

4. Diskussion

4.1. Optimierungen

4.1.1. Optimierungen der Sondenherstellung

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Sondenherstellung über Klonierung und anschließende Amplifikation mit einem genspezifischen, sowie einem T7-Promotor-Primer häufig bessere Resultate erbrachte, als eine direkte Amplifikation mit einem T7-Promotor am 3'Primer (siehe Abb.2.1., Weg b und e). Dies lag zum einen daran, dass bei der Amplifikation eines Fragmentes aus einem Plasmid wesentlich seltener unerwünschte Nebenprodukte entstanden als bei der Amplifikation von g- oder cDNA. Zum anderen erschwerte der um den T7-Promotor verlängerte 3'Primer die PCR. Dadurch fällt weniger Optimierungsarbeit an, das Produkt ist besser reproduzierbar und in diesem Zustand besser und länger lagerbar.

4.1.2. Optimierung der *ISH*

Es konnten wesentliche Fortschritte bis zum reproduzierbaren Einsatz der automatisierten, nicht-radioaktiven *ISH* als Routinemethode erreicht werden. Die Qualität der Gefrierschnitte konnte verbessert (siehe 4.1.2.1.) und der Farbgradient auf den Objektträgern ganz beseitigt werden. Außerdem konnte der Hintergrund auf den Schnitten entscheidend verringert, sowie das Nachdunkeln der Schnitte aufgehoben werden.

4.1.2.1. Optimierung der Gefrierschnitte

Behandlung des Gewebes:

(siehe Methoden 2.2.2.2.)

Das Gewebe wurde nach Entnahme direkt in PBS-DEPC überführt und ohne vorherige Sucrose-Behandlung oder Fixierung direkt eingebettet. Dadurch konnte das Gewebe seine Struktur besser erhalten. Für das Einbetten wurde anstelle eines einfachen Plastikförmchens eine spezielle Kupferkammer verwendet (siehe Abb. 4.1.). Diese wurde mit Einbettmedium (Tissue Tec-OCT, Sakura Finetek Europa B.V.- 23800 AA Zeoterwonde, Niederlande) gefüllt und anschließend für einige Sekunden auf einen -40 °C kalten Aluminiumblock gestellt. Nach Anfrieren der unteren



Abb. 4.1.: Darstellung der Kupferkammer

Die Kammer besteht aus einem quadratischen Kupferboden und transparenten Seitenwänden aus Plexiglas.

Schicht des Einbettmediums, konnte das Gewebe gut ausgerichtet eingelassen werden. Die Blöcke wurden danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Einstellung des Kryotoms:

(siehe Methode 2.2.2.4.)

Die jeweilige Temperatur wurde höher gewählt. Sie wurde in der Kammer von $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf ca. $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ und am Messerblock von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf ca. $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ hochgesetzt. Dadurch hatte das Gewebe eine weichere Konsistenz und ließ sich insgesamt besser schneiden. Die Schnittdicke wurde von $12\text{ }\mu\text{m}$ auf $20\text{ }\mu\text{m}$ erhöht. Dadurch beschädigten die auftretenden Kräfte die Gewebstrukturen nicht so stark

Wahl der Objektträger

(siehe Methode 2.2.2.1.)

Das Gewebe wurde auf Superfrost-Objektträger (Superfrost[®]Plus (Menzel GmbH + Co KG, Braunschweig)) überführt. Im Vergleich zu silanisierten Objektträgern wiesen sie eine noch bessere Haftung auf.

Behandlung der Schnitte:

(siehe Methode 2.2.2.1.)

Nach einer Fixierung in PFA wurden die Schnitte acetyliert, entwässert und getrocknet. Sobald ein Schnitt einmal in einer Box mit Silica-Gel bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren war, wurde er erst bei anschließender Verwendung langsam aufgetaut.

Vorteile:

Im Vergleich wurde schnell deutlich, dass das nach neuer Methode behandelte Gewebe eine höhere Qualität besitzt. Die Gewebstrukturen waren insgesamt besser erhalten. Der sich bereits kalzifizierende Knochen wurde durch das Schneiden nicht aus seiner Umgebung herausgetrennt. Durch das Anwenden von Superfrost-Objektträgern und das Acetylieren der Schnitte, wurde der Hintergrund deutlich vermindert und das Signal trat besser hervor.

4.1.2.2. Optimierung des Tecan-Automaten

Es wurden zwei Schritte im Ablauf geändert (siehe Methoden 2.3.2.1./2.3.2.2.).

Die Abteilung von Prof. Eichele am Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie in Hannover entwickelte in Kooperation mit der Firma Tecan einen Automaten, der mittlerweile seit 3 Jahren immer weiter optimiert wird. Die Arbeitsprotokolle wurden verglichen und verschiedene Änderungen vorgenommen. U.a. wurde SAP durch die gleiche Konzentration Neutravidin ersetzt. Des weiteren wurde die Anzahl der Waschschrte mit Schaf-Serum von 2 x 45 min auf 4 x 20 min erhöht.

Vorteile:

Durch das Neutravidin wurde der Hintergrund vermindert. Die Waschschrte mit Schafserum waren intensiver, was sich zusätzlich am schwächeren Hintergrund bemerkbar machte.

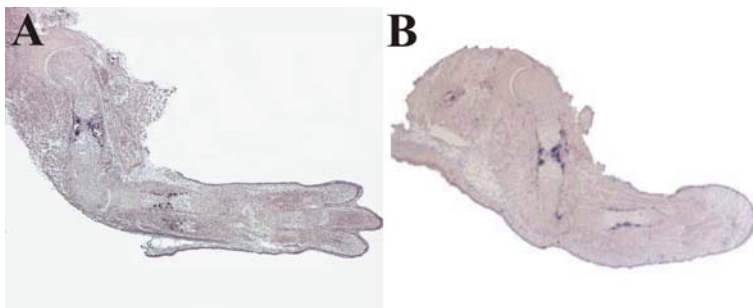


Abb. 4.2.: Vergleich der Signalqualität

Abb. A zeigt einen Schnitt nach alter Methode, während der Schnitt in Abb. B nach der neuen Methode behandelt wurde. Es wird eine Verbesserung des Hintergrundes und der Signalintensität deutlich.

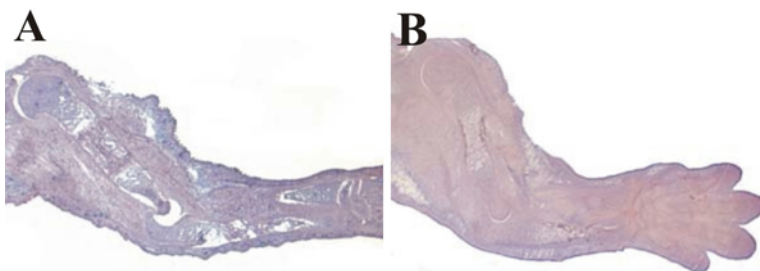


Abb. 4.3.: Vergleich der Gewebsqualität

Abb. A zeigt einen Schnitt nach alter Methode, während der Schnitt in Abb. B nach der neuen Methode behandelt wurde. Es wird eine Verbesserung der Gewebsqualität deutlich.

4.2. Einteilung der Gene und deren Beschreibung aus Literaturangaben

Aufgrund der Literaturangaben konnte man die Kandidatengene ihrer Funktion nach einteilen. Durch die Einordnung der Gene in funktionelle Gruppen, wurde die Möglichkeit geschaffen, die interessantesten Gene für weitergehende funktionelle Analysen aussuchen zu können. Da diese Einteilung natürlich nur schon Bekanntes berücksichtigen konnte, wurden eventuell neue Aspekte übersehen. Doch bei einer solch großen Zahl ist es unumgänglich, zunächst die Anzahl der Kandidaten einzugrenzen, um eine handhabbare Anzahl von Genen für weitere Experimente aussuchen zu können. Diese Einteilung bietet dafür die Möglichkeit.

