

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik
für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor : Prof. Dr. Dr. Schubert)

Entwicklung eines Organkulturmodells des embryonalen Gaumens der Maus

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Schubert
geboren am 01.11.1970 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter :

1. Prof. Dr. Dr. Schubert
2. Prof. Dr. Dr. Gundlach

eingereicht am: 02.09.2008
verteidigt am: 04.03.2009

Gewidmet

Meiner Familie

Referat

Der Verschluss des sekundären Gaumens der Maus unter in vitro Bedingungen wurde an 114 Feten von 17 Muttertieren des NMRI-Stammes und 93 Feten von 30 Muttertieren des A/WySnJ-Stammes untersucht.

Für das Organkulturmodell wurden die Muttertiere nach 14 Tagen und 6 Stunden ($\pm 1,5$) post conceptionem getötet und die Feten nach der Mikrosektion entnommen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil ein Gaumenverschluss in vivo noch nicht stattgefunden hat, aber der Verschluss unmittelbar bevorsteht.

Die Präparate wurden für 72 Stunden bei 37 °C, 98 % Luftfeuchte und unter Zugabe von 5 % CO₂ inkubiert und eine makrophotographische Dokumentation jeweils vor und nach der Inkubation durchgeführt.

Für die Definition der einzelnen Verschlusszustände des Gaumens ist ein 6-stufiges Scoresystem entwickelt worden, welches auf AL-OBAIDI (1995) zurückgeht und detailliert die wesentlichsten Entwicklungsstufen wiedergibt.

Für ausgewählte Fälle sind Präparate zusätzlich histologisch aufbereitet worden, um so die Ergebnisse zu präzisieren.

53% der Präparate des NMRI-Stammes erreichten einen Verschluss von mindestens 2/3 der Gaumenplattenfläche bei einem durchschnittlichen Ausgangsscorewert von 4 (erster Plattenkontakt) und nur 13% des A/WySnJ-Stammes bei einem mittleren Anfangswert von Score 2 (deutliches Auseinanderweichen der Platten). Die statistische Auswertung ergab ein deutliches und signifikantes Wachstum der Gaumenplattenpaare des NMRI Stammes, während beim A/WySnJ-Stamm keine signifikante progressive Entwicklung stattfand. Der sekundären Gaumen des NMRI-Stammes wies zu beiden Dokumentationszeitpunkten einen signifikant höheren Entwicklungsgrad auf. Bei der bekannten genetischen Disposition zur Spaltbildung fanden sich beim A/WySnJ-Stamm auch körperliche Entwicklungsdefizite im Bezug auf die Größe der Tiere und ihrer einzelnen Kompartimente.

Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse anderer Forschergruppen erwies sich als schwierig, da die verwendeten Mäusestämme verschieden und die Versuchsbedingungen nicht einheitlich waren.

Bibliographische Beschreibung

Schubert, Andreas: Entwicklung eines Organkulturmodells des embryonalen Gaumens der Maus

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Zielstellung	3
2	Literaturüberblick	4
2.1	Äthiologie und Einteilung der Spalten des Gesichtsschädels	4
2.1.1	Genetische Disposition zur Merkmalsausbildung	4
2.1.2	Multifaktorielles System mit Schwellenwerteffekt	5
2.1.3	Peristatische Einflüsse auf die Spaltbildung	6
2.1.4	Klassifikation der Spalten	8
2.1.5	Häufigkeit des Auftretens von Spalten	9
2.2	Embryogenese des sekundären Gaumens	11
2.2.1	Wachstum und Aufrichten der Gaumenplatten	11
2.2.2	Fusion der Gaumenplattenpaare	13
2.2.3	Geninduzierte Signaltransduktion während der Embryogenese	14
2.3	Kulturmodelle des sekundären Gaumens der Maus	16
2.3.1	Genetisch alterierte Mausmodelle	16
2.3.2	Suspensionsorgankulturen des sekundären Gaumens	18
3	Material und Methodik	20
3.1	Eigene Untersuchungen	20
3.1.1	Haltung der Versuchstiere	20
3.1.2	Ablauf der Untersuchung	21
3.1.2.1	Präparation der Feten	21
3.1.2.2	Photodokumentation und Einteilung der Präparate in das Scoresystem	22
3.1.2.3	Kultivierung der Präparate	25
3.1.2.4	Dokumentationen mittels histologischen Schnitten	26
3.2	Statistische Testverfahren	27

4	Ergebnisse	28
4.1	Entwicklung der Gaumenplatten der NMRI-Maus	28
4.1.1	Fusionsgrad vor der Inkubation	28
4.1.2	Fusionsgrad nach der Inkubation	29
4.1.3	Entwicklungsdifferenz der Präparate der NMRI-Maus	31
4.2	Entwicklung der Gaumenplatten der A/WySnJ-Maus	32
4.2.1	Fusionsgrad vor der Inkubation	32
4.2.2	Fusionsgrad nach der Inkubation	33
4.2.3	Entwicklungsdifferenz der Präparate der A/WySnJ-Maus	34
4.3	Statistische Auswertung	36
4.3.1	NMRI-Stamm	36
4.3.2	A/WySnJ-Stamm	37
4.3.3	Statistischer Vergleich der Scorewerte beider Stämme	38
4.3.4	Lineares Modell der Scoreentwicklung der Präparate	41
5	Diskussion	42
6.	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	60
8	Thesen	77
9	Lebenslauf	79
10	Selbstständigkeitserklärung	80
11	Danksagungen	81

Abkürzungsverzeichnis

Ahr	Acryl-hydrocarbon receptor
Alk5	Activin receptor like kinase 5
BMP	Bone morphogenetic protein
Bzd`s	Benzodiazepines
CHX	Cycloheximide
Cp1	Cleft palate 1
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
DEX	Dexamethasone
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EMT	Epithelial mesenchymale transformation
FBS	Fetales bovines Serum
Fgf10	Fibroblast growth factor 10
Fgfr	Fibroblast growth factor receptor
GABA	Gamma-aminobutyric acid
Ham`s F12	Nutrient mixture
HC	Hydrocortisone
Hoxa-2	Homeobox a2
HV	Hydroxy isovaleric acid
Inbred strain	Inzuchtstamm
Irf6	Interferon regulatory factor 6
LKG	Lippen-Kiefer-Gaumenspalten
LKGS	Lippen-Kiefer-Gaumen-Segelspalten
MC	Methyl crotonic acid
MEE	Middle edged epithel
MFT	Multifactorial threshold model
MMP	Matrix metalloproteinase
MSX1	Human homeobox gene 1
Outbred strain	Auszuchtstamm
PA	Propionic acid
P.c.	Post conceptionem
Ptc	Patched homolog 1
Pvrl1	Poliovirus receptor related 1

RA	Retinoid acid
Rpm	Umdrehung pro Minute
SATB2	SATB family member 2
Shh Gen	Sonic hedgehog gene
Shox 2 Gen	Short stature homeobox gene
Smad2	Smad pathway2
TBX22	T-box 22
TCDD	Tetrachlordibenzo-p-dioxin
Tgfb3	Transforming growth factor β 3
TRI	Triamcinolone

1 Einleitung

Bereits aus archäologischen Funden des hippokratischen Zeitalters sind Zeugnisse von Fehlbildungen im Gaumenbereich bekannt. Das Problem der Spaltbildung ist also keineswegs ein neuzeitliches. Schon damals hatte man sich Gedanken über die Zusammenhänge der Entstehung solcher Defekte gemacht. Als Hauptursache sah man insbesondere Mond- und Sonnenfinsternis (ANDRÄ 1989).

Die Verdreifachung der Häufigkeit im Laufe der letzten hundert Jahre (HORCH 1998) belegt die zunehmend große Bedeutung der Prävention und Rehabilitation der Lippen- Kiefer- Gaumenspalten. Trotz aller Erfolge bedürfen die ästhetischen und funktionellen Störungen des kraniofazialen Systems durch Spalten auch heute noch eines aufwendigen und teils sehr langwierigen Behandlungsverlaufes, der den Patienten sowie dessen Angehörige auch vor psychische und soziale Probleme stellt.

Die Forschung über die Mechanismen der Spaltbildungen und deren Vermeidung beruhte zunächst vor allem auf Beobachtungen und empirischen Studien. In deren Folge wurde versucht, eine Klassifizierung der verschiedenen Spalttypen zu erreichen und unterschiedliche Vererbungsmuster durch Sippen- und Konkordanzversuche zu stützen (DAVIS und RICHIE 1922, FOGH-ANDERSEN 1942, KOCH 1963, GYLLING 1962, BETHMANN und KOCH 1963, PFEIFER 1966).

Seit sich die experimentelle Teratologie immer mehr auch auf morphogenetischem Gebiet etabliert hatte, richtete sich das Augenmerk zunehmend auf die Untersuchung an Tiermodellen. Das Tierexperiment hat sich seit den 80-iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts als wichtiges und unverzichtbares Instrument für die Forschung in der Embryologie, Pathologie, Pharmakologie und Teratologie durchgesetzt (SHAW et al. 1978, SCHUBERT 1980, SCOTT et al. 1981, PAROS 1999, BRENT et al. 2004).

Seit dieser Zeit wurde versucht, Modelle zu entwickeln, die ein Verständnis der Entstehungs- und Entwicklungsabläufe verschiedener Organsysteme und ihrer Reaktion auf äußere Einflüsse wiedergeben.

Durch die tierexperimentelle Arbeit als Grundlagenforschung sollten die Organogenese und ihre pathologischen Zusammenhänge aufgedeckt werden,

um so gezielt in ihre Prozesse eingreifen und diese regulieren zu können. Damit diese Erkenntnisse später auf die menschliche Organentwicklung und deren Fehlbildungen und Erkrankungen übertragen werden können, wurden geeignete Vertreter gesucht, welche die selben Entwicklungsmodi aufweisen und in adäquater Weise auf exogene und endogene Einflüsse reagieren wie der menschliche Organismus.

Insbesondere das Mausmodell hat sich wegen günstiger Haltungs- und Reproduktionsbedingungen und einer Vergleichbarkeit mit der menschlichen Morphogenese sowie der phylogenetischen Verwandtschaft beim Ablauf vieler physiologischer und pathologischer Mechanismen durchgesetzt (FERGUSON 1988, DASTON et al. 1997).

Der Gaumenverschluss liegt beispielsweise bei Menschen und Mäusen (siehe Tab. 1) im Stadium der Organogenese an der Grenze zwischen Embryonal- und Fetalzeit der intrauterinen Entwicklung (SCHUBERT 1980). Mäuse entwickeln, ebenso wie Menschen, natürliche Krankheiten, die auch vergleichbare Systeme betreffen (SPENCER 2002). Bei einigen Substanzen, von denen man weiß, dass sie bei Menschen teratogen wirken, reagieren Mäuse ebenfalls in adäquater Weise (DASTON et al. 1997).

Außerdem zeigen sie für viele Fehlbildungen, beispielsweise bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, gleiche phänotypische Merkmale. Das bezieht sich sowohl auf die Häufigkeit wie auch auf die Ausprägung des Merkmals (SYSKA 2000).

Tab.1: Embryonale Entwicklung von Mensch und Maus (mod. nach KREYBIG 1968, 1970)

Spezies	Embryonale Periode	Frühe fetale Periode	Späte fetale Periode	
Maus	10. – 12. Tag	12,5 – 14. Tag	15. Tag	Bis zur Geburt
Mensch	26. – 42. Tag	42. – 90. Tag	90. Tag	

Zielstellung

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es, ein Organkulturmodell der Maus zu entwickeln, das es ermöglicht, einen unmittelbaren Einfluss von teratogenen Noxen und präventiver Substanzen auf die Zielstruktur embryonaler Gaumenentwicklung zu untersuchen. Damit werden die Einflüsse des maternalen Organismus umgangen und die Ergebnisse der embryonalen bzw. fetalen genetischen Veranlagung sichtbar. Im Detail geht es um die Frage, ob eine Fusion bzw. Annäherung der Platten des sekundären Gaumens erreicht werden kann bzw. in welchem Maße sich die embryonale Entwicklung *in vitro* unter Standardkulturbedingungen fortsetzt.

Das Organkulturmodell soll aus zwei Mäusestämmen etabliert werden. Der A/WySnJ-Mausstamm ist mit einer Fehlbildung des Gaumens belastet, die mit einem genetischen Defekt korreliert. Dieser findet sich ebenso beim Menschen wieder (JURILOFF 1976, KALTER 1979).

Als weiteren Mäusestamm haben wir den NMRI-Stamm verwandt, der mit einer spontanen Fehlbildungsrate von nur 2 - 3 % keine erbliche Disposition aufweist. Durch die Verwendung embryonaler Strukturen zweier genetisch unterschiedlicher Mäusestämmen soll auch der Einfluss intrinsischer Faktoren auf die Spaltbildung betrachtet werden.

Ausserdem gilt es zu diskutieren, welche Auswirkungen extrinsische Einflüsse auf die Fusionsrate unter *in vitro* Bedingungen haben. Insbesondere sind das die Kontaktzeit der Gaumenplattenpaare (DIEWERT und WANG 1992), die Art der Präparation der Kulturmodelle (BRINKLEY 1978, TAYA et al. 1999) und der Entnahmezeitpunkt der Feten (DIEWERT 1992, GONG et al. 2001, SYSKA 2000).

Das Modell soll weiterhin standardisiert und reproduzierbar sein und den Anforderungen moderner *in vitro* Suspensionskulturverfahren gerecht werden, um somit eine hohe Effizienz bei geringem Kosten- und Materialaufwand zu gewährleisten.

2 *Literaturüberblick*

2.1 *Ätiologie und Einteilung der Spalten des Gesichtsschädels*

2.1.1 *Genetische Disposition zur Merkmalsausbildung*

Das genaue Entstehungsmuster der LKG ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht einheitlich erklärbar. Dass es sich bei der Vererbung um die wesentlichste Komponente aller ätiologischen Faktoren handelt, ist nahezu unbestritten. Darauf verweisen bereits Zuchtexperimente an Mäusen aus früheren Jahren (REED 1940, STEININGER 1940) und Hunden (VEAU 1942).

Deutliche Häufigkeitsunterschiede zeigen sich weltweit. So wird für Japan eine relativ höhere Anzahl von Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten in einem Verhältnis von 1:370 bis 470 berichtet. Dagegen sind Spaltfehlbildungen in der afrikanischen Bevölkerung mit einem Verhältnis von 1:2700 und in der schwarzen amerikanischen Bevölkerung mit 1:2200 bis 4400 deutlich seltener. Eine Übersicht dazu bietet Tab.2.

Tab. 2: *Rassische Unterschiede der Spalthäufigkeit (nach SCHUBERT 1994)*

Rasse und Herkunft	Relation pro Lebendgeburt	Publikationsjahr
negride Rasse	Afrika	1: 2703
	Amerika	1: 2273
weiße Rasse	Finnland	1: 630
	Slowakei	1:592
	Mitteleuropa	1: 513
	Amerika	1: 500
	Norwegen	1: 481
	DDR	1: 458
Indianer	Nordamerika	1: 400
Asiaten	Japan	1: 373

2.1.2 Multifaktorielles System mit Schwellenwerteffekt

Die Entstehung der meisten menschlichen Fehlbildungen ist auf das Zusammenwirken exogener und endogener Wirkungen zurückzuführen (Schubert 1980, 1986, 1990).

Eines der hierfür am weitesten verbreiteten Modelle ist das multifaktorielle System mit Schwellenwerteffekt - MFT.

Es wurde erstmals von FALCONER (1965) beschrieben und von CARTER (1969) und FRASER (1976) erweitert. Allgemein gilt für multifaktoriell bedingte Erkrankungen, dass die Neigung zur Ausbildung eines Merkmals der Gauß'schen Normalverteilung folgt. Daraus kann man eine kontinuierliche Streuung innerhalb der Bevölkerung ableiten. Die Manifestation der Erkrankung erfolgt für einen bestimmten Prozentsatz der Bevölkerung jenseits einer Schwelle (siehe Abb. 1). Vermehrte exogene Faktoren und verwandtschaftliche Verhältnisse verschieben die Schwelle näher zum Medianwert und erhöhen so die Inzidenz (KURISU et al. 1974, SAXEN 1975). Präventive Einflüsse bewirken das Gegenteil.

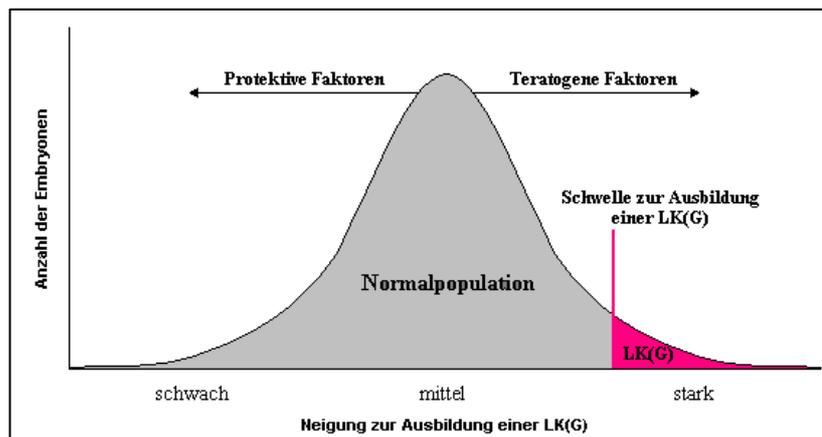


Abb.1: Das multifaktorielle Schwellenmodell mit dem Einfluss protektiver und teratogener Faktoren (aus KROST 2001)

2.1.3 Peristatische Einflüsse auf die Spaltbildung

Schädliche exogene Einflüsse können im Zeitraum der Verschmelzung der Gesichtswülste eine teratogene Wirkung entfalten. Dabei spielt Sauerstoffmangel eine zentrale Rolle (PFEIFER 1966). Begründet wird dies durch den erhöhten O₂- und Substratbedarf während der vermehrten Zellteilung und Proliferation. Die kritische Phase liegt für den primären Gaumen des Menschen in der 6. Embryonalwoche (36. - 42. Tag) und für den sekundären Gaumens in der 8. Schwangerschaftswoche (49. - 56./58. Tag).

Es existieren verschiedene exogene Noxen, von denen Genussgifte wie Alkohol und Nikotin, Medikamente und Drogen, aber auch die Exposition von ionisierenden Strahlen eine wesentliche Rolle spielen. Einige Erkrankungen sind in der Lage, eine inhibitorische Wirkung auf die Palatogenese auszuüben. Dazu zählen Virus-, Allgemein- und Stoffwechselerkrankungen. Seelische Belastungen und starke Exposition von Lärm innerhalb der ersten Schwangerschaftsmonate können auch als äußere Faktoren angesehen werden (GABKA 1964).

Eine detaillierte Übersicht verschiedener Einflüsse auf die Spaltbildung, der Autoren und der Untersuchungsart ist nachfolgend in der Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Zusammenfassung teratogener peristatischer Einflüsse, die Spalten des Gaumens auslösen können

Teratogene Noxen	Autoren	Untersuchungsart
1. Arzneimittel <ul style="list-style-type: none"> • Kortison • Antibiotika • Zytostatika • Retinoide • Antiepileptika • Thymidine 	WINKLER 2003 KÄLLÈN 2005 ADAMS und LAHMER 1991 HOLMES und HARVEY 2001 WIDE und WINBLAD, KÄLLÈN 2001	Therapie von Hypert. Gravid. Retrospektive klinische Studie Klinische Studie Retrospektive klinische Studie
2. Mütterliches Rauchen	ROMITTI 1999 ANDREWS und MC GARRY 1972	Fall-Kontroll-Studie Kontrollstudie
3. Mütterlicher Alkoholkonsum	ROMITTI 1999	Fall-Kontroll-Studie
4. Dysplastische Faktoren	BETHMANN 1975 WOOLF 1963 DONAHUE 1965	Retrospektive und Fall-Kontrollstudie
5. Saisonale Einflüsse	SAUNI 1962 CERVENKA 1996 KROST 2001	Retrospektive und Fall-Kontroll-Studien
6. Ionisierende Strahlung	SCHUBERT 1960 HIRAHUMA 2000	Experimentelle Studie
7. Andere Einflüsse <ul style="list-style-type: none"> • Lärm • Stress 	STRAßBURG 1968 LENZ 1976	Experimentelle Studie Retrospektive Studie
8. Mangelernährung der Mutter	SHAW 1995 TOLAROVA 1998 ANDREWS 1998	Experimentelle Studie

2.1.4 Klassifikation der Spalten

Die ersten Versuche, eine einheitliche Entität zu etablieren, wurden 1922 von DAVIS und RICHIE unternommen. Sie teilten die Spalten in prä- und postalveoläre-, sowie durchgehende Spalten ein. Hierbei handelte es sich um eine rein anatomische Gliederung, deshalb auch der Terminus „Anatomische Nomenklatur“. Im Jahre 1931 wurde von VEAU eine ebenfalls anatomische Gliederung in 4 Gruppen eingeführt. Diese unterscheidet Segelspalten, Gaumen- und Segelspalten, einseitige und doppelseitige durchgehende LKGS (VEAU 1931). Lippen-Kieferspalten blieben bei dieser Einteilung unberücksichtigt. Außerdem gab dieses Schema das morphologische Spektrum nur unzureichend wieder.

