3. Ergebnisse

3.1. Duplikate

Bei den 59 bestätigten Genen wurden mit Hilfe verschiedener Datenbanken (Ensembl, GeneNest, NCBI) insgesamt 6 Duplikate gefunden (diese wurden in Tabelle 3.1. türkis markiert). Im Einzelnen betraf dies folgende Gene:

Gnai→AI153412 und U38501

Ptprz1→ AI849305 und AW120652

Satb2→ AI480578, AI646305 und AW124651

Smpd3→AI594430 und AI747200

Tcf7→ AI019193 und X61385

(Erklärung: Für die oben jeweils unterstrichene Acc.-Nr. wurde eine Sonde hergestellt.)

3.2. RNA-Sonden-Herstellung

Die Sonden sind Teilbereiche von Genen. Sie wurden so gewählt, dass sie in den gering konservierten Bereichen und somit meist nicht direkt im kodierenden Bereich liegen.

Manche der 53 Produkte konnten erst nach aufwendiger Optimierung der PCR-Bedingungen amplifiziert werden. Für 3 ESTs (in der Tabelle 3.1. rot markiert) konnten dennoch nur unspezifische Produkte erhalten werden. Sie wurden durch Sequenzierung bestätigt.

Von 50 Fragmenten konnte eine Dig-markierte Sonde hergestellt werden. Von diesen Sonden gaben 70 % (35) in der *In-Situ*-Hybridisierung ein eindeutiges Signal (in der Tabelle 3.1. gelb/ grün markiert). Die grün markierten Sonden jeweils in Knochen- und/ oder Knorpelbereichen, die gelb markierten jeweils in anderen Gewebsarten nur auf einem ganzen Embryonenschnitt.

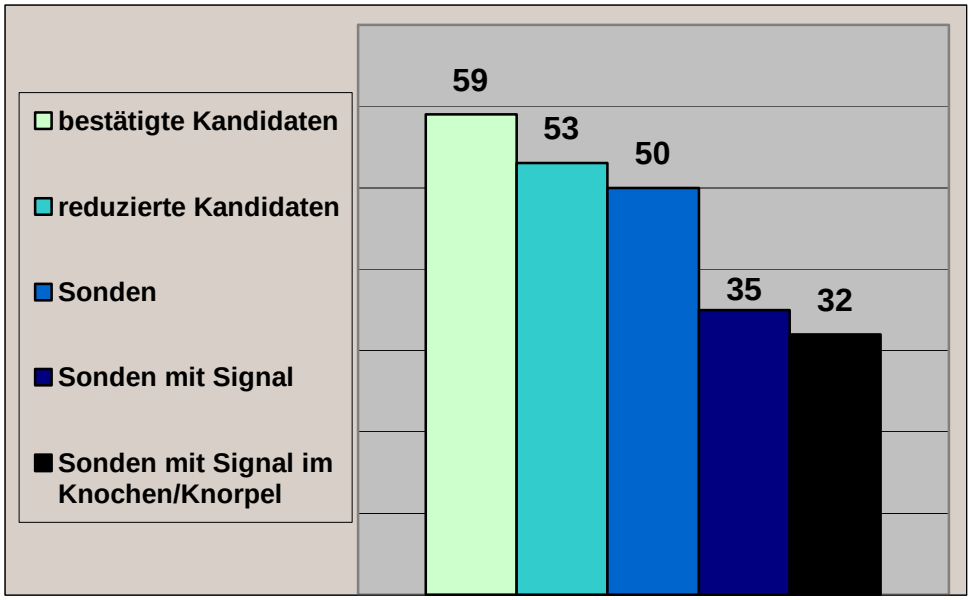

Diagramm 3.1.: Ergebnisse der Sondenherstellung
Die weiße Säule stellt die 59 in der Real-Time-PCR bestätigten Chip-Gene dar. Nach Subtraktion der Duplikate (hellblaue Säule) und Wegfallen von 3 weiteren 3 ESTs, die sich nicht ausreichend amplifizieren liesen, wurden die restlichen 50 Sonden transkribiert (blaue Säule). Von diesen ergaben 35 Sonden in der *ISH* ein eindeutiges Signal (dunkelblaue Säule), 32 davon in knorpel-/ knochenrelevanten Bereichen (schwarze Säule).

3.3. Funktion der Sonden

Zum größten Teil sind die *runx2*-differentiellen Gene und deren Funktionen schon bekannt, für einen Teil ist jedoch keine Funktion beschrieben.

Tabelle 3.1.: In Chip und Real-Time-PCR bestätigte Gene und deren Funktion
Grau: Gene waren auf dem Chip mind. 1,87 fach ($\log_2$ >= 0,9), und in der Real-Time-PCR mindestens zweifach reguliert.
Türkis: Duplikate; für die unterstrichen wurde eine Sonden angefertigt
Rot: Eine Amplifikation war nicht möglich
Grün: Signal in Knorpel- und/ oder Knochenbereichen
Gelb: eindeutiges sonstiges Signal in *ISH* (auf Kryo-Embryonenschnitten, Stadium 12,5 dpc.)
RT: Real-Time

Chip-Sonden	Beschreibung	Chip-Wert	RT-PCR-Wert	Standart-Abweich-ung (RT-PCR)
AA260005	Pawr (Prkc, apoptosis, Wt1, regulator)	3,48	2,89	0,34
AA770975	Stk17b (Serine/threonine kinase 17b, apoptosis-induced)	2,46	3,51	0,55
AA793588	Prkg2 (Protein kinase, cGMP-dependent, type 2)	2,3	2,85	0,4
AB023957	Ethanol induced gene product	2,14	4,13	0,25
AF030433	Dkk1 (Dickkopf1)	13	54,66	5,04
AI019193	Tcf7 (Transcription factor 7, T-cell specific)	8,57	21,41	1,85
AI121797	-	2,3	2,81	0,51
AI153412	Gnai1 (Guanine nucleotide binding protein, α-inhibiting 1)	2,3	2,48	0,31
AI480578	Satb2 (Special AT-rich sequence binding protein 2)	2,64	2,31	0,56
AI481510	Phex (Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome)	3,25	3,43	0,62
AI594430	Smpd3 (Sphingomyelin phosphodiesterase3, neutral)	17,15	4,27	0,87
AI615325	Slc13a5 (solute carrier family 13 (sodium-dependent citrate transporter), member 5)	4,59	295,01	23,63
AI646305	Satb2 (Special AT-rich sequence binding protein 2)	2,46	173,72	20,92
AI746846	Snx10 (Sorting nexin 10)	2,46	6,29	0,3
AI747200	Smpd3 (Sphingomyelin phosphodiesterase3, neutral)	6,5	29,04	1,52
AI838923	Spi6 (Serine protease inhibitor 6)	2,46	2,28	0,36
AI848841	Ptch (Patched homologue)	1,87	2,84	0,12
AI849305	Ptprz1 (Protein tyrosine phosphatase , receptor type 1)	2,64	4,06	0,26
AI852765	Gpc1 (Glypican 1)	2	5,43	0,5
AI854020	Cdo1 (Cysteine dioxygenase 1)	2,14	2,26	0,15
AI854299	-	3,25	32,17	1,95
AJ009862	Tgfb1 (Transforming growth factor-beta1)	14,93	3,93	0,39
AW061016	Vdr (Vitamin D receptor)	6,06	14,16	1,66
AW120652	Ptprz1 (Protein tyrosine phosphatase, receptor type 1)	2,64	4,53	0,71
AW122703	Unc5b (Netrin receptor)	2,64	3,85	0,39
AW124306	-	2,83	2,32	0,18
AW124651	Satb2 (Special AT-rich sequence binding protein 2)	12,13	33,8	8,88
D10837	Lox (Lipooxygenase)	1,87	4,34	0,74
D64141	Ptpn20 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20)	-1,5	-	-

Chip-Sonden	Beschreibung	Chip-Wert	RT-PCR-Wert	Standart-Abweich-ung (RT-PCR)
D83966	Ptpn13 (Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 13)	2,14	4,42	0,35
J02980	Akp2 (Alkaline phosphatase 2)	11,31	169,52	9,23
J03023	Hck (Hemopoietic cell kinase)	3,48	6,23	0,45
J04953	Gsn (Gelsolin)	2,46	3,27	0,19
L13171	Mef2c (Myocyte enhancer factor 2c)	1,87	2,69	0,26
L20232	Ibsp (Integrin binding sialoprotein)	168,9	2436,67	211,5
M12379	Thy1 (Thymus cell antigen 1, theta)	12,13	5,89	0,39
M29009	Cfh (Complement component factor h)	14,93	19,24	1,7
M31131	Cdh2 (Cadherin 2)	1,87	2,58	0,09
M36579	S100A4 (S100 calcium binding protein A4)	2	2,72	0,5
M68513	Epha3 (Ephrin receptor A3)	2,14	4,85	0,67
M69260	Lpc1 (Lipocortin 1)	2,14	2,01	0,2
M89798	Wnt5a (Wingless-related MMTV integration site 5a)	1,87	2,58	0,09
M99054	Trap (Tartrate-resistant acid phosphatase)	6,96	2,12	0,36
U13705	Gpx3 (Gluthadione peroxidase 3)	2,46	3,77	0,13
U20238	Rasa3 (RAS p21 protein activator 3)	2	2,82	0,2
U28960	Pltp (Phospholipid transfer protein)	4	30,81	1,95
U38501	Gnai1 (Guanine nucleotide binding protein,α-inhibiting 1)	2,3	2,26	0,22
U44389	Hpgd (Hydroxyprostaglandin dehydroxygenase 15)	2,46	3,71	0,11
U49513	Ccl9 (Chemokine ligand 9)	4	7,8	0,56
U67840	Dlx5 (Distal-less homeobox 5)	3,48	17,58	2,08
X13986	Spp1 (Secreted phosphoprotein 1)	45,25	192,19	65,53
X14961	Fabp3 (Fatty acid binding protein 3)	2,14	3,02	0,31
X54511	Capg (Capping protein (actin filament), gelsolin-like)	2,14	3,32	0,39
X61385	Tcf7 (Transcription factor 7, T-cell specific)	3,03	14,66	0,62
X66473	Mmp13 (Matrix metalloproteinase 13)	137,2	250,35	29,82
X72795	Mmp9 (Matrix metalloproteinase 9)	64	245,62	102,59
X76291	Ihh (Indian hedgehog)	1,87	16,48	0,91
Y15001	Irx3 (Iroquois related homeobox 3)	2,14	3,66	0,62
Z19543	Cnn2 (Calponin 2)	2,3	2,74	0,21

3.4. Darstellung der Expressionsmuster in der *In-Situ*-Hybridisierung

Es konnten unterschiedliche Expressionen festgestellt werden, z.B. ob das Signal im Knorpel und/oder im Knochen vorhanden war. Die Gene mit gleicher Expression wurden in Gruppen zusammengefasst (siehe Tabelle 3.2.).

Tabelle 3.2.: Darstellung der Expression in der *In-Situ*-Hybridisierung
Runx2-Chip-Gene mit ihrem jeweiligen Signal im Wildtyp-Humerusgewebe der Maus (15,5 dpc.)

	Chondrozyten		Perichon-drium	Osteo-zyten	trabekulärer Knochen	Periost		Osteo-klasten
	prähyper-troph	hypertroph				Stratum osteogen.	Stratum fibrosum	
runx2	•	•			•	•		
J04953 - Gsn	•				•	•		
M89798 - Wnt5a	•				•	•	•	
X76291 - Ihh	•	•						
L13171 - Mef2c	•	•				•		
AW061016 - Vdr	•	•			•	•		
AW122703 - Unc5b	•	•			•	•		
U67840 - Dlx5	•	•			•	•		
U13705 - Gpx3		•			•			
AI852765 - Gpc1		•			•	•		
L20232 - Ibsp		•			•	•		
X13986 - Spp1		•			•	•		
X66473 - Mmp13		•			•	•		
M68513 - Epha3			•				•	
AF030433 - Dkk1				•		•		
AI854020 - Cdo1					•	•		
AJ009862 - Tgfb1					•	•		
AW124306					•	•		
AW124651 -Satb1					•	•		
D10837- Lox					•	•		
M31131 - Cdh2					•	•		
U20238 - Rasa3					•	•		
X14961 - Fabp3					•	•		
X61385 - Tcf7					•	•		
Z19513 - Cnn2					•	•		
AB023957 - Etanol ind.						•		
J03023 - Hck						•		
M12379 - Thy1							•	•
AI746846 - Snx10								•
M36579 - S100A4								•
M99054 - Trap								•
U38501 - Gnai1								•
U49513-Ccl9								•

Die Häufigkeit der Expressionen in den einzelnen Geweben wurde in Diagramm 3.2. zusammengefasst. Diagr. 3.3. gibt eine Zusammenfassung von Tab. 3.2. und Diagr. 3.2. wieder.

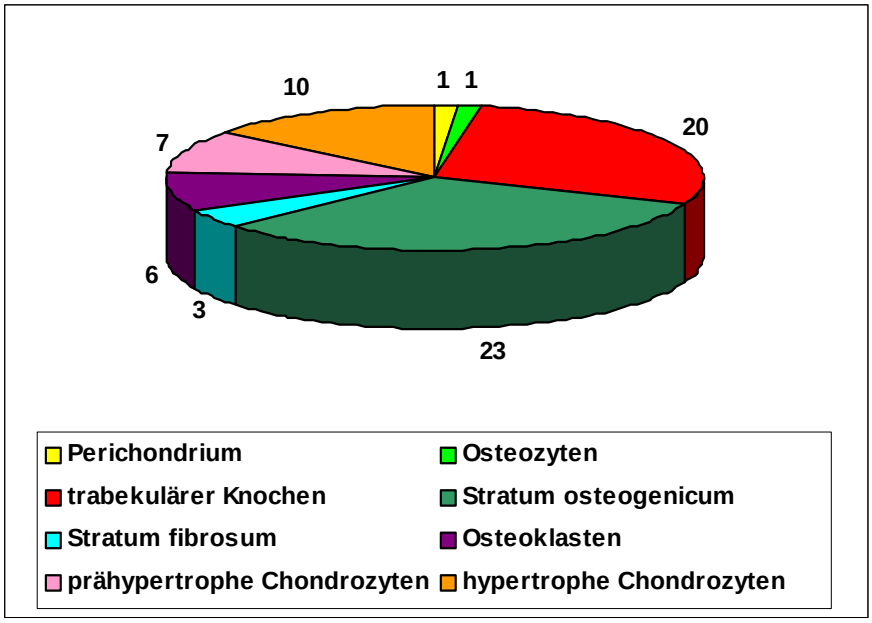

Diagramm 3.2.: Darstellung, wie viele Sonden in den jeweilige Gewebsarten nachgewiesen wurden
Die Einteilung ist der Legende zu entnehmen.

