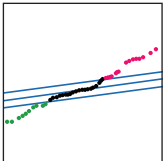


Anorganischer boviner Knochen (Bio-Oss) reguliert miRNA von osteoblastenartigen Zellen



Annalisa Palmieri, PhD¹/Furio Pezzetti, PhD²/Giorgio Brunelli, MD³
 Marcella Martinelli, PhD⁴/Lorenzo Lo Muzio, MD⁵
 Antonio Scarano, DDS⁶/Luca Scapoli, PhD⁴/Marzia Arlotti, PhD¹
 Laura Guerzoni, PhD⁷/Francesco Carinci, MD⁸

Bio-Oss (Geistlich) besteht aus anorganischem bovinem Knochen. Es wird in der Oralchirurgie häufig für verschiedene Verfahren zur Knochenregeneration verwendet. Es ist allerdings bisher kaum bekannt, wie dieses Biomaterial die Osteoblastenaktivität so modifiziert, dass die Knochenbildung gefördert wird. MicroRNAs (miRNAs) sind eine Klasse von kleinen, funktionellen, nicht kodierenden RNAs mit einer Länge von 19 bis 23 Nukleotiden, die die Transkription von Messenger-RNAs (mRNAs) in Proteinen regulieren. In dieser Studie wurde mithilfe der miRNA-Microarray-Technik die Translationsregulation in einer osteoblastenartigen Zelllinie (MG63) untersucht, die mit Bio-Oss in Kontakt stand. Neun hochregulierte miRNAs (mir-423, mir-492, mir-191, mir-23a, mir-377, mir-494, mir-214, mir-193b, mir-320) und vier herunterregulierte miRNAs (mir-27a, mir-24, mir-188, let-7c) wurden identifiziert. Da jede miRNA 100 mRNAs reguliert, wurden nur mRNAs analysiert, die in Bezug zur Knochenbildung stehen. Die überwiegende Mehrheit der entdeckten mRNAs sind herunterreguliert, unter ihnen einige Homöobox-Gene (Gene, die die Morphogenese eines gesamten Körpersegments regulieren), wie beispielsweise *Noggin* und *EN1*. Eine indirekte positive Wirkung zeigte sich am knochenmorphogenetischen Protein-4. Soweit den Autoren bekannt ist, sind die hier aufgezeichneten Daten die ersten zur Translationsregulation in Osteoblasten, die in Kontakt zu Bio-Oss standen. Diese Studie kann für einen besseren Einblick in den molekularen Mechanismus der Knochenregeneration relevant sein. Außerdem kann sie möglicherweise als Hilfsmittel für die Analyse der kombinierten Anwendung von Zytokinen dienen. (Int J Par Rest Zahnheilkd 2010;30:83–87.)

¹ Postdoc Fellow, Institute of Histology, Universität Bologna, Italien; Center of Molecular Genetics, CARISBO Foundation, Bologna, Italien.

² Associate Professor, Institute of Histology, Universität Bologna, Italien; Center of Molecular Genetics, CARISBO Foundation, Bologna, Italien.

³ Senior Lecturer, Dipartimento di Discipline Medico Chirurgiche della Comunicazione e del Comportamento (DMCCC), Section of Maxillofacial Surgery, Universität Ferrara, Ferrara, Italien.

⁴ Assistant Professor, Institute of Histology, Universität Bologna, Italien; Center of Molecular Genetics, CARISBO Foundation, Bologna, Italien.

⁵ Professor, Dental Clinic, Universität Foggia, Italien.

⁶ Assistant Professor, Dental Clinic, Universität Chieti, Italien.

⁷ Postdoc Fellow, Department of DMCCC, Section of Maxillofacial Surgery, Universität Ferrara, Italien.

⁸ Associate Professor, Department of DMCCC, Section of Maxillofacial Surgery, Universität Ferrara, Italien.