Ab 1942 hat sich die Einteilung der LKGS ihrer embryonalen Entwicklung entsprechend durchgesetzt (FOGH-ANDERSEN 1942). Er bezeichnete die Vererbung als wichtigsten Faktor bei der LKG- Spaltgenese und unterschied in diesem Zusammenhang Lippen-, Lippen-Kiefer-, und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Typ I) und von isolierten Gaumenspalten (Typ II). Diese Einteilung nahm man in die „Internationale Klassifikation der Krankheiten“ auf und legitimierte sie durch die WHO weltweit. Eine Modifikation erfolgte in den 60-iger Jahren (siehe Tab. 4)

*Tab. 4 Internationale Klassifikation von Rom basierend auf der Embryologie
(mod. nach PFEIFER et al. 1981)*

Gruppe 1 Spaltformen des vorderen (primären) embryonalen Gaumens

- Lippe uni- und bilateral
- Lippe und Kiefer uni- und bilateral

Gruppe 2 Spaltformen des vorderen und hinteren (primären und sekundären) embryonalen Gaumens

- Lippe uni- und bilateral
- Lippe und Kiefer uni- und bilateral
- Harter Gaumen uni- und bilateral
- Weicher Gaumen median

Gruppe 3 Spaltformen des hinteren (sekundären) embryonalen Gaumens

- Harter Gaumen uni- und bilateral
- Weicher Gaumen median

Gruppe 4 seltene Gesichtsspalten

Weitere Gliederung in „totale“ und „partielle“ Spalten

2.1.5. Häufigkeit des Auftretens von Spalten

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten gehören mit 15 % zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Menschen (IDEBERG 1989).

Es gibt geographische und ethnische Unterschiede im Auftreten. In der Bevölkerung der Ureinwohner Australiens, Amerikas, Kanadas, Indiens und in der Bevölkerung asiatischer Abstammung treten Spalten häufiger auf. Die wenigsten Spalten findet man bei der afrikanischen Bevölkerung. Die europäische Bevölkerung liegt im Mittelfeld (vergl. Tab. 2).

In der Literatur werden über die einzelnen Spaltformen und -kombinationen unterschiedliche Häufigkeitsangaben gemacht. Am zahlreichsten treten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auf (40 bis 65 %), wobei die linke Seite zweimal so oft befallen ist wie die rechte Seite. Lippen- und Lippen-Kieferspalten werden mit 20 bis 25 % der Fälle, isolierte Gaumenspalten mit 30 % der Fälle angegeben (The European Collaboration on Craniofacial Anomalies [www.eurocran.org], 2003).

Tab 5: Häufigkeit der Lippen- Kiefer- Gaumenspalten (aus dem Bericht von EUROCAT Congenital Anomalies and Public Health)

EUROCAT European Surveillance of Congenital Anomalies	1996 - 2001	
Bezeichnung	Häufigkeit pro 10 000	1 von x Geborenen
Lippenspalte mit / ohne Gaumenspalte	9,11	1098
Gaumenspalte	5,84	1712
alle Spalten	14,95	669

WHO IDCFA International Database of Craniofacial Anomalies	2001 - 2002 (2003)	
Bezeichnung	Häufigkeit pro 10 000	1 von x Geborenen
Lippenspalte ohne Gaumenspalte	3,7	2702
Lippenspalte mit Gaumenspalte	8,0	1250
Lippenspalte mit / ohne Gaumenspalte	11,8	847
Gaumenspalte	4,9	2041
alle Spalten	16,7	599

WHO IDCFA International Database of Craniofacial Anomalies	2001 - 2002 (2003)
Bezeichnung	Verhältnis Jungen / Mädchen
Lippenspalte mit / ohne Gaumenspalte	1,56
Gaumenspalte	0,75

2.2 Embryogenese des sekundären Gaumens

2.2.1 Wachstum und Aufrichten der Gaumenplatten

Nach der Befruchtung der Eizelle wird eine Kaskade präzise koordinierter Abläufe in die Wege geleitet, die sich aus Zellmigration, Zellwachstum und Differenzierung sowie Apoptose zusammensetzt. Diese Prozesse bedingen u.a. die Entwicklung der kraniofazialen Strukturen und sind für alle Säugetiere prinzipiell gleich (KERRIGAN 2000, MOXHAM 2003).

Die Entstehung des sekundären Gaumens des Menschen, der annähernd 90 % des harten und weichen Gaumens umfasst, beginnt am Ende der 5. Embryonalwoche und ist etwa in der 10. Woche komplett abgeschlossen. Bei Mäusen finden diese Vorgänge in adäquater Weise statt und sind stammesabhängig um den 15. Tag nach der Konzeption beendet (FERGUSON 1988, KOSAZUMA 1990).

In der Frühphase der Gaumenentwicklung wandern mesenchymale Zellen von der Neuralleiste in die primitive Mundhöhle und bilden die Oberkieferfortsätze zusammen mit dem kranio-pharyngealen Ektoderm. Die zwei Platten des sekundären Gaumens wachsen von diesen Fortsätzen ausgehend und bedingt durch die eingeengten Platzverhältnisse der sich entwickelnden Zunge (siehe Abb.2) zunächst in vertikaler Richtung (KERRIGAN et al. 2000).



Abb. 2: 7 Wochen alter Embryo mit eingeengten Platzverhältnissen in der primären Mundhöhle durch die Zunge (aus MOXHAM 2003)

FERGUSON unterbreitete schon 1981 die These, dass die Wachstumsrichtung in Relation zu den Platzverhältnissen im oronasalem Cavum steht. Er postulierte, dass die große und muskulöse Zunge der Säugetiere das Platzangebot für die Gaumenplatten derart begrenzt, dass erst das vertikale Wachstum des Kraniums ein Absenken der Zunge und somit die Möglichkeit der horizontalen Gaumenentwicklung gewährleistet. Er stellte fest, dass bei jungen Alligatoren, im Gegensatz zu Säugetieren, das Wachstum ausschliesslich in horizontaler Richtung erfolgt. Dies war nach seiner Auffassung auf die verhältnismässig kleinere Alligatorenzunge zurückzuführen. Im übrigen fehlten die lateral begrenzenden Wangen und der Unterkiefer bot den Gaumenplattenpaaren mehr Raum durch eine prämaxilläre Ausbuchtung (FERGUSON et al. 1981).

Durch forciertes Wachstum des Unterkiefers und das damit verbundene Absenken des Zungenkörpers entstehen bei Säugetieren die nötigen Platzverhältnisse, die es den Gaumenplatten ermöglichen, sich in eine horizontale Position einzustellen (siehe Abb.3).

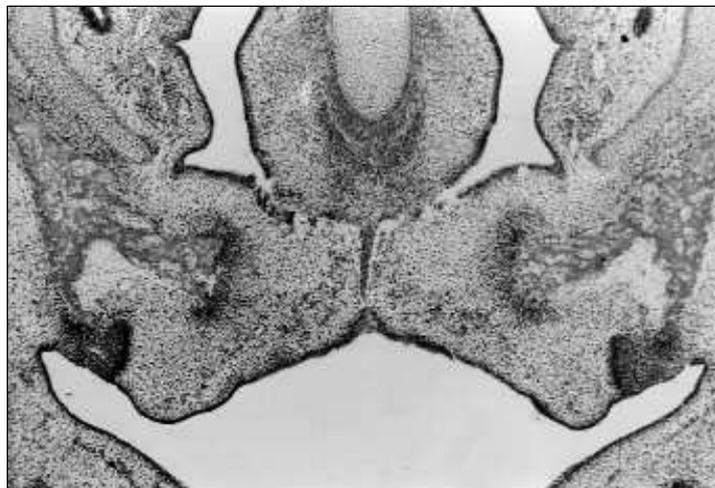


Abb.3: Orientierung der Gaumenplattenpaare und des Nasenseptums nach Absenken der Zunge (aus MOXHAM 2003)

Die Elevation selbst läuft im anterioren Drittel der Gaumenplatten als ein sogenannter schwingender „flip-up“- Mechanismus ab, in den posterioren zwei Dritteln kommt es mehr zu einem remodellierenden „Fluss“ (KERRIGAN et al. 2000). Als treibende Kraft, welche die Elevation vonstatten gehen lässt, beschrieben PRATT et al. (1973) eine Zunahme des Wassergehaltes der extrazellulären Matrix bei deutlich höherer Konzentration an Hyaluronen im anterioren Drittel der Fortsätze. Das Ergebnis dieses Prozesses ist eine Anschwellung der vertikal ausgerichteten Plattenpaare, die damit eine zusammenführend gerichtete Kraft aufbringen. Hyalurone besitzen die Fähigkeit, sich hoch elektrostatisch aufzuladen und somit Wasser in einer Größenordnung von der 10-fachen Menge des eigenen Gewichtes zu binden, und bringen so die nötige intrinsische Kraft zur Plattenaufrichtung auf (MOXHAM 2003).

Unterstützend wirkt sich die Zunahme der Vaskularisation im betroffenen Gebiet aus. Diese ist sowohl für den Transport der benötigten Substanzen wie auch der Produktion erektiler Elemente verantwortlich (GREGG 1971).

Die Plattenaufrichtung ist also das Ergebnis mehrerer Mechanismen, die sich sinnvoll ergänzen.

2.2.2 Fusion der Gaumenplattenpaare

Eine sehr wichtige Rolle in der Orientierung der Gaumenplatten spielt das Epithel, welches um die Ränder angeordnet ist. So fanden BULLEIT und ZIMMERMANN (1985) heraus, dass das orale Epithel, wenn es entfernt worden ist, eine Hemmung der Plattenausrichtung auslöst.

Die Fusion der Platten selbst scheint durch mehrere Zelladhäsionsmoleküle angetrieben zu werden, die ein „aufeinander Zubewegen“ ermöglichen. Als Beispiel seien hier das Nektin 1, die Desmosomen und das Typ-IV Kollagen genannt (COX 2004, MOXHAM 2003).

Der Kontakt der Plattenpaare setzt eine Reihe von Umgestaltungs- und Auflösungsprozessen in Gang, die für die Verschmelzung der Platten nötig sind. Mit der Aktivierung des Matrix Metalloproteinase-2- und 3-Enzyms (MMP) beginnt der Prozess der epithelial- mesenchymalen Umgestaltung (EMT).

Dieser Prozess ist für den Untergang des Epithels in der Fusionszone während der Palatogenese mitverantwortlich (DESPREZ et al. 1993, LOCHTER et al. 1997). Durch das MMP-2 werden beispielsweise fibrilläre Moleküle, wie das Kollagen Typ-I, gespalten. Dieser Prozess findet vorrangig an den Plattenrändern statt (SHAPIRO und SWENEY 1969).

Während der epithelial- mesenchymalen Transformation (HAY 1995) polarisieren sich die Mesenchymzellen in Kontakt mit der extrazellulären Matrix, elongieren und dringen schließlich in die extrazelluläre Matrix ein (OVERTON 1977).

FITCHETT und HAY (1989) studierten die Degeneration des mittleren Randepithels (MEE). Sie stellten eine Veränderung im Phänotyp der Zellen des Saumes von Epithelzellen zu Mesenchymzellen fest. Außerdem fanden sie eine Zunahme des Vimentins. Dabei handelt es sich um ein intermediäres, filamentäres Protein, welches ausschließlich im Mesenchym anzutreffen ist. Die hauptsächlichsten Zell-Zell Verbindungsmoleküle, das E-Katherin und Syndekan-1, sind verschwunden, sobald die Transformation begonnen hat (SUN et al. 1998). Desmosomen und Keratin sind ebenfalls herabreguliert. Das alles geschieht unter dem Einfluss des TGF- β 3 (PROETZEL et al. 1995).

2.2.3 Geninduzierte Signaltransduktion während der Embryogenese

Die Expression von verschiedenen Genen setzt eine Reihe von Wachstums- und Entwicklungsmechanismen in Gang. Dabei besteht ein Informationsaustausch des Epithels mit dem Mesenchym, der in Abb. 4 schematisiert werden soll. Die Figur A zeigt die Schnittrichtung der in Figur B folgenden Entwicklungsstationen. Beginnend mit der vertikalen Lage der Gaumenplatten und der Zunge, die die Mundhöhle vereinnahmt. Durch die Expression des Fgf10-Gens (Figur C) im Mesenchym (hier türkis) wird der Fgfr2b-Rezeptor aktiviert, der sich im Epithel (hier gelb) befindet. Daraufhin kommt es zur Expression des shh-Gens im Epithel, welches die Entwicklung der Gaumenplatten durch Zellproliferation und Wachstum anregt. Nach dem Absenken der Zunge und dem Aufrichten der Gaumenplatten berühren sich die

Platten. Dies aktiviert nachfolgend (Figur D) weitere Gene, in dessen Endkonsequenz die Umgestaltung und Auflösung des Epithels steht. Nach der Umgestaltung wandelt sich das nasale Epithel des Gaumens in pseudogeschichtete ziliare Zellen um, während im oralen Teil eher squamös geschichtete, nicht keratinisierte Zellen vorherrschen (FITCHETT und HAY 1989).

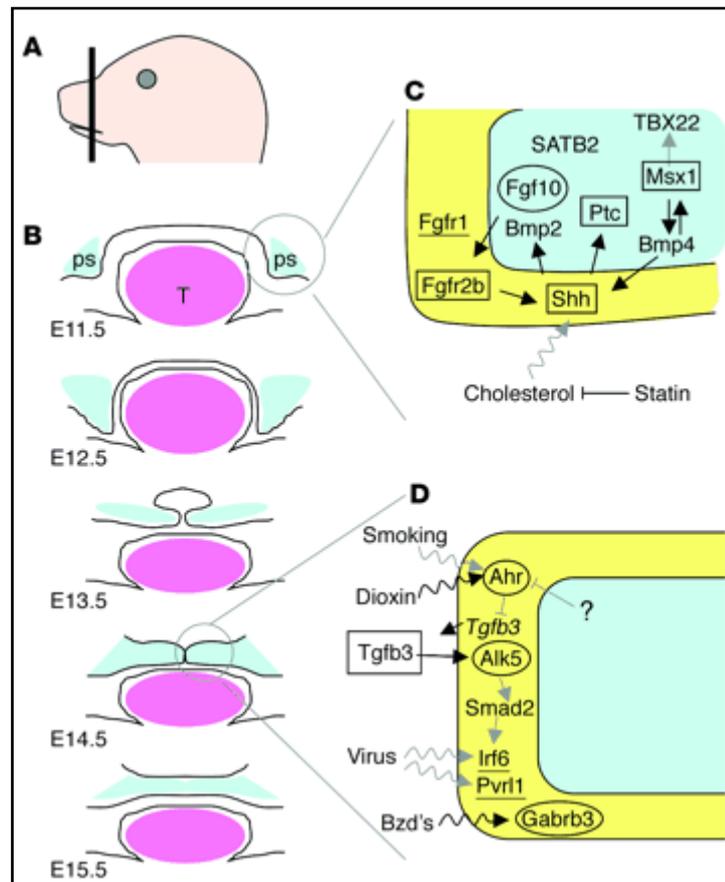


Abb.4: Signalmoleküle sind essentiell für die Gaumenplattenentwicklung (aus MURRAY et al. 2004), Fig. A: Schnittrichtung, Fig. B: Entwicklungszyklen des sekundären Gaumens, Fig. C + D: Signaltransduktion

2.3 Kulturmodelle des sekundären Gaumens der Maus

2.3.1 Genetisch alterierte Mausmodelle

Mausmodelle menschlicher Fehlbildungen werden seit vielen Jahrzehnten für Studien des Entwicklungs- und Pathomechanismus in den Laboratorien weltweit eingesetzt. (BAXTER und FRASER 1950, DARLING 1996, SPENCER 2002). Dabei werden nicht nur Fehlbildungen durch exogene Einflüsse hervorgerufen, sondern auch hereditär bedingte Anomalien nachempfunden.

Um Mäuse mit entsprechenden Merkmalen hervorzubringen, wurden entsprechende Einzelmerkmalsträger miteinander gekreuzt. Für eine stabile Weitergabe von bestimmten Merkmalen der Elterntiere auf ihre Nachkommen werden sogenannte In- als auch Auszuchtstämme verwendet. Die Inzuchtstämme sind durch Kreuzung von Geschwistern untereinander gekennzeichnet. Der AWySnJ-Stamm ist ein Vertreter dieser Art. Im Gegensatz dazu ist ein Auszuchtstamm ein Stamm, der aus 2 genetisch unterschiedlichen Tieren der gleichen Spezies hervorgegangen ist. Hierfür ist der NMRI-Stamm ein typischer Vertreter.

Die so gezüchteten Mäusestämme sind bevorzugte Objekte für die Genforschung. Weitere Spielarten stellen transgene Mäuse und knock-out-Mäuse dar, die nähere Einblicke in die Pathogenese und Behandlungsregime einer Krankheit gestatten. Die gewünschten Mutationen werden zuerst durch homologe Rekombination in Embryonenstammzellen geschaffen, die dann auf alle Zelllinien übergreifen. So kann jede Art der Veränderung in ein Mausgen eingeführt werden (HASTY et al. 1991, WU et al. 1994). Mäuse dieser Art sind aber in den folgenden Untersuchungen nicht eingesetzt worden.

Mit der Zeit haben sich an genetisch veränderten Mäusen eine wachsende Zahl von Genen offenbart, die bei der Entwicklung des Gaumens entscheidend mitwirken (HAGBERG 1998). Man kennt heute ca. 20 Gene, die einen störenden Einfluss ausüben und somit einen Einfluss auf die Spaltentstehung haben (SLAVKIN 1995). Dementsprechend gibt es auch eine Reihe von Mausmodellen mit entsprechenden Genveränderungen (siehe Tab. 6).

