

Aus der Universitätsklinik für Mund-, Kiefer und Plastische Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(komm. Direktor: apl. Prof. Dr. Dr. A.W. Eckert)

**Neue tierexperimentelle Untersuchungen zur präventiven Wirkung
von B-Vitaminen auf LKG-Spalten**

Habilitationsschrift
zur Erlangung des akademischen Grades
eines habilitierten Doktors der Medizin (Dr. med. habil.)
für das Fachgebiet Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

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

von Dr. med. Dr. med. dent. Konstanze Scheller
geboren am 6. Mai 1973 in Erlangen

Gutachter:

Professor Dr. Jochen Fanghänel

Vorlesung: 04.09.2014

Professor Dr. Dr. Siegmund Reinert

Verteidigung: 16.09.2014

Meinem Mann Christian
und meinen Kindern Theresa, Ferdinand und Leopold

Referat

Zielstellung

Gabe von Vitaminen der B-Gruppe kann erfolgreich das Auftreten von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) in Risikofamilien verhindern. Dazu liegen empirische klinische Daten seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts vor. Die Wirkweise ist bis heute nur ansatzweise geklärt.

Material und wesentliche Ergebnisse

Untersuchungen zur Häufigkeit der Spaltereignisse, mit und ohne Vitamin B-Gabe, bis zur Gewebekultur und molekularbiologischen Verfahren wurden durchgeführt. Diese fanden an Muttertieren und deren Feten, mit und ohne Spalten, aus Mäuse-Inzuchtstämmen mit geringer (AB/Jena, NMRI) und hereditärer Belastung für Spalten (A/WySn) statt.

Teratogen verursachte Gaumenspalten (GS) und genetisch determinierte LKGS wiesen im Tierversuch keine geschlechtsabhängige Belastung auf. Die B1-Substitution senkt, wie bekannt, die teratogen induzierte Spaltrate (AB/Jena) signifikant, nicht aber die hereditären Spalten in der A/WySn-Maus. Polyvitamin B-Präparate begünstigten in der Organkultur das embryonale Wachstum des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus. Laborchemische Untersuchungen zeigten eine signifikant niedrigere Konzentration von Thiamin (B1) und Folsäure (B9) im Fruchtwasser von Müttermäusen mit Spaltbetroffenen. Die orale Substitution mit Vitamin B1 hob zwar die B1-Konzentration im Serum der A/WySn-Mütter signifikant an, nicht jedoch im Fruchtwasser. Dafür könnte eine Splice-Variante des Thiamin-2 Transporters (ThTr-2, Slc19a3) mit einem funktionsunfähigen Transportprotein, das zudem immunhistochemisch eine untypische zytoplasmatische Lokalisation aufweist, verantwortlich sein. Die erniedrigten Thiaminwerte im Fruchtwasser der betroffenen Mäusefeten könnten somit an den gestörten kraniofazialen Wachstumsvorgängen bei der Spaltbildungen beteiligt sein.

Folgerungen

Vitamin B1 begünstigt das Wachstum der Gaumenanlagen bei Mäusen des A/WySn-Stamms. Diese Entwicklungsakzeleration ist eine Erklärung für seine spaltpräventiven Effekte. Erniedrigte Thiamin-Werte im Fruchtwasser könnten umgekehrt maßgeblich an der gestörten Morphogenese des Mittelgesichts, die zur Spaltbildung führt, beteiligt sein und erklären die Unwirksamkeit der Vitamin B-Prophylaxe im Stamm bei hereditären Spalten. Weitere molekularbiologische Untersuchungen sollten die Veränderung der Transportkapazität der Thiaminrezeptoren und deren Expression während der embryonalen Entwicklung untersuchen.

Diese Ergebnisse stützen die Theorie der multifaktoriellen Genese der LKGS mit Schwellenwerteffekt, indem exogene kausale Faktoren beeinflussbar, endogene jedoch eher resistent sind.

Dr. Dr. Konstanze Scheller: Neue tierexperimentelle Untersuchungen zur präventiven Wirkung von B-Vitaminen auf LKG-Spalten, Halle (Saale), Univ., Med.Fak., Habil., 84 Seiten, 2014

I. Inhaltsverzeichnis mit Seitenangaben

I.	Inhaltsverzeichnis mit Seitenangaben	
II.	Verzeichnis der Abkürzungen	
1	Einleitung	1
2	Zielstellung	9
3	Material und Methodik	10
3.1	Versuchstiere und Haltung	10
3.1.1	Verschiedene Mäusestämme	10
3.1.2	Haltung der Tiere	11
3.1.3	Verabreichung von Substanzen	12
3.1.4	Opferung der Tiere	13
3.2	Experimentelle Methoden	13
3.2.1	Geschlechtsbestimmung der Feten	13
3.2.2	Organkultur	14
3.2.3	Entnahme von Fruchtwasser und Serum bei der Muttermaus	18
3.2.4	Histologische Untersuchungen	18
3.2.5	Bestimmung der Vitaminkonzentrationen	20
3.2.6	Immunhistochemische Untersuchungen	20
3.2.7	Molekularbiologische Untersuchungen	22
3.3	Statistische Auswertung	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Untersuchungen zur Wirkung von Vitamin B1 (Thiamin)	27
4.1.1	Geschlechtsabhängigkeit	27
4.1.2	Geschlechtsspezifische Beeinflussung der Spaltrate durch Vitamin B1-Substitution	32
4.2	Untersuchungen in der Organkultur	39
4.2.1	Die Entwicklung des sekundären Gaumens zweier unterschiedlicher Mäusestämme (A/WySn, NMRI) in der Organkultur	39

4.2.2	Beeinflussung der Entwicklung des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus durch Polyvitamin B-Präparate in der Organkultur	43
4.3	Serum-und Fruchtwasser-Konzentration verschiedener B-Vitamine in Abhängigkeit von der Spaltentwicklung	45
4.3.1	Grundlegende Untersuchungen in der A/WySn-Maus	45
4.3.2	Untersuchungen zur Thiaminkonzentration im Fruchtwasser und Serum unter Substitution (A/WySn-Maus)	50
4.4	Untersuchungen der Transportproteine	52
4.4.1	Untersuchungen zur ThTr1- / ThTr-2 Rezeptor-Expression	52
4.4.2	Genexpressionsanalysen der Transportproteine Slc19a1-a3 der Maus	55
5	Diskussion	60
6	Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis	71
8	Thesen	78
III.	Tabellarischer Lebenslauf mit Unterschrift	79
IV.	Selbstständigkeitserklärung mit Unterschrift	81
V.	Erklärung über frühere Habilitationsversuche mit Unterschrift	82
VI.	Danksagung	83

II. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
C	Celsius
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPA	Cyclophosphamid
d	Tag (day)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Einheiten
EW	Embryonalwoche
Fa.	Firma
g	Gramm
GS	Gaumenspalte
h	Stunde (hour)
IVF	In vitro Fertilisation
KG	Körpergewicht
LKGS	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mRNA	messenger RNA
O ₂	Sauerstoff
p.c.	nach Konzeption (postconceptionem)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunde
s.c.	subkutan
Tab.	Tabelle
♀	weiblich
♂	männlich

1 Einleitung

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Cheilognathopalatoschisis, LKGS) und isolierte Gaumenspalten (Palatoschisis, GS) sind Fehlbildungen des primären und sekundären Gaumens, die beim Menschen während eines frühen Zeitpunkts der Embryonalentwicklung (5.–9.EW) entstehen. Die genauen Mechanismen der Entstehung und deren zugrunde liegende Ursachen sind bis heute nicht völlig geklärt (Mossey et al., 2009; Dixon et al., 2011).

Wie bei allen bekannten kongenitalen Fehlbildungen ist die Entstehung einer LKGS/GS mit einer gewissen familiäre Disposition verbunden, die durch die einfache Mendel'sche Vererbungslehre nicht zu erklären ist (Fraser, 1976). Das multifaktorielle Schwellenwertmodell nach Falconer (1965) und Carter (1976) scheint hierzu geeigneter, die Anfälligkeit eines Individuums zur Ausbildung einer spezifischen Erkrankung oder Fehlbildung, abhängig von genetischen und umweltspezifischen Faktoren, zu beschreiben (Abb.1). So liegt in der Bevölkerung eine unterschiedlich ausgeprägte Neigung zur Entwicklung einer multifaktoriell bedingten Erkrankung vor. Diese Neigung wird durch exogene Einflüsse, die vom Individuum aktiv beeinflusst werden können (Natsume et al., 1995; 1996), und endogene Faktoren, die nicht zu beeinflussen sind, bestimmt. Mit dem Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes (Additionseffekt) kommt es zur Erkrankung des Individuums. Das spezifische Wiederholungsrisiko für das Auftreten dieser Erkrankung hängt proportional vom Verwandtschaftsgrad mit dem Erkrankten und der Häufigkeit des Auftretens des bestimmten Merkmals in der Gesamtbevölkerung ab.

Die eigentliche Rolle der genetischen Komponente, die die Anfälligkeit des Individuums für eine spezielle Fehlbildung bedingt, ist bis heute weiterhin unklar. Die Suche nach einer klaren genetischen Ursache für die Entstehung einer LKG-Spalte führte bis jetzt zu keiner einheitlichen Lokalisation eines verantwortlichen Gens. So konnten in umfangreichen genetische Analysen bei Patienten mit nicht-syndromalen Spalterkrankungen keine essentielle Gensequenz isoliert werden, die bei allen Patienten nachweisbar gewesen wäre. Stattdessen wurden viele unterschiedliche Genloci beschrieben (1p36, 2p21, 3p11.1, 8q21.3, 10q25.3, 13q31.1, 15q22, 17q22), die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer LKGS assoziiert sein sollen (Mangold et al., 2010; Ludwig et al., 2012). Ein spezielles „Spalt“-Gen konnte also bisher für die am häufigsten auftretenden nicht-syndromalen Manifestationen dieser Fehlbildung nicht identifiziert werden.

Trotz dieser aktuellen genetischen Ergebnisse ist epidemiologisch bewiesen, dass das Auftreten einer Spaltbildung, wie schon erwähnt, eine deutliche familiäre Disposition zeigt. Liegt die Inzidenz bei Verwandten 1.Grades von Betroffenen bei 2-4%, steigt sie bei Eltern ohne Spalterkrankung, nach dem zweiten Kind mit einer Spaltmanifestation, für das dritte Kind auf 9%. Das höchste Wiederholungsrisiko für

das Auftreten einer Spaltbildung findet sich mit 13-14% jedoch für das nächste Kind, wenn schon ein betroffener Elternteil und ein betroffenes Geschwisterkind in der Familie zu finden sind (Hintz und Lindner, 1987; Tolarová, 1987; Mossey et al., 2009).

Wäre eine einzelne Mutation in einem Gen dafür verantwortlich, würde die Inzidenz bei einem rezessiven Erbleiden bei Verwandten 1. Grades bei 25% und bei einer dominanten Vererbung bei 50% liegen. Davon ist die Häufigkeitsverteilung von LKG-Spalten weit entfernt.

Zwillingsstudien gaben ein klinisch beobachtetes Konkordanz-Diskordanz-Verhältnis von eineiigen und zweieiigen Zwillingspaaren mit einer Spaltbildung von 6,4:1 (eineiig/zweieiig) an. Bei einem dominant vererbten Merkmal würde die Häufigkeitsverteilung allerdings bei 2:1 und bei rezessiven Leiden bei 4:1 liegt. So spricht die Häufigkeitsverteilung der LKGS/GS am wahrscheinlichsten für eine additive Polygenie mit Schwellenwerteffekt (Penrose, 1953; Jörgensen, 1974; Christensen und Fogh-Andersen, 1993). Hierbei handelt es sich um einen genetischen Summationseffekt, bei dem es erst durch Überschreitung eines bestimmten Schwellenwerts zu einem pathologischen Effekt kommt. Die niedrige Konkordanzrate unter eineiigen Zwillingen zeigt somit deutlich, dass das Erklärungsmodell für die Entstehung von LKGS am besten geeignet ist, das exogene Faktoren, wie Umwelteinflüsse als teratogene Faktoren berücksichtigt, da diese eine entscheidende Rolle spielen müssen (Douglas, 1958).

Als Erklärung für die familiäre Disposition muss somit angenommen werden, dass die Entstehung von nicht-syndromalen LKG- und Gaumenspalten durch dieses multifaktorielle genetische System zustande kommt (Schulze, 1986). Das Überschreiten des individuellen Schwellenwerts ist hierbei die Grenze, jenseits derer es zur Entstehung einer LKG- oder Gaumenspalte kommt (Abb.1). Abhängig vom Verwandtschaftsgrad verschiebt sich die Verteilungskurve nach rechts (bzw. der Schwellenwert nach links) und ursächliche exogene Faktoren können schon eher eine Manifestation der Fehlbildung bewirken.

Seit den 40-er Jahren des letzten Jahrhunderts, besteht ein großes Interesse an Untersuchungen der embryonalen Gesichtsentwicklung und der Entstehung embryonaler Fehlbildungen. Tierexperimentelle Studien beschäftigten sich einerseits mit der teratogenen und andererseits mit der protektiven Wirkung unterschiedlichster Substanzen auf die embryonale Entwicklung. Diese Untersuchungen richteten ihr besonderes Augenmerk auf die physiologischen und pathologischen Entwicklungsvorgänge des Gesichtsschädels im Tiermodell (Schubert, 1982; Gundlach et al., 1986; Bienengraber et al., 2001; Jiang et al., 2006).

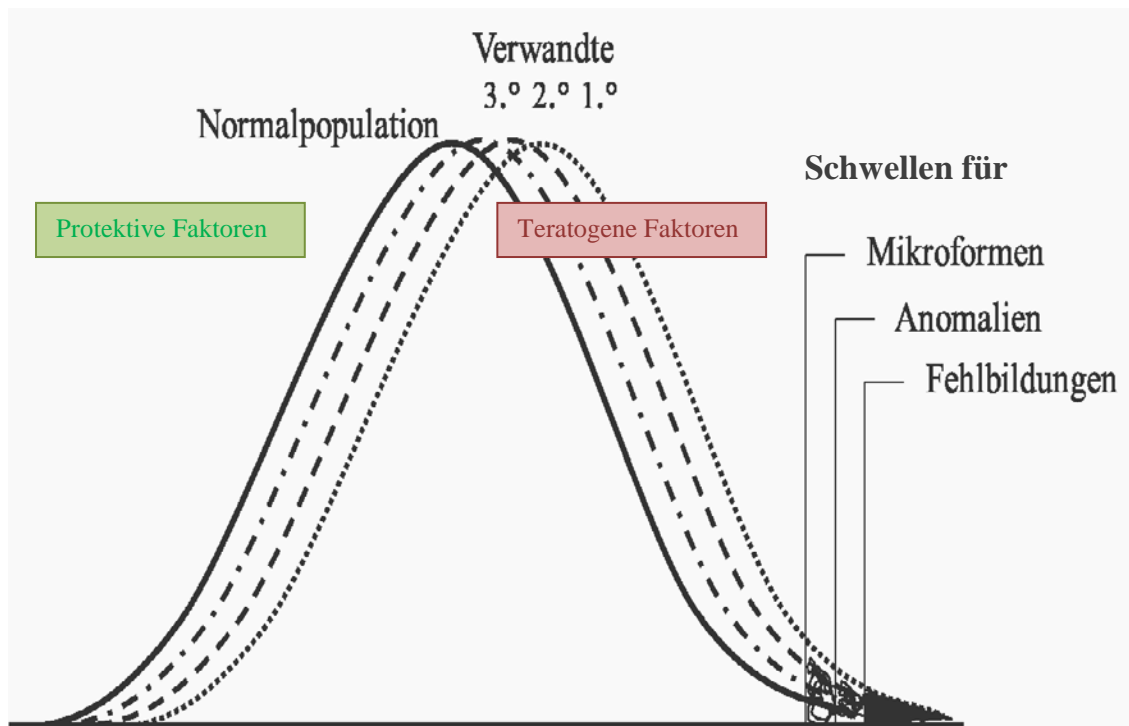


Abb. 1: Multifaktorielles Schwellenwertsystem (modifiziert nach Schubert, 1980).

Während der embryonalen Gesichtsentwicklung in der 5.-7. EW beim Menschen werden Oberlippe und Philtrum durch die beiden Oberkieferwülste und den medialen Nasenwulst gebildet (Abb. 2). Diese epithelial bedeckten Strukturen treffen im Verlauf aufeinander, an den Kontaktstellen löst sich das Epithel auf. Hierauf kann das Mesenchym des lateralen Oberkieferwulstes über das Philtrum wandern und im späteren Verlauf den M. orbicularis oris bilden (Sperber, 1992). Bei Störungen dieser Entwicklungsschritte kommt es zum Ausbleiben der Verschmelzung der Oberkieferwülste mit dem medialen Nasenwulst. Auf diese Weise können die unterschiedlichsten Arten von Spaltbildungen des primären Gaumens an den Verschmelzungsstellen der embryonalen Wülste entstehen (Tessier, 1976; Töndury, 1976; Langmann, 1972; Tammuscheit, 1986).

Die Entwicklung des sekundären Gaumens beginnt beim Menschen später in der Embryonalentwicklung ab der 6. Embryonalwoche. Der größte Anteil des definitiven Gaumens besteht aus den untersten Abschnitten der paarigen Oberkieferwülste (Gaumenplatten), die der Zunge primär lateral in einer „senkrechten“ Position anliegen. Die vergleichsweise große und weit entwickelte Zunge füllt vorerst die gemeinsame Mund-/Nasenhöhle aus. Durch die Verlagerung der Zunge nach kaudal (7.-8. EW) entwickelt sich der Unterkiefer nach vorne und die embryonale Retrogenie schlägt in eine embryonale Progenie um. Zeitgleich kommt es zu einer Nackenstreckung des Embryos. Diese Streckung ist die Voraussetzung dafür, dass sich die beiden Gaumen-Anteile aufrichten und eine intrazelluläre Hydradation stattfindet.

Nach dem Zusammentreffen der Gaumenplatten in der Mittellinie und ausreichend langem Kontakt, kommt es zur Epithelauflösung an den Kontaktstellen und die Platten können anterior mit dem primären Gaumen verwachsen (Sperber, 1992).

Störungen jedweder Art während der kritischen Phase der beschriebenen Prozesse führen somit zur Ausbildung verschiedener Spaltformen entlang der eigentlichen Fusionslinien.

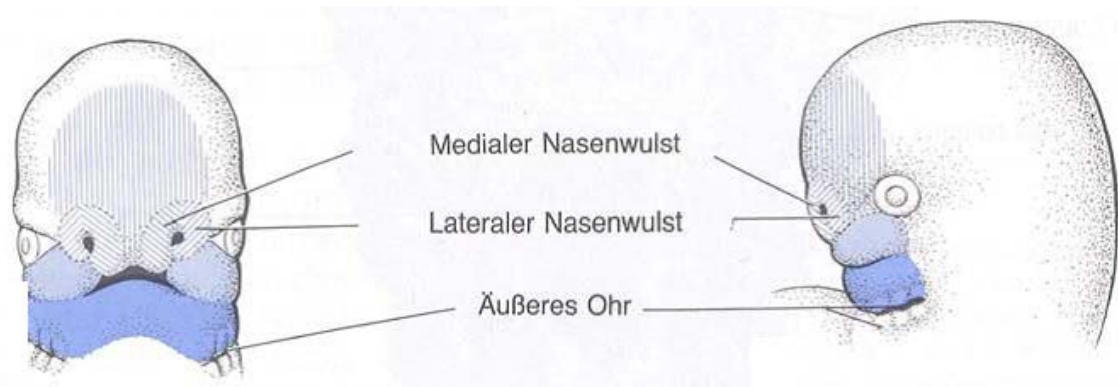


Abb. 2: Gesichtsentwicklung eines menschlichen Embryos am 35±1 Embryonaltag (nach Moore, 1990).

Mäusestämme verschiedener Stämme sind schon sehr lange Gegenstand für Untersuchungen über die embryonale Gesichtsentwicklung. Das Gesicht entwickelt sich morphologisch bei Mäusen und Menschen in so ähnlicher Weise, dass dieses Tiermodell geeignet ist, exogene Einflüsse auf die kraniofaziale Morphogenese zu untersuchen (Jiang et al., 2006). Die normale Gesichtsentwicklung der Hausmaus beginnt nach Konzeption um den 9,5. Tag und ist am 11,5. Tag p.c. mit Bildung der Oberlippe und des primären Gaumens beendet (Tab. 1). Die Entwicklung des sekundären Gaumens beginnt um den 11,5. Tag und ist am 15,5. Tag abgeschlossen (Juriloff, 1982; Jiang et al., 2006; Gritti-Linde, 2007). Hierzu gibt es Mäuse-spezifische Unterschiede, wie Tabelle 1 für die A/WySn-Maus zeigt.

Tab. 1: Embryonale Entwicklung der A/WySn-Maus und des Mensch (modifiziert nach Raupach, 1987).

	Fetalperiode	Frühe Embryonalperiode	Späte Embryonalperiode	Fusion d. Gaumenplatten abgeschlossen
Maus	10.-12. Tag	12.-14. Tag	15. Tag- Geburt	15. Tag, 6 Stunden ⁽¹⁾
LK-Spalten	9,5-11,5 Tag			
Gaumenspalten		11,5.-15,5.Tag		
Mensch	26.-42. Tag	42.-90. Tag	90. Tag- Geburt	57.-84. Tag ⁽²⁾
LK-Spalten	36.-42. Tag			
Gaumenspalten		44.-56./58. Tag		

⁽¹⁾ A/WySn-Mausstamm, Syska, 2004

⁽²⁾ Moore, 1990

Der Vorteil von Mäuse-Inzuchtstämmen, die häufig für Studien der embryonalen Gesichtsentwicklung herangezogen werden, ist ihre geringe genetische Varianz. Das ermöglicht neben den erwähnten Studien zur embryonalen Morphogenese auch solche, um den Einfluss von exogenen Faktoren (Teratogene, Präventiva oder operative Eingriffe) zu untersuchen (Gritli-Linde, 2012). Die A/-Mausstämme und mit ihnen verwandte Inzucht-Stämme haben eine deutliche Disposition zur spontanen Entwicklung von LK/G-Spalten und stellen somit eine optimales Untersuchungssystem zur Analyse der Spaltentwicklung dar (Juriloff, 1982; Wang et al., 1995; Hallgrímsson et al., 2004; Juriloff und Harris, 2008). Andere Inzuchtstämme (AB/Jena, NMRI) zeigen hingegen eine geringe spontane Spaltbildung auf, sind aber sensibel gegen Teratogene (Neubert und Dillmann, 1972; Syska et al., 2004). Diese Prädisposition der A/-Mäusestämme, und hier v.a. der A/WySn-Maus, ist im Vergleich zu den anderen beschriebenen Mäuse-Inzuchtstämmen (z.B. NMRI-Maus) vermutlich durch eine allgemeine Verzögerung der embryonalen Entwicklung und damit auch der Gesichtsentwicklung bedingt (Biddle und Fraser, 1976; Shimizu et al., 2001; Syska et al., 2004; Scheller et al., 2011). Diese Wachstumsverzögerung scheint sich neben einer Reduktion der Körpergröße und des Gewichtes der Mäusenachkommen bei Geburt auch durch ein vermehrtes Auftreten von Spaltbildungen zu äußern.

Hier wäre es eine „therapeutische“ Option, die verlangsamten Wachstumsvorgänge in utero medikamentös zu beschleunigen und somit auch eine Spaltbildung zu verhindern oder im Erscheinungsbild abzuschwächen. Entsprechende klinische sowie tierexperimentelle Untersuchungen wurden an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg seit langem durchgeführt (Schubert, 1980; Schubert, 1982; Schubert et al., 1990; Schubert et al., 2002; Syska et al., 2004; Schubert und Krost, 2006).

Auf der Suche nach Möglichkeiten, das Wiederauftreten einer Spaltbildung in den betroffenen Familien zu verhindern („prevention of recurrence“), wurden seit vielen Jahrzehnten klinische Studien durchgeführt, die sich mit einer möglichen und sinnvollen Prophylaxe beschäftigten. Die prophylaktische Gabe von Vitamin-Präparaten (Polyvitamin B-Präparate, Folsäure, Multivitamin-Präparate) zeigte in klinischen Studien seit den 40-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine deutliche Reduktion der nicht-syndromalen Spaltbildungen in den betroffenen Familien (Tolarová und Harris, 1995; Schubert und Krost, 2006). In darauf hin angelegten Tierversuchen wurden eine deutliche Reduktion der Anzahl und eine Abschwächung der phänotypischen Erscheinung von rein teratogen induzierten Spaltbildungen gesehen (Gundlach et al., 1986; Dostal und Schubert, 1990; Bienengraber et al., 2001; Weingärtner et al., 2006). Diese Untersuchungsergebnisse erbrachten die Bestätigung zu der Vermutung, dass LK/G-Spalten, die durch exogene, teratogene Einflüsse entstehenden, durch eine konsequente Vitamin B-Substitution zu verhindern oder in ihrer Erscheinungsform abzuschwächen seien. Trotz der positiven Ergebnisse der Vitamin B-Prophylaxe im Tierexperiment als auch in klinischen Studien gibt es bis heute keine detaillierte Empfehlung zu einer B-Vitaminsubstitution in der Frühschwangerschaft, um das Auftreten von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten zu verhindern. Eine solche Empfehlung würde der Folsäuresubstitution für die Prävention von Neuralrohrdefekten entsprechen, die nach den Erkenntnissen über die Spaltprävention in entsprechender Weise entwickelt wurde (Smithells et al., 1980; Johnson und Little, 2008).

Einige der wasserlöslichen B-Vitamine, wie Thiamin (B1), Folsäure (B9) und Pyridoxin (B6) werden als „kritische Vitamine“ in der embryonalen Entwicklung bezeichnet, da diese nicht speicherbar sind und ein Fehlen dieser Vitamine zu Fehlbildungen führt (Gaßmann, 1990). Da bis zu 10% aller Menschen heterozygot für Vitamin-abhängige metabolische Störungen sind und 10% der Schwangeren eine insuffiziente Sättigung von Vitamin B1, B2 und B6 aufweisen, scheint eine konsequente Vitaminsubstitution mit Vitamin B-Komplex während der Schwangerschaft generell sinnvoll (Knapp, 1970). Für die klinische Anwendung ist allerdings zu beachten, dass eine Normalisierung der Vitaminkonzentrationen im Serum erst nach einer oralen Gabe der 3-fachen empfohlenen Dosierung zu erwarten ist (Grimm et al., 1978).

Laut Nationaler Verzehrstudie von 2008 (Nationale Verzehrstudie II: Ergebnisbericht Teil 1. Max Rubner-Institut, Karlsruhe 2008) erreichen in Deutschland ca. 21% der Männer und 32% der Frauen die empfohlene Tageszufuhr für Vitamin B1 (Thiamin) und 79% der Männer und 86% der Frauen die empfohlene tägliche Zufuhr für Folsäure (Vitamin B9) nicht. Für Vitamin B6 (12% Männer, 13% Frauen) und Vitamin B12 (8% Männer, 26% Frauen) ist der Anteil der Unterversorgung wesentlich geringer. Eine adäquate Vitamin B-Zufuhr während der Schwangerschaft scheint somit eine konsequente Folgerung.

Die propagierte Prävention mit B-Vitaminen zur Vermeidung des Wiederauftretens von Spaltbildungen in spaltbelasteten Familien („prevention of recurrence“) wurde in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Halle-Wittenberg seit Anfang der 80-er Jahre des vergangenen Jahrhunderts durch Professor Dr. Dr. J. Schubert durchgeführt (Schubert und Krost, 2006). Frauen in betroffenen Familien wurden möglichst 1-2 Monate vor einer geplanten Schwangerschaft und während des ersten Trimenons hochdosiert mit einem frei verkäuflichen Polyvitamin B-Präparaten behandelt. Wesentlich hierbei war v.a. die Gabe von Thiamin (Vitamin B1), das in vorausgegangenen tierexperimentellen Studien den größten antiteratogenen Effekt aufwies (Drostal und Schubert, 1990). Für die Prävention einer Spaltbildung wurde, gegenüber der von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) für eine normale Schwangerschaft empfohlenen Dosierung, die 20-fach höhere Thiamin-Dosierung (B1) zu Spaltprävention gefordert (Tab. 2). Aufgrund der schnell wechselnden frei verkäuflichen Präparate ist eine stetige Aktualisierung der Dosierung bei den angebotenen Präparaten notwendig (Tab. 2).

In der aktuell durchgeführten Erhebung der behandelten Frauen (2014) fanden sich lediglich zwei Mikroformen als Lippenkerben (1980 bis 2005) und eine inkomplette Lippenspalte (2013) unter 107 Lebendgeburten bei Verwandten 1. Grades belasteter Familien (weitergeführt ab 2006 in Anlehnung an Schubert und Krost, 2006). Betrachtete man das empirisch bestimmte Risiko ohne Prophylaxe-Maßnahmen, das mit 4,9% für LKG- und 2,4% für Gaumenspalten angegeben wird (Tolarová, 1969), lag das tatsächliche beobachtete Risiko für die Entstehung einer LKG-Spalte, einschließlich der Mikroformen, bei nur 2,8%. Eine Gaumenspaltbildung wurde nicht beobachtet und das tatsächliche Risiko betrug somit 0%. Diese Rate liegt somit deutlich unter der zu erwartenden Spaltfrequenz (Tolarová, 1987; Mossey et al., 2008; Dixon et al., 2011)

Tab. 2: Empfohlene Vitamindosierung (in mg) zur Spaltprophylaxe (aktualisiert nach Schubert und Krost, 2006) und angelehnt an die Referenzwerte für die Zufuhr durch Nahrungsmittel der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE).