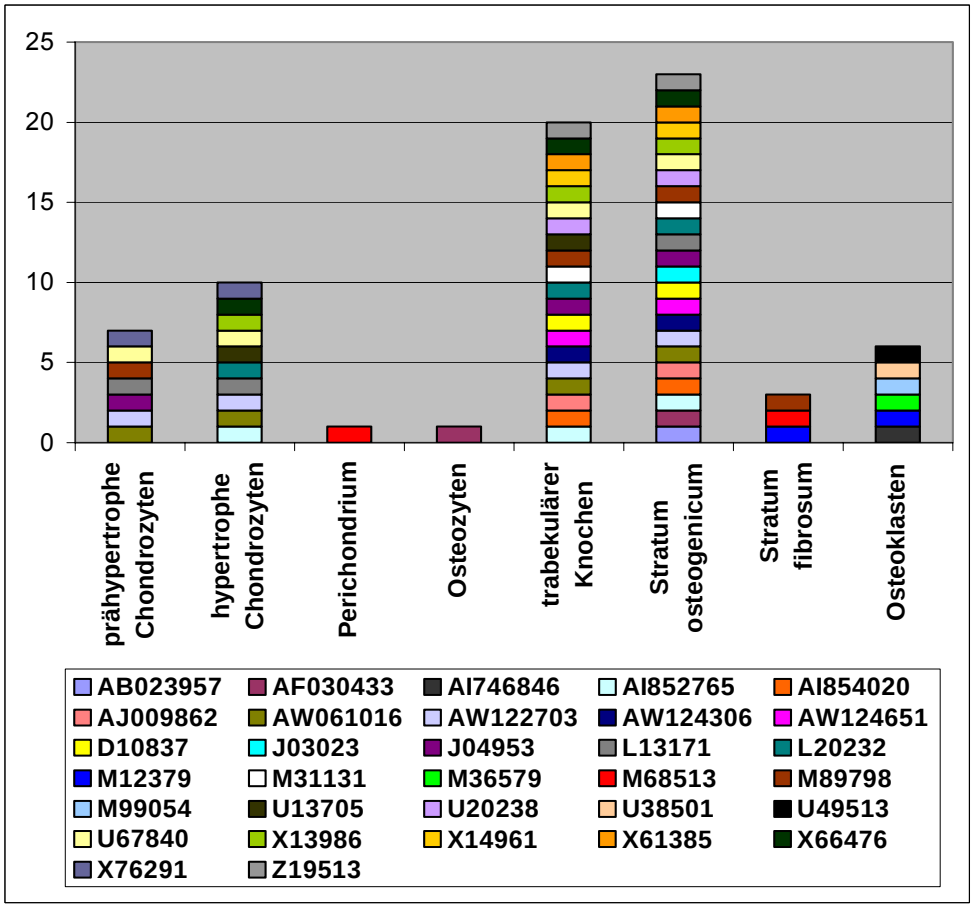

Diagramm 3.3.: Genauere Darstellung der Sonden mit ihrem jeweiligen Signal
Die Einteilung ist der Legende zu entnehmen.

3.5. Charakteristische Marker

Zum besseren Verständnis der verschiedenen Signale in den Gewebstypen des Humerus, sind in Abb. 3.1.-3.4. Beispiele anhand von Col Πa1, Xa1 und Ia1, sowie von Trap erläutert.

(Alle Bilder zeigen den Humerus, bzw. Radius oder Ulna einer Wildtypmaus. Die jeweiligen Vergrößerungen sind den Abbildungen zu entnehmen.)

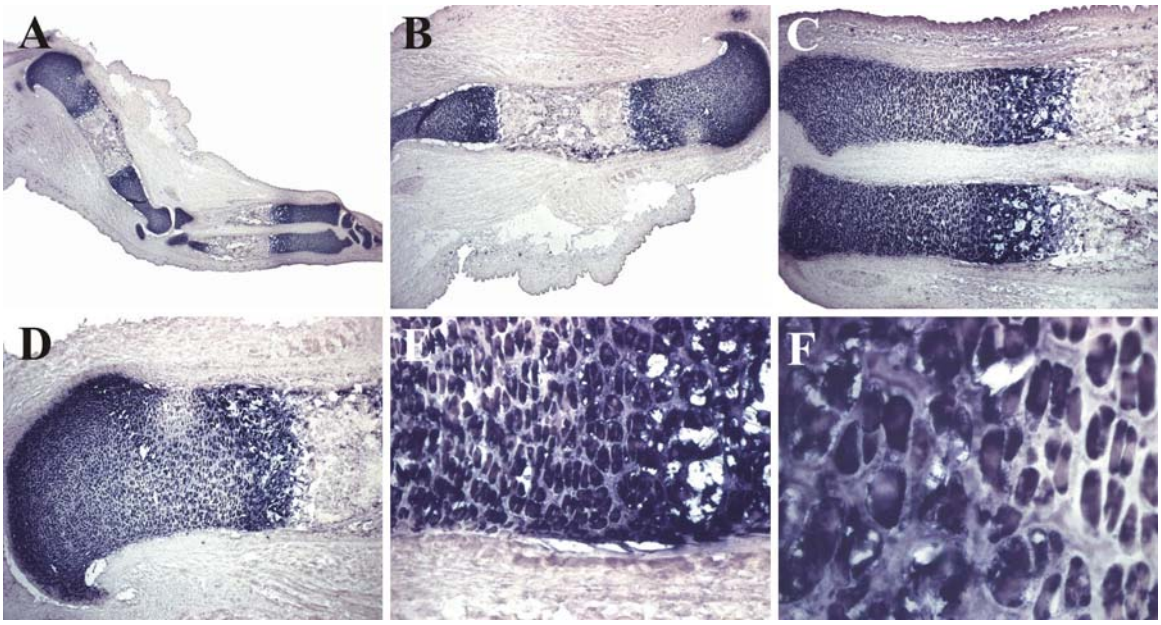

Abb. 3.1.: Expression von Col Πa1:
[Vergrößerungen: A: 25x , B: 50x, C: 100x (Radius/ Ulna), D: 100x , E: 400x, F: 1000x]
Col Πa1 ist ein Marker für proliferierende und prähypertrophe Chondrozyten.

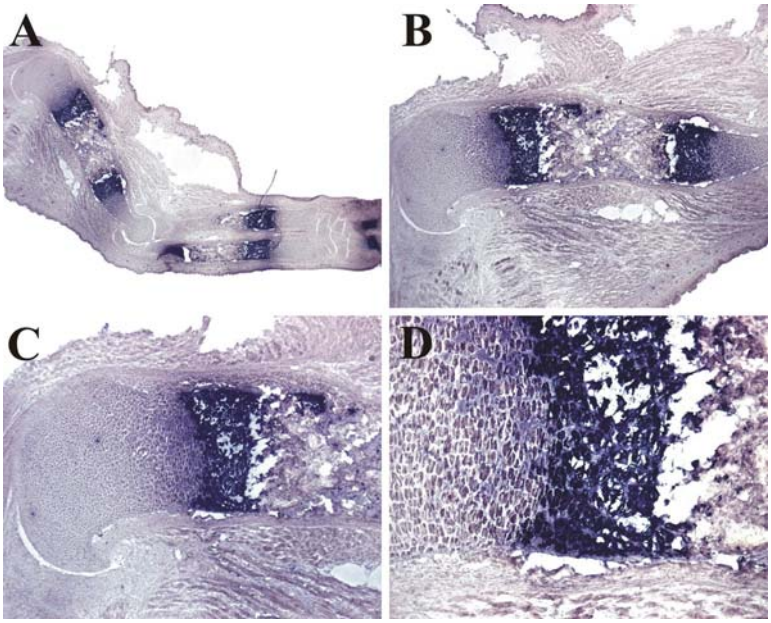

Abb. 3.2.: Expression von Col Xa1:
[Vergrößerungen: A: 25x , B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Col Xa1 ist ein Marker für hypertrophe Chondrozyten.

Col Πa1 ist ein bekannter Marker für proliferierende und prähypertrophe Chondrozyten, sowie Chondrozyten im Bereich der Gelenke [30,31]. Col Xa1 stellt den einzigen bisher

bekannten Marker für hypertrophe Chondrozyten dar [32]. Col Ia1 wird von Osteoblasten exprimiert [13]. Trap ist ein bekannter Marker der Osteoklasten [33].

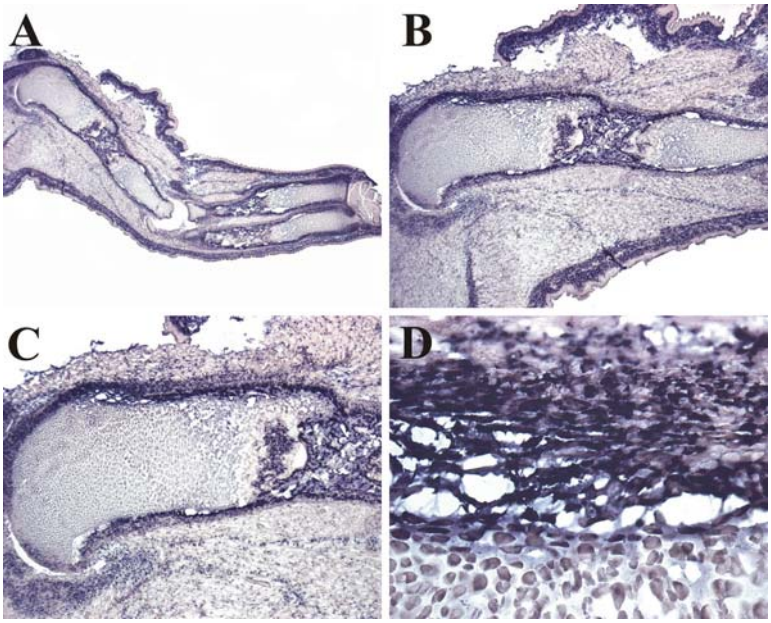

Abb. 3.3.: Expression von Col Ia1:
[Vergrößerungen: A: 25x , B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Col Ia1 ist ein Marker für Osteoblasten.

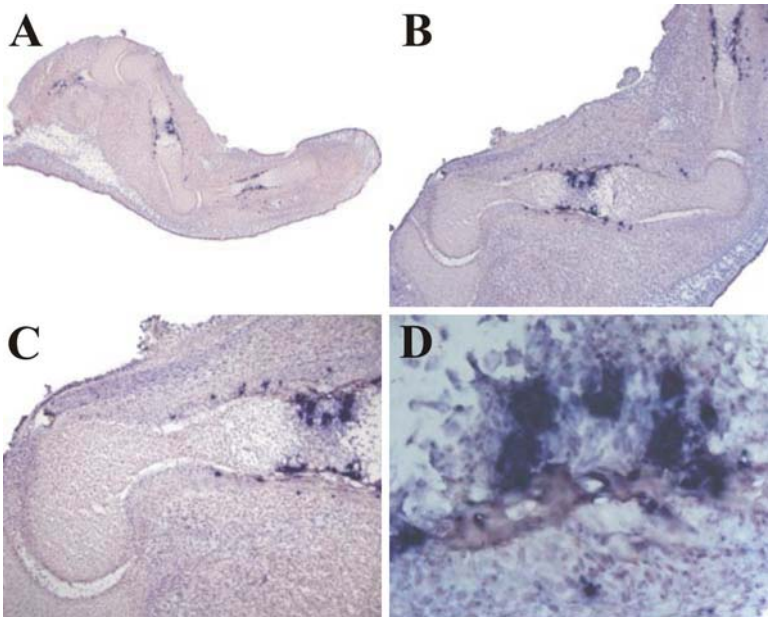

Abb. 3.4.: Expression von Trap (Tartrate-resistant acid phosphatase):
[Vergrößerungen: A: 25x , B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Trap ist ein Marker für Osteoklasten.

3.6. Runx2 und seine Expression im Knochen

Runx2 wird im embryonalen Humerus im Stadium 15,5 dpc. in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, im trabekulären Knochen, sowie im Stratum osteogenicum des Periosteums exprimiert.

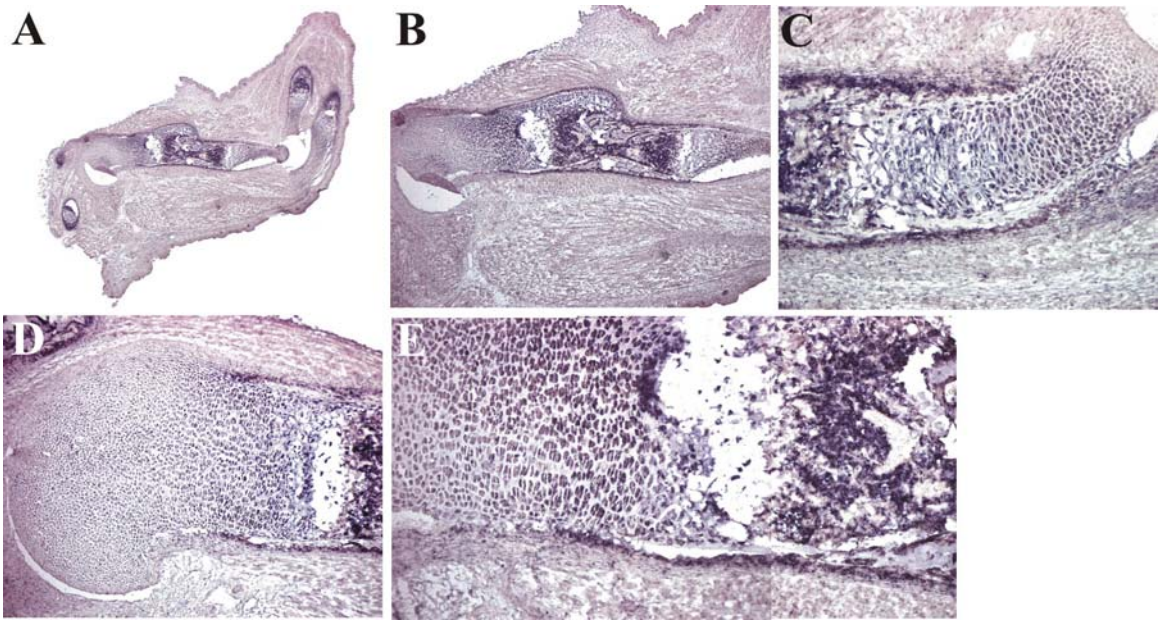

Abb. 3.5.: Expression von Runx2:
[Vergrößerungen: A: 25x , B: 50x, C: 100x, D: 100x, E: 200x]
Die Runx2-Sonde ergab ein Signal in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, sowie im trabekulären Knochen und im Stratum osteogenicum.