Tab.6: Gene, deren Alteration bei Mäusen kraniofaziale Fehlbildungen hervorrufen (aus THYAGARAJAN et al. 2003)

Gen	Mausmodell	Phänotyp	Referenz
T-box (Tbx-1)	KO	Velocardiofaziales Syndrom mit u.a. abnormaler Gesichtsstruktur und Gaumenspalten	JEROME und PAPAIOANNOU 2001
Col-11a1	Chondrodysplastischer Defekt und autosomal-rezessive Mutation	Mandibuläre Wachstumsabnormalitäten mit veränderter Adhärenz und Fusion der Gaumenplatten des sekundären Gaumens	LAVRIN et al. 2001
FGFR-1 und -2	Immunlokalisationsstudien der CD1 Maus	Finden Ausdruck im Epithel der sich entwickelnden Gaumenplatten	LEE et al. 2001
Sox-9	Heterozygote Maus	Gaumenspalten, assoziiert mit Hypoplasie des Skelettes	BI et al. 2001
Msx-1	KO	Spalten des sekundären Gaumens, Defekte des Unterkiefers, des Oberkiefers und der Zähne	SATOKATA und MAAS 1994, NUGENT und GREENE 1998
Col-2a1	Semidominante Mutation der Col2a1 Disproportionales Micromeliamodell	Abnormale Entwicklung des Gaumens und Minderentwicklung des Unterkiefers	RICKS et al. 2002
RXR-alpha	KO	Exogene retinoidsäureinduzierte Gaumenspalten und Lippendefekte	ABBOTT und PRATT 1991, NUGENT et al. 1999
Hic-1	KO	Entwicklungsdefekte des Gaumens und der Lippe zusammen mit dem Miller-Dieker Syndrom	CARTER et al. 2000
BMP-2, -3, -4, -5	BALB/c Maus	Unkontrollierte Palatogenese	LU et al. 2000
erbB-4	Immunlokalisation mit Spalten in A/WYSnJ und keinen Spalten im BALB/cBY Stamm	Assoziiert mit normaler Primärgaumenentwicklung	WANG et al. 1998
Ryk	KO	Kürzere Lippen und vollständige Spalten des Gaumens	HALFORD et al. 2000
EGFR	KO	Mediolaterale Gesichtsdefekte, kleine unterentwickelte Unterkiefer und hohe Inzidenz von Gaumenspalten	MIETTINEN et al. 1999
TGF-β3	KO	Hohe pränatale Sterblichkeit, Gaumenspalten	KAARTINEN et al. 1995, PROETZEL et al. 1995

2.3.2 Suspensionsorgankulturen des sekundären Gaumens

Organkulturen repräsentieren komplexe Systeme. Diese Systeme können unabhängig vom Gesamtorganismus in toto wachsen und es ist somit möglich, Zellproliferation, Matrixproduktion und Organformationen zu untersuchen (AL-OBAIDI et al. 1995). In der Literatur kommen unterschiedliche Organkulturkomplexe der sekundärer Gaumenplattenpaare zur Anwendung, die von isolierten Gaumenanlagen über die Maxillaresektion bis zu kompletten Kopfpräparaten reichen.

Für die Kultivierung selbst können die Präparate auf einfache Metallgitter platziert werden, wie es z.B. POURTOIS (1966) oder MYERS (1967) bevorzugt haben. Eine andere Möglichkeit, die Präparate zu ernähren ist, sie unmittelbar auf einer Agarnährlösung zu platzieren (SMILEY und KOCH 1975), oder sie in Petrischalen zu legen, die mit Nährmedium gefüllt sind (THOMPSON 1969).

BRINKLEY et al. (1975) bauten später eine Apparatur, bei der die Explantate ständig im begasten Medium zirkulieren konnten.

1990 entwickelten SHIOTA et al. eine neue Technik zur Kultivierung von Mäusegaumen, die Suspensionskulturtechnik. Diese Methode erlaubt, eine große Anzahl von Präparaten unter geringem Material- und Zeitaufwand zu kultivieren. Während der Bebrütung ist ein ständiges Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff vorhanden. Außerdem müssen weder Serum noch Antibiotika zugesetzt werden. Diese Methode wurde von zahlreichen Autoren aufgegriffen und modifiziert. Während SHIOTA et al. (1990) ihre Explantate nicht fixierten und in einem rotierenden System frei beweglich ließen, lagerten andere die Präparate auf Porenfilter. Dadurch kam ebenfalls eine ununterbrochene Ernährung zustande, und es wurde eine Identifikation der Einzelpräparate möglich. Einen kurzen Abriss der Vielzahl von Publikationen zeigt Tab. 7.

Tab.7:Ausgewählte Organkulturen des sekundären Gaumens der Maus im Bezug auf die Präparations-, Suspensions- und Kulturbedingungen

Autor	Mäusestamm	Präparation	Inkubationszeit	Kulturtechnik	Kulturmedium	Medienwechsel	Inkubations-Atmosphäre
BRINKLEY et al. 1978	Swiss-Webster	Entf. Unterkiefer Gehirn, Zunge in Kombination	12,4 p.c. bis 13,14 p.c. für 24 h	Begaste Apparatur 34°C	Eagl's basal medium mit Käberserum	kein	Keine Angabe
SHIOTA et al. 1990	ICR	Entfernen des Gehirn, Zunge und Unterkiefer	12 p.c.+ 13,0 p.c. bis 72 h	Rotationssuspension 37°C, 20 rpm	Mod. BGJ ohne Serum	24 h	50 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 45 % N ₂
AL-OBAIDI et al. 1995	NMRI	Entfernen des Gehirn, Zunge Unterkiefer	13,2 p.c. bis 72 h	Rotationssuspension 37°C, 25 rpm	Mod. Bigger BGJ ohne Serum	48 h	95 % O ₂
TAYA et al. 1999	Manchester	Alles entfernt, außer sek. Gaumenplatten	12,5 bis 16,5 p.c. für 0 bis 96 h	Auflagesuspension 37°C	DMEM/ F12 mit Penicillin	48 h	95 % Luft, 5 % CO ₂
KOSAZUMA et al. 2004	ICR	Entfernen Unterkiefer	12,0 p.c. für 72 h	Rotationssuspension 38°C, 20- 25 rpm	Mod. BGJ ohne Serum	24 h	50 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 45 % N ₂
CHOU et al. 2004	ICR	Entfernen Unterkiefer, unteres Kopfteil	13,0 für 48 h	Rotationssuspension 37°C, 20 rpm	Mod. BGJ ohne Serum	24 h	50 % O ₂ , 5 % CO ₂ , 45 % N ₂
PUNGCHANCHAI KUL et al. 2005	CD 1	Alles entfernt, außer sek. Gaumenplatten	13,0- 16,0 für 30, 48 und 60 h	Auflagesuspension 37°C	DMEM/ F12 ohne Serum	kein	95 % Luft, 5 % CO ₂

3 Material und Methodik

3.1 Eigene Untersuchungen

3.1.1 Haltung der Versuchstiere

Für die Untersuchungen des Gaumenverschlusses sind zwei Mäusestämme verwandt worden, an welchen bereits in vivo Versuche erfolgt sind. Zum einem ist das der NMRI-Stamm, welcher eine spontane Spaltrate von 2 - 3 % aufweist, zum anderen der A/WySnJ-Stamm, bei welchem eine extrem erhöhte Spaltrate von 38 % bis knapp 50 % bekannt ist (SYSKA 2000, SCHUBERT 2000).

Beide Stämme wurden am Institut für Humangenetik und medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor Prof. Dr. Hansmann) unter den Bedingungen der standardisierten Koloniezucht aufgezogen. Das beinhaltete eine konstante Raumtemperatur von 22 °C und eine Luftfeuchte von 65 %. Die Umwälzung und Temperierung der Luft erfolgten mittels Klimaanlage. Die Beleuchtung bestand aus 2 Leuchtstofflampen mit 2 x 50 Watt Leistung und 70 Lux Leuchtstärke. Der Beleuchtungsrhythmus bestand aus 12 Stunden Tag und 12 Stunden Nacht.

Die Tiere befanden sich in einer Plexiglasbox der Marke Ehret mit den Maßen 207 x 265 mm. Jeweils 35 Boxen dieser Größe waren in einem fahrbaren Gestell untergebracht. Die Käfige waren entweder mit 3 Tieren des NMRI-Stammes oder 5 Tieren des A/WySnJ-Stammes belegt. Auf Geschlechtertrennung wurde strikt geachtet.

Die Tiere sind durch Altromin-Pellets als Standardkost für Mäuse ernährt worden. Das Futter sowie Frischwasser wurden ständig angeboten, wodurch die Mäuse ad libitum davon Gebrauch machen konnten.

Im Alter von 3 - 4 Monaten waren die Weibchen für die Paarung herangereift und wurden dann in eine separate Box zur Kopulation gesetzt. Die Paarung fand jeweils zu konstanten Zeiten in einem Zeitfenster von 1,5 Stunden (zur Sommerzeit 8 - 9.30 Uhr) statt, um konstante Bedingungen zu ermöglichen. Nach der erfolgten Befruchtung bildeten die Weibchen einen Scheidenpfropf aus, der als Nachweis für die Schwangerschaft diente. Die trächtigen Weibchen wurden, wieder unter standardisierten Bedingungen, jeweils zu 4 Exemplaren in separaten Boxen bis zum Zeitpunkt der Untersuchung untergebracht.

3.1.2 *Ablauf der Untersuchungen*

3.1.2.1 *Präparation der Feten*

14 Tage und 6 Stunden post conceptionem erfolgte die Organentnahme. Der Zeitpunkt „Null“ entsprach dabei dem Zeitpunkt der Konzeption ($\pm 1,5$ Stunden). Die Tiere wurden standardisiert durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet, gemäß der Richtlinie über das fachgerechte und tierschutzkonforme Töten von Versuchstieren (Richtlinie Tierschutz 3.01 Bundesamt für Veterinärwesen - Basel). Die Feten wurden anschließend mittels Einmalskalpell unter Mitnahme des gesamten Uterusschlauchs durch Mikrodissektion von vaginal unter Eröffnung der Bauchdecke komplett entnommen. Der Schlauch wurde nachfolgend in eine eisgekühlte physiologische Kochsalzlösung gegeben und hieraus wurden die Feten sukzessive innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten entnommen und präpariert.

Die Präparation der Feten erfolgte einzeln auf einer gekühlten Glasplatte. Dazu wurden die Präparate mittels steriler Papierspitze auf die Kalotte gelegt. Ein Heidemannspatel, in dorsale Richtung entlang des Gaumens eingebracht, drückte die Zunge nach kaudal, so dass diese später nicht im Präparat verblieb. Die Separation durch das Skalpell entlang der Gaumenplatten trennte den Kopf vom Rumpf unter Mitnahme der Mandibel. Der gesamte Vorgang wurde bei 20-facher Vergrößerung unter ständiger Sicht durch das Binokular durchgeführt. Nach der Präparation erfolgte die Photodokumentation jedes einzelnen Präparates.

3.1.2.2 Photodokumentation und Einteilung der Präparate in das Scoresystem

Jeweils bei 8- und 20-facher Vergrößerung wurde ein Bild digital aufgenommen. Die Kamera der Marke Dimage xt war dabei direkt in die dafür vorgesehene Arretierung des Binokulars Stemi 2000 der Firma Zeiss, Germany, eingesetzt worden. Eine 2-armige Kaltlichtlampe der Firma Schott beleuchtete den Objektisch beidseits von lateral und sorgte so für optimale Lichtverhältnisse.

Um den Verschlussgrad der Gaumenplattenpaare unserer Mäusestämme optimal differenzieren zu können, haben wir die Einteilung von AL-OBAIDI et al. (1995) als Grundlage für unsere Verschlussstadien gewählt.

Beginnend bei der Aufrichtung der Gaumenplattenpaare bis zum vollständigen Verschluss ist die Palatogenese in 6 Stadien unterteilt worden, in sogenannte Scores. Die nachgestellte Skizze soll die einzelnen Stadien noch einmal veranschaulichen.

Tab.8: Verschlussstadien für das Organkulturmodell der Maus (Scores)

Stadium (Score)	Skizze
<i>I Palatal shelves hardly recognizable</i>	
<i>II Clear approach of the shelves</i>	
<i>III Strong approach, but not contact</i>	
<i>IV First contact of the shelves</i>	
<i>V Contact over 2/3 of the fusion zone</i>	
<i>VI Total contact</i>	

- **Stadium I** zeigt die Gaumenplatten noch in einer vertikalen Lage. Die Zunge hat sich bereits soweit abgesenkt (nicht in der Skizze dargestellt), dass ein Aufrichten der Platten teilweise stattgefunden hat.
- **Stadium II** stellt die komplett horizontalisierten und teils bereits angenäherten Gaumenplattenpaare dar. Es ist noch ein deutlicher Gaumenspalt erkennbar.
- **Stadium III** entspricht den stark angenäherten Gaumenplatten, die jedoch noch außer Kontakt stehen.
- **Stadium IV** lässt einen ersten Plattenkontakt erkennen, der fast ausschließlich im anterioren Sektor zu finden ist.
- **Stadium V** zeigt bereits eine Fusion der sekundären Gaumenplatten über eine Distanz von 2/3 der Gaumenplattenfläche.
- **Stadium VI** entspricht einem vollständigen Verschluss über die gesamte Plattendistanz.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die beschriebenen Scorewerte unter in vitro Bedingungen als Makrophotografien.



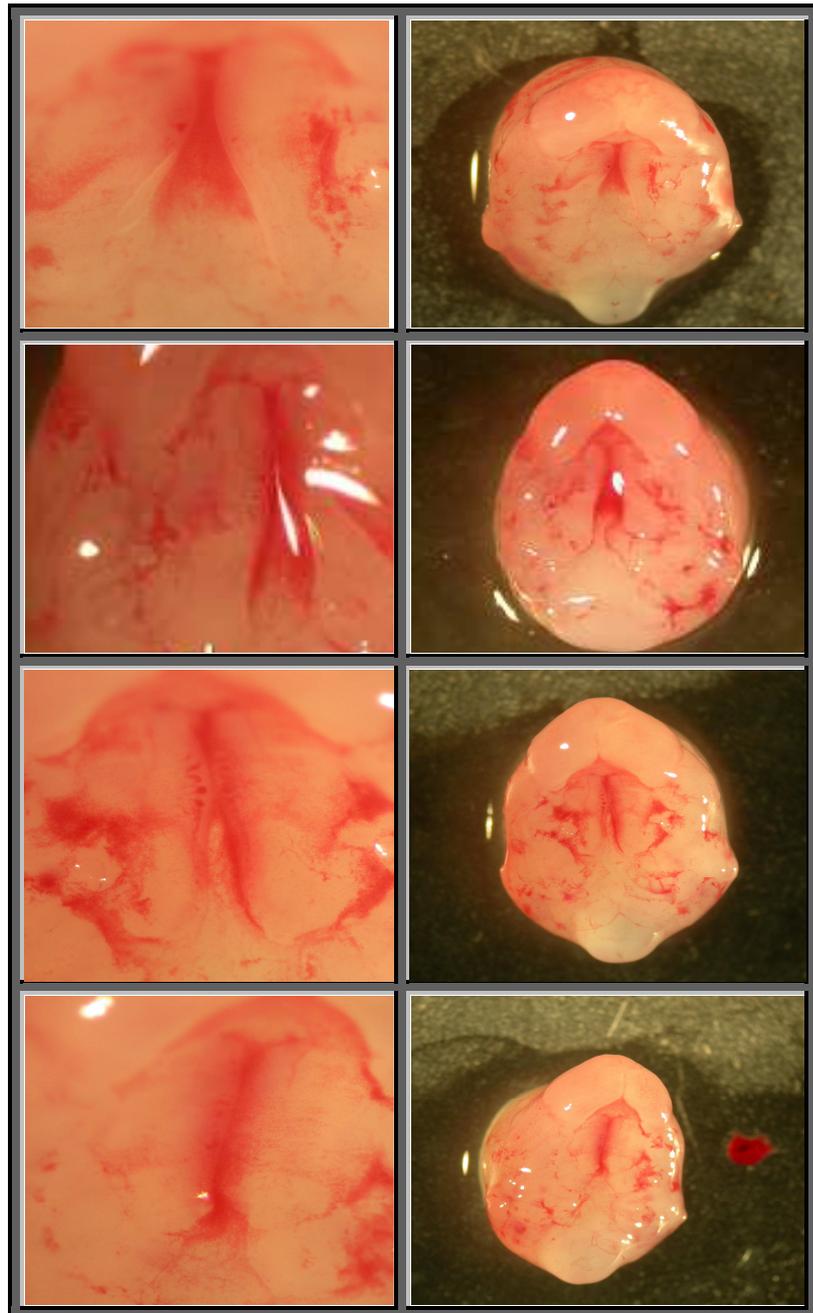


Abb.5: Verschlussstadien 1 bis 6 (von oben nach unten) des sekundären Gaumens der Maus in vitro bei 8- und 20-facher Vergrößerung

3.1.2.3 Kultivierung der Präparate

Für die Kultivierung wurden Sechswellschalen benutzt, in welche 0,4- μ m pore-size Filterinserts der Firma Nune positioniert und jeweils 2 ml Nährlösung zugegeben wurden. Diese Lösung wurde von der Firma Biochrom AG bezogen und mit DMEM und HAM'S F12 im Verhältnis 1:1, sowie L-Glutamin versetzt. Der Inkubator wurde auf eine Temperatur von 37°C, eine Luftfeuchtigkeit von 98 % und eine CO₂ Zugabe von 5 % eingestellt. Die Präparate wurden zu jeweils drei Tieren mit der Kieferbasis bzw. den Gaumenpaaren nach unten auf die Membran in die Sechswellbehälter gelegt und für 72 Stunden inkubiert. Die Präparationsrichtung und der Aufbau der Versuche können schematisch der Abb. 6 entnommen werden.

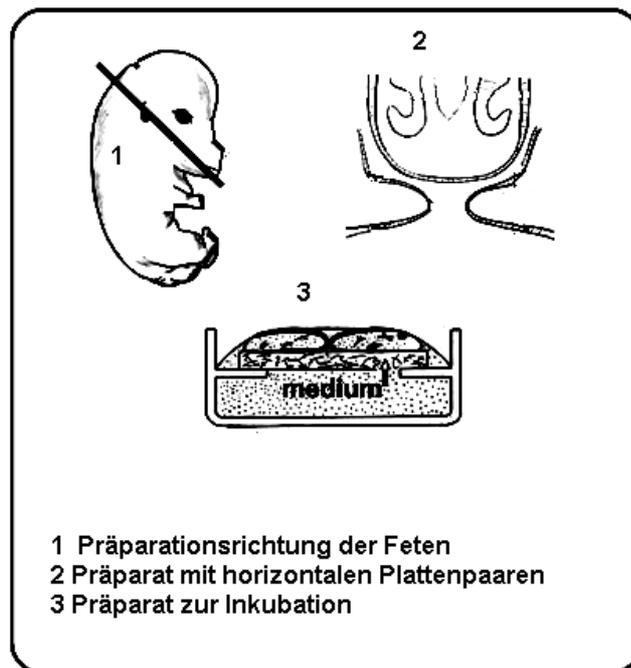


Abb. 6: Schematische Darstellung der Präparatgewinnung und Einbettung in die Sechswellschalen

Der Inkubator der Firma Heraeus musste ausschließlich für das Wechseln des Mediums (nach 24 Stunden) geöffnet werden, um Schwankungen so gering wie

möglich zu halten. Nach Ablauf von 72 Stunden wurden die Feten entnommen und in gleicher Weise wie unter Punkt 3.1.2.1 ausgewertet und dokumentiert. Anschließend fixierten wir alle Präparate für mindestens 7 Tage in 4 %-iger Formaldehydlösung, um eine spätere histologische Aufbereitung zu ermöglichen.

3.1.2.4 Dokumentationen mittels histologischen Schnitten

An ausgewählten repräsentativen Präparaten wurden histologische Schnitte durchgeführt (siehe Abb. 7). Zur erforderlichen Einbettung in Paraffin war eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe für 2 x 10 Minuten jeder Reihe vorgeschrieben (25 %; 50 %; 75 %; 96 %; 99,8 %). Anschließend folgte die Zugabe von Xylen für weitere 3 Zyklen à 10 Minuten und das Einbetten in Paraffin. Nach Aushärtung der Blöcke wurden Frontalschnitte aus dem anterioren, medialen und posterioren Bereich des Gaumens in einer Stärke von 10 µm entnommen und auf Objektträger-Gläschen aufgebracht. Es wurde ein LEICA RM 2145 Mikrotom verwendet.