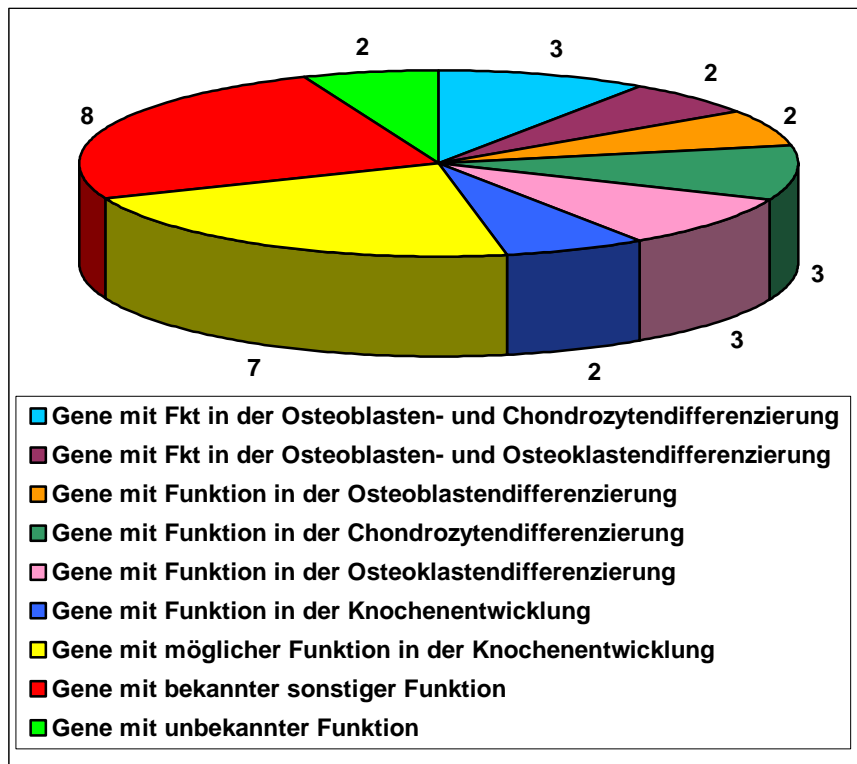


Diagramm 4.4.: Geneinteilung nach ihrer Funktion aus Literaturangaben

Der Literatur nach waren zum Zeitpunkt der Arbeit bei 13 der 32 Gene (die Signal in der *ISH* zeigten) eine Funktion in der Chondrozyten-, Osteoblasten-, bzw. Osteoklastengenesese bekannt. Bei weiteren 2 Genen war eine Zuordnung zu Knochen möglich. 7 Genen wurde eine mögliche Funktion in der Knochenentwicklung zugeschrieben. Bei 8 Genen wurde kein Hinweis auf eine derartige Funktion gefunden. 2 Genen konnte keine Funktion zugeordnet werden. (Fkt: Funktion)

Für die meisten Kandidatengene konnte die Expression im Knochen und/oder Knorpel gezeigt, und somit ein Beitrag zur Bestätigung der Chip-Hybridisierungsergebnisse geleistet werden. Zudem ist es notwendig, für weiterführende Experimente mit einzelnen Kandidatengenen, deren Expressionsmuster zu kennen.

4.2.1. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Chondrozytendifferenzierung

Tgfb1 (AJ009862-Transforming growth factor-beta1) ist ein Wachstumsfaktor, der im Periosteum ab 13,5 dpc.⁷⁰ von Osteoblasten synthetisiert wird und ein wichtiger Regulator der Knochen- und Knorpelentwicklung, sowie der Knochenhomöostase^{34,35}. Einmal aktiviert, stimuliert Tgfb1 die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten^{71,72} und inhibiert die Chondrozytenproliferation und -differenzierung. Die Differenzierung ist von PTHrP abhängig, das downstream von Tgfb1 agiert⁷⁰.

Die meisten *tgfb1*-defizienten Mäuse sterben im Stadium 10,5 dpc., verursacht durch Durchblutungsstörungen des Dottersacks und zusätzlichen hämatopoetischen Defekten.

Weitere Angaben:

→ Tgfb ist als Co-Stimulator von RANKL wichtig für die Differenzierung und das Überleben von Osteoklasten⁷³.

→ Tgfb agiert über Smads. Er inhibiert die Expression von Runx2 über Smad3⁷⁴. Von Tgfb aktiviertes Smad3⁷⁵ inhibiert die Mef2c-abhängige Transkription⁷⁶.

→ Tgfb wird in Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert⁷⁵.

ISH: In der *ISH* konnte die Expression von Tgfb1 in Osteoblasten des Periosteums (entspricht dem Stratum osteogenicum)⁷⁰ bestätigt, sowie eine weitere Expression im trabekulären Knochen gefunden werden. Eine Expression von Tgfb1 in Osteoklasten konnte nicht ausgeschlossen werden, da das Signal überlagert sein könnte.

Cdh2 (M31131-Cadherin 2) gehört zu den Typ-1-Cadherinen der CAMs (Cell adhesion molecules) -Superfamilie. Cdh2 ist an der Hauptvermittlung der mesenchymalen Kondensation beteiligt³⁶. Das Gen wird im Vorknorpel und in Osteoblasten des Perichondriums exprimiert⁴² und ist ein wichtiger Faktor in der Osteoblastendifferenzierung. Es bindet an Catenine, einer Familie intrazellulärer Proteine³⁶.

Homozygote *cdh2*-Mutanten-Mäuse sterben im Stadium 10 dpc. Sie weisen eine Wachstumsretardierung, ein vergrößertes Herz mit erweitertem Herzbeutel und eine abnorme Größe der Somiten (Ursegmente) auf.

Weitere Angaben:

→ Die Zell-zu-Zell-Interaktion während der mesenchymalen Kondensation ist vermutlich beim Auslösen eines oder mehrerer Signaltransduktionswege der Chondrogenese beteiligt. Cdh2 ist einer dieser Hauptvertreter⁷⁷.

→ Cdh spielt eine Rolle in der Entwicklung verschiedener Gewebsarten, wie dem ZNS (Zentrales Nervensystem) und dem visuellen System ⁷⁸.

→ Cdh2 wurde erstmals in neuronalem Gewebe gefunden und wurde mittlerweile auch in der Linse, dem Herz, in Somiten und in mesenchymalem Gewebe der sich entwickelnden Extremitäten festgestellt ⁷⁷.

→ Cdh2 kommt verstärkt in Osteosarkomazellen (Zellen eines malignen Knochentumors) vor ³⁶.

→ Cdh spielt eventuell eine positive Rolle in der Skelettmuskelentwicklung ⁷⁹

→ Pth und Cdh2 stimulieren beide die Knochenbildung. Es wird vermutet, dass Cdh von Pth reguliert wird ³⁶.

→ VitD3 reguliert Cdh negativ ⁷⁷.

→ BMP-2 reguliert möglicherweise Cdh2 ³⁶.

→ Es wird vermutet, dass Wnt Cdh-vermittelte Zelladhäsion reguliert ⁸⁰.

→ Cdh2 spielt eventuell eine Rolle in Osteoblastendifferenzierung und -funktion. Es besteht die Möglichkeit, dass Cdh2 ein direktes Zielgen von Sox 9 ist ³⁶.

→ Die Expression von Cdh2 scheint über Wnt7a reguliert zu werden ⁴³.

