

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KIEFERORTHOPÄDIE  
DIREKTOR: PROF. DR. DR. PETER PROFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE GENEXPRESSIONSANALYSE DER  
SYNCHONDROSIS SPHENOCCIPITALIS ALS BASIKRANIALES  
WACHSTUMSZENTRUM. EINE TIEREXPERIMENTELLE STUDIE.**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michael Maurer

2010



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR KIEFERORTHOPÄDIE  
DIREKTOR: PROF. DR. DR. PETER PROFF  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE GENEXPRESSIONSANALYSE DER  
SYNCHONDROSIS SPHENOCCIPITALIS ALS BASIKRANIALES  
WACHSTUMSZENTRUM. EINE TIEREXPERIMENTELLE STUDIE.**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michael Maurer

2010

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Behr

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2011

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Theorien der Schädelentwicklung</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Makroskopische Schädelentwicklung</b>	<b>5</b>
2.2.1 Pränatale Schädelentwicklung	5
2.2.2 Postnatale Schädelentwicklung	10
<b>2.3 Schädelentwicklung histologisch und molekularbiologisch</b>	<b>12</b>
2.3.1 Desmale Ossifikation	12
2.3.2 Enchondrale Ossifikation	13
2.3.2.1 Enchondral ossifizierende Strukturen	13
2.3.2.2 Synchondrosis sphenoccipitalis als Wachstumszentrum der Schädelbasis	15
2.3.2.3 Molekularbiologischer Ablauf der enchondralen Ossifikation	19
2.3.2.4 Genexpression und Proteinsynthese während der enchondralen Ossifikation und der Knochenremodellation	22
2.3.2.5 Fehlbildungen und Entwicklungsstörungen in Verbindung mit der enchondralen Ossifikation	26
<b>3. Zielstellung der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>4.1 Tiermodell und Entnahme der Proben</b>	<b>31</b>
<b>4.2 RNA – Isolation</b>	<b>32</b>
<b>4.3 Photometrische Quantifizierung</b>	<b>33</b>
<b>4.4 Reverse Transkription</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Quantitative Real – time – PCR</b>	<b>34</b>
4.5.1 Primer	34
4.5.2 Durchführung der quantitativen Real – time – PCR und verwendete Reagenzien	35
4.5.3 Auswertung der qPCRs	37
4.5.4 Agarose – Gelelektrophorese	37
4.5.5 Statistische Auswertung	39

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Genexpression zu Beginn der Säugephase (Tag 0 postnatal)</b>	<b>40</b>
5.1.1 Typ II – Kollagen	40
5.1.2 Typ X – Kollagen	40
<b>5.2 Genexpression zur Mitte der Säugeperiode (Tag 10 postnatal)</b>	<b>40</b>
5.2.1 Typ II – Kollagen	40
5.2.2 Typ X – Kollagen	41
<b>5.3 Genexpression bei Beginn der Aufnahme fester Nahrung (Tag 21 postnatal)</b>	<b>41</b>
5.3.1 Typ II – Kollagen	41
5.3.2 Typ X – Kollagen	41
<b>5.4 Genexpression bei Erreichen der Geschlechtsreife (Tag 52 postnatal)</b>	<b>40</b>
5.4.1 Typ II – Kollagen	41
5.4.2 Typ X – Kollagen	42
<b>5.5 Graphische Darstellung</b>	<b>42</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>6.1 Proben der Synchrondrosis sphenooccipitalis</b>	<b>45</b>
6.1.1 Anstieg der Typ II – und X – Kollagen – Expression bis Tag 10	45
6.1.2 Abfall der Typ II – und X – Kollagen – Expression zwischen Tag 10 und Tag 52	48
6.1.3 Kieferorthopädische Relevanz der synchondralen Entwicklung	49
<b>6.2 Methodendiskussion</b>	<b>52</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>9. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>9.1 Abbildungen</b>	<b>81</b>
<b>9.2 Tabellen</b>	<b>82</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>83</b>
<b>10.1 Verwendete Geräte</b>	<b>83</b>

<b>10.2</b>	<b>Verwendete Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>

**Hinweis:**

Die im Text genannten Gebrauchsnamen, Handelsnamen und Warenbezeichnungen sind zum Teil patent – und urheberrechtlich geschützt. Aus dem Fehlen eines besonderen Hinweises bzw. des Zeichens ® darf nicht geschlossen werden, dass kein Schutz besteht.



### 1. Einleitung

Die biologischen Mechanismen von Wachstum und Entwicklung der Schädelbasis und des Gesichtsschädels sind für die Ätiologie orofazialer Symptome bzw. Syndrome und damit auch für das kieferorthopädische Therapiespektrum von großer Bedeutung (Carlson, 2005). Moyers fasste dies treffend in Worte: „Without the biologic dynamics of natural and contrived changes in craniofacial morphology no occlusion can be improved, no face made more esthetic“ (Moyers, 1988).

In wieweit die Interaktion von genetischen und umweltbedingten Faktoren für den klinischen Befund eine Rolle spielt, ist in manchen Belangen weitgehend unklar. Deshalb ist es für den Kieferorthopäden wichtig, bei allen relevanten genetischen Faktoren auf dem Laufenden zu bleiben, um Therapien erfolgreich durchzuführen.

Das skelettale Wachstum ist ein komplexer Prozess, der einerseits aus der enchondralen Ossifikation und der damit verbundenen Mineralisation von Strukturen besteht (Mackie et al., 2007). Andererseits müssen die knöchernen Einheiten nach ihrer Genese als dynamische Strukturen betrachtet werden, die einem permanenten „Remodelling“ unterliegen, um ihre Funktionalität und Stabilität aufrechtzuerhalten (Proff und Römer, 2009). Wissenschaftliche Erkenntnisse über diese komplexen biologischen Zusammenhänge ermöglichen es dem Behandler, gezielt Entwicklungsvorgänge zu unterstützen oder zu hemmen und optimieren so die kieferorthopädische Behandlung (Schmuth und Diedrich, 2000). Außerdem erhält der Therapeut Anhaltspunkte über das individuelle Behandlungsziel und dessen Langzeitstabilität. Neue Resultate in der Grundlagenforschung im Hinblick auf die Biologie des Wachstums des Gesichtsschädels können in Verbindung mit innovativen Methoden und Technologien zu einer Synthese führen, die eine verbesserte Behandlungsqualität und Effizienz garantiert. Um den optimalen Zeitpunkt für die Therapie bzw. den Höhepunkt der Pathogenese zu bestimmen, ist es erforderlich, die Entwicklung des maxillo – mandibulären Komplexes auf makroskopischer und molekularbiologischer Ebene zu analysieren. So ist eine genaue Betrachtung der Verknöcherung bei verschiedenen Krankheitsbildern wie z. B. bei der Dysostosis cleidocranialis und craniofacialis, bei Morbus Crouzon und dem Apert – Syndrom sowie bei diversen anderen Syndromen und nicht syndromatischen Hypo – oder Hyperplasien im Kiefer – und Gesichtsbereich nötig (Rosenberg et al., 1997; Smartt et al., 2005; Kyrkanides et al., 2007; Rukkulchon und Wong, 2008).

Auch kieferorthopädische Therapiestrategien mit der Zielsetzung Frühförderung und Wachstumshemmung oder – stimulation erfordern Kenntnisse von der Entwicklung der betroffenen Strukturen. Von besonderem Interesse sind hierbei die knorpeligen primären Wachstumszentren der Schädelbasis, wie z. B. die Synchrondrosis sphenoccipitalis, die Lamina perpendicularis des Nasenseptums und der mandibuläre Gelenkfortsatz, aber auch der Processus alveolaris mit den Zahnfächern des Ober – und Unterkiefers als knöchernes Beispiel (Scott, 1953; Kemble, 1973; Roberts und Hartsfield, 2004). Der Verlauf der Ossifikation dieser Areale und ihre konstante Remodellation stellt eine wichtige Funktion für die postnatale Genese des Viszerokraniums dar (Roberts und Hartsfield, 2004; Ödmann et al., 2008).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Ablauf der enchondralen Ossifikation in der Synchrondrosis sphenoccipitalis – laut Virchow dem bedeutendsten primären und sekundären Wachstumszentrum der Schädelbasis (Virchow, 1857). Sie erscheint primär verantwortlich für das Wachstum der Schädelbasis (Mao und Nah, 2004). Auch Baume erkannte die überragende Bedeutung, die ihr durch ihren Beitrag zur Genese aller Strukturen des Gesichtschädels, wie auch Maxilla und Mandibula, zuteil wird, was ihr auch Relevanz in Bezug auf die kieferorthopädische Behandlung verleiht (Baume, 1970).

Die Synchrondrosis sphenoccipitalis als Bestandteil des Chondrokraniums durchläuft – wie alle Wachstumszentren des basikranialen Bereichs – verschiedene Stadien der enchondralen Ossifikation, die mit ihrer Expansion und allmählichen knöchernen Umwandlung einhergehen (Heinkele und Ewers, 1989). Die Entwicklungsvorgänge in der betreffenden Struktur sollen in der vorliegenden Arbeit genauer dargestellt werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Theorien der Schädelentwicklung

Die Gestalt des menschlichen Körpers beruht auf einer regelrechten Entwicklung seiner skelettalen Strukturen (LeVeau und Bernhardt, 1984). Eine Störung dieser Genese führt zu großen Defiziten bei Erscheinung und Funktion des gesamten Organismus (Clarren und Smith, 1977; Blechschmidt und Gasser, 1978; Albright, 1979). In den vergangenen Jahrhunderten wurde in den verschiedenen medizinischen Fachrichtungen der genaue Ablauf des Wachstums skelettaler Strukturen erforscht. In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhundert kam der Berliner Chirurg und Anatom Julius D. Wolff (1835 – 1902) zu der Ansicht, dass extrinsische Faktoren die äußere Erscheinung sowie den inneren Aufbau knöcherner Strukturen beeinflussen können (Enlow, 1968). Dieses als „Wolffsches Gesetz“ bekannte Postulat von der Transformation knöcherner Substanz analog zur Funktion versuchte man auch durch mathematische Formeln auszudrücken (Moss, 1980; LeVeau und Bernhardt, 1984).

Im Laufe der Zeit wurden die Prinzipien der Biomechanik weiter spezifiziert und man befasste sich auch mit den knöchernen Arealen des Kopfes und des Schädels. Dazu liegen mehrere unterschiedliche Theorien vor.

So postulierte Brash um 1920, dass das kraniofaziale skelettale Wachstum ausschließlich durch Remodellation des Knochens erfolgt und Suturen und Knorpelareale keine Rolle spielen (Brash, 1924). Weinmann und Sicher waren in den vierziger Jahren der Ansicht, dass hauptsächlich das suturale Bindegewebe und knorpelige Wachstumszentren für das Wachstum im Schädelbereich verantwortlich sind. Laut Weinmann und Sicher erfolgt das „Bone – Remodelling“ nur aufgrund von lokalen Einflüssen (Carlson, 2005). In der fünfziger Jahren stellten Suturen für Scott jedoch eher nur sekundäre oder kompensatorische Wachstumszonen dar (Scott, 1954). Auch nach heutigen Lehrmeinungen wird den Suturen eine eher ausgleichende Funktion zugerechnet (Fanghänel et al., 2003). Scott proklamierte, dass das Nasenseptum die aktivste und wichtigste Struktur für die kraniofaziale Entwicklung prä – und postnatal sei. Seiner Theorie zufolge drängt das Wachstum des knorpeligen Nasenseptums alle Gesichtsknochen bis auf den Unterkiefer nach ventral und kaudal und somit weg von der Schädelbasis (Scott, 1953). Auch die mandibulären Kondylen und vor allem ihr sekundärer Knorpel waren bei ihm von

herausragender Bedeutung (Scott, 1954). In den folgenden Jahren wurden weitere Studien durchgeführt, um die genannten Theorien zu beweisen oder zu widerlegen. Man kam zu dem Ergebnis, dass sowohl das Remodelling, als auch die Suturen, die Schädelbasis und das Nasenseptum große Anteile an der Entwicklung des Gesichtsschädels haben. Alle Theorien beinhalteten, dass das kraniofaziale Wachstum vererblich und intrinsisch genetisch reguliert ist (Carlson, 2005). In den sechziger Jahren jedoch stellte Moss die kontrovers diskutierte Behauptung auf, dass die Heredität das Wachstum des Schädels zwar einleitet, danach jedoch danach nur noch von untergeordneter Bedeutung ist. Er ging phasenweise sogar soweit, zu behaupten, es gäbe keine Gene, die für Knochen codieren (Moss – Salentijn, 1997). Moss betrachtete das Skelett in einer dynamischeren und funktionelleren Weise als die Forschung vor ihm (Moss – Salentijn, 1997) und vertrat vielmehr die Hypothese der funktionellen Matrix, die besagt, dass Wachstum nur als direkte Antwort auf Umwelteinflüsse bzw. auf Veränderungen der benachbarten Strukturen erfolgt. Eine Hypothese seiner Forschung lautete: „Knochen wachsen nicht, Knochen sind gewachsen.“ (Moss, 1962). Für die Schädelentwicklung sind nach Moss nur zwei Elemente nötig: Die funktionelle Matrix bestehend aus den umgebenden und in Funktion stehenden Weichgeweben und die skelettale Einheit bestehend aus den knöchernen Strukturen, die die funktionelle Matrix unterstützen (Moss, 1962). Knochenwachstum erfolgt laut Moss nur sekundär und kompensatorisch zur Ausdehnung der funktionellen Matrix.

Gegen Ende der sechziger Jahre präsentierte Enlow die Theorie des äquivalenten Wachstums, die den Schädel in mehrere getrennt voneinander zu betrachtende Bereiche einteilt, die sich in ihrer Entwicklung gegenseitig beeinflussen bis sich ein Gleichgewicht zwischen den Strukturen einstellt (Enlow, 1968).

Eine weitere bedeutende Lehrmeinung stellt die Servosystem – Theorie von Petrovic aus den siebziger Jahren dar. Ihr zufolge provoziert die Wachstumsrichtung des Mittelgesichtes nach kaudal und ventral eine Anteriorverlagerung des Oberkieferzahnbogens. Dadurch entsteht eine Diskrepanz zwischen der Ober – und der Unterkieferdentition, die zwar gering ist aber dennoch den Tonus der protrudierenden Muskulatur erhöht. Die Aktivierung dieser Muskeln wirkt sich sowohl auf den kondylären Knorpel als auch auf das Kiefergelenk aus und dient dadurch als Wachstumsstimulus für den Kondylus (Petrovic, 1974). Die Servomotor – Theorie

basiert darauf, dass alle am Wachstum beteiligten Prozesse hormonell geregelt sind und sich gegenseitig beeinflussen (Petrovic und Stutzmann, 1980).

Nach revolutionären Erkenntnissen auf dem Gebiet der Molekularbiologie und Genetik entstand das Bedürfnis, Konzepte zur genetischen Analyse des Schädelwachstums zu entwickeln. T.H. Morgan beschäftigte sich schon vor ca. 75 Jahren mit der Frage, ob alle Gene immer aktiv sind oder nur zu bestimmten Zeiten im Verlauf der Entwicklung (Carlson, 2005). Die Theorie von Scott machte deutlich, dass es primäre Wachstumszentren – in diesem Fall das Nasenseptum – gibt, an denen die für das Schädelwachstum codierenden Gene exprimiert werden. Moss' Theorie von der funktionellen Matrix lenkte das Augenmerk auf Transkriptionsfaktoren, die in der postnatalen Phase der Schädelentwicklung diese kontrollieren, und deren Beeinflussung durch die Umwelt (Carlson, 2005). Die heutige Forschung beschäftigt sich nun damit, inwieweit die Morphogenese von genetischen und intrinsischen Faktoren reguliert wird, inwieweit extrinsische Faktoren die Genexpression verändern und wie die Genexpression das postnatale Wachstum sowie die Reaktion auf eine kieferorthopädische Behandlung beeinflussen.

## **2.2 Makroskopische Schädelentwicklung**

### **2.2.1 Pränatale Schädelentwicklung**

Das Anlagematerial des Schädels ist das Kopfmesoderm mit unterschiedlichen Ursprüngen. Dabei wird der vordere Teil der Schädelbasis und der Gesichtsschädel von Mesektoderm, das von der Prächordalplatte und der Neuralleiste geliefert wird, gebildet (Johnston et al., 1974).

Nach der Vereinigung der Geschlechtszellen kommt es zwischen dem 21. und 25. Schwangerschaftstag zur Ausbildung des Prosencephalon. Die Entstehung dieser ersten schädelähnlichen Struktur wird durch das Einwandern von Zellen aus der Neuralleiste induziert (Johnston und Bronsky, 1995). Das mit Epithel überzogene Mesenchym vermehrt sich ungleichmäßig und es bilden sich fünf Gesichtswülste, nämlich der mediale Stirnwulst und die jeweils paarigen Ober- und Unterkieferwülste, die das Stomatodeum, den Vorläufer der Mundöffnung, umschließen (Miethke, 2000). Der Stirnwulst wird weiterhin in die jeweils paarigen lateralen und medialen Nasenwülste unterteilt (Johnston und Bronsky, 1995). Durch das Wachstum der an

das Stomatodeum angrenzenden Strukturen entsteht schließlich die primäre Mundhöhle. Kaudal des Oberkieferwulstes befinden sich fünf, bzw. sechs Kiemenbögen, wobei sich jedoch der fünfte Kiemenbogen sofort nach dem Entstehen zurückbildet, und die verbleibenden Kiemenbögen die Nummern 1,2,3,4 und 6 tragen (Miethke, 2000). Alle innerhalb dieser, durch die Kiemenbögen erzeugten Abschnitte liegenden Strukturen haben beim Menschen eine gemeinsame Blut- und motorisch – sensible Nervenversorgung (Miethke, 2000). Dieser Tatsache kommt bei der Anästhesie oder Läsion eines betreffenden Nervens besondere Bedeutung in Hinblick auf das Areal der ausfallenden Strukturen zu. Außerdem besteht die Theorie, dass die embryonale Gesichtssegmentierung Einfluss auf die Tumorausbreitung hat (Sperber, 1989).

Daraufhin kommt es durch eine Kombination aus Zellproliferation und morphogenetischen Veränderungen zur Vermehrung des Epithels, wodurch sich die Gesichtswülste einander annähern (Johnston und Bronsky, 1995). Das Mesenchym von Oberkiefer- und Nasenwülsten ist dabei noch durch eine Epithelmauer getrennt. Diese löst sich durch mesenchymale Penetration auf. Die fazialen Wülste nähern sich nun ungehindert weiter einander an und wachsen nach kaudal und ventral, wobei sich die Oberkieferwülste unter die lateralen Nasenwülste schieben und sich schließlich mit den medialen Nasenwülsten vereinigen (Diewert und Wang, 1992; Johnston und Bronsky, 1995). Durch Verschmelzen der Oberkiefer – und der medialen Nasenwülste entsteht der primäre Gaumen, der die Mundhöhle nach kranial abschließt (Johnston und Bronsky, 1995; Miethke, 2000). Die unvollständige oder gänzlich unterbliebene Auflösung der Epithelmauer ist die Ursache für die verschiedenen Formen von Lippen – und Kieferspalt (Johnston und Bronsky, 1995). Im gleichen Zeitraum entwickeln sich Augen und Hals, so dass man gegen Ende der fünften Woche eine erste Andeutung des menschlichen Gesichts feststellen kann (Kjaer, 1998; Miethke, 2000) (siehe Abb. 1).

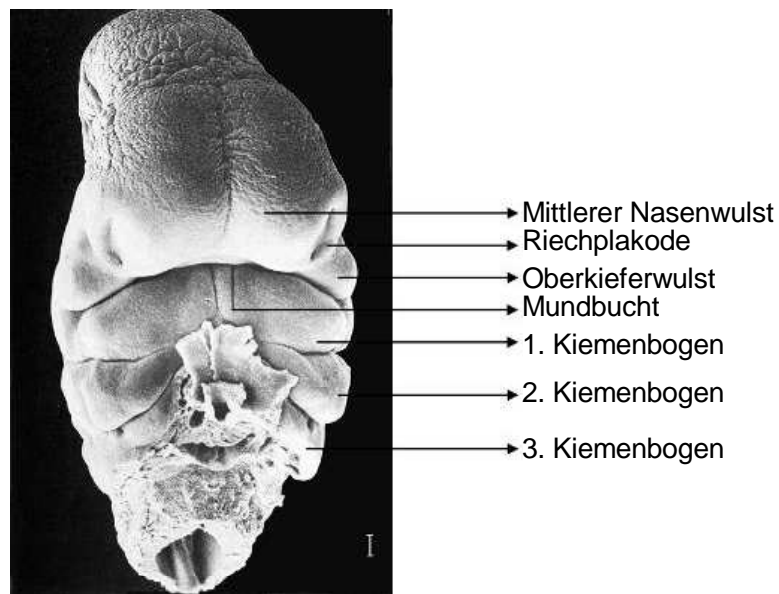


Abb. 1 Vorderansicht des Kopfes und des Halses eines sechs Wochen alten menschlichen Embryos (8mm SSL), rasterelektronische Aufnahme (aus: Hinrichsen, 1985)

In der siebten Woche kommt es neben einer allgemeinen Gewebevermehrung auch zu einer verstärkten Gewebedifferenzierung. Die Bindegewebsanhäufungen an der Schädelbasis differenzieren zu Knorpel, wodurch das Chondrokranium, der Vorläufer der knöchernen Schädelbasis, sowie Nasen- und Ohrknorpel gebildet werden (Kjaer, 1990). Aus dem ersten Kiemenbogen entsteht der Meckelsche Knorpel als erste Struktur des späteren Unterkiefers, der auch zur Entwicklung desselben beiträgt (Bhaskar et al., 1953). Die Mandibula legt sich ihm schalenartig als bindegewebiger Deckknochen an. Der Meckelsche Knorpel bildet weiterhin zusammen mit der Anlage des Amboss und der Ohrkapsel das „primäre Kiefergelenk“ (Hinrichsen, 1990).