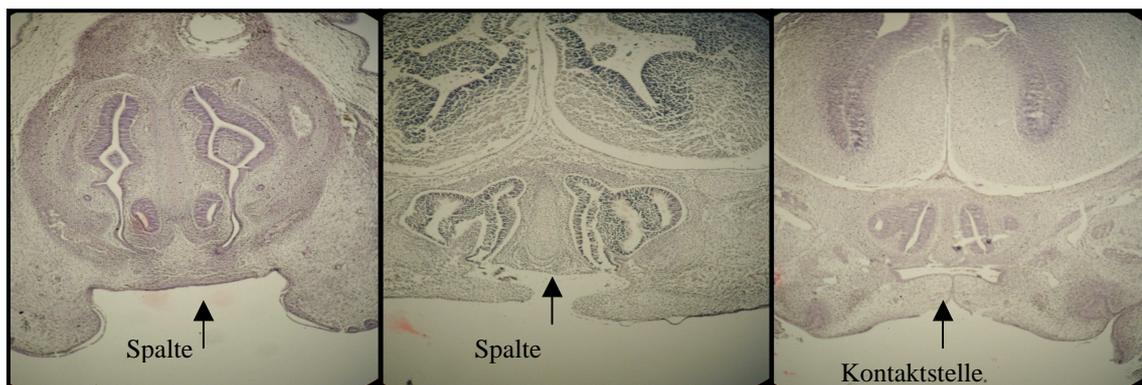


Abb. 7: Verschlussstadium I, III und VI (von li. nach re.) des sekundären Gaumens der Maus (HE-Färbung)

Für die Anfärbung der Präparate mussten die fixierten Objekte wieder rehydriert und 10 Minuten in Hämatoxylin eingelegt werden. Die Hydrierung entspricht in

umgekehrter Reihenfolge der bereits beschriebenen Dehydrierung. Nach der Entfärbung für 30 Sekunden in einem Gemisch aus 70 % ETOH und 30 % HCL (1 %-ig) wurden die Präparate im Eosinbad gefärbt und später wieder entwässert.

3.2 Statistische Testverfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Beratung der Mitarbeiter des Rechenzentrums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Direktor Dr. Wossal.

Die Datenauswertung erfolgte durch das Statistikauswertungsprogramm SPSS, Version 12.

Hier wurden die Scorewerte innerhalb des jeweiligen Mausstammes zu beiden Auswertungszeitpunkten (14 d 6 h p.c. + 72 Std.) verglichen. Anschließend wurde der AWySnJ-Stamm mit dem NMRI-Stamm ebenfalls zu beiden Messzeitpunkten verglichen und die Ergebnisse statistisch ausgewertet. Hierfür wurden der Wilcoxon-Test und der Mann-Withney-U-Test als nichtparametrische Tests verwendet. Diese werden als Homogenitätstests bezeichnet und dienen der Überprüfung der Signifikanz für die Übereinstimmung zweier Verteilungen der gleichen Grundgesamtheit. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in Rangfolgen gebracht. Finden sich in einer Versuchsgruppe überzufällig viele Mäuse mit geringeren Rangzahlen als in einer anderen Versuchsgruppe, kann auf einen Unterschied der Versuchsgruppen im Bezug auf das untersuchte Merkmal geschlossen werden. Die Rangzahlen der einzelnen Stämme wurden demzufolge vor der Inkubation mit denen nach der Bebrütung verglichen. Bei einem progredienten Verschluss mit höheren Scores sind die Rangskalenwerte positiv, mit erniedrigten Scores negativ. Bei gleichbleibenden Scores sind diese gebunden (unverändert). Anhand von insgesamt 207 Versuchsreihen wurde die Scoreveränderung nach der Bebrütung den Ausgangsscores vor der Inkubation gegenübergestellt. Bei der Auswertung der vorliegenden Messwerte wurde von einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ ausgegangen. Dieser Wert beschreibt einen Fehler bzw. eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung der Gaumenplatten der NMRI-Maus

Tab. 9: Dokumentarische Werte des NMRI-Mausstammes

Mausstamm	Anzahl der Muttertiere	Anzahl der Feten	Durchschnittl. Wurfzahl
NMRI	17	114	6,7

4.1.1 Fusionsgrad vor der Inkubation

Zum ersten Auswertungszeitpunkt, d.h. nach der Bebrütung der Präparate, waren 3 von 114 Gaumenpaaren geschlossen (Score 6). Das entspricht einem prozentualen Anteil von 2,6 % (Score 6). Über 2/3 Kontakt (Score 5) wiesen 16 Feten auf (14,0 %). Der größte Anteil von ca. 41,2 %, das sind 47 Feten, hatte bereits vor der Inkubation einen ersten Kontakt der Gaumenplatten (Score 4). In Score 3, starke Annäherung der Gaumenplatten, konnten 24 Feten eingeordnet werden (21,1 %). Der Score 2, wobei die Gaumenplatten noch deutlich getrennt verlaufen, konnte bei 18 Feten festgestellt werden (15,8 %). Schließlich ist bei 6 Feten ein maximales Auseinanderweichen der Gaumenplattenpaare erkennbar gewesen, dies entspricht einem Anteil von ca. 5,3 %. Im Mittel lag der Scorewert bei 3,51 und der Medianwert bei 4 (vergl. Abb. 8).

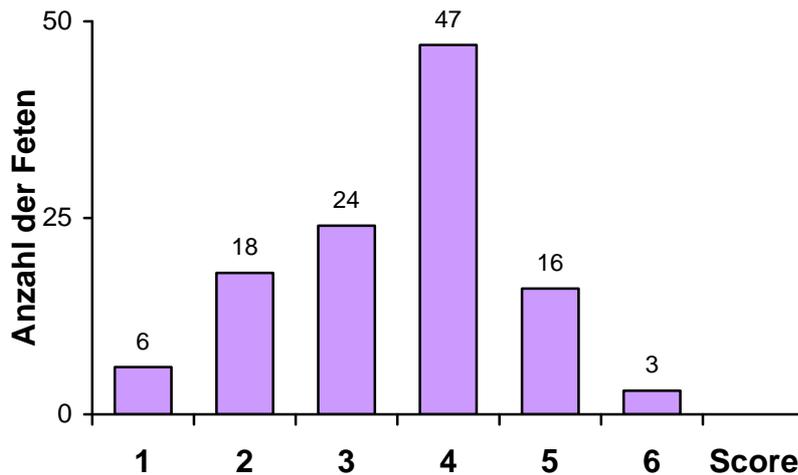


Abb.8: Verteilung der Verschlussstadien des embryonalen Gaumens des NMRI-Mausstammes 14 d 6 h p.c.

4.1.2 Fusionsgrad nach der Inkubation

Eine maximale Distanz (Score 1) wurde bei keinem Exemplar mehr beobachtet (0 %). Ein breiter Spalt (Score 2) ließ sich bei 11 Präparaten erkennen (9,6 %). Der Score 3 (starke Annäherung der Platten) wurde bei 9 Feten beobachtet (7,9 %). Einen großen Anteil von 34 Präparaten ergab der Score 4 (30,0 %) und Score 5 mit 41 Explantaten (36,0 %). Der Score 6, also vollständiger Verschluss der Platten, wurde bei 19 Fällen festgestellt (16,7 %). Der Mittelwert des Scores lag bei 4,45 und der Medianwert bei 5 (siehe Abb.9).

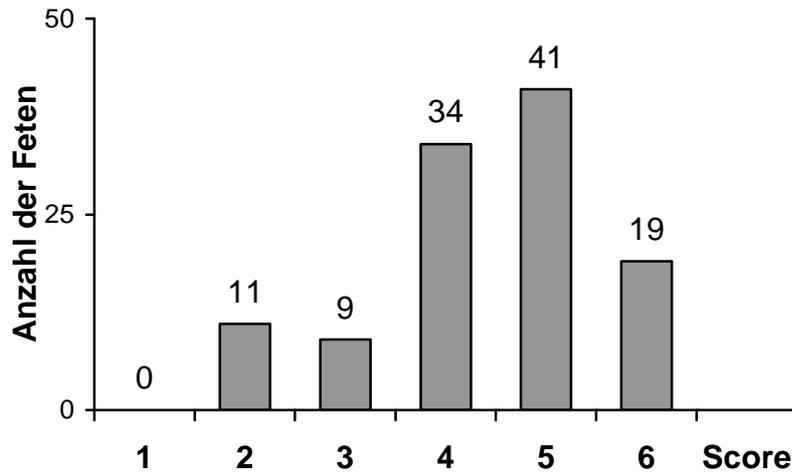


Abb.9: Verteilung der Verschlussstadien des embryonalen Gaumens des NMRI-Mausstammes nach 72 Std. Inkubation

Die Form der Verteilung der einzelnen Stadien entspricht einer Parabel, wobei der Peak im Vergleich zur Kontrolle vom Score 4 auf den Score 5 nach rechts verschoben ist (vgl. Abb. 10).

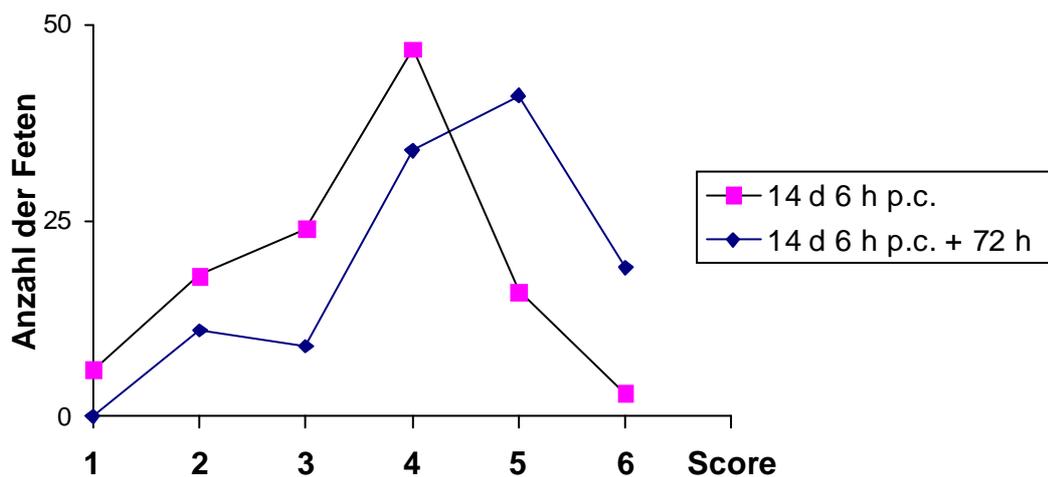


Abb.10: Scoreverteilung 14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation

4.1.3 Entwicklungsdifferenz der Präparate der NMRI-Maus

Neben der allgemeinen Verteilung der unterschiedlichen Verschlussstadien zu den zwei Entwicklungszeitpunkten wurden nun die Differenzen der Anfangs- und Endscores ermittelt.

36 Präparate (31,6 %) behielten ihren Ausgangszustand bei. 43 Explantate (37,7 %) hatten ihren Verschlusszustand während der 3-tägigen Bebrütungszeit um eine Stufe erhöht. 19 Präparate zeigten nach 3 Tagen eine positive Differenz von 2 Scores (17,1 %). Bei 7 Feten konnte eine Erhöhung um 3 Grade festgestellt werden (6,1 %). 2 Präparate hatten Wachstumstendenzen um 4 Scorewerte (1,8 %). 6 Präparate (5,3 %) hatten eine rückläufige Entwicklung um eine Scorestufe erfahren und ein Präparat (0,9 %) um 2 Stufen. Eine Zusammenstellung ist in Abb. 11 dargestellt.

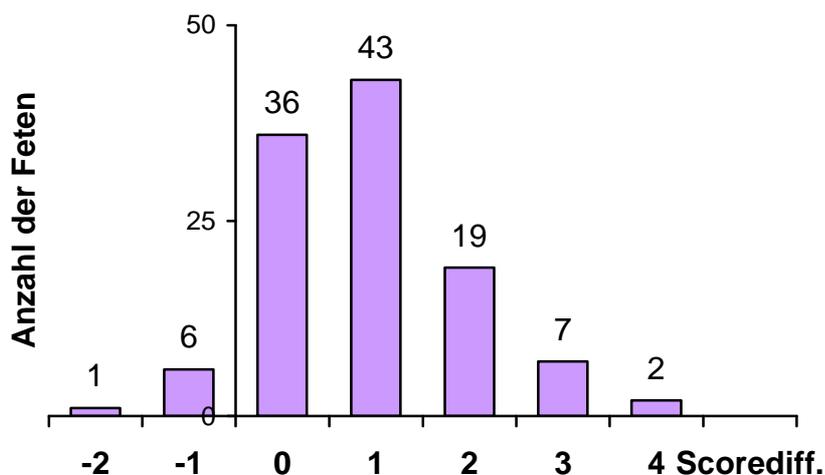


Abb. 11: Scorewertveränderung der Präparate des NMRI-Stammes vom 1. zum 2. Dokumentationszeitpunkt (14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation *in vitro*)

4.2 Entwicklung der Gaumenplatten der A/WySnJ-Maus

Tab. 10: Dokumentarische Werte des A/WySnJ-Mausstammes

Mausstamm	Anzahl der Muttertiere	Anzahl der Feten	Durchschnittl. Wurfzahl
A/WySnJ	30	93	3,1

4.2.1 Fusionsgrad vor der Inkubation

Bei 11 Feten konnte Score 1 (11,8 %), bei 37 Präparaten der Score 2 (39,8 %) und bei 21 Präparaten der Score 3 (22,6 %) dokumentiert werden. Dem Score 4 wurden 18 Feten (19,4 %) zugeordnet. Score 5 wiesen 5 Präparate auf (5,4 %) und schließlich zeigte 1 Präparat (1,1 %) einen vollständigen Verschluss auf (Score 6). Der Mittelwert lag bei 2,7 und der Medianwert bei 2. Die Scoreverteilung gibt zusammenfassend Abb. 12 wieder.

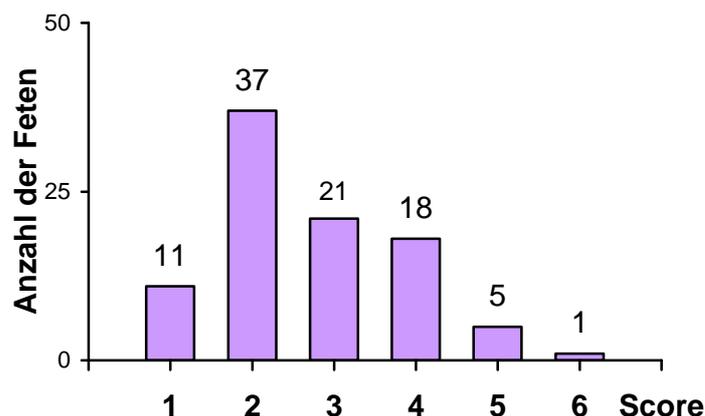


Abb.12: Verteilung der Verschlussstadien des embryonalen Gaumens des A/WySnJ-Mausstammes 14 d 6 h p.c.

4.2.2 Fusionsgrad nach der Inkubation

Nach der Bebrütung konnte bei 9 Präparaten Score 1 (9,7 %), 41 Präparaten Score 2 (44,1 %), 15 Präparaten (16,1 %) Score 3 nachgewiesen werden. 15 Feten hatten Score 4 (16,1 %), 10 Feten Score 5 (10,8 %) und schließlich 3 Feten (3,2 %) hatten einen vollständigen Verschluss erreicht (Score 6). Im Mittel lag der Scorewert bei 2,84 und der Medianwert bei 2 (siehe Abb. 13).

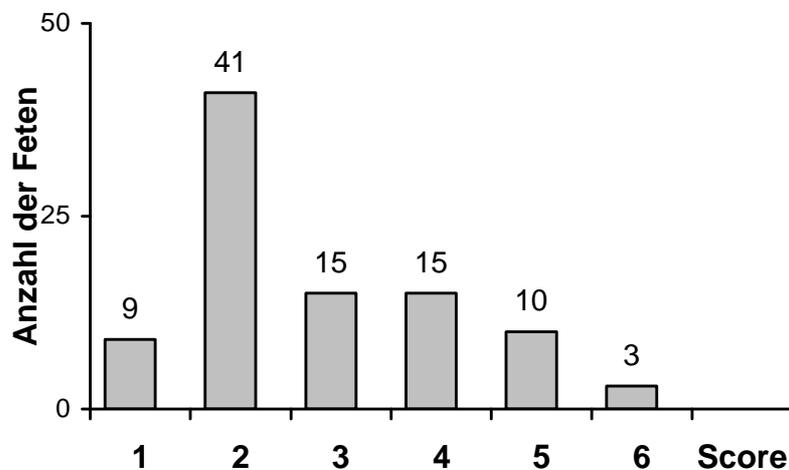


Abb.13: Verteilung der Verschlussstadien des embryonalen Gaumens des A/WySnJ-Mausstammes nach 72 Std. Inkubation *in vitro*

Die Form der Verteilung der einzelnen Stadien entspricht einer Parabel, wobei keine Verschiebung des Peaks zu erkennen ist (vergl. Abb. 14). Er liegt unverändert bei Score 2 (median).

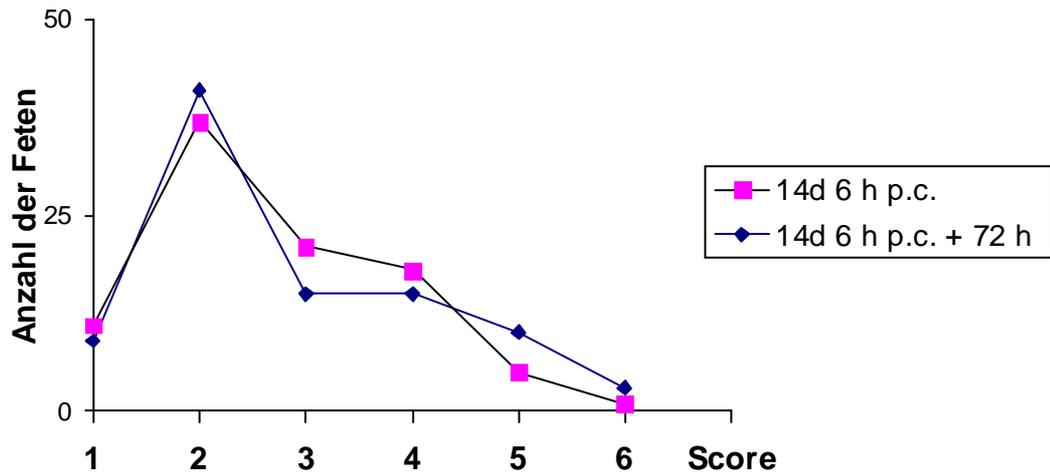


Abb.14: Scoreverteilung 14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation

4.2.3 Entwicklungsdifferenz der Präparate der A/WySnJ Maus

Um die Fusion beurteilen zu können, wurden die Differenzen der einzelnen Versuchspräparate vor und nach der Bebrütung gegenübergestellt (vergl. Abb. 15).

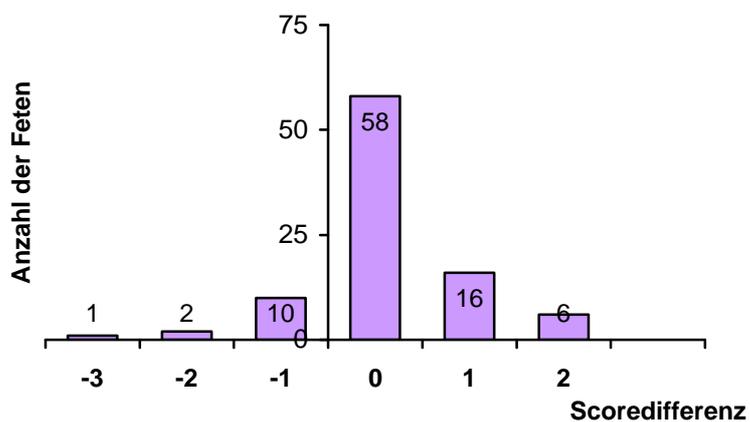


Abb. 15: Scorewertveränderung des A/WySnJ-Stammes vom 1. zum 2. Dokumentationszeitpunkt (14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation in vitro)

Es zeigte sich, dass in 58 Fällen (62,4 %) innerhalb von 3 Tagen Bebrütungszeit keine messbare Veränderung vonstatten gegangen waren. 16 Feten (17,2 %) hatten ein Wachstum und somit eine Verringerung der Gaumenplattendistanz um 1 Grad erreicht. 6 Präparate wiesen ein Wachstum von 2 Scorestadien (6,5 %) auf.

