

Julius Laine

OSTEOBLASTIEN ERILAISTUMISEN JA TOIMINNAN TRANSKRIPTIONAALINEN SÄÄTELY

Syventävien opintojen kirjallinen työ

Kevät 2017

Julius Laine

OSTEOBLASTIEN ERILAISTUMISEN JA TOIMINNAN TRANSKRIPTIONAALINEN SÄÄTELY

Lääketieteellinen biokemia ja genetiikka, Turun Yliopisto

Kevät 2017

Vastuhenkilö: Riku Kiviranta

Osteoblastien erilaistumisen ja toiminnan transkriptionaalinen säätely

SISÄLLYS

1. JOHDANTO
 - 1.1 Luun metaboliset vaikutukset
 - 1.2 Osteoblastit
 - 1.3 Osteoklastit
- 2 OSTEOLASTEJA SÄÄTELEVÄT TRANSKRIPTIOTEKIJÄT
 - 2.1 Runx2 ja Osx
 - 2.2 Zfp521
 - 2.3 Ebf1
- 3 TUTKIMUKSEN HYPOTEESIT
 - 3.1 Ebf1:n vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja toimintaan
 - 3.2 Ebf1:n, Runx2:n, Osx:n ja Zfp521:n yhteistyö osteoblastien erilaistumisessa
- 4 AINEISTO JA MENETELMÄT
 - 4.1 Siirtogeeniset hiirilinjat
 - 4.2 Heterotsygoottihiirien kokoluuvärjäykset
 - 4.3 Mikrotietokonetomografia (μ CT)
 - 4.4 Kallonlakiluusta eristettyjen solujen osteoblastikasvatukset
 - 4.5 Luciferaasi-Renilla-fluorokromitutkimukset
- 5 TULOKSET
 - 5.1 Zfp521 ja Ebf1 *in vivo*
 - 5.2 Ebf1-heterotsygoottihiiret *in vitro*
 - 5.3 Konditionaalisesti poistogeeniset Ebf1-hiiret *in vivo*
 - 5.4 Konditionaalisesti poistogeeniset Ebf1-hiiret *in vitro*
 - 5.5 Ebf1, Runx2 ja Zfp521 *in vitro*
 - 5.6 Ebf1, Runx2 ja Zfp521 *in vivo*
- 6 POHDINTA
 - 6.1 Ebf1 lisää varhaisten osteoblastien erilaistumista
 - 6.2 Runx2 säätelee osteoblasteja yhdessä Ebf1:n ja Zfp521:n kanssa
- 7 Kirjallisuus

1. Johdanto

1.1 Luun metaboliset vaikutukset

Luuta on aikaisemmin pidetty pelkkänä ihmiskehon rakenteellisena tukena ja kalsiumin ja fosfaatin varastona, mutta tämä käsitys on viime vuosien aikana muuttunut. Nykyisin luun merkitystä ihmiskehossa pidetäänkin aikaisempaa laajempana. Luu on tärkeä endokriininen elin, jolla on kyky säädellä moninaisia elimistön aineenvaihdunnallisia toimintoja. Nykyään tiedetään, että luusolut säätelevät luun uudismuodostusta ja ne osallistuvat myös merkittäväällä tavalla luuytimen verisolujen kantasolupesän säätelyyn (Calvi ym. 2003).

Syöpäsolut voivat hakeutua verenkierrossa luun pinnalle, jossa syöpäsolut ja luusolut ovat vuorovaikutuksessa (Wang ym. 2009). Luukudosta uudistetaan koko elämän ajan.

Osteoklastit poraavat luuhun tunneleita kiinnittymällä luuhun ja syömällä, eli resorboimalla luuta. Tätä seuraa osteoblastien hakeutuminen näihin tunneleihin, joissa ne muodostavat uutta luuta. Normaalisissa tilanteissa tämä osteoblastien ja osteoklastien yhteistyö johtaa luun muodostumisen ja hajotuksen tasapainoon. Häiriöt luusolujen erilaistumisessa ja toiminnassa ja monet hormonaaliset muutokset, kuten kilpirauhasen tai lisäkilpirauhasen liikatoiminta voivat johtaa luumäärän vähenemiseen ja osteoporoosiin ja ne voivat myös sekoittaa hematopoieettisen kantasolupesän normaalin toiminnan (Visnjic ym. 2004).

Esimerkiksi on havaittu, että multippelissa myeloomassa luuytimen solujen ja osteoblastien väliset vuorovaikutusmekanismit ovat tärkeitä syöpäsolujen hakeutumisessa luuhun ja tyypillisten luusyöpymien muodostukselle (Abe 2009 ym. ja Azab ym. 2009). Pelkän rakenteellisen tuen sijaan, luun tarkoitus ihmiskehossa onkin monitahoisempi ja siksi on tärkeää selvittää, mitkä solumeکانismit säätelevät luuta muodostavien solujen, osteoblastien, erilaistumista ja toimintaa. Ymmärtämällä osteoblastien erilaistumista ja toimintaa sääteleviä mekanismeja, voidaan ymmärtää paremmin myös aineenvaihdunnallisia luusairauksia ja luuytimen syöpätauteja.

1.2 Osteoblastit

Osteoblastit ovat luuta muodostavia soluja, jotka erilaistuvat luuytimessä sijaitsevista mesenkymaalisista kantasoluista. Mesenkymaaliset kantasolut kykenevät myös erilaistumaan muiksi solutyypeiksi kuten rasva-, lihas- ja rustosoluihin (Aubin 2002). Useiden hormonien, kasvutekijöiden ja sytokiinien on osoitettu säätelevän osteoblastien erilaistumista ja toimintaa (Gazzerro ym. 2006 ja Bodine ym. 2006). Esimerkiksi

lisäkilpirauhashormoni ja Wnt- (*Proto-oncogene protein Wnt-1*) ja BMP2-transkriptiotekijät (*bone morphogenic protein-2*) (Hill ym. 2005 ja Takuwa ym. 1991) lisäävät valikoitujen transkriptiotekijöiden tuotantoa sekä säätelevät mesenkymaalisten kantasolujen sitoutumista osteoblastilinjalle ja solujen erilaistumista kypsiksi luuta muodostaviksi soluiksi.

1.3 Osteoklastit

Luun muodostuksen lisäksi osteoblastit myös säätelevät luuta hajottavien solujen eli osteoklastien erilaistumista ja toimintaa. Ne erittävät RANK-ligandia (*RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) sekä M-CSF-sytokiinia (*macrophage colony-stimulating factor*), jotka kiihdyttävät luuta hajottavien solujen, osteoklastien, erilaistumista hematopoieettisista kantasoluista sekä kypsien osteoklastien toimintaa (Boyce, B ym. 2008). RANKL:n lisäksi osteoblastit erittävät osteoklastien erilaistumista hidastavaa sytokiinia, osteoprotegeriiniä (OPG), joka sitoo RANKL:a ja siten estää sen toimintaa. Näiden kahden sytokiinin välinen tasapaino määrittää osteoklastien erilaistumisnopeuden sekä säätelee kypsien osteoklastien toimintaa.

2. Osteoblasteja säätelevät transkriptiotekijät

2.1 Runx2 ja Osterix

Runx2 (Runt-related transcription factor 2) ja Osterix (Osx) ovat transkriptiotekijöitä, jotka ovat välttämättömiä osteoblastien erilaistumiselle mesenkymaalisisista kantasoluista. Runx2- tai Osx-geenin poistaminen genomista aiheuttaa luun muodostumisen täydelliseen estymiseen (Komori 1997 ym., Otto 1997 ym. ja Nakashima ym. 2002). Toisaalta Runx2:n ylituotanto kypsissä osteoblasteissa johtaa myös siihen, että luuta muodostuukin tavallista vähemmän. Tutkimusten mukaan Runx2 on täysin välttämätön osteoblastien alkuvaiheen erilaistumisessa, mutta tietämys sen negatiivisesta vaikutuksesta kypsemmissä osteoblasteissa on vielä epävarmaa, koska tämä tieto perustuu pelkkiin Runx2:n ylituotantoa hyödyntäviin kokeisiin.