Gegenwärtig (2014) auf dem deutschen Markt befindliche Präparate (frei verkäuflich)								
Vitamine	Empfohlene Tagesdosis (mg) nach DGE	Empfohlene Dosierung für die Prävention (mg) (nach Schubert und Krost, 2006)	Femibion SS 1 ⁽¹⁾	Vitamin B-Komplex ratiopharm ⁽²⁾	BioPräp natürliche Vitamin B-Kapseln ⁽³⁾	Abtei Vitamin B-Komplex forte ⁽⁴⁾	Hevert Vitamin B-Komplex forte ⁽⁵⁾	Nobelin Vitamin B-Komplex ⁽⁶⁾
Thiamin (B1)	1 (1,5)	30	1,2	15	1,7	4,2	100	11
Riboflavin (B2)	1,4 (1,8)	30	1,6	15	2,4	4,8		14
Niacin (B3, PP) speicherbar	17	350	15	15	30,2	36		16
Panthothensäure (B5)	6	50	6	25	11,6	18		18
Pyridoxin (B6)	1,5 (2,6)	35	1,9	10	1,5	6,0	30	5,4
Biothin (B7, H)	0,05	0,25	0,06	0,15	0,0963			0,15
Cyanocobalamin (B12) speicherbar	0,003	0,015	0,0035	10	3,6	0,003	0,5	0,01
Folsäure (B9)	0,4	1	0,4 L-Methyl- folat 0,4 FS	0,45	0,33	0,4		0,4
Sonstige Vitamin E Vitamin C Jod			13 mg 110 mg 150 µg					
Dosierung			Nicht geeignet	2-mal 1	Nicht geeignet	3-mal 2	Nicht geeignet	3-mal 1

¹⁾ Merck Selbstmedikation GmbH, 64293 Darmstadt²⁾ratiopharm GmbH, 89079 Ulm ³⁾BioPräp, Biologische Präparate Handelsges. mbH, 49080 Osnabrück⁴⁾Abtei OP Pharma GmbH, 37696Marienmünster⁵⁾Hevert-Arzneimittel GmbH & Co. KG, 55569 Nussbaum⁶⁾MEDICOM Pharma GmbH,85774 Unterföhring

() Empfohlene Dosis in der Schwangerschaft der DGE

2 Zielstellung

Die positive klinische Erfahrung, die mit einer konsequenten Vitamin B-Prophylaxe in der Frühschwangerschaft (Prävention) zur Vermeidung des Wiederauftretens einer orofazialen Spaltbildung in vorbelasteten Familien („prevention of recurrence“) verbunden ist, führte zu der Frage nach dem möglichen Wirkmechanismus. Diese Arbeit ist Fortsetzung und Ergänzung der vielfältigen Untersuchungen der Hallenser Arbeitsgruppe, auf deren Erkenntnisse sie aufbaut (Schubert, 1980; Schubert, 1982; Raupach, 1987; Schubert et al., 1990; Dostal und Schubert, 1990; Schubert et al., 2002; Schubert und Krost; 2006).

Untersuchungen an verschiedenen Mausmodellen (exogen verursachten Spalten, hereditäre Spalten) sollten hierbei mögliche Unterschiede in der Genese und der Beeinflussbarkeit der bisher angewandten Präventiva aufzeigen.

Hierzu sollte zunächst das geschlechtsspezifische Auftreten von teratogen induzierten Gaumenpalten und genetisch determinierten Lippen-Kiefer-Gaumenspalten bei den Nachkommen zweier unterschiedlicher Inzucht-Mäusestämmen (AB/Jena und A/WySn) analog den bekannten Erkenntnissen beim Menschen analysiert werden.

Weiterhin sollte der Einfluss hochdosierter Vitamin B1-Gabe bei teratogener und genetisch determinierter Spaltbildung geschlechtsspezifisch im Tierversuch untersucht werden.

In Organkulturmodellen zweier unterschiedlicher Inzucht-Mäusestämmen (NMRI und A/WySn) war die Entwicklung des sekundären Gaumens Mäusestamm-spezifisch zu untersuchen, um einen möglichen direkten Einfluss von hochdosiertem Vitamin B-Komplex auf die Entwicklung des sekundären Gaumens zu entdecken.

Laborchemische Analysen verschiedener B-Vitamine im Serum und im Fruchtwasser von A/WySn-Muttermäusen, mit und ohne Spaltbildung in der Nachkommenschaft, sollten mögliche Konzentrationsunterschiede aufdecken, durch die die Wirkung präventiver B-Vitamine beeinflusst sein könnte.

Immunhistochemische Untersuchungen an koronaren Mittelgesichtsschnitten von Feten der A/WySn-Maus mit und ohne Spaltbildung sollten hinsichtlich der Verteilung und zellulären Lokalisation von spezifischen Rezeptoren für spezielle Wachstumsfaktoren untersucht werden (VEGF-R, EGF-R, ThTr1-R).

Letztlich schienen Analysen der mRNA des Folat- und Thiamin 2-Rezeptors geeignet, die vermutete gestörte Aufnahme von Thiamin ins Fruchtwasser von Mäusefeten mit Spaltbildung aufzuzeigen.

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere und Haltung

Männliche und weibliche Inzuchtmäuse (NMRI- und A/WySn-Stamm: Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA / AB/Jena-Maus: Institut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie der Universität Jena, Deutschland) wurden unter definierten Standardbedingungen gehalten (Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung, Tierlabor im Universitätsklinikum Kröllwitz, FG5, U03, Halle) und vermehrt (Inzucht mit strenger Schwester-Bruder-Verpaarung sowie Dokumentation in einem Zuchtbuch).

Die internationalen Richtlinien für das Halten und den Umgang mit Versuchstieren wurde streng eingehalten (<http://www.apa.org/science/anguide.html>).

Alle Tierversuche wurden beim zuständigen Landesverwaltungsamt, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten als anzeigepflichtige (K9M2) und genehmigungspflichtige (K9G5, K9G6) Tierversuche vor Versuchsbeginn nach § 9 Abs. 1 TierSchG angezeigt. Für alle durchgeführten Untersuchungen lag die Genehmigung des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt vor.

3.1.1 Verschiedene Mäusestämme

AB/Jena

Hierbei handelt es sich um einen Inzuchtstamm, der 1934 an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von Paula Hertwig am Institut für Biologie etabliert worden war und später, ab 1952, am Institut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie der Universität Jena weiter gezüchtet wurde. Die normale Wurfgröße dieses Mäusestamms beträgt $7,3 \pm 0,15$ Nachkommen (nach 21 Tagen, beim Absetzen $6,5 \pm 0,1$). Männliche Individuen finden sich zum Absetzungszeitpunkt zu 49,2%. Somit ist die Verteilung von männlich zu weiblichen Nachkommen unter normalen Zuchtbedingungen annähernd 1:1 (Staats, 1985).

Der Gaumenspaltverschluss findet bei diesem Mäusestamm im Vergleich zu anderen Stämmen, z. Bsp. zur NMRI-Maus, um ca. 12 Stunden verzögert statt. Er beginnt um den 14. Tag und 12 Stunden und ist am 15. Tag p.c. abgeschlossen und dürften die exogene Sensibilität zur Entstehung von Gaumenspalten bedingen (Syska et al., 2004). Die natürliche Spaltrate unter diesen Mäusen ist, wie bei der NMRI-Maus, mit $>0,5\%$ sehr gering (Neubert und Dillmann, 1972).

NMRI

Der NMRI-Stamm, der 1926 von C. Lynchin in der Schweiz hervorgebracht wurde, wurde bis zur 51. Generation als Inzuchtstamm gehalten. In diesem Stamm wurde die Variabilität der spontanen LKGS-Bildung bei einer genetisch homogenen Population als Kontrolle untersucht. Es wird eine zufällige Spaltrate von 0,7-3,8% beschrieben, welche nicht genetisch determiniert ist (Neubert und Dillmann, 1972; Schubert, 1982; Syska et al., 2004; Staats, 1985).

Dieser Mäusestamm eignet sich als Kontroll-Population von Mäusen, die eine natürliche, frühzeitige embryonale Gesichtsentwicklung aufweisen.

A/WySn

Die Untergruppe des A/WySn-Stamm entstand aus der A/J-Maus, die 1921 von L. C. Strong durch die Kreuzung der Cold Spring Harbor Albino- und der Bagg Albino-Maus (249 Generationen) hervorgebracht wurde. Bis heute werden diese Mäuse durch konsequente Inzuchtpaarung weitervermehrt (<http://jaxmice.jax.org>). Die genetische Variation in diesem Stamm ist minimal.

Die Nachkommen in diesem Mäusestamm haben eine stabil hohe spontane Rate von 28-50% Lippen-Kiefer- und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Hallgrimsson et al., 2004; Juriloff et al., 2001; Schubert et al., 2002). Diese kraniofaziale Fehlbildung, die im Phänotyp bei diesem Stamm eine überwiegend beidseitige Manifestation aufweist, zeigt eine unvollständige Penetranz und variable Expressivität. Die zu beobachtende phänotypische Heterogenität der LKG-Spalte soll bei dieser Maus durch eine besondere Sensitivität gegenüber mangelnder Koordination der kranialen Wachstumsprozesse hervorgerufen sein (developmental instability, Hallgrimsson et al., 2004).

3.1.2 Haltung der Tiere

Die Tiere wurden nach Geschlecht getrennt zu 5 Stück in einem Käfig aus Makrolon (Grundfläche: 400 cm², Höhe:14 cm) gehalten.

Bei einer konstanten Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 65% wurde der Tag-Nachtrhythmus durch eine 12-/12 Stunden Licht- (79 lux durch 250 Watt Leuchtstoffröhren) und Dunkelphase simuliert. Alle Mäuse bekamen eine genau definierte Standard-Diät #1320 (Haltungsfutter, Altromin-Spezialfutter GmbH & Co.KG, Lage, Deutschland) und Wasser nach Belieben.

Im Alter von 3-4 Monaten erfolgte die Verpaarung der Tiere (Nullipara) jeden Tag zwischen 08.00 – 09:30 Uhr, um den genauen Zeitpunkt der Befruchtung ($\pm 1,5$ Stunden) festlegen zu können. Somit konnte für die anschließenden Untersuchungen und Experimente eine hohe Homogenität des Schwangerschaftszeitpunktes gewährleistet werden (Schmidt, 1985). Konnte die Schwangerschaft aufgrund des Auftretens eines vaginalen Pfropfs am Folgetag bestätigt werden, wurden die trächtigen Mäuse von den anderen separiert und zu 3 Tieren pro Käfig gehalten.

3.1.3 Verabreichung von Substanzen

Teratogene Substanzen

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen lagen in unserer Arbeitsgruppe seit langem vor. Die unveröffentlichten Resultate zur Geschlechtsverteilung bei teratogenen Spalten und der Auswirkung einer B1-Gabe auf die Verteilung der Spaltbildungen wurden analysiert.

Bei der AB/Jena-Maus (Muttermaus mit durchschnittlich 27-30 g Körpergewicht) waren Gaumenspalten durch die intraperitoneale Gabe von 20 mg/kg KG (0,6 mg) Cyclophosphamid (Endoxan®, Fa. Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) oder durch die Gabe von 8 mg/kg KG (0,25 mg) Dexamethason (Jenapharm, Jena, Deutschland) induziert worden. Die peritoneale Applikation durch Injektion war an unterschiedlichen Tagen nach Konzeption (8,5 – 14,5.Tag p.c.) erfolgt.

Für Cyclophosphamid (CPA), ein Senfgas-Analog, das als alkylierendes Zytostatikum zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA in sich schnell teilenden Zellen führt, ist seine embryotoxische (einschließlich der teratogenen) Wirkung seit langem bekannt (Täschner und Vozeh, 1997).

Das plazentagängige Dexamethason (9-Fluor-16 α -methylprednisolon) hat durch eine direkte Wachstumsverzögerung beim Embryo hingegen „nur“ eine teratogene Wirkung (Ain et al., 2005).

Vitamin B1-Präparate

In den teratogenen Versuchsreihen erfolgte die Verabreichung des Vitamins B1 (Vitamin B1-ratiopharm Injektionslösung, 100 mg/ml, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) s.c. (0,75 ml, 3 g/kg KG) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Schwangerschaft der Muttermaus.

Zur Untersuchung der Beeinflussbarkeit genetisch determinierter Spaltbildung bei der A/WySn-Maus wurden 5 verschiedene Fütterungsgruppen gebildet. Gruppe A erhielt 0,5 ml (1 g/kg KG) des Vitamin B1-Präparates als Thiaminchloridhydrochlorid (Vitamin B1-ratiopharm Injektionslösung, 50 mg/ml, ratiopharm

GmbH, Ulm, Deutschland) am 1. Tag p.c. oral als prophylaktische Gabe (Prophylaxe-Gruppe). Gruppe B erhielt das Vitamin B1-Präparat am 15.d p.c., Gruppe C am 15.d und 6 h p.c. und die Gruppe D am 15.d und 12 h p.c.. Die Kontroll-Gruppe erhielt keine Vitamin B1-Gabe.

Untersucht wurden je 18 Mütter-Mäuse pro Untersuchungsgruppe (n=90) in den Fütterungsversuchen der A/WySn-Maus.

Die Anzahl der benötigten Versuchstiere wurde durch eine Fallzahlenberechnung auf Signifikanzniveau von $\alpha=5\%$ und einer Power von 80% ermittelt (nQueryAdvisor® 7.0 + nTerim 2.0, Statistical Solutions, Boston, USA).

3.1.4 Opferung der Tiere

Für die Organkulturen wurden die schwangeren Mäuse (A/WySn, NMRI) am 14. Tag und 8 Stunden p.c. durch Genickbruch getötet und die Feten durch Schnittentbindung geboren.

Zur Bestimmung der unterschiedlichen Vitaminkonzentrationen im Fruchtwasser und Serum der schwangeren Mäuse erfolgte die Opferung der Tiere durch zervikale Dislokation zwischen dem 18.-19.Tag p.c..

3.2 Experimentelle Methoden

3.2.1 Geschlechtsbestimmung der Feten

Nach Opferung der Tiere wurden die Feten aus dem Uterusschlauch präpariert und das Geschlecht der Feten bestimmt. Hierzu wurde der Abstand zwischen Harnröhre bzw. Penis und After gemessen. Bei weiblichen Mäusen ist dieser geringer als bei männlichen Mäusen.

Die Mäusefeten wurden nach dem Auftreten einer Spalte geschlechtsspezifisch erfasst und anschließend statistisch ausgewertet.

3.2.2 Organkultur

Die Organkulturen des sekundären Gaumens wurden an Mäuse-Feten, die ein Alter von 14 Tagen und 8 Stunden erreicht hatten, präpariert.

Durch Einführen eines Heidemannspatels in die Mundhöhle der Mäuse-Feten wurde die gewünschte Schnittebene markiert. Nach Verdrängen der Zunge nach kaudal wurde der Schädel, mitsamt den Mittelgesichts- und Gaumenfortsätzen, parallel zu den Gaumenplatten, mit dem Skalpell abgetrennt (Abb.3a/b). Die Präparation erfolgte in dorso-kranialer Richtung.

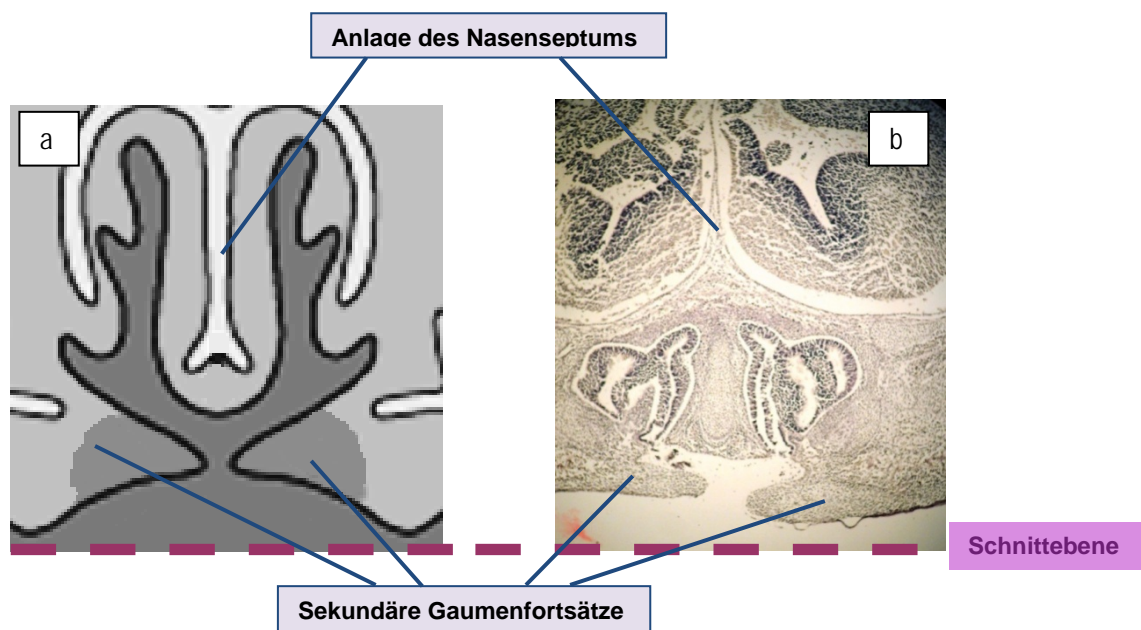


Abb. 3: Schnittebene (rot) durch das Mittelgesicht des Mäuse-Feten im Schema (a) und histologischen (b) Bild.

Die damit angelegten Organkulturen enthielten den primären Gaumen, die Alveolarfortsätze des Oberkiefers (sekundärer Gaumen) und das umgebende, ernährnde Weichgewebe.

Nach Klassifikation des Entwicklungsstadiums nach Al-Obaidi et al. (1995) zum Zeitpunkt der Entnahme (Abb.4/5) und fotografischer Dokumentation des Ausgangsbefundes wurden die Organkulturen unverzüglich inkubiert.

In-vitro Gewebekultur

Die Organsysteme der Mäusefeten wurden in 6-well Inkubationsschalen (Nunc, Dänemark) mit einer Bodenfläche von 9,6 cm²/well bei 37°C, 95% O₂ und 5% CO₂ auf einem sterilen Einsatz mit einer 0,4 µm Polycarbonat-Membran (Nunc 25 mm Organkultur-Einsätze, Nunc, Dänemark) für 72 Stunden inkubiert (Abbott, 1994). Der Medienwechsel erfolgte alle 24 Stunden unter der sterilen Werkbank.

Als Kulturmedium wurde eine Mischung aus DMEM und Ham's F-12 (1:1) verwendet (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), dem 10% fetales Kälberserum (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) sowie 20 E/ml Penicillin und 20 µg/ml Streptomycin (Seromed Biochrom, Berlin, Deutschland) zugegeben wurden.

Das B-Vitamin Komplexpräparat PolybionN® (Thiaminhydrochlorid (Vitamin B1) 5 mg/ml, Riboflavin-5-Phosphat (Vitamin B2) 2mg/ml, Nicotinamid (Vitamin B3) 20 mg/ml, Pantothersäure (Vitamin B5) 3 mg/ml, Biotin (Vitamin B7) 0,25 mg/ml, Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B6) 2 mg/ml) der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) wurde in der Konzentration von 0,1% und 1% dem Grundmedium zugegeben (Tab. 3).

Tab. 3: B-Vitaminskonzentrationen in den verwendeten Kulturmedien (mg/ml). Die nicht grau unterlegten Vitamine wurden nicht substituiert.

Vitaminskonzentration im Kulturmedium	ohne Vitaminszusatz	0,1% PolybionN	1,0% PolybionN
Thiamin (B1)	0,002	0,007	0,052
Riboflavin (B2)	0,0002	0,002	0,02
Nicotinamid (B3)	0,002	0,02	0,2
Pantothersäure (B5)	0,002	0,005	0,03
Pyridoxin (B6)	0,033	0,035	0,053
Biotin (B7)	0,00004	0,0003	0,0025
Folsäure (B9)	0,003	0,003	0,003
Cobalamin (B12)	0,0007	0,0007	0,0007

Auswertung der Gewebekulturen

Das Wachstumsstadium der Gaumenplattenpaare wurde vor der Inkubation und nach 72-stündiger Inkubation bei 5- und 10-facher Vergrößerung (Stereomikroskop Stemi 2000, Karl Zeiss AG, Jena, Deutschland) nach seinem Entwicklungsstadium in das Score-System von Al-Obaidi et al.1995 (Abb.4/5) eingeteilt und fotografiert (Dimagext®, Konica Minolta, Langenhagen, Deutschland).






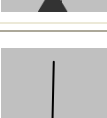
Score	Beschreibung	Schematische Darstellung	Organkultur (Abb. 6)
I	gerade erkennbare palatinale Gaumenfortsätze		
II	Annäherung der Gaumenfortsätze		a
III	Starke Annäherung der Gaumenfortsätze, kein direkter Kontakt		
IV	Erster Kontakt der Gaumenfortsätze		b
V	Kontakt über zwei Drittel in der Fusionszone		c
VI	Kontakt der Gaumenfortsätze über die gesamte Strecke des Gaumens (partiell/vollständig)		d

Abb. 4: Einteilung der Gaumenentwicklung nach Al-Obaidi et al. (1995) mit schematischer Darstellung der Annäherung der Gaumenfortsätze (Scheller et al., 2011).

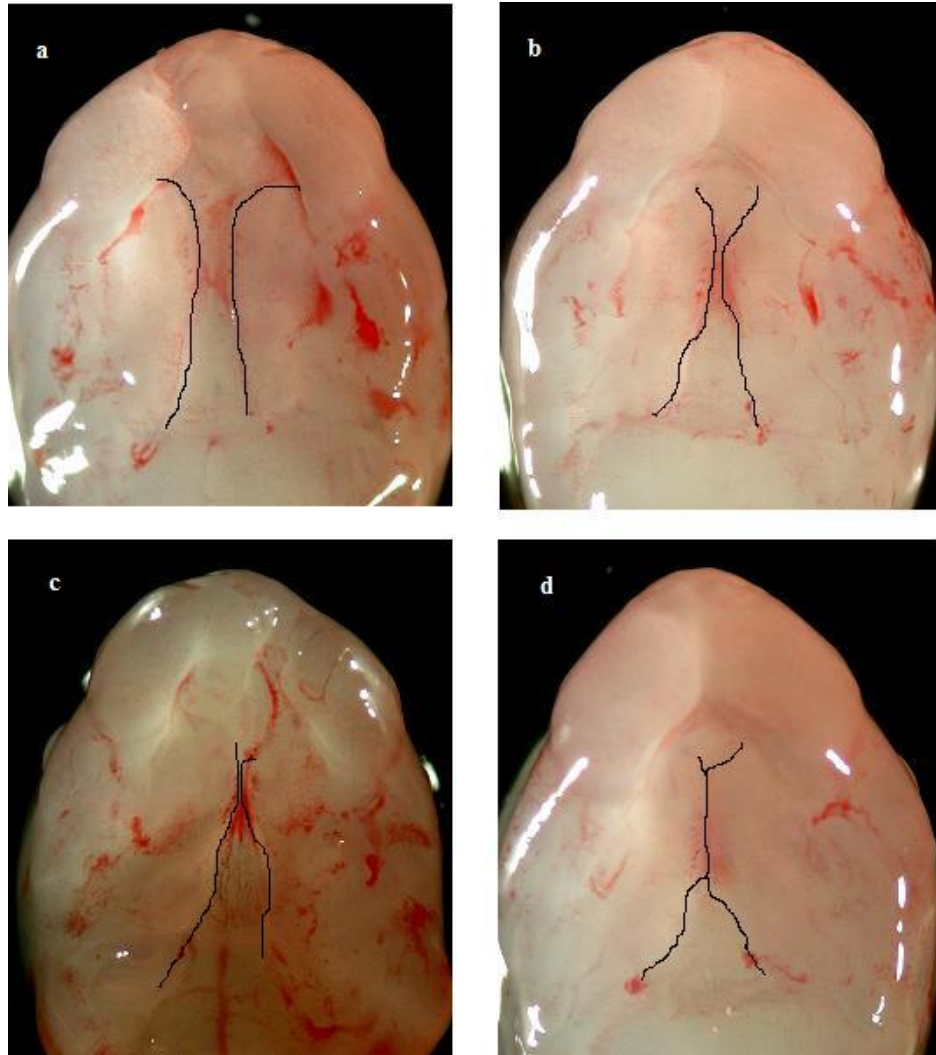


Abb. 5: Entwicklung des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus im Organkulturmodell (Scheller et al., 2011). Nach der Annäherung der Gaumenfortsätze im Stadium II (a) kam es zu einem weiteren vertikalen Wachstum der Gaumenfortsätze zwischen dem anterioren und medialen Drittel des späteren Hartgaumens, bis diese sich im Stadium IV in der Mittellinie berührten (b). Hierauf begann ein Zusammenwachsen der Gaumenfortsätze nach Auflösen der mittigen Epithelmauer von anterior nach posterior (c, d).

3.2.3 Entnahme von Fruchtwasser und Serum bei der Muttermaus

Die Entnahme von Fruchtwasser und Blut erfolgte mittels einer 2 ml Spritze (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien) und einer 27G $\frac{3}{4}$ - Nr. 20 Einmalinjektionskanüle Microlance™3 (Braun, Melsungen, Deutschland). Das Fruchtwasser wurde durch Punktion des Uterusschlauches (Abb.6) und das Vollblut durch Punktion der Aorta abdominalis steril entnommen. Bis zu weiteren Verarbeitung wurden das Fruchtwasser und das Vollblut in Microvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei -20°C aufbewahrt.



Abb. 6: Fruchtwasserentnahme bei der Muttermaus durch Punktion des Uterusschlauches auf beiden Seiten des Uterus bicornatus.

3.2.4 Histologische Untersuchungen

Die in 4%-iger Formaldehydlösung konservierten Gewebeproben aus der Organkultur wurden nach der Inkubation von 72 Stunden in Paraffin eingebettet und in 10 μ m dicke Gewebepreparate entlang der kranio-kaudalen Achse in Serie geschnitten. Nach Dehydrierung durch eine absteigende Ethanolreihe erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA).

Als kompletter palatinaler Verschluss wurde definiert, wenn ein mesenchimaler Übergang bei mehr als 2/3-tel des fusionierten Gaumens von anterior nach posterior nachzuweisen war und der epitheliale Saum in diesem Bereich über 2/3-tel der Fusionsstelle durch Mesenchym ersetzt war (Abb. 7D).

Ein partieller oder inkompletter Verschluss lag vor, wenn die fusionierten Strukturen am Gaumen über 2/3-tel der Strecke mikroskopisch einen epithelialen Saum aufwiesen (Abb. 7C).

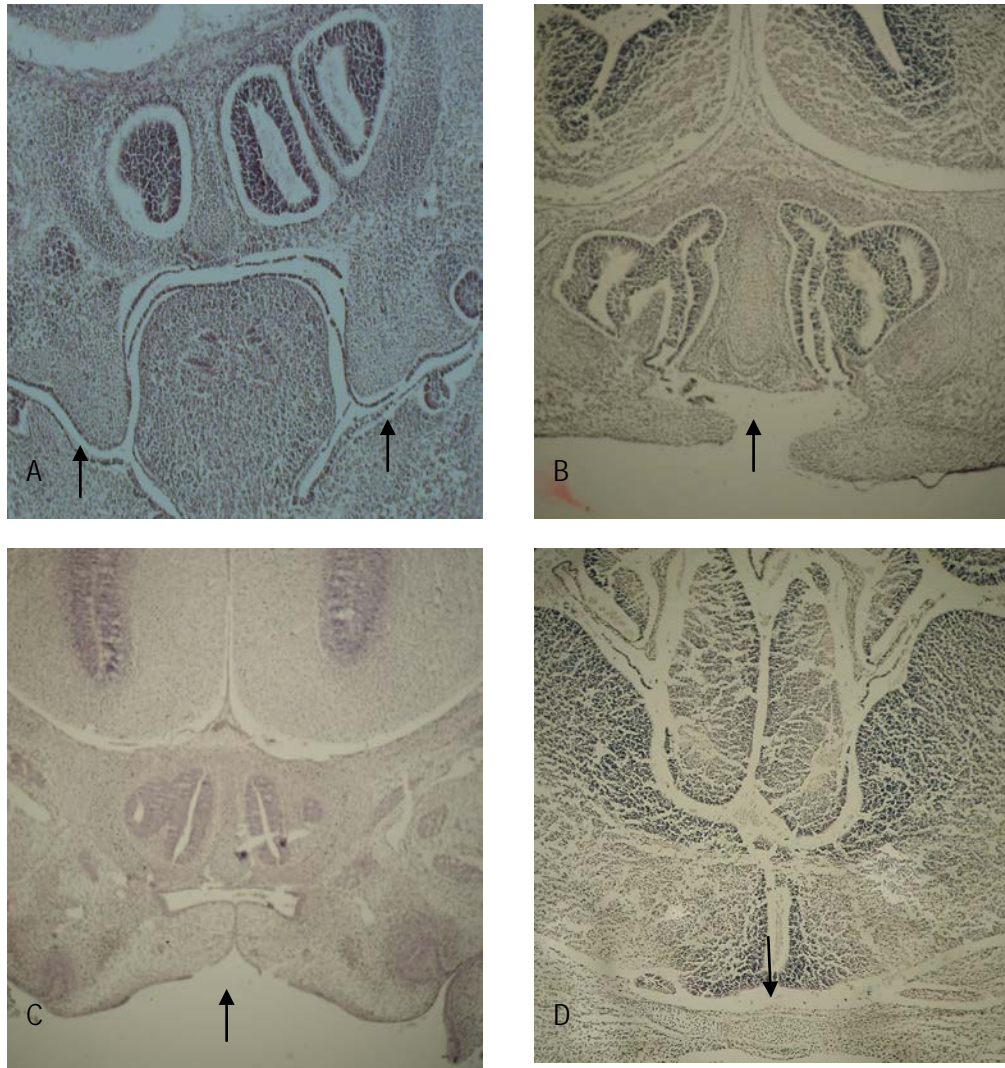


Abb. 7: Histologische Darstellung koronarer Schnitte durch das Mittelgesicht der NMRI-Maus (H.E., 5-fache Vergrößerung). (A) Die Pfeile markieren die beiden Oberkieferwülste, die seitlich der Zungenanlage in vertikaler Richtung stehen. (B) Die vertikal orientierte Gaumenspalte wird durch den Pfeil markiert. (C) Hier markiert der Pfeil den epithelialen Saum zwischen den beiden sich angenäherten Oberkieferwülsten, während (D) einen komplett verschlossenen Gaumen ohne epithelialen Saum an der Fusionsstelle zeigt.

