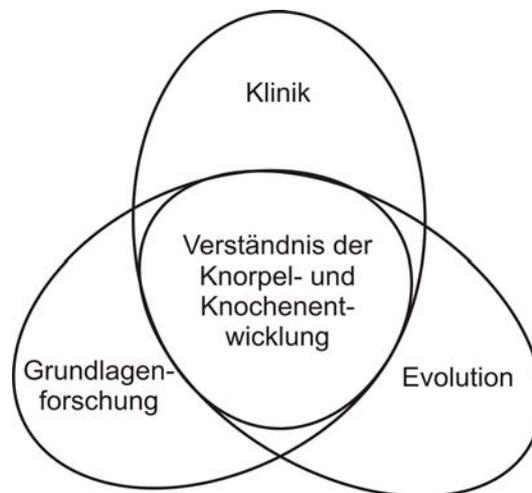


## **5 Diskussion**

Wie Abbildung 5.1 schematisch darstellt, sind für ein tiefgreifendes Verständnis der Knorpel- und Knochenentwicklung bzw. der Frakturheilung neben der klinischen Forschung auch Grundlagenforschung zu den molekularen Mechanismen und die Frage nach der Evolution des Skelettsystems von Bedeutung. Keines der Fachgebiete wird allein ein vollständiges Bild dieses wichtigen Organs liefern können. Daher war es das Ziel dieser Arbeit in einem möglichst breitgefächerten Ansatz neue Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Frakturheilung und Skelettentwicklung, sowie zur Evolution dieser Mechanismen zu gewinnen.



**Abb. 5.1: Zum Verständnis der Knorpel- und Knochenentwicklung beitragende Gebiete.**

### **5.1 Konstruktion von cDNA-Banken aus Frakturkallusgewebe des Schafs**

In der vorliegenden Arbeit wurden im großen Maßstab ESTs sequenziert und analysiert, um ausreichende Sequenzinformationen zu erhalten, die es ermöglichten, die Frakturheilung im Schafsmodell erstmals auf genomischer Ebene zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nicht nur für das Verständnis der Frakturheilung relevant, sondern sind für alle Forschungen hilfreich, die das Schaf als Modellorganismus verwenden. Daneben wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten EST-Sequenzen die Menge verfügbarer Schaf-ESTs um mehr als das Vierfache erhöht. Dabei konnten zumindest partielle Sequenzinformationen für mehr als 5800 Schafgene generiert werden, für die zuvor keine

Sequenzinformationen in den öffentlich zugänglichen Datenbanken enthalten waren. Zudem wurde mit den EST-Sequenzen ein Expressionsprofil aus sieben bzw. zehn Tage nach der Fraktur entnommenem Kallusgewebe erstellt. Da keine Normalisierung der cDNA-Banken erfolgte, kann davon ausgegangen werden, daß diese die Genexpression der beiden Gewebe nahezu unverfälscht wiedergeben.

Durch Vergleiche der Expressionsprofile mit cDNA-Banken aus gesundem humanem Knochen war es möglich, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, die möglicherweise eine Rolle in der Frakturheilung spielen. Obwohl man inzwischen eine ungefähre Vorstellung von den molekularen Prozessen hat, die während der Frakturheilung und Regeneration von Knochen ablaufen, sind noch viele Fragen zu klären, bevor ein vollständiges Bild dieser Vorgänge entstehen kann. Ein tieferes Verständnis hinsichtlich der Rolle der Gene, die in die Frakturheilung involviert sind, sowie ihrer Regulationsmechanismen, ist eine Voraussetzung für die Entwicklung optimaler Therapieansätze bei Störungen im Heilungsverlauf und ist ebenfalls von enormer Bedeutung für andere Krankheiten des Skeletts, wie zum Beispiel der Osteoporose.

### **5.1.1 Gene mit differentieller Expression während der Frakturheilung**

Die differentiell exprimierten Kandidatengene können in funktionelle Gruppen eingeteilt werden. Besonders Mitglieder der Gruppen „extrazelluläre Matrixproteine“, „Resorption/ Umbau/ Entzündung“ und „Regulation der Transkription/ Signaltransduktion“ wurden bisher im Zusammenhang mit Frakturheilung oftmals untersucht. Aus diesen Kategorien wurden sowohl bereits bekannte Kandidaten, als auch neue Gene mit differentieller Expression gefunden.

Da jedoch eine hohe Anzahl Gene identifiziert wurde, für die bereits eine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, in der Knochenentwicklung oder -heilung beschrieben wurde, kann man davon ausgehen, daß es gelungen ist, mit dem verwendeten Ansatz einige grundlegende Mechanismen der Frakturheilung zu erfassen.

Im Weiteren werden drei Gruppen mit einigen differentiell regulierten Genen aufgeführt, die im Zusammenhang mit der Frakturheilung bisher weniger gut untersucht wurden. Diese haben Funktionen in der Angiogenese, der Kontrolle freier Radikale oder gehören zu den Ribosomalen Genen. Für die überwiegende Mehrheit der Gene aus diesen Gruppen wurde eine differentielle Expression im Heilungsverlauf bisher nicht beschrieben. Diese

Beobachtungen könnten Startpunkte für weitere Untersuchungen im Bezug auf die Rolle von Prozessen wie Angiogenese und der Kontrolle freier Radikale im Heilungsverlauf bieten.

### 5.1.2 Ribosomale Gene

Ribosomale Proteine stellen die größte Einzelgruppe der differentiell exprimierten Gene dar. Es gibt mehr als 75 ribosomale Proteine (Kenmochi et al., 1998), die nicht unbedingt gleichartig reguliert sind (Bortoluzzi et al., 2001). Im Vergleich der EST-Verteilungen der PF7- und PF10-Stadien mit cDNA-Banken aus normalem humanem Knochen wurden neun Gene für ribosomale Proteine in den Kallus-cDNA-Banken als signifikant überrepräsentiert gefunden. Acht dieser Gene, sowie sieben weitere zeigten auch in der qRT-PCR-Analyse signifikante Expressionunterschiede mit den höchsten Expressionen bei Tag 7 und Tag 10 nach der Fraktur. Weiterhin waren vier Translationsfaktoren in den PF7 und PF10 cDNA-Banken überrepräsentiert, was durch qRT-PCR für zwei Gene bestätigt werden konnte.

Bisher ist bis auf zwei dieser Gene für keines eine spezifische Funktion bei der Frakturheilung bekannt, obwohl für einige eine differentielle Expression in verschiedenen Entwicklungsprozessen (Tabelle 4.2 und 4.3), sowie der Frakturheilung beschrieben ist (Hadjjiargyrou et al., 2002). Cluster B (Abb. 4.6) enthält 36 Gene, darunter sind 13 der insgesamt 15 ribosomalen Gene, sowie beide Translationsfaktoren, die mit qRT-PCR analysiert wurden. Die Expression war in den beiden frühen Stadien (Tag 7 und 10) am höchsten, was vermuten läßt, daß in diesen Stadien eine besonders starke Proteinsynthese erfolgt.

### 5.1.3 Proteine der extrazellulären Matrix

Unter den differentiell exprimierten Genen wurden mehrere Matrixproteine gefunden. Das Gen mit der höchsten Gesamtexpression ist *Collagen Ia1*. Es ist eine Untereinheit des Hauptproteins im Knochen und es überrascht nicht, daß es gleichfalls eines der Gene mit den stärksten Expressionsunterschieden im Vergleich zum normalen Knochen ist, da im Kallus die Knochenmatrix im Gegensatz zum gesunden Knochen erst wiederhergestellt werden muß. Zwei weitere Kollagene (*Col3a1* und *Col4a1*) und *Osteonectin* wurden in der EST-Analyse ebenfalls signifikant hochreguliert gefunden (Tabelle 4.2). Diese Gene, sowie *Colla2*, *Col4a2*, *Col6a1*, *Col6a2* und zwei Proteoglycane (*Lumican*, *Perlecan*) wurden mittels qRT-PCR analysiert und alle zeigten signifikante Expressionsunterschiede im Heilungsverlauf.