→ Die Entwicklung von Vorknorpel zu Knorpelgewebe erfordert die negative Regulierung der Cdh2-Expression ⁸¹.

ISH: Auch bei Cdh2 konnte eine Expression in Osteoblasten ⁴² des Stratum osteogenicums, sowie eine Expression im trabekulären Knochen bestätigt werden. Eine Expression im Vorknorpel, wie bei Tuan et al. (⁴²) beschrieben, wurde nicht bestätigt. Es wäre möglich, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Extremitäten schon zu weit ausdifferenziert waren, so dass kein Signal mehr auffindbar war.

Dlx5 (U67840-Distal-less homeobox 5) ist ein positiver Regulator der Chondrozyten-differenzierung ^{37,38}. Er induziert die Osteoblastendifferenzierung während der desmalen und enchondralen Ossifikation ³⁹. Er wird in sich differenzierenden Osteoblasten ⁸² und sich differenzierenden Chondrozyten exprimiert ^{37,38}. Dlx5 kann an den *ibsp*-Promotor binden und seine Aktivität stimulieren ⁸³.

Dlx5-defiziente Mäuse weisen Malformationen im Schädel- und Oberkieferknochen und Wachstumsdefekte der langen Knochen auf ⁸³. Sie sterben nach der Geburt und weisen bei der Obduktion eine Luftansammlung in Magen und Interstitium auf ⁸⁴.

Weitere Angaben:

→ Dlx5 wird neben Dlx6 als Kandidatengen der SHFM (Split-hand/ Split-foot-Malformation) diskutiert ⁸⁵.

→ Dlx5 spielt möglicherweise eine Rolle in der Osteoblastendifferenzierung⁸³.

→ Dlx5 unterdrückt die Osteokalzin-Expression⁸⁶.

ISH: Eine Expression in Osteoblasten⁸² (Stratum osteogenicum und trabekulärer Knochen), sowie in Chondrozyten^{37,38} wurde, wie beschrieben, gefunden. Es ist eine Co-Expression von Dlx5 mit Runx2 in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten bekannt^{27,28}.

4.2.2. Gene mit Funktion in der Osteoblasten- und Osteoklastendifferenzierung

Vdr (AW061016-Vitamin D receptor) gehört zur Superfamilie der im Zellkern gelegenen Hormonrezeptoren. Er ist ein von Osteoblasten exprimierter⁸⁷, Liganden-induzierender Transkriptionsfaktor, der mit dem Retinoid-x-Rezeptor (Rxr) ein Heterodimer bildet. 1,25-Hydroxyvitamin D3 ist der bioaktive Metabolit von Vit. D. Es reguliert den Mineralhaushalt, u.a. im Knochen, um Kalzium- und Mineralhomöostase zu gewährleisten. Vdr bindet mit hoher Affinität und Selektivität an 1,25-Hydroxyvitamin D3. In Osteoblasten leitet diese Bindung eine komplexe Kaskade ein, die eine Änderung der Transkriptionsrate bestimmter Gene und Signaltransduktionswege bewirkt⁸⁷. Bei der Maus kann Vdr an den *spp1*-Promotor⁷¹ binden und dort die Transkription regulieren.

Vdr-defiziente Mäuse fallen nach der Entwöhnung durch das Auftreten von Alopezie (Haarausfall), Hypokalzämie, Rachitis (gestörte Mineralisierung der Grundsubstanz des wachsenden Knochens infolge unzureichenden Kalzium- und Phosphatangebots⁽⁸⁾), Unfruchtbarkeit und Knochenmalformationen auf. Weibchen entwickeln zusätzlich Uterushypoplasien (Unterentwicklung der Gebärmutter) und Beeinträchtigungen in der Follikel-(Eizellen-)entwicklung. Die meisten dieser Mausmutanten sterben ca. 15 Wochen nach der Geburt⁸⁸.

Weitere Angaben:

→ Vit. D3 ist an der Osteoblasten- und Osteoklastenregulierung beteiligt. Es reguliert die Proliferation dieser beiden Zellarten. Eine Expression von Vdr in Osteoblasten, jedoch nicht in Osteoklasten ist bekannt⁷⁵.

→ Vit. D3 und Runx2 interagieren beide über Smad3. Vit. D3 reguliert die Expression von Runx2 negativ und gleichzeitig die Regulierung von Vdr/ Rxr positiv⁸⁹.

→ Smad3 agiert als Co-Aktivatoren von Vdr⁷⁵.

→ Vit. D stimuliert die Bildung von Osteoklasten⁹⁰ über das RANK/RANKL-System⁷⁵.

→ Der Osteokalzin-Promotor besitzt ein Bindungsmotiv für den Vdr⁸⁸.

ISH: Eine Expression von Vdr in Osteoblasten⁸⁷, genauer genommen im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen, konnte bestätigt werden. Ergänzend wurde eine Expression in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten gefunden.

Spp1 (X13986-Secreted phosphoprotein 1) ist einer der Hauptvertreter der nicht-kollagenen Knochenmatrix-Proteine (Glykoprotein) und gehört zur Familie der SIBLINS (small integrin-binding ligand, N-linked glykoproteins)⁹¹. Es wird in hypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert⁹²⁻⁹⁴. Weitere Expressionen sind in Makrophagen und T-Lymphozyten bekannt⁹². Spp1 rekrutiert und stimuliert Makrophagen und Lymphozyten und ist an der Regulierung des Kalziumhaushaltes beteiligt⁴⁰. Es ist bekannt, dass Spp1 von Runx2 direkt reguliert wird^{92,95}.

Homozygote *spp1*-Nullmutanten-Mäuse sterben direkt nach der Geburt, da die Rippen nicht kalzifizieren und somit das Atmen nicht möglich ist. Die enchondrale Ossifikation ist gestört. Histologische und molekulare Untersuchungen ergaben, dass die Osteoblastendifferenzierung fast komplett blockiert ist, während die Chondrogenese normal erscheint⁹².

Weitere Angaben:

- Spp1 ist an Knochenumbauvorgängen beteiligt⁹⁴.
- Während der Ossifikation akkumuliert Spp1 in der mineralisierten Knochenmatrix⁹⁶.
- Das Fehlen von Spp1 in Osteoklasten verhindert ihre Bewegung und die Fähigkeit der Knochenresorption⁹⁷.
- Spp1 stimuliert die Gelsolin-assoziierte Kinaseaktivität⁴⁴.
- Vdr kann am *spp1*-Promotor binden und dort die Transkription regulieren⁷¹.

ISH: Die Expression von hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten⁹² (Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen) konnte bestätigt werden. Ein Signal in Osteoklasten⁹⁴ ist nicht auszuschließen, da es von Signal im Knochen überlagert sein könnte. Es konnte aber nicht bestätigt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre ein zu früh gewähltes Entwicklungsstadium, da Sato et al., 1998⁽⁹²⁾ von einer Expression in einem späten Stadium berichten.

4.2.3. Gene mit Funktion in der Osteoblastendifferenzierung

Dkk1 (AF030433-Dickkopf1) fungiert als Inhibitor der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion⁹⁸. Es inhibiert die Osteoblastendifferenzierung⁴¹.

Dkk1-defiziente Mäuse zeigen zwei Hauptphänotypen: Ihnen fehlen Strukturen des Vorderhauptes und sie weisen Vorderpfotenmalformationen auf. Diese Mausmutanten sterben während der Geburt⁹⁹.

ISH: Für *Dkk1* wurde ein Signal im Stratum osteogenicum und in Osteozyten gefunden.