3.7. Einteilung der Gene nach ihrer Funktion aus Literaturangaben

Um die Kandidatengene sinnvoll darstellen zu können, wurden sie in Kategorien, die sich auf ihre Funktion in der Knorpel- und/oder Knochenentwicklung beziehen, eingeteilt. Die Gene wurden nach folgenden Kriterien sortiert:

- Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung
- Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung
- Gene mit Funktion in der Osteoblastendifferenzierung
- Gene mit Funktion in der Chondrozytendifferenzierung
- Gene mit Funktion in der Osteoklastendifferenzierung
- Gene mit Funktion in der Knochenentwicklung
- Gene mit möglicher Funktion in der Knochenentwicklung
- Gene mit bekannter Funktion
- Gene mit unbekannter Funktion

Jedes Gen wurde mit seinem Symbolnamen, seiner Ac.-Nr., den bekannten Synonymen und seiner Expression dargestellt.

Um die Kandidatengene zusätzlich besser in ihren Funktionen und Lokalisationen präsentieren zu können, wurde Gene Ontology (GO) mit einbezogen. Dies ermöglichte eine exakte Charakterisierung der einzelnen Haupt-, Teil- und Unterfunktionen, bzw. -lokalisationen.

Die drei Säulen von GO heißen "molecular function", "biological process", sowie "cellular component". Ein Genprodukt besitzt eine oder mehrere molekulare Funktionen und wird in einem oder mehreren biologischen Prozessen angewendet. Außerdem kann es mit einer oder mehreren zellulären Komponenten assoziiert sein.

Molecular function:

Die molekulare Funktion beschreibt Aktivitäten eines Genprodukts auf der molekularen Ebene, ohne näher auf den Ort oder die genaue Aktion einzugehen.

Biological process:

Ein biologischer Prozess beschreibt das eigentliche biologische Ziel, zu dem ein Genprodukt führt. Er kann aus mehreren molekularen Funktionen zusammengesetzt sein, spiegelt aber keinen Signalweg wieder, sondern lässt nur eine Unterordnung innerhalb eines Prozesses zu.

Cellular component:

Die zelluläre Komponente bezeichnet die Gruppen und Untergruppen von anatomischen Strukturen der Zelle, in denen die Genprodukte aktiv sind.

3.7.1. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung

AJ009862

Transforming growth factor, beta 1

Symb: Tgfb1

Syn.: Tgfß1

- protein binding (GO:0005515)
- growth factor activity (GO:0008083)
- transforming growth factor beta receptor binding (GO:0005160)
- cell growth (GO:0016049)
- cell proliferation (GO:0008283)
- growth (GO:0040007)
- regulation of cell cycle (GO:0000074)

- regulation of cell proliferation (GO:0042127)
- necrosis (GO:0008220)
- defense response (GO:0006952)
- negative regulation of cell proliferation (GO:0008285)
- inflammatory response (GO:0006954)
- protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)
- lymph gland development (GO:0007515)
- skeletal development (GO:0001501)
- transforming growth factor beta receptor signaling pathway (GO:0007179)
- myogenesis (GO:0007519)
- regulation of myogenesis (GO:0016202)
- regulation of protein-nucleus import (GO:0042306)
- organogenesis (GO:0009887)
- extracellular matrix (GO:0005578)
- extracellular space (GO:0005615)

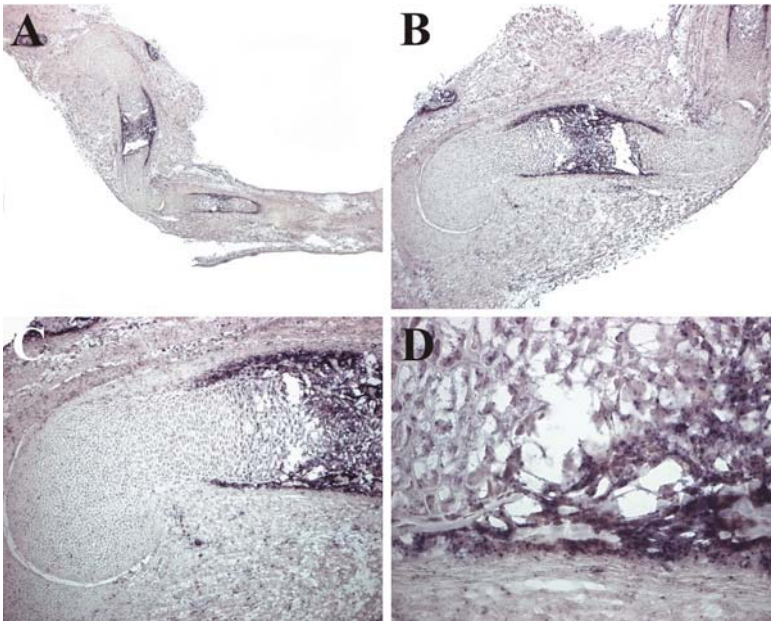

Abb. 3.6.: Expression von Tgfb (AJ009862)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Tgfb1 ist an der Regulierung der Knorpel- und Knochenentwicklung beteiligt [34,35]. Die Sonde ergab ein Signal im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen.

M31131

Cadherin 2

Symb.: Cdh2

Syn: N-Cadherin

- calcium ion binding (GO:0005509)
- cell adhesion (GO:0007155)
- homophilic cell adhesion (GO:0007156)
- membrane (GO:0016020)
- extracellular space (GO:0005615)
- integral to membrane (GO:0016021)
- adherens junction (GO:0005912)

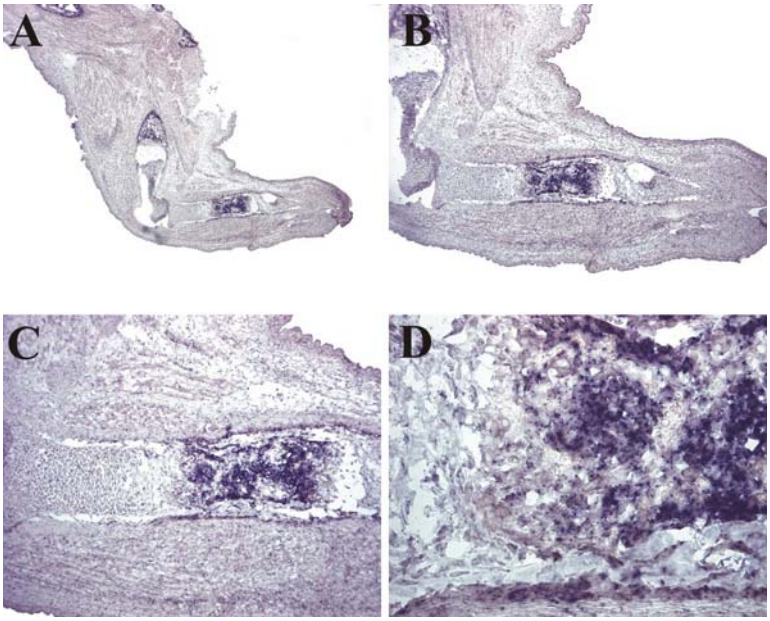

Abb. 3.7: Expression von Cdh2 (M31131)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Cdh2 ist an der Hauptvermittlung der mesenchymalen Kondensation beteiligt und ist ein wichtiger Faktor in der Osteoblastendifferenzierung [36]. Cdh2 konnte im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen nachgewiesen werden.

U67840

Distal-less homeobox 5

Symb.: Dlx5

- transcription factor activity (GO:0003700)
- DNA binding (GO:0003677)
- development (GO:0007275)
- limb morphogenesis (GO:0030326)
- neurogenesis (GO:0007399)
- regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)
- axonogenesis (GO:0007409)
- inner ear morphogenesis (GO:0042472)
- nucleus (GO:0005634)
- transcription factor complex (GO:0005667)

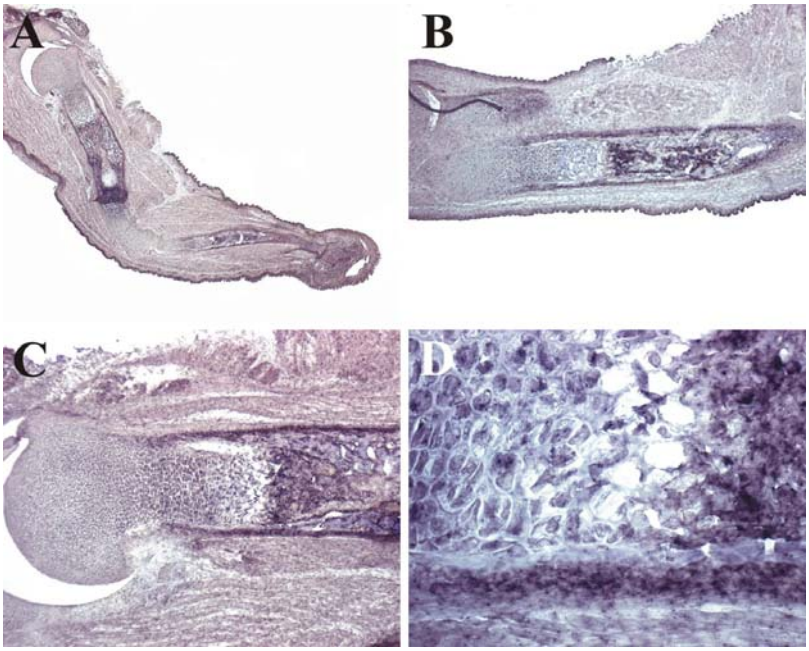

Abb. 3.8: Expression von Dlx5 (U67840)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-prähypertrophe Chondrozyten-hypertrophe Chondrozyten

Dlx5 ist ein Regulator der Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung [37-39]. In der *ISH* wurde Dlx5 im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen, sowie in den prähyper- und hypertrophen Chondrozyten exprimiert.

3.7.2. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung

AW061016

Vitamin D receptor

Symb.: Vdr

- receptor activity (GO:0004872)
- transcription factor activity (GO:0003700)
- DNA binding (GO:0003677)
- ligand-dependent nuclear receptor activity (GO:0004879)
- steroid hormone receptor activity (GO:0003707)
- development (GO:0007275)
- transcription (GO:0006350)
- skeletal development (GO:0001501)
- calcium ion homeostasis (GO:0006874)
- regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)
- calcium ion transport (GO:0006816)
- organogenesis (GO:0009887)
- nucleus (GO:0005634)

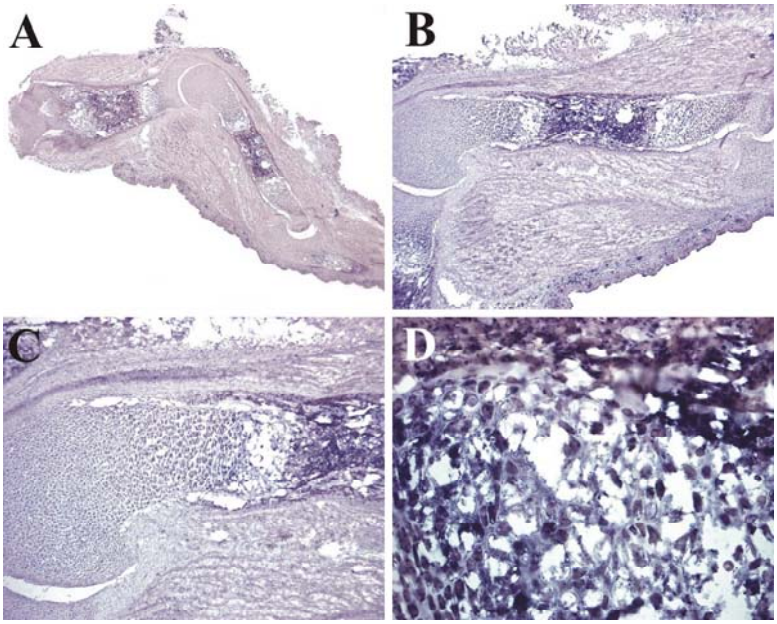

Abb. 3.9.: Expression von Vdr (AW061016)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-prähypertrophe Chondrozyten-hypertrophe Chondrozyten

Vdr ist ein Liganden-induzierender Transkriptionsfaktor. Es ergab sich ein Signal im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen, als auch in den prähyper- und hypertrophen Chondrozyten.