Korrespondenz an: Dr. Francesco Carinci, Department of DMCCC, Section of Maxillofacial Surgery, Universität Ferrara, Corso Giovecca, 203, 44100 Ferrara, Italien; Fax: +39 0532 291582; E-Mail: crc@unife.it

Bio-Oss (Geistlich) besteht aus deproteinisiertem, sterilisiertem bovinem Knochen, und zwar aus kalziumarmem Karbonatapatit, und ist sowohl in physikalischer Hinsicht als auch chemischer identisch mit humanem Knochen¹⁻⁸. Bio-Oss hat eine Druckfestigkeit von 35 MPa. Dank seiner hohen Porosität (75 % bis 80 % des Gesamtvolumens) hat es eine große innere Oberfläche, die als Substrat für eine gesteigerte Angiogenese und als Gerüst für die Knochenbildung dient¹⁻⁸. Aus Berichten geht hervor, dass Bio-Oss die Osteogenese fördert und eine sehr geringe Resorptionsrate hat. Bio-Oss wird häufig für den Sinuslift verwendet⁹⁻¹⁶. In manchen Fällen kann es von Vorteil sein, ein Material wie z. B. Bio-Oss zu verwenden, das nur in geringem Umfang abgebaut wird. In dem Fall wächst vom Sinusboden aus natürlicher Knochen in den Transplantatbereich. Das Bio-Oss fungiert dabei als Platzhalter und beugt der unerwünschten frühen Resorption vor. Dabei zeigt sich keine entzündliche Reaktion. Der Erfolg von Bio-Oss beim Sinuslift wurde auch in einer Langzeitstudie bestätigt¹⁷.

Da der Mechanismus, durch den Bio-Oss die Osteoblastenaktivität stimuliert und so die Knochenbildung fördert, noch kaum bekannt ist, haben die Autoren versucht, durch die Analyse von Mikro-

RNAs (miRNAs) mehr Informationen zu erhalten.

Die Transkription ist die Synthese der Messenger-RNA (mRNA) aus der DNA. Die Translation hingegen ist die Synthese des Proteins aus der mRNA. MiRNAs sind eine Klasse von kleinen, funktionellen, nicht kodierenden RNAs mit einer Länge von 19 bis 23 Nucleotiden, die die Translation von mRNAs in Proteine regulieren^{18, 19}. MiRNAs regulieren also die Menge spezifischer mRNAs in den post-transkriptionellen RNA-Interferenzwegen, indem sie den Abbau der Ziel-mRNAs induzieren²⁰⁻²⁶.

Um die Auswirkung von Bio-Oss auf die miRNAs zu untersuchen, wurde ein Microchip verwendet, der Hunderte von miRNA-Sequenzen (Invitrogen) enthält. Diese Technik wird als miRNA-Microarray oder Genexpressionsprofilierung bezeichnet, da sie es dem Techniker ermöglicht, die Veränderungen in Hunderten von miRNAs gleichzeitig zu analysieren. Die Autoren analysierten 329 humane miRNA-Sequenzen, die auf das Array (Slide) aufgedruckt waren, und verglichen die miRNA-Expressionen in humanen osteoblastenartigen Zellen (MG63), die mit Bio-Oss behandelt worden waren, mit unbehandelten Zellen (MG63).

Material und Methode

Zellkultur

Osteoblastenartige Zellen (MG-63) wurden in sterilen Falcon-Röhrchen (Becton Dickinson), die Eagle's Minimum Essential Medium sowie 10 % fötales Kälberserum (Sigma Chemical Co) und Antibiotika (Penicillin 100 µg/ml und Streptomycin 100 µg/ml; Sigma Chemical) enthielten, in Kultur gebracht. Die Kulturen wurden bei 37 °C in einer wassergesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Die MG63-Zellen wurden gesammelt und in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen/ml in 9-cm²-Wells (3-ml) ausgesät. Dazu wurden zur Zellfreisetzung 0,1 % Trypsin, 0,02 % Ethylendiamintetraessigsäure in Eagle's Puffer verwendet, der frei war von Ca⁺⁺- und Mg⁺⁺. In ein Well-Set wurde Bio-Oss in einer Konzentration von 100 mg/10 ml gegeben. Wenn die Kulturen nach 24 Stunden subkonfluent waren, wurden die Zellen für die RNA-Extraktion bearbeitet.

