

**Einfluss des Transkriptionsfaktors Tal1  
auf die Osteoklastogenese durch  
Regulation von *DC-STAMP***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Nadine Courtial  
aus Limburg

Frankfurt am Main 2011  
(D 30)

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Wels

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Transkriptionsregulation in der Hämatopoese“ von Dr. J. Lausen am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	6
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	8
<b>2. Einleitung</b> .....	10
2.1 <i>Knochenentstehung während der Embryogenese</i> .....	10
2.2 <i>Remodellierung des Knochengewebes</i> .....	13
2.3 <i>Differenzierung von Osteoklasten</i> .....	15
2.4 <i>RANKL-Signaltransduktion in Osteoklasten</i> .....	18
2.5 <i>Zell-Zell-Fusion während der Osteoklastogenese</i> .....	20
2.6 <i>Polarisation und Physiologie der Osteoklasten</i> .....	22
2.7 <i>Transkriptionsfaktoren in Osteoklasten</i> .....	25
2.8 <i>Osteoklasten-assoziierte Krankheiten</i> .....	28
2.9 <i>Transkriptionsfaktor Tal1</i> .....	33
2.10 <i>Tal1 und Osteoklasten</i> .....	37
2.11 <i>Zielsetzung der Arbeit</i> .....	40
<b>3. Material und Methoden</b> .....	41
3.1 <i>DNA/RNA-Methoden</i> .....	41
3.1.1 <i>Standardmethoden und verwendete Kits</i> .....	41
3.1.2 <i>Vektoren</i> .....	41
3.1.3 <i>Quantitative Real Time - PCR (qRT-PCR)</i> .....	47
3.1.4 <i>Microarray-Analyse</i> .....	49
3.2 <i>Zellkultur-Methoden</i> .....	50
3.2.1 <i>Zelllinien</i> .....	50
3.2.2 <i>Kultivierung von eukaryotischen Zellen</i> .....	50
3.2.3 <i>Transfektion von Zellen</i> .....	50
3.2.4 <i>Herstellung einer stabilen Zelllinien</i> .....	51
3.2.5 <i>Isolation muriner Monozyten</i> .....	51
3.2.6 <i>Herstellung von lentiviralen Partikeln</i> .....	52
3.2.7 <i>Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel</i> .....	52
3.2.8 <i>Bestimmung des lentiviralen Titers</i> .....	52
3.2.9 <i>Transduktion muriner Monozyten</i> .....	53
3.2.10 <i>Sortierung GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie-Sortierung</i> .....	54
3.2.11 <i>Differenzierung von RAW264.7-Zellen und muriner Monozyten</i> .....	54
3.2.12 <i>Färbung der sauren Phosphatase</i> .....	54

3.3	<i>Proteinbiochemische-Methoden</i> .....	55
3.3.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten.....	55
3.3.2	Herstellung von Kernextrakten .....	55
3.3.3	Antikörper .....	56
3.3.4	Immunoblot.....	57
3.3.5	Immunfluoreszenz .....	58
3.3.6	Immunhistologie muriner Knochenschnitte .....	58
3.3.7	Co-Immunopräzipitation .....	59
3.3.8	Endogene Immunopräzipitation.....	59
3.3.9	<i>GST-Pulldown</i> .....	60
3.3.10	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	60
3.3.11	Chromatin-Immunopräzipitation mit geringer Zellzahl ( $\mu$ ChIP) .....	62
3.3.12	ChIP-ReChIP .....	62
3.3.13	Promotorstudien .....	63
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
4.1	<i>Monozyten und reife Osteoklasten exprimieren Tal1</i> .....	64
4.1.1	Tal1-Expression in Knochenschnitten .....	64
4.1.2	Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimieren Tal1 .....	66
4.1.3	RAW264.7-Zellen als Modell für Osteoklastogenese exprimieren Tal1 .....	68
4.1.4	Primäre Monozyten als Modell für Osteoklastogenese exprimieren Tal1 .....	69
4.2	<i>RANKL induziert die Expression von Tal1 in Osteoklasten</i> .....	71
4.3	<i>Tal1 inhibiert die Osteoklastendifferenzierung</i> .....	76
4.3.1	Nachweis des Knock-downs und der Überexpression von Tal1 .....	76
4.3.2	Ektopie Expression von Tal1 inhibiert die Osteoklastogenese .....	80
4.3.3	Knock-down von Tal1 induziert die Osteoklastogenese.....	82
4.4	<i>Tal1 beeinflusst Osteoklasten-spezifische Gene</i> .....	83
4.4.1	Einfluss der Tal1-Überexpression auf Osteoklasten-spezifische Gene .....	84
4.4.2	Genexpressionsanalyse nach Tal1-Knock-down .....	87
4.4.3	Vergleich der Ergebnisse des Microarray mit Daten aus RAW264.7-hTal1-Zellen .....	90
4.5	<i>Tal1 interagiert mit PU.1 und MITF</i> .....	92
4.6	<i>Tal1 wirkt als Repressor von DC-STAMP</i> .....	96
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>102</b>
5.1	<i>Tal1 wird in Knochen exprimiert</i> .....	102
5.2	<i>RANKL verursacht eine Induktion des Tal1-Proteins</i> .....	104
5.3	<i>Regulation von microRNA´s während der Osteoklastogenese</i> .....	106
5.4	<i>Tal1 beeinflusst die Osteoklasten-Differenzierung</i> .....	108
5.5	<i>Tal1 beeinflusst Osteoklasten-spezifische Gene</i> .....	110
5.6	<i>Tal1 reguliert die Expression von DC-STAMP</i> .....	112

---

5.7	<i>Tal1 und Osteoklasten-assoziierte Krankheiten</i> .....	115
5.8	<i>Hypothese zur Tal1-Regulation der Osteoklasten-Differenzierung</i> .....	117
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>134</b>
7.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	134
7.2	<i>FDG/LacZ-Expression in Tal1-LacZ- und Wildtyp-Mäusen</i> .....	136
7.3	<i>Verwendete Chemikalien</i> .....	138
7.4	<i>Verwendete Geräte</i> .....	139
<b>8.</b>	<b>Publikationen und Posterpräsentationen</b> .....	<b>140</b>
8.1	<i>Publikation</i> .....	140
8.2	<i>Posterpräsentationen</i> .....	140
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>141</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>142</b>
<b>11.</b>	<b>Eidstattliche Erklärung</b> .....	<b>143</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.2.1:	Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation.....	11
Abb.2.2:	Schematische Darstellung der Epiphysenfuge .....	12
Abb.2.3:	Schematische Darstellung der Knochenremodellierung .....	14
Abb.2.4:	Darstellung der adulten Hämatopoese .....	16
Abb.2.5:	Regulation der Osteoklastendifferenzierung.....	16
Abb.2.6:	Rolle von RANK, RANKL und Osteoprotegerin während der Osteoklastogenese.....	18
Abb.2.7:	Darstellung der RANKL-Signaltransduktion.....	19
Abb.2.8:	Schematische Darstellung der Fusion von mononukleären Pre-Osteoklasten .....	21
Abb.2.9:	Darstellung der Osteoklasten-Physiologie.....	24
Abb.2.10:	Einfluss von Tal1 auf Hämatopoese und Angiogenese .....	34
Abb.2.11:	Schematische Darstellung der Tal1-Isoformen.....	35
Abb.2.12:	Phänotyp der SIL/Tal1-transgenen Mäuse .....	38
Abb.2.13:	Einfluss von Tal1 auf Monozyten-Vorläuferzellen.....	39
Abb.3.1:	Vektorkarte von pcDNA3 .....	42
Abb.3.2:	Vektorkarte von pIRES2-EGFP .....	43
Abb.3.3:	Vektorkarte von pGL3-Basic.....	43
Abb.3.4:	Vektorkarte von psiRNA-h7SK-GFPzeo .....	44
Abb.3.5:	SEW-Vektor zur Herstellung lentiviraler Partikel.....	45
Abb.3.6:	SIEW-Vektor zur lentiviralen Transduktion .....	46
Abb.4.1:	Schematische und histologische Darstellung eines Röhrenknochens .....	64
Abb.4.2:	Immunhistologischer Nachweis von Tal1 in Osteoklasten.....	65
Abb.4.3:	Durchflusszytometrie-Analyse der LacZ-Expression in <i>Tal1-LacZ</i> -Mäusen.....	67
Abb.4.4:	Darstellung der RAW264.7-Zellkultur .....	68
Abb.4.5:	Nachweis von Tal1 in RAW264.7-Zellen .....	69
Abb.4.6:	Darstellung der BMM-Zellkultur .....	69
Abb.4.7:	Immunfluoreszenz-Analyse in Monozyten und reifen Osteoklasten .....	70
Abb.4.8:	RANKL induziert die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene .....	72
Abb.4.9:	RANKL hat keinen Einfluss auf die Expression von <i>Tal1</i> -mRNA.....	73
Abb.4.10:	RANKL induziert die Expression von Tal1 auf Proteinebene.....	73
Abb.4.11:	Analyse der <i>Knock-down</i> -Effizienz des sh-Tal1-Konstrukts.....	77
Abb.4.12:	Transduktionseffizienz der BMM-Zellen.....	78
Abb.4.13:	Tal1- <i>Knock-down</i> in BMM-Zellen.....	78
Abb.4.14:	Tal1-Expression in BMM-LacZ-Zellen.....	79
Abb.4.15:	Tal1-Expression in BMM-hTal1-Zellen.....	79
Abb.4.16:	Tal1-Expression in RAW264.7-hTal1-Zellen.....	80
Abb.4.17:	Tal1 inhibiert die Osteoklasten-Differenzierung in RAW264.7-hTal1-Zellen.....	80
Abb.4.18:	Tal1 inhibiert die Osteoklasten-Differenzierung in BMM-hTal1-Zellen.....	81
Abb.4.19:	<i>Knock-down</i> von Tal1 induziert die Osteoklasten-Differenzierung in BMM-Zellen.....	82
Abb.4.20:	BMM-Zellen aus <i>Tal1-LacZ</i> -Mäusen zeigen keine veränderte Osteoklasten-Differenzierung .....	83
Abb.4.21:	Genexpressionsanalyse in Tal1-überexprimierenden RAW264.7-Zellen .....	85
Abb.4.22:	Einfluss von Tal1 in RAW264.7-hTal1-Zellen nach RANKL-Inkubation.....	86
Abb.4.23:	Kategorisierung der regulierten Gene des <i>Microarrays</i> .....	89
Abb.4.24:	Genexpressionsanalyse von <i>DC-STAMP</i> und <i>Acp5</i> .....	90
Abb.4.25:	Tal1 bindet an die Promotorbereiche potentieller Zielgene.....	91
Abb.4.26:	Schematische Darstellung des murinen <i>DC-STAMP</i> -Promotorbereichs .....	93
Abb.4.27:	Chromatin-Immunopräzipitation von Tal1, PU.1 und MITF auf dem <i>DC-STAMP</i> -Promotor .....	93
Abb.4.28:	Sequentieller ChIP von Tal1 und PU.1 auf dem <i>DC-STAMP</i> -Promotor.....	94
Abb.4.29:	Tal1 interagiert mit PU.1 und MITF .....	95
Abb.4.30:	Tal1 interagiert mit PU.1 in RAW264.7-Zellen.....	95
Abb.4.31:	GST- <i>Pulldown</i> von Tal1 mit PU.1 und MITF .....	96
Abb.4.32:	Vergleich des <i>Knock-downs</i> und der Überexpression von Tal1.....	97
Abb.4.33:	Einfluss von Tal1 auf Zielgene nach RANKL-Behandlung.....	98
Abb.4.34:	Promotorstudie von <i>DC-STAMP</i> in Abhängigkeit von Tal1, PU.1 und MITF.....	99
Abb.4.35:	Einfluss der mutierten E-Box-Sequenz auf die <i>DC-STAMP</i> -Promotoraktivität.....	100
Abb.4.36:	Einfluss von RANKL auf die Tal1-Belegung des <i>DC-STAMP</i> -Promotors .....	100
Abb.4.37:	Einfluss von RANKL auf die PU.1- und MITF-Bindung an den <i>DC-STAMP</i> -Promotor .....	101
Abb.5.1:	Schema der posttranskriptionellen Modifikationen von Tal1.....	106
Abb.5.2:	Schematische Darstellung der Hypothese zur Tal1-Regulation der Osteoklastogenese.....	117
Abb.7.1:	Durchflusszytometrie-Analyse der LacZ-Expression in <i>Tal1-LacZ</i> -Mäusen.....	136
Abb.7.2:	Durchflusszytometrie-Analyse der LacZ-Expression in Wildtyp-Mäusen.....	137

---

Tabelle 2.1: Osteopetrose-assoziierte Maus-Modelle.....	30
Tabelle 3.1: Übersicht verwendeter <i>Kits</i> .....	41
Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in pcDNA3-2HA .....	42
Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für pcDNA3-2HA.....	42
Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in pIRES2-EGFP .....	43
Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für pIRES2-EGFP .....	43
Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten Primer zur Mutagenese von pGL3-Basic-DC-Stamp.....	44
Tabelle 3.7: Übersicht der verwendet Sequenzierungsprimer für pGL3-Basic .....	44
Tabelle 3.8: Übersicht der verwendeten Oligos zur Klonierung in psiRNA-h7SK-GFPzeo .....	45
Tabelle 3.9: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für psiRNA-h7SK-GFPzeo .....	45
Tabelle 3.10: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in SEW.....	46
Tabelle 3.11: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für SEW .....	46
Tabelle 3.12: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in SIEW.....	46
Tabelle 3.13: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für SIEW .....	46
Tabelle 3.14: qRT-PCR Programm zur Messung von cDNA .....	47
Tabelle 3.15: Übersicht verwendeter Primer zur Messung von cDNA .....	48
Tabelle 3.16: q-PCR Programm zur Messung von ChIP-DNA.....	49
Tabelle 3.17: Übersicht verwendeter Primer zur Messung von ChIP-DNA.....	49
Tabelle 3.18: Übersicht der verwendeten Zelllinien .....	50
Tabelle 3.19: Pipettierschema zur Verdünnung lentiviraler Partikel.....	53
Tabelle 3.20: Übersicht verwendeter Primärantikörper.....	56
Tabelle 3.21: Übersicht verwendeter Sekundärantikörper .....	57
Tabelle 3.22: Übersicht verwendeter Immunglobuline .....	57
Tabelle 4.1: Regulierte microRNA's in BMM-Zellen .....	75
Tabelle 7.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und der Hersteller .....	138
Tabelle 7.2: Übersicht der verwendeten Geräte und Hersteller .....	139

## 1. Zusammenfassung

Das menschliche Knochengewebe unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau. Der Knochenumbau, die so genannte Knochenremodellierung, findet stetig statt und etwa 10 % des gesamten Knochengewebes werden innerhalb eines Jahres erneuert (Lerner UH, 2006). Während der Knochenremodellierung befindet sich die Zellaktivität der Knochenaufbauenden Osteoblasten und der Knochenabbauenden Osteoklasten in einem empfindlichen Gleichgewicht (Karsenty G und Wagner EF, 2002; Teitelbaum SL, 2000). Durch Störung des Gleichgewichts zwischen Osteoblasten und Osteoklasten kann es zu Knochen-assoziierten Krankheiten wie Osteoporose oder Osteopetrose kommen (Helfrich MH, 2003; Sambrook P und Cooper C, 2006).

Osteoklasten sind multinukleäre Zellen, die in der Lage sind die Knochenmatrix zu resorbieren (Teitelbaum SL, 2000). Sie entstehen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen durch Differenzierung und Zellfusion von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen (Menea C *et al.*, 2000, Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008). Die Osteoklasten-Differenzierung wird hauptsächlich durch die Zytokine M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) und RANKL (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  b ligand*) induziert. Sie initiieren ein spezifisches Expressionsmuster Osteoklasten-spezifischer Gene und aktivieren die Zellfusion in Osteoklasten-Vorläuferzellen zur Bildung reifer Osteoklasten (Boyle WJ *et al.*, 2003; Asagiri M und Takayanagi H, 2007). Die RANKL-vermittelte Induktion der Osteoklastogenese beruht auf der Initiierung eines streng regulierten Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren (Yang X und Karsenty G, 2002). Einige Transkriptionsfaktoren, die während der Osteoklasten-Differenzierung induziert und exprimiert werden, sind nicht auf Osteoklasten beschränkt. Sie erfüllen auch Aufgaben in anderen hämatopoetischen Differenzierungsprozessen (Engel I und Murre C *et al.*, 1999), so dass vermutlich die Kombination der Transkriptionsfaktoren entscheidend für die Osteoklastogenese ist.

Der *basic helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktor Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*, auch Scl1, *stem cell leukemia 1*) ist ein entscheidender Faktor in der primitiven und der definitiven Hämatopoese (Bloor AJ *et al.*, 2002; Shivdasani RA *et al.*, 1996). Die Expression von Tal1 konnte bisher in verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien gezeigt werden, u.a. in monozytischen Zellen (Elefanty AG *et al.*, 1998; Green AR *et al.*, 1992; Pulford K *et al.*, 1995; Dey S *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors Tal1 in Monozyten und reifen Osteoklasten, vor allem in Bezug auf genregulatorische Prozesse während der Osteoklasten-Differenzierung, untersucht. Der Transkriptionsfaktor Tal1 wird

*in vitro* und *in vivo* in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten exprimiert. Die Proteinexpression von Tal1 wird durch die Inkubation der Zellen mit RANKL induziert, jedoch wurde dies in Bezug auf die mRNA-Expression von Tal1 nicht beobachtet, so dass vermutlich eine posttranskriptionelle Regulation von Tal1 vorliegt.

**D**ie Überexpression von Tal1 sorgte für eine Blockade der Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen in reife Osteoklasten. Der Verlust von Tal1 in primären Monozyten/Makrophagen-Zellen führte zur veränderten Expression von über 1200 Genen, wobei jeweils etwa 600 Gene herauf- bzw. herabreguliert waren. Dies verdeutlicht, dass Tal1 sowohl an der Aktivierung als auch an der Reprimierung der Genexpression in Osteoklasten-Vorläuferzellen beteiligt ist. Die Liste der herabregulierten Gene beinhaltete u.a. das Osteoklasten-spezifische Enzym *Acp5* (auch TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*), die Liste der herauf regulierten Gene beinhaltete u.a. *DC-STAMP* (*dendritic cell specific transmembrane protein*) und *ATP6V0D2* (*d2 isoform of vascular ATPase V0 domain*), beide werden im Zusammenhang mit der Zellfusion während der Osteoklasten-Differenzierung beschrieben (Kim K *et al.*, 2008; Kim T *et al.*, 2010; Yagi M *et al.*, 2005). Der Promotor von *DC-STAMP* beinhaltet mehrere potentielle Bindestellen für Tal1 und Osteoklasten-spezifische Transkriptionsfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass Tal1, PU.1 und MITF im Bereich um 343 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt des *DC-STAMP*-Promotors binden und dass Tal1 mit den Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF interagiert. Der inhibitorische Effekt von Tal1 auf die Osteoklasten-Differenzierung kommt durch die Reprimierung der Aktivität der Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF auf dem *DC-STAMP*-Promotor in Osteoklasten-Vorläuferzellen zustande. Während der Osteoklastogenese kommt es zu einer verringerten Tal1-Bindung auf dem *DC-STAMP*-Promotor, wodurch die Tal1-vermittelte Inhibierung der Expression aufgehoben wird. Die Bindung von PU.1 und MITF auf dem Promotor von *DC-STAMP* nimmt während der Osteoklasten-Differenzierung zu. Die Expression von *DC-STAMP* wird im Verlauf der Osteoklastogenese induziert, wodurch es zur Zell-Zell-Fusion kommt.

**D**ie Analyse des transkriptionellen Netzwerks, das die Fusion mononukleärer Zellen in reife Osteoklasten reguliert, vertieft das molekulare Verständnis der Osteoklasten-Differenzierung und kann zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen, die in der Behandlung von Osteoporose, Riesenzelltumoren und anderen Osteoklasten-assoziierten Krankheiten verwendet werden können.

## 2. Einleitung

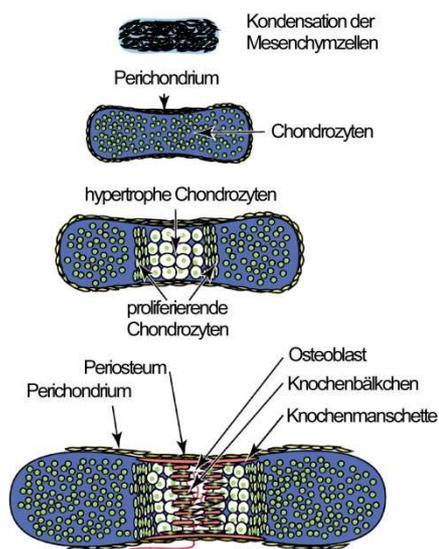
Die Entstehung der menschlichen Gewebe während der Embryogenese und die Differenzierung der hämatopoetischen Zellen bis hin zu spezialisierten Blut- und Knochenzellen beruht auf einem streng regulierten Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren (Engel I und Murre C, 1999). Während basale Transkriptionsfaktoren ubiquitär exprimiert werden, sorgen spezifische Transkriptionsfaktoren Gewebe- und Zelltyp-spezifisch für die Regulation einer spezifischen Genexpression, die für die Differenzierung und Funktion des jeweiligen Zelltyps benötigt werden (Georges AB *et al.*, 2010). Die Entstehung des Knochengewebes während der Embryogenese und die Knochenremodellierung im adulten Organismus, sowie die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Zudem werden hier die regulatorischen Effekte von Transkriptionsfaktoren auf die Osteoklastogenese und der Einfluss des Transkriptionsfaktors Tal1 auf die Hämatopoese und Osteoklasten verdeutlicht.

### 2.1 Knochenentstehung während der Embryogenese

Das menschliche Skelett besteht aus 206 Knochen, wobei eine große Variabilität in Bezug auf die Form der Knochen vorliegt (Karsenty G und Wagner EF, 2002). Das Skelett ist hauptsächlich aus zwei verschiedenen Geweben aufgebaut, der Knorpelsubstanz und dem Knochengewebe. Die Synthese und Aufrechterhaltung der Knochensubstanz wird maßgeblich von Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Chondrozyten beeinflusst (Buckwalter JA und Cooper RR, 1987). Das Skelett eines erwachsenen Menschen besteht zu 4-6 % aus Osteoblasten und zu 1-2 % aus Osteoklasten, während Osteozyten den Großteil des Knochengewebes mit mehr als 90 % darstellen (Bonewald LF, 2007).

Während der menschlichen Entwicklung können zwei Mechanismen zur Knochenbildung beobachtet werden. Flächenartige Knochen wie die Schädelknochen, Rippen, Beckenknochen, u.a. entstehen durch Zusammenlagerung von mesenchymalen Zellen des embryonalen Bindegewebes. Diese differenzieren direkt in Osteoblasten, bauen die Knochengrundsubstanz auf, die anschließend mineralisiert. Dieser Vorgang wird als **desmale Ossifikation** bezeichnet.

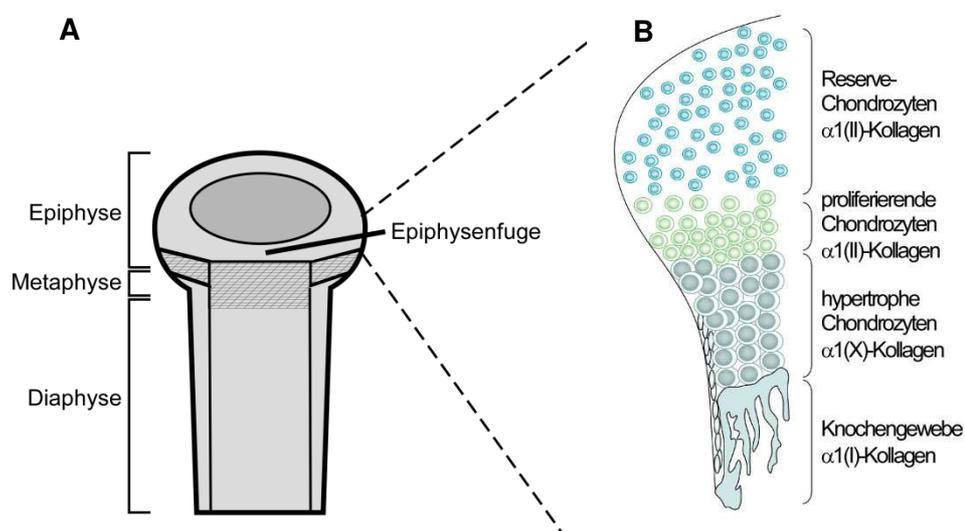
Bei der **endochondralen Ossifikation** werden die Röhrenknochen und alle anderen Elemente des Skeletts über eine Zwischenstufe gebildet (Abb.2.1). Ähnlich wie bei der desmalen Ossifikation lagern sich mesenchymale Zellen des embryonalen Bindegewebes zusammen. Diese Zellen differenzieren dann zu Chondrozyten und bilden die Anlage zum künftigen Knochen (Hall BK, 1987). Die Differenzierung der mesenchymalen Zellen in Richtung Chondrozyten wird maßgeblich vom Transkriptionsfaktor Sox9 (*SRY box containing gene 9*) reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Sox9 direkt an regulatorische Elemente von  $\alpha 1(\text{II})$ -Kollagen bindet (Wright E *et al.*, 1995; Lefebvre V *et al.*, 1997). Die Chondrozyten werden durch die spezifische Expression von Aggrecan und  $\alpha 1(\text{II})$ -Kollagen charakterisiert. Im weiteren Verlauf der endochondralen Ossifikation differenzieren die Chondrozyten zu pre-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, die anhand ihrer Morphologie und der Expression an  $\alpha 1(\text{II})$ -Kollagen unterschieden werden können. Pre-hypertrophe Chondrozyten besitzen ein geringes Expressionslevel an  $\alpha 1(\text{II})$ -Kollagen, während hypertrophe Chondrozyten diese Form des Kollagens nicht mehr exprimieren, sondern  $\alpha 1(\text{X})$ -Kollagen bilden (Poole AR *et al.*, 1989). An der Oberfläche der Knochenanlage, dem so genannten Perichondrium, entwickeln sich mesenchymale Zellen zu Osteoblasten, sie umgeben das Gerüst aus Knorpelzellen mit einer mineralisierten Struktur, die als Knochenmanschette (*bone collar*) bezeichnet wird (Pechak DG *et al.*, 1986).



**Abb.2.1: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation.** Mesenchymale Zellen des embryonalen Bindegewebes lagern sich zusammen und werden nach außen durch das Perichondrium abgegrenzt. Im Zentrum der Knochenanlage differenzieren die Mesenchymzellen zu Chondrozyten. Im Verlauf weiterer Differenzierungsschritte bilden sich hypertrophe Chondrozyten, diese verdrängen die proliferierenden Chondrozyten an den Rand und bilden selbst eine so genannte Ruhezone. Sie durchlaufen apoptotischen Abbau und setzen dadurch VEGF frei, so dass Blutgefäße in das Knorpelgewebe einwachsen. Die Blutgefäße bringen die Chondroklasten für den Abbau der kollagenhaltigen ECM und Osteoblasten für den Aufbau knöchriger ECM in das Knorpelgewebe ein (Nakashima K und de Crombrughe B, 2003, modifiziert).

Die Osteoblasten zeichnen sich durch die Expression von Cbfa1 (RUNX2,  *runt-related transcription factor 2*) aus, das wiederum die Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) induziert (Ducy P *et al.*, 1997). VEGF wird ebenfalls in hypertrophen Chondrozyten exprimiert, die nach vollständiger Differenzierung eine extrazelluläre Matrix (ECM, *extracellular matrix*) bilden, dann in Apoptose gehen und dadurch das Wachstumshormon abgeben. In Abhängigkeit von VEGF dringen dann endotheliale Zellen des Mesenchyms in die Knorpelsubstanz ein und sorgen somit für dessen Vaskularisation. Dieser Prozess dient zum einen für das Einbringen von Chondroklasten, die Knorpelsubstanz abbauen, und zum anderen für das Einwandern von Osteoblasten der Knochenmanschette, die knorpelige ECM in knöchrige ECM umwandeln (Ornitz DM und Marie PJ, 2002; DeLise AM *et al.*, 2000).

Durch die sequentielle Differenzierung der Chondrozyten entsteht eine Zellorganisation, die als Epiphysen- oder Wachstumsfuge bezeichnet wird (Abb.2.2). Ruhende Chondrozyten am distalen Ende der Wachstumsplatte stellen die Quelle für proliferierende Chondrozyten dar und sind somit essentiell für das Längenwachstum des Knochens (Karsenty G und Wagner EF, 2002; Erlebacher A *et al.*, 1995). Im Inneren des Knochens entsteht ein Innenraum (primäres Mark), welcher durch pluripotente Mesenchymzellen ersetzt wird und somit das eigentliche Knochenmark darstellt.



**Abb.2.2: Schematische Darstellung der Epiphysenfuge.** (A) Schematische Darstellung eines Längenknochens. (B) Die Epiphysenfuge gliedert sich in verschiedene Zonen auf, wobei der Differenzierungsstatus der Chondrozyten von der Reservezone bis zur hypertrophen Zone zunimmt. Terminal differenzierte Zellen durchlaufen Apoptose. Durch einwandernde Osteoblasten wird die extrazelluläre Matrix der Chondrozyten in Knochenmatrix umgewandelt (Yang X und Karsenty G, 2002, modifiziert).

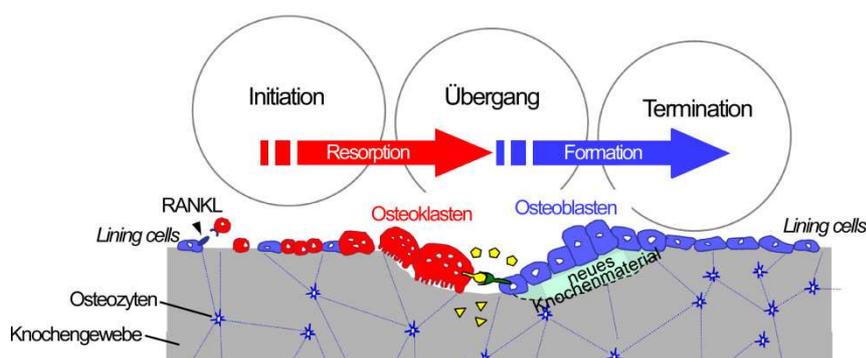
Das Knochengewebe besitzt die Eigenschaft zur Reparatur und Regeneration nach einer Verletzung oder einem chirurgischen Eingriff. Während der Heilung von Knochenbrüchen werden die gleichen Schritte wie zur Entstehung des Knochens während der Embryogenese durchlaufen (Ferguson C *et al.*, 1999). Die Heilung der meisten Frakturen verläuft in einer Kombination aus desmaler und endochondraler Ossifikation. Endochondrale Ossifikation findet an der Außenseite der Knochenhaut und der Frakturstelle statt. Zur desmalen Ossifikation kommt es innerhalb der Knochenhaut. Beide Prozesse dienen der Stabilisierung der Knochenfragmente. Im weiteren Verlauf der Frakturheilung kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms und der Initiation einer Entzündungsreaktion, dann zur Angiogenese und Bildung von Knorpelgewebe, es folgen Mineralisierung und Abbau des Knorpelgewebes, Entstehung von neuem Knochengewebe und Knochenremodellierung (Einhorn TA *et al.*, 1998).

## **2.2 Remodellierung des Knochengewebes**

Die Knochen sind verantwortlich für die Stabilität des menschlichen Körpers. Sie tragen zum Schutz von Organen bei, unterstützen die Gehirn- und Lungenfunktion, sind ausschlaggebend für die Fortbewegung, beinhalten mit dem Knochenmark den Ort der Hämatopoese und dienen als Speicher für Mineralstoffe wie Kalzium und Phosphat. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität und der Funktionalität unterliegt der Knochen einem ständigen Auf- und Abbau, wobei etwa 10 % des gesamten Knochengewebes innerhalb eines Jahres erneuert werden. Die Hauptaufgabe der Knochenremodellierung ist es, durch alltägliche Beanspruchung und Bewegung natürlich entstehende Strukturschäden zu reparieren. Die Mikroarchitektur des Knochens wird somit ständig den jeweiligen, eventuell wechselnden Lebensbedingungen des Menschen, wie zum Beispiel dem Gewicht und der Ernährung, angepasst. Außerdem übernimmt der Knochenumbau die Wiederherstellung des voll funktionsfähigen Knochens nach einer Fraktur (Lerner UH, 2006).

Die Remodellierung des Knochengewebes ist ein komplexer Prozess, der die Funktion von Osteoklasten zur Resorption von Knochenmaterial und die Bildung von neuem Knochenmaterial durch Osteoblasten beinhaltet. Beide Zelltypen interagieren in einer Einheit, die als *basic multicellular unit* (BMU) bezeichnet wird (Hill PA, 1998). Während der Knochenremodellierung werden mehrere Schritte durchlaufen (Abb.2.3), die als Initiation, Übergang und Termination bezeichnet werden (Matsuo K und Irie N, 2008).

Die Initiation der Knochenremodellierung beginnt mit der Freisetzung chemotaktischer Zytokine von den Stromazellen bzw. *Lining cells* (ruhende Osteoblasten). Sie sezernieren chemotaktische Zytokine wie MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), die dafür sorgen, dass Osteoklasten-Vorläuferzellen in den Bereich des Knochenumbaus gelangen. Die Produktion von MCP-1 erfolgt bei Anwesenheit von Parathormon (PTH), das für den Kalzium-Stoffwechsel verantwortlich ist und von Nebenschilddrüsen gebildet wird, wenn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel im Blut zu gering ist (Poole KE *et al.*, 2005). Außerdem sorgen inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) und Interleukin-1 $\beta$  für die Induktion von MCP-1 (Li X *et al.*, 2007; Graves DT *et al.*, 2002). Des Weiteren sind in das Knochengewebe eingebettete, ruhende Osteoblasten, so genannte Osteozyten, in der Lage Strukturschäden und Mikrofrakturen im Knochen zu erkennen. Die Osteozyten induzieren die Expression des Liganden RANKL (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand*) in Osteoblasten. Da RANKL ein entscheidender Faktor der Osteoklastogenese ist, beeinflussen Osteozyten somit die Differenzierung der Osteoklasten (Bonewald LF, 2007).



**Abb.2.3: Schematische Darstellung der Knochenremodellierung.** Der Prozess der Knochenremodellierung wird in drei Schritte unterteilt. Während der Initiation erfolgt die Rekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen (rot) durch *Lining cells*. Osteozyten regen die Expression von RANKL in Osteoblasten (blau) an, wodurch die Differenzierung zum reifen Osteoklasten (rot) induziert wird und die Resorption des Knochenmaterials beginnt. Durch Abbauprodukte (gelb) wird die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen in reife Osteoblasten aktiviert, die dann mit dem Aufbau von neuem Knochenmaterial beginnen (Matsuo K und Irie N, 2008, modifiziert).

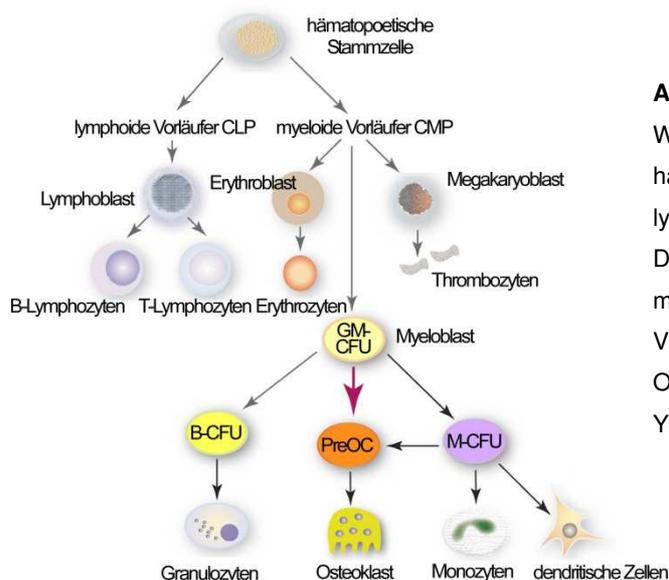
Ist die Differenzierung der Osteoklasten abgeschlossen, beginnen diese mit der Resorption, wobei sie das Knochenmaterial soweit abtragen, dass eine 40-60  $\mu\text{m}$  tiefe Furche entsteht. Durch den Abbau werden Proteine und Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel BMP (*bone morphogenetic proteins*) oder IGF-II (*insulin growth factor II*) freigesetzt. Vermutlich sind diese für die Rekrutierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen zur Resorptionsstelle verantwortlich und leiten den Wendepunkt von Knochenabbau zum Knochenaufbau ein. Dieser ist charakterisiert durch die Apoptose der Osteoklasten, wodurch Osteoblasten-

aktivierende Produkte wie S1P (*sphingosine 1 phosphate*), Mim-1 (*myb induced myeloid protein 1*), PDGF-BB (*B polypeptide chain platelet derived growth factor homodimer*) und HGF (*hepatocyte growth factor*) freigesetzt werden (Matsuo K und Irie N, 2008). Die Osteoblasten sorgen für neues Knochenmaterial bis die Resorptionsstelle aufgefüllt ist. Während des Knochenaufbaus werden Osteoblasten in die Knochenmatrix eingeschlossen und in Osteozyten umgewandelt (Franz-Odendaal TA *et al.*, 2006). An der Knochenoberfläche verbleibende Osteoblasten gehen in den Ruhezustand der *Lining cells* über, bis ein neuer Zyklus der Knochenremodellierung startet. Für den Übergang in den Ruhezustand ist Sclerostin verantwortlich, das von den Osteozyten freigesetzt wird. Es inhibiert den Wnt-Signalweg, der für die Regulation der Osteoblasten-Differenzierung entscheidend ist (Poole KE *et al.*, 2005).

### **2.3 Differenzierung von Osteoklasten**

Die Stabilität und Funktionalität des menschlichen Skeletts beruht auf einem ausgewogenen Gleichgewicht zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau. Während der Remodellierung des Knochengewebes wird die Resorption des Knochengewebes von Osteoklasten durchgeführt, da sie als einziger Zelltyp in der Lage sind die mineralisierte Matrix des Knochens abzubauen (Teitelbaum SL, 2000). Osteoklasten sind multinukleäre, differenzierte Zellen, die ausschließlich im Knochengewebe vorkommen. Sie entstehen aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen (Abb.2.4). Die hämatopoetischen Stammzellen (HSC *hematopoietic stem cells*) differenzieren im Verlauf der Hämatopoese in lymphoide Vorläuferzellen (CLP, *common lymphoid precursor*) und myeloide Vorläuferzellen (CMP, *common myeloid precursor*).

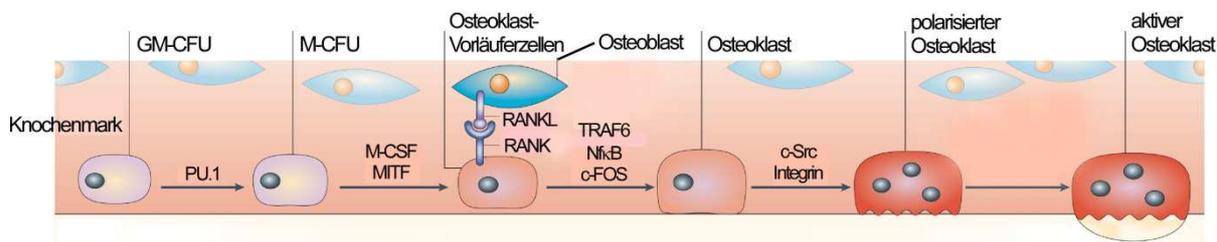
Die lymphoiden Vorläuferzellen werden für die Entwicklung der T- und B-Lymphozyten benötigt. Myeloide Vorläuferzellen differenzieren sich in GM-CFU (*granulocyte macrophage colony forming unit*), aus denen sich die Vorläuferzellen der Granulozyten (B-CFU, *basophil colony forming unit*) und der Monozyten/Makrophagen-Zelllinien entwickeln (Menaar C *et al.*, 2000; Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008). Während der Myelopoese differenzieren GM-CFU in M-CFU (*macrophage colony forming unit*), um dann in den nächsten Schritten Pre-Osteoklasten und terminal den multinukleären Osteoklasten zu bilden (Abb.2.5).



**Abb.2.4: Darstellung der adulten Hämatopoese.**

Während der Hämatopoese differenzieren hämatopoetische Stammzellen, so dass sich ein lymphoider und ein myeloider Zweig auftrennen. Die Differenzierung der Osteoklasten durchläuft mehrere Stufen, wobei die GM-CFU die erste Vorläuferzellen darstellen, die in der Lage sind Osteoklasten zu bilden (Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008, modifiziert).

Der Differenzierungsschritt von M-CFU in Osteoklasten wird maßgeblich von den Zytokinen M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) und RANKL (*receptor activator of nuklear factor  $\kappa$  B ligand*) beeinflusst. Ist jedoch das Zytokin GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) vorhanden, sorgt dies mit RANKL für die Differenzierung von dendritischen Zellen aus M-CFU (Miyamoto T *et al.*, 2001).



**Abb.2.5: Regulation der Osteoklastendifferenzierung.** Osteoklasten gehören zu den Zellen der Monozyten- und Makrophagen-Linie. Frühe Differenzierungsschritte sind abhängig von den Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF, sowie von der Proliferation der Makrophagen und dem Zytokin M-CSF. Aktivierung von RANK durch RANKL, das von Osteoblasten exprimiert wird, führt zur Differenzierung der Vorläuferzellen in Osteoklasten. Dieser Schritt ist assoziiert mit den Signalmolekülen TRAF6, NfκB und c-Fos. Damit die Knochenresorption stattfinden kann, muss sich der Osteoklast auf der Knochenmatrix ausrichten, dann können Knochen abbauende Enzyme gebildet werden (Teitelbaum SL und Ross FP, 2003, modifiziert).

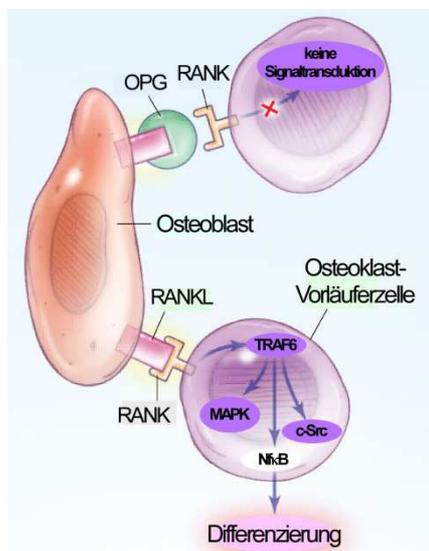
In den ersten Schritten der Osteoklasten-Differenzierung sind M-CSF, dessen Rezeptor c-FMS (*Csfr1, colony stimulating factor 1 receptor*) und der Transkriptionsfaktor PU.1 (*Spi1, spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene*) von Bedeutung. Sie sorgen für die Generierung der Vorläuferzellen von Makrophagen und Osteoklasten (Wiktor-Jedrzejczak W *et al.*, 1990; Tondravi MM *et al.*, 1997). Der Transkriptionsfaktor PU.1 sorgt für die transkriptionelle Aktivierung von *c-FMS* durch Bindung an dessen Promotor (Zhang *et al.*, 1994). M-CSF bindet an den Rezeptor c-FMS und induziert die Proliferation von Osteoklasten-Vorläuferzellen und die Expression von RANK (*receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B*), dem Rezeptor von RANKL (Arai F *et al.*, 1999; Ross FP und Teitelbaum SL, 2005).

Im weiteren Verlauf wird der Transkriptionsfaktor MITF (*microphthalmia associated transcription factor*) durch M-CSF aktiviert. Der M-CSF-Signalweg sorgt für die Aktivierung von MAPK (*mitogen activated protein kinase*). MAPK phosphoryliert MITF und ist somit für dessen Aktivierung verantwortlich. Außerdem wird der anti-apoptotische Faktor Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) exprimiert, wodurch die Apoptose in den Osteoklasten-Vorläuferzellen inhibiert wird (Weilbaecher KN *et al.*, 2001; Lagasse E und Weissman IL, 1997). Die weiteren Differenzierungsschritte werden durch die RANKL-Signalkaskade initiiert. RANKL wird in Osteoblasten und Stromazellen exprimiert, die in einem Zellverband mit den Osteoklasten-Vorläuferzellen im Knochengewebe vorliegen (Simonet WS *et al.*, 1997; Lacey DL *et al.*, 1998). Das Membranprotein interagiert mit dem dazugehörigen Rezeptor RANK auf den Osteoklasten-Vorläuferzellen, dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die u.a. TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), Nf $\kappa$ B (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*) und c-Fos (*V-Fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) beinhaltet (Kobayashi T *et al.*, 2003; Franzoso G *et al.*, 1997; Johnson RS *et al.*, 1992). Der RANKL-Signalweg sorgt für die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene, die u.a für die Fusion der mononukleären Osteoklasten zum multinukleären Osteoklast verantwortlich sind (siehe Abschnitt 2.5).

Zur Generierung des reifen, knochenabbauenden Osteoklasten richtet sich die Zelle an der Knochenoberfläche aus, dieser Prozess wird als Polarisierung bezeichnet. Maßgeblich beteiligt an der Polarisierung sind zum einen c-Src (*sarcoma oncogene*), dessen vollständige Funktion nicht geklärt ist (Horne WC *et al.*, 2005; Lowe C *et al.*, 1993), und zum anderen Integrine, die den direkten Kontakt zur Knochenmatrix herstellen (Faccio R *et al.*, 2003; McHugh KG *et al.*, 2000; Ross FP und Teitelbaum SL, 2005). Der polarisierte Osteoklast exprimiert Knochenmatrix abbauende Enzyme und beginnt mit dem Abbau von Knochengewebe (Bar-Shavit Z, 2007).

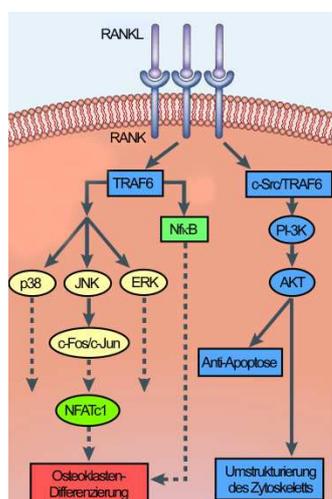
## 2.4 RANKL-Signaltransduktion in Osteoklasten

**RANKL** gehört zur TNF-Proteinfamilie (*tumor necrosis factor*) und aktiviert den Rezeptor RANK, der an der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen wird RANKL an der Membranoberfläche von Osteoblasten des Periosts und von Stromazellen im Knochengewebe exprimiert (Abb.2.6). Bei entzündlichen Reaktionen im Knochengewebe, z.B. rheumatoide Arthritis, kann RANKL auch von T-Lymphozyten produziert werden (Kong YY *et al.*, 1999). Der Antagonist **Osteoprotegerin** (OPG) wird ebenfalls von Osteoblasten exprimiert, bindet an RANKL und verhindert dadurch dessen Interaktion mit RANK. Faktoren wie Parathormon und TNF- $\alpha$ , die verantwortlich für die Initiation der Knochenremodellierung sind, greifen in die Regulation der RANKL- und OPG-Expression ein (Lacey DL *et al.*, 1998; Simonet WS *et al.*, 1997). Durch die Interaktion von RANKL und RANK kommt es zur Ausbildung eines trimeren RANK-Rezeptor-Komplexes und zur Rekrutierung des Adaptormoleküls TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). TRAF6-defiziente Mäuse entwickeln Osteopetrose, diese Krankheit ist mit einer erhöhten Knochendichte assoziiert, da die Osteoklasten-Differenzierung gestört ist (Kobayashi T *et al.*, 2003). TRAF6 kann auch die Signale anderer Rezeptoren der TNF-Familie wie CD40 und Rezeptoren der TLR-Familie wie IL-1R (TLR, *Toll-like receptor family members*) vermitteln (Ye H *et al.*, 2002; Akira S, 2003). Allerdings führt nur die Aktivierung der TRAF6-Signalkaskade über den Rezeptor RANK zur Induktion der Osteoklasten-Differenzierung. Durch die Trimerisierung des RANK-Rezeptors stehen drei TRAF6-Bindestellen zur Verfügung. Es findet eine verstärkte Rekrutierung von TRAF6 an den RANK-Rezeptor statt, dies sorgt für eine Überlagerung der Signale die von anderen TRAF6-Rezeptor-Interaktionen stammen (Kadono Y *et al.*, 2005).



**Abb.2.6: Rolle von RANK, RANKL und Osteoprotegerin während der Osteoklastogenese.** Osteoblasten exprimieren an ihrer Membranoberfläche RANKL, der als aktivierender Ligand des RANK-Rezeptors auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen fungiert. Durch die Interaktion von RANKL und RANK wird eine Signalkaskade in Osteoklasten-Vorläuferzellen aktiviert, die zur Differenzierung führt. Osteoblasten produzieren auch Osteoprotegerin, das die Interaktion von RANK und RANKL blockiert (Tolar J *et al.*, 2004, modifiziert).

Im weiteren Verlauf der TRAF6-Signalkaskade werden die IKK- (I $\kappa$ B-Kinase) und MAPK-Signalwege (*mitogen-activated protein kinase*) induziert (Abb.2.7). Das inhibitorische Protein I $\kappa$ B (*inhibitor of Nf $\kappa$ B*) liegt in einem Komplex mit Nf $\kappa$ B im Zytoplasma vor. Die TRAF6-Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinase resultiert in der Phosphorylierung von I $\kappa$ b, so dass es von Nf $\kappa$ B dissoziiert. Nach Translokation von Nf $\kappa$ B in den Zellkern, bindet es dort an spezifische DNA-Sequenzen und initiiert die Transkription Osteoklasten-spezifischer Gene (Franzoso G *et al.*, 1997; Iotsova V *et al.*, 1997). Außerdem sorgt der Einfluss von TRAF6 für die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs aufgrund der Phosphorylierung von p38, ERK (*extracellular signal regulated kinases*) und JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), was wiederum zur Aktivierung von AP-1 (*activator protein 1*) und NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*) führt. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein Heterodimer bestehend aus c-Fos und c-Jun (Grigoriadis AE *et al.*, 1994) und aktiviert den Transkriptionsfaktor NFATc1. Neben NFATc1 wird auch NFATc2 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2*) exprimiert, das in frühen Phasen der Differenzierung zusammen mit Nf $\kappa$ B die Transkription von *NFATc1* aktiviert. Die Translokation von NFATc1 in den Zellkern ist abhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und der Aktivierung durch die Phosphatase Calcineurin. NFATc1 reguliert die Transkription verschiedener Osteoklasten-spezifischer Gene und bildet transkriptionelle Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren wie PU.1, MITF oder c-Fos (Matsumoto M *et al.*, 2004; Day CJ *et al.*, 2005).



**Abb.2.7: Darstellung der RANKL-Signaltransduktion.** Die Bindung von RANKL an den Rezeptor RANK führt zu einer Trimerisierung des Rezeptors und der Rekrutierung von TRAF6. TRAF6 interagiert mit c-Src und stimuliert dadurch den PI-3K/AKT-Signalweg, wodurch das Osteoklasten-spezifische Zytoskelett und die Inhibition der Apoptose gesteuert werden. Außerdem führt die RANKL-RANK-Interaktion zur Aktivierung der Nf $\kappa$ B- und MAPK-Signalwege, die hier zur ansatzweise dargestellt sind. Zu den wichtigsten Regulatoren zählen c-Fos/c-Jun und NFATc1, die zur Induktion Osteoklasten-spezifischer Gene beitragen (Teitelbaum SL und Ross, 2003, modifiziert).

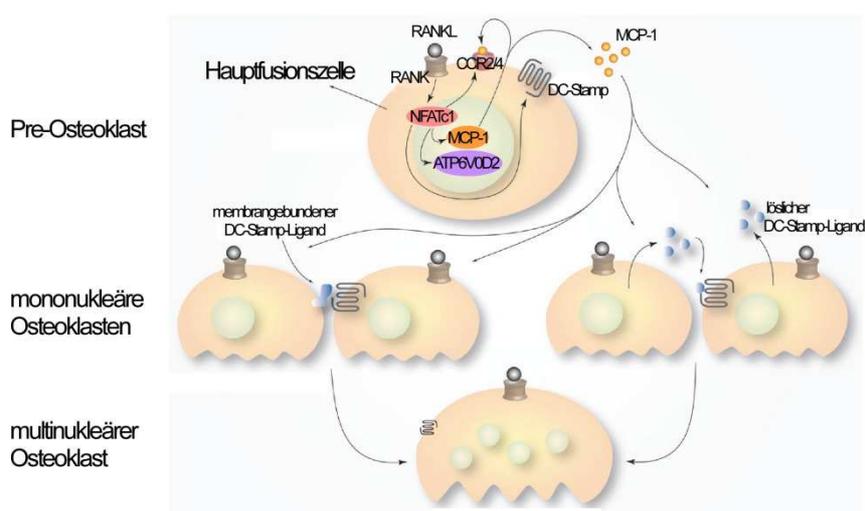
Neben den Nf $\kappa$ B- und MAPK-Signalwegen kommt es ebenfalls zu einer Aktivierung des AKT-Signalweges (Abb.2.7) über c-Src/TRAF6 und PI-3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase). AKT phosphoryliert das pro-apoptische Protein BAD (*Bcl2 associated agonist of cell death*), dadurch wird die Apoptose inhibiert und die Umstrukturierung des Zytoskeletts eingeleitet (Arron JR *et al.*, 2001; Teitelbaum SL und Ross FP, 2003; Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008).

## 2.5 Zell-Zell-Fusion während der Osteoklastogenese

Die Zell-Zell-Fusion von Osteoklasten-Vorläuferzellen ist ein charakteristisches Merkmal von Osteoklasten und entscheidend für die Effektivität der Knochenresorption. Durch die Zellfusion von monozytischen Vorläuferzellen entstehen große, mehrkernige Zellen (Abb.2.8), die eine hohe Aktivität in Bezug auf den Knochenabbau aufweisen (Chen EH *et al.*, 2007). Während Makrophagen und neutrophile Granulozyten Abbauprodukte in das Zytoplasma aufnehmen und in Lysosomen abbauen, erfolgt durch Osteoklasten eine extrazelluläre Degradation. Sie lagern sich an die Knochenmatrix und bilden eine abgedichtete Zone, die als „extrazelluläres Lysosom“ bezeichnet werden kann (Teitelbaum SL und Ross FP, 2003). Der Abbau der Knochenmatrix kann nur stattfinden, wenn der Bereich der Knochenresorption vom Osteoklast vollständig bedeckt wird, d.h. die Größe der Zelle ist proportional zur Resorptionseffizienz. Osteoklasten entstehen durch homotrophe Zell-Zell-Fusion von Monozyten-Vorläuferzellen, wobei mit fortschreitender Fusion die fusionierenden Zellen nicht komplett identisch sein müssen (Ishii M und Saeki Y, 2008). Bereits gebildete multinukleäre Zellen werden als Hauptfusionszelle bezeichnet, d.h. sie sind der Ausgangspunkt für weitere Fusionsprozesse, indem sie fusionskompetente Vorläuferzellen einfangen (Yagi M *et al.*, 2005; Mensah KA *et al.*, 2010).