Erste Anzeichen der Schädelbasis treten in Form von vorknorpeligen Blastemen im Carnegie – Stadium 16 auf. Zu ihnen zählen die seitlich der Chorda gelegenen Parachordalia, die Trabeculae und Polknorpel neben und vor der Hypophyse sowie die Ohrkapsel seitlich um die Layrinthanlage (Hinrichsen, 1990). Nach zweieinhalb bis drei Schwangerschaftsmonaten ist die Basalplatte der Schädelbasis in Form einer flachen Schale aus Knorpel größtenteils ausgebildet. Diese stützt bis dahin zusammen mit dichten Bindegewebsmembranen das Gehirn des Embryos (Clara, 1949; Walberg, 1960; Shapiro und Robinson, 1980). Im Medianbereich dieser

primitiven Schädelbasis befinden sich während der intrauterinen Periode drei bis fünf Synchondrosen, die eine schnelle Expansion dieses Bereichs garantieren (Tillmann und Töndury, 1987). An der knorpeligen Schädelbasis sind im prächordalen Abschnitt die Nasenkapsel und der Anlagebereich des Keilbeins zu unterscheiden, während im chordalen Teil dorsal der Hypophyse die Anlage des Hinterhauptsbeines den Hirnstamm noch nicht vollständig umschließt (Hinrichsen, 1990). Parallel zum synchondralen Wachstum kommt es zu einer Ventral – Kaudal – Verlagerung der Schädelbasis durch Resorption auf der endokranielen und Apposition auf der ektokranielen Seite (Miethke, 2000). Es ist umstritten, ob vor der Geburt eine Änderung des Schädelbasiswinkels Nasion – Sella – Basion eintritt oder nicht (Rakosi, 1979).

Gleichzeitig zur Schädelbasis entwickeln sich die von den Nasenwülsten gebildeten Riechplakoden durch verstärkte Epithelproliferation nach fazial zu Riechgruben und schließlich zu Riechschläuchen. Die oben genannte Epithelmauer trennt die Riechgruben für kurze Zeit von Mund- und Nasenraum und wird als Membrana buconasalis bzw. oronasalis bezeichnet. Ihr Einreißen ist essentiell für die Bildung der Apertura nasalis interna sowie der primitiven Choanen am Ende der fünften Schwangerschaftswoche (Kahl – Nielke, 2010).

In der sechsten Schwangerschaftswoche treten zwei leistenähnliche Fortsätze, die sog. Gaumenplatten auf. Diese hängen nach kaudal in den Sulcus alveolingualis. Die Zunge verlagert sich ebenfalls nach kaudal, woraufhin sich die Gaumenplatten aufrichten und schließlich eine horizontale Lage einnehmen. Es kommt dadurch zwischen siebter und achter Schwangerschaftswoche zur Bildung des sekundären Gaumens (Kraus et al., 1966). Die Gaumenplatten verschmelzen nach ventral mit dem dreieckigen primären Gaumen und hinterlassen an der Vereinigungsstelle der drei Strukturen das Foramen incisivum. Drei Wochen nach Beginn des Gaumenschlusses am Ende der neunten Schwangerschaftswoche ist der gesamte harte Gaumen geschlossen (Kitamura, 1966). Während der Verbindung der Gaumenplatten wächst das Nasenseptum nach kaudal und vereinigt sich mit dem zuvor gebildeten Gaumen wiederum erst durch Bildung einer Epithelmauer und dann durch deren Einschmelzen. Diese anfängliche epitheliale Barriere wird nun durch Bindegewebe ersetzt. Kommt es bei diesem Entwicklungsvorgang zu Störungen, können Gaumenspalten auftreten, die infolge des Verschlussmechanismus nach hinten offen sind (Horch, 2006).



Die definitiven Choanen liegen nun am Übergang der Nasenhöhle in den Pharynx. In der achten Woche kommt es im Bereich der späteren Milchzähne zur ersten maxillären Knochenbildung (Kjaer, 1989).

Die Entstehung des Unterkiefers wird dadurch eingeleitet, dass der Nervus mandibularis noch vor Bildung des ersten Kiemenbogens ins Bindegewebe dieser Region wächst (Sperber, 1989) und eine neurotrope Stimulation für das mandibuläre Knochenwachstum darstellt (Kjaer, 1990; Miethke, 2000). Analog zum Oberkiefer sind auch im Bereich des späteren Unterkiefers zwei Wülste zu erkennen, die sich vergrößern und zum Zeitpunkt der Bildung des primären Gaumens sich ebenfalls aufeinander zu bewegen. Zwischen dem 41. und dem 45. Schwangerschaftstag bildet sich der Meckel – Knorpel, der eine Leitschiene für diese Vorgänge und ein Modell für die Verknöcherung bestimmter Areale im Kinnbereich des Unterkiefers darstellt (Kölliker, 1879). Wenn die Ausbildung des Meckel – Knorpels etwa in der siebten Woche ihren Höhepunkt erreicht hat, treten die ersten Verknöcherungszonen im Unterkiefer an der Teilungsstelle des Nervus mandibularis in den Nervus incisivus und den Nervus mentalis auf, und setzen sich U – förmig entlang des Nervus alveolaris inferior nach mesial und distal fort (Kjaer, 1990). In der zehnten bis elften Schwangerschaftswoche formieren sich sekundäre Knorpel in den ventralen und dorsalen Endbereichen der Mandibula, aus denen die Processus condylares und coronoidei, sowie die Protuberantia mentalis hervorgehen (Graber, 1972) (siehe Abb. 2). Der zapfenartige in das posterosuperiore Ramusgebiet eingelassene Knorpel beginnt ab der elften Woche zu mineralisieren, ist ab dem fünften Monat weitgehend verknöchert und bleibt als Wachstumsknorpel des Kiefergelenks zeitlebens erhalten (Kahl – Nielke, 2010).

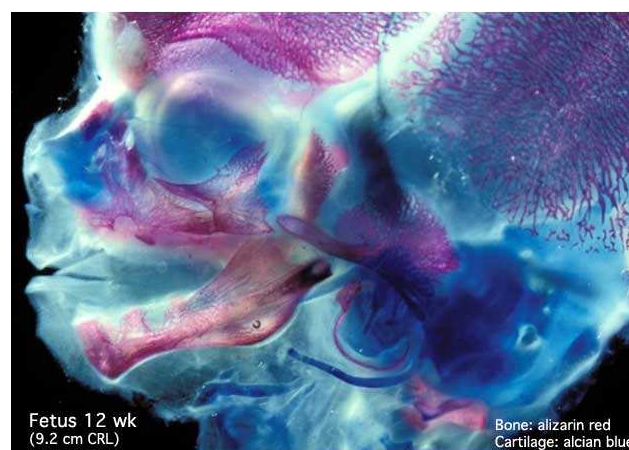


Abb. 2 12 Wochen alter Fetus, Alizarin – Färbung (aus: Diewert, 1985)

### 2.2.2 Postnatale Schädelentwicklung

Postpartal kommt es in beiden Kiefern zu starker Knochenapposition, um den für die Dentition benötigten Platz zu schaffen. Das Größenverhältnis von acht zu eins zwischen Neuro- und Viszerokranium bleibt nach der Geburt zunächst unverändert. Es verändert sich erst mit dem Durchbruch der Milcheckzähne und Milchmolaren, der sich durch eine starke Vorwölbung des Alveolarfortsatzes ankündigt, zugunsten des Viszerokraniums (Miethke, 2000). Im Alter von acht Jahren ist das Wachstum des Neurokraniums weitgehend abgeschlossen und es kommt durch weitere Vergrößerung des Viszerokraniums nach ventral und kaudal zu einer Umproportionierung des Kopfes. Diese Verlagerung beinhaltet eine Ventral – Kaudal – Translation von Ober – und Unterkiefer (Whittaker, 1986). Im Bereich der Schädelbasis erfolgt eine Resorption an der endokraniellen und eine Apposition an der ektokraniellen Seite, was wiederum eine Verlagerung des nasomaxillären Komplexes nach vorne – unten bewirkt (Miethke, 2000). Enlow ging davon aus, dass das Wachstum der Schädelbasis autonom abläuft, während die Entwicklung der Schädelkalotte von der funktionellen Matrix bestimmt wird (Enlow, 1975; 1976).

Vor dem Einsetzen der Entwicklung des Alveolarfortsatzes und dessen postnataler Gebrauchsperiode dienen das Nasenseptum, die Sutura palatina und die Zahnfächer als skelettale Wachstumszentren der Maxilla im Hinblick auf Längen –, Höhen – und Breitenwachstum (Roberts und Hartsfield, 2004). Das Wachstum des harten Gaumens erfolgt durch eine Längenzunahme am dorsalen Ende. Gleichzeitig ist auch eine Dorsalverlängerung der Alveolarfortsätze festzustellen, um Platz für die später durchbrechenden Zuwachszähne zu schaffen. Diese Tatsache steht in engem Zusammenhang mit dem bipolaren Wachstum der Synchondrosis sphenoccipitalis (Miethke, 2000) (siehe Abb. 8). Die weitere Vergrößerung des Oberkiefers erfolgt durch Knochenapposition im Bereich des zirkomaxillären Suturensystems. Hierbei sind vor allem die Sutura frontonasalis, frontomaxillaris, frontolacrimalis, frontozygomata, temporozygomata, sphenozygomata, zygomaticomaxillaris, ethmoideomaxillaris, frontoethmoidalis, pterygopalatina, nasomaxillaris, palatina mediana und vomerica zu nennen (Miethke, 2000). Da die Schädelbasis mit ihrem anterioren Teil das Dach des nasomaxillären Komplexes darstellt, wird ihr eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung des gesamten Mittelgesichtes zuteil (Crawford, 1976).

Der postpartale Unterkiefer liegt im Vergleich zum Oberkiefer in relativ rudimentärer Form vor und ist durch kurze Rami, wenig ausgebildete Processus condylares, einen großen Kieferwinkel und eine mediane Synarthrose zwischen der rechten und linken Spange gekennzeichnet. Die weitere Entwicklung erfolgt durch eine Transformation der Mandibula. Diese umfasst eine Abnahme des Kieferwinkels, eine Längenzunahme der Rami und eine Höhenzunahme des Corpus durch die Ausbildung der Alveolarfortsätze (Miethke, 2000). Ein bedeutendes Wachstumszentrum stellt der Processus condylaris dar, durch dessen intensives Wachstum der Unterkiefer nach kaudoverbal verlagert wird (Scott, 1953). Das weitere sagittale Unterkieferwachstum besteht aus Apposition am Hinterrand und Resorption am Vorderrand, wobei die Apposition die Resorption übertrifft. Dies führt dazu, dass auch die Breite des Ramus zunimmt (Scott, 1953).

Während das prä – und frühe postnatale Wachstum des nasomaxillären Komplexes auf der Funktion von primären knorpeligen Wachstumszentren beruht, stützt sich das postnatale Wachstum nach Einstellen der Okklusion hauptsächlich auf funktionell ausgerichtete sekundäre Wachstumsplatten (Roberts und Hartsfield, 2004). Die Tätigkeit der primären knorpeligen Wachstumszentren nimmt ab, sobald das skelettale Wachstum des Oberkiefers auf sekundärer Knochenapposition im Bereich der maxillären Suturen und auf der Entwicklung der Dentition basiert (Roberts und Hartsfield, 2004), die laut der Theorie von Moss als funktionelle Matrix dient. Diese Ereignisse fallen demnach in die Phase des Zahndurchbruchs und des frühen Milchgebisses. Nichtsdestotrotz bleibt zu berücksichtigen, dass die Synchondrosis sphenooccipitalis als einziges Wachstumszentrum bis weit nach der Geburt permanent aktiv bleibt (Mao und Nah, 2004). Dies verleiht ihr große Bedeutung bei der postnatalen Entwicklung der Schädelbasis und somit auch des kompletten Mittelgesichtes, was dadurch bewiesen wird, dass vorzeitiger Synchondrosenschluss zu Mittelgesichtshypoplasien führt (Watzek et al., 1977).

### 2.3 Schädelentwicklung histologisch und molekularbiologisch

#### 2.3.1 Desmale Ossifikation

Der Beginn der desmalen Ossifikation findet in der achten Schwangerschaftswoche im Bereich des Os frontale statt. Das Os frontale zeigt als erste Struktur des Schädels Anzeichen von Verknöcherung (Kjaer, 1990). Dabei entsteht Knochen direkt aus dem Mesenchym, wobei sich Mesenchymzellen über Vorläuferzellen, sog. Osteoprogenitorzellen, zu Osteoblasten umwandeln. Diese synthetisieren Osteoid, eine Vorform des Knochens, und werden schließlich von dieser Substanz komplett umgeben, worauf sie zu Osteozyten differenzieren (Kühnel, 2002). Es kommt zur Ausbildung balkenförmiger Knocheninseln und daraufhin zur Mineralisation des umgebenden Osteoids durch die Osteoblasten. Diese lagern Calcium und Phosphat ein, wodurch Hydroxylapatit  $[Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2]$  entsteht. Hydroxylapatit stellt den Hauptbestandteil der anorganischen Phase des Knochens dar (Proff und Römer, 2009). Von den Osteoblasten werden nun Matrixvesikel ins Osteoid abgesondert und es bilden sich Zentren, an denen eine weitere Ablagerung und Kristallisation der oben genannten Mineralsalze erfolgt. Wenn Osteoblasten von unmineralisiertem Osteoid oder von mineralisiertem Knochen umgeben sind, transformieren sie sich und man bezeichnet sie nun als Osteozyten (Franz – Odendaal et al., 2006). An der Außenfläche der Knochenbälkchen lagern sich laufend Osteoblasten an, die neue Knochengewebsschichten bilden. Es kommt zum Anlagerungs- oder appositionellen Wachstum (Kühnel, 2002). Die Trabekel vergrößern sich und wachsen schließlich zu primären Ossifikationszentren zusammen. Durch diese direkte Art der Osteogenese entstehen die Knochen der Schädelkalotte (Os parietale, große Teile des Os frontale, Os temporale, posteriore Teile des Os occipitale, Teile der Maxilla und Teile der mandibulären Spange ohne die Endbereiche. Die durch desmale Ossifikation synthetisierten Strukturen des Schädels werden zusammen als Desmo – oder Exokranium bezeichnet (Miethke, 2000).

### 2.3.2 Enchondrale Ossifikation

#### 2.3.2.1 Enchondral ossifizierende Strukturen

Die enchondrale Ossifikation entspricht der desmalen Ossifikation mit dem Unterschied, dass der spätere Knochen zuerst als Knorpelmodell vorliegt, das allmählich durch Knochengewebe ersetzt wird (Mackie et al., 2007). Diese Form der Knochenbildung ist typisch für Röhrenknochen, Wirbelkörper, Beckenknochen und bestimmte Anteile des Schädels und insbesondere der Schädelbasis. Die enchondral gebildeten Teile des Schädels bezeichnet man als Chondrokranium (Kjaer, 1990; Kjaer, 1993). Die ersten Anzeichen von enchondraler Ossifikation sind an den kaudalen Partien des Os occipitale festzustellen, darauf folgen baso – und präsphenooidale und schließlich ethmoidale Bereiche (Kjaer, 1990). Dabei sind die Synchondrosen von herausragender Bedeutung. Diese verhalten sich analog zu epiphysären Wachstumsplatten, mit dem Unterschied, dass das Wachstum an den Epiphysen nur in eine Richtung erfolgt, während die Gewebezunahme bei Synchondrosen bidirektional gerichtet ist (Weathall, 2009).

Vermutlich das bedeutendste primäre und sekundäre Wachstumszentrum im kraniofazialen Bereich ist die im anterioren Bereich der Schädelbasis gelegene Synchondrosis sphenoccipitalis (Virchow, 1857). Weitere bedeutende Wachstumszentren befinden sich im Bereich des Condylus mandibulae und der Lamina perpendicularis (Scott, 1953). Die Wachstumszentren beeinflussen die Entwicklung des Viszerokraniums durch interstitielle Expansion, wodurch es zu primärem oder sekundärem Wachstum kommt (Roberts und Hartsfield, 2004). Bei der basikranialen Entwicklung spielt die Chorda dorsalis eine bedeutende Rolle. Das Mesenchym, das den kranialen Anteil der Chorda dorsalis umgibt, differenziert zu parachordalem Knorpel, aus dem sich danach die Pars basilaris des Os occipitale entwickelt (Miethke, 2000). Während des zweiten Monats setzt die enchondrale Ossifikation in Form von Zentren im basokzipitalen, basoethmoidalen und präsphenooidalem Bereich ein. Eine zusammengeschlossene knorpelige Schädelbasis ist erstmals im Carnegie – Stadium 18 zu beobachten (Müller und O’Rahilly, 1980).

Daraufhin breitet sich die knorpelige Anlage des Os occipitale um das Neuralrohr nach dorsal hin aus. Ventral vom Parachordalknorpel liegen die Hypophysenknorpel

und die Trabeculae cranii, aus denen sich ebenfalls enchondral die Körper des Keilbeins und des Siebbeins bilden (Hinrichsen, 1990). Die Knorpelstrukturen, aus denen die oben genannten Anteile der Schädelbasis hervorgehen, bilden eine medial gelegene Knorpelplatte, die sich von der Nasenregion bis zum ventralen Rand des Foramen magnum erstreckt. Auf beiden Seiten dieser Platte entstehen weitere Knorpelkerne, aus denen die großen und die kleinen Keilbeinflügel entstehen. Ebenfalls lateral der medialen Platte entsteht die knorpelige Labyrinthkapsel, aus der die Pars petrosa sowie die Squama temporalis des Schläfenbeines hervorgehen (Hinrichsen, 1990).

Zwischen der zehnten und elften Woche formt sich wie oben erwähnt ein Knorpelmodell für die Processus condylares und coronoidei in den Endbereichen der Mandibula (Shen et al., 2006). Die kranialen Anteile des kondylären Sekundärknorpels bleiben praktisch das gesamte Leben lang erhalten und sind funktioneller Bestandteil des Kiefergelenks. Dieser danach verbleibende Knorpel dient als Wachstums – bzw. Gelenkknorpel (Shen und Darendeliler, 2006)

Für das Wachstum des Mittelgesichts ist ein Knorpel im mesoethmoidalem Bereich von Bedeutung, der die zentralen Strukturen der vorderen Schädelbasis formt. Es handelt sich dabei um die Lamina perpendicularis des Os ethmoidale im Bereich der späteren Crista galli, die als Teil des Nasenseptums betrachtet wird (Roberts und Hartsfield, 2004) (siehe Abb. 3). Schon pränatal bewirkt diese Struktur eine Verlagerung der Maxilla nach ventral und kaudal (Furstman et al., 1971). Ungefähr bei der Geburt dehnt sich die Lamina perpendicularis weiter nach dorsal aus und schiebt so das komplette Viszerokranium nach ventral, indem es das Wachstum der Maxilla an den zirkomaxillären Suturen induziert (Scott, 1959; Carlson, 2005).

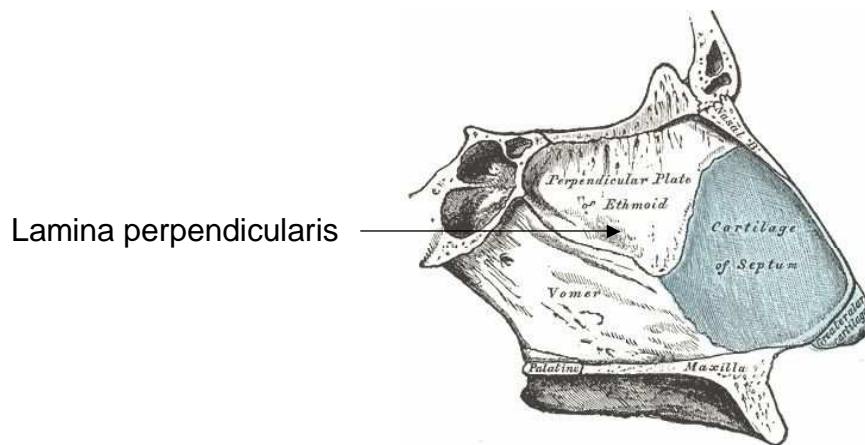


Abb. 3 Anatomie des Nasenseptums und Lage der Lamina perpendicularis (aus: Gray, 1918)

Nach einem Jahr verknöchert die Lamina perpendicularis des Os ethmoidale und löst im dritten Jahr eine Vergrößerung der Nasenhöhlen nach kaudal aus, wodurch sich das Gesicht in vertikaler Richtung verlängert (Scott, 1953). Ein Trauma oder eine Infektion des Nasenseptums während seiner Entwicklung kann deshalb zu einer Hypoplasie des Oberkiefers bzw. des Mittelgesichts führen (Kemble, 1973). Lamina perpendicularis und Crista galli beginnen ungefähr zwei Monate nach der Geburt zu mineralisieren. Ihre Verknöcherung erfolgt nach etwa 14 Monaten (Belden et al., 1997).

### 2.3.2.2 Synchrondrosis sphenoccipitalis als Wachstumszentrum der Schädelbasis

Obwohl es im sphenoidalen und okzipitalen Bereich mehr als 25 Wachstumszentren gibt, fällt die größte Bedeutung im Hinblick auf die Schädelentwicklung der Synchrondrosis sphenoccipitalis zu (Hinrichsen, 1990; Adem et al., 1999). Entwicklungsgeschichtlich betrachtet ist sie eine residuale Knorpelplatte des fetalen Chondrokraniums (Scott, 1958). Sie stellt das Verbindungsstück zwischen der Entwicklung der Schädelbasis und des Gesichtsschädels dar und beeinflusst zudem die Positionen von Maxilla und Mandibula (Lei et al., 2008). Die sphenookzipitale Synchrondrose ist dorsal der Sella turcica zwischen Keilbein und dem basalen Teil des Hinterhauptbeins lokalisiert und bleibt als einziges Wachstumszentrum der Schädelbasis beim Menschen bis ins junge Erwachsenenalter aktiv (Mao und Nah, 2004) (siehe Abb. 4, 5, 6 und 7). Durch ihre im Vergleich zu anderen

Wachstumszentren verlängerte Aktivität trägt sie den größten Anteil an der Entwicklung der Schädelbasis, zumal diese zu einem großen Teil postnatal stattfindet (Takigawa et al., 1984, Kyrkanides et al., 2007). Im Speziellen ist sie für die Vergrößerung und Entwicklung des Bereichs zwischen Basion und Fossa hypophysialis zuständig, was die oben genannten Auswirkungen auf die Nachbarstrukturen hat (Scott, 1953). Im Vergleich zu anderen wachstumsaktiven knorpeligen Arealen weist sie einen mittelmäßigen Gehalt an fibrösem Matrixgewebe auf, der zwar über dem des kondylären Knorpels aber unter dem des Nasenseptums liegt (Koski, 1975). Makroskopisch erscheint die sphenookzipitale Synchronrose als hyaline Knorpelformation, die in umgebendes Knochengewebe eingebettet ist (Nakamura et al., 1999). Mikroskopisch betrachtet besteht sie aus zwei fortsatzähnlichen Wachstumsplatten, die an ihren Reservezonen miteinander verbunden sind, wodurch das charakteristische bidirektionale Wachstum während der enchondralen Ossifikation möglich wird (Maoh und Nah, 2004). In der Mitte dieses Wachstumszentrums befindet sich eine Zone von Chondrozyten, auf die in Richtung Peripherie die für enchondral ossifizierende Strukturen typischen Zonen der Proliferation, Hypertrophie und Verknöcherung folgen (Nakamura et al., 1999). Einen für die Schädelentwicklung wesentlichen Vorgang stellt die Verknöcherung der Synchronrosis sphenooccipitalis dar, da Wachstum nur bei unverknöchelter Synchronrose möglich ist (Heinkele und Ewers, 1989). Ihr Wachstum kommt zum Stillstand, wenn sich eine knöcherne Verbindung zwischen dem sphenoidalen und dem okzipitalen Synchronrosenpol gebildet hat (Heinkele und Ewers, 1989). Diese Ossifikationsbrücken treten beim Menschen erstmals gegen Ende des späten Wechselgebissalters auf und haben mit Erreichen des Erwachsenenalters den Synchronrosenschluss zur Folge (Heinkele und Ewers, 1989). Störungen ihrer Entwicklung und ihr frühzeitiger knöcherner Verschluss können schwere Mittelgesichtshypoplasien nach sich ziehen (Hoyte, 1991; Rosenberg et al., 1997; Kyrkanides et al., 2007).