Allgemein war die Expression bei Tag 7 und Tag 10 am höchsten, jedoch lag sie auch noch bei Tag 14 relativ hoch. *Integrin binding sialoprotein (Ibsp)* ist ein Osteoblastenmarker, das eines der häufigsten nicht-kollagenartigen Matrixproteine im Knochen darstellt. Die Expression von *Ibsp* war im Vergleich zu den anderen Matrixproteinen deutlich anders, mit einer erst bei Tag 10 beginnenden Expression, die bei Tag 14 ihren Höhepunkt erreichte und auch bei Tag 42 noch relativ stark war.

Die Lysyl-tRNA-Synthetase *Kars* hat keine bekannte Rolle in der Frakturheilung. Betrachtet man aber die essentielle Rolle der Lysin-Quervernetzungen bei der Kollagen-Biosynthese, ist es interessant, daß *Kars* die einzige überrepräsentierte tRNA-Synthetase unter den gewonnenen ESTs ist.

*Serpinh1* wurde ebenfalls in den PF7 und PF10-cDNA-Banken als überrepräsentiert gefunden. Es ist ein molekulares Chaperon, das an der Reifung der Kollagen-Moleküle beteiligt ist (Koide et al., 2000). Vermutlich ist es auch wichtig für die Knochenentwicklung, denn *Serpinh1* ist in Bereichen der Kollagen I-Synthese der sich entwickelnden Femura und Tibiae der Maus lokalisiert (Shroff et al., 1993; Tiffée et al., 2000).

#### 5.1.4 Gene mit Funktion in der Angiogenese

Es ist seit langem bekannt, daß die Gefäßinvasion für die embryonale Knochenentwicklung notwendig ist (Foidart und Reddi, 1980). Zudem ist sie ein Schlüsselprozeß für die Frakturheilung (Carano und Filvaroff, 2003). Für einige Angiogenesegene, z.B. *Vascular endothelial growth factor (Vegf)*, wurde bereits eine Hochregulation während der Knochenheilung gezeigt (Pacicca et al., 2003). *Col3a1* und *Col4a1* sind beide in den PF7 und PF10 ESTs überrepräsentiert. Beide Gene haben eine bekannte Funktion in der Angiogenese (Paralkar et al., 1990; Anstrom et al., 2005). Der Marker für glatte Muskelzellen *Csrp1* (Chang et al., 2003), der TGF $\beta$ -Familien Co-Rezeptor *Endoglin*, der für Angiogenese und Herzentwicklung notwendig ist (Jonker und Arthur, 2002; Lebrin et al., 2004) und das Basalmembranproteoglycan *Perlecan* waren alle in RT-Cluster A (Abb. 4.6). Dieser zeigt eine kontinuierliche Expression während der Stadien nach 7, 10 und 14 Tagen. *Hdgf*, ein hoch exprimiertes Gefäßendothelzellprotein, befindet sich ebenfalls in diesem Cluster. Sechs der acht Gene mit bedeutenden Funktionen in der Angiogenese (*Csrp1*, *Col4a1*, *Col4a2*, *Hspg2*, *Hdgf*, *Eng*) sind in Cluster A zusammengefaßt. Die Gene dieses Clusters zeigen eine besonders starke Expression bei Tag 7 und etwas geringere Expression an den Tagen 10 und 14. Dies ist nicht überraschend, da die Bildung neuer Blutgefäße eine Voraussetzung für die

Entwicklung neuen Knochens aus dem Kallusgewebe ist. Die anderen beiden Gene mit Funktionen in der Angiogenese, *Col3a1* und *Tagln2*, finden sich in Cluster B, der wie Cluster A in der frühen Phase (7 und 10 Tage) durch hohe Expressionsstärken charakterisiert ist, aber einen stärkeren Abfall der Expression an Tag 14 zeigt.

### 5.1.5 Gene mit Funktionen bei Resorption, Umbau und Entzündung

Mehrere Gene, die wahrscheinlich eine Rolle bei der charakteristischen Entzündungsreaktion der frühen Heilungsphasen spielen, waren in den PF7- und PF10-Stadien überrepräsentiert (*Fcgrt*, *Basigin*, *Hla-a* und *CD74*). Die Resorption von Knorpel und Knochen durch Osteoklasten ist ein wichtiger Teil der Umbauprozesse während der Knochenneubildung in der Frakturheilung. Daran sind hauptsächlich Enzyme aus den Klassen der Cathepsine und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt. Die Osteoklasten senken in ihren Resorptionslakunen den pH-Wert ab, was zu einer Demineralisierung führt. Es werden Cysteinproteinasen sezerniert, die bei niedrigem pH-Wert aktiv sind und beginnen die Proteinmatrix des Knochens abzubauen. Später, wenn der pH-Wert wieder ausreichend angestiegen ist, setzt die Wirkung der MMPs ein (Uusitalo et al., 2000). Für mehrere Gene aus diesen beiden Klassen wurde die Änderung der Expressionsstärke im Heilungsverlauf gezeigt. Interessanterweise kodieren vier der fünf Gene (*Acp5*, *Ctsk*, *Mmp9*, *Mmp13*) in RT-Cluster E für Enzyme mit bekannter Funktion in der Osteogenese, wobei die ersten drei dieser Gene von Osteoklasten exprimiert werden. Das Expressionsniveau der Gene dieses Clusters war bei Tag 7 minimal und erreichte bei Tag 10 seinen Höhepunkt, was vermuten lässt, daß diese Enzyme im besonderen für Prozesse der Knochenbildung wichtig sind, die bei Tag 10 beginnt. Es konnte für *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Mmp14* und *Mmp19* eine differentielle Expression während des Heilungsverlaufes gezeigt werden. Für alle dieser *Mmps*, außer für *Mmp19*, waren Funktionen in der embryonalen Knochenentwicklung bekannt, was ebenfalls auf die Ähnlichkeit der Knochenheilung mit der Embryonalentwicklung der Knochen hindeutet. *Mmp2*, *Mmp9* und *Mmp14* werden in der narbenlosen embryonalen Wundheilung (Dang et al., 2003) und der Osteogenese (Filanti et al., 2000) differentiell exprimiert. Dies ist von Interesse, da der Knochen eines der wenigen Gewebe ist, die ohne Narbenbildung verheilen können. Für *Mmp19* war bislang keine Funktion in der Knochenentwicklung bekannt. Allerdings ist es bei Hautverletzungen hoch exprimiert, was auf eine Funktion in der Wundheilung hindeutet (Hieta et al., 2003). *Mmp19* erreichte die höchste Expression in den 7- und 10-Tage-Stadien. Cluster F enthält nur zwei Gene, *Cystatin C* und *Tpm2*. Diese beiden

Gene waren die einzigen, die ihr Expressionsmaximum im letzten untersuchten Zeitpunkt erreichten (42 Tage nach der Fraktur). *Cystatin C* (*Cst3*) kann die Knochenresorption und Osteoklastendifferenzierung inhibieren (Brage et al., 2005) und möglicherweise ist *Cst3* zu diesem Zeitpunkt wichtig, um die Osteoklastenaktivität herunterzuregulieren.