Multinukleäre Osteoklasten entstehen durch die Fusion von RANK-exprimierenden, mononukleären Pre-Osteoklasten nach dem Kontakt mit RANKL exprimierenden Zellen wie Osteoblasten oder Stromazellen (Abb.2.8). Die RANKL-RANK-Signalkaskade initiiert die Expression verschiedener Osteoklasten-spezifischer Gene, dazu gehören MCP-1 und CCL-5 (*chemokine C-C motif ligand 5*; auch RANTES, *regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*). Beide Moleküle sind chemotaktische Signale für Monozyten (Kim MS *et al.*, 2005). RANKL induziert ebenfalls die Expression der MCP-1-Rezeptoren CCR2 und CCR4 (*chemokine C-C motif receptor*). Die Rezeptoren CCR2 und CCR4 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die den PI3K-Signalweg stimulieren und somit die Proliferation der Osteoklasten-Vorläuferzellen induzieren. Die Bedeutung von MCP-1 liegt somit in autokrinen und parakrinen Effekten. Während MCP-1 auf derselben Zelle agiert, kann es ebenso andere Vorläuferzellen beeinflussen (Kim MS *et al.*, 2005; Miyamoto K *et al.*, 2009).

Des Weiteren aktiviert RANKL/RANK den Transkriptionsfaktor NFATc1, der die Expression von *ATP6V0D2* (*d2 isoform of vascular ATPase V0 domain*) und *DC-STAMP* (*dendritic cell-specific transmembrane protein*) durch direkte Bindung an deren Promotor aktiviert (Kim K *et al.*, 2008; Kim T *et al.*, 2010). DC-STAMP ist ein Transmembranprotein aus sieben Transmembrandomänen und wurde ursprünglich in dendritischen Zellen entdeckt. Durch den RANKL-Signalweg kommt es zur Entstehung einer Osteoklasten-Vorläuferzellpopulation, in der einige Zellen eine hohe und andere Zellen eine niedrige DC-STAMP-Expression aufweisen. Die Zellen mit niedriger DC-STAMP-Expression fungieren als Hauptfusionszelle und fusionieren mit Zellen, die eine hohe DC-STAMP-Expression besitzen (Mensah KA *et al.*, 2010). DC-STAMP ist ein entscheidender Faktor für die Zellfusion, da *DC-STAMP*-defiziente Mäuse zwar noch in der Lage sind Knochenresorption zu betreiben, die Fusion der mononukleären Zellen zu multinukleären Osteoklasten jedoch unterbunden ist (Yagi M *et al.*, 2005). Die genaue Funktion der *ATP6V0D2* in Osteoklasten wurde bisher noch nicht geklärt, jedoch zeigen *ATP6V0D2*-defiziente Mäuse eine Beeinträchtigung der Osteoklasten-Fusion und einen Anstieg der Knochensubstanz (Lee SH *et al.*, 2006).



**Abb.2.8: Schematische Darstellung der Fusion von mononukleären Pre-Osteoklasten.** Die RANKL-RANK-Signalkaskade induziert den Transkriptionsfaktor NFATc1, der die Transkription von *MCP-1*, MCP-1-Rezeptoren, *ATP6V0D2* und *DC-STAMP* aktiviert. MCP-1 dient als chemotaktisches Signal für Monozyten (parakrin) und stimuliert den PI3K-Signalweg in Pre-Osteoklasten (autokrin). DC-STAMP ist der Hauptregulator der Zell-Zell-Fusion. DC-STAMP-exprimierende Zellen fusionieren und bilden multinukleäre Osteoklasten (Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008, modifiziert).

Vermutlich ist in den Prozess der Zellfusion ebenfalls das Protein MFR (*macrophage fusion receptor*) involviert. MFR zählt zur Familie der SIRP (*signal regulatory protein*), die Typ-I-Transmembranproteine sind. Die Proteine der SIRP-Familie reagieren auf intrinsische Signale der Osteoklasten-Vorläuferzellen und interagieren mit Adaptormolekülen (Saginario C *et al.*, 1998; Vignery A, 2005; Humphrey MB *et al.*, 2004). Die Adaptormoleküle DAP12 (*DNAX activating protein 12*) und FcR $\gamma$  (*Fc receptor common gamma chain*) sorgen vermutlich für die Transkription anderen Mediatoren der Zell-Zell-Fusion, so dass Fusionskompetente Osteoklasten-Vorläuferzellen entstehen. DAP12- und FcR $\gamma$ -defiziente Mäuse entwickeln Osteopetrose aufgrund von Defekten in der Osteoklasten-Differenzierung (Turnbull IR *et al.*, 2007; Kaifu T *et al.*, 2003; Humphrey MB *et al.*, 2004).

## **2.6 Polarisation und Physiologie der Osteoklasten**

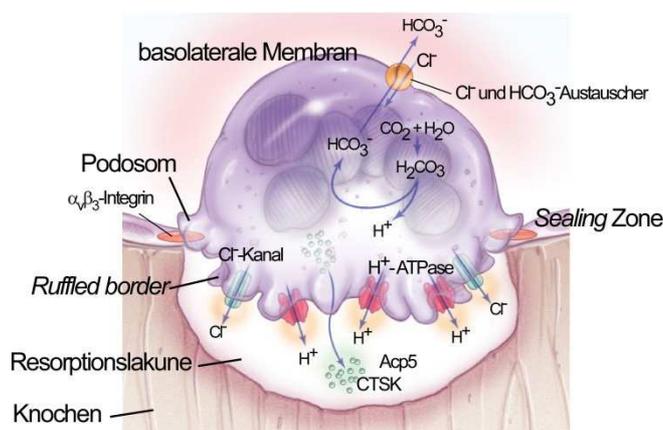
Der Prozess der Knochenresorption ist entscheidend für die Erhaltung der mechanischen Funktionalität der Knochen und findet durchgehend das ganze Leben während der Knochenremodellierung statt. Für den Abbau des Knochengewebes sind ausschließlich Osteoklasten verantwortlich, da deren morphologische Eigenschaften entsprechend der Funktion angepasst sind. Osteoklasten sind Polykaryone und können einen Durchmesser von ca. 300  $\mu\text{m}$  erreichen, während Makrophagen 10-20  $\mu\text{m}$  messen. Aufgrund ihrer Größe sind Osteoklasten in der Lage einen relativ großen Bereich der Knochenmatrix zu bedecken. Der Abbau der Knochenmatrix beginnt mit der Anlagerung des Osteoklasten an den Knochen und der Entstehung der polarisierten Morphologie der Zelle (Bar-Shavit Z, 2007).

Die extrazellulären Signale, die zu Rekrutierung der Osteoklasten an die Stelle der Knochenresorption führen, wurden bisher nicht eindeutig identifiziert. In chemotaktischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Typ-I-Kollagenpeptide,  $\alpha$ 2HS-Glykoproteine und Osteocalcin in Osteoklasten-Vorläuferzellen chemotaktische Reaktionen hervorrufen. Diese chemoattraktorischen Substanzen stammen aus der Knochenmatrix oder werden, im Falle von Kollagen und Osteocalcin, von Osteoblasten gebildet (Malone JD *et al.*, 1982). Weiterhin wird SDF-1 (*stromal cell derived factor 1*) von Stromazellen gebildet und agiert ebenso wie Substanzen apoptotischer Osteozyten, die im Verlauf der Knochenremodellierung freigesetzt werden, als chemotaktisches Signal für Osteoklasten-Vorläuferzellen (Yu X *et al.*, 2003). Die Migration der Vorläuferzellen an die Stelle der Knochenresorption wird maßgeblich von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beeinflusst (Delaisse JM *et al.*, 2003).

Nach Erreichen der Osteoklasten-Vorläuferzellen an der Stelle der Knochenresorption und erfolgreicher Differenzierung in reife Osteoklasten muss eine isolierte Mikroumgebung zwischen Osteoklast und Knochenmatrix entstehen, damit die Resorption stattfinden kann. Während der Osteoklast nicht an die Knochenmatrix gebunden ist, liegen Vesikel mit H<sup>+</sup>ATPase zufällig verteilt in der Zelle vor und Integrine werden auf der gesamten Plasmamembran exprimiert. Der Kontakt zwischen Osteoklast und Knochenmatrix wird durch das Integrin  $\alpha\beta3$  hergestellt (Abb.2.9). Die Expression von  $\alpha\beta3$  wird durch den RANKL-Signalweg und NFATc1 induziert.  *$\beta3$ -Knock-out*-Mäuse zeigen einen Defekt der Osteoklasten, der stufenweise zur Knochenkrankheit Osteopetrose führt (McHugh KP *et al.*, 2000). Durch den Kontakt von Osteoklast und Knochenmatrix konzentrieren sich die Integrine an der Membran, die der Knochenmatrix zugewandt liegt, assoziieren mit Aktin-Filamenten im Osteoklasten und bilden einen Komplex, der als Podosom bezeichnet wird (Aubin JE, 1992). Sie erkennen Proteine der Knochenmatrix mit einem Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Aminosäuremotiv (RGD), das in Osteopontin und BSP (*bone sialoprotein*) vorkommt (Duong LT *et al.*, 2000; Miyauchi A *et al.*, 2006). Durch die Anlagerung der Integrine an die Knochenmatrix bindet die c-Src-Kinase direkt an die terminalen Aminosäuren der  $\beta3$ -Untereinheit. An die zytoplasmatische Domäne der  $\beta3$ -Untereinheit bindet SYK (*spleen tyrosine kinase*). SYK, c-Src und  $\alpha\beta3$  agieren in einem Komplex, der zusammen mit dem M-CSF-Signalweg zur Umorganisation des Zytoskeletts führt (Faccio R *et al.*, 2005; Zou W *et al.*, 2007). Vesikel mit H<sup>+</sup>ATPase assoziieren mit Mikrotubuli und gelangen über diese zur Membran, die der Knochenmatrix zugewandt ist. Durch Exozytose werden sie in die Membran eingelagert und sorgen somit für die komplexen Einfaltungen der Membran, die als *Ruffled Border* bezeichnet wird. Zur Abdichtung der extrazellulären Umgebung dient ein Aktin-Ring, der die sogenannte *Sealing Zone* darstellt. Die gegenüberliegende Membran kann in den basolateralen (BLD, *basolateral domain*) und in den sekretorischen Bereich (FSD, *functional secretory domain*) eingeteilt werden (Mulari MT *et al.*, 2003).

Die Anlagerung der Osteoklasten an die Knochenmatrix, die Ausbildung eines isolierten Bereichs unterhalb des Osteoklasten, die *Sealing Zone* und die *Ruffled Border* lassen ein Kompartiment entstehen, das von der extrazellulären Umgebung abgegrenzt ist und in dem die Knochenresorption stattfinden kann (Abb.2.9). Dieses Kompartiment wird als Resorptionslakune oder Howship's Lakune bezeichnet. Durch die Fusion von säurehaltigen Vesikeln mit der Membran, die der Knochenmatrix zugewandt ist, wird der pH-Wert in diesem isolierten Kompartiment auf einen Wert von ca. pH 4-5 gesenkt (Silver IA *et al.*, 1988). Die Vesikel beinhalten die Protonenpumpe H<sup>+</sup>ATPase, die nach Fusion gekoppelt mit

dem Cl-Kanal ClCn7 (*chlorid channel 7*) in der *Ruffled Border* zur Senkung des pH-Werts beiträgt (Schlesinger PH *et al.*, 1997). Die funktionelle Trennung der *Ruffled Border* von der restlichen Zellmembran wird durch die *Sealing Zone* gewährleistet und führt zur Anreicherung der Protonenpumpen und der Ionenkanäle in diesem Bereich. Die in der Resorptionslakune entstehende Salzsäure (HCl, Hydrogenchlorid) löst solides Hydroxyapatit  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$  in Kalzium  $\text{Ca}^{2+}$  und Wasser  $\text{H}_2\text{O}$  (Blair HC, 1998). Um die Freisetzung von HCl zu ermöglichen, werden Wasserstoff-Ionen im Inneren der Zellen durch die Carboanhydrase II erzeugt. Dieses Enzym wird in hohem Maße in Osteoklasten exprimiert und sorgt für die Hydrierung von  $\text{CO}_2$ , so dass Wasserstoff-Ionen und  $\text{HCO}_3^-$  produziert werden (Sly WS *et al.*, 1983).  $\text{HCO}_3^-$  wird über einen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher in der basolateralen Membran gegen Chlorid-Ionen ersetzt (Teitelbaum SL, 2000).



**Abb.2.9: Darstellung der Osteoklasten-Physiologie.** Die Resorption des Knochengewebes kann erst eingeleitet werden, nachdem der Osteoklast an die Knochenmatrix angelagert wurde. Die Anlagerung wird durch  $\alpha\beta_3$ -Integrine vermittelt, und eine *Sealing Zone* entsteht. Die Umorganisation des Zytoskeletts sorgt für eine polarisierte Morphologie bestehend aus *Ruffled Border* und basolateraler Membran. Carboanhydrase II sorgt für die Bereitstellung von Wasserstoff-Ionen durch Hydrierung von  $\text{CO}_2$ . Die Wasserstoff-Ionen werden zusammen mit  $\text{Cl}^-$ -Ionen in die Resorptionslakune transportiert und sorgen ebenso wie CTSK (Cathepsin K) und Acp5 (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) für den Abbau der Knochenmatrix.  $\text{Cl}^-$  gelangen über einen Ionen-Bikarbonat-Austauscher in die Zelle (Tolar J *et al.*, 2004, modifiziert).

Durch den Abbau der mineralisierten Bestandteile des Knochengewebes werden die organischen Bestandteile freigelegt. Für den Abbau der organischen Bestandteile wird ein Enzym benötigt, das ein pH-Optimum im sauren Bereich besitzt (Abb.2.9). Diese Funktion wird hauptsächlich von Cathepsin K (CTSK) erfüllt, wobei auch andere Proteinasen wie Cathepsin D, B und L in Osteoklasten exprimiert werden (Gowen M *et al.*, 1999; Drake FH *et al.*, 1996). Auch Matrix-Metalloproteinasen wie MMP12 und MMP9 tragen zur Resorption von Kollagen bei (Hou P *et al.*, 2004; Ortega N *et al.*, 2003).

Die Abbauprodukte werden in Vesikel via Endozytose aufgenommen, die das Enzym Acp5 (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) enthalten. Acp5 produziert reaktive Sauerstoffspezies, die in der Lage sind Kollagen anzugreifen (Kaija H *et al.*, 2002). Die Knochenresorption erfordert eine große Menge an Energie, so dass in Osteoklasten eine große Anzahl an Mitochondrien vorhanden ist, die diese Energie bereitstellen. Die Abbauprodukte der Resorptionsprozesse werden von den Osteoklasten nicht benötigt und so findet am sekretorischen Bereich (FSD, *functional secretory domain*) der gegenüberliegenden Membran die Freisetzung der Abbauprodukte statt. Nach der Resorption werden die Abbauprodukte mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen, fusionieren mit der FSD und werden in den extrazellulären Bereich abgesondert und gelangen in den Blutkreislauf, um z.B. im Falle von  $\text{Ca}^{2+}$  den Kalzium-Spiegel im Blut zu erhöhen. Dieser Prozess der Transzytose kann nur aufgrund der funktionellen Separation von *Ruffled Border* und der restlichen Zellmembran erfolgen (Salo J *et al.*, 1997; Nesbitt SA und Horton MA, 1997).

## 2.7 Transkriptionsfaktoren in Osteoklasten

Einige Transkriptionsfaktoren, die an der Entwicklung des Skeletts beteiligt sind, wurden in Studien mit Patienten oder genetisch veränderten Mäuse entdeckt. Zum Teil werden sie spezifisch in Knochenzellen exprimiert und sind verantwortlich für die Differenzierung dieser Zellen. Andere Transkriptionsfaktoren sind nicht Knochenzell-spezifisch, werden aber hauptsächlich in Zellen des Skeletts während der Entwicklung produziert. Im Gegensatz zu Osteoblasten und Chondrozyten entwickeln sich Osteoklasten aus myeloiden Vorläuferzellen. Myeloide Wachstumsfaktoren (M-CSF, RANKL) und Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle während der Hämatopoese spielen, können sich ebenfalls auf die Differenzierung der Osteoklasten auswirken (Yang X und Karsenty G, 2002).

Der **Transkriptionsfaktor PU.1** (Spi1, *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene*) gehört zur Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren (*E-twenty-six*). PU.1 besitzt eine Ets-Domäne, die zur DNA-Bindung beiträgt und purinreiche DNA-Sequenzen mit dem Motiv GGAA erkennt. Die Ets-Domäne ist ebenfalls für die Interaktion mit anderen Proteinen wie GATA1 (*GATA-binding factor 1*), RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) und C/EBP $\alpha$  (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*) verantwortlich (Kodandapani R *et al.*, 1996). Die Expression von PU.1 kommt in myeloiden Zellen wie B-lymphoiden Zellen und granulozytischen Zellen vor. Das Fehlen von PU.1 verursacht diverse Defekte in der

Entwicklung von B-Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Scott EW *et al.*, 1994). *PU.1*-defiziente Mäuse besitzen weder Osteoklasten, noch Makrophagen, sind aber in der Lage frühe Monozyten-Vorläuferzellen zu bilden. Die Funktion von *PU.1* ist Zell-autonom, da das Fehlen der Makrophagen und Osteoklasten durch Knochenmark-Transplantationen oder *PU.1*-Expression in *PU.1*-defizienten Monozyten-Vorläuferzellen aufgehoben werden kann (Tondravi MM *et al.*, 1997; Henkel GW *et al.*, 1999). Die Entwicklung von Makrophagen oder Granulozyten ist abhängig vom Verhältnis des Expressionslevels von *PU.1* zu *C/EBP $\alpha$*  (Dahl R und Simon MC, 2003). Liegt eine verstärkte *PU.1* Expression vor, kommt es zur Differenzierung der Makrophagen. Granulozyten-spezifische Gene werden durch *PU.1* reprimiert, da *PU.1* die Expression von negativen Regulatoren induziert (Nguyen HQ *et al.*, 1993; Laslo P *et al.*, 2006). *PU.1* reguliert ebenfalls die Expression von *RANK* in myeloiden Vorläuferzellen, so dass nach Stimulation die Differenzierung in Richtung Osteoklasten eingeleitet werden kann (Kwon OH *et al.*, 2005). Ektopy Expression von *PU.1* in erythroiden Vorläuferzellen verursacht eine Differenzierungsblockade in Richtung Erythrozyten, so dass eine Erythroleukämie entsteht. Dies konnte in Studien mit Mäusen gezeigt werden, im Menschen konnte eine *PU.1*-Überexpression bisher nicht mit einer Leukämie korreliert werden (Moreau-Gachlin F *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu seiner onkogenen Funktion in erythroiden Zellen, besitzt *PU.1* in myeloiden Zellen eine Tumorsuppressor-Funktion. Der Verlust des optimalen *PU.1*-Expressionslevels in adulten myeloiden Vorläuferzellen oder hämatopoetischen Stammzellen (HSC) führt in Mäusen zur Entwicklung myeloider Leukämien (Walter MJ *et al.*, 2005; Metcalf D *et al.*, 2006). Im Mensch ist der direkte Bezug zwischen Inaktivierung von *PU.1* und myeloider Leukämie nur in wenigen Fällen bekannt (Cook WD *et al.*, 2004). In Fällen von akuter myeloider Leukämie (AML) konnte gezeigt werden, dass *PU.1* geringer exprimiert wird (Rosenbauer F *et al.*, 2004).

Der **Transkriptionsfaktor AP-1** ist ein heterodimeres Protein bestehend aus Fos- und Jun-Proteinen. **c-Fos** (*V-Fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) wird während der Entwicklung von Mäusen in Knorpelgewebe, Knochen und Zähnen exprimiert, wobei eine Überexpression von c-Fos in Mäusen Osteosarkome verursacht (Grigoriadis AE *et al.*, 1994). *c-Fos*-defiziente Mäuse entwickeln Osteopetrose, da die Zellzahl der Osteoklasten reduziert ist. Der Transkriptionsfaktor c-Fos ist entscheidend für die Differenzierung von Monozyten-Vorläuferzellen in Osteoklasten. Auch dieser Effekt ist Zell-autonom, da durch Knochenmark-Transplantation oder ektopy Expression von c-Fos die Osteoklastogenese regeneriert werden kann. Da in *c-Fos*-defizienten Mäusen die Zahl an Makrophagen nicht beeinflusst ist, bedeutet dies, dass c-Fos nach *PU.1* in Bezug auf die Osteoklastendifferenzierung agiert (Wang ZQ *et al.*, 1995). Die Expression von c-Fos wird durch den M-CSF- und  $\alpha\beta 3$ -Integrin-Signalweg über ERK induziert (Murphy LO *et al.*, 2002), wobei die Aktivierung durch  $\alpha\beta 3$

überwiegt (Faccio R *et al.*, 2003). Außerdem ist c-Fos für die Linienentscheidung in Richtung Osteoklasten oder dendritischen Zellen entscheidend. Während GM-CSF/RANKL für die Differenzierung der dendritischen Zellen sorgen, leiten M-CSF/RANKL und die Expression von c-Fos die Osteoklastendifferenzierung ein (Miyamoto T *et al.*, 2001).

Zwei Formen des **Transkriptionsfaktors NFκB** (*nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*), p50 und p52, sind entscheidend für die Regulation von Immun- und Entzündungsantworten. Inaktivierung von p50 resultiert in einer Aktivierung von NfκB (Zhou D *et al.*, 2001), wohingegen Mutationen in p52 zu einer reduzierten Zellzahl an peripheren B-Zellen und Defekten in der humoralen Immunreaktion führen (Caamano JH *et al.*, 1998). Bei Defekten beider Transkriptionsfaktoren führt dies zu einem Osteopetrose-Phänotyp in den untersuchten Mäusen aufgrund eines Arrests in der Osteoklastogenese. Ebenso wie in *PU.1*-defizienten Mäusen sorgen Knochenmarktransplantationen für die Aufhebung dieses Phänotyps (Iotsova V *et al.*, 1997).

Der **Transkriptionsfaktor MITF** (*microphthalmia transcription factor*) ist ein bHLH-Zip-Transkriptionsfaktor (*basic helix-loop-helix leucine zipper*). MITF wurde ursprünglich als Regulator der Melanozyten-Differenzierung beschrieben, da es als Transkriptionsfaktor die Expression von Melanozyten-spezifischen Enzymen aktiviert (Bentley NJ *et al.*, 1994). Allerdings wird MITF, ähnlich wie PU.1, in Makrophagen, Osteoklasten und deren Vorläuferzellen exprimiert (Kawaguchi N und Noda M, 2000). Als Heterodimer kann MITF an DNA-Sequenzen mit dem Motiv CANNTG binden, dieses Bindemotiv ist auch als E-Box bekannt (Lowings P *et al.*, 1992). MITF sorgt zusammen mit PU.1 für die Regulation Osteoklasten-spezifischer Gene. Die Interaktion von MITF, PU.1 und Eos resultiert in der Reprimierung der Osteoklasten-spezifischen Gene *CTSK*, *Acp5* und *OSCAR* (*osteoclast associated receptor*). Der M-CSF/RANKL-Signalweg führt zur verminderten Expression von Eos und zur Phosphorylierung von MITF, dadurch kommt es zur Rekrutierung des Coaktivators CBP/p300 und zur Aktivierung der Osteoklastogenese. MITF wird durch den ERK und p38-MAPK-Signalweg phosphoryliert und aktiviert. Der Effekt von Eos ist auf den MITF/PU.1-Komplex beschränkt. Andere Zielgene von PU.1 und MITF wie *c-FMS* oder *RANK* werden durch Eos nicht beeinflusst (Hu R *et al.* 2007; So H *et al.*, 2003; Mansky KC *et al.*, 2002). Mutationen in MITF resultieren in einem Defekt der Osteoklastogenese (Hodgkinson CA *et al.*, 1993).

## 2.8 Osteoklasten-assoziierte Krankheiten

Das menschliche Knochengewebe unterliegt einem ständigen Abbau durch Osteoklasten und Aufbau durch Osteoblasten, um die Funktionalität und Stabilität des Skeletts zu gewährleisten. Die Dichte des Knochengewebes ist somit abhängig von der Funktion dieser beiden Zelltypen. Ist dieses Gleichgewicht gestört, resultiert dies in einer krankhaften Zunahme oder Abnahme des Knochengewebes (Lerner UH, 2006). Häufig sind adulte Krankheiten der Knochen mit einer verstärkten Aktivität von Osteoklasten verbunden, so dass die Remodellierung des Knochens in Richtung Resorption verschoben ist (Rodan GA und Martin TJ, 2000). Zu Knochen-assoziierten Krankheiten zählen zum Beispiel Osteopetrose, Osteoporose, Parodontose, Paget's Syndrom, rheumatoide Arthritis, multiple Myelome und metastasierende Krebserkrankungen.

Die Ursache von **Osteopetrose**, auch als Marmorknochenkrankheit bezeichnet, liegt in den häufigsten Fällen in einer erblich bedingten Fehlfunktion von Osteoklasten. Die Krankheit wurde zum ersten Mal 1904 von Albers-Schönberg beschrieben, der in Röntgenbildern eines Patienten eine verstärkte Knochendichte diagnostizierte. Da die Krankheit mit einer erhöhten Masse des Skeletts aufgrund von einer anormalen Zunahme der Knochendichte verbunden ist, ist die Diagnose mittels Radiographie erforderlich. Dabei sind eine geringere Strahlendurchlässigkeit des Knochengewebes und das Fehlen der Knochenmarkhöhle zu beobachten. Durch die Fehlfunktion der Osteoklasten wird die Form und Struktur des Knochens beeinflusst, da während der Knochenremodellierung die Resorption des Knochengewebes ausbleibt. In einigen Patienten entstehen durch Osteopetrose Knochenmarkhöhlen, in denen durch endochondrale Ossifikation neues Knochengewebe gebildet wurde, so dass kein Platz für hämatopoetische Zellen verbleibt. Durch die Anreicherung von Knochengewebe nimmt das Skelett zwar an Stabilität zu, aber die Elastizität wird eingeschränkt, wodurch der Knochen anfälliger für Knochenfrakturen wird. Da Osteoklasten ihren Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen besitzen, kann diese Krankheit je nach genetischer Ursache in einigen Fällen durch Transplantation hämatopoetischer Stammzellen geheilt werden (Shapiro F, 1993; Loria-Cortes R *et al.*, 1977). Die Klassifizierung von Osteopetrose erfolgt in zwei Gruppen: Autosomal-rezessiv und autosomal-dominant. Autosomal-rezessive Osteopetrose kommt in 1 von 300 000 Geburten vor. In schwerwiegenden Fällen kommt es aufgrund der unzureichenden Knochenmarkhöhle zu extramedullärer Hämatopoese, die mit einer Vergrößerung von Leber und Milz verbunden ist, die auch als Hepatosplenomegalie bezeichnet wird. Betroffene Kinder weisen Schädigungen der Hirnnerven auf, die zu visuellen Einschränkungen und

Blindheit führen können (Gerritsen EJ *et al.*, 1994). Anämien und verringerte Immunabwehr führen in den meisten Fällen zum Tod während der ersten zehn Lebensjahre des Patienten. In weniger schwerwiegenden Fällen von Osteopetrose ist die Lebenserwartung nicht beeinträchtigt, jedoch kommt es verstärkt zu Knochenfrakturen (Bollerslev J und Andersen PE, 1989).

Zum Verständnis der genetischen Grundlagen und Zusammenhänge, die zur verminderten Aktivität von Osteoklasten bzw. zu Osteopetrose führen, haben Maus-Modelle einen entscheidenden Beitrag geleistet. Dabei ist es verständlich, dass zahlreiche funktionelle Defekte in Osteoklasten zu verringerter Knochenresorption führen können. Die Defekte der Osteoklasten können intrinsisch oder extrinsisch verursacht werden. Die Unterscheidung ist wichtig in Bezug auf eine mögliche Therapie, da durch hämatopoetische Stammzell-Transplantation lediglich intrinsische Defekte minimiert werden. In Tabelle 2.1 sind einige Maus-Modelle zu Osteopetrose zusammengefasst (Tolar J *et al.*, 2004).

Die Osteoklasten-Defekte in Maus-Modellen können in vier Kategorien unterteilt werden: Frühe Differenzierungsdefekte betreffen PU.1 und MITF, Defekte im RANKL-Signalweg, funktionelle Defekte in Osteoklasten und Defekte in der Ansäuerung der Resorptionslakune.

Frühe Differenzierungsdefekte betreffen M-CSF, da in *op/op*-Mäusen (*op*, *osteopetrotic*) eine Insertion in das *mcsf*-Gen das Fehlen von Osteoklasten und Monozyten zur Folge hat. M-CSF wird von Stromazellen und Osteoblasten gebildet, daher gilt der M-CSF-Defekt als extrinsisch (Wiktor-Jedzejczak W *et al.*, 1990). Da die Osteoklasten-Differenzierung ebenso von den Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF abhängig ist, kommt es auch in *PU.1*- bzw. *MITF*-defizienten Mäusen zu einem Fehlen von Osteoklasten (Tondravi MM *et al.*, 1997; Holtrop ME *et al.*, 1981; Hodgkinson CA *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den *op/op*-Mäusen liegt hier jedoch ein intrinsischer Effekt vor. Im weiteren Verlauf der Osteoklastogenese kommt es zu einer RANKL-RANK-vermittelten Kommunikation von Osteoblasten und Osteoklasten, wobei Osteoprotegerin als Antagonist des RANKL-Signalweges gilt. Ektopische Expression von Osteoprotegerin verursacht in Mäusen Osteopetrose aufgrund dessen antagonistischer Wirkung auf die Osteoklastendifferenzierung (Simonet WS *et al.*, 1997). Die Osteoklastogenese ist auch in *RANK*- oder *RANKL*-*Knock-out*-Mäusen gestört (Kong YY *et al.*, 1999). Der RANK/RANKL-Signalweg beinhaltet mehrere Zwischenstufen, so dass Osteopetrose in allen *Knock-out*-Mäusen mit Deletionen in *c-Fos*, *NFκB* und *TRAF6* auftritt (Grigoriadis AE *et al.*, 1994; Iotsova V *et al.*, 1997; Lomaga MA *et al.*, 1999).

Tabelle 2.1: Osteopetrose-assoziierte Maus-Modelle

MAUS-MODELL	BETROFFENES GEN/PROTEIN	URSACHE	OSTEOKLASTEN	QUELLE
<i>op/op</i> -Maus	M-CSF	extrinsisch	nicht vorhanden	Wiktor-Jedrzejczak W <i>et al.</i> , 1990
<i>RANKL-Knock-out</i>	RANKL	extrinsisch	nicht vorhanden	Kong YY <i>et al.</i> , 1999
<i>Osteoprotegerin-transgen</i>	Osteoprotegerin	extrinsisch	nicht vorhanden	Simonet WS <i>et al.</i> , 1997
<i>Csfr/Csfr</i>	M-CSF-Rezeptor	intrinsisch	nicht vorhanden	Dai XM <i>et al.</i> , 2002
<i>PU.1-Knock-out</i>	PU.1	intrinsisch	nicht vorhanden	Tondravi MM <i>et al.</i> , 1997
<i>mi/mi</i> -Maus	MITF	intrinsisch	vorhanden, unreif, keine <i>Ruffled border</i>	Holtrop ME <i>et al.</i> , 1981
<i>RANK-Knock-out</i>	RANK	intrinsisch	nicht vorhanden	Dougall WC <i>et al.</i> , 1999
<i>c-Fos-Knock-out</i>	c-Fos	intrinsisch	nicht vorhanden	Grigoriadis AE <i>et al.</i> , 1994
<i>NFκB1/2-Knock-out</i>	p50 und p52	intrinsisch	reduziert	Iotsova V <i>et al.</i> , 1997
<i>TRAF6-Knock-out</i>	TRAF6	intrinsisch	normal bis reduziert, unreif	Lomaga MA <i>et al.</i> , 1999
<i>c-Src-Knock-out</i>	c-Src	intrinsisch	erhöht, keine <i>Ruffled border</i>	Lowe C <i>et al.</i> , 1993
<i>β3I-Knock-out</i>	β3-Integrin	intrinsisch	erhöht, anormale <i>Ruffled border</i>	McHugh KP <i>et al.</i> , 2000
<i>DC-STAMP-Knock-out</i>	DC-STAMP	Intrinsisch	keine Fusion, reduzierte Funktion	Yagi M <i>et al.</i> , 2005
<i>Atp6i-Knock-out</i>	H <sup>+</sup> -ATPase	intrinsisch	normal bis reduziert	Li YP <i>et al.</i> , 1999
<i>C1Cn7-Knock-out</i>	C1Cn7	intrinsisch	normal, anormale <i>Ruffled border</i>	Kornak U <i>et al.</i> , 2001
<i>Cathepsin K-Knock-out</i>	Cathepsin K	intrinsisch	normal, anormale <i>Ruffled border</i>	Saftig P <i>et al.</i> , 1998
<i>TRAP-Knock-out</i>	TRAP	intrinsisch	erhöht, extensive <i>Ruffled border</i>	Hollberg K <i>et al.</i> , 2002

Ein entscheidender Schritt während der Differenzierung ist die Zell-Zell-Fusion, die hauptsächlich von DC-STAMP abhängig ist. In *DC-STAMP*-defizienten Mäusen sind frühe Differenzierungsschritte bis hin zur Entstehung der mononukleären Osteoklasten nicht beeinträchtigt. Allerdings kommt es aufgrund der fehlenden DC-STAMP-Expression nicht zur Fusion der Osteoklasten-Vorläuferzellen und somit fehlen in *DC-STAMP*-defizienten Mäusen multinukleären Osteoklasten (Yagi M *et al.*, 2005). Späte Defekte betreffen funktionelle Aspekte der Osteoklasten. In den untersuchten Mäusen ist die Anzahl an Osteoklasten nicht beeinflusst, jedoch kommt es nicht zur vollständigen Reifung der Osteoklasten oder die eigentliche Funktion des Osteoklasten, die Knochenresorption, ist beeinträchtigt. Deletionen der Tyrosin-Kinase *c-Src* resultieren in einer anormalen Entwicklung der *Ruffled border*

(Lowe C *et al.*, 1993), ebenso wie  $\beta 3$ -Integrin-Deletionen, die zusätzlich einen Arrest in der Differenzierung und einen Defekt in der Anlagerung an die Knochenmatrix aufweisen (McHugh KP *et al.*, 2000). *Cathepsin K*- oder *TRAP*-defiziente Mäuse können Osteoklasten ausbilden, diese sind jedoch nicht in der Lage Knochen abzubauen (Saftig P *et al.*, 1998; Hollberg K *et al.*, 2002). Die Ansäuerung der Resorptionslakune ist in Mäusen mit Defekten der  $H^+$ -ATPase und des *ClCn7*-Kanals gestört und verursacht in diesem Zusammenhang Osteopetrose (Li YP *et al.*, 1999; Kornak U *et al.*, 2001).

Im Vergleich zu Osteopetrose-assoziierten Mausmodellen, die in den meisten Fällen auf einem Defekt in der Osteoklasten-Differenzierung beruhen, liegen in Fällen von Osteopetrose beim Menschen keine Daten oder Kenntnisse mit einem Bezug zu fehlerhafter Osteoklastogenese vor (Tolar J *et al.*, 2004). In Fällen von Osteopetrose beim Menschen können jedoch häufig Störungen in der Ansäuerung der Resorptionslakune beobachtet werden. In autosomal-rezessiver Osteopetrose sind vor allem genetische Veränderungen der *CAII* (*carbonic anhydrase II*), der *ATP6i* ( $H^+$ -ATPase) und *ClCn7* (*chlorid channel 7*) bekannt. Die Defekte in *ClCn7* kommen auch in autosomal-dominanten Fällen von Osteopetrose vor (Sly WS *et al.*, 1983; Frattini A *et al.*, 2003; Sobacchi C *et al.*, 2001; Taranta A *et al.*, 2003; Cleiren E *et al.*, 2001).

**Osteoporose**, auch als Knochenschwund bezeichnet, ist eine Erkrankung des menschlichen Skeletts, bei der es zu einer verminderten Knochendichte und dadurch zu häufigeren Knochenfrakturen kommt. Die Effekte sind systemisch und betreffen das ganze Skelett (Cummings SR und Melton LJ, 2002). Die Krankheit tritt verstärkt mit dem Alter auf, in Populationen der westlichen Welt erleiden etwa 50 % aller Frauen und 20 % aller Männer nach dem 50. Lebensjahr Knochenfrakturen aufgrund geringerer Knochendichte (*Dep. of Health and Human Service*, Rockville, 2004). Osteoporose kann in primäre und sekundäre Varianten unterteilt werden. Primäre Osteoporose tritt postmenopausal in Frauen und altersbedingt auf, während sekundäre Osteoporose in Folge anderer Krankheiten, medikamentöser Behandlungen, Fehlernährung oder unzureichender Bewegung entstehen kann (Riggs BL *et al.*, 1982). Die verringerte Knochendichte resultiert aus einer Verschiebung der Zellaktivität während der Knochenremodellierung in Richtung der Osteoklasten, so dass die Knochenresorption gegenüber dem Knochenaufbau durch Osteoblasten überwiegt. Die Diagnose des Knochenschwunds kann quantitativ anhand der Knochenmineraldichte (BMD, *bone marrow density*) oder qualitativ anhand der Knochengeometrie und Mikrostruktur erfolgen (Marshall D *et al.*, 1996; Kanis JA *et al.*, 2005).

Osteoporose ist eine Knochenkrankheit mit polygenen Ursachen, d.h. Änderungen in Genen wie *VDR* (vitamin D receptor), *COL1A1* (*collagen type 1 alpha 1*), *LRP5* (*LDL receptor related protein 5*) und *ER* (*estrogen receptor*) werden als Ursachen diskutiert, ebenso wie der Wnt-Signalweg und BMP-2 (Morrison NA *et al.*, 1994; Gong Y *et al.*, 2001). Die Vielfalt und Menge an Mausmodellen, die zur Forschung der genetischen Mechanismen der Osteoporose beigetragen haben, dienen ebenfalls zur Erläuterung der Hintergründe in Osteoporose. Ein Mausmodell zur Untersuchung von Osteoporose kann in Mäusen durch Entfernung der Eierstöcke und Hoden generiert werden. Der fehlende Einfluss der Sexualhormone auf den Organismus ist vergleichbar mit dem Zustand nach der Menopause in Frauen und der damit verbundenen Estrogen-induzierten Osteoporose (Girasole G *et al.*, 1992). Estrogen beeinflusst neben dem Knochengewebe auch andere Gewebe wie Brustdrüsen und Gebärmutter, sowie den Cholesterin-Spiegel im Blut und das Körpergewicht, so dass der Verlust des Sexualhormons weitere phänotypische Veränderung beinhaltet (Shapiro S *et al.*, 1985; Silver JJ und Einhorn TA, 1995). Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Knochenremodellierung weist Osteoprotegerin auf, da *in vitro* und *in vivo* die Zugabe von Osteoprotegerin die Osteoklasten-Differenzierung inhibiert. Transgene Mäuse mit ektopter Osteoprotegerin-Expression entwickeln Osteoporose, im Gegensatz dazu resultiert eine gezielte Mutation des Osteoprotegerin-Gens in schwerwiegender Osteoporose (Mizuno A *et al.*, 1998; Simonet WS *et al.*, 1997). Der Zusammenhang von Osteoprotegerin und Osteoporose im Menschen konnte bisher jedoch nicht erbracht werden.

Neben den hier genannten Ursachen für Osteoporose kommt es in einer Vielzahl von anderen Erkrankungen zu Auswirkungen auf das menschliche Knochengewebe. Das Krankheitsbild von Patienten mit Down-Syndrom ist assoziiert mit gedrungener Körperstatur, Verdichtung der Halswirbel, unvollständige Schließung der Schädelknochen und verringerter Knochendichte (Keeling JW *et al.*, 1997; Sepulveda D *et al.*, 1995). Die Effekte von Trisomie 21 auf Genebene sind mannigfaltig, assoziiert mit Änderungen des Skeletts ist der Transkriptionsfaktor *Ets2*, dessen Gen auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist. Die ektope Expression von *Ets2* in Mäusen verursacht alle Defekte des Skeletts wie sie auch in Patienten mit Down Syndrome beobachtet werden können. *Ets2* gehört zur *Ets*-Familie von Transkriptionsfaktoren, der auch PU.1 zugeordnet wird (Sumarsono SH *et al.*, 1996).

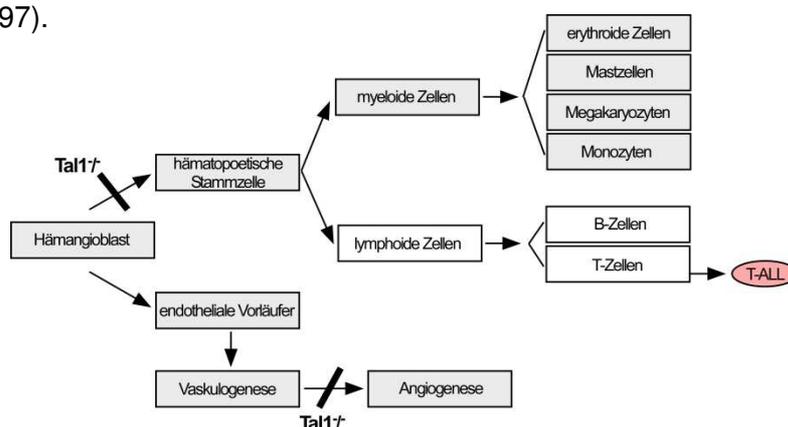
## 2.9 Transkriptionsfaktor Tal1

Die Entstehung von verschiedenen Zelltypen und Geweben in Eukaryoten beruht auf streng regulierten Mechanismen zur Genexpression. Entscheidend in diesem regulativen Prozess ist ein Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren, die in Kombination Gene aktivieren oder reprimieren, je nach Zell-spezifischem Hintergrund. Die Differenzierungsprozesse im hämatopoetischen System zur Entstehung der verschiedenen Blutzelllinien unterliegen im besonderen Maße den regulativen Prozessen von Transkriptionsfaktoren, da fehlorientierte Aktivierung oder Reprimierung von Zielgenen mit der Entstehung von Leukämien verbunden sind (Shivdasani RA und Orkin SH, 1996; Tenen DG *et al.*, 1997; Enver T und Greaves M, 1998; Orkin SH, 2000). Chromosomale Translokationen betreffen häufig Gene, die eine essentielle Rolle während der normalen Regulation von Zellteilung und Proliferation spielen. Der Transkriptionsfaktor Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*; auch Scl, *stem cell leukemia protein*) wurde zunächst im Zusammenhang mit einer Chromosomentranslokation eines Patienten mit akuter, lymphoblastischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) beschrieben. Die Translokation t(1;14)(q33;11) sorgte für eine Fusion des bis dahin unbekanntes Tal1-Gens von Chromosom 1 mit dem Gen für den T-Zell-Rezeptor (TCR, *T-cell receptor*) auf Chromosom 14. Während der normalen Differenzierung von T-Zellen kommt es eigentlich zu einer Abnahme der Tal1-Expression. Die Translokation des *Tal1*-Gens resultiert in der ektopen Expression von Tal1, wodurch es zur verstärkten Proliferation der T-Zellen und der Entstehung von T-ALL kommt (Begley CG *et al.*, 1989).

Während der normalen Entwicklung im menschlichen Embryo findet die Hämatopoese bis zur dritten Wochen zunächst im Dottersack und der AGM-Region (*aorta gonad mesonephros region*) statt, ab der fünften Woche stellt die embryonale Leber das Hauptorgan der Hämatopoese dar (Migliaccio G *et al.*, 1986). Die Tal1-Expression wurde zunächst in der embryonalen Leber gezeigt, aber auch in Endothelzellen der AGM-Region. Diese Zellen besitzen die Stammzellmarker CD34<sup>+</sup>CD45<sup>lin</sup><sup>-</sup> und stellen somit die intraembryonale Quelle der definitiven Hämatopoese dar. Auch CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>- und CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen der fötalen Leber und des adulten Knochenmarks exprimieren Tal1 (Begley CG *et al.*, 1989; Labastie MC *et al.*, 1998). Die Expression von Tal1 kommt jedoch nicht in allen Zelllinien der Hämatopoese vor, sondern wurde bisher nur in erythroiden Zellen, Mastzellen, Megakaryozyten, einigen myeloiden und B-Zell-Vorläuferzellen und in Monozyten beschrieben (Green AR *et al.*, 1991; Green AR *et al.*, 1992; Elefanty AG *et al.*, 1998; Hall MA *et al.*, 2003; Dey S *et al.*, 2010). Dieses Expressionsmuster in embryonalen und adulten hämatopoetischen Zellen der Maus gilt ebenso im humanen System (Mouthon MA *et al.*,

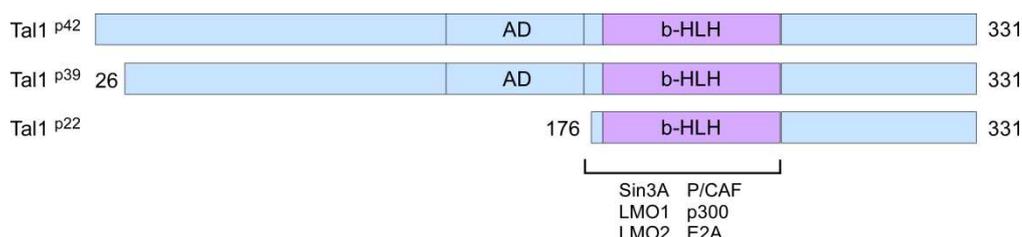
1993; Pulford K *et al.*, 1995). Außerhalb des hämatopoetischen Systems kommt Tal1-Expression in vaskulären Endothelzellen, im embryonalen und adulten Gehirn, in den glatten Muskeln der adulten Aorta und dem Endokard des Herzens vor (Green AR *et al.*, 1992; Kallianpur AR *et al.*, 1994). Die Expression von Tal1 ist auch in niederen Vertebraten konserviert, ähnliche Expressionsmuster wie in Mäusen und dem Menschen konnten auch in Hühner-Embryonen, im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und Zebraquärlingen (auch Zebrafisch, *Danio rerio*) gezeigt werden (Zhang XY *et al.*, 2007; Drake CJ *et al.*, 1997; Mead PE *et al.*, 1998; Gering M *et al.*, 1998).

Tal1 wird in hämatopoetischen Stammzellen und einigen hämatopoetischen Zelllinien exprimiert und stellt einen entscheidenden Transkriptionsfaktor in der Regulation hämatopoetischer Differenzierungsprozesse dar. Das Tal1 eine wichtige Funktion während der Hämatopoese besitzt, wurde mittels Mausmodellen gezeigt. Der *Knock-out* von Tal1 ist letal und *Tal1*-defiziente Mäuse sterben zwischen E8.5-10.5. Diese Mäuse zeichnen das komplette Fehlen des Blutbildungssystems aus. Außerdem sind die embryonalen Stammzellen der *Tal1*-defizienten Mäuse nicht in der Lage nach Implantation in die Blastozyste einer Wildtyp-Maus hämatopoetische Linien auszubilden (Robb L *et al.*, 1995; Shivdasani RA *et al.*, 1995). Auch die Induktion hämatopoetischer Gene ist in den *Tal1*-defizienten-Mäusen gestört (Elefanty AG *et al.*, 1997). In *Tal1*-defizienten Mäusen sind die Entstehung von endothelialen Zellen und die Expression Endothel-spezifischer Gene nicht beeinflusst, jedoch ist die Ausbildung von Blutgefäßen im Dottersack gestört, d.h. die Angiogenese ist inhibiert (Visvader J *et al.*, 1991). Die Hämatopoese kann in *Tal1-Knock-out*-Mäusen durch ektope Expression von Tal1 unter einem GATA1 regulatorischen Element wieder hergestellt werden, da GATA1 in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Silver L und Palis J, 1997).



**Abb.2.10: Einfluss von Tal1 auf Hämatopoese und Angiogenese.** Im hämatopoetischen System wird Tal1 in hämatopoetischen Stammzellen und in erythroiden Zellen, Mastzellen, Megakaryozyten und Monozyten exprimiert (graue Boxen). Abweichende Expression von Tal1 in T-Zellen führt zur Entstehung von T-ALL. In *Tal1*-defizienten Mäusen ist die Vaskulogenese nicht beeinflusst. Jedoch führt die fehlende Tal1-Expression zur Reprimierung der Angiogenese (Barton LM *et al.*, 1999, modifiziert).

Der Transkriptionsfaktor Tal1 gehört zur Familie der **basic helix-loop-helix-Proteine** (bHLH). Bei Mäusen ist das Gen für *Tal1* auf Chromosom 4 und beim Menschen auf Chromosom 1 lokalisiert. Das humane *Tal1*-Gen besitzt eine Länge von 16 kbp und besteht aus acht Exons, wobei nur drei Exons kodierende Sequenzen enthalten (Begley CG *et al.*, 1991; Aplan PD *et al.*, 1990). Das murine *Tal1*-Gen ist dem humanen strukturell sehr ähnlich. Die cDNA des murinen und humanen *Tal1* sind zu 67 % in ihrer Nukleotidsequenz identisch, die größte Homologie mit 88 % kann in der kodierenden Region beobachtet werden. Auf Proteinebene weisen murines und humanes Tal1 94 % Aminosäure-Homologie auf (Begley CG *et al.*, 1994; Baer R, 1993). Innerhalb der Gensequenz befinden sich mehrere Translationsstartpunkte, so dass verschiedene Isoformen entstehen (Abb.2.11). Das 42 kDA Tal1-Protein entspricht der Volllänge, während das 39 kDA und das 22 kDa Tal1-Protein N-terminal verkürzte Isoformen darstellen. Die verkürzten Formen entstehen durch alternative Translation-Initiation an einem internen Methionin (Aplan PD *et al.*, 1990; Bernard O *et al.*, 1991; Goldfarb AN *et al.*, 1992; Elwood NJ *et al.*, 1994; Calkhoven CF *et al.*, 2003). Der Einfluss eines proteolytischen Mechanismus konnte nicht gezeigt werden (Calkhoven CF *et al.*, 2003). Alle Isoformen beinhalten die essentielle bHLH-Region, da diese für die Lokalisation im Kern, die Bindung an DNA und die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist (Goldfarb AN *et al.*, 1992; Hsu HL *et al.*, 1991; Hsu HL *et al.*, 1994). Im N-Terminus der Volllänge und der Tal1-p39-Isoform befindet sich eine Transaktivierungsdomäne, die durch ERK1-vermittelte Phosphorylierung reguliert wird (Wadman IA *et al.*, 1994).



**Abb.2.11: Schematische Darstellung der Tal1-Isoformen.** Das Tal1-Protein kann in verschiedene Isoformen translatiert werden, aufgrund eines internen Methionins zur Translationsinitiation. Es entsteht das Protein der Volllänge mit 331 Aminosäuren und zwei N-terminal verkürzte Formen, diese beinhalten die Aminosäuren 26-331 bzw. 176-331. Alle Isoformen enthalten die bHLH-Region, die für DNA-Bindung und Interaktion mit anderen Proteinen verantwortlich ist. Die Transaktivierungsdomäne (AD) ist nur in den Isoformen Tal1 p<sup>42</sup> und p<sup>39</sup> enthalten (Calkhoven CF *et al.*, 2003).

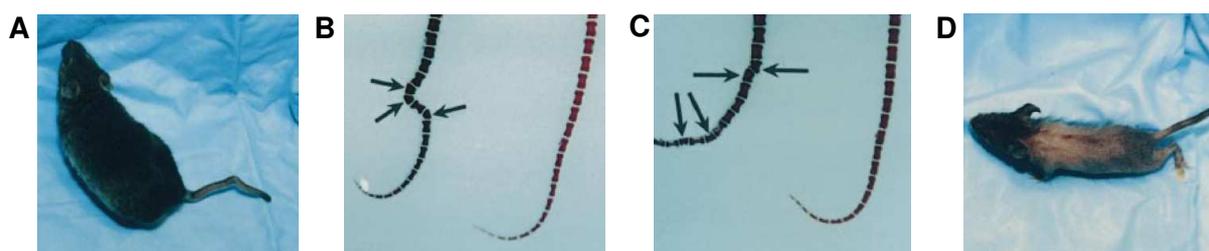
Die Aktivität des Tal1-Proteins wird durch posttranslationale Modifikationen verändert. Bisher wurden Phosphorylierung und Acetylierung beschrieben. Phosphorylierungen können an Serin 122, Threonin 90 und Serin 172 stattfinden. ERK1 (*extracellular signal related kinase 1*) vermittelt die Phosphorylierung an Serin 122 in etablierten Leukämie-Zelllinien. Die daraus resultierende Aktivierung von Tal1 könnte, ebenso wie die Translokationen, einen Einfluss auf die Entstehung von T-ALL zeigen (Cheng JT *et al.*, 1993). Threonin 90 wird spezifisch von der Akt1-Kinase (*thymoma viral proto oncogene 1*) phosphoryliert, wodurch die repressive Funktion von Tal1 vermindert wird (Palamarchuk A *et al.*, 2005). Die Akt-vermittelte Phosphorylierung von Tal1 führt zum TGF $\beta$ -vermittelten (*transforming growth factor  $\beta$* ) Abbau von Tal1 (Terme JM *et al.*, 2009). Tal1 wird durch eine cAMP-abhängige (*cyclic adenosine monophosphate*) Kinase ebenfalls an Serin 172 phosphoryliert. Dieser Aminosäurerest befindet sich in der Nähe der DNA-Bindedomäne, so dass durch die Phosphorylierung die DNA-Bindung, aber nicht die Interaktion mit E47, beeinflusst wird (Prasad KS und Brandt SJ, 1997). Im Gegensatz dazu verursacht die Acetylierung von Tal1 in der bHLH-Region durch p300 (EP300, *E1A binding protein p300*) und dem p300-assoziierten Faktor P/CAF (*p300/CBP associated factor*) *in vitro* eine verstärkte DNA-Bindung in MEL-Zellen (*murine erythroleukemia cells*), wodurch die Differenzierung der erythroiden Zellen eingeleitet wird (Huang S *et al.*, 2000).