miRNA-Microarray

Die miRNAs wurden mit dem Pure-Link-miRNA-Isolation-Kit (Invitrogen) aus den Zellen extrahiert. Aus jeder Probe (behandelt und Kontrolle) wurden 400 Nanogramm miRNA entnommen und für die Hybridisierung des NCode Multi-Species miRNA Microarray verwendet, ein Slide, das 329 humane miRNA-Sequenzen in doppelter Ausführung enthält. Für die Kennzeichnung und Hybridisierung der miRNA auf dem Microarray wurde, nach Anweisung des Herstellers, ein NCode miRNA Labeling System (Invitrogen) verwendet. Jede miRNA wurde unter Verwendung von poly (A)-Polymerase und einem optimierten Reaktionspuffer mit einem poly (A)-Schwanz versehen. Dann wurde mithilfe einer überbrückenden Oligo (dT) eine Capture-Sequenz an die miRNA angebunden. Nach dem Reinigen wurden die markierten miRNAs auf dem Microarray hybridisiert und über Nacht inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 18 bis 20 Stunden wurde das Array gewaschen und mit Alexa Fluor 3 Capture-Reagens (für die Kontrolle) und Alexa Fluor 5 Capture-Reagens (für die behandelten Zellen) gewaschen und hybridisiert. Das Array wurde noch einmal gewaschen und dann mit einem Standard-Micro-

array-Scanner (Axon Instruments) gescannt.

Nach dem Scannen wurde jeder Spot mithilfe einer GenePix Array-Liste identifiziert, die als Datei von www.invitrogen.com/node heruntergeladen werden kann und die Identität und Lage aller Testobjekte, die auf das Array aufgedruckt sind, auflistet. Die Bilder wurden mit der Software GenePix 6.0 (Axon Instruments) quantifiziert. Die Signalintensität für jeden Spot wurde berechnet, indem der lokale Hintergrund von der Gesamtintensität subtrahiert wurde. Die Daten wurden mit den Softwarepaketen DNMAID und Preprocessing normalisiert^{27, 28}. Diese generieren einen Durchschnittswert der beiden Spotreplikate jeder miRNA. Für die Auswahl der differenziell exprimierten miRNA wurden die erhaltenen Daten mit der Software Significance Analysis of Microarray²⁹ analysiert.

Für die Zielvorhersagen und Validierungen wurden die miRNAs mit miRBase Target³⁰, einer Web Resource, bearbeitet, das vom Enright Lab am Wellcome Trust Sanger Institute entwickelt wurde. Dieses Programm verwendet einen Algorithmus mit der Bezeichnung miRanda, um potenzielle Bindungsstellen für bestimmte miRNA in genomischen Sequenzen zu identifizieren.

Die Liste der Zielgene wurde dann mit FatIGO³¹, einem Web-Interface, bearbeitet, das mithilfe von Gene Ontology³² ein einfaches Data-Mining durchführt. Dabei wurde jedem Cluster der regulierten Gene die charakteristischste Gen-Ontologie-Bezeichnung zugeteilt.