### 5.1.6 Gene mit Funktionen in der Kontrolle freier Radikale

Die Gefäßinvasion des terminal hypertrophen Knorpels während der endochondralen Ossifikation ist mit dem Gewebeabbau durch Freisetzung lytischer Enzyme aus Osteoklasten und Endothelzellen verbunden. Dieser Prozeß führt vermutlich zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) (Fragonas et al., 1998). Gegenwärtig ist wenig darüber bekannt, wie unerwünschte Gewebeschäden durch ROS während der Frakturheilung vermieden werden. Glutathionperoxidasen (GPX) sind Enzyme, die die Reduktion von Wasserstoffperoxid, organischen Hydroperoxiden und Lipidperoxiden durch Glutathion katalysieren. Dadurch sind sie am Schutz der Zellen gegen oxidative Schäden beteiligt. Es wurden in den cDNA-Banken aus normalem humanem Knochen keine ESTs für die vier in der in der qRT-PCR getesteten *Gpx*-Gene gefunden. Obwohl keines dieser Gene in der EST-Analyse signifikant überrepräsentiert war, waren insgesamt 85 *Gpx*-ESTs in den PF7- und PF10-Banken vorhanden. In der qRT-PCR wurden für alle vier *Gpx*-Gene eine signifikant differentielle Expression nachgewiesen, die sich jedoch im Muster unterschied, sodaß die vier Gene in vier verschiedenen Clustern der qRT-PCR-Ergebnisse zu finden sind (siehe Abb. 4.6, Cluster A, B, C, D). *Hmox1* war in den ESTs ebenfalls überrepräsentiert. Ähnliches wurde vorher schon im 3-Tage-Stadium bei heilenden Rattenfemura gefunden (Komatsu und Hadjiargyrou, 2004). *Hmox1* ist eine induzierbare Häm-Oxygenase, die möglicherweise am Abbau des Häms aus dem initialen Hämatom im Frakturspalt beteiligt ist, obwohl für dieses Gen auch andere Funktionen während der Entwicklung postuliert wurden (Watanabe et al., 2004).

### 5.1.7 Transkription und Signaltransduktion

Zwei Membranproteine mit Funktionen in der Signaltransduktion waren in den PF7- und PF10-Banken überrepräsentiert. *Itm2c* ist während der Osteoblastendifferenzierung stark exprimiert (Deleersnijder et al., 1996), wobei seine spezifische Funktion und seine mögliche Rolle in der Frakturheilung derzeit unbekannt sind. Für das verwandte Gen *Itm2a* wird jedoch

eine Funktion bei der Steuerung der frühen Chondrozytendifferenzierung vermutet (Van den Plas und Merregaert, 2004). Das G-Protein *Gnai2* war ebenfalls überrepräsentiert, aber es gibt keine Hinweise auf seine genaue Funktion in der Frakturheilung.

Die Signalweiterleitung und die Modifikation der Transkription stellen wichtige Faktoren in der Entwicklung dar und es ist anzunehmen, daß sie auch für die Frakturheilung essentiell sind. Dennoch waren die EST-Zahlen für Transkriptionsfaktoren zu gering, um statistische Signifikanz zu erreichen, obwohl in vielen Fällen ESTs für bestimmte Transkriptionsfaktoren nur in den PF7- und PF10-Banken und nicht in den Banken aus normalem humanem Knochen nachweisbar waren. Beispielsweise wurde jeweils nur ein EST für *Runx2* und *Osterix* gefunden, die beide Schlüsselgene für die Skeletogenese sind (Mundlos et al., 1997; Nakashima et al., 2002). Es wurden qRT-PCRs für einige Transkriptionsfaktoren durchgeführt, für die relativ hohe EST-Zahlen in den frühen Schafkallus-Banken vorlagen. Dabei zeigte sich für *JunB* eine differentielle Regulation mit der höchsten Expression an Tag 7 und Tag 10. *JunB* ist, neben anderen Funktionen, ein positiver Regulator sowohl der Osteoblasten-, als auch der Osteoklastenaktivität (Kenner et al., 2004). *Morf411*, das möglicherweise eine Rolle in der Mechanotransduktion spielt (Myokai et al., 2003) und *Tcf4*, das Wnt-Signale in der Extremitätenentwicklung vermittelt (Cho und Dressler, 1998), zeigten ebenfalls die höchsten Expressionen in den beiden frühen Zeitpunkten. Weiterhin konnte für *Nsep1*, *Ppib* und *Rara*, für die bisher keine Änderung der Expression während der Knochenentwicklung oder -heilung bekannt ist, eine differentielle Expression gezeigt werden.

## 5.2 Expressionsprofile der *Runx2*-Microarray-Experimente

Als zweite wichtige Säule dieser Arbeit wurden, neben den Daten aus den Analysen der Schafkallus-cDNA-Banken, Expressionsprofile von Oberarmknochen (Humeri) aus E14,5 Wildtyp- und *Runx2*-Knockout-Mausembryonen erstellt. Aus einer Vielzahl möglicher Ansätze zur Detektion von Genen mit bisher unbekannter Funktion in der Skeletogenese wurde der Vergleich von Genexpressionsprofilen der Humeri gewählt. Hierbei wurden 71 differentiiell exprimierte Transkripte gefunden.

Im Stadium E14,5 bestehen die Humeri des Wildtyps nur aus Knorpel, Osteoblasten und Osteoklasten und die Invasion der Blutgefäße beginnt gerade. Dies verringert die Komplexität der Gewebezusammensetzung. Im Gegensatz dazu bestehen die Humeri der *Runx2*-defizienten Mäuse nur aus Knorpel. Auf Grund dieser beschränkten Zahl der Gewebe sollte die Anzahl falsch positiver Kandidatengene geringer als bei komplexeren Geweben sein.

Desweiteren hat dieser Ansatz den großen Vorteil eines *in vivo*-Systems und vermeidet daher Artefakte, die beispielsweise durch unterschiedliche Zelllinien und Kulturbedingungen entstehen können.

Um die Effektivität und Verlässlichkeit der Methode zu testen, wurden zunächst die Ergebnisse der Chip-Hybridisierungen durch quantitative RT-PCR mit derselben RNA-Präparation überprüft, die auch für die Hybridisierung verwendet wurde. Hierbei konnte eine zufriedenstellende Anzahl von 85 der 118 differentiellen Transkripte (72%) der Hybridisierung bestätigt werden. 82 dieser 85 bestätigten Transkripte (96,5%) wurden auch in einer zweiten Chip-Hybridisierung oder quantitativen PCR mit einer unabhängigen zweiten RNA-Präparation bestätigt. Nach dem Aussortieren doppelter Probensätze blieben 71 verschiedene Kandidatengene übrig (siehe Tabelle 4.6).

### **5.2.1 Korrelation der Chiphybridisierungen mit den Ergebnissen der qRT-PCR**

Auf den drei Chips des MG U74v2 Array Sets sind Probensätze für mehr als 36000 Gene und ESTs enthalten, die auf der Version 74 der Maus Unigene Datenbank basieren. Die drei Chips dieser Serie (A, B und C) wurden nacheinander mit derselben Hybridisierungslösung hybridisiert. Da die Qualität der Hybridisierungslösung durch drei nacheinander folgende Hybridisierungen nicht beeinträchtigt wird (F. Wagner, rzpd, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, persönliche Mitteilung), deutet die Abnahme des Korrelationskoeffizienten (siehe Tab. 4.5), sowohl im Chip-Chip-Vergleich als auch im Vergleich Chip-qRT-PCR, auf eine Abnahme der Qualität der Probensätze von U74Av2 zu U74Cv2 hin. Diese Annahme wird durch die deutliche Abnahme der als exprimiert gewerteten Transkripte verstärkt (U74Av2: 50,9% ; U74Bv2: 41,5% ; U74Cv2: 19,2%). Wahrscheinlich beruht die Beobachtung darauf, daß die Probensätze aller gut charakterisierten Gene auf dem A-Chip zu finden sind, wohingegen ein zunehmender Anteil ESTs mit mangelhafter, fehlender oder falscher Annotierung auf den B- und C-Chips repräsentiert ist. Da allerdings die bestätigten differentiellen Transkripte des B- und C-Chips nicht nur durch eine zweite Microarray-Hybridisierung, sondern auch unabhängig durch qRT-PCR überprüft wurden, können auch diese Ergebnisse als verlässlich angesehen werden.