Ibsp (L20232-Integrin binding sialoprotein) ist ein Glykoprotein, das zu den wichtigsten nicht-kollagenen extrazellulären Matrixproteinen gehört¹⁰⁰. Es ist Mitglied der SIBLINS (small integrin-binding ligand, N-linked glykoproteins)-Familie⁹¹. Es wird in Knochen und Knorpel und anderen mineralisierten Geweben exprimiert⁹¹. Das Gen ist einer der Hauptmarker der terminal differenzierten Osteoblasten⁸³ und spielt eine Rolle in deren Differenzierung und der Knochenmatrix-Mineralisierung¹³. *Dlx5* kann am *ibsp*-Promotor binden und seine Aktivität stimulieren⁸³. *Ibsp* wird von Runx2 reguliert, es gibt aber auch einen Runx2-unabhängigen, autoregulativen Weg durch eine positive Rückkopplung über den eigenen Promotor¹⁰¹.

Weitere Angaben:

- *Ibsp* ist in Knochenkrebszellen exprimiert¹⁰¹.
 - Es besteht die Möglichkeit, dass *Ibsp* eine Rolle in der Pathogenese von Knochenmetastasen spielt¹⁰⁰.
 - *Ibsp* wird durch Vit. D3 supprimiert¹⁰².
 - Es wird von Runx2 negativ reguliert⁸⁹.
 - Einige Faktoren sind für seine Regulierung im Gespräch. Dies sind u.a. Vit. D3, TGF β , PTH und Runx2¹⁰².
 - *Ibsp* wird mit seinem Transkriptionsregulator Runx2 in Melanomzelllinien co-exprimiert⁹¹.
- ISH: Ein Signal im trabekulären Knochen⁹¹, sowie in Osteoblasten⁸³ (Stratum osteogenicum) und hypertrophen Chondrozyten⁹¹ konnte bestätigt werden.

4.2.4. Gene mit Funktion in der Chondrozytendifferenzierung

Wnt5a (M89798-Wingless-related MMTV integration site 5a), ein Mitglied der Wnt-Gene, gehört zu einer Familie von Protoonkogenen. Wnt ist an der Regulierung der Skelettentwicklung beteiligt¹⁰³. Es bindet an Frizzled-Rezeptoren. Diese Aktivierung stabilisiert das zytosolische β -Catenin, eine downstream-Komponente der Wnt-Signalkaskade. β -Catenin gelangt daraufhin in den Kern und interagiert mit HMG-Box-Transkriptionsfaktoren der Tcf-Familie. Der Tcf- β -Catenin-Komplex übermittelt die Wnt-Signaltransduktion in den Zellkern und agiert als Transkriptionsregulator der Wnt-Zielgene¹⁰⁴.

Wnt5a ist in der Schicht der prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten und im Perichondrium exprimiert^{105,106}. Eine Missexpression von Wnt5a verzögert die Chondrozytenreifung¹⁰⁵. Wnt stimuliert die frühe Osteoblastenproliferation und -differenzierung¹⁰⁷.

Homozygote *wnt5a*-Nullmutanten-Mäuse zeigen eine Verkürzungen der Schnauze, der Zunge und des Unterkiefers. Die Vorder- und Hinterbeine sind verkürzt und es fehlen ihnen Finger. Des weiteren treten Abnormalitäten in der Lunge auf. Die Mäuse sterben während der Geburt¹⁰⁵.

ISH: Die Expression des Gens in prähypertrophen Chondrozyten¹⁰⁶ konnte bestätigt werden. Ergänzend wurde eine Expression im Stratum fibrosum und Stratum osteogenicum des Periost gefunden. Ein Signal im Perichondrium¹⁰⁵ wurde bereits beschrieben. Es wäre möglich, dass es sich um den gleichen Ort der Expression handelt, aber die Definitionen an dieser Stelle divergieren. Zusätzlich wurde noch ein Signal im trabekulären Knochen gefunden.

Tcf7 (X61385-Transcription factor 7, T-cell specific) spielt eine Rolle in der fetalen Thymozytendifferenzierung¹⁰³ und wird postnatal ausschließlich in T-Lymphozyten exprimiert¹⁰⁸.

Tcf spielt eine Rolle in der Chondrozytendifferenzierung und im Wnt-Signaltransduktionsweg⁴³. Eine Interaktion der Tcf-Familie mit β -Catenin bedingt eine Translokation des Komplexes in den Kern, um dadurch die Transkription von Wnt-Zielgenen zu regulieren^{43,103,109}.

Tcf7-defiziente Mäuse entwickeln Adeno-Karzinome (von Drüsen ausgehende Tumore) des Darms und der Brustdrüse¹⁰⁹.

Weitere Angaben:

→ Tcf-Proteine binden über eine HMG (high mobility group)-Box an spezifischen Stellen der Promotoren von Zielgenen und interagieren über ihre N-terminale Domäne mit β -Catenin¹⁰⁴.

→ Tcf7 ist ein Zielgen des Tcf4- β -Catenin-Komplexes und könnte eventuell als Rückkopplungs-Repressor von Tcf4-aktivierten Genen agieren¹⁰⁴.

→ Es besteht die Möglichkeit, dass Tcf7 als Kernintegrator der Wnt-Signaltransduktion während der Entwicklung dient ¹⁰³.

ISH: Tcf7 wurde im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen nachgewiesen.

Ihh (X76291-Indian hedgehog) wird von Runx2 direkt reguliert ⁹ und kontrolliert den Übergang von proliferierenden zu sich differenzierenden Chondrozyten ¹². Die Chondrozytenproliferation und -reifung wird über eine negative Rückkopplung durch Ihh und PTHrP reguliert ^{14,110}. PTHrP ist ein Peptidhormon mit Homologien zum Parathormon. Es wird von gelenksnahen Perichondriumzellen und später von proliferierenden Chondrozyten synthetisiert. Ihh verlangsamt die Chondrozytendifferenzierung durch Stimulation der PTHrP-Produktion ¹¹¹, welches die Hypertrophierung von Chondrozyten inhibiert ¹². Ihh wird in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert ^{14,112}.

Ihh-defiziente Mäuse zeigen verkürzte und deformierte Knochen ¹¹². Die Chondrozytenproliferation ist niedriger und eine Expression von PTHrP fehlt ¹².

Weitere Angaben:

→ Runx2 bindet direkt an die Promotorregion von *ihh* und steigert die Chondrozytenproliferation über eine direkte Induktion von *ihh* ¹¹³.

→ PTHrP reguliert negativ die terminale Chondrozytendifferenzierung über den PTH/PTHrP-Rezeptor (PPR) ¹¹⁴.

ISH: Eine Expression von Ihh in prähypertrophen und anfänglich hypertrophen Chondrozyten ^{14,112} konnte bestätigt werden.

4.2.5. Gene mit Funktion in der Osteoklastendifferenzierung

Gsn (J04953-Gelsolin) gehört zur Familie der Aktin-bindenden und -modulierenden Proteine. Es spielt eine wichtige Rolle in der Aktinfilamentorganisation und -motilität in vielen Zellarten, u.a. den Osteoklasten. Das Gen ist in die Entwicklung der Osteoklastenpodosomen (Adhäsionsstrukturen der Osteoklasten) und Knochenresorption involviert ⁴⁴. Es reguliert dort die Assoziation und Dissoziation der Aktinfilamente der Podosomen ¹¹⁵. Eine Expression von Gsn in Osteoklasten ist bekannt ¹¹⁶.

In *gsn*-defizienten Mäusen zeigen Osteoklasten keine Reaktion auf eine Spp1-Stimulierung. Während der enchondralen Ossifikation kommt es zur Verzögerung, bis hin zur Blockade der Knorpelresorption und zur Verdickung des metaphysären trabekulären Knochens ^{44,117}.