Tal1 zählt zu der Klasse B der bHLH-Proteine und bildet Heterodimere mit Proteinen der Klasse A bHLH-Proteine wie zum Beispiel TCF3 (*transcription factor 3*, auch E47) und TCF12 (*transcription factor 12*, auch HEB) (Hsu HL *et al.*, 1991; Lahlil R *et al.*, 2004; Tanaka A *et al.*, 2009). Nur als Heterodimer ist Tal1 in der Lage an DNA zu binden, wobei es DNA-Sequenzen mit dem Motiv **CANNTG** erkennt, das als E-Box bezeichnet wird (Hsu HL *et al.*, 1994; Nielsen AL *et al.*, 1996). Meist erfolgt die Regulation der Transkription in einem Komplex aus mehreren Interaktionspartnern und die Zusammensetzung dieses Komplexes ist entscheidend, ob Tal1 als Transkriptionsaktivator oder -repressor fungiert. In erythroiden Zellen wurde Tal1 in einem Komplex mit TCF3, LMO2 (*LIM domain only 2*), GATA1 und LDB1 (*LIM domain binding 1*) gefunden (Wadmann IA *et al.*, 1997; Lahlil R *et al.*, 2004). Tal1 ist außerdem in der Lage mit mSin3A (*transcriptional regulator SIN3 yeast homolog A*) und HDAC1 (*histone deacetylase 1*) in einem Co-Repressorkomplex zu interagieren und dadurch die Differenzierung von MEL-Zellen zu inhibieren (Huang S und Brandt SJ, 2000). Durch die Interaktion von Tal1 mit p300 entsteht ein Co-Aktivator-Komplex und die Acetylierung durch P/CAF aktiviert Tal1. Dadurch wird die Transkription von Tal1-Zielgenen in MEL-Zellen und die erythroide Differenzierung induziert (Huang S *et al.*, 1999; Huang S *et al.*, 2000).

## 2.10 *Tal1* und Osteoklasten

Der Transkriptionsfaktor *Tal1* spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Hämatopoese und ist entscheidend für die Differenzierung verschiedener hämatopoetischer Zellen, die aus CMP-Vorläuferzellen (*common myeloid progenitor*) entstehen (Shivdasani RA *et al.*, 1995; Green AR *et al.*, 1991; Green AR *et al.*, 1992; Elefanty AG *et al.*, 1998; Hall MA *et al.*, 2003). Die Differenzierung von Osteoklasten verläuft über mehrere Schritte aus hämatopoetischen Stammzellen, CMP-Vorläuferzellen und Makrophagen/Monozyten (Ross FP und Teitelbaum SL, 2005). Der Zusammenhang von *Tal1* und dessen Auswirkungen auf die Knochenentwicklung oder der Entstehung von Zellen wie Chondrozyten, Osteoblasten, Osteozyten oder Osteoklasten, die am Knochenmetabolismus beteiligt sind, wurde bisher nur in wenigen Publikationen beschrieben. Allerdings finden sich in der Literatur Hinweise, dass *Tal1* eine Auswirkung auf die Zellen des Knochengewebes und die Osteoklasten-Differenzierung haben könnte.

Aplan PD *et al.* zeigten, dass eine veränderte Expression von *Tal1* zusammen mit *LMO1* (*LIM domain only 1*) zu einer verstärkten Proliferation von T-Zellen und der Ausbildung von T-Zell-Lymphomen führt, wie es auch in humanen Formen der T-ALL beobachtet werden kann. Bis dahin konnte dieser Zusammenhang von ektooper *Tal1*-Expression und der malignen Transformation von T-Zellen nicht erbracht werden, da transgene Mäuse mit *Tal1*-Überexpression keine T-Zell-Transformationen aufwiesen (Robb L *et al.*, 1995; Larson RC *et al.*, 1996). Durch Generierung transgener Mäuse, deren *Tal1*-Expression durch den Promotor des *SIL*-Gens (*Scl interrupting locus protein*) gesteuert wird, sollte ein Mausmodell zur Analyse der T-ALL-Ursachen erstellt werden. Diese Mäuse zeigten jedoch keine Transformation der T-Zellen, sondern lediglich eine Verzögerung im Wachstum, spärliche Fellentwicklung und Knochenveränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Knochenveränderungen zeigten sich anhand von abgeknickten Schwänzen, jedoch wurde dieser Phänotyp nicht weiter analysiert (Abb.2.12). Durch Verpaarung mit *LMO1*-überexprimierenden Mäusen führte die ektope Expression von *Tal1* zur Entwicklung aggressiver T-Zell-Transformationen (Aplan PD *et al.*, 1997).

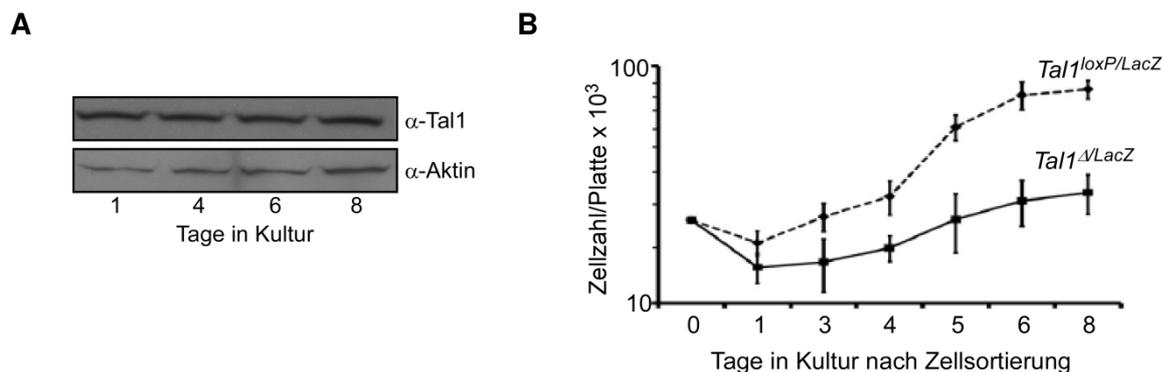


**Abb.2.12: Phänotyp der *SIL/Tal1*-transgenen Mäuse.** Die von Aplan *et al.* generierten transgenen Mäuse exprimieren *Tal1* unter *SIL*-regulatorischen Elementen. Diese Mäuse zeigten keine T-Zell-Transformation, aber hatten geknickte Schwänze (A/B/C), einen kleineren Körperbau und spärliche Behaarung (D) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Aplan PD *et al.*, 1997, modifiziert).

Yamane *et al.* untersuchten *in vitro* embryonale Stammzellen (ES) mit Deletionen des *Tal1* in Bezug auf deren Differenzierungsverhalten in Richtung Osteoklasten. Sie entwickelten ein Co-Kultursystem, wobei ES-Zellen auf ST2-Stromazellen ausgesät werden und nach Kultivierung unter 1,25-Dihydroxyvitamin D3 und Dexamethason nach etwa 11 Tagen multinukleäre Osteoklasten ausbilden. *Tal1*<sup>-/-</sup>-ES-Zellen waren nicht in der Lage Osteoklasten auszubilden, aber es entwickelte sich aus diesen ES-Zellen auch keine andere hämatopoetische Zelllinie. Diese Publikation verdeutlicht, dass *Tal1* frühe Prozesse der Hämatopoese reguliert, die für die Differenzierung aller hämatopoetischer Linien von entscheidender Bedeutung sind (Yamane T *et al.*, 2000).

In einer weiteren Publikation dieser Gruppe wird das Zellmodell der *Tal1*<sup>-/-</sup>-ES-Zellen erneut verwendet, um die Differenzierung von Osteoklasten zu analysieren. *Tal1*-Knock-out Mäuse sterben während der Embryogenese aufgrund des Fehlens aller hämatopoetischen Zellen (Shivdasani RA *et al.*, 1995; Porcher C *et al.*, 1996). In *Tal1*-defizienten ES-Zellen kommt es außerdem nicht zur Expression hämatopoetischer Gene (Elefanty AG *et al.*, 1997). Die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 konnte nach Induktion der ES-Zellen, um hämatopoetische Zellen zu bilden, nicht gezeigt werden. PU.1 ist entscheidend für die Myelopoese, B-Lymphopoese und die Osteoklastogenese. Diese Differenzierungsprozesse sind in *PU.1*-defizienten Mäusen beeinträchtigt (Scott EW *et al.*, 1994; Tondravi MM *et al.*, 1997). Tsuneto *et al.* untersuchten mittels eines induzierbaren Systems die Auswirkungen ektopter PU.1-Expression in den *Tal1*-defizienten ES-Zellen und stellten fest, dass dadurch die Osteoklasten-Differenzierung stattfinden kann. Sie vermuteten, dass die Genregulation durch den Transkriptionsfaktor PU.1 nach der Genregulation durch *Tal1* stattfindet (Tsuneto M *et al.*, 2005).

Die Expression von *Tal1* und dessen Auswirkungen auf die Differenzierung in Richtung Monozyten wurde in CMP-Zellen (*common myeloid progenitor*) gezeigt (Dey S *et al.*, 2010). Frühere Studien zeigten, dass *Tal1* in murinen und humanen Makrophagen vorhanden ist (Kallianpur AR *et al.*, 1994; Pulford K *et al.*, 1995). Dey *et al.* beobachteten die Expression von *Tal1* in CMP's bis hin zu differenzierten Makrophagen (Abb.2.13A).



**Abb.2.13: Einfluss von Tal1 auf Monozyten-Vorläuferzellen.** (A) Western Blot von Tal1 in terminal differenzierten BM MM-Zellen (*bone marrow monocyte/macrophage*). Die Expression von Tal1 ändert sich im Verlauf der Kultur nicht. (B) Wachstumskurve der MM-Zellen aus *Tal1<sup>loxP/LacZ</sup>*-Mäusen, die mit MSCV-GFP (Kontrolle) oder MSCV-GFP-Cre (resultiert in *Knock-out*) transduziert wurden. Der Verlust von Tal1 führt zu einer verringerten Proliferation der MM-Zellen (Dey S *et al.*, 2010, modifiziert).

Eine *Tal1*-Deletion *ex vivo* sorgte für eine Blockade der Proliferation während der Monozytopoese und eine Verzögerung des Zellzyklus (Abb.2.13B). Die Differenzierung der Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen wurde durch den *Tal1*-*Knock-out* beschleunigt. Als Zielgene von Tal1 wurden in dieser Studie *GATA2* (*GATA binding protein 2*) und *p16<sup>Ink4a</sup>* (*CDKN2A*, *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) beschrieben. *p16<sup>Ink4a</sup>* spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Die Transkription von *p16<sup>Ink4a</sup>* wurde in *Tal1*-defizienten Monozyten/Makrophagen-Zellen induziert, was die Blockade in Proliferation und Zellzyklus erklärt. Das reduzierte mRNA-Level von *GATA2* in den *Tal1*-defizienten Zellen steht im Zusammenhang mit der induzierten Differenzierung der Monozyten, da dies auch in *GATA2*-defizienten Mäusen beobachtet wurde (Yamane T *et al.*, 2000; Dey S *et al.*, 2010).

## 2.11 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor Tal1 ist entscheidend für die Angiogenese, die primitive und die definitive Hämatopoese (Robb L *et al.*, 1995; Shivdasani RA *et al.*, 1995). Die Expression von Tal1 wurde in erythroiden Zellen, Megakaryozyten, Mastzellen und Monozyten gezeigt, wobei Tal1 einen entscheidenden Einfluss auf deren Differenzierungsprozesse besitzt (Green AR *et al.*, 1991; Green AR *et al.*, 1992; Elefanty AG *et al.*, 1998; Hall MA *et al.*, 2003; Dey S *et al.*, 2010). Die Rolle von Tal1 in der Osteoklastogenese ist bisher nicht geklärt. Osteoklasten sind multinukleäre Zellen und verantwortlich für die Resorption von Knochenmaterial. Sie entstehen durch Zellfusion aus Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen. Eine Beteiligung von Tal1 an der Differenzierung dieser Zellpopulation während der Hämatopoese wurde bereits beschrieben und Dey *et al.* zeigten, dass Tal1 während der Monozytopoese exprimiert wird und dass ein *Tal1-Knock-out* die Differenzierungsprozesse in Monozyten verstärkt.

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des Transkriptionsfaktors Tal1 in Monozyten und reifen Osteoklasten, vor allem in Bezug auf genregulatorische Prozesse während der Osteoklasten-Differenzierung, zu untersuchen. Die **Expression von Tal1** wurde in Osteoklasten-Vorläuferzellen und in reifen Osteoklasten untersucht, dazu wurden zum einen etablierte Zellkulturen aus RAW264.7-Zellen und primären BMM-Zellen (*bone marrow derived monocytes*), zum anderen *in vivo*-Modelle verwendet. Da der Transkriptionsfaktor Tal1 die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflusst, wurde außerdem der regulatorische **Einfluss von Tal1 auf den Differenzierungsprozess** von Osteoklasten-Vorläuferzellen in reife Osteoklasten analysiert. Die Beteiligung von Tal1 während der Osteoklastogenese und die Regulation Osteoklasten-spezifischer Gene wurde bisher nicht untersucht und somit war ein weiterer wichtiger Aspekt die Analyse des regulatorischen **Einfluss von Tal1 auf die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene**, die für die Entstehung reifer Osteoklasten entscheidend sind. Der Prozess der Osteoklastogenese unterliegt einem regulierten Netzwerk an Transkriptionsfaktoren, so dass ein weiterer Aspekt dieser Arbeit die Analyse der **Interaktion von Tal1 und anderen Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren** war. Die Rekrutierung der Transkriptionsfaktoren an die Promotoren Osteoklasten-spezifischer Gene während der Osteoklasten-Differenzierung wurde untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 DNA/RNA-Methoden

##### 3.1.1 Standardmethoden und verwendete Kits

Molekularbiologische Standardmethoden wie Anzucht von Bakterien, Aufreinigung von Plasmid-DNA, Polymerasekettenreaktion, Modifikation von DNA und Gelelektrophorese wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Sambrook J *et al.* (1989) durchgeführt. Die Isolierung von Plasmid-DNA, Aufreinigung von PCR-Produkten, Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte mit den in Tabelle 2.1 angegebenen *Kits* nach Angaben des Herstellers.

**Tabelle 3.1: Übersicht verwendeter *Kits***

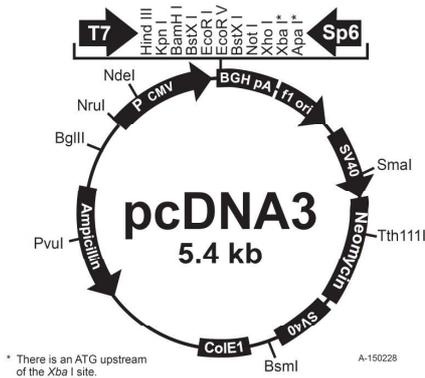
NAME DES KITS	ANWENDUNG	HERSTELLER
GeneJET™ Plasmid Miniprep	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 3 ml Bakterienkulturen	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneJET™ PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	Fermentas (St. Leon-Rot)
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterienkulturen	Invitrogen (Darmstadt)
RNeasy® Mini Kit	Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen	Qiagen (Hilden)
Omniscript® RT Kit	Umschreiben von RNA in cDNA	Qiagen (Hilden)

Restriktionsenzyme und modifizierte Enzyme wurden von New England Biolabs (Ipswich) und Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

##### 3.1.2 Vektoren

###### Expressionsvektor – pcDNA3-2HA

Der pcDNA3-Vektor beinhaltet den Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV), zwei Resistenzkassetten und wurde genetisch so verändert, dass vor der multiplen Klonierungsstelle (MCS) die Sequenz zur Expression eines HA-Fusionsproteins vorhanden ist. Zur Anzucht in Bakterien ist auf dem Vektor das Ampicillin-Resistenzgen vorhanden, die Selektion in Säugetierzellen wird über eine Neomycin-Resistenz erreicht (Abb.3.1).



**Abb.3.1: Vektorkarte von pcDNA3**

Quelle: Invitrogen (Darmstadt) modifiziert

Der Vektor eignet sich als Expressionskonstrukt in Säugetierzellen. Zum Nachweis, z.B. im Western Blot, wurde vor die multiple Klonierungsstelle die Sequenz für das HA-Protein eingefügt, so dass am N-Terminus ein HA-Fusionsprotein entsteht.

**Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in pcDNA3-2HA**

GEN	SPEZIES*		ENZYM	NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]
Tal1	h	fwd	BamHI	ATATGGATCCATGGCCACCGAGCGGCCGCCG	>75,0
		rev	EcoRI	ATATGAATTCTCACCGAGGGCCGGCTCCATC	70,8
MITF	m	fwd	EcoRI	TATAGAATTCTGATGCTGGAAATGC	58,1
		rev	XbaI	TATATCTAGACTAACACGCATGCT	57,6

\* m = murine, h = human; fwd = forward, rev = reverse

**Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für pcDNA3-2HA**

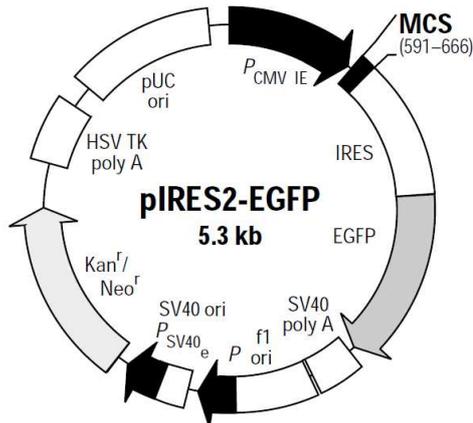
NAME		NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]	TM für Seq. [°C]
T7	fwd	CGAAATTAATACGACTCACTATAG	55,9	53
sp6	rev	GCATTAGGTGACTACTATAG	53,2	53

\* fwd = forward, rev = reverse

Als Matrize zur Amplifikation von murinem MITF wurde der Vektor pEF6/V5-His-MITF von Dr. Nicholas Meadows (Universität Queensland, Brisbane) verwendet. Tal1 wurde aus einem pcDNA3-hTal1-Konstrukt kloniert, das jedoch kein HA-Fusionsprotein enthielt. Der Ursprungsvektor für Tal1 stammt aus dem Labor von Dr. Achim Leutz (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin). Das Expressionskonstrukt pcDNA3-2HA-PU.1. stammt von Dr. Frank Rosenbauer (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin).

Expressionsvektor – pIRES2-EGFP

Der Expressionsvektor pIRES2-EGFP der Firma Clontech (Heidelberg) besitzt ebenfalls einen CMV-Promotor. Die Anzucht in Bakterien erfolgt über eine Kanamycin-Kassette (Kan<sup>r</sup>). In Säugetierzellen kann die Selektion mittels einer Neomycin-Kassette erfolgen, außerdem können transfizierte Zellen über ein GFP-Signal (*green fluorescent protein*) sortiert werden. Die Expression des GFP funktioniert aufgrund einer internen Ribosomenbindestelle (IRES) unabhängig von der in die MCS klonierten Sequenz (Abb.3.2). Als Grundlage zur Klonierung von Tal1 in den pIRES2-EGFP-Vektor wurde das pcDNA3-2HA-hTal1-Konstrukt verwendet. Dabei wurde die hTal1-Sequenz zusammen mit der Sequenz des HA-Fusionsprotein in den pIRES2-EGFP-Vektor kloniert.



**Abb.3.2: Vektorkarte von pIRES2-EGFP**

Quelle: Clontech (Heidelberg)

Der Vektor pIRES2-EGFP eignet sich zur Expression in Säugetierzellen, der Vorteil besteht in der Expression eines GFP-Signals, das zur Selektion mittels Durchflusszytometrie-Sortierung Verwendung findet.

**Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten Primer zu Klonierung in pIRES2-EGFP**

GEN	SPEZIES*	ENZYM	NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]
Tal1	m	fwd	NheI ATATGCTAGCGGATCTCCCACCATGTACCCTTAC	70,7
		rev	XhoI ATATCTCGAGTCACCGAGGGCCGGCTCC	72,4

\* m = murine; fwd = forward, rev = reverse

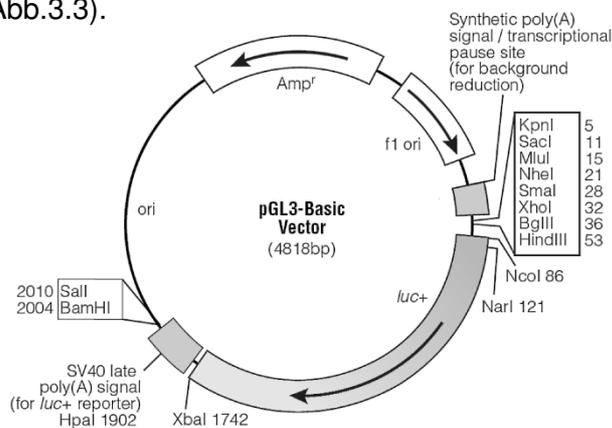
**Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für pIRES2-EGFP**

NAME	ENZYM	NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]	TM für Seq. [°C]
pIRESfor	fwd	ATTGACGCAAATGGGCGGTAG	59,8	53
pIRESrev	rev	ACGCACACCGGCCTTATCCA	61,9	53

\* fwd = forward, rev = reverse

### Luciferase-Reportergenvektor - pGL3-Basic

Der pGL3-Basic-Vektor wird für Reporter-Gen-Studien verwendet. Er besitzt zur Anzucht in Bakterien eine Ampicillin-Resistenz. Der Vektor enthält weder einen eukaryotischen Promotor noch *Enhancer*-Elemente. Der zu untersuchende Promotor wurde vor das Luciferase-Reporter-Gen kloniert, so dass die Promotoraktivität gemessen werden konnte. Einflüsse von Transkriptionsfaktoren auf den klonierten Promotor wirken sich auf die Expression des Reporter-Genes aus und können im Luciferase-Assay nachgewiesen werden (Abb.3.3).



**Abb.3.3: Vektorkarte von pGL3-Basic**

Quelle: Promega (Mannheim)

Der Reporter-Genvektor pGL3basic eignet sich für Promotorstudien, die Sequenz des zu untersuchenden Promotors wird in den Vektor kloniert, so dass er die Expression des Reporter-Genes, des Luciferase-Genes, kontrolliert.

In dieser Arbeit wurde ein Reporter-Gen-Konstrukt verwendet, das von Dr. Takeshi Miyamoto (Keio Universität, Tokyo) zur Verfügung gestellt wurde (Yagi M *et al.*, 2007). Das Konstrukt enthält 682bp des murinen Promotorbereichs von DC-STAMP (*dendritic cell-specific transmembrane protein*). In diesem Bereich des DC-STAMP-Promotors ist eine potentielle Bindestelle für Tal1, eine E-Box, vorhanden. Um den Einfluss von Tal1 auf die Regulation von DC-STAMP zu untersuchen, wurde die E-Box-Sequenz „CAGCTG“ mit Hilfe des *Site-directed-mutagenesis-Kit* von Agilent Technologies/Stratagene (Waldbronn) zu „AAGCTG“ mutiert.

**Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten Primer zur Mutagenese von pGL3-Basic-DC-Stamp**

PROMOTOR	SPEZIES*		NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]
DC-STAMP	m	fwd	TGACTTTTAAAGCTGTGGGTGG	57,9
		rev	CCACCCACAGCTTAAAGTCA	57,9

\* m = murine; fwd = forward, rev = reverse

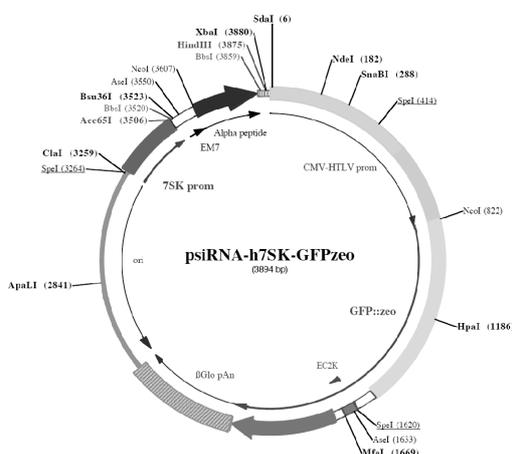
**Tabelle 3.7: Übersicht der verwendet Sequenzierungsprimer für pGL3-Basic**

NAME		NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]	TM für Seq. [°C]
RVprimer3	fwd	CTAGCAAATAGGCTGTCCC	57,3	53
GLprimer2	rev	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA	57,1	53

\* fwd = forward, rev = reverse

### Knockdown-Vektor – psiRNA-h7SK-GFPzeo

Für *Knockdown*-Experimente in Säugetierzellen wurde in dieser Arbeit der psiRNA-h7SK-GFPzeo-Vektor der Firma Invivogen (San Diego) verwendet. Die Expression der *shorthairpin*-RNA (shRNA) wird über den Promotor der humanen 7SK RNA-Polymerase III gesteuert. Zur Selektion in Bakterien und in Säugetierzellen wird ein GFP-Zeozin-Resistenzkassette exprimiert. Die *Knockdown*-Sequenzen wurden über die siRNA Wizard™ Software von Invivogen (San Diego) ermittelt. Als Matrize wurde die Sequenz der mRNA von murinem Tal1 verwendet. Nach dem *Oligo-Annealing* wurden die Sequenzen über die *BbsI*-Schnittstelle in den Vektor eingebracht. Bei der Generierung der Sequenzen wurde als *Loop* die Sequenz „TCAAGAG“ verwendet. Als Kontrolle diente eine gegen das β-Galaktosidase-Gen generierte shRNA-Sequenz.



**Abb.3.4: Vektorkarte von psiRNA-h7SK-GFPzeo**

Quelle: Invivogen (San Diego)

Der psiRNA-Vektor findet Anwendung in *Knockdown*-Experiment. Die Expression shRNA zur Regulation der Ziel-mRNA wird von einem RNA-Polymerase III-Promotor kontrolliert.

**Tabelle 3.8: Übersicht der verwendeten Oligos zur Klonierung in psiRNA-h7SK-GFPzeo**

shRNA		NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'
Tal1-A	fwd	ACCTC <u>GACAAGAACTAAGCAAGAAT</u> CAAGAGATTCTTGCTTAGTTTTCTTGTCTT
	rev	CAAAAAGACAAGAAGCTCAGCAAGAATCTCTTGAATTCTTGCTGAGCTTCTTGTCCG
Tal1-B	fwd	ACCTC <u>GGCCAAGTTACTCAATGACCAT</u> CAAGAGTGGTCATTGAGTAACTTGGCCTT
	rev	CAAAAAGGCCAAGTTACTCAATGACCACTCTTGA <u>TGGTCATTGAGTAACTTGGCCG</u>
Tal1-C	fwd	ACCTC <u>GCAGGTCAATGGACTTATGT</u> CAAGAGCATAAGTCCATTGACCTGCTT
	rev	CAAAAAGCAGGTCAATGGACTTATGCTCTTGACATAAGTCCATTGACCTGCG
Tal1-D	fwd	ACCTC <u>GCTTCTGTTCAAATACTTAT</u> CAAGAGTAAGTATTTGAACAGAAGCTT
	rev	CAAAAAGCTTCTGTTCAAATACTTACTCTTGATAAGTATTTGAACAGAAGCG
Kontrolle	fwd	ACCTC <u>GTGACCAGCGAATACCTGTT</u> CAAGAGAAACAAGAGGTATTCGCTGGTCACT
	rev	CAAAAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCTTGA <u>GAAACAAGAGGTATTCGCTGGTCAAG</u>

\* fwd = forward, rev = reverse

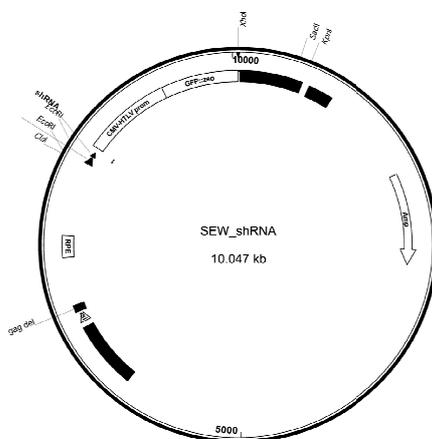
**Tabelle 3.9: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für psiRNA-h7SK-GFPzeo**

NAME		NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	TM [°C]	TM für Seq. [°C]
OL559	fwd	CGATAAGTAACTTGACCTAAGTG	57,1	53
OL408	rev	GCGTTACTATGGGAACATAC	55,3	53

\* fwd = forward, rev = reverse

### Lentivirale Vektoren – SEW und SIEW

Zur lentiviralen Transduktion von shRNA's in Primärzellen wurde der SEW-Vektor verwendet (Demaison C *et al.*, 2002). Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz für die Anzucht in Bakterien, aber der Vektor enthält keinen Selektionsmarker für Säugetierzellen. In den SEW-Vektor wurde aus dem psiRNA-7hSK-Vektor die Sequenz der shRNA inklusive Promotor und der GFP:Zeo-Kassette kloniert. Dazu wurde zunächst ein weiteres WPRE-Element (*Woodchuck Hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) über *XhoI* und *KpnI* eingefügt, da das ursprüngliche WPRE-Element bei der nachfolgenden Klonierungsstrategie verloren geht (Abb.3.5).

**Abb.3.5: SEW-Vektor zur Herstellung lentiviraler Partikel**Quelle: Demaison C *et al.*, 1998 modifiziert

Der SEW-Vektor wird zu lentiviralen Transduktion von primären Monozyten verwendet. Der Ursprungsvektor wurde so modifiziert, dass er neben der shRNA unter der Kontrolle des RNA-Polymerase III-Promotor ebenfalls einen GFP-Zeo-Kassette trägt, so dass eine Selektion mittels Antibiotika oder Durchflusszytometrie möglich ist.



### 3.1.3 Quantitative *Real Time* - PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse der mRNA-Expression wurde die RNA aus Zellen mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen (Hilden) isoliert. Das *Omniscript RT Kit* von Qiagen (Hilden) wurde verwendet, um cDNA mittels reverser Transkription aus RNA herzustellen. Als Primer für die Synthese der cDNA dienten *Hexanukleotid Random-Primer* von Carl-Roth (Karlsruhe). Die qRT-PCR-Analyse wurde im LightCycler480 System (Roche, Mannheim) durchgeführt. Für den PCR-Ansatz wurden 23  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{l}$  *forward-Primer* (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  *reverse-Primer* (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ) und 25  $\mu\text{l}$  *SYBR Green-Mix* der Firma Eurogentec (Köln) gemischt, und 48  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes mit 2  $\mu\text{l}$  cDNA versetzt. Zur Doppelbestimmung wurden zweimal 24  $\mu\text{l}$  des PCR-Ansatzes in eine 96well-RT-PCR-Platte pipettiert (Kisker Gbr #GK480K-BC, Steinfurt).

**Tabelle 3.14: qRT-PCR Programm zur Messung von cDNA**

PROGRAMMSCHRITT	TEMPERATUR [°C]	DAUER	
1. Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1x
2. Denaturierung	95	60 sec	} 50 Zyklen
3. Primer-Anlagerung/Messung	57	30 sec	
4. DNA-Synthese	72	30 sec	
5. Schmelzkurve	57-95	Messung alle 5°C	1x

Die Berechnung der mRNA-Expression erfolgte nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Livak KJ und Schmittgen TD, 2001). Zur Normalisierung wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bzw. des *TATA-binding-Proteins* (TBP) verwendet. Die mRNA-Expression der Kontrollzellen diente als Bezugspunkt und wurde auf 1 gesetzt. In Bezug dazu wurde die relative mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene berechnet.

Tabelle 3.15: Übersicht verwendeter Primer zur Messung von cDNA

mRNA	SPEZIES*		NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	TM [°C]
ATP6V0D2	m	fwd	AAGCCTTTGTTTGACGCTGT	55,3
		rev	GCCAGCACATTCATCTGTACC	59,8
CD11B	m	fwd	CAATAGCCAGCCTCAGTGC	58,8
		rev	GAGCCAGGGGAGAAGTG	60,5
CEBPβ	m	fwd	ACGACTTCCTCTCCGACCTC	61,4
		rev	GGCTCACGTAACCGTAGTCG	61,4
c-FMS	m	fwd	GAAACGCGACTTTCAAAAACA	54,0
		rev	GGCCGGATCTTTGACATACAA	57,9
c-Fos	m	fwd	GGGACAGCCTTTCCTACTACC	61,8
		rev	GATCTGCGCAAAGTCCTGT	57,3
c-Jun	m	fwd	CCAGAAGATGGTGTGGTGT	57,9
		rev	CTGACCCTCTCCCCTTGC	60,5
CICN7	m	fwd	TCCGACAGATGAACAACGTG	57,3
		rev	GGTGTGAGGAGGATCGACTT	59,4
CTSK	m	fwd	ACAGCAGGATGTGGGTGTTCA	59,8
		rev	GCCGAGAGATTCATCCACCT	59,8
DC-STAMP	m	fwd	TGTATCGGTCATCTCCTCCAT	60,3
		rev	GACTCCTTGGGTTCCCTTGCTT	59,8
GAPDH	m	fwd	TCCACTCATGGCAAATTC	53,2
		rev	TTTGATGTTAGTGGGGTCTCG	57,9
GAPDH	h	fwd	GAGTCAACGGATTTGGTCGTATT	58,9
		rev	GAATTTGCCATGGGTGGAAT	55,2
GPNMB	m	fwd	ACGGCAGGTGGAAGGACT	58,2
		rev	CGGTGAGTCACTGGTCAGG	61,0
MITF	m	fwd	CTAAGTGGTCTGCGGTGTCTC	61,8
		rev	GGTTTTCCAGGTGGGTCTG	58,8
MMP9	m	fwd	ACGACATAGACGGCATCCA	56,7
		rev	GCTGTGGTTCAGTTGTGGTG	59,4
NFATc1	m	fwd	TCCAAAGTCATTTTCGTGGA	53,2
		rev	CTTTGCTTCCATCTCCCAGA	57,3
NFATc2	m	fwd	GATCGTAGGCAACACCAAGG	59,4
		rev	CTTCAGGATGCCTGCACA	56,0
NfκB1	m	fwd	CAGGTCCACTGTCTGCCTCT	61,4
		rev	TGTCACTATCCCGGAGTTCA	57,3
NfκB2	m	fwd	TGGAACAGCCCAAACAGC	56,0
		rev	CACCTGGCAAACCTCCAT	56,0
OSCAR	m	fwd	TCTGCCCCCTATGTGCTATC	59,4
		rev	AGTCCAAGGAGCCAGAACC	58,8
PU.1	m	fwd	CAGATGAGGAGGAGGGTGAG	61,4
		rev	CCAGCAGGAAGTGGTACAGG	61,4
RANK	m	fwd	TGGGCTTCTTCTCAGATGTCTTT	58,9
		rev	TGCAGTTGGTCCAAGGTTTG	57,3
Tal1	m	fwd	GCTCGCTCACTAGGCAGT	61,0
		rev	CACCCGGTTGTTGTTGGT	56,0
Tal1	h	fwd	ACCACCAACAATCGAGTGAAG	57,9
		rev	GATCTCATTCTTGCTGAGCTT	55,9
TBP	m	fwd	GGCGGTTTGGCTAGGTTT	56,0
		rev	GGGTTATCTTCACACACCATGA	58,4
TRAF6	m	fwd	TTGCACATTCAGTGTITTTGG	54,0
		rev	TGCAAGTGTCGTGCCAAG	56,0
TRAP (Acp5)	m	fwd	GACAAGAGGTTCCAGGAGACC	61,8
		rev	GGGCTGGGGAAGTCCAG	60,5

\* m = murin, h = human; fwd = *forward*, rev = *reverse*

Für die Quantifizierung von Chromatin-Immunopräzipitations-DNA (ChIP) wurde 1 µl der DNA pro Doppelbestimmung verwendet. Es erfolgte eine quantitative PCR (qPCR) im LightCycler480 (Roche, Mannheim). Aus den gemessenen CT-Werten wurden die Prozent *Input*-Werte mit folgender Formel berechnet:  $100 \times 2^{(Ct_{100\% \text{ Input}} - Ct_{\text{ChIP-IP}})}$

**Tabelle 3.16: qPCR Programm zur Messung von ChIP-DNA**

PROGRAMMSCHRITT	TEMPERATUR [°C]	DAUER	
1. Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1x
2. Denaturierung	95	30 sec	} 50 Zyklen
3. Primer-Anlagerung	57	30 sec	
4. DNA-Synthese	72	30 sec	
5. Messung	78	1 sec	
6. Schmelzkurve	57-95	Messung alle 5°C	1x

**Tabelle 3.17: Übersicht verwendeter Primer zur Messung von ChIP-DNA**

PROMOTOR	SPEZIES*		NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	TM [°C]
RNAPol II	m	fwd	CCTCTCCAAATTGTTCTGGTCATG	61,0
		rev	CAGAGAGCCTGGGTTTTCTTTTATC	61,3
DC-STAMP	m	fwd	GAGCTATGGGCTCATCCAGAAATC	62,7
		rev	AACTGGAAAAAGGAGCCACAGGTT	61,0
DC-STAMP -855bp TSS	m	fwd	CTGACAAGCTTGCAAATGCATATG	59,3
		rev	AATGTCTCTAAGAAGGATGTTGCCT	59,7
DC-STAMP +289bp TSS	m	fwd	GGCCTCTCAAGCTCAGGGAAGACT	66,1
		rev	CGCTTTGCCTCAGTGAACCCTAC	64,2
CTSK	m	fwd	CAGAGGTGTGCCCATAGCCAG	63,7
		rev	ACTGTTTGCTATTAAGTCTTCTGGG	61,6
Acp5	m	fwd	GGAAAGATTGGGCGGCTTGTG	61,8
		rev	CTTTCCACACCCGGTTCCA	61,8

\* m = murin; fwd = *foward*; rev = *reverse*; TSS = *transcriptional start site*

### 3.1.4 Microarray-Analyse

Die Untersuchung des Expressionsprofils in primären Monozyten unter verschiedenen Fragestellungen wurde im Transkriptomanalyselabor, Göttingen durchgeführt. Zum einen wurde das Expressionsprofil von primären Zellen nach Knockdown von Tal1, zum anderen das microRNA-Profil in primären Zellen nach RANKL-Behandlung im Vergleich zu einer Kontrolle analysiert, dazu wurde eine Agilent-Maus-Array verwendet.

## 3.2 Zellkultur-Methoden

### 3.2.1 Zelllinien

Tabelle 3.18: Übersicht der verwendeten Zelllinien

ZELLINIE	ORGANISMUS	GEWEBE	MORPHOLOGIE	MEDIUM
RAW264.7	murin	Monozyten/Makrophagen-Zellen	adhärent	DMEM (Gibco, Darmstadt)
BMM	murin	primäre Monozyten-Zellen	adhärent	$\alpha$ MEM (Gibco, Darmstadt)
Hela	human	Gebärmutterhalszellen eines Adenokarzinom	adhärent	DMEM (Gibco, Darmstadt)
293T	human	embryonale Nierenzellen	adhärent	DMEM (Gibco, Darmstadt)
K562	human	myeloische Blutzellen eines CML-Patienten	Suspensionszellen	RPMI (Gibco, Darmstadt)
Jurkat	human	T-Lymphozyten eines T-Zell-Leukämie-Patienten	Suspensionszellen	RPMI (Gibco, Darmstadt)

### 3.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien (Tabelle 2.18) erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>. Das oben angegebene Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (PAA, Pasching), 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching), sowie 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching) supplementiert. Die Isolation und Kultivierung der BMM-Zellen aus BL/6-Mäusen ist in Abschnitt 2.2.5 erläutert.

### 3.2.3 Transfektion von Zellen

Das Einbringen von Plasmid DNA in 293T- und RAW264.7-Zellen erfolgte mittels Metafecten® bzw. Metafecten Pro® (Biontex, München) nach Angaben des Herstellers.

Für Interaktionsstudien mittels Immunopräzipitation wurden 293T-Zellen mit einer Zelldichte von  $3 \cdot 10^5$  Zellen/Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Zur Analyse der Tal1-PU.1-Interaktion wurden 1 µg Tal1-Flag und 1 µg PU.1-HA mit 2 µl Metafecten® transfiziert, die Tal1-MITF-Interaktion erfolgte nach Transfektion von 1 µg Tal1-Flag und 3 µg MITF-HA. Die Transfektionsansätze wurden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben.

Für Promotorstudien wurden RAW264.7-Zellen in 24-Well (80.000 Zellen pro Well) mit maximal 2 µg Plasmid-DNA und 6 µl MetafectenPro® transfiziert. Dabei setzte sich die Menge der Plasmid-DNA aus 250 ng DC-STAMP-Promotor- (wt bzw. mutiert), 250/500 ng Tal1-, 250/500 ng PU.1-, 250/500 ng MITF1-Plasmid-DNA zusammen. Dieser Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann auf zwei Wells verteilt und die Zellen 48 h im Brutschrank inkubiert.

### 3.2.4 Herstellung einer stabilen Zelllinien

Die RAW264.7-Zellen wurden mit pIRES2-EGFP-hTal1 oder mit verschiedenen psiRNA-h7SK-GFPzeo-shTal1-Konstrukten transfiziert. Für eine Selektion transfizierter Zellen wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt (250 µg/ml G418 für den pIRES2-EGFP-Vektor, 25 µg/ml Zeozin für den psiRNA-h7SK-GFPzeo-Vektor). Nach ca. zwei Wochen resultierte die Antibiotikaselektion in einer Anreicherung der Zellen, die das Plasmid stabil in ihr Genom integrierten. Zur weiteren Selektion von GFP-positiven Zellen wurde eine Durchflusszytometrie-Sortierung durchgeführt und die Zellen anschließend in Kultur genommen.

### 3.2.5 Isolation muriner Monozyten

Zur Isolierung von primären Monozyten wurden BL/6-Mäuse bzw. BL/6-Mäuse mit LacZ-*Knock-in* (Elefanty *et al.*, 1998) im Alter von 6-10 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. *Femur* bzw. *Tibia* des Hinterlaufs wurden semisteril entnommen, von Muskel und Gewebe befreit und in  $\alpha$ MEM (Gibco, Darmstadt) auf Eis gelagert. Unter der Sterilbank wurden die Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze und  $\alpha$ MEM heraus gespült. Durch kurze Sedimentation setzten sich Knochen- und Gewebereste ab, der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und die Zellen nach Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in  $\alpha$ MEM resuspendiert und mit 5 ng/ml M-CSF (R&D Systems, Wiesbaden) über Nacht bei 37°C im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Durch die geringe M-CSF-Konzentration setzten sich die Stromazellen an der Zellkulturschale ab. Am nächsten Tag wurde der Überstand geerntet und bei 1500 rpm, 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in  $\alpha$ MEM resuspendiert und mit 30 ng/ml M-CSF supplementiert. Nach 2-3 Tagen erfolgte ein Medium- und Zytokinwechsel, weitere 24 Stunden später stellen die adhärennten Zellen die Monozyten-Population (BMM, *bone marrow derived monocytes*) dar. Die Kultivierung bzw. Stammhaltung der BMM-Zellen ist nicht möglich, daher wurden die Zellen anschließend direkt in der für den jeweiligen Versuch verwendeten Zellzahl ausgesät.

Zum Ablösen der Zellen wurde Accutase<sup>TM</sup> von Invitrogen (A11105-01, Darmstadt) verwendet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und pro 10cm-Kulturschale 2 ml Accutase<sup>TM</sup> auf die Zellen pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 8 ml  $\alpha$ MEM abgelöst und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um das Accutase-haltige Medium zu entfernen.

Kultivierungsmedium:  $\alpha$ MEM (Gibco #32651-029; w/o Ribo,+ L-Glutamax, + Earle´s salt; Darmstadt)  
+ 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 30 ng/ml M-CSF

M-CSF: 10 µg/ml in PBS/0,1 % BSA (R&D Systems #216-MC, Wiesbaden)

### 3.2.6 Herstellung von lentiviralen Partikeln

Die genetische Manipulation primärer Monozyten erfolgte mittels lentiviraler Transduktion von *Knockdown*-Vektoren (SEW) bzw. Überexpressions-Vektoren (SIEW). Zur Herstellung von lentiviralen Partikel wurden 293T-Zellen (max. Passage #20) mit einer Zelldichte von  $3\text{-}4 \cdot 10^6$  Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. Dazu wurden 3,5 µg *Envelope*-Plasmid (pMDG2-VSV-G), 6,5 µg *Core-packaging*-Plasmid (pCMVdelta8\_91) und 10 µg SEW/SIEW mit 10 µl Metafectene® (Biontex, München) in 200 µl serumfreiem DMEM (Gibco, Darmstadt) gemischt, 20 min inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach vier Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Das Kulturmedium enthält die lentiviralen Partikel, wurde zwischen 24-96 Stunden gesammelt und konnte bei 4 °C gelagert werden.

### 3.2.7 Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel

Die Effizienz der lentiviralen Transduktion von primären Monozyten konnte gesteigert werden, wenn die Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation konzentriert wurden. Hierzu wurden die Virusüberstände bei 1500 rpm, 5 min zentrifugiert, um Zellreste zu pelletieren. Der Überstand wurde mit Hilfe eines 22 µm Filter steril filtriert und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt (BD #326823, Heidelberg). Die Überstände wurden mit Saccharose-Lösung unterschichtet. Rotoreinsatz, Röhrchen und Deckel wurden austariert und in die Ultrazentrifugation BD L8-60M mit Rotoreinsatz SW-Ti 32 (BD, Heidelberg) gestellt. Die Zentrifugation erfolgte bei 25000 rpm für 2 Stunden, 4 °C. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, Flüssigkeitstropfen am Röhrchenrand mit einem saugfähigen Tuch abgenommen. Die Viruspartikel wurden in sterilem PBS/0,1 % BSA resuspendiert und bei 4 °C gelagert oder sofort verwendet.

<u>Saccharose-Lösung:</u>	200 g D(+)-Saccharose in 1 L H <sub>2</sub> O, steril filtriert (Carl-Roth #9097, Karlsruhe)
<u>1x PBS:</u>	2 g KCl; 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 80 g NaCl; 14,35 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O in 1 L H <sub>2</sub> O
<u>PBS/0,1 % BSA:</u>	1 g BSA in 1 L PBS, steril filtriert (PAA, Pasching)

### 3.2.8 Bestimmung des lentiviralen Titers

Die Bestimmung des lentiviralen Titers bzw. der MOI (*multiplicity of infection*) wurde mit Hilfe von 293T-Zellen ermittelt. Dazu wurden  $1 \cdot 10^5$  293T-Zellen pro *Well* einer 24-*Well*-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde 1 Stunde vor Transduktion das Medium gegen DMEM-Medium mit 2x Protaminsulfat erneuert (Bsp.: 10ml Medium + 200 µl Protaminsulfat; 250 µl/*Well*). Die Verdünnungen der Viruspartikel wurden in einer 24-*Well*-Platte nach folgendem Schema hergestellt:

**Tabelle 3.19: Pipettierschema zur Verdünnung lentiviraler Partikel**

	1	2	3	4	5	6
A	1/2 250µl V 250µl M	1/20 50µl v 450µl M	1/200 50µl v 450µl M	1/5 100µl V 400µl M	1/50 50µl v 450µl M	
B	1/10 50µl V 450µl M	1/100 50µl v 450µl M	1/1000 50µl v 450µl M			

M = Medium, V = Virus, v = Virus-Verdünnung aus vorherigem Well

Von den Verdünnungen wurden 250 µl auf die Zellen pipettiert. Die Platte wurde bei 2000 rpm, 90 min und 37°C zentrifugiert, im Brutschrank kultiviert und 4 Stunden nach Virusaufnahme das Medium gewechselt. 3-4 Tage nach Transduktion wurde die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, mit Hilfe von 50 µl Trypsin/EDTA (Gibco, Heidelberg) abgelöst, in FACS<sup>TM</sup>-Röhrchen überführt und bei 1500 rpm, 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 250 µl Roti®-Histofix (Carl-Roth, Karlsruhe) resuspendiert und die GFP-Expression im FACScan<sup>TM</sup> (BD, Heidelberg) ermittelt. Die Berechnung des Virustiters erfolgte nach der Formel:

$$\text{Titer (TU/ml)} = \frac{\% \text{ GFP – positive Zellen} \cdot \text{ausgesäte Zellzahl} \cdot \text{Verdünnung}}{100}$$

1x PBS: 2 g KCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl; 14,35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O

Protaminsulfat: Stammlösung 4 mg/ml in H<sub>2</sub>O, steril filtriert (Sigma Aldrich #P4020, München)

### 3.2.9 Transduktion muriner Monozyten

Zur Transduktion muriner Monozyten wurden die isolierten Zellen mit einer Zelldichte von 5\*10<sup>4</sup> BMM-Zellen/Well in eine 24-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde 1 Stunde vor Transduktion das Medium gegen αMEM-Medium mit 2x Protaminsulfat erneuert (Bsp.: 10 ml Medium + 200 µl Protaminsulfat; 250 µl/Well). Anschließend wurden 250 µl des konzentrierten Virusüberstandes auf die Zellen pipettiert und die Platte bei 2000 rpm, 90 min und 37°C zentrifugiert. Nach 4 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen in αMEM mit 30 ng/ml M-CSF kultiviert. Zur Steigerung der Transduktionseffizienz wurde 48 Stunden nach der ersten Transduktion eine weitere Transduktion durchgeführt.

Protaminsulfat: Stammlösung 4 mg/ml in H<sub>2</sub>O, steril filtriert (Sigma Aldrich #P4020, München)

M-CSF: 10 µg/ml in PBS/0,1 % BSA (R&D Systems #216-MC, Wiesbaden)

### 3.2.10 Sortierung GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie-Sortierung

Zur Anreicherung GFP-positiver Zellen nach Transfektion oder Transduktion wurden die Zellen geerntet, bei 1500 rpm für 5 min pelletiert, das Zellpellet in 500 µl PBS/2 % BSA aufgenommen und mit Hilfe eines Röhrchens mit integriertem Zellsieb (BD #352235, Heidelberg) filtriert. Die Sortierung erfolgte am FACSAria™ (BD, Heidelberg) und wurde von Tefik Merovci durchgeführt (AG Dr. Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt).

Zur Isolierung von RNA wurden die Zellen 24h nach Transfektion sortiert. Die anhand des GFP-Signals sortierten Zellen wurden bei 1500 rpm, 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen ausgesät. Nach 24 h Kultivierung erfolgte die RNA-Isolierung. Das Sortieren transduzierter BMM-Zellen zur Analyse der Differenzierung in Osteoklasten erfolgte direkt in eine 96-Well-Platte.

1x PBS: 2 g KCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl; 14,35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O  
PBS/ 2 % FCS: 0,2 ml FCS (PAA, Pasching) in 10 ml PBS

### 3.2.11 Differenzierung von RAW264.7-Zellen und muriner Monozyten

RAW264.7-Zellen und primäre, murine Monozyten aus BL/6-Mäusen wurden verwendet, um die Differenzierung in Richtung Osteoklasten zu analysieren. Die RAW264.7-Zellen mussten dafür zunächst eine Woche in αMEM (Gibco, Darmstadt) kultiviert werden. Für die Differenzierung wurden RAW264.7 oder primären Monozyten mit einer Zellzahl von 1\*10<sup>4</sup> Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Transduzierte BMM-Zellen konnten aufgrund des GFP-Signals mit einer Zellzahl von 1\*10<sup>4</sup> BMM-Zellen/Well direkt in die 96-Well-Platte mittels FACSAria™ sortiert werden. Die Differenzierung in Richtung Osteoklasten wurde durch Kultivierung der Zellen in αMEM mit 30 ng/ml M-CSF und 20 ng/ml RANKL für BMM-Zellen oder 30 ng/ml RANKL für RAW264.7-Zellen erreicht.

Kultivierungsmedium: αMEM (Gibco #32651-029, Darmstadt) + 10 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin  
RANKL: 10 µg/ml in PBS/0,1 % BSA (R&D Systems #462-TEC, Wiesbaden)  
M-CSF: 10 µg/ml in PBS/0,1 % BSA (R&D Systems #216-MC, Wiesbaden)

### 3.2.12 Färbung der sauren Phosphatase

Die Differenzierung primärer Monozyten in Richtung von Osteoklasten ist verbunden mit der Expression einer Reihe von Osteoklasten spezifischer Proteine, wie zum Bsp. der sauren Phosphatase TRAP (*Tartrate resistant acid phosphatase*). Zum Nachweis der TRAP-Expression wurde das *Acid phosphatase Leucocyte Kit* (Sigma Aldrich #387A-1KT, München) verwendet. Reife Osteoklasten besitzen *in vitro* eine geringe Adhärenz und lösen

sich durch mechanischen Stress ab, daher musste jeder Pipettierschritt sehr vorsichtig durchgeführt werden.

Die Zellen wurden vorsichtig in PBS gewaschen und 10 min mit Hilfe von Roti®-Histofix (Carl-Roth, Karlsruhe) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit vorgewärmten H<sub>2</sub>O (ca. 37°C) wurden die Zellen zunächst darin belassen und ein Mix aus 5 µl *Fast Garnet GBC Base solution* und 5 µl Natrium-Nitrit aus dem Kit hergestellt. Dieser wurde 2 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach erfolgte die Zugabe von 0,9 ml vorgewärmten H<sub>2</sub>O, 10 µl Naphtol-AS-BI-Lösung, 40 µl Acetat-Lösung und 50 µl einer 1 M Tartrat-Lösung. Die 1 M Tartrat-Lösung wurde selbst hergestellt, da die Tartrate-Lösung aus dem Kit zu gering konzentriert ist. Die Färbelösung wurde auf die Zellen pipettiert und 5-30 min im Dunkeln, bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit H<sub>2</sub>O gewaschen und bis zur Analyse in PBS bei 4°C gelagert.

1x PBS: 2 g KCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl; 14,35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O

Tartratlösung: 28 g Kaliumnatriumtartrat (Applichem #A3873, Darmstadt) in 100 ml Natriumacetat 0,1 M; pH 5 lösen (event. Zugabe einiger Tropfen 10 M NaOH, anschließend pH 5 mit 6 N HCl einstellen)

### 3.3 Proteinbiochemische-Methoden

#### 3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen zunächst geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und nach Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min, 4°C wurde das Pelett in Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 30-60 min auf Eis erfolgte eine Sonifizierung im Biorupter® (Diagenode, Liège) für 3 min, Intensität *high*. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm, 30 min, 4°C konnte der Proteinüberstand direkt verwendet werden oder bei -80°C gelagert werden.

