

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR KIEFERORTHOPÄDIE

DIREKTOR: PROF. DR. DR. PETER PROFF

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Wirkung maternaler Hyperhomocysteinämie auf die Entwicklung
und Ossifikation der Synchondrosis sphenoccipitalis.
Eine tierexperimentelle Studie.**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Achim Farrenkopf

2011

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR KIEFERORTHOPÄDIE

DIREKTOR: PROF. DR. DR. PETER PROFF

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Wirkung maternaler Hyperhomocysteinämie auf die Entwicklung
und Ossifikation der Synchondrosis sphenoccipitalis.
Eine tierexperimentelle Studie.**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Achim Farrenkopf

2011

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Peter Proff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Behr
Tag der mündlichen Prüfung:	14.12.2011

1. Einleitung und Fragestellung	7
2. Literaturübersicht	10
2.1. Pränatale Schädelentwicklung.....	10
2.2. Postnatale Schädelentwicklung	13
2.3. Knochenentstehung - Ossifikation	16
2.3.1. Desmale Ossifikation	17
2.3.2. Enchondrale Ossifikation.....	18
2.3.3 Regulation der enchondralen Ossifikation.....	21
2.4. Schädelbasis - Synchrondrosis sphenoccipitalis	25
3. Material und Methoden.....	28
3.1. Tierexperimentelle Methoden	28
3.1.1. Tierhaltung.....	28
3.1.2. Fütterungsbedingungen.....	29
3.1.3. Probenentnahme der Synchrondrosis sphenoccipitalis und der Leber.....	30
3.2. Molekularbiologische Untersuchung.....	30
3.2.1. RNA-Isolierung.....	30
3.2.2. Gewinnung von cDNA.....	31
3.2.3. Quantitative Real – Time – PCR (qPCR).....	32
3.2.4. DNA-Isolierung.....	34
3.2.5. Analyse des Methylierungsgrades der DNA.....	34
3.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	34
3.3. Histologische Untersuchung.....	35
3.3.1. Probenverarbeitung.....	35
3.3.2. Pentachrom-Färbung nach Movat	36
3.3.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	38

3.3.4. Analyse der Chondrone	40
3.3.5. Vermessung der Synchondrosen.....	40
4. Ergebnisse	42
4.1 Physiologische Werte	42
4.2. Histologische Untersuchung der Synchondrosis sphenoccipitalis	43
4.3. Genexpression von Kollagen Typ X	47
4.4. Genexpression von Runx2	49
4.5. Serumkonzentration von IGF-1	50
4.6. DNA-Methylierungsgrad	51
5. Diskussion	53
5.1. Die Bedeutung der Synchondrosis sphenoccipitalis als primäres Wachstumszentrum.....	53
5.2. Die Bedeutung von Homocystein und seine Rolle im Methylierungszyklus	54
5.3. Die Wirkung von Hyperhomocysteinämie auf die enchondrale Ossifikation ...	57
5.4. Die Rolle des Methylierungszyklus für die Epigenetik	60
5.5. Ausblick	63
6 Zusammenfassung	65
7 Literaturverzeichnis.....	67
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	74
9 Danksagung	76
10 Lebenslauf.....	77

1. Einleitung und Fragestellung

Eine wichtige Grundlage der kieferorthopädischen Diagnostik und Therapie ist das Verständnis der entwicklungsbiologischen Abläufe der Schädel- und Gesichtsentwicklung. Um auf skelettale Wachstumsprozesse von Schädel und Gesicht Einfluss nehmen zu können, müssen sich therapeutische Maßnahmen am Entwicklungsverlauf der verschiedenen Strukturen orientieren. Die postnatalen Wachstumsvorgänge erstrecken sich über einen Zeitraum von etwa 20 Jahren (1). Die zeitliche und topografische Abfolge der Entwicklungsvorgänge während der Kraniogenese ist mittlerweile weitgehend geklärt. Forschungen im Bereich der Biologie des Wachstums und der Schädelentwicklung haben neue Erkenntnisse im Hinblick auf molekularbiologische Zusammenhänge gebracht, die das Verständnis und damit die Qualität und Effizienz der kieferorthopädischen Behandlung verbessern (2). Es bestehen jedoch immer noch Unklarheiten im Bereich der Regulation der Wachstumsmechanismen (3). Das komplexe Wachstum des Schädels und seine Entwicklung beruhen auf desmalen und enchondralen Ossifikationsprozessen, die durch genetische Faktoren koordiniert und kontrolliert ablaufen (1). Besonders die Schädelbasis als tragende Struktur des Schädels ist als Bestandteil des genetisch stark beeinflussten und regulierten Chondrokraniums anfällig für Fehlbildungen (4). Für den Kieferorthopäden ist deswegen die Frage interessant, inwieweit Entwicklungsabläufe ausschließlich endogen genetisch determiniert sind, bzw. welche anderen Faktoren das Regelsystem der Osteogenese beeinflussen können (1). Deformierungen der Schädelbasis aufgrund von pathophysiologisch ablaufenden Wachstumsprozessen manifestieren sich, teilweise als eines der Leitsymptome, bei verschiedenen Syndromen, z.B. dem Down-Syndrom, dem Apert-Syndrom oder der Dysostosis cleidocranialis (Morbus Crouzon) (5). Eine Hypoplasie des Mittelgesichtes ist ein gemeinsames, häufiges Symptom dieser Fehlbildungen. Eine Wachstumshemmung im Bereich der

basikranialen Wachstumszentren imponiert klinisch als schüsselförmiges Gesicht. Die skelettalen Wachstumsstörungen sind jedoch trotz gleicher genetischer Vererbung bei verschiedenen Merkmalsträgern unterschiedlich stark ausgeprägt (6; 7). Deswegen ist es wichtig, das Wachstum und den Ablauf der Verknöcherung, sowie die daran beteiligten intrinsisch-genetischen und extrinsischen Faktoren zu untersuchen, um die kieferorthopädische Diagnostik und Therapie auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse zu verbessern.

Das Wachstum der Synchronchondrosis sphenoccipitalis ist hauptsächlich genetisch determiniert (8). In neueren Untersuchungen konnten allerdings auch extrinsische Faktoren wie der Einfluss mechanischer Stimulation gefunden werden, die einen Beitrag zur Entwicklung und zum Wachstum der Synchronchondrosis sphenoccipitalis leisten (9). In einer Untersuchung von Wang et al. (2002) konnte ein Zusammenhang zwischen mechanischer Stimulation der Wachstumsfuge und gleichzeitig erhöhter Zellproliferation in dieser Struktur festgestellt werden (10).

Inwieweit weitere exogene Faktoren wie Fehlernährung oder damit verbundene metabolische Störungen zu einer Veränderung im Wachstum oder bei der Entwicklung eines kraniofazialen Wachstumszentrums führen können, ist bisher kaum untersucht worden. Bisherige Arbeiten von Nakamoto et al. (1987) und Robert et al. (2005) konnten zeigen, dass die Dysfunktion des Methylierungszyklus, welche mit einer Anhäufung von Homocystein, einer nicht proteinogenen Aminosäure, assoziiert ist, zu skelettalen Dysplasien führt (11; 12).

In den bisherig erschienenen Publikationen wurden allerdings noch keine Untersuchungen vorgenommen, die sich mit den Auswirkungen maternaler Hyperhomocysteinämie auf kraniofaziale Wachstumszentren auseinandersetzen.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es deshalb, die Wirkung einer diätinduzierten maternalen Hypermethioninämie und der daraus resultierenden Hyperhomocysteinämie auf die Entwicklung und die chondrale Ossifikation der Synchondrosis sphenoccipitalis von neugeborenen Ratten zu untersuchen.

2. Literaturübersicht

2.1. Pränatale Schädelentwicklung

Die menschliche intrauterine Entwicklung lässt sich in 3 verschiedene Phasen einteilen, die Blastogenese (bis zum 16. Gestationstag), die Embyogenese (16.-60. Gestationstag) und die Fetogenese (61. Tag bis zur Geburt). Zwischen dem 21. und 25. Tag lässt sich bereits eine Vorstufe des späteren Schädels, das Prosencephalon, erkennen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung bilden sich durch ungleichmäßige Vermehrung des Mesenchyms die Gesichtswülste aus, welche durch Furchen voneinander getrennt sind. An der Gesichtsbildung sind zu dieser Zeit 5 Hauptwülste beteiligt, der mediale Stirnwulst und die jeweils bilateralen Ober- und Unterkieferwülste. Die paarig angelegten medialen und lateralen Nasenwülste entwickeln sich etwa eine Woche später. Die 5 Hauptwülste umschließen die primitive Mundbucht (Stomatodeum) und formen durch aufeinander zugerichtetes Wachstum die primäre Mundhöhle. Ab der 7. Woche differenziert sich das Bindegewebe der Schädelbasis zu Knorpel, um das Chondrokranium (Synonyme: Primordialkranium, Endokranium, Basalplatte) zu bilden. Nach ca. 8-9 Wochen ist die Schädelbasis verknorpelt und bildet die flache, schalenförmige Basalplatte. Die Knochen der Schädelkalotte bestehen zu dieser Zeit noch aus einer dichten Bindegewebsmembran, welche das sich entwickelnde Gehirn schützt. Die desmale Ossifikation der Schädelkapsel (Desmokranium, Exokranium) beginnt ab der 8. Woche und bildet das Exokranium. Die chondrale Ossifikation der Schädelbasis setzt ab der 10. Woche ein. Exo- und Endokranium bilden zusammen nach und nach das Synkranium (2). Bei der sukzessiven Verknöcherung der Basalplatte zerfällt das einheitliche Primordialkranium in einzelne Knochensegmente zwischen denen Knorpelfugen, ähnlich den Epiphysenfugen der langen Röhrenknochen, bis ins Pubertätsalter bestehen bleiben (13). Kommt es in diesem frühen Stadium zu Störungen

der enchondralen Ossifikation in der Schädelbasis, können sich schwere Fehlbildungen wie das Apert-Syndrom oder der Morbus Crouzon entwickeln. Als Reste des Chondrokraniums bleiben primäre Knorpelfugen (Synchondrosen) im medianen Bereich der Schädelbasis erhalten, welche für ein schnelles Wachstum in diesen Regionen verantwortlich sind. Durch den synchondralen Wachstumsdruck findet eine Verschiebung der Schädelbasis in Richtung ventral-kaudal statt. Ab der 10. Woche kommt es zu einer Vergrößerung des Viszerokraniums gegenüber dem Neurokranium, um Platz für die entstehenden Zahnkeime zu bilden (2)

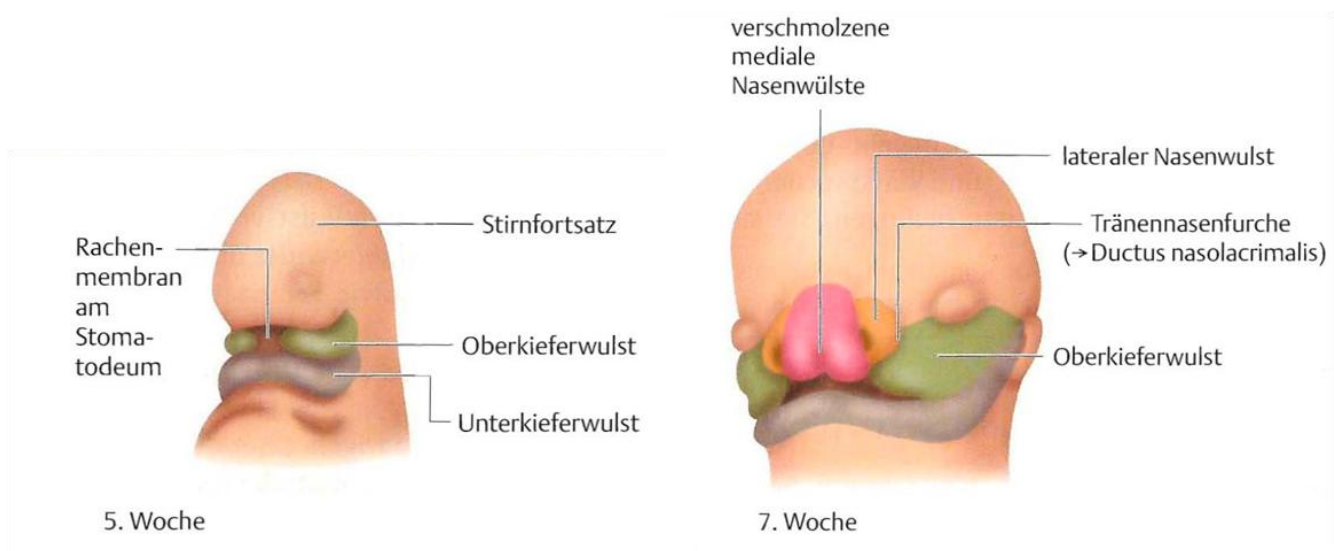


Abb. 1: Gesichtsentwicklung (verändert nach „Anatomie - Duale Reihe“) (94)

Der Oberkiefer entsteht durch Annäherung und Vereinigung der medialen Nasenwülste mit den Oberkieferwülsten. Hierzu bewegen sich die Oberkieferwülste unterhalb der Nasenwülste zur Mitte hin aufeinander zu, bis die Epithelien aneinander liegen. Die Epithelmauer schmilzt durch apoptotische Vorgänge ein und wird durch Bindegewebe ersetzt, so dass sich das Mesenchym der kontralateralen Seiten vereinigt. Es entsteht der primäre Gaumen. Durch die Entwicklung des Nasenseptums nach kaudal und der Gaumenfortsätze nach medial, entsteht der sekundäre Gaumen (14).

Der Unterkiefer entsteht analog zum Oberkiefer aus den sich vereinigenden paarigen Unterkieferwülsten. Der Nervus mandibularis wächst in die noch getrennten Unterkieferwülste ein. Zwischen dem 41. - 45. Tag bildet sich innerhalb des mesenchymalen Bindegewebes der Meckel-Knorpel aus, der Anteilen der Kinnregion des Unterkiefers als knorpelige Vorlage zur chondralen Ossifikation dient. Erste Verknöcherungszonen treten sowohl im Unterkiefer als auch in anderen Arealen des Schädels in der Nachbarschaft von Nerven auf, ihre neurotrope Sekretion dient als Stimulus für die Knochenbildung. Mit 5 Monaten ist der Meckel-Knorpel größtenteils verknöchert und bildet eine trogartige Vertiefung, in der sich die Zahnkeime entwickeln. Trotz der chondralen Ossifikation des Meckel-Knorpels entstehen große Teile des Unterkiefers durch desmale Ossifikation, in den im späteren Verlauf der Entwicklung Sekundärknorpel integriert wird. Zwischen der 10.-11. Woche bilden sich Fortsätze aus Sekundärknorpel, die den Processus coronoideus, den Processus condylaris und die Protuberantia mentalis formen. Der Knorpel wird in den desmalen Knochen des Unterkiefers integriert und mineralisiert, wobei die kranialen Anteile des Processus condylaris dauerhaft erhalten bleiben und dem Längenwachstum sowie der Gelenkfunktion dienen (2).

Das Kiefergelenk beginnt seine Entwicklung ab der 5. Woche zusammen mit dem Musculus pterygoideus lateralis. In der 7. Woche bilden sich die Gelenkgrube (Fossa mandibularis) des Schläfenbeins (Os temporale) und die Gelenkscheibe (Discus articularis), in der 9.-11. Woche die Gelenkkapsel (Capsula articularis) und der Gelenkfortsatz (Processus condylaris). Ab der 12. Woche sind oberer und unterer Gelenkspalt differenziert und getrennt durch den Discus articularis. Der Knorpel am oberen Gelenkpol des Processus condylaris kann in vier Zellschichten unterteilt werden. Vom Knochen zur Oberfläche finden wir zunächst die hypertrophe Chondrozyten-Schicht, anschließend die chondrogene Schicht, die proliferative Schicht und letztlich die

dem Discus articularis zugewandte, artikuläre Schicht. Im Wachstum stimuliert die zellhaltige Bindegewebszone die Chondroblastendifferenzierung und eine appositionelle Zellanreicherung in der angrenzenden Prächondroblastenzone (14).

2.2. Postnatale Schädelentwicklung

Die postnatalen Formveränderungen des Schädels sind durch suturales, chondrales und periostales Wachstum gekennzeichnet. Das suturale Wachstum läuft durch Apposition von Osteoid in den Schädelnähten an den Rändern der Schädelknochen ab. Die Suturen des Schädels sind für das sog. suturale (kompensatorische, sekundäre) Wachstum verantwortlich. Das chondrale Wachstum geht als interstitielles Wachstum von den basikranialen Synchondrosen aus, die als primäre Wachstumszentren bezeichnet werden. Suturen und Synchondrosen ergänzen sich in ihrem Wachstumsprozess (15). Als letzte dieser Strukturen verknöchert die Synchondrosis sphenoccipitalis. Das periostale Wachstum, ebenfalls durch Knochenapposition gekennzeichnet, geht vom Periost aus (16). Bei Neugeborenen besteht die Schädeldecke aus einzelnen Knochenanteilen, die durch bindegewebige Nahtstellen (Suturen) und Fontanellen voneinander getrennt sind. Fontanellen sind bindegewebig überbrückte, breite Knochenspalten zwischen verknöcherten Knochenplatten, die sich zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig einander angenähert haben. Suturen bilden sich zwischen zwei aneinander grenzenden Schädelknochen aus. Im Verlauf der nachgeburtlichen Kopfentwicklung nimmt das Volumen des Schädel-Gesichtsbereiches um etwa das Dreifache zu. Für diesen Größenzuwachs ist vor allem die Knochenapposition an den Grenzflächen der Suturen verantwortlich, weniger stark auch die Apposition auf den Außenflächen und die Resorption an den Innenflächen der Schädelknochen. Der Druck des wachsenden Gehirns (Zerebralisation) bewirkt eine

fortschreitende Expansion der angrenzenden Strukturen. Normalerweise beginnt der Verschluss der Fontanellen etwa im 6. Lebensmonat und ist mit dem 2. Lebensjahr beendet. Die Fontanelle entwickelt sich über das Stadium der Syndesmose (Knochenspalte mit noch bandartiger Bindegewebstrennung der Knochen) zu einer Synostose (endgültige Verknöcherung) der Schädelknochen. Die Suturen verknöchern deutlich später, wenn das Wachstum der Schädelkalotte beendet ist. Durch vorzeitige Verknöcherung (Prämatüre Synostose) der Fontanellen oder der Suturen kommt es je nach Lokalisation zu verschiedensten Schädeldeformitäten (Schädeldysostosen). Eine Mikrozephalie tritt auf, wenn alle Suturen und Fontanellen frühzeitig verknöchern. Eine verzögerte Synostose der Suturen und Fontanellen begünstigt eine Vergrößerung des Schädelvolumens (Hydrozephalus/Wasserkopf).