Abb. 4 Schädelbasis nach Entfernung des Gehirns bei einem *Macaca fuscata* – Affen. Der obere Pfeil weist auf die Sella turcica, der untere Pfeil weist auf die posteriore Schädelbasis. Die Synchondrosis sphenoccipitalis ist dazwischen lokalisiert (aus: Nakamura et al., 1999)



Abb. 5 Sagittale Hemisektion der posterioren Schädelbasis bei einem *Macaca fuscata* – Affen. Der obere Pfeil weist auf die Sella turcica, der untere Pfeil weist auf die Synchondrosis sphenoccipitalis (aus: Nakamura et al., 1999)

Synchondrosis  
sphenooccipitalis

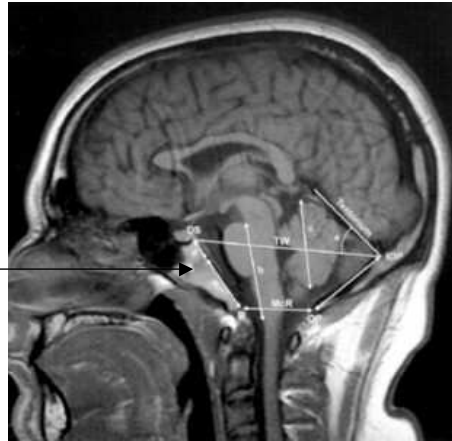


Abb. 6 Lage der Synchondrosis sphenooccipitalis im MRT (aus: Sekula et al., 2005)



Synchondrosis sphenooccipitalis

Abb. 7 Lage der Synchondrosis sphenooccipitalis bei der Ratte (aus: Tang und Mao, 2006)

### 2.3.2.3 Molekularbiologischer Ablauf der enchondralen Ossifikation

Das mesenchymale Gewebe im Bereich der späteren Schädelbasis verdichtet sich durch Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu runden Chondroblasten ungefähr in der sechsten Schwangerschaftswoche zu einem Knorpelblastem (Hinrichsen, 1990).

Daraufhin umgeben sich die Chondroblasten mit kollagenen Fasern und einer homogenen basophilen Grundsubstanz und bilden schließlich die Modelle für die oben genannten knöchernen Strukturen aus hyalinem Knorpel. Dieser Ort der Knochenentstehung wird als Wachstumsplatte bezeichnet. Sie besteht aus einer Ansammlung von Knorpelzellen zwischen einem sekundären Ossifikationszentrum und der primären Spongiosa (Kronenberg, 2003). Eine Synchondrose besteht aus zwei einander gegenüberliegenden Wachstumsplatten mit bidirektionalem Wachstum (Weathall et al., 2009) (siehe Abb. 8).

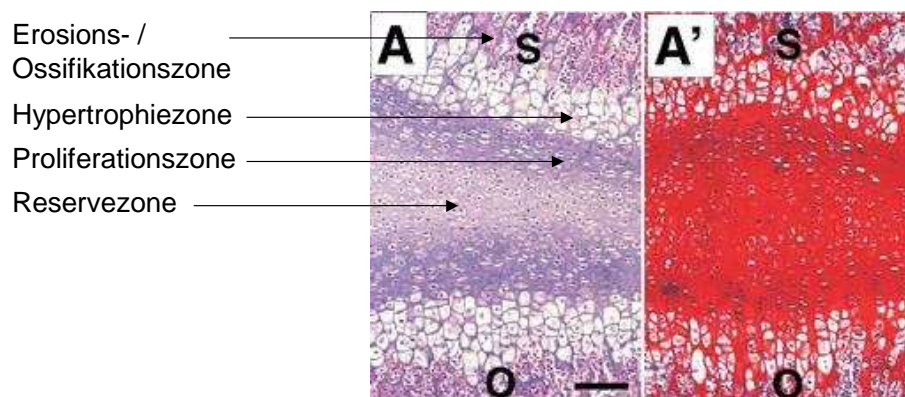


Abb. 8 Bidirektionales Wachstum der Synchondrosis sphenooccipitalis zweier Ratten, HE – Färbung (aus: Tang und Mao, 2006)

Die ersten knöchernen Formationen, die durch enchondrale Ossifikation entstehen, sind vom spongiösen Typ. Diese Struktur ergibt sich daraus, dass sich die Knorpelzellen auflösen und die interzelluläre Matrix mineralisiert (Roberts und Hartsfield, 2004). Im mandibulären Bereich zum Beispiel werden die Chondrozyten von Osteoklasten abgebaut und durch Lamellenknochen ersetzt. Daraufhin wird der spongiöse Knochen durch Remodellation zu Lamellenknochen umgebaut, dessen Trabekel nach der Belastungsrichtung ausgerichtet werden (Roberts und Hartsfield,

2004). Im ersten Schritt der enchondralen Ossifikation werden die Knorpelmodelle von einer dicken gefäßreichen Mesenchymschicht umgeben, die das Perichondrium bildet. Die Zellen dieser Mesenchymschicht lagern eine Knochenmanschette auf die als Vorlage dienende Knorpelformation ab und werden damit zum Periost. Von dieser Knochenmanschette aus dringt eine Gefäßknospe induziert durch Wachstumsfaktoren wie den vascular endothelial growth factor (VEGF) nach innen vor (Lei et al., 2008). Über dieses Blutgefäß wandern Mesenchymzellen und Chondroklasten ein und es kommt zur Ausbildung von mehreren charakteristischen Zonen bei den Knorpelzellen, von denen jede ein bestimmtes Entwicklungsstadium bei der enchondralen Bildung von Knochengewebe darstellt (Rabie et al., 2002; Mackie et al., 2007). In der ersten Zone, der sog. Reservezone, befinden sich normale mitotisch sehr aktive Chondrozyten und wenig interzelluläre Matrix verglichen mit den folgenden Zonen (siehe Abb. 9). Die nächste Zone ist die Proliferationszone. In ihr findet eine starke Vermehrung der Chondrozyten und deren Anordnung in traubenförmigen Zellgruppen statt (Shen und Darendeliler, 2006) (siehe Abb. 9).

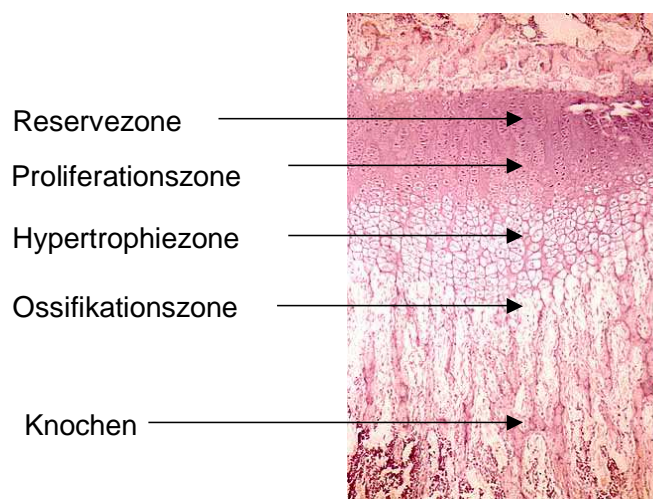


Abb. 9 Zonenaufteilung der enchondralen Ossifikation (aus: Naski und Ornitz, 1998)

Im darauf folgenden Abschnitt der Zelldifferenzierung, der hypertrophen Zone, ordnen sich die Chondrozyten in Säulen an, vergrößern ihr Volumen um das Fünf- bis Zehnfache und nehmen ein blasenförmiges Aussehen an (Heinkele und Ewers, 1989) (siehe Abb. 9). Es können dabei zwei unterschiedliche Arten von Chondrozyten identifiziert werden (Hwang, 1978). Helle Chondrozyten haben ein

schmales endoplasmatisches Reticulum sowie einen unscheinbaren Golgiapparat, wogegen bei dunklen Knorpelzellen beides stärker entwickelt ist. Außerdem liegt in beiden Typen eine unterschiedliche Genexpression vor (Ahmed et al., 2007). Parallel zur Hypertrophie der Zellen erfolgt die Absonderung extrazellulärer Matrix, worauf es notwendigerweise zum Absterben der Chondrozyten kommt. Dieser Zelltod der Knorpelzellen ist absolut unumgänglich für das Einsetzen der Verknöcherung (Adams und Shapiro, 2002; Hatori et al., 1995; Zenmyo et al., 1996; Smartt, 2005). Erste Anzeichen für kalzifizierte Formationen sind deshalb in der Hypertrophiezone festzustellen (Shen und Darendeliler, 2006). Dieser Vorgang ist für das spätere Längenwachstum des Knochens essentiell. In der nächsten Zone, der sog. Resorptionszone werden lakunenförmige Bereiche der Knorpelsubstanz resorbiert. Es kommt schließlich zum Absterben der hypertrophen Knorpelzellen, wobei sich die transversalen Septen dazwischen auflösen, während die longitudinalen Septen intakt bleiben und so das Einwandern von Zellen aus bereits ossifizierten Bereichen erlauben (Mackie et al., 2007). Dazu zählen Osteoklasten, Osteoblastenvorläufer, Knochenmarkzellen und Blutgefäße. Die Osteoklasten helfen beim Abbau der Knorpelmatrix, während die Osteoblastenvorläufer Reste der Knorpelmatrix für die Ablagerung von Knochengewebe verwenden (Mackie et al., 2007). Die einstrahlenden Blutgefäße führen Osteoblasten – Progenitorzellen mit sich, sowie Knochenmarkstammzellen, die zu weiteren Osteoblasten differenzieren (Shen und Darendeliler, 2006). Die durch die Ablagerung von Hydroxylapatit kalzifizierende Matrix unterbindet nun die Diffusion von Nährstoffen zu den verbleibenden Knorpelzellen (Shen und Darendeliler, 2006). Während sich bei hellen Chondrozyten die Zellmembran auflöst, kommt es bei den dunklen Knorpelzellen zum Ausstoß von Zytoplasma in den Extrazellulärraum (Mackie et al. 2007). Bei beiden Arten erfolgt die nukleäre Kondensation daraufhin zu spät und unvollständig, was zum Absterben der Chondrozyten führt. Ob dieser für die Ossifikation nötige Zelltod der Chondrozyten als Apoptose betrachtet werden kann, oder ob es sich eher um eine autophagische Reaktion handelt ist noch nicht ausreichend geklärt (Adams und Shapiro, 2002; Gibson 1998; Colnot et al., 2001; Roach und Clark, 1999; Roach und Clark, 2000; Roach et al., 2004).

### 2.3.2.4 Genexpression und Proteinsynthese während der enchondralen Ossifikation und der Knochenremodellation

Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus faserknorpelspezifischem Typ II – Kollagen, sowie Hyaluronsäure mit dem ebenfalls spezifischen Proteoglykan Aggrecan. Typ II – Kollagen ist essentiell für die Existenz der Chondrozyten, weshalb das für Typ II – Kollagen codierende Col2A1 – Gen während bestimmter Phasen der enchondralen Ossifikation verstärkt exprimiert wird (Shen et al., 2006; Mackie et al., 2007). Die Kombination aus fibrillärem Typ II – Kollagen und dem polyanionischen Aggrecan ist die Basis für die speziellen physischen Eigenschaften des Knorpelgewebes (Mackie et al., 2007). Kollagene wie Typ I, II und X – Kollagen werden als Vorläufer – Moleküle – sog. Preprokollagene – mit einem kurzen Signalpeptid, jeweils endständigen Carboxy – und Aminopropeptiden und einem zentralen  $\alpha$  – Ketten – Segment synthetisiert (Tsipouras und Ramirez, 1987). Es kommt nach der Translation zu intrazellulären Modifikationen der Fibrillogenese. Dazu zählen Hydroxilierungen und Glykosilierungen (siehe Abb. 10). Extrazellulär erfolgen danach die Entfernung der Carboxy – und Aminopropeptide durch spezielle Endopeptidasen und die Oxidation von Lysinresten (Tsipouras und Ramirez, 1987). Nun erfolgt die Anordnung der fertigen Moleküle zu Fibrillen (siehe Abb. 10).

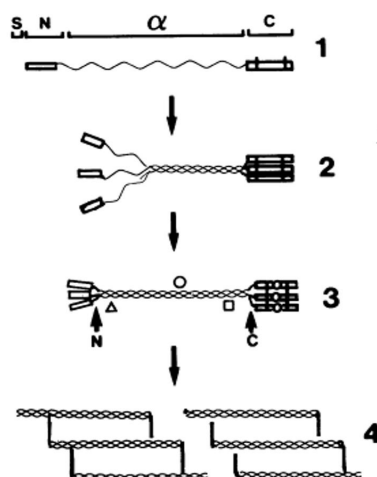


Abb. 10 Schematische Darstellung der Fibrillogenese der Kollagene: Preprokollagen mit verschiedenen Domänen: S = Signalpeptid, N = Aminopropeptid, C = Carboxypropeptid (1), Triple – Helix der  $\alpha$  – Kette

(2), posttranslationale Modifikationen und Abspaltung der Carboxy – und Aminopropeptide (3), Anordnung zu Fibrillen (4), (aus: Tsipouras und Ramirez, 1987)

Beim Eintritt der Chondrozyten in die Hypertrophiephase wird die Synthese von Typ II – Kollagen herunterreguliert und stattdessen vermehrt Typ X – Kollagen gebildet (van der Erden et al., 2003; Mackie et al., 2007). Typ X – Kollagen ist ein Strukturprotein von niederem Molekulargewicht, das ausschließlich in der Hypertrophiezone von Wachstumsplatten und –zentren während der enchondralen Ossifikation zu finden ist (Schmid und Linsenmayer, 1985; Kwan et al., 1986; 1991). Die hypertrophen Zellen sezernieren weiterhin eine an Typ II – Kollagen und dem Proteoglykan Aggrecan reiche extrazelluläre Matrix und exprimieren ein spezifisches genetisches Programm an Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Sox – 9 (Kronenberg, 2003; Adams und Shapiro, 2002; Smartt, 2005).

Mutationen des nun verstärkt exprimierten und für Typ X – Kollagen codierenden Col10A1 – Genes führen beim Menschen zu irreversiblen Dysplasien des Knorpels (Mackie et al., 2007). Typ X - Kollagen bindet an die Chondrozyten über den Integrin  $\alpha 2 \beta 1$  – Rezeptor, sowie durch Interaktion mit dem discoidin – domain – receptor 2 (DDR – 2), was zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt (Luckman et al., 2003; Leitingner und Kwan, 2006; Leitingner und Hohenester, 2007; Mackie et al., 2007). Dadurch kann Typ X – Kollagen auf intrazelluläre Signalwege in den Chondrozyten Einfluss nehmen (Leitingner und Kwan, 2006).

Die Knorpelzellen exprimieren im kompletten Stadium der Hypertrophie den Transkriptionsfaktor Runx – 2 für das für Typ X - Kollagen codierende Gen Col10A1. Dadurch garantiert Runx – 2 den vollständigen Ablauf der Hypertrophie und stellt einen wichtigen Transkriptionsfaktor für die spätere Differenzierung der Osteoblasten dar (Proff und Römer, 2009). Außerdem ist Runx – 2 verantwortlich für den Eintritt der Chondrozyten ins Stadium der Hypertrophie (Mackie et al., 2007).

Das parathormon – related protein (PTHrP) sowie Sox – 9 verhindern die Expression von Runx – 2, um die Vergrößerung der Chondrozyten zu hemmen. Es wird angenommen, dass Runx – 2 an der Rückkopplungsschleife von Indian Hedgehog und PTHrP mitwirkt, die den fortlaufenden Ablauf von Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten sicherstellt (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996; Weathall, 2009). Außerdem wird in diesem Stadium verstärkt die Kollagenase

Matrix – Metalloproteinase 13 (MMP – 13) exprimiert (Tchetina et al., 2007). Der parallel zur Hypertrophie der Chondrozyten erfolgende Abbau der extrazellulären Matrix wird durch MMP – 13 induziert, indem sie eine Degradierung von Typ II – Kollagen und Aggrecan hervorruft und dadurch den Abbau der transversalen Septen und das Eindringen von Zellen aus der Ossifikationszone ermöglicht (Cawston und Wilson, 2006; Inada et al., 2004; Stickens et al., 2004). PTHrP reduziert außerdem die Expression von Genen, die für die endgültige Differenzierung von Zellen verantwortlich sind. Dazu zählen Typ X – Kollagen und die alkalische Phosphatase (Weathall, 2009). Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung ist Osterix, ohne den sich kein Knochengewebe bilden würde (Shibata et al., 2006). Da sich ektopischer Knorpel in Osterix – defizienten Arealen bildet, wird auch angenommen, dass Osterix eine hemmende Wirkung auf die Differenzierung der Chondrozyten hat (Proff und Römer, 2009).

Die sekundäre Weiterentwicklung des verknöcherten maxillo – mandibulären Komplexes erfolgt durch „Bone – Remodelling“, also durch die Kombination aus Knochenresorption durch Osteoklasten und Knochenapposition durch Osteoblasten (Hill, 1998). Die Beseitigung von mineralisiertem Knochen durch die Osteoklasten wird abgelöst von der Anlagerung von danach mineralisierender Knochenmatrix durch die Osteoblasten (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Beim Wachstum der Mandibula zum Beispiel kommt es dadurch zur Knochenremodellation, dass Knochen an der lingualen Fläche abgebaut wird und vestibulär augmentiert wird. Durch diese selektiven Prozesse werden die betreffenden Bereiche funktionell an die neue physiologische Belastung angepasst. Wenn sich Apposition und Resorption die Waage halten, spricht man von Knochendrift (Kahl – Nielke, 2010). Durch diese Mechanismen werden pro Jahr 10 % Knochengewebe erneuert, während generell 20 % der knöchernen Struktur von der derartigen Umbauvorgängen betroffen sind (Kahl – Nielke, 2010). Bone – Remodelling besteht aus vier Einzelschritten, nämlich Aktivierung, Resorption, Umsteuerung und Apposition (Hill, 1998). Im ersten Schritt aktivieren Chemokine und chemotaktische Zytokine (v.a. monocyte chemoattractant protein MCP – 1), die von Stromazellen sezerniert werden, Osteoblastenvorläuferzellen für die bevorstehende Resorption (Proff und Römer, 2009). MCP – 1 wird als Reaktion auf die Anwesenheit von PTHrP, dem tumor necrosis factor –  $\alpha$  (TNF –  $\alpha$ ) und Interleukin – 1 $\beta$  produziert (Graves et al., 2002). Es wird auch angenommen, dass Osteozyten auf durch das Wachstum des



umliegenden Gewebes hervorgerufene Mikrofrakturen reagieren und durch gesteigerte Expression von RANKL (receptor activator of NF –  $\kappa$ B – ligand) eine Osteoklastendifferenzierung hervorrufen (Matuso und Irie 2008, Bonewald 2007). In der darauffolgenden Resorptionsphase beseitigen die Osteoklasten eine Schicht von 40 – 60  $\mu$ m (Hadjidakis und Androulakis, 2006). In der Umkehrphase endet die Knochenresorption durch Apoptose der Osteoklasten. Weiterhin kommt es zur Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen hervorgerufen durch lipidmodifizierte Glykoproteine der wingless (wnt) – Familie, BMP – 2 und mehrere andere Transkriptionsfaktoren wie Runx – 2 (Proff und Römer, 2009). Osteoblasten leiten sich von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks ab. Im Zuge der Resorption freigesetzte Wachstumsfaktoren wie BMPs (bone morphogenetic proteins) oder der insulin – like growth factor II (IGF II) leiten die Knochenapposition durch die Osteoblasten ein. Dazu sezernieren diese die alkalische Phosphatase, Typ I – Kollagen, Proteoglykane, Sialoproteine und Osteopontine (Proff und Römer, 2009). Entlang der Knochenoberfläche ordnen sich die Osteoblasten in Gruppen an und produzieren eine Knochenmatrix durch die Abgabe von Typ I – Kollagen (siehe Abb. 11). Diese mineralisiert schließlich durch die alkalische Phosphatase, deren Funktionsweise noch nicht vollständig geklärt ist. Sobald die erforderliche Menge an Knochenmaterial aufgebaut ist, stellen die Osteoblasten ihre Aktivität ein, bis ein neuer Remodelling – Zyklus beginnt (Proff und Römer, 2009). Das endgültige Appositions – Resorptions – Muster ist mit etwa sechseinhalb Monaten intrauterin etabliert (Enlow, 1975).

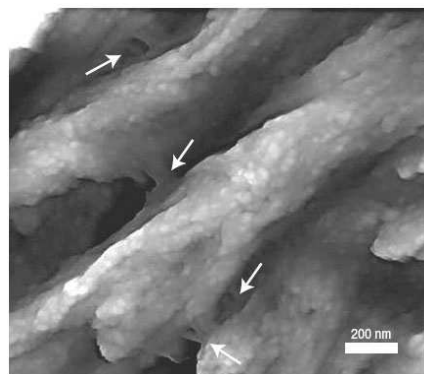


Abb. 11 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Knochens: Typ I – Kollagen – Fibrillen, bedeckt mit Hydroxylapatit (aus: Hassenkamp et al., 2004)

### **2.3.2.5 Fehlbildungen und Entwicklungsstörungen in Verbindung mit der enchondralen Ossifikation**

Diverse Fehlbildungen des Skeletts sind auf eine angeborene oder erworbene Störung der enchondralen Ossifikation und der Kollagensynthese zurückzuführen (Adler et al., 1989). Man kann dabei durch Medikamente, Strahlenexposition, usw. bedingte isolierte Knochenfehlbildungen, generalisierten Knochenentwicklungs – und Wachstumsstörungen (Skelettdysplasien) und Fehlbildungen in Zusammenhang mit Syndromen und Erbkrankheiten unterscheiden (Adler und Thomas, 1996).

