



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“Caracterización de la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular, en células ROBmtert y MC3T3”

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico.

Karina Villegas León.

-Director de Tesis:

**Dr. Mario Galindo Díaz.
Programa de Biología Celular y Molecular,
Facultad de Medicina,
Universidad de Chile.**

-Profesora patrocinante:

**Dra. María Antonieta Valenzuela Pedevila.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile.**

Santiago, 2008.

Dedicado a mis Padres y a mi hermana.

AGRADECIMIENTOS

- Al Doctor Mario Galindo por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio.

Además, por enseñarme el valor de la rigurosidad del trabajo en ciencia.

- A Ignacio, por el apoyo constante.

- A mis compañeros de laboratorio: Inga, Mariana, Nelson, Omar, Ismael y Daniela.; por la alegría y por todas las instancias en las que aportaron en la realización de mi trabajo.

Esta Tesis fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1060772.

ÍNDICE

Resumen	iv
Abstract	v
Abreviaturas	vi
Introducción	1
- Formación de los huesos.	1
- Diferenciación de las células óseas: Runx2 como regulador maestro.	2
- La familia Runx y su relación con Cbfb.	5
- Runx2 y su nueva función como regulador de la proliferación de las células óseas.	7
Hipótesis.	11
Objetivos	11
- Objetivo general.	11
- Objetivos específicos.	11
Materiales y métodos	12
- Modelos experimentales	12
- Soluciones	12
- Cultivo celular	13
- Sincronización de cultivos celulares y obtención de células arrestadas arrestadas en etapas específicas del ciclo celular	13
- <i>Western blot</i>	15
- Semi qRT-PCR.	16
- <i>Northern blot</i>	19

- Citometría de Flujo.	21
- Estrategia experimental general.	21
Resultados	23
- Estandarización de las condiciones de semiqPCR para el análisis de la expresión de mRNA para Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH.	23
- Niveles similares de Runx2 y Cbfb en las células MC3T3 y ROBmtert bloqueadas en el ciclo celular.	24
- A partir del tratamiento con Hidroxiurea no se obtienen cultivos sincrónicos de MC3T3.	29
- Análisis de los niveles de Runx2 y Cbfb durante el ciclo celular de MC3T3 y ROBmtert.	32
- Análisis de la expresión post mitótica de Runx2 y Cbfb	38
Discusión.	40
Conclusiones.	43
Referencias.	45
Figuras	
Figura 1: Crecimiento y diferenciación del linaje osteoblástico.	3
Figura 2: Osteoblastogénesis.	4
Figura 3: Interacción de Runx2 con proteínas co-reguladoras.	6
Figura 4: Relación funcional entre los niveles de proteína Runx2, la proliferación y la diferenciación de preosteoblastos.	8
Figura 5: Estrategia experimental.	22
Figura 6 : Estandarización del semiqPCR.	24

Figura 7: Niveles de proteína y mRNA para Runx2 y Cbf β en células MC3T3 bloqueadas en diferentes etapas del ciclo celular.	27
Figura 8: Niveles de proteína y mRNA para Runx2 y Cbf β en células ROBmtert bloqueadas en diferentes etapas del ciclo celular.	28
Figura 9: Sincronización fallida de células MC3T3.	30
Figura 10: Expresión de Runx2 y Cbf β a través del ciclo celular en células MC3T3 tratadas con Hidroxiurea.	31
Figura 11: Expresión de Runx2 y Cbf β a través del ciclo celular en células ROBmtert tratadas con Hidroxiurea.	31
Figura 12: Sincronización de células MC3T3.	33
Figura 13: Expresión de Runx2 y Cbf β a través del ciclo celular en células MC3T3 sincronizadas con Mimosina.	35
Figura 14: Expresión de Runx2 y Cbf β a través del ciclo celular en células ROBmtert sincronizadas con Mimosina.	36
Figura 15: Expresión de mRNA Runx2 y mRNA Cbf β en células MC3T3 y ROBmtert sincronizadas en la transición mitosis-G1.	39

RESUMEN

En mamíferos, el factor de transcripción Runx2 es un regulador central de la formación ósea, el cual promueve el compromiso de linaje y la diferenciación mediante la activación de genes de fenotipo óseo en osteoblastos postproliferativos. Sin embargo, recientemente se ha descrito que Runx2 tiene una función antiproliferativa en osteoblastos y preosteoblastos, sustentando la salida del ciclo celular desde la fase G1. Los niveles de Runx2 son regulados por el ciclo celular en las células MC3T3 (preosteoblastos), respecto a las transiciones G1/S y M/G1: la expresión oscila entre niveles máximos, en la fase G1 temprana y mínimos, en la fase S temprana y en mitosis. Cbfb es un cofactor transcripcional que dimeriza con Runx2, aumentando la capacidad de unión al DNA de este factor de transcripción. Adicionalmente, al dimerizar con Runx2, Cbfb lo protege de la ubiquitinación y la consecuente degradación proteosomal. Sin embargo, no se sabe si los niveles proteicos de Cbfb fluctúan a través del ciclo celular. Para dilucidar esto y para obtener un nuevo modelo de estudio para la función antiproliferativa de Runx2, caracterizamos la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular, en una línea celular derivada de cráneo de embrión de rata (ROBmtert), utilizando células MC3T3 como control.

Nuestros resultados indican que los niveles de proteína y mRNA para Runx2 son regulados por el ciclo celular de manera similar en las células MC3T3 y ROBmtert, validando el uso de este nuevo modelo celular. Además, encontramos fluctuación de los niveles proteicos de Cbfb a través del ciclo celular, siguiendo el mismo patrón de expresión de los niveles proteicos de Runx2. Lo anterior sugiere que esta fluctuación es uno de los factores que controla la actividad antiproliferativa de Runx2.

Characterization of Runx2 and Cbfb expression through cell cycle, in MC3T3 and ROBmtert cells (abstract).

In mammals, the Runx2 (CBFA1/AML3/PEBP2 A) transcription factor is a central regulator of bone formation that promotes lineage commitment and differentiation by activating bone phenotypic genes in postproliferative osteoblasts. However, it has recently been described that Runx2 has an antiproliferative function in osteoblasts and preosteoblasts supporting exit from the cell cycle from G1 phase. Runx2 levels are cell cycle-regulated in MC3T3 cells (preosteoblasts) with respect to the G1/S phases and M/G1 phases transitions: expression oscillates from maximal levels during early G1 phase to minimal levels during early S phase and mitosis. Cbfb is a transcriptional coactivator that dimerizes with Runx2, enhancing DNA binding capacity of this transcription factor. In addition, by dimerizing with Runx2, Cbfb protects it from ubiquitination and its subsequent proteasomal degradation. However, it is not known if Cbfb protein levels fluctuate through cell cycle. To elucidate this and to produce a new model to study Runx2 antiproliferative function, we characterize Runx2 and Cbfb expression through cell cycle, in a rat embryo cranial bone derived-cell line (ROBmtert), using MC3T3 cells as a control.

Our results indicate that the levels of Runx2 protein and mRNA are cell cycle-regulated similarly in MC3T3 and ROBmtert cells, validating use of this new cellular model. Moreover, we found that Cbfb protein levels fluctuate through cell cycle, following the same pattern of expression of Runx2 protein levels. This suggests that this fluctuation is one of the factors that control the antiproliferative activity of Runx2.

ABREVIATURAS

BMP: proteína morfogénica del hueso.

Cdk: quinasa dependiente de ciclina.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

cpm: cuentas por minuto (radiactividad).

DEPC: dietilpirocarbonato.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EtBr: bromuro de etidio.

FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico 2.

Go: gap 0 o período de reposo proliferativo.

G1: gap 1 o primer período de crecimiento del ciclo celular.

G2: gap 2 del ciclo celular.

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma.

M: Mitosis.

mA: miliamperes.

MEM: medio de cultivo mínimo.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

mV: milivolts.

NLS: señal de localización nuclear.

NMTS: señal de localización subnuclear.

P³²: isótopo inestable de fósforo (radiactivo).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PVDF: polifluoruro de vinilideno.

Rb: proteína retinoblastoma.

rDNA: ácido desoxirribonucleico codificante para ribosomas.

RHD: dominio homólogo a la proteína Runt.

RNA: ácido ribonucleico.

S: fase de síntesis del ciclo celular.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

TGF β : factor de crecimiento transformante β .

TGF-RI: receptor I de factor de crecimiento transformante.

Tm: temperatura a la cual la mitad del ácido desoxirribonucleico se encuentra desnaturado.

INTRODUCCIÓN

1) Formación de los huesos.

Los huesos son un tejido conectivo especializado que junto a los cartílagos constituyen el sistema óseo de los vertebrados. Este tejido cumple funciones mecánicas, protectoras y metabólicas [Lian y col., 2004; Hauang y col., 1997].

La formación de huesos ocurre a través de dos vías alternativas: la osificación directa y la osificación indirecta. La osificación directa o endomembranosa implica proliferación de las células mesenquimáticas para formar el blasfema óseo y luego diferenciación a osteoblastos. A través de este proceso se forman los huesos planos como las clavículas y parte del cráneo [Hauang y col., 1997]. Por otra parte, la osificación indirecta o endocondral corresponde al proceso de formación de hueso a partir de un modelo de cartílago hialino, el cual comienza a crecer intersticialmente y en cuyo centro hay condrocitos hipertrofiados que comienzan a calcificar la matriz extracelular. A la vez, en la periferia del cartílago las células del pericondrio se diferencian a osteoblastos. A continuación, comienza la formación de matriz ósea, la formación del periostio y de la médula ósea, y la aparición de los primeros osteoclastos. Así, la osificación endocondral se caracteriza por la aparición secuencial de un cartílago modelo, un cartílago calcificado y finalmente hueso. La mayoría de los huesos se forman mediante este tipo de osificación [Hofstetter y col., 1995].

Los osteoblastos son células fundamentales en el metabolismo del hueso; sintetizan los componentes estructurales y producen factores reguladores que promueven tanto la formación como la reabsorción del hueso [Puzas, 1998]. El fenotipo terminal de un osteoblasto es un osteocito, que corresponde a una célula con baja actividad metabólica que se encuentra encerrada por una matriz extracelular calcificada [Lian y Stein, 1999].

En mamíferos, la formación de los huesos comienza en una etapa tardía del desarrollo embrionario y se observa durante el crecimiento y en la vida adulta de los individuos, asociada al remodelamiento óseo y la reparación de fracturas. [Lian y col., 2004].

2) Diferenciación de las células óseas: Runx2 como regulador maestro.

El establecimiento del fenotipo osteoblástico maduro procede a través de tres etapas secuenciales bien caracterizadas, que requieren de la expresión de un grupo de genes regulados a nivel transcripcional. Primero, hay proliferación de las células osteoprogenitoras y preosteoblastos; etapa en la que se expresan genes que sustentan la proliferación y genes asociados a la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Luego, la transición a la segunda etapa, implica una salida gradual del ciclo celular con el consecuente cese de la expresión de los genes relacionados con proliferación, al mismo tiempo que se activan genes asociados con la maduración de la matriz extracelular. Por último, el paso a la tercera etapa está marcado por el inicio de la expresión de genes que determinan la mineralización de la matriz extracelular (figura 1) [Lian y Stein, 1999; Lian y Stein, 2003].

Todo esto requiere de eventos de determinación, proliferación y diferenciación celular, modulados por una expresión temporal e interdependiente de genes de crecimiento celular y genes que determinan el fenotipo de las células óseas, así como por señales extracelulares como factores de crecimiento, hormonas esteroidales y proteínas reguladoras de desarrollo (figura 2) [Lian y col., 2004].

Las proteínas Runx son factores de transcripción eucariontes [Levanon y col., 2001; Lian y col., 2003]. Entre ellos, el más relevante en osteogénesis es Runx2, requerido para la

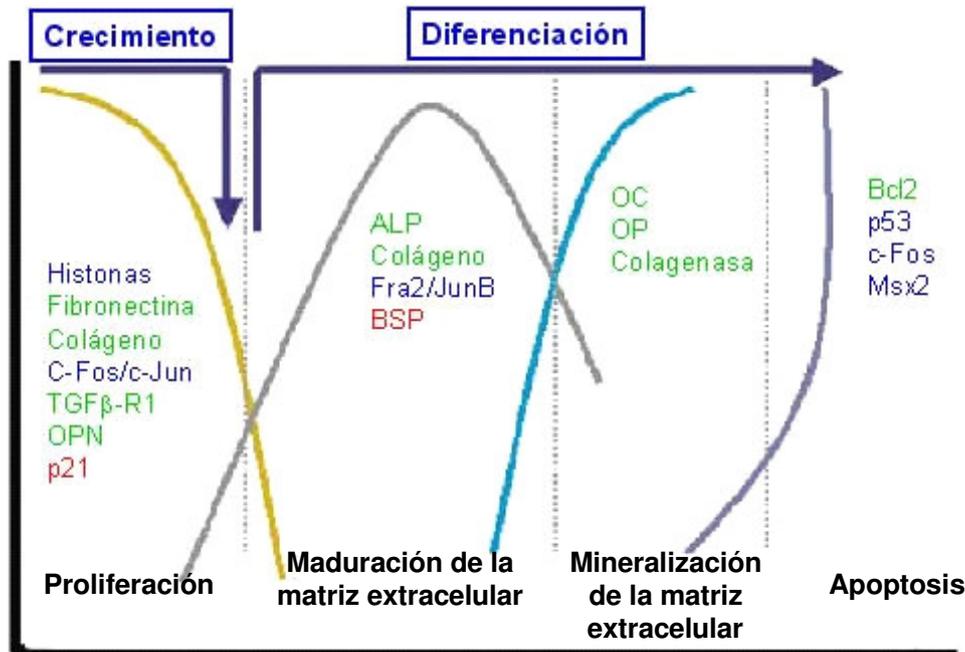


Figura 1. Crecimiento y diferenciación del linaje osteoblástico. El programa de crecimiento y diferenciación osteoblástico puede ser dividido en tres estados, basados en diferentes marcadores expresados en cada etapa: la proliferación de osteoblastos está marcada por la inducción de varios marcadores de ciclo celular que incluyen histonas; la maduración de la matriz extracelular es caracterizada por la expresión de proteínas relacionadas a matriz extracelular que incluyen colágeno y fosfatasa alcalina (ALP); la mineralización de osteoblastos requiere la inducción de osteoclastina (OC) y de otros genes. Finalmente, los osteoblastos entran en un proceso de apoptosis. Cabe destacar que la mayoría de estos genes marcadores son regulados positivamente (mostrado en verde) o negativamente (mostrado en rojo) por Runx2. (Stein y col., 2004a).

diferenciación *in vitro* de osteoblastos y para la formación de huesos *in vivo*. Ratones transgénicos, deficientes para la expresión de Runx2, muestran una completa ausencia de huesos [Komori y col., 1997], y en humanos, la haploinsuficiencia del gen Runx2 está relacionada con el síndrome de displasia cleidocraneal, caracterizado por fontanelas abiertas, clavículas hipoplásticas, dientes supernumerarios y baja estatura [Lee y col., 1997].