X13986

Secreted phosphoprotein 1

Symb.: Spp1

Syn.: Opn (Osteopontin), Minopontin, Apl-1, ETA-1, BSPI, Ric

- cytokine activity (GO:0005125)
- cell adhesion (GO:0007155)
- ossification (GO:0001503)
- extracellular space (GO:0005615)

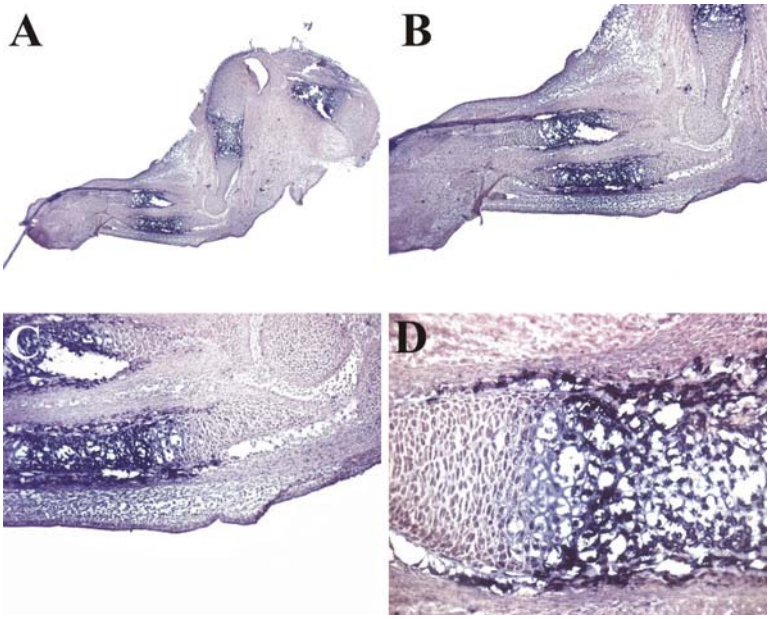

Abb. 3.10.: Expression von Spp1 (X13986)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-hypertrophe Chondrozyten

Spp1 ist an der Regulierung des Kalziumhaushaltes beteiligt [40]. Es wurde eine Expression im Stratum osteogenicum, im trabekulären Knochen und in den hypertrophen Chondrozyten gefunden.

3.7.3. Gene mit Funktion in der Osteoblastendifferenzierung

AF030433

Dickkopf 1

Symb.: Dkk1

- development (GO:0007275)
- Wnt receptor signaling pathway (GO:0016055)
- extracellular (GO:0005576)
- extracellular space (GO:0005615)

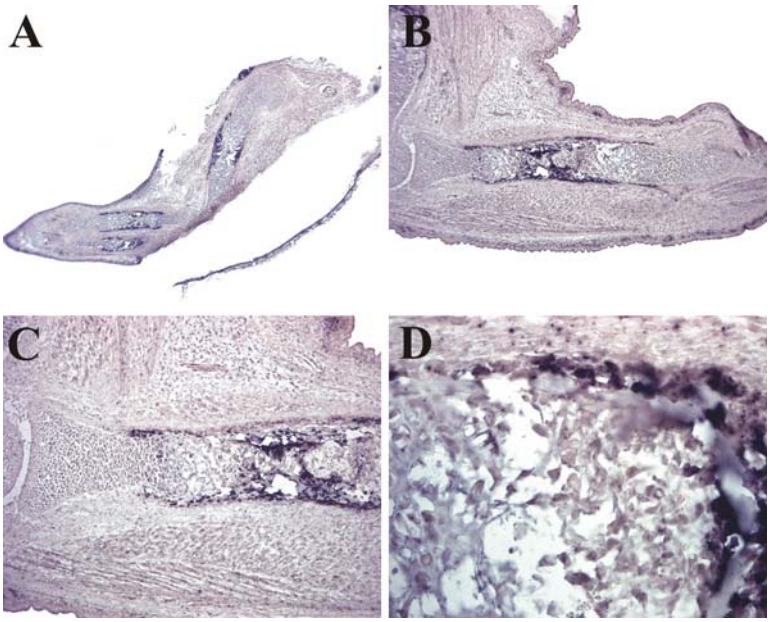

Abb. 3.11.: Expression von Dkk1 (AF030433)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-Osteozyten

Dkk1 ist an der Osteoblastendifferenzierung beteiligt [41]. Eine Expression von Dkk1 wurde in den Osteoblasten des Stratum osteogenicum und in Osteozyten festgestellt.

L20232

Integrin binding sialoprotein

Symb.: Ibsp

Syn.: Bsp (Bone sialoprotein 2)

- Protein binding
- cell adhesion (GO:0007155)
- integrin-mediated signaling pathway (GO:0007229)
- ossification (GO:0001503)
- extracellular space (GO:0005615)

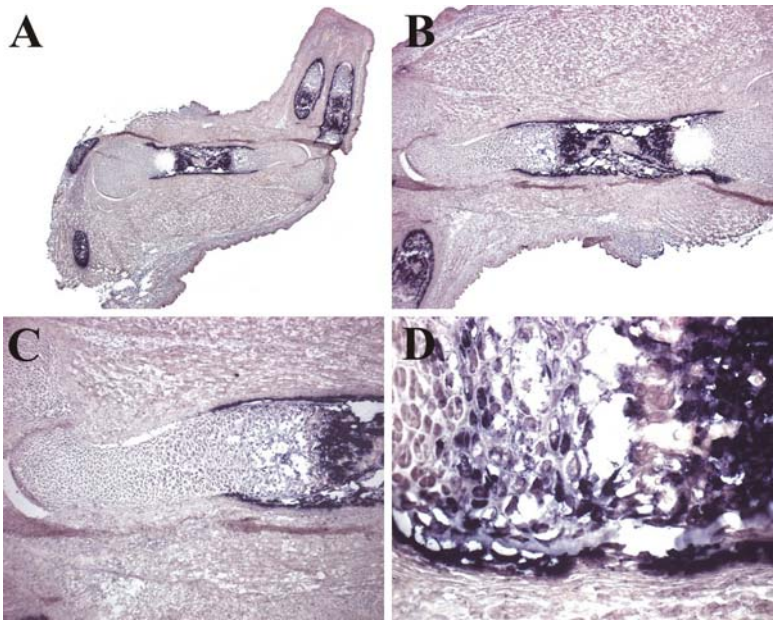

Abb. 3.12.: Expression von Ibsp (L20232)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-terminal hypertrophe Chondrozyten

Ibsp spielt eine Rolle in der Differenzierung von Osteoblasten und der Knochenmatrix-Mineralisierung [13]. In der *ISH* wurde es im Stratum osteogenicum, dem trabekulären Knochen und den terminal hypertrophen Chondrozyten exprimiert.

3.7.4. Gene mit Funktion in der Chondrozytendifferenzierung

M89798

Wingless-related MMTV integration site 5A

Symb.: Wnt5a

- signal transducer activity (GO:0004871)
- receptor binding (GO:0005102)
- development (GO:0007275)
- cell-cell signaling (GO:0007267)
- signal transduction (GO:0007165)
- limb morphogenesis (GO:0030326)
- Wnt receptor signaling pathway (GO:0016055)
- frizzled-2 signaling pathway (GO:0007223)
- lung development (GO:0030324)
- embryonic morphogenesis (GO:0009795)
- organogenesis (GO:0009887)
- extracellular (GO:0005576)
- extracellular space (GO:0005615)

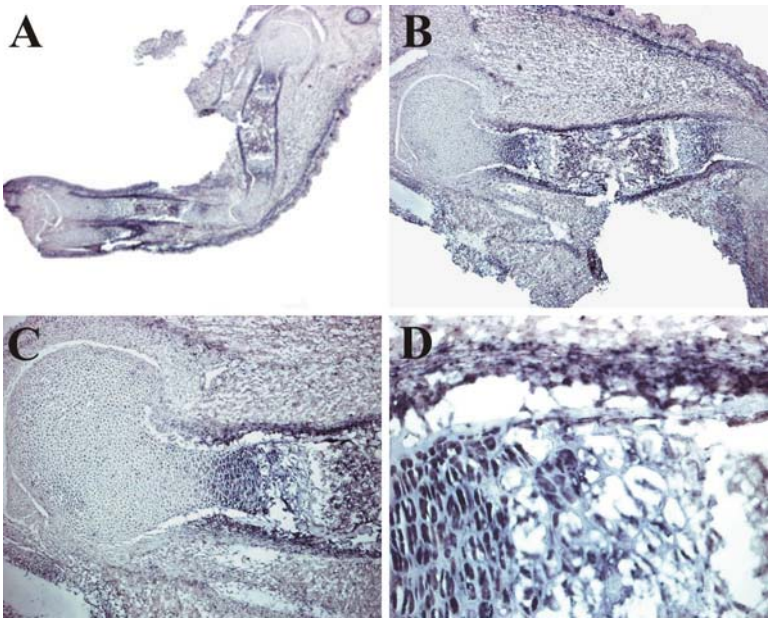

Abb. 3.13.: Expression von Wnt5a (M89798)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal.: Stratum fibrosum-Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-prähypertrophe Chondrozyten

Wnt ist an der Regulierung der Chondrozytendifferenzierung beteiligt [42]. Wnt5a konnte im Stratum fibrosum und osteogenicum, sowie im trabekulären Knochen und den prähypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden.

X61385

Transcription factor 7, T-cell specific

Symb.: Tcf7

Syn.: Tcf1, Hnf1

- transcription factor activity (GO:0003700)
- DNA binding (GO:0003677)
- regulation of cell proliferation (GO:0042127)
- Wnt receptor signaling pathway (GO:0016055)
- regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)
- regulation of apoptosis (GO:0042981)
- nucleus (GO:0005634)
- transcription factor complex (GO:0005667)

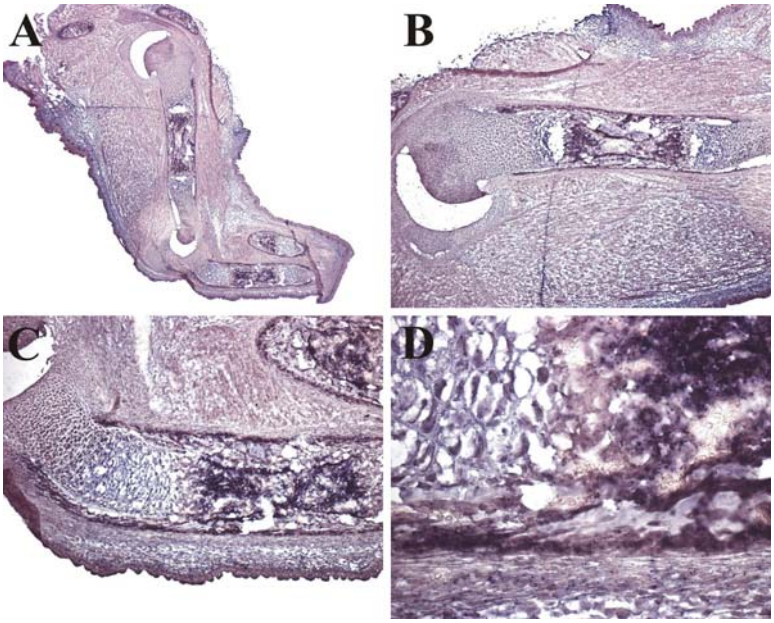

Abb. 3.14.: Expression von Tcf7 (X61385)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Auch Tcf, der eine entscheidende Rolle im Wnt-Signaltransduktionsweg spielt, ist an der Regulierung der Chondrozytendifferenzierung beteiligt [43]. Für Tcf7 wurde eine Expression im trabekulären Knochen, sowie im Stratum osteogenicum gefunden.

X76291

Indian hedgehog

Symb.: Ihh

- signal transducer activity (GO:0004871)
- hydrolase activity (GO:0016787)
- peptidase activity (GO:0008233)
- cell communication (GO:0007154)
- development (GO:0007275)
- cell-cell signaling (GO:0007267)
- pattern specification (GO:0007389)
- proteolysis and peptidolysis (GO:0006508)
- protein splicing (GO:0016539)
- extracellular space (GO:0005615)

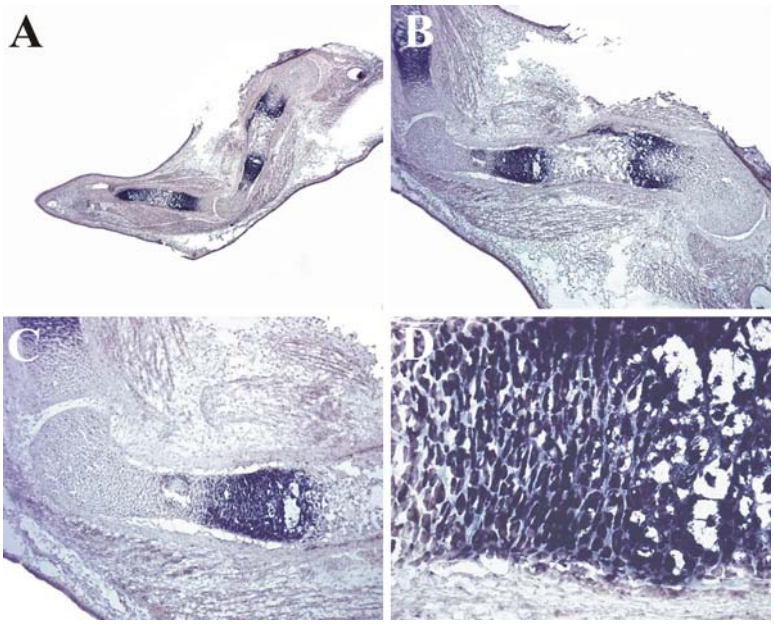

Abb. 3.15.: Expression von Ihh (X76291)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: prähypertrophe Chondrozyten-anfänglich hypertrophe Chondrozyten

Ihh ist ein bekannter Regulator der Chondrozytendifferenzierung [12,13]. Eine Expression von Ihh wurde in den prähypertrophen und anfänglich hypertrophen Chondrozyten detektiert.

3.7.5. Gene mit Funktion in der Osteoklastendifferenzierung

J04953

Gelsolin

Symb.: Gsn

- actin binding (GO:0003779)
- nucleus (GO:0005634)

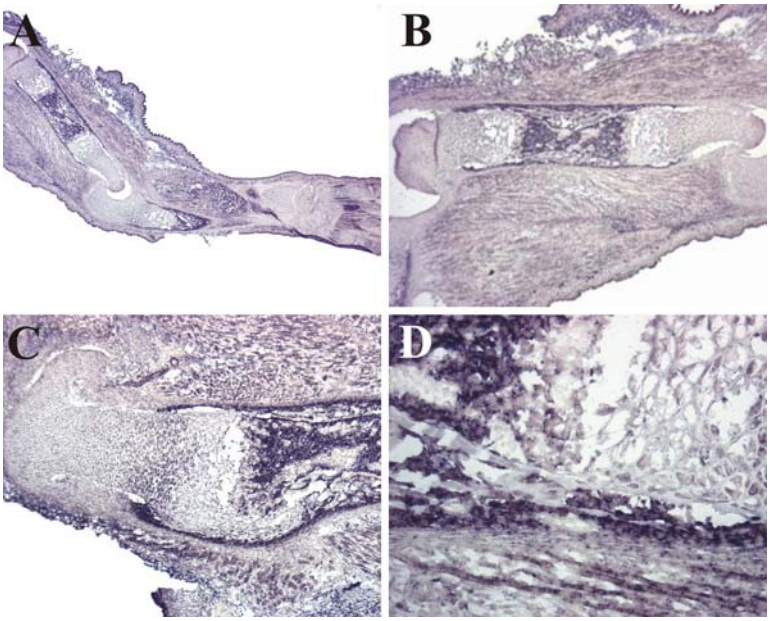

Abb. 3.16.: Expression von Gsn (J04953)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Strat. osteogenicum-trabekulärer Knochen-schwach prähypertrophe Chondrozyten

Gsn spielt eine wichtige Rolle in der Aktinfilamentorganisation und –motilität in vielen Zellarten, u.a. den Osteoklasten [44]. Es wurde ein Signal im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen, sowie ein schwaches Signal in prähypertrophen Chondrozyten gefunden.