Dabei sind exemplarisch das durch unzureichende Kollagenvernetzung charakterisierte Ehlers – Danlos – Syndrom und das Marfan – Syndrom mit seiner typischen unzureichenden Fibrillogenese als Syndrome mit Beteiligung der enchondralen Verknöcherung zu nennen. Weiterhin beruht die chondroektodermale Dysplasie auf fehlerhafter Proliferation und Reifung des epiphysären Knorpels, sowie auf einer Unterentwicklung des Blasen – und Säulenknorpels und der Eröffnungszone, einhergehend mit mangelhafter Vaskularisierung und Nekrose dieser Bereiche (Adler und Thomas, 1996). Bei der letalen Chondrodystrophie oder Achondroplasie kommt es infolge eines frühzeitigen Sistierens der enchondralen Ossifikation zu einem verminderten Längenwachstum der Knochen aufgrund einer reduzierten Chondrogenese. Diese hat eine verschmälerte Hypertrophiezone und dementsprechend verminderte Verkalkung zur Folge (Adler und Thomas, 1996).

Bei der an Gelenken und Wachstumsfugen auftretenden Osteochondrose weisen die Wachstumszonen keine Hypertrophiezone auf und es ist eine übermäßige Expression der mRNA von MMP – 13, Typ I – und X – Kollagen sowie Runx – 2 festzustellen (Mirams et al., 2009).

Auch Krankheitsbilder im Bereich der Kiefer und des Gesichtsschädels sind auf eine abnorme Kollagensynthese bzw. auf eine gestörte enchondrale Ossifikation zurückzuführen. Dabei stellt die Schädelbasis oftmals den Ursprungsort für verschieden geartete, syndromatische Formen von Kraniosynostosen dar (Smartt et al., 2005). Entwicklungsanomalien des Schädeldachs – bedingt durch den vorzeitigen Verschluss bestimmter Suturen – die zwangsläufig mit fazialen Deformationen einhergehen, werden mit abnormer Morphologie der Sphenochondrosis sphenoccipitalis assoziiert (Hoyte, 1991; Smith et al., 1996; Mooney et al., 2000; Putz et al., 2002). Als Beispiele hierfür sind Morbus Crouzon und das Apert –

Syndrom zu nennen, denen Störungen der Chondroblastenaktivität und eine ungenügende Volumenzunahme der Schädelbasis zugrunde liegen (Kreiborg et al., 1976; Ousterhout und Melsen, 1982; Grayson et al., 1985; Kreiborg et al., 1993; Joos und Kleinheinz, 2006). Es resultieren ein vermindertes Wachstum des Chondrokraniums nach ventral, eine gestörte Osteogenese des Schädels und eine prämatüre Fusion der Suturen (Carinci et al., 2002). Insgesamt ist der anterior – posteriore Schädeldurchmesser reduziert und der transversale Schädeldurchmesser erhöht, was eine Dysmorphie des Gesichtsschädels mit Hypertelorismus, extrem retrognathem Oberkiefer und daraus folgender Pseudoprognathie mit offenem Biss, Spalten des weichen Gaumens und extremen Zahnengständen bedingt (Kreiborg und Cohen, 1992; Kleinheinz und Joos, 2001; Joos und Kleinheinz, 2006).

Patienten, die am Scheuthauer – Marie – Saintone – Syndrom, das auch als Dysostosis cleidocranialis bezeichnet wird, leiden, weisen eine autosomal – dominante mesenchymale Störung der knochenbildenden Zentren sowohl des desmal als auch des enchondral ossifizierenden Skeletts auf (Joos und Kleinheinz, 2006; Otto et al., 2002). Im Speziellen treten bei diesem Syndrom neben Hypo – oder Aplasie der Schlüsselbeine eine Verkürzung der Schädelbasis, eine Hypoplasie des Gesichtsschädels sowie dentalen Anomalien auf (Joos und Kleinheinz, 2006).

Ebenfalls ist zum Beispiel auch die Osteogenesis imperfecta im viszerokraniellen Bereich relevant. Bei dieser Bindegewebskrankheit bilden die Osteoblasten Typ III – Kollagen anstatt Typ I – Kollagen, wodurch im Knochen unphysiologische Knorpelinseln, eine abnorme Faserstruktur und eine mangelhafte Stabilität festzustellen ist (Kamoun – Goldrat und Le Merrer, 2007). Der Grund für diese autosomal dominante Erkrankung liegt bei Mutationen der für Typ I – Kollagen codierenden Col1A1 – und Col1A2 – Gene (Tsipouras et al., 1987). Die Patienten weisen weiterhin zellarme Proliferations – und Hypertrophiezonen, ungewöhnlichen Vakuolen in den Chondrozyten sowie Variationen bei der Gestalt und Dicke der knöchernen Strukturen auf (Rodriguez et al., 1982).

Bei der mittlerweile selten auftretenden Vitamin D – Mangel – Rachitis, die u. a. zu einem verschmälerten Oberkiefer führt, kommt es zu einer Störung der Knorpelresorption mit aufgetriebener Säulen – und Blasenknorpelzone, wodurch die weiteren Schritte der enchondralen Ossifikation blockiert werden und das abgelagerte Osteoid nicht verkalkt (Adler et al., 1989). Dem histologischen Befund der Rachitis ähnlich ist die Hypophosphatasie. Auch sie zeichnet sich durch eine

verlängerte Hypertrophiezone mit einer daran angrenzenden Schicht aus ungeordnetem, unverkalktem Osteoid und persistierenden Knorpelarealen aus (Adler und Thomas, 1996).

Generell kann man sagen, dass Störungen der enchondralen Ossifikation meistens zu drastischen Verringerungen von Lebensqualität und – alter führen.

#### 3. Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Analyse der Genexpression in der Synchondrosis sphenooccipitalis am Tiermodell Ratte vom Zeitpunkt nach der Geburt bis zur Geschlechtsreife. Die Synchondrosis sphenooccipitalis wurde wegen ihrer herausragenden Bedeutung als kraniofaziales Wachstumszentrum im Hinblick auf die enchondrale Ossifikation mit Einfluss auf die Lage von Ober – und Unterkiefer als Probenentnahmestelle gewählt. Dabei wurde die für Typ II – und X – Kollagen codierende mRNA an Proben der Synchondrosis sphenooccipitalis mittels quantitativer real – time polymerase – chain – reaction (qPCR) untersucht. Typ II – Kollagen stellt während der enchondralen Ossifikation einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix der Knorpelzellen dar (Mackie et al., 2007). Da Typ II – Kollagen für das Überleben von Chondrozyten existenziell ist (Yang et al., 1997), sollte mit dem Nachweis von Typ II – Kollagen – mRNA der Beweis für das prähypertrophe Stadium der Chondrozyten zum entsprechenden Zeitpunkt erbracht werden.

Im Gegensatz zu Typ II – Kollagen wird Typ X – Kollagen in der hypertrophen und in der Erosionszone des Knorpelgewebes am Übergang zur Ossifikationsfront exprimiert (Shen et al., 2006). Aus diesem Grund wurde untersucht, wann sich die Expression von Typ X – Kollagen erhöht, um den Zeitpunkt des Hypertrophiestadiums der Chondrozyten zu bestimmen und somit den chronologischen Ablauf der enchondralen Ossifikation darzustellen. Ziel der Studie war die Untersuchung von Änderungen der Expression von für Typ II – und X – Kollagen codierenden mRNA, um die für die Produktion von extrazellulärer Matrix und für die Ossifikation der Schädelbasis der Ratte wichtigen Entwicklungsstufen zu bestimmen. Die Messtage wurden repräsentativ für die wichtigen Stadien der Entwicklung der Ratte gewählt. So erfolgte die erste Bestimmung der Kollagen – Expression direkt postnatal, die zweite zur Mitte der Säugeperiode, die dritte in der Phase der Aufnahme fester Nahrung und die vierte und letzte bei Erreichen der Geschlechtsreife. Zu diesem Zweck wurden Proben aus der Synchondrosis sphenooccipitalis am jeweiligen Messtag von sieben verschiedenen Individuen entnommen, aus denen die RNA aufgereinigt wurde. Diese wurde nach Kontrolle der Reinheit in „complementary – DNA“ (cDNA) umgeschrieben und mittels qPCR auf die Expression von Typ II – und X – Kollagen untersucht.

### 3. Zielstellung der Arbeit

---

Die Promotionsarbeit hat die Erfassung von physiologisch wichtigen Zeitpunkten für die Reifung der Chondrozyten zum Ziel und ist als Pilotstudie für weitergehende Untersuchungen an der Synchronodrosis sphenoccipitalis angelegt.

.

### 4. Material und Methoden

#### 4.1 Tiermodell und Entnahme der Proben

Für die Studie wurden männliche LEW – Ratten aus einem Wurf verwendet, wobei die Mütter von mehreren Würfen untereinander verwandt sind und somit gezielte Inzucht vorliegt. Die Mütter wurden unter standardisierten Bedingungen zunächst 14 Tage in K3 – Käfigen gehalten bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , einer Luftfeuchtigkeit von 60 %, Fütterung und Tränke ad libitum und einem Lichtregime von 12 Stunden täglich von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr. Die Tiere wurden zum jeweiligen Zeitpunkt in einer Ruhephase zwischen 10.00 Uhr und 12.00 Uhr unter Ether – Euthanasie dekapitiert. Anschließend wurden die benötigten Teile der Schädelbasis freipräpariert. Die Präparate wurden vor der vollständigen Entnahme mit Kochsalzlösung gespült, um Fremdkörper zu entfernen. Durch die Dekapitierung entbluteten die Köpfe möglichst vollständig, woraufhin eine vollständige Enthäutung derselben erfolgte. Die Synchondrosis sphenoccipitalis konnte durch einen Längsschnitt in der Sutura sagittalis und Entfernung des Groß- und Kleinhirns gewonnen werden. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Beprobung der Tiere erfolgte am Tag der Geburt, zur Mitte der Säugeperiode am 10. Tag, am Ende der Säugeperiode bzw. am Übergang zur Aufnahme von fester Nahrung am 21. Tag sowie am 52. Tag, an dem bei LEW – Ratten die Zuchtreife, die Aufnahme fester Nahrung, eine Abnahme des Proteinansatzes und eine Zunahme des Fettansatzes festzustellen ist. Mit dem 52. Tag haben die Tiere ihren Peak an täglichem Proteinansatz überschritten, während die Massezunahme dann hauptsächlich durch einen stärkeren Fettansatz bewirkt wird.

Pro Versuchstag wurden acht Ratten verwendet, von denen jeweils eine Probe entnommen wurden.

### 4.2 RNA – Isolation

Die Proben wurden von -70°C in flüssigen Stickstoff überführt, im Mikro – Dismembrator S (B. Braun Biotech International, Melsungen) in gefrorenem Zustand homogenisiert und mit 600 µL DTT – RLT – Puffer (Verhältnis 1 : 600) des RNeasy – Kit (Qiagen GmbH, Hilden) versetzt. Dieses Lysat wurde 10 min bei 37°C inkubiert und im QIAshredder des DNA / RNA – Mini – Kit (Qiagen GmbH, Hilden) bei 13000 U/min 2 Minuten zentrifugiert. Das dabei erhaltene Eluat wurde mit 600 µL 70% Ethanol versetzt. Dieses Gemisch wurde in ein Aufreinigungsgefäß des oben genannten Kits überführt und 15 Sekunden bei 8000 U/min zentrifugiert. Das hierbei entstandene Eluat wurde verworfen, die im Aufreinigungsgefäß verbleibende Substanz wurde mit 350 µL RW1 – Puffer versetzt und wieder bei 8000 U/min für 15 Sekunden zentrifugiert, wonach der Durchsatz ebenfalls verworfen wurde. Danach gab man eine aus 10 µL DNase – Stammlösung aus dem RNase – Free DNase Set (Qiagen GmbH, Hilden) und 70 µL RDD – Puffer bestehende DNase – Lösung direkt auf die Membran des Aufreinigungssäulchens und inkubierte diese 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nun wurden wieder 350 µL RW1 – Puffer zugegeben, bei 8000 U/min für 15 Sekunden abzentrifugiert und der Durchsatz verworfen. Nach dem gleichen Schema wurde die aufzureinigende Substanz zweimal mit RPE – Puffer gereinigt, nachdem das Aufreinigungssäulchen aus dem Aufreinigungsgefäß in ein neues Sammelgefäß überführt wurde. Die nun auf der Membran des Aufreinigungssäulchens aufgereinigt vorliegende RNA wurde danach mit 30 µL nuklasefreiem Wasser eluiert. Die aus den Proben aufgereinigte RNA wurde in PCRs amplifiziert und auf Agarose – Gele aufgebracht und durch Gelelektrophorese auf ihre Qualität geprüft. Dabei wies die RNA auf dem Gel entsprechend der Sedimentationskonstanten voneinander abgrenzbare 28 S – und 18 S – rRNA – Banden auf, wobei die 28 S – Bande ungefähr doppelt so intensiv wie die 18 S – Bande war, was bei Eukaryonten typisch ist und die Intaktheit der RNA beweist.



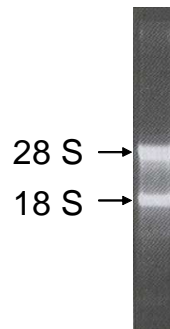


Abb. 12      Agarosegelelektrophorese einer RNA – Isolation einer Probe der Ratte

#### 4.3 Photometrische Quantifizierung

Danach erfolgte die photometrische Quantifizierung der Konzentration der isolierten RNA mittels Picodrop UV / Vis – Photospektrometer. RNA zeigt eine Absorptionsbande mit einem Maximum bei 260 nm und einem Minimum bei 320 nm. Verunreinigungen durch Proteine haben eine Absorptionsbande bei 280 nm, da Proteine bei 280 nm absorbieren. Der Quotient von Extinktion bei 260 nm verursacht durch unkontaminierte RNA geteilt durch Extinktion bei 280 nm verursacht durch Verunreinigungen soll bei Werten zwischen 1.8 und 2.0 liegen, um eine potentielle Verunreinigung auszuschließen. RNA – Proben, die dieses Kriterium nicht erfüllten, sind nicht zur Untersuchung geeignet und wurden verworfen.

#### 4.4 Reverse Transkription

Die reverse Transkription beinhaltet das Umschreiben der gewonnenen RNA in cDNA, welche als Template für die nachfolgende qPCR verwendet wird. Für die Reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Anleitung verwendet. Zur Elimination der eventuell vorhandenen genomischen DNA wurden jeweils 14 µL Mastermix mit folgenden Bestandteilen angesetzt (siehe Tab. 1).

Reagenz	Volumen
gDNA Wipeout Buffer 7x	2 µL
Template RNA	Ad 250 ng
RNase – free Water	Ad 14 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>14 µL</b>

Tab. 1 Mastermix 1 zur Elimination genomischer DNA

Die Mastermixe zur Elimination von genomischer DNA wurden für zwei Minuten bei 42°C inkubiert und unmittelbar danach auf Eis gelagert. Danach wurden die Mastermixe für die Transkriptionsreaktion hergestellt (siehe Tab. 2).

Reagenz	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µL
Quantiscript RT Buffer 5x	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>6 µL</b>

Tab. 2 Mastermix 2 für reverse Transkription

Der Mastermix zur Elimination genomischer DNA mit der Template – RNA wurde mit dem Mastermix für die reverse Transkription gemischt und bei 42 °C für 15 Minuten inkubiert. Eine abschließende Inkubation bei 95°C für drei Minuten ist zur Inaktivierung der reversen Transkriptase nötig.

## 4.5 Quantitative Real – time – PCR

### 4.5.1 Primer

Alle verwendeten Primer wurden in einer quantitativen Real – time – PCR mit jeweils mit einer cDNA - Probe bei einer Annealing – Temperatur von 65°C getestet. Die Produkte der qPCR wurden mit einer Agarose – Gelelektrophorese analysiert. Dabei war entscheidend, dass auf dem Gel nur ein spezifisches qPCR – Amplikon je Probe vorhanden war, dessen Größe mit der der Zielsequenz übereinstimmte, was beweist, dass die Produkte spezifisch amplifiziert wurden und nicht verunreinigt waren. Für die Untersuchung wurden folgende Primer verwendet (siehe Tab. 3).

Name	Basensequenz	T <sub>M</sub>	Akzessionsnr.
Col2a1-fwd	5'- GCT CAT CCA GGG CTC CAA TG – 3'	65°C	NM_012929
Col2a1-rev	5'- CAA TGG GAA GGC GTG AGG TC – 3'	65°C	
Col10a1-fwd	5'- AGC TCA CGG AAA ATG ACC AG – 3'	65°C	XM_001053056
Col10a1-rev	5'- GTT CTA AGC GGG GGA TTA GG – 3'	65°C	
β-actin-fwd	5'- CTC ATG CCA TCC TGC GTC TG – 3'	65°C	NM_031144.2
β-actin-rev	5'- GGC AGT GGC CAT CTC TTG CT – 3'	65°C	

Tab. 3      Verwendete Primer mit Sequenz und Akzessionsnummer

#### 4.5.2 Durchführung der quantitativen Real – time – PCR und verwendete Reagenzien

Zur Quantifizierung der gewonnenen cDNA wurden quantitative Real – time – PCRs im Abi 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA., U.S.A.) durchgeführt. Dabei erfolgte in einem initialen Schritt die Aktivierung der Taq - Polymerase bei 95°C für 15 Minuten. Daraufhin folgten 40 Zyklen der Amplifikationsreaktion. Ein Zyklus umfasste 30 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung des doppelsträngigen DNA – Templates sowie 30 Sekunden für das Annealing der Primer an die einzelsträngige DNA bei 65°C und 30 Sekunden für die Polymerisation durch die Taq – Polymerase bei 72°C. Die Erfassung der Daten erfolgte bei 72°C. Abschließend wurden die Schmelzkurven der einzelnen Template erfasst. Diese Methode gestattet die Erfassung des Zeitpunktes, an dem das qPCR – Ausgangsmaterial ausreichend amplifiziert wurde, um aufgrund seiner nun gesteigerten Fluoreszenz – Emission die Detektion zu ermöglichen. Dieser Zeitpunkt wird „Ct – Wert“ bzw. „Threshold cycle“ genannt.

Für die qPCRs wurde das QuantiTect SYBR Green RT – PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Anleitung verwendet, sowie die folgenden Reagenzien (siehe Tab. 4).

Reagenz	Volumen
cDNA - Template	1 µL
RNAse – free Water	1,5 µL
Forward – Primer (1pmol/ µL)	5 µL
Reverse – Primer (1pmol/ µL)	5 µL
2* QuantiTect SYBR Green RT – PCR Mastermix	12,5 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µL</b>

Tab. 4 Reagenzien einer qPCR

Die benötigten Forward – und Reverse – Primer sind in Tab. 3 aufgeführt. Das RNAse – free Water ist im QuantiTect SYBR Green RT – PCR Kit enthalten. Der 2\* QuantiTect SYBR Green RT – PCR Mastermix ist gebrauchsfertig und enthält folgende Reagenzien (siehe Tab. 5).

HotStarTaq DNA – Polymerase
QuantiTect SYBR Green RT – PCR Buffer
dNTP – Mix einschließlich dUTP (10mM)
0.4x SYBR Green I
ROX (Referenz – Farbstoff) (50nM)
MgCl <sub>2</sub> (5mM)

Tab. 5 Inhaltsstoffe des 2\* QuantiTect SYBR Green RT – PCR Mastermix

### 4.5.3 Auswertung der qPCRs

Es wurde die Methode der relativen Quantifizierung gewählt. Dabei wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierbaren Haushaltsgenes, in diesem Fall  $\beta$  – Aktin, normalisiert. Man bestimmt dabei nicht die absoluten Startkopienzahlen oder –konzentrationen, sondern vergleicht die Expression des Zielgens mit der Expression des ubiquitär und homogen exprimierten  $\beta$  – Aktin (Pfaffl, 2004).

Zur Quantifizierung wurde der Ct – Wert (Threshold – Cycle) bestimmt, der den Anfang der exponentiellen Phase beschreibt und aussagt, wann die proportional zur Zunahme der Ziel – DNA ansteigende Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund – Fluoreszenz ansteigt. Nun wird im ersten Schritt für jede Probe der Ct – Wert des Referenzgens vom Ct – Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert (Pfaffl, 2004; Nishimura et al., 2009).

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Referenzgen})$$

### 4.5.4 Agarose – Gelelektrophorese

Um die qPCR – Produkte anhand ihrer Größe identifizieren zu können und ihre Reinheit zu bestimmen, wurden Agarose – Gelelektrophoresen durchgeführt. Die dazu verwendeten 2 – prozentigen Midi – Gele wurden aus 60 mL 1x TBE – Laufpuffer, 1,2 g LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) und 0,5  $\mu$ L Ethidiumbromid (5mg/mL) hergestellt. Zur Herstellung des 1x TBE – Puffer wurde 10x TBE – Puffer entsprechend verdünnt. Der 10x TBE – Puffer wurde folgendermaßen hergestellt nach folgendem Schema hergestellt (siehe Tab. 6).

Reagenz	Menge
Tris Ultra Qualität	121.14 g
Borsäure	51.33 g
EDTA	3.72 g
Aqua dest.	600 mL
auf pH 8.3 einstellen	
Aqua dest. ad 1000 mL	

Tab. 6 Bestandteile und Herstellung des 10x TBE - Puffers

1x –TBE – Laufpuffer und Agarose wurden in einem Erlenmeier – Kolben gemischt und in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung aufgeköcht. Das Gel wurde in einen 11 x 14 cm großen Gelschlitten gegossen. Mit einem 12 – fach Kamm wurden Probetaschen geformt. Als DNA – Größenstandard wurde Gene Ruler 100 Bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon – Rot) verwendet. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Probetaschen des Gels mit jeweils 5 µL des Amplifikats und 2 µL Bromphenolblau als Ladepuffer bestückt. Die Laufzeit betrug 60 Minuten bei 90 Volt. Die entstandenen DNA – Banden werden aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids unter UV – Licht im Intas Gel – Imager sichtbar (siehe Abb. 12).

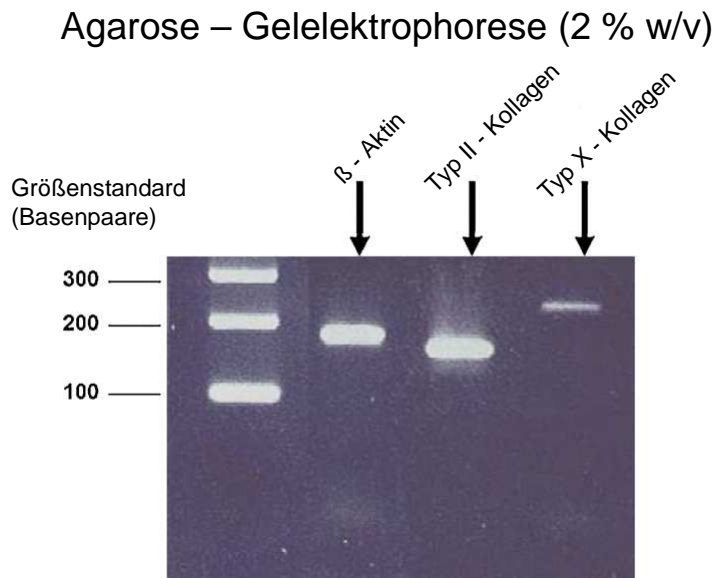


Abb. 13 Analyse des letztendlich erhaltenden qPCR – Produkts durch eine Agarose – Gelelektrophorese (2 % w / v) mit 100 Basenpaar – Größenstandard. Die Amplifikate der Zielgene Typ II – und X – Kollagen sowie des Haushaltsgenes  $\beta$  – Aktin weisen hohe Spezifität auf.