1x PBS: 2 g KCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl; 14,35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O

Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 % Triton-X-100; 50 mM NaCl

#### 3.3.2 Herstellung von Kernextrakten

Das Protokoll zur Herstellung von Kernextrakten wurde nach Schreiber *et al.*, 1989 modifiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Puffern. Die Zellen zur Isolierung der Kernfraktion wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Durch Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min, 4°C wurden die Zellen pelletiert und das Zellpelett in Puffer A resuspendiert, dabei wurden 4 Volumenteile an Puffer A in Bezug auf die Größe des

Zellpellets verwendet. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 20 % NP-40 (1:100 in Zellsuspension) und ein weiterer Inkubationsschritt für 5 min auf Eis. Die Zellsuspension wurde bei 13000 rpm, 5 min, 4°C zentrifugiert, im Pelett wurden somit die Zellkerne angereichert, der Überstand entsprach der Zytoplasmafraktion. Die Zellkernfraktion wurde in Puffer C resuspendiert, dabei wurde 1 Volumenanteil an Puffer C in Bezug auf die Größe des ursprünglichen Zellpellets verwendet, und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm, 30 min, 4°C wurde der Überstand direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

1x PBS: 2 g KCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl; 14,35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O

Puffer A: 10 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8; 0,1m M EGTA pH 8; 10 mM KCl

Puffer C: 20 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8; 1 mM EGTA pH 8; 0,4 M NaCl; 20 % Glycerin

20 % NP-40: 2 ml NP-40 in 10 ml H<sub>2</sub>O (Carl-Roth, Karlsruhe)

### 3.3.3 Antikörper

Tabelle 3.20: Übersicht verwendeter Primärantikörper

NAME	SPEZIES	VERWENDUNG*	BESCHREIBUNG	HERSTELLER
E47 (N-649)	Kaninchen	1:1000 für WB	polyklonaler Antikörper gegen Aminosäure 1-649 des humanen E47, (200 µg/ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-763)
Flag	Maus	1:1000 für WB	monoklonaler Antikörper gegen das FLAG-Peptid DYKDDDDK (4,6 µg/µl)	Sigma Aldrich, München (F3165)
HA-probe	Maus	1:1000 für WB	monoklonaler Antikörper gegen das HA-Peptid CYPYDVPDYASL (1 µg/µl)	Covance, München (MMS101P)
LaminB1	Kaninchen	1:1000 für WB	polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid der 400-500 AS des murinen LaminB1 (1 mg/ml)	Abcam, Cambridge (ab16048)
MITF (C-5)	Maus	1:100 für WB, 10 µg/IP	monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des humanen MITF (200 µg/ml)	NeoMarkers, Dreieich (MS-771-P0)
MITF (N-15)x	Ziege	10 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des humanen MITF (200 µg/0,1 ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-10999)
MITF (C5)	Maus	10 µg/IP	monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des humanen MITF (1 mg/ml)	Abcam, Cambridge (ab12039)
PU.1/Spi1 (T-21)	Kaninchen	1:200 für WB und IF, 5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des murinen PU.1 (200 µg/ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-352)
Tal1 (C-21)	Ziege	1:100 im WB	polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des humane Tal1 (200 µg/ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-12984)
Tal1	Kaninchen	1:100 für IF, 5 µg/IP	polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid um S122 des humanen Tal1 (0,25 mg/ml)	Abcam, Cambridge (ab75739)
α-Tubulin	Maus	1:2000 im WB	monoklonaler Antikörper gegen die Volllänge des α-Tubulin aus dem Huhn (1 mg/ml)	Abcam, Cambridge (ab7291)

\* WB = Western Blot, IP = Immunoprecipitation, IF = Immunfluoreszenz, AS = Aminosäure

**Tabelle 3.21: Übersicht verwendeter Sekundärantikörper**

NAME	SPEZIES	VERWENDUNG*	BESCHREIBUNG	HERSTELLER
anti- <i>goat</i> IgG - HRP	Esel	1:5000 im WB	Anti-Ziege IgG mit HRP gekoppelt (200 µg/0.5 ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2020)
anti- <i>mouse</i> IgG - HRP	Ziege	1:5000 im WB	Anti-Maus IgG mit HRP gekoppelt (200 µg/0.5 ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2005)
anti- <i>rabbit</i> IgG - HRP	Ziege	1:5000 im WB	Anti-Kaninchen IgG mit HRP gekoppelt (200 µg/0.5 ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2004)
anti- <i>rabbit</i> -FITC	Esel	1:200 in IF	Anti-Kaninchen mit FITC gekoppelt (200 µg/0,5 ml)	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2090)
anti- <i>mouse</i> IgG - IRDye® 800CW	Ziege	1:10000 im Odyssey-System	Anti-Maus IgG mit <i>InfraredDye</i> gekoppelt	Li-Cor, Bad Homburg (926-32210)
anti- <i>rabbit</i> IgG - IRDye® 800CW	Ziege	1:10000 im Odyssey-System	Anti-Kaninchen IgG mit <i>InfraredDye</i> gekoppelt	Li-Cor, Bad Homburg (926-32211)

\* HRP=*horseradish peroxidase*; FITC= Fluoresceinisothiocyanat; WB = Western Blot; IF = Immunfluoreszenz

**Tabelle 3.22: Übersicht verwendeter Immunglobuline**

NAME	SPEZIES	VERWENDUNG*	BESCHREIBUNG	HERSTELLER
IgG <i>goat</i>	Ziege	2-10 µg/IP	Ziege IgG als Kontrolle in IP	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2028)
IgG <i>mouse</i>	Maus	2-10 µg/IP	Maus IgG als Kontrolle in IP	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2025)
IgG <i>rabbit</i>	Kaninchen	2-10 µg/IP	Kaninchen IgG als Kontrolle in IP	Santa Cruz, Heidelberg (sc-2027)

\* IP = Immunopräzipitation

### 3.3.4 Immunoblot

Die Detektion von Proteinen mittels Immunoblot erfolgte nach Auftrennung in einem denaturierenden SDS-PAGE (*Sodium-dodecylsulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran (Carl-Roth, Karlsruhe). Die Blockierung der Membran erfolgte mit Magermilchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden in Magermilchlösung verdünnt (Tabelle 2.20 und 2.21) und eingesetzt. Für Gesamtzellextrakte wurde  $\alpha$ -Tubulin und für Kernextrakte LaminB1 als Ladekontrolle verwendet. Der quantitative Ausgleich der Ladekontrolle erfolgte mit Hilfe des Odyssey-Systems (Li-COR Biotechnologies, Bad Homburg). Dazu erfolgte die Blockierung der Membran in Odyssey-Puffer (Li-COR Biotechnologies, Bad Homburg) und die Antikörper wurden in Odyssey-Puffer/0,1 % Tween20 verdünnt und eingesetzt.

4x Protein-Ladepuffer: 500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; etwas Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer: 30 g Tris; 144 g Glycin, 10 g SDS in 1 L H<sub>2</sub>O

10x Transfer-Puffer: 30 g Tris; 144 g Glycin in 1 L H<sub>2</sub>O

1x Transfer-Puffer: 200 ml 10x Transfer-Puffer, 400 ml Methanol in 1 L H<sub>2</sub>O

Magermilchlösung: 5 % Magermilchpulver in PBS + 0,1 % Tween 20

Odyssey-Puffer: Odyssey-Stammlösung (Li-COR #927-40000, Bad Homburg) 1:2 in PBS

### 3.3.5 Immunfluoreszenz

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenz wurden Zellen auf runden Deckgläschen in einer 24-Well-Platte mit einer Zelldichte von 10000 Zellen pro Well ausgesät. Die Deckgläschen wurden vor der Aussaat zunächst in 10 % Essigsäure gewaschen, dann mit H<sub>2</sub>O gespült, mit 70 % Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank getrocknet.

Nach 24 Stunden konnten die Zellen zur Färbung verwendet werden. Zur Beurteilung von primären Osteoklasten wurden die Zellen bis zur vollständigen Differenzierung mit RANKL behandelt und anschließend gefärbt. Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und zur Fixierung auf den Deckgläschen 10 min mit Roti®-Histofix (Carl-Roth, Karlsruhe) behandelt. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte zur Permeabilisierung der Zellmembran eine fünfminütige Inkubation in PBS/0,1 % Triton-X-100, danach wurde zweimal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurden die Deckgläschen für eine Stunde in PBS/1 % BSA gelagert. Anschließend wurde der Primärantikörper in PBS/1 % BSA verdünnt (Tabelle 2.20) und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper, in PBS/1 % BSA verdünnt (Tabelle 2.21), zugegeben. Nach 3 Stunden Inkubation im Dunkeln wurden die Zellen zweimal 5 min mit PBS gewaschen, dann erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels DAPI (4',6-diamidino-2-Phenylindol; Sigma-Aldrich, München). Dazu wurde eine Gebrauchslösung von 1:5000 in PBS hergestellt, auf die Zellen pipettiert und 2 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden vorsichtig getrocknet, in Eindeckmedium *Pro Long® Gold antifade* (Invitrogen #P3630, Darmstadt) gelegt und im Dunkeln getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die mikroskopische Auswertung anhand des Fluoreszenzmikroskops Nikon TE300 und der Software *NISelement AR 2.30*.

1x PBS: 2 g KCl; 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 g NaCl; 14,35 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O

PBS/1 % BSA: 1 g BSA (PAA, Pasching) in 100 ml PBS

DAPI: 5 mg/ml in H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich, München)

### 3.3.6 Immunhistologie muriner Knochenschnitte

Die immunhistologische Untersuchung von murinen Knochenschnitten wurde von Dr. Jeske J. Smink (AG Dr. Achim Leutz, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) durchgeführt. Nach Entnahme der murinen Knochen wurden diese fixiert, zur Entkalkung drei Tage in 0,45 M EDTA/PBS gelagert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Entparaffinieren wurde zum Nachweis der Tal1-Expression der anti-Tal1 Antikörper C-21 (Santa Cruz sc-12984, Heidelberg) verwendet.

### 3.3.7 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation wurde zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen verwendet. Dazu wurden 293T-Zellen mit Expressionskonstrukten der potentiellen Interaktionspartner transfiziert (Abschnitt 2.2.3) und 48 Stunden nach Transfektion Gesamtzellextrakte hergestellt (Abschnitt 2.3.1). Zur Lyse wurden 200 µl Lysepuffer verwendet. Nach Abnahme einer *Input*-Kontrolle (5 % des Lysevolumens) erfolgte die Zugabe von 6 µl anti-Flag Agarose- *Beads* (Sigma Aldrich #A2220, München) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Proben zum Waschen bei 1500 rpm, 2 min, 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die pelletierten *Beads* wurden in 0,5 ml Lysepuffer aufgenommen und 10 min bei 4 °C auf einem Rotator gewaschen. Dieser Waschschrift wurde fünfmal wiederholt, danach wurden die *Beads* in 15 µl Proteinladepuffer aufgenommen. Nach Auftrennung der Proben im SDS-PAGE erfolgte die Beurteilung der Co-Immunopräzipitation mittels Western Blot (Abschnitt 2.3.4).

Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 % Triton-X-100; 50 mM NaCl

4x Protein-Ladepuffer: 500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; etwas Bromphenolblau

### 3.3.8 Endogene Immunopräzipitation

Zur Analyse endogener Interaktionen wurden zweimal  $3 \cdot 10^7$  RAW264.7-Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte (Abschnitt 2.3.1) hergestellt, dazu wurde das Zellpellet in 0,5 ml Lysepuffer aufgenommen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an die *Beads* wurden die Zellysate zunächst eine Stunde mit 10 µl Agarose-*Beads* (Cell Signaling Technology/NEB #9007S, Frankfurt) inkubiert (*Pre-Clearing*). Nach Zentrifugation bei 1500 rpm, 2 min, 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Abnahme einer *Input*-Kontrolle wurden für die Immunopräzipitation der spezifische Antikörper bzw. IgG als Kontrolle (Tabelle 2.20 bzw. 2.22) zugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 10 µl Agarose-*Beads* dazu pipettiert und 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Zum Waschen wurden die Proben bei 1500 rpm, 2 min, 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die pelletierten *Beads* wurden in 0,5 ml Lysepuffer aufgenommen und 10 min bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Dieser Waschschrift wurde fünfmal wiederholt, danach wurden die *Beads* in 15 µl Proteinladepuffer aufgenommen. Nach Auftrennung der Proben im SDS-PAGE erfolgte die Beurteilung der endogenen Interaktion mittels Western Blot (Abschnitt 2.3.4).

Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 % Triton-X-100; 50 mM NaCl

4x Protein-Ladepuffer: 500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; etwas Bromphenolblau

### 3.3.9 GST-Pulldown

Für einen GST-Pulldown wurde Tal1 als GST-Fusionsprotein in *E.coli* BL21-Bakterien exprimiert und nach Lyse mittels anti-GST Agarose-Beads (Sigma Aldrich #G4510, München) aufgereinigt. Dieser Versuch wurde von Olga Bölling (AG Dr. Jörn Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) durchgeführt und wird hier kurz beschrieben.

Der mögliche Interaktionspartner wurde mit Hilfe des *TNT Quick coupled transcription/translation system* (Promega #L4610, Madison) nach Angaben des Herstellers *in vitro* translatiert und mit <sup>35</sup>S-Methionin (Hartmann Diagnostics, Hannover) radioaktiv markiert. Für die Durchführung des GST-Pulldowns wurden gleiche Mengen des GST-Fusionsproteins, welches an anti-GST Agarose-Beads gebunden vorlag, mit dem radioaktiv markierten Interaktionspartner gemischt und anschließend mit Lyse-Puffer auf 300 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Inkubation unter ständiger Rotation für 3 Stunden bei 4 °C wurden die *Beads* dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen und in 15 µl Proteinladepuffer aufgenommen. Die Interaktion wurde nach SDS-PAGE mittels anschließender Autoradiographie analysiert. Dafür wurde das Gel vor der Exposition unter Vakuum bei 65 °C für ca. 2 Stunden getrocknet.

Lyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1 % Triton-X-100; 1 mM EDTA; 10 % Glycerin;  
1 mM DTT

4x Protein-Ladepuffer: 500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; etwas Bromphenolblau

### 3.3.10 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Zur Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion mittels Chromatin-Immunopräzipitation wurden  $1 \cdot 10^7$  RAW264.7-Zellen geerntet und in 10ml DMEM-Medium (Gibco, Heidelberg) resuspendiert. Das Protein-DNA-Crosslinking erfolgte durch Zugabe von 37 % Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 0,75 % für 15 min bei Raumtemperatur. Das Stoppen der Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin in einer Endkonzentration von 125 mM und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur erreicht. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1,2 ml FA-Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Chromatin durch Sonifikation im Biorupter (Diagenode, Liège) bis zu einer Fragmentgröße von 250-1000 bp sonifiziert und nachfolgend im Agarosegel überprüft. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm, 5 min, 4 °C pelletiert. Das im Überstand enthaltene Chromatin konnte anschließend direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

Für die Immunopräzipitation wurden 100-150 µl Chromatin-Lysat in 450 µl Ripa-Puffer aufgenommen und mit 6 µl magnetischen Protein G-Beads (New England Biolabs, Ipswich) und spezifischem Antikörper bzw. IgG als Kontrolle versetzt (Tabelle 2.20 und 2.22),

anschließend wurde bei 4°C und ständiger Rotation über Nacht inkubiert. Als *Input*-Kontrolle wurden 150 µl Chromatin-Lysat bei 4°C gelagert. Die magnetischen Protein G-*Beads* wurden vor der Verwendung mit 75 ng/µl DNA aus Lachssperma (Sigma Aldrich, München) für 30 min und mit Roti®-Block (Carl-Roth, Karlsruhe) für 45 min blockiert und anschließend dreimal mit RIPA/SDS-Puffer gewaschen.

Am nächsten Tag wurden die *Beads* dreimal mit Waschpuffer und einmal mit Final-Waschpuffer für je 10 min bei 4°C unter ständiger Rotation gewaschen. Die Reaktionsgefäße wurden in ein magnetisches *Rack* gestellt, so dass sich die *Beads* sammelten und der Überstand abgenommen werden konnte. Die Elution des Chromatins erfolgte durch Inkubation der *Beads* in 120 µl Elutionspuffer für 15 min bei 30°C. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In den weiteren Schritten musste eine *Input*-Probe mitgeführt werden. Zur Entfernung der RNA wurde 1 µl RNase 20 mg/ml (Invitrogen, Darmstadt) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde auf ein Gesamtvolumen von 400 µl mit Elutionspuffer aufgefüllt und 5 µl Proteinase K (Applichem, Darmstadt) zugegeben. Durch die anschließende Inkubation für 5 Stunden bei 65°C im Schüttelinkubator wurden die Proteine abgebaut und somit die Verknüpfung von Proteinen und Chromatin aufgehoben. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung über Nacht bei -20°C. Dazu wurden 2 Vol 100 % Ethanol und 10 µl Glykogen (Carl-Roth, Karlsruhe) zugegeben.

Am nächsten Tag wurde das präzipitierte Chromatin bei 15000rpm, 60 min, 4°C pelletiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend konnte die ChIP-DNA mittels (qRT-)PCR analysiert werden (Abschnitt 2.1.3).

<u>1x PBS:</u>	2 g KCl; 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 80 g NaCl; 14,35 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O in 1 L H <sub>2</sub> O
<u>FA-Lysepuffer:</u>	50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 % Triton-X-100, 1 % Natrium-Deoxycholat; 0,4 % SDS
<u>RIPA-Puffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8,0; 1 % NP-40; 0,5 % Natrium-Deoxycholat
<u>RIPA-Puffer:</u>	50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8,0; 1 % NP-40; 0,5 % Natrium-Deoxycholat; 0,1 % SDS
<u>Waschpuffer:</u>	0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8
<u>Final-Waschpuffer:</u>	0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8
<u>Elutionspuffer:</u>	1 % SDS; 100 mM NaHCO <sub>3</sub>
<u>Glycogen:</u>	5 mg/ml in H <sub>2</sub> O (Carl-Roth #HP51, Karlsruhe)
<u>SSD:</u>	1 µg/µl in H <sub>2</sub> O (Sigma Aldrich, München)

### 3.3.11 Chromatin-Immunopräzipitation mit geringer Zellzahl ( $\mu$ ChIP)

Zur Bestimmung der Protein-DNA-Interaktionen in primären Monozyten wurde die ChIP-Methode (Abschnitt 2.3.10) auf eine geringere Zellzahl angepasst. Die Zellen wurden geerntet und 500.000 Zellen in 500  $\mu$ l  $\alpha$ MEM-Medium (Gibco, Heidelberg) resuspendiert. Das *Crosslinking* der Proteine an die DNA, die Vorbereitung des Chromatins für die Immunopräzipitation und die Immunopräzipitation wurden, wie im ChIP-Protokoll unter 2.3.10 angegeben, durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die *Beads* einmal mit Ripa-Puffer, anschließend dreimal mit Waschpuffer und zweimal mit Final-Waschpuffer für je 5 min bei 4°C unter ständiger Rotation gewaschen. Das Konzentrieren der *Beads* erfolgte in einem magnetischen *Rack*. Die Elution des Chromatins wurde durch Inkubation der *Beads* in 120  $\mu$ l Elutionspuffer für 15 min bei 30°C, 1400 rpm erreicht. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf ein Gesamtvolumen von 400  $\mu$ l mit Elutionspuffer aufgefüllt. In den weiteren Schritten wurde eine *Input*-Probe mitgeführt werden. Das weitere Vorgehen entspricht dem ChIP-Protokoll (Abschnitt 2.3.10).

### 3.3.12 ChIP-ReChIP (sequentieller ChIP)

Zur sequentiellen Analyse der Protein-Protein-Interaktion auf Chromatinfragmenten wurde die ChIP-ReChIP-Methode verwendet. Die Zellernte von  $1 \cdot 10^7$  RAW264.7-Zellen, das *Crosslinking* und die Fragmentierung der DNA erfolgten nach dem ChIP-Protokoll (Abschnitt 2.3.10). Für die 1. Immunopräzipitation wurden 150  $\mu$ l Lysat in 600  $\mu$ l Ripa-Puffer aufgenommen und mit dem 1. spezifischen Antikörper (Tabelle 2.20) bzw. IgG als Kontrolle (Tabelle 2.22) und magnetischen *Beads* versetzt, dann über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die *Beads* dreimal mit Waschpuffer und einmal mit Final-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mittels 30 minütiger Inkubation in 50  $\mu$ l DTT 10 mM unter ständigem, kräftigen vortexen. Der Überstand wurde 1:10 in FA-Lysepuffer verdünnt und für die 2. Immunopräzipitation der 2. spezifische Antikörper bzw. IgG als Kontrolle (Tabelle 2.20 und 2.22) und magnetische *Beads* zugegeben, dann über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. In den weiteren Schritten musste eine *Input*-Probe mitgeführt werden. Das weitere Vorgehen entspricht dem ChIP-Protokoll (Abschnitt 2.3.10).

### 3.3.13 Promotorstudien

Zur Analyse der Promotoraktivität wurden 48 Stunden nach Transfektion die Lysate hergestellt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend in 90 µl Luciferase-Lysepuffer lysiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 10 µl des Lysats in eine 96-Well-Platte pipettiert. Im Luminometer (Microumat LB96P, Berthold Technologies, Bad Wildbad) wurde das emittierte Licht, welches bei der durch die Luciferase katalysierten Oxidation des Luciferins freigesetzt wurde, bei 562 nm gemessen. Zusätzlich wurde ein Basalwert für den Luciferase-Lyse-Puffer ermittelt.

Luciferase-Lyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,4; 1 % Triton X-100; 50 mM NaCl

Luciferase-Puffer: 21,625 mM Glycylglycin; 1 mM ATP (Carl-Roth #CN22.1, Karlsruhe); 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,075 mM Luciferin (Carl-Roth #CN24.3, Karlsruhe)

Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein β-Galaktosidase-Vektor co-transfiziert. Zur Messung der β-Galaktosidaseaktivität wurden 10 µl des Zelllysats in eine 96-Well-Platte vorgelegt und 100 µl der β-Galaktosidase-Lösung dazugegeben.

Die Gelbfärbung, welche aus der Hydrolyse des *o*-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und *ortho*-Nitrophenol (gelb) resultierte und durch die β-Galaktosidase katalysiert wird, wurde gemessen. Die Messung erfolgte mit dem SPECTRAmax™ 340 (Molecular Devices, Sunnyvale) mit dem Programm *SPF SoftMaxPro* bei einer Wellenlänge von 420 nm.

β-Galaktosidase-Lösung: 11,1 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM β-Mercaptoethanol; 3,25 mM ONPG; 74,4 mM Natrium-Phosphat pH 7,5

Na-Phosphat-Lösung (0,1 M): 82 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O; 18 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O

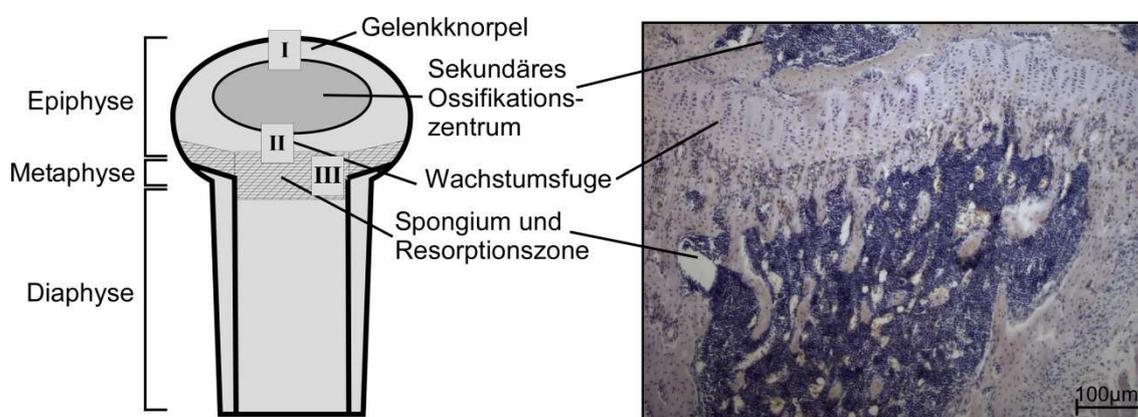
ONPG: 13,28 mM in 0,1 M Natrium-Phosphat-Lösung

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Monozyten und reife Osteoklasten exprimieren Tal1

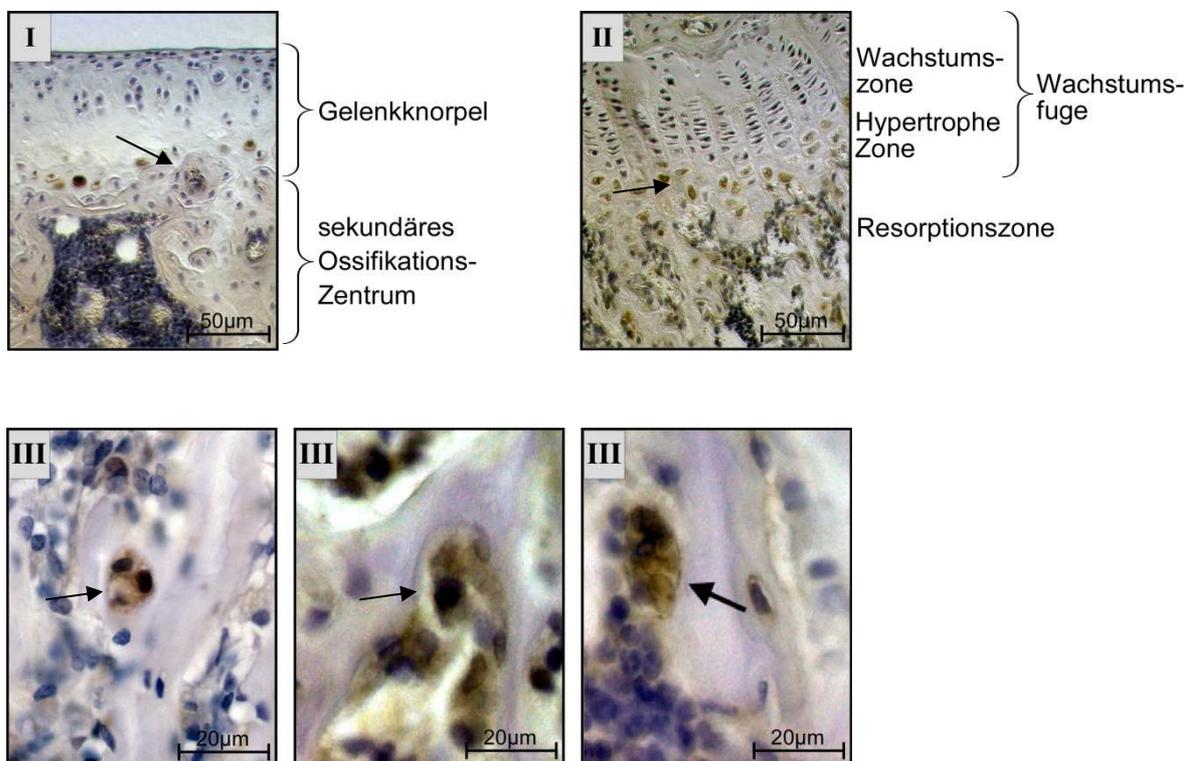
#### 4.1.1 Tal1-Expression in Knochenschnitten

Die Expression von Tal1 konnte bisher in einigen Zellen der embryonalen und adulten Hämatopoese gezeigt werden, vor allem in erythroiden Zellen, Megakaryozyten, Mastzellen und Monozyten (Green AR *et al.*, 1991; Green AR *et al.*, 1992; Elefanty AG *et al.*, 1998; Hall MA *et al.*, 2003; Dey S *et al.*, 2010). Zur Untersuchung der Tal1-Expression in Osteoklasten bzw. im Knochengewebe wurden Gewebeschnitte der Oberschenkel von Wildtyp-Mäusen hergestellt. Nach Entkalkung, Einbettung in Paraffin und nach Herstellung von Gewebeschnitten erfolgte eine immunhistologische Färbung mit einem Tal1-Antikörper. Die Analyse der Tal1-Expression in den histologischen Schnitten erfolgte durch Dr. Jeske J. Smink (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin). In Abbildung 4.1 ist der schematische Aufbau eines Röhrenknochens und als Übersicht ein immunhistologisch-gefärbter Knochen einer Maus dargestellt, die römischen Ziffern kennzeichnen die untersuchten Bereiche.



**Abb.4.1: Schematische und histologische Darstellung eines Röhrenknochens.** Der Knochen wird in Epiphyse und Diaphyse unterteilt, wobei der Übergangsbereich als Metaphyse bezeichnet wird. Der Gelenkknorpel wird von Chondrozyten gebildet. In der Wachstumsfuge kommt es zum Längenwachstum des Knochens. In der Resorptionszone finden der Abbau der Chondrozyten und der Aufbau von Knochengewebe statt. Die römischen Ziffern kennzeichnen die Bereiche, die in Bezug auf die Tal1-Expression im Knochen untersucht wurden. Dieser Versuch wurde von Dr. J.J. Smink durchgeführt (AG Dr. A. Leutz, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin).

Die Tal1-Expression konnte in Chondrozyten des Gelenkknorpels (Abb.4.2 I) und der Wachstumsfuge (Abb.4.2 II) nachgewiesen werden. Außerdem exprimieren reife, multinukleäre Osteoklasten der Resorptionszone Tal1 (Abb.4.2 III). Diese befinden sich an der Oberfläche des Knochengewebes.



**Abb.4.2: Immunhistologischer Nachweis von Tal1 in Osteoklasten.** Die Knochen von BL/6-Mäusen wurden entnommen, fixiert und entkalkt. Nach immunhistologischer Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen Tal1 erfolgte die Auswertung der verschiedenen Bereiche des Knochens. Die römischen Zahlen bezeichnen die verschiedenen Zonen, in denen die Tal1-Expression nachgewiesen wurde (Pfeile). Anhand der immunhistologischen Untersuchung der Knochen konnte die Tal1-Expression in Chondrozyten des Gelenkknorpels (I) und in der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge (II) gezeigt werden. Außerdem wird Tal1 in reifen Osteoklasten exprimiert (III). Dieser Versuch wurde von Dr. J.J. Smink durchgeführt (AG Dr. A. Leutz, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin).

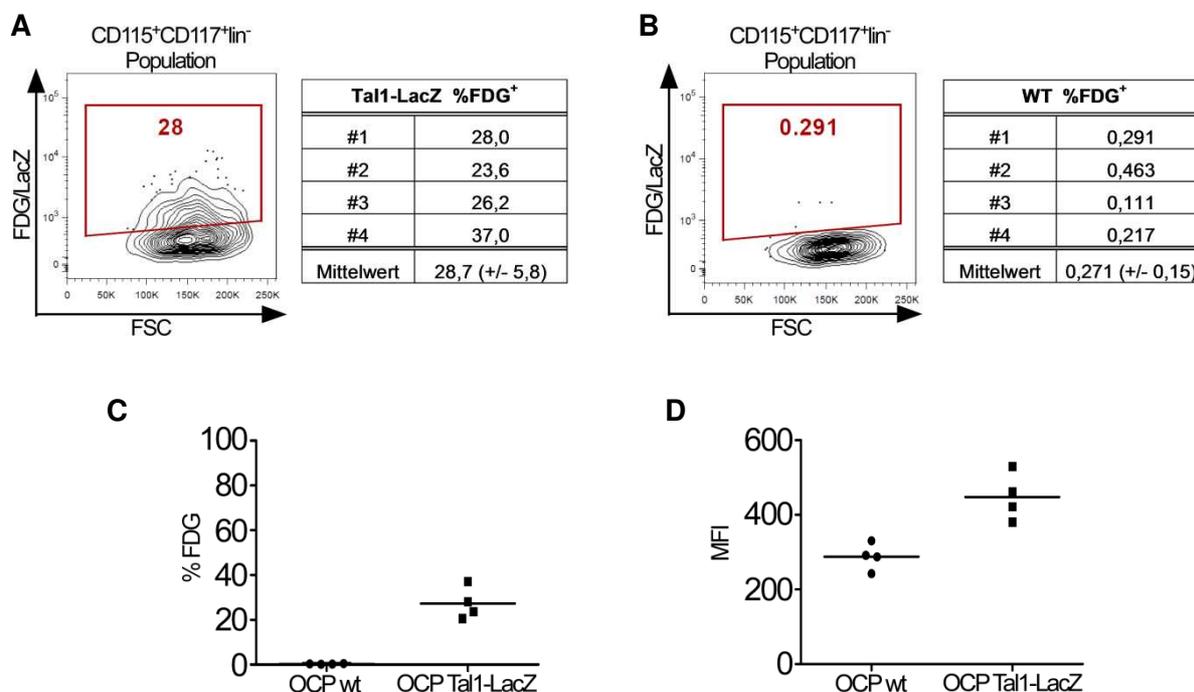
#### 4.1.2 Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimieren *Tal1*

Zur Analyse der *Tal1*-Expression in einem *in vivo*-Zusammenhang wurde ein Mausmodell verwendet, das mit Hilfe einer *LacZ-Knock-in*-Strategie die Expression von *LacZ* ( $\beta$ -Galaktosidase) unter *Tal1*-regulatorische Elemente stellt. Durch das Einbringen des *LacZ*-Gens in den *Tal1*-Locus wird die Expression von *Tal1* gestört (Elefanty AG *et al.*, 1998). Diese Mäuse zeigen die gleichen Eigenschaften wie *Tal1*-defiziente Mäuse. Homozygote Tiere sterben in E9.5 (Shivdasani RA *et al.*, 1995), heterozygote Tiere mit einem *Tal1-LacZ*-Allel besitzen einen normalen Phänotyp und die Expression von *LacZ* kann in der fötalen Leber, Zellen der Hämatopoese und im Gehirn nachgewiesen werden. Also in Geweben, die bereits in der Literatur in Zusammenhang mit der Expression von *Tal1* beschrieben wurden (Green AR *et al.*, 1992, Kallianpur AR *et al.*, 1994).

Die Analyse der *Tal1-LacZ*-Mäuse erfolgte durch Dr. Joachim R. Göthert (Universität Duisburg-Essen). Dazu wurde das Knochenmark der Mäuse entnommen, mit Hilfe von Antikörpern gefärbt und eine Durchflusszytometrie-Analyse durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen anhand des Propidiumiodid-Signals (PI) sortiert, um zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können. Durch die Auftrennung der Lebendzell-Population in Größe (FCS, *forward scatter*) und Granularität (SSC, *sideward scatter*) wurden Zellaggregate ausgeschlossen. Diese Population wurden anschließend in eine c-Kit- und lin-Zellpopulation (*lineage*) sortiert. Die CD117<sup>+</sup>-Population (auch c-Kit oder SCFR, *mast/stem cell growth factor receptor*) wurde dann anhand des Oberflächenmarkers CD115 (auch *Csfr1*, *colony stimulating factor 1 receptor*) und des Oberflächenmarkers Mac1 (*macrophage 1 antigen*, auch CD11B) für die Makrophagen/Monozyten-Population sortiert. Die CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-Population konnte anschließend mit Hilfe von FDG-Färbung (Fluorescein-di- $\beta$ -D-galactopyranosid) als Nachweis für die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase analysiert werden.

Die Untersuchung der *Tal1-LacZ*-Mäuse anhand der oben genannten Durchflusszytometrie-Parameter zeigte, dass die CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-Population der *Tal1-LacZ*-Mäuse eine Expression von *LacZ* aufweist (Abb.4.3A). Als Kontrolle wurden die Knochenmarkzellen von Wildtyp-Mäusen anhand der gleichen Durchflusszytometrie-Parameter untersucht. Die Analyse der Wildtyp-Mäuse zeigte keine FDG-Färbung in der CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-Population in der Durchflusszytometrie (Abb.4.3B). Insgesamt wurde je Versuchsgruppe das Knochenmark von vier Mäusen analysiert (gesamte Daten siehe Anhang 7.2). Die statistischen Berechnungen weisen eine statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,002 auf. Die *Tal1-LacZ*-Mäuse zeigten in der Osteoklasten-Vorläuferpopulation im Mittel eine

LacZ-Expression von 27,3 %. In Wildtyp-Mäuse wurde LacZ im Mittel zu 0,271 % in der CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-Population exprimiert. Zur Verdeutlichung wurde die FDG/LacZ-Expression (Abb.4.3C) und die MFI (*mean fluorescence intensity*) der Wildtyp- und *Tal1-LacZ*-Mäuse in einem Diagramm dargestellt (Abb.4.3D).

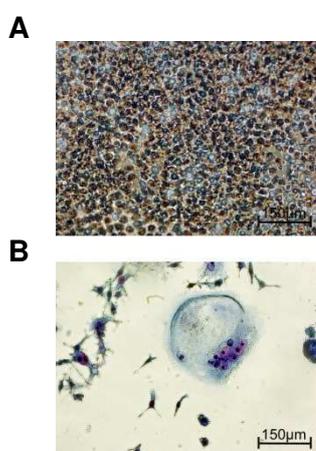


**Abb.4.3: Durchflusszytometrie-Analyse der LacZ-Expression in *Tal1-LacZ*-Mäusen.** Das Knochenmark der *Tal1-LacZ*-Mäuse wurde entnommen und mit Antikörpern zur Durchflusszytometrie-Analyse inkubiert. Zunächst erfolgte eine Auftrennung in lebende und tote Zellen mit Hilfe von Propidiumiodid (PI). Diese Zellen wurden dann anhand der Oberflächenmarker CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup> in die Osteoklasten-Vorläuferpopulation sortiert und die Expression von LacZ mit Hilfe der FDG-Färbung analysiert. **(A)** Die *Tal1-LacZ*-Mäuse exprimieren in den Osteoklasten-Vorläuferzellen LacZ. **(B)** Die Wildtyp-Mäuse weisen in den Osteoklasten-Vorläuferzellen keine Expression von LacZ auf. **(C)** Darstellung der FDG-Färbung in der Osteoklasten-Vorläuferpopulation (OCP). Die Osteoklasten-Vorläuferzellen der *Tal1-LacZ*-Mäuse weisen FDG-Färbung in dieser Population auf, im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen. **(D)** Auch die Darstellung der MFI (*mean fluorescence intensity*) verdeutlicht die LacZ-Expression in den Osteoklasten-Vorläuferzellen der *Tal1-LacZ*-Mäuse. Dieser Versuch wurde von Dr. J.R. Göthert durchgeführt (Universität Duisburg-Essen).

Die Expression von LacZ in der CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-Population der *Tal1-LacZ*-Mäuse zeigt, dass die regulatorischen Elemente des *Tal1*-Promotors in der Population der Osteoklasten-Vorläuferzellen aktiv sind.

### 4.1.3 RAW264.7-Zellen als Modell für Osteoklastogenese exprimieren *Tal1*

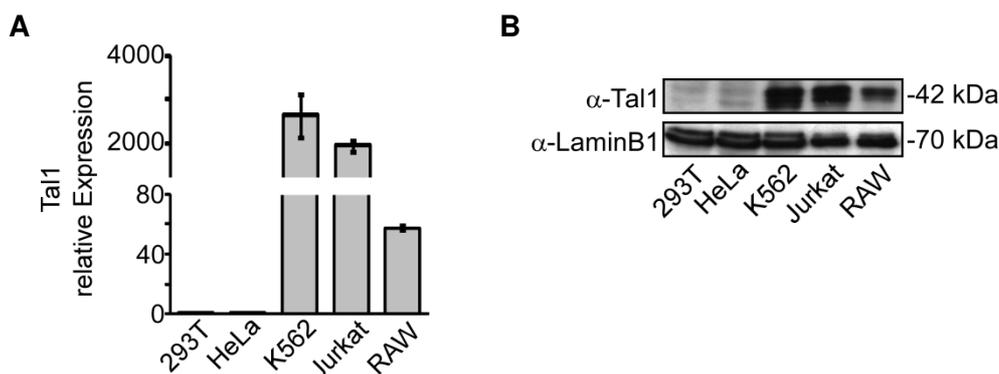
Die *Tal1*-Expression wurde bisher in *in vivo*-Modellen mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie-Analyse eines Maus-Modells gezeigt. Im nächsten Schritt wurde die *Tal1*-Expression *in vitro* in einer etablierten Zellkultur analysiert. Dazu wurde die Zelllinie RAW264.7 verwendet, eine murine Monozyten/Makrophagen-Leukämiezelllinie, die aus einem Tumor generiert wurde, der durch Infektion mit dem murinen Abelson-Virus entstanden war (Raschke WC *et al.*, 1978). Die RAW264.7-Zellen sind in der Lage *in vitro* in Richtung Osteoklasten zu differenzieren, wenn sie mit dem Zytokin RANKL (*receptor activator of  $Nf\kappa B$  ligand*) behandelt werden (Abb.4.4).



**Abb.4.4: Darstellung der RAW264.7-Zellkultur.** (A) Die RAW264.7-Zellen sind eine etablierte, adhärenente Monozyten/Makrophagen-Leukämiezelllinie. Die Zellen wurden mit Giemsa gefärbt. (B) Nach Inkubation der RAW264.7-Zellen mit dem Zytokin RANKL fusionieren die einzelnen Zellen zu reifen, multinukleären Osteoklasten. Die Zellen wurden mit Giemsa gefärbt.

Der Nachweis der *Tal1*-Expression wurde auf mRNA- und Proteinebene erbracht. Als Negativkontrollen wurden 293T- und HeLa-Zellen verwendet (Zur Hausen H, 1967; Scherer WF *et al.*, 1953). Als Positivkontrollen dienten K562-Zellen, eine Erythroleukämiezelllinie, und Jurkat-Zellen, eine T-Zell-Leukämiezelllinie. Beide Zelllinien wurden aus Patientenzellen generiert, die aufgrund einer verstärkten *Tal1*-Expression Leukämien entwickelten (Koeffler HP und Golde DW, 1980; Weiss A und Stobo JD, 1984).

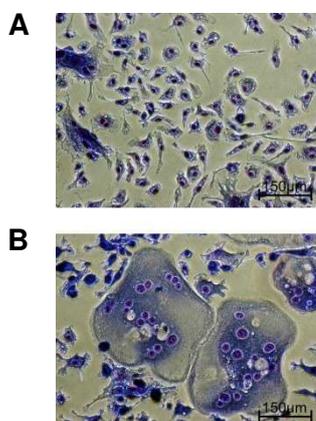
In der qRT-PCR zeigte sich, dass in RAW264.7-Zellen *Tal1*-kodierende mRNA vorliegt. Die Expression der mRNA in 293T-, HeLa-, K562- und Jurkat-Zellen wurden aufgrund des humanen Ursprungs der Zellen mit einem spezifischen Primer für humanes *Tal1* gemessen. Die mRNA-Expression in RAW264.7-Zellen wurden mit einem spezifischen Primer für murines *Tal1* gemessen, da die Zelllinie aus der Maus etabliert wurde. Als Bezugspunkt für die Auswertung wurde der *Tal1*-mRNA-Gehalt in 293T-Zellen auf 1 gesetzt (Abb.4.5A). Die *Tal1*-Expression in RAW264.7-Zellen bestätigte sich ebenfalls auf Proteinebene im Western Blot, da bei etwa 42 kDa eine Bande für *Tal1* zu erkennen war (Abb.4.5B), d.h. die mRNA-Expression von *Tal1* korreliert mit der *Tal1*-Proteinexpression in RAW264.7-Zellen.



**Abb.4.5: Nachweis von Tal1 in RAW264.7-Zellen.** (A) Genexpressionsanalyse der *Tal1*-mRNA mittels qRT-PCR in RNA/cDNA aus 293T-, HeLa-, K562-, Jurkat- und RAW264.7-Zellen. Die mRNA-Expression in 293T-Zellen wurde als Bezugspunkt gewählt und auf 1 gesetzt. In RAW264.7-Zellen konnte die mRNA für *Tal1* nachgewiesen werden. (B) Western Blot-Analyse mit Hilfe eines Tal1-Antikörpers der Kernextrakte von 293T-, HeLa-, K562-, Jurkat- und RAW264.7-Zellen. In RAW264.7-Zellen zeigte sich die Expression des Tal1-Proteins bei etwa 42 kDa.

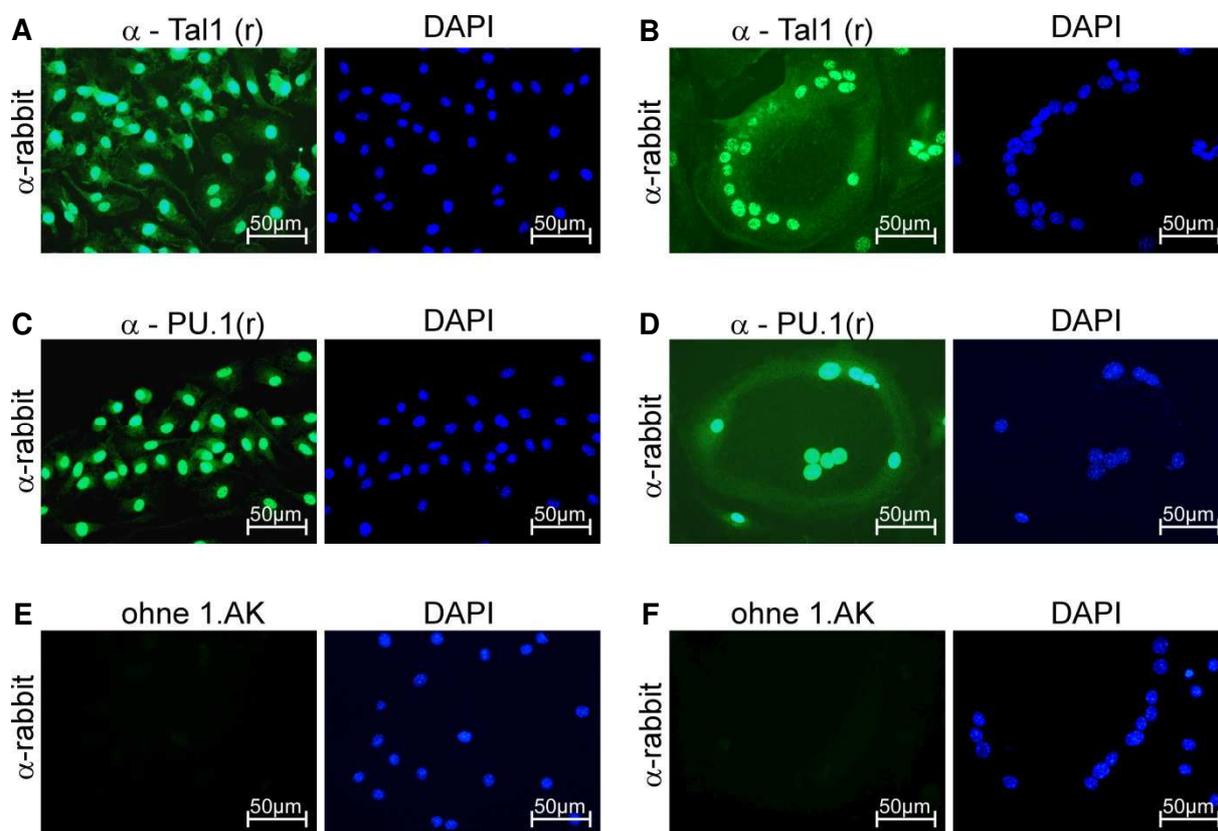
#### 4.1.4 Primäre Monozyten als Modell für Osteoklastogenese exprimieren *Tal1*

Als Zellmodell für die Analyse der Tal1-Expression bzw. für weitere Experimente zur Untersuchung des Einflusses von Tal1 auf die Osteoklastendifferenzierung und auf die Osteoklasten-spezifische Genexpression wurde eine primäre Zellkultur aus Monozyten etabliert. Dazu wurde das Knochenmark von BL/6-Mäusen isoliert und mit M-CSF inkubiert, so dass eine Anreicherung der Monozyten des Knochenmarks erfolgte. Die Isolierung der BMM-Zellen aus murinem Knochenmark erfolgte nach einem etablierten Protokoll (Takahashi N *et al.*, 1988). Die BMM-Zellen (*bone marrow derived monocytes*) sind in der Lage sich *in vitro* in Richtung Osteoklasten zu differenzieren, wenn sie mit dem Zytokin RANKL (*receptor activator of  $Nf\kappa B$  ligand*) behandelt werden (Suda T *et al.*, 1999).



**Abb.4.6: Darstellung der BMM-Zellkultur.** (A) Die BMM-Zellen wurden aus dem Knochenmark von 6-10 Wochen alten BL/6-Mäusen unter Inkubation mit M-CSF generiert. Sie besitzen eine adhärenente Zellmorphologie. Die Zellen wurden mit Giemsa gefärbt. (B) Nach Inkubation der BMM-Zellen mit dem Zytokin RANKL fusionieren die einzelnen Zellen zu reifen, multinukleären Osteoklasten. Die Zellen wurden mit Giemsa gefärbt.

Die BMM-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von Tal1 untersucht. Dazu wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit M-CSF zur Kultivierung der Monozyten-Zellen bzw. mit M-CSF/RANKL zur Generierung reifer Osteoklasten inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Färbung der undifferenzierten BMM-Zellen. Nach sechs Tagen Kultivierung waren die BMM-Zellen nahezu vollständig in Osteoklasten differenziert und wurden für die Immunfluoreszenz verwendet. In Abb.4.7 ist die Immunfluoreszenz-Färbung von Tal1 der BMM-Zellen dargestellt. Tal1 wird in den BMM-Zellen im Kern exprimiert (Abb.4.7A), auch die reifen, multinukleären Osteoklasten exprimieren Tal1 in den Kernen (Abb.4.7B). Die DNA wurden mit Hilfe von DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) angefärbt.



**Abb.4.7: Immunfluoreszenz-Analyse in Monozyten und reifen Osteoklasten.** Nach Isolierung der BMM-Zellen aus dem Knochenmark von BL/6-Mäusen wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät und nach 24 h bzw. nach Differenzierung in Osteoklasten eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Der Nachweis erfolgte anhand eines FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörpers. Die DNA wurden mittels DAPI angefärbt. **(A)** BMM-Zellen exprimieren Tal1 in den Zellkernen. **(B)** In Osteoklasten differenzierte BMM-Zellen weisen ebenfalls eine Tal1-Expression in den Zellkernen auf. **(C)** BMM-Zellen exprimieren PU.1 in den Zellkernen. **(D)** In Osteoklasten differenzierte BMM-Zellen weisen ebenfalls eine PU.1-Expression in den Zellkernen auf. **(E)** BMM-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und nach 24 h nur mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Der Antikörper weist keine unspezifische Bindung auf. **(F)** Die reifen Osteoklasten wurden ebenfalls nur mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, auch hier ist keine unspezifische Bindung zu erkennen.

Die Entstehung der Monozyten/Makrophagen-Zellen während der Hämatopoese aus hämatopoetischen Stammzellen ist in frühen Differenzierungsschritten unter anderem vom Transkriptionsfaktor PU.1 abhängig (Tondravi MM *et al.*, 1997). Daher wurden die BMM-Zellen und die reifen Osteoklasten ebenfalls auf die Expression von PU.1 mittels Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigte sich, dass die primären Monozyten PU.1 exprimieren und dass PU.1 im Kern lokalisiert ist (Abb.4.7C). Nach RANKL-Behandlung und Differenzierung in Richtung Osteoklasten war die PU.1-Färbung ebenfalls in den Kernen der multinukleären Zellen zu beobachten (Abb.4.7D).

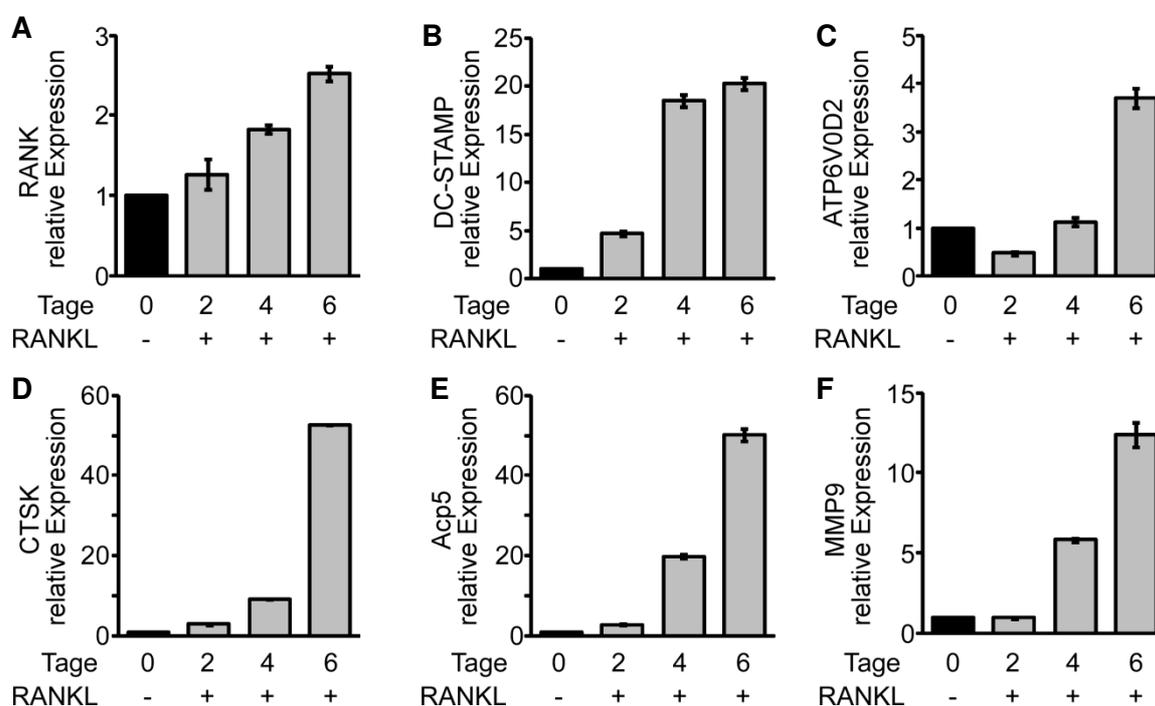
Als Kontrolle der Immunfluoreszenz und als Nachweis, dass das Fluoreszenzsignal spezifisch vom Primärantikörper stammt, wurden BMM-Zellen und reife Osteoklasten nur mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und bewertet. In Abb.4.7 E und F ist zu erkennen, dass der Sekundärantikörper keine unspezifische Bindung in den Zellen aufweist.

Bisher konnte nachgewiesen werden, dass Tal1 in Osteoklasten-Vorläuferzellen und in reifen Osteoklasten exprimiert wird. Die Analyse erfolgte *in vivo* mittels Immunhistologie von murinen Knochenschnitten und anhand des Maus-Modells, in dem das *LacZ*-Gen unter *Tal1*-regulatorischen Elementen exprimiert wird. Außerdem konnte Tal *in vitro* in der etablierten Monozyten/Makrophagen-Zelllinien RAW264.7 und in der Primärzellkultur aus BMM-Zellen von murinem Knochenmark gezeigt werden. Als nächstes wurde die Tal1-Expression während der Osteoklasten-Differenzierung untersucht.