El gen *runx2* codifica al menos dos isoformas de mRNA que producen proteínas con diferente dominio amino terminal. Las isoformas tipo I y II son el resultado de *splicing*

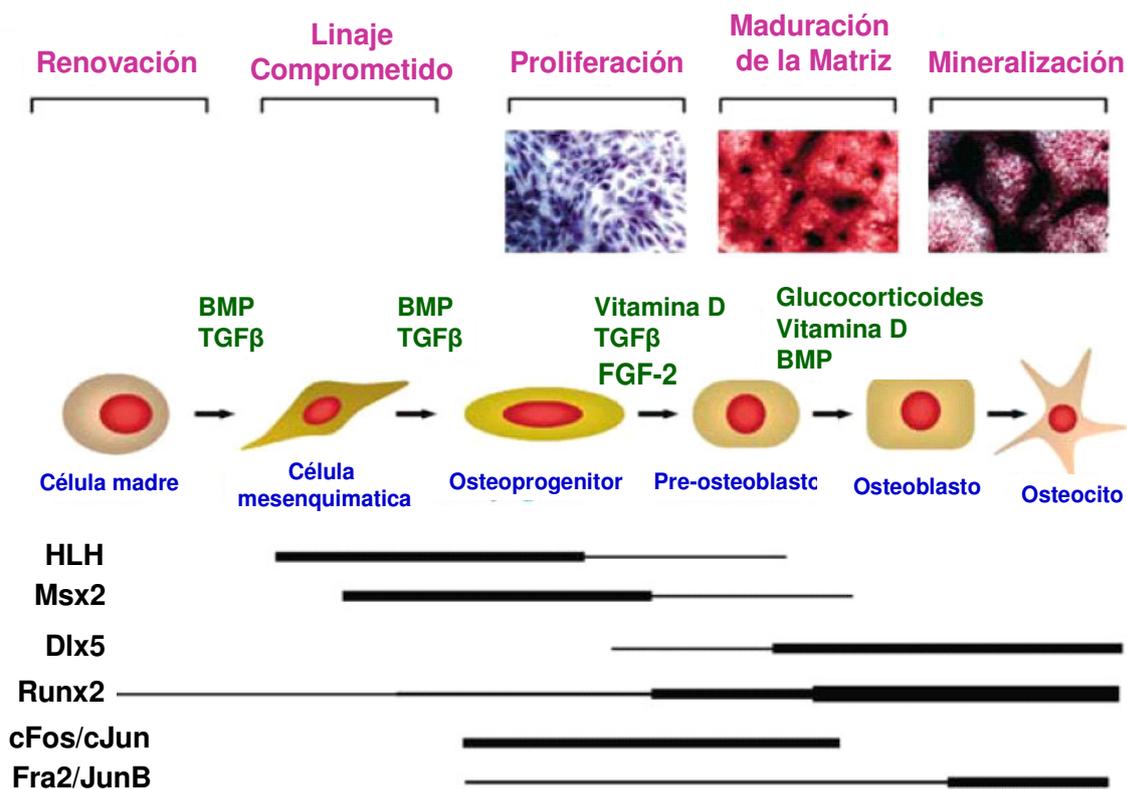


Figura 2. Osteoblastogénesis. La progresión desde una célula mesenquimática pluripotencial hasta un osteocito maduro es regulada por señales fisiológicas, incluyendo: TGFβ, BMP, vitamina D y glucocorticoides. En general, un preosteoblasto avanza a través de tres distintos estadios morfológicos y fenotípicos para llegar a ser un osteoblasto maduro y luego un osteocito. Las microfotografías muestran las etapas de proliferación (tinción con Trypan blue), maduración de la matriz extracelular (histoquímica para fosfatasa alcalina), y mineralización (tinción de von Kossa para el contenido de calcio). Además de las señales extracelulares, hay factores de transcripción que controlan el destino del linaje osteoblástico, la expresión de varios de ellos se muestra abajo. El grosor de las líneas horizontales representa los niveles celulares relativos de los factores en las etapas indicadas. Los niveles de Runx2 están referidos a la expresión de la isoforma tipo II (Stein y col., 2004a).

alternativo y del uso de distintos promotores, uno distal (P1) y otro proximal (P2), respectivamente. La isoforma tipo II de Runx2 se expresa en bajo nivel en las células osteoprogenitoras en activa proliferación. Sin embargo, en la etapa postproliferativa y conforme avanza el proceso de diferenciación a osteoblasto, se eleva la expresión de la isoforma tipo II, funcionalmente relevante para la diferenciación ósea [Xiao y col., 1999].

Diferente estudios de biología molecular, entre ellos microarrays, han permitido establecer un perfil temporal de expresión de genes que son controlados por Runx2 durante la

osteogénesis; algunos de expresión temprana como TGF-RI, y otros de expresión más tardía como osteocalcina [Javed y col., 1999]. Mas aún, se ha encontrado recientemente que en células proliferativas del linaje osteoprogenitor, durante la mitosis, Runx2 permanece unido a los promotores de ciertos genes blanco, regulando la expresión post-mitótica temprana de éstos, lo que permite la retención del fenotipo óseo en las células de la progenie por medio de un mecanismo epigenético [Young y col., 2007a].

3) La familia Runx y su relación con Cbfb.

En mamíferos hay tres genes que codifican para proteínas que pertenecen a la familia de factores de transcripción AML/CBFA/PEBP2 (*acute myeloid leukemia/core binding factor/polyomavirus enhancer binding protein*), ellos generan las proteínas Runx1, Runx2 y Runx3. Los factores de transcripción Runx presentan dominios funcionalmente conservados, entre los que se encuentran: una señal de localización nuclear (NSL), una señal de localización subnuclear (NMTS) [Zeng y col., 1997; Zaidi y col., 2001], dominios de transactivación y represión transcripcional [Meyer y col., 1995; Zeng y col., 1997; Levanon y col., 1998; Javed y col., 2000; Stein y col., 2000; Zaidi y col., 2001; Stein y col., 2003; Stein y col., 2004b] y un dominio ácido altamente conservado (RHD) de 100-120 aminoácidos (93% de identidad). El RHD tiene un subdominio de unión al DNA que reconoce una secuencia nucleotídica específica (figura3) [Kamachi y col., 1990].

Para llevar a cabo el programa génico relacionado a la expresión de genes de fenotipo óseo, es necesario que Runx2 se asocie con la proteína Cbfb, formando un heterodímero [Kundu y col., 2002; Yoshida y col., 2002]. El dominio RHD de la proteína Runx2 interactúa con la proteína Cbfb, permitiendo que este dominio incremente su afinidad por el DNA [Speck y Stacy, 1995]. Las regiones del DNA a las que se une el heterodímero Runx2/Cbfb, se

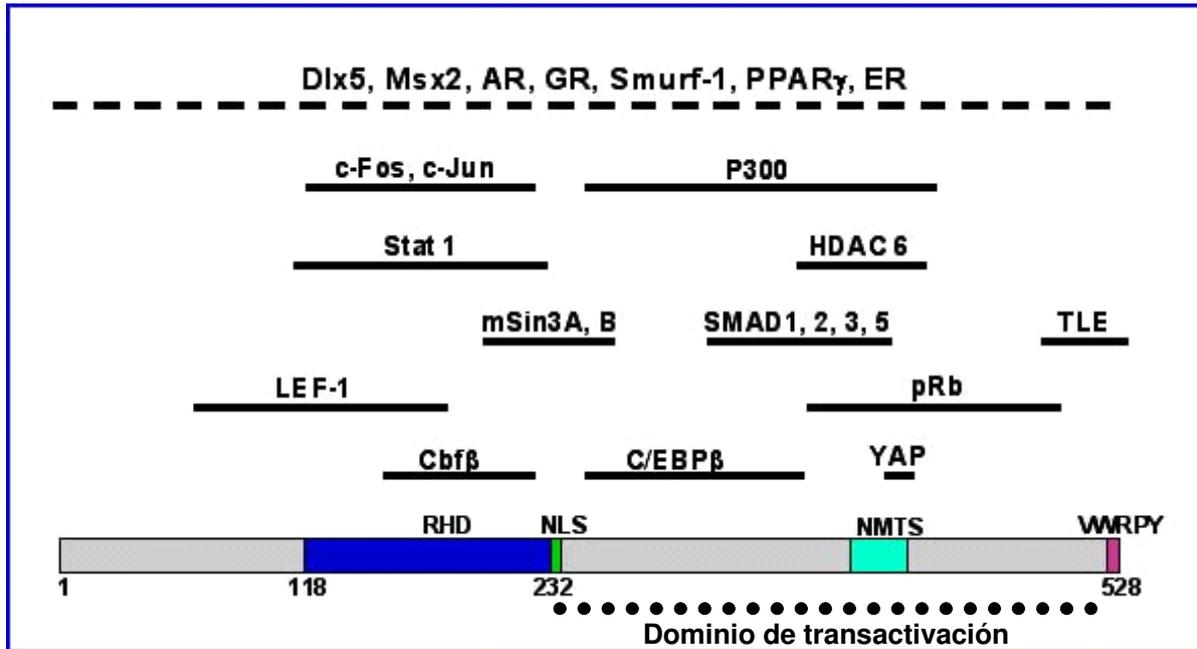


Figura 3. Interacción de Runx2 con proteínas co-reguladoras.

Runx2 funciona como una “proteína plataforma”, que a través de sus distintos dominios puede interactuar con un espectro de proteínas regulatorias que se muestran en la figura. Se indican los dominios RHD, región homóloga a la proteína Runt; NLS, señal de localización nuclear; NMTS, señal de unión a la matriz nuclear; VWRPY, dominio de represión transcripcional y el dominio de transactivación. De esta forma, Runx2 y sus proteínas asociadas funcionan como un mecanismo de integración de vías de señalización celular, el cual es necesario para la diferenciación osteoblástica y la regulación génica tejido-específica. (Lian y col., 2004).

localizan en el corresponde al promotor de sus genes blanco. Al unirse a secuencias tan específicas de DNA, Runx2 provee una plataforma estructural (proteína andamio) donde pueden ensamblarse estratégicamente complejos macromoleculares regulatorios que incluyen maquinarias para modificación de histonas y remodelamiento de la cromatina, formando microambientes que permiten el *crossstalk* entre la región proximal y la distal del promotor en cuestión y la consecuente transcripción del gen, o bien, promueve la formación de microambientes que lleven a la represión del gen; todo según las proteínas con las que se asocie Runx2 (figura 3) [Stein y col., 2003; Stein y col., 2004a] .

4) Runx2 y su nueva función como regulador de la proliferación de las células óseas.

Uno de los puntos críticos para la osteogénesis normal es el estricto control de la expansión proliferativa de las células mesenquémicas, osteoprogenitoras, preosteoblastos y osteoblastos inmaduros [Liu y col., 2002].

La expresión de bajos niveles de Runx2 en células mesenquémicas osteoprogenitoras y en osteoblastos inmaduros activamente proliferativos no resulta necesariamente en la expresión de marcadores de maduración osteoblástica [Lee y col., 2000]. La explicación de esto, radica en el descubrimiento de que Runx2 es regulado negativamente por el ciclo celular en preosteoblastos y osteoblastos inmaduros. Sin embargo, aunque en bajos niveles, la asociación de Runx2 a los promotores de los genes blanco en los cromosomas durante la mitosis permite la mantención del compromiso de estas células con el linaje óseo [Young y col., 2007b].

En la línea celular de preosteoblastos de ratón MC3T3, los niveles de Runx2 se elevan drásticamente en estado de reposo proliferativo o quiescencia (Go), inducido por privación de suero o inhibición por contacto, mientras que Runx2 disminuye a nivel basal cuando las células son estimuladas a proliferar (figura 4) [Pratap y col., 2003, Galindo y col., 2005].

Este comportamiento de Runx2 en el ciclo celular también ha sido observado en la línea de osteoblastos humanos HOB y cultivos primarios de osteoblastos de embrión de rata [Galindo y col., 2005]. Durante el arresto proliferativo de células MC3T3, se ha logrado establecer, mediante las técnicas de transcripción nuclear *run-on* e inhibición con RNA antisentido, que la actividad transcripcional del gen Runx2, isoforma tipo II (corresponde al uso del promotor P1), está aumentada.

En preosteoblastos proliferativos de la línea celular MC3T3, se observa que los niveles de la proteína Runx2 disminuyen en la transición G1/S del ciclo celular y durante mitosis (M),

pero son restituidos rápidamente en la transición M/G1 del ciclo celular. En la transición G1/S del ciclo celular, Runx2 es activamente degradado a través de la vía del proteosoma [Galindo y col., 2005], que es la vía específica de degradación de este factor de transcripción [Zhao y col., 2003]. La rápida restitución post-mitosis de la proteína Runx2 durante el inicio de la fase G1 podría explicarse por la acumulación del mRNA de Runx2 observada durante la mitosis. Además, se ha sugerido que la transcripción del gen Runx2 estaría regulada por el ciclo celular en células con activa proliferación [Galindo y col., 2005].

Respecto a la regulación que el factor Runx2 podría ejercer sobre el ciclo celular, se sabe que pre-osteoblastos y osteoblastos inmaduros derivados a partir del cráneo de ratones Runx2^{-/-}

Célula progenitora

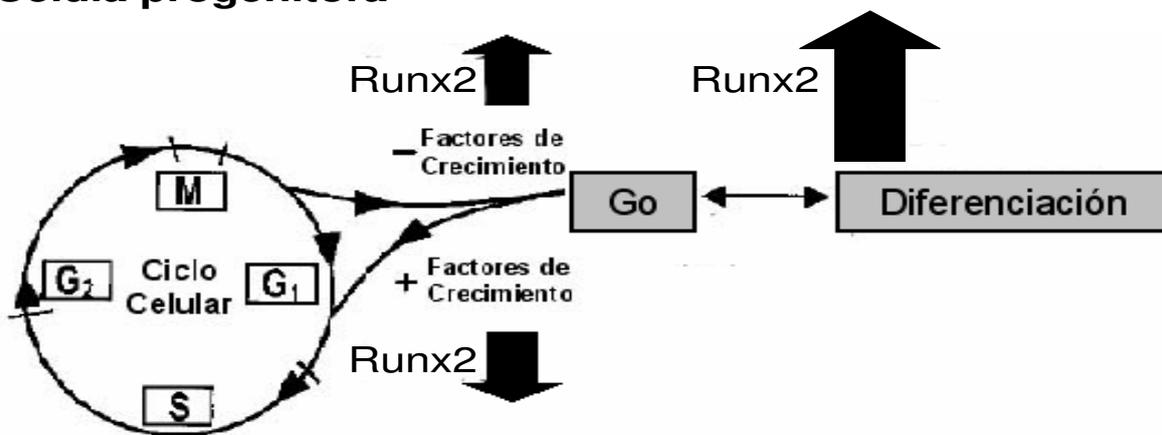


Figura 4. Relación funcional entre los niveles de la proteína Runx2, la proliferación y la diferenciación de preosteoblastos. El diagrama muestra las fases del ciclo celular (G₁, S, G₂ y M) de preosteoblastos proliferando activamente, como también los estados de reposo proliferativo (G₀) y de diferenciación, en relación con los cambios en los niveles de Runx2. Los niveles de Runx2 aumentan cuando la célula sale del ciclo celular (G₀), en respuesta a la privación de factores de crecimiento. Por el contrario, los niveles de Runx2 disminuyen en células que entran al ciclo proliferativo en respuesta a factores de crecimiento. Los niveles de Runx2 son aún mayores durante la diferenciación osteoblástica (Pratap y col., 2003).

(que no expresan este factor) y Runx2^{ΔC/ΔC} (que expresan la proteína carente del dominio carboxilo terminal) exhiben una alta actividad proliferativa, comparadas con células similares obtenidas de ratones normales, relacionada a la inactivación funcional de Runx2. Mas aún, la reintroducción de Runx2, mediada por adenovirus, en las células deficientes para Runx2, restablece el control de la actividad proliferativa [Pratap y col., 2003].

Las propiedades antiproliferativas de Runx2 en el contexto óseo tienen relación con las propiedades antiproliferativas descritas para otros miembros de la familia Runx, por ejemplo: se ha observado en líneas celulares de cáncer de colon y de cáncer gástrico que hay falta de expresión de Runx3, explicada por la hipermetilación de su promotor [Guo y col., 2002]; también, que deleciones, mutaciones y translocaciones de Runx1 y Runx3 se relacionan con leucemia mielógena aguda [Blyth y col., 2005] y cáncer gástrico [Li y col., 2002].

Runx2 regula al ciclo celular, pero el ciclo celular también regula a Runx2; se desconocen los mecanismos exactos, pero hay antecedentes que indican que el complejo Ciclina D1-Cdk4 induce la ubiquitinación de Runx2 por fosforilación de la proteína [Shen y col., 2006], que hay control de la fosforilación de Runx2 durante la mitosis por Ciclina B-cdk1 y una fosfatasa [Rajgopal y col., 2007], que pRb activa a Runx2 [Lee y col., 2006] y que el promotor de Runx2 tiene motivos de unión para las proteínas Fra2 y JunD cuya expresión está asociada al ciclo celular [Drissi y col., 2000].