### 5.2.2 Identifizierung von Genen mit bisher unbekannter Funktion in der Skeletogenese

Die Identifizierung mehrerer bereits bekannter direkter Runx2-Zielgene [(*Mmp13*, *Spp1*, *Ibsp*, *Ihh* (D'Alonzo et al., 2002; Uchida et al., 2001; Sato et al., 1998; Yoshida et al., 2004; Javed et al., 2001)] zeigt die grundsätzliche Verlässlichkeit dieser Methode. Diese Beobachtungen und Ergebnisse machen es sehr wahrscheinlich, daß auch andere Kandidatengene dieses Experiments ebenfalls direkt oder indirekt durch Runx2 reguliert werden. Weitere Runx2-Zielgene wie *Osteocalcin* wurden zwar bei den Hybridisierungen als differentiell exprimiert gefunden, allerdings lag der Expressionsunterschied unterhalb des gewählten Grenzwertes einer ca. 1,86-fachen Regulation ( $\log_2= 0,9$ ). Dies könnte an der geringen Zahl vollständig ausdifferenzierter, *Osteocalcin* exprimierender Osteoblasten im Stadium E14,5 liegen.

Es waren 24 Gene differentiell exprimiert, die bisher nicht als Runx2-Zielgene beschrieben wurden, aber eine bekannte Rolle in der Biologie der Knochen spielen (Tabelle 4.8). Für 11 weitere Kandidatengene lassen bisherige Ergebnisse eine Funktion im Knochen vermuten (siehe Tabelle 4.8).

Dagegen sind für 18 Gene Funktionen bekannt, die nicht mit Knochengewebe in Verbindung gebracht wurden. Schließlich gibt es aktuell bei 13 der 71 Gene keinerlei Daten, die auf eine bestimmte Funktion hinweisen.

22 der 31 Gene aus den letzten beiden Gruppen zeigten eine Expression im Knochen und stellen daher interessante Kandidaten für weitere Analysen dar.

Daneben wurden für 36 der 71 Kandidatengene Mausmodelle beschrieben, wovon bei bisher 19 Linien ein Skelettphänotyp gefunden wurde (siehe Tabelle 4.9). Möglicherweise würde eine detaillierte Untersuchung des Skeletts der übrigen 17 Mauslinien noch weitere milde Auffälligkeiten am Skelettsystem aufdecken.

Weder die hier identifizierten Gene mit möglicher Funktion in der Skeletogenese, noch die neuen potentiellen Runx2-Zielgene wurden in einer anderen Studie identifiziert, die RNA aus C3H10T1/2-Zellen mit konstitutiver und induzierbarer Überexpression von *Runx2* verwendete (Stock et al., 2004). Dies liegt höchstwahrscheinlich an der benutzten Zelllinie, die mesenchymalen Vorläuferzellen der Knorpelkondensationen ähnlich ist. Die betroffenen Zellen der in dieser Arbeit verwendeten Humeri, sind jedoch schon über das Stadium der mesenchymalen Progenitorzellen hinaus differenziert.

### 5.2.3 Gene Ontology-Analyse und Funktion der Kandidatengene

Die Menge der 71 differentiell exprimierten Gene wurden auf die Überrepräsentierung einzelner GO-Annotationen hin untersucht. Tabelle 4.10 zeigt signifikant überrepräsentierte GO-Annotationen für die Kategorien „molecular function“, „biological process“ und „cellular component“. Es wurden signifikante Überrepräsentierungen von Annotationen, die mit Knochenentwicklung in Verbindung stehen, z.B. „biomineral formation“, „bone remodeling“ und „ossification“, sowie zur Lokalisation im extrazellulären Raum gefunden. Diese Beobachtung liefert starke, wenn auch indirekte Hinweise, daß die Ergebnisse der Chip-Hybridisierungen biologisch relevant sind. Werden die Gene nach ihrer Funktion eingeordnet, ist auffällig, daß die größte Gruppe aus Genen besteht, deren Produkte in die Signalweiterleitung involviert sind. Hierzu gehören z.B. *Ihh*, *Tgfb1*, *Wnt5a*, *Ptch1* und *Pthr1*. Die zweitgrößte Gruppe besteht aus Transkriptionsfaktoren, z.B. *Irx3*, *Tcf7*, *Dlx5*, *Satb2* und *Mef2c*, gefolgt von Genen, die an der Zelladhäsion und -wanderung beteiligt sind (*Cdh2*, *Nrp2*, *Thy1*, *Unc5b*) und Matrixproteinen (*Ibsp*, *Npnt*, *Spp1*, *Dmp1*).

### 5.2.4 Signifikanz der Ergebnisse für das *Runx2*-Signalnetzwerk

Um bisher unbekannte, potentiell direkte Zielgene von *Runx2* zu identifizieren, wurde die Menge der 44 Gene, die zumindest partiell mit *Runx2* koexprimiert sind (siehe Tabelle 4.10) mit den Ergebnissen aus der Suche nach konservierten *Runx2*-Bindungsstellen in den Promotorbereichen verglichen. Alle Gene, die bekanntermaßen durch *Runx2* reguliert werden (*MMP13*, *Spp1*, *Ibsp*, *Ihh*) (D’Alonzo et al., 2002; Uchida et al., 2001; Sato et al., 1998; Yoshida et al., 2004; Javed et al., 2001) oder funktionelle *Runx2*-Bindungsstellen im Promotor enthalten (*Dmp1*) (Fen et al., 2002), wurden durch die Promotoranalyse identifiziert. Daher ist es plausibel, daß auch die anderen fünf Gene (*Vdr*, *Wnt5a*, *Pthr1*, *Fabp3*, *Ptprz1*), die eine Koexpression mit *Runx2* zeigen und konservierte *Runx2*-Bindungsstellen im Promotor aufweisen, direkte *Runx2*-Zielgene sein könnten.

Die Untersuchung der Regulation der neuen potentiellen Zielgene in Zellkulturexperimenten mit Überexpression von *Runx2* lieferte teils deutlich veränderte Expressionen der Kandidatengene. Auch in den Tibiae von *Runx2*-überexprimierenden transgenen Mäusen konnte eine zumindest leicht veränderte Regulation der meisten Kandidaten festgestellt werden. Diese Ergebnisse verstärken den Verdacht der *Runx2*-abhängigen Regulation auch für *Dkk1* und *Tcf7*, deren Promotoren potentielle *Runx2*-Bindungsstellen enthalten, die allerdings in weniger als drei der untersuchten Spezies konserviert sind. Es sind jedoch

weitere Experimente erforderlich, um die direkte Regulation der Kandidaten durch *Runx2* vollständig zu beweisen.

*Mmp9* und *Ctsk* sind nicht mit *Runx2* koexprimiert, sondern werden stattdessen in Osteoklasten exprimiert. Da diese Gene konservierte Runx-Bindungsstellen in ihren Promotoren besitzen, sind sie Kandidaten für eine Regulation durch *Runx1*, welches den wichtigsten *Runt*-Transkriptionsfaktor in Osteoklasten darstellt (Saltman et al., 2005). Dies zeigt, daß die Analyse der Promotorbereiche auch für potentielle *Runx1*-Zielgene interessant ist.

