping of the cleidocranial dysplasia (CCD) locus on chromosome band 6p21 to include microdeletion. Am J Med Genet 58: 200-205*
27. **Golan I, Baumert U, Hrala BP, Müßig D (2004)** *Early craniofacial signs of cleidocranial dysplasia. Int J Paediatr Dent 14: 49-53*
28. **Goodman RM, Tadmor R, Zaritsky A, Becker SA (1975)** *Evidence for an autosomal recessive form of cleidocranial dysostosis. Clin Genet 8: 20*
29. **Greig DM (1993)** *A neanderthaloid skull presenting features of cleidocranial dysostosis and other peculiarities. Edinburgh Med J 40: 497-557*

30. **Gundlach KK, Buurman R (1978)** Cleidocranial dysplasia - histological findings in the dental cementum. *Dtsch Zahnarztl Z* 33: 574-578
31. **Hart TC, Zhang Y, Gorry MC, Hart PS, Cooper M, Marazita ML, Marks JM, Cortelli JR, Pallos D (2002)** A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* 70: 943-954
32. **Hassell TM (1993)** Tissues and cells of the peridontium. *Periodontol* 2000 3: 9-38
33. **Hitchin AD, Fairley JM (1974)** Dental management in cleidocranial dysostosis. *Br J Oral Surg* 12: 46-55
34. **Huang JS, Ho KY, Chen CC, Wu YM, Wang CC, Ho YP, Liu CS (1997)** Collagen synthesis in idiopathic and dilantin-induced gingival fibromatosis. *Kaohsiung J Med Sci* 13: 141-148
35. **Jensen BL (1994)** Cleidocranial dysplasia: Craniofacial morphology in adult patients. *J Craniofac Genet Dev Biol* 14: 163-176
36. **Jiménez MG, Balbín M, López JM, Albarez J, Komori T, López-Otin C (1999)** Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 6: 4431-4442
37. **Kanzler B, Kuschert SJ, Liu YH, Mallo M (1998)** Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development* 125: 2587-2597
38. **Kargul B, Salih IM, Yilmaz L, Dumlu A (1997)** Cleidocranial dysostosis: report of a case. *J Clin Pediatr Dent* 22: 83-86
39. **Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G (1997)** Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet* 16: 307-310

40. **Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY (2002)**
Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109: 113-124
41. **Lunkinmaa PL, Jensen BL, Thesleff I, Andreasen JO, Kreiborg S (1995)**
Histological observations of teeth and peridental tissues in cleidocranial dysplasia imply increased activity of odontogenic epithelium and abnormal bone remodeling. *J Craniofac Genet Dev Biol* 15: 212-221
42. **Marie P, Sainton P (1898)** Sur la dysostose cleido-cranienne hereditaire. *Rev neurol* 6: 835
43. **Martin M (1765)** Sur un deplacement naturel de la calvicule. *J med Chir Pharmacol* 23: 456
44. **McLarren KW, Lo R, Grbavec D, Thirunavukkarasu K, Karsenty G, Stifani S (2000)** The mammalian basic helix loop loop helix protein HES1 binds to and modulates the transactivating function of the runt-related factor Cbfa1. *J Biol Chem* 275: 530-538
45. **Mehta L, Verma IC (1992)** Cleidocranial dysplasia: underdiagnosed and misdiagnosed? *Indian J Pediatr* 59: 633-642
46. **Melfi RC (1994)** Oral embryology and microscopic anatomy. 9. Auflage. Lea & Febiger, Philadelphia, 206-219
47. **Mundlos S, Mulliken JB, Abramson DL, Warman ML, Knoll JH, Olsen BR (1995)** Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family. *Hum Mol Genet* 4: 71-75
48. **Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR (1997)** Mutations involving the transcription factor Cbfa1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 5: 773-779

49. **Mundlos S (1999)** Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Genet* 36: 177-182

50. **Narayanan A, Page R (1983)** Connective tissue of the periodontium: a summary of current work. *Collagen Rel Res* 3: 33-64

51. **Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000)** *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer, München Jena, 16-17 und 56-57

52. **Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR (1996)** AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 2: 321-330

53. **Orban und Sicher (1945)** The oral mucosa. *J dent Educ* 10: 94

54. **Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997)** Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 5: 765-771

55. **Pendás AM, Balbín M, Liano E, Jiménez MG und López-Otin C (1997)** Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP-13). *Genomics* 40: 222-233