Auch die rückwärtige Entwicklung ist bei A/WySnJ wesentlich ausgeprägter. 10 Präparate hatten einen um einen Scorewert niedrigeren Verschlusswert (10,8 %). 2 Präparate hatten eine rückläufige Entwicklung von 2 Scorestadien (2,2 %), sowie 1 Präparat von 3 Stadien (1,1 %).

4.3 Statistische Auswertung

4.3.1 NMRI-Stamm

Nach der Ermittlung der Rangskalenwerte ergaben sich beim NMRI-Mäusestamm 5 negative Ränge, 71 positive Ränge und 38 Bindungen.

Tab.11: Vergleich der Ränge des NMRI-Stammes 14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation

Stamm: NMRI	Ranganzahl	Mittlerer Rang	Rangsumme
<i>Negative Ränge</i>	5	29,6	148
<i>Positive Ränge</i>	71	39,13	2778
<i>Bindungen</i>	38		
<i>Gesamt</i>	114		

Nur 4,38 % aller Feten hatten dementsprechend eine scheinbar rückläufige Entwicklung von mindestens einem Scorewert erfahren. 62,3 % waren allerdings um einen Scorewert oder höher gewachsen. Ein Drittel aller Präparate blieb unverändert. Der Wilcoxon-Test bestätigte das signifikante Wachstum z.T. bis zum Verschluss der Gaumenplattenpaare des sekundären Gaumens in der Organkultur ($p=0,05$).

Tab.12: Statistik für den Wilcoxon-Test basierend auf negativen Rängen für den NMRI-Stamm

NMRI-Stamm	14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation
Z	-7,008
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

4.3.2 A/WySnJ-Stamm

Nach der Ermittlung der Rangskalenwerte des A/WySnJ-Stammes hatten sich 12 negative Ränge, 23 positive Ränge und 58 Bindungen ergeben.

Tab. 13: Ränge und Rangsumme des A/WySnJ-Stammes 14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation

Stamm: A/WySnJ	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
<i>Negative Ränge</i>	12	18,13	217,5
<i>Positive Ränge</i>	23	17,93	412
<i>Bindungen</i>	58		
<i>Gesamt</i>	93		

12,9 % aller Feten wiesen bei diesem Stamm eine scheinbar rückläufige Entwicklung von einem Scorewert oder mehr auf. 24,7 % zeigten ein Wachstum von mindestens einem Scorewert, während bei 62,4 % der Präparate keinerlei Entwicklung des sekundären Gaumens im Vergleich zum Ausgangszustand nachzuweisen war.

Nach Auswertung durch den Wilcoxon-Test ergab sich für den A/WySnJ-Stamm ein Wert von 0,094. Bei einem Signifikanzgrenzwert von $p=0,05$ war demnach kein signifikantes Wachstum bzw. kein signifikanter Verschluss der Gaumenplattenpaare des sekundären Gaumens der Präparate zu verzeichnen gewesen.

Tab.14: Statistik für den Wilcoxon-Test basierend auf negativen Rängen für den A/WySnJ-Stamm

A/WySnJ-Stamm	14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation
Z	-1,684
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,094

4.3.3 Statistischer Vergleich der Scorewerte beider Stämme

Bei beiden von uns verwandten Mausstämmen sind zuerst die Scores zum Zeitpunkt 14 d 6 h p.c. und anschliessend zum Zeitpunkt 14 d 6 h p.c. + 72 Std. statistisch miteinander verglichen worden.

Letztendlich wurden beide Stämme insgesamt auf die Gaumenplattenentwicklung hin statistisch überprüft. (Differenz Zeitpunkt II – Zeitpunkt I)

Tab.15 Rangwerte 14 d 6 h p.c. (entspricht Auswertung I) und nach 72 Std. Inkubation (entspricht Auswertung II) beider Stämme

Stamm	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Auswertung I			
NMRI	114	121,92	13898,5
A/WySnJ	93	82,04	7629,5
gesamt	207		
Auswertung II			
NMRI	114	132,84	15143,5
A/WySnJ	93	68,65	63,84,5
gesamt	207		

Für 114 Feten des NMRI- und 93 Feten des A/WySnJ-Stammes mit ermittelten mittleren Rängen von 121,92 (NMRI) und 82,04 (A/WySnJ) ergaben sich Rangsummen von 13898,5 (NMRI) und 7629,5 (A/WySnJ) zum Zeitpunkt 14 Tage und 6 Std. p.c. und 132,84 (NMRI) und 68,65 (A/WySnJ) nach 72 Std. Inkubation (vergl. dazu Tab. 15).

Tab. 16: Statistische Auswertung der Rangwerte 14 d 6 h p.c. (entspricht Auswertung I) und nach 72 Std. Inkubation (entspricht Auswertung II) beider Stämme basierend auf negativen Rängen

	14 d 6 h p.c.	Nach 72 Std. Inkubation
Mann-Withney-U	3258,5	2013,5
Wilcoxon-W	7629,5	6384,5
Z	-4,918	-7,858
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,000

Nach statistischer Auswertung der Ergebnisse sind sowohl zum ersten Auswertungszeitpunkt (14 d 6 h p.c.) als auch nach 72 Std. Inkubation ein signifikanter Unterschied in der Entwicklung der Präparate beider Stämme festgestellt worden.

Dementsprechend waren der A/WySnJ- und der NMRI-Stamm in der Wachstumsentwicklung der sekundären Gaumenpaare sowohl zum Zeitpunkt der Organentnahme, als auch nach der Inkubation auf einem unterschiedlichen Entwicklungsniveau (vergl. Tab. 16).

Betrachtet man die Score Differenzen eines jeden Stammes zum zweiten Zeitpunkt (14d 6 h p.c. + 72 Std.) mit dem ersten Auswertungszeitpunkt (14 d 6 h p.c.) und vergleicht anschließend die Stämme miteinander, kann man ebenfalls einen signifikanten Unterschied feststellen. Damit sind nicht nur die Entwicklungsstufen der sekundären Gaumenplatten zu den einzelnen Auswertungszeitpunkten unterschiedlich, sondern die Entwicklung der Platten

lief während der Bebrütung signifikant unterschiedlich voneinander ab (siehe Tab. 17 und 18).

Tab.17 Rangwerte der Scoredifferenz zum Auswertungszeitpunkt 14 d 6 h p.c. + 72 Std.(entspricht Auswertung II) und 14 d 6 h p.c. (entspricht Auswertung I) beider Stämme

Stamm	Mittlerer Rang.	Rangsumme
NMRI	123,63	14093,5
A/WySnJ	79,94	7434,5
gesamt	207	

Tab. 18: Statistische Auswertung der Rangwerte 14 d 6 h p.c. + 72 Std. (entspricht Auswertung II) und der Differenz zu 14 d 6 h p.c.(entspricht Auswertung I) beider Stämme basierend auf negativen Rängen

	Differenz
Mann-Withney-U	3063,5
Wilcoxon-W	7434,5
Z	-5,577
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

4.3.4 Lineares Modell der Scoreentwicklung der Präparate

Um den linearen Verlauf der Scoreentwicklung beider Stämme noch verdeutlichen zu können, ist ein multivariater Test durchgeführt worden. Obwohl dieser Test nicht in erster Linie für rangskalierte Werte vorgesehen ist, lassen sich Trends in der Entwicklung dieser Werte graphisch darstellen. Damit können noch einmal die bis dahin analysierten Ergebnisse unterstrichen werden. Der NMRI-Stamm zeigte eine positive Wachstumstendenz um durchschnittlich einen Scorewert (von Score 3,7 auf 4,5) während der Inkubationszeit von 72 Stunden (in Abb. 16 blau dargestellt).

Der A/WySnJ-Mausstamm zeigte im selben Zeitraum kaum eine Wachstumstendenz (grüne Linie in Abb.16).

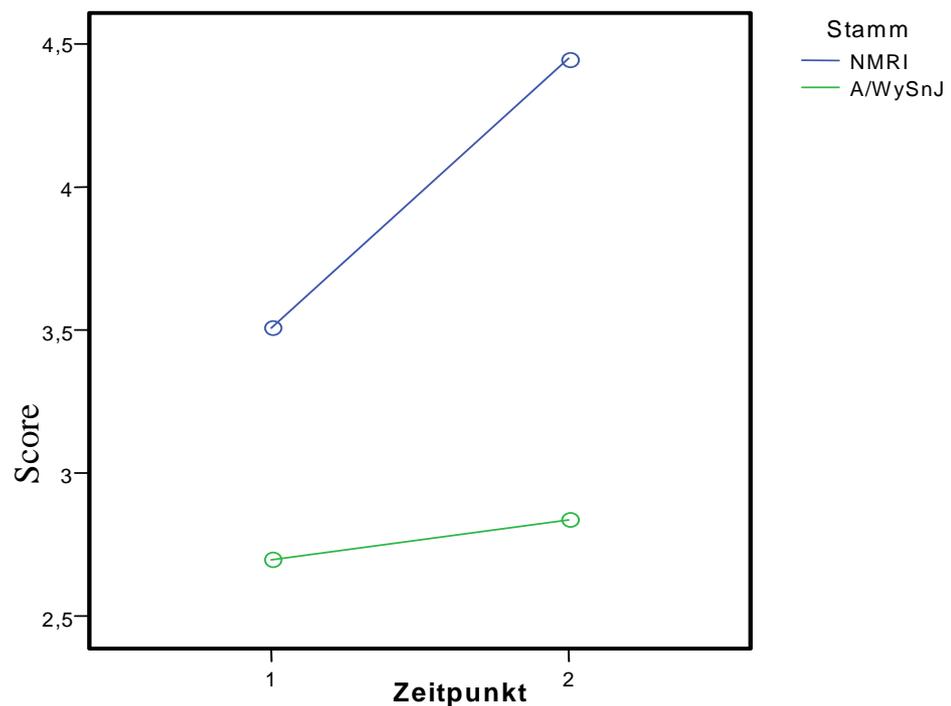


Abb. 16: Wachstumstendenz des NMRI- und A/WySnJ-Stammes im Vergleich zum Zeitpunkt 14 d 6 h p.c. und nach 72 Std. Inkubation

5 *Diskussion*

Die phylogenetische Parallelität im Bezug auf physiologische und pathologische Mechanismen der Organgenese zwischen Mensch und Maus ist heute unbestritten (PETER 1911, HINRICHSSEN 1991, DASTON et al. 1997, SYSKA 2000). Das wird z.B. bei der Analyse der morphologischen Erscheinungsbilder von Lippen- Kiefer- und Gaumenspalten (KALTER 1979, SYSKA 2000) und der zeitlichen Relation des embryonalen und fetalen Entwicklungszyklus (KREYBIG 1976) in überzeugender Weise deutlich. Bei der morphologischen Dysgenese des sekundären Gaumens treten beispielsweise bei beiden Spezies die gleichen phänotypischen Merkmale auf. Das bezieht sich sowohl auf die Häufigkeit als auch auf die Ausprägung des Merkmals (SYSKA 2000). Dies wird mit der phylogenetischen Konservierung der meisten biologischen Prozesse erklärt. Man kann davon ausgehen, dass verschiedene Kontrollgene homolog sind und daher vergleichbare Funktionen auch speziesübergreifend ausgeübt werden können (DASTON et al. 1997).

Mäuse sind wegen ähnlichen physiologischen Abläufen durchaus geeignete Modelle für menschliche Krankheiten und bilden vor allem auch ein großes genetisches Reservoir an potentiellen Modellen unterschiedlicher menschlicher Erkrankungen (BEDELL et al. 1997).

Als repräsentative Vertreter für eine unterschiedliche Spaltdisposition haben wir uns für den NMRI-Stamm mit einer spontanen Spaltbildungsrate von 2 - 3 % und den A/WySnJ-Stamm entschieden. Letzterer hat einen genetischen Basisdefekt entwickelt und hat daraus resultierend meist einseitige Lippenspalten mit und ohne Gaumenspalten mit einer Frequenz von 25 - 35 % (HALLGRIMSON et al. 2004), unter den Zuchtbedingungen unseres Labors von knapp 50 % (SCHUBERT 2000).

In der hier vorliegenden in vitro Studie beobachtete ich eine Fusion von mindestens 2/3 der gesamten Gaumenplattendistanz von 53 % des NMRI-Stammes und von 13 % des A/WySnJ-Stammes nach 72 Stunden Inkubation. Damit war die Spaltrate unter in vitro Bedingungen im Gegensatz zur normalen Geburt erheblich erhöht. Ausgehend von den natürlich auftretenden Spaltraten

muss es durch die Versuchsdurchführung oder die Auswertung infolge verschiedener Mechanismen offensichtlich zu einer Hemmung des Wachstums und der Plattenfusion in der Organkultur gekommen sein.

Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Gaumenfusion bei in vitro Untersuchungen ist der Zeitpunkt für die Entnahme der Feten und deren Aufbereitung für ein Organkulturmodell. Die Geschwindigkeit und der Entwicklungsgrad der Palatogenese vor der Entnahme der Kulturen hängen von der Reife des Embryos ab. Laut DIEWERT et al. (1992, 1995) und SYSKA (2000) ist die Zeit um den 15. Tag nach der Befruchtung der optimale Zeitpunkt der Präparatentnahme und hat damit die größte zu erwartende Fusionsrate. Selbst eine Verlängerung der Inkubationszeit bringt keine nennenswerte Erhöhung der Gaumenfusionsrate (DIEWERT et al. 1992, 1995, SYSKA 2000). Aus diesem Grund ist auch die Entnahme der Feten zum Zeitpunkt 14 Tage und 6 Stunden p.c. erfolgt. Zu späteren Terminen ist bei spaltresistenten Formen ggf. der Spaltverschluss bereits erfolgt. Das Ende der Zeit, bis zu dem ein Gaumenverschluss noch stattfinden kann, ist unterschiedlich und genetisch bedingt.

Bei der direkten Gegenüberstellung beider verwendeter Mäusestämme wurden die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen im Bezug auf den Entwicklungszustand der Gaumenplatten zum Zeitpunkt der Organentnahme 14 Tage und 6 Stunden p.c. augenscheinlich. Beim NMRI-Stamm waren ca. 79 % der Gaumenplattenpräparate zum Entnahmezeitpunkt schon angenähert, berührt oder sogar teilweise fusioniert. Dagegen waren diese Zustände beim A/WySnJ-Stamm in lediglich ca. 48 % der Fälle beobachtet worden. Das entspricht einem Scorewert von 3 bis 4 und höher. Bei den Präparaten des NMRI-Stammes lagen die medianen Scorewerte 14 Tage und 6 Stunden p.c. dementsprechend bei Score 4. Im Gegensatz dazu lagen die medianen Scorewerte des A/WySnJ-Stammes nur bei Score 2, das entspricht in etwa dem 13 Tag p.c. des NMRI-Stammes (vgl. dazu Abb. 17 und 19).

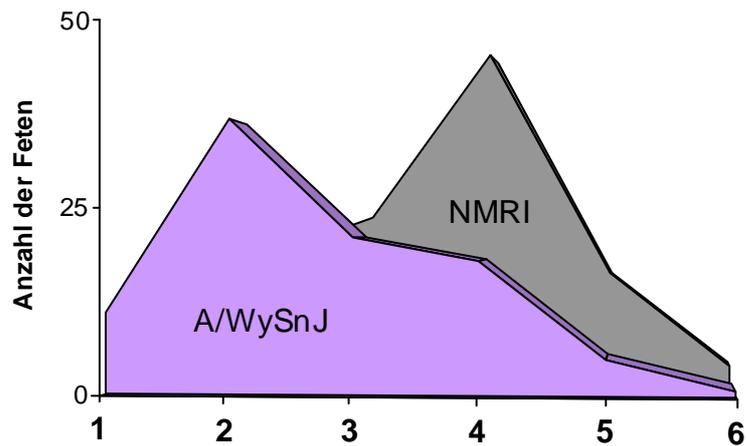


Abb.17: Verschlussstadien (Scores) des embryonalen Gaumens des NMRI- und A/WySnJ Mausstammes 14 d 6 h p.c. in vitro im Vergleich

Vergleicht man anschließend beide Stämme nach 72 Stunden Inkubation, erreichten die Organkulturen des NMRI-Stammes median Score 5 (vgl. Abb.18). Beim A/WySnJ-Stamm kam es zu keinem wesentlichen Wachstum.

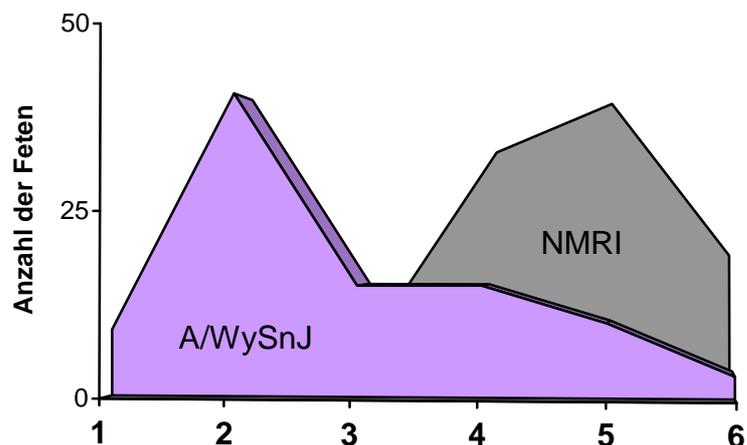


Abb.18: Verschlussstadien (Scores) des embryonalen Gaumens des NMRI- und A/WySnJ-Mausstammes nach 72 Std. Inkubation in vitro im Vergleich

Da beide Mäusestämme in der Aufzucht, Haltung und Versuchsdurchführung identisch gehandhabt wurden, müssen diese Unterschiede innerhalb des Stammes begründet liegen. Möglicherweise läuft die Entwicklung der Feten des A/WySnJ-Stammes insgesamt langsamer als die des NMRI-Stammes ab. Dafür würde der unterschiedliche Entwicklungszustand der Feten beider Stämme sprechen, der sich nicht nur auf den Entwicklungszustand der Gaumenplattenpaare beschränkt. Bereits in früheren Untersuchungen wurde deutlich, dass der A/WySnJ-Stamm im Bezug auf Größe und Ausprägung des Kopfes, Rumpfes und der Extremitäten deutlich hinter den nicht disponierten Stämmen zurücklag (DIEWERT und WANG 1992, CIRIANI 1986, SYSKA 2000).

SYSKA (2000) berichtete nach Entbindung der Feten des A/WySnJ-Stammes über eine durchschnittliche Körperlänge von gerade einmal 3,6 mm. Demgegenüber konnte der NMRI-Stamm mit einer Länge von 9,7 mm aufwarten, das entspricht einer Differenz von 270 %. Die durchschnittliche Wurfzahl pro Muttertier zeigte die gleiche Tendenz. Während bei der NMRI-Maus im Durchschnitt 7 Embryos entnommen werden konnten, waren es bei der A/WySnJ-Maus gerade einmal 3 Tiere.

CIRIANI et al. (1986) untersuchten verschiedene Mausstämme und kreuzten diese dann untereinander. Das Resultat bestätigte, dass der A/WySnJ-Stamm inklusive aller Nachkommen die geringste körperliche Entwicklung erfahren hat.

Neben der genetischen Disposition und der damit verbundenen Wachstumsgeschwindigkeit und Spalthäufigkeit kommen noch eine Reihe exogener, die Versuchsdurchführung betreffender, Faktoren hinzu. Diese Faktoren beeinflussen ebenfalls das Wachstum der Gaumenplatten und sind für die reduzierte Fusionsrate im Vergleich zu den in vivo Untersuchungen zu berücksichtigen.