### 5.2.5 Überschneidungen mit den Kandidaten der Frakturheilungs-cDNA-Banken

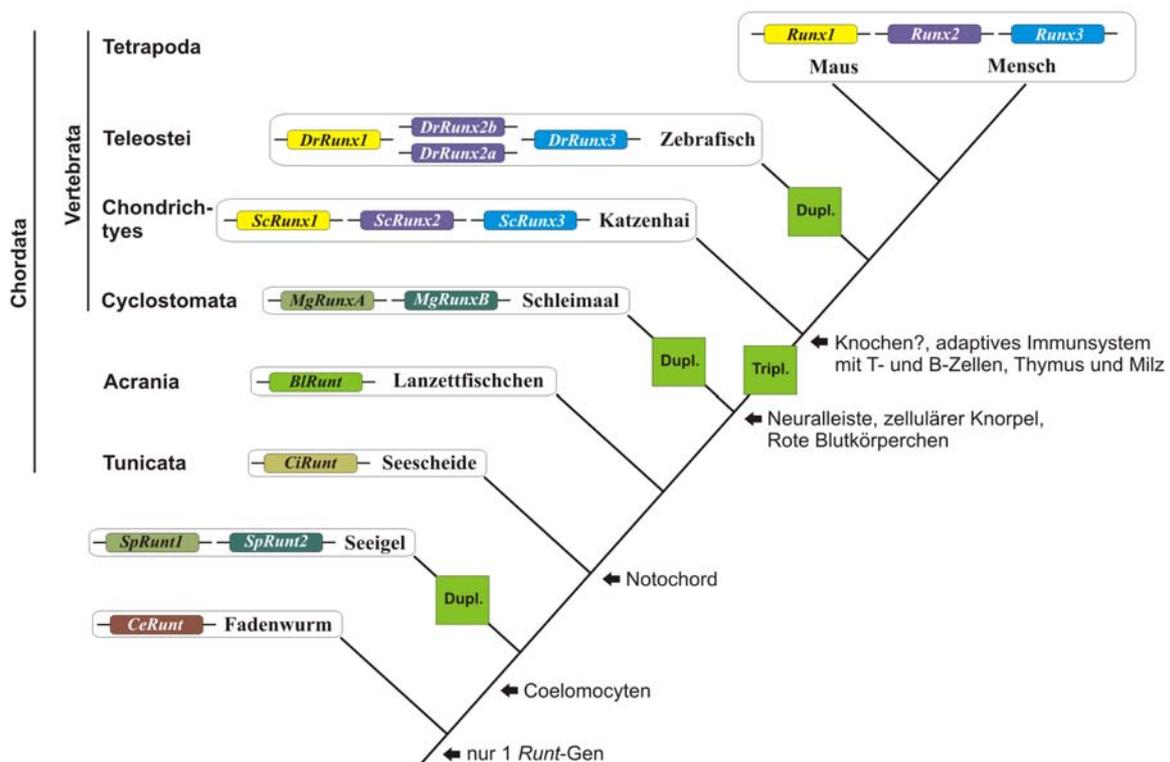
Die EST-Analyse erlaubt auf Grund der großen Anzahl benötigter Sequenzen nur über relativ stark exprimierte Gene signifikante Aussagen. Dies zeigt sich beispielsweise daran, daß bei der Auswertung der EST-Zahlen von Transkriptionsfaktoren keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt wurden. Jedoch konnten mittels qRT-PCR-Analysen auch für einige der Transkriptionsfaktoren (*Id1*, *Id3*, *JunB*, *Rara*, *Tcf4*) signifikante Änderungen der Expression im Frakturheilungsverlauf gezeigt werden. Außer *Acp5* gab es bei der EST-Analyse keine Überschneidungen mit den identifizierten Kandidaten der Microarray-Analyse. Allerdings wiesen die qRT-PCRs für einige weitere Kandidaten (*Ctsk*, *Gpx3*, *Ibsp*, *Mmp9*, *Mmp13*, *S100a4*) ebenfalls eine differentielle Expression im Heilungsverlauf auf. Dies unterstützt die bisherigen Erkenntnisse, daß bei Knochenheilung und -entwicklung ähnliche molekulare Mechanismen ablaufen (Vortkamp et al., 1998; Gerstenfeld und Einhorn, 2003) und zeigt, daß die beiden Ansätze einander ergänzen.

## 5.3 Die Evolution der *Runt*-Genfamilie

Die große Bedeutung der kleinen *Runt*-Genfamilie für die Entwicklung wichtiger Merkmale der Vertebraten wirft die Frage auf, ob es eine Korrelation von Duplikationsereignissen in der Chordatenevolution mit der Entstehung dieser Merkmale gibt. Um eine mögliche Bedeutung von *Runt*-Duplikationen für die Merkmalsentstehung und insbesondere die evolutionäre Entwicklung des Skeletts klären zu können, ist jedoch zunächst eine gut begründete phylogenetische Analyse dieser Genfamilie notwendig.

### 5.3.1 Duplikationsereignisse in der Evolution der Chordaten-*Runx*-Gene

Knorpelfische (Chondrichthyes) repräsentieren eine wichtige Gruppe zur Rekonstruktion der Evolution der Chordata. Es gab jedoch bisher nur partielle Sequenzen zweier *Runx*-homologer Gene aus dem Rochen *Raja eglanteria*. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Sequenzen aus dem Kleingefleckten Katzenhai *Scyliorhinus canicula* ist es nun möglich, eine vervollständigte Phylogenie der Chordata-*Runx*-Gene zu erstellen. Daraus ergibt sich der schematisch in Abbildung 5.2 dargestellte Stammbaum der *Runx*-Genfamilie innerhalb der Chordata. Die Stammart der Chordata besaß vermutlich nur ein *Runx*-Gen und mehrere unabhängige Duplikationen ereigneten sich in den Taxa der Seeigel, der Schleimaale und Knochenfische.



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der *Runx*-Evolution unter Einbeziehung der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.** Dargestellt sind die Anzahl der *Runx*-Gene pro Spezies und die vermuteten Zeitpunkte der *Runx*-Genduplikationen (Dupl.) und -triplikation (Tripl.). Mit Pfeilen werden Apomorphien aufgeführt, die die jeweilige monophyletische Gruppe begründen, z.B. das Notochord als neu entstandenes Chordata-Merkmal.

Da das *RunxB*-Gen des Schleimaals ursprünglichere Merkmale aufweist (siehe Abb. 4.15) und *RunxA* das orthologe Gen zum Vorläufergen der drei *Runx*-Gene der übrigen Vertebraten ist, ist davon auszugehen, daß im Taxon der Schleimaale eine eigene *Runx*-Duplikation stattgefunden hat. Somit muß eine Triplikation des Vorläufergens der drei *Runx*-Gene der Gnathostomata stattgefunden haben.

**Abkürzungen:** **Bl:** *Branchiostoma lanceolatum*; **Ce:** *Caenorhabditis elegans*; **Ci:** *Ciona intestinalis*; **Dr:** *Danio rerio*; **Mg:** *Myxine glutinosa*; **Sc:** *Scyliorhinus canicula*; **Sp:** *Strongylocentrotus purpuratus*.

Es ist wahrscheinlich, daß die Stammart der Chordata nur ein *Runt*-Gen besaß, da sich in den Genomen von *Caenorhabditis elegans*, *Ciona intestinalis*, *Oikopleura dioica* und *Branchiostoma floridae* ebenfalls nur ein *Runt*-Gen findet. Gleichfalls kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß diese Spezies ebenfalls zwei *Runt*-Gene besaßen und eines später verloren ging. Jedoch ist die Annahme nur eines Gens in der Stammart der Chordata die sparsamere Erklärung.