56. **Pospieszynska MD (1998)** Morphologische Veränderungen des Unterkiefers und der Kiefergelenke bei einer Patientin mit Dysostosis cleidocranialis. *J Orofac Orthop / Fortschr Kieferorthop* 59: 246-250

57. **Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth A S, Becker A, Brueton L, Lee P J, Majewski F, Mulliken JB, Suri M, Zenker M, Mundlos S, Otto F (1999)** Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 65: 1268-1278

58. **Ramesar RS, Greenberg J, Martin R (1996)** Mapping of the gene for cleidocranial dysplasia in the historical Cape Town (Arnold) kindred and evidence for locus homogeneity. *J Med Genet* 33: 511-514
59. **Rainbow RD (1996)** Immunohistochemistry. In: Ellis R, Woods A (Hrsg.): *Laboratory histopathology – a complete reference, Volume 2*. Churchill Livingstone, Edinburgh London, 1-52
60. **Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peteres H, Tang Z, Maxson R, Maas R (2000)** Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24: 391-395
61. **Scheuthauer G (1871)** Kombination rudimentärer Schlüsselbeine mit Anomalien des Schädels beim erwachsenen Menschen. *Allg. Wien. med. Ztg.* 16: 293
62. **Schiebler TH (1996)** Histologie. 4. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg, 465–466
63. **Schroeder H, Münzel-Pedrazzoli S, Page R (1973)** Correlated morphometric and biochemical analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 18: 899–923
64. **Schroeder H (1992)** Orale Strukturbiologie. 4. Auflage. Thieme, Stuttgart, 248–254, 349-369
65. **Schurch P, Fleischer-Peters A (1967)** Zur Klinik der Dysostosis cleidocranialis. *Z Kinderheilk* 98: 107
66. **Selvamurugan N, Brown RJ, Partridge NC (2000)** Regulation of collagenase-3 gene expression in osteoblastic and non-osteoblastic cell lines. *J Cell Biochem* 79: 182-190
67. **Shaikh R, Shusterman S (1998)** Delayed dental maturation in cleidocranial dysplasia. *J Dent Child* 65: 325-329

68. **Smith NH (1968)** A histologic study of cementum in a case of cleidocranial dysostosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 25: 470–478
69. **Stifani S, Blaumueller SS, Redhead CM, Hill NJ, Artavanis-Tsakonas S (1992)** Human homologs of a *Drosophila* enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* 2: 119–127
70. **Thirunavukkarasu K, Mahajan M, McLarren KW, Stifani S, Karsenty G (1998)** Two domains unique to osteoblast-specific transcription factor *Osf2/Cbfa1* contribute to its transactivation function and its inability to heterodimerize with *CBFb*. *Mol Cell Biol* 18: 4197–4208
71. **Tilstra DJ, Byers PH (1994)** Molecular basis of hereditary disorders of connective tissue. *Annu Rev Med* 45: 149-163
72. **Tintut Y, Parhami F, Le V, Karsenty G, Demer LL (1999)** Inhibition of osteoblast-specific transcription factor *Cbfa1* by the cAMP pathway in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 41: 28875-28879
73. **Tipton DA, Howell KJ, Dabbous MK (1997)** Increased proliferation, collagen and fibronectin production by hereditary gingival fibromatosis fibroblasts. *J Periodontol* 6: 524-530
74. **Tribiolo C, Lufkin T (1999)** The murine *Bapx1* homebox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development* 126: 5699-5711
75. **Tsuji K, Ito Y, Noda M (1998)** Expression of the *PEBP2 α A/AML3/CBFA1* gene is regulated by *BMP4/7* heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells. *Bone* 22: 87-92

76. **Uria JA, Jiménez MG, Balbin M, Freije JMP, López-Otin C (1998)** Differential effects of TGF- β on the expression of collagenase 1 and collagenase 3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 16: 9769-9777
77. **Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996)** Disruption of the *cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3444–3449
78. **WeiB C (2001)** Basiswissen medizinische Statistik. Springer, Berlin Heidelberg, 230
79. **Wieser R, Wrana JL, Massague J (1995)** GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the THGF-beta receptor complex. *EMBO J* 14: 2199-2208
80. **Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT (1998)** Role of the α 2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem* 49: 32988-32994
81. **Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT (2000)** MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor *cbfa1*. *J Biol Chem* 6: 4453–4459
82. **Yamamoto H, Sakae T, Davies JE (1989)** Cleidocranial dysplasia: A light microscope, electron microscope and crystallographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2: 195–200
83. **Zhou G, Chen Y, Zhou L, Thirunavukkarasu K, Hecht J, Chitayat D, Gelb BD, Pirinen S, Berry SA, Greenberg CR, Karsenty G, Lee B (1999)** *Cbfa1* mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. *Hum Mol Genet* 12: 2311–2316
84. **Zhou YX, Xu X, Chen L, Li C, Brodie SG, Deng CX (2000)** a Pro250Arg substitution in mouse *Fgfr1* causes increased expression of *Cbfa1* and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet* 9: 2001–2008