In unseren Untersuchungen wurde, wie im Abschnitt 3.1.2 beschrieben, der Kopf unterhalb der Gaumenplatten vom Rumpf unter Mitnahme der Mandibel entfernt. Damit sind alle beeinflussenden Faktoren des Muttertiers auf die Feten eliminiert worden. Die „innere Kraft“, die durch eine nicht plattenbezogene Muskelaktivität, wie das Öffnen des Mundes, das Schlucken und Flexion der

Wirbelsäule gekennzeichnet ist, kann somit teilweise aufgehoben worden sein (BRINKLEY et al. 1987).

Genauso dürfte das teilweise Aufheben der Schwerkraft im statischen, flüssigkeitsgefüllten Uterus in einer in vitro Untersuchung nicht vollständig nachempfinden können.

In einer vorangegangenen Studie haben BRINKLEY et al. (1978) Versuche bezüglich des Einflusses verschiedener Präparationstechniken auf die Wachstumsgeschwindigkeit der sekundären Gaumenplatten durchgeführt. Sie verwendeten Swiss-Webster-Mäuse und kamen letztlich zu dem Ergebnis, dass es bei Entnahme des Gehirns in Höhe der Augenpaare und zusätzlich der Zunge zu einer beschleunigten Entwicklung der Gaumenplatten im Vergleich zu der Technik, bei welcher ausschließlich die Zunge entnommen wurde, kam. Wurden Gehirn, Zunge und zusätzlich der Unterkiefer entnommen, erfolgte der Gaumenverschluss zeitlich verzögert, aber immer noch schneller als bei unpräparierten Feten. Damit ist eine Beeinflussung der Fusionsgeschwindigkeit in gewissen Grenzen wahrscheinlich. In welcher Größenordnung diese Wachstumsveränderung vonstatten gegangen ist, kann nur schwer eingeschätzt werden. Ein direkter Vergleich unserer Ergebnisse mit den anderen Arbeitsgruppen ist nicht ohne weiteres möglich, da die Ausgangs- und Kultivierungsbedingungen zu unterschiedlich sind. Die Präparate waren teilweise nicht für 72 Stunden inkubiert worden. Die Bebrütungstemperatur sowie die Begasung der Präparate differierten in den verschiedenen Untersuchungen (siehe Tab 7).

Ein anderes Problem der Schnitttechnik ist, dass mit zunehmendem Präparationsumfang die Integrität der einzelnen Organsegmente und damit deren Stabilität verloren gehen. Unsere Technik lässt die ursprüngliche Position der sekundären Gaumenplatten im Bezug zur Nase und zum Schädel weitestgehend unberührt. Allerdings zeigte sich insbesondere beim A/WySnJ-Stamm in einigen Fällen eine scheinbar rückläufige Entwicklung. Diese könnte von Destabilisierungsprozessen in Folge von Integritätsverlusten durch die Präparation und der reduzierten Entwicklung hervorgerufen worden sein. Es fiel nach der Bebrütung der Explantate des A/WySnJ-Stammes eine Veränderung der Gewebestabilität an verschiedenen Präparaten auf. Als Folge dessen könnte es zum Auseinanderweichen beider Hemisphären und in diesem

Zusammenhang auch zum Divergieren der sekundären Gaumenplatten gekommen sein.

Andere Autoren kultivierten zum Teil ausschließlich die Gaumenplatten, z.B. TAYA et al. (1999). Selbstverständlich werden bei diesen reduzierten Formen der Kultivierung Unwägbarkeiten ausgeschlossen, trotzdem dürften die Ergebnisse schwer auf komplexe Systeme übertragbar sein. Einige Präparationsarten und deren Auswirkungen zeigt Tab. 19.

Tab. 19: Auswirkungen unterschiedlicher Präparationstechniken auf die Gaumenentwicklung in der Organkultur

Entnahmeregion	Auswirkung auf das Plattenwachstum
Gehirn + Zunge + Unterkiefer	Verzögerung des Wachstums, aber noch schneller als unpräpariert
Gehirn + Unterkiefer	Geringe Beschleunigung des Wachstums
Gehirn + Zunge	Große Beschleunigung des Wachstums
Zunge	Mittlere Beschleunigung des Wachstums
Ausschließlich Platten	Kein Einfluss

Entscheidende Größen für den Erfolg der Plattenverschmelzung sind die Position und der Grad der Annäherung der Gaumenplatten zum Zeitpunkt der Entnahme. In dieser Arbeit konnte eine starke Annäherung bis zur Fusion der Plattenpaare in 48 % der Fälle des A/WySnJ-Stammes und in 79 % der Fälle des NMRI-Stammes zum Entnahmezeitpunkt beobachtet werden.

ERFANI et al. (2001) überprüften in einer Studie durch Kohlenstoffpartikelreferenzmessungen den Mindestabstand der Gaumenplatten, der für eine Fusion nach der Entbindung erforderlich ist. Durch die Implantation dieser Partikel und deren sukzessiver Entnahme bei unterschiedlichen Distanzen aus dem Uterus konnte ihre Annahme bestätigt werden, dass es bei einer Überschreitung einer Mindestdistanz von mehr als 0,48 mm bzw. >0,5 mm zu keinem völligen Gaumenverschluss kommen konnte. Im Bezug auf die

Forschungsergebnisse von ERFANI et al. (2001) wären diese Bedingungen nötig, um überhaupt eine Fusion unter in vitro Bedingungen zu initiieren. Das lässt vermuten, dass das Wachstumspotential unter in vitro Bedingungen beschränkt ist und bestärkt ebenfalls die Aussage, dass der Entnahmezeitpunkt ein entscheidender Parameter für Untersuchungen dieser Art darstellt. TAKAHARA et al. (2004) gingen ebenfalls von diesen Voraussetzungen aus und verwendeten ausschließlich Präparate mit einem Gaumenplattenabstand von unter 0,5 mm. Alle Feten, die diese Mindestanforderung nicht erfüllten, wurden verworfen. Ebenso achteten SHIMIZU et al (2001) und PUNYCHANCHAIKUL et al. (2004) auf diese Mindestbedingungen und selektierten ihre Kulturen nach diesen Maßgaben.

Das ist eine mögliche Erklärung dafür, dass es nach der Kultivierung der Präparate nicht in jedem Falle zu einer Fusion der Gaumenplatten kommen konnte. Dementsprechend wäre es in 53 % der Fälle der Kulturen des A/WySnJ-Stammes und 22 % des NMRI-Stammes von vornherein nicht möglich gewesen, zu fusionieren. Das lässt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren, allerdings kann das keine alleinige Erklärung für unsere Ergebnisse sein, da die Fusionsraten niedriger sind, als es durch diesen Aspekt allein der Fall gewesen wäre.

GONG et al. (2001) verweisen auf die Notwendigkeit einer entsprechenden Plattengröße als Parameter für eine erfolgreiche Fusion. Die Genexpression, die das Wachstum der Gaumenplatten direkt betrifft, würde zwar ein regelrechtes Aufrichten nach wie vor einleiten, wegen ihrer reduzierten Größe allerdings würde sich kein ausreichender Kontakt bilden. Somit wäre keine ausreichende Fusion möglich (GONG et al. 2001).

DIEWERT und WANG sowie WANG et al. vertraten bereits 1992 eine erweiterte Form dieser Hypothese. Sie sahen ebenfalls einen Aspekt für die erhöhte Spaltrate in einer reduzierten Kontaktzeit des eingeeengten Kontaktgebietes, welches auf einem reduzierten Wachstum der Oberkieferwülste basiert. Nach ihrer Auffassung ist eine nicht näher spezifizierte Kontaktzeit nötig, um die Auflösungs-, Umgestaltungs- und Fusionsvorgänge in die Wege leiten zu können.

Der Aspekt eines eingeeengten Kontaktgebietes konnte durch die eigenen Untersuchungen bekräftigt werden. In den Fällen, in denen es nötig wurde, die Zunge separat zu entnehmen, da diese nicht primär aus dem Spaltbereich entfernt werden konnte, war die gesamte Distanz der Gaumenplatten durch die Zunge verlegt. Diese eingeeengten Platzverhältnisse erlaubten den Gaumenplatten nicht, sich in eine horizontale Lage zu begeben. Laut RICHMAN und MITCHELL (1996) liegt eine der Ursachen in der Dyskoordination des Ober- und Unterkieferwachstums begründet.

Schubert et al. (2005) untersuchten 18 Tage alte Feten auf die Position des Unterkiefers und der Zunge. Allen Vertretern des A/WySnJ-Stammes konnte eine mandibuläre Retrognathie nachgewiesen werden. Die Ausprägung der Retrognathie war bei den Spaltträgern erhöht und die Zunge befand sich bei allen Merkmalsträgern zwischen den Platten. Das Verkeilen der Zunge verhinderte die Orientierung und das Aufrichten der Gaumenplatten, in dessen Ergebnis Spalten entstehen (RICHMAN und MITCHELL 1996, HALLGRIMSON 2000).

Damit wäre auch die Erklärung für die benötigte Mindestentwicklung der Platten und des kraniofazialen Systems geliefert. Es besteht wahrscheinlich ein durch genetische Vorgaben definiertes Zeitfenster, währenddessen ein Kontakt der Platten stattfinden muss und bei dessen Überschreitung Mechanismen nur noch ausgleichend wirken können.

Einige wichtige erläuterte Entwicklungsdefizite, welche im Kontext mit den erwähnten Mechanismen stehen und zu einer erhöhten Spaltneigung führen können, sind in der nachfolgenden Tabelle noch einmal dargestellt worden (Tab. 20).

Tab. 20: Embryonale Entwicklungsmerkmale, die eine erhöhte Spaltprävalenz induzieren

Einflussfaktor	Autor
Retardierte Skelettentwicklung	HALLGRIMSON et al. 2000
Retardierte Körpergröße	SYSKA 2000
Retardierte Plattenentwicklung	GONG et al. 2001
Mandibuläre Retrognathie	SCHUBERT et al. 2005
Eingeschränkte Somitenzahl und Gesichtsentwicklung	CIRIANI et al. 1986
Reduzierte Kontaktzeit und Kontaktgebiet der Gaumenplatten	DIEWERT und WANG 1992 WANG et al. 1992
Mandibuläres Wachstumsdefizit	RICHMON und MITCHELL 1996
Veränderte Gesichtsmorphologie	YONG et al. 2007

In unserer Untersuchung kam es bei einigen Präparaten trotz medialem Gaumenplattenkontaktes nach der Entnahme der Feten zu keiner vollständigen Verschmelzung nach der Inkubation. Es verblieben anterior Teilspalten.

Eine mögliche Erklärung bietet das Fehlen der Expression verschiedener Gene entlang der anterior-posterior Achse. Diese werden regional reguliert und haben Wechselwirkungen zwischen dem Gaumenepithel und dem Mesenchym (ZHANG et al. 2002, NIE 2005). Als Beispiel sei das MSX1 Gen genannt, welches die epithelial- mesenchymale Umgestaltung in die Wege leitet und aus der homeobox-Familie stammt (DAVIDSON und HÜGEL 1991).

Durch die Präparation besteht die Möglichkeit, das empfindliche Epithel verletzt und die Expression für diesen Teil verhindert zu haben. Während die mittlere Region durch horizontale Ausrichtung und Verlängerung der Gaumenplattenpaare zur Fusion gelangt, kommt es im vorderen und hinteren Teil durch Gewebeumbau und durch die Verlängerung der Platten zur Fusion. HILLARD et al. (2005) fanden heraus, dass das vordere Gaumenepithel allein die Fähigkeit besitzt, das vordere Mesenchym anzusteuern. Selbst wenn die Plattenabschnitte im Mittelteil durch Elevation und Annäherung regelrecht

initiiert wurden, muss im vorderen Teil nicht zwangsläufig eine Proliferation und ein Remodelling stattfinden, wodurch es anterior zu Spalten kommen kann (YN et al. 2005).

GONG et al. (2001) bekräftigten den Einfluss des MSX1 Genes auf die Umgestaltung auch an A/WySnJ-Mäusen und fanden dazu ein homologes Gen beim Menschen.

Unser Organkulturmodell der Maus bezieht sich auf die Forschungsergebnisse von SHIOTA et al. (1990). Durch ihre Methode der suspendierten Organkultur für die Entwicklung fetaler Mausgaumen haben sie eine praktikable Methode für in vitro Untersuchungen entwickelt. Durch diese neue Technik, bei der 12 und 13 Tage alte Mausfeten in einem chemisch definierten, serumfreien Medium für 48 - 72 h kultiviert wurden, konnte erstmals extrauterin ein erfolgreicher Gaumenverschluss herbeigeführt werden. Wir haben ihre Methode aufgegriffen und für unsere Versuche modifiziert und ausgebaut.

Wichtige Inkubationsparameter für das Gaumenwachstum sind die Gaszusammensetzung, Temperatur und Kulturzeit. Dass es einen Einfluss der Kulturbedingungen auf die Plattenentwicklung gibt, belegten TAKIGAVA et al. (2004) an präparierten, einseitigen Gaumenplatten. Bei Säugetieren kommt es, wie in Kap. 2.2.2 beschrieben, zur Umwandlung des mittleren Gaumenrandepithels durch Apoptose, epithelial- mesenchymale Transformation und Zellwanderung. Im Endergebnis löst sich diese Barriere auf und die beiden Platten fusionieren. Bei einem statischen Versuchsaufbau mit einem Gasgemisch von 95 % Luft und 5 % CO₂ erfolgte eine MEE Zelltransformation von 35 %. Beim Einsatz von 95 % O₂ und 5 % CO₂ in Suspension soll es laut TAKIGAVA et al. (2004) sogar zu einer kompletten Umgestaltung der MEE Zellen kommen können. In der gleichen Studie ließ sich ebenfalls der Nachweis erbringen, dass ein Luftgemisch von 25 % zusammen mit 5 % Co₂ einen hemmenden Einfluss auf die MEE-Transformation hat (TAKIGAVA et al. 2004). Die Bebrütungsatmosphäre wird von verschiedenen Forschergruppen unterschiedlich bewertet und angewandt, was Tab. 7 bestätigt. Wir haben uns

für die Standardkulturbedingungen (95 % Luft, 5 % CO₂ und 37 °C bei einer Luftfeuchte von 98%) entschieden, mit welchen ein Gaumenverschluss uneingeschränkt möglich ist (TAYA et al. 1999, PUNGCHANCHAIKUL et al. 2005).

Grundsätzlich problematisch anzusehen ist, dass die Definition, wann ein Gaumenpaar als adhärent bzw. fusioniert anzusehen ist, in verschiedenen Arbeiten differiert. Wir unterscheiden 6 Scoregrade, wobei der erste Kontakt mit Score 4, 2/3 Adhärenz mit Score 5 und völlige Verschmelzung mit Score 6 beziffert wird. Andere Autoren haben keine dementsprechend differenzierte Unterteilung, was eine Einschätzung der Ergebnisse erschwert. SHIOTA et al. (1990), KOSAZUMA et al. (2004) und andere Autoren beschränkten sich nur auf Fusion und Nichtfusion, wobei teilweise schon ab einer Verschmelzung von 50 % Gaumenplattenlänge von Fusion gesprochen wird.

Für die Kultivierung der Präparate habe ich mich für einen statischen Versuchsaufbau (Kap. 3.1.2.3) entschieden. Die Vorteile einer statischen Kultivierung gegenüber der kontinuierlichen Rotation liegen in der eindeutigen Identifizierung der Präparate während der gesamten Untersuchungsphase, dem Ausschluss weiterer Kräfte als der Erdanziehung sowie der Möglichkeit, Veränderungen sofort einzusehen und zu bewerten.

Durch das Eigengewicht der Feten nach der Auflage auf die Inserts kann es allerdings zu einem erhöhten Reibewiderstand und damit zu einem zusätzlichen inhibierenden Faktor auf die Plattenentwicklung kommen. Beim Aufsetzen der Präparate könnte außerdem die zarte Epithelschicht beschädigt und damit die Fusionsprozesse beeinträchtigt werden (CARETTE und FERGUSON 1992).

AL-OBAIDI et al. (1995) gingen diesbezüglich einen anderen Weg, indem sie die Präparate in ein geschlossenes, mit Medium gefülltes Flaschensystem gaben. Durch eine kontinuierliche Rotation von ca. 12 - 15 rpm sollte ein gleichmäßiges Umspülen und die freie Entfaltung der Gaumenplatten gewährleistet werden. Sie räumten allerdings ein, dass dieses Verfahren der Suspensionstechnik auch eine Reihe von Unwägbarkeiten beinhaltet. Ein dreidimensionales Wachstum ist zwar jetzt möglich, jedoch kam es auch zu

Irritationen durch Turbulenzen und Scherkräfteinwirkungen. Bei einigen Präparaten kam es zu fehlerhaftem horizontalem Wachstum und überlappendem Verschlussmuster (AL-OBAIDI et al.1995).

Tab. 22: Einfluss verschiedener Versuchsbedingungen auf die Fusionsrate

Einflussfaktoren	Autor
Entnahmetag	DIEWERT et al. 1992 SYSKA 2000
Kultivierungsdauer	SHIMIZU et al. 2001
Plattendistanz	ERFANI et al. 2001 TAKAHARA et al. 2004 PUNCHYENCHAIKUL et al. 2004
Präparationstechnik	BRINKLEY et al. 1978
Medium	SHIOTA et al. 1990
Gasgemisch	TAKIGAVA et al. 2004
Versuchsaufbau	AL-OBAIDI et al. 1995 SHIOTA et al. 1990

Das in unseren Organkulturen benutzte Medium stammte von der Firma Biochrom und beinhaltet DMEM und HAM'S F12 im Verhältnis 1:1. Das Gemisch wurde zusätzlich mit L-Glutamin versetzt. Dem Nährmedium ist weder Serum noch Antibiotika zugesetzt worden. ZELTINGER et al. (1997) überprüfte diesbezüglich 11 Kulturmedien, ebenfalls unter teilweisem Zusatz von Kälberseren auf ihre Ernährungs- und Entwicklungspotenz hin. Optimale Ergebnisse erzielten sie mit DMEM-F12 Medium ohne Agenzienzusätze. ABBOTT et al. (1992) untersuchten den Einfluss verschiedener hemmender und fördernder Agenzien und den Einfluss bovinen Serums auf die Plattenfusion von Mäusen und Ratten (Tab. 21).

Tab.21 Wirkung verschiedener Agenzienzusätze im Wachstumsmedium auf das Plattenwachstum der sekundären Gaumen der Maus und Ratte (mod. nach ABBOTT et al. 1992 und WATANABE et al. 1995)

Agenzien	Wirkung auf das Plattenwachstum
Serumfreies Medium	Fusion der Gaumenplatten (Kontrollmedium)
1% FSB + Selenium + Transferrin + Glutamin	Anstieg der Fusionsrate bis 75 %
DEX + 1% FBS	Anstieg der Fusionsraten bis 68 %
TCDD	Anstieg der Fusionsraten (23 – 47 %) (Einfluss auf die mediale-epitheliale Differenzierung)
FBS > 1%	Wachstumsstörungen der Gaumenplatten
RA	Fusion von Maus und Ratte gehemmt (abnormale Proliferation und Differenzierung der MEE)
TRI + HC + DEX	Hemmung des Plattenwachstums von Maus und Ratte
PA	Abfall der Fusionsrate bis 8 %
HV	Abfall der Fusionsrate bis 14 %
Avidin	Abfall der Fusionsrate bis 25 %
CHX	Komplette Hemmung der Fusion

Seren variieren in ihrer Zusammensetzung und ihren Inhaltsstoffen und sind somit nicht eindeutig definierbar. Da dies eindeutig zu Lasten einer reproduzierbaren und einheitlichen Versuchsdurchführung geht, haben wir uns in unseren Versuchen gegen einen Zusatz entschieden.

Die vergrößerte Fusionsneigung im Zusammenhang von DEX oder TCDD in Gegenwart von FSB weist auf einen unbekanntem Faktor hin, der laut ABBOTT et al. (1992) für eine volle Aktivität der Plattenfusion nötig ist. Dennoch bezeichnen sie serumfreie Organkulturen für die Entwicklung von Maus-, Ratten- und menschlichen Gaumenexplantaten als geeignete Entwicklungsmedien.