3.2.5 Bestimmung der Vitaminkonzentrationen

Die wasserlöslichen Vitamine B1, B2, B3, B5 und B6 in Fruchtwasser und Serum wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-Chromatographie, Surveyor Plus HPLC, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:10 mit reinstem Millipore® Wasser (LS Orbital Sanitary Process Equipment GmbH, Schwechat, Österreich) bestimmt. Pro Probe konnten maximal bis zu 3 verschiedene B-Vitamine analysiert werden. Die Vitamin-Standards wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Folsäure und Vitamin B12 wurden durch den kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (Siemens Medical Solutions Diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) bestimmt.

3.2.6 Immunhistochemische Untersuchungen

Da die vorangegangenen Serum- und Fruchtwasser-Bestimmungen von Thiamin (Vitamin B1) eine geringere Konzentration von Thiamin im Fruchtwasser von Mäusen mit einer Spaltbildung gezeigt hatten, stellte sich die Frage, ob eine erniedrigte Thiaminkonzentration im Fruchtwasser von Mäusen mit Spalten reaktiv mit einer Erhöhung der Thiaminrezeptoren-Expression (ThTr-1) im Mittelgesicht einhergeht.

Ebenfalls interessierte durch die vorangegangenen Untersuchungen, inwiefern eine erniedrigte Serum-Konzentration von Thiamin bei Müttermäusen mit Spaltkindern eventuell zu einer reaktiven Erhöhung der Thiaminrezeptorendichte ThTr-2 in der Plazenta führen.

Koronare in Paraffin eingebettete Mittelgesichtsschnitte von 12 A/WySn-Mäuse-Feten mit Spalten und 14 A/WySn-Mäuse-Feten ohne Spalten wurden immunhistochemisch gegen den ThTr1-Rezeptor untersucht (Mendoza et al., 2006). Ebenfalls erfolgte eine immunhistochemische Darstellung des Thiamin-1 und Thiamin-2 Transporters in der Plazenta dieser Mäuse mit und ohne Spaltbildung.

Zusätzlich wurden bei 8 Patienten mit LKG-Spalten die Lippenhautresektate, die während des primären Lippenspaltverschlusses reseziert werden mussten, immunistochemisch gegen verschiedene Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (EGF-R, VEGF-R, ThTr-1) untersucht, um ggf. Defizite aufzuzeigen. Die schriftliche Aufklärung der Sorgeberechtigten des Kindes über die histologische Untersuchung lag vor.

Thiamin-Rezeptor-Expression (ThTr-1, ThTr-2)

Die Schnitte vom Mittelgesicht der A/WySn-Feten wurden 30 min mit einem monoklonale Antikörper (Kaninchen gegen Maus) gegen den ThTr-1 Rezeptor (Cat.# THTR11, Alpha Diagnostic Intl Inc., San

Antonio, USA) und ThTr-2 Rezeptor (E-13: sc162314, Santa Cruz Biotechnology, USA) in einer Verdünnung von 1:100 - 1:1000 inkubiert und anschließend dreimal hintereinander mit klarem Wasser gespült. Der verwendete ThTr-2 Antikörper (E-13: sc162314, Santa Cruz Biotechnology, USA) ist gegen den extrazellulären Anteil des transmembranösen Thiamin 2-Rezeptors gerichtet (Santa Cruz) und besitzt keine Kreuzreaktivität zu dem ThTr-1 Rezeptor.

Die Inkubation mit dem zweiten an alkalische Phosphatase gekoppelten polymeren Antikörper (Ziege gegen Kaninchen, EnVision AP, DAKO, Hamburg, Deutschland und Esel gegen Ziege, Santa Cruz Biotechnology, USA) folgte in einer Verdünnung von 1:100 – 1:1000 für weitere 30 min. Die Farbreaktion wurde durch das BCIP/NBT-Substrat (DAKO, Deutschland) gegen AP-markierte Strukturen hervorgerufen.

Die Negativkontrolle erfolgte durch alleinige Inkubation mit dem 2. Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelter polymerer Antikörper) und intern am fibrösen Bindegewebe im Randbereich der Präparate. In diesen Schnitten zeigte sich keine Kreuzreaktion mit dem Gewebe der untersuchten Mäuse-Feten.

Die koronaren Schnitte der Mittelgesichter der Mäusefeten mit und ohne Spaltbildung wurden bei 5-facher bis 100-facher Vergrößerung des Objektivs (Stereomikroskop Stemi 2000, Karl Zeiss AG, Jena, Deutschland) nach einer internen Klassifikation der Expression des Thiamin 1-Rezeptors eingeteilt (keine Expression des Thiamin 1-Rezeptors = 0, starke Expression = 5).

VEGF-Rezeptor-1-Expression

Der VEGF-A (vaskular endothelial growth factor) ist ein essentielles Signalprotein, das vor allem an der embryonalen *de novo* Vaskulogenese und späteren Angiogenese durch Stimulation der vaskulären Endothelien zur Teilung und Migration beteiligt ist (Ferrara et al., 2003). VEGF-A bindet ausschließlich an die zwei Untergruppen des Typ 1 und Typ 2-Rezeptors der VEGF-Rezeptoren. Hypoxie der Zellen vermittelt durch die Expression von speziellen Hypoxie-Markern eine Steigerung der VEGF-Expression und Rezeptordichte zur Sicherstellung einer angepassten Durchblutung und Oxygenierung der Gewebe (Shweiki et al., 1992).

EGF-Rezeptor-Expression

Der Nachweis der Expression des EGF-Rezeptors (epithelial growth factor, EGF) erfolgte mittels des polyklonalen Antikörpers gegen den transmembranösen, in allen Zellen vorkommenden Rezeptor (Nr. ABIN197229, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), AA 1068-1072, antikörper-online.de). EGF als Wachstumsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von epithelialen Zellen (Marques et al., 2002), konnte allerdings bisher nicht mit der Entstehung von nicht-syndromalen LKG-Spalten in Verbindung gebracht werden (Martinelli et al., 2009).

3.2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Um eventuelle Störungen des Transports der Vitamine zum Erfolgsorgan zu analysieren wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt.

Slc19: Folat/Thiamin Transporter

Der Thiamin- und der Folat-Rezeptor gehört zur SLC19-Genfamilie, welche aus drei unterschiedlichen transmembranösen Transporter-Proteinen besteht (Ganapathy et al., 2003). Trotz einiger Ähnlichkeiten in ihrer Struktur zeigt sich, dass im Transportmechanismus eindeutige Unterschiede bestehen. Die wasserlösliche B-Vitamine (Folsäure und Thiamin) werden von diesen ubiquitär vorkommenden Transportproteinen entlang eines H(+)/OH(-) Gradienten transportiert.

Das Slc19a1-Gen (solute carrier family 19 (Folattransporter), member 1) ist bei der Maus auf Chromosom 10 (39,72 cM) lokalisiert (Maus Gen-Sequenz: <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:103182>) und vermittelt den Transport von Folsäure als Anion bei physiologischem pH-Wert. Transportiert werden bevorzugt Monoglutamatverbindungen (reduziertes Folat und Antifolat), welche in der Dünndarmmukosa reduziert worden sind. Das menschliche Homolog (SLC19A1) ist auf Chromosom 21q22.3 lokalisiert.

Das Slc19a2-Gen (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1928761>) und das Slc19a3-Gen (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:1931307>) kodiert für den Thiamin 1- und 2-Transporter (ThTr-1, ThTr-2). Diese vermitteln den Transport von Thiamin als Kation bei physiologischem pH-Wert und sind bei der Maus beide auf Chromosom 1 lokalisiert (Slc19a2: 71,56 cM, Slc19a3: 42,65 cM). Die Homologe beim Menschen finden sich auf Chromosom 1q23.3 (SLC19A2) und 2q37 (SLC19A3).

SLC19A1 (Folat-Transporter) und SLC19A2 (Thiamin Transporter-1) finden sich in den Gewebezellen (v.a. Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen) und transportieren Folsäure und Thiamin in das Zytoplasma des Zielgewebes. Der bei der Maus aus 488 Aminosäuren bestehende Thiamin Transporter-2 (Slc19a3) ist für die aktive Thiaminaufnahme aus dem Darm und über die Plazenta ins Fruchtwasser verantwortlich.

RNA-Isolation aus Gewebe nach Chromczynski und Sacchi (1987)

Die getöteten Mäusefeten wurden sogleich nach der Schnittentbindung auf Spalten untersucht und in einem Eppendorf-Hütchen bei -90°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Mittels eines Kryostats wurden 20 µm große Gefrierschnitte der Kopfregion bei -30°C angefertigt und auf Objektträgern (Super Frost Plus, Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) übertragen.

Die mRNA-Isolation erfolgte an den Kryopräparaten ohne Unterbrechung der Kühlkette mittels der Trizol-Methode (TRizolReagent®, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Kühlzentrifuge Heraeus RS17 (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) bei 2°C.

Nach der Zugabe von 800 µl Trizol auf die zu lysierenden Zellen der Gewebeschnitte und Überführen der Zellysate in sterile Eppendorfgefäße wurde 160 µl Chloroform (Merck, Deutschland) zugegeben. Nach kräftigem Ausschütteln per Hand (20 s) erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 12.600 rpm und 2°C. Die wässrige Oberphase wurde in ein neues RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 12.600 rpm (10 min, 2°C) wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in 1 ml 70%-igem eisgekühltem Ethanol gewaschen. Nach weiterer Zentrifugation (12.600 rpm, 5 min, 2°C) wurde der Überstand entfernt, das Pellet getrocknet (40°C) und zur weiteren Analyse in 30-50 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Kontrolle der isolierten RNA erfolgte in einem 2%-igen Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die 28S und 18S Banden (Verhältnis von 2:1) unter UV-Licht beurteilt.

First-Strand cDNA-Synthese

Die isolierte mRNA wurde mittels spezifischer Primer durch Reverse Transkription (Revert Aid™ H Minus Reverse Transcriptase Kit, Fermentas, USA) in doppel-strängige DNA-RNA-Hybridmoleküle, die als cDNA-templates (complementary DNA) dienen, umgeschrieben. 1,5 µg RNA wurden mit 1 µL Oligo dT Primer (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit Nuklease freiem Wasser auf 12 µl verdünnt und für 5 min im Thermocycler auf 65°C erhitzt, um die RNA zu denaturieren, und dann sofort auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurden 7 µl RT-Reaction-Mix, bestehend aus 4 µl 5xReaktion Puffer, 2 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl Ribonuclease Inhibitor (Ribo Lock RNase Inhibitor), zugegeben und 5 Minuten bei 25°C inkubiert, um es den Primern zu ermöglichen sich an die mRNA-Vorlage anzulegen (Tab. 4). Hierauf wurde zügig 1 µl der Revert Aid™ H Minus M-Mul V Reversen Transkriptase (Fermentas, St. Leon Rot, USA) hinzu pipettiert. Die reverse Transkription erfolgte für 10 min bei 25°C, anschließend für 1h 20 min bei 42°C. In einem finalen Schritt wurde das RT-Enzym durch eine weitere Temperaturerhöhung auf 70°C für 10 min inaktiviert und die Reaktion gestoppt.

PCR-Reaktion

Nach Aktivierung der HotStarTaq Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 95°C für 15 min wurden 35 bis 40 Zyklen im Thermocycler (Biometra, 37079 Göttingen, Deutschland) nach folgendem Schema durchgeführt:

- Denaturierung bei 95°C für 30 s
- Annealing bei 58°C für 30 s
- Elongation bei 72 für 3 min.

Der letzte Elongationsschritt erfolgte bei 72°C für 10 min mit anschließender Kühlung bei 4°C.

Der 1x-PCR-Reaktionsansatz (25 µl) setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl Q Solution, 2,5 µl 10x-Puffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs, 0,25 µl 20 µM Primer fw, 0,25 µl 20 µM Primer rev, 0,2 µl HotStarTaq, 11,8 µl H₂O und 1 µl Template (cDNA).

Tab. 4: Zusammenstellung der verwendeten Primer-Sequenzen

Gen	Primer	Sequenz 5'→3'	Orientierung	Lokalisation
Slc19a3	Slc19a3 16	GCCGACCCACATAGCTGAAA	sense	16-36
Thiamin-Transporter 2	Slc19a3 re 1711	TGCCCATTTGTGACGGGAAT	antisense	1711-1691
	Slc19a3 fw 973	ACACTTTGCGCATTGGTTCC	sense	973-993
	Slc19a3 rw 1596	TTTCGGCACTTAGCTGAGCA	antisense	1596-1576
	Slc19a3 rw 1304	CCCAGATGCTGCGTGAGTAA	antisense	1304-1284
	Slc19a3 fw 349	TCTCACCAGCCCAGAGATGA	sense	349-369
	Slc19a3re 984	TGCGCAAAGTGTCTCAAAGC	antisense	984-964
Slc19a2	Slc19a2 fw 891	GAGTGAACGGCCTCAAGGTA	sense	891-911
Thiamin-Transporter 1	Slc19a2 rw 2083	TACCATCCTGTGGCTCCTGA	antisense	2083-2063
	Slc19a2 fw 66	GGGACTCCAAGCACCTTGAC	sense	66-86
	Slc19a2 rw 1706	CGTTAGGACGTGGAGGCTTG	antisense	1706-1686
	Slc19a2 fw 891	CGGCCTCAAGGTACAAAACG	sense	891-911
	Slc19a2 8	GGCGTAAATCAGGAACTGAGT	sense	8-28
	Slc19a2 re 1888	GGCTTCCGGCTTCTCTTAGCA	antisense	1888-1868

Nach Überprüfen der mRNA-Isolation durch Überprüfen der ATPase-PCR in allen zur Verfügung stehenden Proben (Abb. 8) wurden diejenigen RNA-Isolationen mit klaren Banden bei 1500 kb weiter verwendet. Die Wahl der ATPase als Positivkontrolle erfolgte, da das weiterhin zu analysierende Gen (Thiamin- und Folatrezeptor) annähernd die gleiche molekulare Größe (>2.000bp) aufwies und somit eine suffiziente Positivkontrolle bei der Größe des zu amplifizierenden Segments notwendig war.

Proben ohne Nachweis des ATPase-Gens wurden im weiteren Verlauf nicht weiter analysiert (z. Bsp.: 7, 10, 15, Abb. 8), da von einer insuffizienten RNA-Isolation in diesen Proben ausgegangen werden musste. Die meisten Proben zeigten jedoch eine suffiziente RNA-Isolation nach der PCR-Reaktion und wurden weiter untersucht.

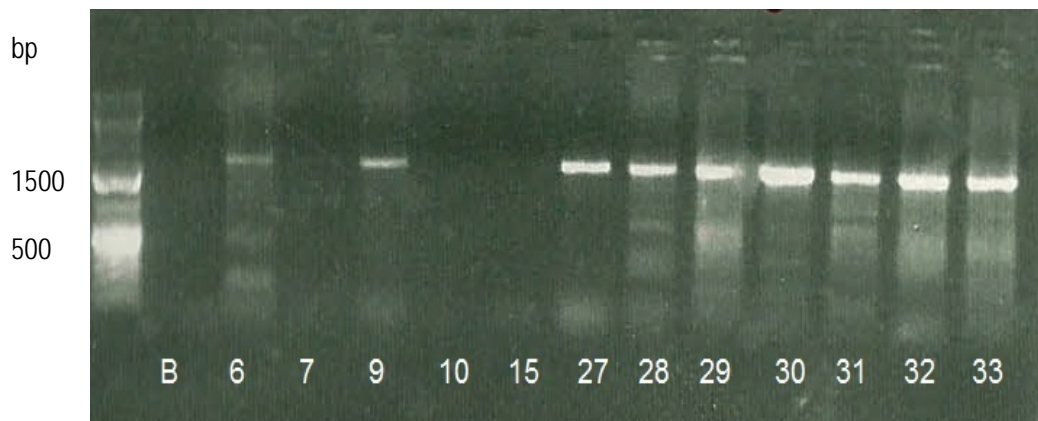


Abb. 8: Darstellen des ATPase-Amplifikats in allen untersuchten Proben. Die Proben mit geringem oder keinem Nachweis wurden nicht weiter analysiert (z.Bsp.: Probe 10 und 15).

Sequenzierung und Auswertung

Die Sequenzierung und Auswertung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Deutschland) mit einem ABI Prism® 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Die vervielfältigten DNA-Proben wurden in einem Volumen von 15 µl in einer definierten Konzentration (nach Angaben des Herstellers in ng/µl, abhängig von der zu sequenzierenden Anzahl der Basenpaare) in Millipore-Wasser aufgenommen. Die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Deutschland) teilte die sequenzierten DNA-Sequenzen per Email mit

3.3 Statistische Auswertung

Die dokumentierten Wachstums-Scores der A/WySn- und NMRI-Maus, zu Beginn der Organkultur und nach 72 Stunden Inkubation, wurden durch den Wilcoxon Rang Vorzeichen- und den Wilcoxon Rang Summen-Test (Mann-Whitney-U-test) mit SPSS, Version 12, (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) im Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg analysiert (Wilcoxon, 1945; Mann und Whitney, 1947).

Die Variablen „Kategorie vorher“ und „Kategorie nachher“ wurden als rangskalierte Daten mit nicht-parametrischen Standardtests als abhängige Stichproben durch den Wilcoxon-Test ausgewertet. Zudem erfolgte ein Vergleich der Variablen „vorher-nachher“ in der Kontrollgruppe mit jeweils einer Vitamingruppe durch den Mann-Whitney-Test. Die Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn sich bei der statistischen Analyse eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) ergab.

Das palatinale Wachstum während der 72-stündigen Inkubationszeit in der Organkultur wurde statistisch auf einem Signifikanzniveau von $\alpha=0.05$ (Tag 14,25 und Tag 17,25) verglichen.

Der Chi-Quadrat-Test wurde angewandt, um zu prüfen zwei Untersuchungsergebnisse unabhängig voneinander sind. Für signifikant wurde das Ergebnis erachtet, wenn Chi-Quadrat bei 3,841 ($p = 0,05$) und für sehr signifikant, wenn Chi-Quadrat bei 6,63 ($p=0,01$) lag (Pearson, 1900). Der oben erläuterte Chi-Quadrat-Test setzt voraus, dass alle erwarteten Häufigkeiten mindestens $N = 5$ betragen und insgesamt mindestens $N = 30$ Fälle einbezogen werden, was bei unseren Untersuchungen zutraf.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Wirkung von Vitamin B1 (Thiamin)

4.1.1 Geschlechtsabhängigkeit

Teratogene Spaltbildung

Für diese Untersuchung erfolgte eine erneute Auswertung der Geschlechtsverteilung in Tierversuchen zur teratogenen Spaltbildung, die an unserer Klinik durchgeführt worden waren (Schubert, 1982; Dostal und Schubert, 1990; Schubert et al., 1990).

Cyclophosphamid und Dexamethason

In diesen Untersuchungen wurde trächtigen AB/Jena-Mäusen zu verschiedenen Zeiten der Schwangerschaft entweder Cyclophosphamid (CPA, 0,6 mg) oder Dexamethason (0,25 mg) intraperitoneal verabreicht.

In den Cyclophosphamidgruppen (Gabe von 20 mg/kg KG am 10,5., 11,5. oder 12,5. Tag) konnten insgesamt 481 lebende Feten untersucht werden, davon wiesen 272 eine Spaltbildung auf (56,5%). Das Geschlechterverhältnis betrug männlich : weiblich 1 : 1,54 (189 : 292). In der Subgruppe mit Spalten befanden sich 118 männliche und 154 weibliche Feten, mithin war das Geschlechterverhältnis 1 : 1,55.

In der Gruppe ohne Spalten war das Geschlechterverhältnis mit 138 weiblichen und 71 männlichen Feten mit 1 : 1,94 zur weiblichen Nachkommenschaft hin verschoben (Tab. 5). Es waren somit mehr weibliche als männliche Feten ohne Spaltbildung in der überlebenden Nachkommenschaft zu finden.

Die Ergebnisse (Tab. 5, Abb. 9) sprechen dafür, dass sich die embryoletalen Effekte von Cyclophosphamid (bis zu 50%) vorwiegend auf den männlichen Nachwuchs ausgewirkt hatten. Trotzdem lag auch die Spaltrate männlicher Feten mit 62,4% (118/156) höher als im weiblichen Geschlecht mit 52,7% ($p=0,016$, $\chi^2=5,822$).

In der unbehandelten Kontrollgruppe fanden sich bei 12 Muttertieren 87 lebende Feten ohne Spaltbildung. Das Geschlechterverhältnis lag bei 43 weiblichen und 44 männlichen Feten bei 1 : 1,02.

Tab. 5: Geschlechtsspezifische Analyse des Auftretens von Gaumenspalten nach Verabfolgung von 20 mg/kg KM Cyclophosphamid bei AB/Jena-Mäusen.

CPA 0,6 mg										
	Anzahl der Nachkommen			Anzahl der Spaltbetroffenen			ratio	Spaltrate		
	♀	♂	insgesamt	♀	♂	insgesamt		♀	♂	insgesamt
10,5.d	47	33	80	31	27	58	1,4	66,0	81,8	72,5
11,5.d	159	90	249	100	67	167	1,8	62,9	74,4	67,1
12,5.d	86	66	152	23	24	47	1,3	26,7	36,4	30,9
Summe	292	189	481	154	118	272	1,5	52,7	62,4	56,5

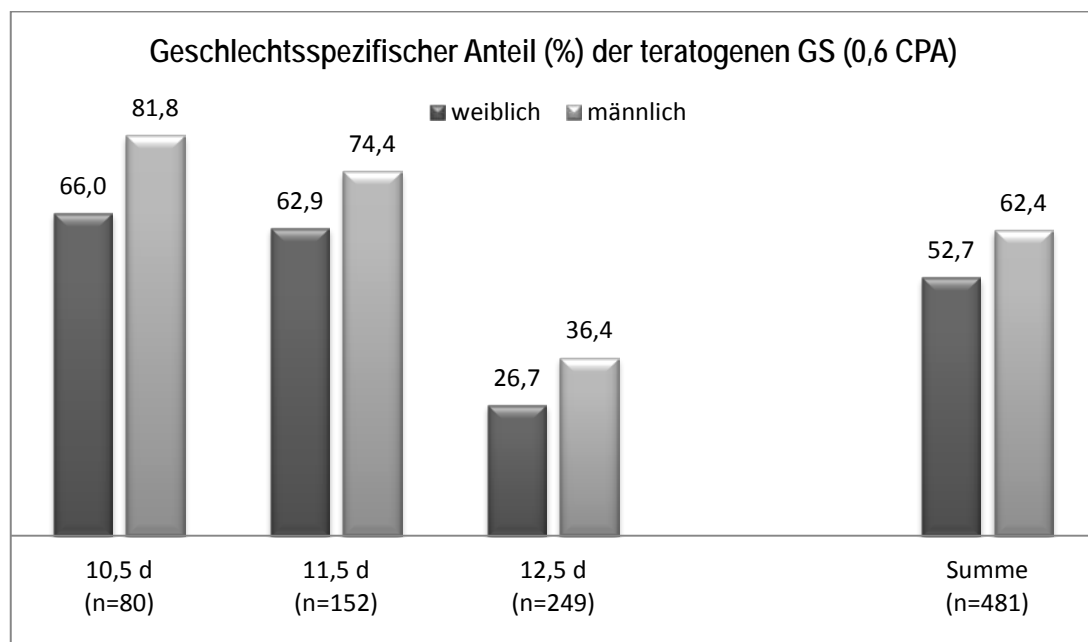


Abb. 9: Geschlechtsspezifische Verteilung teratogen induzierter Gaumenspalten (0,6 mg CPA).

Dexamethason (8 mg/kg KG) erwies sich zwischen dem 10,5. und 13,5. Tag als geeignetes „Spaltteratogen“ und war vor allem an den Tagen 12,5 und 13,5 p.c. praktisch ohne embryonale Wirkung. Das Geschlechtsverhältnis betrug insgesamt 1 : 1,3 (111 : 144) zugunsten der weiblichen Nachkommen. In der spaltbehafteten Subgruppe näherte es sich mit 1 : 1,16 (56/65) an. Allerdings standen insgesamt 50,4% männliche Feten mit Spalten 45,1% weiblichen gegenüber (Tab. 6, Abb. 10). Somit fanden sich wiederum mehr weibliche Feten ohne Spaltbildung (79/55, 1 : 1,43) unter den lebenden Nachkommen. Dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p=0,4$; $\chi^2=0,709$).

Wie auch in der CPA-Gruppe schein auch hier das männliche Geschlecht das „schwächere“ zu sein und gegenüber dem Teratogen anfälliger, allerdings war dieser Effekt nicht so ausgeprägt. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Applikation (13,5.d) nicht mehr vorhandenen embryonalen Wirkung überlebten mehr männliche Feten und das Geschlechterverhältnis näherte sich männlich : weiblich mit 1 : 1,3.

Tab. 6: Geschlechtsspezifische Spaltbildung nach Verabreichung von 0,25 mg Dexamethason.

Dexamethason (0,25 mg)										
	Anzahl der Nachkommen			Anzahl der Spaltbetroffenen			ratio	Spaltrate		
	♀	♂	insgesamt	♀	♂	insgesamt		♀	♂	insgesamt
10,5.d	32	21	53	1	0	1	1,5	3,1	0,0	1,9
11,5.d	34	33	67	4	8	12	1,0	11,8	24,2	17,9
12,5.d	28	18	46	14	13	27	1,6	50,0	72,2	58,7
13,5.d	50	39	89	46	35	81	1,3	92,0	89,7	91,0
Summe	144	111	255	65	56	121	1,3	45,1	50,5	47,5

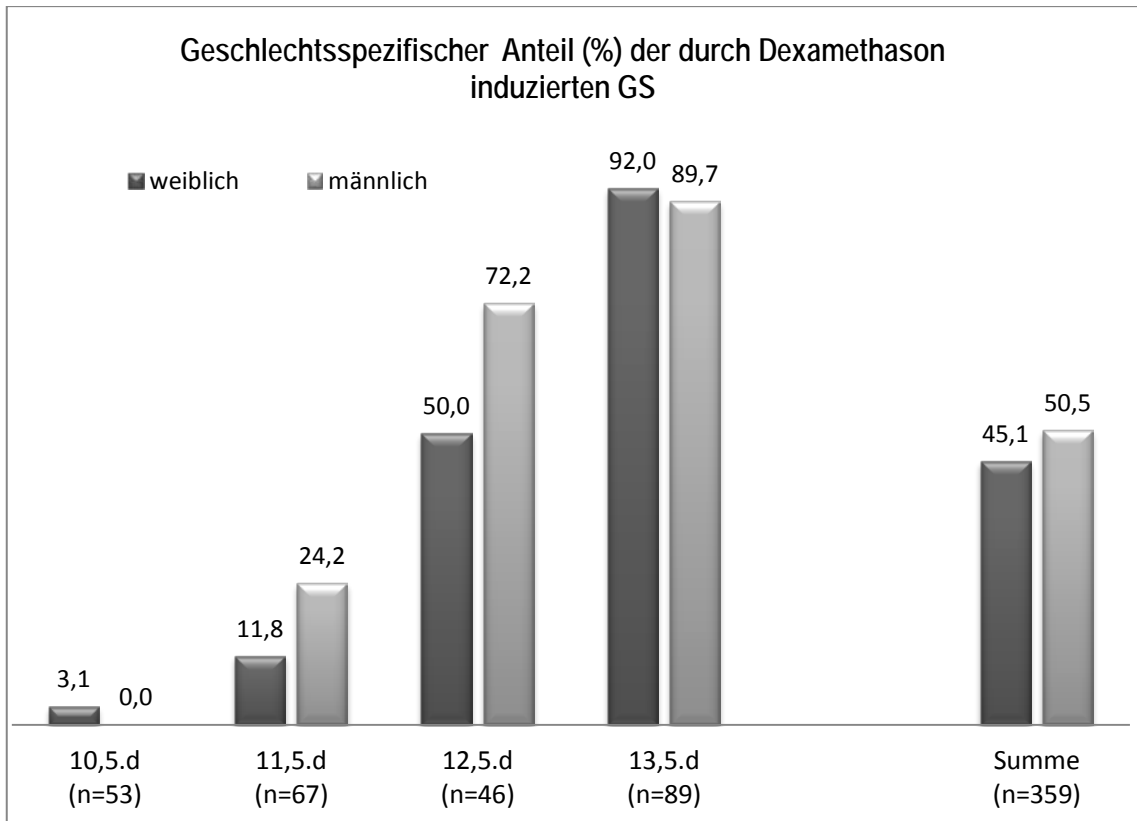


Abb. 10: Geschlechtsspezifische Verteilung der durch Dexamethason induzierten Gaumenspalten.

Genetisch determinierte Spaltbildung (A/WySn-Maus)

Untersucht wurden jeweils 18 A/WySn-Muttermäuse in 5 verschiedenen Untersuchungsgruppen (n=90) hinsichtlich Ihrer Nachkommen mit und ohne Spaltbildung (n=449).

Hinsichtlich der Nachkommen bei diesem Mäusestamm konnte kein wesentlicher Unterschied in der Geschlechtsverteilung gefunden werden. So lag die Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Lebendgeburten mit 1 : 1,079 (männlich/weiblich) ganz leicht zugunsten der weiblichen Nachkommen und entsprach nicht ganz der Geschlechtsverteilung beim Menschen mit einem leichten Überwiegen der männlichen Nachkommen 1 : 1,052 (weiblich/männlich) (<https://www.cia.gov/library/publikation/the-world-factbook/fields/2018.html>). Bedenkt man allerdings die kleine Untersuchungsgruppe mit 90 Muttermäusen und den geringen Unterschied kann von einer gleichen Verteilung der Geschlechter unter den lebendgeborenen Nachkommen der A/WySn-Maus ausgegangen werden.

Innerhalb aller untersuchten Gruppen war zudem kein signifikanter Unterschied in der Spalthäufigkeit bezogen auf das Geschlecht der Nachkommen zu finden (Abb. 11).

In allen Würfen, mit und ohne B1-Substitution, wurden Nachkommen mit Spaltbildung gefunden. Die insgesamt niedrigste Spaltrate (schwere und leichtere Formen zusammengefasst) fand sich in der Kontroll- und Prophylaxe-Gruppe (Gruppe A). Isolierte Lippen- oder Gaumenspalten als abgeschwächte Erscheinungsform der Spaltbildung wurden nicht beobachtet.