## 4.2 RANKL induziert die Expression von Tal1 in Osteoklasten

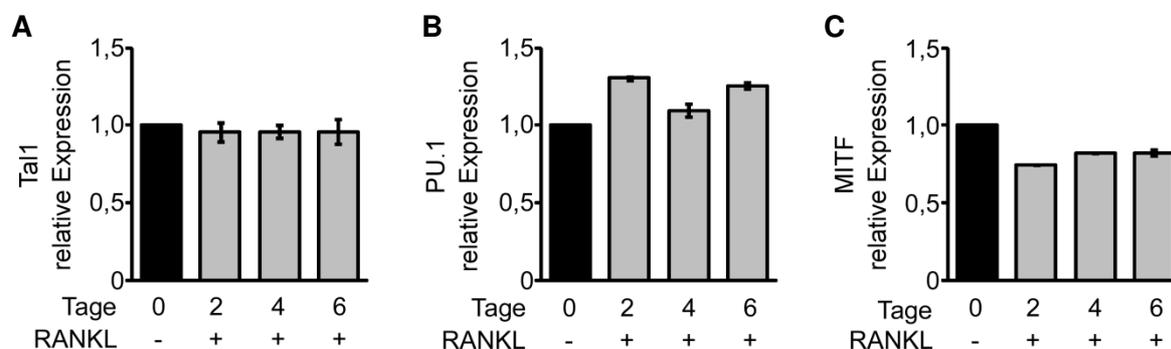
Tal1 wird in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten exprimiert. Zur Analyse der Tal1-Expression mittels qRT-PCR und Western Blot während der Osteoklasten-Differenzierung wurden BMM-Zellen mit rekombinantem M-CSF/RANKL inkubiert und an Tag 0, 2, 4 und 6 geerntet. Zur Überprüfung, dass die BMM-Zellen durch Inkubation mit dem rekombinanten Zytokin RANKL in Richtung Osteoklasten differenzieren, wurden die verschiedenen Zeitpunkte zunächst auf die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene überprüft, die in der Literatur beschrieben wurden. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qRT-PCR. Abb.4.8 verdeutlicht, dass die untersuchten Osteoklasten-spezifischen Gene während der Inkubation mit RANKL induziert werden. Die RANKL-Induktion erfolgt über dessen Rezeptor RANK (*receptor activator of NfκB*), der an Tag 6 etwa 3-fach induziert wurde (Abb.4.8A).

Die für die Zellfusion entscheidenden Rezeptoren *DC-STAMP* (*dendritic cell specific transmembrane protein*) und *ATP6V0D2* (*d2 isoform of vascular ATPase V0 domain*) wurden an Tag 6 etwa 20-fach (Abb.4.8B) bzw. 4-fach (Abb.4.8C) verstärkt exprimiert, wobei die Expression von *DC-STAMP* schon an Tag 4 ein Plateau erreichte. Die Osteoklastenspezifischen Enzyme *CTSK* (*cathepsin K*) und *Acp5* (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) wurden etwa zu 50-fach an Tag 6 nach RANKL-Behandlung induziert (Abb.4.8D/E). Die Expression von *MMP9* (*matrix metalloproteinase 9*) wurde an Tag 6 etwa 13-fach gesteigert (Abb.4.8F). Durch die RANKL-Behandlung differenzieren sich die BMM-Zellen in Richtung Osteoklasten, was anhand der Expressionsanalysen der Osteoklastenspezifischen Gene gezeigt werden konnte.



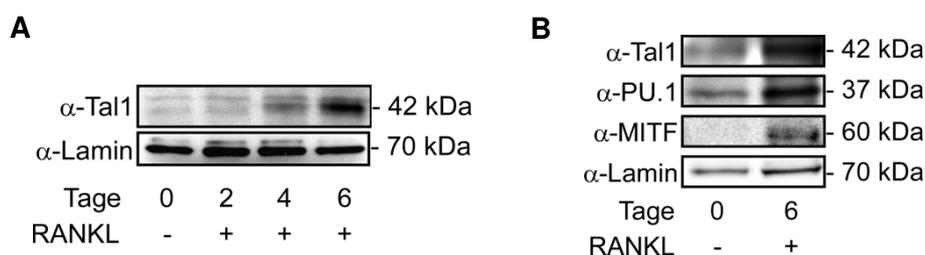
**Abb.4.8: RANKL induziert die Expression Osteoklastenspezifischer Gene.** Genexpressionsanalyse der mRNA aus BMM-Zellen nach 0, 2, 4 und 6 Tagen RANKL-Behandlung mittels qRT-PCR der Osteoklastenspezifischen Gene **(A)** *RANK* (*receptor activator of  $Nf\kappa B$* ), **(B)** *DC-STAMP* (*dendritic cell specific transmembrane protein*), **(C)** *ATP6V0D2* (*d2 isoform of vascular ATPase V0 domain*), **(D)** *CTSK* (*cathepsin K*), **(E)** *Acp5* (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) und **(F)** *MMP9* (*matrix metalloproteinase 9*) in BMM-Zellen ohne RANKL- und mit RANKL-Behandlung für 2, 4 und 6 Tage. Im Verlaufe der Osteoklasten-Differenzierung, die in BMM-Zellen durch Inkubation mit RANKL erreicht wurde, wurden die Osteoklastenspezifischen Gene induziert. Die Berechnung erfolgte im Vergleich zur Expression in unbehandelten BMM-Zellen, die als Bezugspunkt auf 1 gesetzt wurde.

Die Expression von *Tal1* auf mRNA-Ebene wurde in BMM-Zellen und RANKL-behandelten BMM-Zellen bestimmt. Es zeigte sich, dass sich das Expressionslevel der *Tal1*-mRNA im Verlaufe der Osteoklasten-Differenzierung nicht verändert (Abb.4.9A). Ähnlich verhielt sich auch die mRNA-Expression der Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *MITF* (Abb.4.9B und Abb.4.9C).



**Abb.4.9: RANKL hat keinen Einfluss auf die Expression von *Tal1*-mRNA.** Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR von BMM-Zellen ohne RANKL- und mit RANKL-Behandlung für 2, 4 und 6 Tage. **(A)** Die Expression der *Tal1*-mRNA wird durch die Inkubation der Zellen mit RANKL nicht beeinflusst. **(B/C)** Auch die Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *MITF* weisen kein verändertes mRNA-Expressionslevel nach RANKL-Behandlung auf.

Zum Nachweis der *Tal1*-Proteinexpression mittels Western Blot wurden BMM-Zellen aus dem Knochenmark von BL/6-Mäusen isoliert und mit RANKL behandelt. An Tag 0, 2, 4 und 6 wurden die Zellen geerntet, Kernextrakte nach Schreiber *et al.* (1989) hergestellt und die *Tal1*-Expression anhand eines *Tal1*-Antikörpers im Western Blot analysiert. Die Behandlung der BMM-Zellen mit RANKL führte auf Proteinebene zur Induktion der *Tal1*-Expression, was im Western Blot in Abb.4.10A anhand der *Tal1*-Proteinbande bei 42 kDa zu erkennen ist. Für die Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *MITF* zeigte sich ebenfalls eine Induktion nach RANKL-Behandlung (Abb.4.10B).



**Abb.4.10: RANKL induziert die Expression von *Tal1* auf Proteinebene.** **(A)** BMM-Zellen wurden aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und mit RANKL behandelt. Nach Ernte der Zellen an Tag 0, 2, 4 und 6 wurden Kernextrakte hergestellt und im Western Blot anhand eines spezifischen *Tal1*-Antikörpers analysiert. Es zeigte sich, dass RANKL während der Differenzierung das Expressionslevel an *Tal1*-Protein induziert. **(B)** Der Vergleich von Tag 0 (- RANKL) und 6 (+ RANKL) zeigt die Induktion der Proteinexpression von *Tal1*, *PU.1* und *MITF*.

Die Regulation der Tal1-Expression während der Osteoklastogenese findet nicht auf transkriptioneller Ebene, sondern auf Proteinebene statt, so dass die RANKL-Behandlung zu einem verstärkten Vorkommen des Tal1-Proteins führt. Die Regulation von Tal1 scheint somit einem posttranskriptionellen Prozess zu unterliegen. Auf posttranskriptioneller Ebene kann die Genexpression von microRNA (miR) reguliert werden. Um zu klären, ob die Tal1-Expression durch eine microRNA reguliert wird, wurde ein microRNA-*Microarray* im Transkriptomanalyselabor „TAL“ (Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Dazu wurde die RNA von unbehandelten BMM-Zellen und die RNA von BMM-Zellen nach dreitägiger RANKL-Behandlung analysiert. Durch den microRNA-*Microarray* wurden 32 microRNA's identifiziert, die im Vergleich von unbehandelten Zellen zu RANKL-behandelten Zellen ein verändertes Expressionsniveau aufzeigten. In Tabelle 4.1 sind die regulierten microRNA's dargestellt, außerdem gibt die Tabelle einen Einblick in die bisher beschriebenen Funktionen der jeweiligen microRNA. Die microRNA's regulieren mRNA auf posttranskriptioneller Ebene durch Beeinflussung der Translation des Proteins. Sie spielen in verschiedenen biologischen Prozessen, wie der Hämatopoese und in der Entstehung von Krankheiten wie Krebs, eine entscheidende Rolle (Havelange V und Garzon R, 2010; Farazi TA *et al.*, 2011).

Im Zusammenhang mit der posttranskriptionellen Regulation von Tal1 in BMM-Zellen sind vor allem solche microRNA der *Microarray*-Analyse interessant, die aufgrund der RANKL-Behandlung eine geringere Expression aufweisen. Während der Osteoklasten-Differenzierung kommt es zu einer Induktion des Tal1-Proteins, obwohl die Expression der *Tal1*-mRNA nicht verändert wird. Hypothetisch sollte RANKL zur reduzierten Expression einer microRNA führen, so dass die Reprimierung der *Tal1*-mRNA aufgehoben und die Translation des Tal1-Proteins aktiviert werden kann. Bei den herabregulierten microRNA's des *Microarrays* handelt es sich um die microRNA's miR-451, miR-144, miR-706, miR-139-39 und miR-486. Oftmals liegen die codierenden Sequenzen von microRNA's in einem Cluster, so auch im Fall von miR-451 und miR-144. Die Regulation dieser microRNA's wird vom Transkriptionsfaktor GATA1 reguliert und beide spielen eine Rolle in der Regulation der Erythropoese (Rasmussen KD *et al.*, 2010). Eine bioinformatische Analyse mittels TargetScan (Lewis BP *et al.*, 2005) ergab außerdem eine potentielle Bindestelle für die miR-144 im 3'-UTR (*untranslated region*) von Tal1.

Tabelle 4.1: Regulierte microRNA's in BMM-Zellen

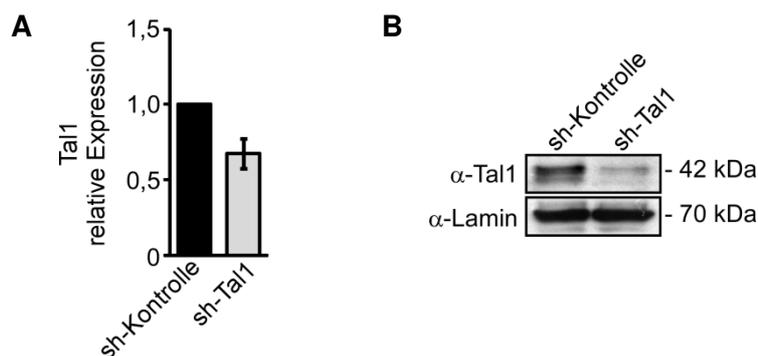
microRNA	Treated vs. Wt	LITERATUR
mmu-miR-451	-5,027	induziert Erythropoese (Bruchova-Votavova H <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-144	-5,007	im Cluster mit miR-451 (Rasmussen KD <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-706	-2,790	Fettsäure-vermittelte Insulinresistenz (Li ZY <i>et al.</i> , 2011)
mmu-miR-139-3p	-2,177	exprimiert in Nebennierentumoren (Tombol Z <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-486	-1,569	Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg (Small EM <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-34a	1,383	negative Regulation von Onkogenen (Zauli G <i>et al.</i> , 2011)
mmu-miR-191	1,457	Expression während Monozytopoese (Cekaite L <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-29c*	1,605	verantwortlich für Hypermethylierung (Nguyen T <i>et al.</i> , 2011)
mmu-miR-130a	1,665	reguliert Erythropoese (Yang GH <i>et al.</i> , 2009)
mmu-miR-96	1,742	dereguliert in kolorektalen Karzinomen (Bandres E <i>et al.</i> , 2006)
mmu-miR-342-3p	1,843	exprimiert in aktivierten B-Zellen und CLL (Li S <i>et al.</i> , 2011)
mmu-miR-101a	1,850	Regulation der Cyclooxygenase-2 (Chakrabarty A <i>et al.</i> , 2007)
mmu-miR-183	1,903	dereguliert in kolorektalen Karzinomen (Bandres E <i>et al.</i> , 2006)
mmu-miR-34b-5p	2,165	Regulation der Aktin-mRNA (Ghosh T <i>et al.</i> , 2008)
mmu-miR-378	2,210	reguliert Osteoblasten-Differenzierung (Kahai S <i>et al.</i> , 2009)
mmu-miR-146b	2,277	exprimiert in Osteomyelofibrose (Hussein K <i>et al.</i> , 2009)
mmu-miR-99b	2,315	Expression in LT-HSC (Guo S <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-155	2,376	verringerte Expression in Erythropoese (Masaki S <i>et al.</i> , 2007)
mmu-let-7e	2,428	im Cluster mit mir-99b und mir-125a-5p (Lionetti M <i>et al.</i> , 2009)
mmu-miR-199b*	2,486	induziert Calcineurin/NFAT (da Costa Martins PA <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-199a-5p	2,505	verringerte Expression durch Akt (Sayed D <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-193	2,513	induziert TRAIL-Signalweg (Ovcharenko D <i>et al.</i> , 2007)
mmu-miR-149	2,553	inhibiert Akt und E2F1 in Krebszellen (Lin RJ <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-125a-5p	2,557	Expression in vaskular-endothelialen Zellen (Li D <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-34c	2,789	reguliert Zellproliferation mit p53 (Corney DC <i>et al.</i> , 2007)
mmu-miR-146a	2,796	Einfluss auf Osteoklastogenese (Nakasa T <i>et al.</i> , 2011)
mmu-miR-365	2,924	reguliert in Blutplättchen (Osman A und Falker K, 2011)
mmu-miR-199a-3p	2,970	reguliert mTOR (Fornari F <i>et al.</i> , 2010)
mmu-miR-143	3,294	Einfluss in Osteosarkom-Metastasierung (Osaki M <i>et al.</i> , 2011)
mmu-miR-193b	3,413	Expression in Adenokarzinom reduziert (Wu W <i>et al.</i> , 2009)
mmu-miR-214	3,552	beeinflusst Entwicklung des Skeletts (Watanabe T <i>et al.</i> , 2008)
mmu-miR-455	4,456	verstärkte Expression in Adipozyten (Walden TB <i>et al.</i> , 2009)

### 4.3 *Tal1* inhibiert die Osteoklastendifferenzierung

Nachdem die Expression von *Tal1* in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten gezeigt werden konnte, wurde die biologische Funktion von *Tal1* in dieser Zellpopulation untersucht. RAW264.7- und BMM-Zellen stellen ein geeignetes Zellsystem dar, um die Osteoklasten-Differenzierung *in vitro* zu untersuchen, da sie unter Behandlung mit rekombinanten RANKL fusionieren und multinukleäre Osteoklasten ausbilden (Suda T *et al.*, 1999). Zur Untersuchung der biologischen Funktion von *Tal1* *in vitro* wurde das Expressionslevel von *Tal1* in den Zellen mit Hilfe von *Knock-down*-Konstrukten bzw. *Tal1*-Expressionskonstrukten manipuliert.

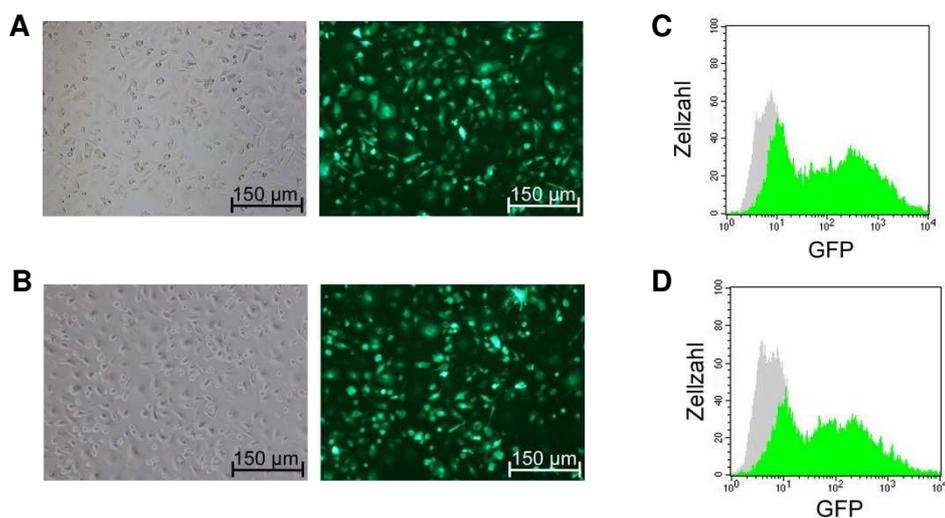
#### 4.3.1 *Nachweis des Knock-downs und der Überexpression von Tal1*

Die Etablierung des *Knock-downs* von *Tal1* wurde zunächst in der Zelllinie RAW264.7 durchgeführt. Dazu wurden verschiedene shRNA (*short hairpin* RNA) gegen murines *Tal1* in den Vektor psiRNA-h7SK-GFPzeo der Firma Invivogen (San Diego) kloniert. Die shRNA-Sequenzen für zwei Konstrukte wurden mit Hilfe der Software siRNA Wizard<sup>TM</sup> von Invivogen generiert, diese sind komplementär zur *helix-loop-helix*-Region von murinem *Tal1*. Zwei weitere Konstrukte enthielten shRNA-Sequenzen, die von Ambion (Darmstadt) generiert wurden. Diese shRNA regulieren die *Tal1*-Expression durch Bindung im 3'-UTR von murinem *Tal1*. Die *Knock-down* Effizienz wurde nach transients Transfektion in RAW264.7-Zellen bestimmt. Das Konstrukt mit der Sequenz „GGCCAAGTTACTCAATGACCA“ zeigte den deutlichsten *Tal1-Knock-down* in RAW264.7-Zellen und wurde zur Herstellung einer stabilen Zelllinie verwendet. Nachdem die shRNA in das Genom integriert wurde, wurden die Zellen geerntet und die *Knock-down*-Effizienz des Konstrukts auf mRNA-Level mittels qRT-PCR und auf Proteinlevel im Western Blot kontrolliert. Als Kontrolle diente eine shRNA, die gegen das Gen der  $\beta$ -Galaktosidase gerichtet war. Im Vergleich zur Kontrolle erzielte das sh-*Tal1*-Konstrukt eine Reduzierung der *Tal1*-Expression um etwa 30-40 % auf mRNA-Ebene (Abb.4.11A). Die Überprüfung des *Knock-downs* im Western Blot zeigte eine deutliche Reduktion der *Tal1*-Expression, die etwa 50-60 % betrug (Abb.4.11B).



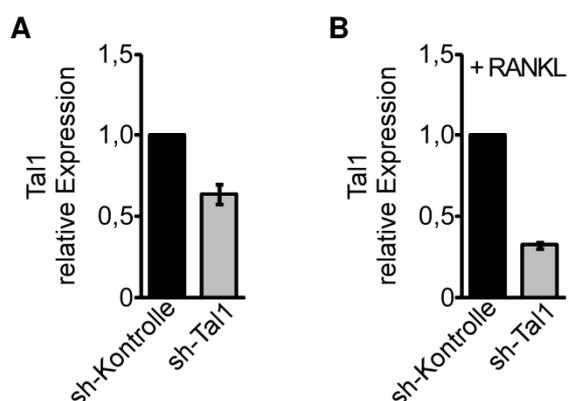
**Abb.4.11: Analyse der Knock-down-Effizienz des sh-Tal1-Konstrukts. (A)** Expressionsanalyse der *Tal1*-mRNA in stabil transfizierten RAW264.7-Zellen. Das sh-Tal1-Konstrukt sorgte für eine *Knock-down*-Effizienz von etwa 30-40 %. **(B)** Western Blot-Analyse der *Knock-down*-Effizienz von Tal1 auf Proteinebene. Der *Knock-down* von Tal1 ist auf Proteinebene deutlicher zu erkennen als auf mRNA-Ebene und zeigte im Western Blot eine Reduzierung der Tal1-Expression um 50-60 %.

Die Sequenzen für die sh-Kontrolle und das sh-Tal1-Konstrukt wurden in den SEW-Vektor kloniert (Demaison C *et al.*, 2002). Dieser Vektor wurde zur Herstellung lentiviraler Partikel verwendet, die zur Transduktion der primären BMM-Zellen eingesetzt wurden. Die Herstellung der Viruspartikel erfolgte in 293T-Zellen nach dem „Drei-Plasmid-System“, d.h. der SEW-sh-Tal1 wurde mit den Verpackungsplasmiden co-transfiziert. Für die Transduktion wurden die BMM-Zellen mit einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/*Well* in einer 24-*Well*-Platte ausgesät. Nach 24 h erfolgte die erste Transduktion und nach weiteren 48 h eine zweite Transduktion. Die Transduktionseffizienz der BMM-Zellen wurde anhand des GFP-Signals mikroskopisch und mittels Durchflusszytometrie überprüft. In Abbildung Abb.4.12 ist zu erkennen, dass die Mehrzahl der Zellen ein GFP-Signal aufweist. Die Auswertung der Durchflusszytometrie zeigte eine Transduktionseffizienz von etwa 60 % (Abb.4.12C/D).



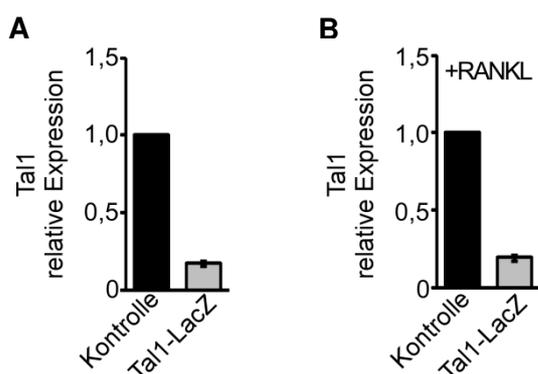
**Abb.4.12: Transduktionseffizienz der BMM-Zellen.** (A) Mikroskopische Auswertung der BMM-Zellen nach Transduktion mit den Viruspartikeln der sh-Kontrolle. Im Vergleich zum Durchlicht (links) erscheinen die meisten Zellen GFP-positiv (rechts). (B) Mikroskopische Auswertung der BMM-Zellen nach Transduktion mit Viruspartikeln für sh-Tal1. Im Vergleich zum Durchlicht (links) sind nahezu alle Zellen GFP-positiv (rechts). (C) GFP-Messung mittels Durchflusszytometrie der transduzierten BMM-Zellen mit den Viruspartikeln der sh-Kontrolle. Die Zellen sind zu etwa 60 % GFP-positiv. (D) GFP-Messung mittels Durchflusszytometrie der transduzierten BMM-Zellen mit den Viruspartikeln für sh-Tal1. Die Zellen sind zu etwa 60 % GFP-positiv.

Nach erfolgreicher Transduktion der primären BMM-Zellen wurde im nächsten Schritt die *Knock-down*-Effizienz überprüft. Dazu wurde die RNA der transduzierten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression der *Tal1*-mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Der *Knock-down* von *Tal1* führte in den transduzierten BMM-Zellen zu einer Reduktion der *Tal1*-mRNA um etwa 40-50 %. Transduzierte BMM-Zellen, die drei Tage mit rekombinantem RANKL behandelt wurden, zeigten einen *Tal1*-*Knock-down* von etwa 60 % (Abb.4.13).



**Abb.4.13: *Tal1*-*Knock-down* in BMM-Zellen.** (A) qRT-PCR der *Tal1*-mRNA in transduzierten BMM-Zellen. Im Vergleich zur sh-Kontrolle weisen sh-Tal1-transduzierte BMM-Zellen einen *Knock-down* von etwa 40 % auf. (B) qRT-PCR der *Tal1*-mRNA in transduzierten BMM-Zellen. Im Vergleich zur sh-Kontrolle weisen sh-Tal1-transduzierte BMM-Zellen nach dreitägiger RANKL-Behandlung einen *Knock-down* von etwa 60 % auf.

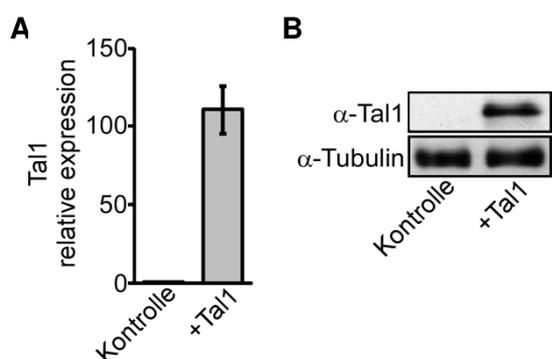
Zur Untersuchung der Auswirkung des *Tal1*-*Knock-down* konnte auch das Mausmodell verwendet werden, das einen *Knock-in* des  $\beta$ -Galaktosidasegens in den *Tal1*-Locus trägt, wie in Abschnitt 4.1.2 bereits erläutert. Die BMM-Zellen der *Tal1-LacZ*-Mäuse wurden kultiviert, RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Beurteilung der *Tal1*-Expression mittels qRT-PCR. Die *Tal1*-Expression in den BMM-Zellen der *Tal1-LacZ*-Mäusen betrug etwa 20 % (Abb.4.14A). Auch nach dreitägiger RANKL-Behandlung zeigte sich eine Reduktion der *Tal1*-Expression auf 20 % (Abb.4.14B).



**Abb.4.14: *Tal1*-Expression in BMM-LacZ-Zellen.**

(A) qRT-PCR der *Tal1*-mRNA in BMM-Zellen der *Tal1-LacZ*-Mäuse. Im Vergleich zur Kontrolle weisen die BMM-LacZ-Zellen eine *Tal1*-Expression von nur noch 20 % auf. (B) qRT-PCR der *Tal1*-mRNA in BMM-Zellen der *Tal1-LacZ*-Mäuse. Im Vergleich zur Kontrolle weisen die BMM-LacZ-Zellen nach dreitägiger RANKL-Behandlung eine *Tal1*-Expression von etwa 20 % auf.

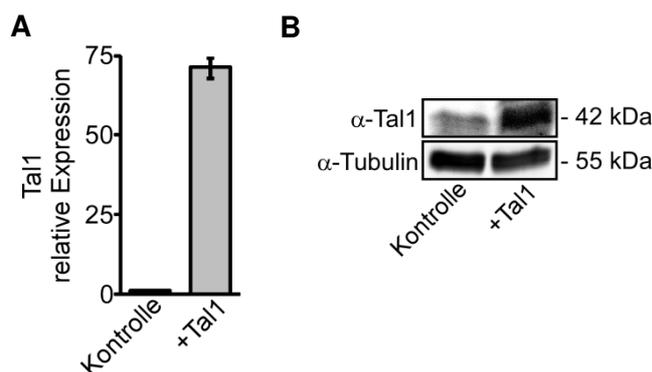
Zur Überexpression von Tal1 in BMM-Zellen wurde die humane Sequenz von *Tal1* in den SIEW-Vektor kloniert (Demaison C *et al.*, 2002). Es wurde die humane Sequenz verwendet, um zwischen endogener und ektopter Expression unterscheiden zu können. Dieser Vektor wurde ebenfalls zur Herstellung lentiviraler Partikel in 293T-Zellen verwendet. Die Transduktionseffizienz der SIEW-hTal1-Partikel in BMM-Zellen war vergleichbar mit den *Knock-down*-Partikeln. Die Überprüfung der Tal1-Überexpression erfolgte mittels qRT-PCR und im Western Blot. Dazu wurde die RNA transduzierter Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Analyse der *hTal1*-mRNA in den hTal1-überexprimierenden BMM-Zellen ergab eine 100-fache Induktion (Abb.4.15A). Für die Analyse der Tal1-Überexpression auf Proteinebene wurden die transduzierten Zellen geerntet und Gesamtzellextrakte erstellt. Im Western Blot mit anti-Tal1-Antikörper zeigte sich in den Tal1-überexprimierenden BMM-Zellen ein starkes Signal für Tal1 bei etwa 42 kDa (Abb.4.15B).



**Abb.4.15: *Tal1*-Expression in BMM-hTal1-Zellen.**

(A) qRT-PCR der *Tal1*-mRNA in transduzierten BMM-Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle ist die *Tal1*-Expression 100-fach induziert. (B) Nachweis der *Tal1*-Expression mittels Western Blot. Die BMM-Zellen transduziert mit SIEW-Tal1 zeigen ein deutliches *Tal1*-Signal bei 42 kDa im Vergleich zu den Kontroll-Zellen.

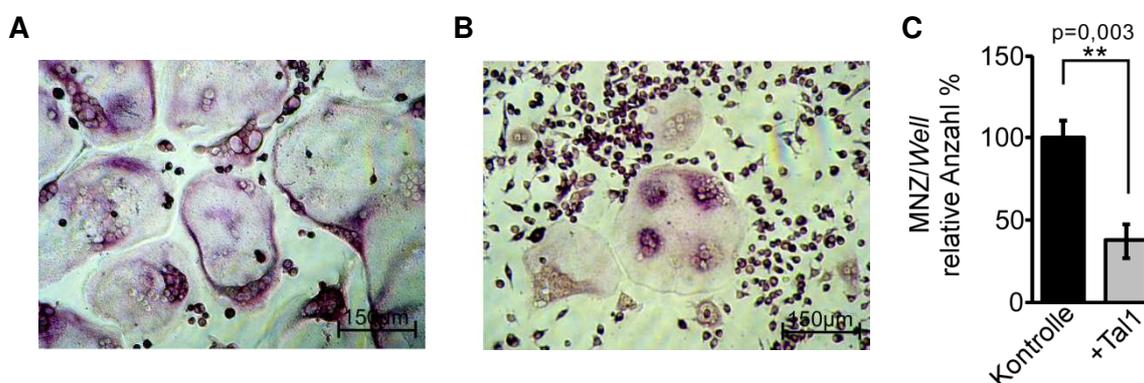
Außerdem wurden RAW264.7-Zellen mit pIRES2-EGFP-hTal1 transfiziert und unter G418-Selektion eine stabile Zelllinie hergestellt. Auch hier erfolgte die Überprüfung der Tal1-Überexpression mittels qRT-PCR und im Western Blot. Die RNA der stabilen RAW264.7-hTal1-Zellen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die *Tal1*-Expressionsanalyse ergab für die stabile Zelllinie eine etwa 75-fach erhöhte *Tal1*-mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.4.16A). Auch im Western Blot war eine deutliche *Tal1*-Überexpression in der stabilen Zelllinie ersichtlich (Abb.4.16B).



**Abb.4.16: Tal1-Expression in RAW264.7-hTal1-Zellen.** (A) qRT-PCR der *Tal1*-mRNA in der stabilen Zelllinie RAW264.7-hTal1. Im Vergleich zur Kontrolle war die *Tal1*-Expression 75-fach induziert. (B) Nachweis der Tal1-Expression mittels Western Blot. Die RAW264.7 stabil-transfiziert mit pIRES2-EGFP-hTal1 zeigten ein deutliches Tal1-Signal bei 42 kDa im Vergleich zu den Kontrollzellen.

### 4.3.2 Ektope Expression von *Tal1* inhibiert die Osteoklastogenese

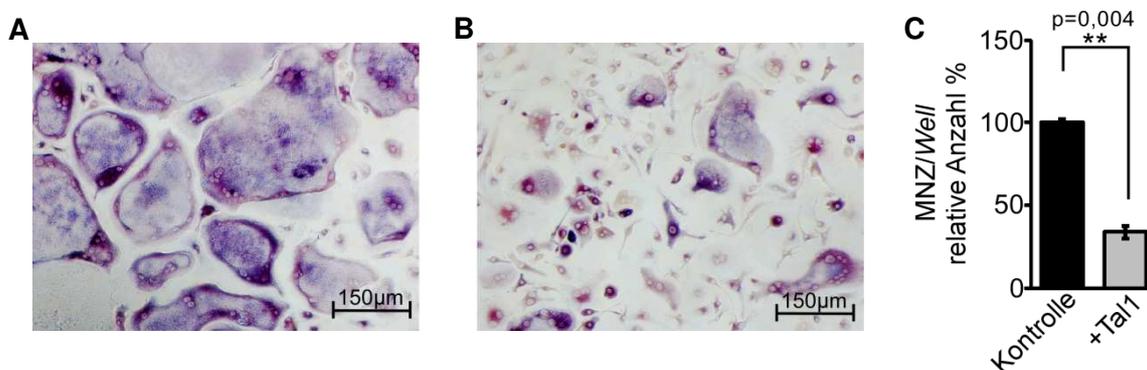
Nachdem gezeigt werden konnte, dass die stabile Zelllinie in RAW264.7 *Tal1* verstärkt exprimiert, wurde im nächsten Schritt die Auswirkungen der *Tal1*-Überexpression auf das Differenzierungsverhalten der Zellen in Richtung Osteoklasten untersucht. Dazu wurden die RAW264.7-h*Tal1*-Zellen mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen/*Well* in einer 96-*Well*-Platte ausgesät und mit RANKL behandelt. Nach sechs Tagen Inkubation waren die Osteoklasten im Mikroskop erkennbar und die Zellen wurden mit Hilfe des *Acid phosphatase Leucocyte Kit* von Sigma-Aldrich (München) angefärbt. Diese Färbemethode weist die Expression von *Acp5* (TRAPC, TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) nach, das ein Markergen für Osteoklasten ist und zur funktionellen Charakterisierung von reifen Osteoklasten verwendet wird. Die Beurteilung der gefärbten Zellen erfolgte mikroskopisch, dabei wurden alle multinukleären Zellen gezählt, die mehr als drei Zellkerne beinhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Tal1* in den RAW264.7-Zellen zu einer Blockade der Differenzierung führt, da im Vergleich zur Kontrolle etwa 50 % weniger multinukleäre Zellen entstanden sind (Abb.4.17).



**Abb.4.17: Tal1 inhibiert die Osteoklasten-Differenzierung in RAW264.7-hTal1-Zellen.** (A) TRACP-Färbung von RAW264.7-GFP-Zellen, die sechs Tage mit RANKL Tage behandelt wurden. (B) TRACP-Färbung von RAW264.7-h*Tal1*-Zellen, die sechs Tage mit RANKL behandelt wurden. (C) Statistische Auswertung der Anzahl

der multinukleären Zellen (MNZ) aus RAW264.7-hTal1 im Vergleich zur Kontrolle. Die Zählung der MNZ erfolgte im Mikroskop nach Färbung der TRACP, gezählt wurden alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der MNZ der Kontrolle als 100 gesetzt. Dieser Versuch wurde von Dr. J. Lausen durchgeführt (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main).

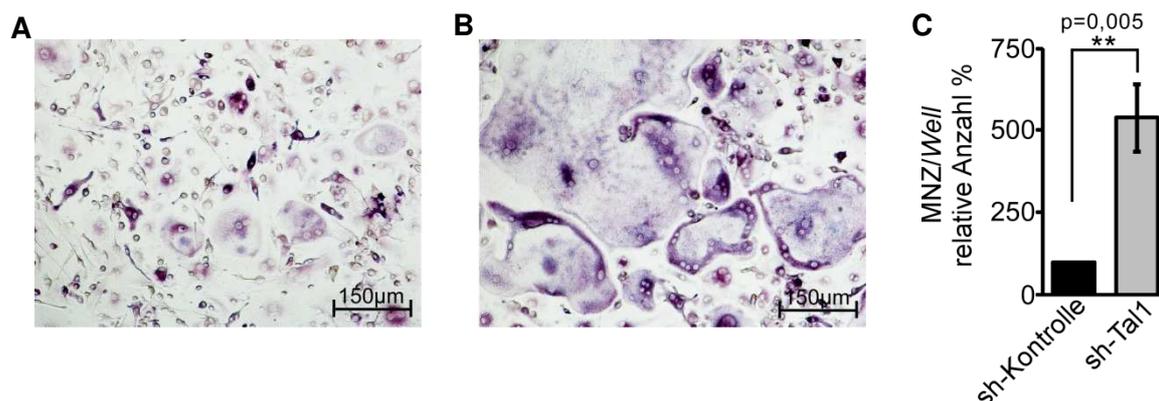
Die Auswirkung der Tal1-Überexpression in Bezug auf die Osteoklasten-Differenzierung wurde auch in primären Zellen analysiert, da diese ein physiologisches Zellsystem im Gegensatz zur etablierten Zellkultur aus RAW264.7-Zellen darstellen. Dazu wurden die BMM-Zellen von BL6-Mäusen isoliert und mit lentiviralen Partikel zur ektopen Expression von Tal1 transduziert. Die erfolgreiche Transduktion konnte anhand des GFP-Signals mikroskopisch beurteilt werden. GFP-positive, d.h. erfolgreich transduzierte Zellen, wurde mit Hilfe des FACSAria™ mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte sortiert. Nach sechs Tagen Inkubation mit rekombinantem RANKL waren die Osteoklasten im Mikroskop erkennbar und die Zellen wurden mit Hilfe des *Acid phosphatase Leucocyte Kit* von Sigma-Aldrich (München) angefärbt. Nach der Färbung erfolgte die Auszählung aller multinukleären Zellen mit mehr als drei Zellkernen. Abb.4.18A und B stellen die Färbung der TRACP-positiven Zellen dar. Die statistische Auswertung in Abb.4.18C verdeutlicht, dass die Überexpression von Tal1 auch in primären Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie einen inhibierenden Effekt auf die Osteoklastogenese hatte. Im Vergleich zur Kontrolle lagen in den BMM-hTal1-Zellen im Mittel nur etwa 34 % multinukleäre Zellen vor.



**Abb.4.18: Tal1 inhibiert die Osteoklasten-Differenzierung in BMM-hTal1-Zellen. (A)** TRACP-Färbung von BMM-Zellen, die sechs Tage mit RANKL behandelt wurden. **(B)** TRACP-Färbung von BMM-hTal1-Zellen, die sechs Tage mit RANKL behandelt wurden. **(C)** Statistische Auswertung der Anzahl der multinukleären Zellen (MNZ) aus BMM-hTal1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Zählung der MNZ erfolgte im Mikroskop nach Färbung der TRACP, gezählt wurden alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der MNZ der Kontrolle als 100 gesetzt.

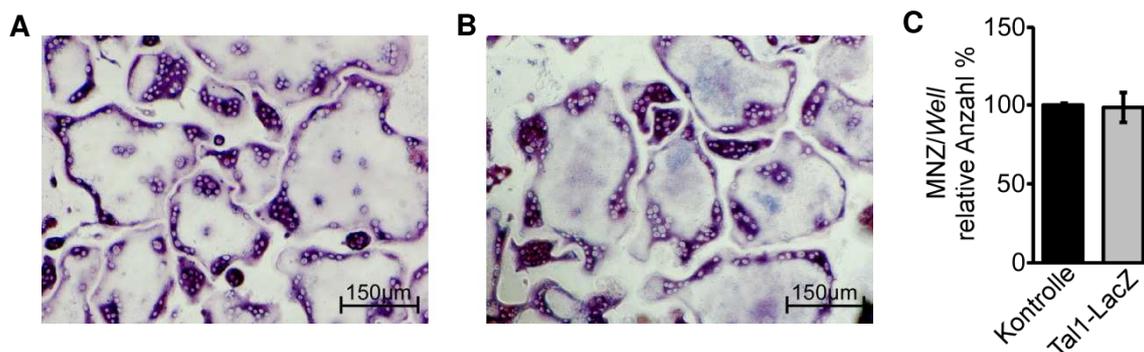
### 4.3.3 Knock-down von *Tal1* induziert die Osteoklastogenese

Der Einfluss des *Knock-downs* von *Tal1* wurde ebenfalls in primären Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie untersucht. Nachdem die Effizienz des *Knock-downs* nach Transduktion in BMM-Zellen erfolgreich gezeigt werden konnte, wurden die GFP-positiven Zellen mittels FACS Aria™ mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen/*Well* in eine 96-*Well*-Platte sortiert. Nach etwa 3 Tagen Inkubation mit RANKL entwickelten sich aus den BMM-sh-*Tal1*-Zellen die ersten multinukleären Zellen. Nach 4-5 Tagen waren nahezu alle BMM-sh-*Tal1*-Zellen zu Osteoklasten fusioniert, so dass die Zellen aller Versuchsansätze fixiert wurden. Die Beurteilung der Zellen nach Färbung der TRACP mit dem *Acid phosphatase Leucocyte Kit* von Sigma-Aldrich (München) erfolgte mikroskopisch durch Auszählung aller multinukleären Zellen, die aus mindestens drei Zellen entstanden sind, d.h. drei Zellkerne enthalten. Es zeigte sich, dass der *Knock-down* von *Tal1* verstärkt zu einer Differenzierung der BMM-Zellen in Richtung Osteoklasten führt. Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen entstanden aus den BMM-sh-*Tal1*-Zellen 5-fach mehr Osteoklasten (Abb.4.19).



**Abb.4.19: Knock-down von *Tal1* induziert die Osteoklasten-Differenzierung in BMM-Zellen. (A)** TRACP-Färbung von BMM-Zellen, die vier Tage mit RANKL behandelt wurden. **(B)** TRACP-Färbung von BMM-sh-*Tal1*-Zellen, die vier Tage mit RANKL behandelt wurden. **(C)** Statistische Auswertung der Anzahl der multinukleären Zellen (MNZ) aus BMM-sh-*Tal1* im Vergleich zur Kontrolle. Die Zählung der MNZ erfolgte im Mikroskop nach Färbung der TRACP, gezählt wurden alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der MNZ der Kontrolle als 100 gesetzt.

Eine *Knock-down*-Situation für *Tal1* liegt ebenfalls im *LacZ*-Mausmodell vor, so dass die isolierten BMM-Zellen dieser Mäuse auf ihr Differenzierungsverhalten in Richtung Osteoklasten untersucht wurden. Nach Aussaat von 10.000 Zellen/*Well* in eine 96-*Well*-Platte wurden die Zellen mit RANKL für etwa vier Tage inkubiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach TRACP-Färbung der Zellen. Es wurde jedoch kein Unterschied im Vergleich von Kontroll-Zellen zu BMM-*LacZ*-Zellen festgestellt (Abb.4.20).



**Abb.4.20: BMM-Zellen aus *Tal1-LacZ*-Mäusen zeigen keine veränderte Osteoklasten-Differenzierung.** (A) TRACP-Färbung von BMM-Zellen, die vier Tage mit RANKL behandelt wurden. (B) TRACP-Färbung von BMM-LacZ-Zellen, die vier Tage mit RANKL behandelt wurden. (C) Statistische Auswertung der Anzahl der multinukleären Zellen (MNZ) aus BMM-LacZ-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Zählung der MNZ erfolgte im Mikroskop nach Färbung der TRACP, gezählt wurden alle Zellen mit mehr als drei Zellkernen. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der MNZ der Kontrolle als 100 gesetzt.

Der Transkriptionsfaktor *Tal1* besitzt einen Einfluss auf die Differenzierung in Richtung Osteoklasten. Die ektope Expression von *Tal1* in RAW264.7- und BMM-Zellen resultierte in einer Inhibierung der Osteoklastogenese. Im Gegensatz dazu führte der *Knock-down* von *Tal1* zu einer induzierten Differenzierung der BMM-Zellen, so dass es zu einer erhöhten Anzahl an multinukleären Zellen kam. Die Expression von *Tal1* und die biologische Auswirkung von *Tal1* während der Osteoklastogenese konnten bisher gezeigt werden. Zur Klärung der molekularbiologischen Vorgänge in Abhängigkeit von *Tal1* wurde als nächstes der Einfluss von *Tal1* auf Osteoklasten-spezifische Gene untersucht.

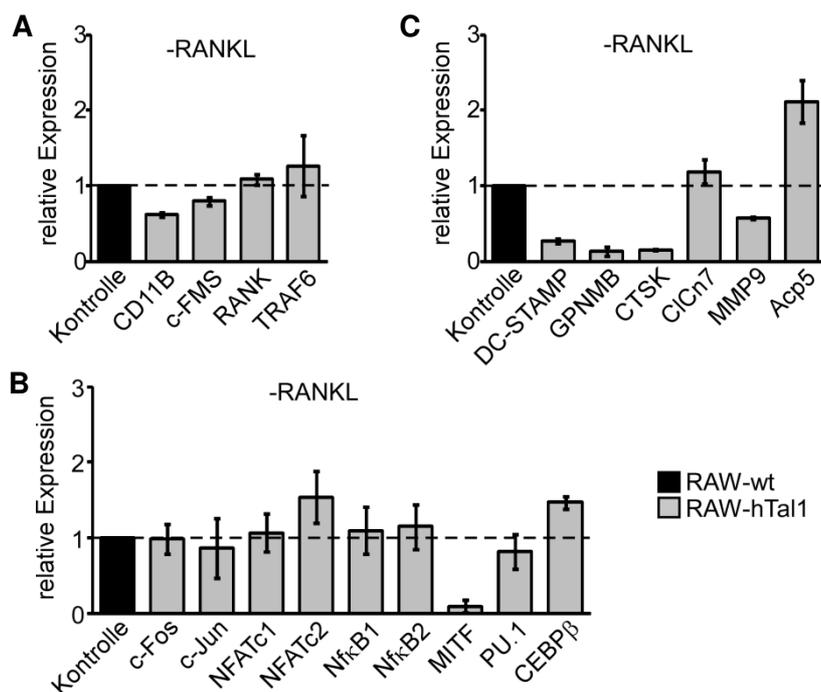
#### 4.4 *Tal1* beeinflusst Osteoklasten-spezifische Gene

Der Transkriptionsfaktors *Tal1* besitzt eine entscheidende Funktion in der Entwicklung des hämatopoetischen Systems. Das Fehlen von *Tal1* in *Tal1*-defizienten Mäusen führt zum Tod im Verlaufe der embryonalen Entwicklung zwischen E8.5 und E10.5 (Robb L *et al.*, 1995; Shivdasani RA *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression von *Tal1* einen inhibierenden Effekt auf die Osteoklastogenese besitzt. Der Einfluss von *Tal1* auf Osteoklasten-spezifische Gene ist nicht bekannt. Daher wurde der Effekt von *Tal1* auf Osteoklasten-spezifische Gene untersucht, um den inhibierenden Effekt von *Tal1* auf die Osteoklasten-Differenzierung zu erklären. Dazu wurden Genexpressionsanalysen in der stabilen Zelllinie RAW264.7-h*Tal1* und in BMM-sh-*Tal1*-Zellen durchgeführt. Die Expression der Osteoklasten-spezifischen Gene in Abhängigkeit von *Tal1* wurde mittels qRT-PCR und Chromatin-Immunopräzipitation verifiziert.

#### 4.4.1 Einfluss der Tal1-Überexpression auf Osteoklasten-spezifische Gene

Die Analyse des Tal1-Einflusses auf Osteoklasten-spezifische Gene erfolgte zunächst anhand einer Tal1-überexprimierenden Zelllinie. RAW264.7-Zellen wurden mit dem pIRES2-hTal1-Konstrukt transfiziert. Damit eine stabile Integration in das Genom erfolgte, wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion unter Selektionsdruck mit Antibiotika gesetzt. Durch kontinuierliche Behandlung mit Antibiotika entwickelte sich die stabile RAW264.7-hTal1-Zelllinie (Nachweis der Tal1-Expression siehe Abb.4.16). Aus diesen Zellen wurden RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene untersucht. Außerdem wurden die RAW264.7-hTal1-Zellen für zwei Tage mit RANKL behandelt, RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, um Unterschiede der RANKL-Induktion in RAW264.7-Zellen und RAW264.7-hTal1-Zellen vergleichen zu können. Die Auswahl der untersuchten Osteoklasten-spezifischen Gene erfolgte nach Literaturrecherche. Sie umfasste Gene der RANKL-Signalkaskade, Osteoklasten-spezifische Transkriptionsfaktoren und Osteoklasten-spezifische Marker, die für die Knochenresorption entscheidend sind.

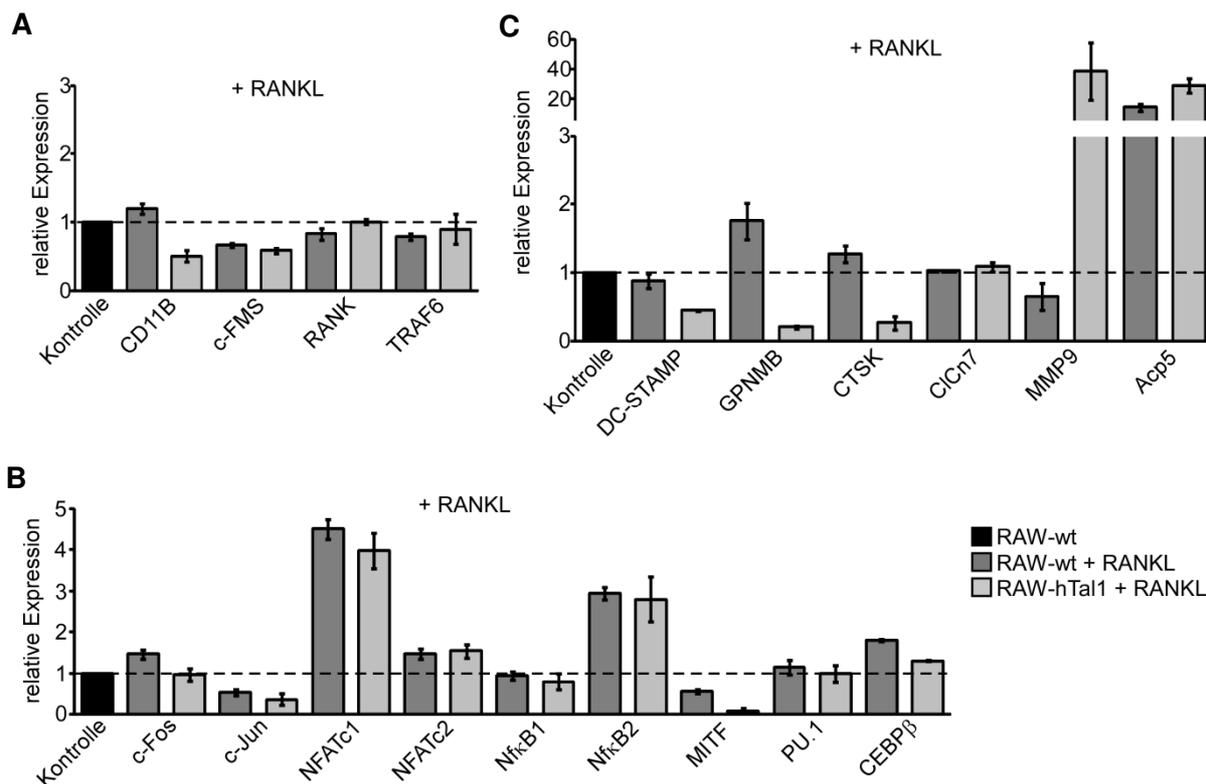
In Abb.4.21 ist die Genexpressionsanalyse der verschiedenen Osteoklasten-spezifischen Gene in RAW264.7-hTal1-Zellen gezeigt. Die Zellen wurden nicht mit RANKL behandelt, d.h. die Tal1-Überexpression stellt hier zunächst den Einfluss auf Monozyten/Makrophagen-Status dar. Dabei zeigte sich, dass Tal1 keinen Einfluss auf Monozyten/Makrophagen-Oberflächenmarker wie CD11B oder c-FMS besitzt. Auch die Expression von RANK, dem Rezeptor von RANKL, der für die Initiation der Osteoklasten-Differenzierung verantwortlich ist, zeigte keine Veränderung. Die RANKL-Signalkaskade wird über das Adaptormolekül TRAF6 in der Zelle weitergeleitet, auch hier konnte kein Effekt von Tal1 auf die Expression von *TRAF6* festgestellt werden (Abb.4.21A). In den RAW264.7-hTal1-Zellen wurde die Expression der Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren c-Fos/c-Jun, NFATc1/2, NfκB1/2, MITF und PU.1 untersucht. Ein deutlicher Effekt von Tal1 war hier auf die Expression von *NFATc2*, *CEBPβ* und *MITF* zu erkennen. *NFATc2* und *CEBPβ* wurden in den RAW264.7-hTal1-Zellen etwa 1,5-fach verstärkt exprimiert, während die Expression von *MITF* inhibiert war (Abb.4.21B). Am deutlichsten war der Effekt von Tal1 in Bezug auf die Expression der Osteoklasten-Marker. Die Expression von *DC-STAMP*, *GPNMB*, *CTSK* und *MMP9* wurde durch die Tal1-Überexpression reduziert, *Acp5* wurde etwa 2-fach verstärkt exprimiert. Auf die Expression von *C1Cn7* hatte Tal1 keinen Einfluss (Abb.4.21C).



**Abb.4.21: Genexpressionsanalyse in Tal1-überexprimierenden RAW264.7-Zellen.** (A) In RAW264.7-hTal1-Zellen war die Expression von Monozyten/Makrophagen-Markern *CD11B* und *c-FMS* nicht verändert. Auch die Expression von *RANK* und *TRAF6* wurde durch Tal1 nicht beeinflusst. (B) Die Genexpressionsanalyse der Osteoklasten-spezifische Transkriptionsfaktoren in Tal1-überexprimierenden RAW264.7-Zellen zeigte einen induzierenden Effekt auf *NFATc2* und *CEBPβ*, und einen inhibierenden Effekt auf *MITF*. (C) Die Tal1-Überexpression sorgte für eine Reduktion der Osteoklasten-Marker *DC-STAMP*, *GPNMB*, *CTSK* und *MMP9*. Die Expression von *Acp5* wurde induziert. Es zeigte sich kein Effekt auf die Expression von *C1Cn7*.