AL-OBAIDI et al. (1995) belegten, dass es Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit von Feten unter in vitro Bedingungen gibt. Sie führten Untersuchungen zum Wachstumszustand sekundärer Gaumenplatten des NMRI-Mäusestammes unter in vitro und in vivo Bedingungen durch. Als Ergebnis konnte ein zeitlich verzögertes Wachstum der Gaumenplatten unter in vitro Bedingungen beobachtet werden. In unseren Untersuchungen ist diese Entwicklungsverzögerung sogar noch ausgeprägter, obwohl durch die variablen Versuchsbedingungen (Versuchsbeginn) nur ein Trend abzulesen war (siehe Abb. 21).

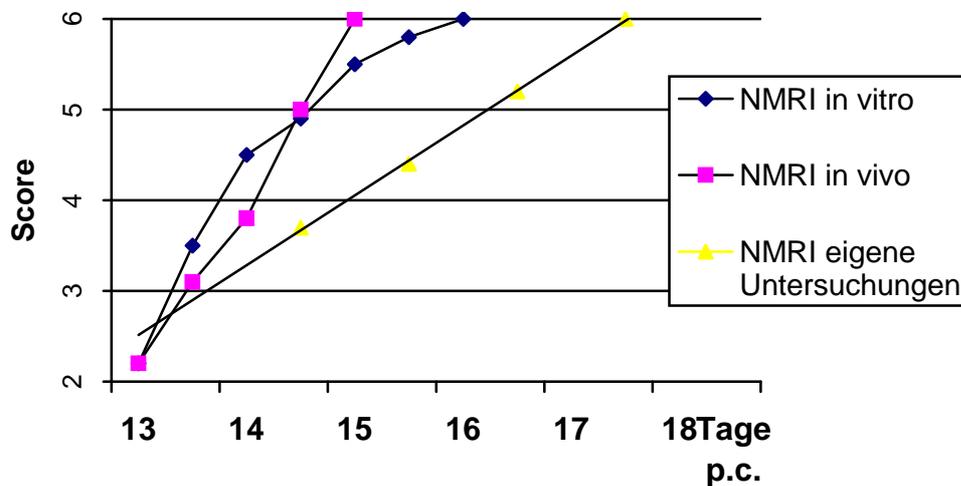


Abb.19: Entwicklung der sekundären Gaumenplatten der NMRI-Maus unter in vitro- und in vivo Bedingungen (mod. nach AL-OBAIDI et al. 1995) und der Trend der eigenen Untersuchungen

Im Ergebnis der Forschung auf dem Gebiet der Teratologie und der Prävention von Lippen-Kiefer- und Gaumenspalten stellte sich heraus, dass eine Reihe von Substanzen, in der kritischen Phase der Palatogenese verabreicht, in der Lage war, die ursprüngliche Spaltrate zu verändern (GONG et al. 2001).

SCHUBERT (1970, 1977) überprüfte die teratogene Empfindlichkeit der Hausmaus, indem er in der kritischen Entwicklungsphase des Gaumens Röntgenstrahlen, Cyclophosphamid oder Dexamethason verabreichte und stellte eine dosisabhängige teratogene Wirkung bis 100 % auf die Nachkommen fest.

Die teratogene Wirkung hängt neben vielen Faktoren (Dosis, Applikationszeitpunkt, Applikationsdauer) von der genetischen Disposition der Stämme ab. Mäusestämme, wie der NMRI-Stamm, mit einem früheren embryonalen Zeitpunkt des Gaumenverschlusses als der genetisch vorbelastete A/WySnJ-Stamm haben dementsprechend eine niedrigere Spaltrate (FRASER 1980). Den Grund dafür sieht FRASER in der reduzierten Kontaktzeit mit schädigenden Noxen.

Dies bedeutet, dass eine beschleunigte Embryogenese zu einer geringeren Spaltanfälligkeit führen könnte (SCHUBERT 2000). Durch die Zugabe von Vitaminkomplexen in das Wachstumsmedium beispielsweise wäre eine Wachstumsbeschleunigung und somit Erhöhung der Gaumenfusionsrate denkbar. Das ist in bei vivo Untersuchungen von SCHUBERT und RAUPACH (1991) bereits gelungen. Der Gaumenverschluss konnte dabei um ca. 6 Stunden vorverlegt werden. Diese Vorverlagerung des Gaumenfusionszeitpunktes resultierte aus der Vorverlagerung der gesamten embryonalen Entwicklung (SYSKA 2000). Auch spätere, weiterführende Untersuchungen beschäftigten sich mit diesem Thema und bestätigten diese Auffassung (NUGENT et al. 1998, PAROS et al. 1999, YN 2005).

Die Anwendung der Organkulturmodelle für teratologische Fragestellungen eröffnet eine interessante Perspektive mit neuen Aspekten. Frei von maternaler Beeinflussung könnten z.B. die Wirkung präventiver Substanzen getestet und die Möglichkeiten einer eventuellen „therapeutischen“ Beeinflussbarkeit nach stattgefundenem Ereignis „Spaltbildung“ geprüft werden. Dazu bedarf es aber auch weiterer Entwicklung der Methodik selbst, die eine gute Ergänzung und teilweise Alternative zu Tiermodellen darstellt.

6 Zusammenfassung

Die Forderung nach einer wirkungsvollen Therapie der LKGS-Spalten, noch mehr aber ihre Prävention, ist untrennbar mit dem Verständnis der Ätiologie und Morphologie sowie der Pathogenese verbunden. Um Teilen dieser Aspekte gerecht zu werden, wurde ein Organkulturmodell der Maus entwickelt, welches den Verschluss des sekundären Gaumens der Maus *in vitro* nachvollziehen lässt.

Durch die Umgehung des maternalen Organismus kann der Einfluss von teratogenen und präventiven Substanzen auf die Gaumenentwicklung direkt getestet werden.

In unseren Versuchen sollte das Wachstum der sekundären Gaumenplatten bis zur Verschmelzung an zwei unterschiedlichen Mäusestämmen beobachtet werden. Von besonderem Interesse waren auch die Einflüsse des Versuchsaufbaus und die Präparation der Organkulturmodelle auf die Fusions- bzw. Wachstumsrate. Damit soll in Hinblick auf weitere Versuche die Methodik weiterentwickelt werden können.

Um auch auf genetische Faktoren eingehen zu können, war ein Mäusestamm mit einer geringeren und genetisch nicht vorbelasteten und einer mit einer hohen und genetisch disponierten Fehlbildungsrate ausgewählt worden. Der NMRI-Stamm besitzt eine spontane Spaltbildungsrate von 2 - 3 % und der A/WySnJ-Stamm mit einem genetischen Basisdefekt eine Spaltbildungsrate von 25 - 35 %. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen aufgezogen. Für die Kopulation stand ein Zeitfenster von nur 1,5 Stunden zur Verfügung, um einen möglichst identischen Entwicklungsstand aller Tiere zu gewährleisten. Nach 14 Tagen und 6 Stunden *post conceptionem* wurden die Muttertiere geopfert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil der Gaumenverschluss der Embryonen *in vivo* noch nicht stattgefunden hat, aber der Verschluss unmittelbar bevorsteht. Die Feten wurden anschließend nach Eröffnung der Bauchdecke entnommen und sukzessive präpariert. Dazu ist der Unterkiefer unter Mitnahme der Zunge abpräpariert und in einem definierten, serumfreien Medium zur Inkubation in Sechswellschalen gegeben worden. Es schloss sich eine 3-tägige Inkubationszeit mit täglichem Mediumwechsel an. Eine

makrophotographische und histologische Dokumentation sollte die Ergebnisse sichern und wurde jeweils vor- und nach der Inkubation durchgeführt.

Der Gaumenverschluss wurde in 6 Stadien nach dem Scoreschema von AL-OBAIDI (1995) aufgeteilt. Dieses ermöglichte eine differenzierte Beurteilung der Gaumenentwicklung, sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in weiterführenden Studien.

Insgesamt standen für die Untersuchungen 114 Feten von 17 Muttertieren des NMRI-Stammes und 93 Feten von 30 Muttertieren des A/WySnJ-Stammes zu Verfügung. Bereits zur Entnahme gab es Unterschiede in der Größe und Anzahl der Feten pro Muttertier. Der A/WySnJ-Stamm lag bei beiden Parametern hinter denen des NMRI-Stammes zurück. Das Ergebnis der Untersuchungen nach 72 Stunden Inkubation erbrachte ein signifikantes Wachstum der sekundären Gaumenplatten des NMRI-Stammes und ein eher verhaltenes und nicht signifikantes Wachstum des A/WySnJ-Stammes. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Entwicklungsdefizit des A/WySnJ-Stammes und niedriger Fusionsraten wird basierend auf der genetischen Prädisposition zur Spaltbildung diskutiert. Im Gegensatz zum NMRI-Stamm, der eine Fusionsrate von 53 % aufwies, wurden beim A/WySnJ-Stamm nur 13 % erreicht. Der Score als Indikator für die Wachstumszustände der sekundären Gaumenplatten lag zum Entnahmezeitpunkt beim NMRI-Stamm bereits bei median 4 (bei 2 beim A/WySnJ-Stamm). Nach der Bebrütung stieg der Score bei den NMRI-Präparaten median auf 5, während er bei den A/WySnJ-Präparaten im wesentlichen verharrte. Einige wichtige Ergebnisse sind in Tab. 22 nachfolgend zusammengefasst.

Tab. 22: Gegenüberstellung einiger ausgewählter Parameter beider Mausstämmе

Untersuchungsfakten	NMRI-Stamm	A/WySnJ-Stamm
Zahl der Muttertiere	17	30
Zahl der Feten	114	94
Score zum Untersuchungszeitpunkt I	4	2
Score zum Untersuchungszeitpunkt II	5	2
Durchschnittliche Wurfzahl	7	3
Spaltbildungsrate	2 %	35 %
Durchschnittliche Größe der Feten	9,7mm	3,6mm

Es wird eine Reihe von Faktoren diskutiert, welche die Ergebnisse beider Mäusestämmе in Verbindung mit Literaturdaten begründen könnten. Im Wesentlichen liegen die Unterschiede in der Verwendung unterschiedlicher Mäusestämmе, abweichender Versuchs- und Präparierdurchführung, sowie in der Auswertungsmethodik.

Eigene Ergebnisse liegen bei 53 % für einen Verschluss von mindestens 2/3 der gesamten Gaumenfläche für NMRI und von 13 % für A/WySnJ nach 72 Std. Inkubation. CHOU et al. (2004), SHIOTA et al. (1990), SHIMIZU et al. (2001) und andere Autorengruppen berichteten demgegenüber von höheren Fusionswerten. Eine Problematik liegt vor allem in der Definition für verschlossene Gaumen und in der Vorselektion der Präparate.

Das entwickelte Modell und seine Ergebnisse an den zwei genetisch unterschiedlichen Stämmеn kann Grundlage für weitere Untersuchungen sein. Angedacht ist die Prüfung, in wieweit durch Zugabe von Agenzien zu dem Nährmedium die Wachstumsrate gefördert oder sogar der genetisch fixierte Endpunkt der Gaumenfusion beeinflusst werden kann. Dies soll die Möglichkeit eröffnen, „therapeutisch“ auf die Ausbildung von Gaumenspalten einwirken zu können. Klinisch würde das bedeuten, auch nach der kritischen Phase in der Schwangerschaft eine Einflussmöglichkeit in therapeutischer Hinsicht zu haben.

7 *Literaturverzeichnis*

1. Abbott BD, Buckalew AR: Embryonic palatal responses to teratogens in serum-free organ culture. *Teratology* 45 (1992) 369-82
2. Al-Obaidi N, Kastner U, Merker H-J, Klug S: Development of a suspension organ culture of the fetal rat palate. *Arch Toxicol* 69 (1995) 472-9
3. Andrä A, Neumann HJ (Hrsg.): Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1989, S. 21-72
4. Andrews J, McGarry J: A community study of smoking in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 79 (1972) 1057-73
5. Baxter H und Fraser FC: Production of congenital defects in offspring of female mice treated with cortisone. *McGill Med J* 19 (1950) 245-9
6. Bethmann W, Koch J: Das Thallwitzer Modell zur Einteilung von Lippen-Kiefer- Gaumen- Segelspalten und die Häufigkeit dieser Missbildungen. *Zschr Ärztl Fortbild* 61 (1963) 733-8
7. Bethmann W: Einige humangenetische Aspekte bei Missbildungen und Syndromen im Kiefer-Gesichtsbereich. *Stomatol* 25 (1975) 107-18
8. Brent RL, Robert L: Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drugs, chemicals, and physical agents). *Pediatrics* 113 (2004) 984-95
9. Brinkley L, Basehoar G, Avery JK: Effects of craniofacial structures on in vitro palatal shelf elevation. *J Dent Res* 53 (1974) 63

10. Brinkley L, Basehoar G, Avery A: A new *in vitro* system for studying secondary palate development. *J Embryol Exp Morphol* 34 (1975) 485-95
11. Brinkley L, Basehoar G, Avery J: Effects of craniofacial structures on mouse palatal closure *In vitro*. *J Dent Res* 57 (1978) 402-11
12. Brinkley LL, Morris-Wiman J: Computer-assisted analysis of hyaluronate distribution during morphogenesis of the mouse secondary palate. *Development* 100 (1987) 629-35
13. Bulleit RF, Zimmermann EF: The influence of the epithelium on palate shelf reorientation. *J Embryol Exp Morphol* 88 (1985) 265-79
14. Carette MJ, Ferguson WJ: The fate of medial edge epithelial cells during palatal fusion *in vitro*: an analysis by Dil labelling and confocal microscopy. *Development* 114 (1992) 379-88
15. Carter CO: Polygenic inheritance and common diseases. *Lancet* 1 (1969) 1252-6
16. Cervenka J, Ruzicka L, Kláskova O: Seasonal incidence of cleft lip and palate in Czech regions. *Cleft Palate J* 6 (1996) 35-9
17. Chabora AJ, Horowitz SL: Cleft lip and palate: one genetic system. A new hypothesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 38 (1974) 181-6
18. Chou MJ, Kosazuma T, Takigawa T, Yamada S, Takahara S, Shiota K: Palatal shelf movement during palatogenesis: a fate map of the fetal mouse palate cultured *in vitro*. *Anat Embryol (Berl)*. 208 (2004) 19-25
19. Ciriani D, Diewert VM: A comparative study of development during primary palate formation in A/WySn, C57BL/6, and their F1 crosses. *J Craniofac Genet Dev Biol* 6 (1986) 369-77

20. Condie BG, Bain G, Gottlieb DI, Capecchi MR: Cleft palate in mice with target mutation in the gamma- aminobutyric acid- producing decarboxylase 67. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 11451-55
21. Cox TC: Taking it to the max: the genetic and developmental mechanisms coordinating midfacial morphogenesis and dysmorphology. *Clin Genet* 65 (2004) 163-76
22. Culiati CT, Stubbs L, Nicholls RD, Montgomery CS, Russell LB, Johnson DK, Rinchik EM: Concordance between isolated cleft palate in mice and alterations within a region including the gene encoding the beta 3 subunit of the type A gamma- aminobutyric acid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 5105-9
23. Darling S: Mice as models of human developmental disorders: natural and artificial mutants. *Curr Opin Genet Dev* 6 (1996) 289-94
24. Daston GP: Advances in understanding mechanisms of toxicity and implications for risk assessment. *Reprod Toxicol* 11 (1997) 388-96
25. Davis JS, Ritchie HP: Classification of congenital clefts of the lip and palate. *J Am Med Assoc* 79 (1922) 1323-7
26. Desprez PY, Roskelley C, Campisi J, Bissell MJ: Isolation of functional cell lines from a mouse mammary epithelial cell strain: the importance of basement membrane and cell-cell interactions. *Mol Cell Differ* 1 (1993) 99-110
27. Diewert VM, Lozanoff S: Animal models of facial clefting: experimental, congenital, and transgenic. In: Mooney MM, Siegel MI (Hrsg.): *Understanding Craniofacial Anomalies: Etiopathogenesis of Craniosynostoses and Facial Clefting*. New York: Wiley-Liss, 2002, S. 251-272.

28. Diewert VM, Wang KY: Recent advances in primary palate and midface morphogenesis research. *Crit Rev Oral Biol Med* 4 (1992) 111-30
29. Donahue RF: Birth variables and the incidence of cleft palate: Part 1. *Cleft Palate J* 2 (1965) 282-90
30. Erfani S, Maldonado TS, Crisera CA, Warren S, Lee S, Longaker MT: An in vitro mouse model of cleft palate: defining a critical intershelf distance necessary for palatal clefing. *Plast Reconstr Surg* 108 (2001) 403-10
31. Falconer DS: The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives. *Ann Hum Genet* 29 (1965) 51-76
32. Ferguson MW: Palatal shelf elevation in the Wistar rat fetus. *J Anat* 125 (1978) 555-577
33. Ferguson MW: The American alligator (*Alligator mississippiensis*): a new model for investigating developmental mechanism in normal and abnormal palate formation. *Med Hypotheses* 5 (1979) 1079-90
34. Ferguson MW: The structure and development of the palate in *Alligator mississippiensis*. *Arch Oral Biol* 26 (1981) 427-43
35. Ferguson MW: Palate development. *Development* 103 (1988) 41-60
36. Fitchett JE, Hay ED: Medial edge epithelium tranforms to mesenchyme after embryonic palatal shelves fuse. *Dev Biol* 131 (1989) 455-74
37. Fogh-Andersen P: Inheritance of Hare Lip and Cleft Palate. *Nyt Nordisk Forlag Arnold Busek, Copenhagen, 1942*
38. Fraser FC: The genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Hum Genet* 22 (1970) 336-52

39. Fraser FC, Pashayan H: Relation of face shape to susceptibility to congenital cleft lip. A preliminary report. *J Med Genet* 7 (1970) 112-7
40. Fraser FC: The multifactorial threshold concept- uses and misuses. *Teratology* 14 (1976) 267-80
41. Fraser FC: Animal models for craniofacial disorders. *Prog Clin Biol Res* 46 (1980) 1-23
42. Gabka J: Hasenscharten und Wolfsrachen: Entstehung, Behandlung und Operationsverfahren. 2. Aufl. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1964, S. 114-32
43. Gendron-Maguire M, Mallo M, Zhang M, Gridley T: Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* 75 (1993) 1317-31
44. Gong SG: Phenotypic and Molecular Analyses of A/WySn Mice. *Cleft Palate Craniofac J* 38 (2001) 486-91
45. Gregg JM, Avery JK: Experimental studies of vascular development in normal and cleft palate mouse embryos. *Cleft Palate J* 8 (1971) 101–17
46. Grimm G: Lippen- Kiefer- Gaumen-Spalten. In: Schwenzer N, Grimm G (Hrsg.): Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde. Spezielle Chirurgie Bd. 2. Thieme, Stuttgart-New York, 1990, S. 382-423
47. Gurley JM, Wamsley M, Susann MS, Sandell LJ: Alterations in apoptosis and epithelial- mesenchymal transformation in an in vitro cleft palate model. *Plast Reconstr Surg* 113 (2004) 907-14
48. Gylling U, Soivid AJ: Frequency, morphology and operative mortality in cleft lip and palate in Finland. *Acta Chir Scand* 123 (1962) 1-5

49. Hagberg C, Larson O, Milerad J: Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. *Cleft Palate Craniofac J* 35 (1998) 40-5
50. Hallgrímsson B, Dorval CJ, Zelditch ML, German RZ: Craniofacial variability and morphological integration in mice susceptible to cleft lip and palate. *J Anat* 205 (2004) 501-17
51. Hasty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, Bradley A: Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature* 350 (1991) 243-6
52. Hay ED: An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154 (1995) 8-20
53. Haym J. Über die Häufigkeit der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. *Zahnärztl Rdsch* 23 (1950) 360-4
54. Hillard SA, Yu L; Gu S, Zhang Z, Chen YP: Regional regulation of palate growth and patterning along the anterior- posterior axis in mice. *J Anat* 207 (2005) 655-67
55. Hirahuma H, Jikko A, Maeda M, Fuchikat H: Effect of X irradiation on secondary palate development in mice. *Radiat Res* 154 (2000) 34-8
56. Hogan B, Costantini F, Lacy E: Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994, S. 127-216
57. Holmes LB, Harvey EA, Coull BA: The teratogenicity of anticonvulsant drugs. *N Engl J Med* 344 (2001) 1132-8
58. Honigmann P: Auswertung der Ergebnisse nach einseitiger Lippenspalten-Operation: Eine retrospektive Studie. *Med Diss Basel* (2005) S. 4-17