2.2 Zfp521

Zfp521-geeni (30-zinc finger protein) ilmentyy rustosoluissa, luukalvossa, osteoblastien esiasteissa ja osteosyyteissä (Hesse ym. 2010). Zfp521 säätelee luun muodostusta siten, että sillä on estävä vaikutus osteoblastien erilaistumiseen varhaisvaiheessa ja kiihdyttävä vaikutus myöhäisemmässä erilaistumisvaiheessa (Wu ym. 2009 ja Kiviranta ym. 2013). Kun

Zfp521-transkriptiotekijää tuotetaan kokeellisesti ylimäärin kypsissä osteoblasteissa, luun määrä lisääntyy osteoblastien määrän ja aktiivisuuden lisääntymisen takia. Toisaalta Zfp521-geenin poistaminen kypsistä osteoblasteista johtaa alentuneeseen luun muodostukseen. Varhaisvaiheen osteoblasteissa Zfp521:n vaikutus on vielä epäselvää, koska sekä Zfp521:n liikatuotanto, että Zfp521-geenin poisto varhaisissa osteoblasteissa tai mesenkymaalisissa kantasoluissa, johtaa osteoblastien heikentyneeseen erilaistumiseen.

2.3 Ebf1

Ebf1 on transkriptiotekijä, jonka Hagman ym. (1993) havaitsivat säätelevän B-solujen erilaistumista. Myöhemmissä tutkimuksissa on myös havaittu, että Ebf1:llä on vaikutuksia myös hermo- ja rasvasolujen erilaistumiseen (Jimenez ym. 2007 ja Garel ym. 1999). Tutkimukseni kannalta on mielenkiintoista, että Ebf1:llä epäillään olevan vaikutuksia myös osteoblastien erilaistumiseen ja toimintaan. Hesslein ym. (2009) myös osoittivat, että Ebf1-geenin poistaminen hiiren genomista kaikissa soluissa johti lisääntyneeseen luun muodostukseen ja luun määrään histomorfometria-analyysin perustella. Samassa tutkimuksessa tehdyssä mikrotietokonetomografiassa kuitenkin havaittiin, että varsinaisen mineralisoituneen luun määrä olikin päinvastoin vähentynyt neljän viikon ikäisillä hiirillä. Ebf1:n ylituotanto kypsissä osteoblasteissa on todettu johtavan päinvastaiseen fenotyyppiin, verrattuna Ebf1:n globaaliin poistoon genomista. Ebf1:stä ylituottavasta hiirimallista havaittiin histomorfometrialla, että osteoblastien määrä oli kasvanut. Kuitenkin luun muodostus oli vähentynyt ja massa pienentynyt (Kiviranta ym. 2013).

3. Tutkimuksen hypoteesit ja tarkoitus

3.1 Ebf1:n vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja toimintaan

Ebf1:n globaali poistaminen hiiren genomista, on todettu lisäävän luun muodostusta ja osteoblastien määrää. Toisaalta Ebf1:n ylituotanto hiiren kypsissä osteoblasteissa johtaa vähentyneeseen luun muodostukseen, vaikka osteoblastien määrä oli näillä hiirillä kohonnut. Soluviljelmässä Ebf1:n ylituotanto lisää osteoblastien erilaistumista varhaisessa vaiheessa. Tämä löydös herättää epäilyn, että osteoblastien toimintakyky heikentyy, kun Ebf1:tä tuotetaan ylimäärin kypsissä osteoblasteissa. Tämän tutkimuksen hypoteesina oli, että Ebf1:llä on erilaistumisvaihespesifisiä vaikutuksia säädellössään osteoblastien kehittymistä ja toimintaa. Varhaisissa osteoblasteissa Ebf1:llä vaikuttaisi olevan positiivinen vaikutus osteoblastien erilaistumiseen ja myöhäisessä vaiheessa negatiivinen vaikutus. Aikaisemmissa

tutkimuksissa oli käytetty globaalisti Ebf1-poistogeenista hiirimallia, sekä kypsissä osteoblasteissa Ebf1:stä ylimäärin tuottavaa hiirimallia. Näitä tutkimuksia täydentääksemme, tässä tutkimuksessa käytettiin Ebf1:n suhteen globaalisti heterotsygoottia hiirimallia, sekä säädeltävästi poistogeenisiä hiiriä, joissa Ebf1 poistettiin genomista joko varhaisissa tai kypsissä osteoblasteissa. Näiden hiirimallien avulla oli tarkoitus selvittää Ebf1:n vaikutuksia osteoblastien erilaistumisen ja toiminnan säätelyyn eri vaiheissa.

3.2 Ebf1:n, Runx2:n ja Zfp521:n yhteistyö osteoblastien erilaistumisessa

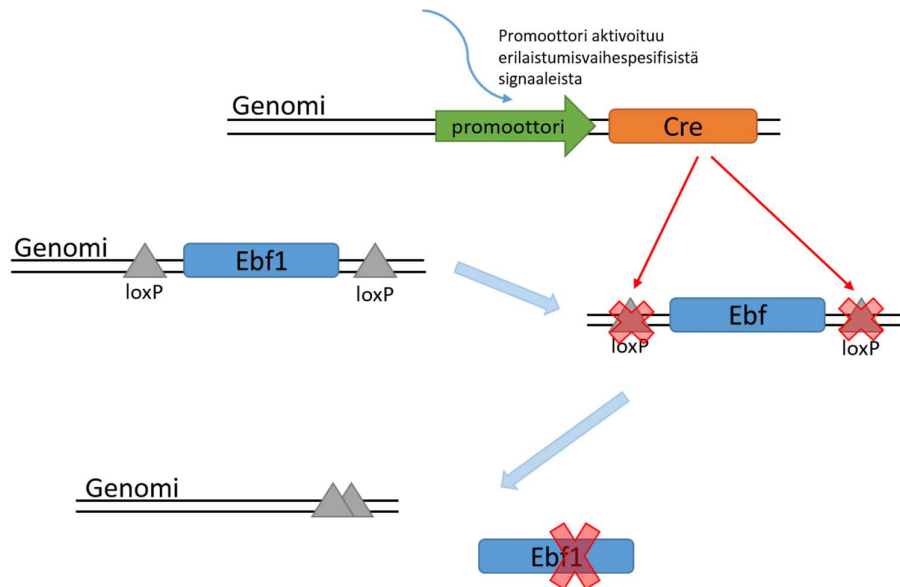
Runx2 on välttämätön transkriptiotekijä osteoblastien erilaistumiselle ja luun muodostukselle. Viimeaikaisten tutkimusten mukaan myös Ebf1 ja Zfp521 vaikuttavat osteoblastien erilaistumisen ja toiminnan säätelyyn. Zfp521 sitoutuu Runx2-proteiinin kanssa (Hesse ym. 2010) ja Zfp521:n on tutkimusten perusteella epäilty estävän Runx2:n vaikutusta transkriptiotekijänä. On myös havaittu, että Zfp521 sitoutuu Ebf1:een ja vähentää sen transkriptionaalista vaikutusta (Kiviranta ym. 2013). Maier ym. (2004) havaitsivat, että Ebf1 ja Runx1 ovat vuorovaikutuksessa säädellensä B-solujen erilaistumista. Maierin ym. (2004) tutkimus herättääkin kysymyksen, voisivatko Ebf1 ja Runx2 olla vuorovaikutuksessa ja siten säädellä osteoblastien erilaistumista ja toimintaa. Tämän tutkimuksen osatarkoituksena onkin selvittää, ovatko Ebf1, Zfp521 ja Runx2 kaikki vuorovaikutuksessa keskenään ja säätelevätkö nämä transkriptiotekijät vuorovaikutuksensa kautta osteoblastien erilaistumista ja toimintaa.

4. Aineisto ja menetelmät

4.1 Siirtogeeniset hiirilinjat

Tutkimuksessamme käytettiin sekä *in vivo* kokeita, tarkoittaen elävässä organismissa tehtyä tutkimusta, sekä *in vitro* kokeita, joissa kokeita tehdään soluviljelmien avulla. *In vivo* kokeissa käytettiin muuntogeenisiä hiirilinjoja, jotka olivat saatavilla tutkimusryhmässänne valmiiksi. Kaikki tutkimuksessa käytettävät muuntogeeniset hiiret, oli tehty käyttämällä C57BL/6-hiiriä. Tutkimukseen tarvittavia hiirilinjoja oli kahta päätyyppiä. Toisessa tutkittava geeni oli kokonaan poistettu hiiren kaikista soluista (globaali geenin poisto) ja toisessa tutkittava geeni poistettiin genomista, kun solun erilaistumisaste oli spesifisessä vaiheessa. Globaalisti poistogeenisessä hiiressä tutkittava geeni oli poistettu joko molemmista alleeleista

(homotsygootti) tai vain toisesta alleelistä (heterotsygootti). Erilaistumisvaihespesifisessä geenin poistossa tutkittava geenit poistetaan genomista, kun kyseiselle erilaistumisvaiheelle tunnettu geeni alkaa ilmentyä genomissa.