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der Tal1-Überexpression in RAW264.7-Zellen untersucht, die mit RANKL inkubiert wurden. Dieser Versuchsansatz diente dazu festzustellen, ob Tal1 einen Effekt auf die RANKL-vermittelte Induktion der Osteoklasten-spezifischen Gene hat. Die stabilen RAW264.7-hTal1-Zellen wurden für zwei Tage mit RANKL inkubiert. Nach RNA-Isolierung und Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte die Genexpressionsanalyse der in Abb.4.21 analysierten Gene in RAW264.7-Wildtyp (wt) und in RAW264.7-hTal1. In Abb.4.22 sind die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zusammengefasst, dabei stellen die dunkelgrauen Balken die RANKL-vermittelte Induktion der Gene in RAW264.7-wt dar, die hellgrauen Balken entsprechen der Expression in RAW264.7-hTal1 nach RANKL-Inkubation. Es zeigte sich, dass die Tal1-Überexpression in RANKL-behandelten Zellen keinen Einfluss auf die Expression der Rezeptoren *c-FMS* und *RANK* besitzt, auch das Adaptormolekül *TRAF6* wurde in seiner Expression nicht verändert. Die Expression von *CD11B* wurde im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen um etwa 50 % reduziert (Abb.4.22A). In Bezug auf die Expression der meisten Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren konnte ebenfalls kein Tal1-Einfluss festgestellt werden. Eine

Ausnahme stellte die *MITF*-Expression dar, die aufgrund der Tal1-Überexpression reprimiert wurde (Abb.4.22B). Tal1 wirkte sich hauptsächlich auf die Gene *DC-STAMP*, *GPNMB*, *CTSK*, *MMP9* und *Acp5* aus. Die Expression von *DC-STAMP* war aufgrund der Tal1-Überexpression um etwa 50 % reduziert, bei *GPNMB* und *CTSK* führte Tal1 zu einer 90 % bzw. 80 % geringeren Expression in den RAW264.7-hTal1 nach RANKL-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Im Fall von *MMP9* und *Acp5* sorgte Tal1 für eine deutliche Induktion der Expression. Auf die Expression von *CiCn7* zeigte sich kein Effekt (Abb.4.22C).



**Abb.4.22: Einfluss von Tal1 in RAW264.7-hTal1-Zellen nach RANKL-Inkubation.** (A) Die Tal1-Überexpression in RAW264.7-hTal1-Zellen führte zu keiner veränderten Genexpression der Rezeptoren *c-FMS* oder *RANK* nach RANKL-Behandlung (hellgraue Balken), auch die Expression von *TRAF6* wurde nicht beeinflusst. Die Expression von *CD11B* wurde in RAW264.7-hTal1 reprimiert. (B) Die Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren zeigten in RAW264.7-wt aufgrund der RANKL-Behandlung keine Induktion der Genexpression, mit Ausnahme von *NFATc1* und *NfκB2*, die induziert wurden (dunkelgraue Balken). Die Überexpression von Tal1 hatte keine Auswirkungen in RAW264.7-hTal1 auf den Expressionsstatus für die analysierten Transkriptionsfaktoren (hellgraue Balken). (C) Tal1 sorgte für einen inhibierenden Effekt auf die Induktion von *DC-STAMP*, *GPNMB* und *CTSK* in RAW264.7-hTal1 nach RANKL-Inkubation. Die Expression von *CiCn7* wurde nicht beeinflusst. Die RANKL-vermittelte Expression von *MMP9* und *Acp5* wurde aufgrund der Tal1-Überexpression verstärkt.

Die Genexpressionsanalyse der Tal1-überexprimierenden, stabilen Zelllinie RAW264.7-hTal1 gab Aufschluss über einige potentielle Zielgene von Tal1, deren Expression sowohl auf Makrophagen/Monozyten-Status als auch während der Osteoklasten-Differenzierung verändert vorlagen. Dazu gehörte der Rezeptor *CD11B* und der Transkriptionsfaktor *MITF*, auf deren Expression Tal1 einen inhibierenden Einfluss hatte. Der Großteil der untersuchten Gene, die in die RANKL-Signalkaskade involviert sind, wurde nicht durch Tal1 beeinflusst. Der inhibierende Effekt von Tal1 zeigte sich vor allem in Bezug auf die Expression von *DC-STAMP*, *GPNMB*, *CTSK* und *MMP9*. Nach RANKL-Inkubation blieb der inhibierende Tal1-Effekt erhalten. Die Expression von *MMP9* und *Acp5* wurde durch Tal1 aktiviert. Um den genomweiten Einfluss von Tal1 zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt eine Genexpressionsanalyse mittels *Microarray* des *Knock-downs* von Tal1 untersucht.

#### **4.4.2 Genexpressionsanalyse nach Tal1-Knock-down**

Die Genexpressionsanalyse mittels *Microarray* des *Tal1-Knock-downs* erfolgte in primären Monozyten aus BL/6-Mäusen. Die Genexpressionsanalyse sollte einen Gesamteindruck des Tal1-Effekts auf die Genexpression in BMM-Zellen vermitteln. Die BMM-Zellen wurden aus dem Knochenmark der Mäuse isoliert und der *Tal1-Knock-down* mit Hilfe lentiviraler Partikel in die primären Zellen eingebracht. Die Zellen wurden geerntet und die RNA isoliert, die dann im Transkriptomanalyselabor Göttingen für einen Agilent-*Array* (Maus) verwendet wurde. Es erfolgte ein Vergleich von BMM-sh-Tal1 mit BMM-sh-Kontrolle. Anhand der *Array*-Daten wurde eine Liste von regulierten Genen erstellt, die mit Hilfe der Software *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* (Huang DW *et al.*, 2009) ausgewertet wurde und anhand von *GO-Termini* (*gene ontology*) kategorisiert wurde. Der Begriff „*GO-Termini*“ umfasst eine biomedizinische Ontologie, in denen sich die Bereiche „Zelluläre Komponente“, „Biologischer Prozess“ und „Molekulare Funktion“ darstellen lassen.

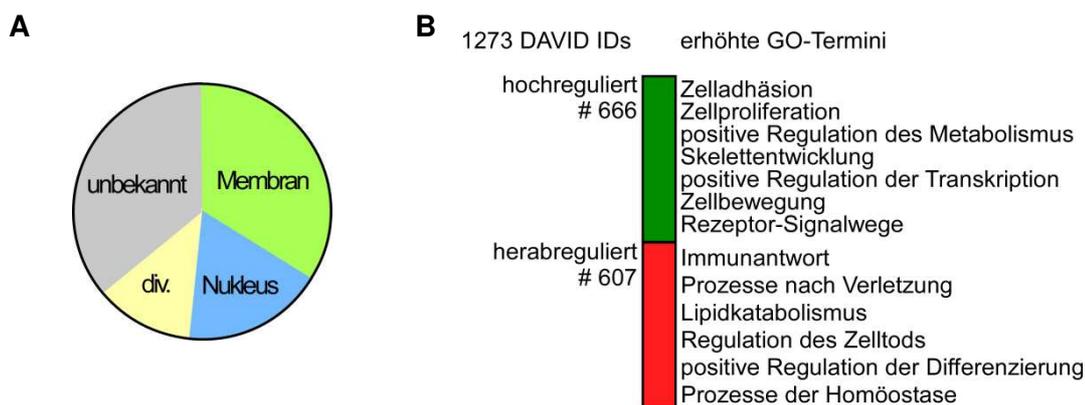
Durch die Gruppierung mit der Software *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* wurden die veränderten Gene verschiedenen Bereichen zugeordnet. Die *Microarray*-Genliste wurde auf Gene untersucht, die einen Einfluss im Knochengewebe und im hämatopoetischen System, einen Einfluss in der Entwicklung des Skeletts und einen Einfluss auf transkriptionelle Regulation besitzen.

Durch den *Knock-down* von *Tal1* wurde die Expression von 1273 Genen mit einer *DAVID-ID* verändert. Die Analyse zur Expression in Geweben zeigte, dass 3,8 % der veränderten Gene in Verbindung mit der Expression in Makrophagen und 0,9 % der veränderten Gene mit der Expression im hämatopoetischen System beschrieben sind.

Zunächst wurde analysiert, welchen Bereichen die meisten Gene zugeordnet werden konnten. Dabei zeigte sich, dass 253 Gene der Ionen-Bindung, 60 Gene der extrazellulären Matrix, 72 Gene der Zelladhäsion und 40 Gene der Vesikel-Formation verändert vorlagen. Außerdem zeigte sich, dass durch den *Tal1-Knock-down* 18 Gene der Kollagen-Entwicklung, 22 Gene der Knochenentwicklung und 41 Gene des Skelett-System verändert vorlagen. Durch den *Tal1-Knock-down* wurden die Gene von *SOX9* und *MEF2C* beeinflusst, beide Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von Chondrozyten und die Entstehung von Kollagen besitzen (Yang X und Karsenty G, 2002). In der Kategorie der Skelett-Entwicklung finden sich Gene wie Matrix-Metalloproteinasen, *Acp5* (auch *TRAP*, *tartrate resistant acid phosphatase*) oder *TGFβ* (*transforming growth factor beta*). *Acp5* findet sich auch in der Kategorie „Entwicklung von Knochen“.

Der Kategorie „Transkriptionsfaktoren“ wurden 82 Gene zugeteilt, die durch den *Tal1-Knock-down* eine veränderte Expression im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Darunter Transkriptionsfaktoren wie *MEF2C*, der entscheidend für die Chondrozyten-Entwicklung ist (Arnold MA *et al.*, 2007). Auch die Expression des Transkriptionsfaktors *CEBPβ*, der einen negativen Effekt auf den RANKL-Signalweg besitzt (Smink JJ und Leutz A, 2009), scheint von *Tal1* reguliert zu werden. Außerdem liegt eine veränderte Expression der Gene für *Ly1* und *Tal2*, die ebenso wie *Tal1* zur Familie der bHLH-Transkriptionsfaktoren gehören, vor (Baer R, 1993). Der *Knock-down* von *Tal1* hatte auch Auswirkungen auf die Expression von *E47* (*TCF3*, *transcription factor 3*), der als Interaktionspartner von *Tal1* beschrieben ist (Lahlil R *et al.*, 2004).

In Bezug auf die Lokalisation zeigte sich, dass der Hauptteil der veränderten Gene eine Lokalisation im Kern bzw. in der Membran besaßen (Abb.4.23A). Insgesamt waren 666 Gene hochreguliert mit GO-Termini, z.B. in Zelladhäsion oder Skelettentwicklung. 607 Gene waren herabreguliert mit GO-Termini in z.B. Immunantwort oder Regulation des Zelltods (Abb.4.23B).

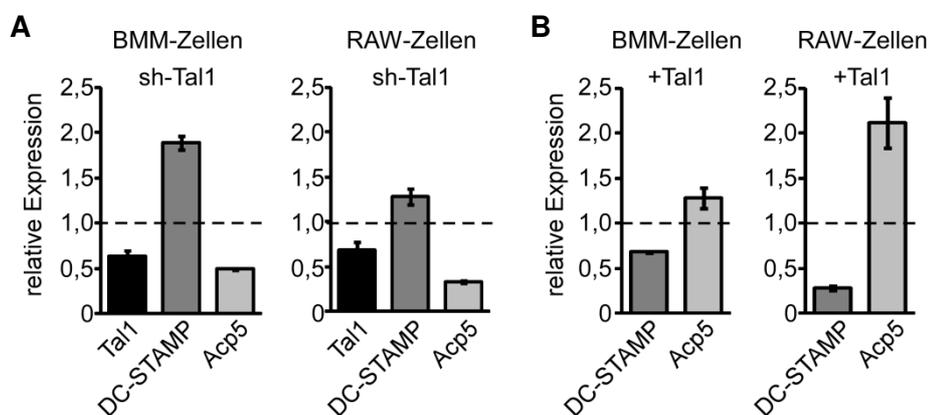


**Abb.4.23: Kategorisierung der regulierten Gene des *Microarrays*.** Die Auswertung der Genliste des *Microarrays* erfolgte mit der Software *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* (Huang DW et al., 2009). **(A)** Die Analyse ergab 1273 Gene mit einer DAVID-ID, die eine regulierte Genexpression aufweisen. Davon waren die meisten der Membran- bzw. Kernlokalisierung zuzuordnen. **(B)** Von den Genen mit veränderter Expression waren 666 Gene in den BMM-sh-Tal1 hochreguliert, 607 Gene waren in den BMM-sh-Tal1 herabreguliert.

Die *Array*-Analyse erbrachte 607 Gene, die aufgrund des *Tal1-Knock-downs* herabreguliert waren. *EAR5* (*eosinophil associated, ribonuclease A family, member 5*), *SLPI* (*secretory leukocyte peptidase inhibitor*), *IRG1* (*immunoresponsive gene 1*), *S100A8* (*S100 calcium binding protein A8*) und *FPR1* (*formyl peptide receptor 1*) waren in BMM-sh-Tal1 am stärksten herabreguliert. Unter den herabregulierten Genen konnten ebenfalls *CTSK*, *MMP9*, *Acp5*, *IL6* (*interleukin 6*) und *RUNX3* (*runt-related transcription factor 3*) gefunden werden. Außerdem führte der *Tal1-Knock-down* zu 666 Genen, die hochreguliert waren. Die am stärksten hochregulierten Gene waren *IGFB2* (*insulin like growth factor binding protein 2*), *COL8A2* (*collagen, type VIII, alpha 2*), *CXCL12* (*chemokine C-X-C motif ligand 12*), *TSLP* (*thymic stromal lymphopoietin*) und *ASB10* (*ankyrin repeat and SOCS box-containing 10*). In der Liste der hochregulierten Gene konnten auch *DC-STAMP*, *ATP6V0D2* (*d2 isoform of vascular ATPase V0 domain*) und *MEF2C* (*myocyte specific enhancer factor 2C*) gefunden werden. Im Vergleich der *Array*-Ergebnisse mit einer genomweiten Studie zur Identifikation von Tal1-Zielgenen in hämatopoetischen Vorläuferzellen zeigte sich eine Überlappung von etwa 300 Genen, d.h. dies sind vermutlich direkte Zielgene von Tal1 (Wilson NK et al., 2010).

#### 4.4.3 Vergleich der Ergebnisse des Microarray mit Daten aus RAW264.7-hTal1-Zellen

Die Genexpressionsanalyse der Tal1-überexprimierenden RAW264.7-Zellen und der *Microarray* nach *Tal1-Knock-down* ergaben eine Reihe von Genen, deren Expression durch Tal1 beeinflusst wurde. Im Vergleich beider Analysen zeigte sich eine Überlappung bei der Regulation von *DC-STAMP*, *Acp5*, *CTSK* und *MMP9*. Die Gene *GPNMB*, *CD11B* oder *MITF* wurden in der RAW264.7-hTal1-Zelllinie von Tal1 beeinflusst, wurden jedoch in der *Microarray*-Analyse nicht identifiziert. Die Osteoklasten-Differenzierung wird durch Tal1 beeinflusst, dies könnte mit einem Tal1-Effekt auf die Zellfusion zusammenhängen, daher wurden im folgenden DC-STAMP untersucht. Außerdem zeigte sich in den Analysen der Osteoklasten-Differenzierung, dass die Zellen in der Lage sind *Acp5* zu exprimieren, d.h. späte Differenzierungsschritte scheinen von Tal1 nicht beeinflusst zu werden. Es zeigte sich, dass der *Knock-down* von Tal1 sowohl in BMM-Zellen als auch in RAW264.7-Zellen zu einer verstärkten Expression von *DC-STAMP* führte. Die Expression von *Acp5* wurde reprimiert (Abb.4.24A). Dieser Effekt von Tal1 konnte ebenfalls in der *Microarray*-Analyse beobachtet werden. *Vice versa* verursachte die Überexpression von Tal1 eine Reduktion von *DC-STAMP* in BMM- und RAW264.7-Zellen. Die Expression von *Acp5* wurde induziert (Abb.4.24B).



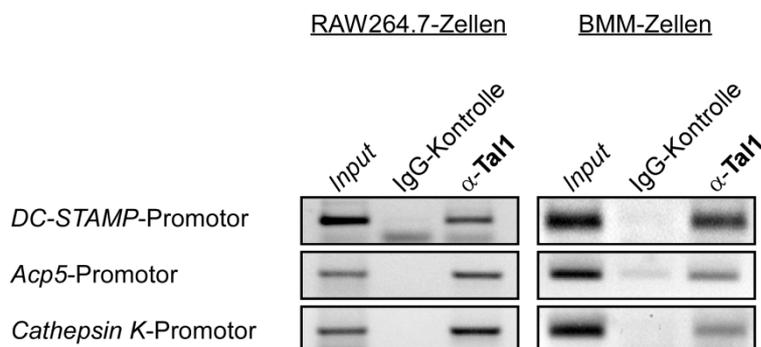
**Abb.4.24: Genexpressionsanalyse von *DC-STAMP* und *Acp5*.** (A) Die qRT-PCR zeigte eine induzierte Expression von *DC-STAMP* in BMM- und RAW264.7-Zellen nach *Knock-down* von Tal1. Die Expression von *Acp5* wurde in beiden Zellsystemen aufgrund des Tal1-*Knock-downs* reduziert. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in der *Microarray*-Analyse. (B) *Vice versa* zeigte die Genexpressionsanalyse der Tal1-Überexpression in BMM- bzw. RAW264.7-Zellen eine Inhibierung von *DC-STAMP* und eine Aktivierung von *Acp5*.

Aufgrund der Genexpressionsanalysen und der *Microarray*-Analyse konnten *DC-STAMP*, *Acp5*, *MMP9* und *CTSK* als potentielle Zielgene von Tal1 festgestellt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob es sich um direkte Zielgene von Tal1 handelte.

#### 4.4.4 Tal1 bindet im Promotorbereich Osteoklasten-spezifischer Gene

Die Osteoklasten-spezifischen Gene *DC-STAMP*, *Acp5*, *CTSK* und *MMP9* konnten als potentielle Zielgene von Tal1 identifiziert werden. Die Promotorbereiche aller Gene wurden als nächstes auf potentielle Tal1-Bindestellen untersucht. Eine Analyse der Promotorregionen der Gene anhand der Software TESS (*transcription element search system*; Schug J, 2008) ergab mehrere E-box-Motive, die potentielle Tal1-Bindestellen darstellen. Eine Ausnahme war *MMP9*, dessen Promotorregion keine E-Box aufwies, daher erfolgte hier keine weitere Analyse. Die Tal1-Bindung an die Promotorbereiche von *DC-STAMP*, *Acp5* und *CTSK* wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) untersucht. Dazu wurden RAW264.7- bzw. BMM-Zellen geerntet und ChIP-Lysate nach *Crosslinking* der Proteine an die DNA hergestellt. Die Lysate wurden mit spezifischem Tal1-Antikörper inkubiert und die Komplexe mittels magnetischer Protein G-Beads aufgereinigt. Anschließend wurden die präzipitierten DNA-Fragmente in einer PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 3.3.10).

Dadurch konnte festgestellt werden, dass Tal1 direkt an die Promotorregion der untersuchten Gene von *DC-STAMP*, *Acp5* und *CTSK* bindet. Die Tal1-Bindung an die untersuchten Promotoren von *DC-STAMP*, *Acp5* und *CTSK* konnte in RAW264.7-Zellen und in BMM-Zellen nachgewiesen werden (Abb.4.25).



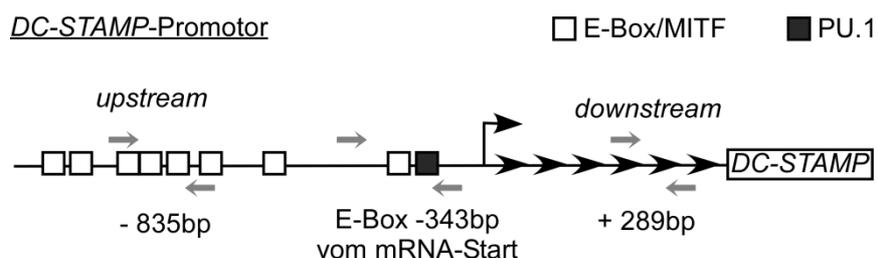
**Abb.4.25: Tal1 bindet an die Promotorbereiche potentieller Zielgene.** Die Analyse der Promotorregion von *DC-STAMP*, *Acp5* und *CTSK* erbrachte potentielle Tal1-Bindestellen, so genannte E-Box-Motive. Die Chromatin-Immunopräzipitation mit spezifischem Tal1-Antikörper zeigte, dass Tal1 in der Lage ist im Promotorbereich der Zielgene zu binden. Die Tal1-Bindung konnte in RAW264.7- und BMM-Zellen nachgewiesen werden.

Die Genexpressionsanalyse der RAW264.7-hTal1-Zellen, der *Microarray* nach *Tal1-Knock-down* in BMM-Zellen und die Chromatin-Immunopräzipitation deuteten gemeinsam auf einen Tal1-Einfluss auf *DC-STAMP*, *Acp5* und *CTSK* hin. Die biologischen Auswirkungen von Tal1 auf die Osteoklasten-Differenzierung, die in Abschnitt 3.3 dargestellt wurden, zeigten einen inhibierenden Effekt von Tal1 auf die Bildung von multinukleären Zellen. Das Fehlen der multinukleären Zellen nach Tal1-Überexpression könnte durch die Tal1-Regulation von *DC-STAMP* erklärt werden, da *DC-STAMP* für die Zell-Zell-Fusion verantwortlich ist. Im folgenden Abschnitt wurde die Regulation von *DC-STAMP* in Abhängigkeit von Tal1 untersucht.

#### 4.5 *Tal1 interagiert mit PU.1 und MITF*

Der Transkriptionsfaktor Tal1 ist ein *basic helix-loop-helix*-Protein der Klasse B und interagiert z.B. mit anderen bHLH-Proteinen der Klasse A als Heterodimer (Hsu HL *et al.*, 1991). Tal1 ist in der Lage an sogenannte E-Boxen mit der Sequenz CANNTG im Promotorbereich von Zielgenen zu binden (Nielsen AL *et al.*, 1996). Je nach Zusammensetzung des transkriptionellen Komplexes kommt es dann zur Aktivierung oder Repression der Transkription (Huang S *et al.*, 1999; Huang S und Brandt SJ, 2000; Huang S *et al.*, 2000; Lahlil R *et al.*, 2004).

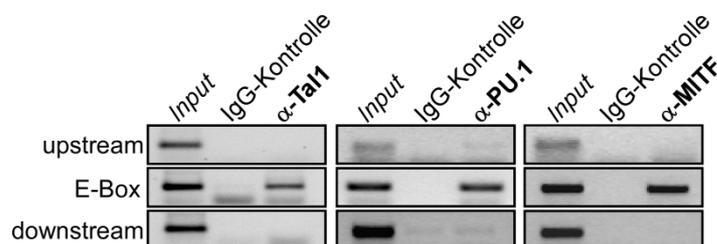
Die Genexpressionsanalysen konnten bereits zeigen, dass Tal1 das Osteoklastenspezifische Gen *DC-STAMP* beeinflusst. *DC-STAMP* ist ein entscheidender Faktor während der Fusion der mononukleären Osteoklasten zu aktiven, multinukleären Osteoklasten (Yagi M *et al.*, 2005). Mittels TESS-Analyse wurde der Promotorbereich des murinen *DC-STAMP* auf potentielle Bindestellen für Tal1, MITF und PU.1 untersucht. Es zeigte sich, dass in diesem Bereich einige potentielle E-Boxen „CANNTG“ vorhanden sind. Der Transkriptionsfaktor MITF bindet ebenfalls an DNA-Sequenzen mit dem E-Box-Motiv. Im Bereich um -343 Basenpaare vor dem Transkriptionsstartpunkt konnte ebenfalls eine potentielle PU.1-Bindestelle festgestellt werden, die sich durch eine purinreiche Sequenz auszeichnet. In Abb.4.26 ist der Promotorbereich von *DC-STAMP* schematisch, basierend auf der TESS-Analyse, dargestellt. Die E-Boxen sind als weiße Boxen dargestellt, diese kommen vermehrt im „*upstream*“-Bereich des Promotors vor. Eine Kombination aus E-Box und potentieller PU.1-Bindestelle befindet sich um -343 bp. Im „*downstream*“-Bereich befinden sich keine potentiellen Bindestellen für PU.1, MITF oder Tal1.



**Abb.4.26: Schematische Darstellung des murinen *DC-STAMP*-Promotorbereichs.** Die Sequenz des murinen Promotorbereichs von *DC-STAMP* wurde mit Hilfe der TESS-Analyse auf möglich Bindestellen für Tal1, PU.1 und MITF untersucht. Tal1 und MITF binden an E-Box-Sequenzen, während PU.1 an purinreiche Sequenzen bindet. Die weißen Boxen markieren E-Box-Sequenzen, die graue Box die potentielle PU.1-Bindestelle. Die Pfeile kennzeichnen die Primer für Chromatin-Immunopräzipitations-Analysen.

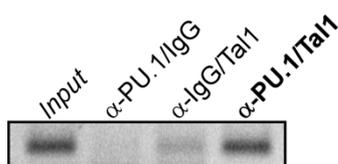
Die Tal1-Bindung an den Promotor von *DC-STAMP* konnte bereits gezeigt werden (Abb.4.25). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Tal1 auch an andere Bereiche „upstream“ oder „downstream“ des *DC-STAMP*-Promotors bindet. Auch die Bindung der Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF in diesen Bereichen wurde analysiert. Dazu wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) der einzelnen Transkriptionsfaktoren in RAW264.7-Zellen durchgeführt.

Die Bindung von Tal1 an die E-Box im Bereich -343 bp bestätigte sich. In anderen Bereichen des *DC-STAMP*-Promotors konnte keine Bindung festgestellt werden (Abb.4.27, links). Die potentielle Bindestelle für PU.1 liegt in der Nähe der nachgewiesenen Tal1-Bindestelle und auch für PU.1 war hier eine Bindung zu erkennen (Abb.4.27, mittig), ebenso wie für MITF (Abb.4.27, rechts). In „upstream“- und „downstream“-Bereichen zeigte sich auch für PU.1 und MITF keine Bindung.



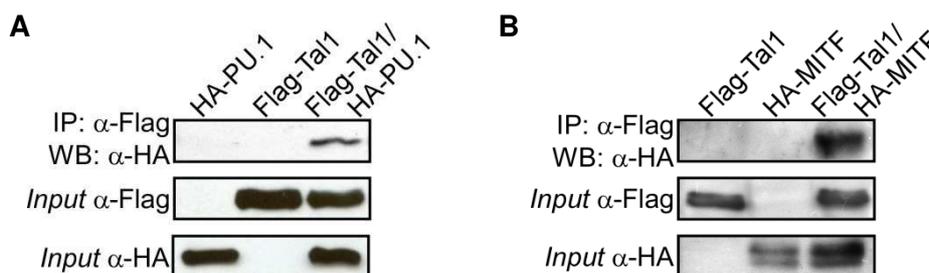
**Abb.4.27: Chromatin-Immunopräzipitation von Tal1, PU.1 und MITF auf dem *DC-STAMP*-Promotor.** Die ChIP-Analyse des *DC-STAMP*-Promotors stellt die Bindung von Tal1 an die E-Box im Bereich -343 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt dar. Im Bereich vor oder nach dieser E-Box fand keine Tal1-Bindung statt. Das gleiche Bindungsmuster zeigte sich auch für PU.1 und MITF. Für die ChIP-Analyse wurden RAW264.7-Zellen und die in Abb.4.26 angezeigten Primer (Pfeile) verwendet.

Die untersuchten Transkriptionsfaktoren Tal1, PU.1 und MITF belegten den Promotor von *DC-STAMP* im gleichen Bereich, dies konnte in individuellen ChIP-Analysen für jeden Transkriptionsfaktor gezeigt werden. Die Bindung der Faktoren wurde in einem sequentiellen ChIP untersucht, um die gleichzeitige Bindung der Transkriptionsfaktoren an den *DC-STAMP*-Promotor zu zeigen. Die ChIP-Lysate von RAW264.7-Zellen wurden zunächst mit dem ersten spezifischen Antikörper inkubiert. Nach Präzipitation mittels magnetischer Protein G-Beads und Elution, erfolgte die Inkubation mit dem zweiten spezifischen Antikörper. Anschließend wurden die Antikörper-Protein-DNA-Komplexe erneut mit magnetischen Protein G-Beads präzipitiert. Nach Entfernung der Proteine konnten die DNA-Fragmente mittels PCR analysiert werden. Während die Bindung von MITF und Tal1 an den *DC-STAMP*-Promotor nicht gezeigt werden konnte, bestätigte die PCR-Analyse des sequentiellen ChIP von Tal1 und PU.1 die gemeinsame Bindung auf dem *DC-STAMP*-Promotor dieser Transkriptionsfaktoren (Abb.4.28).



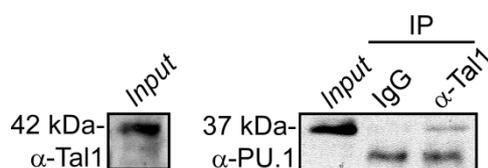
**Abb.4.28: Sequentieller ChIP von Tal1 und PU.1 auf dem *DC-STAMP*-Promotor.** ChIP-Lysate aus RAW.264.7-Zellen wurden verwendet, um die Interaktion von Tal1 und PU.1 auf dem *DC-STAMP*-Promotor zu analysieren. Es zeigte sich eine simultane Bindung von Tal1 und PU.1 auf dem *DC-STAMP*-Promotor.

Es konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Tal1 mit den Osteoklastenspezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF an den Promotorbereich von *DC-STAMP* bindet. Als nächstes stellte sich die Frage, ob Tal1 in der Lage ist mit diesen Faktoren zu interagieren. Dazu wurde eine Co-Immunopräzipitation in 293T-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Expressionskonstrukten von Tal1 und PU.1 bzw. Tal1 und MITF transfiziert. Tal1 lag als Flag-Fusionsprotein vor und konnte mit anti-Flag-Agarose-Beads präzipitiert werden. Die potentiellen Interaktionspartner PU.1 und MITF wurden als HA-Fusionsproteine exprimiert. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die potentiellen Interaktionspartner im anschließenden Western Blot analysiert. Der Nachweis der Immunopräzipitation erfolgte anhand eines anti-HA-Antikörpers. Die *Input*-Kontrollen wurden mit anti-Flag für Tal1, und anti-HA für PU.1 und MITF nachgewiesen. In Abb.4.29 ist zu erkennen, dass es in entsprechend transfizierten 293T-Zellen zu einer Interaktion von Tal1 und PU.1 bzw. von Tal1 und MITF kommt.



**Abb.4.29: Tal1 interagiert mit PU.1 und MITF.** 293T-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Tal1 und PU.1 bzw. MITF transfiziert. Das Flag-Tal1-Fusionsprotein wurde mit anti-Flag-Agarose-Beads aus den Lysaten präzipitiert und die potentiellen Interaktionspartner im Western Blot mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Es zeigte sich, dass Tal1 mit PU.1 (**A**) und MITF (**B**) interagiert. Der Versuch zur Interaktion von PU.1 und Tal1 wurden von Dr. J. Lausen durchgeführt (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main).

Um die Interaktion von Tal1 mit den Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF auch auf endogenem Level zu zeigen und somit die biologische Relevanz dieser Interaktion in einem Zellkulturmodell für Osteoklasten-Differenzierung zu verdeutlichen, wurde eine endogene Immunopräzipitation durchgeführt. Dazu wurden Lysate aus RAW264.7-Zellen hergestellt und mit dem spezifischen Antikörper für den potentiellen Tal1-Interaktionspartner inkubiert. Die Aufreinigung der Antikörper-Protein-Protein-Komplexe erfolgte mit Agarose-Beads. Die Komplexe wurden im SDS-Gel aufgetrennt und Tal1 mit einem anti-Tal1-Antikörper nachgewiesen. Die Interaktion von MITF und Tal1 konnte in RAW264.7-Zellen nicht gezeigt werden. Jedoch bestätigte sich die Interaktion von PU.1 und Tal1 in RAW264.7-Zellen auf endogenem Level (Abb.4.30).



**Abb.4.30: Tal1 interagiert mit PU.1 in RAW264.7-Zellen.** Mittels endogener Immunopräzipitation von PU.1 aus RAW264.7-Zellen konnte die Interaktion mit Tal1 festgestellt werden. Der Nachweis erfolgte im Western Blot mit einem anti-Tal1-Antikörper. Die Expression der Interaktionspartner in den RAW264.7-Zellen wird durch die *Input*-Proben verdeutlicht.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Interaktion von Tal1 und den Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF auf einer direkten Protein-Protein-Interaktion beruht. Tal1 wurde als GST-Fusionsprotein in *E.coli* BL21 exprimiert und mit Hilfe von GST-Beads aufgereinigt. Die potentiellen Interaktionspartner wurden *in vitro* translatiert,

dazu wurde das *TNT Quick coupled transcription/ translation system* (Promega, Madison) verwendet. Während der Translation wurde radioaktiv-markiertes  $^{35}\text{S}$ -Methionin in die Proteine eingebaut. Das Tal1-GST-Protein wurde gekoppelt an die GST-Beads mit dem  $^{35}\text{S}$ -markiertem PU.1 bzw. MITF inkubiert. Nach dem Waschen der Beads erfolgte die Auftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender autoradiographischer Auswertung. Es zeigte sich, dass die Interaktion von Tal1 mit PU.1 bzw. MITF auf einer direkten Protein-Protein-Interaktion beruht (Abb.4.31).



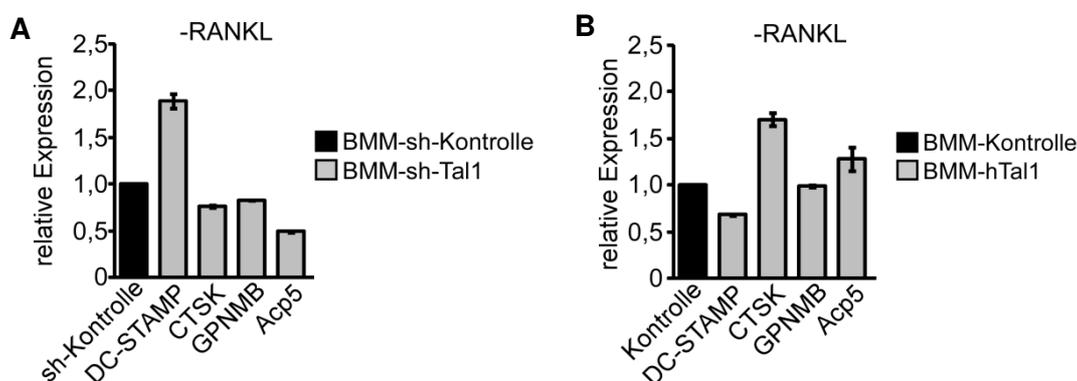
**Abb.4.31: GST-Pulldown von Tal1 mit PU.1 und MITF.** (A) GST-Tal1 wurde mit *in vitro* translatiertem und  $^{35}\text{S}$  radioaktiv-markiertem PU.1 inkubiert. Die Autoradiographie zeigt die Interaktion von Tal1 und PU.1. (B) GST-Tal1 wurden mit *in vitro* translatiertem und  $^{35}\text{S}$  radioaktiv-markiertem MITF inkubiert. Die Autoradiographie nach Auftrennung zeigt die Interaktion von Tal1 und MITF. Die Versuche wurden von Olga Bölling durchgeführt (AG Dr. J. Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main).

Die Versuche zur Analyse der Interaktion von Tal1 mit PU.1 und MITF zeigten, dass die untersuchten Transkriptionsfaktoren direkt interagieren und an den Promotorbereich des murinen *DC-STAMP* binden.

#### 4.6 Tal1 wirkt als Repressor von DC-STAMP

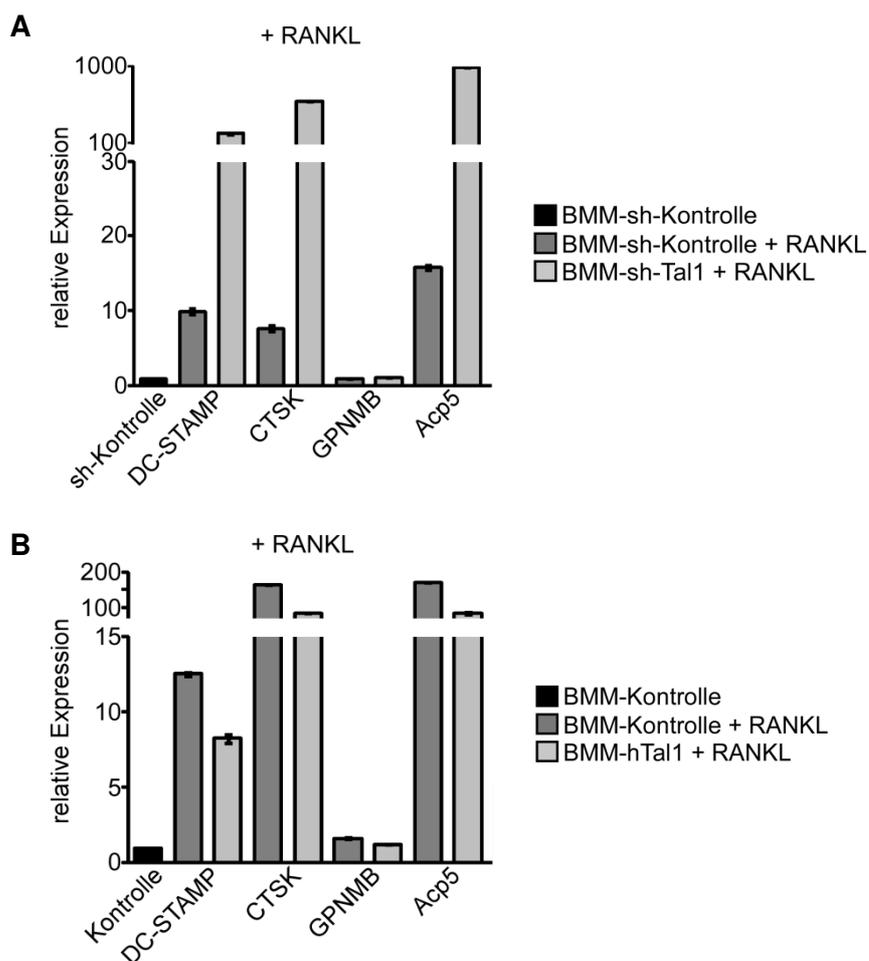
*DC-STAMP* ist maßgeblich an der Zell-Zell-Fusion während der Osteoklasten-Differenzierung beteiligt (Yagi M *et al.*, 2005). Durch die RANK-RANKL-Signalkaskade wird die Expression von *DC-STAMP* induziert und der Rezeptor wird an der Oberfläche von fusionskompetenten, mononukleären Osteoklasten exprimiert, die dann miteinander fusionieren können (Kim K *et al.*, 2008; Kim T *et al.*, 2010). Die biologische Relevanz von Tal1 während der Osteoklasten-Differenzierung wurde bereits in Abschnitt 4.3 dargestellt. Die Überexpression von Tal1 zeigte einen inhibierenden Einfluss auf die Ausbildung multinukleärer Zellen. Anschließende Genexpressionsanalysen ergaben eine Reihe von Osteoklasten-spezifischen Genen, die von Tal1 reguliert werden. Unter anderem zeigten die bisherigen Experimente einen Einfluss von Tal1 auf die Expression von *DC-STAMP*. Tal1 ist in der Lage an den Promotorbereich von *DC-STAMP* zu binden, auch PU.1 und MITF binden an den *DC-STAMP*-Promotor.

Als nächstes wurde der Einfluss von Tal1 auf *DC-STAMP* untersucht, dabei wurde der Tal1-Effekt vor allem im Zusammenhang mit RANKL-induzierten Veränderungen während der Differenzierung analysiert. Die in Abschnitt 4.4. teilweise gezeigten Genexpressionsanalysen in BMM-Zellen sind hier in Abb.4.32 erneut dargestellt. Es war zu erkennen, dass der *Knock-down* von Tal1 in BMM-Zellen die Expression von *DC-STAMP* induziert, während die Expression von *CTSK* (*cathepsin K*), *GPNMB* (*transmembrane glycoprotein nmb*) und *Acp5* (*TRAP, tartrate resistant acid phosphatase*) inhibiert wurde. Den gegenteiligen Effekt erzielte die Überexpression von Tal1. Die Expression von *DC-STAMP* wurde inhibiert, *CTSK* und *ACP5* wurden induziert. Auf *GPNMB* zeigte die Tal1-Überexpression keinen Einfluss.



**Abb.4.32: Vergleich des *Knock-downs* und der Überexpression von Tal1.** (A) Die Genexpressionsanalyse des *Knock-downs* von Tal1 in BMM-Zellen verdeutlicht einen induzierenden Einfluss von Tal1 auf *DC-STAMP*. Die Expression von *CTSK* und *Acp5* wurde reprimiert. (B) Die Genexpressionsanalyse der Überexpression von Tal1 in BMM-Zellen zeigt den gegenteiligen Effekt zum *Knock-down*. Die Expression von *DC-STAMP* wurde reprimiert, während *CTSK* und *Acp5* verstärkt exprimiert werden. Auf *GPNMB* zeigte sich kein Tal1-Einfluss.

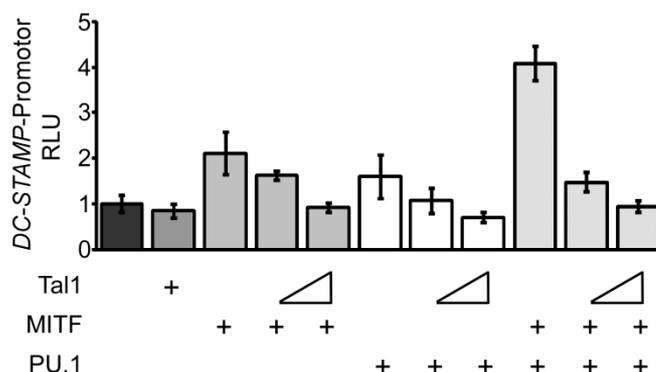
Um die Genexpression auch in Zusammenhang mit RANKL zu untersuchen, wurden die BMM-Zellen nach Transduktion des Tal1-Konstrukts für den *Knock-down* bzw. für die Überexpression mit RANKL behandelt. Nach drei Tagen Inkubation mit RANKL wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Die RANKL-Behandlung in der Kontrolle führte zu einer Induktion der Osteoklasten-spezifischen Gene *DC-STAMP*, *CTSK* und *Acp5* (Abb.4.33A, dunkelgraue Balken). Der *Knock-down* von Tal1 sorgte für eine verstärkte Induktion der Expression von *DC-STAMP*, aber auch von *CTSK* und *Acp5* (Abb.4.33A, hellgraue Balken). *Vice versa* verursachte die Überexpression von Tal1 in BMM-Zellen nach RANKL-Behandlung eine verringerte Expression von *DC-STAMP*, *CTSK* und *Acp5* (Abb.4.33B, hellgraue Balken). Die Expression von *GPNMB* wurde durch Tal1 nicht beeinflusst und dient hier als Kontrolle.



**Abb.4.33: Einfluss von Tal1 auf Zielgene nach RANKL-Behandlung.** (A) Die Inkubation der BMM-Zellen mit RANKL sorgte für eine Induktion von *DC-STAMP*, *CTSK* und *Acp5* (dunkelgraue Balken). Im Vergleich mit der physiologischen Induktion durch RANKL zeigte sich, dass der *Knock-down* von Tal1 die Expression von *DC-STAMP* verstärkte. Auch die Expression von *CTSK* und *Acp5* wurden induziert (hellgraue Balken). (B) Die Überexpression von Tal1 in BMM-Zellen führte zu einem gegenteiligen Effekt auf die Expression von *DC-STAMP*, *CTSK* und *Acp5* im Vergleich zum *Knock-down*. Es zeigte sich eine verminderte Induktion von *DC-STAMP*, *CTSK* und *Acp5* in den Tal1-überexprimierenden Zellen nach RANKL-Behandlung (hellgraue Balken).

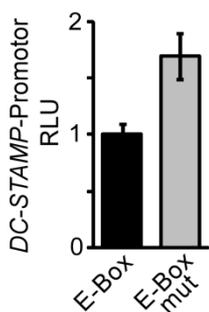
Die Genexpressionsanalysen nach *Knock-down* und Überexpression von Tal1 verdeutlichten einen inhibierenden Effekt von Tal1 auf die Expression von *DC-STAMP*. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation wurde gezeigt, dass Tal1, PU.1 und MITF an den Promotor von *DC-STAMP* binden, daher wurde in der folgenden Reporteragen-Analyse der Einfluss von Tal1 in Zusammenhang mit PU.1 und MITF untersucht. Dazu wurden RAW264.7-Zellen mit einem Luciferase-Reporteragen-Konstrukt transfiziert, das 682 bp vom Promotorbereich des murinen *DC-STAMP* enthält (Yagi M *et al.*, 2007).

Die Promotoranalyse von *DC-STAMP* zeigte, dass Tal1 allein nicht in der Lage war das Promotorkonstrukt zu aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF induzierten die Luciferase-Aktivität etwa 2-fach. Zusammen sorgten MITF und PU.1 für eine 4-fache Aktivierung des *DC-STAMP*-Promotorkonstrukts. Die Aktivierung des *DC-STAMP*-Promotorkonstrukts durch MITF und PU.1 wurde durch Co-Transfektion von Tal1 bis auf den Basalwert des *DC-STAMP*-Promotors reprimiert (Abb.4.34).



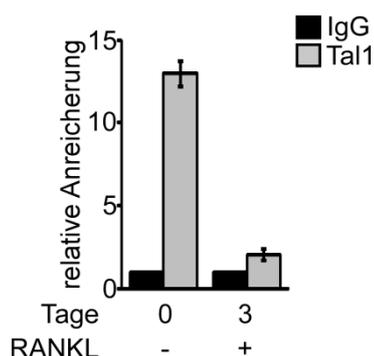
**Abb.4.34: Promotorstudie von *DC-STAMP* in Abhängigkeit von Tal1, PU.1 und MITF.** RAW264.7-Zellen wurden mit einem *DC-STAMP*-Promotorkonstrukt transfiziert. Tal1 allein zeigte keine Aktivierung der Luciferase. PU.1 und MITF aktivierten den Promotor, zusammen verstärkte sich dieser Effekt. Tal1 zeigte eine konzentrationsabhängige Reprimierung der von MITF und PU.1 verursachten Aktivierung des *DC-STAMP*-Promotorkonstrukts.

Wie bereits in Abb.4.26 dargestellt, besitzt der Promotorbereich von *DC-STAMP* mehrere E-Boxen, d.h. potentielle Bindestellen für Tal1. Die Bindung von Tal1 an die E-Box -343 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt von *DC-STAMP* konnte mittels Chromatin-Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Abb.4.27). Diese E-Box ist ebenfalls im Promotorkonstrukt von *DC-STAMP* enthalten. Durch Mutagenese wurde die CAGCTG-Sequenz der E-Box in AAGCTG verändert, um zu analysieren, ob Tal1 an diese E-Box des *DC-STAMP*-Promotors bindet. Zur Analyse der Auswirkungen dieser Mutation wurden das *DC-STAMP*-Promotorkonstrukt und die mutierte Variante in RAW264.7-Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die mutierte Variante des *DC-STAMP*-Promotorkonstrukts wies eine höhere Luciferase-Aktivität als das Wildtyp-Konstrukt auf (Abb.4.35). Die im Reporter-Gen-Konstrukt enthaltene E-Box scheint die Tal1-Bindestelle zu sein, denn nach Mutation ist Tal1 nicht mehr in der Lage an den Promotor von *DC-STAMP* zu binden, was zu einer verstärkten Luciferase-Aktivität führt. Dies zeigt, dass Tal1 eine reprimierende Funktion auf die Regulation der *DC-STAMP*-Genexpression besitzt.



**Abb.4.35: Einfluss der mutierten E-Box-Sequenz auf die *DC-STAMP*-Promotoraktivität.** Das *DC-STAMP*-Promotorkonstrukt beinhaltet eine E-Box-Sequenz. Nach Mutation der E-Box-Sequenz wurden das Wildtyp- und das mutierte Konstrukt in RAW264.7-Zellen transfiziert. Die Mutation der E-Box-Sequenz führte zu einer verstärkten Luciferase-Aktivität.

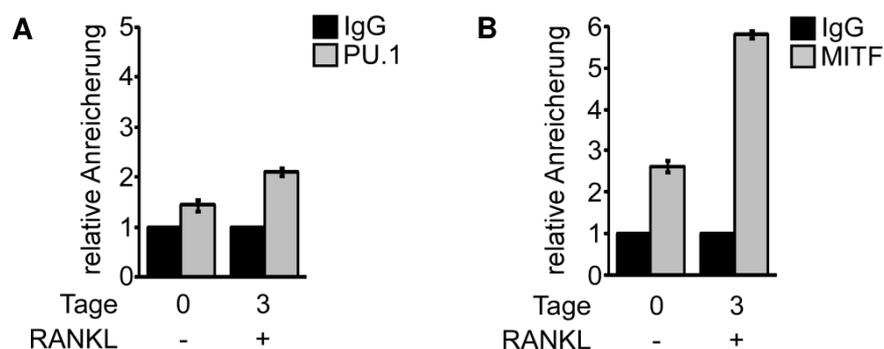
Die Genexpressionsanalysen nach Tal1 *Knock-down* und Überexpression zeigten einen Einfluss auf die *DC-STAMP*-Expression, mittels Chromatin-Immunopräzipitation bestätigte sich die Bindung von Tal1 an den *DC-STAMP*-Promotor und mittels Luciferase-Analysen konnte ein reprimierender Effekt von Tal1 auf *DC-STAMP* festgestellt werden. Daher wurde als nächstes das Verhalten von Tal1 in Bezug auf dessen Bindung auf dem *DC-STAMP*-Promotor während der RANKL-Behandlung, d.h. während der Osteoklasten-Differenzierung, untersucht. Dazu wurden primäre Monozyten (BMM-Zellen) aus BL/6-Mäusen isoliert und mit RANKL behandelt. Nach drei Tagen RANKL-Inkubation wurden die Zellen geerntet und CHIP-Lysate erstellt. Es folgte eine Chromatin-Immunopräzipitation mit Tal1 von RANKL-behandelten Lysaten im Vergleich zu Lysaten, die nicht mit RANKL inkubiert waren. Die Analyse der Promotor-Belegung mittels quantitativer PCR (qPCR) zeigte, dass Tal1 den *DC-STAMP*-Promotor besetzte, aber während der Osteoklasten-Differenzierung wurde die Tal1-Bindung aufgehoben (Abb.4.36).



**Abb.4.36: Einfluss von RANKL auf die Tal1-Belegung des *DC-STAMP*-Promotors.** Die qPCR der Chromatin-Immunopräzipitation mit Tal1 in BMM-Zellen ohne RANKL-Behandlung verdeutlichte die Tal1-Bindung an den *DC-STAMP*-Promotor. Während der Osteoklasten-Differenzierung kam es zu einer verringerten Tal1-Bindung an den *DC-STAMP*-Promotor in BMM-Zellen, die drei Tage mit RANKL behandelt wurden.

Aufgrund der CHIP-Analyse der Tal1-Bindung an den *DC-STAMP*-Promotor konnte festgestellt werden, dass es während der Osteoklastogenese zu einer Reduktion der Tal1-Bindung kommt. Abschließend wurde untersucht, wie sich die Bindung der Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF während der Osteoklasten-Differenzierung auf dem *DC-STAMP*-Promotor verändert. Auch hier wurden BMM-Zellen ohne (-) und mit (+) RANKL-

Behandlung verwendet. In Abb.4.37 ist zu erkennen, dass beide Faktoren während der Osteoklastogenese verstärkt den *DC-STAMP*-Promotor belegen. Die Bindung von PU.1 an *DC-STAMP* betrug in etwa 1,3-fach mehr als die IgG-Kontrolle und nahm auf etwa 2-fach nach RANKL-Inkubation zu (Abb.4.37A). Die Bindung von MITF an den *DC-STAMP*-Promotor war mit etwa 2,5-fach über der IgG-Kontrolle deutlicher als die PU.1-Bindung. Während der Osteoklasten-Differenzierung steigerte sich die MITF-Belegung auf das 6-fache (Abb.4.37B).



**Abb.4.37: Einfluss von RANKL auf die PU.1- und MITF-Bindung an den *DC-STAMP*-Promotor. (A)** Chromatin-Immunpräzipitation von PU.1 in BMM-Zellen ohne (-) und mit (+) RANKL-Inkubation. Die Bindung von PU.1 an den *DC-STAMP*-Promotor verstärkt sich während der Osteoklasten-Differenzierung. **(B)** Chromatin-Immunpräzipitation von MITF in BMM-Zellen ohne (-) und mit (+) RANKL-Inkubation. Die Bindung von MITF an den *DC-STAMP*-Promotor verstärkt sich während der Osteoklasten-Differenzierung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Tal1 in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten exprimiert wird. Die Überexpression von Tal1 verursacht eine Blockade der Osteoklasten-Differenzierung und der *Knock-down* von Tal1 resultiert in einer verstärkten Ausbildung multinukleärer Zellen. Der Tal1-Einfluss lässt sich auf molekularer Ebene unter anderem durch die Interaktion mit den Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF erklären. Die Transkriptionsfaktoren liegen vermutlich in einem transkriptionellen Komplex vor, der vermutlich die Expression von *DC-STAMP*, dem verantwortlichen Rezeptor der Zell-Zell-Fusion während der Osteoklastogenese, reguliert.

## 5. Diskussion

Das Skelett der Vertebraten besteht aus Knochen- und Knorpelgewebe, diese Gewebe werden von den Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten aufgebaut (Buckwalter JA und Cooper RR, 1987). Die Entstehung der Knochen während der embryonalen Entwicklung und die Erhaltung des Knochengewebes im adulten Organismus beruht auf einem Gleichgewicht der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. Während Osteoblasten für den Aufbau von Knochengewebe verantwortlich sind, dienen Osteoklasten der Knochenresorption (Karsenty G und Wagner EF, 2002; Zaidi M, 2007; Teitelbaum SL, 2000). Ist das Gleichgewicht von Knochenaufbau und Knochenabbau gestört, kann dies zu Krankheiten wie Osteoporose und Osteopetrose führen (Helfrich MH, 2003; Sambrook P und Cooper C, 2006; Novack DV und Teitelbaum SL, 2008). Die Zellpopulation der Osteoklasten geht aus den hämatopoetischen Stammzellen über die Zwischenstufe der Monozyten hervor. Die Differenzierung der Osteoklasten wird hauptsächlich von den Zytokinen M-CSF und RANKL, die verschiedene Signalwege in Osteoklasten-Vorläuferzellen beeinflussen, induziert. Der RANKL-Signalweg führt zur Aktivierung verschiedener Osteoklastenspezifischer Transkriptionsfaktoren, die in einem streng regulierten Netzwerk die Aktivierung von Genen induzieren, die für die Osteoklasten-Differenzierung und für die Knochenresorption benötigt werden (Menaar C *et al.*, 2000, Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008). In dieser Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor Tal1 als Regulator der Osteoklasten-Differenzierung identifiziert werden. Tal1 wird in reifen Osteoklasten exprimiert und hat einen Einfluss auf die Osteoklasten-Differenzierung durch die Regulation von *DC-STAMP*.