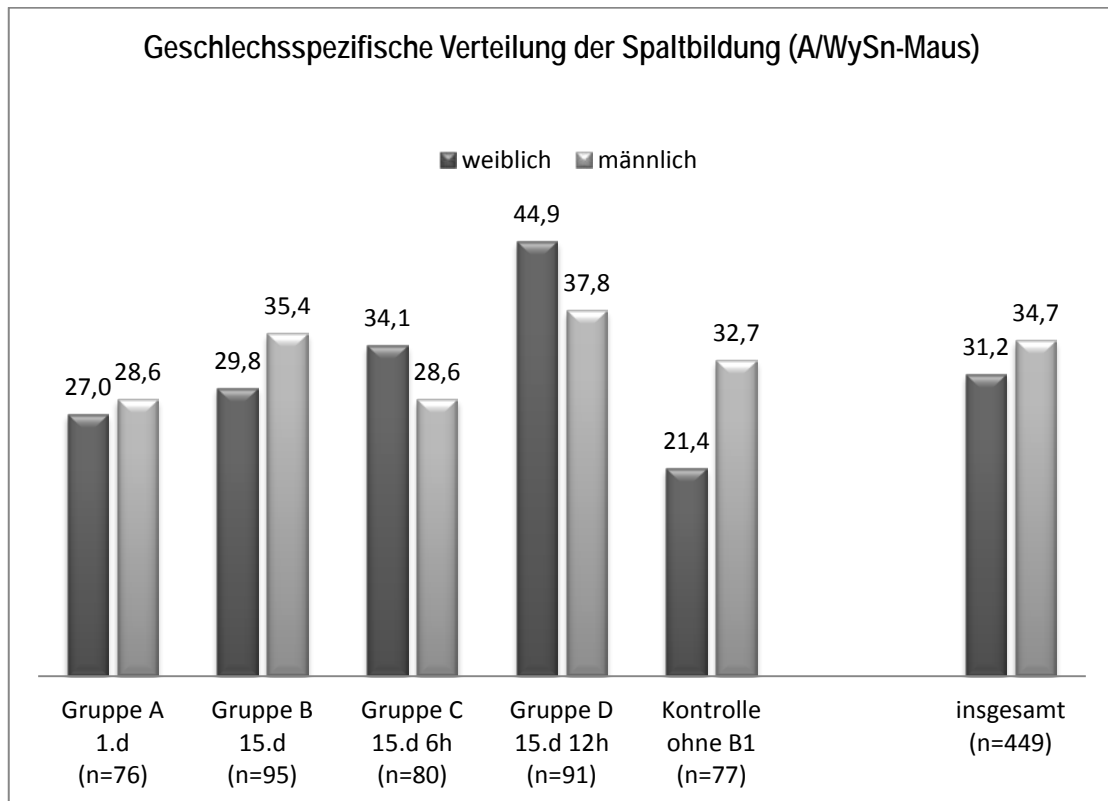


Abb. 11: Geschlechtsspezifische Verteilung der LKG-Spalten bei der A/WySn-Maus ohne Bevorzugung eines Geschlechts.

Bei der teratogen (CPA und Dexamethason) beeinflussten Embryogenese der AB/Jena-Maus überlebten mehr weibliche als männliche Feten, während bei der genetisch determinierten A/WySn-Maus die Geschlechtsverteilung unter den Nachkommen annähernd gleich war.

Bei der geschlechtsspezifischen Verteilung der Spaltbildung zeigte sich wiederum kein Unterschied, denn weibliche und männliche Nachkommen waren im Verhältnis in allen Gruppen gleich häufig betroffen.

So konnte in den durchgeführten Tierversuchen das für den Menschen beschriebene Verhältnis der nicht-syndromalen Spaltverteilung zwischen weiblichen und männlichen Individuen nicht bestätigt werden.

4.1.2 Geschlechtsspezifische Beeinflussung der Spaltrate durch Vitamin B1-Substitution

Cyclophosphamid und Vitamin B1

Hierzu wurden erneut die schon vorliegenden Untersuchungen (Schubert et al., 1990) hinsichtlich der geschlechtsspezifischen Beeinflussung einer Vitamin B1-Substitution (0,75 mg i.p.) auf die Entstehung teratogener Gaumenspalten ausgewertet. Die Gabe des Vitamin B1-Präparates erfolgte prophylaktisch vor Verabreichung des Teratogens (8,5.-10,5.d), simultan mit dem Teratogen (11,5. d) oder therapeutisch (12,5.-14,5. d).

Zunächst fand sich bei Betrachtung der gesamten überlebenden Feten (n=449) signifikant mehr weibliche als männliche Nachkommen (298 ♀ resp. 151♂, $p \leq 0,001$).

Untersuchte man die geschlechtsspezifische Verteilung der Spalthäufigkeit in den einzelnen Substitutionsgruppen so war auch hier ein Überwiegen der weiblichen Feten mit Spalten (146/61) zu sehen, die allerdings nicht signifikant war ($p=0,074$; $\chi^2=3,165$). Bei der Analyse der einzelnen Substitutionsgruppen zeigte sich der deutlichste geschlechtsspezifische Unterschied in der Prophylaxe-Gruppe. Hier waren signifikant weniger der männlichen Nachkommen (50,9% ♀ zu 22,5% ♂, $p=0,03$) von einer Gaumenspalte betroffen (Abb.12). In der Gruppe mit der simultan zum Teratogen verabreichten Vitamin B1-Substitution waren signifikant ($p=0,05$) weniger weiblichen Nachkommen von einer Spaltbildung betroffen.

In der therapeutischen Gruppe war kein signifikanter Unterschied ($p=0,5$) in der geschlechtsspezifischen Verteilung der GS zu erkennen (53,4% ♀ zu 44,0% ♂, $p=0,5$) (Tab. 7).

Insgesamt reduzierte sich der Anteil der Gaumenspalten bei den weiblichen Nachkommen in der Prophylaxe- und Therapiegruppe nur gering um den Faktor 1,2 (Prophylaxe) / 1,6 (Therapie) im Gegensatz zur Kontrollgruppe. In der Simultan-Gruppe war unter den weiblichen Nachkommen der Rückgang am deutlichsten bei einer Reduktion um den Faktor 1,4 auf 44,2% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.12).

Die deutlichste Wirkung der Vitamin B1-Substitution war allerdings in der Prophylaxe-Gruppe der männlichen Nachkommen zu finden (22,5% Spaltbildungen), die durch die frühe Vitamin B1-Substitution eine Reduktion der Spaltrate um den Faktor 3,3 erfuhr. Simultan- und Therapiegruppe zeigten dagegen bei den männlichen Individuen nur einen 1,5-fachen (49,2%) bzw. 1,6-fachen (44,0%) Rückgang.

Somit trat die deutlichste Wirkung bei prophylaktischer Gabe in der männlichen Nachkommenschaft bei weiterhin deutlich mehr überlebenden weiblichen Feten (112/40) auf.

Tabelle 6: Geschlechtsspezifische Verteilung der teratogenen GS (0,6 mg CPA) unter Vitamin B1-Gabe.

CPA 0,6 mg + B1										
	Anzahl der Nachkommen			Anzahl der Spaltbetroffenen			ratio	Spaltrate		
	♀	♂	insgesamt	♀	♂	insgesamt		♀	♂	insgesamt
8,5-10,5.d	112	40	152	57	9	66	2,8	50,9	22,5	43,4
11,5.d	113	61	174	50	30	80	1,9	44,2	49,2	46,0
12,5-14,5.d	73	50	123	39	22	61	1,5	53,4	44,0	49,6
Summe	298	151	449	146	61	207	2,0	49,0	40,4	46,1

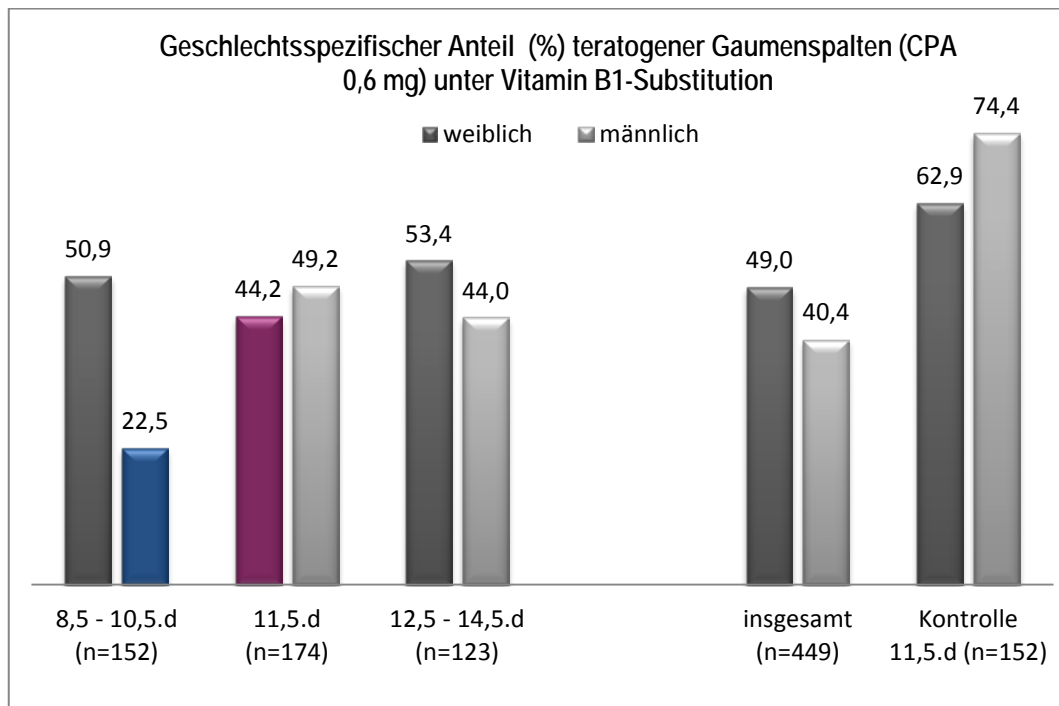


Abb.12: Reduktion der durch 0,25 mg CPA verursachten Gaumenspalatfrequenz durch Vitamin B1-Gabe (0,75 mg). Die farbige markierten Balken zeigen den stärksten Effekt auf männliche Nachkommen in der Prophylaxe- und auf weibliche Nachkommen in der Simultan-Gabe-Gruppe.

Dexamethason und Vitamin B1

Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Effekt einer Vitamin B1-Substitution zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung bei Verabreichung von 0,25 mg Dexamethason am 13,5. Tag der Embryonalentwicklung (stärkster teratogener Effekt in der Kontrollgruppe). Auch in dieser Untersuchungsgruppe erfolgte eine geschlechtsspezifische Auswertung der vorhandenen Daten.

Insgesamt wurden 282 Feten untersucht; davon wiesen insgesamt 104 eine Gaumenspalte (36,9%) auf.

In den Präventionsgruppe (10,5 - 12,5.Tag) war eine um den Faktor 5,3 signifikant niedrigere Rate von Gaumenspalten bei den weiblichen Nachkommen (17,9% ♀ zu 43,3 ♂, $p_{\text{Prophylaxe}}=0,02$) zu beobachten (Abb.13). In der Simultan- und Therapiegruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Rückgang der Gaumenspaltrate zwischen den Geschlechtern der Nachkommen ($p_{\text{simultan}}=0,2$, $p_{\text{Therapie}}=0,16$).

In der männlichen Nachkommenschaft war die Simultangabe mit einer Reduktion um den Faktor 2,4 zur Kontrollgruppe am erfolgversprechendsten (Abb. 13).

Insgesamt konnte in allen Gruppen eine deutliche (signifikante) Reduktion der durch Dexamethason induzierten Gaumenspaltrate durch die Gabe von Thiamin bezogen auf die Kontrollgruppe gesehen werden (Tab. 8).

Tab. 8: Signifikante Reduktion der geschlechtsspezifischen, teratogen induzierter Gaumenspalten (0,25 mg Dexamethason) unter Thiamin-Substitution bezogen auf die Kontrollgruppe.

Dexamethason (0,25 mg) + B1										
	Anzahl der Nachkommen			Anzahl der Spaltbetroffenen			ratio	Spaltrate		
	♀	♂	insgesamt	♀	♂	insgesamt		♀	♂	insgesamt
10,5-12,5.d	39	30	69	7	13	20	1,3	17,9	43,3	29,0
13,5.d	56	43	99	17	16	33	1,3	30,4	37,2	33,3
14,5-16,5.d	73	41	114	37	14	51	1,8	50,7	34,1	44,7
Summe	168	114	282	61	43	104	1,5	36,3	37,7	36,9

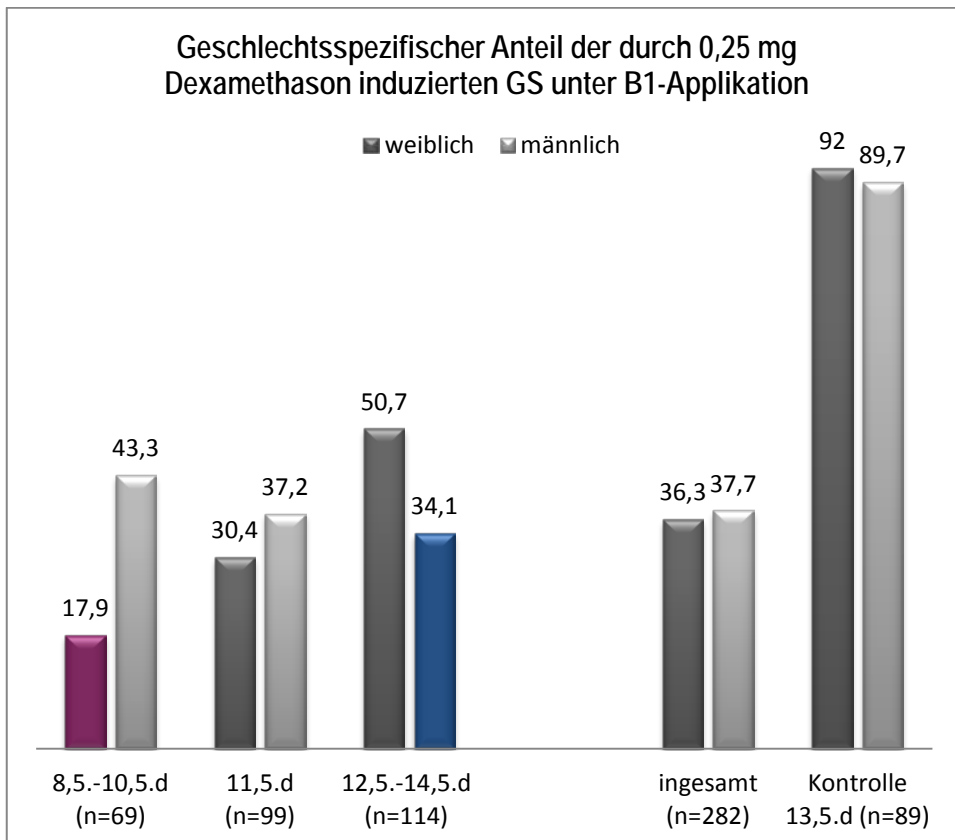


Abb. 13: Vitamin B1-Gabe bei teratogen induzierte Gaumenspalten (0,25 mg Dexamethason am 13,5.d).

Genetisch determinierte Spaltbildung (AMySn)

Die insgesamt einbezogenen 90 Muttertiere erbrachten 449 Nachkommen, von denen 144 mit einer Spalte behaftet waren. Sie bildeten die Substitutionsgruppen A bis D mit Vitamin B1 (1g/kg KG), welches einmalig an unterschiedlichen Tagen p.c. verabreicht wurde, und die Kontrollgruppe ohne jedwede Substitution. In den substituierten Gruppen wurden 372 Feten geboren, von denen 122 eine Spaltbildung aufwiesen (31,2% ♀ vs. 28,6% ♂). Somit ergab sich kein therapeutischer Effekt.

31,2% der weiblichen Nachkommen und 34,7% der männlichen Nachkommen waren in den Versuchsgruppen spaltbehaftet ($p=0,47$; $\chi^2=0,515$). In der Kontrolle lagen die Werte bei 21,4% resp. 32,6%, also auch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,29$; $\chi^2=1,100$).

Das Geschlechterverhältnis aller Feten betrug 1 : 1,23 (167/205) gegenüber 1 : 0,6 (49/28) in der Kontrollgruppe. Die entsprechenden Werte für die Spaltträger unter den Feten waren 1 : 1,10 (58/64), in der Kontrolle 1 : 0,37 (6/16). Trotz Überwiegen des weiblichen Geschlechts waren also männliche

Nachkommen wiederum vermehrt von der Spaltbildung betroffen (Tab. 9). Die relativ geringe Gruppengröße in der Kontrollgruppe mag das Ergebnis etwas aggravierern.

Tab. 9: Geschlechtsspezifische Analyse des Auftretens von hereditären LKGS bei A/WySn-Mäusen unter Vitamin B1-Substitution.

A/WySn-Maus (genetisch determinierte Spaltbildung)										
	Anzahl der Nachkommen			Anzahl der Spaltbetroffenen			ratio	Spaltrate		
	♀	♂	insgesamt	♀	♂	insgesamt		♀	♂	insgesamt
1.d	39	37	76	12	12	24	1,1	30,8	32,4	31,6
15.d	74	48	122	14	17	31	1,5	18,9	35,4	25,4
15.d+6h	43	37	80	16	12	28	1,2	37,2	32,4	35,0
15.d+12h	49	45	94	22	17	39	1,1	44,9	37,8	41,5
Summe	205	167	372	64	58	122	1,2	31,2	34,7	32,8
Kontrolle	28	49	77	6	16	22	0,6	21,4	32,7	28,6

Der erhoffte therapeutische Effekt der hohen Vitamin B1-Substitution während der Entwicklung des sekundären Gaumens, der zu einem Verschluss des Gaumens hätte führen können, blieb aus (Abb. 14). Es zeigte sich bei dieser Maus keine wesentliche Abnahme der schweren Spaltformen (LKGS) zugunsten der abgeschwächten Formen, wie der Lippen- oder Lippen-Kieferspalte (LKS).

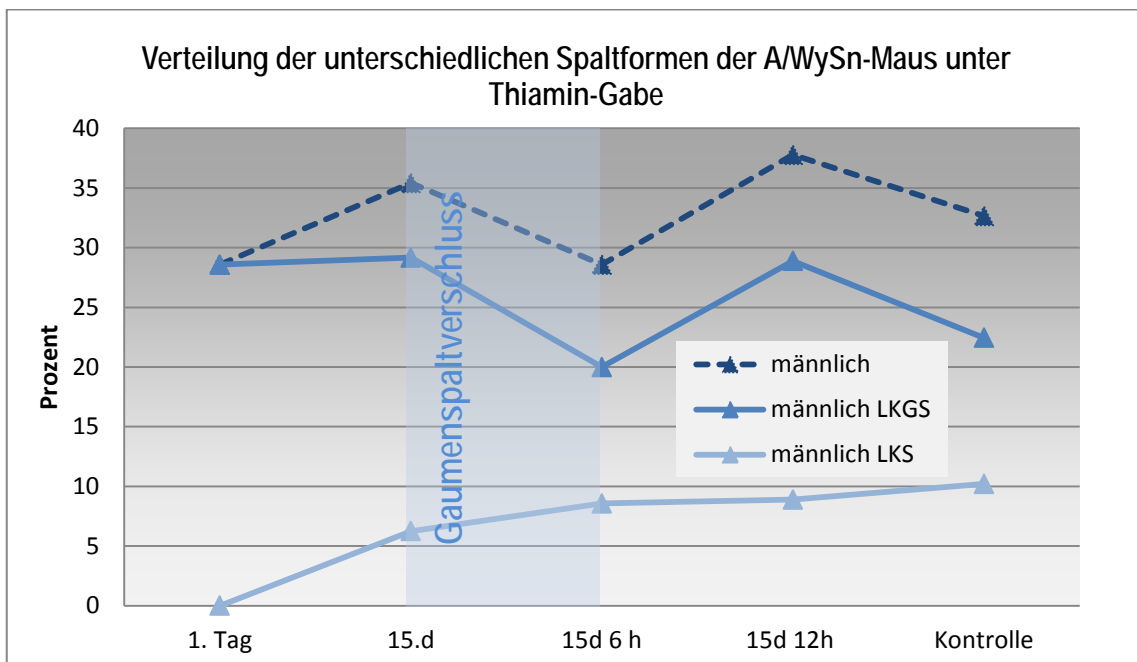
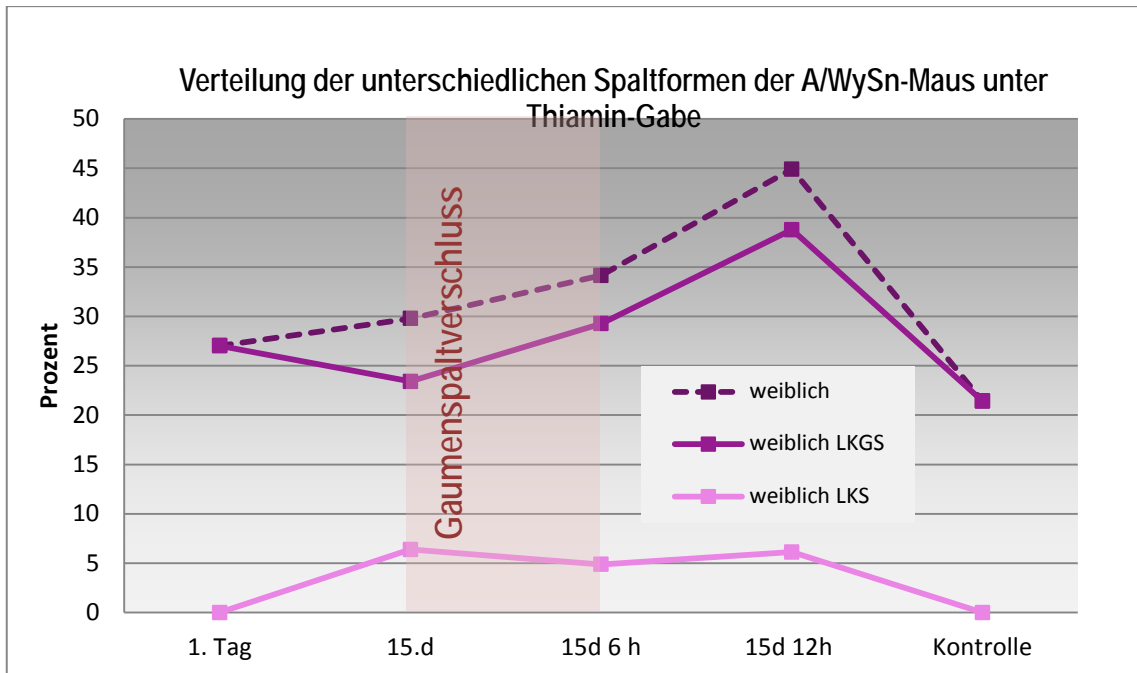


Abb. 14: Geschlechtsspezifische Verteilung der schweren (LKGS) und leichteren (LKS) Formen bei Thiamin-Gabe. Die obere Linie stellt die Gesamt-Spaltrate dar, die darunter liegenden die Aufteilung in die verschiedenen Schweregrade der Spaltbildung (LKGS, LKS).

Zusammenfassend ließen sich deutliche Unterschiede bei der Wirkung von Vitamin B1 auf die Vermeidung einer Spaltbildung feststellen.

Bei dem früh in der Embryonalperiode wirkenden Teratogen (0,6 mg CPA, 11,5.d) konnte durch Thiamin ein eindeutig anti-teratogener Effekt (Abb. 12) erzielt werden, der als Prophylaxe v.a. bei den männlichen und simultan verabreicht bei den weiblichen Nachkommen eine signifikante Reduktion der Gaumenspaltrate ergab. Selbst bei therapeutischer Gabe (12,5 -14,5.d) konnte noch ein deutlicher Effekt durch die Reduktion der Gaumenspaltrate gesehen werden.

Bei Verabreichung von Dexamethason (0,25 mg, 13,5.d), das später in der Embryonalentwicklung der Maus teratogen wirkt, war der deutlichste Effekt bei den weiblichen Nachkommen unter prophylaktischer Gabe zu finden. Insgesamt fand sich eine deutliche Reduktion der Gaumenspaltraten in allen Gruppen. Je früher die Vitamin B1-Gabe erfolgte, desto stärker war der anti-teratogene Effekt bei beiden Geschlechtern (Tabelle 8, Abb. 13). Auch in dieser Gruppe konnte ein „therapeutischer Effekt“ gezeigt werden, der unter den männlichen Nachkommen sehr deutlich ausgeprägt war.

Die genetisch determinierte Spaltbildung (A/WySn-Maus) konnte durch die Thiamingabe nicht positiv beeinflusst werden. Es zeigte sich weder eine Abschwächung der Spaltbildung bei weiblichen oder männlichen Nachkommen (Abb. 14), die als therapeutischer Effekt gewertet werden könnte, wie er doch für die teratogene Spaltbildung beschrieben werden konnte.

4.2 Untersuchungen in der Organkultur

4.2.1 Die Entwicklung des sekundären Gaumens zweier unterschiedlicher Mäusestämme (A/WySn, NMRI) in der Organkultur

Die embryonale *in vitro* Entwicklung des sekundären Gaumens zweier unterschiedlicher Mäusestämme (NMRI, A/WySn) wurde im Organmodell untersucht. Diese unterschiedlichen Mäusestämme wurden ausgewählt, da sie sich hinsichtlich der spontanen Spaltbildungsrate deutlich unterscheiden. Fand man bei der NMRI-Maus lediglich eine Spaltbildungsrate von 0-3,8% (Neubert und Dillmann, 1972; Schubert, 1982; Syska et al., 2004; Staats, 1985) und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Teratogenen, so war die spontane, genetisch determinierte Spaltrate bei der A/WySn-Maus mit 28-50% Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKG) nicht durch Teratogene beeinflussbar (Hallgrimsson et al., 2004; Juriloff et al., 2001; Schubert et al., 2002).

Anhand dieser beiden sehr unterschiedlichen Mäusestämmen ließen sich somit die endogenen (A/WySn-Maus) und exogenen (NMRI-Maus) Einflüsse bei der Entwicklung des sekundären Gaumens unter konstanten Bedingungen beobachten.

In dieser Versuchsreihe wurden 114 NMRI-Mäusefeten, von 17 Müttern (6,7 Nachkommen/Mutter), und 93 A/WySn-Mäusefeten von 30 Müttern (3,1 Nachkommen/Mutter) untersucht. Zum Zeitpunkt der Opferung (14,25 p.c.) waren 2,6% (3/114) der Gaumenplattenpaare der NMRI-Maus (Score VI) und 1,1% (1/93) der A/WySn-Maus geschlossen („partiell“ verschlossen, Score VI). Im Durchschnitt lag der Entwicklungsstand der NMRI-Maus bei einem Score von 3,51 (Median: 4) und der A/WySn-Maus bei 2,7 (Median:2).

Nach 72-stündiger Inkubation zeigte sich bei der NMRI-Maus der niedrigste Entwicklungsstand von Score I in keiner der Organkulturen mehr (0%). 19/114 Organkulturen (16,7%) waren makroskopisch total verschlossen, wobei histologisch eine „komplette“ Fusion (kein epithelialer Saum vorhanden) bei 14/19 Organkulturen (73,7%) nachzuweisen war. 31,6% (36/114) Gaumenplattenpaare zeigten kein Wachstum. 43/114 (37,7%) entwickelten sich um einen Score-Punkt, 19/114 (17,1%) um 2 Score-Punkte, 7/114 (6,1%) um 3 Score-Punkte und 2/114 (1,8%) um 4 Score-Punkte weiter (Abb. 14). Insgesamt wurde somit bei 62,3% der NMRI-Organokulturen eine positive Gaumenentwicklung in der Organokultur gesehen. Lediglich 5,14% der Organokulturen zeigten eine regressive Entwicklung um 1 Score-Punkt bei 6/114 und um 2 Score-Punkten bei einer Organokultur. Der Wilcoxon-Test bestätigte eine signifikante Entwicklung ($p=0.05$) der Gaumenplattenpaare der NMRI-Maus zu einem mittleren Fusions-Score von 4,45 (Median 5) in der Organokultur (Tab. 10, Abb. 15).

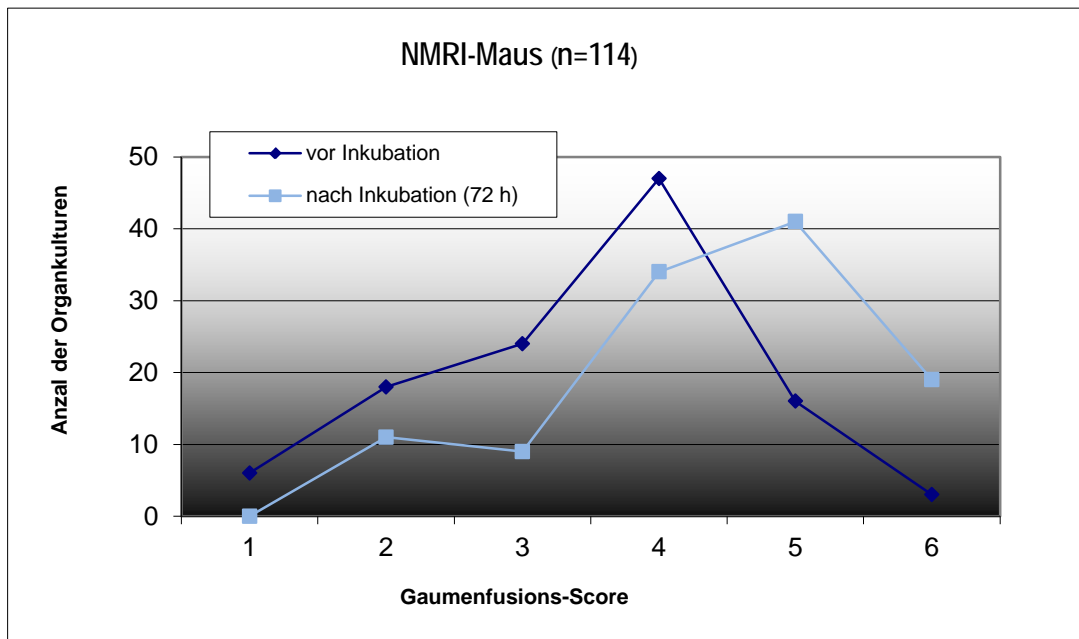


Abb. 15: Während der Inkubation von 72h zeigte sich bei der der NMRI-Maus in der Organkultur ein signifikantes Wachstum der sekundären Gaumenfortsätze (MW von 3,5 auf 4,45).