Kuva 1. Erilaistumisvaihespesifiset signaalit aktivoivat promoottorin (Osx- tai OC-promoottori), joka johtaa Cre-geenin ilmentymiseen. Cre-entsyymi katkaisee genomien loxP-jaksojen kohdalta, joiden välissä Ebf1-geeni sijaitsee ja siten Ebf1-geeni poistuu niiden solujen genomista, joissa erilaistumisspesifinen promoottorin aktivoituminen on tapahtunut.

Ebf1-geenin poistamiseksi varhaisen ja myöhäisen erilaistumisasteen osteoblasteista käytettiin kahta eri erilaistumisvaihespesifistä geeniä, joista toinen ilmentyi solun varhaisvaiheen erilaistumisessa (Osterix, Osx) ja toinen myöhäisvaiheen erilaistumisessa (osteokalsiini, OC). Osteokalsiini ja Osterix ovat proteiineja, jotka ilmentyvät pääosin osteoblasteissa ja siten geenin poisto kohdentuu merkittävästi vain osteoblasteihin. Hiirilinjoissa, joista geeni poistettiin erilaistumisvaihespesifisesti, tutkittava geeni oli genomissa siten, että sen DNA-koodin edessä ja takana oli loxP-DNA-jaksot. Näiden loxP-jaksojen kohdalta geeni katkaistiin Cre-proteiinin avulla, joka johti tutkittavan geenin poistumiseen genomista. Cre-proteiinia koodaava geeni oli genomissa yhdessä joko OC- tai Osx-promoottorin kanssa, joiden aktivoitumien johti Cre-proteiinin ilmentymiseen. Tutkittava geeni leikkautui tämän jälkeen genomista pois, kun Cre-proteiini katkaisi genomien lox-P jaksojen kohdalta. Tällä menetelmällä voitiin tutkittava geeni poistaa vain

osteoblasteista ja geenin ilmentyminen ja sen toiminta estää varhaisessa tai myöhäisessä osteoblastien erilaistumisvaiheessa.

Tutkimuksen pääkohteena oli Ebf1, joten erilaistumisvaihespesifisiä poistogeenisiä hiiriä käytettiin vain Ebf1:stä tutkittaessa. Globaalisti poistogeenisistä hiirilinjoista käytin Ebf1-, Zfp521- ja Runx2-poistogeenisiä hiiriä sekä hiirilinjoja, joissa hiiret olivat heterotsygootteja näistä geeneistä kahden tai kolmen suhteen.

Hiiret ja in vivo -kokeet			
	μCT	COB	Luurankovärjäys
Homotsygootit			
Ebf1	x		
Zfp521	x		
Heterotsygootit			
Ebf1		x	x
Runx2			x
Zfp521			x
E1xR2			x
E1xZ5			x
R2xZ5			x
E1xR2xZ5			x
Konditionaalisesti poistogeeniset			
Ebf1-Osx	x	x	
Ebf1-OC	x		

Kuva 2 Tutkimuksessa käytettyjen hiirten genotyypit ja genotyypeistä tehdyt tutkimukset

Tutkittavat hiiret otettiin tutkimukseen 3, 6 tai 12 viikon ikäisinä. Tutkimusnäytteiden keräyspäivänä hiiret nukutettiin hiilidioksidikammiossa. Tämän jälkeen tehtiin sydänpunctio, josta saatiin kerättyä verinäyte ja joka samalla toimi hiiren ensivaiheen lopetuksena. Toisen vaiheen lopetusmenetelmänä käytettiin kaularangan sijoiltaan siirtoa. Lopetuksen jälkeen hiiriltä otettiin talteen oikea alaraaja ja rintarankalohko, jotka säilytettiin 70-prosenttisessä etanolissa, ja vasen alaraaja, joka otettiin formaldehydisäilytykseen.

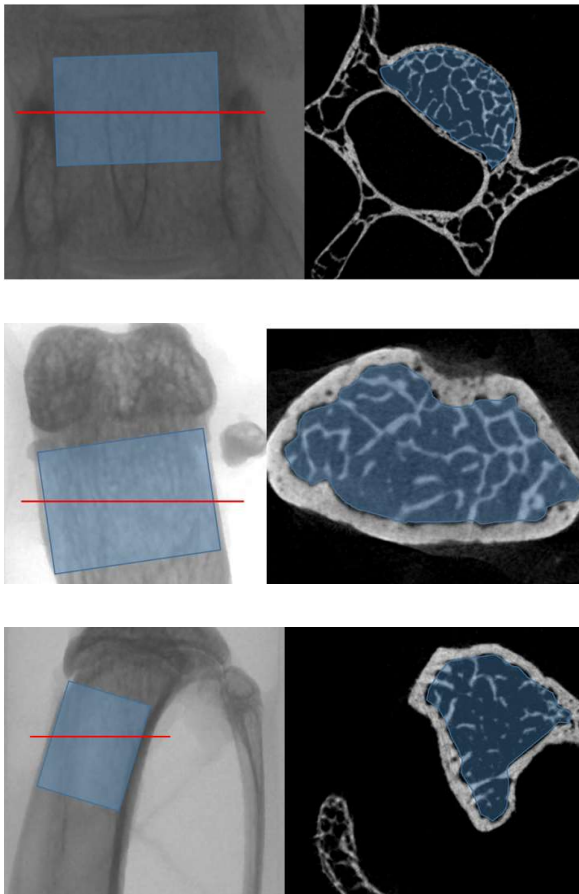
4.2 Heterotsygoottihiirten kokoluuvärjäys

Lisäksi tein hiirten kokoluurankovärjäyksen vastasyntyneistä ja viikon ikäisistä hiiristä. Hiiret otettiin tutkimukseen 1–3 vuorokauden tai 7–8 vuorokauden ikäisinä. Hiiret ovat vaihtolämpöisiä 10 vuorokauden ikään asti, joten nukutus ja kivunlievitys saatiin aikaan viilentämällä hiiret jäähauteella. Nukutuksen jälkeen hiiret lopetettiin injektoimalla yliannos

tribromoetanolia (Avertin) vatsaonteloon. Lopetuksen jälkeen hiiret preparoitiin ihosta, rasvasta ja sisäelimistä ja ne laitettiin värjäytymään sini- (Alcian) ja punavärjykseen (Alizarin), jolloin luu värjäytyi siniseksi ja rusto punaiseksi. Värjäytymisen jälkeen luuta ympäröivä pehmytkudos, rustoa lukuun ottamatta, liuotettiin pois 2 %:lla kaliumhydroksidilla (KOH). Liuosta vaihdettiin 3–4 välein ja vaihtokerroilla 2-prosenttisesta kaliumhydroksidista korvattiin viidesosa glykolilla. Runx2-heterotsygoottihierillä on todettu olevan defekti kallonlakiluiden kasvussa ja niillä on syntyessään normaalia suurempi aukile kallonlaessa. Parittamalla Runx2-heterotsygoottihieriä Ebf1- ja/tai Zfp521-heterotsygoottihierien kanssa haluttiin selvittää, onko näillä genotyypeillä eroja kallonlakauikeeseen koossa. Värjätyistä hieristä kerättiin kallot, joista mitattiin kallonlakauikeeseen koko.

4.3 Mikrotietokonetomografia (μ CT)

Tutkittavilta hieriltä kerättiin oikea reisilu, säärilu ja lannerankalohko, joita säilytettiin 70-prosenttisessä etanolissa. Ennen tietokonetomografiaa, reisi- ja sääriluiden ympäriltä poistettiin tarkasti pehmytkudos ja lannerankalohkojen ympäriltä pehmytkudosta siistittiin pois. Luut kuvattiin Skyscan 1072 röntgentietokonetomografialaitteella. Näytteet kuvattiin 0,45 asteen välein siten, että luunäyte pyöri pituussuunnassa. Tämän jälkeen kuvat rekonstruointiin, eli 0.45 asteen välein kuvautuista röntgenkuvista muodostettiin poikittaisleikkeitä, käyttäen Skyscan 1072 laitteen lisenssiin kuuluvaa rekonstruointiohjelmaa. Kuvista valittiin analysoitava tilavuus (VOI = volume of interest) piirtämällä VOI:n ääriiivat poikittaisleikkeisiin piirtopöytää käyttäen (ks. kuva 3). Ääriiivat piirrettiin siten, että analysoitava tilavuus sisälsi vain tiiviin luun sisällä olevan hohkaluun. Reisiluusta valittiin analysoitavaksi luun distaaliosan hohkaluu, sääriluusta proksimaaliosan hohkaluu ja lannerangasta analysoitiin III – IV rintanikaman hohkaluu.