### 5.1 *Tal1* wird in Knochen exprimiert

Die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen und die Entwicklung verschiedener Blutzelllinien unterliegen maßgeblich dem Einfluss von Tal1 (Lecuyer E und Hoang T, 2004; Bloor AJ *et al.*, 2002; Shivdasani RA *et al.*, 1995). Die Expression von Tal1 konnte in hämatopoetischen Stammzellen, Erythrozyten, Megakaryozyten und Mastzellen gezeigt werden. Außerhalb des hämatopoetischen Systems konnte die Tal1-Expression im Gehirn und in Endothelzellen festgestellt werden. Außerdem wurde die Expression von Tal1 in CMP-Zellen beschrieben, d.h. in Monozyten/Makrophagen von Maus, Zebrafisch und Mensch (Muroyama Y *et al.*, 2005; Green AR *et al.*, 1991; Elefanty AG *et al.*, 1998; Hall MA *et al.*, 2003; Mouthon MA *et al.*, 1993; Pulford K *et al.*, 1995; Kallianpur AR *et al.*, 1994; Zhang XY und Rodaway AR, 2007).

In Kollaboration mit Dr. J.J. Smink (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin) wurde die Expression von Tal1 in immunhistologischen Analysen von murinen Knochenschnitten gezeigt. Die Tal1-Expression konnte in Zellen des Gelenkknorpels und der hypertrophen Zone der Wachstumsfuge beobachtet werden (Abb.4.2). Das Gewebe des Gelenkknorpels und der Wachstumszone wird hauptsächlich von Chondrozyten und z.T. von Osteoblasten gebildet (Karsenty G und Wagner EF, 2002; Erlebacher A *et al.*, 1995; Sahni M *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang von Tal1 und Chondrozyten war bisher nicht bekannt und somit liegen auch keine Kenntnisse über den Einfluss von Tal1 auf die Entwicklung von Chondrozyten vor. Die Expression von Tal1 im Bereich des Gelenkknorpels und der hyperthrophen Zone lässt vermuten, dass Tal1 einen transkriptionellen Effekt in Chondrozyten besitzt. Die Differenzierung von Chondrozyten wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor MEF2C (*myocyte specific enhancer factor 2C*) reguliert (Arnold MA *et al.*, 2007; Wuelling M und Vortkamp A, 2010). Der Transkriptionsfaktor MEF2C aktiviert die Genexpression, die in Chondrozyten zur Entstehung der Hypertrophie führt (Arnold MA *et al.*, 2007). In der Literatur ist MEF2C als direktes Zielgen von Tal1 in Megakaryozyten beschrieben, Tal1 aktiviert die Expression von MEF2C, dies sorgt für normale Differenzierung der Megakaryozyten in Richtung Thrombozyten (Gekas C *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte in Genexpressionsanalysen mittels *Microarray* ein Einfluss von Tal1 auf die Expression von MEF2C gezeigt werden (s. Abschnitt 4.4.2 und 5.5). Der *Knock-down* von Tal1 in BMM-Zellen resultierte in der Aktivierung von MEF2C. Möglicherweise ist Tal1 auch in Chondrozyten für die Aktivierung von MEF2C verantwortlich, reguliert Gene der Differenzierung oder der Hypertrophie von Chondrozyten.

Die Wachstumsfuge enthält neben Chondrozyten auch Osteoblasten, deren Differenzierung maßgeblich vom Transkriptionsfaktor RUNX2 abhängig ist (Yang X und Karsenty G, 2002). Die Expression von Tal1 wurde bereits in Osteoblasten beschrieben (Pulford K *et al.*, 1995), wobei *in vitro* kein Einfluss von Tal1 auf die Osteoblasten-Differenzierung gezeigt werden konnte. Jedoch liegen keine *in vivo* Daten vor, da konditionale *Knock-out*-Mäuse nicht auf einen Knochen-spezifischen Phänotyp untersucht wurden (Pimanda JE *et al.*, 2006). Die Expression von Tal1 spricht allerdings dafür, dass Tal1 eine Rolle in Osteoblasten spielt. Tal1 ist in der Lage mit dem Transkriptionsfaktor RUNX1 zu interagieren und reguliert die Genexpression der RUNX-Gene. Außerdem ist bekannt, dass Tal1 an den Promotorbereich von RUNX1 und RUNX3 in fötalen Leberzellen bindet (Landry JR *et al.*, 2008; Palii CG *et al.*, 2011), und in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tal1 die Expression von RUNX3 reguliert. Die RUNX-Gene gehören zu einer Proteinfamilie, eventuell findet daher auch eine Tal1-Regulation von RUNX2 statt.

In Bezug auf das Thema dieser Arbeit war eine wichtige Beobachtung, dass *Tal1* *in vivo* in reifen Osteoklasten exprimiert wurde (Abb.4.2 III). Außerdem konnte die *Tal1*-Expression in Monozyten aus dem Knochenmark von BL/6-Mäusen gezeigt werden. Auch *in vitro* differenzierte Osteoklasten exprimierten *Tal1* (Abb.4.7). Diese Beobachtung bestätigte das Vorkommen von *Tal1* in CMP-Zellen, wie sie bereits für die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen beschrieben wurde (Dey S *et al.*, 2010). In Kollaboration mit Prof. Dr. J.R. Göthert (Universität Duisburg-Essen) konnte gezeigt werden, dass der Promotor von *Tal1* in Osteoklasten-Vorläuferzellen aktiv ist (Abb.4.3). Mittels Durchflusszytometrie konnte in der  $CD115^+CD117^{+}lin^-$ -Population von Mäusen, die einen *LacZ-Knock-in* im *Tal1*-Locus tragen (Elefanty AG *et al.*, 1998), die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase anhand der FDG-Färbung verdeutlicht werden. Dies zeigt, dass die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase an *Tal1*-regulatorische Elemente gekoppelt ist. Zur weiteren Bestätigung der *Tal1*-Expression in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten könnten von *LacZ-Knock-in*-Mäusen Knochenschnitte angefertigt und eine *LacZ*-Färbung durchgeführt werden, ebenso könnte die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in BMM-Zellen untersucht werden. Die Untersuchung anderer *Tal1*-Reportergergen-Mäuse könnte ebenfalls zum Verständnis der *Tal1*-Regulation in Bezug auf den Einfluss von Promotor oder *Enhancer*-Strukturen im Knochengewebe beitragen, wie es für die Regulation in hämatopoetischen Stammzellen gezeigt wurde (Göttgens B *et al.*, 2002).

## 5.2 *RANKL* verursacht eine Induktion des *Tal1*-Proteins

Die Differenzierung der Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen über Monozyten wird maßgeblich von den Zytokinen M-CSF und *RANKL* induziert (Menea C *et al.*, 2000, Yavropoulou MP und Yovos JG, 2008; Arai F *et al.*, 1999; Ross FP und Teitelbaum SL, 2005). *RANKL* aktiviert die Differenzierung durch Interaktion mit dem Rezeptor *RANK*, der an der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläufer exprimiert wird (Takahashi N *et al.*, 1988; Kartsogiannis V *et al.*, 1999). Die *RANK*-*RANKL*-vermittelte Induktion der Differenzierung findet durch Regulation spezifischer Transkriptionsfaktoren statt, die zur Expression Osteoklasten-spezifischer Gene führen (Lacey DL *et al.*, 1998; Yang X und Karsenty G, 2002; Teitelbaum SL und Ross FP, 2003).

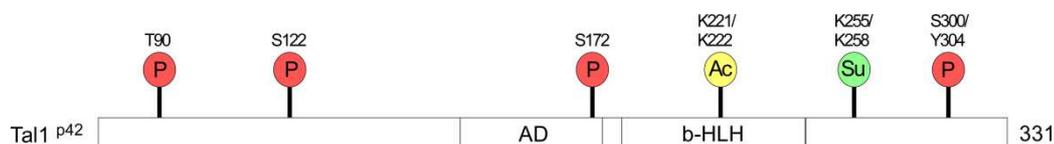
Der Transkriptionsfaktor *Tal1* wird in Osteoklasten-Vorläufern und reifen Osteoklasten exprimiert. Die Analyse des *RANKL*-Einflusses auf die Expression von *Tal1* zeigte, dass der Transkriptionsfaktor *Tal1* auf Proteinebene verstärkt exprimiert wurde, je länger die Zellen

mit RANKL behandelt wurden, d.h. während der Osteoklasten-Differenzierung kommt es zu einer Induktion des Tal1-Proteins (Abb.4.10A). Weiterhin werden die Osteoklastenspezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF nach RANKL-Behandlung auf Proteinebene induziert (Abb.4.10B). Es zeigte sich allerdings, dass Tal1 nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert wurde, da sich das mRNA-Level in den RANKL-behandelten BMM-Zellen nicht veränderte (Abb.4.9A), auch für die Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF zeigte sich auf mRNA-Ebene keine RANKL-vermittelte Aktivierung (Abb.4.9B/C).

Während der Osteoklasten-Differenzierung wird durch das Zytokin RANKL der PI-3K/AKT-Signalweg induziert, der für die Aktivierung anti-apoptotischer Gene in Osteoklasten eine Rolle spielt. Dieser Signalweg könnte für die Regulation von Tal1 verantwortlich sein. Der Zusammenhang von Tal1 und Apoptose konnte bereits in hämatopoetischen Stammzellen gezeigt werden, da adulte hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen Tal1 für das Überleben benötigen (Souroullas GP *et al.*, 2009), dieser Zusammenhang könnte auch in Osteoklasten bestehen. Außerdem ist bekannt, dass Tal1 durch die Akt1-Kinase an Threonin 90 phosphoryliert wird, dadurch kommt es zu einer veränderten Lokalisation von Tal1 innerhalb des Zellkerns. Durch die Akt-vermittelte Phosphorylierung wird die Repressorfunktion von Tal1 aufgehoben (Palamarchuk *et al.*, 2005), dies verdeutlicht einen direkten Zusammenhang des PI-3K/AKT-Signalweg und Tal1, der auch in Osteoklasten zustande kommen könnte.

Die Diskrepanz zwischen mRNA und Protein von Tal1 könnte auch durch eine erhöhte Proteinstabilität zustande kommen. Im Zusammenhang mit LMO2 wurde beschrieben, dass die Interaktion von Tal1 und LMO2 zu einem Proteinkomplex führt, so dass der Abbau durch das Proteasom verhindert wird (Lecuyer E *et al.*, 2007). Die Proteinstabilität von Tal1 könnte auch von einer posttranslationalen Modifikation beeinflusst werden. Die Arginin-Methylierung von FOXO1 führt zu einer Inhibierung der Phosphorylierung durch Akt, wodurch ebenfalls die Polyubiquitinierung von FOXO1 inhibiert ist (Yamagata K *et al.*, 2008). Der Zusammenhang von Phosphorylierung und Degradation konnte bereits für Tal1 gezeigt werden. Tal1 wird am Serin300 phosphoryliert, wodurch es zu einer NOTCH-vermittelten Ubiquitinierung von Tal1 kommt, die zur Degradation führt (Nie L *et al.*, 2008). Eventuell wird die Phosphorylierung von Tal1 im Verlauf der Osteoklasten-Differenzierung aufgehoben, so dass es zu keiner NOTCH-vermittelten Degradation von Tal1 kommen kann.

Bisher wurden mehrere posttranslationale Modifikationen für Tal1 beschrieben (siehe Abschnitt 2.10 und Abb.5.1), wie zum Beispiel Acetylierung und Phosphorylierung (Cheng JT *et al.*, 1993; Palamarchuk A *et al.*, 2005; Prasad KS und Brandt SJ, 1997; Huang S *et al.*, 2000).



**Abb.5.1: Schema der posttranslationalen Modifikationen von Tal1.** Das Tal1-Protein wird an verschiedenen Aminosäuren posttranslational modifiziert. Neben Phosphorylierungen, wird Tal1 auch acetyliert und sumoyliert (potentielle Sumoylierungsstelle).

Diese posttranslationalen Modifikationen von Tal1 könnten sich gegenseitig beeinflussen und somit die Proteinstabilität regulieren. Außerdem könnte die Expression der *Tal1*-mRNA in Osteoklasten-Vorläuferzellen von einer microRNA abhängig sein (siehe Abschnitt 5.3). Zur Klärung des induzierten Tal1-Proteinlevels während der Osteoklasten-Differenzierung könnten Tal1-Konstrukte hergestellt werden, in denen durch Mutation die Modifikationsstellen oder potentielle microRNA-Bindestellen verändert wurden.

### 5.3 Regulation von microRNA's während der Osteoklastogenese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tal1 in Osteoklasten-Vorläufern und reifen Osteoklasten exprimiert wird. Außerdem zeigte sich aufgrund von RANKL eine Induktion des Tal1-Proteins während der Osteoklasten-Differenzierung, die jedoch auf mRNA-Ebene nicht vorhanden war. Die Diskrepanz zwischen der Expression der *Tal1*-mRNA und der Expression des Tal1-Proteins kann durch eine gesteigerte Proteinstabilität, posttranslationale Modifikationen von Tal1 oder durch posttranskriptionelle Regulation, dafür können microRNA's verantwortlich sein, zustande kommen.

Der Einfluss von microRNA's findet in physiologischen Prozessen wie der Hämatopoese, aber auch in Krankheiten wie Krebs statt (Havelange V und Garzon R, 2010; Farazi TA *et al.*, 2011). In der Literatur findet sich bereits eine Analyse des microRNA-Profiles in Osteoklasten bzw. Osteoklasten-Vorläuferzellen. In dieser Studie wurde der microRNA-Microarray 24 h nach RANKL-Behandlung durchgeführt und erbrachte 70 regulierte microRNA's (Sugatani T *et al.*, 2011). Allerdings verstärkt sich die Expression des Tal1-Proteins während der Osteoklasten-Differenzierung erst zwischen 2-4 Tage RANKL-Behandlung.

Die dreitägige RANKL-Inkubation zeigte in einem microRNA-*Microarray* ein Effekt auf 32 microRNA's, deren Expression verändert wurden (Tabelle 4.1). Im Vergleich mit dem microRNA-*Microarray* nach 24 h RANKL-Behandlung zeigte sich eine Übereinstimmung in 8 microRNA's, die in beiden *Arrays* verändert exprimiert vorlagen (Sugatani T *et al.*, 2011). Die Liste enthält einige microRNA's, die bereits in Zusammenhang mit der Osteoklasten-Differenzierung beschrieben wurden, z.B. miR-155 und miR-146a (Mizoguchi F *et al.*, 2010; Nakasa T *et al.*, 2011). Die miR-199b\* konnte mit der Regulation des Calcineurin/NFAT-Signalweg in Herzzellen in Verbindung gebracht werden, eventuell besteht auch in Osteoklasten eine Verbindung dieser microRNA und dem NFAT-Signalweg (da Costa Martins PA *et al.*, 2010). Der microRNA-*Microarray* erbrachte den Hinweis auf fünf microRNA's, deren Expression während der Osteoklasten-Differenzierung reduziert wurde, diese sind potentielle Kandidaten für die Regulation von Tal1.

Die microRNA mir-451 und mir-144 wurden am stärksten reprimiert, beide liegen zusammen in einem Cluster vor. Sie werden für die erythroide Differenzierung benötigt und mir-451 fördert die Erythropoese in K562-Zellen (Rasmussen KD *et al.*, 2010; Bruchova-Votavova H *et al.*, 2010). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren Tal1 und RUNX1 konnte auf der Promotorregion von miR144-451 mittels Chromatin-Immunopräzipitation in K562-Zellen gezeigt werden (Dr. Jörn Lausen), eventuell findet hier ein *Feed-back-loop* in Bezug auf die gegenseitige Regulation statt. Eine Analyse des 3'-UTR (*untranslated region*) von murinem Tal1 mit Hilfe von TargetScan Mouse 5.1 (Lewis BP *et al.*, 2005) erbrachte eine potentielle Bindestelle der miR-144. In Monozyten könnte die miR-144 für die geringe Expression der Tal1-mRNA verantwortlich sein. Durch RANKL wird die Osteoklasten-Differenzierung induziert, dies sorgt für die reduzierte Expression der miR-144, dadurch könnte die Reprimierung der mRNA aufgehoben und die Translation von Tal1 aktiviert werden.

Der hier vermutete Einfluss einer microRNA auf die Regulation von Tal1 wurde ebenfalls für den Transkriptionsfaktor AML1 (*acute myeloid leukemia 1 protein*, RUNX1) beschrieben. Die Expression der *AML1*-mRNA zeigte während der Monozytopoese keine Veränderungen, aber das AML1-Protein wurde verstärkt exprimiert. Die posttranskriptionelle Regulation der *AML1*-mRNA erfolgte durch die microRNA miR-17-5p, miR-20a und miR-106a (Fontana L *et al.*, 2007). Das 3'-UTR von Tal1 besitzt ebenfalls eine potentielle Bindestelle für die miR-17-5p, miR-20a und miR-106a. Die Regulation von Tal1 könnte ebenso wie die Regulation von AML1 von derselben microRNA abhängig sein. Zur Bestätigung dieser Hypothesen könnte die generelle Aktivierung des 3'-UTR von Tal1 während der Osteoklasten-Differenzierung untersucht werden. Anschließend könnte ein spezifischer Einfluss auf Tal1 durch *Knock-down* oder Überexpression der microRNA's analysiert werden.

## 5.4 *Tal1* beeinflusst die Osteoklasten-Differenzierung

Der biologische Einfluss von *Tal1* wurde anhand von zwei Modellen zur Osteoklasten-Differenzierung untersucht. Die etablierte Zelllinie RAW264.7 und primäre Monozyten aus dem Knochenmark von BL/6-Mäusen können *in vitro* in Richtung Osteoklasten differenziert werden, wenn sie mit dem Zytokin RANKL inkubiert werden (Suda T *et al.*, 1999). Die ektopische Expression von *Tal1* in RAW264.7-Zellen resultierte in einer Reduktion der Anzahl an multinukleären Zellen (Abb.4.17). Das gleiche Ergebnis konnte in *Tal1*-überexprimierenden BMM-Zellen beobachtet werden (Abb.4.18). Umgekehrt konnte anhand des *Knock-downs* in BMM-Zellen gezeigt werden, dass es durch den Verlust von *Tal1* zu einer verstärkten Bildung von multinukleären Zellen kam (Abb.4.19).

Die Osteoklasten-Differenzierung scheint jedoch nicht komplett gestört zu sein bzw. wirkt sich *Tal1* nur auf späte Stufen der Osteoklastogenese aus, da nicht fusionierte, mononukleäre Zellen eine positive *Acp5*-Färbung aufweisen. *Acp5* ist ein Osteoklasten-Marker, der zur Identifizierung von Osteoklasten verwendet wird. Die Expression von *Acp5* findet bereits in frühen Schritten der Osteoklastogenese statt. Die positive Färbung für *Acp5* in den mononukleären Zellen verdeutlicht, dass *Tal1* frühe Schritte der Differenzierung nicht beeinflusst und scheinbar erst späte Schritte reguliert.

Die Experimente verdeutlichen einen negativen Einfluss von *Tal1* auf die Osteoklasten-Differenzierung. Dieser Effekt von *Tal1* konnte bereits in Bezug auf die Differenzierung von CMP-Zellen gezeigt werden, die eine Vorstufe von Osteoklasten während der Osteoklastogenese darstellen. Die Expression von *Tal1* erfolgt in allen Stufen der Monozytopoese von CMP-Zellen bis hin zu Makrophagen. Der *Tal1-Knock-out* in CMP-Zellen resultierte in einer verringerten Zellproliferation während späteren Stufen der Monozytopoese und in einem verzögerten Durchlaufen der S-Phase. Im Gegensatz zu den *Tal1*-Effekten auf die Proliferation wurde die Differenzierung der CMP-Zellen in Richtung Monozyten nach *Knock-out* von *Tal1* gesteigert (Dey S *et al.*, 2010). Der *Knock-down* von *Tal1* in den Osteoklasten-Vorläuferzellen könnte ebenfalls zu einer veränderten bzw. verringerten Proliferation führen, so dass die Differenzierung der Zellen vorangetrieben wird. Der Einfluss von *Tal1* auf die Proliferation der Osteoklasten-Vorläuferzellen könnte mit einer Zellzyklus-Analyse überprüft werden.

Zur Untersuchung des Tal1-Effekts auf die Osteoklasten-Differenzierung *in vivo* wurde das *Tal1-LacZ-Knock-in*-Mausmodell verwendet (Elefanty AG *et al.*, 1998), hier wurde das *LacZ*-Gen in den *Tal1*-Locus mittel Rekombination eingebracht, dadurch kommt es zu einer Deletion von *Tal1*. Nach Isolation der BMM-Zellen aus dem Knochenmark heterozygoter *LacZ*-Mäuse, wurden diese in Bezug auf die Osteoklasten-Differenzierung untersucht. Allerdings zeigte sich zwischen Kontrolle und BMM-LacZ-Zellen kein Unterschied in der Anzahl der multinukleärer Zellen (Abb.4.20).

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte das Alter der Mäuse sein, sie waren mit 7 Wochen relativ jung, eventuell wirkt sich die *Tal1*-Deletion erst bei älteren Mäusen auf die Osteoklasten-Differenzierung aus. Außerdem könnte es in den *Tal1-LacZ-Knock-in*-Mäusen zu Kompensationsmechanismen kommen. Die genetische Veränderung liegt bereits während der Embryogenese vor, eventuell übernehmen im Verlauf der Entwicklung alternative Faktoren die Funktion von *Tal1*. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für die Entwicklung von Erythrozyten beschrieben. Es zeigte sich, dass der *Tal1-Knock-out* nur einen geringen Einfluss auf die Reifung von Erythrozyten hatte, die Mäuse zeigten nur eine milde Anämie (Hall MA *et al.*, 2005). Die Funktion von *Tal1* konnte erfolgreich durch den bHLH-Transkriptionsfaktor *Lyl1* (*lymphoblastic leukemia derived sequence 1*) hergestellt werden (Porcher C *et al.*, 1999; Capron C *et al.*, 2006). Zur Klärung, ob *Lyl1* eventuell durch verstärkte Expression in BMM-LacZ-Zellen für eine Aufhebung der *Tal1*-Deletion sorgt, wurde die mRNA-Expression bestimmt, jedoch wurde keine erhöhte Expression gemessen (Daten nicht gezeigt).

*Tal2* gehört ebenfalls zur Familie der der bHLH-Transkriptionsfaktoren und ist strukturell ähnlich zu *Tal1*, beide weisen eine hohe Konservierung im Bereich der bHLH-Domäne auf (Baer R, 1993; Xia Y *et al.*, 1994; Baer R *et al.*, 1997). *Tal2* wird ebenso wie *Tal1* in Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimiert und der Promotor von *Tal2* ist in RAW264.7-Zellen aktiv (Diplomarbeit C. Mücke, AG Dr. J. Lausen, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main). Allerdings zeigte sich auch für *Tal2* in BMM-LacZ-Zellen keine veränderte Expression, die zur Kompensation der *Tal1*-Deletion führen könnte (Daten nicht gezeigt). Um Kompensationsmechanismen auszuschließen, könnte ein Osteoklasten-spezifisches *Tal1-Knock-out*-Mausmodell verwendet werden (siehe dazu Abschnitt 5.7).

## 5.5 *Tal1* beeinflusst Osteoklasten-spezifische Gene

Tal1 spielt eine wichtige Rolle während der Erythropoese, der Megakaryopoese und der Entwicklung von Mastzellen (Green AR *et al.*, 1991; Green AR *et al.*, 1992; Elefanty AG *et al.*, 1998; Hall MA *et al.*, 2003). In einer Studie, die eine genomweite Analyse von Tal1-Zielgenen beinhaltete, konnte die Bindung von Tal1 auf mehr als 7000 Genen in hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen gezeigt werden (Wilson NK *et al.*, 2010). Eine weitere Studie zeigte mittels ChIP-Sequenzierung die Bindung von Tal1 auf etwa 2000 Genen in primären Erythrozyten der fötalen Leber (Kassouf MT *et al.*, 2010).

Der Transkriptionsfaktor Tal1 zeigte in *in vitro*-Differenzierungsexperimenten einen negativen Einfluss auf die Osteoklasten-Differenzierung. Die molekularbiologischen Vorgänge in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten in Abhängigkeit von Tal1 wurden mittels Genexpressionsanalyse der RAW264.7-hTal1-Zelllinie und nach *Knock-down* in BMM-Zellen untersucht. Die Genexpressionsanalyse mittels *Microarray* erbrachte 1273 Gene, die aufgrund des *Tal1-Knock-downs* in primären Monozyten eine veränderte Expression aufzeigten. Im Vergleich mit der bereits erwähnten Studie, in der die Promotorbindung von Tal1 in hämatopoetischen Stammzellen/Vorläuferzellen untersucht wurde, zeigte sich eine Überlappung von 300 Genen. Möglicherweise stellen diese direkte Zielgene von Tal1 dar (Wilson NK *et al.*, 2010). Der *Knock-down* von Tal1 resultierte in mehr als 600 Genen, die herabreguliert waren, und etwa 600 Genen, die hochreguliert waren. Dies verdeutlicht, dass Tal1 in Osteoklasten-Vorläuferzellen sowohl eine reprimierende als auch eine aktivierende Funktion auf die Regulation Osteoklasten-spezifischer Gene besitzt. Die Proteinexpression von Tal1 wird während der Osteoklasten-Differenzierung induziert, dies könnte bedeuten, dass Tal1 vermehrt für die Regulation Osteoklasten-spezifischer Gene benötigt wird.

Die Genexpressionsanalyse erbrachte außerdem einen Tal1-Einfluss auf *RUNX3* und *IL6*. Der *Tal1-Knock-down* führte zu einer Reduzierung von *RUNX3* (*runt-related transcription factor 3*). Der Transkriptionsfaktor RUNX3 wurde bereits mit der Differenzierung von Monozyten in Verbindung gebracht (Sanchez-Martin L *et al.*, 2011; Puig-Kroger A *et al.*, 2010). Eventuell spielt er auch während der Osteoklasten-Differenzierung eine entscheidende Rolle, d.h. die reduzierte Expression von *RUNX3* sorgt für eine Induktion der Differenzierung und könnte damit erklären, dass der *Tal1-Knock-down* vermehrt zu einer Ausbildung multinukleärer Zellen führt. Außerdem zeigte sich für das *Interleukin 6* (IL6) eine verringerte Expression aufgrund des *Tal1-Knock-downs*. IL6 kann aktivierende und

reprimierende Effekte auf die Osteoklasten-Differenzierung ausüben. In Osteoblasten aktiviert IL6 die Expression von RANKL, das wiederum die Osteoklasten-Differenzierung durch Interaktion mit seinem Rezeptor RANK an der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen einleitet (Manolagas SC, 1995). Allerdings führt die direkte Interaktion von IL6 mit Osteoklasten-Vorläufer zu einer Inhibierung der Differenzierung und *IL6*-transgene Mäuse zeigen eine reduzierte Anzahl an Osteoklasten, die mit einer verminderter Knochenresorption verbunden ist (Yoshitake F *et al.*, 2008). Eine verringerte Expression an IL6 könnte in BMM-Zellen somit zur Aufhebung der Repressorfunktion von IL6 führen, so dass es verstärkt zur Osteoklasten-Differenzierung kommt.

Die Liste der hochregulierten Gene enthielt u.a. *DC-STAMP* und *ATP6V0D2*. Beide Rezeptoren werden nach RANKL-Induktion an der Oberfläche von mononukleären Osteoklasten exprimiert und sind verantwortlich für die Zell-Zell-Fusion, die mit der Ausbildung multinukleärer, reifer Osteoklasten verbunden und für die Knochenresorption entscheidend ist (Kim K *et al.*, 2008; Kim T *et al.*, 2010; Yagi M *et al.*, 2005). Die induzierte Expression von *DC-STAMP* nach *Tal1-Knock-down* in BMM-Zellen passt zu den Beobachtungen in RAW264.7-hTal1-Zellen, in denen es aufgrund der Tal1-Überexpression zu einer Reduktion der *DC-STAMP*-Expression kommt. Der Einfluss von Tal1 konnte sowohl in BMM- als auch in RAW264.7-Zellen nach *Tal1-Knock-down* und *vice versa* nach Tal1-Überexpression gezeigt werden (Abb.4.24). Die *Acp5*-Expression unterliegt einer Tal1-vermittelten Induktion, auch dies konnte in beiden Zellmodellen zur Osteoklasten-Differenzierung nach *Tal1-Knock-down* und Tal1-Überexpression verdeutlicht werden (Abb.4.24). Die Analyse der Promotoreregionen von *DC-STAMP* und *Acp5* zeigten potentielle Bindestellen von Tal1, so genannte E-Boxen. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation konnte die Bindung von Tal1 auf den Promotoren der Osteoklasten-spezifischen Gene *Acp5* und *DC-STAMP* gezeigt werden (Abb.4.25). Dies lässt vermuten, dass Tal1 durch direkte Bindung an die Promotoren die Expression der Zielgene reguliert.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der Tal1-Zielgene in Osteoklasten-Vorläuferzellen eine Reihe potentieller Kandidaten, die den inhibierenden Effekt von Tal1 auf die Osteoklasten-Differenzierung erklären. Osteoklasten entstehen durch Zellfusion, wobei bereits gebildete multinukleäre Zellen fusionskompetente Vorläuferzellen einfangen, die eine hohe *DC-STAMP*-Expression aufweisen (Mensah KA *et al.*, 2010). In Osteoklasten-Vorläuferzellen sorgt Tal1 für die Reprimierung der Transkription von *DC-STAMP*. Nach RANKL-vermittelter Induktion der Osteoklasten-Differenzierung kommt es dann zu einer Aktivierung der *DC-STAMP*-Transkription vermutlich durch Transkriptionsfaktor- oder Cofaktor-Austausch auf dem Promotor von *DC-STAMP*.

In weiterführenden Experimenten könnte der Transkriptions- und Cofaktorstatus auf den Osteoklasten-spezifischen Genen untersucht werden. Mittels ChIP-Sequenzierung könnte die Bindung von Tal1 genomweit untersucht werden. Es wäre interessant, den Status in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten zu vergleichen, um die Dynamik der Tal1-Bindung auf Zielgenen zu analysieren. Die genomweite Analyse der Tal1-Bindung könnte Aufschluss darüber geben, ob die Regulation der Zielgene durch einen Osteoklasten-spezifischen Tal1-Komplex zustande kommt. Außerdem ist Tal1 in der Lage mit Coaktivatoren wie p300 und Corepressoren wie mSin3A und HDAC1 zu interagieren und je nachdem die Expression von Zielgenen zu induzieren oder zu reprimieren (Huang S und Brandt SJ, 2004; Huang S *et al.*, 2009; Huang S *et al.*, 2000). In Bezug auf die Regulation von *DC-STAMP*, aber auch von anderen Osteoklasten-spezifischen Genen, könnte mittels ChIP die Bindung möglicher Tal1-Cofaktoren auf den Promotoren untersucht werden, um im Zusammenhang mit Histonmodifikationen auf den Aktivierungsstatus des Promotors schließen zu können. Die Expression von DC-STAMP wird während der Osteoklastogenese induziert, d.h. es kommt vermutlich zu einer Bindung von transkriptionellen Aktivatoren und zur Veränderungen der Histonmodifikationen, die sich aktivierend auf die Genexpression auswirken. Die Analyse der Histonmodifikationen könnte ebenfalls mittels ChIP erfolgen.

## 5.6 *Tal1 reguliert die Expression von DC-STAMP*

Der Transkriptionsfaktor Tal1 gehört zur Familie der *basic helix-loop-helix* Proteine und bindet DNA-Sequenzen mit dem CANNTG-Motiv im Promotorbereich der Zielgene (Hsu HL *et al.*, 1994; Nielsen AL *et al.*, 1996). Auf dem Promotor bildet sich zur Regulation der Transkription ein Komplex aus mehreren Transkriptions- und Cofaktoren (Ravasi T *et al.*, 2010). Die Tal1-vermittelte Regulation von Zielgenen kann je nach Zusammensetzung des transkriptionellen Komplexes zu einer Reprimierung oder Aktivierung der Transkription führen (Lecuyer E und Hoang T, 2004).

Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass Tal1 einen Einfluss auf Osteoklasten-spezifische Gene besitzt und im Promotorbereich dieser Zielgene bindet. Vor allem der Einfluss von Tal1 auf die Expression von *DC-STAMP* könnte den beobachteten Effekt von Tal1 auf die Osteoklasten-Differenzierung erklären. Der Prozess der Osteoklasten-Differenzierung bzw. der Zellfusion während der Differenzierung wird maßgeblich durch DC-STAMP erreicht. *DC-STAMP*-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage multinukleäre Osteoklasten zu bilden, d.h. der Prozess der Zellfusion ist gestört und die Fähigkeit zur Knochenresorption ist

beeinträchtigt (Yagi M *et al.*, 2005; Lee SH *et al.*, 2006). Der *Knock-down* von Tal1 resultierte in einer induzierten Expression von *DC-STAMP*, was in der Konsequenz vermutlich in einer verstärkten Zellfusion in multinukleäre Osteoklasten führte.

Die Analyse des Promotorbereichs von *DC-STAMP* erbrachte einige potentielle Bindestellen für die Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF. Mittels ChIP konnte die Bindung von Tal1, PU.1 und MITF an den *DC-STAMP*-Promotor gezeigt werden, d.h. Tal1 reguliert *DC-STAMP* durch direkte Bindung an dessen Promotor. Außerdem zeigte sich, dass Tal1 mit dem Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktor PU.1 interagiert. Die Interaktion von Tal1 und MITF konnte nur nach ektopter Expression gezeigt werden, nicht auf endogenem Level. Möglicherweise liegt der Tal1-MITF-Komplex in den Zellen in geringer Konzentration vor, so dass der Komplex nicht nachweisbar ist. Außerdem könnte das Erkennungsmotiv des verwendeten Antikörpers in der Interaktionsfläche von Tal1 und MITF liegen, so dass eine Immunpräzipitation nicht möglich ist.

Der reprimierende Effekt von Tal1 auf die Expression von *DC-STAMP* konnte ebenfalls in einer Promotorstudie gezeigt werden. Die Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF sind in der Lage ein *DC-STAMP*-Promotorkonstrukt zu aktivieren. Agieren beiden Transkriptionsfaktoren zusammen, wird die Aktivierung von *DC-STAMP* verstärkt. Tal1 sorgte für eine konzentrationsabhängige Reduzierung der *DC-STAMP*-Promotoraktivität. Die Analyse der Bindung von Tal1 an den Promotor von *DC-STAMP* während der Osteoklasten-Differenzierung zeigte, dass es durch die RANKL-vermittelte Induktion der Osteoklastogenese zu einer Abnahme der Tal1-Bindung an den *DC-STAMP*-Promotor kommt, während die Bindung von MITF und PU.1 zunimmt. Vermutlich bilden Tal1, PU.1, MITF und andere Faktoren in Osteoklasten-Vorläuferzellen einen transkriptionellen Komplex zur Regulation von *DC-STAMP*.

Der aktivierende Einfluss von MITF und PU.1 auf die Expression Osteoklasten-spezifischer Gene während der Differenzierung wurde in der Literatur bereits beschrieben. MITF und PU.1 aktivieren die Transkription der Osteoklasten-spezifischen Gene *Acp5* (TRAP, *tartrate resistant acid phosphatase*) und *CTSK* (*Cathepsin K*). M-CSF sorgt auf Osteoklasten-spezifischen Genen für eine Komplexbildung von MITF und PU.1, allerdings erfolgt dadurch keine verstärkte Expression dieser Gene (So H *et al.*, 2003; Luchin A *et al.*, 2001). Erst durch RANKL kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktor-Komplexes durch Phosphorylierung von MITF durch MAPK/p38, Rekrutierung von Coaktivatoren und NFATc1 (Sharma SM *et al.*, 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Komplex von MITF und PU.1 in Osteoklasten-Vorläuferzellen den Transkriptionsfaktor EOS enthält, der

zusammen mit mSin3A und HDAC1 zu einer Reprimierung der Transkription von *Acp5* und *CTSK* führt. Die Behandlung der Osteoklasten-Vorläuferzellen mit RANKL sorgt für einen Austausch des reprimierenden Komplexes in einen Komplex, der die Transkription von *Acp5* und *CTSK* aktiviert (Hu R *et al.*, 2007).

Der Transkriptionsfaktor Tal1 scheint in Bezug auf die Regulation von *DC-STAMP* während der Osteoklasten-Differenzierung eine ähnliche Rolle wie der Transkriptionsfaktor EOS zu spielen. In Osteoklasten-Vorläuferzellen binden MITF, PU.1 und Tal1 vermutlich mit anderen Faktoren in einem reprimierenden Komplex an *DC-STAMP*. RANKL sorgt für die verstärkte Rekrutierung von MITF und PU.1, außerdem kommt es vermutlich zur Bindung von Coaktivatoren, so dass die Expression von *DC-STAMP* induziert wird. Die Analyse möglicher Corepressoren wie mSin3A, HDAC1 und möglicher Coaktivatoren wie p300, P/CAF mittels Chromatin-Immunopräzipitation könnte zur weiteren Klärung des Tal1-Effekts auf die transkriptionellen Vorgänge in Bezug auf *DC-STAMP* beitragen.

In weiteren Experimenten könnte eine detaillierte Bestimmung der Interaktionsflächen erfolgen. Mit Hilfe von N- oder C-terminalen GST-Konstrukten von Tal1 oder der Interaktionspartner könnte analysiert werden, ob die C- oder N-Termini von Tal, PU.1 oder MITF interagieren. Anhand von Deletionskonstrukten könnte die Interaktionsfläche der Proteine auf wenige Aminosäuren genau bestimmt werden. Die Verwendung von Tal1-Konstrukten, die Mutationen an Modifikationsstellen beinhalten, könnte Aufschluss geben, ob eine posttranskriptionelle Modifikation von Tal1 (Abschnitt 2.10) für die Protein-Protein-Interaktion benötigt wird. Die Osteoklasten-Differenzierung und die damit einhergehenden regulativen Vorgänge zur Expression Osteoklasten-spezifischer Gene wird neben PU.1 und MITF auch von anderen Transkriptionsfaktoren gesteuert, dabei spielen vor allem AP-1 und NFATc1 eine entscheidende Rolle (Ross FP und Teitelbaum SL, 2005). Zur Aufdeckung anderer Interaktionspartner von Tal1 in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten könnten die Aufreinigung von Tal1 mit möglichen Interaktionspartnern aus RAW264.7-Zellen und eine Analyse mittels Massenspektroskopie erfolgen.

Zur weiteren Untersuchung des reprimierenden Einflusses von Tal1 auf die Osteoklasten-Differenzierung bzw. die DC-STAMP-vermittelte Zellfusion wird analysiert, ob die ektope Expression von DC-STAMP in Tal1-überexprimierenden Zellen die Zellfusion wiederherstellen kann. Die Expression von DC-STAMP könnte die Tal1-vermittelte Inhibierung der Osteoklasten-Differenzierung aufheben. Außerdem wäre zu klären, ob Tal1 auch die biologische Funktion von Osteoklasten beeinträchtigt, da Tal1 einen Effekt auf die Expression von *Acp5* und *CTSK* besitzt. Auch die Analysen zur Osteoklasten-Differenzierung

zeigten, dass nicht fusionierte Zellen in der Lage sind *Acp5* zu exprimieren. Der Einfluss von Tal1 auf die Fähigkeit der multinukleären Zellen zur Knochenresorption könnte mittels Resorptionsanalysen stattfinden. Dazu werden Tal1-manipulierte Zellen auf Knochensplitter ausgesät und durch RANKL-Inkubation in Richtung Osteoklasten differenziert. Die reifen Osteoklasten resorbieren das Knochenmaterial und greifen somit den Knochen an, was mittels Giemsa-Färbung nachgewiesen werden könnte. Dies könnte zeigen, ob Tal1 die Fähigkeit zur Knochenresorption beeinträchtigt.

## 5.7 *Tal1 und Osteoklasten-assoziierte Krankheiten*

Die Aktivitäten von Osteoblasten und Osteoklasten beruht auf einem empfindlichen Gleichgewicht, kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts kann dies zu krankhaften Veränderungen des Knochengewebes führen (Lerner UH, 2006). In einigen Knochen-assoziierten Krankheiten kommt es zu einer erhöhten Osteoklasten-Aktivität, die die Aktivität der Osteoblasten übersteigt und somit zu einem verstärkten Abbau von Knochengewebe führt (Rodan GA und Martin TJ, 2000). Meistens beruhen diese Osteoklasten-assoziierten Krankheiten auf einer monogenetischen Ursache, andere Formen wie zum Beispiel das Paget-Syndrom stellen komplexe Krankheiten dar, die durch genetische und ökologische Faktoren entstehen (Helfrich MH, 2003).

Eine Verbindung des Transkriptionsfaktors Tal1 mit Osteoklasten-assoziierten Krankheiten ist bisher nicht bekannt. Tal1 wird häufig im Zusammenhang mit chromosomalen Translokation in T-Zellen beschrieben, die zur Ausbildung von akuter, lymphoblastischer T-Zell-Leukämie führt (Begley CG *et al.*, 1989; Ferradono AA und Look AT, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tal1 einen Einfluss auf die Osteoklasten-Differenzierung besitzt. Dies lässt vermuten, dass Tal1 eine Rolle in der Entstehung von Osteoklasten-assoziierten Krankheiten spielen könnte, dadurch könnte Tal1 als therapeutisches Ziel zur Behandlung dieser Krankheiten in Frage kommen.

Osteoporose ist eine Erkrankung des menschlichen Skeletts, wobei es zum Verlust des Knochengewebes aufgrund erhöhter Osteoklasten-Aktivität kommt (Cummings SR und Melton LJ, 2002). In Fällen von Osteoporose kommt es zu einem Verlust der Osteoklasten-Aktivität und einer Zunahme der Knochensubstanz (Tolar J *et al.*, 2004). Tal1 könnte hier für die erhöhte bzw. verringerte Osteoklasten-Aktivität verantwortlich sein. Die repressive Funktion von Tal1 könnte durch Verwendung von inhibierenden kleinen Peptiden oder

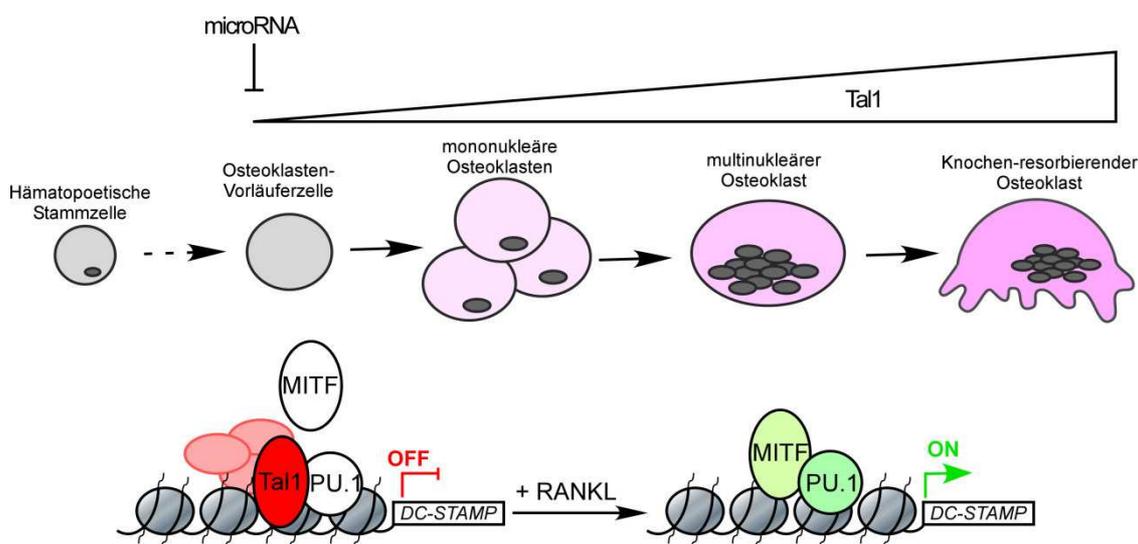
shRNA's aufgehoben werden, ähnlich wie es für die Behandlung von metastasierenden Knochentumoren beschrieben wurde (Kawatani M und Osada H, 2009).

Riesenzellen ähneln Osteoklasten aufgrund der multinukleären Morphologie und entstehen in multiplen Myelomen oder aufgrund von metastasierenden Brust- und Prostatakrebsarten. Die aus Riesenzellen entstehenden Riesenzelltumore sind zunächst gutartig, führen allerdings im Verlauf der Krankheit in 50 % aller Fälle zu einem bösartigen Tumor (Anract P *et al.*, 1998; Campanacci M *et al.*, 1987). Die Ursache für Riesenzelltumore ist weitgehend unerforscht, allerdings konnte ein Zusammenhang des Übergangs in einen bösartigen Tumor mit der Expression von IL6 gezeigt werden (Vogrincic GS *et al.*, 1997; Gamberi G *et al.*, 2003). Tal1 könnte zur Entstehung der Riesenzelltumore beitragen, eventuell durch Beeinflussen der Expression von IL6 oder DC-STAMP.

Die Tal1-Effekte in Krankheiten wie dem Paget-Syndrom, Osteoporose, Osteopetrose oder Riesenzelltumoren könnte mit *Tal1*-Mausmodellen untersucht werden. *Tal1*-transgene Mäuse zeigten einen Knochen-assoziierten Phänotyp, der sich durch geknickte Schwänze auszeichnete. Jedoch wurden diese Mäuse nicht weiter in Bezug auf den Tal1-Einfluss auf die Knochenremodellierung untersucht (Aplan PD *et al.*, 1997). Es wäre zunächst interessant die primären Monozyten/Makrophagen der *Tal1*-transgenen Mäuse auf ihre Fähigkeit zur Osteoklasten-Differenzierung zu untersuchen. In den *Tal1-LacZ*-Knock-in-Mäusen zeigte sich *in vitro* kein Effekt auf die Osteoklastogenese, die untersuchten Tiere waren jedoch noch relativ jung, eventuell wirkt sich die *Tal1*-Deletion erst mit dem Alter aus. Außerdem könnte die Untersuchung ältere Tiere Aufschluss auf eventuelle Erkrankungen wie Osteoporose geben, die anhand der Knochendichtemessung bestimmt werden könnte. Ein optimales Mausmodell wäre ein Osteoklasten-spezifischer *Tal1-Knock-out*. Beide Mäuse zur Herstellung einer Osteoklasten-spezifischen *Tal1-Knock-out*-Maus existieren, die Osteoklasten-spezifischen Maus exprimiert die Cre-Rekombinase unter regulatorischen Elementen von *Cathepsin K* oder *Acp5* (Chiu WS *et al.*, 2004) und in einer anderen Maus wird das *Tal1*-Gen von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert (Hall MA *et al.*, 2003).

## 5.8 Hypothese zur *Tal1*-Regulation der Osteoklasten-Differenzierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor *Tal1* in Osteoklasten-Vorläuferzellen und reifen Osteoklasten exprimiert wird. Das Proteinlevel von *Tal1* wird durch das Zytokin RANKL während der Osteoklasten-Differenzierung induziert, was im Gegensatz zur konstanten Expression an *Tal1*-mRNA während der Osteoklastogenese steht. Vermutlich liegt hier eine posttranskriptionelle Regulation durch microRNA's oder eine Regulation durch posttranslationale Modifikationen, die zur Proteinstabilität von *Tal1* beitragen, vor. Der *Knock-down* von *Tal1* in Osteoklasten-Vorläuferzellen hatte einen Einfluss auf die Regulation von mehr als 1200 Genen, wobei etwa 600 Genen herauf- und etwa 600 Gene herabreguliert waren. Dies zeigt, dass *Tal1* sowohl als Aktivator und als Repressor in der Regulation Osteoklasten-spezifischer Gene fungiert. Außerdem könnte die induzierte *Tal1*-Proteinexpression während der Differenzierung mit einer verstärkten Genregulation von Osteoklasten-spezifischen Genen stehen.



**Abb.5.2: Schematische Darstellung der Hypothese zur *Tal1*-Regulation der Osteoklastogenese.** *Tal1* wird in Osteoklasten-Vorläuferzellen und in reifen Osteoklasten exprimiert. Die *Tal1*-Proteinexpression nimmt während der Osteoklasten-Differenzierung zu, während die Expression der *Tal1*-mRNA konstant bleibt. Die Diskrepanz zwischen *Tal1*-mRNA und *Tal1*-Protein könnte durch posttranskriptionelle (microRNA) oder posttranslationale Regulation entstehen. Frühe Differenzierungsprozesse werden von *Tal1* nicht beeinflusst, da die Zellen in der Lage sind *Acp5* zu exprimieren (violette Färbung). In Bezug auf die Regulation von *DC-STAMP* scheint *Tal1* in Osteoklasten-Vorläuferzellen eine Repressorfunktion zu besitzen. Im Verlauf der Osteoklastogenese nimmt die *Tal1*-Bindung an den *DC-STAMP*-Promotor ab. Vermutlich kommt es dann zur Rekrutierung eines Aktivatorkomplexes, der *PU.1* und *MITF* enthält und die Expression von *DC-STAMP* induziert.

Für Tal1 wurde in Bezug auf die Regulation von *DC-STAMP* eine Repressorfunktion in Osteoklasten-Vorläuferzellen gezeigt. Scheinbar bildet Tal1 einen transkriptionellen Komplex mit den Osteoklasten-spezifischen Transkriptionsfaktoren PU.1 und MITF. In Osteoklasten-Vorläuferzellen wird *DC-STAMP* nicht exprimiert. Der RANKL-Signalweg sorgt für den Austausch des Repressorkomplexes in einen Aktivorkomplex, so dass die Expression von *DC-STAMP* induziert wird. Die reprimierende Funktion von Tal1 auf die Expression von *DC-STAMP* kommt vermutlich erst während später Stufen der Osteoklastogenese zustande. Frühe Differenzierungsprozesse sind nicht beeinflusst, da die Zellen in der Lage sind *Acp5* zu exprimieren, das einen frühen Marker der Osteoklasten-Differenzierung darstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Regulation der Zellfusion ein entscheidender Prozess ist und dass Tal1 daran beteiligt ist. Die unkontrollierte Expression von *DC-STAMP* könnte zu einer erhöhten Zahl an reifen Osteoklasten führen, dies wäre mit einer verstärkten Knochenresorption verbunden, die sich eventuell in Richtung Osteoporose entwickeln könnte.