Ergebnisse

Aufgrund der Hybridisierung der miRNA (aus den MG63-Zellen, die mit Bio-Oss in einer Konzentration von 100 mg/10 ml in Kultur gebracht worden

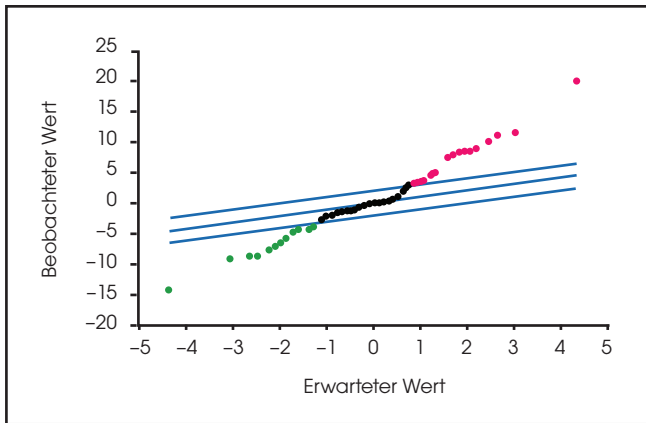


Abb. 1 Statistische Analyse des Microarray-Plots von MG63-Zellen, die 24 Stunden mit Bio-Oss in einer Konzentration von 100 mg/10 ml behandelt wurden. Herunterregulierte miRNAs befinden sich unten links, hochregulierte miRNAs oben rechts. Die parallelen Linien, die von unten links nach oben rechts eingezeichnet wurden, sind die Cut-off-Grenzen.

Tabelle 1 Herunter- und hochregulierte Gene

miRNA	Biologische Funktion	Zielgene
Hochreguliert	Skelettentwicklung	SUFU, IGF2, IGFb4, EN1, PAPSS1, NOG
	Knorpelbildung	NOG
Herunterreguliert	Skelettentwicklung	DLX5

waren) auf den Sequenzen, die auf den Slide aufgedruckt waren, konnten die Autoren eine systemische Analyse der miRNAs durchführen und so Primärinformationen zur Regulierung des Translationsprozesses gewinnen, der durch das Bio-Oss induziert wird. Es wurden neun hochregulierte miRNAs (mir-423, mir-492, mir-191, mir-23a, mir-377, mir-494, mir-214, mir-193b, mir-320) und vier herunterregulierte miRNAs (mir-27a, mir-24, mir-188 let-7c) identifiziert. Die Falscherkennungsrate war gleich 0 und die Punktzahl betrug > 7. Abbildung 1 ist die grafische Darstellung der statistischen Analyse für das Microarray. Sie zeigt die differenziell exprimierte miRNA. Da eine miRNA potenziell Tausende von Genen reguliert, wählten die Autoren nur die Gene aus, die im Zusammenhang zur Osteogenese und zum Knochenremodeling stehen und die von zwei fast unabhängigen miRNA reguliert wurden (Tabelle 1). Gene mit gegensätzlicher Regulierung wurden ausgeschlossen.

Diskussion

Histologische Berichte zeigen, dass die meisten Bio-Oss-Partikel von neugebildetem, reifem, kompaktem Knochen mit gut organisierten Osteonen umgeben waren^{2, 5, 7, 8}. In manchen Bereichen wurden Osteoblasten beobachtet, die im Begriff waren, sich direkt an die Partikeloberfläche anzulagern. Am Knochen-Partikel-Interface bestand immer ein enger Kontakt zwischen dem Knochen und den Partikeln⁹⁻¹³. Weder an den Partikeln noch am Interface zum Knochen lag entzündliches Zellinfiltrat vor. Allerdings ist bisher kaum bekannt, wie dieses Biomaterial auf genetischer Ebene die Osteoblastenaktivität so modifiziert, dass die Knochenbildung gefördert wird. Deshalb versuchten die Autoren, weitere Informationen zu erhalten, indem sie miRNAs in Osteoblasten analysierten, die in Kontakt zu Bio-Oss standen, und diese mit Osteoblasten verglichen, die keinen Kontakt zu Bio-Oss hatten.

miRNAs sind eine erst vor Kurzem entdeckte Klasse von kleinen, nicht kodierenden RNA-Molekülen mit 19 bis 23 Nukleotiden. Sie spielen im posttranskriptionellen regulatorischen Prozess eine wichtige Rolle. miRNAs werden nicht selbst in Proteine übersetzt. Vielmehr regulieren sie die Expression anderer Gene, indem sie ihre RNA-Ziele entweder spalten oder deren Übersetzung unterdrücken.