M99054

Tartrate-resistant acid phosphatase

Symb.: Trap

Syn.: Acp5 (Acid phosphatase 5), T5AP (Type-5 Acid phosphatase)

- extracellular space (GO:0005615GO)
- lysosome (GO:0005764)
- acid phosphatase activity (GO:0003993)
- hydrolase activity (GO:0016787)

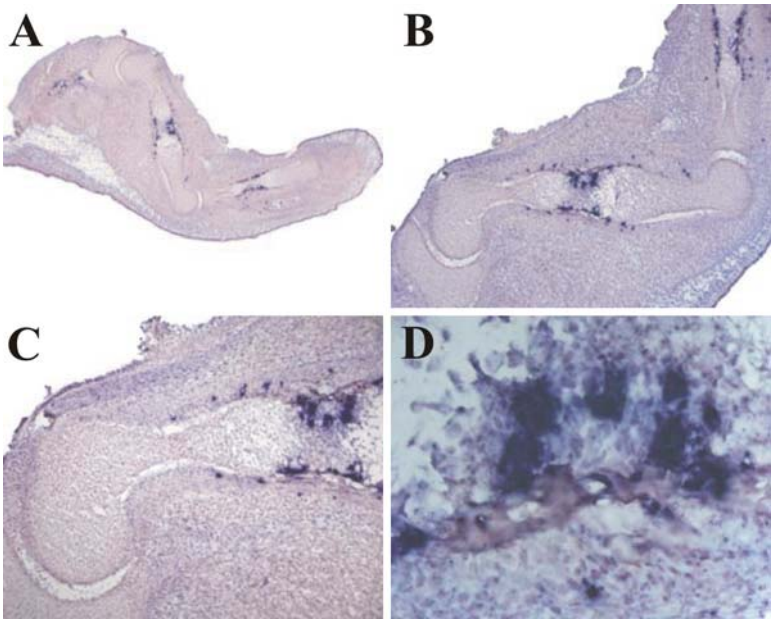

Abb. 3.17.: Expression von Trap (M99054)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Osteoklasten

Die Expression von Trap ist mit der Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten assoziiert [45]. Trap wird in Osteoklasten exprimiert.

U49513

Chemokine ligand 9

Symb.: Ccl9

Syn.: CCF-18, MIP-1gamma, Mrp2

- cytokine activity (GO:0005125)
- chemokine activity (GO:0008009)
- signal transduction (GO:0007165)
- chemotaxis (GO:0006935)
- immune response (GO:0006955)
- extracellular (GO:0005576)
- extracellular space (GO:0005615)

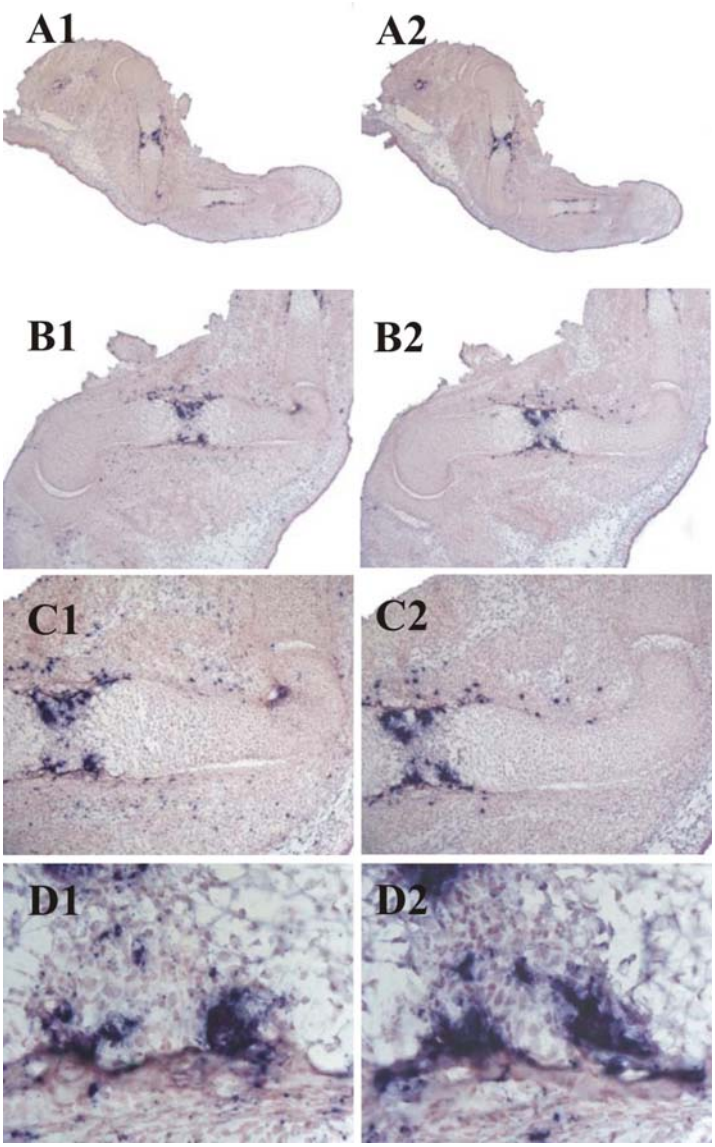

Abb. 3.18.: Expression von Ccl9 (U49513) im Vergleich zu Trap
[Vergrößerungen: A1/2: 25x, B1/2: 50x, C1/2: 100x, D1/2: 400x]
(Abb. A1-D1: Ccl9 – Abb. A2-D2: Trap)
Signal: Osteoklasten

Ccl9 ist an der Adipogenese beteiligt [46] und stimuliert die zytoplasmatische Motilität (Beweglichkeit) und Polarisation der Osteoklasten [47]. Das Signal von Ccl9 wurde in Osteoklasten und deren Vorläuferzellen gefunden.

3.7.6. Gene mit Funktion in der Knochenentwicklung

D10837

Lysyl Oxydase

Symb.: Lox

Syn.: Lipooxygenase, TSC60, rrg (ras recision gene)

- oxidoreductase activity (GO:0016491)
- copper ion binding (GO:0005507)
- protein-lysine 6-oxidase activity (GO:0004720)
- extracellular space (GO:0005615)

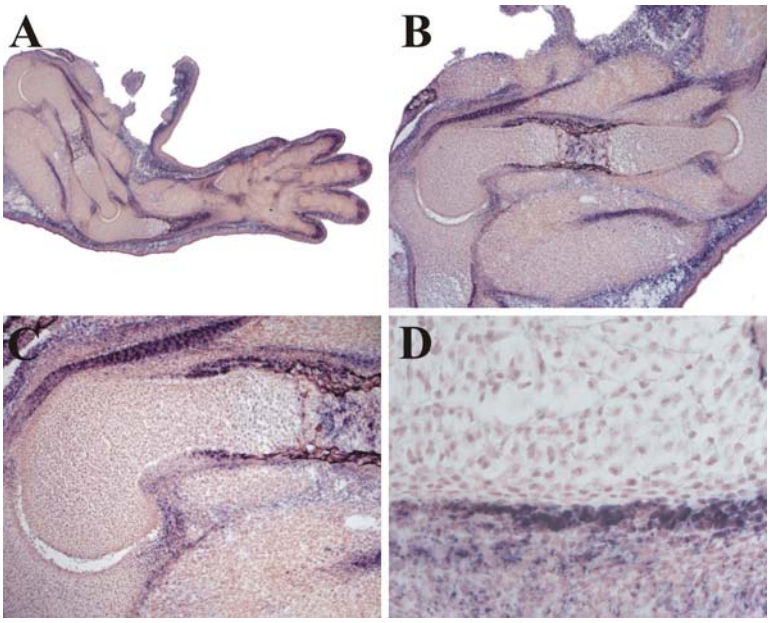

Abb. 3.19.: Expression von Lox (D10837)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal**:** Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Lox ist für die Querverbindungen in Kollagenen und Elastinen verantwortlich [48] und wandelt dort spezifische Lysinereste zu reaktiven Aldehydgruppen um [49]. In der *ISH* wurde im Knochen ein Signal im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen nachgewiesen.

X66473

Matrix metalloproteinase 13

Symb.: Mmp13

Syn.: Collagenase-3

- hydrolase activity (GO:0016787)
- calcium ion binding (GO:0005509)
- zinc ion binding (GO:0008270)
- metallopeptidase activity (GO:0008237)
- metalloendopeptidase activity (GO:0004222)
- interstitial collagenase activity (GO:0004232)
- proteolysis and peptidolysis (GO:0006508)
- collagen catabolism (GO:0030574)
- extracellular matrix (GO:0005578)
- extracellular space (GO:0005615)

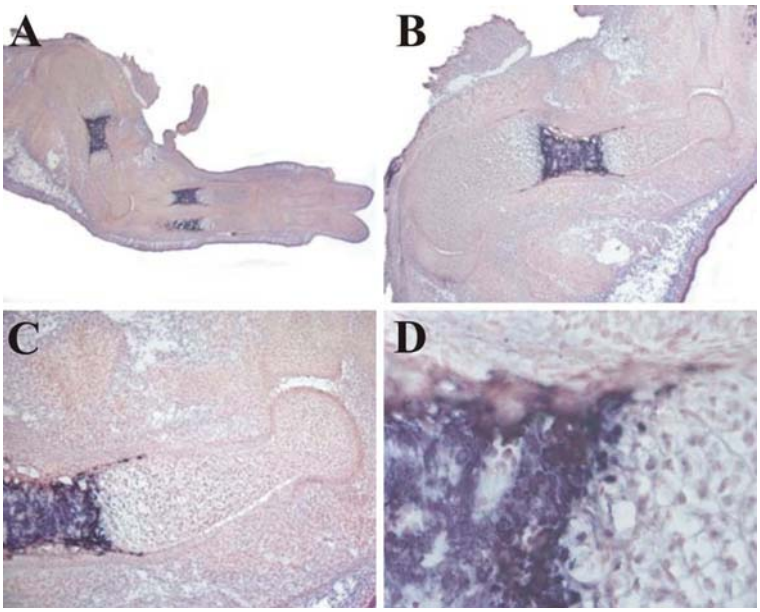

Abb. 3.20.: Expression von Mmp13 (X66473)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-terminal hypertrophe Chondrozyten

Mmp13 scheint an der Knochenresorption der Osteoklasten beteiligt zu sein [50]. Es wurde eine Expression im trabekulären Knochen, Stratum osteogenicum und den terminal hypertrophen Chondrozyten festgestellt.

3.7.7. Gene mit möglicher Funktion in der Knochenentwicklung

AW122703

Unc-5 homolog B (C. elegans)

Symb.: Unc5b

Syn.: Unc5h2

- receptor activity (GO:0004872)
- integral to membrane (GO:0016021)

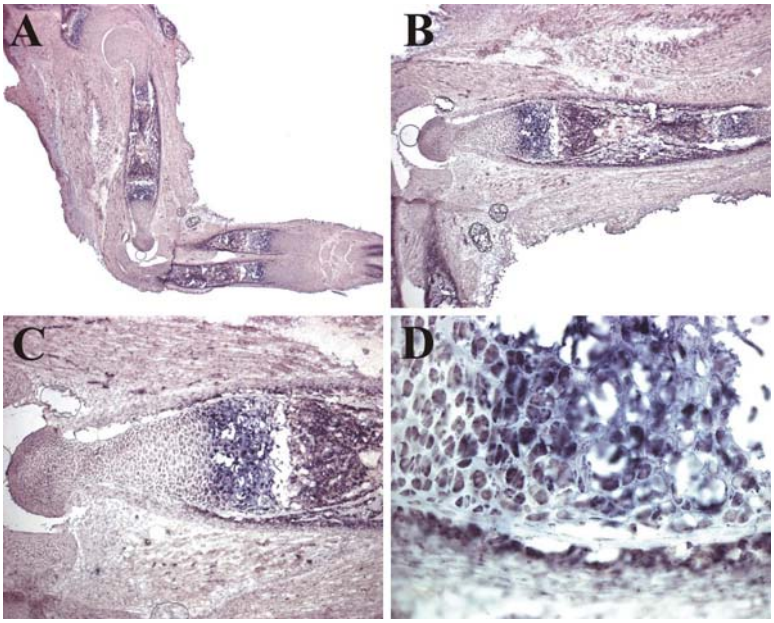

Abb. 3.21.: Expression von Unc5b (AW122703)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-prähypertrophe Chondrozyten-hypertrophe Chondrozyten

Unc5b bindet direkt an Netrin-1 [51]. Netrin und Unc5b regulieren neuronale und axonale Wanderung im Embryo [52]. Eine Expression von Unc5b wurde im Stratum osteogenicum, im trabekulären Knochen, sowie in den prähyper- und hypertrophen Chondrozyten gefunden.