Das Vorhandensein von zwei *Runt*-Genen im Seeigel ist höchstwahrscheinlich das Ergebnis einer Tandemduplikation, da sich beide Gene in einem genomischen Contig und in einem Cluster der phylogenetischen Analyse befinden (siehe Abb 4.15).

Die intensive Suche nach *Runt*-homologen Genen im Kleingefleckten Katzenhai zeigte, daß diese Spezies drei Mitglieder der *Runt*-Genfamilie besitzt, die nach der phylogenetischen Analyse ortholog zu *Runx1*, -2 und -3 der Amniota sind (siehe Abb. 4.15). Diese drei Gene könnten das Ergebnis von zwei Duplikationsrunden beider Gene (z.B. Duplikation des gesamten Genoms) und einem nachfolgenden Verlust eines Gens sein, sodaß drei Gene erhalten blieben. Allerdings ist eine Duplikation eines Gens mit einer weiteren Duplikation nur eines der beiden Gene die sparsamere Erklärung.

Der Stammbaum zeigt, daß das *RunxA* des Schleimaals ortholog zum Ausgangsgen dieser Triplikation ist. Dies zugrundegelegt, muß in der Stammart der Schleimaale eine eigene Duplikation des *Runt*-Gens stattgefunden haben. Passend zu dieser Annahme ist *RunxA* in Geweben, in denen bei Vertebraten *Runt*-Gene wichtige Funktionen ausüben, z.B. im Knorpel, deutlich höher exprimiert (Abb 4.21). Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, daß zwei wesentliche Ereignisse die *Runt*-Genfamilie der Gnathostomata geformt haben. In Übereinstimmung mit den Daten, die auf zumindest eine Genomduplikation vor 350 - 650 Millionen Jahren hindeuten (McLysaght et al., 2002), wurde ein einzelnes *Runt*-Gen in der Stammart der Gnathostomata dupliziert. Im gleichen Zeitraum muß zudem eine weitere Duplikation nur eines *Runt*-Gens stattgefunden haben, die zu den drei Mitgliedern dieser Familie der Gnathostomata führte.

### **5.3.2 Der gesamte *Runt*-Locus wurde einschließlich eines stromabwärts liegenden *Clic*-Gens tripliziert**

Es sollte geklärt werden, ob in der Stammart der Gnathostomata nur das *Runt*-Gen selbst oder der gesamte *Runt*-Lokus tripliziert wurde. Hinweise auf eine Triplikation des *Runt*-Lokus liefern die *Runt*-Gene der Mammalia, die jeweils zwei Isoformen mit unterschiedlichen N-

Termini besitzen. Eine der beiden beginnt mit den Aminosäuren MRIPV und wird durch den proximalen Promotor P2 reguliert, die andere fängt mit den Aminosäuren MASNS oder einer ähnlichen Sequenz an und wird vom distalen Promotor P1 aus abgelesen (Bangsow et al., 2001; Stewart et al., 1997; Levanon et al., 2001). Auch von *ScRunx1-3* des Katzenhais konnten jeweils beide Isoformen identifiziert werden. Zudem konnte nachgewiesen werden, daß im Lanzettfischchen ebenfalls ein proximaler und ein distaler Promotor für *Runt* vorhanden sind (Stricker et al., 2003).

Die Hypothese einer Triplikation des *Runt*-Lokus wird jedoch vor allem durch Indizien gestützt, die sich aus der genomischen Umgebung ergeben. Es wurde bereits beschrieben, daß bei *Runx1-3* des Menschen jeweils stromabwärts des Gens ein *Clic*-Gen liegt. Im Huhn konnte ebenfalls neben allen drei *Runt*-Genen ein entsprechendes *Clic*-Gen auf dem komplementären Strang identifiziert werden. Am wichtigsten ist jedoch, daß auch bei *Ciona intestinalis* ein *Clic*-Gen benachbart zum *Runt*-Gen am gleichen Ende von Chromosom 12 liegt. Es liegt daher nahe anzunehmen, daß tatsächlich der gesamte *Runt*-Lokus tripliziert wurde.

### 5.3.3 Bedeutung der *Runt*-Exon/Intron-Struktur für die Phylogenie der Chordata

Kürzlich wurde publiziert, daß wahrscheinlich die Tunicata als Schwestergruppe der Vertebrata anzusehen sind (Delsuc et al., 2006). Bisher wurde vorwiegend angenommen, daß die Cephalochordaten nächstverwandt zu den Vertebraten sind, da sie eine große Anzahl gemeinsamer abgeleiteter Merkmale (Synapomorphien) aufweisen, die auf diese Verwandtschaft hindeuten. Dies schließt beispielsweise segmentierte Muskeln, die Differenzierung des Neuralrohres in „graue und weiße Substanz“, dorsale Spinalnerven, Ähnlichkeiten im Kreislaufsystem und den Thyroidhormon-Signalweg ein. Dagegen wurden morphologische Hinweise für eine Schwestergruppenbeziehung zwischen Vertebraten und Urochordaten nur von Jefferies (1986) veröffentlicht, die aber auf umstrittenen Fossilfunden beruhen.

Der Vergleich der Exon/Intron-Strukturen der *Runt*-Gene von Seeigel, Lanzettfischchen, des Fadenwurms *C. elegans*, zweier Urochordaten (*C. intestinalis* und *O. dioica*) und von Mensch, Maus und Schleimaal unterstützt die These der Tunicata-Vertebrata-Schwestergruppenbeziehung (siehe Abb. 4.16). Ein Intron ist sowohl in den Vertebratenspezies, als auch in beiden Urochordata-Spezies vorhanden. Dagegen fehlt es im

Seeigel, Lanzettfischchen und Fadenwurm. Dies deutet darauf hin, daß im ursprünglichen Zustand kein Intron vorhanden war und das Intron ein neuerworbenes Merkmal ist.

Es ist recht unwahrscheinlich, daß sich ein Intron an derselben Position des *Runt*-Gens zweimal unabhängig voneinander entwickelt. Allerdings steht die Annahme, daß ein Intron eine Homologie für Urochordaten und Vertebraten ist, im Gegensatz zu fast allen phylogenetischen Analysen, die auf morphologischen Merkmalen beruhen und ein Vertebraten-Cephalochordaten-Schwestergruppenverhältnis begründen (z.B. Brusca et al., 2003; Nielsen, 1995). Phylogenetische Analysen, die molekulare Daten verschiedener Taxa der Deuterostomier nutzen, ergaben teilweise zu den morphologischen Befunden widersprüchliche Resultate.

Untersuchungen, die auf Genen für ribosomale RNAs beruhen, wiesen auf eine Schwestergruppenbeziehung zwischen Cephalochordaten und Vertebraten hin (Cameron et al., 2002; Winchell et al., 2002). Allerdings ergaben Untersuchungen einer größeren Anzahl von Genen eine Präferenz für eine Vertebraten-Urochordaten Schwestergruppenbeziehung (Philippe et al., 2005; Blair und Hedges, 2005). Eine dieser Arbeiten zeigte, daß Vertebraten und Cephalochordaten möglicherweise durch einige Gene mit ungleichen Mutationsraten zwischen den beiden Taxa scheinbar näher verwandt sind als Vertebraten und Urochordaten. Gene mit einer stabileren Mutationsrate deuteten jedoch auf eine nähere Verwandtschaft von Vertebraten und Urochordaten hin (Blair und Hedges, 2005). Zusätzlich wurden bei der Untersuchung der Cadherin-Domänenstruktur ähnliche abgeleitete Merkmale bei Vertebraten und Urochordaten gefunden, die ebenfalls eine Schwestergruppenbeziehung dieser beiden Taxa vermuten lassen (Oda, 2002). Wenn letzteres zutreffend ist, waren die oben erwähnten morphologischen Ähnlichkeiten zwischen Vertebraten und Cephalochordaten wahrscheinlich schon in einem Urochordaten-Vorläufer vorhanden und sind während des Übergangs zu einem sessilen Leben der adulten Tiere reduziert worden.