85. **Zou SJ, D'Souza RN, Ahlberg T, Bronckers AL (2003)** Tooth eruption and cementum formation in the Runx2/Cbfa1 heterozygous mouse. Arch Oral Biol 48: 673-677

6.2 Patientenkollektiv

6.2.1 Patienten mit Dysostosis cleidocranialis

Patient	Alter / Geschlecht	Probennummer	Entnahmestelle
Patient 1	22 Jahre, weiblich	2C	Regio 21
		3C	Regio 48
		4C	Regio 38
Patient 2	14 Jahre, männlich	13C	Harter Gaumen
		111C	Regio 11
Patient 3	11 Jahre, weiblich	19C	Harter Gaumen
		75C	Regio 15
		81C	Regio 17 / 18
		89C	Regio 48
		90C	Regio 44
Patient 4	21 Jahre, männlich	107C	Regio 17
Patient 5	20 Jahre, weiblich	124C	Regio 17
		126C	Regio 13
		133C	Regio 43

		134CI + II	Regio 42b
		135C	Regio 43
		136C	4. Quadrant
		138C	Regio 27
		141C	Regio 21
		142C	Regio 23
		147C	Regio 25b
Patient 6	14 Jahre, männlich	154C	Regio 47
		156CI + II	Regio 48
		157C	Regio 43 / 44
		158C	Regio 24b

6.2.2 Patienten der Kontrollgruppe

Patient	Alter / Geschlecht	Probennummer	Entnahmestelle
Patient 7	47 Jahre, männlich	7N	Regio 31 – 41
Patient 8	14 Jahre, männlich	17N	Harter Gaumen
Patient 9	18 Jahre, weiblich	21N	Harter Gaumen

		70N	Harter Gaumen
Patient 10	75 Jahre, männlich	25N	Regio 16
		110N	Regio 47
		121N	Regio 47
Patient 11	10 Jahre, männlich	56N	Harter Gaumen
Patient 12	29 Jahre, weiblich	64N	Harter Gaumen
Patient 13	13 Jahre männlich	65N	Harter Gaumen
Patient 14	16 Jahre, männlich	67N	Harter Gaumen
Patient 15	16 Jahre, weiblich	68N	Regio 15, 35, 45
Patient 16	66 Jahre, männlich	73N	Regio 45
Patient 17	67 Jahre, männlich	119N	Regio 37
Patient 18	16 Jahre, weiblich	170N	Gingivastanze

6.3 Rohdaten

6.3.1 Dysostosis cleidocranialis

Gewebeprobe	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 1 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 2 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 3 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 4 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 5 pro 100 000 μm^2
2C	17681	22553	26783	16442	16113
3C	17228	6782	15776	4862	9289
4C	3690	15724	11771	10794	12247
13C	21503	8829	15955	14842	13528
19C	13438	7867	5878	13303	7371
75C	11013	18242	19988	13886	19764
81C	16879	15436	16128	19413	15857
89C	23645	12502	9323	17040	9412
90C	21335	20308	21001	18631	
107C	9811	19410	10453	16410	18127
111C	6651	10914	11339	6198	9337
124C	14348	16145	13561	10579	11292
126C	15992	10804	16424	23159	15233

133C	7685	16300	12754	22565	28690
134CI	16700	11746	9438	8348	15293
134CII	6261	13335	14090	17097	17746
135C	12739	13635	11299	14374	18396
136C	17292	22597	15219	17333	25094
138C	13914	12551	21099	15233	17317
141C	17141	7162	10359	11243	10042
142C	10444	9306	10648	14456	19026
147C	20346	24760	20670	18408	14484
154C	11603	17056	7855	15586	
156CI	11153	16678	16296	13539	10260
156CII	13741	13337	14002	14515	11133
157C	7730	20797	11661	9146	12513
158C	8254	9559	8594	10450	19254