Mehr als die Hälfte aller präparierten Organkulturen des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus zeigten zum Entnahmezeitpunkt einen deutlich weniger fortgeschrittenen Entwicklungsstand der Gaumenfortsätze (Abb.16). Bei 11/93 A/WySn-Mäuse (11,8%) war zu Beginn der Inkubation kaum eine Gaumenplattenentwicklung (Score I) und bei 37/93 (39,8%) nur eine geringe Annäherung (Score II) der Gaumenfortsätze zu erkennen. Der durchschnittliche Entwicklungsstand lag bei einem Score von 2,7 (Median: 2), der sich auch nach der Inkubation von 72 nicht wesentlich ($p=0,094$) änderte (Score: 2,8; Median: 2). 58/93 Organkulturen (62,4%) zeigten nach 72 Stunden Inkubation überhaupt kein Wachstum, 16/93 (17,2%) entwickelten sich um 1 Score-Punkt und 6/93 um 2 Score-Punkte (6,5%). Insgesamt war bei allen Organkulturen der A/WySn-Maus eine positive Entwicklung in nur 24,7% nachzuweisen. Regressiv veränderten sich 10/93 Kulturen um 1 Score-Punkt (10,8%), 2/93 (2,2%) um 2 Score-Punkte und 1/93 um 3 Score-Punkte (1,1%). Bei einem schlechteren Ausgangswert (2,7) der Gaumenentwicklung zeigten die A/WySn-Mäuse kein signifikantes Wachstum (2,84, $p=0,094$) *in vitro*.

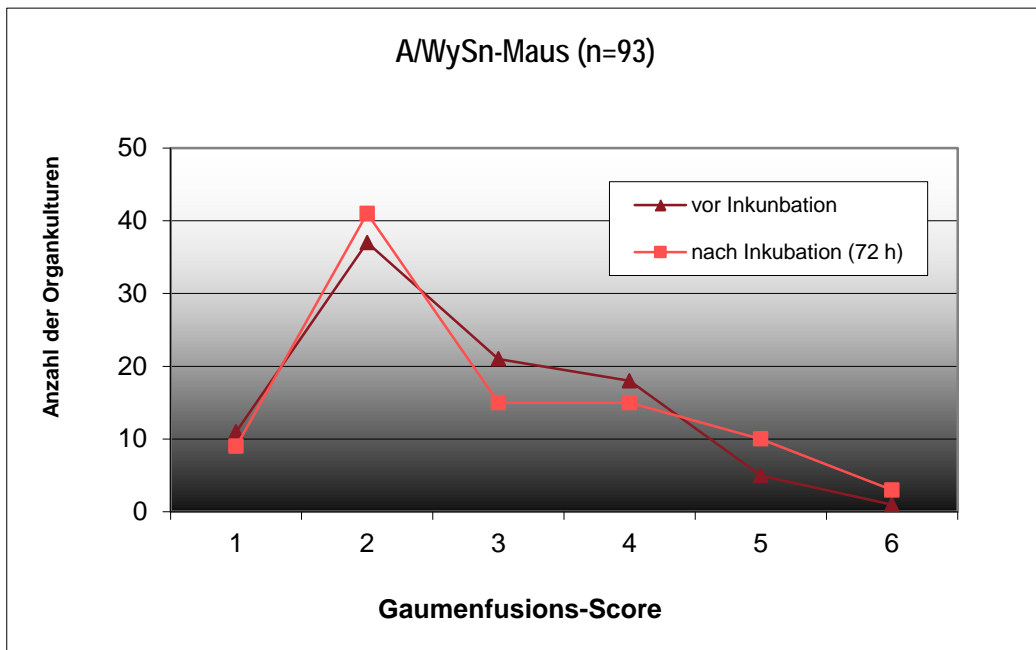


Abb. 16: Bei einem deutlich schlechteren Ausgangsscore zu Beginn der Organkultur fand bei der A/WySn-Maus (MW: 2,7) kaum ein Wachstum oder eine Weiterentwicklung der Gaumensfortsätze in der Organkultur statt (MW: 2,84).

Verglichen mit den NMRI-Embryos (Mittelwert-Score: 3,51) war die Gaumenentwicklung der A/WySn-Maus (Mittelwert-Score: 2,7), wie die gesamte körperliche Entwicklung (NMRI: 9,7 mm vs. A/WySn: 3,6 mm) zum Entnahmezeitpunkt verzögert. So lag der Ausgangswert des Gaumenwachstums zu Beginn der Organkultur bei der A/WySn-Maus (MW: 2,7) deutlich unter dem der NMRI-Maus (MW: 3,51). Während es nach 72 Stunden Inkubation bei der NMRI-Maus zu einem deutlichen Wachstum in der Organkultur gekommen war, stagnierte dieses bei der A/WySn-Maus.

Tab. 10: Gaumenentwicklung in der Organkultur der NMRI- und A/WySn-Maus.

Score	14d+6h	72h Inkubation	14d+6h	72h Inkubation
	NMRI (n = 114)	NMRI (n = 114)	A/WySn (n = 93)	A/WySn (n = 93)
I	6 (5.3%)	0 (0%)	11 (11.8%)	9 (9.7%)
II	18 (15.8%)	11 (9.6%)	37 (39.8%)	41 (44.1%)
III	24 (21.1%)	9 (7.9%)	24 (19.4%)	15 (16.1%)
IV	47 (41.2%)	34 (30%)	18 (19.4%)	15 (16.1%)
V	16 (14%)	41 (36%)	5 (5.4%)	10 (10.8%)
VI	3 (2.6%)	19 (16.7%)	1 (1.1%)	3 (3.2%)
VI partiell		5/19 (26.3%)		3/3 (100%)
VI vollständig		14/19 (73.7%)		0/3 (0%)
Mittelwert	3.51	4.45	2.7	2.84
Median	4	5	2	2

4.2.2 Beeinflussung der Entwicklung des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus durch Polyvitamin B-Präparate in der Organkultur

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die A/WySn-Maus in der Organkultur kein Wachstum des sekundären Gaumens aufwies. Bei der Vermutung, dass ein verlangsamtes embryonales Wachstum für die hohe Rate an Spaltbildungen bei dieser Mäuserasse verantwortlich sein könnte, wurde die klinisch wirksame Prophylaxe einer Polyvitamin B-Substitution in der Organkultur angewandt.

Die Organkulturen von 186 Feten (37 Mütter) wurden angelegt und 163 Organkulturen (87,6%) in die Auswertung einbezogen. 23 Organkulturen konnten nach der Präparation keinem Score-Wert zugeordnet werden und wurden in den weiteren Untersuchungen nicht berücksichtigt. Zum Zeitpunkt der Präparation (14,8.d p.c.) lag der mittlere Entwicklungsscore aller A/WySn-Organokulturen bei 2 (n=163, 100%). Keines der Präparate zeigte eine vollständige Fusion der Gaumenplatten (0/163).

In der Kontrollgruppe (ohne Substitution mit Vitamin B-Komplex, n=54) war eine gruppenspezifische Regression des Wachstums zu beobachten (Abb. 12). Der mittlere Score fiel von 2,35 ($\pm 0,85$) auf 2,25 ($\pm 0,89$) ab. In dieser Gruppe fand bei 70,4% (38/54) der Organokulturen kein signifikantes Wachstum statt ($p=0,58$). 14,8% (8/54) der Organokulturen zeigten eine Regression um einen Score-Grad und 3,7% (2/54) um zwei. Nur 6 von 54 Präparaten (11,1%) wiesen eine registrierbare Weiterentwicklung auf: fünf Exemplare entwickelten sich um einen Score-Punkt (9,3%) und zwei um zwei Punkte (1,9%).

In der mit 0,1% Vitamin-B substituierten Organokultur zeigte sich bei mehr als der Hälfte (51,5%) der Organokulturen eine Weiterentwicklung (32/62). 35,5% (22/62) entwickelten sich um einen Score-Punkt und 16,1% (10/62) um 2 Score-Punkte. 24 Organokulturen (24/62, 38,7%) zeigten keinerlei Wachstum der Gaumenfortsätze. Drei Exemplare (3/62) zeigten zu Versuchsende einen um einen Grad geringeren Score (4,8%) und ein Exemplar einen um zwei Score-Punkte niedrigeren Wert (1,6%).

In der 1,0% B-Komplex Versuchsgruppe entwickelten sich 42,6% (26/61) der kultivierten Präparate weiter. 21,3% zeigten einen Fortschritt um einen Score-Punkt (13/61), 19,7% stiegen um zwei Punkte (12/61), während 1,6% sogar einen Fortschritt von 3 Score-Punkten aufwiesen (1/61). Nur bei 13,1% (8/61) fand eine Regression statt und 44,3% (27/61) zeigten kein signifikantes Wachstum (Abb.17).

In beiden Vitamin B-Komplex Versuchsgruppen war zu Versuchsende ein signifikantes Wachstum ($p \leq 0,000$) der Gaumenplatten zu verzeichnen. Zwei Exemplare, eines in jeder substituierten Gruppe ($n_{0.1\%}=62$, $n_{1.0\%}=61$), zeigten makroskopisch eine vollständige Fusion der Gaumenplatten (Score 6) am

Ende der 72-stündigen Inkubation (1,6%). Die histologische Untersuchung in den koronaren Schnitten konnte nur eine partielle Fusion mit einem epithelialen Saum in der Verschmelzungszone nachweisen.

Der Wachstumsunterschied in beiden Vitamin B substituierten Gruppen war nicht signifikant ($p=0,5$). In der Kontrollgruppe (ohne Vitaminsubstitution) zeigte sich kein signifikanter Entwicklungsfortschritt des Gaumenwachstums ($p=0,32$, Abb. 17).

Zusammenfassend konnte ein positiver, direkter Effekt auf das Wachstum des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus durch das Poly-Vitamin B-Präparat ab einer Medienkonzentration von 0,1% gezeigt werden.

Entwicklung des sekundären Gaumens in der Organkultur

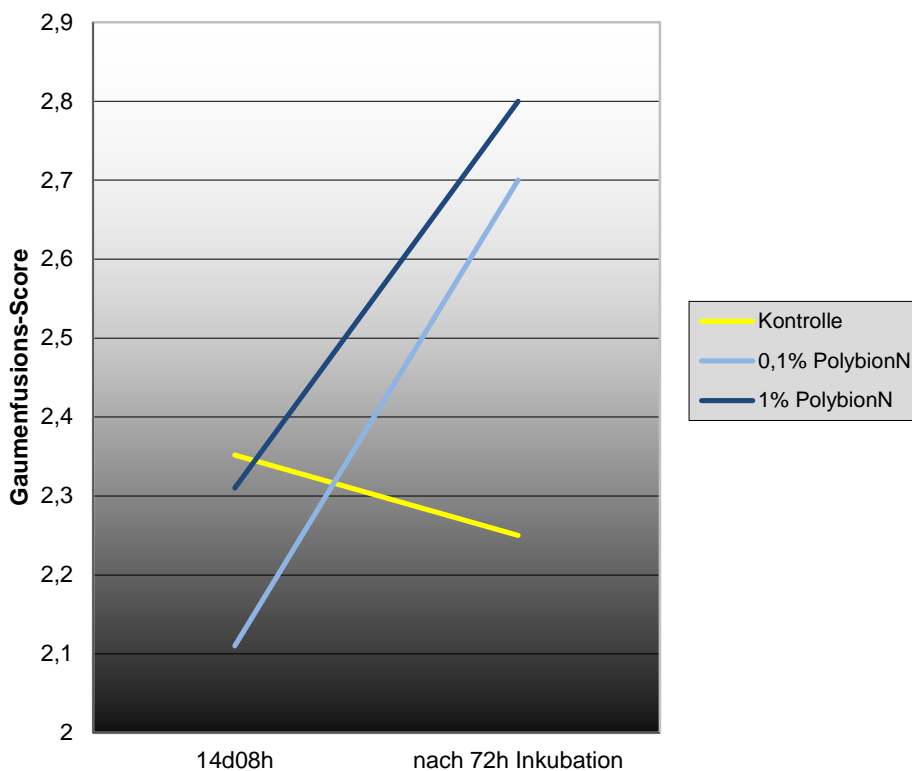


Abb. 17: Entwicklung des sekundären Gaumens in der Organkultur der A/WySn-Maus durch Zugabe von Polyvitamin B (Polybion N®) nach 72-stündiger Inkubation.

4.3 Serum- und Fruchtwasser-Konzentration verschiedener B-Vitamine in Abhängigkeit von der Spaltentwicklung

4.3.1 Grundlegende Untersuchungen in der A/WySn-Maus

Die direkte wachstumsfördernde Wirkung der Poly-Vitamin B-Präparate auf die Entwicklung des sekundären Gaumens in der Organkultur und die positiven klinischen Ergebnisse einer Polyvitamin B-Prophylaxe führten zu der Überlegung, ob es einen Unterschied in der Serum- und Fruchtwasserkonzentration dieser B-Vitamine, abhängig vom Auftreten einer Spaltbildung in der Nachkommenschaft, gibt.

Hierzu wurden bei 150 schwangeren Muttermäusen die Serum- und Fruchtwasserwerte für verschiedene B-Vitamine untersucht.

761 Feten wurden nach Schnittentbindung hinsichtlich einer Spaltbildung untersucht. Hier fanden sich 16 isolierte Lippen-(Kiefer-)Spalten (2,1%), eine Gaumenspalte (0,1%) und 182 durchgehende Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (23,9%). Die Gesamtpaltrate lag bei 26,2%. Bei nur 37 von 150 Würfen (24,7%) konnte keine Spaltbildung in der Nachkommenschaft gefunden werden (Kontrolle) und alle Nachkommen des Wurfs zeigten sich phänotypisch gesund.

Die Vitamin B1-Konzentration (Thiamin) war im Serum ($p_{\text{Serum}}=0,01$) und im Fruchtwasser ($p_{\text{Fruchtwasser}}<0,001$) von Muttermäusen mit Spaltkindern, verglichen mit Muttermäusen ohne Spaltkinder, signifikant erniedrigt (Abb. 18).

Bei Müttermäusen ohne Spaltkinder waren Serum- und Fruchtwasserkonzentration annähernd gleich hoch ($p=0,3$).

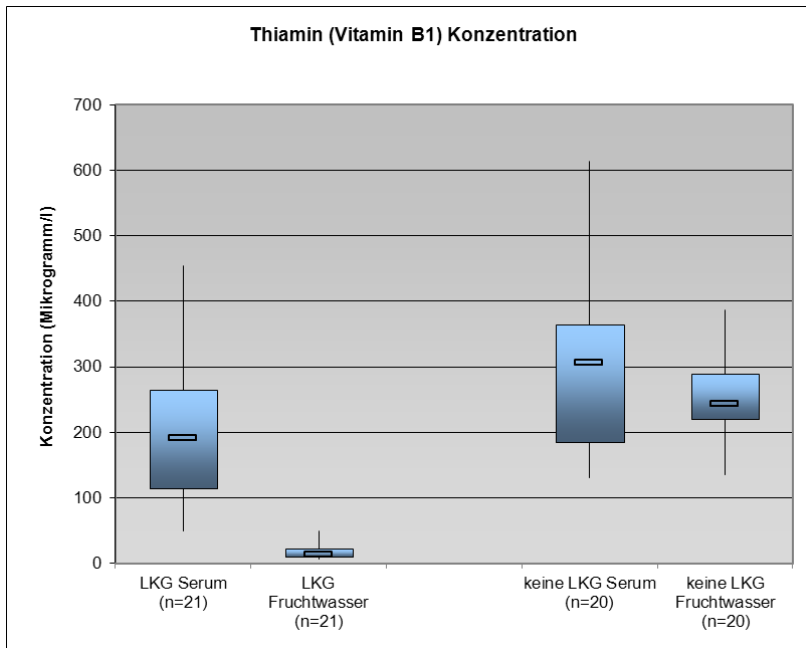


Abb. 18: Signifikant niedrigere Werte von Thiamin im Serum und Fruchtwasser bei Müttern mit Spaltbildung in der Nachkommenschaft.

Die Konzentration von Riboflavin (Vitamin B2) zeigte zwischen beiden Gruppen (mit und ohne Spaltkinder) keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 19). Im Serum war sie in beiden Gruppen annähernd gleich hoch und jeweils signifikant höher als im Fruchtwasser ($p_{\text{Spalte}} < 0,001$; $p_{\text{keine Spalte}} = 0,002$).

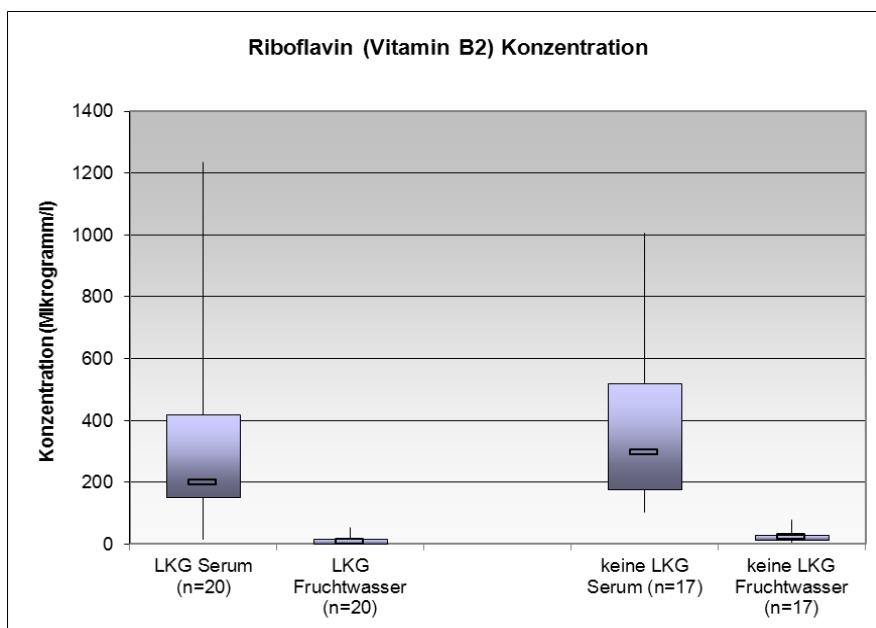


Abb. 19: Riboflavin (Vitamin B2) zeigte in der Serum- und Fruchtwasserverteilung keinen Unterschied.

Die Vitamin B3-Konzentration (Niacin) zeigte weder im Serum ($p_{\text{Serum}}=0,14$) noch im Fruchtwasser ($p_{\text{Fruchtwasser}}=0,07$) signifikante Unterschiede in beiden Gruppen (Abb. 20). Im Fruchtwasser war die Konzentration niedriger als im Serum, unterschied sich allerdings in den beiden Gruppen nicht signifikant.

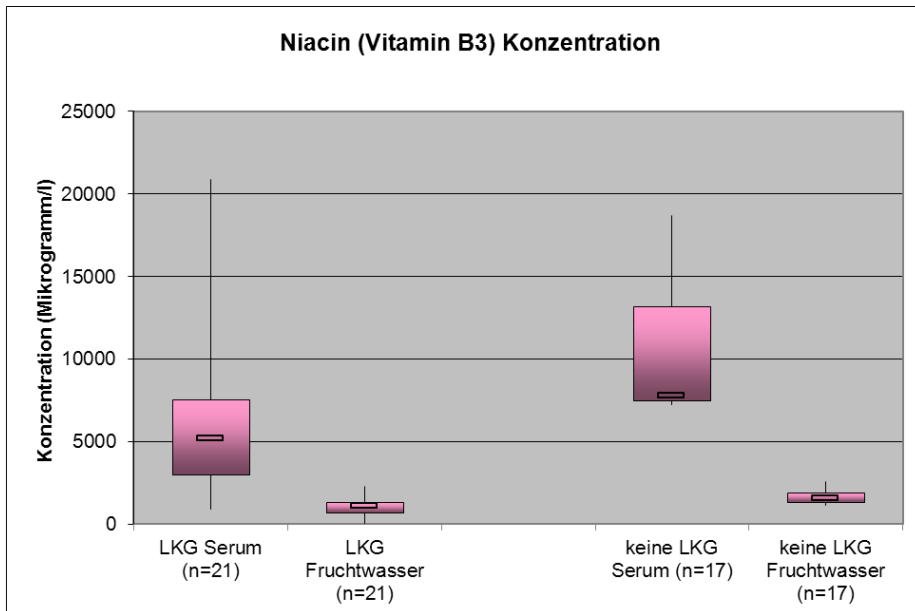


Abb. 20: Niacin (Vitamin B3) zeigte keine Unterschiede zwischen Muttermäusen mit und ohne Spaltbildung bei den Nachkommen.

Vitamin B5 (Pantothensäure) war in beiden Gruppen im Fruchtwasser signifikant höher konzentriert als im Serum ($p_{\text{Serum}} < 0,001$). Zudem war die Fruchtwasserkonzentration von Muttermäusen ohne Spalt-Nachkommen signifikant höher als die von Muttermäusen mit Spalt-Nachkommen ($p_{\text{Fruchtwasser}} \leq 0,001$).

Die Serum-Werte zeigten zwischen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1$; Abb. 21).

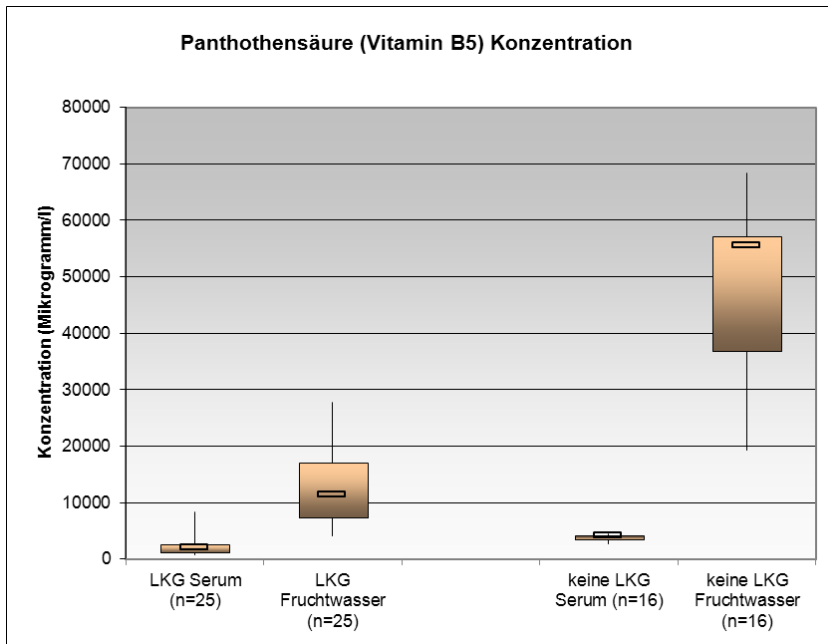


Abb. 21: Vitamin B5-Konzentration (Panthothensäure) mit signifikantem Konzentrationsunterschied im Fruchtwasser.

Vitamin B6 (Pyridoxin) war im Serum in beiden Gruppen höher konzentriert als im Fruchtwasser ($p_{\text{Spalte}} < 0.001$; $p_{\text{keine Spalte}} < 0.001$). Die Serum- und Fruchtwasserkonzentrationen unterschieden sich allerdings in beiden Gruppen nicht (Abb. 22).

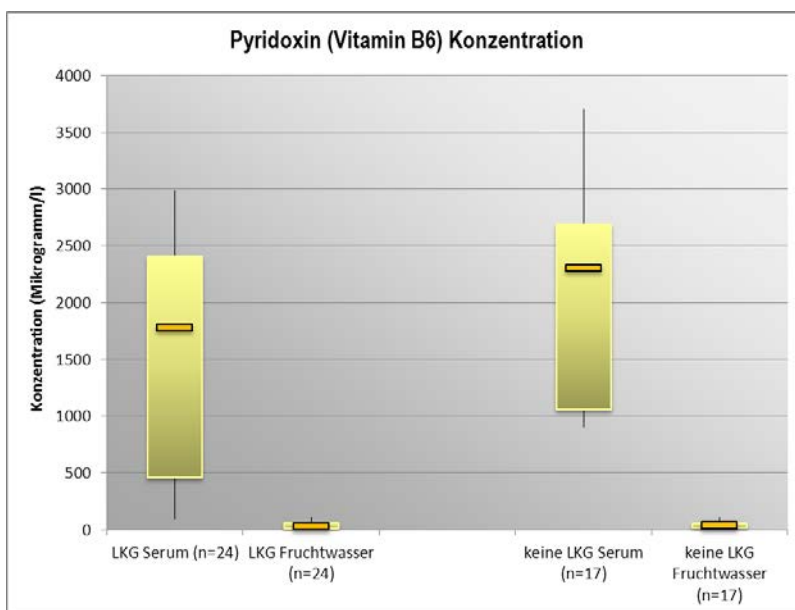


Abb. 22: Konzentrationsverteilung von Pyridoxin (Vitamin B6) ohne wesentlichen Unterschied zwischen Müttern mit und ohne Spaltkindern.

Bei der Untersuchung der Folsäurekonzentration konnten im Serum zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p_{\text{Serum}}=0,5$, Abb. 23). Im Fruchtwasser hingegen fanden sich bei Muttermäusen mit Spaltkindern signifikant niedrigere Werte als bei Muttermäusen ohne Spaltkinder ($p_{\text{Fruchtwasser}}=0.004$).

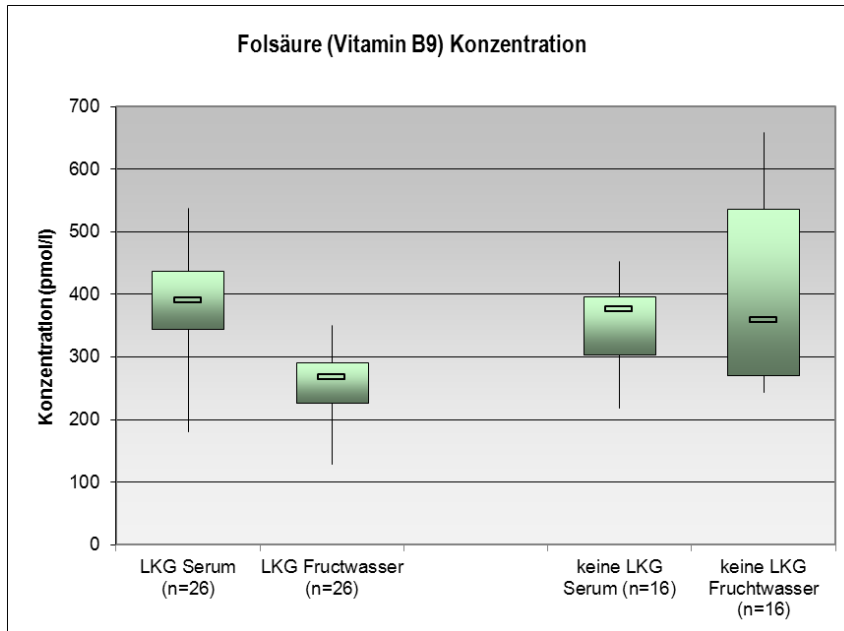


Abb. 23: Folsäure (Vitamin B9) mit signifikant niedrigeren Werten im Fruchtwasser von Muttermäusen mit Spaltkindern.

Die Untersuchung der B12-Konzentration (Cobalamin) zeigte in 19 Untersuchungen bei Muttermäusen mit Spaltfeten und 10 Untersuchungen bei Muttermäusen ohne Spaltfeten keine verwertbaren Ergebnisse und wurde somit nicht weiter berücksichtigt.

Zusammenfassend war ein signifikanter Zusammenhang zwischen der erniedrigten Vitamin B1-Konzentration im Serum und Fruchtwasser von Mutter-Mäusen und dem Auftreten von Spalten in Ihrer Nachkommenschaft nachweisbar ($p_{\text{Serum}}=0,01$ und $p_{\text{Fruchtwasser}}<0,001$, Abb.19). So ging ein erniedrigter Thiamin-Spiegel im Serum der Muttermäuse und im Fruchtwasser der Feten mit dem Auftreten von Spaltbetroffenen in der Nachkommenschaft signifikant einher.

Die wasserlöslichen Vitamine B2 ($p=0,38$), B3 ($p=0,13$), B5 ($p=0,1$), B6 ($p=0,12$) und Folsäure (B9, $p=0.5$) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Serum-Konzentration in beiden Gruppen.

Im Fruchtwasser von Muttermäusen mit Spaltfeten konnten allerdings auch für Vitamin B5 (Pantothensäure) und Folsäure (B9) signifikant niedrigere Werte als bei Muttermäusen mit phänotypisch gesunden Mäusenachkommen, gefunden werden (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich der Konzentrationen verschiedener B-Vitamine bei Muttermäusen mit und ohne Spaltkinder.

	B1	B2	B3	B5	B6	B9 (Folsäure)
Abbildung	19	20	21	22	23	24
Serum	niedriger	kein Unterschied	kein Unterschied	kein Unterschied	kein Unterschied	kein Unterschied
FW	niedriger	kein Unterschied	kein Unterschied	niedriger	kein Unterschied	niedriger

4.3.2 Untersuchungen zur Thiaminkonzentration im Fruchtwasser und Serum unter Substitution (A/WySn-Maus)

Zeigte sich in den Vorversuchen eine deutliche niedrigere Konzentration von Thiamin (B1) im Fruchtwasser und Serum von A/WySn-Muttermäusen mit Spaltkindern, so lag es nahe diesen Mäusestamm mit hochdosiertem Vitamin B1 oral zu substituieren und die Verteilung der Vitamin B1-Konzentration zu untersuchen.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die Konzentration von Thiamin im Serum in den substituierten Gruppen (Gruppe A-D) signifikant höher lag als in der Kontrollgruppe. Die Thiaminkonzentration der untersuchten Gruppen im Fruchtwasser unterschieden sich alle jedoch nicht signifikant (Tab. 11).