Weitere Angaben:

- Spp1 stimuliert Gelsolin-assoziierte Kinaseaktivitäten ⁴⁴.
- Spp1 stimuliert Gelsolin-assoziiertes cScr, was zu einer erhöhten Gelsolin-assoziierten P13k-Aktivität führt ¹¹⁶.
- Für CapG, einem Mitglied der Gsn-Familie, ist eine diffuse Expression im Stadium 12,5 dpc. in Knochen und Knorpel, für ein anderes Mitglied namens Adservin im Stadium 17,5 dpc. im trabekulären Knochen bekannt ¹¹⁸.

ISH: In der *ISH* wurde ein Signal im Stratum osteogenicum und im trabekulären Knochen entdeckt. Ein beschriebenes Signal in Osteoklasten ¹¹⁶ wurde dadurch nicht ausgeschlossen, da dieses von Signal im Knochen überlagert sein könnte. Es konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Trap (M99054-Tartrate-resistant acid phosphatase) ist ein eisenhaltiges Glycoprotein und gehört zur Purple-Protein-Klasse. Es ist als Markerenzym für Osteoklasten bekannt ¹¹⁹ und ist dort in den Lysosomen lokalisiert. Die Expression von Trap wird durch RANKL induziert ¹²⁰. Seine Expression ist mit der Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten, Makrophagen und Zellen der Monozytenlinie assoziiert ⁴⁵. Trap dephosphoryliert die Proteine Spp1 und Ibsp, daraufhin ist es ihnen nicht mehr möglich, sich in Osteoklasten einzuschleusen ³³. Trap-positive Osteoklasten spielen eine Rolle in der Kontrolle der Knochendicke und in der Schaffung von Knochenmarksraum ¹²¹.

Trap-defiziente Mäuse weisen eine Beeinträchtigung im Knochenwachstum auf. Des weiteren zeigen die Knochen Deformationen und die Knochenresorption durch Osteoklasten ist gestört. Dadurch tritt eine milde Form der Osteopetrose auf ⁴⁵.

ISH: Ein Signal von Trap in Osteoklasten ^{33,119} wurde bestätigt.

Ccl9 (U49513-Chemokine ligand 9) gehört zur Familie der CC-Chemokine. Sie sind fähig Monozyten, Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten chemisch anzulocken ¹²². Ccl9 wird von RANKL induziert, agiert über den Chemokinrezeptor CCR1 und stimuliert die zytoplasmatische Motilität (Beweglichkeit) und Polarisation der Osteoklasten, in denen er auch exprimiert ist ⁴⁷.

Weitere Angaben:

- Ccl9 ist an der Adipogenese beteiligt ⁴⁶.
- Die Werte von Ccl9 sind bei einer manifesten Arteriosklerose erhöht ⁴⁶.
- Möglicherweise spielt Ccl9 eine wichtige Rolle in der Regulierung der Knochenresorption ⁴⁷.

ISH: Eine Expression in Osteoklasten ⁴⁷ konnte bestätigt werden.

4.2.6. Gene mit Funktion in der Knochenentwicklung

Lox (D10837-Lipoxygenase) ist ein extrazelluläres Monoaminoxidase-Enzym, das für die Querverbindungen in Kollagenen und Elastinen verantwortlich ist ⁴⁸ und dort spezifische Lysinreste zu reaktiven Aldehydgruppen umwandelt ⁴⁹. Es wird in Osteoblasten ¹²³ und im kardiovaskulären System exprimiert ¹²⁴.

Lox-defiziente Mäuse sterben kurz nach der Geburt. Sie weisen kardiovaskuläre Instabilität durch Aneurysma- (Ausweitung eines arteriellen Blutgefäßes aufgrund einer veränderten Wandstruktur (⁸)), sowie Diaphragma (Scheidewand)-rupturen (Risse) auf ⁴⁸. Ein Fehlen von *Lox* ist mit Osteoporose (Erkrankung des Skelettsystems mit Verlust bzw. Verminderung von Knochensubstanz (⁸)) und schwachen Knochen assoziiert. Das Inhibieren von *Lox* hat negative Effekte auf die Knochenbildung und -funktion ⁴⁹.

ISH: Eine Expression in Osteoblasten ¹²³, im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen, konnte bestätigt werden.

Mmp13 (X66473-Matrix metalloproteinase 13) ist ein Mitglied der Familie der Matrix-Metalloproteinasen und wird von Osteoblasten exprimiert ⁷². Das Gen wird von *Runx2* reguliert ¹²⁵ und scheint an der Knochenresorption der Osteoklasten beteiligt zu sein ⁵⁰.

Weitere Angaben:

→ Die Expression von *Mmp13* ist bei Patienten mit Osteoarthritis erhöht ¹²⁶.

→ Parathormon induziert Proteinkinase-A-abhängige Dephosphorylierung und Transaktivierung von *Runx2* und führt zur Stimulation der *Mmp13*-Promotoraktivität in Osteosarkoma-Zellen ¹²⁷.

ISH: In der *ISH* wurde die Expression in Osteoblasten ⁷² (Stratum osteogenicum) bestätigt. Eine weitere Expression wurde in terminal hypertrophen Chondrozyten gefunden.

4.2.7. Gene mit möglicher Funktion in der Knochenentwicklung

Unc5b (AW122703-Netrin Rezeptor associated) ist ein Mitglied der Unc-Rezeptoren-Familie, die zu den Netrin1-Rezeptorklassen gehört, und bindet direkt an Netrin-1⁵¹. Unc5b ist früh in den Gefäßen des sich entwickelnden Herzens und in der Lunge zu finden. Später wird es in den Extremitätenknospen, im Auge und Innenohr exprimiert⁵¹. Netrin-1 wird in Osteoblasten und Osteoklasten¹²⁸, dem Nervensystem, Innenohr und der Lunge exprimiert¹²⁹. Netrin und Unc5b regulieren die neuronale und axonale Wanderung im Embryo⁵².

Netrin1-defiziente Mäuse weisen Defekte im Nervensystem auf.

ISH: Unc5b wurde in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, sowie im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen gefunden.

Der Transkriptionsfaktor **Satb2** (AW124651-Special AT-rich sequence binding protein 2) ist ein Homeodomänen-Protein. Satb1 und Satb2 sind die einzigen bekannten Familienmitglieder. Satb2 bindet an den MARS (Matrix attachment regions) der endogenen Immunglobulin- μ -Loci der B-Lymphozyten-Vorläuferzellen¹³⁰. Man nimmt an, dass Satb2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gaumens spielt. Eine Translokation führt zur Gaumenspalte⁵³.

Weitere Angaben:

→ Satb1 ist an der Regulierung verschiedener T-zellspezifischer Gene beteiligt⁵³.

ISH: Das Gen wies ein Signal im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen auf.

Hck (J03023-Hemopoietic cell kinase) gehört zur Familie der Src-Protein-Tyrosin-Kinasen. Es wird in speziellen Zellen des hämatopoetischen Systems, z.B. in gereiften Granulozyten und Monozyten exprimiert¹³¹.

Die meisten *src*-defizienten Mäuse sterben während der Geburt. Die Überlebenden weisen eine Osteoklastenfunktionsstörung und somit eine Form der Osteopetrose auf^{54,55}.

Weitere Angaben:

→ Src-Protein-Tyrosin-Kinasen spielen eine Rolle in knochenresorbierenden Osteoklasten^{54,55}.

→ Es besteht die Möglichkeit, dass auch andere Src-Protein-Tyrosin-Kinasen eine Rolle in knochenresorbierenden Osteoklasten spielen¹³².