Por otra parte, la unión de Cbfb a Runx2 permite la estabilización de este factor de transcripción [Huang y col., 2001] al quedar protegido de la ubiquitinación ya que el 70% de los residuos de lisina de Runx2 se encuentran en el RHD [Zhao y col., 2003]. Sin embargo, no se sabe si la estabilización de Runx2 al heterodimerizar con Cbfb tiene efecto sinérgico en el potencial antiproliferativo de Runx2, tampoco se conoce si Cbfb es necesario para la regulación de la expansión proliferativa y no hay antecedentes sobre la expresión Cbfb a

través del ciclo celular. A pesar de esto, se sugiere que podría haber una regulación de la expresión del gen de Cbfb por parte del ciclo celular, ya que hay antecedentes de que en la estructura de su promotor hay motivos de unión para Sp1, Ets y Myc [Hajra y Collins, 1996], que son factores de transcripción involucrados en control del ciclo celular.

Finalmente, a diferencia de lo que ocurre con la diferenciación, la función antiproliferativa de Runx2 en células óseas no se encuentra bien estudiada. Dentro de este contexto, este estudio pretende contribuir analizando la expresión de Cbfb a través del ciclo celular y validando una línea celular como nuevo modelo de estudio para la función antiproliferativa de Runx2.

HIPÓTESIS

“En células preosteoblásticas, los niveles de Cbfb fluctúan a través del ciclo celular, y lo hacen de manera similar a los niveles de Runx2, constituyendo uno de los factores de control de la actividad antiproliferativa de Runx2”.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

- 1) Caracterizar la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular en las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert.
- 2) Validar la línea celular preosteoblástica ROBmtert como nuevo modelo de estudio para la función antiproliferativa de Runx2.

Objetivos específicos:

- 1) Bloquear en etapas específicas del ciclo celular a las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert.
- 2) Generar cultivos sincrónicos de las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert.
- 3) Determinar las fases del ciclo celular mediante el análisis de los niveles de marcadores de ciclo celular y contenido de DNA de las células de los cultivos sincrónicos.
- 4) Analizar comparativamente los niveles de proteína y mRNA para Runx2 y Cbfb durante las distintas etapas del ciclo celular en las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Modelos experimentales.

Para el desarrollo de los experimentos se utilizaron 2 líneas celulares que corresponden a preosteoblastos de ratón (MC3T3) y preosteoblastos de rata (ROBmtert).

La línea preosteoblástica MC3T3 corresponde a células adherentes que crecen en monocapa, y fue obtenida a partir de células calvarias de embrión de ratón tipo C57BL/6 [Kodama y col., 1981].

La línea ROBmtert se obtuvo a partir de ratas que expresaban normalmente Runx2. El tejido calvario fue digerido tres veces con colagenasa P. Las células liberadas en la tercera digestión fueron colectadas, sembradas y posteriormente transfectadas con telomerasa murina (mTERT), utilizando un plasmidio que además contenía un gen de resistencia a neomicina. Las células resistentes a dicho antibiótico fueron cultivadas en un medio selectivo hasta el pasaje 17, luego de lo cual fueron congeladas [Bae y col., 2007].

2) Soluciones.

- MOPS 10X: 0,2 M MOPS; 10 mM Na₂EDTA; 50 mM NaAc en H₂O DEPC (ajustado a pH 7).
- TBE 10X: 90mM Tris-borato; 2mM EDTA en H₂O DEPC.
- PBS 1X: 137 mM NaCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 8,09 mM Na₂HPO₄ x 12H₂O; 2,68 mM KCl en H₂O destilada.
- PBST: 0,1% Tween (Winkler); 137 mM NaCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 8,09 mM Na₂HPO₄ x 12H₂O; 2,68 mM KCl en H₂O destilada.
- H₂O DEPC: 6,2 mM DEPC en H₂O destilada.

3) Cultivo celular.

Las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert fueron mantenidas en estado subconfluyente, en α -MEM (Gibco™) que fue suplementado con 10% suero fetal bovino caracterizado (Gibco™); 100 U/ml-0,07 mM penicilina-estreptomicina (Gibco™); 0,5 μ M de anfotericina B (Gibco™) y 2 mM de L-glutamina (Gibco™), con 5% CO₂ y 37°C.

4) Sincronización de cultivos celulares y obtención de células arrestadas en etapas específicas del ciclo celular.

Cultivos celulares subconfluentes fueron lavados una vez con PBS a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron tratadas con 0,5% tripsina-EDTA (Gibco™) por 3 minutos a 37°C, luego de lo cual, fueron colectadas en solución de tripsina y se diluyeron (factor de dilución:3) en medio de cultivo suplementado. Las células diluidas fueron contadas usando la cámara de Neubauer. Se sembraron 4×10^4 células en placas de 100 x 20 mm, y 24 horas después, los cultivos celulares fueron detenidos en etapas específicas del ciclo celular mediante la adición de diferentes drogas. Las drogas fueron preparadas en PBS 1X a diferentes concentraciones; Mimosina 10 mM, Hidroxiurea 100 mM y en DMSO diluido en PBS 1X; Nocodazol 0,06 mM. Luego, las soluciones de droga fueron esterilizadas por filtración utilizando filtros Gyro Disc de 0,2 μ m (Orange Scientific) y adicionadas al medio de cultivo en volúmenes específicos para obtener la concentración final deseada. Se arrestaron las células en G1 tardío por tratamiento con 0,5 mM Mimosina (Sigma), o en S temprano por tratamiento con 2 mM Hidroxiurea (Sigma), o en mitosis por tratamiento con 0,3 μ M (100 ng/ml) Nocodazol (Sigma). Las drogas se dejaron actuar por 24 horas.

Para los experimentos de sincronización en el ciclo celular, las células bloqueadas en G1 tardío con Mimosina o en G1/S con Hidroxiurea, fueron lavadas tres veces con PBS 1X

estéril a temperatura ambiente, y a continuación, se les adicionó medio fresco sin droga como estímulo para la progresión en el ciclo celular. A partir de los cultivos estimulados para progresar sincrónicamente en ciclo celular, se obtuvieron muestras cada 3 horas y por un tiempo de hasta 30 horas. Cultivos de células tratados por 24 horas con Mimosina o Hidroxiurea, fueron utilizados como muestras para el tiempo 0 horas.

Para la sincronización celular en mitosis, se realizó un tratamiento con Nocodazol, por 16 horas. Las células arrestadas en mitosis fueron seleccionadas dando golpes mecánicos reiterativos a las placas de cultivo, posteriormente, las células mitóticas en suspensión se recolectaron en el medio de cultivo con droga. Las células se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 40 ml de medio con droga. A continuación, las células seleccionadas se contaron usando la cámara de Neubauer, tras lo cual fueron lavadas 3 veces agregando medio de cultivo fresco sin droga y centrifugando a 300 x g durante 5 minutos cada vez. Las células se sembraron en medio fresco sin droga, a una concentración de 5×10^4 células por placa de cultivo. A partir de los cultivos estimulados a progresar sincrónicamente en la fase G1 del ciclo celular, se obtuvieron muestras cada 2 horas y por un tiempo de hasta 10 horas. La muestra correspondiente a las 0 horas se obtuvo a partir de una alícuota de la solución total de células mitóticas en presencia de Nocodazol.

Posteriormente, las células fueron lavadas una vez con PBS 1X a T° ambiente, luego de lo cual se agregó 1ml de PBS 1X 4% *cocktail* de inhibidores de proteasas (*complete mini*, Roche) y en esta solución se arrastró el contenido celular total utilizando un Scraper, realizándose todo este procedimiento a 4°C. La suspensión obtenida se traspasó a un tubo *ependorf*, en el que se dejaron decantar las células en hielo por 5 minutos. Finalmente, las células se centrifugaron a 2500 x g por 5 minutos a 4°C, tras lo cual se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido fue almacenado a -80°C.

Las muestras para análisis de mRNA total, se obtuvieron lavando una vez las células con PBS 1X a T° ambiente. Luego, se agregó 1ml de Trizol (Invitrogen™) y se incubó por 1 minuto a T° ambiente. La suspensión de células se arrastró utilizando un Scraper y se traspasó a un tubo *ependorf*, en el que se almacenó a -80°C.

5) Western blot.

Los *pellets* de células fueron resuspendidos en 100 µl de un amortiguador de carga y lisis [50mM Tris HCl, 0,1M DTT, 2% SDS, 9% glicerol, 4% *cocktail* de inhibidores de proteasas (*complete mini*, Roche), 1% azul de bromofenol, 0,05 mM MG132 y 2M de urea] y hervidas en un baño de agua durante 5 minutos. Luego, las muestras se homogenizaron por pipeteo y se calentaron por 3 minutos mas, a fin de obtener una resuspensión total. Finalmente, las muestras de proteínas totales fueron enfriadas en hielo por 5 minutos y resueltas por electroforesis en un gel SDS-PAGE de poliacrilamida al 10%, a 120 mV durante 1 hora, en un amortiguador de corrida [25 mM Tris, 0,2M glicina en H₂O]. Las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Hybond-P™, Amersham) a 300mA, por 2 horas a 4°C, en un amortiguador de transferencia [20% MetOH, 25 mM Tris, 0,2M glicina en H₂O], utilizando el sistema húmedo BIO-RAD.

Las membranas fueron bloqueadas con PBST 1X 5% leche (BIO-RAD), durante 2 horas y luego se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario correspondiente, en una solución 1% leche PBST 1X . Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados en este estudio: Runx2 monoclonal (gentileza del laboratorio del Dr. Gary Stein) y Cbfβ policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,CA), ambos en una dilución 1:1000, además de los anticuerpos para los marcadores de ciclo celular: Cyclina D1 monoclonal, Cyclina A policlonal, Cdk2 policlonal y Cdk4 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,CA) en una

dilución 1:2000. El anticuerpo policlonal para Actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,CA), fue utilizado como control interno. A continuación, las membranas se incubaron por 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario, anti-cabra o anti-ratón o anti-conejo, conjugados con la enzima HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.,CA). Las bandas proteicas inmunoreactivas se detectaron por quimioluminiscencia registrada en un film (BioMax Light Film, Kodak) que se expuso entre 1 y 20 minutos antes de ser revelado. La intensidad de las bandas resultantes se cuantificó con el programa ImageJ, y se normalizaron contra la señal obtenida para Actina.

Previo a la hibridación con un siguiente anticuerpo, las membranas se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBST a T° ambiente, luego se incubaron 15 minutos en agitación con solución de *stripping* (*Re-blot Mild Plus*, Chemicon International) 1X en H₂O destilada, y finalmente, se lavaron 3 veces por 5 minutos con PBST a T° ambiente.

6) Semi-qRT-PCR.

6.1 Extracción de RNA total.

Las muestras de células almacenadas en Trizol (Invitrogen™) a -80°C, fueron descongeladas a T° ambiente. Luego, se agregaron 200 µl de cloroformo, se vortexeó la mezcla y se centrifugó a 12.000 x g por 15 minutos, tras lo cual la fase orgánica (fase inferior) quedó separada de la fase acuosa (fase superior). La fase orgánica se descartó, mientras que la fase acuosa se mezcló por inversión con 0,5 mL de isopropanol y luego se incubó 1 hora a 4°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g por 15 minutos, para precipitar el RNA. El pellet obtenido se lavó con 1 ml de EtOH 75% enfriado en hielo y se centrifugó a 7.500 x g por 5 minutos. Finalmente, el RNA obtenido se resuspendió en 30 µl de H₂O DEPC.

6.2_Obtención de cDNA.

El RNA fue cuantificado de acuerdo a su absorbancia a 260 nm y utilizando la siguiente ecuación: $[\text{RNA}] \text{ en } \mu\text{g} / \mu\text{l} = (\text{factor de dilución} \cdot \text{Abs}_{260} \cdot 40) / 1000$. En el mismo proceso se verificó que el valor de la razón $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ se encontrara por sobre 1,9 para indicar un grado de pureza adecuado de la muestra.

A continuación, la integridad del RNA fue verificada en un gel 1% agarosa en buffer TBE conteniendo 0,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de EtBr. Una mezcla de 5 μl de la muestra más 1 μl de solución de carga [0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilencianol; 30% glicerol en H_2O] fue resuelta a 70 mV por 25 minutos. Se consideró íntegro al RNA cuando se observaban claramente las bandas de RNA ribosomal 28S y 18S, utilizando un transiluminador de luz UV.

Una muestra de 12 μg de RNA fue tratada con DNAasa RQ1 (Promega) a una concentración de 1 U/ μg de RNA, a 37°C por 30 minutos y según el protocolo indicado por el fabricante. Concluida la digestión enzimática, la muestra de RNA tratada se cuantificó. A partir de esta muestra, se tomó una alícuota que contuviera 3 μg de RNA, sobre los cuales se efectuó una transcripción reversa, utilizando la enzima M-MLV RT (Promega) y partidores al azar (Invitrogen™) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

6.3_SemiqPCR.

Se estandarizaron los parámetros de temperatura y número de ciclos adecuados para cada amplificación a realizar. La temperatura óptima de annealing para cada par de partidores a utilizar (Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH), se determinó a través de un PCR con gradiente de T° de annealing, utilizando un cDNA obtenido a partir de cultivos asincrónicos de células de osteosarcoma de rata (ROS). Se probaron temperaturas iguales, superiores e inferiores al promedio de la Tm calculada para cada uno de los respectivos pares de partidores. La Tm se

obtuvo a partir de la ecuación $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$. Se consideró temperatura óptima aquella en la que se observara la mayor cantidad del producto amplificado. El número de ciclos adecuados para cada amplificación a realizar, se determinó mediante un PCR con gradiente de ciclos para Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH (con las T° óptimas de annealing previamente determinadas) utilizando un cDNA de células de cultivos celulares asincrónicos de osteosarcoma de rata (ROS). Se realizaron pruebas con 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos de amplificación. Se consideró adecuado el número de ciclos que mostrara el producto de interés, pero que se encontrara bajo el punto de saturación de la amplificación.

Una vez optimizado el protocolo, se obtuvieron los niveles relativos de mRNA de las muestras, realizando los PCRs a partir del cDNA obtenido previamente, utilizando Taq DNA polimerasa recombinante (InvitrogenTM) y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Se utilizaron los siguientes partidores (para humano rata y ratón): Runx2, directo 5'CCAGATGGGACTGTGGTTACC-3' y reverso 5'-ACTTGGTGCAGAGTTCAGGG-3'; Cbfb, directo 5'- GAT TAA GTA CAC GGG CTT CAG G -3' y reverso 5'- CTC GCT CCT CAT CAA ACT CC -3'; GAPDH, directo5'- CCT TCA TTG ACC TCA ACT A -3' y reverso 5'- GGC CAT CCA CAG TCT TCT -3' e histona H4, directo5'- ATG TCA GGA CGA GGA AAA GG -3' y reverso 5'- GTC TTG CGC TTG GCG TGC TC -3'.

10 μ l del producto de cada PCR fueron combinados con 2 μ l de solución de carga [0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilencianol; 30% glicerol en H₂O], y resueltos mediante una electroforesis en un gel de agarosa 1% en TBE 1X con 0,06 μ g/ml de EtBr, a 120 mV durante 40 minutos, en amortiguador TBE 1X. Las bandas obtenidas fueron observadas y fotografiadas en un transiluminador UV y la señal de cada una de ellas fue cuantificada utilizando el programa Image J.

7) Northern blot.

7.1_Extracción, separación y transferencia de RNA total.

Se tomaron 8,5 µg de RNA de cada muestra y se mezclaron con 14 µl de solución de carga denaturante [1X MOPS; 2M formaldehído; 2M formamida; 15% dye; 0,15 mM EtBr]. Las muestras fueron resueltas en un gel desnaturalante [1X MOPS; 1,2M formaldehído; 1% agarosa en H₂O], corriendo a 75 mA por 6 horas, hasta observarse definidas las bandas 28S y 18S de RNA ribosomal, verificándose además la integridad del RNA cargado. Posteriormente, el RNA separado, fue transferido durante dos días acoplado al flujo osmótico en amortiguador SSC 10X a una membrana de Nylon cargada positiva (Hybond-N+, Amersham Biosciences), que una vez concluida la transferencia, se almacenó sellada a 4°C.