Der Gesichtsschädel (Viszerokranium) des Neugeborenen ist im Vergleich zum Hirnschädel (Neurokranium) relativ kleiner. Dieses Verhältnis bleibt zunächst bestehen, da parallel zum Größenwachstum des Gesichtsschädels das Gehirnwachstum zu einer weiteren Ausdehnung des Neurokraniums führt. Erst mit dem Durchbruch der Milchzähne und der damit verbundenen Entwicklung der Alveolarfortsätze kommt es zu einer deutlichen Größenzunahme des Viszerokraniums. Die fortschreitende Entfaltung der Nasennebenhöhlen im Zuge der Pneumatisation unterstützt diese Entwicklung. Um das 5.-6. Lebensjahr herum verschieben sich die Proportionen durch den Durchbruch der bleibenden Sechsjahresmolaren und der damit verbundenen Bisshebung nochmal deutlich zugunsten des Gesichtsschädels. Ab dem 8. Lebensjahr wächst das Neurokranium nur noch sehr langsam, wohingegen sich der Gesichtsschädel stark nach kaudal und ventral entwickelt. Für diese Gesichtsumproportionierung ist sowohl die Translation von Ober- und Unterkiefer als auch das Wachstum der Alveolarfortsätze verantwortlich (2)(Abb. 2a-d).

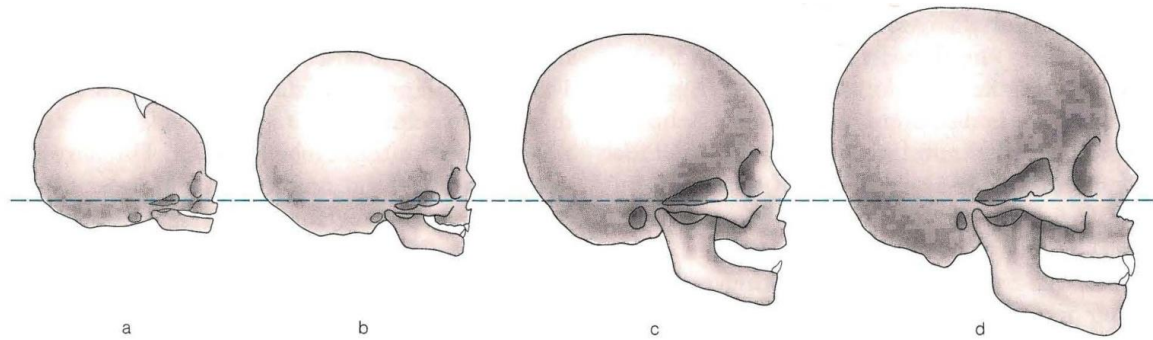


Abb. 2 a-d: Der Schädel im Verlauf der Entwicklung in gleichem Maßstab zum Zeitpunkt der Geburt(a), im Alter von einem Jahr(b), sechs Jahren(c) und zwanzig Jahren (d). Die Umproportionierung des Verhältnisses von Hirnschädel zu Gesichtsschädel wird deutlich. (verändert nach „Kieferorthopädie I“ – PDZ 11) (17)

Die Ausformung des Unterkieferkörpers und des Alveolar-und Muskelfortsatzes entsteht hauptsächlich durch periostales Wachstum (15). Das extreme Längenwachstum des Gelenkfortsatzes entsteht durch enchondrale Ossifikation des Sekundärknorpels des Condyluspols, ähnlich dem Längenwachstum der Röhrenknochen in der Epiphysenfuge. Der Oberkiefer wächst durch Knochenapposition im Bereich der Alveolarfortsätze und des Gaumendachs in kaudaler Richtung, Resorptionen finden ausschließlich kontralateral am Nasenboden statt. Die verschiedenen Suturen des Oberkiefers ermöglichen durch intersegmentale Knochenablagerung eine Ausdehnung in transversaler und sagittaler Richtung, stellen jedoch nach dem 4. Lebensjahr keine aktiven Wachstumszentren mehr dar, so dass eine weitere Größenzunahme durch periostales Wachstum erfolgt (14). Die inaktiven Suturen können jedoch etwa bis zum 13-14. Lebensjahr durch externe Kräfte zu erneutem Wachstum angeregt werden, diesen Mechanismus nutzt die Kieferorthopädie z.B. im Rahmen einer transversalen Gaumennahterweiterung.

Für die Entwicklung des Mittelgesichts spielen die Synchronosen der Schädelbasis eine entscheidende Rolle. Postnatal sind die Synchronosen sphenofrontalis, sphenothmoidalis und sphenoccipitalis für das sagittale und vertikale Wachstum von

Bedeutung. Nach dem 7. Lebensjahr führen die Synchondroses sphenofrontalis und sphenothmoidalis zu keiner weiteren aktiven, sagittalen und vertikalen Dimensionsveränderung mehr (14). Sie sind weiterhin zugadaptiv und regulieren so das Wachstum der vorderen Schädelgrube. Die Synchondrosis sphenoccipitalis bleibt aktiv und ist fortan die stärkste Treibkraft der Mittelgesichtsentwicklung, während die Suturen lediglich sekundär kompensatorisch wirken (16). Die knorpelige Verbindung von Os sphenoidale und Os occipitale verknöchert erst zwischen dem 16.- 20. Lebensjahr und ist so aufgrund ihrer zentralen Lage für die postnatale Ventralverlagerung von Oberkiefer, Unterkiefer und des gesamten Viszerokraniums mitverantwortlich (18).

2.3. Knochenentstehung - Ossifikation

Grundsätzlich unterscheiden wir zwei verschiedene Mechanismen der Osteogenese, die desmale Ossifikation und die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation entstehen direkt aus mesenchymalen Vorläuferzellen Osteoblasten, die den Geflechtknochen bilden der sich später zu Lamellenknochen entwickelt. Diese Art von Ossifikation findet sich nur bei der Clavicula sowie bei den flachen Schädelknochen (Deckknochen), die das Desmokranium bilden. Bei der enchondralen Ossifikation differenzieren sich mesenchymale Vorläuferzellen zu Chondroblasten, die eine Knochenvorlage aus Knorpelmatrix bilden, welche dann sekundär von Osteoblasten durchwandert und ossifiziert wird. Durch diese indirekte Osteogenese entsteht das Chondrokranium, dessen Entwicklung und Wachstum sehr stark genetisch determiniert ist (1).

2.3.1. Desmale Ossifikation

Die desmale Ossifikation findet ausschließlich während der fetalen Phase der Osteogenese statt und beginnt ab der 8. Schwangerschaftswoche im Bereich des Stirnbeins. Durch diese direkte Ossifikation werden ausschließlich einige Schädelknochen des Gesichtsschädels (Os frontale, Os parietale, Mandibula) und die Clavicula gebildet. Hierbei entsteht zunächst einfacher Faserknochen, der später in lamellären Knochen umgebaut wird.

Aus dem embryonalen Mesenchym differenzieren sich Osteoblasten, die eine kollagenreiche Interzellulärsubstanz, das Osteoid, absondern. Diese unverkalkte Knochengrundsubstanz füllt bald den gesamten Interzellularraum zwischen den Osteoblasten aus, die sich daraufhin zu Osteozyten differenzieren. Durch Einlagerung von Calcium und Phosphat verkalkt das Osteoid und es bildet sich Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, welches später Hauptbestandteil des anorganischen Knochens ist (19; 20). Ausgehend von primären Ossifikationszentren schreitet die Apatitablagerung zunächst relativ ungeordnet fort und ist erst abgeschlossen, wenn die Anordnung der Kristalle der Verlaufsrichtung der Kollagenfasern entspricht. Durch zentrale Resorptionsvorgänge bilden sich eine äußere, kompakte Kortikalis und eine innere, aufgelockerte, durch Trabekel gekennzeichnete Spongiosa aus. Um die den Knochen versorgenden Gefäße ordnen sich Osteoblasten an, die konzentrische Schichten von Osteoid sezernieren. Auf diese Weise entstehen Osteone, die zusammen das Havers-Kanal-System bilden, welches der Ernährung des Knochens dient. Nach der Mineralisierung der Knochenmatrix ist interstitielles Wachstum nicht mehr möglich. Das den Knochen begrenzende Bindegewebe wandelt sich in die Knochenhaut (Periost) um, welche osteogene Funktion sowie Ernährungsfunktion besitzt und fortan für ein appositionelles Wachstum sorgt (19).

2.3.2. Enchondrale Ossifikation

Die meisten Knochen des Körpers werden durch enchondrale Ossifikation gebildet. Der erste Schritt ist hierbei die Bildung einer knorpeligen Vorlage des späteren Knochens (Primordialskelett), die im Anschluss während der pränatalen und postnatalen Entwicklung durch definitiven Knochen ersetzt wird.

Die Bildung des hyalinen Knorpels beginnt mit der Verdichtung mesenchymaler Zellen, die sich zu Chondroblasten differenzieren und typische Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix sezernieren (Kollagen Typ II, Aggrekan, Proteoglykane, Glykoproteine, Hyaluronsäure). Das Primordialskelett bietet eine mechanische Stabilität und ermöglicht die Anheftung verschiedener Zellen. Nach fortgeschrittener Matrixsynthese beenden die Chondrozyten ihren Zellzyklus, verringern ihre Kollagen Typ II -Produktion und synthetisieren nun vermehrt Kollagen Typ X. Nach dem Aufbau der Matrix beginnen die Chondrozyten zu hypertrophieren und werden schließlich apoptotisch. Die durch Makrophagen abgebauten Chondrozyten hinterlassen Lakunen in dem Primordialskelett, in die Blutgefäße und embryonale Stammzellen einwandern. Mesenchymale Zellen differenzieren sich zu Osteoblasten und beginnen mit der Sekretion von Knochenmatrixproteinen (Kollagen Typ I, Glykoproteine, Proteoglykane). Diese noch nicht verkalkte Matrix wird als Osteoid bezeichnet und wird sekundär durch die Einlagerung von Kalziumphosphat zu Knochen umgebaut. Die Kalzifizierung des Knorpels beginnt ausgehend von mehreren Ossifikationszentren, hinterlässt jedoch unkalzifizierte Areale im Bereich von Epiphysenfugen und Synchronosen, in denen auch nach abgeschlossener Ossifikation aktives enchondrales Wachstum stattfindet (21). Die bei der enchondralen Ossifikation ablaufenden Vorgänge werden häufig anhand der menschlichen Epiphysenfuge beschrieben. Dieses Wachstumsschema trifft ebenso auf die Synchronosen des Schädels zu. In den bipolar aufeinander zuwachsenden Synchronosen finden wir ebenfalls eine zentrale Zone hyalinen

Knorpels, die durch kleine ruhende Chondrozyten gekennzeichnet ist, in Richtung Knochen schließen sich beidseits je eine Proliferationszone sowie eine Zone blasig hypertrophierter Knorpelzellen an (22).

Enchondrale Wachstumszentren, wie sie sich in Synchondrosen finden lassen, zeigen einen typischen morphologischen Aufbau, der die verschiedenen Zellen und deren Funktionszustände widerspiegelt (Abb.3).

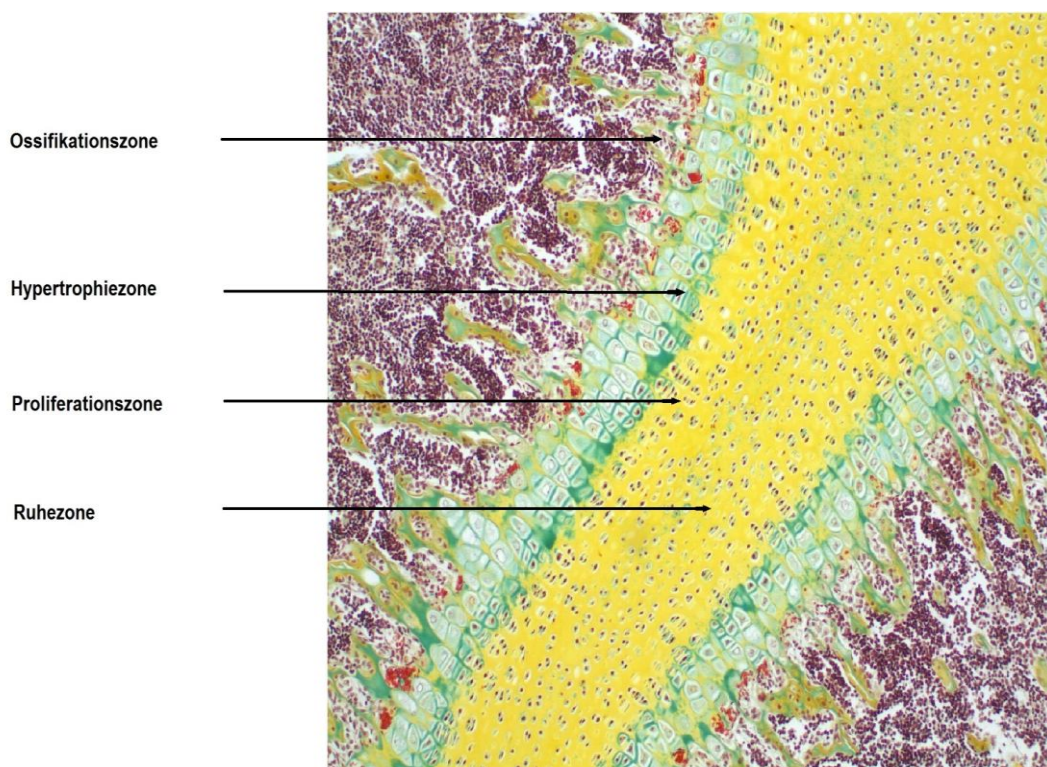


Abb. 3: Ansicht der Zonenaufteilung in der Synchondrosis sphenoccipitalis einer Ratte (Pentachrom-Färbung bei 40x Vergrößerung))

Am weitesten distal der Ossifikationsfront liegt die Zone der ruhenden Chondrozyten oder die Reservezone. Hier erfolgt noch kein Wachstum, die Ruhezone dient lediglich als Reservoir für die nach proximal folgenden Zonen der Proliferation und Differenzierung. Am Übergang zwischen Ruhezone und Proliferationszone beginnen die Chondrozyten mit der Zellteilung und ordnen sich in Reihen säulenförmig an (23). Sie sezernieren in

diesem prähypertrophen Stadium vermehrt Kollagen Typ II als Bestandteil der extrazellulären Matrix (24).

Der Proliferationszone folgt die Zone der hypertrophen Chondrozyten, in der die Fähigkeit zu Zellteilung herabgesetzt ist. Die Zellen nehmen hier stark an Volumen zu, weshalb diese Zone auch als Blasenknorpel bezeichnet wird. In der durch ausdifferenzierte Chondrozyten gekennzeichneten hypertrophen Chondrozytenzone steigen die Expression und Sekretion von Kollagen Typ X, alkalischer Phosphatase, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und MMP13 (Matrix-Metallo-Proteinase-13) stark an. Vor allem die Sekretion von MMP13 trägt durch den teilweisen Abbau von Kollagen und Aggrekan entscheidend dazu bei, dass Osteoblasten, Osteoklasten und Blutgefäße in den Knorpel einwandern. Die Invasion von Gefäßen wird durch den angiogenen Faktor VEGF begünstigt (25; 26). Die Chondrozyten werden je nach Stadium der Hypertrophie in prähypertroph, hypertroph und terminal hypertroph eingeteilt. Typisch für prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten ist die vermehrte Kollagen Typ X -Expression. Nach Durchlaufen des Stadiums der terminalen Hypertrophie werden die Chondrozyten apoptotisch.

Die Ossifikations-oder Erosionszone ist der dem Knochen unmittelbar anliegende, durch Lakunen gekennzeichnete Bereich, in dem schließlich die enchondrale Ossifikation abläuft. Hier werden Knorpelzellen durch Chondroklasten abgebaut (27). Blutgefäße und mesenchymale Stammzellen wandern in die entstandenen Hohlräume ein. Osteoblasten differenzieren sich aus mesenchymalen Progenitorzellen und beginnen mit der Sekretion der Knochenmatrixproteine entlang der verbliebenen Knorpelsepten (24). Durch die stetige Ablagerung von Hydroxylapatit entsteht eine Diffusionsbarriere, so dass die Ernährung der Knorpelzellen nicht weiter gewährleistet ist. Die interstitiell liegenden hyalinen Knorpelzellen degenerieren und werden von Osteoblasten durch Knochen ersetzt (23).

2.3.3. Regulation der enchondralen Ossifikation

Entwicklungsbiologische und molekularbiologische Forschungen zeigten, dass die Entwicklung des knöchernen Skeletts von zahlreichen Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung des Skelettsystems gehört Runx2 aus der Familie der Runt-Gene. Untersuchungen belegen, dass dieser Faktor eine entscheidende Rolle für die Entwicklung, das Wachstum und die Reifung von Knochen und Knorpel spielt (Abb. 4). Darüber hinaus ist er ebenfalls für die Zahnentwicklung von Bedeutung (28; 29; 30; 31).

Runx2 besitzt eine essentielle Funktion während der Knochenentstehung, da ohne seine Expression aufgrund einer Blockade der Osteoblastenreifung kein Knochengewebe ausgebildet werden kann (31; 32).

Der Transkriptionsfaktor Runx2 wurde zuerst bei der Embryogenese der Taufliege *Drosophila* entdeckt. Bei Mensch und Maus sind 3 verwandte Runx-Gene bekannt (Runx-1, Runx-2, Runx-3). Die Runx-Transkriptionsfaktoren gehören zu der Familie der heterodimeren Proteine und setzen sich aus einer DNA-bindenden α -Untereinheit (Runx) und einer nicht-DNA-bindenden β -Untereinheit (CBF β) zusammen. Runx2 ist beim Menschen auf Chromosom 6p21 lokalisiert, bei Mäusen auf dem Chromosom 17 (28). Jedes dieser Runx-Gene besitzt eine hochkonservierte, DNA-bindende Runt-Domäne (Runt-related-domain), die Voraussetzung für die Transkriptionsaktivität ist. Neben der Bezeichnung Runx2 werden synonym auch die Begriffe CBFA1 / PEBP2 α A / AML2 verwendet (33). Die 128 Aminosäuren lange Runt-Domäne dient neben der DNA-Bindung auch als Bindestelle für das Protein CBF β (Core Binding Factor β). CBF β heterodimerisiert mit dem Runx2-Transkriptionsfaktor und steigert dadurch die DNA-Bindungsaffinität und die Transkriptionsaktivität. Runx-Proteine regulieren über die Bindung an Promotorregionen von Zielgenen deren Expression. Zur Regulation von

Genen durch Runx2 benötigen diese in ihrer Promotorregion Bindungsstellen, an die der Transkriptionsfaktor mit seiner Runt-Domäne binden kann. Alle Runx-Proteine binden an die gleiche DNA-Sequenz (TGYGGT) und regulieren somit die Expression der Zielgene (34).