Beide alternativen taxonomischen Stellungen der Tunicata und Cephalochordata sind jedoch mit der Hypothese konsistent, daß die Stammart der Chordata nur ein *Runt*-Gen besessen hat.

#### **5.3.4 Die *Runt*-Expression in konservierten und neu entstandenen Merkmalen**

Zur Beantwortung der Frage, ob *Runt*-Genduplikationen mit der Entstehung neuer Merkmale der Chordata korrelieren, sind nicht nur eine möglichst vollständige Phylogenie der

Genfamilie, sondern auch Kenntnisse über die Expressionsmuster der betreffenden Gene notwendig.

Die *Runt*-Gene der Bilateria haben komplexe Expressionsmuster und schließen eine verblüffende Vielfalt unterschiedlicher Gewebe ein. Im Folgenden wird für eine detaillierte Diskussion das larvale *Runt*-Expressionsmuster des Lanzettfischchens als Außengruppe mit Expressionen im Darm, Notochord und Neuralrohr verwendet, welches in parallel zu dieser Arbeit laufenden Untersuchungen gefunden wurde. Es wird auch eine mögliche Signifikanz der *Runt*-Expression für die Evolution einiger neuer Merkmale betrachtet.

#### **5.3.4.1 Das Notochord ist eine apomorphe *Runt*-Expressionsdomäne in Chordaten**

Das Notochord ist ein Definitionsmerkmal der Chordaten (Satoh und Jeffery, 1995). Es ist ein dorsal liegender Stab dehnbaren mesodermalen Gewebes, das direkt unterhalb des Neuralrohres liegt. Das Notochord wirkt als ein Skelettelement während der frühen Embryonalentwicklung der Chordaten. Zusätzlich hat das Notochord in Vertebratenembryonen wichtige induktive Funktionen, wie beispielsweise bei der Bildung der Neuralleiste (Hall, 2005b). Es muß jedoch erwähnt werden, daß die Rolle des Notochord in adulten Lanzettfischchen völlig anders ist. Als ein abgeleitetes Merkmal besteht es in adulten Tieren aus muskelähnlichen Zellen und wird als kontraktiles Skelettorgan betrachtet (Suzuki und Satoh, 2000). *BrRunt* ist im Notochord als einer Apomorphie der Chordaten sowohl in Larven, als auch in adulten Tieren exprimiert. Im Schleimaal ist *RunxA* ebenfalls in der Chorda exprimiert (Abb. 4.21) und während der frühen Skeletogenese der Maus wurde für *Runx2* eine Expression im Notochord beschrieben (Otto et al., 2002). Daher scheint die *Runt*-Expression im Notochord der Maus ein ursprünglicher Zustand zu sein.

#### **5.3.4.2 Der Darm ist eine plesiomorphe *Runt*-Expressionsdomäne bei Chordaten**

Der Darm ist eines der ersten Merkmale, die sich in den Metazoa entwickelten und ist wahrscheinlich eine der bedeutendsten ursprünglichen *Runt*-Expressionsorte. Sowohl das *Run* im Nematoden, als auch *SpRunt1* im Seeigel sind im Darm exprimiert (Nam et al., 2002; Stricker et al., 2003). Desweiteren wurde die Expression von *Runt* bei adulten Lanzettfischchen im Kiemendarm, Darm und schwächer im Leberblindsack gefunden (siehe

Abb. 4.22; Stricker et al., 2003). Auch das *Runx3* der Mammalia ist im Darm exprimiert. Hier ist es an der Differenzierung der Darmepithelzellen beteiligt und spielt eine Rolle bei der Entstehung von Darmkrebs (Li et al., 2002). Interessanterweise ist auch im Katzenhai *ScRunx3* im Vergleich zu *ScRunx1* und -2 im Spiralmagen am stärksten exprimiert (siehe Abb. 4.20). Daher kann man vermuten, daß nach den *Runt*-Duplikationen in den Gnathostomata das *Runx3*-Gen zum wichtigsten *Runt*-Gen in diesem Bereich wurde.

Der plesiomorphe Zustand der *Runt*-Expression im Kiemendarm als Merkmal des Chordatengrundbauplans könnte mit der späteren Entwicklung, z. B. des pharyngealen Knorpels, im Zusammenhang stehen. Dieser entstand in der Kiemenregion und damit an einer Stelle, an der *Runt* bei Lanzettfischchen sehr stark exprimiert ist.

#### **5.3.4.3 Alle drei *Runt*-Gene sind an der Entwicklung der Placoidschuppen und Zähne beteiligt**

Zähne entwickeln sich als Epithelanhänge. Hierbei spielt eine komplexe Interaktion zwischen dem Ectoderm und dem darunterliegenden, aus der Neuralleiste stammenden Mesoderm eine Schlüsselrolle. Letztlich differenzieren die dentalen Epithelzellen zu Ameloblasten und die mesenchymalen Zellen zu Odontoblasten, welche Zahnschmelz beziehungsweise Dentin ablagern.

Auch *Runx1-3* sind während der Zahnentwicklung exprimiert. In der Maus ist dabei die Expression von *Runx2* und -3 auf mesenchymale Gewebe beschränkt, wohingegen *Runx1* nur im Epithel exprimiert wird. *Runx2* ist hier für die Vermittlung der Interaktion zwischen Mesenchym und Epithel von Bedeutung (D'Souza et al., 1999).

Von einem evolutionsbiologischen Standpunkt aus ist es interessant, daß Odontoblasten, die das Dentin der Placoidschuppen und Zähne ablagern, aus Neuralleistenvorläuferzellen hervorgehen (Hall, 1999). Da die Differenzierung zu Odontoblasten ausschließlich aus Neuralleistenzellen erfolgt, ist Dentin eine neues Merkmal der Vertebraten und an die Entstehung der Neuralleiste gekoppelt.

Auf Grund der starken Expression aller drei Katzenhai-*Runt*-Gene in der Haut (siehe Abb. 4.20) ist es auch interessant, ob alle drei Gene an der Entwicklung der Placoidschuppen beteiligt sind. Placoidschuppen sind kleine, konische, zahnähnliche Strukturen, die charakteristisch für Knorpelfische sind. *In situ*-Hybridisierungen zeigten, daß tatsächlich alle drei Gene in den sich entwickelnden Placoidschuppen exprimiert sind. *ScRunx1* und -3 werden in den Epidermiszellen des Stratum germinativum exprimiert, wohingegen eine

Expression von *ScRunx2* dort zu finden ist, wo sich später die Basalplatte ausbildet. Daher ist die Expression aller drei *Runt*-Gene während der Zahnentwicklung eine Apomorphie der Gnathostomata.

#### 5.3.4.4 *Runt*-Gene in der Evolution von Knorpel und Knochen

Bei der Analyse der Ontogenese und Evolution des Skeletts ist der Zebrafisch ein wichtiger Modellorganismus, in dem gezeigt wurde, daß *Runx2* den Osteoblastenmarker *Osteocalcin* aktivieren kann (Pinto et al., 2005). Für *Runx1 - 3* der Maus wurde ebenfalls die Expression in Skelettelementen gezeigt. Dies legt nahe, daß *Runt*-Gene schon in den gemeinsamen Vorläufern der Knochenfische und Tetrapoda und nicht nur bei der Stammart der Mammalia eine Schlüsselrolle bei der Skelettentwicklung gespielt haben.