#### 4.5.5 Statistische Auswertung

Die statische Auswertung erfolgte mit dem SPSS – Programm (Version 15,0 für MS Windows). Die Resultate liegen als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung vor. Der Kruskal – Wallis – Test wurde verwendet, um die Daten der Genexpression der einzelnen Gruppen an den jeweiligen Messtagen (Messzeitpunkte Tag 0, Tag 10, Tag 21, Tag 52 postnatal) untereinander zu vergleichen. Bei einem totalen Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurden paarige Vergleiche mit dem Mann – Whitney U – Test durchgeführt. Eine statische Signifikanz wurde bei  $p \leq 0,05$  (\*) oder  $p \leq 0,01$  (\*\*) erreicht. Die angewendeten Tests waren immer zweiseitig. Bei der Berechnung der Signifikanz wurden Mittelwerte der Kopienzahlen angenommen.

### 5. Ergebnisse

Es wurden Proben vom Knorpel der Synchrondrosis sphenooccipitalis von jeweils sieben verschiedenen Individuen zu vier verschiedenen postnatalen Zeitpunkten untersucht. Die Messtage wurden so gewählt, dass sie wichtige Entwicklungsstadien repräsentieren. Bei den Proben wurde die Expression von für Typ II – und X – Kollagen codierender mRNA anhand des Verhältnisses zur Expression von für  $\beta$  – Aktin codierender mRNA festgestellt.

#### 5.1 Genexpression zu Beginn der Säugephase (Tag 0 postnatal)

##### 5.1.1 Typ II – Kollagen

Am Lebenstag 0 der Individuen gleich nach der Geburt betrug das Verhältnis der in der Synchrondrosis sphenooccipitalis exprimierten, für Typ II – Kollagen codierenden mRNA zur mRNA des konstant exprimierten Haushaltsgenes  $\beta$  – Aktin  $0.128 \pm 0.083$ . Damit lag die neonatale Genexpression von Typ II – Kollagen statistisch hochsignifikant unter der Genexpression am 10. Lebenstag ( $p = 0.0009$ ) und am 52. Lebenstag ( $p = 0.0039$ ). Auch am 21. Lebenstag war im Vergleich zum Tag der Geburt eine tendenziell höhere Expression von Typ II – Kollagen festzustellen, deren statistische Signifikanz jedoch nicht nachweisbar war ( $p = 0.447$ ).

##### 5.1.2 Typ X – Kollagen

Bei Typ X – Kollagen lag die neonatale Expression bei  $2.66 \times 10^{-4}$  pro Kopie von  $\beta$  – Aktin, was ebenfalls niedriger war, als an den Tagen 10 ( $p = 0.0009$ ), 21 ( $p = 0.0114$ ) und 52 ( $p = 0.0015$ ).

#### 5.2 Genexpression zur Mitte der Säugeperiode (Tag 10 postnatal)

##### 5.2.1 Typ II – Kollagen

An Tag 10 lag das Genexpressionsverhältnis bei  $4.688 \pm 3.127$  Kopien von Typ II – Kollagen zu  $\beta$  –Aktin. Es lag damit statistisch signifikant höher als an den Tagen 0 ( $p = 0.0009$ ) und 52 ( $p = 0.0019$ ). Beim Vergleich mit der Expression von Typ II –



Kollagen am Tag 21 konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ( $p = 0.121$ ).

### 5.2.2 Typ X – Kollagen

Die Expression von für Typ X – Kollagen codierender mRNA lag am 10. Lebenstag postnatal bei  $0.62 \pm 0.462$  Kopien pro Kopie von  $\beta$  – Aktin. Damit war eine statistisch signifikante Steigerung im Vergleich zu den Tagen 0 ( $p = 0.0009$ ) und 52 ( $p = 0.0128$ ) erfolgt. Im Vergleich zu Tag 21 lag die Genexpression von Typ X – Kollagen zwar tendenziell höher, was sich jedoch nicht in statistischer Signifikanz äußerte ( $p = 0.0615$ ).

## 5.3 Genexpression bei Beginn der Aufnahme fester Nahrung (Tag 21 postnatal)

### 5.3.1 Typ II – Kollagen

Am Tag 21 nach der Geburt lag die Genexpression bei  $0.689 \pm 0.685$  Kopien von Typ II – Kollagen pro Kopie von  $\beta$  – Aktin. Damit unterschied sie sich statistisch signifikant weder von Tag 0 ( $p = 0.447$ ), noch von Tag 10 ( $p = 0.121$ ) bzw. Tag 52 ( $p = 0.968$ ).

### 5.3.2 Typ X – Kollagen

Typ X – Kollagen wurde am Tag 21 in einer Menge von  $0.127 \pm 0.126$  Kopien pro Kopie von  $\beta$  – Aktin exprimiert. Dieses Verhältnis lag damit am Tag 21 statistisch signifikant höher als am Tag 0 ( $p = 0.0114$ ). Im Vergleich mit Tag 10 ( $p = 0.0615$ ) und Tag 52 ( $p = 0.96$ ) war jedoch keine statistische Signifikanz gegeben.

## 5.4 Genexpression bei Erreichen der Geschlechtsreife (Tag 52 postnatal)

### 5.4.1 Typ II – Kollagen

Am 52. Lebenstag der Ratten und damit am letzten Tag der Beprobung lag die Expression von Typ II – Kollagen bei  $0.791 \pm 0.346$  Kopien pro Kopie von  $\beta$  – Aktin und damit statistisch signifikant niedriger als am Tag 10 postnatal ( $p = 0.0019$ ). Im

Vergleich zu Tag 0 erhöhte sich die Expression von Typ II – Kollagen am Tag 52 jedoch statistisch signifikant ( $p = 0.0039$ ). Die absteigende Tendenz im Vergleich zu Tag 21 war jedoch statistisch nicht erfassbar ( $p = 0.968$ ).

### 5.4.2 Typ X – Kollagen

Typ X – Kollagen wurde am Tag 52 mit  $0.122 \pm 0.032$  Kopien pro Kopie von  $\beta$  – Aktin exprimiert. Damit erhöhte sich die Expression von Typ X – Kollagen im Vergleich zu Tag 0 statistisch signifikant ( $p = 0.0015$ ), lag jedoch ebenfalls statistisch signifikant unter der Expression an Tag 10 ( $p = 0.0128$ ). Im Vergleich zu Tag 21 war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen ( $p = 0.96$ ).

### 5.5 Graphische Darstellung

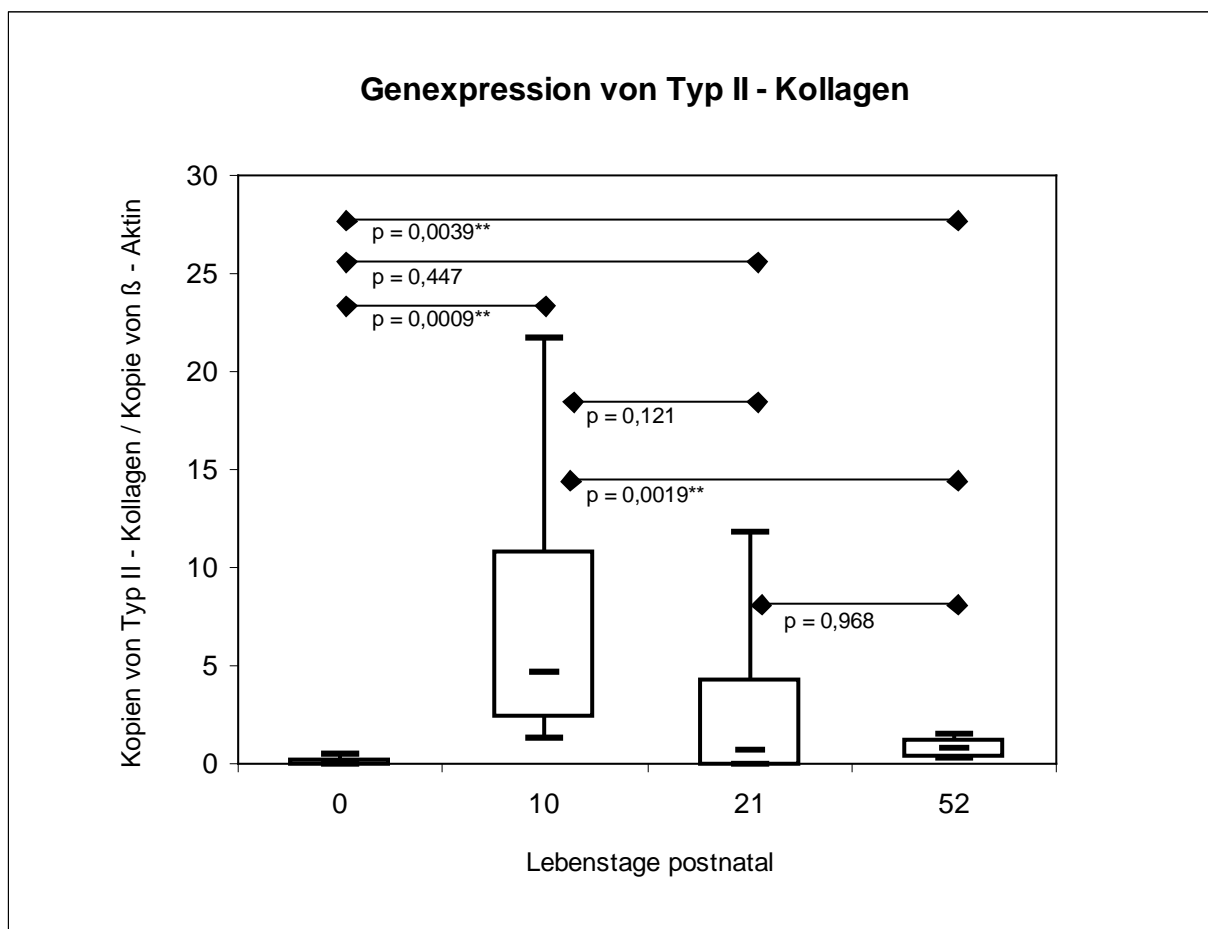


Abb. 14 Boxplot – Illustration der Expression von für Typ II – Kollagen codierender mRNA in der Synchronchondrosis sphenoccipitalis der für die

Studie herangezogenen Individuen. Die Säulen repräsentieren die interquartile Breite innerhalb der pro Messtag beprobten Gruppen. Die exprimierte Kopienzahl des Zielgenes Typ II – Kollagen wurde ins Verhältnis zur Expression des Haushaltsgenes  $\beta$  – Aktin gesetzt. Demnach wurden die exprimierten Kopien von Typ II – Kollagen pro zum selben Zeitpunkt exprimierter Kopie von  $\beta$  – Aktin angegeben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Messtagen wurde als p – Wert nach dem Kruskal – Wallis – Test angegeben. Dabei sind Werte unter 0,05 (\*) statistisch signifikant und Werte unter 0,01 (\*\*) statistisch hochsignifikant.

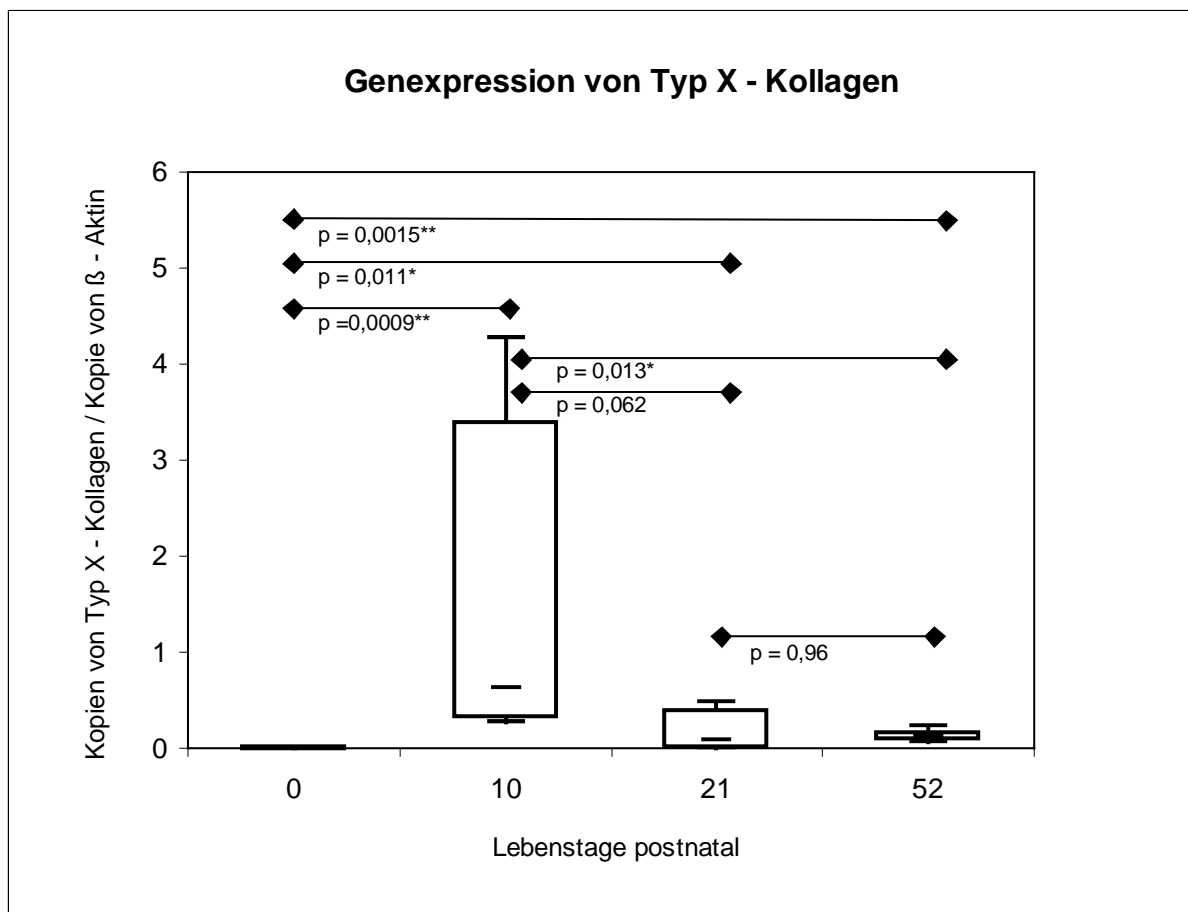


Abb. 15 Boxplot – Illustration der Expression von für Typ X – Kollagen codierender mRNA in der Synchondrosis sphenoccipitalis der für die Studie herangezogenen Individuen. Die Säulen repräsentieren die interquartile Breite innerhalb der pro Messtag beprobten Gruppen. Die exprimierte Kopienzahl des Zielgenes Typ X – Kollagen wurde ins

Verhältnis zur Expression des Haushaltsgenes  $\beta$  – Aktin gesetzt. Demnach wurden die exprimierten Kopien von Typ II – Kollagen pro zum selben Zeitpunkt exprimierter Kopie von  $\beta$  – Aktin angegeben. Die statistische Signifikanz der Unterschiede in der Expression zwischen den einzelnen Messtagen wurde als p – Wert nach dem Kruskal – Wallis – Test angegeben. Dabei sind Werte unter 0,05 (\*) statistisch signifikant und Werte unter 0,01 (\*\*) statistisch hochsignifikant.

### 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zielt darauf, die Genexpression von für Typ II – und X – Kollagen codierender mRNA im Zuge der enchondralen Ossifikation der Synchronchondrosen sphenoccipitalis von Ratten unter Berücksichtigung wichtiger physiologischen Entwicklungsstadien wie das neonatale Stadium, die Säugeperiode, die Phase der Aufnahme fester Nahrung und die Geschlechtsreife zu beschreiben. Dadurch soll zusätzlich zu kephalometrischen, anatomisch – histologischen und radiologischen Studien ein Beitrag zur Erforschung der Schädelbasisentwicklung auf molekularer Ebene geleistet werden. Die Synchronchondrosen sphenoccipitalis gilt als essentielles Wachstumszentrum des kraniofazialen Bereichs, aber auch als Ursprungsort verschiedener Malformationen von syndromatischer und nonsyndromatischer Form (Smartt et al., 2005).

Das schnelle Fortschreiten der postnatalen Entwicklung macht das Tiermodell Ratte zu einem geeigneten Versuchstier für das Studium der skelettalen Entwicklung. Moderne technische und molekularbiologische Methoden gestatten die genaue Untersuchung der Chondrozytenproliferation in Wachstumsplatten bzw. –zentren im Mikroumfeld des Knochens sowie der osteoblasteninduzierten Knochensynthese bzw. der Resorption dieses Gewebes durch Osteoklasten (Horton et al., 2008). Dabei ist aber zu berücksichtigen, inwieweit das Wachstumsmuster der Ratte mit dem des Menschen korreliert und wie die körperliche Entwicklung beider Spezies miteinander zeitlich zu vergleichen ist. Außerdem steht zur Debatte, welcher Zusammenhang zwischen den verschiedenen Entwicklungsabschnitten und den skelettalen Wachstumsvorgängen bei Ratte und Mensch besteht. Um aus den an der Ratte gewonnenen Erkenntnissen Schlüsse für die menschliche Entwicklung zu ziehen, muss der Entwicklungsstand der Schädelbasis dieses Tieres dem der entsprechenden menschlichen Struktur gegenüber gestellt werden.

#### 6.1 Proben der Synchronchondrosen sphenoccipitalis

##### 6.1.1 Anstieg der Typ II – und X – Kollagen – Expression bis Tag 10

Die Synchronchondrosen sphenoccipitalis gilt als hauptverantwortlich für das Längenwachstum der Schädelbasis (Tang und Mao, 2006). Man kann sie als Verbindungsglied zwischen Neurokranium und Viszerokranium bei der Entwicklung

beider Strukturen bezeichnen, wodurch sie auch bedeutenden Einfluss auf die Einlagerung von Maxilla und Mandibula hat (Lei et al., 2008). Wird ihre Entwicklung gehemmt, kommt es zu enormen kraniofazialen Fehlbildungen häufig in Verbindung mit Kraniosynostosen (Hoyte, 1991; Rosenberg et al., 1997; Smartt et al., 2005). Trotz ihrer großen Bedeutung für die Schädelentwicklung ist wenig über ihre molekularbiologische Organisation in den verschiedenen Wachstumsstadien bekannt. Die Untersuchung der Proben des knorpeligen Wachstumszentrums wurde im Hinblick auf die Expression von für die Strukturproteine Typ II – und X – Kollagen codierender mRNA vorgenommen. Beide spielen eine bedeutende Rolle beim Ablauf der enchondralen Ossifikation und wurden aus diesem Grund untersucht.

Wie Knochengewebe, in dem die knochenbildenden Osteoblasten eine kollagenreiche Matrix sezernieren, basiert auch knorpeliges Gewebe auf einer derartigen Matrix (Kronenberg, 2003). Im Gegensatz zum Knochen jedoch, in dem Typ I – Kollagen dominiert, stellt beim Knorpel Typ II – Kollagen neben Aggrecan einen Hauptbestandteil der organischen Matrix des Knorpelgewebes dar und gewährleistet demselben mechanische Stabilität (Mackie et al., 2007). Außerdem gilt es als essentiell für die grundsätzliche Lebensfähigkeit der Chondrozyten, was in früheren Studien bewiesen wurde. So zeigte sich bei Mäusen ohne die Fähigkeit zur Expression von Typ II – Kollagen eine gesteigerte Chondrozytenapoptose (Aszodi et al., 2000). Die übermäßige Expression von Typ II – Kollagen als einer der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix des Knorpels gilt als Nachweis für das Vorhandensein von Chondrozyten in einem frühen Stadium der enchondralen Ossifikation (Mackie et al., 2007). Die betreffende Struktur befindet sich demnach in einem aktiven Stadium und ist somit noch nicht bzw. noch nicht vollständig ossifiziert. Die Synthese von Typ II – Kollagen und von dem für die Elastizität mitverantwortlichen Aggrecan von proliferierenden und sich teilenden Chondrozyten fördert die Expansion des hyalinen Knorpels, der als Modell für die daraus entstehende knöcherne Struktur dient (Kronenberg, 2003; Mackie et al., 2007).

Typ X – Kollagen wird ausschließlich von Chondrozyten im hypertrophen Stadium der enchondralen Ossifikation produziert. Die Expression von Typ X – Kollagen gilt deshalb als Nachweis für das Wachstum der Chondrozyten und ihren Eintritt ins Stadium der Hypertrophie (Shen et al., 2005, 2006). In diesem Zuge erfolgende organisatorische Veränderungen bei Typ X – Kollagen sollen zur Förderung der

Kalzifizierung und knöchernen Umsetzung der Knorpelmatrix beitragen (Kwan et al., 1991; Shen et al., 2005).