Aufgrund der Hybridisierung der miRNA aus den MG63-Zellen, die mit 100 mg/10 ml Bio-Oss in Kultur gebracht worden waren, auf den Sequenzen, die auf den Slide aufgedruckt waren, konnten die Autoren eine systemische Analyse der miRNAs durchführen und so Primärinformationen zur Regulierung der Übersetzung gewinnen, die durch das Bio-Oss induziert wird (Tabelle 1).

Die überwiegende Mehrheit der entdeckten Gene war herunterreguliert, unter ihnen einige Homöobox-Gene. Noggin (NOG) inaktiviert die Mitglieder der TGF (transformierende Wachstumsfaktoren) β -Superfamilie

von Signalproteinen, wie z. B. das knochenmorphogenetische Protein-4, NOG, das effizienter als die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie durch extrazelluläre Matrizen diffundiert, spielt bei der Erzeugung von Morphogengradienten vielleicht eine wesentliche Rolle³³. Der humane Engrailed Homolog 1 oder EN1 ist während der Entwicklung der Gliedmaßen an der Steuerung der Musterbildung beteiligt³⁴. Distal-less Homöobox 5 (DLX5) wird hochreguliert. Es gehört zu einer Homöobox-Transkriptionsfaktor-Familie, die bei der Knochenentwicklung und Frakturheilung eine Rolle spielt. Die Mutation dieses Gens hängt mit der Fehlbildung Spaltfuß/Spalthand zusammen³⁵. Eine weitere Gruppe der herunterregulierten Gene sind die Hormone, wie der insulinartige Wachstumsfaktor 2 (IGF2). Dieses Hormon gehört zur Insulinfamilie der Polypeptid-Wachstumsfaktoren, die an Entwicklung und Wachstum beteiligt ist³⁶.

Die hier erörterten Gene sind nur einige von denen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind, die von der miRNA differenziell reguliert werden. Die Autoren haben diejenigen analysiert, deren Funktion besser bekannt ist und die in direktem Bezug zu Knochenbildung, Skelettentwicklung, Knorpelumbau und Knochenproduktion stehen. Außerdem kann die Tatsache, dass mehrere Gene, die in Zusammenhang mit der Knochenbildung stehen, eine negative translatorische Kontrolle ausüben, auf die frühen Phasen der Analyse bezogen werden (d. h. auf die MG63-Zellen, die 24 Stunden kultiviert wurden, bis sie subkonfluent waren). Diese Phase ist durch eine erhöhte Zellkinetik und geringe Differenzierung und extrazelluläre Matrixproduktion gekennzeichnet.

MG63 ist übrigens eine Zelllinie und keine primäre Osteoblastenzellkultur. Trotzdem bietet die Verwendung ei-

ner Zelllinie Vorteile, da die Reproduzierbarkeit der Daten höher ist, weil keine Variabilität des untersuchten Patienten vorliegt. Primäre Zellkulturen sind eine Quelle normaler Zellen, aber sie enthalten auch verschiedene Typen kontaminierender Zellen sowie Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Außerdem haben die Autoren sich dafür entschieden, das Experiment nach 24 Stunden durchzuführen, um Informationen zu den frühen Phasen der Stimulation zu erhalten, die einen kritischen Zeitraum bei einer Transplantatbehandlung darstellen. Es sind noch weitere Untersuchungen mit anderen osteoblastenartigen Zelllinien, Primärkulturen und unterschiedliche Zeitpunkte notwendig, um die molekularen Abläufe im Zusammenhang mit Bio-Oss umfassend zu verstehen. Es wurde allerdings eine globale Auswirkung auf die Knochenbildung entdeckt und das Studienmodell kann für die Untersuchung einer kombinierten Anwendung von Zytokinen, wie z. B. knochenmorphogenetischem Protein-4, nützlich sein.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Universität Ferrara, Italien (FC), PRIN 2005 Prot. 2005067555-002 (FC), der Fondazione CARIFE (FC) und der Fondazione CARISBO (FP) unterstützt.