7.2_Preparación de sondas.

Se realizaron RT-PCRs de 40 ciclos de amplificación para Runx2, Cbfb y H4 a las temperaturas correspondientes según la estandarización previa. Los productos de RT-PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron al transiluminador UV, luego de lo cual fueron cortados con bisturí y eluidos a través de una columna membranas de sílica (kit PureLink™ Quick gel Extraction, Invitrogen™), siguiendo las instrucciones de manufactura. El DNA eluido en buffer TE fue cuantificado según la ecuación [DNA] en µg / µl = (factor de dilución x Abs₂₆₀ x 50)/ 1000 y se almacenó -20°C.

7.3_Hibridación.

Las membranas con el RNA de interés fueron sometidas a cross-linking durante 1 minuto para luego ser incubadas en una solución de prehibridación [1% SDS; 5X SSC; 5X Denhardt;

(Winkler); 0,02M KH_2PO_4 ; 34 $\mu\text{g/ml}$ DNA de espermio de salmón (Winkler); 50% formamida], durante 6 horas a 42°C en agitación lenta. Posteriormente, el cDNA de las sondas fue marcado con α -[P³²] dCTP (kit rediprime™II, Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones de manufactura. Luego, la sonda marcada con α -[P³²] dCTP, fue denaturada a 100°C durante 5 minutos y enfriada en hielo por 5 minutos antes de agregarla a una solución de hibridación [1% SDS; 10% Dextrano sulfato (Winkler); 5X SSC; 5X Denhardt (Winkler); 0,02M KH_2PO_4 ; 34 $\mu\text{g/ml}$ DNA de espermio de salmón (Winkler); 50% formamida]. Las membranas se incubaron en esta solución durante 15 horas a 42°C con agitación lenta. Concluida la hibridación, las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 minutos a T° ambiente y en agitación con una solución de baja estrictez [2X SSC 0,1% SDS], tras lo cual se midió la intensidad de la señal radiactiva, retenida en la membrana, utilizando un contador Geiger. Cuando la señal fue alta (más de 150 cpm, medidos en la escala 10X) se repitió el mismo lavado pero por 20 minutos. Cuando la señal continuó alta, se cambió la solución de lavado por una de mayor estrictez [0,2X SSC; 0,1% SDS] y se realizaron dos lavados de 10 minutos a temperatura ambiente.

7.4_Detección.

Películas sensibles (*Hyperfilm™ MP*, Amersham) se expusieron a la radiación de las membranas hibridadas y lavadas. El tiempo de exposición varió entre 2 horas y dos días a -80°C . Una vez reveladas las placas, la señal obtenida fue cuantificada densitográficamente con el programa ImageJ y normalizada contra la banda 28S de RNA ribosomal.

7.5_Stripping.

Para utilizar las membranas en una siguiente hibridación, se lavaron durante 1 hora en SDS

0,1% previamente hervido, y en agitación. La intensidad de la radiación residual se monitoreó con un contador Geiger.

8) Citometría de Flujo.

Las fracciones celulares en cada una de las etapas del ciclo celular fueron determinadas mediante el análisis del contenido de DNA por FACS (fluorescent activated cell sorting). Para ello, las células fueron tripsinizadas, posteriormente lavadas con PBS 1X, luego centrifugadas a 300 x g por 5 minutos, finalmente resuspendidas en EtOH 70% y almacenadas por 24 horas a -20°C. Una vez que todas las muestras fueron fijadas en EtOH, se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos, después se resuspendieron en PBS 1X y se centrifugaron a 300 x g por 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en una solución PBS 1X; 0,1% TritónX-100; 10 µg/mL RNAasa A, y se incubó a 37°C por 15 minutos. Luego de la incubación, las muestras tratadas se dejaron enfriar a T° ambiente por 10 minutos antes de agregarles yoduro de propidio hasta una concentración de 10 µg/mL, para luego ser analizadas en el citómetro de flujo. Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados con el programa WEASEL v2.4.

9) Estrategia experimental general.

La estrategia experimental general de este trabajo se resume a través de un esquema (figura5).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

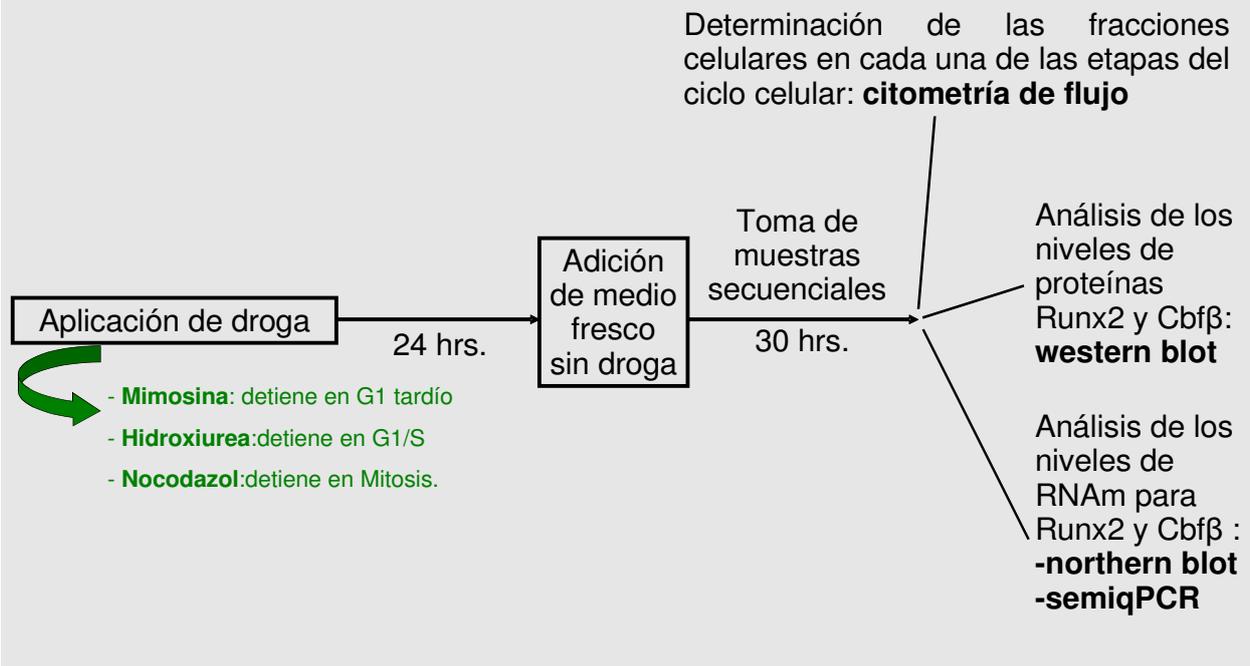


Figura 5. Estrategia experimental. Las muestras secuenciales obtenidas de los cultivos sincrónicos fueron analizadas respecto a la expresión de Runx2 y Cbf β a través del ciclo celular.

RESULTADOS

1) Estandarización de las condiciones de semiqPCR para el análisis de la expresión de mRNA para Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH.

Las condiciones experimentales para analizar los niveles de mRNA para Runx2, Cbfb, histona H4 y GAPDH mediante northern blot en células óseas se encuentran estandarizadas [Galindo y col., 2005]. Sin embargo, la detección de estos transcritos a través de semiqPCR no se encuentra descrita.

Con el objetivo de analizar mediante semiqPCR la expresión de mRNA para Runx2, Cbfb, histona H4 y GAPDH en etapas específicas del ciclo celular en las líneas MC3T3 y ROBmtert, se estandarizaron los parámetros experimentales a utilizar.

Para estandarizar las condiciones de temperaturas de apareamiento y de número de ciclos del semiqPCR, se realizaron distintas amplificaciones por PCR a partir de cDNA de la línea celular de osteosarcoma ROS, utilizando gradientes de temperatura de apareamiento y de número de ciclos de amplificación para cada par de partidores a utilizar (figura 6).

En la la figura 6A, se muestran los productos de PCR obtenidos utilizando gradientes de temperaturas de apareamiento. Según lo observado, las mejores temperaturas de apareamiento para amplificar Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH, resultaron ser: 59,2; 56,5; 55,1 y 54°C, respectivamente. Estas temperaturas serán entonces, las que se utilizarán para realizar los semiqPCR. En la figura 6B, encontramos los productos de PCR obtenidos a través de un gradiente de número de ciclos de amplificación. Los resultados indican que el punto anterior a la saturación para amplificar Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH, se da a los 35, 35, 25 y 35 ciclos, respectivamente. Estos serán los números de ciclos de amplificación a efectuar para cada semiqPCR a realizar.

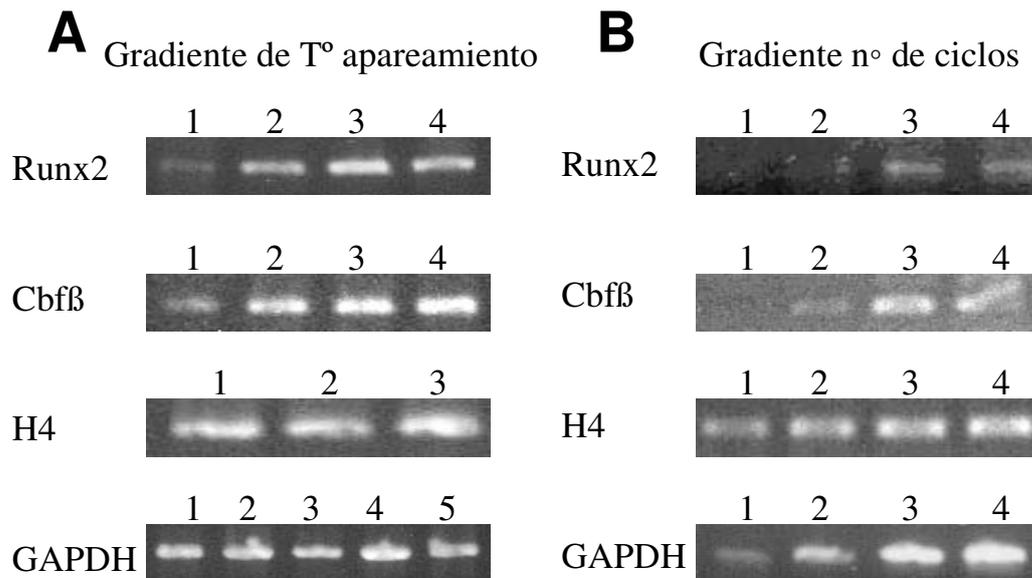


Figura 6. Estandarización del semiqPCR. A partir de cDNA obtenido desde cultivos de células ROS se realizaron ampliificaciones con gradientes de temperaturas de apareamiento y diferentes números de ciclos. En el panel A, se observan los productos de PCR, luego de 30 ciclos de amplificación, con distintas temperaturas de apareamiento para cada par de primers. Para Runx2, las temperaturas de apareamiento fueron: 62; 61; 59,2 y 55,1 °C (carriles 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Para Cbfb, las temperaturas de apareamiento fueron: 60,6; 59,4; 57,2 y 56,5 °C (carriles 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Para H4, las temperaturas de apareamiento fueron: 61; 59,2; 55,1 °C (carriles 1, 2 y 3, respectivamente). Para GAPDH, las temperaturas de apareamiento fueron: 60, 58, 56, 54 y 52 °C (carriles 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). En el panel B, se observan los productos de PCR para cada uno de los pares de primers, utilizando la respectiva temperatura óptima de apareamiento descrita en el panel A. Se realizaron ampliificaciones de 25, 30, 35 y 40 ciclos (carriles 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Las temperaturas de apareamiento utilizadas para amplificar Runx2, Cbfb, H4 y GAPDH, fueron 59,2; 56,5; 55,1 y 54°C, respectivamente.

2) Niveles similares de Runx2 y Cbfb en las células MC3T3 y ROBmtert bloqueadas en el ciclo celular.

Previamente, se ha descrito que los niveles de proteína y mRNA para Runx2 son regulados por el ciclo celular en preosteoblastos de la línea celular MC3T3 [Galindo y col., 2005]. En estas células, tratadas con diferentes drogas para bloquear etapas específicas del ciclo celular, se observa que los niveles de proteína Runx2 disminuyen en las fases G1 tardío, en la transición G1/S y durante mitosis; además, los niveles de mRNA para Runx2 están

disminuidos en G1 tardío y S, mientras que en M se encuentran aumentados [Galindo y col., 2005].

Con el fin de analizar los niveles de proteína y mRNA para Runx2 asociados a etapas específicas del ciclo celular en preosteoblastos de la línea ROBmtert, se procedió a bloquear las células en distintas etapas del ciclo. Como control, se utilizaron preosteoblastos de la línea celular MC3T3. Según se observa en la figura 7, las células MC3T3 fueron bloqueadas en distintas fases del ciclo utilizando diferentes drogas. Los bloqueos en etapas específicas del ciclo celular se validaron mediante la detección por *western blot* y semiqPCR de distintos marcadores de ciclo celular y su comparación con los niveles de estos marcadores, detectados en los cultivos celulares asincrónicos. El análisis de los marcadores de ciclo celular en las células bloqueadas en G1 tardío, mediante tratamiento con Mimosina muestra ausencia de ciclinas D1 y A, como también de mRNA para la histona H4 en comparación a lo observado en cultivo de células asincrónicas (figura 7A). Las células arrestadas en la fase S, mediante tratamiento con Hidroxiurea, muestran presencia de ciclina D1, de ciclina A y de mRNA para H4 (figura 7B). Por último, las células arrestadas en la fase M, por tratamiento con Nocodazol, muestra presencia de ciclina D1, débil expresión de ciclina A y ausencia de mRNA para H4 (figuras 7C). Al utilizar estos métodos de bloqueo del ciclo celular en las células ROBmtert, se obtienen resultados similares, a excepción del mRNA para H4 que se observa aumentado en G1 tardío (figuras 8A-C).

El análisis de estos resultados, muestra que ambas líneas celulares son bloqueadas en puntos similares del ciclo celular, lo cual valida la utilización de estos procedimientos para analizar los niveles de Runx2 y CbfB asociados las fases G1 tardía, S y M en ROBmtert, de forma comparativa con MC3T3.

En MC3T3 y ROBmtert, los niveles de las proteínas Runx2 y Cbf β relativos a los niveles de

actina, se observan disminuidos en G1 tardío en comparación a lo observado en los cultivos asincrónicos para ambas líneas celulares (figuras 7A, D, E y 8A, D, E). Los niveles de mRNA para Runx2 y para Cbfb, relativos a los niveles de mRNA 28S, también se observan disminuidos en MC3T3, pero no en ROBmtert, donde se observan en las células control y las tratadas (figuras 7A, F, G y 8A, F, G).

En células MC3T3 arrestadas en la fase S, se observa que los niveles de las proteínas Runx2 y Cbfb están disminuidos, mientras que los niveles de los mensajeros para ambas proteínas están aumentados, principalmente para Runx2 (figuras 7B y D-G). Para la misma fase del ciclo celular, en células ROBmtert, se observa que los niveles de proteína y mRNA para Runx2 están aumentados, a la vez que los niveles de la proteína Cbfb están disminuidos, principalmente a nivel de proteína (figuras 8B y D-G).

Finalmente, el bloqueo con Nocodazol muestra que en la fase M los niveles de las proteínas Runx2 y Cbfb disminuyen en MC3T3 y mas drásticamente en ROBmtert (figuras 7C-E y 8C-E). Mientras que en MC3T3 los niveles de mRNA para Runx2 están aumentados en M, en ROBmtert se observan disminuidos (figuras 7C y F y 8C y F), en tanto que el mensajero para Cbfb se observa disminuido en ambas líneas celulares (figuras 7C y G y 8C y G).

Estos resultados nos permiten concluir que los niveles de proteína Runx2 y Cbfb son regulados de manera similar, en MC3T3 y ROBmtert, durante las fases G1 tardío y Mitosis, mostrando diferencias en la regulación de la proteína Runx2 en la fase S.