AW124651

Special AT-rich sequence binding protein 2

Symb.: Satb2

- molecular-function unknown (GO:0005554)
- transcription factor activity (GO:0003700)
- DNA binding (GO:0003677)
- biological-process unknown (GO:0000004)
- development (GO:0007275)
- regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)
- cellular-component unknown (GO:0008372)
- nucleus (GO:0005634)

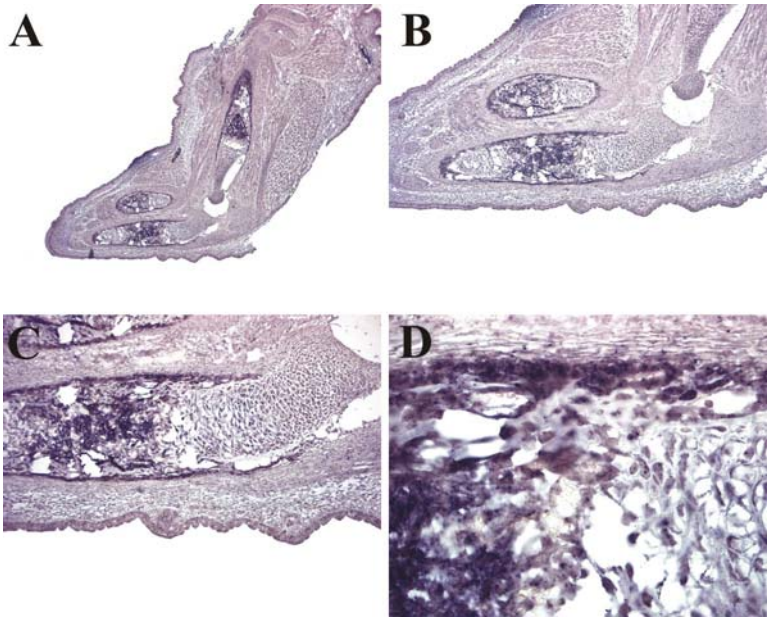

Abb. 3.22.: Expression von Satb2 (AW124651)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Man nimmt an, dass Satb2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gaumens spielt [53]. Es wurde im trabekulären Knochen und Stratum osteogenicum exprimiert.

J03023

Hemopoietic cell kinase

Symb.: Hck

Syn.: Bmk

- transferase activity (GO:0016740)
- protein kinase activity (GO:0004672)
- protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674)
- protein-tyrosine kinase activity (GO:0004713)
- ATP binding (GO:0005524)
- intracellular signaling cascade (GO:0007242)
- protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)

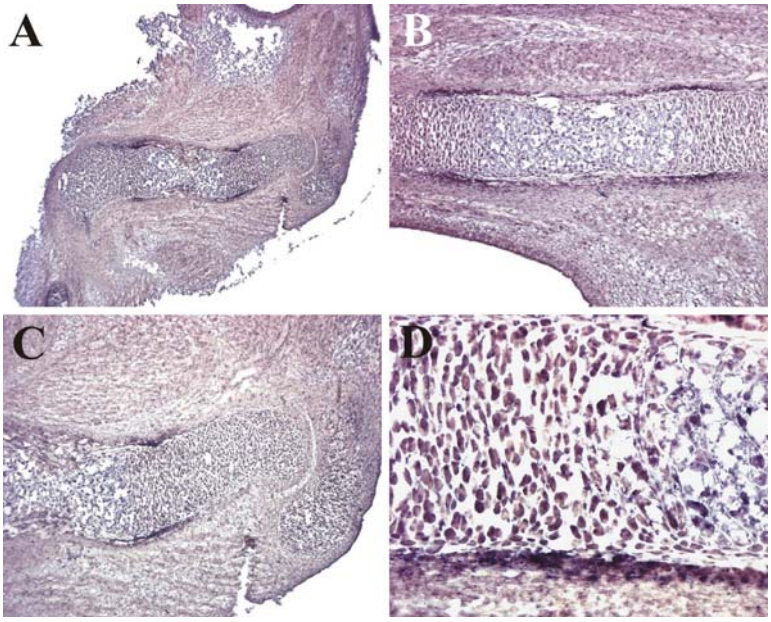

Abb. 3.23.: Expression von Hck (J03023)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum, flankierend zu prähypertrophen Chondrozyten

Hck gehört zur Familie der Src-Protein-Tyrosin-Kinasen. Diese spielen eine Rolle in knochenresorbierenden Osteoklasten [54,55]. Allerdings wurde Hck im Stratum osteogenicum gefunden. Das Signal war flankierend zu den prähypertrophen Chondrozyten.

L13171

Myocyte enhancer factor 2C

Symb.: Mef2c

- protein binding (GO:0005515)
- transcription factor activity (GO:0003700)
- DNA binding (GO:0003677)
- transcription coactivator activity (GO:0003713)
- RNA polymerase II transcription factor activity (GO:0003702)
- transcription (GO:0006350)
- neurogenesis (GO:0007399)
- muscle development (GO:0007517)
- regulation of transcription, DNA-dependent (GO:0006355)
- transcription from Pol II promoter (GO:0006366)
- nucleus (GO:0005634)

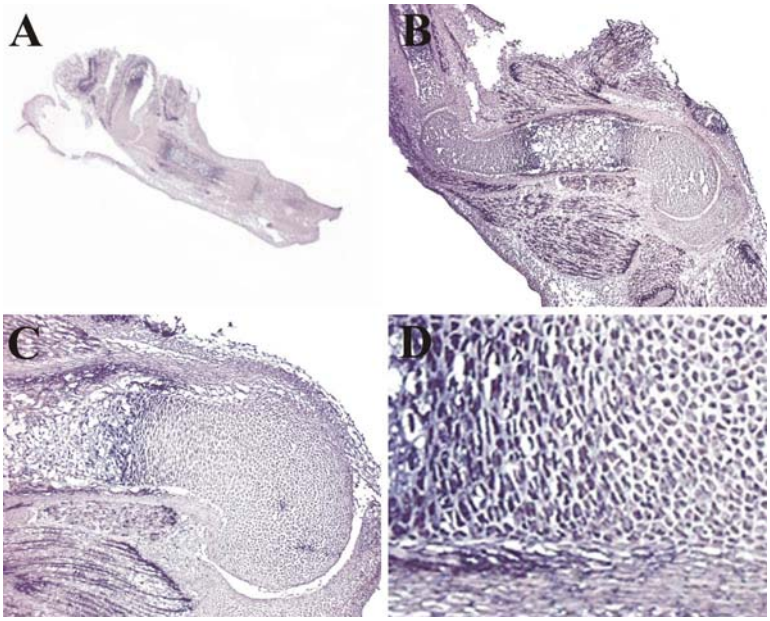

Abb. 3.24.: Expression von Mef2c (L13171)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-hypertrophe Chondrozyten-prähypertrophe Chondrozyten

Mef2 ist an der Regulierung der Myogenese beteiligt [56]. Zusätzlich zu einem Signal im Muskel, wurde ein Signal in den prähyper- und hypertrophen Chondrozyten und im Stratum osteogenicum festgestellt.

M36579

S100 calcium binding protein A4

Symb.: S100A4

Syn.: Calvasculin, CAPL, FSp1, Mts1

- calcium ion binding (GO:0005509)

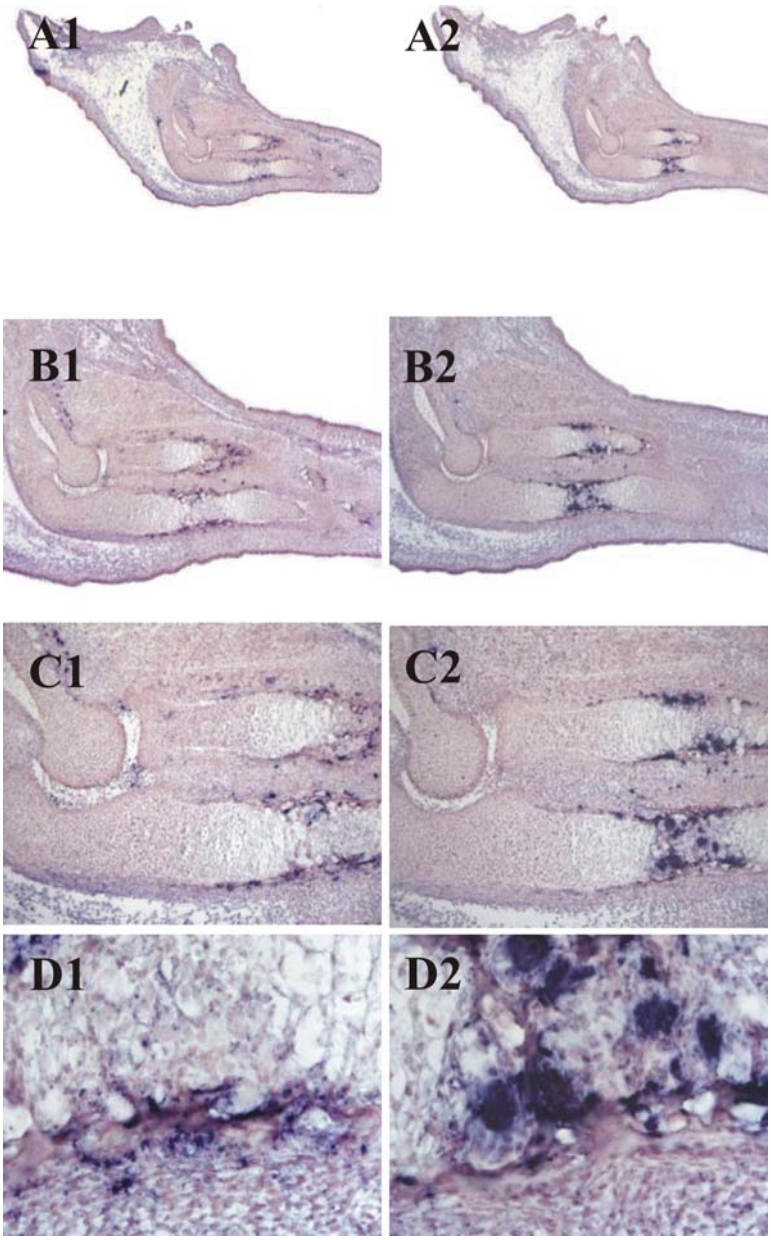

Abb. 3.25.: Expression von S100A4 (M36579) im Vergleich zu Trap
[Vergrößerungen: A1/2: 25x, B1/2: 50x, C1/2: 100x, D1/2: 400x]
(Abb. A1-D1: S100A4 – Abb. A2-D2: Trap)
Signal: Osteoklasten

Die S100-Proteine sind in verschiedenste zelluläre Funktionen involviert, u.a. Signaltransduktion, Interaktionen des Zytoskeletts, Zellproliferation, Krebsmetastasierung

und Zell-zu-Zell-Kommunikation [57]. S100A4 konnte in Osteoklasten und deren Vorläuferzellen nachgewiesen werden.

M68513

Ephrin receptor A3

Symb.: Epha3

Syn.: CEK-4, ETK-1, Hek, Tyro4, Mek4

- transferase activity (GO:0016740)
- receptor activity (GO:0004872)
- protein kinase activity (GO:0004672)
- protein serine/threonine kinase activity (GO:0004674)
- protein-tyrosine kinase activity (GO:0004713)
- ATP binding (GO:0005524)
- ephrin receptor activity (GO:0005003)
- transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)
- protein amino acid phosphorylation (GO:0006468)
- membrane (GO:0016020)
- extracellular space (GO:0005615)
- integral to membrane (GO:0016021)

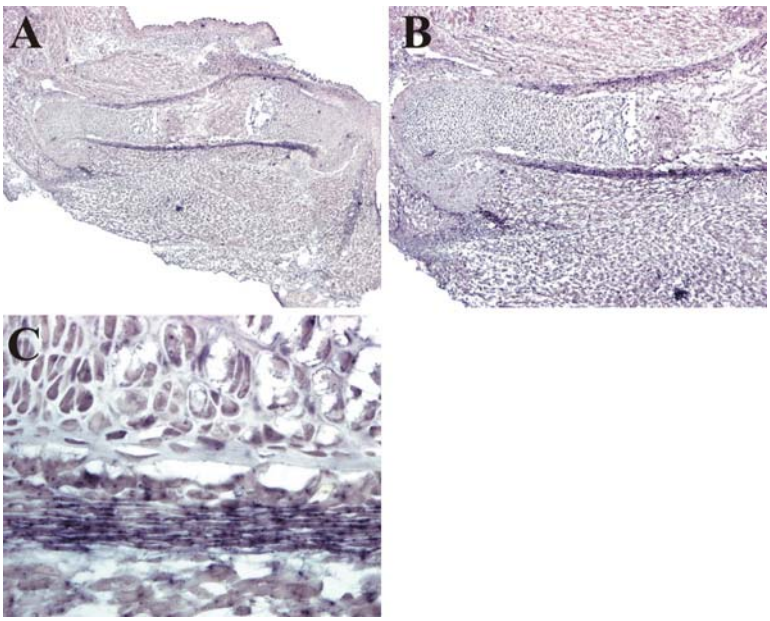

Abb. 3.26.: Expression von Epha3 (M68513)
[Vergrößerungen: A: 50x, B: 100x, C: 400x]
Signal.: Periost (Stratum fibrosum)-Perichondrium

Eph/ Ephrine scheinen die Knorpelmorphogenese zu beeinflussen [58]. Ephrine sind an der Regulierung von MCSF (Makrophage colony stimulating factor) beteiligt [59]. Epha3 wurde im Stratum fibrosum und im Perichondrium gefunden.

U20238

RAS p21 protein activator 3

Symb.: Rasa3

Syn.: Gap3

- GTPase activator activity (GO:0005096)
- intracellular signaling cascade (GO:0007242)

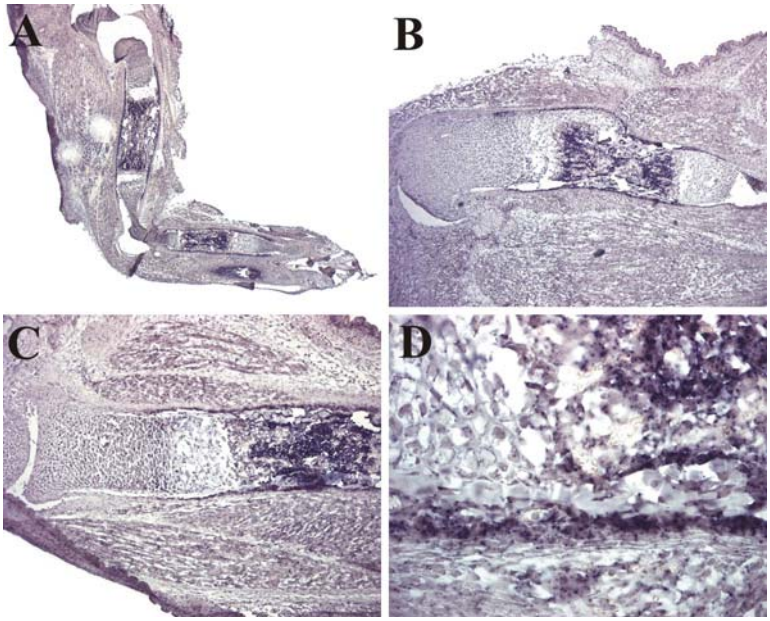

Abb. 3.27.: Expression von Rasa3 (U20238)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Ras p21 inhibiert selektiv die Src-Familie der Tyrosinkinasen [17]. Eine Expression von Rasa3 wurde im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen detektiert.