6.3.2 Normalkollektiv

Gewebeprobe	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 1 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 2 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 3 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 4 pro 100 000 μm^2	Relative Menge an Kollagen I im Schnitt 5 pro 100 000 μm^2
7N	8453	5824	11341	14148	4721
17N	15185	12360	13312	7157	10934
21N	4904	11803	10953	6820	2143
25N	9564	11222	6368	13333	8961
56N	7674	12042	10752	9399	8376
64N	7242	7081	6277	3984	4254
65N	4996	7913	12492	7680	5397
67N	4505	8967	13844	10988	
68N	3379	1123	4701	1448	3113
70N	9093	4409	9265	4645	5620
73N	8309	5338	5521	6243	10693
110N	10070	4161	10902	3779	12246
119N	4541	4989	4006	8105	
121N	6535	6452	11943	6651	6668
170N	3436	7110	5866	3925	4624

6.4 Danksagung

Zu allererst danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Niederdellmann für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas. Darüberhinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Reichert, der sich dankenswerterweise bereit erklärte, meine Dissertation weiter zu betreuen. Vor allem aufgrund seines begrenzten Zeitangebots weiß ich die unproblematische Übernahme meiner Promotion besonders zu schätzen.

Herrn PD Dr. Dr. Driemel danke ich für die Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Untersuchungen publizieren zu können.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Anja Reck für die Hilfestellung bei allen labortechnischen Fragen, die sich im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen ergaben.

Insbesondere danke ich meiner Familie für ihr unvergleichliches Verständnis für meinen zeitintensiven Ausbildungsweg. Ohne die finanzielle und moralische Unterstützung sowohl durch meine Eltern, als auch durch meine Tante Barbara und meinen Onkel Rudolf wäre die Anfertigung dieser Promotionsarbeit nur sehr schwer möglich gewesen. Meine Schwester Stephanie verstand es durch ihre direkte und liebenswerte Ansprache, mich in allen Lebenslagen aufzuheitern. Meiner jederzeit zu mir stehenden Oma war es leider nicht mehr erlaubt, die Fertigstellung meiner Dissertation zu erleben. In Gedanken ist sie jedoch immer bei mir.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner einzigartigen Frau Stephanie bedanken, die allzeit für mich da ist und für alle meine Probleme und Sorgen jederzeit ein offenes Ohr hat. Durch ihre Liebe und ihren Beistand half sie mir, meine oft gehegten Zweifel zu zerstreuen.

6.5 Lebenslauf

Name: Tobias Rudolf Ach

Geburtsdatum: 21.09.1979 in Weiden/Oberpfalz

Eltern: Josef Ach, Versorgungstechniker
Gudrun Ach, MTA

Familienstand: Verheiratet

Schul Ausbildung: 1985-1989 Grundschule Windischeschenbach
1989-1998 Gymnasium Neustadt/Waldnaab

Zivildienst: 1998-1999 Klinikum Weiden

Hochschulausbildung: 1999-2006 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg

25.09.2001 Ärztliche Vorprüfung
19.09.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
13.04.2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.05.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03.05.2006 Approbation als Arzt

Seit 2006 Studium der Zahnmedizin an der Universität
Regensburg

Berufliche Tätigkeit: 01.01.2008 bis 30.06.2008 Assistenzarzt in der Klinik und
Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie am
Klinikum der Universität Regensburg

- Publikation: Ach T, Baumert U, Morszeck C, Dahse R, Reichert TE, Driemel O (2007) Immunhistochemische Untersuchung des Kollagen Typ I-Gehalts der Gingiva bei Dysostosis cleidocranialis. Mund Kiefer GesichtsChir 6: 349-354
- Posterpräsentation: Ach T, Baumert U, Morszeck C, Dahse R, Reichert TE, Driemel O: Immunhistochemische Untersuchung des Kollagen Typ I-Gehalts der Gingiva bei Dysostosis cleidocranialis. Vorgestellt bei der 58. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Kieferchirurgie innerhalb der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am 01.05.2008 in Wiesbaden.
- Preise: Posterpreis des Vereins ehemaliger Zahnmedizinstudenten Regensburg e. V. für die Arbeit „Immunhistochemische Untersuchung des Kollagen Typ I-Gehalts der Gingiva bei Dysostosis cleidocranialis“, verliehen am 27.06.2008.