Gene, deren Expression durch Runx2 aktiviert werden, sind z.B. osteoblastenspezifische Gene wie die von Kollagen Typ I, Kollagen Typ X, Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin, Osteocalcin oder auch Ameloblastin, das in Ameloblasten während der Zahnschmelzentwicklung eine Rolle spielt (35). Die Aktivierung findet durch Bindung von Runx2 an die Promotorregion osteogener Gene statt, wodurch die Transkription dieser Zielgene initiiert wird (36). Das Runx2-Gen besitzt selbst 2 verschiedene Promotoren, einen distalen (P1) und einen proximalen (P2). Am proximalen Promotor wird die Transkription von Runx2, Isoform 1 gestartet, am distalen Promotor wird die Transkription von Runx2, Isoform 2 initiiert (37). Diese beim Menschen vorkommenden Isoformen werden bestimmten entwicklungsbiologischen Prozessen zugeordnet. Isoform 1 soll eher für die frühe Osteoblastendifferenzierung und die direkte, desmale Osteogenese von Bedeutung sein, wohingegen Isoform 2 eine hohe Relevanz bei der enchondralen Ossifikation und terminalen Differenzierung hypertropher Chondrozyten und Osteoblasten haben soll (30; 37; 38).

Runx2 induziert in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor das Protein Indian hedgehog (Ihh) über eine direkte Bindung an dessen Promotorregion und ist so entscheidend für die Reifung, Proliferation und terminale Differenzierung hypertropher Chondrozyten zuständig. Ihh wird üblicherweise in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert und verlangsamt den Übergang von proliferierenden zu sich differenzierenden Chondrozyten durch die Stimulation der PTHrP-Produktion (Parathyroid Hormone-related Protein) aus Perichondriumzellen. PTHrP inhibiert die Hypertrophie von Chondrozyten. Erst durch die zunehmende Distanz der Chondrozyten vom

Perichondrium und der damit verbundenen abnehmenden Konzentration von PTHrP schwindet der inhibitorische Effekt, und die Chondrozyten beginnen mit der Phase der Hypertrophie (39). Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Knorpelzellen sowie der Synthese der Knorpelmatrixproteine spielt auch der Transkriptionsfaktor SOX9 (Sry-related high mobility group box 9). Er hat eine repressive Wirkung auf Runx2, wird von mesenchymalen Vorläuferzellen und proliferierenden Chondrozyten synthetisiert und verhindert so die Größenzunahme der Chondrozyten. Erst in hypertrophen Chondrozyten ist die SOX9-Expression abgeschaltet, so dass Runx2 durch Wegfall der Repression in der Endphase der Knorpelzellentwicklung die Differenzierung der Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten stimulieren kann (40; 41).

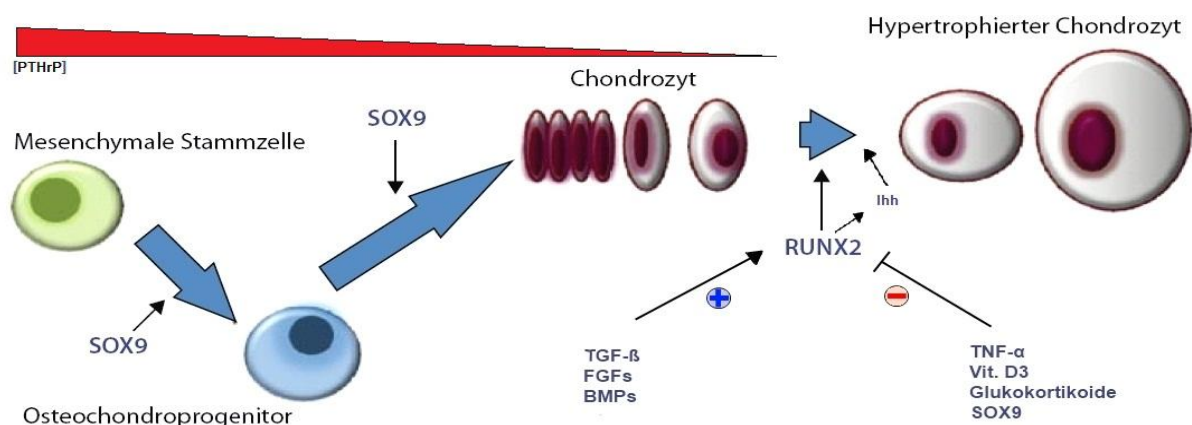


Abb.4: Kontrolle der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung durch die Transkriptionsfaktoren SOX9 und Runx2 (verändert nach A. Hofmann et al.) (42)

Runx2 unterliegt aktivierenden Einflüssen, vor allem durch Wachstumsfaktoren wie den Transforming Growth Factors (TGF-βs), Fibroblast Growth Factors (FGFs) und den Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). BMPs leiten den osteogenen Differenzierungsweg in Mesenchymzellen ein und induzieren die Synthese von osteoblastenspezifischen Proteinen (alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Transkriptionsfaktor Runx2) (29; 43).

Es existieren jedoch auch negative Regulatoren wie Vitamin D3, Glukokortikoide und TNF-α (Tumor-Nekrose-Faktor-α) (35; 36; 44). Im P2-Promotor von Runx2 befindet sich

ein responsives Element für Vitamin D3, dessen Mutation zu einer Repression des Gens führt (45). Glukokortikoide blockieren die Runx2-Expression in Knochenzellen und verhindern so die Osteoblastendifferenzierung (46).

Um die Funktion von Runx2 in der Entwicklung des Skeletts besser zu analysieren, wurden genetisch veränderte Knockout-Mäuse untersucht. Versuchstiere mit einer Haploinsuffizienz des Runx2-Gens (heterozygot, Runx2-defizient) zeigen eine phänotypische Symptomausprägung, wie sie beim Menschen von der cleidokranialen Dysplasie bekannt ist, der eine generalisierte Skelettdysplasie zu Grunde liegt (28; 47). Bei homozygoten Runx2-defizienten Versuchstieren, denen der Transkriptionsfaktor Runx2 vollständig fehlt, fällt auf, dass keine der knorpeligen Knochenanlagen ossifiziert ist (31). Die Expression typischer knochenspezifischer Marker wie alkalischer Phosphatase und Kollagen Typ I ist reduziert, die Expression wichtiger Knochenmatrixproteine wie Osteocalcin und Osteopontin bleibt aus. Die Tiere sind kleinwüchsig und haben ein geringeres Geburtsgewicht, zudem sterben sie aufgrund der fehlenden knöchernen Stabilisierung des Thorax postnatal an Ateminsuffizienz (48). Die Knorpelentwicklung und die Osteogenese sind durch die fehlende Differenzierung der Osteoblasten gestört, auch die Zahnanlagen sind im Knospenstadium arretiert (49). Durch diese Tiermodelle wurde deutlich, dass Runx2 eine Schlüsselrolle in der Skelettentwicklung übernimmt und die Prozesse der Differenzierung und Reifung mesenchymaler Progenitorzellen zu Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten reguliert (36).

2.4. Schädelbasis - Synchrondrosis sphenoccipitalis

Die Entwicklung der Schädelbasis ist als Teil des Chondrokraniums überwiegend genetisch determiniert (8). Die Verbindung zwischen Hirnschädel und Gesichtsschädel besteht aus Anteilen des Stirnbeins (Os frontale), des Siebbeins (Os ethmoidale), des Keilbeins (Os sphenoidale), des Schläfenbeins (Os temporale) und Anteilen des Hinterhauptbeins (Os occipitale).

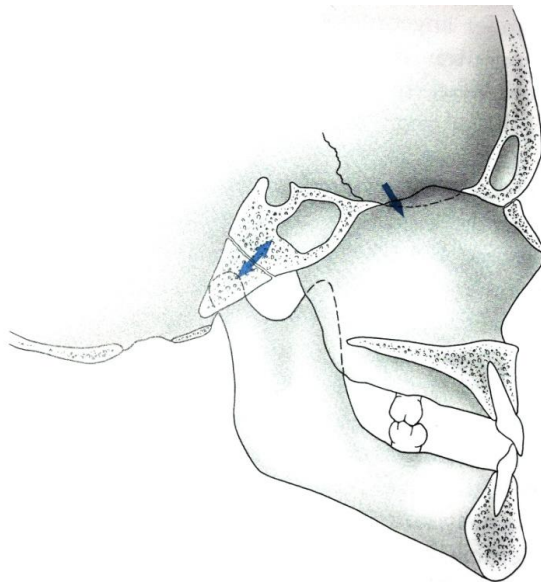


Abb. 5: Schädelbasis – „Stemmkörperwirkung“ der Synchrondrosis sphenoccipitalis (verändert nach „Kieferorthopädie I“ – PDZ 11) (17)

Die Zerebralisation ist zunächst die treibende Kraft für das Wachstum der Schädelbasis. Ausgehend von zahlreichen Ossifikationszentren wird diese durch enchondrale Ossifikation gebildet (22). Zwischen den entstandenen ossifizierten Knochenplatten der Schädelbasis bleiben die Synchrondrosen erhalten. Synchrondrosen sind residuale, interossale Fugen und stammen noch aus der Primärknorpelanlage der fetalen

Basalplatte. Knochenfugen, die über Synchondrosen kommunizieren, werden als primäre Wachstumszentren definiert und besitzen die Fähigkeit zu eigenständiger Wachstumsleistung. Das synchondrale Wachstum zwischen zwei Knochen findet durch enchondrale Ossifikation statt und ähnelt den Vorgängen in den Epiphysenfugen der Extremitäten. In Rattensynchondrosen wurde histologisch eine strukturelle Zonierung nachgewiesen, die deutliche Parallelen zum Aufbau der Epiphysenfugen aufweist (22). Die basokraniellen Synchondrosen sind jedoch durch ein senkrecht zu ihrem Verlauf gerichtetes, bipolares Wachstum gekennzeichnet, das von den mit Hyalin-Knorpel überzogenen Rändern der Schädelbasissegmente ausgeht (50; 51). Durch dieses aufeinander zugerichtete Wachstum entsteht eine sogenannte "Stemmkörperwirkung" (Enlow 1975), welche die vordere Schädelgrube (Fossa cranii anterior) als Teil des Neurokraniums, aber auch Oberkiefer und die am Os temporale befindliche Unterkiefergelenkgrube (Fossa articularis mandibulae) als Teil des Viszerokraniums nach anterior verlagert (sekundäres anteriores Displacement) (16).

Unter den vorhandenen Synchondrosen der Schädelbasis, wie der Synchondrosis sphenopetrosa, S. petrooccipitalis, S. intraoccipitalis anterior und S. intraoccipitalis posterior, ist die Synchondrosis sphenoccipitalis zwischen Keilbein und Hinterhauptbein aufgrund ihrer zentralen Lage und der späten Synostose von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der Schädelform, insbesondere des Mittelgesichts. Verknöchern nahezu alle Synchondrosen kurz nach der Geburt oder spätestens mit dem 5.-6. Lebensjahr (Synchondrosis intraoccipitalis anterior und posterior), bleibt die Synchondrosis sphenoccipitalis bis zum 16.-20. Lebensjahr aktiv (52). So folgt die Entwicklung des Gesichtsschädels nach dem 7. Lebensjahr vor allem dem enchondralen Wachstum der knorpeligen Strukturen des Condylus mandibulae und der Synchondrosis sphenoccipitalis. Zu diesem Zeitpunkt bereits inaktive Synchondrosen passen sich Formveränderungen der umliegenden Knochenstrukturen zugadaptiv an (53). Kommt es

zu einer verfrühten Wachstumshemmung der Synchrondrosis sphenoccipitalis, resultiert daraus eine Mittelgesichtshypoplasie (schüsselförmiges Gesicht), wie sie bei vielen Kraniodysostosen beobachtet werden kann. Die experimentelle Entfernung der sphenoccipitalen Synchrondrose aus Rattenschädeln führte zu einem Stillstand des Längenwachstums der Schädelbasis (50). Die Synchrondrosis sphenoccipitalis ist in erster Linie verantwortlich für das Wachstum der Schädelbasis und des Mittelgesichts, letztlich beeinflusst sie auch die Entwicklung aller anderen Gesichts-Skelett-Strukturen, wie Ober-und Unterkiefer (54; 15).

3. Material und Methoden

3.1. Tierexperimentelle Methoden

3.1.1. Tierhaltung

Für die Untersuchungen verwendeten wir ausschließlich erstgebärende weibliche Tiere des Zuchtstammes *LWE1.W* verwendet. Die Böcke dieses Stammes kamen zur Begattung der weiblichen Tiere zum Einsatz. Die Tiere werden gezüchtet, indem immer wieder Geschwistertiere gepaart werden. Diese Inzuchtstämme haben den Vorteil, dass die Ratten ähnliche Stoffwechselfparameter haben. Die Versuchstiere wurden bei Standardbedingungen in Dreiergruppen in K3-Käfigen gehalten bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50-52 % und einem Lichtregime von 12 Stunden täglich von 6 bis 18 Uhr. Zweimal pro Woche wurde die Einstreu gewechselt. Die Deckung der weiblichen Tiere erfolgte über Nacht im Verhältnis von 1:2 (Bock : Weibchen). Nach erfolgreicher Paarung wurden die Böcke aus den Käfigen entfernt. Ein spermienpositiver Vaginalabstrich am nächsten Morgen wurde als erfolgreiche Empfängnis gewertet.

3.1.2. Fütterungsbedingungen

Für die Tiere der Kontroll-Gruppe wurde das Experimentalfuttermittel „SSNIFF V1236-000“ der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland verwendet.

Futterzusammensetzung in Gewichtsprozent:

Tabelle 1: Futterzusammensetzung

Rohstoff:	Anteil:
Rohprotein	21,2%
Rohfett	3,8%
Rohfaser	4,2%
Rohasche	6,7%
Stärke	36,1%
Zucker	5,1%
Vitamin A	25000 IE
Vitamin D3	1000 IE
Vitamin E	135 mg/kg
Vitamin K	20 mg/kg
Methioninanteil	0,46%

Für die Tiere der Test-Gruppe kam eine Spezialanfertigung des gleichen Futtermittels zum Einsatz, bei dem allerdings der Methionin-Anteil um das Zehnfache auf 4,6% erhöht wurde. Die Futteraufnahme und Tränkung erfolgte ad libitum.

3.1.3. Probenentnahme der Synchronodrosis sphenoccipitalis und der Leber

Die Probenentnahme erfolgte am 10. und am 20. postnatalen Tag. Unter Äther-Euthanasie wurden die Tiere zwischen 10-12 Uhr dekapitiert. Alle Präparate wurden vor der Entnahme mit Kochsalzlösung gespült, um eventuell anhaftende Fremdkörper zu entfernen. Nach der möglichst vollständigen Enthäutung der Köpfe wurden Weichgewebe und äußere Muskulatur entfernt. Die Synchronodrosis sphenoccipitalis wurde durch einen Längsschnitt in die Sutura sagittalis unter Entfernung von Groß- und Kleinhirn gewonnen. Die Leber wurde nach Freipräparation über einen Zugang zur Bauchhöhle gespült und anschließend entnommen. Alle Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme bei -196 °C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

3.2. Molekularbiologische Untersuchung

3.2.1. RNA-Isolierung

Die bei -70°C lagernden Proben wurden vor der Zermörserung im Mikro – Dismembrator S® (B. Braun Biotech International, Melsungen) in flüssigem Stickstoff gekühlt, bevor sie in gefrorenem Zustand homogenisiert wurden. Das entstandene Lysat wurde mit 1 ml Tri-Reagent der Firma Sigma-Aldrich und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet, um die Gesamt-RNA aus dem Gewebe zu extrahieren. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in 30 µl des beiliegendem nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Quantifizierung der aufgereinigten RNA wurde photometrisch mit Hilfe eines Picodrop UV / Vis – Photospektrometers bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen.

3.2.2. Gewinnung von cDNA

Tabelle 2a: Mastermix 1 zur Elimination genomischer DNA

Reagenz	Volumen
gDNA Wipeout Buffer 7x	2 μ L
Template RNA	1 μ g
RNase – Free Water	ad 12 μ L
Gesamtvolumen	14 μL

Tabelle 2b: Mastermix 2 für Reverse Transkription

Reagenz	Volumen
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 μ L
Quantiscript RT Buffer 5x	4 μ L
RT Primer Mix	1 μ L
Gesamtvolumen	6 μL

Für die Durchführung einer quantitativen PCR(Polymerase Chain Reaction) wurde die isolierte Gesamt-RNA mit dem QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen GmbH, Hilden) zu cDNA nach Herstellerangaben revers transkribiert. Die Tabellen 2a und 2b zeigen die erforderlichen Parameter.

3.2.3. Quantitative Real – Time – PCR (qPCR)

Verwendete Primer:

Die Primer (Tabelle. 3) wurde mit Hilfe einer speziellen Online-Software (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) ausgesucht. Die Auswahl der Primer mit dem Programm garantiert, dass spezifische Amplikons mit einer hohen PCR-Effizienz amplifiziert werden.

Tabelle 3: Verwendete Primer mit Sequenz und Akzessionsnummer

Name	Basensequenz	T _M	Akzessionsnr.
Runx2-fwd	5'- TTCAGACCCCAGGCAGTTCC – 3'	65°C	XM_001060656.1
Runx2-rev	5'- GAAGGGTCCGCTCTGGCTTT – 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	
18sRNA -fwd	5'- CGGACGGCTTTGGTGA CTCT – 3'	65°C	NM_031144.2
18sRNA -rev	5'- GCTGCCTTCCTTGGATGTGG – 3'	65°C	

qPCR-Bedingungen:

Die Amplifikationsreaktion wurde mit dem „DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR“ Reaktionskit (Finnzymes/NEB) durchgeführt (Tabelle. 4). Dieses Kit enthält eine „ready to use“-PCR-Stammlösung, die bereits alle erforderlichen Reaktionskomponenten enthält (Puffer, DNA-Polymerase, Didesoxynukleotidtriphosphate, SybrGreen I-Fluoreszenzfarbstoff). Die Detektion der

in der PCR entstehenden DNA-Amplifikate wird durch die unspezifische Bindung von SybrGreen I an doppelsträngiger DNA gewährleistet. Der entstandene DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$ und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 591 \text{ nm}$. Der *cycle threshold* (ein bestimmter PCR-Cyclus, bei dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert erreicht) einer Probe wird durch das quantitative PCR-System „ABI 7000 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) gemessen. Die gemessenen *cycle thresholds* von Runx2 und Typ X Kollagen wurden gegen den *cycle threshold* eines Referenzmarkers (18S rRNA) normalisiert. Die Genexpression der Zielgene wurde somit relativ zum konstitutiv exprimierten Haushaltsgen gemessen. Jede zu untersuchende Probe soll als Triplikat gemessen werden. Zusätzlich wurde eine Wasserkontrolle (no template control) eingesetzt, um eine mögliche Verunreinigung der Reaktionskomponenten mit cDNA nachzuweisen.