Die Vergrößerung der aus hyalinem Knorpel bestehenden Areale lässt sich anhand der Hochregulation von Typ II – Kollagen in der sphenoookzipitalen Synchronchondrose zwischen Tag 0 und Tag 10 feststellen. In der Synchronchondrose kommt es durch die Chondrozytenproliferation und das damit einhergehende appositionelle Wachstum zur Vergrößerung des Synchronchondrosendurchmessers (Heinkele und Ewers, 1989). Aus der gesteigerten Expression von Typ II – Kollagen geht hervor, dass die Chondrozyten im Bereich von Tag 10 proliferieren und in großer Anzahl im prähypertrophen Stadium vorliegen. Durch die mit dem Anstieg der Typ II – Kollagen – Expression hervorgerufene Chondrozytenproliferation und Matrixproduktion vergrößert sich die gesamte knorpelige Struktur, wie es in diesem Lebensabschnitt erforderlich ist (Kronenberg, 2003). Beim Menschen erfolgt analog zur Ratte im Alter von drei bis vier Jahren eine Gewebevermehrung im Bereich der Synchronchondrosis sphenooccipitalis. Die Gründe hierfür liegen vermutlich in der Expansion des Gehirnes in diesem Entwicklungsabschnitt (Koski, 1968; Thilander und Ingervall, 1973). Die um Tag 10 festgestellte Erhöhung der Expression von Typ II – und X – Kollagen bei der Ratte fällt mit der Vergrößerung ihrer Hirnmasse zusammen (Watson et al., 2006; Bockhurst et al., 2008), die im Zuge der Öffnung der Augen und der Erweiterung der motorischen Fähigkeiten erfolgt. Der durch die Volumensteigerung der neuralen Substanz erzeugte Druck und die daraus resultierende Deformation der Knorpelmatrix können als Stimulus zur reaktiven Expansion der Wachstumszentren der Schädelbasis – dabei insbesondere der Synchronchondrosis sphenooccipitalis – aufgefasst werden. Bei der Ratte wächst das Gehirn im Zeitraum von der Geburt bis zum 14. Lebenstag postnatal am schnellsten, wobei die absoluten Spitzen der Wachstumsgeschwindigkeit etwa am achten Lebenstag gemessen wurden (Watson et al., 2006). Dieses Phänomen wirkt sich demnach auch auf die Wachstumszentren der Schädelbasis aus. Anhand der erhöhten Expression von Typ II – Kollagen am zehnten Lebenstag der Ratten in der vorliegenden Studie und der dadurch erfolgten Vermehrung des synchronchondralen Knorpelgewebes zu diesem Zeitpunkt kann man annehmen, dass die sphenoookzipitale Synchronchondrose sich durch Matrixproliferation und damit einhergehender Vergrößerung an die expandierende Gehirnmasse anpasst. Entsprechend der Theorie von Moss dient das Gehirn als funktionelle Matrix, deren

Ausdehnung verlangt, dass auch die Schädelbasis als skelettale Einheit an Größe zunimmt, ihre Gestalt verändert und mehr intrakranielle Kapazität zur Verfügung stellt (Moss, 1962; Moss und Young, 1960; Hoyte, 1971). Es ist möglich, dass aus der sich vergrößernden Gehirnmasse auf parakrinem Weg Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Interleukin – 1 austreten und die Entwicklung der Nachbarstrukturen positiv beeinflussen (Kyrkanides et al., 2007).

Diese Wachstumsvorgänge liefern einen Nachweis dafür, dass die Entwicklung der Synchronrose sowohl genetisch determiniert ist, als auch als Reaktion auf sekundäre Einflüsse zu betrachten ist (van Limborgh, 1972).

### **6.1.2 Abfall der Typ II – und X – Kollagen – Expression zwischen Tag 10 und Tag 52**

Zwischen Lebenstag 10 und 52 der Ratten war ein kontinuierlicher Abfall der Typ II – und X – Kollagen – Expression festzustellen. Diese Beobachtung kann darauf beruhen, dass die enchondrale Ossifikation der Synchronrosis sphenooccipitalis fortschreitet und vormals knorpelige Areale – wie erwartet – nun durch Knochen ersetzt werden. Folglich werden die Chondrozyten weniger und die absolut gemessene Expression von Typ II – und X – Kollagen ist entsprechend reduziert. Das neu entstandene Knochengewebe exprimiert nun Typ I – Kollagen anstelle von Typ II – und X – Kollagen (Mackie et al., 2007; Proff und Römer, 2009).

Die am Tag 52 gemessenen Expressionswerte deuten jedoch an, dass die Verknöcherung der Synchronrosis sphenooccipitalis nicht mit dem Erreichen der Geschlechtsreife abschließt. In der Synchronrosis sphenooccipitalis kommt es – wie in früheren Studien an *Cercopithecus* – Affen bewiesen – schon zu Verknöcherungen, während an anderen Stellen noch appositionelles und interstitielles Knorpelwachstum erfolgt (Heinkele und Ewers, 1989). Den Beweis dafür liefert die tendenziell gleiche Entwicklung der Typ II – und X – Kollagen Expression in dieser Struktur. Bei der Betrachtung der erzielten Ergebnisse an Tag 52 bleibt zu berücksichtigen, dass das Gehirn der Ratte erst etwa am 60. Lebenstag seine maximale Größe erreicht (Dobbing und Sands, 1971; Watson et al., 2006). Dies spricht ebenfalls dafür, dass die Synchronrosis sphenooccipitalis demnach noch über die Pubertät hinaus in knorpeligem Zustand verbleibt, wogegen sie sich beim Menschen und beim Affen in der Spätphase des Wachstums schließt (Rönning, 1971; Thilander und Ingervall, 1973; Heinkele und Ewers, 1989; Gilles et



al., 2005). Im Gegensatz zur Ratte erreicht das menschliche Gehirn bereits im neunten Lebensjahr 95 % seiner endgültigen Größe und weist im elften Lebensjahr, also vor der Geschlechtsreife sein Maximalgewicht auf (Dekaban und Sadwosky, 1978; Watson et al., 2006). Beim Menschen stellt also das Gehirn keinen Zwang zur Adaption der Schädelbasis bzw. ein Hindernis für einen knöchernen Synchrondrosenschluss dar, da es sein Wachstum vor der Synchrondrose einstellt. Dazu passt die Tatsache, dass beim Menschen ungefähr mit 12 Jahren knöcherne Brücken, die die sphenookzipitale Synchrondrose durchziehen feststellbar sind (Madeline, 1995). Der Verschluss der menschlichen Synchrondrosis sphenooccipitalis beginnt – im Gegensatz zur Ratte – gegen Ende des späten Wechselgebissalters (Heinkele und Ewers, 1989) und endet im 16. bis 17. Lebensjahr bei Frauen und etwa zwei Jahre später bei Männern (Thilander und Ingervall, 1973; Adem et al., 1999). Diese bis in die Pubertät verlängerte Entwicklung erlaubt eine weitere Ausdehnung des Oberkiefers nach dorsal und stellt dadurch Platz für den Nasopharynx beim Heranwachsenden zur Verfügung (Takigawa et al., 1984). Außerdem bleibt die Möglichkeit der vertikalen Entwicklung des Gesichts durch die späte Verknöcherung dieser Struktur erhalten und unterstreicht ihre Funktion als das bedeutendste primäre und sekundäre Wachstumszentrum der Schädelbasis, wie es Virchow schon 1857 formulierte (Virchow, 1857). Studien zufolge bleibt in der Synchrondrose das sogenannte sphenookzipitale Pseudoforamen, ein ovales kanalähnliches Knorpelsegment parallel zu den erwähnten Knorpelarealen ohne Anzeichen von Ossifikation, bis ins junge Erwachsenenalter, in manchen Fällen sogar das komplette Leben lang bestehen (Madeline, 1995). Diese Tatsache, dass kleine Teile der menschlichen Synchrondrose unter Umständen als Knorpel verbleiben, muss jedoch deutlich von der definitiven Persistenz der im Verhältnis viel stärker ausgeprägten Knorpelformationen in der Synchrondrose der Ratte abgegrenzt werden.

### **6.1.3 Kieferorthopädische Relevanz der synchondralen Entwicklung**

Da die Maxilla am anterioren Teil der Schädelbasis verankert ist und die Mandibula in enger Beziehung zum zentralen bzw. posterioren Part des Basikraniums steht, ist eine Beteiligung der Synchrondrosis sphenooccipitalis als bedeutendstes Wachstumszentrum in diesem Bereich an der Positionierung von Ober – und Unterkiefer bzw. am Auftreten von verschiedenen Formen der Malokklusion

naheliegend (Hopkin, 1968; Bacon et al., 1992; Proff et al., 2008). Aus diesem Grund bezeichnen manche Autoren die Schädelbasis als Leitschiene für die Maxilla und das Mittelgesicht (Enlow, 1973; Enlow, 1990; Dibbets, 1996).

Aufgrund des Einflusses der Synchrondrosis sphenoccipitalis auf die Form und Lage sowohl des Ober – als auch des Unterkiefers, ist es angebracht, ihre Entwicklung auch bei der orthodontischen Therapie im Auge zu behalten. Schon 1899 fand Angle heraus, dass eine von der Norm abweichende Entwicklung der Schädelbasis im Hinblick auf Wachstumsintensität und – orientierung dazu führen kann, dass sich die Relation der Mandibula zur Maxilla ebenfalls verändert (Angle, 1899). Durch Hemmung bzw. Unterbleiben insbesondere des synchondralen Wachstums wird demnach die Entwicklung der umgebenden Strukturen beeinflusst (Smarrt, et al., 2005; Rukkulchon und Wong, 2008). Als Beispiele kann man das klinische Bild bestimmter Syndrome wie z. B. Morbus Apert heranziehen, die bei verfrühtem Synchrondrosenschluss oder abnormer Knorpelbildung in den Wachstumszentren der Schädelbasis auftreten (Kreiborg et al., 1976; Ousterhout und Melsen, 1982; Grayson et al., 1985; Kreiborg et al., 1993). Bereits in vorhergehenden Studien wurde die Frage gestellt, ob und wie die Entwicklung der Synchrondrosis sphenoccipitalis für therapeutische Zwecke beeinflusst werden kann (Rukkulchon und Wong, 2008).

Der Zusammenhang zwischen der Abnahme des Schädelbasiswinkels und der Tendenz weg von der skelettalen Angle – Klasse I bzw. II hin zur skelettalen Angle – Klasse III wurde bereits in früheren Studien bestätigt (Hopkin et al., 1968; Kerr und Adams, 1988; Alves et al., 2008). Dabei wird die Unterkiefergelenkgrube und damit das Kiefergelenk wahrscheinlich durch eine übermäßige Sagittalentwicklung der Schädelbasis nach ventral verlagert (Björk, 1955; Hoyte, 1991; Singh, 1999). Durch einen beschleunigten Synchrondrosenschluss kommt es zur Abflachung und Kaudalverlagerung der basosphenoidalen und basookzipitalen Schädelbasisbereiche, wodurch sich die die Schädelbasis erfassenden Winkel signifikant verringern. So wurden bei Angle – Klasse III – Patienten signifikant verkleinerte Schädelbasiswinkel N – S – Ba (N: Nasion, S: Sella – Punkt, Ba: Basion) und Ca – S – Ba – Winkel (Ca: Foramen caecum (Schnittpunkt des Umrisses des Orbitadachs und der zerebralen Oberfläche des Stirnbeins), S: Sella – Punkt, Ba: Basion) gemessen (Proff et al., 2008). Außerdem wurden Veränderungen wie das Abknicken des vorderen Teils der basosphenoidalen Areale festgestellt (Butow,

1990; Rosenberg et al. 1997; Rukkulchon und Wong, 2008). Auch die absolute Länge der Schädelbasis zwischen Foramen caecum und entweder Basion oder Articulare ist bei Angle - Klasse III – Patienten deutlich verringert (Proff et al., 2008). Derartige Entwicklungsvorgänge haben zur Folge, dass sich die Maxilla nach dorsal und die Mandibula nach ventral bewegen und sich beim Patienten schließlich die Angle – Klasse III einstellt (Rosen und Whittaker, 1984; Rosenberg et al., 1997). Ein vergrößerter Schädelbasiswinkel dagegen kann bei Patienten mit Angle – Klasse II in der Regel festgestellt werden, wenngleich die Korrelation hier nicht so deutlich ist wie bei Angle – Klasse III (Kerr und Hirst, 1987). Trotzdem ist auch in diesen Fällen eine Analyse der Schädelbasis zur Diagnosestellung und für die weitere Therapie unumgänglich (Bacon et al., 1992).

Inwiefern die Einflussnahme auf die Synchronosis sphenooccipitalis die Therapie dentofazialer Malformationen unterstützen kann, bleibt abzuwarten. Es ist nachgewiesen, dass das periodische Einwirken von Druck auf die Synchronose den Stoffwechsel der Matrixkomponenten beeinflusst. Dadurch kommt es je nach Art und Richtung der ausgeübten Kraft entweder zur Unterdrückung weiteren Wachstums oder zur Gewebevermehrung (Ohashi et al., 2002; Stokes et al., 2002). Die Chondrozyten des Wachstumszentrums reagieren demnach einerseits auf Zugbelastung mit verstärkter Proliferation und Differenzierung (Stokes et al., 2002;; Wang und Mao, 2002). Andererseits kann eine mechanische Belastung der Schädelbasis bewirken, dass die im Zuge der enchondralen Ossifikation auftretende hypertrophe Zone eine größere Dicke aufweist als dies in unbelastetem Zustand der Fall wäre. Die Gründe hierfür liegen darin, dass aufgrund der Belastung mehr Chondrozyten in das Stadium der Hypertrophie eintreten und sich stärker vergrößern als unter normalen Bedingungen (Rukkulchon und Wong, 2008).

Auch die an Tag 10 gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Kollagen – Genexpression sprechen dafür, dass sich die Synchronosis sphenooccipitalis in ihrer Entwicklung sekundär beeinflussen lässt. In diesem Fall passt sich das sphenoookzipitale Wachstumszentrum der Schädelbasis wahrscheinlich durch eigene Vergrößerung an das expandierende Gehirn an. Rukkulchon und Wong bewiesen bereits in vitro, dass die sphenoookzipitale Synchronose nicht nur auf die funktionelle Matrix, sondern auch auf exogen erzeugte mechanische Reize und Belastungen mit funktioneller Anpassung reagiert (Rukkulchon und Wong, 2008). Der therapeutische Ansatz zur Behandlung kraniofazialer Syndrome und nonsyndromaler Anomalien

sowie zur Korrektur fehlerhafter Lagebeziehungen und Einlagerungen der Kiefer in den Gesichtsschädel kann in einer Steuerung von Wachstumsintensität und – richtung der Synchronchondrosis sphenoccipitalis liegen (Rukkulchon und Wong, 2008). Zu welchem Zeitpunkt das Eingreifen in das Wachstum der Synchronchondrosis sphenoccipitalis zu erfolgen hätte, bleibt abzuwarten. Es ist anhand der vorliegenden Studie festzuhalten, dass dieses Wachstumszentrum der Schädelbasis bei der Ratte in der Säugeperiode die aktivste Phase seiner postnatalen Entwicklung durchläuft. Außerdem wurde in früheren Forschungsarbeiten der Einfluss der Synchronchondrosis sphenoccipitalis auf die Einlagerung der Kiefer und die Möglichkeit der Beeinflussung seiner Entwicklung nachgewiesen (Mao und Nah, 2004; Kyrkanides et al., 2007; Rukkulchon und Wong, 2008). Wie diese drei Tatsachen kombiniert und für die Therapie genutzt werden können, und wie diese Therapie genau auszusehen hätte, könnte Gegenstand weiterer Studien sein. Außerdem wäre die Entwicklung der Synchronchondrosis sphenoccipitalis anderen viszerokraniellen Wachstumszentren gegenüberzustellen, um den Einfluss der einzelnen Strukturen aufeinander genau zu erfassen (siehe 6.2).

### 6.2 Methodendiskussion

Abschließend kann man sagen, dass die gewonnenen Ergebnisse bereits wichtige Anhaltspunkte für die viszerokranielle Entwicklung geben. Dennoch wäre eine Verifizierung der auf Ebene der Transkription durch qPCR erhaltenen Resultate sinnvoll. Dies könnte durch eine proteinbiochemische Analyse geschehen. Dabei könnte man versuchen, die signifikante Regulation der Expression von Typ I – Kollagen, Typ II – Kollagen und Typ X – Kollagen durch die Quantifizierung der betreffenden Proteine gegen ein Referenzprotein wie  $\beta$  – Aktin in entsprechenden Gewebeproben durch Western – Blots nachzuweisen.

Eine weitere Bestätigung der Ergebnisse wäre durch begleitende kephalometrische in vivo – Studien an der Ratte möglich. Dabei könnten verschiedene bildgebende bzw. histologisch – anatomische Verfahren eingesetzt werden, um die durch die molekularbiologische Untersuchung entwickelten Theorien über die Schädelentwicklung makroskopisch zu unterstützen. Auf diese Weise wäre es auch möglich, die bei der Tötung der Tiere auftretenden Probleme zu umgehen. Dazu zählt unter anderem die zweifelsohne diffizile Präparation der anatomischen Strukturen bei den Jungtieren. Diese erfolgte zwar unter größter Vorsicht und

Gewissenhaftigkeit, birgt jedoch trotz schnellstmöglicher Kollektion des Materials das Risiko der Degeneration der in den Proben enthaltenen RNA. Weiterhin könnte die durch die Entfernung der Artgenossen entstandene Stresssituation und die damit verbundenen Hormonschwankungen für die Tiere vermieden werden.

Theoretisch ist es auch denkbar, dass es unter den beprobten Tieren interindividuelle Differenzen bei der Genexpression gab. So besteht die Möglichkeit, dass sich unter den untersuchten Ratten Individuen befanden, die äußerst ungewöhnliche oder sogar pathologische Genexpressionsmuster im Vergleich zu ihren Artgenossen aufwiesen (Gedrange et al., 2008). Diese sind nicht repräsentativ und beeinflussen das Gesamtergebnis negativ. Dieses Problem könnte durch „RNA – Pooling“ umgangen werden. Dabei würde man die RNA der Tiere einer Altersgruppe nicht einzeln wie in der vorliegenden Arbeit, sondern in einem gemeinsamen Ansatz analysieren. Dazu mischt man die RNA von mehreren verschiedenen Individuen in äquimolaren Konzentrationen. Aus den RNA – Proben von acht Versuchstieren einer Altersstufe könnten auf diese Weise zwei RNA – Pools, bestehend aus jeweils vier Proben gebildet werden. Nun sollte zwischen diesen beiden Pools der gleichen Altersstufen eine signifikant größere Ähnlichkeit bestehen, als zu Pools anderer Altersstufen (Gedrange et al., 2008). Nichtsdestotrotz können mit der vorliegenden Methode der separaten Analyse der Individuen insgesamt genauere Ergebnisse erzielt werden.

Die Komplexität der Entwicklung aller viszerokranialen Schädelanteile könnte durch Studien an weiteren Wachstumszentren erfasst werden, um die unterschiedlichen Entwicklungsprozesse, Zellanordnungen und Verknöcherungsmuster der verschiedenen Wachstumszentren zu analysieren (Takigawa et al., 1984). Dabei wäre einerseits die Lamina perpendicularis des Os ethmoidale von herausragendem Interesse. Sie stellt ein bedeutendes Wachstumszentrum des Mittelgesichts dar und ist für die regelgerechte Genese des fazialen Bereichs von größter Wichtigkeit (Hopkin 1963; Kemble, 1973). Speziell für die Zahnheilkunde bzw. auch für die Kieferorthopädie ist außerdem der Processus condylaris des Unterkiefers von Interesse. Dessen physiologische Entwicklung wird stark von Vorgängen während der verschiedenen Entwicklungsphasen beeinflusst. Dabei sind sowohl die umgebenden muskulären Strukturen als auch die artikuläre Funktion und Beanspruchung sowie die Dentition beteiligt (Roberts und Hartsfield, 2004; Shen et al., 2006; Proff et al., 2007). Andererseits ist die normale Ausbildung des

Gelenkfortsatzes auch essentiell für die physiologische Funktion des Kiefergelenks, die Einlagerung des Unterkiefers und für ausreichende Platzverhältnisse im Bereich der Zahnreihen (Kantomaa und Hall, 1991; Coben, 1998, Gerlach et al., 2002). Weitere bedeutende Wachstumszentren des viszerokraniellen Bereiches von kieferorthopädischer Relevanz sind beispielsweise der Muskelfortsatz des Unterkiefers, der Kieferwinkel und das Alveolarfach (Miethke, 2000; Bresin 2001; Gerlach et al., 2002; Torisu et al., 2009). Auch sie könnten zur genaueren Untersuchung hinsichtlich der Entwicklung des Gesichtsschädels herangezogen werden.

Generell muss man jedoch hinterfragen, ob der Einfluss des Gehirnes auf die Entwicklung der Schädelbasis bei Mensch und Ratte gleich ist. Dabei unterscheiden sich beide Spezies nicht nur anhand der Wachstumsgeschwindigkeit des Gehirnes sondern auch hinsichtlich dessen Morphologie und der Entwicklung der einzelnen zerebralen Strukturen. Als Beispiele sind das olfaktorische System, das bei der Ratte weitaus stärker als beim Menschen ausgeprägt ist, oder der Neokortex und das visuelle System, bei dem die menschliche Version dem Nagetier überlegen ist, zu nennen (Watson et al., 2006). Die Unterschiede zwischen Mensch und Ratte sind jedoch weitestgehend zu vernachlässigen. Für die Entwicklung des Gehirnes und der angrenzenden Strukturen betreffenden Studien gelten die an der Ratte gewonnenen Ergebnisse als durchaus geeignet, um Rückschlüsse auf das analoge Verhalten des menschlichen Organismus ziehen zu können. Bei beiden Spezies ist das zentrale Nervensystem bei der Geburt noch relativ unausgereift und durchläuft einen weitgehend identischen Entwicklungsprozess (Watson et al., 2006). Da primatenhafte Labortiere, deren Gesichts – und Schädelbasisareale sich exakt wie beim Menschen entwickeln, nur begrenzt verfügbar sind, können die in der Forschungsarbeit an der Ratte gewonnenen Ergebnisse als Darstellung der Genese und der Reaktionen eines dem Menschen in vielen Punkten ähnlichen Systems betrachtet werden (Schuhmacher, 1999).

### **7. Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Quantifizierung von Kollagen – Transkripten in der Schädelbasis der Ratte mittels qPCR, um deren Korrelation mit dem postnatalen Schädelwachstum nachzuweisen. Dabei wurde der Ablauf der enchondralen Ossifikation am knorpeligen viszerokraniellen Wachstumszentrum der Synchronosis sphenoccipitalis im Hinblick auf wichtige physiologische Entwicklungsstufen untersucht. Typ II – Kollagen gilt als Marker der Proliferation und der prähypertrophen Phase der Chondrozyten und Typ X – Kollagen als Marker für die Hypertrophie der Chondrozyten. Die Messungen der Kollagen – Expression erfolgten am Tag der Geburt, in der Mitte der Säugephase der Tiere am zehnten Lebenstag, beim Eintritt in das Stadium der festen Nahrungsaufnahme am 21. Lebenstag und bei Erreichen der Geschlechtsreife am 52. Lebenstag.

In der Mitte der Säugephase am Tag 10 war eine deutliche Hochregulation der Typ II – und X – Kollagen – Expression in der sphenookzipitalen Synchronrose nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wächst das Gehirn der Ratte mit der größten Geschwindigkeit und übt durch seine Expansion anscheinend einen Wachstumsreiz auf die Schädelbasis aus (Hoyte, 1971; Watson et al., 2006). Dieser durch Nachbarstrukturen ausgelöste, durch mechanische Stimulation bedingte Wachstumsschub unterstreicht Moss' Theorie von der funktionellen Matrix (Moss, 1960; Moss und Young, 1960; Moss, 1962; Enlow, 1968). Man kann zu dem Schluss kommen, dass die Entwicklung der Synchronosis sphenoccipitalis sowohl genetisch determiniert, als auch sekundär beeinflussbar ist (van Limborgh, 1972).