Die Untersuchung der regulativen Effekte von Tal1 in Bezug auf die Zellfusion und der Osteoklasten-spezifische *Knock-out* von Tal1 tragen zur Aufklärung des transkriptionellen Netzwerks während der Osteoklasten-Differenzierung bei. Das molekulare Verständnis der transkriptionellen Vorgänge während der Osteoklastogenese ist entscheidend für die Entwicklung neuer therapeutische Ansätze zur Behandlung von Osteoporose oder anderen Knochen-assoziierten Krankheiten. Tal1 könnte hier als therapeutisches Ziel in Frage kommen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* **278**: 38105-38108
- Anract P, De Pinieux G, Cottias P, Pouillart P, Forest M, Tomeno B (1998) Malignant giant-cell tumours of bone. Clinico-pathological types and prognosis: a review of 29 cases. *Int Orthop* **22**: 19-26
- Aplan PD, Begley CG, Bertness V, Nussmeier M, Ezquerra A, Coligan J, Kirsch IR (1990a) The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol Cell Biol* **10**: 6426-6435
- Aplan PD, Jones CA, Chervinsky DS, Zhao X, Ellsworth M, Wu C, McGuire EA, Gross KW (1997) An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *Embo J* **16**: 2408-2419
- Aplan PD, Lombardi DP, Ginsberg AM, Cossman J, Bertness VL, Kirsch IR (1990b) Disruption of the human SCL locus by "illegitimate" V-(D)-J recombinase activity. *Science* **250**: 1426-1429
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T (1999) Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med* **190**: 1741-1754
- Arnold MA, Kim Y, Czubryt MP, Phan D, McAnally J, Qi X, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2007) MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* **12**: 377-389
- Arron JR, Vologodskaja M, Wong BR, Naramura M, Kim N, Gu H, Choi Y (2001) A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J Biol Chem* **276**: 30011-30017
- Asagiri M, Takayanagi H (2007) The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**: 251-264
- Aubin JE (1992) Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes. *J Bone Miner Res* **7**: 365-368
- Baer R (1993) TAL1, TAL2 and LYL1: a family of basic helix-loop-helix proteins implicated in T cell acute leukaemia. *Semin Cancer Biol* **4**: 341-347
- Baer R, Hwang LY, Bash RO (1997) Transcription factors of the bHLH and LIM families: synergistic mediators of T cell acute leukemia? *Curr Top Microbiol Immunol* **220**: 55-65
- Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzo M, Garcia-Foncillas J (2006) Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* **5**: 29
- Bar-Shavit Z (2007) The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *J Cell Biochem* **102**: 1130-1139
- Barton LM, Gottgens B, Green AR (1999) The stem cell leukaemia (SCL) gene: a critical regulator of haemopoietic and vascular development. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1193-1207
- Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, Hershfield MS, Haynes BF, Cohen DI, Waldmann TA, et al. (1989) Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2031-2035
- Begley CG, Robb L, Rockman S, Visvader J, Bockamp EO, Chan YS, Green AR (1994) Structure of the gene encoding the murine SCL protein. *Gene* **138**: 93-99
- Begley CG, Visvader J, Green AR, Aplan PD, Metcalf D, Kirsch IR, Gough NM (1991) Molecular cloning and chromosomal localization of the murine homolog of the human helix-loop-helix gene SCL. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 869-873
- Bentley NJ, Eisen T, Goding CR (1994) Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol* **14**: 7996-8006

- Bernard O, Lecoite N, Jonveaux P, Souyri M, Mauchauffe M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D (1991) Two site-specific deletions and t(1;14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the tal-1 gene. *Oncogene* **6**: 1477-1488
- Blair HC (1998) How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* **20**: 837-846
- Bloor AJ, Sanchez MJ, Green AR, Gottgens B (2002) The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification. *J Hematother Stem Cell Res* **11**: 195-206
- Bollerslev J, Andersen PE, Jr. (1989) Fracture patterns in two types of autosomal-dominant osteopetrosis. *Acta Orthop Scand* **60**: 110-112
- Bonewald LF (2007) Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* **1116**: 281-290
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**: 337-342
- Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT (2010) miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. *Leuk Lymphoma* **51**: 686-693
- Buckwalter JA, Cooper RR (1987) Bone structure and function. *Instr Course Lect* **36**: 27-48
- Gaamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C, Snapper CM, Bravo R (1998) Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* **187**: 185-196
- Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Kros G, Pietsch H, Hoang T, Leutz A (2003) Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev* **17**: 959-964
- Campanacci M, Baldini N, Boriani S, Sudanese A (1987) Giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg Am* **69**: 106-114
- Capron C, Lecluse Y, Kaushik AL, Foudi A, Lacout C, Sekkai D, Godin I, Albagli O, Poullion I, Svinartchouk F, Schanze E, Vainchenker W, Sablitzky F, Bennaceur-Griscelli A, Dumenil D (2006) The SCL relative LYL-1 is required for fetal and adult hematopoietic stem cell function and B-cell differentiation. *Blood* **107**: 4678-4686
- Cekaite L, Glancy T, Sioud M (2010) Increased miR-21 expression during human monocyte differentiation into DCs. *Front Biosci (Elite Ed)* **2**: 818-828
- Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK (2007) MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15144-15149
- Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A (2007) Cell-cell fusion. *FEBS Lett* **581**: 2181-2193
- Cheng JT, Cobb MH, Baer R (1993) Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol Cell Biol* **13**: 801-808
- Chiu WS, McManus JF, Notini AJ, Cassady AI, Zajac JD, Davey RA (2004) Transgenic mice that express Cre recombinase in osteoclasts. *Genesis* **39**: 178-185
- Cleiren E, Benichou O, Van Hul E, Gram J, Bollerslev J, Singer FR, Beaverson K, Aledo A, Whyte MP, Yoneyama T, deVernejoul MC, Van Hul W (2001) Albers-Schonberg disease (autosomal dominant osteopetrosis, type II) results from mutations in the CICN7 chloride channel gene. *Hum Mol Genet* **10**: 2861-2867
- Cook WD, McCaw BJ, Herring C, John DL, Foote SJ, Nutt SL, Adams JM (2004) PU.1 is a suppressor of myeloid leukemia, inactivated in mice by gene deletion and mutation of its DNA binding domain. *Blood* **104**: 3437-3444
- Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY (2007) MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* **67**: 8433-8438
- Cummings SR, Melton LJ (2002) Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* **359**: 1761-1767
- da Costa Martins PA, Salic K, Gladka MM, Armand AS, Leptidis S, el Azzouzi H, Hansen A, Coenen-de Roo CJ, Bierhuizen MF, van der Nagel R, van Kuik J, de Weger R, de Bruin A, Condorelli G, Arbones ML, Eschenhagen T, De Windt LJ (2010) MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol* **12**: 1220-1227

- da Costa Martins PA, Salic K, Gladka MM, Armand AS, Leptidis S, el Azzouzi H, Hansen A, Coenen-de Roo CJ, Bierhuizen MF, van der Nagel R, van Kuik J, de Weger R, de Bruin A, Condorelli G, Arbones ML, Eschenhagen T, De Windt LJ (2010) MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat Cell Biol* **12**: 1220-1227
- Dahl R, Simon MC (2003) The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis* **31**: 229-233
- Dahl R, Walsh JC, Lancki D, Laslo P, Iyer SR, Singh H, Simon MC (2003) Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* **4**: 1029-1036
- Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**: 111-120
- Day CJ, Kim MS, Lopez CM, Nicholson GC, Morrison NA (2005) NFAT expression in human osteoclasts. *J Cell Biochem* **95**: 17-23
- Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L (2003) Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* **61**: 504-513
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* **8**: 309-334
- Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ (2002) High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* **13**: 803-813
- Department of Health and Human Services (2004) Bone health and osteoporosis: a report of the Surgeon-General. Rockville: US Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General.
- Dey S, Curtis DJ, Jane SM, Brandt SJ (2010) The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol Cell Biol* **30**: 2181-2192
- Dore LC, Amigo JD, Dos Santos CO, Zhang Z, Gai X, Tobias JW, Yu D, Klein AM, Dorman C, Wu W, Hardison RC, Paw BH, Weiss MJ (2008) A GATA1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3333-3338
- Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* **13**: 2412-2424
- Drake CJ, Brandt SJ, Trusk TC, Little CD (1997) TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev Biol* **192**: 17-30
- Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* **271**: 12511-12516
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997) Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* **89**: 747-754
- Duong LT, Lakkakorpi P, Nakamura I, Rodan GA (2000) Integrins and signaling in osteoclast function. *Matrix Biol* **19**: 97-105
- Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*: S7-21
- Elefanty AG, Begley CG, Metcalf D, Barnett L, Kontgen F, Robb L (1998) Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ "knock-in" strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11897-11902
- Elefanty AG, Robb L, Birner R, Begley CG (1997) Hematopoietic-specific genes are not induced during in vitro differentiation of scl-null embryonic stem cells. *Blood* **90**: 1435-1447

- Elwood NJ, Green AR, Melder A, Begley CG, Nicola N (1994) The SCL protein displays cell-specific heterogeneity in size. *Leukemia* **8**: 106-114
- Engel I, Murre C (1999) Transcription factors in hematopoiesis. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 575-579
- Enver T, Greaves M (1998) Loops, lineage, and leukemia. *Cell* **94**: 9-12
- Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* **80**: 371-378
- Faccio R, Novack DV, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL (2003a) Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by beta3 integrin. *J Cell Biol* **162**: 499-509
- Faccio R, Takeshita S, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL (2003b) c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest* **111**: 749-758
- Faccio R, Teitelbaum SL, Fujikawa K, Chappel J, Zallone A, Tybulewicz VL, Ross FP, Swat W (2005) Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nat Med* **11**: 284-290
- Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T (2011) miRNAs in human cancer. *J Pathol* **223**: 102-115
- Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA (1999) Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* **87**: 57-66
- Ferrando AA, Look AT (2003) Gene expression profiling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol* **40**: 274-280
- Fontana L, Pelosi E, Greco P, Racanicchi S, Testa U, Liuzzi F, Croce CM, Brunetti E, Grignani F, Peschle C (2007) MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol* **9**: 775-787
- Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Calin GA, Grazi GL, Pollutri D, Croce CM, Bolondi L, Gramantieri L (2010) MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* **70**: 5184-5193
- Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* **235**: 176-190
- Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U (1997) Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* **11**: 3482-3496
- Frattini A, Pangrazio A, Susani L, Sobacchi C, Mirolo M, Abinun M, Andolina M, Flanagan A, Horwitz EM, Mihci E, Notarangelo LD, Ramenghi U, Teti A, Van Hove J, Vujic D, Young T, Albertini A, Orchard PJ, Vezzoni P, Villa A (2003) Chloride channel CICN7 mutations are responsible for severe recessive, dominant, and intermediate osteopetrosis. *J Bone Miner Res* **18**: 1740-1747
- Gamberi G, Serra M, Ragazzini P, Magagnoli G, Pazzaglia L, Ponticelli F, Ferrari C, Zanasi M, Bertoni F, Picci P, Benassi MS (2003) Identification of markers of possible prognostic value in 57 giant cell tumors of bone. *Oncol Rep* **10**: 351-356
- Gekas C, Rhodes KE, Gereige LM, Helgadottir H, Ferrari R, Kurdistani SK, Montecino-Rodriguez E, Bassel-Duby R, Olson E, Krivtsov AV, Armstrong S, Orkin SH, Pellegrini M, Mikkola HK (2009) Mef2C is a lineage-restricted target of Scl/Tal1 and regulates megakaryopoiesis and B-cell homeostasis. *Blood* **113**: 3461-3471
- Georges AB, Benayoun BA, Caburet S, Veitia RA (2010) Generic binding sites, generic DNA-binding domains: where does specific promoter recognition come from? *Faseb J* **24**: 346-356
- Gering M, Rodaway AR, Gottgens B, Patient RK, Green AR (1998) The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *Embo J* **17**: 4029-4045
- Gerritsen EJ, Vossen JM, van Loo IH, Hermans J, Helfrich MH, Griscelli C, Fischer A (1994) Autosomal recessive osteopetrosis: variability of findings at diagnosis and during the natural course. *Pediatrics* **93**: 247-253
- Ghosh T, Soni K, Scaria V, Halimani M, Bhattacharjee C, Pillai B (2008) MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic {beta}-actin gene. *Nucleic Acids Res* **36**: 6318-6332

- Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC (1992) 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* **89**: 883-891
- Goldfarb AN, Goueli S, Mickelson D, Greenberg JM (1992) T-cell acute lymphoblastic leukemia--the associated gene SCL/tal codes for a 42-Kd nuclear phosphoprotein. *Blood* **80**: 2858-2866
- Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**: 513-523
- Gottgens B, Nastos A, Kinston S, Piltz S, Delabesse EC, Stanley M, Sanchez MJ, Ciau-Uitz A, Patient R, Green AR (2002) Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *Embo J* **21**: 3039-3050
- Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, Bertocello I, Drake F, Zavarselk S, Tellis I, Hertzog P, Debouck C, Kola I (1999) Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* **14**: 1654-1663
- Graves DT, Alsulaimani F, Ding Y, Marks SC, Jr. (2002) Developmentally regulated monocyte recruitment and bone resorption are modulated by functional deletion of the monocytic chemoattractant protein-1 gene. *Bone* **31**: 282-287
- Green AR, Lints T, Visvader J, Harvey R, Begley CG (1992) SCL is coexpressed with GATA1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* **7**: 653-660
- Green AR, Salvaris E, Begley CG (1991) Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. *Oncogene* **6**: 475-479
- Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ, Wagner EF (1993) Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* **122**: 685-701
- Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**: 443-448
- Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, Purton LE, Fleming HH, Cobb B, Merckenschlager M, Golub TR, Scadden DT (2010) MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14229-14234
- Hall BK (1987) Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clin Orthop Relat Res*: 255-272
- Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, Gothert JR, Jane SM, Begley CG (2003) The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 992-997
- Hall MA, Slater NJ, Begley CG, Salmon JM, Van Stekelenburg LJ, McCormack MP, Jane SM, Curtis DJ (2005) Functional but abnormal adult erythropoiesis in the absence of the stem cell leukemia gene. *Mol Cell Biol* **25**: 6355-6362
- Havelange V, Garzon R (2010) MicroRNAs: emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol* **85**: 935-942
- Helfrich MH (2003) Osteoclast diseases. *Microsc Res Tech* **61**: 514-532
- Henkel GW, McKercher SR, Leenen PJ, Maki RA (1999) Commitment to the monocytic lineage occurs in the absence of the transcription factor PU.1. *Blood* **93**: 2849-2858
- Hill PA (1998) Bone remodelling. *Br J Orthod* **25**: 101-107

- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* **74**: 395-404
- Hollberg K, Hultenby K, Hayman A, Cox T, Andersson G (2002) Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. *Exp Cell Res* **279**: 227-238
- Holtrop ME, Cox KA, Eilon G, Simmons HA, Raisz LG (1981) The ultrastructure of osteoclasts in microphthalmic mice. *Metab Bone Dis Relat Res* **3**: 123-129
- Horne WC, Sanjay A, Bruzzaniti A, Baron R (2005) The role(s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function. *Immunol Rev* **208**: 106-125
- Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I, Ferreras M, Sato T, Shapiro SD, Foged NT, Delaisse JM (2004) Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* **34**: 37-47
- Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R (1991) Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **11**: 3037-3042
- Hsu HL, Huang L, Tsan JT, Funk W, Wright WE, Hu JS, Kingston RE, Baer R (1994) Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **14**: 1256-1265
- Hu R, Sharma SM, Bronisz A, Srinivasan R, Sankar U, Ostrowski MC (2007) Eos, MITF, and PU.1 recruit corepressors to osteoclast-specific genes in committed myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* **27**: 4018-4027
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**: 44-57
- Huang S, Brandt SJ (2000) mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**: 2248-2259
- Huang S, Qiu Y, Shi Y, Xu Z, Brandt SJ (2000) P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *Embo J* **19**: 6792-6803
- Huang S, Qiu Y, Stein RW, Brandt SJ (1999) p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene* **18**: 4958-4967
- Humphrey MB, Ogasawara K, Yao W, Spusta SC, Daws MR, Lane NE, Lanier LL, Nakamura MC (2004) The signaling adapter protein DAP12 regulates multinucleation during osteoclast development. *J Bone Miner Res* **19**: 224-234
- Hussein K, Theophile K, Dralle W, Wiese B, Kreipe H, Bock O (2009) MicroRNA expression profiling of megakaryocytes in primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Platelets* **20**: 391-400
- Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* **3**: 1285-1289
- Ishii M, Saeki Y (2008) Osteoclast cell fusion: mechanisms and molecules. *Mod Rheumatol* **18**: 220-227
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V (1992) Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* **71**: 577-586
- Kadono Y, Okada F, Perchonock C, Jang HD, Lee SY, Kim N, Choi Y (2005) Strength of TRAF6 signalling determines osteoclastogenesis. *EMBO Rep* **6**: 171-176
- Kahai S, Lee SC, Lee DY, Yang J, Li M, Wang CH, Jiang Z, Zhang Y, Peng C, Yang BB (2009) MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7. *PLoS One* **4**: e7535
- Kaifu T, Nakahara J, Inui M, Mishima K, Momiyama T, Kaji M, Sugahara A, Koito H, Ujike-Asai A, Nakamura A, Kanazawa K, Tan-Takeuchi K, Iwasaki K, Yokoyama WM, Kudo A, Fujiwara M, Asou H, Takai T (2003) Osteopetrosis and thalamic hypomyelinosis with synaptic degeneration in DAP12-deficient mice. *J Clin Invest* **111**: 323-332

- Kaija H, Alatalo SL, Halleen JM, Lindqvist Y, Schneider G, Vaananen HK, Vihko P (2002) Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. *Biochem Biophys Res Commun* **292**: 128-132
- Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ (1994) The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood* **83**: 1200-1208
- Kanis JA, Johnell O, Oden A, De Laet C, de Terlizzi F (2005) Ten-year probabilities of clinical vertebral fractures according to phalangeal quantitative ultrasonography. *Osteoporos Int* **16**: 1065-1070
- Kappel A, Schlaeger TM, Flamme I, Orkin SH, Risau W, Breier G (2000) Role of SCL/Tal-1, GATA, and ets transcription factor binding sites for the regulation of flk-1 expression during murine vascular development. *Blood* **96**: 3078-3085
- Karsenty G, Wagner EF (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* **2**: 389-406
- Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT (1999) Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* **25**: 525-534
- Kassouf MT, Hughes JR, Taylor S, McGowan SJ, Soneji S, Green AL, Vyas P, Porcher C (2010) Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Res* **20**: 1064-1083
- Kawaguchi N, Noda M (2000) Mitf is expressed in osteoclast progenitors in vitro. *Exp Cell Res* **260**: 284-291
- Kawatani M, Osada H (2009) Osteoclast-targeting small molecules for the treatment of neoplastic bone metastases. *Cancer Sci* **100**: 1999-2005
- Keeling JW, Hansen BF, Kjaer I (1997) Pattern of malformations in the axial skeleton in human trisomy 21 fetuses. *Am J Med Genet* **68**: 466-471
- Kim K, Lee SH, Ha Kim J, Choi Y, Kim N (2008) NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol* **22**: 176-185
- Kim MS, Day CJ, Morrison NA (2005) MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation. *J Biol Chem* **280**: 16163-16169
- Kim T, Ha H, Kim N, Park ES, Rho J, Kim EC, Lorenzo J, Choi Y, Lee SH (2010) ATP6v0d2 deficiency increases bone mass, but does not influence ovariectomy-induced bone loss. *Biochem Biophys Res Commun* **403**: 73-78
- Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffolleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y (2003) TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* **19**: 353-363
- Kodandapani R, Pio F, Ni CZ, Piccialli G, Klemsz M, McKercher S, Maki RA, Ely KR (1996) A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature* **380**: 456-460
- Koeffler HP, Golde DW (1980) Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* **56**: 344-350
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM (1999a) Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* **402**: 304-309
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM (1999b) OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**: 315-323
- Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ (2001) Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* **104**: 205-215
- Kwon OH, Lee CK, Lee YI, Paik SG, Lee HJ (2005) The hematopoietic transcription factor PU.1 regulates RANK gene expression in myeloid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun* **335**: 437-446

- Labastie MC, Cortes F, Romeo PH, Dulac C, Peault B (1998) Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. *Blood* **92**: 3624-3635
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**: 165-176
- Lagasse E, Weissman IL (1997) Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* **89**: 1021-1031
- Lahlil R, Lecuyer E, Herblot S, Hoang T (2004) SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol* **24**: 1439-1452
- Landry JR, Kinston S, Knezevic K, de Bruijn MF, Wilson N, Nottingham WT, Peitz M, Edenhofer F, Pimanda JE, Ottersbach K, Gottgens B (2008) Runx genes are direct targets of Scl/Tal1 in the yolk sac and fetal liver. *Blood* **111**: 3005-3014
- Larson RC, Lavenir I, Larson TA, Baer R, Warren AJ, Wadman I, Nottage K, Rabbitts TH (1996) Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *Embo J* **15**: 1021-1027
- Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R, Gantner BN, Dinner AR, Singh H (2006) Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* **126**: 755-766
- Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH, Hoang T (2002) The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**: 2430-2440
- Lecuyer E, Hoang T (2004) SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol* **32**: 11-24
- Lecuyer E, Lariviere S, Sincennes MC, Haman A, Lahlil R, Todorova M, Tremblay M, Wilkes BC, Hoang T (2007) Protein stability and transcription factor complex assembly determined by the SCL-LMO2 interaction. *J Biol Chem* **282**: 33649-33658
- Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, Kang JS, Miyamoto T, Suda T, Lee SK, Pignolo RJ, Koczon-Jaremko B, Lorenzo J, Choi Y (2006) v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med* **12**: 1403-1409
- Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B (1997) SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**: 2336-2346
- Lerner UH (2006) Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res* **85**: 584-595
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**: 15-20
- Li D, Yang P, Xiong Q, Song X, Yang X, Liu L, Yuan W, Rui YC (2010) MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J Hypertens* **28**: 1646-1654
- Li S, Moffett HF, Lu J, Werner L, Zhang H, Ritz J, Neuberg D, Wucherpennig KW, Brown JR, Novina CD (2011a) MicroRNA expression profiling identifies activated B cell status in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One* **6**: e16956
- Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC (2007) Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem* **282**: 33098-33106
- Li YP, Chen W, Liang Y, Li E, Stashenko P (1999) Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nat Genet* **23**: 447-451
- Li ZY, Na HM, Peng G, Pu J, Liu P (2011b) Alteration of microRNA expression correlates to fatty acid-mediated insulin resistance in mouse myoblasts. *Mol Biosyst* **7**: 871-877
- Lin RJ, Lin YC, Yu AL (2010) miR-149\* induces apoptosis by inhibiting Akt1 and E2F1 in human cancer cells. *Mol Carcinog* **49**: 719-727

- Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, Todoerti K, Mosca L, Fabris S, Sales G, Deliliers GL, Bicciato S, Lombardi L, Bortoluzzi S, Neri A (2009) Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. *Blood* **114**: e20-26
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* **13**: 1015-1024
- Loria-Cortes R, Quesada-Calvo E, Cordero-Chaverri C (1977) Osteopetrosis in children: a report of 26 cases. *J Pediatr* **91**: 43-47
- Lowe C, Yoneda T, Boyce BF, Chen H, Mundy GR, Soriano P (1993) Osteopetrosis in Src-deficient mice is due to an autonomous defect of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4485-4489
- Lowings P, Yavuzer U, Goding CR (1992) Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol Cell Biol* **12**: 3653-3662
- Luchin A, Suchting S, Merson T, Rosol TJ, Hume DA, Cassady AI, Ostrowski MC (2001) Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation. *J Biol Chem* **276**: 36703-36710
- Malone JD, Kahn AJ, Teitelbaum SL (1982) Dissociation of organic acid secretion from macrophage mediated bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* **108**: 468-473
- Manolagas SC (1995) Role of cytokines in bone resorption. *Bone* **17**: 63S-67S
- Mansky KC, Sulzbacher S, Purdom G, Nelsen L, Hume DA, Rehli M, Ostrowski MC (2002) The microphthalmia transcription factor and the related helix-loop-helix zipper factors TFE-3 and TFE-C collaborate to activate the tartrate-resistant acid phosphatase promoter. *J Leukoc Biol* **71**: 304-310
- Marshall D, Johnell O, Wedel H (1996) Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *Bmj* **312**: 1254-1259
- Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K, Umemura T (2007) Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* **364**: 509-514
- Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, Hisatake K, Nogi Y (2004) Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J Biol Chem* **279**: 45969-45979
- Matsuo K, Irie N (2008) Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* **473**: 201-209
- McHugh KP, Hodivala-Dilke K, Zheng MH, Namba N, Lam J, Novack D, Feng X, Ross FP, Hynes RO, Teitelbaum SL (2000) Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *J Clin Invest* **105**: 433-440
- Mead PE, Kelley CM, Hahn PS, Piedad O, Zon LI (1998) SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* **125**: 2611-2620
- Menaa C, Kurihara N, Roodman GD (2000) CFU-GM-derived cells form osteoclasts at a very high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 943-946
- Mensah KA, Ritchlin CT, Schwarz EM (2010) RANKL induces heterogeneous DC-STAMP(lo) and DC-STAMP(hi) osteoclast precursors of which the DC-STAMP(lo) precursors are the master fusogens. *J Cell Physiol* **223**: 76-83
- Metcalf D, Dakic A, Mifsud S, Di Rago L, Wu L, Nutt S (2006) Inactivation of PU.1 in adult mice leads to the development of myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 1486-1491
- Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Marinucci M, Peschle C (1986) Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. *J Clin Invest* **78**: 51-60

- Miyamoto K, Ninomiya K, Sonoda KH, Miyauchi Y, Hoshi H, Iwasaki R, Miyamoto H, Yoshida S, Sato Y, Morioka H, Chiba K, Egashira K, Suda T, Toyama Y, Miyamoto T (2009) MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner. *Biochem Biophys Res Commun* **383**: 373-377
- Miyamoto T, Ohneda O, Arai F, Iwamoto K, Okada S, Takagi K, Anderson DM, Suda T (2001) Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood* **98**: 2544-2554
- Miyauchi A, Gotoh M, Kamioka H, Notoya K, Sekiya H, Takagi Y, Yoshimoto Y, Ishikawa H, Chihara K, Takano-Yamamoto T, Fujita T, Mikuni-Takagaki Y (2006) AlphaVbeta3 integrin ligands enhance volume-sensitive calcium influx in mechanically stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab* **24**: 498-504
- Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, Kato S, Miyasaka N, Ezura Y, Noda M (2010) Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. *J Cell Biochem* **109**: 866-875
- Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 610-615
- Moreau-Gachelin F, Wendling F, Molina T, Denis N, Titeux M, Grimber G, Briand P, Vainchenker W, Tavittian A (1996) Spi-1/PU.1 transgenic mice develop multistep erythroleukemias. *Mol Cell Biol* **16**: 2453-2463
- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367**: 284-287
- Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo PH, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D (1993) Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* **81**: 647-655
- Mulari MT, Zhao H, Lakkakorpi PT, Vaananen HK (2003) Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* **4**: 113-125
- Muroyama Y, Fujiwara Y, Orkin SH, Rowitch DH (2005) Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature* **438**: 360-363
- Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**: 556-564
- Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M (2011) The inhibitory effect of microRNA-146 expression on bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum*
- Nakashima K, de Crombrughe B (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet* **19**: 458-466
- Nesbitt SA, Horton MA (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* **276**: 266-269
- Nguyen HQ, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA (1993) The zinc finger transcription factor Egr-1 is essential for and restricts differentiation along the macrophage lineage. *Cell* **72**: 197-209
- Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, Sim MS, Turner RR, Morton DL, Hoon DS (2011) Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics* **6**: 388-394
- Nie L, Wu H, Sun XH (2008) Ubiquitination and degradation of Tal1/SCL are induced by notch signaling and depend on Skp2 and CHIP. *J Biol Chem* **283**: 684-692
- Nielsen AL, Norby PL, Pedersen FS, Jorgensen P (1996) E-box sequence and context-dependent TAL1/SCL modulation of basic helix-loop-helix protein-mediated transcriptional activation. *J Biol Chem* **271**: 31463-31469
- Novack DV, Teitelbaum SL (2008) The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol* **3**: 457-484
- Orkin SH (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* **1**: 57-64
- Ornitz DM, Marie PJ (2002) FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* **16**: 1446-1465

- Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z (2003) How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **995**: 109-116
- Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T (2011) MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. *Mol Ther*
- Osman A, Falker K (2011) Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes. *Platelets*
- Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Leng N, Brown D (2007) Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res* **67**: 10782-10788
- Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y (2005) Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Res* **65**: 4515-4519
- Palii CG, Perez-Iratxeta C, Yao Z, Cao Y, Dai F, Davison J, Atkins H, Allan D, Dilworth FJ, Gentleman R, Tapscott SJ, Brand M (2011) Differential genomic targeting of the transcription factor TAL1 in alternate haematopoietic lineages. *Embo J* **30**: 494-509
- Pechak DG, Kujawa MJ, Caplan AI (1986) Morphological and histochemical events during first bone formation in embryonic chick limbs. *Bone* **7**: 441-458
- Pimanda JE, Silberstein L, Dominici M, Dekel B, Bowen M, Oldham S, Kallianpur A, Brandt SJ, Tannahill D, Gottgens B, Green AR (2006) Transcriptional link between blood and bone: the stem cell leukemia gene and its +19 stem cell enhancer are active in bone cells. *Mol Cell Biol* **26**: 2615-2625
- Poole AR, Matsui Y, Hinek A, Lee ER (1989) Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat Rec* **224**: 167-179
- Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J (2005) Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* **19**: 1842-1844
- Porcher C, Liao EC, Fujiwara Y, Zon LI, Orkin SH (1999) Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* **126**: 4603-4615
- Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH (1996) The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* **86**: 47-57
- Prasad KS, Brandt SJ (1997) Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J Biol Chem* **272**: 11457-11462
- Puig-Kroger A, Aguilera-Montilla N, Martinez-Nunez R, Dominguez-Soto A, Sanchez-Cabo F, Martin-Gayo E, Zaballos A, Toribio ML, Groner Y, Ito Y, Dopazo A, Corcuera MT, Alonso Martin MJ, Vega MA, Corbi AL (2010) The novel RUNX3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and downregulates IL-8 expression. *Immunobiology* **215**: 812-820
- Pulford K, Lecointe N, Leroy-Viard K, Jones M, Mathieu-Mahul D, Mason DY (1995) Expression of TAL-1 proteins in human tissues. *Blood* **85**: 675-684
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**: 261-267
- Rasmussen KD, Simmini S, Abreu-Goodger C, Bartonicek N, Di Giacomo M, Bilbao-Cortes D, Horos R, Von Lindern M, Enright AJ, O'Carroll D (2010) The miR-144/451 locus is required for erythroid homeostasis. *J Exp Med* **207**: 1351-1358
- Ravasi T, Suzuki H, Cannistraci CV, Katayama S, Bajic VB, Tan K, Akalin A, Schmeier S, Kanamori-Katayama M, Bertin N, Carninci P, Daub CO, Forrest AR, Gough J, Grimmond S, Han JH, Hashimoto T, Hide W, Hofmann O, Kamburov A, Kaur M, Kawaji H, Kubosaki A, Lassmann T, van Nimwegen E, MacPherson CR, Ogawa C, Radovanovic A, Schwartz A, Teasdale RD, Tegner J, Lenhard B, Teichmann SA, Arakawa T, Ninomiya N, Murakami K, Tagami M, Fukuda S, Imamura K, Kai C, Ishihara R, Kitazume Y, Kawai J, Hume DA, Ideker T, Hayashizaki Y (2010) An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell* **140**: 744-752
- Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, Melton LJ, 3rd (1982) Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. *J Clin Invest* **70**: 716-723

- Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, Metcalf D, Begley CG (1995) Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the *scl* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7075-7079
- Rodan GA, Martin TJ (2000) Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**: 1508-1514
- Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, Akashi K, Fiering S, Tenen DG (2004) Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet* **36**: 624-630
- Ross FP, Teitelbaum SL (2005)  $\alpha$  and  $\beta$ 3 integrins and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* **208**: 88-105
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K (1998) Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13453-13458
- Saginario C, Sterling H, Beckers C, Kobayashi R, Solimena M, Ullu E, Vignery A (1998) MFR, a putative receptor mediating the fusion of macrophages. *Mol Cell Biol* **18**: 6213-6223
- Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, Gertner R, Levy D, Basilico C (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev* **13**: 1361-1366
- Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikko K, Vaananen HK (1997) Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* **276**: 270-273
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning - a laboratory manual. (2<sup>nd</sup> edition) Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York
- Sambrook P, Cooper C (2006) Osteoporosis. *Lancet* **367**: 2010-2018
- Sanchez-Martin L, Estecha A, Samaniego R, Sanchez-Ramon S, Vega MA, Sanchez-Mateos P (2011) The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* **117**: 88-97
- Sayed D, Abdellatif M (2010) AKT-ing via microRNA. *Cell Cycle* **9**: 3213-3217
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**: 695-710
- Schlesinger PH, Blair HC, Teitelbaum SL, Edwards JC (1997) Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J Biol Chem* **272**: 18636-18643
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 6419
- Schug J (2008) Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**: Unit 2 6
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* **265**: 1573-1577
- Sepulveda D, Allison DB, Gomez JE, Kreibich K, Brown RA, Pierson RN, Jr., Heymsfield SB (1995) Low spinal and pelvic bone mineral density among individuals with Down syndrome. *Am J Ment Retard* **100**: 109-114
- Shapiro F (1993) Osteopetrosis. Current clinical considerations. *Clin Orthop Relat Res*: 34-44
- Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenshein NB, Lewis JL, Jr., Knapp RC, Stolley PD, Schottenfeld D (1985) Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens. *N Engl J Med* **313**: 969-972
- Sharma SM, Bronisz A, Hu R, Patel K, Mansky KC, Sif S, Ostrowski MC (2007) MITF and PU.1 recruit p38 MAPK and NFATc1 to target genes during osteoclast differentiation. *J Biol Chem* **282**: 15921-15929
- Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**: 432-434
- Shivdasani RA, Orkin SH (1996) The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**: 4025-4039

- Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ (1988) Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* **175**: 266-276
- Silver JJ, Einhorn TA (1995) Osteoporosis and aging. Current update. *Clin Orthop Relat Res*: 10-20
- Silver L, Palis J (1997) Initiation of murine embryonic erythropoiesis: a spatial analysis. *Blood* **89**: 1154-1164
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309-319
- Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, Yu YS, Tashian RE (1983) Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 2752-2756
- Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN (2010) Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4218-4223
- Smink JJ, Leutz A (2010) Rapamycin and the transcription factor C/EBPbeta as a switch in osteoclast differentiation: implications for lytic bone diseases. *J Mol Med* **88**: 227-233
- So H, Rho J, Jeong D, Park R, Fisher DE, Ostrowski MC, Choi Y, Kim N (2003) Microphthalmia transcription factor and PU.1 synergistically induce the leukocyte receptor osteoclast-associated receptor gene expression. *J Biol Chem* **278**: 24209-24216
- Sobacchi C, Frattini A, Orchard P, Porras O, Tezcan I, Andolina M, Babul-Hirji R, Baric I, Canham N, Chitayat D, Dupuis-Girod S, Ellis I, Etzioni A, Fasth A, Fisher A, Gerritsen B, Gulino V, Horwitz E, Klamroth V, Lanino E, Mirolo M, Musio A, Matthijs G, Nonomaya S, Notarangelo LD, Ochs HD, Superti Furga A, Valiaho J, van Hove JL, Vihinen M, Vujic D, Vezzoni P, Villa A (2001) The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet* **10**: 1767-1773
- Souroullas GP, Salmon JM, Sablitzky F, Curtis DJ, Goodell MA (2009) Adult hematopoietic stem and progenitor cells require either Lyl1 or Scl for survival. *Cell Stem Cell* **4**: 180-186
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* **20**: 345-357
- Sugatani T, Vacher J, Hruska KA (2011) A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood* **117**: 3648-3657
- Sumarsono SH, Wilson TJ, Tymms MJ, Venter DJ, Corrick CM, Kola R, Lahoud MH, Papas TS, Seth A, Kola I (1996) Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. *Nature* **379**: 534-537
- Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T (1988) Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* **122**: 1373-1382
- Tanaka A, Itoh F, Itoh S, Kato M (2009) TAL1/SCL relieves the E2-2-mediated repression of VEGFR2 promoter activity. *J Biochem* **145**: 129-135
- Taranta A, Migliaccio S, Recchia I, Caniglia M, Luciani M, De Rossi G, Dionisi-Vici C, Pinto RM, Francalanci P, Boldrini R, Lanino E, Dini G, Morreale G, Ralston SH, Villa A, Vezzoni P, Del Principe D, Cassiani F, Palumbo G, Teti A (2003) Genotype-phenotype relationship in human ATP6i-dependent autosomal recessive osteopetrosis. *Am J Pathol* **162**: 57-68
- Teitelbaum SL (2000a) Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**: 1504-1508
- Teitelbaum SL (2000b) Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab* **18**: 344-349
- Teitelbaum SL, Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* **4**: 638-649
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**: 489-519

- Terme JM, Lhermitte L, Asnafi V, Jalinot P (2009) TGF-beta induces degradation of TAL1/SCL by the ubiquitin-proteasome pathway through AKT-mediated phosphorylation. *Blood* **113**: 6695-6698
- Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ (2004) Osteopetrosis. *N Engl J Med* **351**: 2839-2849
- Tombol Z, Eder K, Kovacs A, Szabo PM, Kulka J, Liko I, Zalatnai A, Racz G, Toth M, Patocs A, Falus A, Racz K, Igaz P (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol* **23**: 1583-1595
- Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL (1997) Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature* **386**: 81-84
- Tsuneto M, Tominaga A, Yamazaki H, Yoshino M, Orkin SH, Hayashi S (2005) Enforced expression of PU.1 rescues osteoclastogenesis from embryonic stem cells lacking Tal-1. *Stem Cells* **23**: 134-143
- Turnbull IR, Colonna M (2007) Activating and inhibitory functions of DAP12. *Nat Rev Immunol* **7**: 155-161
- Vignery A (2005) Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J Exp Med* **202**: 337-340
- Visvader J, Begley CG, Adams JM (1991) Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* **6**: 187-194
- Vitelli L, Condorelli G, Lulli V, Hoang T, Luchetti L, Croce CM, Peschle C (2000) A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol Cell Biol* **20**: 5330-5342
- Vogrinic GS, O'Connell JX, Gilks CB (1997) Giant cell tumor of tendon sheath is a polyclonal cellular proliferation. *Hum Pathol* **28**: 815-819
- Vyas P, McDevitt MA, Cantor AB, Katz SG, Fujiwara Y, Orkin SH (1999) Different sequence requirements for expression in erythroid and megakaryocytic cells within a regulatory element upstream of the GATA1 gene. *Development* **126**: 2799-2811
- Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH, Baer R (1994) The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene* **9**: 3713-3716
- Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, Rabbitts TH (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J* **16**: 3145-3157
- Walden TB, Timmons JA, Keller P, Nedergaard J, Cannon B (2009) Distinct expression of muscle-specific microRNAs (myomirs) in brown adipocytes. *J Cell Physiol* **218**: 444-449
- Walter MJ, Park JS, Ries RE, Lau SK, McLellan M, Jaeger S, Wilson RK, Mardis ER, Ley TJ (2005) Reduced PU.1 expression causes myeloid progenitor expansion and increased leukemia penetrance in mice expressing PML-RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12513-12518
- Wang ZQ, Liang J, Schellander K, Wagner EF, Grigoriadis AE (1995) c-fos-induced osteosarcoma formation in transgenic mice: cooperativity with c-jun and the role of endogenous c-fos. *Cancer Res* **55**: 6244-6251
- Watanabe T, Sato T, Amano T, Kawamura Y, Kawamura N, Kawaguchi H, Yamashita N, Kurihara H, Nakaoka T (2008) Dnm3os, a non-coding RNA, is required for normal growth and skeletal development in mice. *Dev Dyn* **237**: 3738-3748
- Weilbaecher KN, Motyckova G, Huber WE, Takemoto CM, Hemesath TJ, Xu Y, Hershey CL, Dowland NR, Wells AG, Fisher DE (2001) Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol Cell* **8**: 749-758
- Weiss A, Stobo JD (1984) Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line. *J Exp Med* **160**: 1284-1299
- Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW, Jr., Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER (1990) Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4828-4832
- Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schutte J, Kaimakis P, Chilarska PM, Kinston S, Ouwehand WH, Dzierzak E, Pimanda JE, de Bruijn MF, Gottgens B (2010) Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* **7**: 532-544

- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P (1995) The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* **9**: 15-20
- Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X (2009) Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev* **18**: 50-55
- Wuelling M, Vortkamp A (2010) Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* **25**: 625-631
- Xia Y, Hwang LY, Cobb MH, Baer R (1994) Products of the TAL2 oncogene in leukemic T cells: bHLH phosphoproteins with DNA-binding activity. *Oncogene* **9**: 1437-1446
- Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T (2005) DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* **202**: 345-351
- Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Morita K, Hosogane N, Matsuo K, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T (2007) Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J Bone Miner Res* **22**: 992-1001
- Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, Mukai H, Kasuya Y, Fukamizu A (2008) Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell* **32**: 221-231
- Yamane T, Kunisada T, Yamazaki H, Nakano T, Orkin SH, Hayashi SI (2000) Sequential requirements for SCL/tal-1, GATA-2, macrophage colony-stimulating factor, and osteoclast differentiation factor/osteoprotegerin ligand in osteoclast development. *Exp Hematol* **28**: 833-840
- Yang GH, Wang F, Yu J, Wang XS, Yuan JY, Zhang JW (2009) MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control. *J Cell Biochem* **107**: 548-556
- Yang X, Karsenty G (2002) Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. *Trends Mol Med* **8**: 340-345
- Yavropoulou MP, Yovos JG (2008) Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **8**: 204-216
- Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, Segal D, Dzivenu OK, Vologodskaja M, Yim M, Du K, Singh S, Pike JW, Darnay BG, Choi Y, Wu H (2002) Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* **418**: 443-447
- Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S (2008) Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. *J Biol Chem* **283**: 11535-11540
- Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P (2003) Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res* **18**: 1404-1418
- Zaidi M (2007) Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* **13**: 791-801
- Zauli G, Voltan R, di lasio MG, Bosco R, Melloni E, Sana ME, Secchiero P (2011) miR-34a Induces the Downregulation of Both E2F1 and B-Myb Oncogenes in Leukemic Cells. *Clin Cancer Res* **17**: 2712-2724
- Zhang DE, Hetherington CJ, Chen HM, Tenen DG (1994) The macrophage transcription factor PU.1 directs tissue-specific expression of the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Mol Cell Biol* **14**: 373-381
- Zhang XY, Rodaway AR (2007) SCL-GFP transgenic zebrafish: in vivo imaging of blood and endothelial development and identification of the initial site of definitive hematopoiesis. *Dev Biol* **307**: 179-194
- Zhou D, Yu T, Chen G, Brown SA, Yu Z, Mattson MP, Thompson JS (2001) Effects of NF-kappaB1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF-kappaB activation and TNFalpha, IL-1alpha, IL-1beta and IL6 mRNA expression in vivo. *Int J Radiat Biol* **77**: 763-772
- Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP, Teitelbaum SL (2007) Syk, c-Src, the alphavbeta3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* **176**: 877-888
- Zur Hausen H (1967) Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol* **1**: 1174-1185

## 7. Anhang

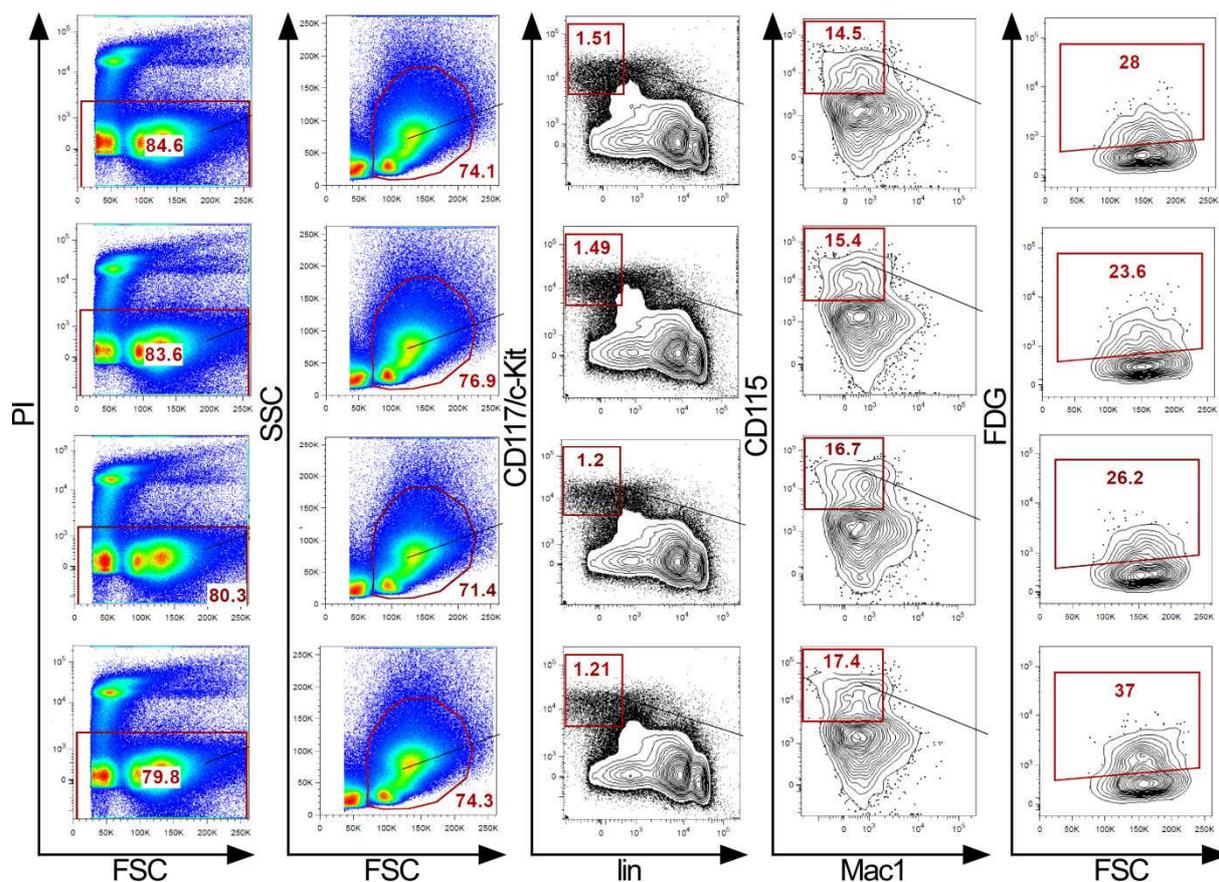
### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -	anti-
%	(v/v) Volumenprozent, (w/v) Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
$\mu$	Mikro-
<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Acp5</b>	auch TRAP oder TRACP, <i>tartrate resistant acid phosphatase</i>
<b>AK, AB</b>	Antikörper, engl. <i>antibody</i>
<b>aMEM</b>	<i>alpha minimum essential medium</i>
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosin-triphosphat
<b>BMM</b>	<i>bone marrow derived monocytes</i>
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>Bsp., z.B.</b>	(zum) Beispiel
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
<b>ca.</b>	circa
<b>c-FMS</b>	auch Csf1r, <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
<b>ChIP</b>	Chromatin-Immunopräzipitation
<b>Co-IP</b>	Co-Immunopräzipitation
<b>CTSK</b>	<i>cathepsin K</i>
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-Phenylindol
<b>DC-STAMP</b>	<i>dendritic cell specific transmembrane protein</i>
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylen-diamintetraacetat
<b><i>et al.</i></b>	und andere, lat. <i>et alii</i>
<b>FDG</b>	Fluorescein-di-beta-galactopyranosid
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS, FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>fwd</b>	<i>foward</i>
<b>G</b>	Guanin
<b>g</b>	Gramm
<b>GFP /EGFP</b>	grün fluoreszierendes Protein, engl. ( <i>enhanced</i> ) <i>green fluorescent protein</i>
<b>GST</b>	Gluthation-S-Transferase

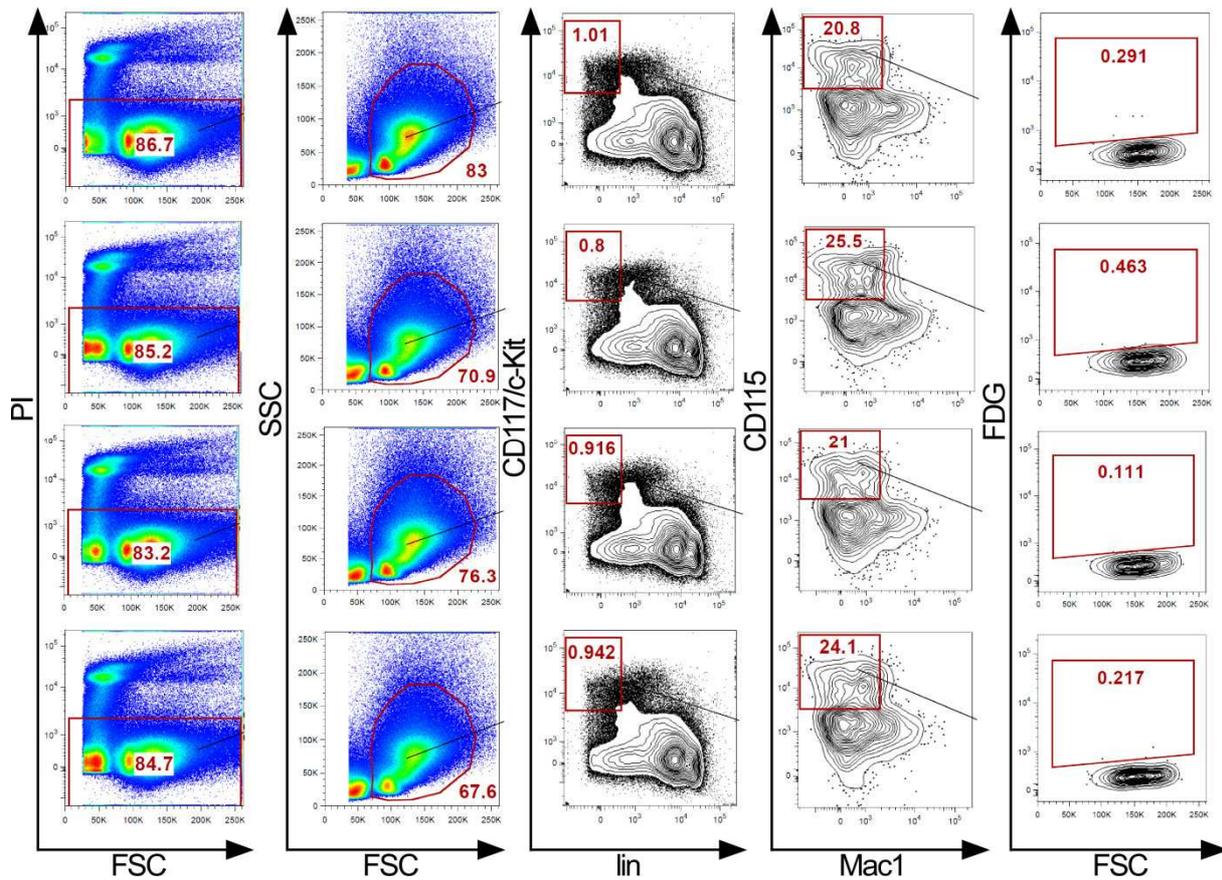
<b>h</b>	human oder Stunde
<b>HA</b>	Hämagglutinin
<b>HRP</b>	Meerrettich-Peroxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IRES</b>	<i>internal ribosomal binding site</i>
<b>k</b>	Kilo-
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Liter
<b>LacZ</b>	β-Galaktosidase
<b>m</b>	murin
<b>M</b>	molar (Mol pro Liter)
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
<b>min</b>	Minute
<b>MITF</b>	<i>Microphthalmia associated transcription factor</i>
<b>MW</b>	Molekulargewicht
<b>OC, OCP</b>	Osteoklast, <i>osteoclast progenitor</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCR, qPCR</b>	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
<b>PU.1</b>	auch Spi1, <i>SFFV proviral integration oncogen</i>
<b>PVDF</b>	Polyvinylidendifluorid
<b>RANK</b>	<i>receptor activator of nuclear Nfκb</i>
<b>RANKL</b>	<i>receptor activator of nuclear Nfκb ligand</i>
<b>rev</b>	<i>reverse</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>rounds per minute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>Scl</b>	<i>stem cell leukemia protein</i> , auch Tal1
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodiumdodecylsulfate</i>
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin RNA</i>
<b>T</b>	Thymin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>Tal1</b>	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i> , auch Scl
<b>TM</b>	Schmelztemperatur
<b>TRAP</b>	<i>tartate resistant acid phosphatase</i>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>WB</b>	Western Blot
<b>wt</b>	Wildtyp

## 7.2 FDG/LacZ-Expression in *Tal1-LacZ*- und Wildtyp-Mäusen

Die Knochenmarkszellen der *Tal1-LacZ*- und der Wildtyp-Mäuse wurde anhand der in Abschnitt 4.1.2 genannten Durchflusszytometrie-Parameter aufgetrennt und bewertet. Hier sind die Werte der einzelnen Analysen dargestellt. Abb.7.1 zeigt die Auswertung der *Tal1-LacZ*-Mäuse, in Abb.7.2 sind die Daten der Wildtyp-Mäuse dargestellt. Die Analyse wurde von Dr. J.R. Göthert (Universität Duisburg-Essen) durchgeführt.



**Abb.7.1: Durchflusszytometrie-Analyse der LacZ-Expression in *Tal1-LacZ*-Mäusen.** Das Knochenmark der *Tal1-LacZ*-Mäuse wurde entnommen und mit Antikörpern zur Durchflusszytometrie-Analyse inkubiert. Zunächst erfolgte eine Auftrennung in lebende und tote Zellen mit Hilfe von Propidiumiodid (PI). Die lebenden Zellen wurden dann weiterhin anhand ihrer Expression von CD117 und lin sortiert. Die CD117<sup>+</sup>-Population entspricht den hämatopoetischen Zellen und wurde anschließend anhand von CD115 und Mac1 in die Osteoklasten-Vorläufer-Population unterteilt. Die CD115<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>lin<sup>-</sup>-Population wurde auf die Färbung von FDG als Marker für die LacZ-Expression untersucht. Es zeigte sich, dass die *Tal1-LacZ*-Mäuse in den Osteoklasten-Vorläuferzellen LacZ, d.h. Tal1 exprimieren. Dieser Versuch wurde von Dr. J.R. Göthert durchgeführt (Universität Duisburg-Essen).



**Abb.7.2: Durchflusszytometrie-Analyse der LacZ-Expression in Wildtyp-Mäusen.** Das Knochenmark der Wildtyp-Mäuse wurde entnommen und mit Antikörpern zur Durchflusszytometrie-Analyse inkubiert und in der Durchflusszytometrie analysiert, wie bereits beschrieben. Die Wildtyp-Mäuse exprimieren in den Osteoklasten-Vorläuferzellen kein LacZ. Dieser Versuch wurde von Dr. J.R. Göthert durchgeführt (Universität Duisburg-Essen).

### 7.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 7.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und der Hersteller

CHEMIKALIE	HERSTELLER	ORT
Ampicillin (AMP)	Carl Roth	Karlsruhe
Adenosinriphosphat (ATP)	Carl Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	München
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories	Pasching
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich	München
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	Karlsruhe
Essigsäure, 100 %	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol, 100 %	Carl Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	München
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth	München
Formaldehyd	Carl Roth	Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA-Laboratories	Pasching
G418	AppliChem	Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth	Karlsruhe
L-Glutamin	PAA-Laboratories	Pasching
Glycerin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycogen	Carl Roth	Karlsruhe
Glycylglycin (Gly Gly)	AppliChem	Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth	Karlsruhe
Luciferin	Carl Roth	Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth	Karlsruhe
<i>Macrophage-colony stimulating factor</i> (M-CSF)	R&D Systems	Wiesbaden
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	Karlsruhe
Metafectene®	Biontex	München
Metafectene Pro®	Biontex	München
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Carl Roth	Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth	Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP-40)	Appllichem	Darmstadt
<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)	Carl Roth	Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories	Pasching
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem	Darmstadt
Protaminsulfat	Sigma Aldrich	München
Protease-Inhibitor-Mix	Roche	Mannheim
Proteinase K	Appllichem	Darmstadt
<i>Receptor activator of NfκB ligand</i> (RANKL)	R&D Systems	Wiesbaden
RNase A	Invitrogen	Darmstadt
Roti®-Block	Carl Roth	Karlsruhe
Roti®-Histofix	Carl Roth	Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth	Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth	Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth	Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth	Karlsruhe
Zeozin	Invivogen	Cyla

## 7.4 Verwendete Geräte

Tabelle 7.2: Übersicht der verwendeten Geräte und Hersteller

GERÄT	BEZEICHNUNG	HERSTELLER	ORT
Autoklav	HST 4-5-6 E	Zirbus Technology	Bad Grund
Bakterienbrutschrank	Kelvitron	Haraeus Holding	Hanau
DNA Thermal Cycler	Thermal Cycler 480	Perkin Eltner Cetus	Tuttlingen
DNA Thermal Cycler	GeneAmp 2400	Perkin Eltner Cetus	Tuttlingen
Elektrophoresekammer DNA	PerfectBlue Gelsystem S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Elektrophoresekammer Protein	Elektrophoresesystem	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Entwicklermaschine	OptimaxTQ	MS Laborgeräte	Diehlheim
Durchflusszytometrie-Gerät	FACSAria™, FACSScan™	BD Biosciences	Erembodegem
Falkon-Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich	Tuttlingen
Gefrierschrank -80 °C	Hettich Freezer	Andreas Hettich	Tuttlingen
Geldokumentation DNA	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories	München
Heizbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Kühlzentrifuge	CT15RE	Hitachi HighTechnologies	Mannheim
Light Cycler	LightCycler480	Roche	Mannheim
Luminometer	Microlumat LB96P	Berthold Technologies	Bad Wildbad
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika	Staufen
Mikroskop-Zellkultur	Diavert	Leitz	Wetzlar
NanoDrop	New Drop 1000 Spectromax	Biotechnologie	Erlangen
PCR-Thermocycler	Primus 96	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Rollmixer	R137	PSI Medizintechnik	Laudenbach
Schüttelinkubator	TH15	Edmund Bühler	Hechingen
Schüttler	Skyline DRS-12 ELMI LTF	Labortechnik	Wasserburg
SemiDry-Blotter	PerfectBlue SemiDry Web S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Sonifizierer	Bioruptor	Diagenode	Liège
Spektrometer	SpektraMax 340	MWG Biotech	Ebersberg
Sterilbank	CleanAir	BioFlow Technik	Meckenheim
Stromgeber	Consort	Labortechnik Fröbel	Wasserburg
Vortexer	Vibrofix VF1	Janke & Kunkel Labortechnik	Staufen i. Br.
Tank-Blotter	PerfectBlue Web S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Thermoblock	TDB-120	Kisker-Biotech	Steinfurt
Waage	EMB 600-2	Kern & Sohn	Balingen
Wasserbad	Polystat CC3	P.Huber Kältemaschinenbau	Offenburg
Zählkammer	Glasstic Glide	Hycor Biomedical Inc.	Kassel
Zellkulturbrutschrank	Cellstar	Nunc	Wiesbaden