Literatur

1. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:117-124.
2. Piattelli M, Favero GF, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus lifting augmentation procedure: A histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:835-840.
3. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): A clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997;17:232-241.
4. Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinized bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:157-163.
5. Tadjoedin ES, de Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 2003;30:261-270.
6. Merckx MAW, Maltha JC, Stoelinga PJW. Assessment of the value of anorganic bone additives in sinus floor augmentation: A review of clinical reports. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:1-6.
7. Maiorana C, Sommariva L, Brivio P, Sigurtà D, Santoro F. Maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone (Bio-Oss) and autologous platelet-rich plasma: Preliminary clinical and histologic evaluations. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:227-235.
8. Hallman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L. A clinical histologic study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 months of healing. *Clin Oral Implants Res* 2001;12:135-143.



9. Haas R, Baron M, Donath K, Zechner W, Watzek G. Porous hydroxyapatite for grafting the maxillary sinus: A comparative histomorphometric study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:337–346.
10. Artzi Z, Nemcovsky CE, Dayan D. Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological stainings in 10 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:420–427.
11. Sennerby L, Lundgren S. Histologic aspects of simultaneous implant and graft placement. In: Jensen OT (ed). *The Sinus Bone Graft*. Chicago: Quintessenz, 1999:95–105.
12. Landi L, Pretel RW Jr, Hakimi NM, Setayesh R. Maxillary sinus floor elevation using a combination of DFDBA and bovine-derived porous hydroxyapatite: A preliminary histologic and histomorphometric report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2000;20:574–583.
13. Froum SJ, Tarnow DP, Wallace SS, Rohrer MD, Cho SC. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: A clinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analysis—Part 2 of an ongoing prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1998;18:528–543.
14. Wheeler SL. Sinus augmentation for dental implants: The use of alloplastic materials. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1287–1293.
15. Wallace SS, Froum SJ, Tarnow DP. Histologic evaluation of a sinus elevation procedure: A clinical report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1996;16:46–51.
16. Wallace SS, Froum SJ. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:328–343.
17. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tepei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:369–372.
18. Moss EG. MicroRNAs in noncoding RNAs. In: Barciszewski J, Erdmann V (eds). *Molecular Biology and Molecular Medicine*. Georgetown: Landes Bioscience, 2003:98–114.
19. Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, et al. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res* 2006;34:4801–4815.
20. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: Growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003;113:673–676 (erratum 2003;114:269).
21. Sontheimer EJ, Carthew RW. Silence from within: Endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell* 2005;122:9–12.
22. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: The big world of small RNAs. *Science* 2005;309:1519–1524.
23. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001;106:23–34.
24. Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001;293:834–838.
25. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001;15:2654–1659.
26. Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004;118:57–68.
27. Vaquerizas JM, Dopazo J, Díaz-Uriarte R. DNMAID: Web-based diagnosis and normalization for microarray data. *Bioinformatics* 2004;20:3656–3658.
28. Herrero J, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. Gene expression data preprocessing. *Bioinformatics* 2003;19:655–656.
29. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116–5121 (erratum 2001;98:10515).
30. MicroCosm Targets Version 5. <http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5>. Accessed November 24, 2009.
31. Babelomics. FatiGO. <http://www.fatigo.org>. Accessed November 24, 2009.
32. The Gene Ontology website. <http://www.geneontology.org>. Accessed September 22, 2009.
33. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A:1544–1552 (erratum 2004;86-A:141).
34. Johnson RL, Tabin CJ. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 1997;90:979–990.
35. Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. Specification of jaw subdivisions by *Dlx* genes. *Science* 2002;298:381–385.
36. Constancia M, Hemberger M, Hughes J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 2002;417:945–948.