Die am Tag 52 gewonnenen Werte sprechen dafür, dass die Verknöcherung der Synchronosis sphenoccipitalis bei der Ratte nicht mit der Geschlechtsreife ihr Ende findet. Die Synchronosis sphenoccipitalis der Ratte ossifiziert nicht komplett, wie beim Menschen im Alter von 16 bis 18 Jahren. Ein Teil ihrer knorpeligen Anteile bleibt lebenslang erhalten (Thilander und Ingervall, 1973; Gilles et al., 2005). Der Abfall der Typ II – und X – Expression zwischen Tag 10 und Tag 52 kann damit zusammenhängen, dass sich die knorpeligen Areale der Synchronrose allmählich knöchern umwandeln und folglich verkleinern. Dies hat zur Folge, dass die Typ II und X – Kollagen – Expression im nun knöchernen Gewebe durch die ansteigende Typ I – Kollagen – Expression abgelöst wird. (Mackie et al., 2007; Proff und Römer, 2009).

## 7. Zusammenfassung

---

Insgesamt kann man zu dem Schluss kommen, dass sich gegen Ende der Säugephase die wichtigsten Prozesse für die viszerokraniale Genese abspielen. Nichtsdestotrotz kann man die Entwicklung der Schädelbasis als multifaktoriell beeinflusstes Geschehen betrachten. Zur Verifizierung der auf molekularbiologischer Ebene gewonnenen Resultate wären proteinbiochemische bzw. kephalometrische Studien geeignet.





### 8. Literaturverzeichnis

Adams C.S., Shapiro I.M., 2002. The fate of the terminally differentiated chondrocyte: Evidence for microenvironmental regulation chondrocyte apoptosis. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13: 465 – 473

Adem C., Lafitte F., Jarquin S., Guillem P., Chiras J., 1999. Persistance de la synchondrose sphéno – occipitale chez l’adulte. J. Radiol. 80 : 863 – 865

Adler C.P., Olah A., Riede U.N., 1989. Knochengewebe. In: Riede U.N., Schaefer H.E., Wehner H., 1989. Allgemeine und spezielle Pathologie: 1030 – 1061, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York

Adler C.-P., Thomas C., 1990. Knochen – Knorpel. In: Thomas C. (Hrsg.): Spezielle Pathologie: 527ff, Schattauer Verlag, Stuttgart – New York

Ahmed Y.A., Tatarczuch L., Pagel C.N., Davies H.M., Mirams M., Mackie E.J., 2007. Physiological death of hypertrophic chondrocytes. Equine Vet. J. 39: 546 – 552

Albright J.A., 1979. Bone: Physical properties. In: Albright J.A., Brand R.A. (Hrsg.), 1979. The scientific basis of orthopedics: 135 – 183. Appleton – Center – Crofts, New York , N.Y.

Alves, P.V., Mazzuchelli J. et al., 2008. Cranial base angulation in Brazilian patients seeking orthodontic treatment. J. Craniofac. Surg. 19: 334 – 338

Angle E.H., 1899. Classification of malocclusion. Dent. Cosmos. 41: 248 – 264

Arat Z.M., Türkkahraman H., English J.D., Gallerano R.L., Boley J.C., 2010. Longitudinal changes of the cranial base from puberty to adulthood. Angle Orthod. 80: 725 – 732

Aszódi A., Bateman J.F., Gustafsson E., Boot – Hanford R., Fässler R., 2000. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what we can learn from knock – out mice? *Cell Struct. Funct.* 25: 73 – 84

Bacon W., Eiller V., Hildwein M. et al., 1992. The cranial base in subjects with dental and skeletal Class II. *Eur. J. Orthod.* 14: 224 – 228

Bhaskar S.N., Weinmann J.P., Schour I., 1953. The role of the Meckel's cartilage in the development and growth of the rat mandible. *J. Dent. Res.* 32 : 398 – 410

Baume L.J., 1970. Differential response of the condylar, epiphyseal, synchondrotic and articular cartilages of the rat to varying levels of vitamin A. Its impact on current growth concepts. *Am. J. Orthod.* 58: 537 – 551

Belden C.J., Mancuso A.A., Kotzur I.M., 1997. The developing anterior skull base: CT appearance from birth to 2 years of age. *Am. J. Neuroradiol.* 18: 811 – 818

Blechsmidt E., Gasser R.F., 1978. Bionkinetics and biodynamics of human differentiation: Principles and applications. C. Thomas (Hrsg.) – Springfield, IL.

Bonewald L.F., 2007. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. Review. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1116: 281 – 290

Brash J.C., 1924. The growth of the jaws and the palate. In: *The Growth of Jaws, Normal and abnormal, in Health and Disease.* London, Dental Board of the United Kingdom: 23 – 66

Bresin A., 2001. Effects of masticatory muscle function and bite – raising on mandibular morphology of the growing rat. *Swed. Dent. J. Suppl.* 150: 1 – 49

Björk A., 1955. Cranial base development. *Am. J. Orthod.* 41: 198 – 225

Bockhurst K.H., Narayana P.A., Liu R., Ahobila – Vijjula P., Ramu J., Kamel M., Wosik J., Bockhurst T., Hahn K., Hasan K.M., Perez – Polo J.R., 2008. Early

postnatal development of rat brain: in vivo tensor imaging. J. Neurosci. Res. 86: 1520 – 1528

Butow K.W., 1990. Craniofacial growth disturbance after skull base and associated suture synostoses in the newborn chacma baboon: a preliminary report. Cleft Palate J. 27: 241 – 252

Carinci F., Bodo M., Tosi L., et al., 2002. Expression profiles of craniosynostosis – derived fibroblasts. Mol. Med. 8: 638 – 644

Carlson D.S., 2005. Theories of the craniofacial growth in the postgenomic era. Semin. Orthod. 11: 172 - 183

Carter, D.R., Beaupre G.S., Giori N.J., Helms J.A., 1998. Mechanobiology of skeletal regeneration. Clin. Orthop. 355: 41 – 55

Cawston, T.E., Wilson A.J., 2006. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 20: 983 – 1002

Cendekiawan T., Wong R.W., Rabie A.B., 2008. Temporal expression of SOX9 and type II Kollagen in spheno – occipital synchondrosis of mice after mechanical tensor stimuli. Angle Orthod. 78: 83 – 88

Clara M., 1949. Entwicklungsgeschichte des Menschen. Quelle und Meyer, Heidelberg

Clarren S.K., Smith D.W., 1977. Congenital deformities. Pediatr. Clin. North. Am. 24: 665 - 677

Coben S.E., 1998. The spheno-occipital synchondrosis: the missing link between the profession's concept of craniofacial growth and orthodontic treatment. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop. 114: 709 – 714

Colnot, C., Sidhu, S.S., Balmain, N., Poirier, F., 2001. Uncoupling of chondrocyte death and vascular invasion in mouse galectin 3 null mutant bones. *Dev. Biol.* 22: 203 – 214

Crawford D.B., 1976. The chondrocranium in achondroplasia. In: Bosma J.F. (Hrsg.), 1976. Symposium on development of the basicranium. U.S. Department of health education and welfare, Bethesda

Das U.N., 2002. Essential fatty acids as possible enhancers of the beneficial actions of probiotics. *Nutrition* 18: 786

Dekaban A.S., Sadowsky D., 1978. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann. Neurol.* 4: 345 – 356

Dibbets J.M., 1996. Morphological associations between the Angle classes. *Eur. J. Orthod.* 18: 111 – 118

Diewert V.M., 1985. Development of the human craniofacial morphology during the late embryonic and early fetal periods. *Am. J. Orthod.* 88: 64 – 76

Diewert V.M., 1985. Growth movements during prenatal development of human facial morphology. *Prog. Clin. Biol. Res.* 187: 57 – 66

Diewert V.M., Wang K.Y., 1992. Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 111 – 130

Dobbing J. Sands J., 1971. Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth – spurt. *Biol. Neonate* 19: 363 – 378

Dvorak J., 1974. Das Kinn als Ergebnis postnatalen Wachstums des rezenten Unterkiefers. *Fortschr. Kieferorthop.* 35: 286

Enlow D.H., 1968. Wolff's law and the factor of architectonic circumstance. Am. J. Orthod. 54: 803 – 822

Enlow, D.H., 1968. The human face: an account of the postnatal growth and development of the craniofacial skeleton. Harper and Row, New York.

Enlow, D.H., 1975. Handbook of facial growth. Saunders, Philadelphia – London – Toronto

Enlow D.H., 1975. Rotations of the mandible during growth (in: McNamara, J.A., 1975. Determinants of mandibular form and growth. Craniofacial Growth Series 4, Ann Arbor)

Enlow, D.H., 1976. The prenatal and postnatal growth of the human basicranium. In: Bosma J.F. (Hrsg.), 1976. Symposium on development of the basicranium. U.S. Department of health education and welfare, Bethesda

Fanghänel J., Perra F., Anderhuber F., Nitsch R., 2003. Waldeyer: Anatomie des Menschen. De Gruyter, Berlin – New York.

Fernandes R.M., Abreu A.V., Silva R.B., Silva D.F., Martinez G.L., Babinski M.A. et al., 2008. Maternal malnutrition during lactation reduces skull growth in weaned rat pups: experimental and morphometric investigation. Anat. Sci. Int. 83: 123 – 130

Franz – Odendaal T.A., Hall B.K., Witten P.E., 2006. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Dev. Dyn. 235: 176 – 190

Furstman L., Bernick S., Mahan P.Z., 1971. The role of the nasal septum in the development of the secondary palate of the rat. Am. J. Orthod. 60: 244 – 256

Gedrange T., Weingärtner J., Hoffmann A., Homuth G., Ernst F., Bokan I., Mai R., Proff P., 2008. Development of an improved protocol to analyse gene expression in temporomandibular joint condylar cartilage of rats using DNA microarrays. Ad. Med. Sci. 53: 191 – 197

Gerlach R.F., Toledo D.B., Fonseca R.B., Novaes P.D., Line S.R., Merzel J., 2002. Alveolar Bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. Arch. Oral. Biol. 47: 203 – 209

Gibson G.J., 1998. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. Microsc. Res. Tec. 43: 191 – 204

Giles W.B., Phillips C.L., Joondeph D.R., 1981. Growth in the basicranial synchondroses of adolescent *Macaca mulatta*. Anat. Rec. 199: 259 – 266

Graber T.M., 1972. Orthodontics. Principles and practice. Saunders, Philadelphia – London – Toronto

Graves D.T., Alsulaimani F., Ding Y., Marks S.C.Jr, 2002. Developmentally regulated monocyte recruitment and bone resorption are modulated by functional deletion of the monocytic chemoattractant protein – 1 gene. Bone 31: 282 – 287

Gray H., 1918. Anatomy of the human body, 20<sup>th</sup> edition. Lea & Febiger, Philadelphia

Grayson B.H., Weintraub. N., Bookstein F.L., McCarthy J.G., 1985. A comparative study of the cranial base craniofacial anomalies: Part I. Tensor analysis. Cleft Palate J. 22: 75 – 87

Hadjidakis D.J., Androulakis I.I., 2006. Bone Remodelling. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1092: 385 – 396

Hassenkamp T., Fantner G.E., Cutroni J.A., Weaver J.C., Morse D.E., Hansma P.K., 2004. High resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. Bone 35: 4 – 10

Hatori M., Klatte K.J., Teixeira C.C., Shapiro I.M., 1995. End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: Evidence of apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. J. Bone Miner. Res.10: 1960 – 1968

Heinkele M., Ewers R., 1989. Spheno – occipital synchondrosis – a fluorescence and polarization microscopy study in Cercopithecus aethiops monkeys. Fortschr. Kieferorthop. 50: 493 – 505

Hill P.A., 1998. Bone remodelling. Br. J. Orthod. 25: 101 – 107

Hinrichsen K.V., 1990. Gesichtsentwicklung. In: Hinrichsen, K.V. (Hrsg.): Humanembryologie: 650 – 692. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg

Hinrichsen K.V., 1990. Schädelentwicklung. In: Hinrichsen, K.V. (Hrsg.): Humanembryologie: 693 – 705. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg

Hinrichsen K.V., 1985. The early development of morphology and patterns of the face in the human embryo. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 98: 1 – 79

Hopkin G.B., 1963. Hypoplasia of the middle third of the face associated with congenital absence of the anterior nasal spine, depression of the nasal bones and angle class III malocclusion. Br. J. Plast. Surg. 16: 146 – 153

Hopkin G.B., Houston W.J.S., James G.A., 1968. The cranial base as an aetiological factor in malocclusion. Angle Orthod. 38: 250 – 255

Horch, H.H., 2006. Kraniofaziale Fehlbildungen Teil II: Lippen – Kiefer – Gaumenspalten. In: Horch H.H. (Hrsg.), 2006. Mund – Kiefer – Gesichtschirurgie: 442 – 552. Urban & Fischer Verlag, München – Jena

Horton J.A., Bariteau J.T., Loomis R. M., Strauss J.A., Damron T.A., 2008. Ontogeny of skeletal maturation in the juvenile rat. Anat. Rec. 291: 283 – 292

Hoyte, D.A.N., 1971. Mechanisms of growth in the cranial vault and base. J. Dent. Res. 50: 1447 – 1461

Hoyte D.A.N., 1991. The cranial base in normal and abnormal skull growth. Neurosurg. Clin. North Am. 2: 515 – 537



Hwang W.S., 1978. Ultrastructure of human foetal and neonatal hyaline cartilage. J. Pathol. 126: 209 - 214

Inada, M., Wang, Y., Byrne, M.H., Rahman, M.U., Miyaura, C., Lopez – Otin, C. et al., 2004. Critical roles for Kollagenase – 3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 17192 – 17197

Ingervall B., Thilander B., 1972. The human spheno – occipital synchondrosis. I. The time of closure appraised macroscopically. Acta Odontl. Scand. 30: 349 – 356

Johnston M.C., Bhakdinaronk A., Reid Y.C., 1974. An expanded role of the neural crest in oral and pharyngeal development. In Bosma J.F. (Hrsg.): Third Symposion on oral sensation and perception: 37 – 52. US Government Printing Office, Washington D.C

Johnston M.C., Bronsky P.T., 1995. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 6: 368 – 422

Joos U., Kleinheinz J., 2006. Klinisch relevante Syndrome im Kopfbereich. In: Horch, H.H. (Hrsg.): Mund – Kiefer – Gesichtschirurgie: 388 – 418. Urban & Fischer Verlag, München – Jena

Kahl – Nielke B., 2010. Einführung in die Kieferorthopädie. Deutscher Zahnärzte Verlag , Köln

Kamoun – Goldrat A.S., Le Merrer M.F., 2007. Osteogenesis imperfecta and dentinogenesis imperfecta: diagnostic frontiers and importance in dentofacial orthopedics. Orthod. Fr. 78: 89 – 99

Kantomaa T., Hall B.K., 1991. On the importance of cAMP and Ca<sup>++</sup> in mandibular condylar growth and adaption. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 99: 418 – 426

Kawakami H., 2005. Biological significance of milk basic protein (MBP) for bone health. Food Sci. Technol. Res. 11: 1 – 8

Kemble J.V., 1973. The importance of the nasal septum in facial development. Laryngol. Otol. 87: 379 – 386

Kerr, J.F., Wyllie A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide – ranging implications in tissue kinetics. Br. J. cancer 26: 239 - 257

Kerr W.J.S., 1978. A method of superimposing serial lateral cephalometric films for the purpose of comparison: a preliminary report. Br. J. Orthod. 5: 51 – 53

Kerr W.J.S., Hirst D., 1987. Craniofacial characteristics of subjects with normal and postnormal occlusions - A longitudinal study. Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop. 92: 207-211

Kerr W.J.S., Adams C.P., 1988. Cranial base and jaw relationship. Am. J. Phys. Anthropol. 77: 213 - 220

Kimura H., Kwan K.M., Zhang Z., Deng J.M., Darnay B.G., Behringer R.R., Nakamura T., de Crombrughe B., Akiyama H., 2008. Cthrc1 is a positive regulator of osteoblastic bone formation. PloS. One 3, e 3174

Kitamura H., 1966. Epithelial remnants and pearls in the secondary palate in the human abortus: a contribution to the study of the mechanism of cleft palate formation. Cleft Palate J. 3: 240 – 257

Kjaer I., 1989. Prenatal skeletal maturation of the human maxilla. J. Craniofac. Gen. Dev. Biol. 10: 257 – 264

Kjaer I., 1990. Ossification of the human fetal basicranium. J. Craniofac. Gen. Dev. Biol. 10: 29 – 38

Kjaer I., Kjaer T.W., Graem N., 1993. Ossification sequence of occipital bone and vertebrae in human fetuses. *J. Craniofac. Gen. Dev. Biol.* 10: 83 – 88

Kjaer I., 1998. Neuro – osteology. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9: 224 – 244

Kleinheinz J., Joos U., 2001. Imaging of cartilage and mimic muscles with MRI. Anatomic study in healthy volunteers and patients with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac. J.* 38: 291 – 298

Kölliker A., 1879. *Entwicklungsgeschichte des Menschen und der höheren Tiere*, Engelmann, Leipzig

Koski K., 1968. Cranial growth centers: facts of fallacies? *Am. J. Orthod.* 54: 566–583.

Koski K., 1975. Cartilage in the face. *Birth defects: original article series. Volume XI* 7: 231 – 254

Kraus B.S., Kitamura J.H., Latham R.A., 1966. *Atlas of development anatomy of the face with special reference to normal and cleft lip and palate*. Harper & Ron, New – York - London

Kreiborg S., Prydsøe U., Dahl E., Fogh – Anderson P., 1976. Clinical conference 1. Calvarium and cranial base in Apert's syndrome. An autopsy report. *Cleft Palate J.* 13: 296 – 303

Kreiborg S., Cohen M.M.Jr., 1992. The oral manifestations of Apert syndrome. *J Craniofac. Gent. Dev. Biol.* 12: 41 – 48

Kreiborg S., Marsh J.L., Cohen M.M. Jr. Et al., 1993. Comparative three – dimensional analysis on CT – scans of the calvaria and cranial base in Apert and Crouzon syndromes. *J. craniomaxillofac. Surg.* 21: 181 – 188

Kronenberg H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332 – 336

Kronenberg, H.M., 2006. PTHrP and skeletal development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1068: 1 – 13

Kühnel W., 2002. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Thieme, Stuttgart

Kwan A.P.L., Freemont A.J., Grant M.E., 1986. Immunoperoxidase localization of type X collagen in chick tibiae. *Biosci. Rep.* 6: 155 – 162

Kwan A.P.L., Cummings C.E., Chapman J.A., Grant M.E., 1991. Macromolecular organization of chicken type X Kollagen in vitro. *J. Cell Biol.* 114: 597 – 604

Kyrkanides S., Kambylafkas P., Miller J.H., Tallents R.H., Puzas J.E., 2007. The cranial base in craniofacial development: a gene therapy study. *J. Dent. Res.* 86: 956 – 961

Lanske B., Karaplis A.C., Lee K., Luz A., Vortkamp A., Pirro A., Karperien M., Defize L.H.K., Ho C., Mulligan R.C, Abou – Samra A.B., Juppner H., Segre G.V., Kronenberg H.M., 1996. PTH / PTHrP receptor in early development and Indian Hedgehog – regulated bone growth. *Science* 273: 663 – 666

Lei W.Y., Wong R.W.K, Rabie A.B.M., 2008. Factors regulating endochondral ossification in the spheno – occipital synchondrosis. *Angle Orthod.* 78: 215 - 220

Leitinger, B., Hohenester E., 2007. Mammalian Kollagen receptors. *Matrix Biol.* 26: 146 – 155

Leitinger, B., Kwan A.P., 2006. The discoidin domain receptor for type X Kollagen. *Matrix Biol.* 25: 355 – 364

LeVeau B.F., Bernhardt D., 1984. Effect of forces on the growth, development and maintenance of the human body. *Phys. Ther.* 64: 1874 – 1882

Long J.J., 1971. A cephalometric study of the closure of the spheno – occipital synchondrosis in a group of subjects exhibiting Class II dentoskeletal relations. *Am. J. Orthod.* 59: 301 – 302

Luckman, S.P., Rees, E., Kwan, A.P., 2003. Partial characterization of cell – type X Collagen interactions. *Biochem. J.* 372: 485 – 493

Mackie E.J., Ahmed Y.A., Tatarczuch L., Chen K.S., Mirams M., 2007. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 46 – 62

Mao J.J., Nah H.D., 2004. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 125: 676 – 689

Madeline L.A., Elster A.D., 1995. Postnatal development of the central skull base: normal variants. *Radiology* 196: 757 – 763

Mansfield K., Rajpurohit R., Shapiro I.M., 1999. Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *J. Cell Physiol.* 179: 276 – 286

Mao J., Nah H., 2004. Growth and development: hereditary und mechanical modulations. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 125: 676 – 689

Matuso K., Irie N., 2008. Osteoclast – osteoblast communication. *Arch. Biochem. Biophys.* 473: 201 – 209

Melsen B., 1977. Histological analysis of the postnatal development of the nasal sepum. *Angle Orthod.* 47: 83 – 96

Merzel J., Salmon C.R., 2008. Growth and the modelling/remodelling of the alveolar bone of the rat incisor. *Anat. Rec.* 291: 827 – 834

Miethke R.R., 2000. Schädelentwicklung. In: Diedrich P. (Hrsg.): *Kieferorthopädie I*: 19 – 45. Urban & Fischer Verlag, München – Jena

Mirams M., Tatarczuch L., Ahmed Y.A., Pagel C.N., Jeffcott L.B., Davies H.M., Mackie E.J., 2009. Altered gene expression in early osteochondrosis lesions. *J Orthop. Res.* 27: 452 - 457

Mooney M.P., Cooper G.M., Burrows A.M. et al., 2000. Trigonocephaly in rabbits with familial interfrontal suture synostosis: The multiple effects of premature single – suture fusion. *Anat. Rec.* 260: 238 – 251

Moss M.L., Young R.W., 1960. A functional approach to craniology. *Am. J. Phys. Anthropol.* 18: 281 – 292

Moss M.L., 1960. Functional analysis of human mandibular growth. *J. Prosth. Dent.* 10: 1149 – 1160

Moss M.L., 1962. The functional Matrix. In Kraus B., Riedel R. (Hrsg.): *Vistas in Orthodontics*: 85 – 98. Lea & Febiger, Philadelphia

Moss M.L., 1968. A theoretical analysis of the functional matrix. *Acta Biotheor.* 18: 195 – 202

Moss M.L., 1980. The design of bones. In: Owen R. et al. (Hrsg.), 1980. *Scientific Foundations of Orthopaedics and Traumatology*: 59 – 66. Saunders, Philadelphia