Tabelle 4: PCR-Reaktionsbedingungen

PCR-Reaktionsbedingungen		
1x	95°C für 10 min	DNA-Denaturierung
40x	95°C für 30 sec	DNA-Denaturierung
	65°C für 30 sec	Annealing/Elongation/Detektion

3.2.4. DNA-Isolierung

Die bei -70°C lagernden Leber-Proben wurden vor der Zermörserung im Mikro-Dismembrator S® (B. Braun Biotech International, Melsungen) in flüssigem Stickstoff gekühlt, bevor sie in gefrorenem Zustand homogenisiert wurden. Das Lysat wurde anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die weitere Extraktion der genomischen DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification Kit (Fa. Promega).

Die isolierte genomische DNA wurde in nukleasefreiem Wasser in einem Volumen von 50 µl gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie bei 260 nm bestimmt.

3.2.5. Analyse des Methylierungsgrades der DNA

Der Methylierungszustand der DNA wurde mit Hilfe des Imprint® Methylated DNA Quantification Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), einem ELISA-Test, mit dem der Anteil der methylierten DNA quantifiziert werden kann, ermittelt.

3.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Integrität der Gesamt-RNA und zur Analyse von PCR-Amplikons wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 2%ige Gele verwendet. Für die Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels wurde 1,2 g nukleasefreie Agarose in 60 ml 1x TBE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle bis zur Homogenisierung der Suspension vorsichtig erhitzt. Danach wurden 4 µl einer 5%igen

Ethidiumbromidlösung der verflüssigten Agaroselösung zugesetzt und in einen Gel-Schlitten gegossen. Die Probestaschen wurden mit Hilfe eines speziellen Gel-Kamms ausgeformt. Nach dem Erstarren der Gel-Matrix wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer platziert und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Die aufzutragenden Nukleinsäure-Proben wurden mit 1/10 Volumen eines DNA-Ladepuffers versetzt und nach Entfernung des Gel-Kamms in die Probestaschen hineinpipettiert. Mit einer angelegten Spannung von 120 V betrug die Elektrophoresedauer ca. 45 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet.

3.3. Histologische Untersuchung

3.3.1 Probenverarbeitung

Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme in Formaldehyd (4%) fixiert und aufbewahrt. Zu Beginn der Arbeitsprozedur wurden die Proben in EDTA (10%) für 5-6 Std. entkalkt und anschließend erneut in Formaldehyd (4%) für mindestens 24 Std. fixiert. Die Entwässerung des Materials wurde durch ein automatisches Einbettungsgerät (Hypercenter XP®, Fa. Shandon) mit Hilfe einer aufsteigend konzentrierten Ethanolreihe und Xylol durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 2 µm dicke Schnitte der Synchondrosen angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Im Anschluss wurden die Schnitte in einem Brutschrank für 12 Std bei 37°C getrocknet. Vor der jeweiligen Färbung wurden die Gewebsschnitte in Xylene entparaffiniert und über eine absteigend konzentrierte Ethanolreihe rehydratisiert.

3.3.2 Pentachrom-Färbung nach Movat

Die Pentachrom-Färbung nach Movat ermöglicht eine kontrastreiche Darstellung und damit eine gute Unterscheidung der verschiedenen Hart- und Weichgewebekomponenten. Mineralisiertes Knochengewebe erscheint orange-gelblich, mineralisierter Knorpel wirkt blau-grün, und nicht mineralisierter Knorpel wird leuchtend gelb dargestellt (55). Das Bindegewebe färbt sich in unterschiedlichen Grün- und Blautönen, die Zellkerne stellen sich dunkel gefärbt dar (Abb.6).

Die Pentachrom-Färbung wurde nach dem in Tabelle 5 dargestellten Arbeitsprotokoll durchgeführt.

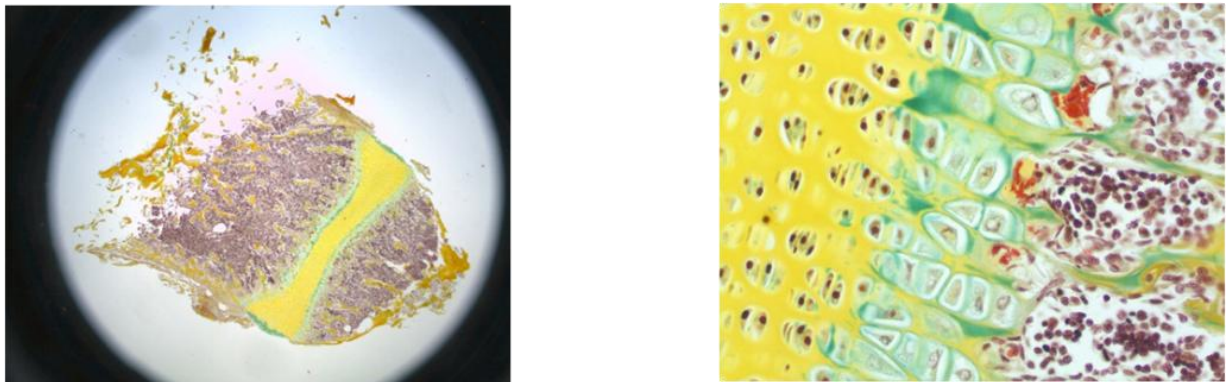


Abb. 6: Pentachrom-Färbung nach Movat – Knorpel (links 2x, rechts 40x Vergrößerung)

Tabelle 5: Arbeitsprotokoll - Pentachrom-Färbung

Schritt	Reagenz	Einwirkzeit
1.	Entparaffinieren in Xylene	3x5 Min.
2.	Ethanol 100 %	2x2 Min.
3.	Ethanol 96 %	2 Min.
4.	Ethanol 80 %	2 Min.
5.	Ethanol 70 %	2 Min.
6.	Ethanol 50 %	2 Min.
7.	Spülen mit Aqua dest.	3-5 x eintauchen
8.	Alcianblaulösung	10-15 Min.
9.	Abspülen unter Leitungswasser	6 Min.
10.	Alkalischer Alkohol	60-120 Min.
11.	Abspülen unter Leitungswasser	10 Min.
12.	Spülen mit Aqua dest.	1 x eintauchen
13.	Hämatoxylinlösung	10-15 Min.
14.	Spülen mit Aqua dest.	3 x eintauchen
15.	Abspülen unter Leitungswasser	15 Min.
16.	Spülen mit Aqua dest.	3 x eintauchen
17.	Brillant Crocein-Säurefuchsinlösung	8 Min.
18.	0,5 % Essigsäure	3 x eintauchen
19.	5 % Phosphorwolframsäure	15-20 Min.
20.	0,5 % Essigsäure	1 Min.
21.	Ethanol 100 %	3x5 Min.
22.	Safraninlösung	40 Min.
23.	Ethanol 100 %	3x5 Min.
24.	Entfetten in Xylene	3 Min.
25.	Eindeckeln mit Einbettmedium (Entellan® OMIKRON GmbH, Neckarwestheim)	

3.3.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine wichtige Standardfärbung von Gewebsschnitten in der Histologie und kann generell bei jedem Präparat angewendet werden. Mit Hilfe des basischen, positiv geladenen Hämatoxylins und des negativ geladenen, sauren Eosins, können Zellkerne vom Cytoplasma unterschieden werden. Zellkerne und Knorpelgrundsubstanz werden im Schnittbild blau dargestellt, Cytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten erscheinen rötlich (Abb. 7) (55).

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach dem in Tabelle 6 dargestellten Arbeitsprotokoll durchgeführt.

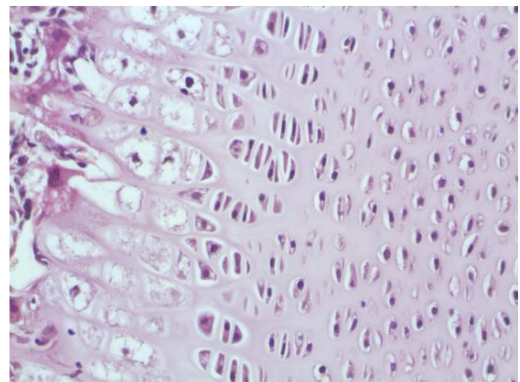
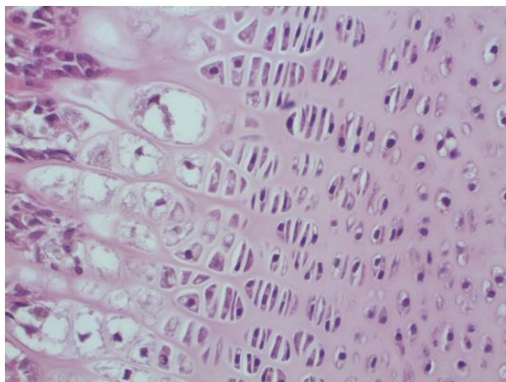


Abb. 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) – Knorpel (bei 40x Vergrößerung)

Tabelle 6: Arbeitsprotokoll - Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Schritt	Reagenz	Einwirkzeit
1.	Entparaffinieren in Xylene	3x5 Min.
2.	Ethanol 100 %	2x2 Min.
3.	Ethanol 100 %	2 Min.
4.	Ethanol 96%	2 Min.
5.	Ethanol 96 %	2 Min.
6.	Ethanol 70 %	2 Min.
7.	Spülen mit Aqua dest.	3-5 x eintauchen
8.	Überschichten mit Hämatoxylin	5-10 Min.
9.	Abspülen unter Leitungswasser	10-15 Min.
10.	Überschichten mit wässrigem Eosin (0,1%)	4 Min.
11.	Abspülen unter Leitungswasser	10 Min.
12.	Spülen mit Aqua dest.	1 x eintauchen
13.	Ethanol 96 %	1 Min.
14.	Ethanol 96 %	1 Min.
15.	Ethanol 100 %	2-5 Min.
16.	Ethanol 100 %	2-5 Min.
17.	Entfetten in Xylene	2-5 Min.
18.	Eindeckeln mit Einbettmedium (Entellan® OMIKRON GmbH, Neckarwestheim)	

3.3.4. Analyse der Chondrone

Um die Zellproliferation innerhalb der Synchrondrosen zu analysieren, wurden von uns HE-Schnittbilder von jeweils 5 Tieren aus Kontroll- und Test-Gruppe ausgewertet. Hierzu wurden pro Tier entlang der Synchrondrosis sphenoccipitalis acht Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurden sowohl die abgebildeten Chondrone ausgezählt, als auch die Menge der darin enthaltenen Chondrozyten. Da alle Chondrozyten innerhalb eines Chondrons aus ein und derselben Tochterzelle hervorgehen (21), ist es anhand dieser Daten möglich, Aussagen über die Zellproliferation zu treffen (56). Je mehr Zellen vorhanden sind, desto höher ist die Wachstumsrate (9).

3.3.5. Vermessung der Synchrondrosen

Um eine Wachstumsstörung innerhalb der zu untersuchenden synchondralen Strukturen festzustellen, wurden die in den histologischen Pentachrom-Schnitten dargestellten Knorpelanteile vermessen. Hierzu wurde die frei zugängliche Software UTHSCSA ImageTool Version 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) genutzt (Abb.8) (57). Das Programm ermöglicht es, komplexe Flächen mit einer Mehrpunktlinienführung genau zu erfassen. Anhand der Pixeldichte der gleich aufgelösten und vergrößerten Bilder können wir nun mit einem Umrechnungsfaktor die Quadratmillimeter der markierten Fläche errechnen. Aufgrund von eventuellen Messungenauigkeiten wurde jede Flächenmessung mehrfach wiederholt und anschließend der Mittelwert gebildet. Von Interesse war es, den Unterschied im Fortschritt der Verknöcherung der Synchrondrosen und den damit verbundenen Rückgang der Knorpelflächenanteile zwischen Tag 10 und Tag 20 postnatal beider Versuchsgruppen zu erfassen.

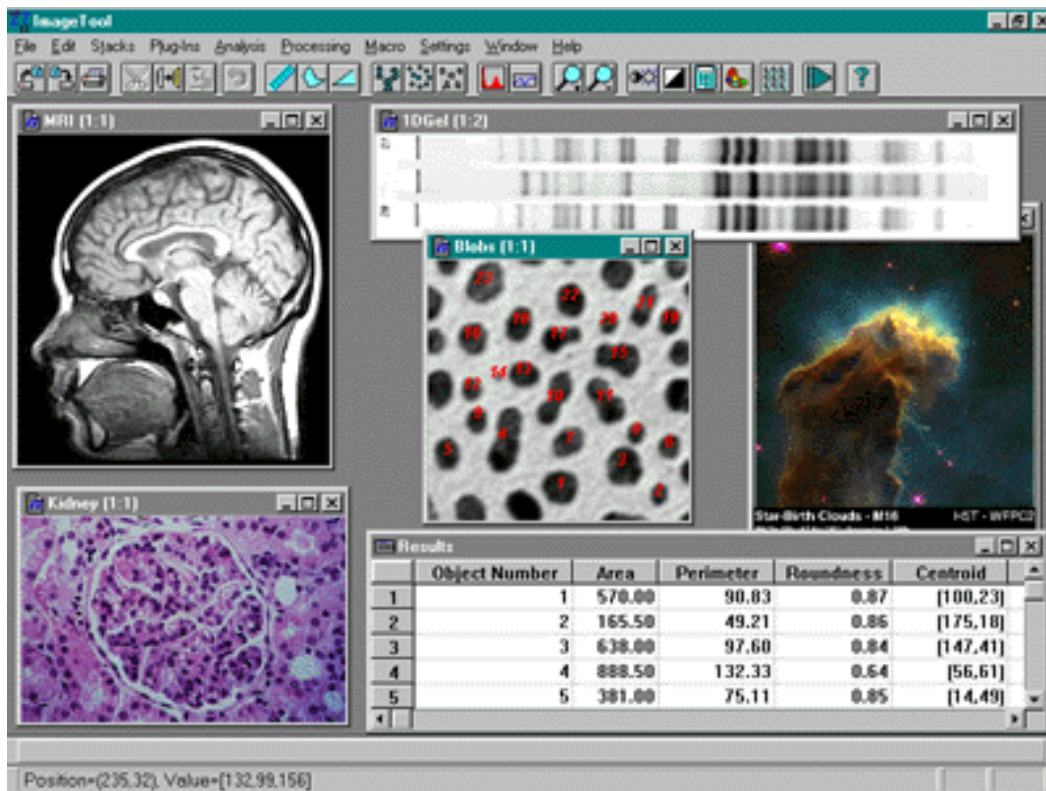


Abb. 8: Die freie Software ImageTool Version. 3.0 wurde von uns zur Flächenvermessung der Knorpelanteile der Synchondrosis sphenooccipitalis verwendet (57).

4. Ergebnisse

4.1. Physiologische Werte

Um das Vorliegen einer Wachstumsstörung zu prüfen, wurde das jeweilige Körpergewicht der Tiere aus der Kontroll- und Test-Gruppe an den Tagen 10 und 20 postnatal gemessen. Zu denselben Zeitpunkten wurden Blutproben entnommen, um die Konzentration der Blutglukose zu bestimmen. Die ermittelten Messwerte von Gewicht und Blutzuckerspiegel der Kontroll-Gruppe und der Test-Gruppe sind in Abb.9 dargestellt.

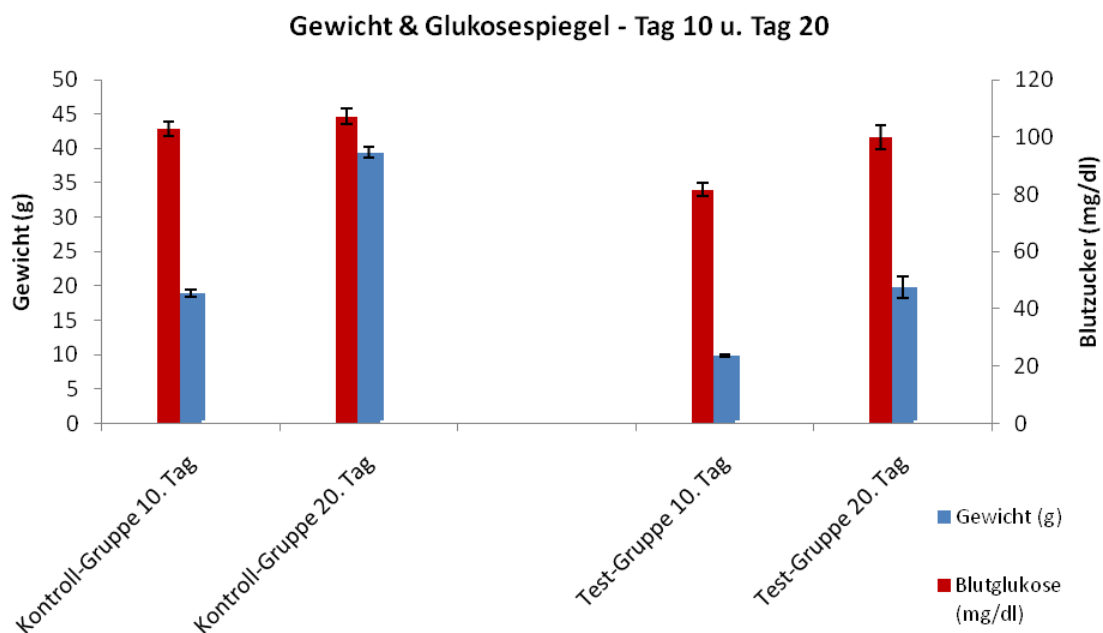


Abb. 9: Gewicht und Blutglukose von Kontroll- und Test-Gruppe gemessen am Tag 10 und Tag 20 postnatal

Die Kontrolltiere wogen am Tag 10 $18,9 \pm 1,1$ g und entwickelten bis Tag 20 ein Körpergewicht von $39,4 \pm 1,6$ g. Die Tiere der Test-Gruppe wurden an Tag 10 mit $9,84 \pm 0,4$ g gemessen und wogen nach 20 Tagen $19,8 \pm 3,2$ g. Der Blutglukosespiegel unterschied sich ebenfalls zwischen den Kontrolltieren und den Tieren der Test-Gruppe. Die Kontroll-Gruppe wies mit $103 \pm 5,5$ mg/dl am Tag 10 und $107,2 \pm 5,8$ mg/dl an Tag

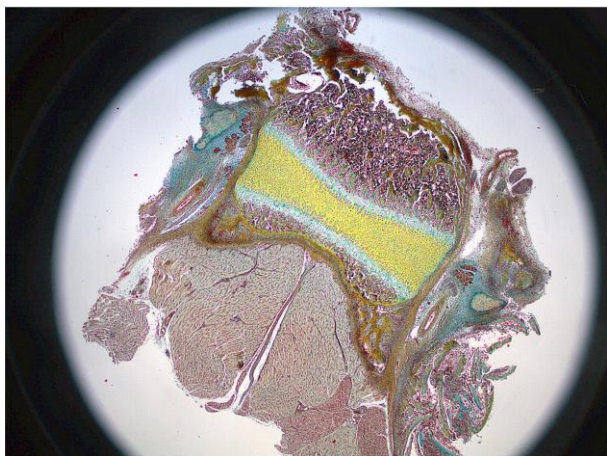
20 höhere Glukosewerte auf als die Tiere der Test-Gruppe, die mit $81,6 \pm 4,5$ mg/dl an Tag 10 und $99,8 \pm 8,4$ mg/dl an Tag 20 niedrigere Werte zeigten.

