

6 Zusammenfassung

Für ein besseres Verständnis der Knochenentwicklung, und -heilung ist es notwendig mehr Informationen über die daran beteiligten Gene zu erhalten. Dazu sind Ansätze aus der klinischen Forschung sowie der Grundlagenforschung geeignet, und auch evolutionsbiologische Ansätze können wertvolle Hinweise zur Biologie des Skeletts liefern.

Als klinischer Forschungsansatz zum besseren Verständnis der Frakturheilung wurden in der vorliegenden Arbeit cDNA-Banken aus verschiedenen Stadien von Frakturkallusgewebe des Schafs erstellt und daraus Sequenzen von über 47000 ESTs generiert. Aus der Analyse der EST-Zahlen für einzelne Gene in den cDNA-Banken und zusätzlichen quantitativen PCRs konnten 87 Kandidatengene mit einer möglichen Funktion im Heilungsprozeß identifiziert werden. Darunter befanden sich auch 53 Gene, denen bisher keine Funktion in der Entwicklung oder Heilung des Knochens zugeschrieben wurde. Neben der Identifikation dieser Gene stellen die EST-Sequenzen auch eine wichtige Ressource für andere Arbeiten mit dem Schaf als Modellorganismus dar.

In einem grundlagenorientierten, entwicklungsbiologischen Ansatz wurden Gene mit potentieller Funktion in der Skeletogenese durch Vergleiche von Expressionsprofilen im *Runx2*-Mausmodell identifiziert. *Runx2* kodiert einen für die Skeletogenese essentiellen Transkriptionsfaktor. Die Hybridisierung von Affymetrix GeneChip Arrays mit RNA aus Oberarmknochen von E14,5 *Runx2*-Wildtyp- und Knockout-Embryonen lieferte 71 differentiell exprimierte Transkripte, die durch quantitative PCR bestätigt werden konnten. Von diesen war bisher für 31 Gene noch keine Funktion in der Skeletogenese beschrieben. Nach der Bestimmung des Expressionsmusters der Kandidatengene durch *in situ*-Hybridisierung wurde eine evolutionsbiologischer Ansatz benutzt, um potentiell direkt durch *Runx2* regulierte Gene aufzudecken. Hierbei wurden die Promotorbereiche der Kandidatengene nach *Runx*-Bindungsstellen durchsucht, die zwischen mehreren Spezies konserviert sind. Durch diese Methode konnten fünf neue potentielle *Runx2*-Zielgene identifiziert werden.

Weiterhin konnten durch Untersuchungen zur Evolution der *Runt*-Genfamilie Erkenntnisse über die Evolution der molekularen Mechanismen der Skeletogenese gewonnen werden. Die Klonierung und phylogenetische Analyse von drei *Runt*-homologen Gene des Kleingefleckten Katzenhais *Scyliorhinus canicula* zeigte, daß diese zu den drei bei Säugetieren vorhanden *Runx1-3* Genen ortholog sind. Expressionsanalysen der *Runt*-homologen Genen des Katzenhais, Schleimaals und Lanzettfischchens, sowie des für die Skeletogenese der

Vertebraten ebenfalls wichtigen *Sox9*-Gens im Lanzettfischchen deuten darauf hin, daß diese Gene eine evolutionär konservierte Funktion in der Entwicklung des Skeletts bzw. seiner Vorläuferstrukturen besitzen. Es konnte gezeigt werden, daß diese für die Skeletogenese wichtige molekulare Maschinerie zudem bereits bei den Cephalochordata und nicht wie bisher vermutet erst bei den Vertebrata vorhanden ist und damit etwa 100 Millionen Jahre älter ist, als bisher angenommen wurde.