Moss – Salentijn L., 1997. Melvin L. Moss and the functional Matrix. *J. Dent. Res.* 76: 1814 – 1817

Moyers, R.E., 1988. *Handbook of orthodontics*. Year Book Medical Publishers, Chicago

Müller F., O’Rahilly R., 1980. The human chondrocranium at the end of the embryonic period, proper, with particular reference to the nervous system. *Am. J. Anat.* 159: 33 – 38

Nakamura, T., Aikawa, T., Iwamoto – Enamoto, M., Iwamoto M., Higuchi, Y., Pacifici, M. et al., 1997. Induction of osteogenetic differentiation by hedgehog proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 465 – 469

Nakamura Y., Noda K., Kuwahara Y., Minyeong L., Tanaka S., Kawasaki K., Kobayashi K., 1999. Magnetic resonance images and histology of the sphenoid – occipital synchondrosis in young monkeys (*Macaca fuscata*). *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 115: 138 – 142

Nap R.C., Hazewinkel H.A., van’t Klooster A.T., 1991. Skeletal development in the dog in relation to nutrition. *Tijdschr. Diergeneeskde.* 116: 609 – 627

Naski M.C., Ornitz D.M., 1998. FGF signalling in skeletal development. *Front. in Biosci.* 3: 781 – 794

Nishimura M., Suzuki S., Satoh T., Naito S., 2009. Tissue – specific mRNA expression profiles of human solute carrier 35 transporters. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* 24: 91 – 99

Noonan K.J., Hunziker E.B., Nessler J., Buckwalter J.A., 1998. Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones. *J. Orthop. Res.* 16: 500 – 508

Ödman A., Mavropoulos A., Kiliaridis S., 2008. Do masticatory functional changes influence the mandibular morphology in adult rats. *Arch. Oral Biol.* 53: 1149 - 1154

Ohashi N., Robling A.G., Burr D.B., Turner C.H., 2002. The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J. Bone Miner. Res.* 17: 284 – 292

Okamoto K., Ito J., Tokiguchi S., Furusawa T., 1996. High resolution findings in the development of the spheno – occipital synchondrosis. *Am. J. Neuroradiol.* 17: 117 – 120

Otto F., Kanegane H., Mundlos S., 2002. Mutations in the Runx2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum. Mutat.* 19: 209 – 216

Ousterhout D., Melsen B., 1982. Cranial base deformity in Apert's syndrome. *Plast. Reconstr. Surg.* 69: 254 – 269

Petrovic A., Stutzmann J., 1980. Growth hormone: mode of action on different varieties of cartilage. *Pathol. Biol.* 28: 43 – 58

Petrovic A., 1974. Control of postnatal growth of secondary cartilages of the mandible by mechanisms regulating occlusion. Cybernetic model. *Trans. Eur. Orthod. Soc.* 69 – 75

Pfaffl M.W., Real – time RT – PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum* 1/2004: 92 – 95

Pfaffl M.W., Tichopad A., Progmert C., Neuvians T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best keeper Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26: 509 - 515

Proff P., Gedrange T., Franke R., Schubert H., Fanghänel J., Miehe B., Harzer W., 2007. Histological and histomorphometric investigation of the condylar cartilage of juvenile pigs after anterior mandibular displacement. *Ann. Anat.* 189: 269 – 275

Proff P., Will F., Bokan I., Fanghänel J., Gedrange T., 2008. Cranial base features in skeletal Class III patients. *Angle Orthod.* 78: 433 – 439

Proff P., Römer P., 2009. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin. Oral. Invest.* 13: 355 – 362



Proff P., Weingärtner J., Bayerlein T., Reicheneder C., Fanghänel J., Bill J., 2006. Histological and histomorphometric study of growth – related changes of cranial sutures in the animal model. J. Craniomaxillofac. Surg. 34: 96 – 100

Putz D.A., Smith T.D., Burrows A.M. et al., 2002. Cranial base changes following coronal suture ectomy in craniosynostotic rabbits. Orthod. Craniofac. Res. 5: 90 – 103

Rabie A.M.B., Shen G., Hägg E.U., Kaluarachchi T.K.P.K, 2000. Type X Kollagen – a marker for endochondral ossification of the mandibular condyles. Orthodontics Year Book 2000: 50 – 58

Rabie A.M.B., Hägg E.U., 2002. Factors regulating mandibular condylar growth. Am J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 122: 401 – 409

Rakosi, T., 1979. Atlas und Anleitung zur praktischen Fernröntgenanalyse. Hanser, München – Wien

Rath B., Nam J., Knobloch T.J., Lanutti J.J., Agarwal S., 2008. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. J. Biomech. 41: 1095 - 1103

Ren Y., Maltha J.C., Kuijpers – Jagtman A.M., 2004. The rat as a model for orthodontic tooth movement – a critical review and a proposed solution. Eur. J. Orthod. 26: 483 – 490

Roach, H.I., Aigner T., Kouri, J.B., 2004. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? Apoptosis 9: 265 – 277

Roach, H.I., Clark, N.M., 1999. “Cell paralysis” as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. J. Bone Miner. Res. 14: 1367 – 1378

Roach H.I., Clark, N.M., 2000. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. J. Bone Joint Surg. Br. 82: 601 – 613

Roberts W.E., Hartsfield J.K. Jr, 2004. Bone development and function: Genetic and environmental mechanisms. Sem. Orthod. 10: 100 – 122

Rodriguez J.I., Perera A., Regadera J., Collado F., Contreras F., 1982. Lethal osteogenesis imperfecta. Anatomopathologic (optical and structural) study of eight autopsy cases. An. Esp. Pediatr. 17: 18 – 33

Rönning O., 1971. Alterations in craniofacial morphogenesis induced by parenterally administered papain. An experimental study on the rat. Suom. Hammalääk. Toim. 67 (Suppl. III)

Rosen H.M., Whittaker L.A., 1984. Cranial base dynamics in craniofacial dysostosis. J. Maxillofac. Surg. 12: 56 – 61

Rosenberg P., Arlis H.R., Haworth R.D., Heier L., Hoffman L., Latrenta G., 1997. The role of the cranial base in facial growth: experimental craniofacial synostosis in the rabbit. Plast. Reconstr. Surg. 99: 1396 – 1407

Rukkulchon B.K., Wong R.W.K., 2008. Effect of tensile force on expression of PTHrP and thickness of hypertrophic zone in organ – cultured mouse sphenoid – occipital synchondroses. Arch. Oral Biol. 53: 690 – 699

Schmid T.M., Linsenmayer T.F., 1985. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. J. Cell Biol. 100: 598 – 605

Schmuth G., Diedrich P., 2000. Die heutige Kieferorthopädie – Standortbestimmung und Zukunftsperspektiven. In Diedrich P. (Hrsg.): Kieferorthopädie I: 3 – 15. Urban & Fischer Verlag, München – Jena

Schuhmacher G.H., 1999. Regulative and adaptive factors in craniofacial growth. *Ann. Anat.* 181: 9 – 13

Scott J.H., 1953. The cartilage of the nasal septum: a contribution to the study of facial growth. *Br. Dent. J.* 95: 37 – 43

Scott J.H., 1954. The growth of the human face. *Proc. R. Soc. Med.* 47: 91 – 100

Scott J.H., 1958. The cranial base. *Am. J. Phys. Antropol.* 16: 319 – 348

Scott, J.H., 1959. Further studies on the growth of the human face. *Proc. R. Soc. Med.* 52 : 263 – 268

Scott J.H., 1967. Dento – facial development and growth. Pergamon Press – Oxford

Sekula R.F. Jr, Jannetta P.J., Kenneth F.C., Edward M.M., Sekula L.K., McCrady C.S., 2005. Dimensions of the posterior fossa in patients symptomatic for Chiari I malformation but without cerebellar tonsillar descent. *Cerebrospinal Fluid. Res.* 18: 2 – 11

Shapiro R., Robinson F., 1980. The embryogenesis of the human skull. An anatomic and radiographic atlas. Harvard University Press, Cambridge – London

Shapiro, I.M., Adams, C.S., Freeman T., Srinivas V., 2006. fate of the hapertropic chondrocyte: Mcroenvironmental perspectives on apoptosis and survival in the epiphyseal growth plate. *Birth Defects Res. C.: Embryo Today* 75: 330 – 339

Shen G., 2005. The role of type X Kollagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod. Craniofac. Res.* 8: 11 – 17

Shen G., Hägg U., Rabie A.B., Kaluarachchi K., 2005. Identification of temporal pattern of mandibular condylar growth: a molecular and biochemical experiment. *Orthod. Craniofac. Res.* 8: 114 – 122

Shen G., Zhao Z., Kaluarachchi K., Rabie A.B., 2006. Expression of type X Kollagen and capillary endothelium in condylar cartilage during osteogenic transition – a comparison between adaptive remodelling and natural growth. *Eur. J. Orthod.* 28: 210 – 216

Shen G. Darendeliler M.A., 2006. Cephalometric evaluation of condylar and mandibular growth modification: a review. *Orthod. Craniofac. Res.* 9: 2 – 9

Shen G., Rabie A.B., Zhao Z.H., Kaluarachchi K., 2006. Forward deviation of the mandibular condyle enhances endochondral ossification of condylar cartilage indicated by increased expression of type X Kollagen. *Arch. Oral Biol.* 51: 315 – 324

Shibata S., Suda N., Suzuki S., Fukuoka H., Yamashita Y.N., 2006. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix and Sox9 at the onset of condylar cartilage formation in fetal mouse mandible. *J. Anat.* 208: 169 – 177

Shum L., Nuckolls G., 2002. The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton. *Arthritis Res.* 4: 94 – 106

Singh G.D., 1999. Morphologic determinants in the etiology of Class III malocclusion: a review. *Clin. Anat.* 12: 382 – 405

Singh G.D., McNamara J.A., Lozanoff S., 1997. Morphometry of the cranial base in subjects with class II malocclusion. *J. Dent. Res.* 76: 694 – 703

Smartt J.M.jr., Karmacharya J, Gannon F.H., Teixeira C., Mansfield K., Hunenko O., Shapiro I., Kirschner R.E., 2005. Intrauterine fetal constraint induces chondrocyte apoptosis and premature ossification of the cranial base. *Plast. Reconstr. Surg.* 116: 1363 – 1369

Smith T.D., Mooney M.P., Losken H.W., Siegel M.I., Burrows A., 1996. Postnatal growth of the cranial base in rabbits with congenital coronal suture synostosis. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 16: 107 – 117

Sperber, G.H., 1989: Craniofacial embryology. Dental Practitioner Handbook No. 15, 4<sup>th</sup> edition, Wright PSG, Bristol – London – Boston

Stevens S.S., Beaupre G.S., Carter D.R., 1999. Computer model of endochondral growth and ossification in long bones: biological and mechanobiological influences. J. Orthop. Res. 17: 646 – 653

Stickens, D., Behonick D.J., Ortega N., Heyer B., Hartenstein B., Yu Y. et al., 2004. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13 – deficient mice. Development 131: 5883 – 5895

Stokes I.A.F., Mente P.M., Iatridis J.C., Farnum C.E., Aronsson D.D., 2002. Growth plate chondrocyte enlargement modulated by mechanical loading. In: Tanguay A., Peuchot B. (Hrsg.), 2002. Research into spinal deformities. 3. Proceedings of 3<sup>rd</sup> biannual meeting of the international research society of spinal deformities: 378 - 81 Amsterdam, IOS press

Takahashi K., Yamazaki M., Saisu T., Nakajima A., Shimizu S., Mitsuhashi S., Moriya H., 2004. Gene expression for extracellular matrix proteins in shockwave induced osteogenesis in rats. Calcif. Tissue Int. 74: 187 – 193

Takigawa M., Okada M., Takano T., Ohmae H., Sakuda M., Suzuki F., 1984. Studies on chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septal cartilage, and sphenoid – occipital synchondrosis in culture. J. Dent. Res. 63: 19 – 22

Tang M., Mao J.J., 2006. Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate. Cell Tissue Res. 324: 467 – 474

Tchetina, E.V., Kabayashi, M., Yasuda, T., Meijers, T., Pidoux, I., Poole, A.R., 2007. Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II – Kollagen and is accompanied by the induction of MMP – 13 and Kollagenase activity: Implications for development and arthritis. Matrix Biol. 26: 247 – 258

Thilander B., Ingervall B., 1973. The human spheno – occipital synchondrosis. II. A histological and microradiographic study of its growth. *Acta Odontol. Scand.* 31: 323 – 334

Tillmann B., Töndury G., 1987. Bewegungsapparat. In: Rauber A., Kopsch F. (Hrsg.), 1987. *Lehrbuch und Atlas der Anatomie des Menschen*, Bd. 1, Thieme, Stuttgart

Torisu T., Yamada K., Fukui T., Yamaki M., Nakamura J., Saito I., 2009. A cross – sectional study on the relationship between craniofacial morphology and the coronoid process. *Eur. J. Orthod.* 31: 613 – 619

Tsipouras P., Ramirez F., 1987. Genetic disorders of Kollagen. *J. Med. Genet.* 24: 2 – 8

Tsipouras P., Schwartz R.C., Goldberg J.D., Berkowitz R.L., Ramirez F., 1987. Prenatal prediction of Osteogenesis imperfecta (OI type IV): exclusion of inheritance using a Kollagen gene probe. *J. Med. Genet.* 24: 406 – 409

Van der Erden B.C., Karperien M., Wit J.M., 2003. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev.* 24: 782 – 801

Van Limborgh J., 1972. The role of the genetic and environmental factors in the control of postnatal craniofacial morphogenesis. *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 10: 37 – 57

Van Limborgh J., 1970. A new view on the control of the morphogenesis of the skull. *Acta Morphol. Neerl. Scand.* 8: 143 - 160

Virchow R., 1857. Untersuchungen über die Entstehung des Schädelgrundes im gesunden und krankhaften Zustande und über den Einfluss derselben auf die Schädelform, Gesichtsbildung und Gehirnbau. Reimer, Berlin

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., Tabin, C.J., 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH – related protein. *Science* 273: 613 – 622

Walberg F., 1960. Prenatal development of the face, the nasal and oral cavities and the cranium. In: Lundström A., (Hrsg.), 1960. Introduction to orthodontics. McGraw – Hill, New York – Toronto – London

Wang X., Mao J.J., 2002. Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. J. Dent. Res. 81 : 701 – 705

Wang X., Mao J.J., 2002. Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli. J. Bone Miner. Res. 17: 1843 – 1850

Watson R.E., DeSesso J.M., Hurtt M.E., Cappon D.G., 2006. Postnatal growth and morphological development of the brain: a species comparison. Birth Defects Res. (Part B)77: 471 – 484

Watzek G., Matras H., Pernecky A., Tuchmann A., 1977. Auswirkungen von prämaternen Synostosen des Neurokraniums auf das Viszerokranium. Fortschr. Kieferorthop. 38: 205 – 212

Weathall R.J., 2009. In vitro regulation of proliferation and differentiation within a postnatal growth plate of the cranial base by parathyroid hormone – related peptide. J. Cell Physiol. 219: 688 – 697

Whittaker D.K., Molleson T., Daniel A.T., Williams J.T., Rose P., Resteghini P., 1985. Quantitative assessment of tooth wear, alveolar – crest high and continuing eruption in a romano – british population. Arch. Oral Biol. 30: 493 – 501

Whittaker D.K., 1986. Occlusal and approximal wear in roman – british skulls. In: Cruwys E., Foley R.A. (Hrsg.): Teeth and anthropology. BAR International Series 291, Oxford

Wu Q.Q., Chen Q., 2000. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation and hypertrophy: ion – channel dependent transduction of matrix deformation signals. Exp. Cell Res. 256: 383 – 391

Yang C., Li S.W., Helminen H.J., Khillian J.S., Bao Y., Prockop D.J., 1997. Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking Kollagen II. *Exp. Cell. Res.* 235: 370 - 373

Zelzer E., Olsen B.R., 2003. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423: 343 – 348

Zenmyo m., Komiya S., Kawabata R., Sasaguri Y., Inoue A., Morimatsu M., 1996. Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. *J. Pathol.* 180: 430 – 433



## 9. Abbildungs – und Tabellenverzeichnis

### 9.1 Abbildungen

- Abb. 1        Vorderansicht des Kopfes und des Halses eines sechs Wochen alten menschlichen Embryos (8mm SSL), rasterelektronische Aufnahme (aus: Hinrichsen, 1985)
- Abb. 2        12 Wochen alter Fetus, Alizarin – Färbung (aus: Diewert, 1985)
- Abb. 3        Anatomie des Nasenseptums und Lage der Lamina perpendicularis (aus: Gray, 1918)
- Abb. 4        Schädelbasis nach Entfernung des Gehirns bei einem *Macaca fuscata* – Affen (aus: Nakamura et al., 1999)
- Abb. 5        Sagittale Hemisektion der posterioren Schädelbasis bei einem *Macaca fuscata* – Affen (aus: Nakamura et al., 1999)
- Abb. 6        Lage der Synchronchondrosis sphenoccipitalis im MRT (aus: Sekula et al., 2005)
- Abb. 7        Lage der Synchronchondrosis sphenoccipitalis bei der Ratte (aus: Tang und Mao, 2006)
- Abb. 8        Bidirektionales Wachstum der Synchronchondrosis sphenoccipitalis zweier Ratten, HE – Färbung (aus: Tang und Mao, 2006)
- Abb. 9        Zonenaufteilung der enchondralen Ossifikation (aus: Naski und Ornitz, 1998)
- Abb. 10       Schematische Darstellung der Fibrillogenese der Kollagene (aus: Tsipouras und Ramirez, 1987)
- Abb. 11       Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Knochens: Typ I – Kollagen – Fibrillen, bedeckt mit Hydroxylapatit (aus: Hassenkamp et al., 2004)
- Abb. 12       Agarosegelelektrophorese einer RNA – Isolation einer Probe der Ratte
- Abb. 13       Analyse des letztendlich erhaltenden qPCR – Produkts durch eine Agarose – Gelelektrophorese (2 % w / v) mit 100 Basenpaar – Größenstandard
- Abb. 14       Boxplot – Illustration der Expression von für Typ II – Kollagen codierender mRNA in der Synchronchondrosis sphenoccipitalis der für die Studie herangezogenen Individuen

- Abb. 15      Boxplot – Illustration der Expression von für Typ X – Kollagen codierender mRNA in der Synchondrosis sphenoccipitalis der für die Studie herangezogenen Individuen

### 9.2 Tabellen

- Tab. 1      Mastermix 1 zur Elimination genomischer DNA
- Tab. 2      Mastermix 2 für reverse Transkription
- Tab. 3      Verwendete Primer mit Sequenz und Akzessionsnummer
- Tab. 4      Reagenzien einer qPCR
- Tab. 5      Inhaltsstoffe des 2\* QuantiTect SYBR Green RT – PCR Mastermix
- Tab. 6      Bestandteile und Herstellung des 10x TBE - Puffers

## 10. Anhang

### 10.1 Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Mikro Dismembrator S	B. Braun Biotech International, Melsungen
PCR – Cyler Biometra T – Gradient	Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
TS – 100 Thermo Shaker	G. Kisker GbR, Steinfurt
Analysenwaage BP 1200	Sartorius GmbH, Göttingen
Zentrifuge Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products, Osterode
Gelelektrophoresekammer Horizon 11 – 14	Life Technologies, Gaithersburg MD., U.S.A.
Spannungsgerät Gibco PS 305	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Carlsbad CA., U.S.A.
UV – Vis – Spektrometer Picodrop	Picodrop Ltd., Cambridge, U.K.
Nitas Gel Imaginer	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Germany
Vortex Genie 2	Scince Industries Inc., Bohemia NY., U.S.A.
Pipette Eppendorf research 0,1 – 2,5 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf research 0,5 - 10 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf research 2 – 20 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf research 10 – 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf research 20 – 200 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf research 100 – 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg

### 10.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

#### Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2 – Propanol	B. Braun AG, Melsungen
Stickstoff	Linde AG, Pullach

EDTA Titriplex	Merck KGaA, Darmstadt
Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Borsäure	Appli Chem GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boeringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Ingelheim
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Gene Ruler 100 BP DNA Ladder	Fermentas GmbH St. Leon – Rot
6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH St. Leon – Rot
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt

### Verwendete Kits und fertige Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden
AllPrep DNA / RNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Wizard SV Gel & PCR Clean Up System	Promega GmbH, Mannheim
QuantiTect SYBR Green RT – PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### Standardpuffer

Bezeichnung	Bestandteile
10x TBE Puffer, pH 8,3	121,14 g/L Tris Ultra Qualität, 51,33 g/L Borsäure 3,72 g/L EDTA – Tirtriplex Ad 1 L Aqua dest.

**Primer**

<b>Name</b>	<b>Basensequenz</b>	<b>T<sub>M</sub></b>	<b>Akzessionsnr.</b>	<b>Hersteller</b>
Col2a1-fwd	5'- GCT CAT CCA GGG CTC CAA TG – 3'	65°C	NM_012929	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Col2a1-rev	5'- CAA TGG GAA GGC GTG AGG TC – 3'	65°C		
Col10a1-fwd	5'- AGC TCA CGG AAA ATG ACC AG – 3'	65°C	XM_001053056	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Col10a1-rev	5'- GTT CTA AGC GGG GGA TTA GG – 3'	65°C		
β-actin-fwd	5'- CTC ATG CCA TCC TGC GTC TG – 3'	65°C	NM_031144.2	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
β-actin-rev	5'- GGC AGT GGC CAT CTC TTG CT – 3'	65°C		

### **11. Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Proff und Herrn Dr. Piero Römer für die freundliche Überlassung des Themas, den Zeitaufwand und die engagierte Betreuung der Arbeit. Außerdem bedanke ich mich bei Frau MTA Bernadette Fürnstein für die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit im Labor. Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und die große Unterstützung und Hilfe währenddessen bedanken.

### 12. Lebenslauf

#### **Persönliche Daten:**

Vor - / Nachname:	Michael Maurer
Geboren:	09.01.1984
Geburtsort:	Regensburg
Wohnort:	Winzerstr. 11, 92339 Beilngries
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Dr. jur. Joachim Maurer, Abteilungsdirektor beim Freistaat Bayern Josefine Maurer (geb. Stadler), Lehrerin

#### **Schul - / Ausbildung:**

Sept. 1990 – Aug. 1994:	Besuch der Grundschule Beilngries
Sept. 1994 – Juni 2003:	Besuch des Willibald – Gymnasiums Eichstätt
Juni 2003:	Abiturprüfung
Aug. 2003 – Mai 2004:	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Eichstätt
Okt. 2004 – Juni 2010:	Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
	Sept. 2005: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	April 2007: Zahnärztliche Vorprüfung
	Juni 2010: Zahnärztliche Prüfung
Seit Sept. 2010:	Tätigkeit in freier zahnärztlicher Praxis als Vorbereitungsassistent