3.7.8. Gene mit bekannter sonstiger Funktion

AI746846

Sorting nexin 10

Symb.: Snx10

- protein transporter activity (GO:0008565)
- transport (GO:0006810)
- intracellular signaling cascade (GO:0007242)
- protein transport (GO:0015031)
- intracellular protein transport (GO:0006886)

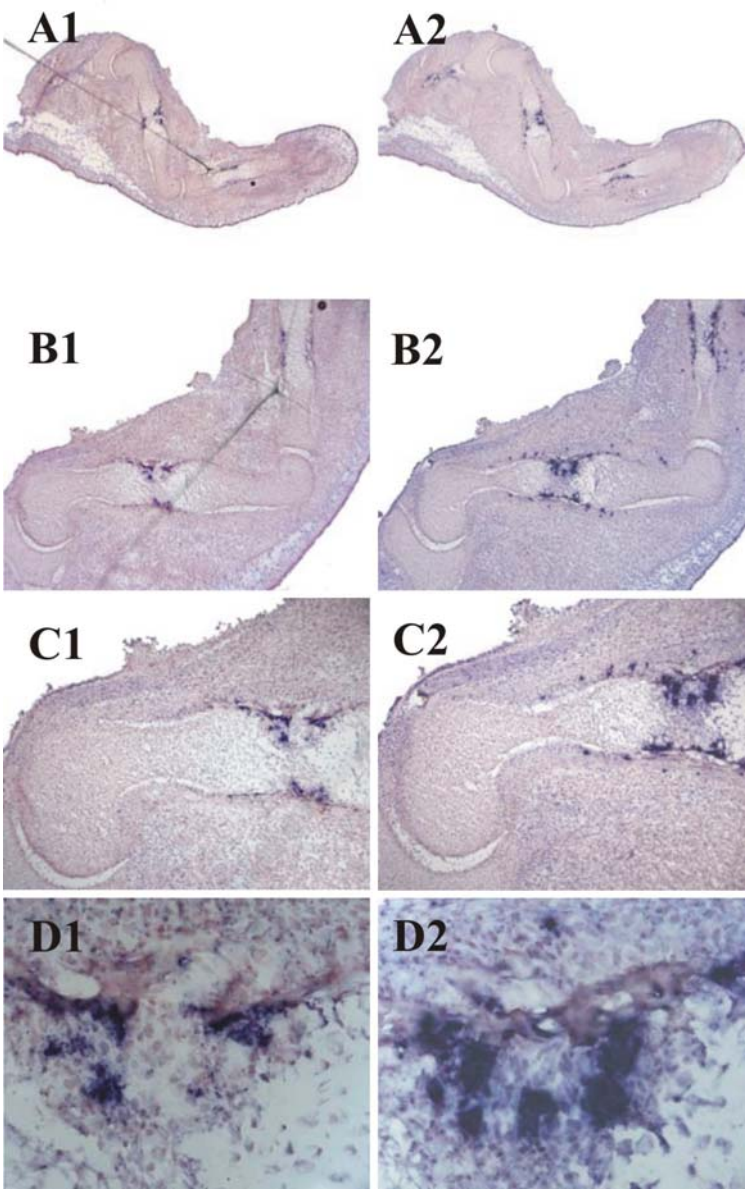

Abb. 3.28.: Expression von Snx10 (AI746846) im Vergleich zu Trap
[Vergrößerungen: A1/2: 25x, B1/2: 50x, C1/2: 100x, D1/2: 400x]
(Abb. A1-D1: Snx10 – Abb. A2-D2: Trap)
Signal: Osteoklasten

Die Familie der Sorting-Nexin-Proteine ist an der Regulierung von Rezeptorabbauvorgängen und am Membrantransport in der Zelle beteiligt [60]. Snx10 wird in Osteoklasten exprimiert.

AI852765

Glypican 1

Symb.: Gpc1

Syn.: Lipid-linked heparan sulfate proteoglycans

- extracellular matrix (GO:0005578)
- extracellular space (GO:0005615)

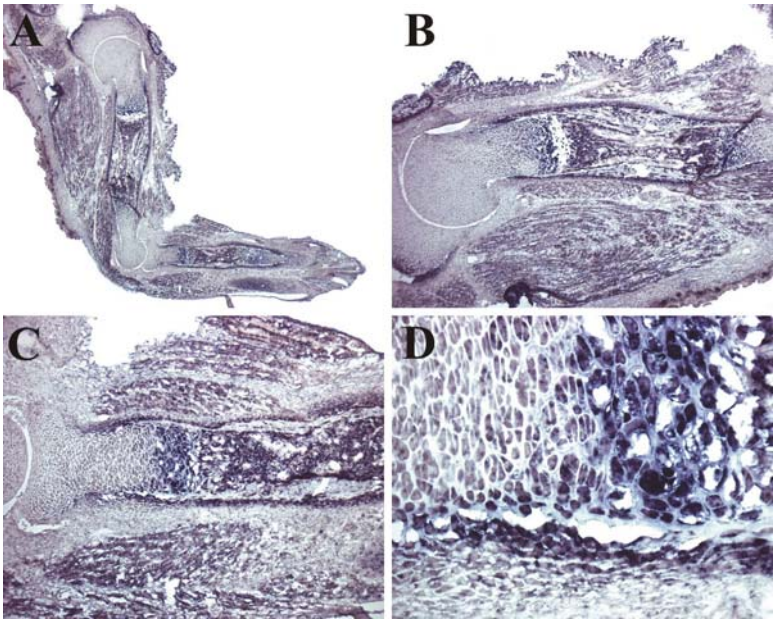

Abb. 3.29.: Expression von Gpc1 (AI852765)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-hypertrophe Chondrozyten

Glypicane spielen ein Rolle in der Fgf-Signaltransduktion [61] und sind wichtig für das Wachstum und die Entwicklung des Gehirns [62]. Das Signal von Gpc1 wurde im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen, sowie in hypertrophen Chondrozyten gefunden.

AI854020

Cysteine Dioxygenase 1

Symb.: Cdo1

Syn.: L-Cysteine Oxygen Oxidoreductase

- oxidoreductase activity (GO:0016491)
- electron carrier activity (GO:0009055)
- oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen (GO:0016702)
- cysteine dioxygenase activity (GO:0017172)
- taurine metabolism (GO:0019530)
- L-cysteine catabolism to taurine (GO:0019452)
- cytosol (GO:0005829)

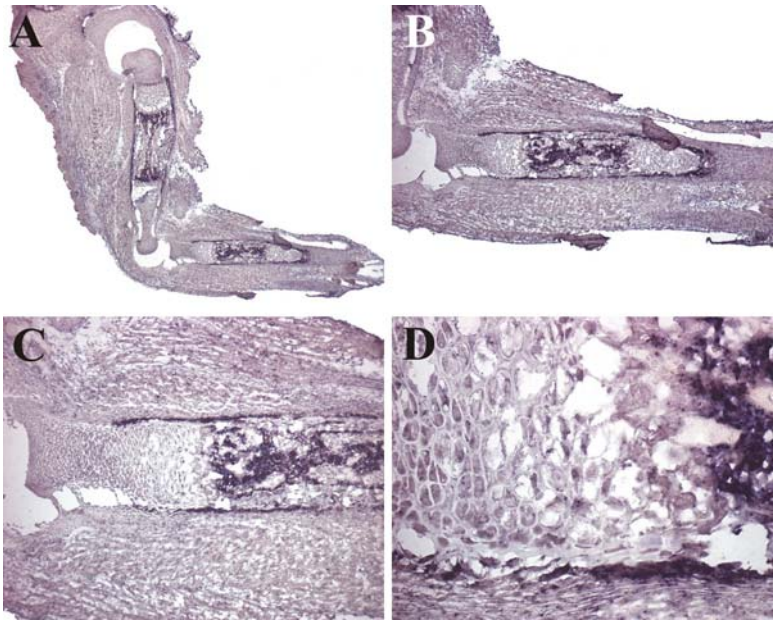

Abb. 3.30.: Expression von Cdo1 (AI854020)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Cdo1 wird im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen exprimiert.

M12379

Thymus cell antigen, theta

Symb.: Thy1

Syn.: CD90, Thy 1.2, Thy-1, Thy1.1

- external side of plasma membrane (GO:0009897)
- membrane (GO:0016020)

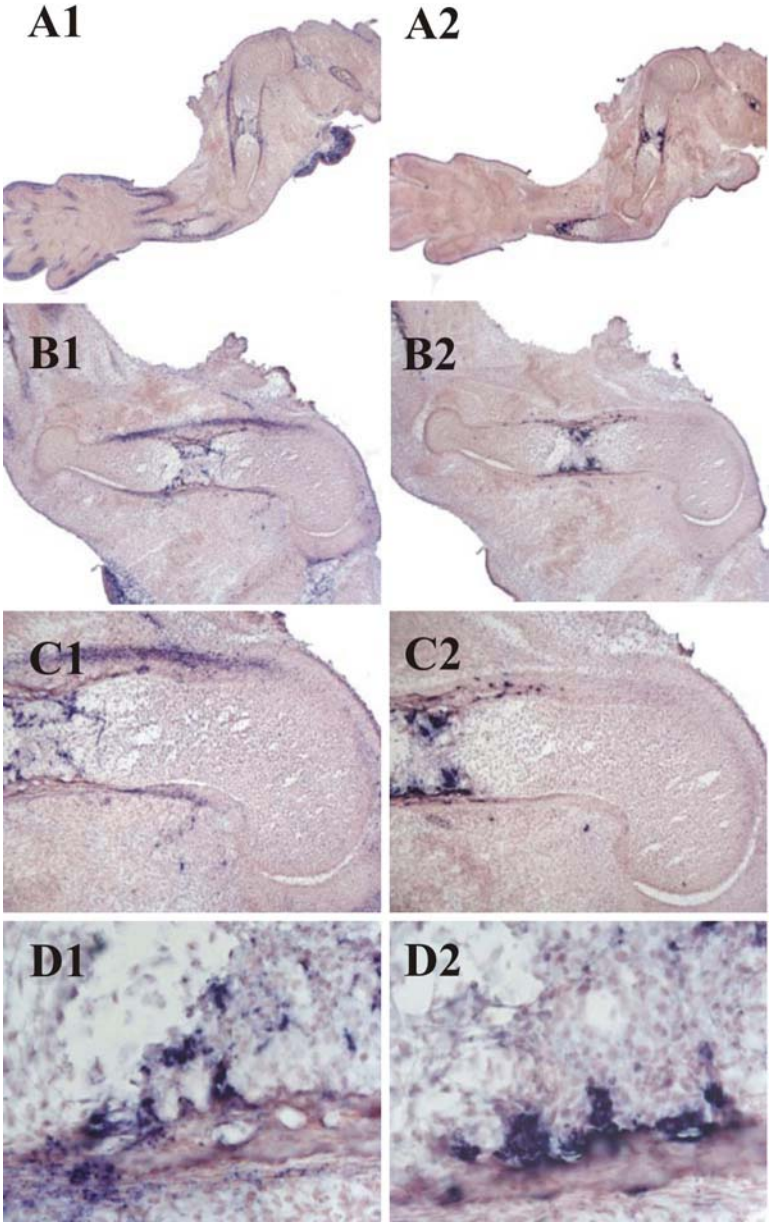

Abb. 3.31.: Expression von Thy1 (M12379) im Vergleich zu Trap
[Vergrößerungen: A1/2: 25x, B1/2: 50x, C1/2: 100x, D1/2: 400x]
(Abb. A1-D1: Thy1 – Abb. A2-D2: Trap)
Signal: Stratum fibrosum-Osteoklasten

Thy1 wird im Stratum fibrosum und Osteoklasten exprimiert.

U13705

Glutathione peroxidase 3

Symb.: Gpx3

- oxidoreductase activity (GO:0016491)
- peroxidase activity (GO:0004601)
- glutathione peroxidase activity (GO:0004602)
- response to oxidative stress (GO:0006979)
- extracellular space (GO:0005615)

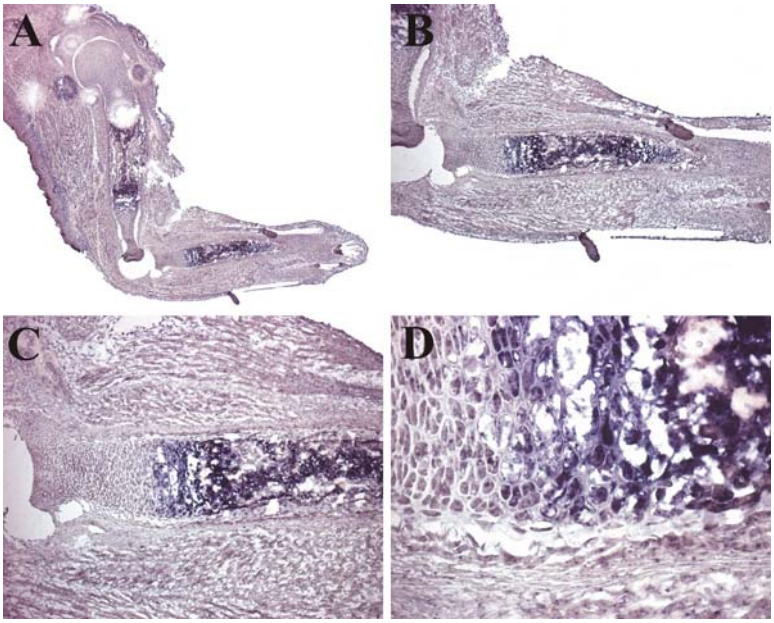

Abb. 3.32.: Expression von Gpx3 (U13705)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen-hypertrophe Chondrozyten

Gpx katalysiert die Reduktion von H_2O_2 (Wasserstoff-Peroxidase) und schützt somit Zellen vor oxidativer Beschädigung [63]. Gpx3 konnte im Stratum osteogenicum, im trabekulären Knochen und in den hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden.