Trotz der signifikant erhöhten Serumspiegel unter Substitution, konnte die Konzentration von Muttermäusen ohne Spaltnachkommen aus den Vorversuchen (Abb. 19) in dieser Versuchsreihe nicht erreicht werden, was der Tatsache geschuldet ist, dass es keine Muttermaus gab, die einen Wurf ohne mindestens ein Spaltkind hatte (Abb. 24).

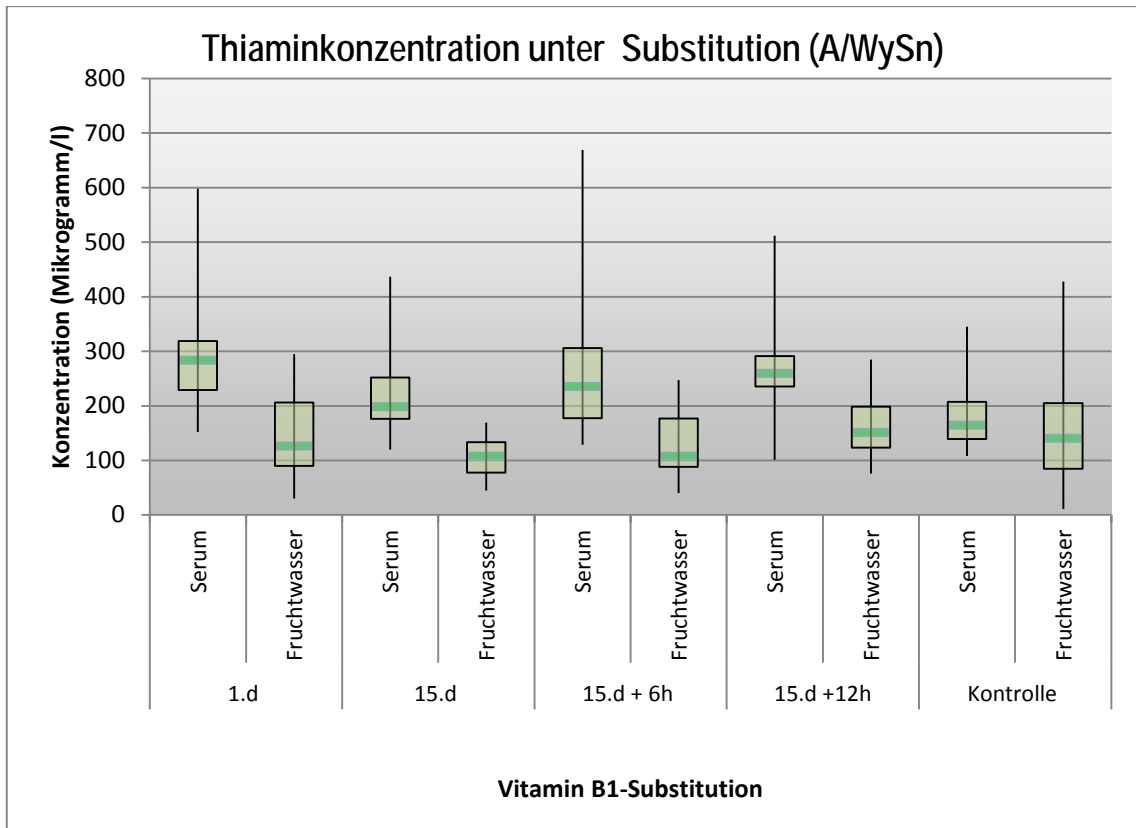


Abb. 24: Boxplot der Serum- und Fruchtwasserkonzentration von Vitamin B1 unter Substitution.

Bei der genetisch determinierten A/WySn-Maus schien die Aufnahme über die Plazenta ins Fruchtwasser aufgrund eines aktiven Transportproblems, über den passiven Einstrom hinaus, nicht möglich. So resultierte keine signifikante Erhöhung des Thiaminspiegels im Fruchtwasser der Muttermäuse (Abb. 24, Tab. 11).

Verglich man hierauf die Thiamin-Werte im Serum und im Fruchtwasser der einzelnen Tiere hinsichtlich der Manifestation schwerer (durchgängige Lippen-Kiefer-Gaumenspalten) und milder Spaltformen (Lippen-Kiefer-Spalten) konnte bei keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied gefunden werden.

Tab. 12: Konzentrationsunterschiede der Gruppen mit B1-Substitution zur Kontrolle ohne. Die Serumkonzentrationen in allen Substitutionsgruppen lagen signifikant höher als die in der Kontrollgruppe.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Serum	p=0.0002	p=0.039	p=0.016	p=0.02
Fruchtwasser	p=0.23	p=0.023	p=0.12	p=0.36

4.4 Untersuchungen der Transportproteine

4.4.1 Untersuchungen zur ThTr1- / ThTr-2 Rezeptor-Expression

Untersuchungen in koronaren Schnitten des Mittelgesichts und der Plazenta der A/WySn-Maus

Da in Vorversuchen die stark erniedrigte Thiaminkonzentration im Fruchtwasser der Mäuse mit einer Spaltbildung aufgefallen war, stellte sich nun die Frage nach dem möglichen Grund.

Immunhistochemische Untersuchungen an koronaren Schnitten durch die fetalen Mäuseköpfe zeigten eine hohe, zytoplasmatische Expression des spezifischen ThTr-1 (Thiamin-1 Rezeptor) in der Muskulatur der Gaumenfortsätzen von Mäuse-Feten mit Spaltbildung (Score-Mittelwert: 4,41; n=12).

In den Gaumenfortsätzen von Mäuse-Feten ohne Spaltbildung (n=14) zeigte sich eine wesentlich geringer ausgeprägte transmembranöse Expression (Score-Mittelwert: 1,4; Abb. 25).

In der Plazenta konnte keine Expression von ThTr-1 nachgewiesen werden.

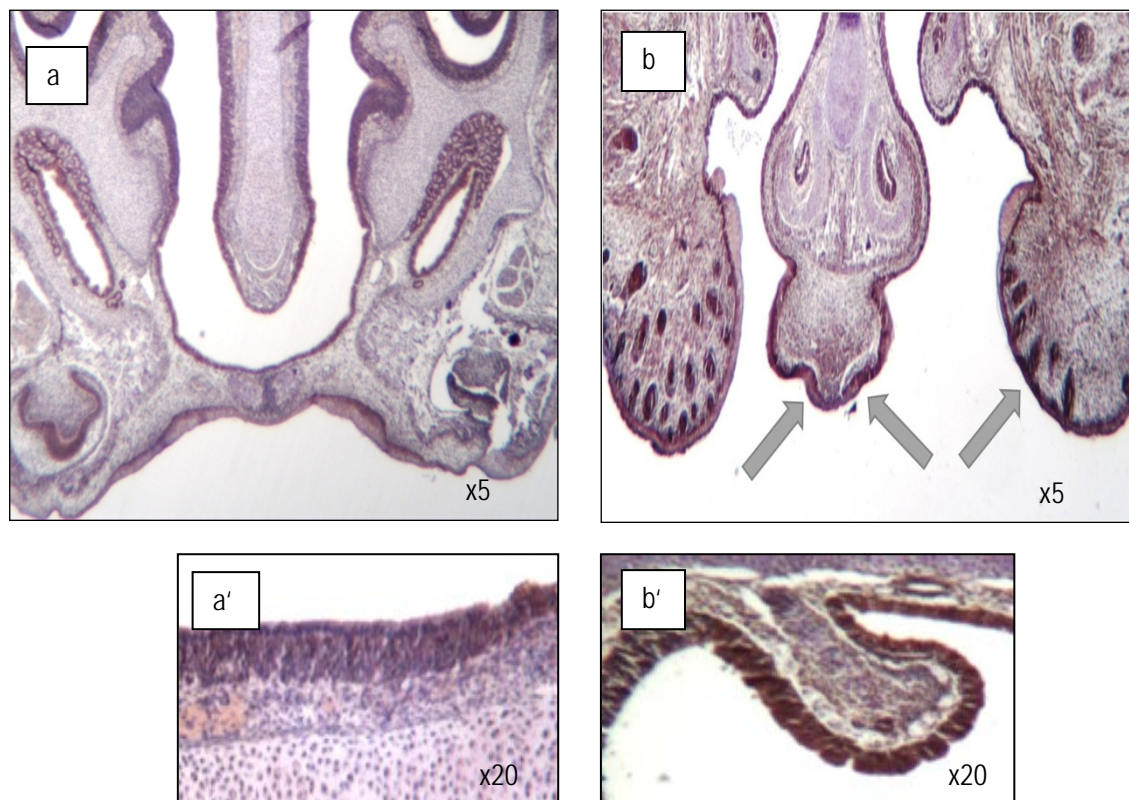


Abb. 25: Koronare Schnittrichtung im Bereich des Mittelgesichts (region of interest, ROI) einer A/WySn-Maus. Im Vergleich zu einer normal entwickelten A/WySn-Maus (a, a') zeigte sich bei der Maus mit der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte eine deutliche zytoplasmatische Expression des ThTr-1 Rezeptors in den Gaumenfortsätzen (b, b').

Der Thiamin-2 Rezeptor (ThTr-2) war in der Plazenta von Mäusefeten ohne Spaltbildung membranständig lokalisiert (Rajgopal et al., 2001). Bei der Untersuchung der Plazenta von Feten mit Spaltbildung war dieser intrazytoplasmatisch und diffus verteilt im Plazentaparenchym nachweisbar. Diese fehlerhafte zytoplasmatische Lokalisation gab einen Hinweis auf eine mögliche Funktionseinschränkung beim Transport von Vitamin B1 durch die Plazenta (Abb. 26).

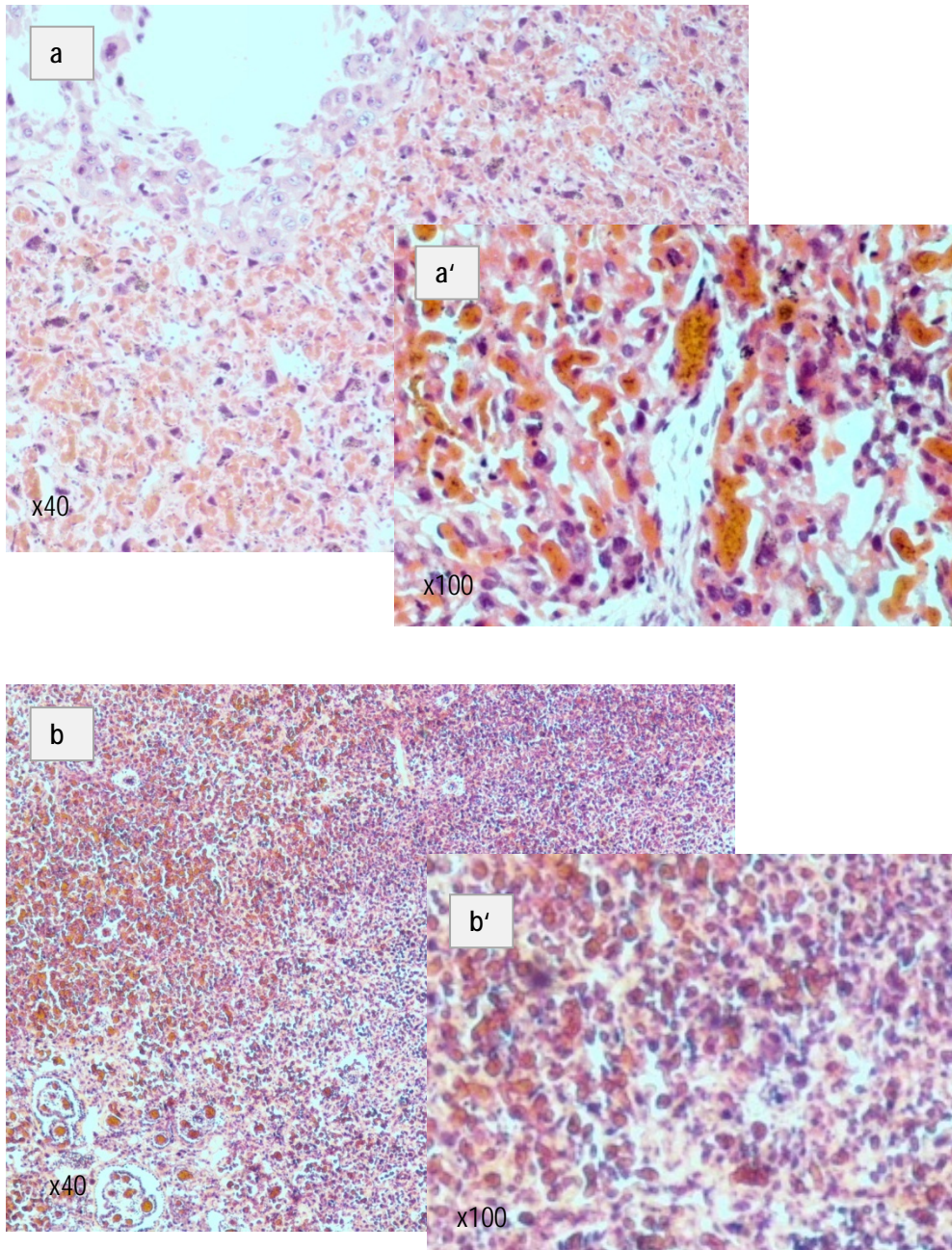
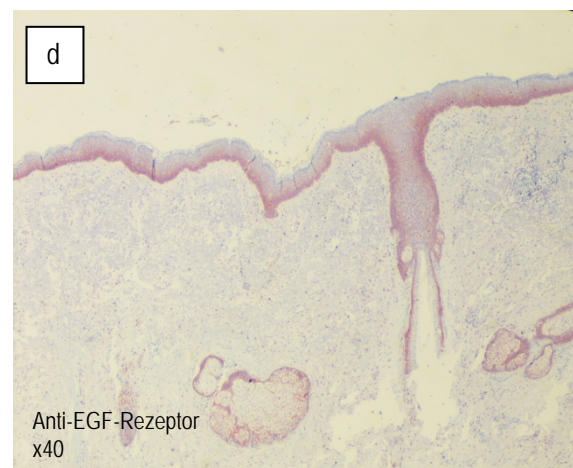
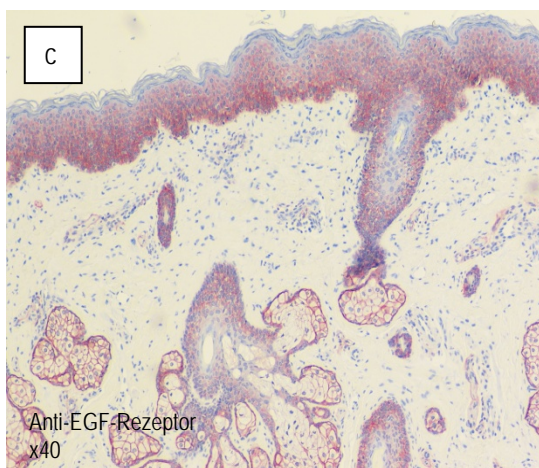
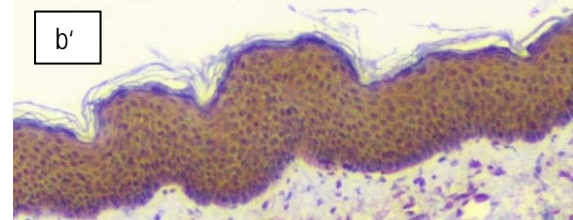
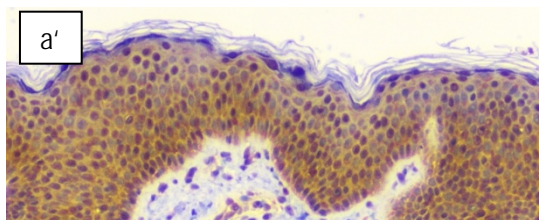
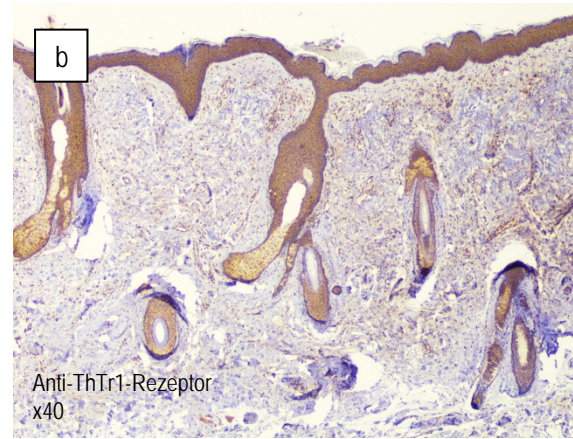
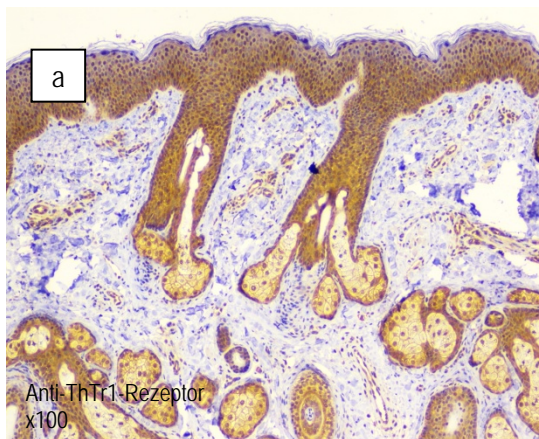


Abb. 26: Immunohistochemischer Nachweis des zytoplasmatisch lokalisierten ThTr-2 Rezeptors in der Plazenta der Spaltmaus (a; a') sowie der transmembranösen Lokalisation in der Plazenta der Maus ohne Spalte (b, b').

ThTr1-Rezeptor-, VEGF-Rezeptor- und der EGF-Rezeptor-Expression in humanen Lippenexzidaten

Aufgrund des positiven Nachweises des Thiamin-Rezeptor 1 in den Mittelgesichtsschnitten der A/WySn-Maus lag es nahe die Expression dieses Rezeptors sowie weiterer Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die für die Entwicklung des Gesichtes wichtig sind, in humanen Lippenexzidaten (n=8) zu untersuchen (Iamaroon et al., 1996). Immunhistochemisch konnte eine mäßig starke Thiaminrezeptor-1 Expression in den zytoplasmatischen Anteilen der quergestreiften Muskultur und in den mittleren und basalen Epidermislagen der Oberlippenresektate nachgewiesen werden (Abb. 27a, Detaildarstellung: a'). In der Kontrolle einer gesunden Lippenhaut war der Thiamin1-Rezeptor in der Basalmembran und nur schwach und membranständig in den Skelettmuskulaturanteilen nachweisbar (Abb. 27b, Detaildarstellung: b').



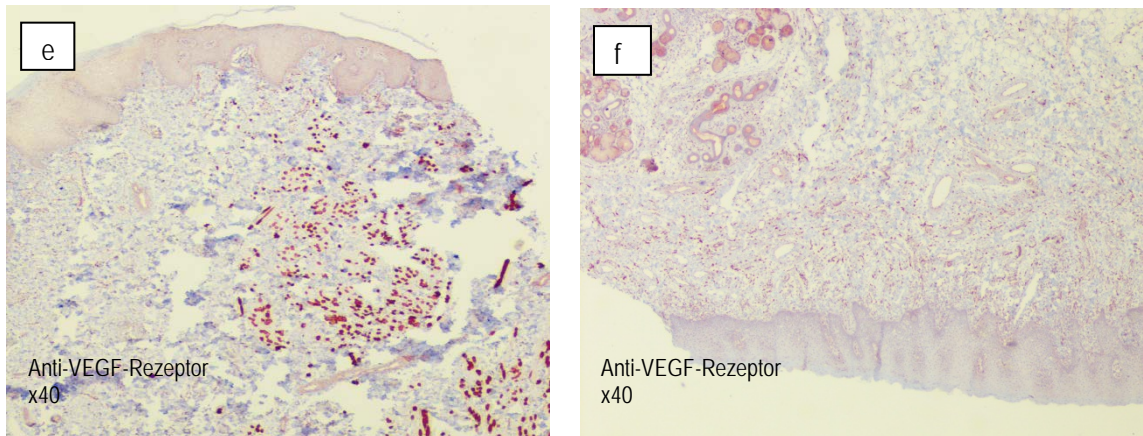


Abb. 27: Immunhistologische Untersuchung von Lippenexzidaten bei Lippenspalten (a, c, e) und normaler Lippenhaut (b, d, f). Die untersuchten Rezeptoren gegen die o.g. Wachstumsfaktoren sind jeweils im Bild angegeben.

Der EGF-Rezeptor (epithelial growth factor) zeigte eine betont positive zytoplasmatische und membranöse Expression entlang der basalen Epithelzelllagen und Keratinozyten in beiden Präparaten (Abb. 27c, d).

Der VEGF-Rezeptor (vascular endothelial growth factor) war in den zytoplasmatischen Anteilen der Skelettmuskulatur in den mesenchymalen Anteilen (Muskulatur) der Lippenspaltpräparate stark positiv nachweisbar, während es bei der normalen Lippenhaut kaum zu einer Reaktion führte (Abb. 27e, f).

Diese Befunde stehen im Einklang mit der Lokalisation der Rezeptoren in der ROI (regio of interest) in den untersuchten Mäusen (Imaroon et al., 1996).

4.4.2 Genexpressionsanalysen der Transportproteine Slc19a1-a3 der Maus

Der Folsäure-Transporter (SLC19A1), der Thiamin-Rezeptor 1 (SLC19A2) und 2 (SLC19A3) stammen alle aus derselben Familie von Transportproteinen. Die Gene, die für diese Transporter kodieren, sind bei Mensch und Maus auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert und sorgen für die aktive Aufnahme von Folsäure und Thiamin in die entsprechenden Gewebe.

Da bei der Analyse der Serum- und Fruchtwasserkonzentrationen bei Muttermäusen von Spaltbetroffenen niedrige Werte für Thiamin und Folsäure im Fruchtwasser auffielen und zudem eine „falsche“ Lokalisation der Transportproteine in der Immunhistochemie nachzuweisen war, wurden diese Transporter auf mRNA-Ebene untersucht. Die sog. Expressionsanalyse hat den Vorteil, dass direkt untersucht werden kann, was die Zelle mit bestimmten Proteinen macht. Veränderungen im Protein, die nicht durch genomische Veränderungen, sondern durch Veränderungen in der Zusammensetzung der mRNA zustande kommen können somit aufgedeckt werden.

Wenn die genetische Information von der DNA in die einsträngige messenger RNA (mRNA) umgeschrieben wird, synthetisiert die RNA-Polymerase ein Pre-mRNA-Molekül, das alle informationstragenden Abschnitte (Exons) und alle Abschnitte ohne Information für die Proteinbildung (Introns) enthält. Dieses Pre-mRNA-Molekül stellt somit eine genaue RNA-Kopie dieses DNA-Abschnittes dar (Transkription). Noch im Zellkern werden die nicht kodierenden Intronbereiche aus diesen RNA-Strängen entfernt und die Exons exakt aneinander gefügt (Spleissen). Nun verlässt die mRNA, deren Sequenz noch aus den Exons besteht, durch die Poren der Kernhülle den Zellkern und wandert ins Zytoplasma, wo an den Ribosomen die Proteine gebildet werden. Veränderungen der m-RNA resultieren somit in einer Veränderung der Proteinstruktur (Berg et al., 2013).

Sequenzanalysen des Slc19a1 (Folat-Transporter)

Der Folat-Transporter (reduced folate transporter, RFT) mit einem full-length-Genom von 2815 bp besteht beim Menschen aus einem Protein von 591 Aminosäuren (Maus: 512 AS). Dieses transmembranöse Protein, welches v.a. in der Plazenta, Leber und in geringerer Konzentration auch in der Lunge nachweisbar ist, bindet selektiv und nicht-kovalent Folsäure bei neutralem pH-Wert und transportiert diese in die Zellen. Dieser Rezeptor hat eine hohe Affinität zu Folat und deren reduzierten Formen.

In den mittels der Primer SCL46a1 fw 112 SCL 46a1 rev 1495 amplifizierten DNA-Produkt des Folatrezeptors (RFC1, reduced folate carrier1) zeigte sich eine Übereinstimmung des Bandenmusters bei Spaltmäusen und gesunden Mäusen. Hier fanden sich 3 Transkriptionsvarianten (Abb. 28).

Nach Analyse der transkribierten m-RNA des Folat-Transporters konnte bei den Mäusen mit (S.M) und ohne Spalte (k.S.M) kein Unterschied in der Sequenz gefunden werden. Es fanden sich drei Splice-Varianten bei ca. 1500 bp, 850 bp und 650 bp, welche ähnlich für den Slc19a1-Rezeptor bei der Ratte beschrieben wurde (Kneuer et al., 2005). Eine spezielle Mutation in dem für diesen Rezeptor-kodierenden Genabschnitt konnte bei der A/WySn-Maus nicht gefunden werden.

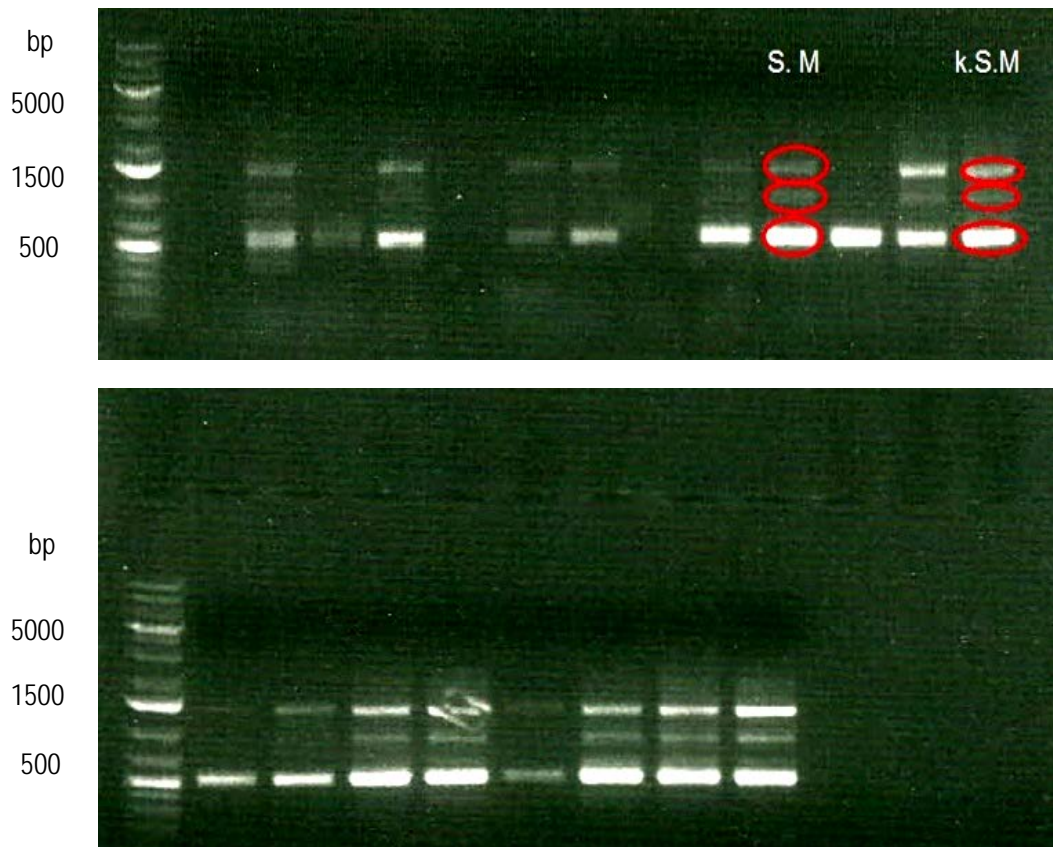


Abb. 28: Expression des Folat-Rezeptors bei allen Mäusen (mit und ohne Spaltbildung).

Sequenzanalysen des Slc19a2 und a3 (Thiamin 1- und Thiamin 2-Transporter)

In allen untersuchten Mäusegruppen (mit und ohne Spalte) konnte das full-length ThTr-2-Amplifikat (Slc19a3 fw973, Slc19a3 rev1596) nachgewiesen werden (Abb. 29). Das für den regulären Thiamin-2 Rezeptor kodierende DNA-Fragment, wies eine Länge von 3.105 bp auf und bestand aus 6 Exons mit 5 bekannten Protein-Transkripten der kodierenden Sequenzen (Abb. 29).

Neben dem full-length Protein (Slc19a3 fw973 und Slc19a3 rev) zeigten sich bei den Spaltmäusen vermehrt eine Splice-Variante, die ein wesentlich kürzeres Fragment von ca. 700 kb aufwies (Abb. 30).

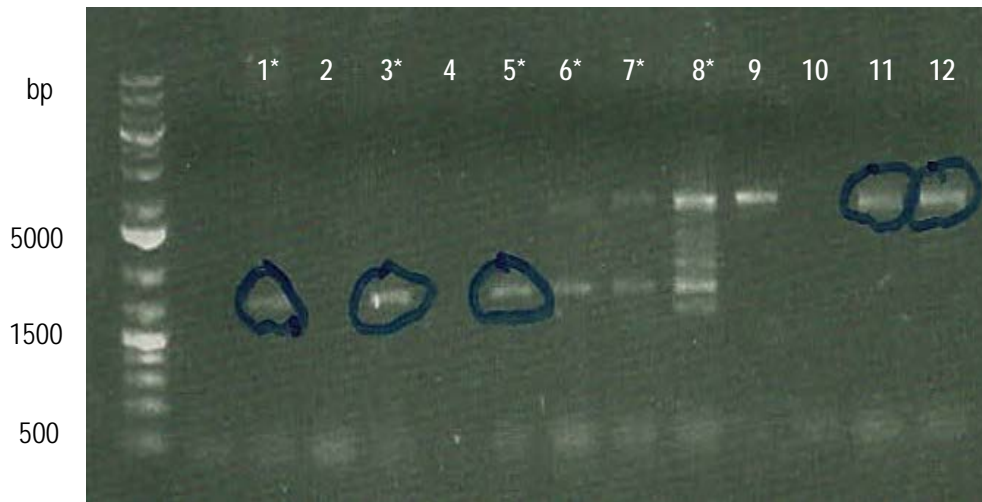


Abb. 29: ThTr-2-Transporter-Splice-Varianten neben der full-length Variante bei den Mäusen mit Spalten (*).