59. Horch HH: Praxis der Zahnheilkunde. Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. 3. Auflage, Band 10/II. Urban-Schwarzenberg. München-Wien-Baltimore, 1998, S.28
60. Ideberg M: Assessment of 392 cleft lip, alveolus and palates in newborn babies as to forms, seasons and distribution of associated malformations. In: Kriens O (Ed.): What is a cleft lip and palate? A multidisciplinary update. Thieme, Stuttgart - New York, 1989, S. 40
61. Juriloff DM, Trasler DG: Test of the hypothesis that embryonic face shape is a causal factor in genetic predisposition to cleft lip in mice. *Teratology* 14 (1976) 35-41
62. Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ: Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome* 12 (2001) 426-35
63. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Heisterkamp N, Groffen J: Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial- mesenchymal interaction. *Nat Genet* 11 (1995) 415-21
64. Kalter H: The history of the A family of inbred mice and the biology of its congenital malformations. *Teratology* 20 (1979) 313-32
65. Kerrigan JJ, Mansell JP, Sengupta A, Brown N, Sandy J.R: Palatogenesis and potential mechanisms for clefting. *J R Coll Surg Edinb* 45 (2000) 351-8
66. Koch J: Zur Diagnostik der Lippen-, Kiefer- und Gaumenspalten. *Dtsch Stomatol* 13 (1963) 660-6
67. Kosazuma T: Development of the fetal mouse palate in suspension organ culture. *Acta Anat* 137 (1990) 59-64

68. Kosazuma T, Hashimoto S, Ohno H, Chou MJ, Shiota K: Organ culture of the fetal mouse palate for screening the developmental toxicity of chemicals: a validation study. *Congen Anomal* 44 (2004) 60-71
69. Kreybig T von: Experimental prenatal toxicology. *Arzneimittel-Forschung* 17 (1968) 1-211
70. Kreybig T von: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Teratogenen auf die kritischen Phasen der vorgeburtlichen Entwicklung des Gesichtsschädels. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 196 (1970) 270-2
71. Kreybig T von: Zur Teratologie der Hydroxamsäuren. *Med Klinik* 71 (1976) 844-54
72. Kriens O: Incidence, number and sex distribution of the various forms of cleft lip, alveolus and/or palate. In: Kriens O: What is a cleft lip and palate? A multidisciplinary update. Thieme, Stuttgart-New York, 1989, S 44
73. Krost B: Saisonale Einflüsse bei der Entstehung von Lippen- Kiefer-Gaumenspalten. Halle. Univ. Med. Fak. Diss. (2001)
74. Kurisu K, Niswander JD, Johnston MC, Mazaheri M: Facial morphology as an indicator of genetic predisposition to cleft lip and palate. *Am J Hum Genet* 26 (1974) 702-14
75. Lenz W: Abhängigkeit der Mißbildungen vom Alter der Eltern. *Dtsch Med Wochenschr* 101 (1976) 1172
76. Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedmann N, Werb Z, Bissel MJ: Matrix metalloproteinase Stromelysin- 1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 139 (1997) 1861-72

77. Loevy H: Genetic influences on induced cleft palate in different strains of mice: *Anat Rec* 145 (1963) 117-22
78. Melton DW: Gene targeting in the mouse. *Bioessays* 16 (1994): 633-8
79. Moxham BJ: The development of the palate- a brief review. *Eur J Anat* 7 (2003) 53-74
80. Murray JC, Schutte BC: Cleft palate: Players, pathways, and pursuits. *J Clin Invest* 113 (2004) 1676-8
81. Myers GS, Petrakis NL, Lee M: Short communication: Cultivation of embryonic rat palate in defined and semi-defined media. *Arch Oral Biol* 12 (1967) 565-8
82. Neumann D, Koberg W, Frank A: Die Häufigkeit der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. In: Schuchardt K, Steinhardt G, Schwenzler N (Hrsg): *Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie Bd. 16/17*. Thieme, Stuttgart, 1973, S. 3
83. Nie X: Cranial base in craniofacial development: Developmental features, influence on facial growth, anomaly, and molecular basis. *Acta Odontol Scand* 63 (2005) 127-35
84. Nugent P, Ma L, Greene RM: Differential expression and biological activity of retinoic acid-induced TGF beta isoforms in embryonic palate mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 177 (1998) 36-46
85. Overton J: Response of epithelial and mesenchymal cells to culture on basement lamella observed by scanning microscopy. *Exp Cell Res* 105 (1977) 313-23
86. Paros A, Beck S: Folinic acid reduces cleft lip [CL(P)] in *AWySn* mice. *Teratology* 60 (1999) 344-7

87. Peter K: Modelle zur Entwicklung des menschlichen Gesichtes. *Anat Anz* 39 (1911) 41-66
88. Pourtois M: Onset of the acquired potentiality for fusion in the palatal shelves of rats. *J Embryol Exp Morphol* 16 (1966) 171-82
89. Pfeifer G: Morphology of the formation of clefts as a basis for treatment. In: Schuchardt K (Ed): *Treatment of Patients with Clefts of Lip, Alveolus, and Palate*. Thieme, Stuttgart, 1966, S.14
90. Pfeifer G: Die Entwicklungsgeschichte der Lippen- Kiefer- Gaumenspalten als Leitspur für die Behandlung. *M Schr Kinderheilkd* 114 (1966) 244-9
91. Pratt RM, Goggins JAL, Wilk AL, King CT: Acid mucopolysaccharide synthesis in the secondary palate of the developing rat at the time of rotation and fusion. *Dev Biol* 32 (1973) 230-7
92. Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T: Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 11 (1995) 409-14
93. Punyanchaikul P, Gelbier M, Fere H, Block-Zupan: Gene expression during palate fusion in vivo and in vitro. *J Dent Res* 84 (2005) 526-31
94. Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, *et al.*: Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185 (1997) 165-84

95. Richman J, Mitchell PJ: Craniofacial development: Knockout mice take one on the chin. *Curr Biol* 6 (1996) 364-7
96. Roberts CJ, Lowe CR, Lloyd S: Cyclic variations in the date of last menstrual period of mothers of infants with congenital malformations in South Wales, 1964-66. *Br J Prev Soc Med* 26 (1972) 212-8
97. Romitti P, Lidral AC, Munger RG, Daak-Hirsch S, Burns TL, Murray JC: Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59 (1999) 39-50
98. Satokata I, Maas R: Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 6 (1994) 348-56
99. Saxèn I: Epidemiology of cleft lip and palate. An attempt to rule out chance correlations. *Br J Prev Soc Med* 29 (1975) 103-10
100. Schiebler TH, Schmidt W: Kopf und Hals. Entwicklung und Wachstum. In: Schiebler TH, Schmidt W (Hrsg): Anatomie. Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. Springer, Berlin-Heidelberg-New-York-London-Paris-Tokyo-Hong-Kong-Barcelona-Budapest, 1991, S. 397-409
101. Schubert J: Experimentelle Gaumenspalten durch Röntgenbestrahlung und der Einfluß von Serotonin als Strahlenschutzstoff. Leipzig. Med. Diss. (1970)

102. Schubert J: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der medikamentösen Prophylaxe kongenitaler Spaltbildungen. II. Untersuchungen an durch Cyclophosphamid erzeugten Gaumenspalten bei Mäusen. Zahn-, Mund-, Kieferheilk 65 (1977) 638-41
103. Schubert J: Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung experimenteller Gaumenspalten an der Hausmaus. Halle/Saale Med. Fak. Prom B (1980)
104. Schubert J und Raupach HW: Tierexperimentelle Untersuchungen kranio-fazialer Mißbildungen und ihre klinische Relevanz. Nova acta Leopold 58 (1986) 513-20
105. Schubert J, Metzke H, Bittroff H, Hintz J, Lindner H: Significance of microforms of CLP for anomalies and malformations of the jaws and face. Acta Chirurg Plast 30 (1988) 14-20
106. Schubert J: New finding explaining the mode of action in prevention of facial clefting and first clinical experience. J Cranio Max Fac Surg 18 (1990) 343-7
107. Schubert J, Raupach HW: Mode of action of drug-related prevention of malformations in animal experiments. In: Pfeifer G. (Ed.): Craniofacial abnormalities and clefts of the lip, alveolus and palate. 4th Hamburg International Symposium. Thieme, Stuttgart, New York, 1991, S. 161-162
108. Schubert J: Versuch eines Klinikums zur Überwindung der Empirie. In: Parthier B. (Hrsg.): Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina, Jahrbuch 2000. Leopoldina, Halle(Saale), 2000 (R 3), S. 263-286

109. Schubert J, Jahn H, Berginski M: Experimental aspects of the pathogenesis of Robin sequence. *Cleft Palate Craniofac J* 42 (2005) 372-6
110. Schulze C: Über genetische Faktoren bei der Ätiologie von Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten. *Fortschr Kieferorthop* 47 (1986) 346-55
111. Schutte BC, Murray JC: The many faces and factors of orofacial clefts. *Hum Mol Genet* 8 (1999) 1853-9
112. Scott JE, Persand TV: Prostaglandin F2 alpha effects on the early mouse embryo. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 32 (1981) 549-52
113. Shapiro BL, Sweney L: Electron microscopic and histochemical examination of oral epithel-mesenchymal interaction (programmed cell death). *J Dent Res* 48 (1969) 652-60
114. Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR: Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 346 (1995) 393-6
115. Shimizu N, Aoyama H, Hatakenaka N, Kaneda M, Teramoto S: An in vitro screening system for characterizing the cleft palate- inducing potential of chemicals and underlying mechanisms. *Reprod Toxicol* 15 (2001) 665-72
116. Shiono PH, Klebanoff MA, Berendes HW: Congenital malformations and maternal smoking during pregnancy. *Teratology* 34 (1986) 65-71
117. Shiota K, Kosazuma T, Klug S, Neubert D: Development of the fetal mouse palate in suspension organ culture. *Acta Anat (Basel)* 137 (1990) 59-64

118. Slavkin HC: Molecular biology experimental strategies for craniofacial-oral-dental dysmorphology. *Connect Tissue Res* 32 (1995) 233-39
119. Smiley GR, Koch WE: A comparison of secondary palate development with different in vitro techniques. *Anat Rec* 181 (1975) 711-23
120. Spencer G: Background on mouse as a model organism. National Human Genome Research Institute (2002) 1-3
121. Sperber GH: Formation of the primary palate. In: Wyszynski D (Hrsg.): *Cleft Lip and Palate from Origin to Treatment*. Oxford University Press (2002) S. 5-13
122. Sun D, McAlmon KR, Davies JA, Bernfield M, Hay ED: Simultaneous loss of expression of syndecan-1 and E-cadherin in the embryonic palate during epithelial- mesenchymal transformation. *Int J Dev Biol* 42 (1998) 733-6
123. Syska E: Experimentelles Modell der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten als pathogenetisches Äquivalent der Fehlbildung des Menschen. Halle. Univ. Diss. (2000)
124. Takahara S, Takigawa T, Shiota K: Programmed cell deaths not a necessary prerequisite for fusion on the fetal mouse palate. *Int J Dev Biol* 48 (2004) 39-46
125. Takigawa T, Shiota K: Terminal differentiation of palatal medial edge epithelial cells in vitro is not necessarily dependent on palatal shelf contact and midline epithelial seam formation. *Int Dev Biol* 48 (2004) 307-17

126. Taya V, Ferguson MW: Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Development* 126 (1999) 3869-79
127. Thompson JN: The role of vitamin A in reproduction. In: DeLuca HF & Suttie JW (Hrsg.): *The Fat Soluble Vitamins*. University of Wisconsin Press, Madison, Wi, 1969, S. 267-281
128. Thyagarajan T, Totey S, Danton MJS, Kulkarni AB: Genetically altered mouse models: The good, the bad, and the ugly. *Crit Rev Oral Biol Med* 14 (2003) 154-74
129. Tolarová MM, Cervenka J: Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *Am J Med Genet* 75 (1998) 126-37
130. Tolarová MM: Orofacial clefts in Czechoslovakia: incidence, genetics, and prevention of cleft lip and palate over a 19-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 21 (1987) 19-25
131. Trasler DG: Pathogenesis of cleft lip and its relation to embryonic face shape in A-J and C57BL mice. *Teratology* 1 (1968) 33-49
132. Veau V: *Division palatine*. Paris: Masson et cie (1931)
133. Veau V: Fünf Hasenscharten bei Hundekeimlingen von 11-14 mm Sstl.. *Anatomy and Embryology* 111 (1942) 433-47
134. Woolf CM, Woolf RM, Broadbent TR: Genetic and nongenetic variables related to cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg* 32 (1963) 65-74
135. Wang KY, Diewert VM: A morphometric analysis of craniofacial growth in cleft lip and noncleft mice. *J Craniofac Genet Dev Biol* 12 (1992) 141-54

136. Wang KY, Juriloff DM, Diewert VM: Deficient and delayed primary palatal fusion and mesenchymal bridge formation in cleft lip-labile strains of mice. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 15 (1995) 99-116
137. Watanabe T, Dakshinamurti K, Persaud VN: Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture. *J Nutr* 125 (1995) 2114-21
138. Wu H, Liu X, Jaenisch R: Double replacement: Strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine *Col1a-1* gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 2819-23
139. Yn L, Gu S, Song Y, Yan M, Zhang Z, Chen Y, Zhang X, Zhang G, Chen Y: *Shox 2*-deficient mice exhibit a rare type of incomplete clefting of the secondary palate. *Development* 132 (2005) 4397-406
140. Yu P, Gosaim AK, Khamna A: The role of transforming factor-beta in the modulation of mouse cranial suture fusion. *Plast Reconstr Surg* 108 (2001) 916-24
141. Zeltinger J, Holbrook KA: A model system for long-term serum-free suspension organ culture of human fetal tissues: experiments on digits and skin from multiple body regions. *Cell Tissue Res* 290 (1997) 51-60
142. Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y: Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 129 (2002) 4135-46
143. Zimmermann B, Zsambaos D: Retinoids inhibit the differentiation of embryonic-mouse mesenchymal cells in vitro. *Arch Dermatol Res* 277 (1985) 98-104

144. Zschiesche S: Thoughts on the relationship of cleft patients.
Fortschr Kieferorthop 162 (1982) 251-64
145. Zschiesche S, Schwanitz G, Fleischer-Peters A: Untersuchungen zur Häufigkeit zusätzlicher Anomalien bei Spaltpatienten. In: Pfeifer G (Hrsg.): Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Behandlungskonzepte, Spätergebnisse, Teamwork und Fürsorge, Teratologie. 3. Internationales Symposium, Hamburg 1979. Thieme, Stuttgart-New York, 1982, S. 249-252

8 *Thesen*

- 1.) Untersuchungen der Embryonalentwicklung an Mäusen als Vertreter der Vertebraten spiegeln grundsätzlich die morphologischen und funktionellen Gegebenheiten der Palatogenese des Menschen wider.
- 2.) Bei der Dysgenese des sekundären Gaumens finden sich die gleichen phänotypischen Merkmale bei Maus und Mensch.
- 3.) Auf der Basis der fetalen Genetik ermöglicht das Organkulturmodell des sekundären Gaumens der Maus die Entwicklungsvorgänge unter Umgehung der übrigen fetalen und mütterlichen Einflüsse zu studieren.
- 4.) Die Mechanismen der Palatogenese laufen in einem festgelegten zeitlichen Rahmen ab und liegen unter in vitro Bedingungen zeitlich hinter den in vivo Abläufen. Sie sind genetisch determiniert.
- 5.) Eine Mindestentwicklung des kraniofazialen Systems und eine Mindestannäherung und Größe der Gaumenplatten ist nötig, um einen kompletten Gaumenverschluss unter in vitro Bedingungen herbeiführen zu können. Dementsprechend ist der Entnahmetag ein entscheidendes Kriterium für die Reife der Feten und den Entwicklungsstand der Gaumenplatten.
- 6.) Die Entwicklung der Gaumenplatten des sekundären Gaumens des A/WySnJ-Stammes liegt am Entnahmetag sowie nach der Inkubation hinter der des NMRI-Stammes zurück. Das Wachstumspotential des NMRI-Stammes ist unter in vitro Bedingungen wesentlich höher als das des A/WySnJ-Stammes.
- 7.) Der A/WySnJ-Mäusestamm hat genetisch bedingte Entwicklungsdefizite, welche im Modell wie auch unter in vivo Bedingungen mit einer erhöhten Spaltrate im Vergleich zum NMRI-Mäusestamm einhergehen. Entwicklungsdefizite, die mit einer erhöhten Spaltrate einhergehen, können sein:
 - Retardierte Körper- und Skelettentwicklung
 - Retardierte Gesichtsentwicklung, insbesondere des Unterkiefers
 - Reduziertes Kontaktgebiet und Kontaktzeit
 - Veränderte Gesichtsmorphologie
- 8.) Das 6-stufige Scoresystem gibt detailliert und reproduzierbar die Entwicklungsstufen der sekundären Gaumenplatten unter in vitro Bedingungen wieder.

- 9.) Die verwendeten Geräte und Materialien, sowie die Methode der Versuchsdurchführung und die Präparation haben einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis der in vitro Untersuchungen.
Der statische Versuchsaufbau unter Standardkulturbedingungen und das verwendete Medium ohne weitere Zusätze eignen sich gut für Organkulturen.
- 10.) Der Versuchsaufbau und deren Durchführung ist reproduzierbar und geeignet, Einflussfaktoren (Medikamente etc.) in der Phase der Gaumenfusion zu untersuchen mit dem Ziel, die Fusionsrate auch bei genetisch disponierten Mäusestämmen zu beeinflussen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Andreas Schubert
Kurt-Moosdorf-Strasse 10
61118 Bad Vilbel

anschu3@freenet.de

geb. 01.11.1970 in Lutherstadt Eisleben

deutsche Staatsangehörigkeit

ledig

Schulbildung

1977 – 1987 Polytechnische Oberschule in Eisleben und Halle

1994 – 1997 Abitur am Kolleg in Halle

Berufsausbildung und Berufstätigkeit

1987 - 1990 Berufsausbildung zum Mess-Steuer-Regeltechniker in BUNA-Werken

1990 - 1991 Wehrdienst

1991 - 1994 Starkstromtechniker bei der Firma Ritter Starkstromtechnik Berlin

1999 - 2005. Studium der Zahnmedizin an der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg

2006 - 2008 Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dr. Wöltge, Limburg

2008 - Angestellter Zahnarzt und Weiterbildung zum Oralchirurgen in der Praxis Dr. Dr. Frohn in Krefeld

10 Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die diesem Antrag beiliegende Dissertation mit dem Titel "Entwicklung eines Organkulturmodells des embryonalen Gaumens der Maus" noch nie, weder ganz noch teilweise, im Rahmen eines anderen Promotionsverfahrens vorgelegt oder veröffentlicht habe. Die vorliegende Arbeit habe ich ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher nicht veröffentlicht.

Bad Vilbel, 10.08.2008

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit wahrnehmen, all denen zu danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Dr. Schubert gilt mein besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die vielen Hinweise und Ratschläge.

Ich bedanke mich auch für die gute Betreuung bei meinem Mentor, Dr. Dr. Berginski.

Frau Haufe vom Universitätsrechenzentrum hat sich mit bewundernswerter Geduld meiner statistischen Probleme angenommen und immer wieder Hilfestellungen bei statistischen Interpretationen gegeben.

Dr. Wöltge nebst Familie ist ebenfalls durch seine Unterstützung an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt.

Nicht vergessen darf ich auch das Engagement und die Aufmunterung seitens meiner Familie, besonders meiner Schwester und meiner Freundin Martina.