4.2. Histologische Untersuchung der Synchronosis sphenoccipitalis

Zur Untersuchung der Synchronosis sphenoccipitalis im Hinblick auf eine Wachstumsstörung wurden histologische Schnittpräparate angefertigt, die den Zustand der Synchronrose am Tag 10 und Tag 20 postnatal darstellen. Diese Präparate zeigen an den jeweiligen Messtagen typische histomorphologische Charakteristika (Abb. 10 und 11).

Kontrollgruppe

Tag 10 postnatal



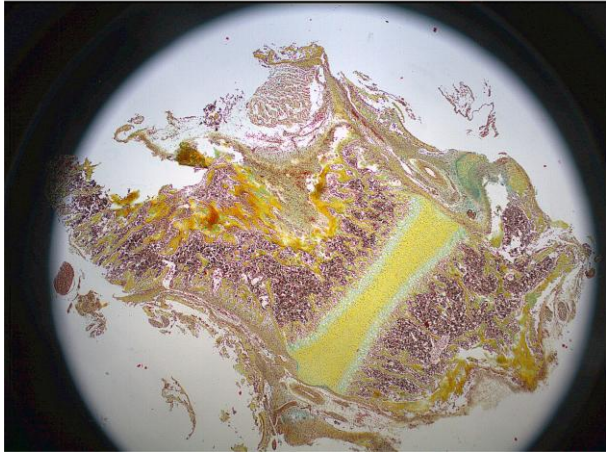
Tag 20 postnatal



Abb. 10: Schnittfläche der Synchronosis sphenoccipitalis bei den Kontrolltieren am Tag 10 und Tag 20 postnatal bei 2X Vergrößerung. Die gelb markierte Zone besteht aus hyalinem Knorpel. Die türkisfarbene Zone, die den hyalinen Knorpel rostral und kaudal umgibt, besteht aus mineralisiertem Knorpel.

Testgruppe

Tag 10 postnatal



Tag 20 postnatal

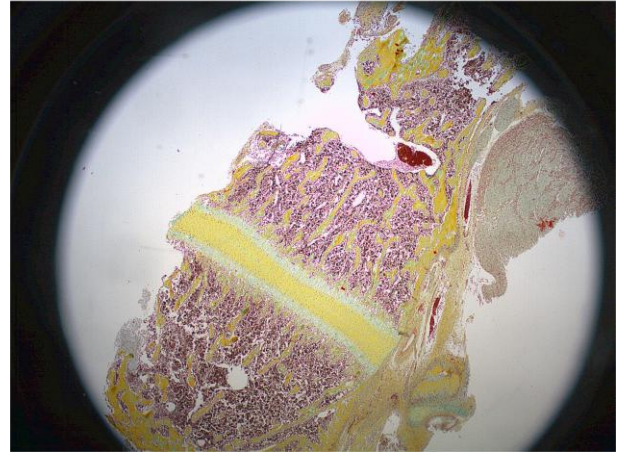


Abb.11: Schnittfläche der Synchondrosis sphenooccipitalis bei den Testtieren am Tag 10 und Tag 20 postnatal bei 2X Vergrößerung. Die gelb markierte Zone besteht aus hyalinem Knorpel. Die türkisfarbene Zone, die den hyalinen Knorpel rostral und kaudal umgibt, besteht aus mineralisiertem Knorpel.

Auf den Schnittbildern vom Tag 10 sind sowohl bei der Test-Gruppe als auch bei der Kontroll-Gruppe bikonkav ausgeformte Synchondrosen zu sehen, deren Enden beidseits verbreitert sind. Die Knorpel/Knochen-Grenzen wölben sich zentral aufeinander zu.

Am Tag 20 zeigen sich bei den Präparaten beider Gruppen eher parallel zueinander verlaufende Knorpel/Knochen-Grenzen. Die größte Dimensionsveränderung findet an den Enden der Synchondrose statt, an denen zwischen Tag 10 und Tag 20 am meisten Knochenzuwachs zu beobachten ist.

Von Interesse war es, die fortschreitende enchondrale Verknöcherung der Synchondrose durch eine histologische Färbung nachzuweisen und den Umbau des Knorpels in Knochen sowohl für die Kontroll-Gruppe als auch für die Test-Gruppe zu quantifizieren und zu vergleichen (Abb. 12).

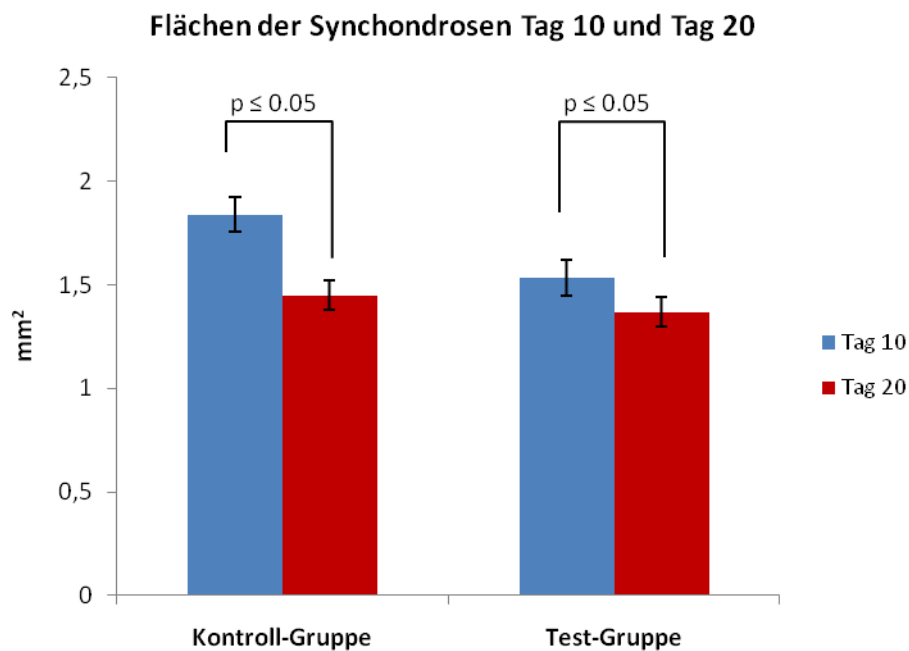


Abb. 12: Flächenbestimmung der Synchondrosen von Kontroll- und Test-Gruppe am 10. und 20. postnatalen Tag

Wir konnten feststellen, dass die Synchondrosen der Kontroll-Gruppe ausgehend von $1,84 \pm 0,11 \text{ mm}^2$ Knorpelfläche am Tag 10, nach 20 Tagen noch einen Restknorpelanteil von $1,45 \pm 0,09 \text{ mm}^2$ aufweisen. Damit waren 21,2 % der ursprünglichen Knorpelfläche verknöchert. Die Test-Gruppe zeigt am Tag 10 eine Knorpelfläche von $1,53 \pm 0,06 \text{ mm}^2$. Am Tag 20 ist noch eine Knorpelfläche von $1,37 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ übrig, d.h. dass zwischenzeitlich 10,7% der Synchondrose ossifiziert wurden. Die ermittelten Werte weisen auf ein signifikant schnelleres Fortschreiten der Ossifikation innerhalb der synchondralen Strukturen in der Kontroll-Gruppe hin und zeigen einen wesentlich langsameren Verknöcherungsfortschritt innerhalb der Test-Gruppe.

Um die Zellproliferation innerhalb der Synchondrosen zwischen der Kontroll-Gruppe und der Test-Gruppe vergleichen zu können, zählten wir die Anzahl der Chondrone entlang der im histologischen Schnittbild dargestellten Synchondrosis sphenoccipitalis und

registrierten die Anzahl der darin enthaltenen Chondrozyten. Es wurden Schnitte von jeweils 5 Tieren aus der Kontroll- und Test-Gruppe am 10. postnatalen Tag untersucht.

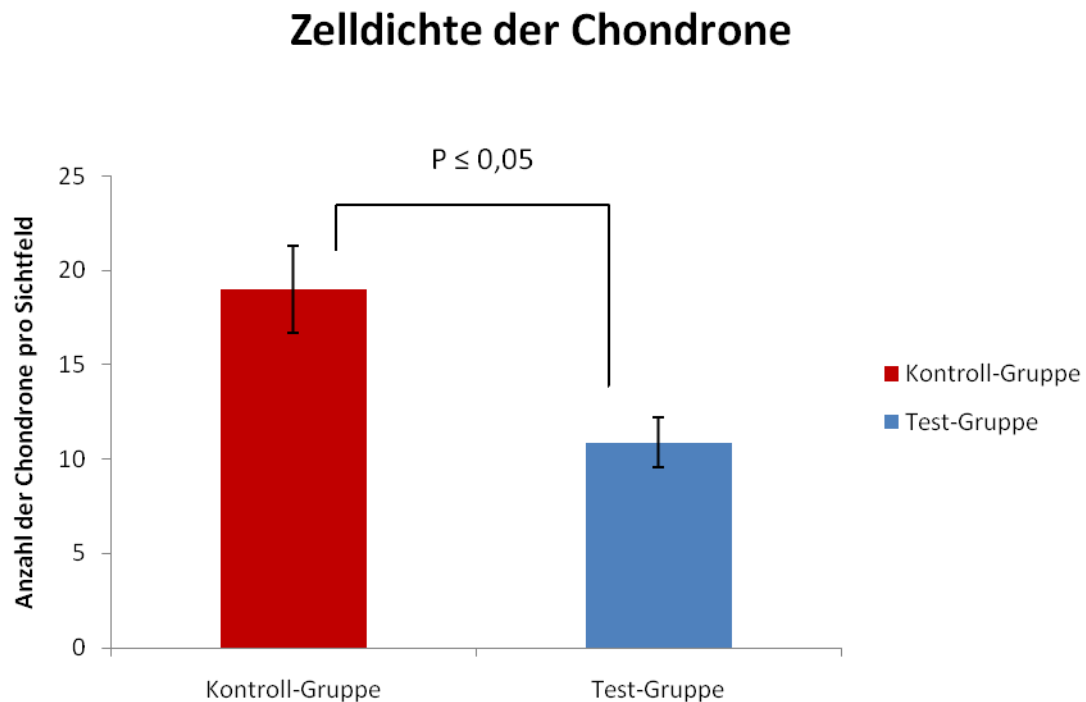
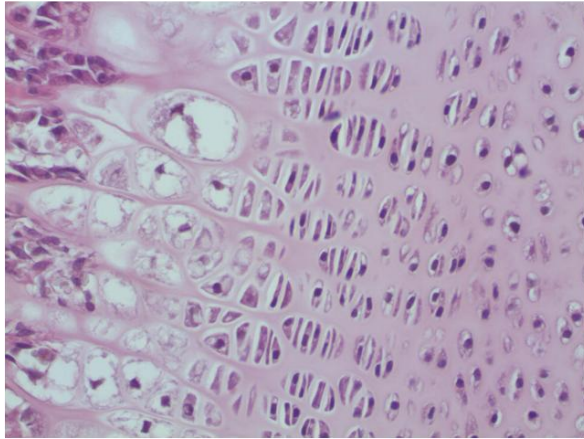


Abb. 13: Auszählung der Chondrone pro Sichtfeld bei 40-facher Vergrößerung bei der Kontroll- und Test-Gruppe am 10. postnatalen Tag

In den untersuchten Synchronchondrosen der Kontroll-Gruppe wurden 19 ± 5 Chondrone/Sichtfeld gezählt. Die Anzahl der Chondrone in den Präparaten der Test-Gruppe war mit 11 ± 2 Chondronen/Sichtfeld signifikant niedriger (Abb. 13).

HE – Färbung der sphenooccipitalen Synchondrose bei 40x Vergrößerung

Kontroll-Gruppe



Test-Gruppe

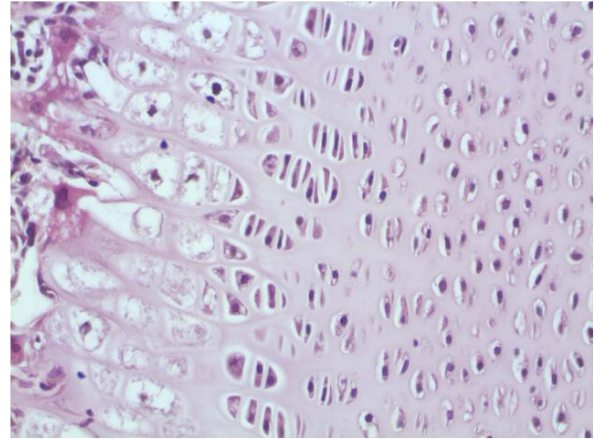


Abb. 14: Sichtfelder aus den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten, sphenooccipitalen Synchondrosen vom 10. postnatalen Tag bei 40x Vergrößerung. Die Zellkerne und die Knorpelgrundsubstanz werden im Schnittbild bläulich dargestellt, Kollagenfasen und Cytoplasma erscheinen rötlich.

Auf dem histologischen HE-Präparat der Kontroll-Gruppe (Abb.14, links) sind viele dicht aneinandergelagerte Chondrone mit reichlich Chondrozyten zu erkennen. Im Vergleich dazu sind die Chondrone im Schnittbild der Test-Gruppe (Abb.14, rechts) weiträumiger verteilt und weisen weniger eingelagerte Chondrozyten auf.

4.3. Genexpression von Kollagen Typ X

Um die Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchung der Synchondrosen weiter zu prüfen, haben wir spezielle Markergene der Chondrozytendifferenzierung im Hinblick auf ihre transkriptionelle Aktivität untersucht.

Kollagen Typ X wird während der enchondralen Ossifikation ausschließlich von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten gebildet, so dass dessen Expression als ein typischer Marker für die Chondrozytendifferenzierung angesehen werden kann.

Um zu analysieren, ob eine Störung der Chondrozytendifferenzierung vorliegt, wurden mit dem Verfahren der Realtime-PCR Schmelzkurven bestimmt und die Expressionswerte von Kollagen Typ X anhand eines Haushaltsgens (18sRNA) geeicht. Die Messwerte wurden jeweils am 10. postnatalen Tag sowohl bei der Kontroll-Gruppe als auch bei der Test-Gruppe ermittelt. Die prozentuale Gegenüberstellung der Werte ist in Abb. 15 dargestellt.

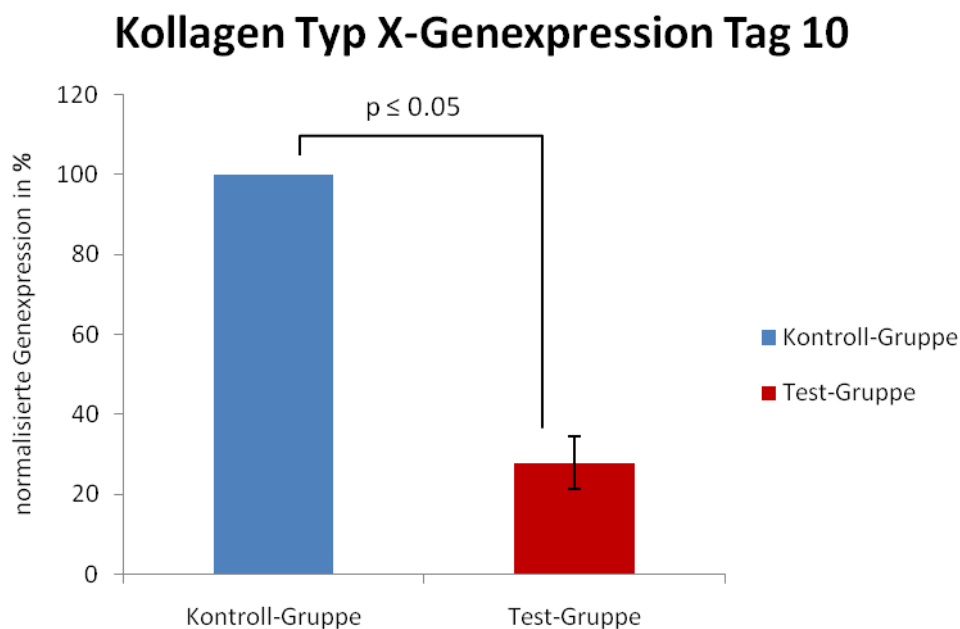


Abb. 15: Kollagen Typ X-Genexpression von Kontroll- und Test-Gruppe am Tag 10 in Prozent

Wir konnten feststellen, dass die Tiere der Methionin-Diätgruppe lediglich $27,9 \pm 13$ % der Kollagen Typ X -Expression gegenüber der Kontroll-Gruppe aufweisen. Dieser Sachverhalt stellt eine signifikante Verringerung der transkriptionellen Aktivität von Kollagen Typ X bei der Test-Gruppe dar.

4.4. Genexpression von Runx2

Der Transkriptionsfaktor Runx2 steuert durch die Transkription von knorpel- und knochenspezifischen Genen wie Kollagen Typ I, Kollagen Typ X, Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin oder Osteocalcin und durch den Einfluss auf andere Regulatoren wie dem Protein Ihh oder dem Transkriptionsfaktor Sox9 die Proliferation und Differenzierung hypertropher Chondrozyten bei der enchondralen Ossifikation. In der Osteogenese ist Runx2 außerdem mitverantwortlich für die Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoblasten. Die Expressionswerte von Runx2 wurden am 10. postnatalen Tag sowohl bei der Kontroll-Gruppe als auch bei der Test-Gruppe ermittelt. Mit Hilfe der Realtime-PCR wurden die verschiedenen Schmelzkurven bestimmt und die Expressionswerte anhand eines Haushaltsgens (18sRNA) geeicht. Die prozentuale Gegenüberstellung der Werte ist in Abb. 16 dargestellt.