Por el contrario, los niveles de mRNA para Runx2 y Cbfb son regulados de manera similar, en MC3T3 y ROBmtert, durante la fase S, mostrando diferencias en la regulación del mRNA de Runx2 durante G1 tardío y mitosis; y para el mRNA de Cbfb durante G1 tardío. Así, en una próxima etapa decidimos analizar las fluctuaciones de estas proteínas y sus mRNAs utilizando células sincronizadas en fase S o en fase G1 tardío.

Bloqueos MC3T3

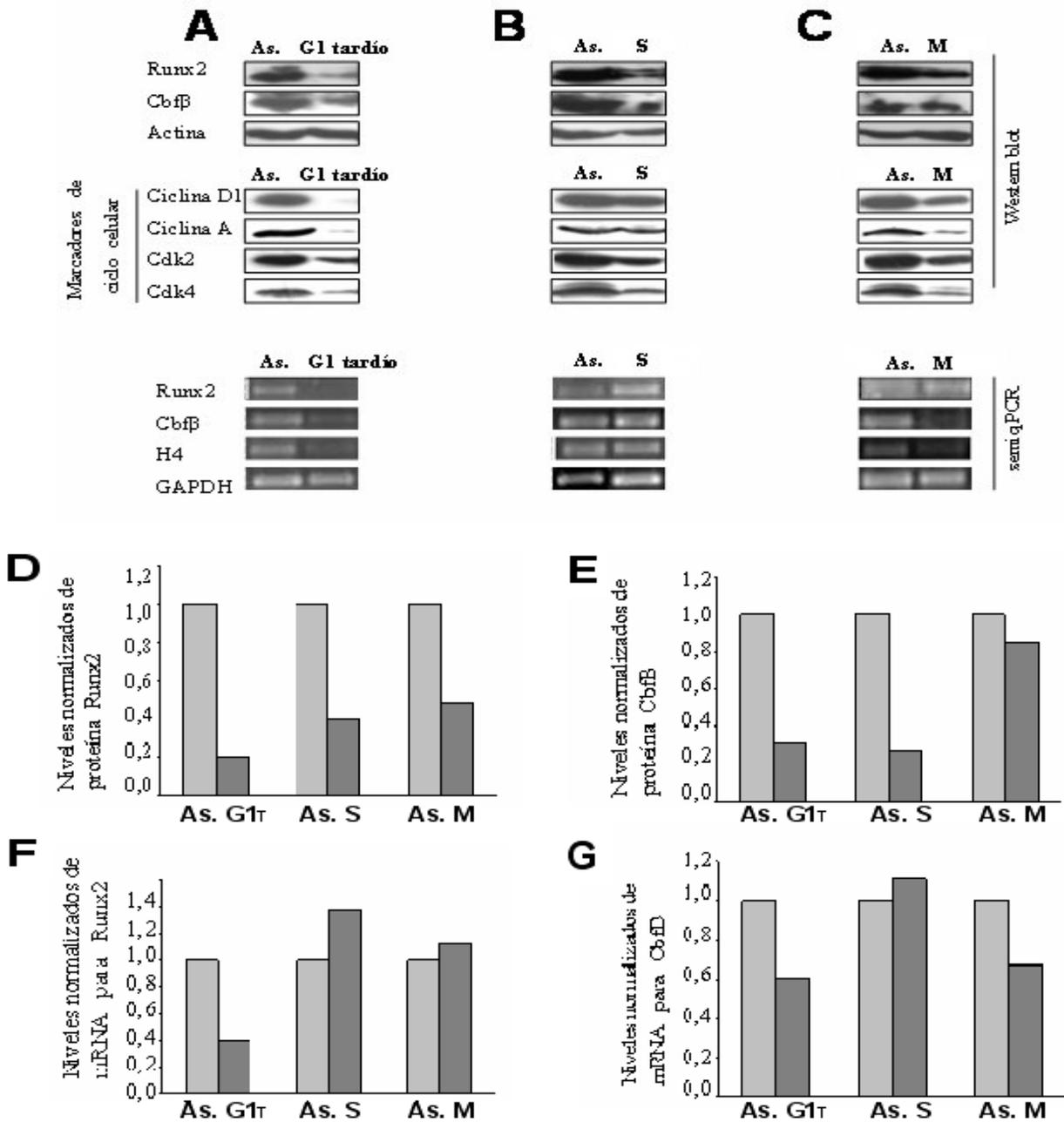


Figura 7. Niveles de proteína y mRNA para Runx2 y Cbfb en células MC3T3 bloqueadas en diferentes etapas del ciclo celular. Las células MC3T3 se arrestartaron en diferentes etapas del ciclo celular. Las células se trataron por 24 horas con Mimosina (arresto en G1 tardío, G1T) o Hidroxiurea (arresto en S) o Nocodazol (arresto en mitosis, M), como se muestra en los paneles A, B y C, respectivamente. Los niveles de proteína y de mRNA Runx2 y Cbfb se analizaron por *western blot* y semiqPCR. Los controles de los bloqueos corresponden a cultivos asincrónicos (As.) sin tratamiento con drogas. Los niveles de proteínas ciclinas y cdk's, y mRNA para histona H4, se utilizaron como marcadores de ciclo celular. Actina y GAPDH se utilizaron como controles internos. Se grafican los niveles normalizados de proteínas (paneles D y E) y de mRNA (paneles F y G).

Bloqueos ROBmtert

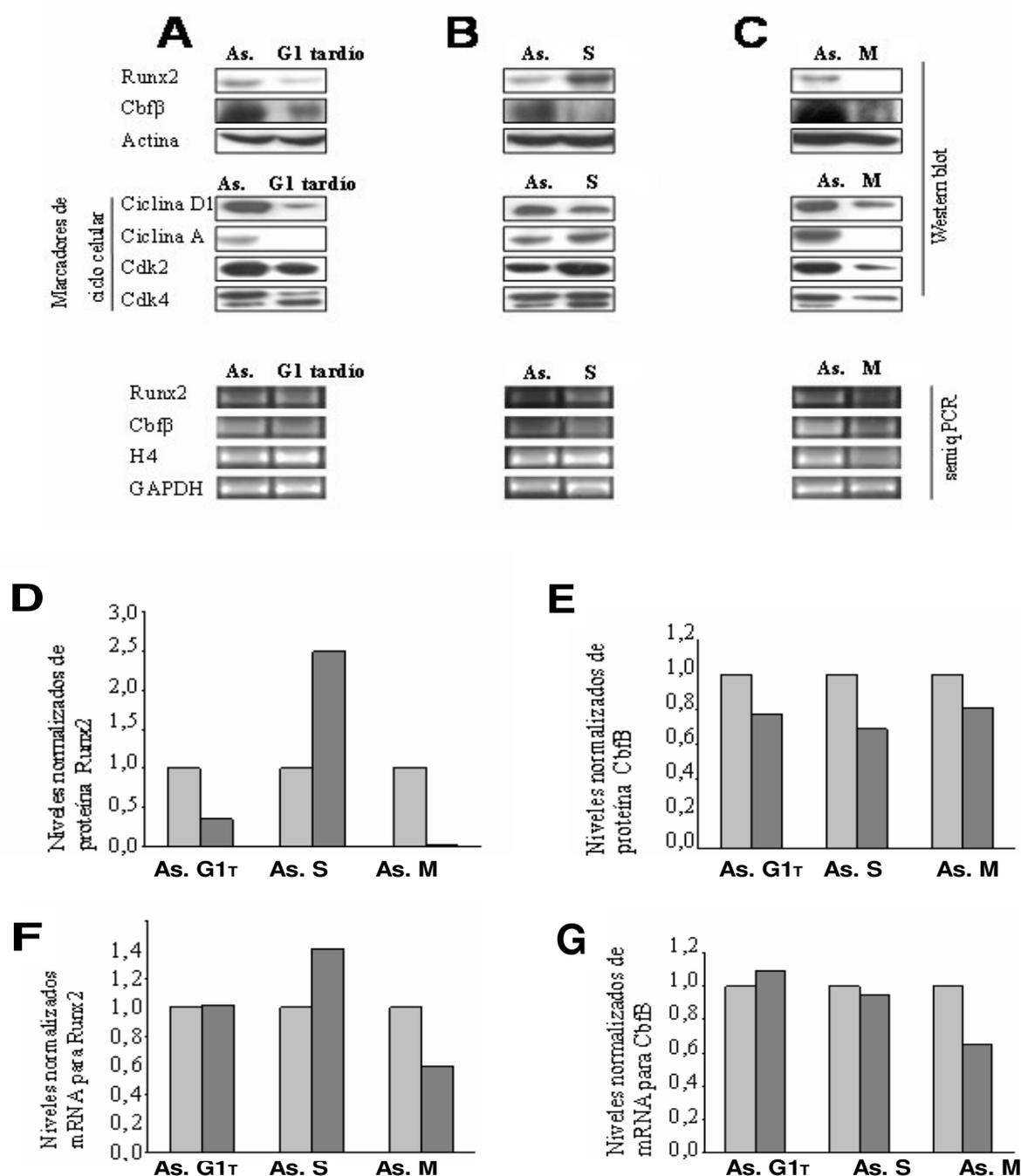


Figura 8. Niveles de proteína y mRNA para Runx2 y Cbfb en células ROBmtert bloqueadas en diferentes etapas el ciclo celular. Las células ROBmtert se arrestartaron en diferentes etapas del ciclo celular. Las células se trataron por 24 horas con Mimosina (arresto en G1 tardío, G1T) o Hidroxiurea (arresto en S) o Nocodazol (arresto en mitosis, M), como se muestra en los paneles A, B y C, respectivamente. Los niveles de proteína y de mRNA Runx2 y Cbfb se analizaron por *western blot* y semiqPCR. Los controles de los bloqueos corresponden a cultivos asincrónicos (As.) sin tratamiento con drogas. Los niveles de proteínas ciclinas y cdk's, y mRNA para histona H4, se utilizaron como marcadores de ciclo celular. Actina y GAPDH se utilizaron como controles internos. Se grafican los niveles normalizados de proteínas (paneles D y E) y de mRNA (paneles F y G).

3) A partir del tratamiento con Hidroxiurea no se obtienen cultivos sincrónicos de MC3T3.

Con el objetivo de analizar la expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular, células MC3T3 y ROBmtert se trataron con Hidroxiurea y luego se indujeron a progresar sincrónicamente en el ciclo celular. Este método de sincronización no había sido utilizado con anterioridad en MC3T3.

La citometría de flujo sobre las muestras de MC3T3, tomadas a través de las horas post liberación del bloqueo impuesto por Hidroxiurea, arroja como resultado principal un amplio y creciente porcentaje de células subG1 (no viables) y un porcentaje basal de células en las fases G2/M y S del ciclo celular (figura 9). También se observa una disminución de la población celular en G1, conforme va aumentando la población subG1 (figura 9). La población de células subG1, corresponde a células con un contenido de ADN inferior al normal, que sugiere la presencia de células apoptóticas y/o necróticas.

Los niveles de marcadores de ciclo celular en las células MC3T3 tratadas con Hidroxiurea, muestran un comportamiento aparentemente acorde a un cultivo sincrónico hasta las 9 horas. Sin embargo, se observa posteriormente que los niveles de las proteínas cdks (de las que se espera una expresión constitutiva) descienden abruptamente (12-30 horas, figura 10A), lo que coincide con el aumento de la población subG1 detectado mediante citometría de flujo (figura 9). En las células ROBmtert sincronizadas con Hidroxiurea, se observa que los niveles de mensajero para H4 (marcador de fase S), están aumentados entre las 3 - 6 horas, además de la expresión constitutiva de cdks observada hasta las 18 horas (figura 11A). Lo anterior, sugiere que la células ROBmtert podrían haber respondido de mejor forma que las células MC3T3, al tratamiento con Hidroxiurea, pero no indica necesariamente que la sincronización

resultó de acuerdo a lo esperado. Por esta razón se decidió aplicar otro método de sincronización basado en la utilización de la droga Mimosina.

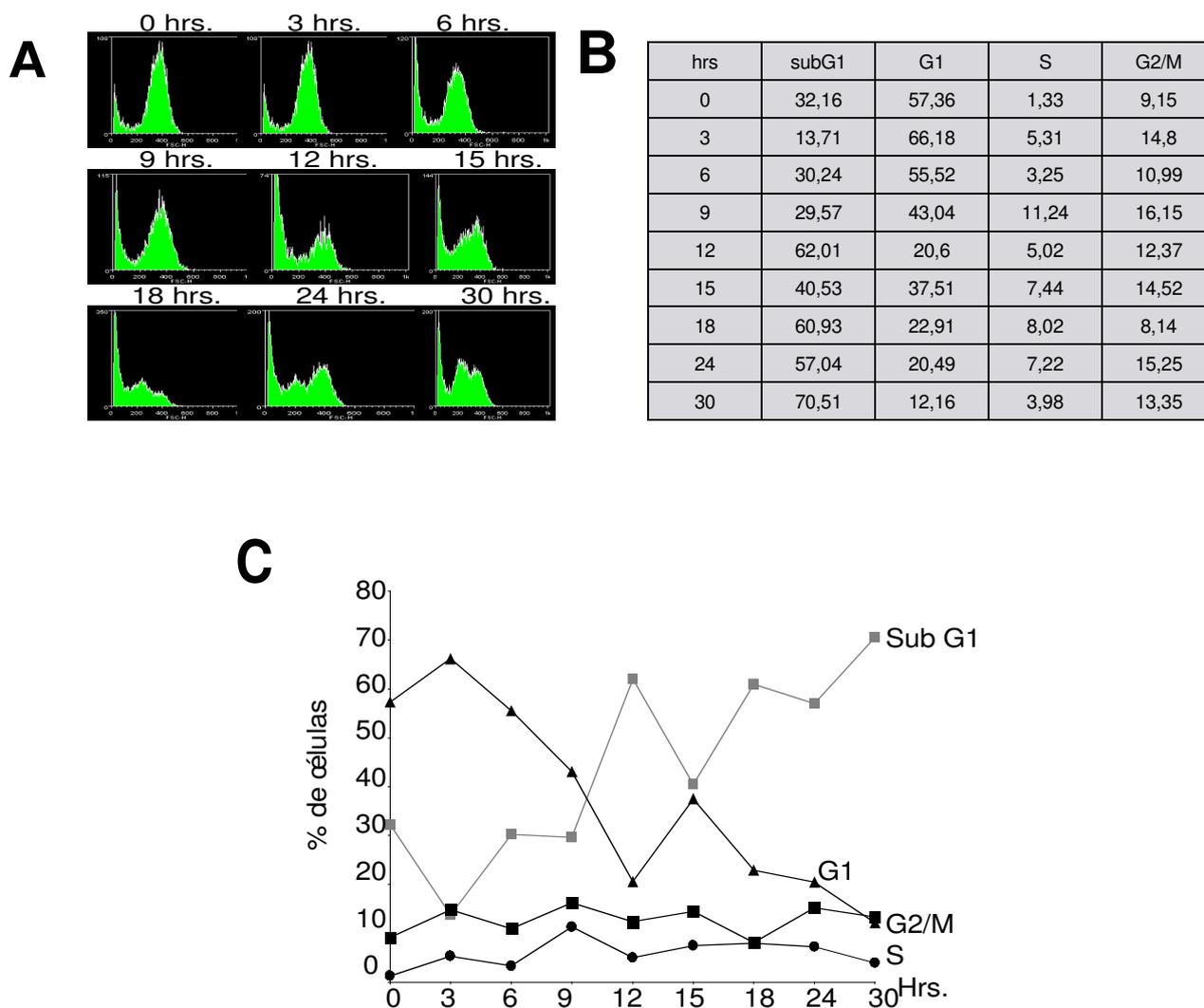


Figura 9. Sincronización fallida de células MC3T3. Las células se arrestaron en la fase S temprana del ciclo celular, mediante un tratamiento con Hidroxiurea por 24 horas. Posteriormente, se estimularon a progresar de forma sincronizada en el ciclo celular. Se analizó el contenido de DNA (teñido con yoduro de propidio) de cada una de las muestras por medio de citometría de flujo (panel A). Los porcentajes de células en las distintas etapas se determinaron usando el programa WEASELv2.4 (panel B) y se representan graficados (panel C).