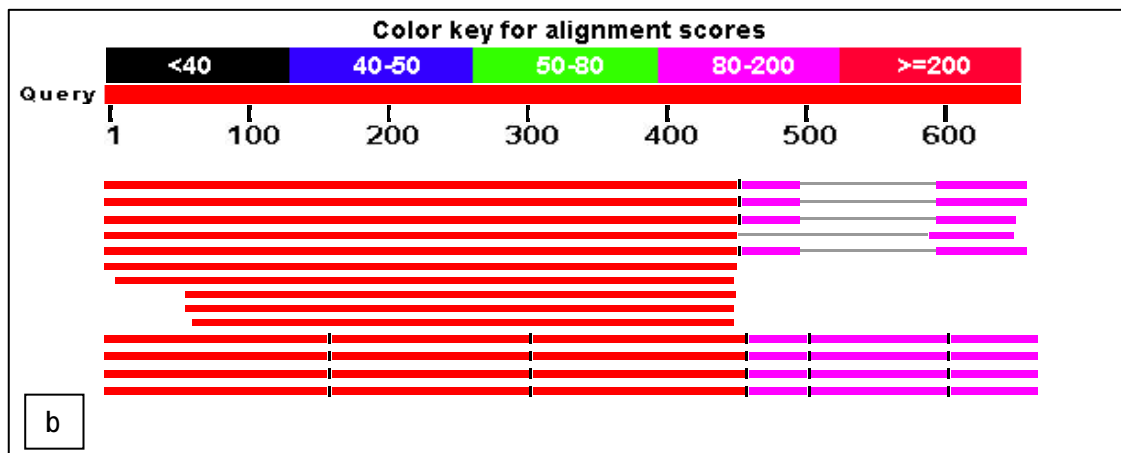
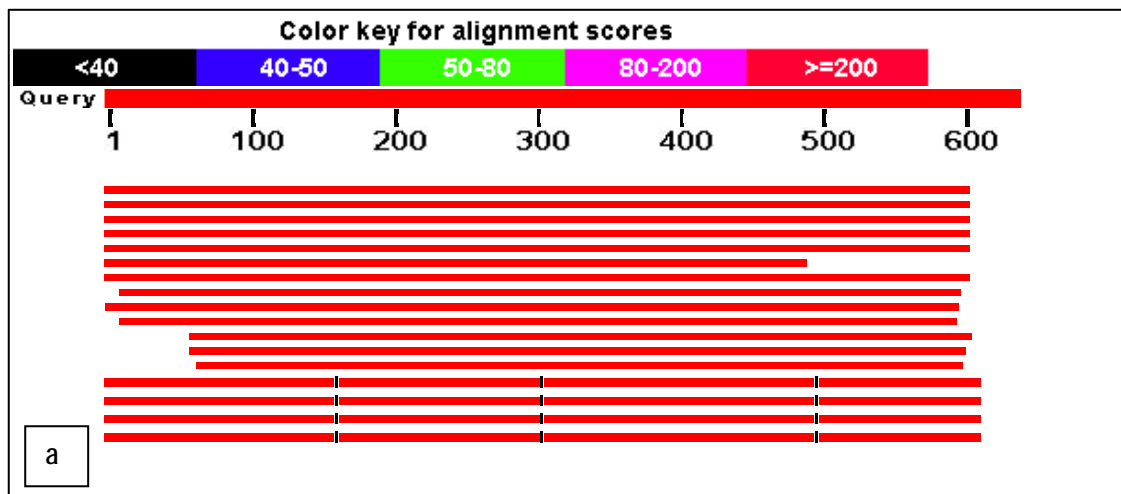


Abb. 30: Full-length Variante des ThTr2-Rezeptors (a) und die kleinere Splice-Variante in einer Maus mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte (b).

Bei der neu entdeckten Splice-Variante des Thiamin 2-Rezeptors zeigte sich, dass ein intronisches Exon (Abb. 31, weiß markiert) in der amplifizierten Sequenz in frame nachweisbar war. Dies führte dazu, dass Exon 1 (gelb) bis zu dem in frame liegende Stop-Codon (AAT) des intronischen Exons (weiß) abgelesen wurde und so zu einer stark verkürzten Variante des Slc19a3-Rezeptors führte. Durch diese Splice-Variante wurden die Sequenz von Exon 2, 3, und 4 ausgespliced und nicht mehr abgelesen.



Abb. 31: Slc19a3-Sequenz einer Spalt-Maus. Exon 1 (gelb) wurde von einem intronischen Exon (weiß) gefolgt.

In 15 untersuchten Mäusefeten (10 mit Spaltbildung und 5 ohne Spaltbildung) zeigte sich deutlich, dass das Auftreten einer Spaltbildung mit dem Auftreten einer Splice-Variante zusammenfällt (Tab. 12).

Tab. 12: Tabellarische Zusammenfassung der auf die Splice-Variante untersuchte Mäuse (n=15).

	Maus mit Spalte		Maus ohne Spalte		insgesamt
Splice-Variante Slc19a3	+	-	+	-	
Anzahl der Mäuse	9	1	0	5	15

5 Diskussion

Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKGS) zählen zu den häufigsten embryonalen Fehlbildungen beim Menschen. Die Inzidenz von LKG-Spalten hat sich in den letzten 100 Jahren in Europa verdoppelt. Lag die Häufigkeit um 1900 noch bei ca. 1:1.700 Geburten, stieg diese im ersten Drittel des letzten Jahrhunderts bereits auf 1:1.000 und zur Jahrhundertwende auf 1:500 (Dixon et al., 2011). Die Gründe für diesen Anstieg sind unklar und werden oftmals durch die Zunahme der Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Säuglinge mit Erreichen der Fortpflanzungsfähigkeit und durch eine stärkere Chemisierung der Umwelt begründet (IPDTC Working Group, 2011; Dixon et al., 2011). Im Jahr 2012 lag die Prävalenz für eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte im Bundesland Sachsen-Anhalt laut Fehlbildungsmonitor mit 23 Lebendgeburten (17 männliche, 8 weibliche) bei 14,7/10.000 Geborenen (1 auf 681) und für eine isolierte Gaumenspalten mit 15 Neugeborenen (6 männliche, 9 weibliche) bei 8,8/10.000 (1 auf 1.135). Hier spiegelt sich auch die bekannte geschlechtsspezifische Verteilung wider (Götz et al., 2012).

Die typische geschlechtsspezifische Verteilung dieser Fehlbildungsformen zeigt ein deutliches Überwiegen der männlichen Neugeborenen bei der schwersten Form der LKGS, der durchgängigen Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalte. Weiterhin sind bis heute linksseitige LKG-Spalten deutlich häufiger vorzufinden als rechtsseitige (Verhältnis 3:1 - 2:1). Bei Mädchen überwiegen stets die Gaumenspalten (IPDTC Working Group, 2011). Welche Bedeutung diese spezifische Geschlechtsverteilung der unterschiedlichen orofazialen Spaltbildungen hat, wird viel diskutiert.

Die Behandlung von Kindern mit dieser angeborenen Fehlbildung ist interdisziplinär und erfordert erfahrene Behandler unterschiedlicher Fachdisziplinen (Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kieferorthopädie, Kinderzahnheilkunde, Genetik, Logopädie) unter der Koordination eines Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen. Viele Eltern reagieren zunächst erschüttert, wenn ihnen ab der 20.Schwangerschaftswoche durch die Pränataldiagnostik mitgeteilt wird, dass ihr Kind eine Spaltbildung im Gesichtsbereich hat (Matthews et al., 1998; Sepulveda et al., 2010).

Die Frage nach der Ursache für eine nicht-syndromale Spaltbildung kann allerdings bis heute nur unzulänglich beantwortet werden (Mossey et al., 2009). Bei erneutem Kinderwunsch steht oftmals die Frage im Vordergrund, was getan werden könnte, um eine weitere Spaltbildung beim nächsten Kind zu vermeiden. Unsere Arbeitsgruppe hat viele Untersuchungsergebnisse aus klinischen und tierexperimentellen Studien durchgeführt, die belegen können, dass eine Vitamin B-Komplex-Prophylaxe in der Frühschwangerschaft einen präventiven Effekt hat (Schubert, 1980; 1982; Schubert et al., 2002; 2006; Scheller et al., 2011; 2013 (a); 2013 (b)).

Diese klinische Prävention mit Vitamin B-Präparaten wird in spaltbelasteten Familien seit 1980 an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit großem Erfolg durchgeführt (Schubert und Krost, 2006). Hierbei wird Müttern, die aufgrund der positiven Familienanamnese ein erhöhtes Risiko für eine Spaltbildung haben, empfohlen, Vitamin B-Komplexpräparate in einer um das 20-fache erhöhten Dosierung (Tabelle 1) schon möglichst zwei Monate vor einer geplanten Schwangerschaft einzunehmen. Nebenwirkungen durch die hohe Dosierung konnten bei unseren Patientinnen und den Kindern nicht beobachtet werden, da aufgrund der Wasserlöslichkeit eine schnelle renale Elimination der nicht speicherbaren B-Vitamine erfolgt. Die oftmals propagierte hochdosierte Einnahme von Multivitaminpräparaten (Tolarova und Harris, 1995; Czeizel, 1993; Itikala et al., 2001) wurde an unserer Klinik aufgrund des schon lange bekannten teratogenen Potentials von Vitamin A nicht durchgeführt (Godman, 1984; Lammer et al., 1985).

In der Literatur finden sich allerdings viele Untersuchungen, die eine präventive Wirkung von Folsäure und Multi-Vitamin-Präparaten auf die Entstehung von LKGS propagieren. Vielen dieser Studien mangelt es leider an einem eindeutigen Studiendesign und die Aussage ist aufgrund der geringen Anzahl der beteiligten Patienten insuffizient (Czeizel, 1993; Tolarova und Harris, 1995). Johnson und Little (2008) berichteten von einem Rückgang der Prävalenz von 25% durch Einnahme von Multi-Vitamin-Präparaten in einer aktuellen Meta-Analyse, während ältere Studien keine signifikanten Ergebnisse diesbezüglich liefern konnten (Botto et al., 2002; Czeizel, 1993; Itikala et al., 2001).

Folsäure-Substitution während der Schwangerschaft hat eine eindeutig präventive Wirkung auf die Entstehung von Neuralrohrdefekten. Inwiefern diese präventive Wirkung auch auf die Verhinderung von LKGS zutrifft ist bis heute nicht vollständig geklärt (Ulrich et al., 1999; Hernández-Díaz et al., 2000). Interessant scheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass Folsäuremangel bei Tieren LKGS hervorrufen kann und Folsäure-Antagonisten beim Menschen mit einem erhöhten Risiko von LKGS einhergehen (Hernández-Díaz et al., 2000).

Die Untersuchungen der Hallenser Arbeitsgruppe waren seit langem auf die weitere experimentelle Fundierung dieser über Jahrzehnte empirisch begründeten Prävention gerichtet (Schubert, 1980; Schubert, 1982; Raupach, 1987; Schubert et al., 1990; Dostal und Schubert, 1990; Schubert et al., 2002; Schubert und Krost; 2006). Darauf aufbauend sind die eigenen Versuche als Beitrag zum Themenkomplex „Prävention und Wirkmechanismus“ zu verstehen, in der modernere experimentelle Methoden eingesetzt wurden, die erst in den letzten zur Verfügung standen.

Tierversuche an der AB/Jena-Maus konnten zeigen, dass bei Verabreichung eines Teratogens (Cyclophosphamid, Dexamethason) signifikant mehr lebende weibliche Feten geboren wurden. Unter Standardbedingungen sollte das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Nachkommen aber bei 1:1

liegen (Staats, 1985). Weibliche und männliche Feten waren allerdings von der Spaltbildung des sekundären Gaumens prozentual in Ihrer Geschlechtsgruppe gleich häufig betroffen. Diese Beobachtung widerspricht den beim Menschen gefundenen Verteilungen, die eindeutig eine Dominanz des weiblichen Geschlechts bei der Gaumenspalte und des männlichen Geschlechts bei der schwereren Form der Spaltbildung, der Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, aufweisen (Mossey et al., 2009). Aufgrund des hohen Anteils an Gaumenspalten unter den männlichen Nachkommen muss hier ebenfalls von einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Teratogen ausgegangen werden. Ebenso findet man beim Menschen eine deutlichere Dominanz männlicher lebender Säuglinge nach Geburt, die in den teratogenen Untersuchungsreihen der AB/Jena-Maus auch nicht beobachtet werden konnte. Hier scheinen bei den hohen postimplantären Verlusten nach Teratogen-Gabe, mehr männliche Individuen betroffen zu sein und das ungleiche Verhältnis zwischen lebenden weiblichen und männlichen Feten zu begründen. Bei der genetisch determinierten A/WySn-Maus konnte dieser Unterschied nicht gefunden werden, was wiederum darauf schließen lässt, dass männliche Embryonen sensibler und stärker auf Teratogene reagieren als weibliche.

Aufgrund dieser tierexperimentellen Ergebnisse, die eindeutig eine positive Wirkung der Vitamin B-Verabreichung belegten, stellte sich nun die Frage welcher Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegen könnte. Voruntersuchungen belegten eine Wachstumsbeschleunigung der Mäuseembryonen mit einer Verkürzung der kritischen Phase der Gaumenentwicklung durch eine hohe Vitamin B-Komplex Substitution (Raupach, 1987; Schubert et al., 1990).

In einem Organkulturmodell sollte ein möglicher Unterschied in der Entwicklung des sekundären Gaumens bei einer sich normal entwickelnden Maus (NMRI) und einer Maus mit einer hohen spontanen Spaltbildungsrate (A/WySn-Maus) untersucht werden.

Hier zeigte sich deutlich, dass bei der genetisch determinierten A/WySn-Maus ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Gaumenfortsätze im Vergleich zur NMRI-Maus vorlag (Scheller et al., 2011). Dies entsprach den Untersuchungen von Syska et al. (2004), der dieses verlangsamte Gaumenwachstum in der A/WySn-Maus und AB/Jena-Maus *in vivo* schon nachweisen konnte. Zusätzlich konnte in diesen von Syska et al. (2004) durchgeführten Untersuchungen dargestellt werden, dass es möglich war, die Gaumenentwicklung *in vivo* durch die Verabreichung von B-Vitaminen bei der AB/Jena-Maus zu beschleunigen.

Diese Beobachtungen führten dazu, eine mögliche positive Beeinflussung des sekundären Gaumenwachstums durch die direkte Wirkung von B-Vitaminen auf die Organoberfläche zu untersuchen, wofür die Organkultur hervorragend geeignet ist. Natsume et al. (1998) hatten bereits eine direkte positive Wirkung verschiedener Vitamin-, Folsäure- und β -Carotin-Derivate auf die Fusion des sekundären

embryonalen Gaumens des A/J-Mäusestamms *in vitro* beschrieben. Durch direkte Zugabe des Polyvitamin B-Präparates Polybion®N (Merck, Deutschland) in das Medium konnte das Wachstum der sekundären Gaumenfortsätze im Organkulturmodell der A/WySn-Maus schon ab einer Dosierung von 0,1% signifikant gesteigert werden (Scheller et al., 2013a). Der direkte Kontakt der Vitamin B-Präparate mit der Gewebeoberfläche des sekundären Gaumens könnte in diesen Untersuchungen der ausschlaggebende Grund für das fortschreitende Wachstum der Gaumenfortsätze in der Organkultur sein. Ohne Vitamin B-Zusatz in der Kontrollgruppe war bei der genetisch determinierten A/WySn-Maus, im Gegensatz zu der sich normal entwickelnden NMRI-Maus, kein Wachstum eingetreten.

Trotz der guten Eignung dieses Modells für die Untersuchung von exogenen Einflüssen auf ein sich entwickelndes Organsystem, muss doch bedacht werden, dass die Entwicklung der Gaumenfortsätze in diesem Organkulturmodell der A/WySn-Maus auf ungefähr 13% reduziert ist (Erfani et al., 2001; Scheller et al., 2011), während bei diesem -Mäusestamm *in vivo* eine Rate von 50-65% beschrieben wird (Hallgrímsson et al., 2004; Syska et al., 2004). Dieser doch beträchtliche Unterschied zwischen dem Organkulturmodell und dem lebenden Tiermodell wird v.a. durch die traumatische Prozedur des Präparierens bei der Herstellung der Organkultur verursacht. Bei den von vornherein schon zum Entnahmezeitpunkt kleineren A/WySn-Mäusen kommt diese Prozedur des Präparierens wahrscheinlich auch stärker zum Tragen, und resultiert in einem noch stärkeren negativen Effekt bei der Entwicklung der Gaumenfortsätze in der Organkultur. Somit sind die positiven Ergebnisse durch die Stimulation des Wachstums mit Polyvitamin-Präparaten bei diesem Mäusestamm umso überzeugender.

Diese Untersuchungen führten zu weiteren Überlegungen über die spezifische Verteilung der B-Vitamine im Fruchtwasser und Serum von Muttermäusen mit und ohne Feten mit LKG-Spalten in der Nachkommenschaft. Diese Untersuchungen wurden nun deshalb durchgeführt, da davon ausgegangen wurde, dass im Fruchtwasser befindliches Vitamin, wie das zugesetzte in der Organkultur, direkt auf die wachsenden Strukturen einwirken und diese positiv beeinflussen kann. Zudem findet sich bisher zu dieser Fragestellung noch keine Untersuchung in der Literatur.

Bei den laborchemischen Untersuchungen konnte ein deutlicher Unterschied in der Konzentration verschiedener B-Vitamine zwischen Muttertieren mit und ohne Spaltfeten in der Nachkommenschaft gefunden werden. So war die Fruchtwasser-Konzentration von Thiamin (B1), Panthothensäure (B5) und Folsäure (B9) bei Müttern mit Spaltkindern signifikant niedriger als bei Müttern mit gesunden Nachkommen. Lediglich bei Thiamin (B1) war auch der Serumspiegel bei den Muttermäusen mit Spaltkindern signifikant niedriger (Scheller et al., 2013b), was auf Störung der Aufnahme von Vitamin B1 bei Müttern mit Spaltkindern und Nachkommen mit einer Spaltbildung hindeuten könnte.

Die bekannte generalisierte Wachstumsretardierung der A/WySn-Mäuse-Feten (Juriloff et al., 2001; Juriloff und Harris, 2008), die beschriebene Verzögerung des Wachstums des sekundären Gaumens und die vermehrte Entstehung von LKG-Spalten kann damit im Zusammenhang stehen und eine fehlende Wachstumsstimulation mit verursachen (Juriloff, 1982; Syska et al., 2004). Betrachtet man klinische sowie tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten, so zeigen diese deutlich, dass ein Thiaminmangel während der Schwangerschaft auch zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung der Feten dieser Spezies führt (Röcklein et al., 1985; Heinze und Weber, 1990; Buttherworth et al., 1993). Spezielle Hinweise auf eine erhöhte LKGS-Spaltrate durch Thiaminmangel fanden sich in diesen tierexperimentellen Untersuchungen allerdings nicht.

Stimuliert durch die positiven experimentellen Ergebnissen aus der Organkultur und den Untersuchungen der Vitamin B-Verteilungen im Serum und im Fruchtwasser erfolgte nun die spezifische Gabe von Vitamin B1 in einer deutlich erhöhten Dosis an die genetisch prädisponierten A/WySn-Mäuse. Der positive Effekt dieser Medikation hinsichtlich der Reduktion der Spalthäufigkeit bei teratogen induzierten Spaltformen (v.a. Gaumenspalten) war schon hinlänglich beschrieben worden (Drostal und Schubert, 1990) und sollte nun in diesem genetisch determinierten Mäuse-Modell untersucht werden. Die stark erhöhte Dosis des Thiamins, die den A/WySn-Muttermäusen verabreicht wurde, entsprach im Verhältnis annähernd derjenigen, die im klinischen Alltag den Müttern mit erhöhtem Risiko für eine Spaltbildung als Prophylaxe verabreicht wird (Schubert und Krost, 2006). Bei der genetisch determinierten A/WySn-Maus zeigte sich allerdings kein positiver Effekt hinsichtlich der Reduktion der Spaltfrequenz oder einer Abschwächung des Phänotyps beiden Nachkommen. Es fand sich somit durchweg annähernd der gleiche Prozentsatz an Spaltbildungen in allen Substitutionsgruppen. Ähnliche Beobachtungen waren schon beschrieben worden und legten somit die Vermutung nahe, dass genetisch determinierte, nicht-syndromale Spaltbildungen eine so stabile Störung darstellen, dass sie durch die orale Vitamin B-Gabe nicht positiv zu beeinflussen sind (Schubert et al., 2002). Die aktuellen Ergebnisse bestätigen dies.

Da davon ausgegangen wurde, dass das im Fruchtwasser befindliche Vitamin B1, wie in der Organkultur, direkt auf die wachsenden Strukturen einwirken kann, wurde versucht dieses oral zu substituieren, um den Serum- und Fruchtwasserspiegel anzuheben. In den Fütterungsversuchen mit hochdosiertem Vitamin B1 konnte der Serum-Wert des Thiamins in den substituierten Gruppen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant erhöht werden. Die niedrigen Fruchtwasserkonzentrationen waren aber trotzdem nicht ausgeglichen. Im Vergleich zu den Thiamin-Werten der A/WySn-Muttermäuse, die nur Nachkommen ohne Spaltbildung hatten, war der Wert im Fruchtwasser allerdings bei allen in diesem Versuch untersuchten Mäusen immer noch signifikant niedriger (Scheller et al., 2013b). Zu berücksichtigen bleibt in diesem Zusammenhang, dass keine einzige Muttermaus bei den Fütterungsversuchen einen Wurf ohne

Spaltbildung hatte und somit im Durchschnitt generell niedrigere Thiamin-Werte im Fruchtwasser zu erwarten gewesen waren.

Die niedrige Fruchtwasserkonzentration bei Muttermäusen mit Spaltbetroffenen, die sich durch orale Substitution auch nicht ausgleichen ließ, legte die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein spezifisches Aufnahmeproblem dieser Subgruppen handeln könnte. Betrachtet man den Thiamintransport nach oraler Aufnahme durch den Darm, so passiert dieser beim Menschen und auch Nagern auf zweierlei Weise: Bei niedrigen und physiologischen Konzentrationen erfolgt die Thiaminabsorption durch einen aktiven Transportmechanismus (Thiamintransporter-2), während bei hoher Konzentration der Transport über die Darmmukosa passiv entlang des Konzentrationsgefälles erfolgt (Hoyumpa et al., 1975; 1982). So war bei der A/WySn-Maus das wasserlösliche Thiamin, nach der hochdosierten Fütterung, aufgrund des hohen intestinalen Wertes anhand des Konzentrationsgefälles durch den passiven Transport, unter Umgehung des aktiven Transports über den Thiamin-2-Rezeptor, ins Serum der Muttermäuse gelangt.

Trotz der höherer Thiamin-Werte im Serum nach Substitution war es dennoch zu keiner Erhöhung der Thiamin-Konzentration im Fruchtwasser gekommen. Allerdings ist hierfür eine Besonderheit im Transportmechanismus des Thiamins verantwortlich. Der Transport des Thiamins durch die Plazenta ist dem durch die Mukosa des Darmes nicht gänzlich gleichzusetzen, da dieser eben v.a. durch den aktiven Transport über den Thiamintransporter 2 (ThTr-2) erfolgt. Eine passive Erhöhung des Thiamin-Gehalt im Fruchtwasser durch Diffusion, wie er für die Aufnahme aus dem Darm beschrieben ist, existiert hier offensichtlich nicht. Der vergleichsweise niedrige Wert im Fruchtwasser der Muttermäuse mit Spalt-Nachkommen lässt sich somit nur durch einem gestörten aktiven Transportmechanismus (ThTr-2) des Thiamins ins Fruchtwasser erklären (Schenker et al., 1990; Rindi und Laforenza, 2000; Ganapathy et al., 2003; Zhao und Goldman, 2013). Die Veränderung der Funktion des Transportproteins für Thiamin (ThTr-2) durch die Plazentaschranke wäre eine mögliche Ursache hierfür.

Der Thiamin- als auch der Folat-Rezeptor gehören beim Menschen zur SLC19 Gen-Familie (Maus: Slc19a1-a3) welche aus drei unterschiedlichen transmembranösen Transporter-Proteinen SLC19A1-A3 besteht (Ganapathy et al., 2003). Trotz ausgeprägter Ähnlichkeiten in Ihrer Struktur bestehen im spezifischen Transportmechanismus der drei Proteine eindeutige Unterschiede (Zhao und Goldman, 2013). Die beiden Thiamintransporter ThTr1 und ThTr2 besitzen eine zu 48% genetische Identität und transportieren, trotz hoher Homologie von ca. 40% zu dem Folattransporter SLCA1, kein Folat. Während der ThTr1-Transporter v.a. im Skelettmuskel zu finden ist und dort die aktive Aufnahme von Thiamin in die Zellen regelt, findet sich der ThTr2-Transporter v.a. im Duodenum und der Plazenta (Dutta et al., 1999; Said et al., 2004).

Aufgrund der inadäquaten Thiaminaufnahme ins Fruchtwasser und der dort stark erniedrigten Werte von Muttermäusen mit Spaltkindern erfolgten immunhistochemische Untersuchungen, um die Rezeptorexpression des ThTr-1 Transporters in den betroffenen Abschnitten des Mittelgesichts und der Plazenta von betroffenen Mäusen und phänotypisch gesunden Nachkommen zu analysieren. Die immunhistochemischen Analysen von koronaren Mittelgesichtsschnitten der A/WySn-Maus zeigten bei Spaltmäusen eine stark ausgeprägte zytoplasmatische Lokalisation des ThTr-1-Transporters in der Muskulatur des Mittelgesichts. Diese war nicht zu erwarten, da der transmembranöse Rezeptor, bei Verwendung eines Antikörpers, der nur den extrazellulären Anteil des Transporters nachweisen soll, eigentlich nur in der Zellmembran nachweisbar sein sollte (Dutta et al., 1999). Dieses Expressionsmuster zeigte sich analog auch in menschlichen Präparaten aus dem Spaltbereich von betroffenen Kindern. Die Befunde können dahingehend interpretiert werden, dass in Spaltfeten ein hoher Bedarf an Vitamin B1 besteht, der durch ein reaktives Ansteigen des Rezeptors kompensiert werden soll. Inwiefern die „falsche“ Lokalisation durch ein möglicherweise insuffizientes Transportprotein verursacht ist und mit einer reduzierten Aufnahme von Thiamin in die Zellen ebenfalls zu einem kompensatorischen Anstieg der Expression führt, bleibt zu untersuchen.

Die Verteilung der Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren EGF war vor allem in den epithelialen Strukturen der Lippenresektate nachweisbar (Iamaroon et al., 1996). Der VEGF-Rezeptor war stark in den zytoplasmatischen Anteilen der Skelettmuskulatur der mesenchymalen Anteile (Muskulatur) der Lippenspaltpräparate nachweisbar, während es bei der normalen adulten Lippenhaut kaum zu einer Reaktion führte. Dies zeigt, dass bei der Spaltbildung in der Lippe nicht nur von einem vaskulären Problem ausgegangen werden muss.

Auch bei Untersuchungen zur Thimain-2-Transporterlokalisierung in der Plazenta von A/WySn-Mäusen mit Spaltbildung zeigte sich die untypische zytoplasmatische Lokalisation des Transportproteins ThTr-2, die bei den phänotypisch gesunden Nachkommen nicht auffindbar war (Schenker et al., 1990; Ganapathy et al., 2003).

Aufgrund der Ergebnisse zur Thiamin-Verteilung im Serum und Fruchtwasser von Muttermäusen und dem immunhistochmischen Nachweis einer untypischen Lokalisation der Thiaminrezeptoren wurden Untersuchungen auf molekularer Ebene angeschlossen.

Es wurde bei Muttermäusen mit und ohne Spaltkinder die mRNA-Expression des Thiamin 2-Transporters untersucht. Hier konnte bei den Spaltmäusen des A/WySn-Stammes erstmals eine neue Splice-Variante des Thiamin 2-Transportproteins (ThTr2, Scl19a3) isoliert werden. Diese Splice-Variante lieferte durch eine interne Leserasterverschiebung ein viel kürzeres, funktionsunfähiges Transportprotein. Durch Einspleisen eines intronischen Exons hinter Exon 1, mit einem in-frame gelegenen Stopp-Codon, führte

das beim Ablesen der Sequenz dazu, dass Exon 2, 3 und 4 ausgespliced wurden und nur noch Exon 1 mit einem kleinen Anteil des Introns bis zum Stopp-Codon (TTA) erhalten blieb. Inwieweit diese Splice-Variante des Thiamin2-Transportproteins bei den Spaltmäusen zu einem funktionsunfähigen Protein führt, sollte noch im Weiteren anhand von Expressionsanalysen und spezifischen Proteinmethoden (Western-Blot-Analysen) untersucht werden.

Die neu entdeckte Splice-Variante des Thiamin-2-Transporters scheint also eine mögliche Ursache für die erniedrigte Fruchtwasserkonzentration von B1 bei genetisch determinierter Spaltbildung zu sein, da die Thiaminaufnahme ins Fruchtwasser durch die Plazenta hauptsächlich aktiv über diesen Transportmechanismus erfolgt (Hoyumpa et al., 1975; Schenker et al., 1990). Durch diese niedrigen Thiaminwerte im Fruchtwasser ist die direkte Wirkung auf die wachsenden kraniofazialen Strukturen nicht gegeben. Über mögliche Konsequenzen dieser neuen Erkenntnisse darf spekuliert werden.

6 Zusammenfassung

Die interdisziplinäre Behandlung und kontinuierliche Betreuung von Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten steht im zentralen Aufgabenfeld der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. Die heutigen Behandlungsmethoden versprechen eine gute Rehabilitation und Eingliederung der Patienten in die Gesellschaft. Wäre es allerdings möglich, die Fehlbildung, die mit einer Wahrscheinlichkeit von annähernd 1:500 Geburten in Europa eine der häufigsten Fehlbildungen beim Menschen ist, in ihrer Entstehung zu verhindern, wäre dies eine fantastische Option für betroffene Familien. Ganz abgesehen von dem hohen ökonomischen Aufwand zur Behandlung der Betroffenen.

Experimentelle Studien konnten die Wirksamkeit von Polyvitamin B-Präparaten zur Reduktion der Spaltrate bei Verabreichungen von Teratogenen im Tierversuch („reduction of occurrence“) und in empirisch klinischer Anwendung bei betroffenen Familien („reduction of recurrence“) bestätigen (Tolarová und Harris, 1995; Schubert et al., 2002; Schubert und Krost, 2006).