Kuva 3. Mikrotomografialla kuvattujen nikamien (A), reisiluiden distaalipään (B) ja sääriluun proksimaalipään (C) analysoitavat tilavuudet luuytimestä, jossa hohkaluu näkyy valkoisena kennomaisena muodostumana.

Kuvista mitattiin analysoitavan tilavuuden alueelta luun määrä, analysoitavan luuytimen määrä, luun määrä suhteessa luuytimen kokonaistilavuuteen (BV/TV) ja hohkaluun trabekkelien määrä (Tb.N), käyttämällä Skyscan 1072 tietokonetomografialaitteen lisenssiin kuuluvaa analysointiohjelmaa.

4.4 Kallonlakiluusta eristettyjen solujen osteoblastikasvatukset

Ebf1-OC ja Ebf1-Osx muuntogeenisten hiirten kallonlakiluista eristetyistä soluista tehtiin soluviljelmät, jossa soluja erilaistettiin osteoblasteiksi. Keräyspäivänä hiiret lopetettiin, kuten edellä kirjattu (ks. 4.1). Kallonlaki poistettiin saksilla, pestiin PBS-liuoksella (fosforipuskuroitu liuos) irtosuista ja tämän jälkeen osteoblastien esiastesoluja irrotettiin kallonlaesta kollageenaasi-dispaasientsyymi liuoksella ja laitettiin kasvamaan elatusnesteeseen petrimaljalle. Hiiristä otettiin lisäksi kudospnäyte, jonka avulla määritettiin hiirten genotyyppi. Tutkittavaksi hiiriksi valittiin ne, jotka olivat homotsygotteja loxP-jaksojen ja Cre:n suhteen. Vertaisnäytteiksi valittiin ne, jotka olivat heterotsygotteja loxP-jaksojen suhteen. Soluja

kasvatettiin 2–3 päivää ja tämän jälkeen solut pestiin PBS-liuoksella, jotta petrimaljan pohjaan kiinnittymättömät solut saatiin poistettua. Ne solut, jotka olivat tarttuneet petrimaljan pohjaan, irrotettiin EDTA-trypsiini liuoksella homogeeniseksi soluseokseksi. Samaa genotyyppiä olevat solut kerättiin yhteen pulloon, solut laskettiin ja laitettiin 6-kuoppalevylle kasvamaan 7500 solua/kaivo. Soluja kasvatettiin 0, 7, 14 ja 21 vuorokautta ja jokaista aikapistettä kohden oli kolme 6-kuoppalevyn kaivoa. Soluja kasvatettiin α -elatusnesteessä ja solujen erilaistumisen käynnistäminen osteoblastilinjalte saatiin aikaan käyttämällä natrium- β -glyserofosfaattia, deksametasonia ja askorbiinihappoa. Kokeen aikapistepäivinä, elatusneste poistettiin, solut pestiin PBS-liuoksella ja kiinnitettiin kaivon pintaan formaliinilla. Tämän jälkeen solut värjättiin alkalinen fosfataasivärjäyksellä (Sabatakos ym. 2000) tai määritettiin alkalisen fosfataasin ilmentyminen qPCR (kvantitatiivinen PCR) menetelmällä (Kiviranta ym. 2013).

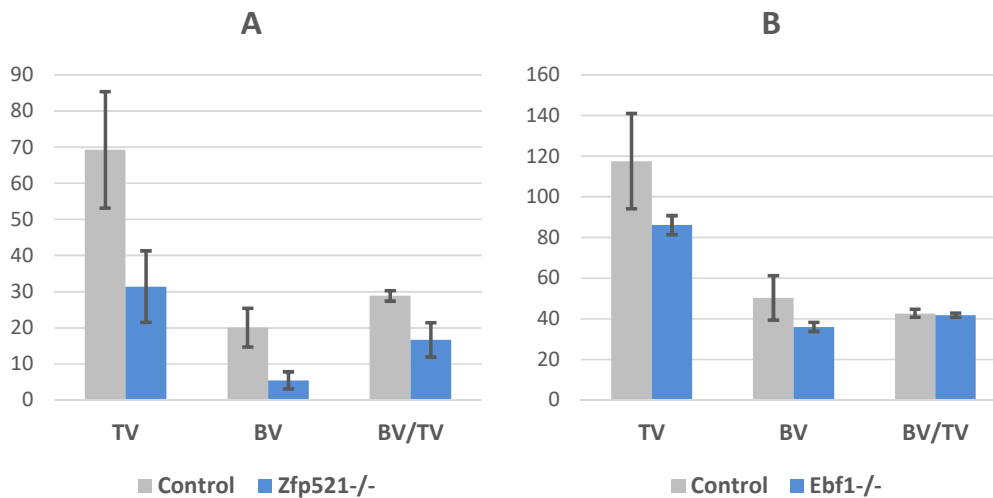
4.5 Luciferaasi-Renilla-fluorokromitutkimukset

Ebf1:n, Runx2:n ja Zfp521:n vaikutuksia Osterix-geenin ilmentymiseen tutkittiin käyttämällä Promegan kaupallista tutkimusmenetelmää (Dual-Luciferase Reporter Assay System). Kokeessa käytettiin DNA-plasmidia, jossa oli Osterix-geenin promootteri, jota plasmidin DNA-ketjussa seurasi lusiferaasi-entsyymiä koodaavaa geenijakso (Osx-Luc-plasmidi). Ebf1-, Runx2-, ja Zfp521-geeneistä käytimme plasmideita, joissa geeni ilmentyi sytomegalovirus promootterin avulla transfektoidussa solussa. Kokeen soluina käytettiin C3H10T1/2-soluja, jotka ovat hiiriperäisiä mesenkymaalista kantasoluista peräisin olevia soluja. C3H10T1/2-soluja laitettiin kasvamaan 96-kuoppalevylle 50 000 solua/kaivo. Käyttämällä Promegan kaupallista Fugene 6 transfektioliuosta, Ebf1-, Zfp521- ja Runx2-plasmideja transfektoitiin joko yksin, kahdestaan tai kolmestaan C3H10T1/2-soluihin, jotta saataisiin selvitettyä niiden yksittäiset ja yhteiset vaikutukset Osx-geenin ilmentyiseen. Lisäksi kaikkiin solukasvatuksiin transfektoitiin myös Osx-Luc-plasmidia ja renilla-plasmidia. Renillan ilmentyminen plasmidissa tapahtui verrannollisesti solujen transfektion onnistumiseen. Soluja inkuboitiin 24 tuntia 37 celciusasteessa ja tämän jälkeen lisättiin LAR-II kaupallinen liuos. LAR-II liuoksessa on lusiferaasisubstraatti, joka liittyessään soluissa muodostuneeseen lusiferaasiin, saa aikaan luminesenssia. Luminesenssi mitattiin luminometrilla. Mittauksen jälkeen lisättiin Stop & Glo kaupallinen liuos, jossa on lusiferaasin luminesenssin lopettava ainesosa, sekä renillan substraatti, joka saa aikaan soluissa muodostuneen renillan luminesenssi. Luminesenssi mitattiin luminometrilla ja lusiferaasista saadut tulokset suhteutettiin

renillanluminesenssiin, eli lusiferaasin luminesenssi suhteutettiin solujen transfektion onnistumiseen, jolloin saatiin eri kaivojen solujen ja plasmidiyhdistelmien transfektiotehokkuuden erot huomioitua.