Células MC3T3 tratadas con Hidroxiurea.

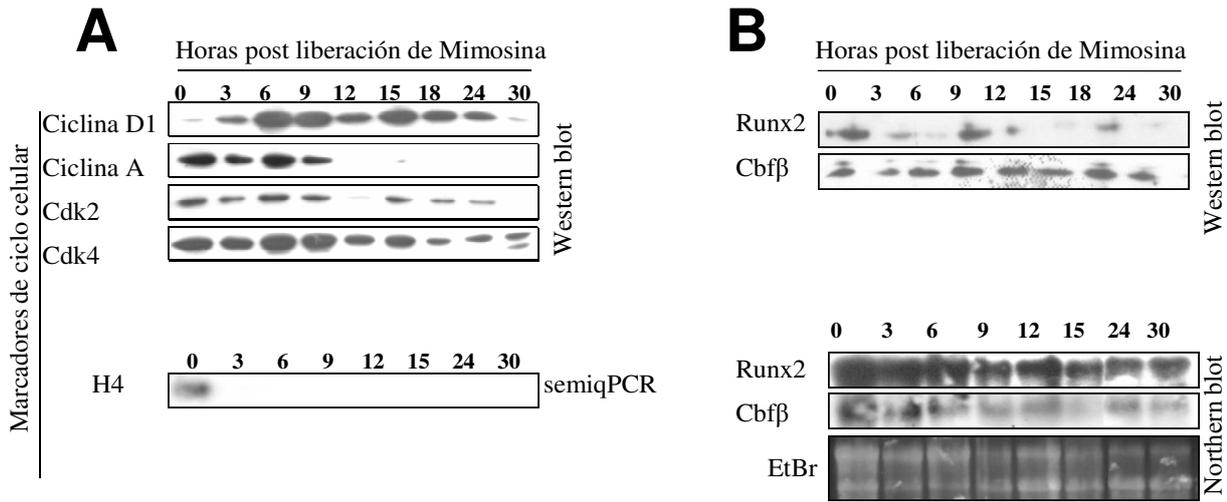


Figura 10. Expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular en células MC3T3 tratadas con Hidroxiurea. Las células MC3T3 se arrestaron en la fase S temprana del ciclo celular, mediante un tratamiento con Hidroxiurea por 24 horas. Posteriormente, las células se estimularon a progresar de forma sincronizada en el ciclo celular. Los niveles de proteínas ciclinas y cdk2, y mRNA para histona H4, se utilizaron como marcadores de ciclo celular (panel A). Los niveles de proteína Runx2 y Cbfb se analizaron por *western blot* (panel B) y los niveles de los mensajeros respectivos se determinaron por *northern blot* (panel B). Actina y RNAs 28S y 18S se utilizaron como controles internos (paneles A y B).

Células ROBmert tratadas con Hidroxiurea

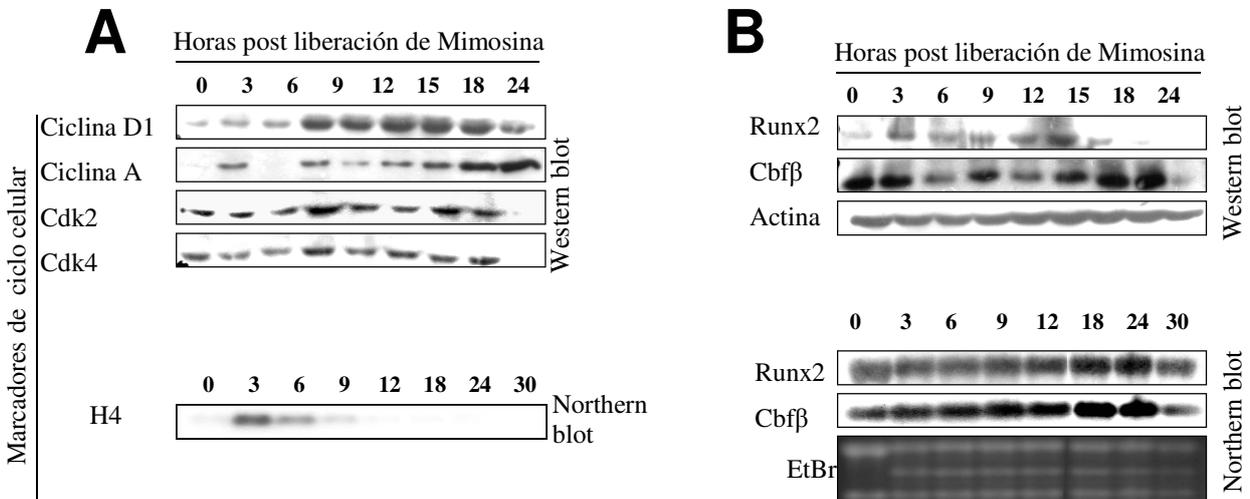


Figura 11. Expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular en células ROBmert tratadas con Hidroxiurea. Las células ROBmert se arrestaron en la fase S temprana del ciclo celular, mediante un tratamiento con Hidroxiurea por 24 horas. Posteriormente, las células se estimularon a progresar de forma sincronizada en el ciclo celular. Los niveles de proteínas ciclinas y cdk2, y mRNA para histona H4, se utilizaron como marcadores de ciclo celular (panel A). Los niveles de proteína Runx2 y Cbfb se analizaron por *western blot* (panel B) y los niveles de los mensajeros respectivos fueron determinados por *northern blot* (panel B). Actina y RNAs 28S y 18S se utilizaron como controles internos (paneles A y B).

4) Análisis de los niveles de Runx2 y Cbfb durante el ciclo celular de MC3T3 y ROBmtert.

Los antecedentes respecto a la regulación de los niveles de proteína y mRNA Runx2 en el ciclo celular de preosteoblastos, indican que en células MC3T3 sincronizadas, los niveles de proteína Runx2 disminuyen durante G1 tardío, permaneciendo bajos durante las fases S y mitosis, pero son restituidos rápidamente en la transición M/G1. Además, se ha observado, que el mRNA para Runx2 disminuye durante G1 tardío, pero posteriormente aumenta, acumulándose en mitosis [Galindo y col., 2005].

Dado que los niveles de las proteínas Runx2 y Cbfb son regulados de manera similar en células MC3T3 y ROBmtert respecto a etapas específicas del ciclo celular; G1 y mitosis, decidimos analizar en mayor detalle la regulación de este factor y su cofactor a lo largo del ciclo celular en las líneas celulares ROBmtert y MC3T3.

Las células MC3T3 fueron sincronizadas en el ciclo celular, mediante un arresto en G1 tardío inducido por un tratamiento con Mimosina por 24 horas. Posteriormente, las células fueron estimuladas a progresar a través del ciclo celular. La progresión del cultivo sincrónico de MC3T3 a través del ciclo celular fue monitoreada por citometría de flujo (figura 12). La figura 12B muestra los porcentajes de células en cada etapa del ciclo celular, observándose que las células fueron efectivamente arrestadas con la droga ya que a las 0 horas (24 horas de tratamiento con Mimosina) el 77% de ellas se encuentra en la fase G1 del ciclo celular. Durante las primeras 9 horas, el porcentaje de células en G1 oscila entre 70-75%, lo que indica que las células progresan a través de G1 tardío. En este período, los porcentajes de células en fase S y G2/M fluctúan entre 17-21% y 5-7%, respectivamente. Entre las 12-15 horas, el porcentaje de células que se encuentra en la fase G1 del ciclo celular disminuye considerablemente a un 59 y 50%, el porcentaje de células en fase G2/M se mantiene bajo,

entre un 5-4%, respectivamente, mientras que el porcentaje de células en fase S aumenta a un 36 y 46%, respectivamente, indicando la progresión las células en esta fase del ciclo celular. A las 18 horas, comienza a aumentar el porcentaje de células en fase G2/M (24%), lo que indica que las células están progresando en esta etapa del ciclo celular, lo cual es consistente con los bajos valores de fase G1 (31%) y el comienzo en la disminución de fase S (44%) observada a este tiempo. Finalmente, entre las 24-30 horas disminuye aún más la fracción de células en fase S (40-32%) y G2/M (14-10%), respectivamente, indicando el inicio de un

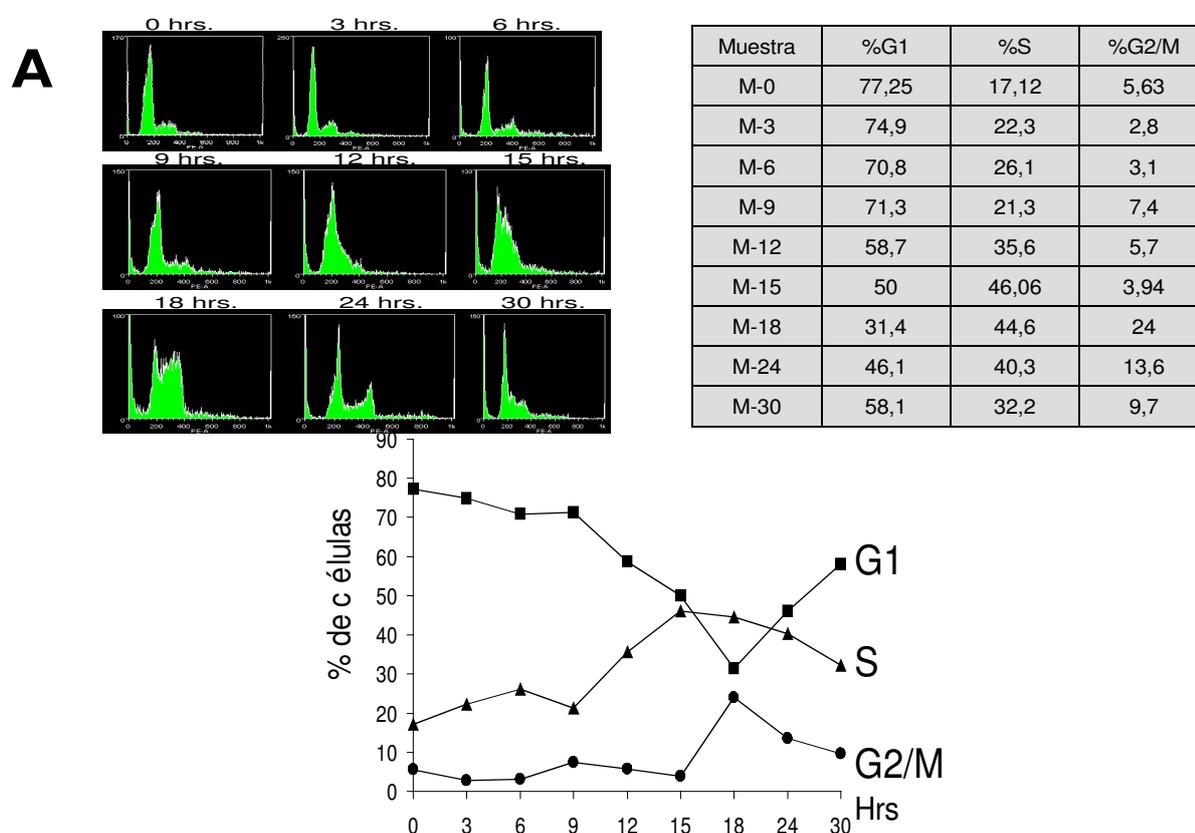


Figura 12. Sincronización de células MC3T3. Las células se arrestaron en G1 tardío mediante un tratamiento con Mimosina por 24 horas. Posteriormente, se estimularon a progresar de forma sincronizada en el ciclo celular. Se analizó el contenido de DNA (teñido con yoduro de propidio) de cada una de las muestras por medio de citometría de flujo (panel A). Los porcentajes de células en las distintas etapas se determinaron usando el programa WEASELv2.4 (panel B) y se representan graficados (panel C).

nuevo ciclo celular, consistente con el aumento de un 46-60% de la población celular en fase G1.

El análisis de los marcadores de ciclo celular, en células MC3T3 sincronizadas por tratamiento con Mimosina (figura 13A), muestra que los niveles de mRNA para histona H4 (marcador de fase S) se elevan en la transición G1/S (3-12 horas) y los niveles de la proteína ciclina A aumentan transitoriamente durante G2/M (18 horas) para luego disminuir a las 24-30 horas. Finalmente, los niveles de ciclina D1 (marcador de fase G1) se elevan al final de la fase S (15-18 horas) y se incrementan fuertemente durante G1 (24-30 horas). Estos resultados, muestran que las células MC3T3 liberadas del arresto proliferativo impuesto por Mimosina progresan de forma sincrónica a través del ciclo celular y que la asignación de las etapas del ciclo, mediante FACS análisis y niveles de marcadores moleculares son concordantes.

Al utilizar este método de sincronización en células ROBmtert, se observa la expresión de los marcadores mRNA H4, ciclina A y ciclina D asociados a la progresión en el ciclo celular (figura 14A), de manera similar a lo observado en células MC3T3 (figura 13A). La expresión de mRNA para H4 se detecta entre las 3 y las 9 horas indicando la progresión de las células a través de la fase S. El aumento de ciclina A a las 12 horas sugiere el fin de la fase S y el comienzo de la fase G2 y posterior mitosis, que se extendería no mas allá de las 15 horas. El mayor incremento detectado en los niveles de ciclina D1 entre las 18 y las 24 horas indicaría que esa etapa corresponde a la fase G1 del ciclo celular siguiente.

Los niveles de cdk's se observan principalmente constantes durante el ciclo celular de MC3T3 y ROBmtert, consistente con la expresión constitutiva descrita para estas proteínas (figuras 13A y 14A). Los resultados obtenidos, validan el método de sincronización con Mimosina en

las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert y confirman que los marcadores utilizados son apropiados para la asignación de etapas del ciclo celular en estos experimentos.