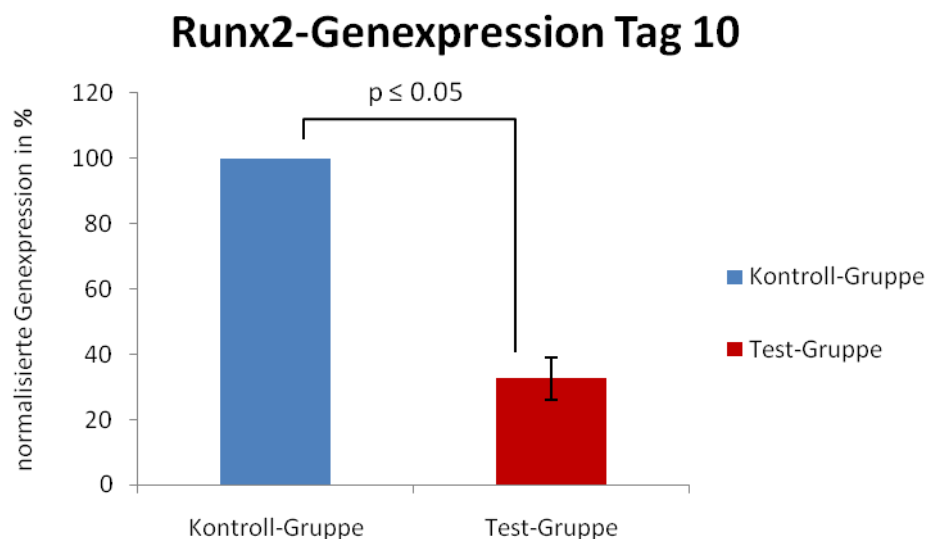


Abb. 16: Runx2-Genexpression von Kontroll- und Test-Gruppe am Tag 10 in Prozent

Verglichen mit der Kontroll-Gruppe weisen die Tiere der Test-Gruppe eine auf $32,6 \pm 13\%$ erniedrigte und damit signifikant herunter regulierte Runx2-Genexpression auf.

4.5. Serumkonzentration von IGF-1

Aus den vorangegangenen Messungen konnte bereits auf eine Wachstumsstörung geschlossen werden. Um die Ursachen näher eingrenzen zu können, wurde der Serumgehalt von IGF-1, einem wichtigem Wachstumsfaktor, gemessen. IGF-1 (Insuline Like Growth Factor) gehört zu den insulinähnlichen Wachstumsfaktoren und nimmt Einfluss auf das skelettale Wachstum. IGF-1 stimuliert die Zellteilung und Proliferation von Chondrozyten und Osteoblasten in den Wachstumsfugen. Ein Mangel an IGF-1 während der Entwicklung führt zu einer Verkürzung der langen Röhrenknochen, während eine Überproduktion zu Riesenwuchs führt (59).

Die Serumkonzentration von IGF-1 wurde am 20. postnatalen Tag sowohl bei der Kontroll-Gruppe als auch bei der Test-Gruppe ermittelt. Die Gegenüberstellung der entsprechenden Werte ist in Abb. 17 dargestellt.

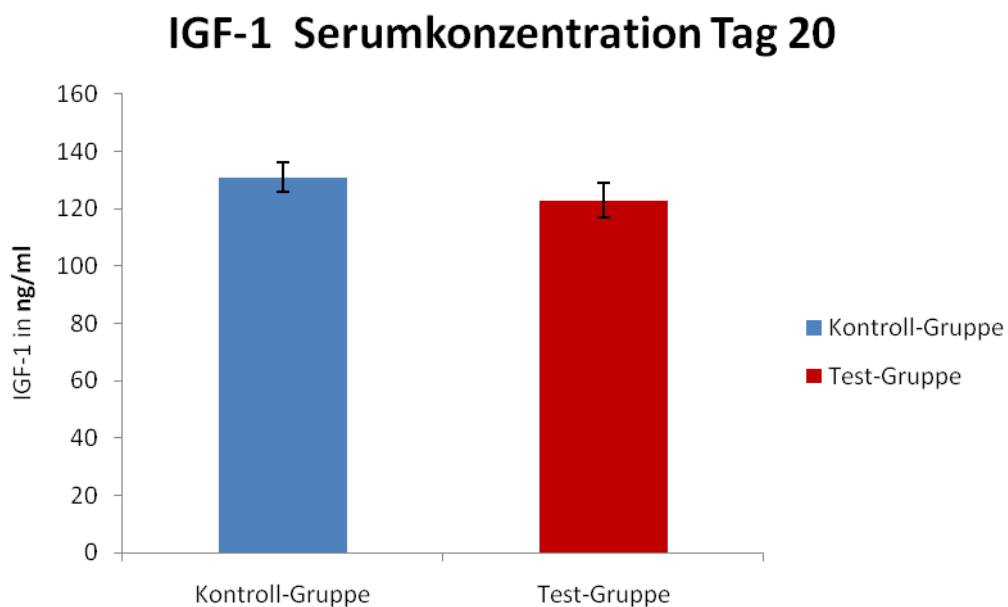


Abb. 17: IGF-1 Serumkonzentration der Kontroll- und Test-Gruppe am Tag 20

Der Serumgehalt an IGF-1 war in der Test-Gruppe verglichen mit der Kontroll-Gruppe nicht signifikant verändert. Es ist am Tag 20 postnatal kein signifikanter Unterschied zwischen den IGF-1 Serumkonzentrationen der Kontroll-Gruppe und der Test-Gruppe festzustellen. Die Test-Gruppe zeigt mit $123 \pm 15,2$ ng/ml im Vergleich zu den Tieren der Kontroll-Gruppe mit $131 \pm 14,3$ ng/ml eine leicht verringerte IGF-1 Konzentration im Serum.

4.6. DNA-Methylierungsgrad

In verschiedenen Publikationen wurde ein Zusammenhang von Hypermethioninämie/ Hyperhomocysteinämie und Veränderungen in der DNA-Methylierung beschrieben (60; 61; 62). Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger Faktor, der die transkriptionelle Aktivität von Zellen bzw. Gewebe beeinflussen kann. In diesem Zusammenhang prüften wir deshalb, ob die Test-Gruppe eine Veränderung der DNA-Methylierung aufwies. Aufgrund der geringen zu unserer Verfügung stehenden Probenmenge der Synchondrosis sphenooccipitalis verwendeten wir Leberproben, um eine mögliche Veränderung der DNA-Methylierung nachzuweisen.

Um den globalen Methylierungsgrad der isolierten genomischen DNA beurteilen zu können, wurde mit Hilfe eines ELISA-Systems der Methylierungsgrad quantitativ gemessen. Hierbei verhält sich der Betrag der methylierten DNA in der Probe proportional zu der gemessenen Extinktion. Die ermittelten Absorbanzwerte sind in Abb.18 aufgetragen.

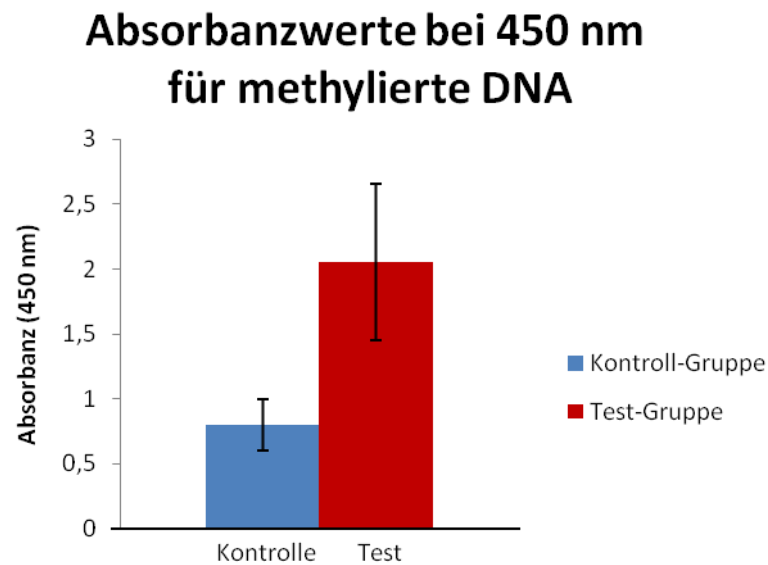


Abb. 18: Absorbanzwerte der Kontroll- und Test-Gruppe bei 450 nm für methylierte DNA

Die Absorbanzwerte der methylierten DNA der Kontroll-Gruppe sind mit $OD_{450nm}=0,78 \pm 0,2$ signifikant geringer als die Werte der Test-Gruppe mit $OD_{450nm}= 2,1 \pm 0,6$. Es konnte somit gezeigt werden, dass die globale Methylierung der genomischen Leber-DNA aus der Test-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant erhöht ist.

5. Diskussion

5.1 Die Bedeutung der Synchrondrosis sphenoccipitalis als primäres Wachstumszentrum

Die Synchrondrosen des Schädels sind Knorpelfugen, die zwischen den Knochen der Schädelbasis lokalisiert sind. Als Wachstumszentren haben sie eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung des kraniofazialen Skeletts (9). Im Unterschied zu Suturen, die sekundär kompensatorisch wirksam werden, sind Synchrondrosen primäre Wachstumszentren. Ihr Aufbau ähnelt dem der Epiphysenfugen der langen Röhrenknochen, in denen das Wachstum ebenfalls durch enchondrale Ossifikation zustande kommt. In Rattensynchrondrosen wurde histologisch eine strukturelle Zonierung nachgewiesen, die deutliche Parallelen zum Aufbau der Epiphysenfugen aufweist (22). Eine Besonderheit der basokranialen Synchrondrosen ist jedoch ihr senkrecht zu ihrem Verlauf gerichtetes, bipolares Wachstum, das von den mit hyalinem Knorpel überzogenen Rändern der Schädelbasissegmente ausgeht (50; 51). Enlow beschrieb bereits 1975 eine sogenannte "Stemmkörperwirkung", die durch das aufeinander zugerichtete enchondrale Wachstum entsteht, und stellte speziell die Bedeutung der Synchrondrosis sphenoccipitalis für das Wachstum des Mittelgesichtes heraus (16). Synchrondrosen sind nur in der Wachstumsphase aktiver, nicht dauerhaft existierender Bestandteil des Skeletts, die in Abhängigkeit von ihrer anatomischen Position zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Wachstums ossifizieren. Die meisten Synchrondrosen, wie die Synchrondroses sphenopetrosa, petrooccipitalis, intraoccipitalis anterior und intraoccipitalis posterior, verknöchern kurz nach der Geburt oder spätestens etwa mit dem 5.-6. Lebensjahr vollständig. Die Synchrondrosis sphenoccipitalis bleibt dagegen bis ins frühe Erwachsenenalter (16-18 Jahre) aktiv (52). In Ratten konnte durch den molekularbiologischen Nachweis von Kollagen Typ II und -Typ X gezeigt werden, dass

die Synchondrosis sphenoccipitalis bis zum 52. Tag persistierte. Eine besonders hohe transkriptionelle Aktivität dieser Gene war am 10. und 20. postnatalen Tag nachweisbar (58).

Inwieweit extrinsische Faktoren, wie Fehl- bzw. Mangelernährung und dadurch bedingte metabolische Störungen die chondrale Ossifikation der Synchondrosis sphenoccipitalis beeinflussen, ist zur Zeit nicht bekannt.

Wir untersuchten in dieser Doktorarbeit den Effekt einer Methionin-induzierten maternalen Hyperhomocysteinämie auf die Entwicklung und Verknöcherung der Synchondrosis sphenoccipitalis an den zwei postnatalen Zeitpunkten Tag 10 und Tag 20.

5.2 Die Bedeutung von Homocystein und seine Rolle im Methylierungszyklus

Homocystein (Hcy) ist eine nicht proteinogene, schwefelhaltige Aminosäure. Sie wird als Zwischenprodukt im Methylierungszyklus (Abb.19) gebildet, wobei Methionin zu S-Adenosylmethionin, einem wichtigen Methylendonator, aktiviert wird. Die Endprodukte des Methylierungsprozesses sind das methylierte Produkt und S-Adenosylhomocystein (SAH), welches anschließend durch die SAH-Hydrolase zu Homocystein und Adenosin hydrolisiert wird. Unter physiologisch normalen Bedingungen dient Hcy überwiegend als Methylgruppendonator für die Remethylierung und Bildung von Methionin durch die Methionin-Synthase. Im Falle eines exzessiven Methioninüberschusses oder der Nachfrage nach Cysteinbildung wird Hcy durch das Vitamin B6-abhängige Enzym Cystathionin- β -Synthase (CBS), zu Cystathion umgewandelt. Cystathion wird vor allem durch die Cystathion- γ -Lase zu Cystein gespalten.

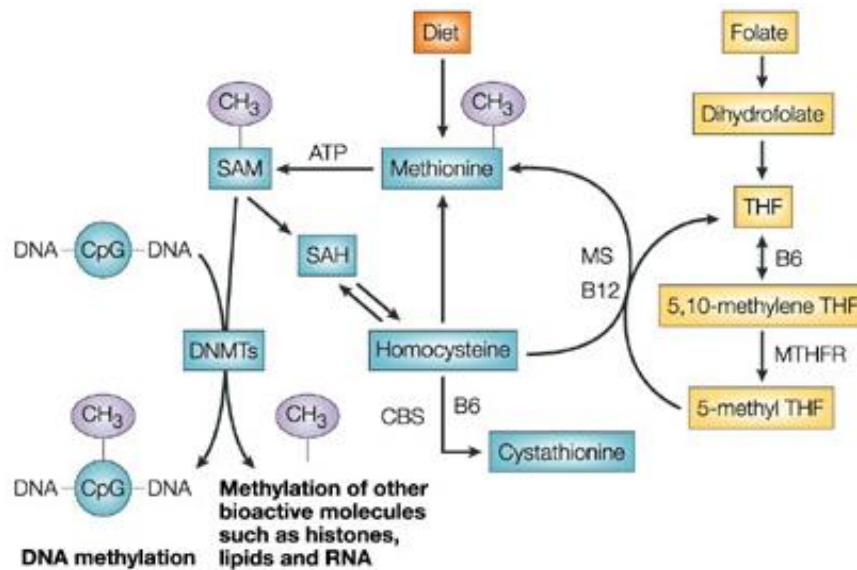


Abb. 19: Der Methionin-Zyklus - (verändert nach S. A. Lamprecht und M. Lipkin) (63)

Mangelernährung (Vitamin B6- Mangel), Alkoholmissbrauch oder genetische Mutationen, z.B. eine Mutation des CBS-Gens, sind für eine Homocysteinämie und Homocysteinurie verantwortlich (11). Ein pathologischer Anstieg des Hcy im Blutserum und seine Sekretion im Urin sind wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung bestimmter Krankheiten, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen (Morbus Alzheimer), Erkrankungen des Bindegewebes oder skelettale Veränderungen. Skelettale Veränderungen äußern sich in einer verminderten Knochendicke und Mineralisation sowie in einer Störung der kollagenen Vernetzung (12). Einige klinische Studien berichten von Patienten mit Gesichtsfehlentwicklungen und einer Ausprägung von marfanoiden Strukturen. Zusätzlich wurde durch Robert et al. (2005) aufgezeigt, dass die Hemmung des CBS-Gens zu Hyperhomocysteinämie und einer Verkürzung der langen Röhrenknochen durch die gestörte Knorpeldifferenzierung führt (11). Wie bereits erwähnt, entsteht Homocystein als Stoffwechselzwischenprodukt des Methionin-Zyklus. Homocystein kann durch Behinderungen der weiteren Stoffwechselwege, beispielsweise verursacht durch einen Mangel an Kofaktoren wie Vitamin B6, B9 und B12,

akkumulieren. Auch kann es durch eine deutlich erhöhte Zufuhr von Methionin zu einer Hyperhomocysteinämie kommen (61; 62). Verschiedene Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass ein erhöhter Homocystein-Plasmaspiegel ein starker Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere für deren Grunderkrankung, die Arteriosklerose, ist (64; 65; 66; 67). In hoher Konzentration wirkt Homocystein direkt als Oxidanz und hat eine Affinität zu LDL (Low Density Lipoprotein) und zum Gefäßendothel. Die Aminosäure fördert die LDL-Oxidation. Das oxidierte LDL wird von Makrophagen phagozytiert, in Intima und Media der Arterien als Schaumzellen gespeichert und schädigt so über eine Entzündungsreaktion und einen konsekutiven Gewebeumbau die Arterienwände durch Förderung der Bildung von arteriosklerotischen Plaques. Eine zusätzliche Folge der Hyperhomocysteinämie ist eine Steigerung der Blutviskosität sowie eine Aktivierung der Thrombogenese bei gleichzeitiger Störung der Fibrinolyse. Die Hyperhomocysteinämie führt nicht nur zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, sondern auch zu frühzeitigen Demenzererscheinungen. Die Therapie besteht in der Substitution der fehlenden oder in zu geringem Maß vorhandenen Vitamine, um die Abbauwege des Homocysteins wieder zu ermöglichen (68; 69).

In früheren Veröffentlichungen gibt bereits Hinweise, dass der Einfluss einer Hyperhomocysteinämie in der Schwangerschaft eine Reihe von Komplikationen mit sich bringt, wie Schwangerschaftshypertonie (Präeklampsie), vorzeitige Aborte, Neuralrohrdefekte, auch fötale Wachstumseinschränkungen konnten beobachtet werden (62; 70).

5.3 Die Wirkung von Hyperhomocysteinämie auf die enchondrale Ossifikation

Mütterliche Hyperhomocysteinämie während der Gravidität wird mit Fehlbildungen des sich entwickelnden Skelettsystems der Nachkommen in Verbindung gebracht und ist mit fetalen Wachstumsretardationen und der Entstehung von Hyperinsulinämie assoziiert. (71; 72).

Diese Beobachtung konnten wir auch bei den Ratten der Test-Gruppe machen, die erniedrigte Blutglucosewerte und ein signifikant verringertes Gewicht im Vergleich zu den Tieren der Kontroll-Gruppe aufwiesen. Die Untersuchung von knorpeligen Wachstumszentren der Tibia wurde von Robert et al (2005) an gentechnisch-veränderten CBS^{-/-}-Mäusen vorgenommen, die eine vollständige Cystathionin- β -Synthase-Defizienz aufwiesen.