→ Spp1 stimuliert Gelsolin-assoziiertes cSrc, was zu einer erhöhten Gelsolin-assoziierten P13k-Aktivität führt¹¹⁶.

ISH: Eine Expression von Hck wurde im Stratum osteogenicum, das flankierend zu den prähypertrophen Chondrozyten liegt, entdeckt.

Mef2c (L13171-Myocyte enhancer factor 1) gehört zur MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor)-Box-Familie, die zur Myogenese (Muskelentwicklung) beitragen^{76,133}. Sie werden in Skelett-, Herz- und glatten Muskelzellen, im kardiovaskulären System, sowie in Neuronen exprimiert¹³⁴. Mef2-Transkriptionsfaktoren stellen wichtige Co-Faktoren der MRFs (Myogenic regulatory factors) dar, welche die Myogenese einleiten⁵⁶. MRFs und Mef2-Faktoren regulieren gegenseitig ihre Expression durch eine positive Rückkopplung⁷⁶. Des Weiteren steigern sie die Muskel-induzierende Aktivität der myogenen bHLH (basic helix-loop-helix)-Proteine¹³⁴. Wenn man davon ausgeht, dass die Muskelmasse die Knochenmasse beeinflusst, wäre eine Koregulierung denkbar.

Mef2c-defiziente Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung, bedingt durch Defekte des Herzens und Gefäßsystems^{4,135}.

Weitere Angaben:

→ Von Tgfb aktiviertes Smad3 inhibiert die Mef2c-abhängige Transkription⁷⁶.

ISH: Mef2c wurde in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, sowie im Stratum osteogenicum exprimiert.

S100A4 (M36579-S100 calcium binding protein A4) gehört zur Superfamilie der Calcium-bindenden Proteine. Es wird in mesenchymalen Zellen (die den Knorpel umgeben), sowie in Prä-Osteoblasten und Osteozyten exprimiert. Die S100-Proteine sind in verschiedenste zelluläre Funktionen involviert, u.a. Signaltransduktion, Interaktionen des Zytoskeletts, Zellproliferation, Krebsmetastasierung und Zell-zu-Zell-Kommunikation⁵⁷.

Homozygote *s100A4*-Mäuse zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten.

Weitere Angaben:

→ Es besteht die Möglichkeit, dass S100A4 einen negativen Regulator der Osteoblastendifferenzierung darstellt⁵⁷.

→ Es wird angenommen, dass *s100A4* downstream von *runx2* und *osx* liegt⁵⁷.

→ Weiterhin wird angenommen, dass S100A4 am Anfang der Haarfollikelregeneration eine Rolle in der Aktivierung von Stammzellen spielt¹³⁶.

→ Es besteht ein Hinweis darauf, dass S100A4 eine Änderung der Mmp-Expression und deren Inhibitoren bewirkt¹³⁷.

ISH: Für das Gen ist eine Expression in Prä-Osteoblasten und Osteozyten beschrieben⁵⁷. Dies konnte nicht bestätigt werden, da S100A4 nur eine Expression in Osteoklasten und deren Vorläuferzellen aufwies.

Epha3 (M68513-Ephrin receptor A3), ein Ephrin-Rezeptor gehört zur größten Subfamilie der RPTKs (Rezeptor-Protein-Tyrosin-Kinasen). Ephrine sind an der Regulierung von MCSF (Makrophage colony stimulating factor) beteiligt⁵⁹. Eph-RPTKs und ihre Liganden, die Ephrine, aktivieren Signaltransduktionswege durch Bindung verschiedener zytoplasmatischer Proteine, die die Zelladhäsion und Organisation des Aktinzytoskeletts regulieren⁵⁸. Eph/ Ephrine scheinen eine Rolle bei der Inhibierung von Knorpelmustern zu spielen und damit auf die Knorpelmorphogenese einzuwirken⁵⁸. Sie sind mit Brust-Karzinomen und -Melanomen assoziiert¹³⁸.

Weitere Angaben:

→ Eph-Rezeptoren können Regulatoren des MAPK-Signaltransduktionswegs einschalten⁵⁸.

→ Ephrin B1 wurde in Osteosarkoma-Tumoren entdeckt. Ephrin B2 und A1 wurden in Melanomen gefunden, Ephrin A1 zusätzlich in Kaposi-Sarkomen (eine bösartige Wucherung der Haut, die auch die Schleimhäute befallen kann. Sie tritt häufig in Verbindung mit einer HIV-Infektionen auf)¹³⁸.

ISH: Das Gen wurde im Perichondrium und im Stratum fibrosum exprimiert.

Rasa3 (U20238-RAS p21 protein activator 3) aktiviert Rasp 21, das die Src-Familie der Tyrosinkinase selektiv inhibiert. In T-Zellen aktiviert Ras p21 den Faktor Nf κB¹³⁹, der auch an der Osteoklastengnese beteiligt ist¹⁷.

ISH: Für Rasa3 wurde eine Expression im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen gefunden.

4.2.8. Gene mit bekannter sonstiger Funktion

Snx10 (AI746846-Sorting nexin 10) ist ein Mitglied der Sorting-Nexin-Proteine, die an der Regulierung von Abbauvorgängen der Rezeptoren und am Membrantransport in der Zelle beteiligt sind⁶⁰. Sie interagieren mit Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen¹⁴⁰.

Weitere Angaben:

→ Snx5 ist ein Protein, welches an FANCA (assoziiert mit der Fanconie-Anämie, einer autosomal dominanten Erbkrankheit, mit Symptomen wie normochromer makrozytärer Anämie, Minderwuchs, Hypo- oder Aplasie des Daumens, etc.) bindet¹⁴¹.

→ Snx6 interagiert mit Mitgliedern der Tgfb-Familie¹⁴⁰.

ISH: Snx10 zeigte eine Expression in Osteoklasten und deren Vorläuferzellen.

Gpc1 (AI852765-Glypican 1) gehört zur Familie der Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankerten Zelloberflächen-Proteoglykanen (PG). Sie spielen eine Rolle in der Fgf-Signaltransduktion⁶¹ und sind wichtig für das Wachstum und die Entwicklung des Gehirns. Es wurden hohe Konzentrationen im Gehirn und im sich entwickelnden Skelettsystems gefunden⁶². Gpc1 ist an der Fgf2-Signaltransduktion beteiligt¹⁴².

Weitere Angaben:

→ Es wurde von einer Überexpression von Gpc1 in Brustkrebszellen berichtet¹⁴².

→ In manchen Pankreas (Bauchspeicheldrüsen)-Tumoren ist die Expression von Gpc1 signifikant erhöht¹⁴³.

ISH: Gpc1 wurde in den hypertrophen Chondrozyten, dem Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen gefunden.

Cdo1 (AI854020-Cysteine Dioxygenase 1) wurde im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen exprimiert.

Für **Thy1** (M12379-Thymus cell antigen 1, theta) wurde ein Signal in Osteoklasten und im Stratum fibrosum detektiert.

Das zytosolische, selenabhängige **Gpx3** (U13705-Gluthadione peroxidase 3) katalysiert die Reduktion von H₂O₂ (Wasserstoff-Peroxidase) und schützt somit Zellen vor oxidativer Beschädigung. Es wird während des Prozesses der Differenzierung unter dem Einfluss von Vit. D3 positiv reguliert⁶³.

Weitere Angaben:

→ Ein Fehlen von Gpx könnte mit einer gestörten Osteoblastenfunktion einhergehen und in die Pathogenese von metabolischen Knochenkrankheiten wie der Osteoporose involviert sein¹⁴⁴.