Die Wirkungsweise der Prophylaxe ist bis heute weiterhin unklar (Mossey et al., 2008; Dixon et al., 2011), zudem auch keine eindeutige Spaltätiologie erkennbar ist. Die positive Wirkung der Vitamin B1-Gabe zur Verhinderung von teratogen bedingten LKGS war in unseren Untersuchungen nicht geschlechtsabhängig. Insgesamt fanden sich allerdings signifikant mehr reife weibliche, als männliche Feten in der Nachkommenschaft. Bei einer beschriebenen Geschlechtsverteilung von 1 : 1 bei der AB/Jena-Maus spricht dies dafür, dass männliche Embryos bei der Verabreichung von Teratogenen schon gehäuft intrauterin sterben (Staats, 1985), also anfälliger auf die embryotoxische Wirkung des Teratogens reagieren. Hierfür besteht eine gewisse Analogie zum Menschen. Weibliche Feten scheinen stabiler gegenüber schädlichen Einflüssen, Knaben sind öfters von Spalten betroffen. Bei der genetisch determinierten Spaltbildung in der A/WySn-Maus war allgemein keine signifikante Reduktion der Spaltrate durch die hochdosierte Gabe von Thiamin gefunden worden, und männliche und weibliche Individuen waren gleich häufig von dieser Fehlbildung betroffen. Insgesamt lassen sich also in den experimentellen Ergebnissen keine signifikanten Hinweise auf einen geschlechtsabhängigen Wirkmechanismus der Prävention belegen.

Eine Beschleunigung des embryonalen Gesichtswachstums und damit eine Verkürzung der sensiblen Phase der kraniofazialen Entwicklung ist ein möglicher Mechanismus der prophylaktischen Wirkung von B-Vitaminen (Raupach, 1987; Schubert et al., 1990; Natsume et al., 1998; Scheller et al., 2011; 2013a). Untersuchungen in Organkulturen belegten das stark verzögerte Wachstum des sekundären Gaumens der spaltsensiblen A/WySn-Maus im Vergleich zur spaltresistenten NMRI-Inzucht-Maus (Scheller et al., 2011). Hier konnte eine signifikante Beschleunigung der Wachstumsvorgänge des sekundären Gaumens der A/WySn-Maus durch die Verabreichung eines Polyvitamin B-Präparates (Polybion N®) ab einer 0,1%-igen Konzentration im Medium erreicht werden. Hier liegt ein Schwellenwerteffekt vor und jede weitere

Steigerung der Konzentration, z. Bsp. auf 1,0%, erbrachte keinen weiteren Nutzen (Scheller et al., 2011). Diese Ergebnisse beweisen eine direkte Beeinflussungsmöglichkeit des embryonalen Gesichtswachstums durch das Polyvitamin B-Präparate, ohne sich zunächst in einer phänotypischen Reduktion der Spalttrate bei diesen Mäusen bemerkbar zu machen.

Hinweise auf eine Rolle der B-Vitamine zeigten auch Untersuchungen der Serum und Fruchtwasserkonzentration. Eindeutig erniedrigte Spiegel für Thiamin (im Serum und Fruchtwasser), Panthothensäure und Folsäure (jeweils nur im Fruchtwasser) von Muttermäusen mit Spaltkindern sind der Beweis (Scheller et al., 2013b).

In Verbindung damit erfolgten immunhistologische Untersuchungen koronarer Schnitte durch das Mittelgesicht von Mäusefetten mit und ohne LKG-Spalten. Hier konnte eine starke Expression des Thiaminrezeptors-1 (ThTr1) im Zytoplasma der Skelettmuskulatur der Mäuse mit Spaltbildung gefunden werden. Bei normaler transmembranöser Lokalisation des Rezeptors wird dieses Expressionsmuster in der Immunhistologie als kompensatorische Überexpression einerseits aufgrund einer möglichen Funktionsstörung, andererseits veranlasst durch die niedrige Fruchtwasser-Konzentration von Thiamin interpretiert. Vergleichende Untersuchungen von Lippenexzidaten von Kindern mit Lippenspalten (LKS, LKGS) zeigten analog diese ungewöhnliche zytoplasmatische Expression des Thiamin-1-Transporters (ThTr1) in der Skelettmuskulatur. Die verminderte zelluläre Aufnahme von Thiamin in die Skelettmuskelzellen, die einerseits durch das „falsch lokalisierte“ Transportprotein und andererseits durch die niedrige Fruchtwasserkonzentration bedingt sein mag, mag somit zu dieser starken Überexpression im Zytoplasma des Skelettmuskels geführt haben. Die damit verbundene schlechtere zelluläre Utilisation von B1 könnte mit einer Wachstumshemmung des Mesenchyms (Skelettmuskelzellen) einhergehen und wird so auch die „Wanderung“ des Mesenchyms vor Fusion der embryonalen Gesichtswülste verhindern. In der Kontrolle (gesunde Lippenhaut) war dieses Transportprotein für Thiamin in der Basalmembran dagegen membranständig nachweisbar. Die weiter untersuchten Rezeptoren für andere Wachstumsfaktoren zeigten keine spezifischen Auffälligkeiten für EGF. Für VEGF allerdings konnte eine starke Expression in den mesenchymalen Strukturen gezeigt werden. Gegenwärtig können diese Ergebnisse allerdings noch nicht interpretiert werden.

Aufgrund der niedrigen Konzentrationen von Folat und Thiamin im Fruchtwasser von Muttermäusen mit Spaltfetten lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein Transportproblem handeln könnte. Expressions-Analysen auf mRNA-Niveau konnten bei dem Folattransporter (Slc19a1) keine Auffälligkeiten zeigen. Beim Thiamintransporter-2 (Slc19a3) hingegen, der hauptsächlich für den aktiven Transport von Thiamin über die Plazenta verantwortlich ist, fand sich eine neue Splice-Variante des Transportproteins direkt nur bei Spaltfetten. Diese führt zur Bildung eines kleineren, funktionslosen Transportproteins und kann für die in der Immunhistologie gefundene „falsche“ zytoplasmatische Lokalisation des eigentlich transmembranös verankerten Proteins verantwortlich sein. Die Veränderung des Thiamintransporters-2 kann eventuell

durch eine Funktionseinschränkung für die niedrige Fruchtwasserkonzentration von Thiamin verantwortlich sein, da der Transport von Thiamin durch die Plazenta v.a. aktiv durch diesen Transporter erfolgt. Somit kann durch die niedrige Fruchtwasserkonzentration keine lokale, positive Wirkung von Thiamin auf die Embryonalentwicklung des Gesichtes erfolgen.

Zusammenfassend konnte durch logische Fortführung der experimentellen Untersuchungen zur Wirkweise der Vitamin B-Gabe mit dem Ziel der Spaltprävention und konsequentes, jeweils auf Vorversuche aufbauendes Versuchsdesign, ein neuer Mechanismus der Verteilung von Thiamin bei Spaltindividuen und Muttertieren entdeckt werden. Dieser erklärt durch seine Veränderung die Rolle dieses B-Vitamins in der Spaltgenese und folglich auch der Prävention, nicht jedoch die der Folsäure. Diese Ergebnisse sind somit klare Unterstützung und schlüssiger Baustein für das Konzept der klinischen Prävention mit Thiamin und B-Komplexvitaminen, wie es in Halle seit Jahrzehnten verfolgt wird.

7 Literaturverzeichnis

1. Abbott B. Effects of methanol on embryonic mouse palate development in serum-free organ culture. *Teratology*. 1994, 49:122-134.
2. Ain R, Canham LN, Soares MJ. Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *J Endocrinol*. 2005, 185:253-263.
3. Al-Obaidi N, Kastner U, Merker HJ, Klug S. Development of a suspension organ culture of the fetal rat palate. *Arch Toxicol*. 1995, 69:472-479.
4. Biddle FG, Fraser FC. Genetics of cortisone-induced cleft palate in the mouse-embryonic and maternal effects. *Genetics*. 1976, 84:743-754.
5. Bienengraber V, Malek FA, Möritz KU, Fanghänel J, Gundlach KK, Weingärtner J. Is it possible to prevent cleft palate by prenatal administration of folic acid? An experimental study. *Cleft Palate Craniofac J*. 2001, 38:393-398.
6. Botto LD, Erickson JD, Mulinare J, Lynberg MC, Liu Y. Maternal fever, multivitamin use, and selected birth defects: evidence of interaction? *Epidemiology*. 2002, 13:485-488.
7. Butterworth RF. Maternal thiamine deficiency. A factor in intrauterine growth retardation. *Ann N Y Acad Sci*. 1993, 678:325-329.
8. Carter CO. Genetics of common single malformations. *Br Med Bull*. 1976, 32:21-26. Review.
9. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987, 162:156-159.
10. Christensen K, Fogh-Andersen P. Cleft lip (+/- cleft palate) in Danish twins, 1970-1990. *Am J Med Genet*. 1993, 47:910-916.
11. Czeizel AE. Prevention of congenital abnormalities by periconceptional multivitamin supplementation. *BMJ*. 1993, 306:1645-1648.
12. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2011, 12:167-178. Review.
13. Dostal M, Schubert J. Further studies on protective effects of vitamins in cyclophosphamide-induced cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1990, 19:308-311.
14. Douglas B. The role of environmental factors in the etiology of so-called congenital malformations. II. Approaches in humans; study of various extragenital factors; theory of compensatory nutrients, development of regime for first trimester. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull*. 1958, 22:214-229.
15. Dutta B, Huang W, Molero M, Kekuda R, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V, Prasad PD. Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J Biol Chem*. 1999, 274:31925-31929.

16. Erfani S, Maldonado TS, Crisera CA, Warren SM, Lee S, Longaker MT. An in vitro mouse model of cleft palate: defining a critical intershelf distance necessary for palatal clefting. *Plast Reconstr Surg.* 2001, 108:403-407.
17. Falconer DS. *Introduction to quantitative Genetics.* 1981, 2nd ed., Longman, London.
18. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003, 9:669-676.
19. Fraser CF. Evolution of palatable multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet.* 1980, 23:796-813.
20. Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch.* 2004, 447:641-666. Review
21. Gassmann, B. Elevated dosages of vitamins. Benefits and Hazards. *Food / Nahrung.* 1990, 34:107.
22. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Engl J Med.* 1984, 310:1023–1031.
23. Götz D, Hoyer-Schuschke J, Köhn A, Reißmann A, Spillner C, Vogt C. Jahresbericht des Bundeslandes Sachsen-Anhalt zur Häufigkeit von congenitalen Fehlbildungen und Anomalien sowie genetisch bedingten Erkrankungen 2012, Fehlbildungsmonitoring Sachsen-Anhalt an der Medizinischen Fakultät der Otto-Guericke-Universität Magdeburg. 2013:41-42.
24. Grimm U, Brömmel C, Külbelp. Transketolase activity as a parameter for the vitamin B1 provision in some dermatoses (herpes zoster, psoriasis, drug eruptions, excema, and urticarial). *Dermatol Monatsschr.* 1978, 164:715-719.
25. Gritti-Linde A. Molecular control of secondary palate development. *Dev Biol.* 2007, 301:309-326.
26. Gritti-Linde A. The mouse as a developmental model for cleft lip and palate research. *Front Oral Biol.* 2012, 16:32-51.
27. Gundlach KK, Abou Tara N, von Kreybig T. Animal experimental results on the etiology and prevention of facial clefts and other craniofacial anomalies. *Fortschr Kieferorthop.* 1986, 47:356-361.
28. Hallgrímsson B, Dorval CJ, Zelditch ML, Geran RZ. Craniofacial variability and morphological integration in mice susceptible to cleft lip and palate. *J Anat.* 2004, 205:501-517.
29. Heinze T, Weber W. Determination of thiamine (vitamin B1) in maternal blood during normal pregnancies and pregnancies with intrauterine growth retardation. *Z Ernährungswiss.* 1990, 29:39-46.
30. Hernández-Díaz S, Werler MM, Walker AM, Mitchell AA. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med.* 2000, 30:1608-1614.
31. Hintz JA, Lindner H. Familienuntersuchungen am Spaltträgerkrankengut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter besonderer Berücksichtigung sogenannter Mikrosymptome bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. 1987, Halle/ Saale Med. Fak. Diss..
32. Hoyumpa AM Jr, Middleton HM 3rd, Wilson FA, Schenker S. Thiamine transport across the rat intestine. I. Normal characteristics. *Gastroenterology.* 1975, 68:1218-1227.
33. Hoyumpa AM Jr, Strickland R, Sheehan JJ, Yarborough G, Nichols S. Dual system of intestinal thiamine transport in humans. *J Lab Clin Med.* 1982, 99:701-708.

34. Iamaroon A, Tait B, Diewert VM. Cell proliferation and expression of EGF, TGF-alpha, and EGF receptor in the developing primary palate. *J Dent Res.* 1996, 75:1534-1539.
35. IPDTC Working Group. Prevalence at birth of cleft lip with or without cleft palate: data from the International Perinatal Database of Typical Oral Clefts (IPDTC). *Cleft Palate Craniofac J.* 2011, 48:66-81.
36. Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology.* 2001, 63:79-86.
37. Jiang R, Bush JO, Lidral AC. Development of the upper lip: morphogenetic and molecular mechanisms. *Dev Dyn.* 2006, 235:1152-1166. Review.
38. Johnson CY, Little . Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol.* 2008, 37:1041-1058.
39. Jörgensen G. Erbfaktoren bei häufigen Krankheiten mit multifaktorieller (polygener) Determination. In: *Handbuch der allgem. Pathologie.* 1974, Bd. 9. Springer, Berlin-Heidelberg.
40. Juriloff DM, Harris MJ, Brown CJ. Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model. *Mamm Genome.* 2001, 12:426-435.
41. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse genetic models of cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008, 82:63-77.
42. Juriloff DM. Differences in frequency of cleft lip among the A strains of mice. *Teratology.* 1982, 25:361-368.
43. Kalter H. The history of the A family of inbred mice and the biology of its congenital malformations. *Teratology.* 1979, 20:213-232. Review.
44. Knapp A. [Modern nutrition problems with special reference to genetic metabolic disorders]. *Dtsch Gesundheitsw.* 1970, 25:367-373.
45. Kneuer C, Schrader S, Honscha W. Alternative transcripts of rat *slc19a1*: cloning, genomic organisation, tissue specific promoters and alternative splicing. *DNA Seq.* 2005, 16:1-6.
46. Lammer ED, Chen DT, Har RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW jr, Lott IT. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med.* 1985, 313:837-841.
47. Langman J. *Medizinische Embryologie.* 1972, Thieme 2. Auflage.
48. Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, Al Chawa T, Nasser E, Böhmer AC, Mattheisen M, Alblas MA, Barth S, Kluck N, Lauster C, Braumann B, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Daratsianos N, Kreuzsch T, Murray JC, Marazita ML, Ruczinski I, Scott AF, Beaty TH, Kramer FJ, Wienker TF, Steegers-Theunissen RP, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Lange C, Cichon S, Propping P, Knapp M, Nöthen MM. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet.* 2012, 44:968-971.

49. Mangold E, Ludwig KU, Birnbaum S, Baluardo C, Ferrian M, Herms S, Reutter H, de Assis NA, Chawa TA, Mattheisen M, Steffens M, Barth S, Kluck N, Paul A, Becker J, Lauster C, Schmidt G, Braumann B, Scheer M, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, Blaumeiser B, Moebus S, Krawczak M, Schreiber S, Meitinger T, Wichmann HE, Steegers-Theunissen RP, Kramer FJ, Cichon S, Propping P, Wienker TF, Knapp M, Rubini M, Mossey PA, Hoffmann P, Nöthen MM. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without palate. *Nature Genetics*. 2010, 42:24–26.
50. Mann H, Whitney D. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of mathematical Statistics*. 1947, 18:50-60.
51. Marques SA, Dy LC, Southall MD, Yi Q, Smietana E, Kapur R, Marques M, Travers JB, Spandau DF. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002, 300:1026-1035.
52. Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Spinelli G, Lunardi S, Carinci F. Lack of association between common polymorphisms of epidermal growth factor receptors and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2009, 73:929-931.
53. Matthews MS, Cohen M, Viglione M, Brown AS. Prenatal counselling for cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg*. 1998, 101:2003-2004.
54. Mendoza R, Anderson MM, Overbaugh J. A Putative Thiamine Transport Protein Is a Receptor for Feline Leukemia Virus Subgroup A. *J Virol*. 2006, 80:3378–3385.
55. Moore KL. *Grundlagen der medizinischen Embryologie*. 1990, Enke, Stuttgart.
56. Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC. Cleft lip and palate. *Lancet*. 2009, 374:1773-1785. Review
57. Natsume N, Kawai T, Suzuki T. Preference for dairy products and manifestation of cleft lip and/or palate. *Plast Reconstr Surg*. 1996, 98:900-901.
58. Natsume N, Kawai T, Suzuki T. Preference for vegetables rich in beta-carotene and manifestation of cleft lip and/or palate. *Plast Reconstr Surg*. 1995, 95:934-935.
59. Natsume N, Nagatsu Y, Kawai T. Direct effect of vitamins at the time of palatal fusion. *Plast Reconstr Surg*. 1998, 102:2512-2513.
60. Neubert D, Dillmann I. Embryotoxic effects in mice treated with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1972, 272:243-264.
61. Pearson, K. On the criterion that a given system of derivations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. In: *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1900, 50:157–175.

62. Penrose L B. The genetical background of common diseases. *Acta genet.* 1953, 4:257-265.
63. Rajgopal A, Edmondson A, Goldman ID, Zhao R. SLC19A3 encodes a second thiamine transporter ThTr2. *Biochim Biophys Acta.* 2001, 29:175-178.
64. Raupach HW. Untersuchungen zum Einfluss von Thiamin (Vitamin B1) auf die Palatogenese der Hausmaus. 1987, Halle/ Saale, Med. Fak. Diss..
65. Rindi G, Laforenza U. Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000, 22:246-255.
66. Roecklein B, Levin SW, Comly M, Mukherjee AB. Intrauterine growth retardation induced by thiamine deficiency and pyriithiamine during pregnancy in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1985, 151:455-460.
67. Said HM, Balamurugan K, Subramanian VS, Marchant JS. Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004, 286:491-498.
68. Scheller K, Orce y Tiggers J, Schubert J. Vitamin B-complex application promotes secondary palate development in a palate organ model of the A/WySnJ mouse. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013(a), 71:143-150.
69. Scheller K, Röckl T, Scheller C, Schubert J. Lower concentrations of B-vitamin subgroups in the serum and amniotic fluid correlate to cleft lip and palate appearance in the offspring of A/WySn mice. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013(b), 71:e1-7.
70. Scheller K, Schubert A, Schubert J. In vitro investigation of the secondary palate development in two strains of mice. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011, 40:737-742.
71. Schenker S, Johnson RF, Hoyumpa AM, Henderson GI. Thiamine-transfer by human placenta: normal transport and effects of ethanol. *J Lab Clin Med.* 1990, 116:106-115.
72. Schmidt R. A modified mating regimen for the laboratory mouse. *Z Versuchstierkd.* 1980, 27:206-208.
73. Schubert J, Krost B. Prevention of cleft lip and palate. Reducing risk of recurrence--a 25-year clinical experience. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006, 10:301-305.
74. Schubert J, Schmidt R, Raupach HW New findings explaining the mode of action in prevention of facial clefting and first clinical experience. *Craniomaxillofac Surg.* 1990, 18:343-347.
75. Schubert J, Schmidt R, Syska E. B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002, 31:410-413.
76. Schubert J. Prevention of experimentally induced cleft palate in mice. *Cleft Palate J.* 1982, 19:83-88.
77. Schubert J. Untersuchungen zur medikamentösen Beeinflussung experimenteller Gaumenspalten. 1980, Halle/ Saale, Med. Fak. Diss..
78. Schulze C. Über genetische Faktoren bei der Ätiologie von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. *Fortschr Kieferorthop.* 1986, 47:346-355.

79. Sepulveda W, Wong AE, Martinez-Ten P, Perez-Pedregosa J. Retronasal triangle: a sonographic landmark for the screening of cleft palate in the first trimester. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010, 35:7-13.
80. Shimizu N, Aoyama H, Hatakenaka N, Kanenda M, Teramoto S. An in vitro screening system for characterizing the cleft palate-inducing potential of chemicals and underlying mechanisms. *Reprod Toxicol.* 2001, 15:665-672.
81. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992, 359:843-845.
82. Sperber GH. Current concepts in embryonic craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992, 4:67-72.
83. Staats J. Standardized Nomenclature for Inbred Strains of Mice: eighth listing. *Cancer Res.* 1985, 45:945-977.
84. Syska E, Schmidt R, Schubert J. The time of palatal fusion in mice: a factor of strain susceptibility to teratogens. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004, 32:2-4.
85. Taeschner W, Vozech S. Pharmacokinetic drug data. In: Speight TM, Holford NHG, editors. *Avery's Drug Treatment (Appendix A)*. 1997:1629-1664.
86. Tammuscheit UG. Entstehungsmechanismen von Lippen-Kiefer-(Gaumenspalten). *Fortschr. Kieferorth.* 1986, 47:339-345.
87. Tessier P. Anatomical classification facial, cranio-facial and latero-facial clefts. *J Maxillofac Surg.* 1976, 4:69-92.
88. Tolarova M, Harris J. Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratol.* 1995, 51:71-78.
89. Töndury G. Zur Genese der LKG-Spalten. *Z Kinderchir.* 1976, 19 (Suppl.): 5.
90. Ulrich M, Kristoffersen K, Rolschau J, Grinsted P, Schaumburg E, Foged N. The influence of folic acid supplement on the outcome of pregnancies in the county of Funen in Denmark. Part II. Congenital anomalies. A randomized study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999, 87:111-113.
91. Wang KY, Juriloff DM, Diewert VM. Deficient and delayed primary palatal fusion and mesenchymal bridge formation in cleft lip-lipable strains of mice. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1995, 15:99-116.
92. Weingaertner J, Fanghaenel J, Bienengraeber V, Gundlach KK. Initial findings on teratological and developmental relationships and differences between neural tube defects and facial clefting. First experimental results. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005, 33:297-300. Review.
93. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics.* 1945, 1:80-83.
94. Tolarová M. A study of the incidence, sex-ratio, laterality and clinical severity in 3,660 probands with facial clefts in Czechoslovakia. *Acta Chir Plast.* 1987, 29:77-87.
95. Schubert J, Schmidt R, Syska E. B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002, 31:410-413.

96. Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, Seller MJ, Nevin NC, Harris R, Read AP, Fielding DW. Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet*. 1980, 1:339-340.
97. Tolarová M. Genealogical analysis of isolated cleft palate. *Acta Chir Plast*. 1969, 11:108-116.
98. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 2013, Springer Spektrum, Auflage 7
99. Zhao R, Goldman ID. Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Mol Aspects Med*. 2013, 34:373-385. Review

8 Thesen

1. Vitamin-B-Komplexpräparate können die Entwicklung der sekundären Gaumenfortsätze in der Organkultur direkt positiv beeinflussen.
2. Bei Gabe eines Teratogens während der Embryonalentwicklung werden mehr lebende weibliche Nachkommen geboren.
3. Bei der genetisch determinierten Maus wurden lebende weibliche zu männliche Feten im Verhältnis 1 : 1,079 geboren (kein Unterschied).
4. Die durch Teratogene verursachte und die genetisch determinierte Spaltbildung ist nicht geschlechtsgebunden.
5. Die Rate der durch Teratogene hervorgerufenen Gaumenspaltbildungen lässt sich durch die Gabe von Vitamin B1-Präparaten reduzieren, nicht jedoch die der genetisch determinierten.
6. Bei der genetisch determinierten Spaltbildung der A/WySn-Maus finden sich im Serum signifikant erniedrigte Werte für Thiamin (B1).
7. Bei der A/WySn-Maus finden sich im Fruchtwasser von Muttermäusen mit Spaltbildung in der Nachkommenschaft signifikant erniedrigte Werte für Thiamin (B1), Panthothensäure (B5) und Folsäure (B9).
8. Trotz hoher Vitamin B1-Gabe und einem damit verbundenen signifikanten Anstieg der Thiaminkonzentration im Serum stieg die Fruchtwasserkonzentration bei der A/WySn-Maus nicht an.
9. Die direkte Beeinflussung der kraniofazialen Entwicklung durch B-Vitamine war so *in vivo* nicht gegeben.
10. Eine neu entdeckte Splice-Variante im Thiamin 2-Transportergen (Slc19a3), die mit einer Leserasterverschiebung durch ein intronisches Exon verbunden ist, führt zu einem funktionsunfähigen, in der Plazenta zytoplasmatisch lokalisiertem Transportprotein.
11. Im Folat-Transporter (Slc19a1) konnte keine genetische Auffälligkeit festgestellt werden.

III. Tabellarischer Lebenslauf mit Unterschrift

Name: Dr. med. Dr. med. dent. Konstanze Scheller
Geburtsname: Weinzierl
Geburtsdatum: 06. Mai 1973
Geburtsort: Erlangen
Familienstand: verheiratet mit Dr. Christian Scheller (Neurochirurg), 3 Kinder

Schulbildung:

1979 bis 1983 Grundschohle in Nürnberg
1983 bis 1992 Melanohthon-Gymnasium Nürnberg
08. Juli 1992 Allgemeine Hochschulreife (Bayern)

Universitätsausbildung:

November 1992 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
November 1993 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
27. September 1994 Ärztliche Vorprüfung
19. September 1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03. September 1997 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
26. Oktober 1998 Ärztliche Prüfung
November 1998 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-
Nürnberg
01. Mai 2000 Approbation als Ärztin
13. November 2001 Promotion zum Dr. med. am Institut für klinische und molekulare Virologie
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
„Funktionelle Analyse des offenen Leserahmens UL26 des humanen
Cytomegalovirus“ (Prof. Dr. T. Stamminger)
09. April 2002 Staatsexamen Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
19. April 2002 Approbation als Zahnärztin
26. Februar 2003 Promotion zum Dr. med. dent. an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-
und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-

Nürnberg

„Primär Stabilität der knöchernen Verankerung von dentalen Implantaten und ihre Korrelation zu histomorphometrischen Parametern“ (Prof. Dr. Dr. F.W. Neukam)

Berufsausbildung:

11/ 1998 bis 04/ 2000

Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

05/2000 bis 04/ 2003

Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

05/ 2003 bis 12/2006

Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig

06. Juli 2006

Fachärztin für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

seit 01/ 2007

Oberärztin an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/2009

Zusatzbezeichnung „Plastische Operationen“

Dr. med. Dr. med. dent. Konstanze Scheller

IV. Selbstständigkeitserklärung mit Unterschrift

Ich erkläre, dass ich die Habilitationsschrift selbst verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Halle, den

Dr. med. Dr. med. dent. Konstanze Scheller

V. Erklärung über frühere Habilitationsversuche mit Unterschrift

Ich erkläre, dass frühere Habilitationsversuche nicht stattfanden und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren im Gang ist.

Halle, den

Dr. med. Dr. med. dent. Konstanze Scheller

VI. Danksagung

„Wenn Du ein Schiff bauen willst, dann trommle nicht Männer zusammen um Holz zu beschaffen, Aufgaben zu vergeben und die Arbeit einzuteilen, sondern lehre die Männer die Sehnsucht nach dem weiten, endlosen Meer.“

Antoine de Saint-Exupery

In diesem Sinne möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Johannes Schubert, emeritierter Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer und Plastische Gesichtschirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Möglichkeit bedanken seine Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Prävention von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten weiter führen zu können. So bin ich sehr glücklich, dass Herr Professor Schubert mir die Möglichkeit gab, die operative Therapie der kleinen Patienten bei ihm zu erlernen und meine Forschungsarbeiten mit dem klinischen Alltag zu verbinden. Ich möchte mich herzlich dafür bedanken, dass er mir die Augen für das Wesentliche in der wissenschaftlichen Arbeit und der klinischen Behandlung von Patienten mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten geöffnet hat, auch wenn ich noch viel lernen muss. Zudem möchte ich mich auch noch herzlich für die Großzügigkeit bedanken, dass er mir stets meine Freiheit in der Forschungsarbeit und den klinischen Entscheidung gab.

Meinem Mann Christian danke ich dafür, dass er stets an mich geglaubt hat und mir uneingeschränkt in allen Situationen des Lebens zur Seite steht.

Meinen Kindern Theresa, Ferdinand und Leopold danke ich dafür, dass sie mich das Wesentliche im Leben haben erkennen lassen.

Meinen Eltern danke ich für die Möglichkeit, dass ich diesen Weg habe gehen können.

Herrn Andreas Schubert und Frau Julia Orce y Tigges möchte ich für Ihre Unterstützung bei der Untersuchung in den Organkulturen danken. Herrn Thomas Röckl und Herrn Florian Kalmring danke ich für Ihr unermüdliches Engagement bei Ihrer Arbeit mit den Mäusen und hoffe dass sie Ihre Ergebnisse bald zu Papier bringen.

Herrn PD Dr. Bernhard Hiebl (Tierschutzbeauftragter der Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die Unterstützung bei der Beantragung meiner Tierversuche.

Frau Henicke und Frau Gottschalk (Tierpflegerinnen der Zentralen Tierhaltung des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung am Klinikum Kröllwitz) möchte ich für die unermüdliche Unterstützung beim Management der Tierversuche danken, da sie die stets den Überblick behielten und sich rührend um die Tiere kümmern.

Herrn Dr. Peter Hermann-Trost, Frau Dr. Diesel und Frau Dr. Busse (Institut für Pathologie, Halle) danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung und der Befundung der histologischen Untersuchungen.

Meinen Kollegen möchte ich für die Unterstützung im klinischen Alltag danken. Besonders danke ich Herrn Daniel Müller, der ein großes Organisationstalent ist und es mit seiner Art stets verstand, mich aufzumuntern.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Kollegen, Herrn Professor Dr. Dr. Alexander W. Eckert, der mich mit seiner mitreisenden Begeisterungsfähigkeit stets zu motivieren verstand. Zudem danke ich ihm für seine freundschaftliche Unterstützung.

Der letzte Dank geht an meine beste Freundin Dr. Michaela Göde in Nürnberg, die mich so nimmt, wie ich bin.