El análisis de la expresión de Runx2 y Cbf β durante el ciclo celular en las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert sincronizadas con Mimosina, muestra que en G1 tardío (tiempo 0 horas) los niveles de estas proteínas, relativos a los niveles de actina, se encuentran disminuidos

Células MC3T3 sincronizadas

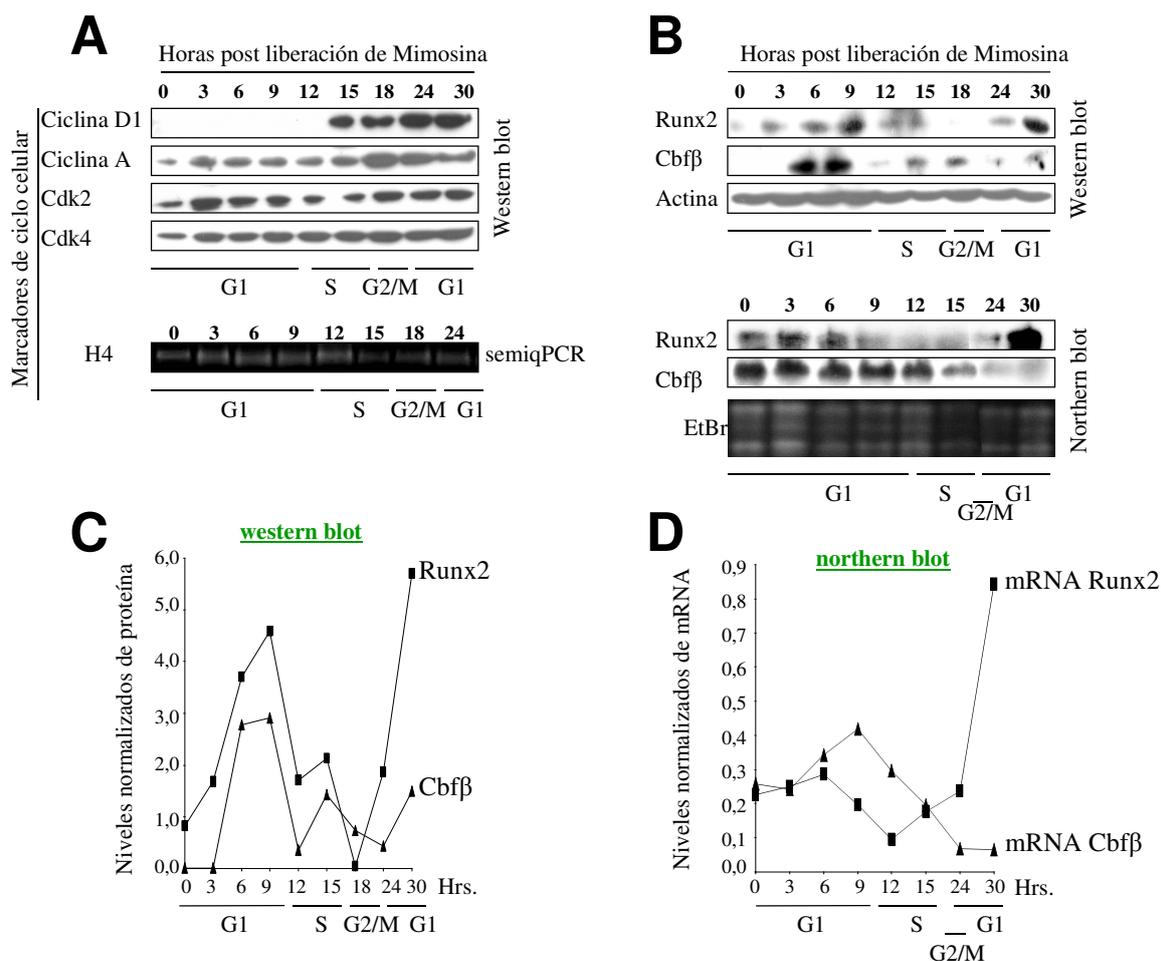


Figura 13. Expresión de Runx2 y Cbf β a través del ciclo celular en células MC3T3 sincronizadas con Mimosina. Las células se arrestaron en G1 tardío mediante un tratamiento con mimosina por 24 horas. Posteriormente, las células se estimularon a progresar de forma sincronizada en el ciclo celular. Los niveles de proteínas ciclinas y cdk's, y mRNA para histona H4, se utilizaron como marcadores de ciclo celular (panel A). Los niveles de proteína y de mRNA Runx2 y Cbf β se analizaron por *western blot* y *northern blot*, respectivamente (panel B). Actina y RNAs 28S y 18S se utilizaron como controles internos. La fluctuaciones de los niveles de proteína y de mRNA para Runx2 y Cbf β se representan graficadas, con valores normalizados (paneles C y D, respectivamente). (figuras 13B,C y 14B,C), confirmando los resultados obtenidos en similares experimentos,

descritos en las figuras 7A, D, E y 8A, D, E). Interesantemente, se observa en ambas líneas celulares, asociado a la progresión hacia la fase S del ciclo celular, un aumento transitorio en los niveles de la proteína Runx2 y Cbfb (figuras 13B,C y 14B,C). Específicamente, en MC3T3 se observa que este aumento se encuentra hacia el final de la fase G1 (6 y 9 horas). Luego, al comienzo de la fase S (12 horas), ocurre una disminución de los niveles de las

Células ROBmtert sincronizadas

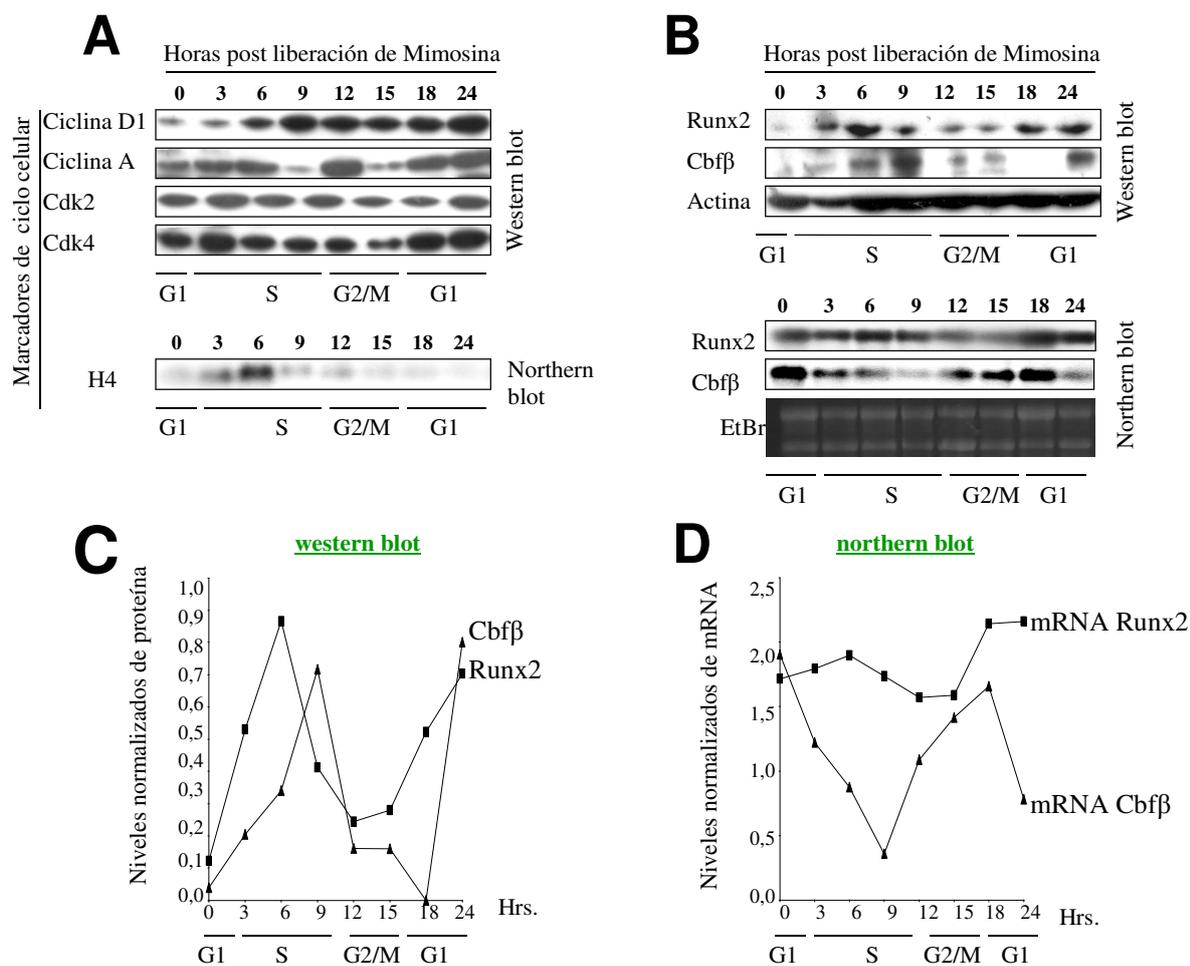


Figura 14. Expresión de Runx2 y Cbfb a través del ciclo celular en células ROBmtert sincronizadas con Mimosina. Las células se arrestaron en G1 tardío mediante un tratamiento con mimosina por 24 horas. Posteriormente, las células se estimularon a progresar de forma sincronizada en el ciclo celular. Los niveles de proteínas ciclinas y cdk, y mRNA para histona H4, se utilizaron como marcadores de ciclo celular (panel A). Los niveles de proteína y de mRNA Runx2 y Cbfb se analizaron por *western blot* y *northern blot*, respectivamente (panel B). Actina y RNAs 28S y 18S se utilizaron como controles internos. Las fluctuaciones de los niveles de proteína y de mRNA para Runx2 y Cbfb se representan graficadas, con valores normalizados (paneles C y D, respectivamente).

proteínas Runx2 y Cbf β , lo que concuerda con los bajos niveles de estas proteínas observados en las células tratadas con Hidroxiurea (figuras 7B, D y E). El alza de la proteína Runx2, y el bajo nivel de la proteína Cbf β visto en ROBmtert durante el inicio de la fase S (3 horas, figura 14) es también coincidente con el aumento y disminución de los niveles para estas proteínas, respectivamente encontrados en células arrestadas en el inicio de la fase S con Hidroxiurea (figuras 8B, D y E). Posteriormente, se aprecia una disminución en los niveles de proteínas para Runx2 y Cbf β asociado a la progresión de las células MC3T3 y ROBmtert a través de las fases G2/M del ciclo celular. Por último, se observa la restitución de los niveles proteicos de Runx2 y Cbf β entre las 24-30 horas post liberación del bloqueo con Mimosina, coincidente con la entrada de ambas líneas preosteoblásticas en la fase G1 del ciclo celular (figuras 13B,C y 14B,C).

El análisis de los niveles del transcrito para Runx2 durante el ciclo celular en las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert, muestra que los niveles de mRNA para este factor disminuyen durante la transición de las fases G1/S/G2 del ciclo celular, para aumentar nuevamente durante el inicio de la fase G1, de manera coincidente con la disminución y consecutiva restitución observada en los niveles de proteína durante estas etapas, respectivamente. Estos resultados son coherentes con los recientemente publicados (Galindo y col., 2005), que muestran que esta proteína es regulada negativamente durante la progresión en el ciclo celular.

Continuando con el análisis de los niveles de transcrito para el cofactor de Runx2, se observa que en células de la línea MC3T3 sincronizadas en el ciclo celular, los niveles de mRNA para Cbf β se mantienen desde la fase G1 tardía hasta el inicio de la fase S. Posteriormente, los niveles de mRNA para este cofactor disminuyen al final de la fase S y no son restituidos post mitosis, durante el inicio de la fase G1. En las células de la línea ROBmtert, los niveles de

mRNA para Cbfb detectados durante G1 tardío (tiempo 0 horas), al igual que en MC3T3, disminuyen durante la fase S, siendo mínimos al final de esta. Luego, los niveles del transcrito aumentan transitoriamente durante las fases G2/M y disminuyen nuevamente al inicio de la fase G1.

5) Análisis de la expresión post mitótica de Runx2 y Cbfb.

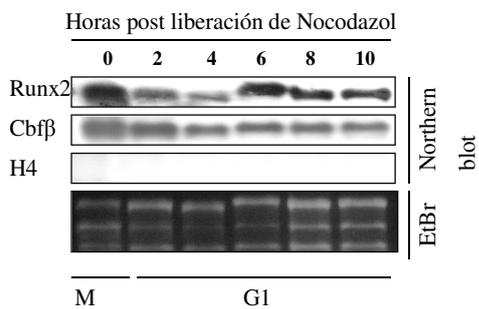
Debido a la corta duración de la fase M (1-2 horas), se dificulta un adecuado análisis de la fluctuación de la proteína y mRNA durante la progresión de las células a través de la mitosis, en células tratadas con Mimosina. Así, cultivos de las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert, se trataron con Nocodazol, para inducir arresto mitótico. Posteriormente, se seleccionaron las células en mitosis y se estimularon a progresar sincrónicamente en la fase G1 del ciclo celular (figura 15A y B). En las células MC3T3, se observa que los niveles de mRNA para Runx2 disminuyen en la transición mitosis-G1 (0-4 horas, figura 15) y son restituidos durante la progresión en la fase G1 temprana del ciclo celular (6-10 horas).

En las células ROBmtert, también se observa una disminución en los niveles del mensajero para Runx2 en la transición mitosis-G1 (0-2 horas, figuras 16A y B), y al igual que lo observado en MC3T3, los niveles de mRNA se restituyen durante la fase G1 temprana (4-10 horas, figuras 15C y D).

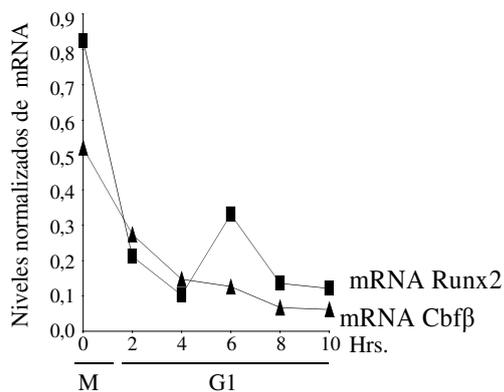
Por el contrario, los niveles del mRNA para Cbfb disminuyen postmitóticamente y no son restituidos durante la fase G1 del ciclo celular, excepto un leve y transitorio incremento detectado en ROBmtert.

Estos resultados, son coincidentes y complementan con mayor precisión la regulación de los mensajeros para Runx2 y Cbfb, asociada a la transición de las fases M/G1 del ciclo celular.

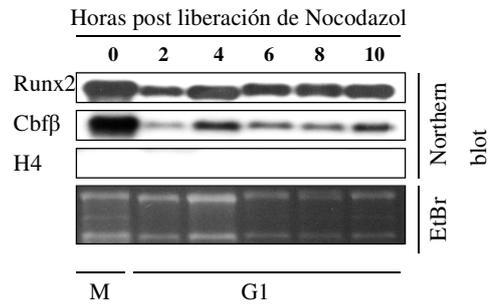
A Células MC3T3 sincronizadas



B



C Células ROBmtert sincronizadas



D

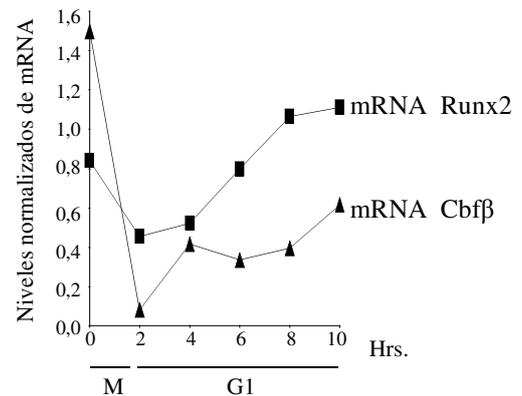


Figura 15. Expresión de mRNA Runx2 y mRNA Cbfb en células MC3T3 y ROBmtert sincronizadas en la transición mitosis-G1. Las células se arrestaron en mitosis, mediante tratamiento con nocodazol y luego, estimuladas a progresar sincronizadamente en la fase G1 del ciclo celular. Los niveles de mRNA para Runx2 y Cbfb se determinaron por northern blot, en preosteoblastos de las líneas MC3T3 y ROBmtert (paneles A y C, respectivamente). Se presentan los valores normalizados (paneles B y D).

DISCUSIÓN

En este estudio se pudo comprobar la hipótesis inicial, ya que los resultados obtenidos indican que efectivamente los niveles de Cbfb fluctúan a través del ciclo celular, y lo hacen de manera similar a los niveles de Runx2. Este comportamiento pudo observarse tanto en MC3T3, como en ROBmert. En ambas líneas celulares, la aparición de Ciclina D1 y la disminución de los niveles de Cbfb, se relacionan con el decaimiento de los niveles de Runx2, a la vez que el incremento en los niveles de Runx2 se acompaña con de un alza en los niveles de Cbfb (figuras 13 y 14). Hay antecedentes previos, de que el complejo Ciclina D1-Cdk4 fosforila una Serina conservada (serina-472) del extremo carboxilo terminal de Runx2 induciendo su ubiquitinación y degradación dependiente de proteasoma [Shen y col., 2006]. Por otra parte, se conoce que al formar un heterodímero con Runx2, Cbfb protege a las lisinas del RHD (70% de las lisinas totales) de Runx2 de la ubiquitinación [Zhao y col., 2003] y que tiene efectos estabilizadores en esta proteína [Huang y col., 2001]. Por lo tanto, los resultados del análisis de los niveles de proteínas Runx2 y Cbfb por western blot, en las sincronizaciones con Mimosina, coinciden con estos antecedentes previos y dan cuenta de la fina regulación entre la expresión de Runx2 y la progresión del ciclo celular. El patrón de expresión de Cbfb, sugiere que una de las formas en las que el ciclo celular podría regular la expresión de Runx2 sería aumentando o disminuyendo la disponibilidad del cofactor Cbfb, el cual le proporciona a Runx2, no solo incremento en la estabilidad, sino también funcionalidad al tener efecto alostérico sobre la capacidad de unión al DNA [Li y col., 2006]. Tal como en Runx2, el concepto de que Cbfb está relacionado con el control de la proliferación, también se observa en otros contextos biológicos, ya que hay antecedentes de que en el 32% de las células de cáncer gástrico obtenidas en cirugías hay menor expresión del gen para esta proteína y que el porcentaje aumenta conforme progresa el avance de la enfermedad

[Sakakura y col., 2005]. Además, en el promotor de Cbfb encontramos motivos de unión para proteínas implicadas en el control del ciclo celular: Sp1, Ets y Myc [Hajra y Collins, 1996]. Se sabe que c-myc, al inducir a p19 (ARF), estabiliza y activa a p53, que activa (entre otras) la transcripción de p21 que impide la actividad quinasa de los complejos ciclina-quinasa tales como CiclinaD1-cdk4 y CiclinaA-cdk2, controlando la progresión G1-S y G2-M respectivamente, al dejar hipofosforilada a la proteína Rb en el ciclo celular [Levine, 1997]. Lo anterior, sugiere que la transcripción del gen Cbfb, podría regularse positivamente por c-myc, en G1-S o en G2-M, que es lo que se observa en la células MC3T3 y ROBmtert respectivamente (figuras 13, 14 y 15). La traducción de p53, tal como la de Runx2 y la de otras proteínas relacionadas con proliferación y muerte celular ocurre por un mecanismo alternativo y dependiente de IRES [Ray y col., 2006], pero, interesantemente 2 IRES, representan a las 2 isoformas de p53; una de las cuales predomina en G1/S y la otra en G2/M [Ray y col., 2006].