Auch beim Katzenhai zeigte sich bei der Expressionsanalyse durch quantitative RT-PCR im Knorpel des Kiemenbogens eine Expression aller drei *Runt*-Gene, wobei *ScRunx3* am stärksten exprimiert ist, gefolgt von *ScRunx1* und *ScRunx2*. Die Expression aller drei Gene erinnert an die Situation in den Knorpelanlagen der Maus, in denen ebenfalls alle drei *Runt*-Gene exprimiert werden (Yoshida und Komori, 2005). Mit einer insgesamt geringeren Expressionstärke wurde das gleiche Verhältnis wie im Kiemenbogen (*Runx3*>*Runx1*>*Runx2*) auch in der RNA aus der Wirbelsäule gefunden. Bisher steht es jedoch noch aus, die Expressionsmuster aller *Runt*-Gene im Knorpel durch *in situ*-Hybridisierungen zu bestimmen. Somit kann keine Aussage getroffen werden, ob die *Runt*-Gene des Katzenhais ein der Knorpel- und Knochenentwicklung der Maus vergleichbares Expressionsmuster haben. Eine vergleichende Untersuchung der Wirbelsäulenregion des Hais wäre besonders interessant, da berichtet wurde, daß der Neuralbogen der Katzenhaiwirbelkörper mineralisierten hypertrophen Knorpel enthält und benachbart dazu sogar Knochen durch perichondriale Ossifikation bildet (Hall, 2005a).

Im Schleimaal kann der Knorpel in harte und weiche Anteile unterschieden werden (Robson et al., 2000). *MgRunxB* ist sowohl im harten, als auch im weichen Knorpel nur schwach exprimiert. Allerdings ist nach der phylogenetischen Analyse (siehe Abb. 4.15) *MgRunxA* ortholog zum Ursprungsgen der Vertebraten-*Runt*-Genfamilie. Dieses Gen zeigt vor allem im harten Knorpel eine starke Expression, was darauf hindeutet, daß dies auch in der Stammart der Vertebrata der Fall war.

In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß im Neunauge, der einzigen weiteren rezenten Gattung der Agnatha, *Sox9* zusammen mit *Col2* und *Pthrp* im Knorpel exprimiert ist

(Trivett et al., 2005; Zhang et al., 2006). Daraus wurde geschlossen, daß das genetische Programm für die Chondrogenese von der Induktion eines chondrogenen Mesenchyms bis zur Synthese kollagenhaltiger Matrix überraschend früh während der Vertebratenevolution entstand (Zhang et al., 2006). Auf Grund der starken Knorpelexpression des *RunxA*-Gens des Schleimaals können auch *Runt*-Gene als ein Teil des molekularen Netzwerks zur Knorpelbildung in der Stammart der Vertebrata angesehen werden.

Um einen tieferen Einblick in die frühe Evolution unseres Skeletts zu gewinnen, wurde die *Runt*-Expression des Lanzettfischchens genauer untersucht. Im Gegensatz zum zellulären Knorpel, den man im Kiemendarm der Vertebrata findet, werden die Kiemenbögen des Lanzettfischchens von azellulären, faserigen Elementen stabilisiert, die höchstwahrscheinlich von umliegenden Epithelzellen sezerniert werden. Die äußere Schicht dieser Elemente zeigt ein deutliches Signal bei der Färbung mit einem Kollagen 2-spezifischen monoklonalen Antikörper (Rychel et al., 2006). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen klar, daß auch *BlRunt* zusammen mit *BlSox9* in dieser Region stark exprimiert ist. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die molekulare Maschinerie, die die Vertebraten für die Knorpelentwicklung nutzen, bereits in der Stammart der Cephalochordata und Vertebrata vorhanden war und damit etwa 100 Millionen Jahre älter ist als bisher angenommen.

## 5.4 Fazit und Ausblick

Die Analyse der Schaf-cDNA-Banken lieferte durch die Vergleiche der EST-Zahlen und zusätzlicher qRT-PCRs insgesamt 87 Kandidatengene, von denen 53 Gene noch nicht mit einer Funktion bei der Knochenheilung oder -entwicklung in Verbindung gebracht wurden. Deren Einfluß während der Frakturheilung ist somit unklar. Hier bieten sich Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen auch in anderen Modellorganismen, um die Wirkungsweise dieser Gene zu untersuchen. Beispielsweise könnte eine retrovirale Expression von Kandidatengenen in Zellkulturen Hinweise auf chondro- oder osteogene Funktionen liefern.

Da *Runx2* ein Schlüsselgen der Skelettentwicklung und vermutlich auch der Frakturheilung ist, bahnt auch die Untersuchung des *Runx2*-Mausmodells den Weg für einen genaueren Einblick in die Biologie des Skeletts. Durch die Kombination von Microarray-basierten Expressionsprofilen, qRT-PCRs, *in situ*-Hybridisierungen und bioinformatischen Methoden konnte unter den 71 differentiell exprimierten Kandidaten bei 30 Genen erstmals eine wahrscheinliche Funktion in der Skeletogenese aufgezeigt werden. Für das Verständnis der

Skelettentwicklung auf molekularer Ebene sind direkte Zielgene von Runx2 besonders bedeutsam. In einem evolutionsbiologischen Ansatz konnten durch Analyse von zwischen mehreren Spezies konservierten Promotorbereichen mit *Fabp3*, *Pthr1*, *Ptprz1*, *Vdr* und *Wnt5a* fünf neue potentielle Runx2-Zielgene identifiziert werden. Die ersten Ergebnisse, die auf eine Regulation der Gene durch Runx2 hindeuten, lassen weitergehende Experimente durch detailliertere Untersuchung der Promotoren sinnvoll erscheinen, um die Regulation durch Runx2 zu überprüfen.

Durch die Sequenzen der *Runt*-Gene des Katzenhais konnte eine wichtige Lücke in der Phylogenie der Chordata-*Runt*-Gene geschlossen werden. Die Expression aller drei *Runt*-Gene des Katzenhais im Knorpel, des Schleimaal-*RunxA*-Gens vor allem in harten Knorpel und des Lanzettfischchen-*Runt*-Gens besonders im Kiemendarm ist ein starkes Indiz für eine Funktion der Genfamilie in der Entwicklung von Stützelementen bzw. des Skeletts schon während früher Evolutionsstufen der Chordata. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die orthologen Gene verschiedener Spezies nicht nur auf Sequenzebene Ähnlichkeiten besitzen, sondern auch funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen.

Als weiterführendes Experiment wäre die Expression der *Runt*-Gene der verschiedenen Spezies beispielsweise mittels RCASBP-Viren in Hühnchen-Mikromasskulturen denkbar. Hiermit könnten bei Aktivierung unterschiedlicher Zielgene Hinweise auf mögliche funktionelle Ähnlichkeiten der entsprechenden orthologen Gene erhalten werden.

Insbesondere die deutliche Koexpression von *Runt* und *Sox9* im Lanzettfischchen zeigt, daß wichtige Teile der molekularen Maschinerie für die Knorpelentwicklung deutlich früher vorhanden waren als bisher angenommen. Das wirft die Frage auf, ob möglicherweise weitere Gene, die in der Skeletogenese wichtige Funktionen übernehmen, bereits so früh in der Evolution in diesen Bereichen exprimiert waren und ob eventuell auch die Regulation beispielsweise von *Runt*-Zielgenen über so lange Zeiträume konserviert sein könnte.