5. Tulokset

5.1 Zfp521 ja Efb1 *in vivo*

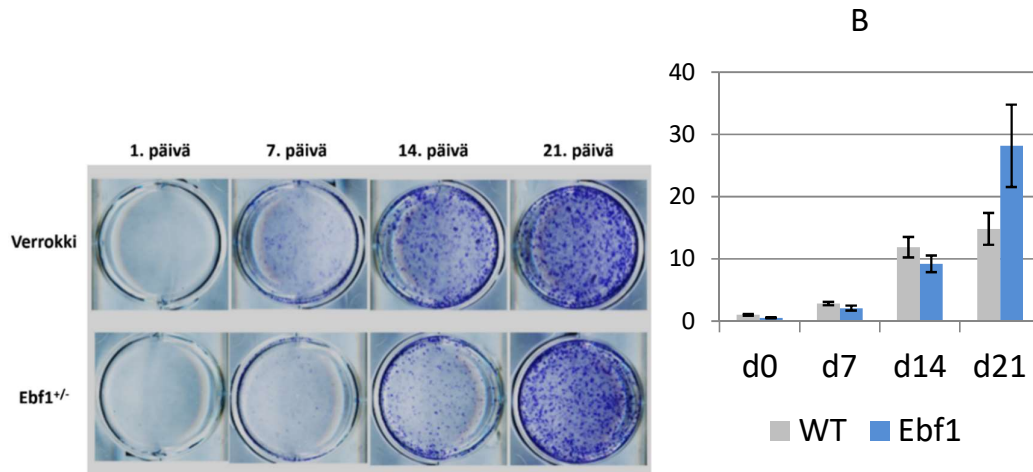


Kuva 4: 3-viikon ikäisten Zfp521-poistogeenisten (**A**) ja Efb1-poistogeenisten (**B**) hiirten rintanikamat analysoitiin mikrotietokonetomografialla. TV (tissue volume) on analysoidun luuytimen tilavuus. BV (bone volume) on hohkaluun määrä. BV/TV (bone volume / tissue volume) on hohkaluun määrä suhteessa analysoituun luuytimen tilavuuteen.

Mikrotietokonetomografialla tehdyssä nikamien analyysissä 3-viikon globaalisti Zfp521-poistogeenisten hiirten nikamissa havaittiin TV:n ($p < 0,005$) ja BV:n ($p < 0,001$) olevan pienempi kuin verrokkiryhmässä. Lisäksi BV/TV:n havaittiin olevan pienempi Zfp521-poistogeenisissä hiirissä ($p < 0,005$) eli hohkaluun määrä oli vähentynyt enemmän, suhteessa luuytimen kokonaistilavuuteen. BV/TV oli 42,3 % matalampi poistogeenisten hiirten nikamissa, verrattuna verrokkihierren nikamiin.

3-viikon ikäisissä Efb1-poistogeenisissä hiirissä havaittiin myös TV:n ($p < 0,05$) ja BV:n ($p < 0,05$) olevan pienempi, kuin verrokkiryhmässä. Suhteutettuna analysoidun nikaman luuytimen tilavuuteen ei Efb1-poistogeenisissä hiirissä ollut muuttunut tilastollisesti merkitsevästi.

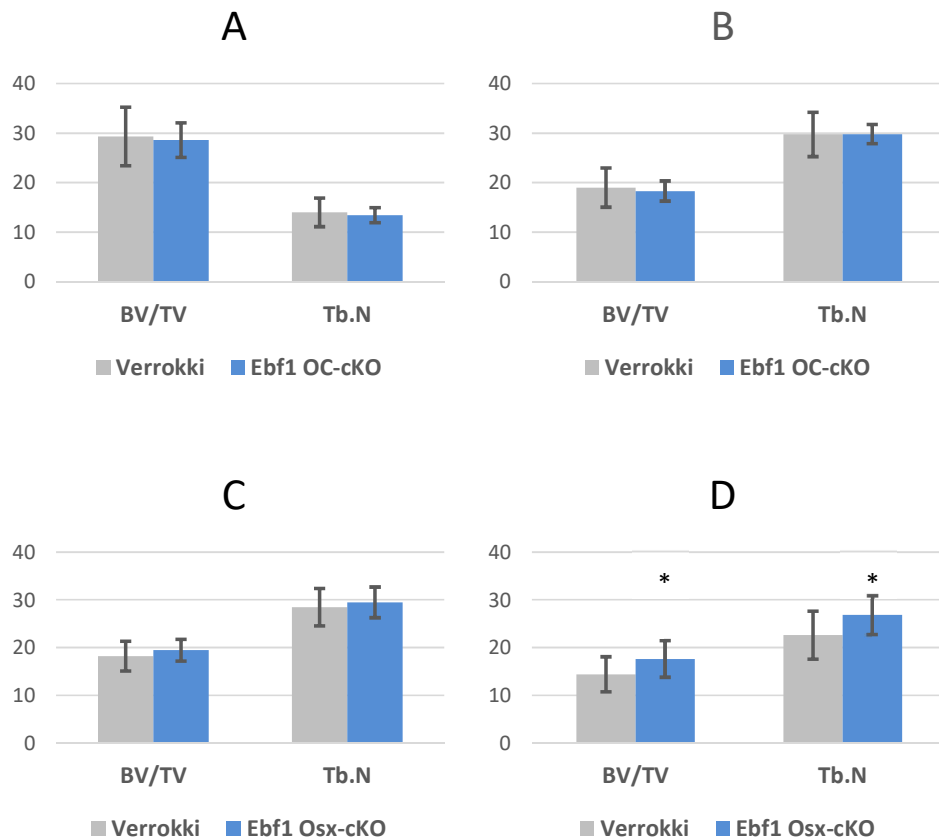
5.2 Ebf1-heterotsygoottihiiret *in vitro*



Kuva 5 Ebf1 heterotsygoottien (Ebf1^{+/-}) hiirten soluja kerättiin kallonlakiluusta ja viljeltiin osteoblastierilaistumista indusoivassa elatusnesteessä (COB = calvarial osteoblasts). Soluja kasvatettiin 0, 7, 14 ja 21 päivää ja tehtiin ALP-värjäykset ja ALP-värjäysten absorbanssimittaukset (ALP = alkalinen fosfataasi). **A:** Ebf1^{+/-} hiirten osteoblastikasvatusten ALP-värjäykset. **C:** Ebf1^{+/-} COB-viljelyistä ALP-absorbanssi. (**B**)

Ebf1^{+/-} hiirten kallonlaesta eristetyistä soluista (COB) tehtiin soluviljelyt osteoblastien erilaistumista indusoivassa elatusnesteessä. Kasvatukset analysoitiin solujen keräyspäivänä ja 7, 14 ja 21-vuorokauden kuluttua solukasvatusten alusta. Analysointipäivänä osa kaivoista värjättiin ALP-värjäyksellä ja osasta mitattiin ALP-aktiivisuus, värjäämällä hajotetusta solususpensiosta ALP ja mittaamalla absorbanssi. Kasvatuksissa havaittiin, että ALP-aktiivisuus oli matalampi heterotsygoottisoluihin 14-päivän aikapisteeseen asti, mutta 21 päivän kuluttua heterotsygoottisolujen ALP-aktiivisuus oli jopa ohittanut verrokkihiirten COB-kasvatusten ALP-aktiivisuuden. Ebf1^{+/-} kasvatuksissa nähdyn selvän eron takia halusimme tehdä uudet COB-viljelyt hiiristä, joilta Ebf1 oli poistettu osteoblastispesifisesti (ks. 5.5).

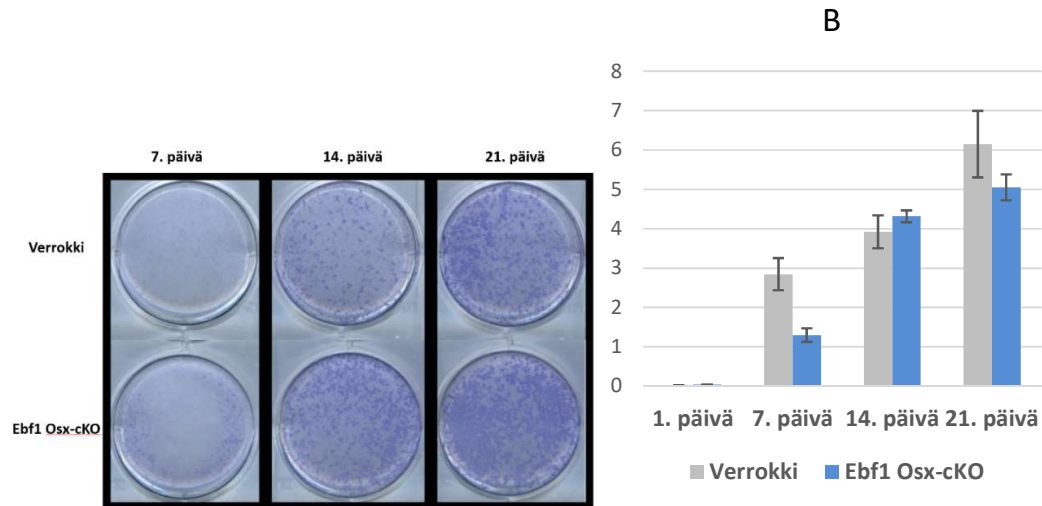
5.3 Konditionaalisesti poistogeeniset Ebf1-hiiret *in vivo*