Si bien la proteína Cbfb marca tendencias similares a través del ciclo celular, en las líneas celulares estudiadas en este trabajo, no se observa la misma relación entre el mensajero y la proteína en cuestión: en MC3T3, los niveles máximos de la proteína se alcanzan junto a los de mRNA ; mientras que en ROBmtert, los niveles máximos de la proteína se relacionan con los mínimos valores para el mRNA (figuras 13 y 14). Lo anterior sugiere que podría haber un control transcripcional y traduccional de los niveles de Cbfb a través del ciclo celular.

En cuanto al comportamiento de Runx2 través del ciclo celular, ya existían datos para MC3T3 que indicaban que los niveles de Runx2 están disminuidos en la transición G1/S y durante mitosis, pero se restituyen rápidamente en la transición M/G1, además de que el mRNA para Runx2 está aumentado en G2/M [Galindo y col., 2005]. En este estudio, en las células MC3T3 se repite el resultado de acumulación de mRNA para Runx2 durante G2/M

y la rápida restitución de los niveles de proteína Runx2 en G1 temprano (a las 30 horas post liberación de la droga). Además, se observa un alza transitoria de los niveles de este factor, asociada a la fase S.

La línea ROBmtert, sobre la cual no hay registros en cuanto a la expresión de Runx2 a través del ciclo celular, muestra el mismo comportamiento que MC3T3; un alza transitoria de la proteína en S, acumulación del mensajero en G2/M y restitución de los niveles proteicos de Runx2 en G1 temprano. Hay antecedentes que en la línea celular ósea ROS, luego de la mitosis, hay una partición equivalente de la cantidad de proteína Runx2 para cada una de las células generadas y que además, en la telofase, se observan igual número de *foci* de Runx2 en los dos núcleos de la progenie que corresponden a la mitad de los *foci* observados en G2 [Zaidi y col., 2003]. Lo anterior sugiere que el alza transitoria de los niveles de Runx2 observada en la fase de síntesis del ciclo celular de MC3T3 y ROBmtert podría permitir tener suficiente cantidad de este factor para unirse a los promotores de rDNA que han sido duplicados (en la fase S) y a los cuales se sabe que Runx2 permanece asociado durante la mitosis siendo una pieza clave en el mecanismo de retención del fenotipo óseo [Young y col., 2007].

Por otra parte, dado que la expresión de Runx2 en cuanto a proteína y mRNA manifiesta el mismo patrón de expresión a través del ciclo celular en las líneas celulares MC3T3 y ROBmtert, se valida el uso de esta última como un nuevo modelo para el estudio de la función antiproliferativa de Runx2.

La mejor comprensión de los complejos mecanismos que regulan la proliferación y la diferenciación de las células óseas, puede llevar a la creación de terapias para casos en los que se quiera favorecer la formación de hueso debido a lesiones o en el caso de patologías como el osteosarcoma, en las que se quiera controlar la expansión proliferativa. También, la investigación en Runx2 puede llevar a dilucidar cuál es el rol general de los factores Runx en

los diversos tejidos, ya que aparecen como proproliferativos en algunos casos y antiproliferativos en otros [Blyth y col., 2005], como Runx2 en la línea osteogénica [Galindo y col., 2005] . Mas allá incluso, el conocimiento de los mecanismos de Runx2 podría permitir la manipulación de células troncales, para direccionarlas hacia la formación de tejido óseo con las características deseadas.

CONCLUSIONES

- La proteína Cbfb fluctúa a través de ciclo celular de MC3T3 y ROBmtert, de una manera similar al factor de transcripción Runx2. Esto sugiere, que el control del ciclo celular sobre la expresión y función de Runx2, se ejercería al menos en parte, controlando los niveles de su cofactor.
- El alza moderada y transitoria de los niveles de Runx2 asociada a la progresión hacia la fase S del ciclo celular (G1 tardío en MC3T3), permitiría tener una cantidad suficiente de este factor para unirse a los promotores, a los que se ha descrito, que este factor permanece unido durante la mitosis.
- La expresión de Runx2 a través del ciclo celular en ROBmtert es similar a la expresión observada MC3T3, validando a esta línea celular de rata, como nuevo modelo de estudio de la función antiproliferativa de Runx2.

REFERENCIAS

Bae, J.S., Gutierrez, S., Narla, R., Pratap, J., Devados, R., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., Lian, J.B., Javed, A. (2007). Reconstitution of Runx2/Cbfa1-null cells identifies a requirement for BMP2 signaling through a Runx2 functional domain during osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 100: 434-49.

Blyth, K., Cameron, ER., Neil, JC. (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer.*5: 376-87.

Drissi, H., Luc, Q., Shakoori, R., Chuva de Sousa Lopes, S., Choi, J.Y., Terry, A., Hu, M., Jones, S., Neil, J.C., Lian, J.B., Stein, J.L., Van Wijnen, A.J., Stein, GS. (2000). Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol.* 184: 341 – 350.

Galindo, M., Pratap, J., Young, D.W., Hovhannisyanyan, H., Im, H.J., Choi, J.Y., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S, van Wijnen, A.J. (2005). The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *J Biol Chem.* 280: 20274 – 20285.

Guo, WH., Weng, LQ., Ito, K., Chen, LF., Nakanishi, H., Tatematsu, M., Ito, Y. (2002). Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by Runx3, a novel tumor suppressor. *Oncogene.* 21:8351-8355.

Hajra, A., Collins, F.S.(1996). Structure of the leukemia-associated human CBF gene. *Genomics.* 38: 107.

Huang, L. F.; Fukai, N.; Selby, P.B.; Olsen, B.R.; Mundlos, S. (1997). Mouse Clavicular Development: analysis of wild-type and cleidocranial dysplasia mutant mice. *Dev. Dyn,* 210: 33 – 40.

Hofstetter, W., Wetterwald, A., Cecchini, M.G., Mueller, C., Felix, R. (1995). Detection of transcripts and binding sites of colony-stimulating factor-1 during bone development. *Bone.* 17: 145 – 151.

Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, HJ., Yokomizo, T., Ito, Y. (2001). Dimerization with PEBP2beta protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J.* 20: 723-733.

Javed, A., Gutierrez, S., Montecino, M., van Wijnen, A.J, Stein, J.L., Stein, G.S., Lian, J.B. (1999). Multiple Cbfa/AML sites in the rat osteocalcin promoter are required for basal and vitamin D responsive transcription and contribute to chromatin organization. *Mol Cell Biol.* 19: 7491 – 7500.

- Javed, A., Guo, B., Hiebert, S., Choi, J-Y., Green, J., Zhao, S., Osborne, M.A., Stifani, S., Stein, J.L., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, G.S. (2000). Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX CBF(alpha)/AML/PEBP2 (alpha) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *J. Cell. Sci.* 113: 2221-2231.
- Kamachi, Y., Ogawa, E., Asano, M., Ishida, S., Murakami, Y., Satake, M., Ito, Y., Shigesada, K. (1990). Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *J. Virol.* 64: 4808-4819.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Chimisu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y-H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., Kishimoto, T.(1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 89: 755 – 764.
- Kundu, M., Javed, A., Jeon, J.P., Horner, A., Shum, L., Eckhaus, M., Muenke, M., Lian, J.B., Yang, Y., Nuckolls, G.H., Stein, G.S., Liu, P.P. (2002). *Cbf beta* interacts with *Runx2* and has a critical role in bone development. *Nat Genet.* 32: 639 – 644.
- Lee, B., Thirunavukkarasu, K., Zhou, L., Pastore, L., Baldini, A., Hecht, J., Geoffroy, V., Ducy, P., Karsenty, G. (1997). Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor *OSF2/CBFA1* in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet.* 16: 307 – 310.
- Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., Bae, S.C. (2000). *Runx2* is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between *runx2* and *smad5* induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol.* 20: 8783 – 8792.
- Lee, J.S., Thomas, D.M., Gutierrez, G., Carty, S.A., Yanagawa, S., Hinds P.W. (2006). *HES1* Cooperates With *pRb* to Activate *RUNX2*-Dependent Transcription. *J Bone Miner Res.* 6: 921-33.
- Levanon, D., Goldstein, R.E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z., Groner, Y. (1998). Transcriptional repression by *AML1* and *LEF-1* is mediated by the *TLE/Groucho* corepressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11590 – 11595,
- Levanon, D., Brenner, O., Negreanu, V., Bettoun, D., Woolf, E., Eilam, R., Lotem, J., Gat, U., Otto, F., Speck, N., Groner, Y. (2001). Spatial and temporal expression pattern of *Runx3* (*Aml2*) and *Runx1* (*Aml1*) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 109: 413–417.
- Levine, A.J. (1997). *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88 (3):323-31. Review.

Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H.M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S.C., Ito, Y. (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109: 113 – 124.

Li, Z., Lukasik, S.M., Liu, Y., Grembecka, J., Bielnicka, I., Bushweller, J.H., Speck, N.A., (2006). A mutation in the S-switch region of the Runt domain alters the dynamics of an allosteric network responsible for CBFbeta regulation. *J Mol Biol.* 364:1073-83.

Lian, J.B., Stein, G.S. (1999). *The Cell of Bone: In: Dynamics of bone and cartilage metabolism. Principles and Clinical Applications*, Seibel, M.J, Vrobins, S.P., Bilezikian, J.P (eds.), Academic Press, San Diego.

Lian, JB., Balint, E., Javed, A., Drissi, H., Vitti, R., Quinlan, EJ., Zhang, L., van Wijnen. AJ., Stein, JL., Speck, N., Stein, GS. (2003). Runx1/AML1 hematopoietic transcription factor contributes to skeletal development in vivo. *J. Cell Physiol.* 196: 301–311.

Lian, J.B., Stein, G.S. (2003). Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Current Pharmaceutical Design.*

Lian, J.B., Javed, A., Zaidi, S.K., Lengner, C., Montecinos, M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein G.S. (2004). Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression.* 14: 1– 41.

Liu, F., Aubin, J.E., Malaval, L. (2002). Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6, family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone.* 31: 212 – 219.

Meyers, S., Lenny, N., Hiebert, S.W. (1995). The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1b-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 15: 1974–1982.

Niki, M., Okada, H., Takano, H., Kuno, J., Tani, K., Hibino, H., Asano, S., Ito, Y., Satake, M., Noda, T. (1997). Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 94: 5697–5702.

Okuda, T., Deursen, J., van Hiebert, S.W., Grosveld, G., Downing, J.R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocation in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell.* 84: 321–330.

Pratap, J., Galindo M., Zaidi, S.K., Vradii, D., Bhat, B.M., Robinson, J.A., Choi, J.Y., Komori, T., Stein, J.L., Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. (2003). Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of pre-osteoblasts. *Cancer Res.* 63: 5357–5362.

Puzas, E.J. *Osteoblast Cell Biology, Lineage and Functions. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* Murray J. Favus. (eds). Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, 1998.

Rajgopal, A., Young, D.W., Munjeeb, K.A., Stein, J.L., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, G.S. (2007). Mitotic control of RUNX2 phosphorylation by both CDK1/cyclin B kinase and PP1/PP2A phosphatase in osteoblastic cells. *J Cell Biochem.* 100: 1509-1517.

Ray, P.S., Grover, R., Das S. (2006) Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep.* 7: 404-10.

Sakakura, C., Hagiwara A., Miyagawa K., Nakashima, S., Yoshikawa, T., Kin, S., Nakase, Y., Ito, K., Yamagishi, H., Yasumi, S., Chiba, T., Ito, Y. (2005). Frequent downregulation of the runt domain transcription factors RUNX1, RUNX3 and their cofactor CBFβ in gastric cancer. *Int J Cancer.* 113: 221-8.

Shen, R., Wang, X., Drissi, H., Liu, F., O'keefe, R.J., Chen. (2006). Cyclin D1-Cdk4 induce Runx2 ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 281: 16347 – 16353.

Speck, N.A. and Stacy, T. (1995). A new transcription factor family associated with human leukemias. *Crit. Rev. Eukary. Gene Expr.* 5: 3337 – 3364.

Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., Montecino, M., Choi, J-Y., Zaidi, K., Javed, A. (2000). Intranuclear trafficking of transcription factors: implications for biological control. *J Cell Sci.* 113: 2527 – 2533.

Stein, G.S., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Choi, J.Y., Pratap, J., Zaidi, S.K. (2003). Temporal and spatial parameters of skeletal gene expression: targeting RUNX factors and their coregulatory proteins to subnuclear domains. *Connect Tissue Res.* 44: 149 – 153.

Stein, G.S., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S.K., Young D.W., Choi JY, Pockwinse SM. (2004a). Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene.* 23: 4315 – 4329.

Stein, G.S., Lian, J.B., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Javed, A., Montecino, M., Zaidi, S.K., Young, D., Choi, J.Y., Gutierrez, S., Pockwinse, S. (2004b). Nuclear microenvironments support assembly and organization of the transcriptional regulatory machinery for cell proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* 91: 287 – 302.

Xiao, Z.S., Hinson, T.K., Quarles, L.D. (1999). Cbfa1 isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J Cell Biochem.* 74: 596 – 605.

Yoshida, C.A., Furuichi, T., Fujita, T., Fukuyama, R., Kanatani, N., Kobayashi, S., Satake, M., Takada, K., Komori T. (2002). Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet.* 32: 633 – 638.

Young, D.W., Hassan, M.Q., Pratap, J., Galindo, M., Zaidi, S.K., Lee, S-H., Yang, X., Xie, R., Javed, A., Underwood, J., Furcinitti, P., Imbalzano, AN., Penman, S., Nickerson, J.A., Montecino, M.A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein GS. (2007a). Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature*. 445: 442-6.

Young, D.W., Hassan, M.Q., Yang, X.Q., Galindo, M., Javed, A., Zaidi, S.K., Furcinitti, P., Lapointe, D., Montecino, M., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein, G.S. (2007b). Mitotic retention of gene expression patterns by the cell fate-determining transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 3189-94.

Zhao, M., Qiao, M., Oyajobi, B.O., Mundy. GR, Chen D. (2003). E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor alpha1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 278: 27939-27944.

Zaidi, S.K., Javed, A., Choi, J-Y., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., Stein, G.S. (2001). A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of osteocalcin gene. *J Cell Sci*. 114: 3093 – 3102.

Zaidi, S.K., Young, D.W., Pockwinse, S.M., Javed, A., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein, G.S. (2003). Mitotic partitioning and selective reorganization of tissue-specific transcription factors in progeny cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 100: 14852-7.

Zeng, C., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Meyers, S., Sun, W., Shoplant, L., Laurence, J.B., Penman, S., Lian, J.B., Sten, G.S., Hiebert, S.W. (1997). Identification of a nuclear matrix-targeting signal in the leukemia and bone-related AML-CBFalpha transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 6746 – 6751.