ISH: Gpx3 wurde in hypertrophen Chondrozyten, im Stratum osteogenicum und in trabekulärem Knochen exprimiert.

Gnai1 (U38501-Guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1) gehört zu einer großen Familie von Molekülen (G Proteinen (Guanine nucleotide-binding proteins)), die für Signaltransduktion zwischen Transmembranrezeptoren und zellulären Effektoren verantwortlich sind. Gnai1 wird in Makrophagen exprimiert⁶⁴.

Gnai-defiziente Mäuse weisen einen Defekt im Langzeitgedächtnis auf.

ISH: Die *ISH* ergab ein Signal in Osteoklasten.

Fabp3 (X14961-Fatty acid binding protein 3) gehört zur Familie der Fabps (Fatty acid binding proteins). Diese sind in den Fettsäuretransport involviert, der von der Zellmembran aus zur intrazellulären Seite verläuft. Fabp3 wird im Herz- und Skelettmuskel exprimiert^{65,66}.

Homozygote *fabp3*-Nullmutanten-Mäuse zeigen eine Herzhypertrophie.

ISH: Fabp3 wurde im Stratum osteogenicum und trabekulären Knochen exprimiert.

Die gleiche Expression ergab sich auch für das Calmodulin- und Aktin-bindende Protein **Cnn2** (Z19513-Calponin 2), dessen Expression in Fibroblasten bisher schon bekannt ist¹⁴⁵. Cnn2 fördert die Aktin-Polymerisation und inhibiert die Aktin-aktivierte myosine ATPse-Aktivität⁶⁷.

4.2.9. Gene mit unbekannter Funktion

Sowohl das **Ethanol induced gene product** (AB023957), als auch **AW124306** wurden im Stratum osteogenicum exprimiert. Für AW124306 ergab sich zusätzlich ein Signal im trabekulären Knochen.

4.3. Überblick über die Runx2-Signaltransduktion und Runx2-regulierten Gene

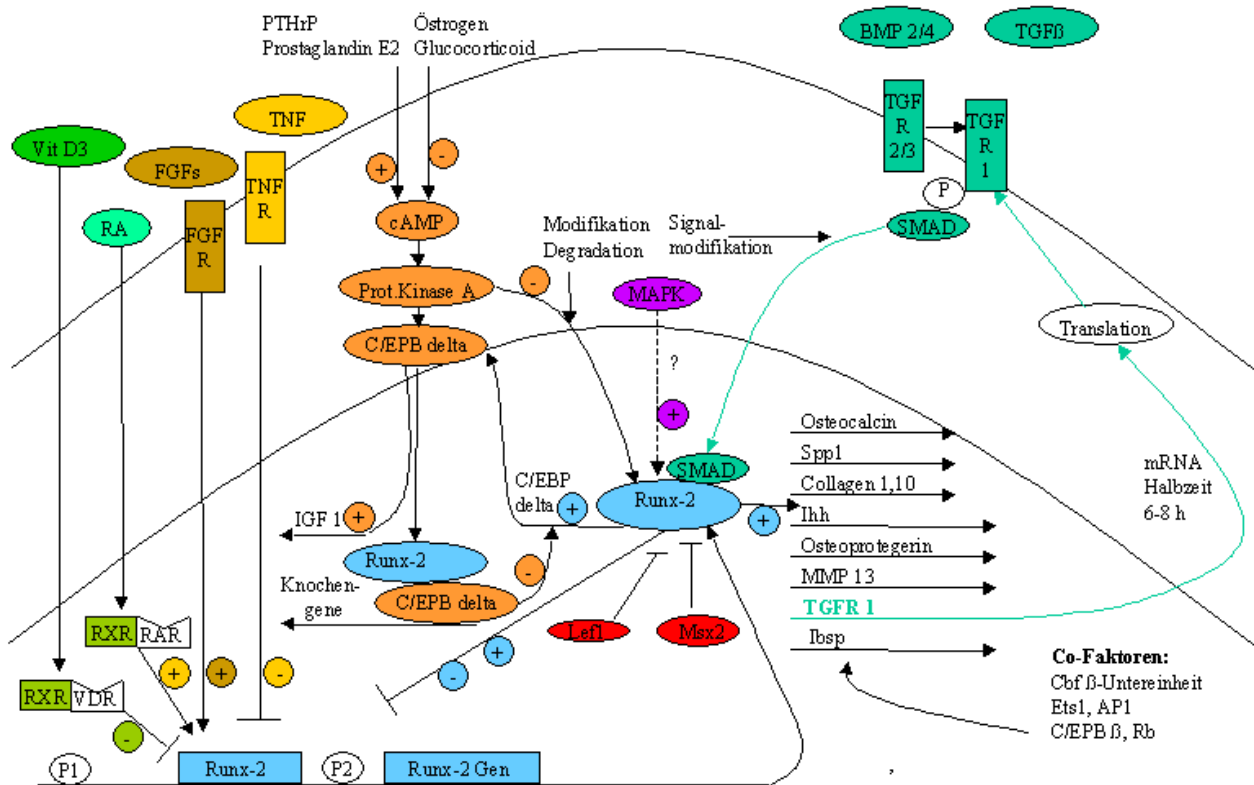


Abb. 4.4.: Runx2 Signalwege

Positive Regulierung von BMPs, FGFs, TGFs und negative Regulierung von $\text{TNF}\alpha$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Vit D_3). Runx2 interagiert mit vielen Co-Faktoren und reguliert verschiedene Zielgene direkt. Eine Regulierungsschleife ist durch die RNA von $\text{TGF}\beta\text{R1}$ gegeben, die eine kurze Halbwertszeit von 6-8 Stunden besitzt und den Einfluss der $\text{TGF}\beta\text{R}$ -Signaltransduktion durch SMADs auf Runx2 (auf der rechten Seite grün dargestellt) ¹⁴⁶ beeinflusst. Eine andere Regulierungsschleife (auf der linken Seite orange dargestellt) wird durch die positive Regulierung von C/EPB δ durch Runx2 bereitgestellt. C/EPB δ agiert durch den Protein Kinase A Signalweg und kann mit Runx2 zusammen knochenspezifische Gene regulieren und seine eigene Expression inhibieren. Darüber hinaus kann die Runx2-Signaltransduktion durch Phosphorylierung von Protein Kinase A und MAPKinase beeinflusst werden ¹⁴⁷. Runx2 kann durch Bindung an die Homeoboxproteine Msx2 oder Lef1 unterdrückt werden. Bisher konnte noch nicht ausreichend geklärt werden, ob der MAPK-Signaltransduktionsweg einen direkten oder indirekten Einfluss auf Runx2 besitzt ^{147,148}.