Kuva 6 12-viikon ikäisten hiirien reisi- ja sääriluu analysoidiin mikrotietokonetomografialla. BV/TV (bone volume / tissue volume) on hohkaluun määrä suhteessa analysoituun luuytimen tilavuuteen. Tb.N (trabecular number) on luutrabekkelien määrä. **A:** Ebf1-OC-cKO reisiluu. **B:** Ebf1-OC-cKO sääriluu. **C** Ebf1-Osx-cKO reisiluu. **D:** Ebf1-Osx-cKO sääriluu

Mikrotietokonetomografialla analysoidiin 12 -viikon ikäisten Ebf1-OC ja Ebf1-Osx erilaistumisvaihespesifisten poistogeeniset hiirten reisi- ja sääriluu. Ebf1-OC-cKO hiirten reisi- tai sääriluiden hohkaluun määrässä (BV/TV) tai trabekkelien määrässä (Tb.N) ei ollut eroa verrokkihiiriin. Myöskään Ebf1-Osx-cKO hiirten reisiluiden BV/TV:ssä tai Tb.N:ssä ei ollut eroa verrattuna verrokkihiirten reisiluihin. Kuitenkin Ebf1-Osx-cKO hiirten sääriluissa nähtiin tilastollisesti merkittävä BV/TV:n ($p < 0,05$) ja Tb.N:n ($p < 0,05$) kasvu, verrattuna verrokkihiirien sääriluihin. Kun Ebf1-geeni poistettiin varhaisista osteoblasteista, sääriluissa siis nähtiin hohkaluun määrän ja trabekkeleiden määrän kasvu. Ebf1-geenin poisto kypsemmissä osteoblasteissa ei kuitenkaan vaikuttanut näihin parametreihin.

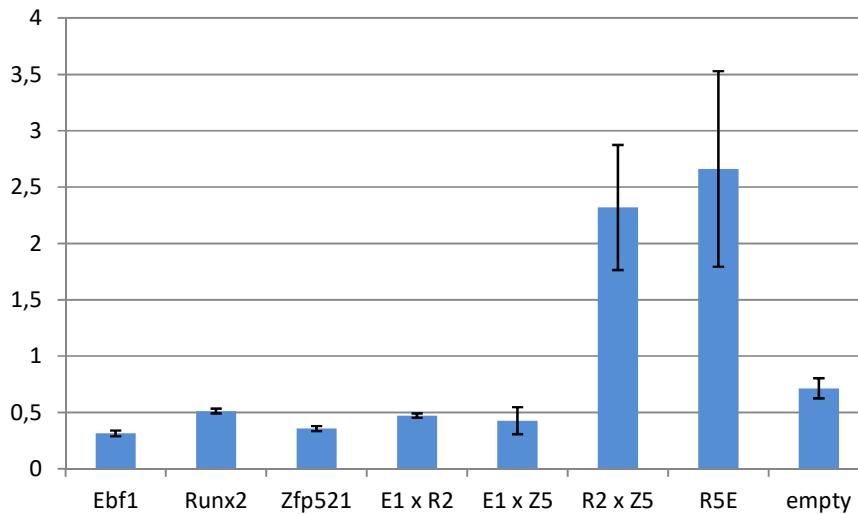
5.4 Konditionaalisesti poistogeeniset Ebf1-hiiret *in vitro*



Kuva 7 Ebf1-Osx-cKO hiirten soluja kerättiin kallonlakiluusta ja viljeltiin osteoblastierilaistumista indusoivassa elatusnesteessä (COB = calvarial osteoblasts). Soluja kasvatettiin 0, 7, 14 ja 21 päivää ja tehtiin ALP-värjäykset (alkalinen fosfataasi). **A:** Ebf1-Osx-cKO hiirten osteoblastikasvatusten ALP-värjäykset **B:** Ebf1-Osx-cKO COB-viljelyistä analysoitiin ALP-mRNA:n määrä qPCR-menetelmällä.

Ebf1-Osx-cKO hiirten kallonlaesta eristetyistä soluista (COB) tehtiin soluviljelyt osteoblastien erilaistumista indusoivassa elatusnesteessä. Kasvatukset analysoitiin solujen keräyspäivänä ja 7, 14 ja 21-vuorokauden kuluttua solukasvatusten alusta. Analysointipäivänä osa kaivoista värjättiin ALP-värjäyksellä ja osasta mitattiin ALP-tuotantoa mittaamalla ALP-mRNA:n määrä qPCR:llä. Ebf1-Osx-cKO konditionaalisesti poistogeenisissä hiirissä Ebf1 poistuu osteoblastien genomista osteoblastien varhaisessa erilaistumisvaiheessa. Ebf1-Osx-cKO hiirten COB-kasvatusten ALP-aktiivisuus oli 7 päivän kohdalla selvästi matalampi kuin verrokkikasvatuksissa. 14 päivää viljelyiden aloituksista Ebf1-Osx-cKO-viljelmien ALP-aktiivisuus oli kuitenkin jo ottanut kiinni verrokkikasvatusten ALP-aktiivisuuden.

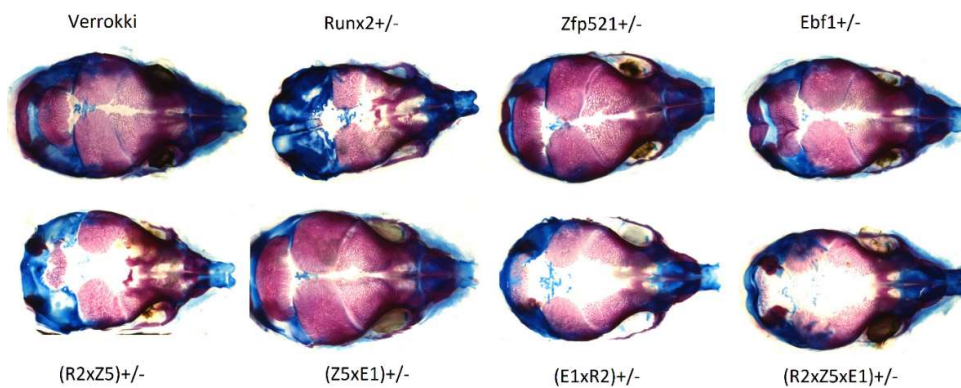
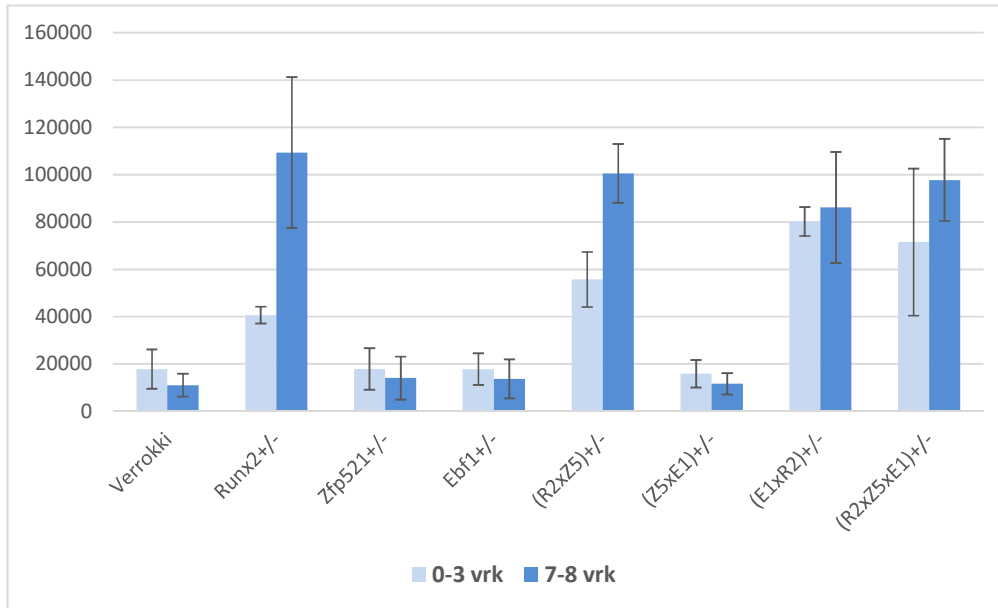
5.5 Ebf1, Runx2 ja Zfp521 *in vitro*



Kuva 8 Lusiferaasi-Osterixpromootorin aktivaatio Ebf1-, Zfp521- ja/tai Runx2-transkriptiotekijöiden vaikutuksesta.