U38501

Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1

Symb.: Gnai1

Syn.: Gialpha1, Adenylate cyclase inhibitory protein

- signal transducer activity (GO:0004871)
- GTP binding (GO:0005525)
- heterotrimeric G-protein GTPase activity (GO:0003927)
- signal transduction (GO:0007165)
- G-protein coupled receptor protein signaling pathway (GO:0007186)

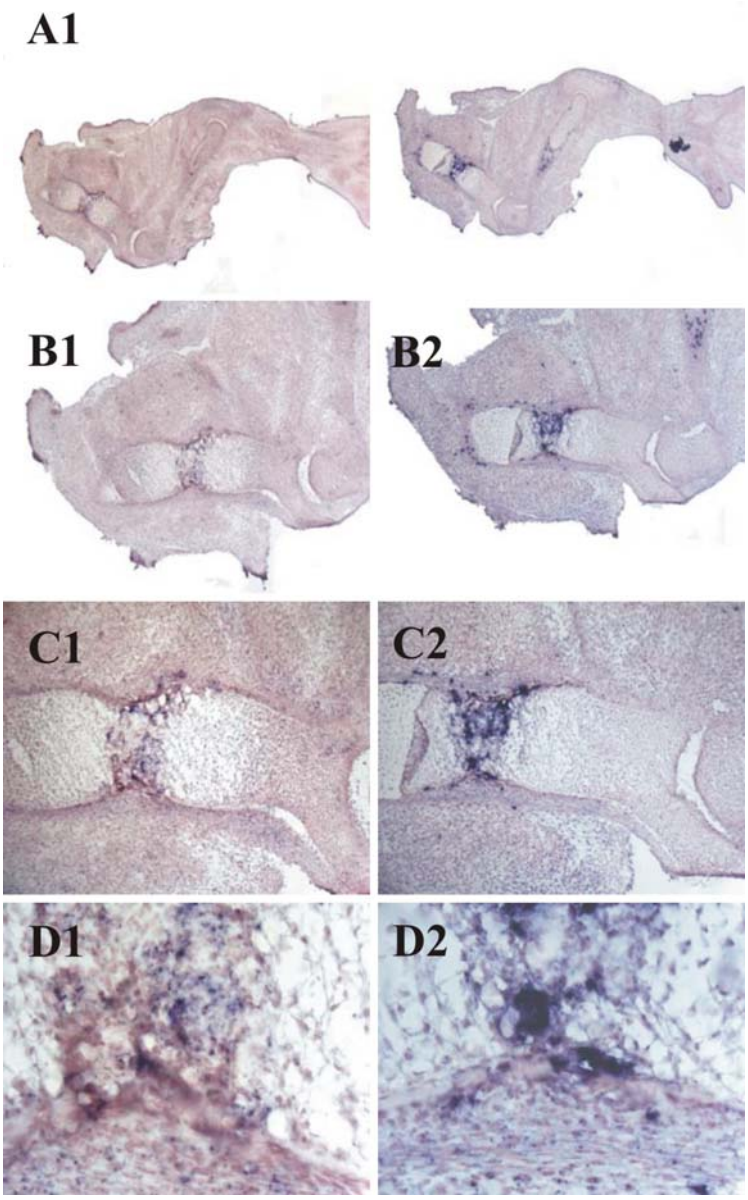

Abb. 3.33.: Expression von Gnai1 (U38501) im Vergleich zu Trap
[Vergrößerungen: A1/2: 25x, B1/2: 50x, C1/2: 100x, D1/2: 400x]
(Abb. A1-D1: Gnai1 – Abb. A2-D2: Trap)
Signal: Osteoklasten

G Proteine spielen eine Rolle in der Signaltransduktion zwischen Transmembranrezeptoren und zellulären Effektoren [64]. Für Gnai1 wurde eine schwache Expression in den Osteoklasten detektiert.

X14961

Fatty acid binding protein 3, muscle and heart

Symb.: Fabp3

Syn.: H-Fabp, MDGI (Mammay-derived growth inhibitor)

- binding (GO:0005488)
- transporter activity (GO:0005215)
- lipid binding (GO:0008289)
- transport (GO:0006810)

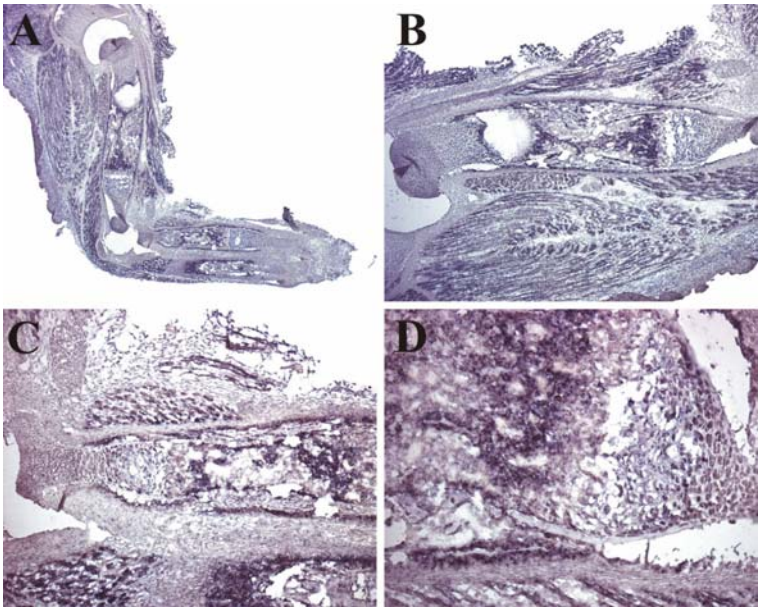

Abb. 3.34.: Expression von Fabp3 (X14961)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Fabp3 ist in den Fettsäuretransport involviert [65,66]. Es wurde im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen gefunden.

Z19543

Calponin 2

Symb.: Cnn2

Syn.: H2-Calponin

- calmodulin binding (GO:0005516)
- actin binding (GO:0003779)
- smooth muscle contraction (GO:0006939)

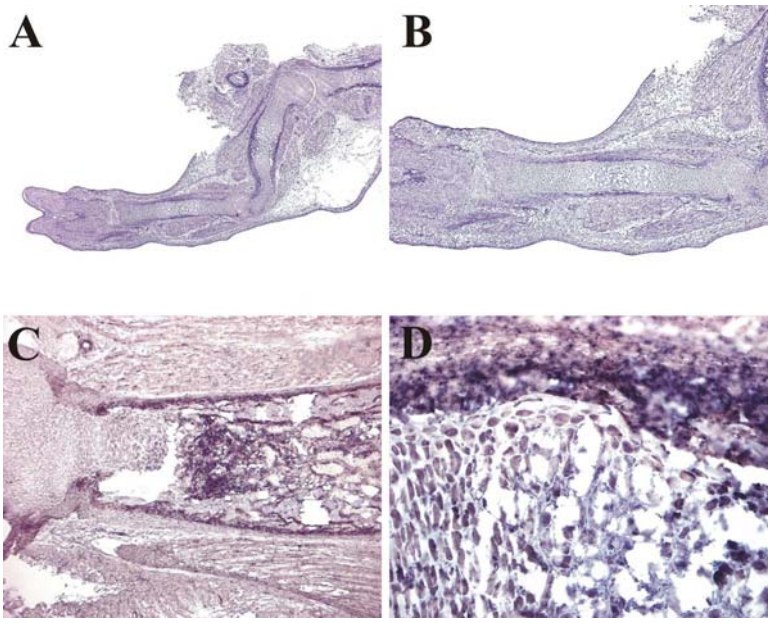

Abb. 3.35.: Expression von Cnn2 (Z19513)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Calponin fördert die Aktin-Polymerisation und inhibiert Aktin-aktivierte myosine ATPse-Aktivität [67]. Cnn2 wird im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen exprimiert.

3.7.9. Gene mit unbekannter Funktion

AB023957

Ethanol induced gene product

Symb.:-

Diesem Gen ist keine genaue Funktion zugeordnet. Es sind keine konservierten Domänen oder Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannt. Es wurde eine Expression im Stratum osteogenicum gefunden.

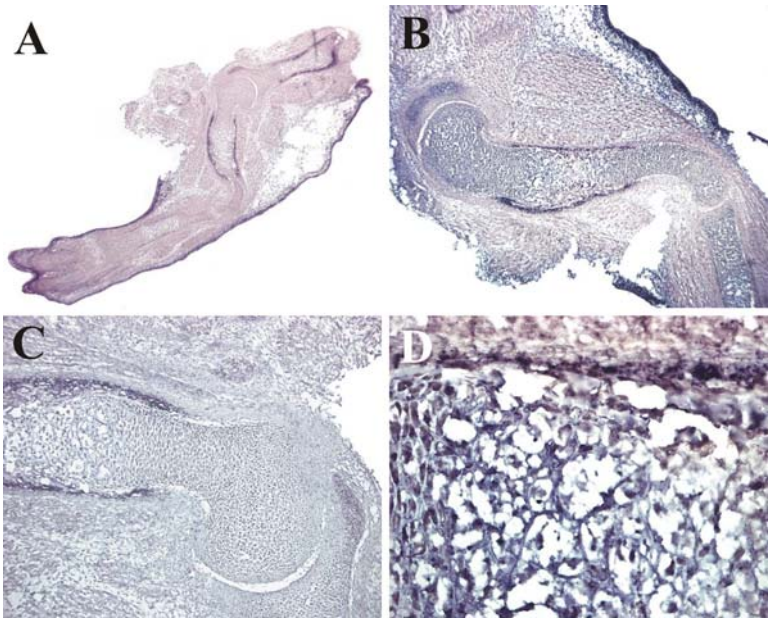

Abb. 3.36.: Expression von Ethanol induced gene product (AB023957)
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum

AW124306
-
Symb.: -

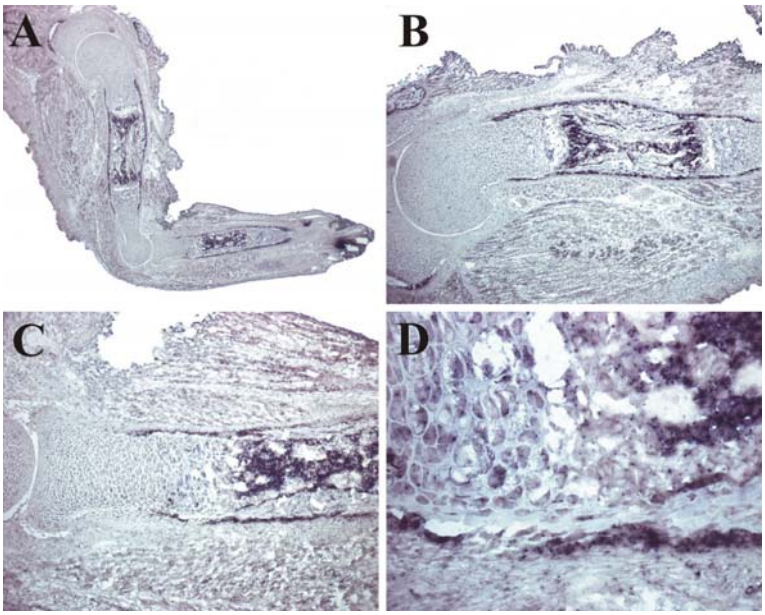

Abb. 3.37.: Expression von AW124306
[Vergrößerungen: A: 25x, B: 50x, C: 100x, D: 400x]
Signal: Stratum osteogenicum-trabekulärer Knochen

Hypothetisches Protein MGC38046. Es sind keine konservierten Domänen oder Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannt. AW124306 konnte im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen nachgewiesen werden.

3.8. Promotoranalyse

In unsere Arbeitgruppe wurde der Datensatz der Runx2-Chipanalyse durch ein informatisches Verfahren mit Hilfe der SITEBLAST software [68] nach 100 % konservierten Runx2-Bindungs-stellen durchsucht. Hierfür wurden die upstream-Regionen aller differentiellen Mausgene und deren Homologe im Huhn, Schimpansen, der Ratte und im Menschen in der CORG-Datenbank [69] gescannt. Tabelle 3.3. zeigt diejenigen Gene/ ESTs des Datensatzes, bei denen Runx2-Bindungsstellen gefunden wurden. Dies betraf 10 der 59 Gene/ ESTs.

Tabelle 3.3.: ETSs, bei denen konsevierte Runx-Bindungsstellen im GenPromotor gefunden wurden
Angaben über die Zahl der errechneten Bindungstellen, sowie die Spezies, in denen diese konservierten Stellen gefunden wurden.
H:Huhn, M: Mensch, R: Ratte, S: Schimpanse

Acc.-Nr.	Beschreibung	Bindungs-stellen	Konservierte Bereiche
AI849305	Ptprz1 (protein tyrosine phosphatase, receptor type Z, polypeptide 1)	6_22743054	H/R
AW061016	Vdr (vitamin D receptor)	3_67101594 3_67094345 3_67100499	M/R/S M/S M/R/S
L20232	Ibsp (integrin binding sialoprotein)	5_103467429	M/S
M89798	Wnt5a (wingless-related MMTV integration site 5A)	14_23031112	M/R/S
U44389	Hpgd (hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD))	8_55995707	M/S
X13986	Spp1 (secreted phosphoprotein 1)	5_103674970	M/S
X14961	Fabp3 (fatty acid binding protein 3, muscle and heart)	4_129218343	M/R/S
X66473	Mmp13 (matrix metalloproteinase 13)	9_7275583	M/R/S
X72795	Mmp9 (matrix metalloproteinase 9)	2_165556809 2_165556771	M/R/S M/S
X76291	Ihh (Indian hedgehog)	1_76547202	M/R