AP1: adaptor-related protein complex 1, **BMP:** bone morphogenetic protein, **c/EPB:** CCAAT enhancer-binding protein, **cAMP:** zyklisches Adenosinmonophosphat, **Cbfb:** CMP-binding factor.β, **Ets1:** v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, **Fgf:** fibroblast growth factor, **Ibsp:** Integrin binding sialoprotein, **IGF:** Insulin like growth factor, **Ihh:** Indian Hedgehog, **Lef1:** lymphoid enhancer binding factor 1, **MAPK:** mitogen activated protein kinase, **Mmp13:** matrix metalloproteinase 13, **Msx2:** homeo box, msh-like 2, **PTHrP:** parathyroid hormone related protein, **RA:** retinoic acid, **RAR:** retinoic acid receptor, **Rb:** retinoblastoma, **RXR:** retinoid x receptor, **SMAD:** mothers against decapentaplegic-related proteins, **Spp1:** secreted phosphoprotein 1, **TGFβ:** transforming growth factor beta., **TNF:** tumor necrosis factor, **Vdr:** vitamin D receptor
 “+”: positive Regulierung “-“: negative Regulierung

Runx2 ist in den meisten Fällen als positiver Regulator von Genen der Knochenentwicklung bekannt, wie dies der Fall bei Spp1 ⁹², Osteokalzin ¹⁴⁹, Osteoprotegerin ¹⁵⁰, Mmp13 ^{95,127}, Col I ^{151,152}, Ihh ⁹, C/EPBd ¹⁵³ und Tgfr1 ¹⁵⁴ ist. Ibsp hingegen wird durch Runx2 negativ reguliert ¹⁵⁵. Dem Transkriptionsfaktor ist es außerdem möglich, seine eigenen Expression positiv oder negativ zu beeinflussen ^{156,157}. Runx2 spielt höchstwahrscheinlich eine zentrale Rolle in der

Koordination verschiedener Signaltransduktionswege, die in die Chondrozyten- und/ oder Osteoblastendifferenzierung involviert sind (siehe Abb. 4.4.).

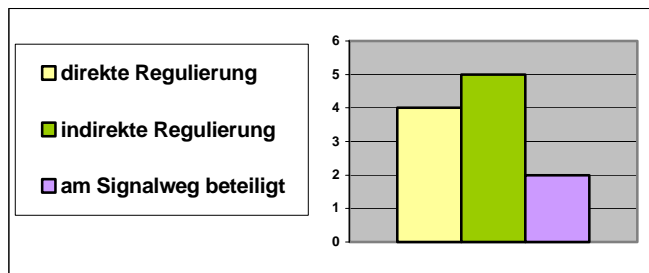


Abb. 4.5: Runx2-regulierte Gene

Es konnte für 4 der Kandidatengene eine direkte (Ibsp, Ihh, Mmp13, Spp1) und für 5 eine indirekte (Ccl9, Gnai1, S100A4, Snx10, Trap) Regulierung durch Runx2 gefunden werden. Für weitere 2 Gene (Tgf β 2, Vdr) konnte eine Beteiligung am Runx2-Signalweg gefunden werden.

Die Runx2-Aktivität wird durch Faktoren gesteigert, bei denen bekannt ist, dass sie bestimmte andere Signaltransduktionswege, wie PTH/PTHrP (Signale durch PKA- und PKC-Signaltransduktionswege^{158,159}), BMPs (Signale durch den TGF- β -Rezeptor/ SMAD-Signaltransduktionsweg¹⁵⁴) und höchstwahrscheinlich auch den MAPK (mitogen-activated proteinkinase)-

Signaltransduktionsweg¹⁴⁷ stimulieren. Des weiteren kann die Runx2-Aktivität durch Bindung an das Homeobox-Protein Msx2¹⁶⁰, bzw. Lef1¹⁶¹, einem Mitglied des Wnt-Signaltransduktionswegs, unterdrückt werden. Innerhalb der differentiellen Gene wurden Kandidatengene gefunden, von denen bekannt ist, dass sie von Runx2 direkt reguliert werden. Dies sind Ibsp¹⁰¹, Ihh^{9,113}, Mmp13¹²⁵ und Spp1⁹².

Gene mit ausschließlichem Signal in Osteoklasten werden aller Wahrscheinlichkeit nach indirekt durch Runx2 reguliert, da die nicht vorhandene Osteoklastendifferenzierung auf einer gestörten Osteoblastenentwicklung basiert (Kapitel 1.3, Abb. 1.6.). Dies betrifft Ccl9, Gnai1, S100A4, Snx10 und Trap. Für Thy1, das zusätzlich Signal im Stratum fibrosum zeigte, kann dies nicht mit Sicherheit angenommen werden. Andere Gene, wie Tgf β 1⁷⁴ und Vdr⁸⁹ sind indirekt am Runx2-Signalweg beteiligt.

4.4. Promotoranalyse

Eine Promotoranalyse von konservierten Runx2-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen fand u.a. die 4 Gene (von insgesamt 10) aus dem Datensatz, von denen bekannt ist, dass sie direkt durch Runx2 reguliert werden (Ibsp, Ihh, Mmp13, Spp1 ;siehe Abschnitt 4.3. und Abb. 4.5.). Dieses Ergebnis lässt erwarten, dass auch Vdr, Wnt5a und Fabp3, die genauso Runx2-Bindungsstellen in ihrem Promotor besitzen und eine Expression in Knochen/ Knorpel zeigten, durch Runx2 direkt reguliert sind. Ptpcz1 und Hpgd besitzen zwar auch Runx2-Bindungsstellen, sie wiesen aber nur ein Signal in anderen Gewebsarten auf.

4.5. Datenbank

Um die während dieser Arbeit gesammelten Daten verwalten und anderen zugänglich machen zu können, wurden diese Informationen in eine hierfür erstellte Datenbank (“Bone eXpress“-<http://www.molgen.mpg.de/research/mundlos/bone-express>) eingegeben. Hierbei wurden zu den einzelnen Kandidaten verschiedene Informationen berücksichtigt. Auf der entsprechenden Seite findet man den aktuellen Gennamen, sein Symbol und seine Synonyme, sowie der Ac-Nr. . Verschiedene Abbildungen der *ISH* auf Kryoschnitten der oberen Extremität einer Wildtypmaus, sowie die Sequenz und Primer der verwendeten Sonde sind aufgeführt. Eine kurze Beschreibungen führt die spezifischen GO-Termini und Expressionsmuster auf. Diese Datenbank bietet eine Plattform für schnellen, geordneten und übersichtlichen Informationsaustausch, nicht nur innerhalb der Arbeitsgruppe, sondern auch mit möglichen Kooperationspartnern.

Bone eXpress - search results

query FOR Ccl9 (Chemokine ligand 9) IN geneName
Search method: exact
1 genes found: **U49513**

Action:

Information	Images				
Project: runx2-differentielle gene (wt-schnitte) last edit by: urban_m Name: Ccl9 (Chemokine ligand 9) Synonym: CCF-18, MIP-1gamma, Mrp2 Accession No.: U49513 gene functions and references: cytokine activity (GO:0005125) chemokine activity (GO:0008009) signal transduction (GO:0007165) chemotaxis (GO:0006935) immune response (GO:0006955)	25x 50x 100x 400x				
Sequence: <pre> ctctcctcc tcattettac aactgtcttt ggaatctggg cccagatcac acatgcaaca gagacaaaag aagtccagag cagcttgaag gcacagcaag ggcctgaaat tgaaatgttt cacatgggct tcaagactc ttcagattgc tgctgtcct ataactcagc gattcagttg tcaagattc taggtattt tcccaccagt ggtgggtgta ccaggccggg catcatctt atcagcaaga gggggtcca ggtctgtgce aaccccagt atggagagt tcagagatgc attgaaagat tggagaaaaa ctcaacaaca cggacctaca aacaataaca </pre>					
Stage: 15.5					
Expression: <table border="1"> <tr> <td>Cartilage</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Bone</td> <td>osteoclasts</td> </tr> </table>	Cartilage	-	Bone	osteoclasts	
Cartilage	-				
Bone	osteoclasts				

Abb. 4.6.: Darstellung der Datenbank "Bone eXpress"

Man kann die Kandidatengene über bestimmte Kriterien, wie ihren Gennamen, ihr Symbol und Synonyme, der Ac-Nr., etc. aufrufen. Auf der Seite befinden sich die Sequenz, die verwendeten Primer der durchgeführten Amplifikation, eine kurze Beschreibung, sowie die GO-Termini und Fotos mit dem spezifischen Signal des aufgerufenen Gens.