Hypoteesina oli, että Runx2, Zfp521 ja Ebf1 ovat vuorovaikutuksessa osteoblastien erilaistumisen säätelyssä ja vaikuttavat Osterix-transkriptiotekijän aktiivisuuteen ja siten osteoblastien erilaistumisaktiivisuuteen. Tutkimme tätä yhteisvaikutusta ensin *in vitro* Osterix-lusiferaasipromootorimenetelmällä (ks. aineisto ja menetelmät, 4.5). Yksin Ebf1, Zfp521 tai Runx2 eivät vaikuttaneet Osterixpromootorin aktiivisuuteen. Myöskään Ebf1 yhdessä Zfp521:n tai Runx2:n kanssa ei aktivoinut Osterixpromootoria. Yhdessä Runx2 ja Zfp521 kuitenkin selvästi lisäsivät Osterixaktiivisuutta ja selvästi eniten Osterixpromootteri aktivoitui kaikkien kolmen, Ebf1:n, Runx2:n ja Zfp521:n yhteisvaikutuksesta. Kyseessä oli kuitenkin *in vitro* menetelmä, joka kertoo näiden transkriptiotekijöiden suorista vaikutuksista, mutta tulokset kuitenkin haluttiin varmistaa vielä *in vivo* tutkimusmenetelmällä.

5.6 Ebf1, Runx2 ja Zfp521 *in vivo*



Kuva 9 Kallonlakkiaukion koko hiirillä, jotka ovat heterozyootteja Ebf1:n, Zfp521:n ja/tai Runx2:n suhteen (A). Vastasyntyneiden heterotsygoottihierren kallonlakkiaukeamat (B).

Ebf1:n, Runx2:n ja Zfp521:n yhteisvaikutuksen selvittämiseksi *in vitro* tutkimukset haluttiin vahvistaa *in vivo* tutkimuksella. Tutkimuksessa käytettiin hiiriä, jotka olivat heterotsygootteja Ebf1:n, Runx2:n ja/tai Zfp521:n suhteen. Runx2-heterotsygooteilla tiedetään olevan suurentunut kallonlakkiaukile, huonontuneen luutumisen takia. Tarkoituksena tässä tutkimuksessa oli selvittää, onko Ebf1- tai Zfp521-alleelin poistamisella vaikutusta kallonlakkiaukileen kokoon ja siten saada vahvistusta hypoteesille, että Ebf1, Runx2 ja Zfp521 tekevät yhteistyötä osteoblastien erilaistumisessa. Vastasyntyneillä hiirillä (0-3vrk) nähtiin odotetusti, että Runx2-heterotsygooteilla hiirillä kallonlakkiaukile oli suurentunut. Kun Runx2-alleelin lisäksi myös Zfp521-alleeli oli poistettu, eli Runx2+Zfp521 tuplaheterotsygooteilla,

kallonlakkiaukile suurentui merkittävästi. Kaikkein suurin kallonlakkiaukile oli kuitenkin hiirillä, jotka olivat Runx2- ja Ebf1-heterotsygootteja tai heterotsygootteja kaikkien kolmen geenin suhteen eli triplaheterotsygootteja. Viikon ikäisillä hiirillä kallonlakkiaukileiden kokojen erot, eri genotyyppien välillä, olivat kaventuneet. Runx2-heterotsygoottien kallonlakkiaukile oli kasvanut selvästi eniten. Myös Runx2+Zfp521 tuplaheterotsygooteilla oli kallonlakkiaukile kasvanut. Kuitenkin Runx2+Ebf1 tuplaheterotsygooteilla ja Runx2+Ebf1+Zfp521-triplaheterotsygooteilla kallonlakkiaukile ei ollut kasvanut vastasyntyneisyydestä viikon ikään mennessä. Tulokset osoittavat, että Ebf1-heterotsygotismi heikensi luun muodostusta vastasyntyneillä hiirillä Runx2- tai Runx2+Zfp521-heterotsygotismiin yhdistettynä, mutta viikon ikäisenä näillä hiirillä Ebf1-heterotsygotismi vaikutti olevan eduksi luun muodostukselle.

6. Pohdinta

6.1 Ebf1 lisää varhaisten osteoblastien erilaistumista

Tässä tutkimuksessa oli tarkoituksena selvittää Ebf1:n vaikutuksia varhaisten osteoblastien erilaistumisen säätelyyn. Ebf1:n vaikutus luun muodostukseen ja osteoblasteihin havaittiin tutkittaessa globaalisti Ebf1-poistogeenisiä hiiriä. Näiden hiirten luita tutkittiin histomorfometrialla, jossa nähtiin lisääntynyt luun ja osteoblastien määrä, mutta samalla mineralisoitunut luu oli mikrotietokonetomografian (μ CT) perusteella vähentynyt. Tässä tutkimuksessa analysoitiin μ CT:lla Ebf1-/- hiirten nikamien hohkaluuta. Tuloksista havaittiin, että mineralisoituneen hohkaluun määrä oli vähentynyt, mutta myös nikamien koko oli pienentynyt. Nikamien kokoon suhteutettuna ei hohkaluun määrä ollut merkittävästi muuttunut verrattuna villityypin hiiriin. Aikaisempien tutkimusten perusteella myös tiedettiin, että Ebf1:llä on luun muodostusta vähentävä vaikutus kypsissä osteoblasteissa. Ebf1-heterotsygoottihieristä eristettyjen solujen osteoblasti-induktiokasvatuksissa solut kasvoivat aluksi hitaammin, mutta myöhemmissä aikapisteissä niiden kasvu olikin nopeutunut. Tulos viittaa siihen, että Ebf1-puutos varhaisissa osteoblasteissa hidastaa niiden erilaistumisesta, mutta osteoblastien saavutettua riittävän erilaistumisasteen, Ebf1-puutos lisää osteoblastien erilaistumista. Tämä löydös vahvistaa aikaisempien tutkimusten tulokset, joissa Ebf1:llä havaittiin olevan estävä vaikutus kypsissä osteoblasteissa ja herättää myös epäilyn, että varhaisemmissa osteoblasteissa Ebf1:lla on lisäävä vaikutus niiden erilaistumiseen.

Ebf1:n kaksoisvaikutuksesta tehtiin lisätutkimuksia Ebf1-Osx hiirillä, joissa Ebf1 poistettiin osteoblastien genomista siinä erilaistumisvaiheessa, jossa Osterix alkaa ilmentyä. Osterix ilmentyy osteoblastien esiastesoluissa, jolloin mesenkymaaliset kantasolut ovat jo valikoituneet erilaistumaan osteoblasteiksi, mutta erilaistuminen itsessään on hyvin varhaisessa vaiheessa. Ebf1-Osx hiiristä eristettyjen solujen osteoblasti-induktiossa havaittiin, että aluksi näiden solujen erilaistuminen oli hidastunut, mutta myöhemmissä aikapisteissä solut erilaistuivat samalla nopeudella verrokkihiirten solujen kanssa. Näiden hiirien reisi- ja sääriluista tehtiin myös μ CT-analyysi. Reisuissa ei nähty luun määrässä muutosta, mutta sääriluiden hohkaluu oli Ebf1-Osx hiirillä lisääntynyt. μ CT-analyysi tehtiin myös Ebf1-OC hiirten sääri- ja reisuista, joiden osteoblastien genomista Ebf1 poistetaan vasta kypsissä osteoblasteissa. Näillä hiirillä luun määrä ei ollut muuttunut.

Tulokset viittaavat siihen, että mikäli Ebf1:llä on positiivinen vaikutus osteoblastien erilaistumisen varhaisvaiheessa, tämä vaikutus tapahtuu ennen kuin Osterix alkaa ilmentyä. Ebf1:n osteoblasteja estävä vaikutus sen sijaan vaikuttaa alkavan vasta Osterixin jälkeen, johon Ebf1-Osx hiirten μ CT-tutkimustuloksetkin viittaavat. Sen sijaan kypsissä osteoblasteissa Ebf1:n poistaminen genomista ei vaikuta μ CT-tuloksiin. μ CT-analyysi on hyvä tutkimus havaitsemaan selviä eroja luun määrässä, mutta toisaalta tutkimuksena se ei ole kovin sensitiivinen ja pienet erot saattavat jäädä näkymättä. Se ei myöskään anna suoraan informaatiota poistogeenisyyden vaikutuksista solujen toimintaan. Ebf1-OC hiirten tulosta voi myös selittää se, että Ebf1:n myöhäinen vaikutus ei ole niin merkittävä verrattuna varhaiseen, osteoblastien erilaistumista lisäävään vaikutukseen. On myös mahdollista, että Ebf1:n kanssa samaan ryhmään kuuluva Ebf2 osittain kompensoi sen puutosta.