Der Mangel an Cystathionin- β -Synthase verhindert den Abbau von Homocystein und führt so zu einer Hyperhomocysteinämie. Bei den entsprechenden CBS-defizienten Tieren wurden skelettale Anomalien beobachtet, die vor allem an den langen Röhrenknochen sichtbar wurden. Generell waren retardierte Knochen dort zu finden, wo diese durch enchondrale Ossifikation entstehen. Als Ursache der verkürzten Knochen wurde eine fehlerhafte Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten innerhalb der Wachstumsfugen identifiziert. In einer histologischen Prüfung wurde festgestellt, dass die morphologische Architektur der Wachstumsfuge mit der von Wildtypmäusen übereinstimmte, also die typische zellstadienbedingte Anordnung der Zonen aufwies. Allerdings erschienen die Wachstumsfugen von Tibia sowie von anderen langen Röhrenknochen der CBS-defizienten Mäuse deutlich breiter und weniger verknöchert als die der Wildtypmäuse (11). Mikroskopische Untersuchungen der Wachstumsfugen dieser Tiere mit gentechnisch induzierter Hyperhomocysteinämie zeigten eine

Unterbrechung der Differenzierung der Chondrozyten vor allem in der hypertrophen Chondrozytenzone (11).

Die kraniofazialen Wachstumszentren wurden von Robert et al. (2005) jedoch nicht in ausreichender Weise untersucht. Wir stellten während unserer Arbeit fest, dass auch die basokraniellen Wachstumszentren unserer Testtiere von einer Wachstumsstörung betroffen sind, speziell die von uns untersuchte Synchrondrosen sphenoccipitalis zeigte Entwicklungsverzögerungen. Die histologischen Untersuchungen der Synchrondrosen sphenoccipitalis der Kontroll- und der Test-Gruppe ergab, dass das Wachstumszentrum an den Tagen 10 und 20 bei beiden Gruppen nicht vollständig ossifiziert war. Dieser histologische Befund stimmt mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchungen von Maurer (2010) überein (58). Die histologische Pentachrom-Färbung der Rattensynchrondrosen ließ eine Unterscheidung zwischen hyalinem und mineralisiertem Knorpel zu. Dies ermöglichte eine exakte Flächenintegration der knorpeligen Anteile der Synchrondrosen an den beiden Messpunkten Tag 10 und Tag 20 postnatal. Die histomorphometrische Analyse der Knorpelfugen ergab, dass die Synchrondrosen der Testtiere kleiner angelegt waren als die Wachstumsfugen der Kontroll-Gruppe. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass die enchondrale Ossifikation der Synchrondrosen sphenoccipitalis in den Tieren der Test-Gruppe vergleichsweise geringer fortgeschritten war.

Um zu zeigen, dass sich die Zellproliferation innerhalb der Synchrondrosen zwischen den Testtieren und der Kontroll-Gruppe unterscheidet, bestimmten wir die Anzahl der Chondrone entlang der Synchrondrosen-Knochengrenze. Chondrone sind zusammengelagerte, Chondrozyten welche eingekapselt sind. Sie werden auch als isogene Gruppe bezeichnet, da alle Zellen eines Chondrons aus ein und derselben Tochterzelle hervorgehen (21). Die hohe Teilungsrate auf engstem Raum führt zu einer Abflachung der Zellen. Es gibt eine mathematische Beziehung zwischen der

Zellteilungsrate und dem Knochenwachstum (9). Die Anzahl der Chondrozyten in einem Chondron ist somit ein Maß für die Zellproliferation des knorpeligen Wachstumszentrums.

Die histologisch beobachteten Erkenntnisse konnten wir zusätzlich durch Genexpressionsuntersuchungen der Synchondrosen am 10. postnatalen Tag verifizieren. Dabei wurde die transkriptionelle Aktivität von zwei Knorpeldifferenzierungsmarkergenen, Runx2 und Kollagen Typ X, gemessen.

Runx2 zählt zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von Knorpel und Knochen. Er beeinflusst die Transkription von knorpel- und knochenspezifischen Genen wie die von Kollagen Typ I, Kollagen Typ X, Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin und Osteocalcin (35). Runx2 stimuliert besonders in der Endphase der Knorpelzellentwicklung die Differenzierung der Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten (40; 41; 73).

Kollagen Typ X wird im Bereich des Knorpels ausschließlich von sich differenzierenden prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert, so dass sich anhand der Genexpressionswerte Aussagen über die Zellstadien der Chondrozyten und deren Aktivität machen lassen (20; 58).

Sowohl die Genexpression von Kollagen Typ X als auch die von Runx2 war bei den Testtieren am Tag 10 verglichen mit der Kontroll-Gruppe signifikant herunter reguliert. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten der histologischen Untersuchung überein, bei der wir eine langsamere Verknöcherung der Synchondrosen der Test-Gruppe nachweisen konnten. Um die Ursache für die Wachstumsstörungen im Bereich der enchondral ossifizierenden Synchondrosen weiter zu analysieren, wurde zusätzlich der Serumgehalt von IGF-1 bestimmt. IGF-1 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der über membranständige Rezeptoren die Zellproliferation der Knochen- und Knorpelzellen

beeinflusst (74). Die Untersuchung ergab, dass kein signifikanter Unterschied an IGF-I zwischen den Gruppen vorhanden war. Ein weiterer Wachstumsfaktor, IGF-II, konnte aufgrund der geringen Probenmenge nicht bestimmt werden; dies sollte somit eine weitere Aufgabe für zukünftige Untersuchungen sein.

5.4 Die Rolle des Methylierungszyklus für die Epigenetik

Tierexperimentelle Daten und epidemiologische Studien früherer Untersuchungen weisen immer wieder darauf hin, dass durch die mütterliche Ernährung während der Gravidität Gene des Feten permanent epigenetisch modifiziert werden können (75; 76; 77). Der Methylierungszustand im Promotorbereich von Genen gilt dabei als Kontrollparameter für dessen Transkription (78). Ein unmethylierter Zustand scheint die Transkription zu begünstigen, während hypermethylierte Promotoren die Transkription und Expression des folgenden Genes hemmen (gen silencing) (79; 80; 81; 82). Während der Entwicklung von Säugetieren gibt es zwei kritische Phasen, in denen die Methylierungsmuster des Genoms neu verteilt werden. In der Keimbahn und im frühen embryonalen Stadium finden epigenetische Reprogrammierungsvorgänge statt, die das gesamte Genom betreffen. Zunächst werden durch Demethylierungsprozesse nahezu alle vererbten Modifikationen beseitigt, in einem zweiten Schritt werden dann neue Methylierungsmuster gesetzt. Besonders während dieser Zeit ist der Organismus empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen (83; 84).

Die Fähigkeit zu Methylierungsprozessen der DNA ist stark an das Vorhandensein von Methylgruppendonatoren und Kofaktoren wie Vitamin B12, Folsäure und Methionin gebunden, welche der Mutter und dem Feten vor allem durch die Nahrung zugeführt werden (76). Wird der Organismus während der Entwicklung einer erhöhten Dosis von Methionin ausgesetzt, kann das Einfluss auf den Methylierungsgrad der DNA haben (85;

86; 87). Die Methylierung der DNA ist eine enzymatisch katalysierte Modifikation der DNA, wodurch eine Methylgruppe auf eine Cytosin-Base übertragen wird. Es werden ausschließlich Cytosine methyliert, auf die ein Guanin folgt, d.h. die in Form eines CpG-Dinukleotids vorkommen. Vier verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMT 1, 2, 3a und 3b) sind für die Methylierung der DNA zuständig. DNMT 1 dient vor allem der Aufrechterhaltung des bereits vorhandenen Methylierungsmusters, wohingegen DNMT 3a und 3b für eine De-novo-Methylierungsfunktion verantwortlich gemacht werden. Die Funktion von DNMT 2 wurde noch nicht eindeutig identifiziert. Die für die Modifikation benötigte Methylgruppe wird von einem der wichtigsten Methylendonatoren, dem S-Adenosyl-Methionin (SAM) zur Verfügung gestellt. S-Adenosyl-Methionin entstammt dem Methylierungszyklus und wird durch die Methionin-Adenosyltransferase aus der nicht proteinogenen Aminosäure Methionin und ATP (Adenosin-Triphosphat) synthetisiert. Durch die DNA-Methyltransferase-1 (DNMT1) wird nun die Methylgruppe von SAM auf das C5 des Cytosins übertragen und es entsteht 5-Methylcytosin und S-Adenosylhomocystein (SAH) (88; 89). S-Adenosylmethionin stimuliert die Methylierung der DNA und inhibiert zusätzlich den Mechanismus der aktiven Demethylierung (90; 91). Durch den gemeinsamen Kreislauf des Methylierungszyklus resultiert aus einer Hypermethioninämie auch eine Hyperhomocysteinämie. Die verfügbaren Daten deuten daraufhin, dass die zusätzliche Gabe von Methionin und die damit verbundene Hyperhomocysteinämie Hypermethylierungen der DNA induziert und so auch an der Entstehung von verschiedenen Entwicklungsstörungen und Syndromen beteiligt ist (87; 92).

Auch bei unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass die mütterliche Methionin-Diät zu Veränderungen des Methylierungsgrades der DNA führte. Die DNA aus den Leberproben zeigte bei den Testtieren eine signifikant höhere Hypermethylierung im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe. Aufgrund des limitierten

Probenmaterials konnten wir den Methylierungsgrad der DNA aus der Synchronchondrosis sphenoccipitalis nicht bestimmen. Somit ist bisher noch ungeklärt, inwiefern sich die Methylierungsgrade der DNA des Wachstumszentrums bei beiden Versuchsgruppen unterscheiden. Wir können zwar annehmen, dass die Methionin-Diät ebenfalls in anderen Organen zu Hypermethylierungen geführt hat, jedoch steht dieser Beweis noch aus und sollte in zukünftigen Untersuchungen analysiert werden. Der Nachweis des Methylierungsgrades wurde zudem auf globaler Ebene durchgeführt, weshalb Schlussfolgerungen zum Methylierungsgrad einzelner Gene nicht gezogen werden konnten. Wir konnten jedoch zeigen, dass die Genexpression für den Transkriptionsfaktor Runx2 und für Kollagen Typ X in der Synchronchondrosis sphenoccipitalis bei den Testtieren signifikant herunter reguliert war. Die erniedrigte transkriptionelle Aktivität von Runx2 steht wahrscheinlich in Zusammenhang mit der von uns anhand der histologischen Ergebnisse dargestellten Wachstumsverzögerung der Synchronchondrose. Auch die verringerte Kollagen Typ X-Expression deutet darauf hin, dass eine Störung in der hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten für das langsamere Fortschreiten der Verknöcherung des Wachstumszentrums bei den Testtieren verantwortlich ist. Hypermethylierungen im Promotorbereich der untersuchten Gene könnten mit der herunter regulierten transkriptionellen Aktivität in Zusammenhang stehen. Diese mögliche Verknüpfung wurde von uns anhand der hypermethylierten Leber-DNA der Test-Gruppe aufgezeigt. Um diesen Einfluss eindeutig zu verifizieren, sollten in weiterführenden Forschungsprojekten gezielt die genregulierenden Promotorbereiche von Runx2 und Kollagen Typ X im Hinblick auf deren Methylierungsgrad analysiert werden.

5.5 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit zeigen, dass die mütterliche Methionin-Diät während der Schwangerschaft den globalen Methylierungsgrad von Leber-DNA von neugeborenen Ratten verändert und zudem Einfluss auf die Genexpression von Runx2 und Kollagen Typ X hat. Experimente, welche speziell die DNA aus der Synchronisation des Sphenoccipitalis im Hinblick auf deren Methylierung untersuchen, stehen noch aus. Um zu verifizieren, dass auch die basikranialen Wachstumszentren Ziel der durch die Methionin-Diät induzierten Hypermethylierungen sind, sollte speziell die DNA aus Proben der Synchronisation des Sphenoccipitalis Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Unsere Genexpressionsversuche haben gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität der Markergene Runx2 und Kollagen Typ X in der Test-Gruppe signifikant herunter reguliert war. Um den Zusammenhang zwischen der Methylierung der DNA und der veränderten Genexpression von Runx2 und Kollagen Typ X sicher herauszustellen, müssen speziell die CpG-Inseln im Promotorbereich der untersuchten Gene auf ihren Methylierungsgrad hin analysiert werden. CpG-Inseln sind über eine Phosphodiesterbindung verbundene Basen, bestehend aus Cytosin und Guanin (Cytosin-phosphatidyl-Guanin). Im menschlichen Gesamtgenom ist die Zahl dieser CpG-Dinukleotide statistisch unterrepräsentiert. Liegt die Wahrscheinlichkeit, ein bestimmtes Dinukleotid im menschlichen Genom zu finden, bei etwa 6%, treten CpG-Dinukleotide wesentlich seltener auf. Normalerweise liegen etwa 70% aller CpG-Dinukleotide methyliert vor, d.h. dass ein Methylrest an C5 der Cytosinbase kovalent gebunden ist. Methyl-Cytosine desaminieren jedoch spontan zu Thymin, wodurch eine sogenannte GC-Suppression entsteht. Neben einzeln auftretenden CpG-Dinukleotiden existieren jedoch auch die sogenannten „CpG-Inseln“, kurze Abschnitte der DNA (300-3000 Bp.), auf denen das Dinukleotid Cytosin-Guanin statistisch gehäuft vorkommt. CpG-Inseln repräsentieren etwa 1% des Genoms und sind in der Regel zunächst nicht methyliert. In der DNA

wurden CpG-Inseln v.a. am 5`-Ende von 60-70% der menschlichen Gene innerhalb der Promotorregion nachgewiesen. Der Methylierungszustand der CpG-Inseln im Promotorbereich von Genen gilt als Kontrollparameter für dessen Transkription. Ein unmethylierter Zustand scheint die Transkription zu begünstigen, während hypermethylierte CpG-Inseln die Transkription und Expression des folgenden Genes hemmen (gen silencing) (79; 81; 82).

Auch im Promotorbereich des Runx2-Gens wurde eine solche CpG-Insel nachgewiesen, deren physiologische Bedeutung für die Regulation des Gens noch nicht vollständig geklärt ist. Diese CpG-Insel könnte als Ziel von Methylierungsreaktionen für die Runx2-Gentranskription von Bedeutung sein (37). Epigenetisch bedingte Hypermethylierung der im Promotorbereich gelegenen CpG-Insel könnte eine Transkription von Runx2 inhibieren und so für Beeinträchtigungen der enchondralen Knochenentwicklung verantwortlich sein. Um solche Methylierungsuntersuchungen gezielt für spezielle Genpromotoren durchzuführen, könnten zukünftig moderne Verfahren wie microarray-based-DNA-methylation-Analyseverfahren (93) zum Einsatz kommen.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss einer durch eine maternale Methionindiät induzierten Hyperhomocysteinämie auf das Wachstum und die Entwicklung der Synchronchondrosen sphenoccipitalis bei neugeborenen Ratten vom Zuchtstamm LWK1.W.

Dabei wurde der Verlauf der enchondralen Ossifikation des basokraniellen Wachstumszentrums im Hinblick auf dessen histologisches und molekularbiologisches Entwicklungsstadium zwischen zwei Versuchsgruppen verglichen. Wir züchteten eine Kontroll-Gruppe und eine Test-Gruppe von Tieren, wobei die Test-Gruppe mit einem 10-fach erhöhten Methionin-Anteil gefüttert wurde. Um eine Wachstumsstörung bei den Testtieren nachzuweisen, wurden Gewicht und Blutzuckerspiegel beider Gruppen am 10. und 20. postnatalen Tag gemessen. Des Weiteren wurden histologische Präparate der Synchronchondrosen sphenoccipitalis angefertigt, anhand derer eine Flächenvermessung der knorpeligen Anteile der Synchronchondrose vorgenommen wurde. Zusätzlich wurde die Anzahl und Zelldichte der Chondrone innerhalb der Wachstumsfuge bestimmt, die Rückschlüsse über die Proliferation und Wachstumsrate der Knorpelzellen zulassen. Als zwei wichtige Markergene der Knorpel- und Knochenentwicklung wurden Kollagen Typ X und der Transkriptionsfaktor Runx2 am 10. postnatalen Tag in der Synchronchondrosen sphenoccipitalis im Hinblick auf ihre transkriptionelle Aktivität untersucht. Um den Einfluss der Hyperhomocysteinämie auf das Epigenom zu analysieren, ermittelten wir anhand von Leberproben den Methylierungsgrad der DNA. Erste Hinweise auf eine Wachstumsstörung erhielten wir dadurch, dass die Tiere der Test-Gruppe ein geringeres Körpergewicht hatten als die vergleichbaren Tiere der Kontroll-Gruppe. Auch die histomorphometrische Analyse der Knorpelanteile der Synchronchondrosen am 10. und 20. postnatalen Tag zeigte eine verringerte Wachstumsrate der Wachstumsfugen bei den Testtieren. Die Vermutung, dass eine verminderte Zellproliferation die Ursache für die

Wachstumsrestriktion ist, wurde durch die vergleichsweise geringe Anzahl der Chondrone innerhalb der Synchronosen der Testtiere bestätigt. Zusätzlich zeigten Genexpressionsuntersuchungen der Knochendifferenzierungsmarkergene Runx2 und Kollagen Typ X eine signifikant verringerte transkriptionelle Aktivität bei den Tieren der Test-Gruppe. Die veränderte Genexpression der Markergene in der Synchronose und die gleichzeitig ermittelte globale Hypermethylierung der DNA aus Leberproben der Ratten deutet zumindest auf eine epigenetische Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität hin. Dieser Zusammenhang muss jedoch durch die spezielle Analyse der entsprechenden Genpromotoren im Hinblick auf deren Methylierungsstatus zukünftig noch eingehender untersucht werden.

Wir stellten fest, dass die methionininduzierte Hyperhomocysteinämie zu einer Hypermethylierung der Leber-DNA führte. Des Weiteren konnten wir eine Verzögerung im Fortschritt des Wachstums und der Verknöcherung der Synchronosis sphenoccipitalis beobachten. Um den Zusammenhang zwischen der Hyperhomocysteinämie und der beobachteten Wachstumsrestriktion in den Synchronosen der Testtiere nachzuweisen, müssen jedoch zukünftig weitere Untersuchungen, speziell der synchondralen DNA, folgen. Als klinisch relevante Schlussfolgerung erachten wir es als sinnvoll, bei Müttern während der Schwangerschaft die ausreichende Versorgung mit Kofaktoren wie Vitamin B6 und Vitamin B12 sicherzustellen, um einer Hyperhomocysteinämie bei Mutter und Kind vorzubeugen und so das Risiko von kieferorthopädisch relevanten Wachstumsstörungen und Veränderungen zu minimieren.

7 Literaturverzeichnis

1. **Rakosi T , Jonas I.** 1989.*Kieferorthopädie - Diagnostik.* Stuttgart : G. Thieme.
2. **Miethke R-R.** 2000. Schädelentwicklung. *Kieferorthopädie 1 - Orofaziale Entwicklung und Diagnostik.* Bd. 11/1.: Elsevier Urban & Fischer, 17-46.
3. **Harzer W.** 1999.*Lehrbuch der Kieferorthopädie.* München : Carl Hanser .
4. **Nie X.** 2005. Cranial base in craniofacial development: Developmental features, influence on facial growth, anomaly, and molecular basis. *Acta Odontol. Scand.*, 63(3), 127 - 135 .
5. **Nie X, Luukko K, Kvinnsland IH, Kettunen P.** 2005. Developmentally Regulated Expression of Shh and Ihh in the Developing Mouse Cranial Base: Comparison With Sox9 Expression. *Anat. Rec. A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology.* 286(2), 891 - 898.
6. **Cedzich C, Farmand M.** 2003. Diagnostik und Therapie der nichtsyndromalen und syndromalen Kraniosynostosen. *HNO.* 51(3), 198-208.
7. **Suda N, Hamada T, Hattori M, Torii C, Kosaki K, Moriyama K.** 2007. Diversity of supernumerary tooth formation in siblings with cleidocranial dysplasia having identical mutation in RUNX2 : possible involvement of non-genetic or epigenetic regulation. *Orthod. & Craniofac.* 10(4), 222-225.
8. **van Limborgh J.** 1972. The role of genetic and local environmental factors in the control of postnatal craniofacial morphogenesis. *Acta Morphol Neerl Scand.* 10(1), 37-47.
9. **Cendekiawan T, Wong RWK, Rabie ABM.** 2010. Relationships Between Cranial Base Synchondroses and Craniofacial Development: A Review. *Open Anat J.* 2, 67-75.
10. **Wang X, Mao JJ.** 2002. Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. *J Dent Res.* 81(10), 701-705.
11. **Robert K, Maurin N, Vayssettes C, Siauve N, Janel N.** 2005. Cystathionine Synthase Deficiency Affects Mouse Endochondral Ossification. *Anat Rec.* 282A, 1-7.
12. **Nakamoto T, Rothermel KS, McGrath KR.** 1987. Biochemical and physical alterations of bones in newborn rats due to excess methionine administered either by gastric intubation or by maternal milk. *Arch Oral Biol.* 32(2), 1001-1005.
13. **Rohen, J.W.** 1994. Bau und Entwicklung des Kopfes. *Anatomie für Zahnmediziner.* München: Schattauer, 78.
14. **Nieke, K.** 2001. Pränatale Schädelentwicklung. *Einführung in die Kieferorthopädie 2. Aufl.* München: Urban & Fischer, 18-35.
16. **Fanghänel J, Preuß K.** 2004. Suturen – Wachstumszentren. *Osteopathische Med.* 1, 4-8.

17. **Miethke R-R.** 2000. *Kieferorthopädie 1. Praxis der Zahnheilkunde* 4. Aufl., Urban & Fischer, München, 11/1, 19-45,
18. **Liem T.** 2006. Ossifikation des Neurokraniums und Viszerokraniums. *Morphodynamik in der Osteopathie: Grundlagen und Anwendung am Beispiel der kranialen Sphäre.* Hippokrates, 371.
19. **Rateitschak KH.** 1989. *Kieferorthopädie Diagnostik.* Bd. 8, Stuttgart : G. Thieme, 8-9.
20. **Proff P, Römer P.** 2009. The molecular mechanism behind bone remodelling: a review. *Clin Oral Investig.* 13(4), 355-362.
21. **Junqueira LC, Gratzl M.** 2002. *Histologie.* 5. Aufl. Springer.
22. **Heinkele M, Ewers R.** 1989. Die Synchondrosis sphenooccipitalis - eine fluoreszenz- und polarisationsmikroskopische Untersuchung am Cercopithecus-aethios-Affen. *J Orofac. Orthoped./Fortschr. Kieferorthop.* 50(6), 493.
23. **Shen G, Darendeliler MA.** 2006. Cephalometric evaluation of condylar and mandibular growth modification: a review. *Orthod & Craniofac Res.* 9(1), 2-9.
24. **Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M.** 2008. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Internat J Biochem & Cell Biol.* 40, 46–62.
25. **Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, López-Otín C, Krane SM.** 2004. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(49), 17192-17197.
26. **Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR.** 2004. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development.* 131(9), 2161-2171.
27. **Welsch, U.** 2003. *Histologie - Sobotta.* München : Elsevier, 97-133.
28. **Mundlos, S.** 1999. Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J Med Gen.* 36(3), 177–182.
29. **Katagiri T, Takahashi N.** 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 8, 147-159.
30. **Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M.** 1999. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 274, 6972-6978.
31. **Komori, T.** 2002. RUNX2, A Multifunctionel Transcription Factor in Skeletal Development. *J Cell Biochem.* 87, 1-8.
32. **Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T.** 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89, 755-764.

33. **van Wijnen AJ, Stein GS, Gergen JP, Groner Y, Hiebert SW, Ito Y, Liu P, Neil JC, Ohki M, Speck N.** 2004. Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene* . 23(24), 4209-4210.
34. **Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ.** 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell Press*. 89, 765–771.
35. **Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G.** 1997. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell Press*. 89, 747-754.
36. **Rath-Deschner B, Daratsianos N, Dühr S, Girmann N, Winter J, Kroll F, Reichert C, Jäger A, Götz W.** 2010. The Significance of RUNX2 in Postnatal Development of the Mandibular Condyle. *J Orofac Orthoped*. 1, 17-31.
37. **Stock M, Otto F.** 2005. Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers. *J Cell Biochem*. 95, 506–517.
38. **Xiao Z-S, Hjelmeland AB, Quarles LD.** 2004. Selective Deficiency of the “Bone-related” Runx2-II Unexpectedly Preserves Osteoblast-mediated Skeletogenesis. *J Biol Chem*. 27(19), 20307–20313.
39. **Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T.** 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev*. 18, 952-963.
40. **Kronenberg, H.M.** 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 423, 332-336.
41. **Zelzer E, Olse BR.** 2003. The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*. 423, 343-348.
42. **Hofmann A, Mattyasovszky SG, Brüning C, Ritz U, Mehling I, Meurer A, Rommens PM.** 2009. Osteoblasten - Zelluläre und molekulare Regulationsmechanismen in der Frakturheilung. *Orthopäde*. 38, 1009-1019.
43. **Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T.** 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*. 127, 1755-1766.
44. **Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS.** 2002. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 277(4), 2695-701.
45. **Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ.** 2002. 1,25-(OH)₂-vitamin D3 suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res*. 274(2), 323-33.
46. **Chang DJ, Ji C, Kim KK, Casinghino S, McCarthy TL, Centrella M.** 1998. Reduction in transforming growth factor beta receptor I expression and transcription factor CBFa1 on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem*. 273(9), 4892-4896.
47. **Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR.** 1997. Mutations Involving the Transcription Factor CBFA1 Cause Cleidocranial Dysplasia. *Cell Press*. 89, 773-779.

48. **Tu Q, Zhang J, Paz J, Wade K, Yang P, Chen J.** 2008. Haploinsufficiency of Runx2 results in bone formation decrease and different BSP expression pattern changes in two transgenic mouse models. *J Cell Physiol.* 217(1), 40-47.
49. **Zheng L, Iohara K, Ishikawa M, Into T, Takano-Yamamoto T, Matsushita K, Nakashima M.** 2007. Runx3 negatively regulates Osterix expression in dental pulp cells. *Biochem. J.* 405, 69-75.
50. **Koski, K.** 1968. Cranial growth centers: Facts or fallacies? *Am J Orthod.* 54, 566-583.
51. **Watzek G, Matras H, Perneczky A, Tuchmann A.** 1977. Auswirkungen von prämaternen Synostosen des Neurokraniums auf das Viszerokranium. *J Orofac Orthoped.* 38(2), 205-212.
52. **Fanghänel J.** 2003. Entwicklung des knöchernen Schädels. *Waldeyer - Anatomie des Menschen.* 17.Aufl. Berlin : W. Gruyter, 180.
53. **Roberts W E.** 2004. Bone Development and Function: Genetic and Environmental Mechanisms. [Hrsg.] Department of Oral Facial Development, Indiana University School of Dentistry, Indianapolis, IN, USA Section of Orthodontics. *Seminars in Orthod.* 1(2), 100-122.
54. **Kyrkanides, S.** 2007. The Cranial Base in Craniofacial Development: a Gene Therapy Study. *J Dent Res.* 86(10), 956-961.
55. **Mulisch M, Welsch U.** 2010. *Romeis - Mikroskopische Technik.* Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag.
56. **Fanghänel J.** 2011. *persönliche Kommunikation.* Regensburg.
57. **Matteson SR, Nummikoski P, Langlais RP, Deahl T, Langland O, DeVoise S, Campbell P, Kalkwarf KL, Howe JP.** *ImageTool 3.0.* Texas : Department of Dental Diagnostic Science alt University of Texas Health Science Center.
58. **Maurer, M.** 2010. Entwicklungsabhängige Genexpressionsanalyse der Synchondrosis sphenoccipitalis als basiskraniales Wachstumszentrum. Eine tierexperimentelle Studie.
59. **Wang Y, Cheng Z, Elalieh HZ, Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S, Clemens TL, Bikle DD, Chang W.** 2001. IGF-1R Signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. *J Bone Miner Res.* 26(7), 1437-1446.
60. **Bleich S, Lenz B, Ziegenbein M, Beutler S, Frieling H, Kornhuber J, Bönsch D.** 2006. Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces down-regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 30(4), 587-591.
61. **Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetsky VS, Etem E.** 2007. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. *Int J Dev Neurosci.* 25(3), 133-139.
62. **Koz ST, Gouwy NT, Demir N, Nedzvetsky VS, Etem E, Baydas G.** 2010. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. *Int J Dev Neurosci.* 28(4), 325-329.

63. **Lamprecht S, Lipkin M.** 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms - Folate in one-carbon metabolism. *Nature Reviews Cancer.* 3, 601-614.
64. **Dorfman D, DiRocco A, Simpson D, Tagliati M, Tanners L, Moise J.** 1997. Oral methionine may improve neuropsychological function in patients with AIDS myelopathy: results of an open-label trial. *AIDS.* 11(8), 1066-1067.
65. **Dudman NP, Temple SE, Guo XW, Fu W, Perry MA.** 1999. Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats in vivo. *Circulation Research.* 84, 409-416.
66. **McAuley DF, Hanratty CG, McGurk C, Nugent AG, Johnston GD.** 1999. Effect of methionine supplementation on endothelial function, plasma homocysteine, and lipid peroxidation. *J Toxicol Clin Toxicol.* 37, 435-440.
67. **Pietrzik K, Brönstrup A.** 1997. The role of homocysteine, folate and other B-vitamins in the development of atherosclerosis. *Arch Latinoam Nutr.* 47, 9-12.
68. **Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM.** 1998. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 55(11), 1449-1455.
69. **Hirano K, Ogihara T, Miki M, Yasuda H, Tamai H, Kawamura N, Mino M.** 1994. Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Res.* 21, 267-276.
70. **Zhao W, Mosley BS, Cleves MA, Melnyk S, James SJ, Hobbs CA.** 2006. Neural tube defects and maternal biomarkers of folate, homocysteine, and glutathione metabolism. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 76(4), 230-236.
71. **Meigs JB, Jacques PF, Selhub J, Singer DE, Nathan DM, Rifai N, D'Agostino RB Sr, Wilson PW.** 2001. Fasting plasma homocysteine levels in the insulin resistance syndrome: the Framingham offspring study. *Diabetes Care.* 24(8), 1403-1410.
72. **Krumdieck CL, Prince CW.** 2000. Mechanisms of Homocysteine Toxicity on Connective Tissues: Implications for the Morbidity of Aging. *J Nutrit.* 130(2), 365-368.
73. **Tang M, Mao JJ.** 2006. Matrix and gene expression in the rat cranial base growth plate. *Cell and Tiss Res.* 324(3), 467-474.
74. **Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, Pelletier JP.** 1998. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res.* 47(3), 90-100.
75. **Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL.** 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *New Engl J Med.* 359, 61-73.
76. **Cooney CA, Dave AA, Wolff GL.** 2002. Maternal Methyl Supplements in Mice Affect Epigenetic Variation and DNA Methylation of Offspring. *J. Nutr.* 132, 2393-2400.
77. **Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM.** 2004. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Upd.* 10(1), 3-18.

78. **Jaenisch R, Bird A.** 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 33, 245-254.
79. **Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H.** 1992. CpG Islands as Gene Markers in the Human Genome. *Genomics.* 13(4), 1095-1107.
80. **Miranda TB, Jones PA.** 2007. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell.* 213(2), 384-390.
81. **Illingworth RS, Bird AP.** 2009. CpG islands – ‘A rough guide’. 583(11), 1713-1720 .
82. **Bastian, PJ, Ellinger J, Rücker A, Müller SC, Yegnasubramanian S, Nelson WG, Stief CG.** 2008. CpG-Insel-Hypermethylierung der DNA. *Urologe.* 47, 1205–1207.
83. **Haaf T.** 2006. Epigenetic Genome Reprogramming in the Germ Line and in the Early Embryo: Implications for Reproductive Medicine. *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 3(3), 136–40.
84. **Mann MRW, Lee SS, Doherty AS, Verona RI, Nolen LD, Schultz RM, Bartolomei MS.** 2004. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development.* 131, 3727-3735.
85. **Guidotti A, Ruzicka W, Grayson DR, Veldic M, Pinna G, Davis JM, Costa E.** 2007. S-adenosyl methionine and DNA methyltransferase-1 mRNA overexpression in psychosis. *Neuroreport.* 18(1), 57-60.
86. **Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DIK.** 2006. Germ-line epigenetic modification of the murine Avy allele by nutritional supplementation. 103 (46), 17308–17312.
87. **Waterland, R.A.** 2006. Assessing the Effects of High Methionine Intake on DNA Methylation. *J. Nutr.* 136, 1706-1710.
88. **Attwood JT, Yung RL, Richardson BC.** 2002. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell and Molec Life Sciences.* 59, 241–257.
89. **Bastian PJ, Waha A, Müller SC, Rücker A.** 2004. Epigenetische Veränderungen in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms. *Dtsch. Ärztebl.* 101(27), A1981-A1985.
90. **Detich N, Hamm S, Just G, Knox JD, Szyf M.** 2003. The methyl donor S-Adenosylmethionine inhibits active demethylation of DNA: a candidate novel mechanism for the pharmacological effects of S-Adenosylmethionine. *J Biol Chem.* 278(23), 20812-20820.
91. **Pascale R, Simile MM, Ruggiu ME, Seddaiu MA, Satta G, Sequenza MJ, Daino L, Vannini MG, Lai P, Feo F.** 1991. Reversal by 5-azacytidine of the S-adenosyl-L-methionine-induced inhibition of the development of putative preneoplastic foci in rat liver carcinogenesis. *Cancer Lett.* 56(3), 259-265.
92. **Wolffe AP, Matzke MA.** 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science.* 286(5439), 481-486.
93. **Huang YW, Huang TH, Wang LS.** 2010. Profiling DNA Methylomes from Microarray to Genome-Scale Sequencing. *Technol in Cancer Res & Treatm.* 9(2), 139-147

94. **Aumüller, G.** 2007. *Anatomie - Duale Reihe*. A Bob und K Bob. Stuttgart : G. Thieme, 976.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 4: Gesichtsentwicklung (verändert nach „Anatomie - Duale Reihe“)	11
Abb. 5 a-d: Der Schädel im Verlauf der Entwicklung	15
Abb. 6: Ansicht der Zonenaufteilung in der Synchronchondrosis sphenooccipitalis einer Ratte (Pentachrom-Färbung)	19
Abb. 4: Kontrolle der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung durch die Transkriptionsfaktoren SOX9 und Runx2 (verändert nach A. Hofmann et al.)	23
Abb. 5: Schädelbasis – „Stemmkörperwirkung“ der Synchronchondrosis sphenooccipitalis (verändert nach „Kieferorthopädie I“ – PDZ 11)	25
Abb. 6: Pentachrom-Färbung nach Movat-Knorpel	36
Abb. 7: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) - Knorpel	38
Abb. 8: ImageTool Version. 3.0	41
Abb. 9: Gewicht & Glukosespiegel - Tag 10 und Tag 20	42
Abb.10: Schnittfläche der Synchronchondrosis sphenooccipitalis bei den Kontrolltieren am Tag 10 und 20 postnatal bei 2X Vergrößerung	43
Abb.11: Schnittfläche der Synchronchondrosis sphenooccipitalis bei den Testtieren am Tag 10 und 20 postnatal bei 2X Vergrößerung	44
Abb.12: Flächen der Synchronchondrosen Tag 10 und Tag 20	45
Abb.13: Zelldichte der Chondrone	46
Abb.14: Sichtfelder aus den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten, sphenooccipitalen Synchronchondrosen vom 10. postnatalen bei 40xVergrößerung	47
Abb.15: Kollagen Typ X-Genexpression Tag 10	48
Abb.16: Runx2-Genexpression Tag 10	49
Abb.17: IGF-1 Serumkonzentration Tag 20	50
Abb.18: Absorbanzwerte bei 450 nm für methylierte DNA	52
Abb.19: Der Methionin-Zyklus - (verändert nach Sergio A. Lamprecht & Martin Lipkin)	55

Tab. 1: Futterzusammensetzung.....	29
Tab.2a: Mastermix 1 zur Elimination genomischer DNA.....	31
Tab.2b: Mastermix 2 für Reverse Transkription.....	31
Tab.3: Verwendete Primer mit Sequenz und Akzessionsnummer.....	32
Tab. 4: PCR-Reaktionsbedingungen.....	33
Tab. 5: Arbeitsprotokoll - Pentachromfärbung.....	37
Tab. 6: Arbeitsprotokoll - Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	39

9 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 und die sehr engagierte Betreuung dieser Dissertation. Außerdem bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Fanghänel für die zusätzliche Korrektur meiner Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mein Studium ermöglicht haben und mich auch darüber hinaus unterstützten.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Achim Farrenkopf

Wohnort: Rotteneckstr. 35, 93053 Regensburg

Geburtsdatum: 01.05.1982

Geburtsort: Neuss

Eltern: Dr. med. Ulrike Schwanitz-Farrenkopf
Dr. med. dent. Hans-Jochem Farrenkopf

Geschwister: Dipl.-Ing. Michael Farrenkopf (Architekt)
Niclas Farrenkopf (Student)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbesuch:

09/1988 – 07/1992 St. – Konrad Grundschule , Neuss Gnadental

09/ 1992 – 06/ 2001 Quirinus Gymnasium, Neuss; Abitur

Zivildienst:

08/2001 – 07/2002 Rotes Kreuz, Neuss Reuschenberg

Ausbildung:

07/ 2002 – 07/2005 Zahntechnik – Ausbildung , Dentallabor:
Andres Bernhardt, Düsseldorf; Gesellenbrief

Studium:

10/2005 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg

09/ 2006 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

03/ 2008 Zahnärztliche Vorprüfung

12/2010 Staatsexamen Zahnmedizin / Approbation

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe, und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.