6.2 Runx2 säätelee osteoblasteja yhdessä Ebf1:n ja Zfp521:n kanssa

Ebf1:n Runx2:n ja Zfp521:n yhteisvaikutuksia osteoblastien erilaistumisessa ja toiminnassa tutkittiin ensin näiden transkriptiotekijöiden kykyä aktivoida Osterixpromootoria. Yksin mikään näistä transkriptiotekijöistä ei aktivoi Osterixpromootoria, mutta Runx2 ja Zfp521 yhdessä aktivoivat. Myös Runx2, Zfp521 ja Ebf1 kaikki kolme yhdessä aktivoivat Osterixpromootoria, mutta Ebf1 kahdestaan Runx2:n tai Zfp521:n kanssa ei aktivoi, joten tulosten perusteella Ebf1:llä ei olisi vaikutusta Osterixin ilmentymiseen. Tämä koe toistettiin 3 kertaa, ja tulokset vaihtelivat koekertojen välillä melkoisesti. Tämän syynä saattoi ainakin osin olla se, että C3H10T1/2 transfektointi osoittautui varsin haastavaksi ja

transfektiotehokkuus vaihtelikin huomattavasti kokeesta toiseen. Lisäksi Runx2:n pitäisi aikaisempien tutkimusten mukaan aktivoida Osterix-promoottoria, mutta kokeessamme tätä ei nähty. Kokeen huonon toistettavuus ja epäjohtonmukaisuus aikaisempiin tutkimuksiin verrattuna heikentää tulosten luotettavuutta.

Runx2-heterotsygoottihierillä kallonlakiaukeaman tiedettiin sulkeutuvan tavallista huonommin, kallonlakiluiden heikentyneen muodostuksen takia. Vastasyntyneillä Runx2-heterotsygoottihierillä olikin suurentunut kallonlakiaukeama ja Ebf1- ja/tai Zfp521-alleelin poistaminen yhdessä Runx2-heterotsygotismien kanssa johti vieläkin suurempaan kallonlakiaukeamaan. Kallonlakiaukeaman pinta-ala oli Runx2+Ebf1-heterotsygoottihierillä vielä suurempi kuin Runx2+Zfp521-heterotsygoottihierillä. Tutkimus toistettiin viikon ikäisillä hierillä ja sekä Runx2-, että Runx2+Zfp521-heterotsygooteilla kallonlakiaukeaman koko kasvoi samalla, kun kallon yleinen kokokin. Viikon ikäisinä näiden hierien osteoblasteilla oli edelleen alentunut kyky muodostaa luuta. Oli kuitenkin hyvin mielenkiintoista, että jos Ebf1-alleeli oli poistettu joko yhdessä Runx2-alleelin tai Runx2- ja Zfp521-alleelien kanssa, kallonlakiaukeaman koko ei enää kasvanut vastasyntyneistä hieristä viikon ikäisiin hieriin, eli kallon yleisen koon kasvaessa näiden hierien kallonlakiaukeamat itse asiassa suhteellisesti pienenivät. Nämä tulokset viittaavat siihen, että Ebf1 ja Zfp521 toimivat yhdessä Runx2:n kanssa säädellensä osteoblastien erilaistumista ja toimintaa. Ebf1:n ja Zfp521:n yhteisvaikutuksia ei näiden tutkimustulosten perusteella voida kuitenkaan arvioida. Lisäksi tulokset vahvistavat konditionaalisesti poistogeenisillä hierillä tehtyjä tutkimuksia ja viittaavatkin siihen, että Ebf1:llä on osteoblastien erilaistumista edistävä vaikutus varhaisissa osteoblasteissa, mutta se estää kypsempien osteoblastien erilaistumista ja toimintaa.

Runx2- ja Osx-transkriptiotekijöiden tiedetään olevan välttämättömiä osteoblastien erilaistumiselle ja muodostukselle. Tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että myös Ebf1 ja Zfp521 säätelevät osteoblastien erilaistumista ja toimintaa. Runx2 edistää osteoblastien erilaistumista varhaisemmissa osteoblastien esiasteissa kuin Osterix, ja Ebf1 ja Zfp521 vaikuttavat olevan toiminnallisessa vuorovaikutuksessa Runx2:n kanssa ja siten säätelevän Osterixin ilmentymistä varhaisissa osteoblasteissa. Yhdessä aiempien tulosten kanssa tämä tutkimus tukee hypoteesia, että Ebf1:llä on kypsien osteoblastien toimintaa estävä vaikutus. Tämän tutkimuksen tulokset tuovat uutta tietoa osteoblastien erilaistumisen transkriptionaalisesta säätelystä. Tämän prosessin tarkempi tuntemus edesauttaa uusien lääkekohteiden löytämisessä luustosairauksien hoitoon.

7. Kirjallisuus

Abe, M. ym., *Vicious cycle between myeloma cell binding to bone marrow stromal cells via VLA-4-VCAM-1 adhesion and macrophage inflammatory protein-1alpha and MIP-1beta production.* J Bone Miner Metab, 2009, Tokushima, Japani, **27**(1): s. 16-23

Aubin, J.E. ja J.T. Triffit, *Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation*, Principles of Bone Biology, 2002, Academic Press: San Diego, CA, USA, **1**: s. 59-81.

Azab, A.K. ym., *RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma.* Blood, 2009, Boston, MA, USA, **114**(3): s. 619-29

Bodine, P.V. ja B.S. Komm, *Wnt signaling and osteoblastogenesis.* Rev Endocr Metab Disord, 2006, Collegeville, PA, USA, **7**(1): 33-39

Calvi, L.M. ym., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche.* Nature, 2003, Rochester, NY, USA, **425**(6960): s. 841-6.

Komori, T. ym., *Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts.* Cell, 1997, Osaka, Japan, **89**(5): s. 755-64.

Garel, S. ym., *Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum.* Development, 1991, Pariisi, Ranska, **126**: s.5285-5294

Gazzerro, E. ja E. Canalis, *Bone morphogenetic proteins and their antagonists.* Rev Endocr Metab Disord, 2006, Genova, Italia, **7**(1): s. 51-65

Hagman, J. ym., *Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression,* Genes Dev, 1993, San Fransisco, California, USA, **7**(5), s. 760-73.

Hesse, E. ym., *Zfp521 controls bone mass by HDAC3-dependent attenuation of Runx2 activity.* J Cell Biol, 2010, Boston, MA, USA, **191**(7): s. 1271-83.

Hesslein, D.G. ym., *Ebf1-dependent control of the osteoblast and adipocyte lineages.* Bone, 2009, New Haven, CT, USA, **44**(4): s. 537-46.

Hill, T. ym., *Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes.* Dev Cell, 2005, Wien, Itävalta, **8**(5): s. 727-738

Jimenez M. ym., *Critical Role for Ebf1 and Ebf2 in the Adipogenic Transcriptional Cascade.* Mol Cell Biol, 2007, Boston, MA, USA, **28**(7): s. 743-757

Kiviranta, R. ym., *Coordinated transcriptional regulation of bone homeostasis by Ebf1 and Zfp521 in both mesenchymal and hematopoietic lineages.,* J. Exp. Med., 2013, **210**(5): s. 969-985, Turku, Suomi

Lukin, K. ym., *Compound haploinsufficiencies of Ebf1 and Runx1 genes impede B cell lineage progression.,* PNAS, 2010, **107**(17), s. 7869-7874, Denver, Colorado, USA,

Maier, H. ym., *Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription.* Nat Immunol, 2004, Denver, CO, USA, **5**(10): s. 1069-77.

Nakashima, K., ym., *The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.* Cell, 2002, Houston, TX, USA, **108**(1): s. 17-29.

Otto, F. ym., *Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development*. Cell, 1997, Lontoo, UK, **89**(5): s. 765-71.

Takuwa, Y. ym., *Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1*. BBRC, 1991, Tsukuba, Ibaraki, Japani, **174**(1): s. 96-101

Visnjic, D. ym., *Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency*. Blood, 2004, Farmington, CT, USA, **103**(9): s. 3258-64.

Wang, J., R. Loberg, ja R.S. Taichman, *The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006, Ann Arbor, MI, USA, **25**(4): s. 573-87

Wu, M. ym., *Zfp521 antagonizes Runx2, delays osteoblast differentiation in vitro, and promotes bone formation in vivo*. Bone, 2009, New Haven, CT, USA, **44**(4): s. 528-36