

UCH-FC
Doc-BMCM
R 741
C. 1

**REGULACION EPIGENETICA DEL GEN RUNX2 EN CELULAS
OSEAS: Identificación de proteínas involucradas en la
metilación y demetilación de las histonas H3 y H4 en el
promotor P1.**



Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular
Y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

Adriana Patricia Rojas Moreno

Octubre, 2014

Director de Tesis Dr:

**Martín Montecino
Miguel Allende**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Adriana Patricia Rojas Moreno

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día **17 de Marzo de 2014**.

Director de Tesis:

Dr. Martín Montecino.

Dr. Miguel Allende





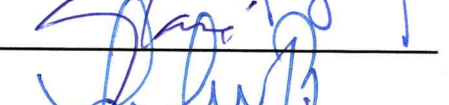
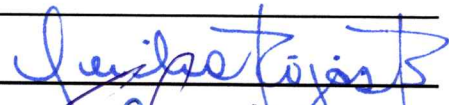
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Verónica Palma.

Dr. Cecilia Rojas.

Dr. Álvaro Glavic.

Dr. Cristian González



A la memoria de mi abuelo Camilo Moreno.



ADRIANA PATRICIA ROJAS MORENO

Licenciada en Biología y Química de la Universidad del Tolima-Colombia; Maestría en Ciencias con énfasis en Genética de poblaciones de la Universidad de los Andes (Bogotá- Colombia). Experiencia en docencia en pregrado y posgrado, en las áreas de Genética, Evolución, Biología celular y molecular, Citogenética. Experiencia en Investigación en Genética de poblaciones, Biología Molecular, Citogenética clásica y molecular. Profesora de Tiempo completo del Instituto de Genética Humana en la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá- Colombia).

AGRADECIMIENTOS

En este espacio quisiera agradecer a todas las personas que hicieron posible la ejecución de ésta tesis.

A mis entidades financiadoras, COLCIENCIAS Y FONDAP (Centro de Regulación del Genoma).

A mis directores Martín Montecino Leonard y Miguel Allende por sus enseñanzas, consejos y apoyo en los momentos difíciles. En especial al Dr Martín Montecino, por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio, por enseñarme la importancia de la rigurosidad a la hora de hacer investigación.

A mis compañeros de laboratorio, quienes se convirtieron en parte de mi familia. Gracias por acogerme como si fuere una sureña más (Concepción-Chile). Rodrigo, Daniel Moena, Hugo, Ignacia. En especial a Berta, Giorgia y Paola quienes se convirtieron en un apoyo fundamental en todo este proceso. Gracias por sus sonrisas, sus abrazos, su compañía.

A Fernando Bustos, mi parceró, por su complicidad, apoyo y amistad desinteresada. Gracias por las bromas, los comentarios osonarcisos y por siempre tener las palabras justas para alegrar esas jornadas de trabajo..

A mi Familia por su amor desinteresado. Porque de cada uno de ellos siempre sentí su inmenso amor, su apoyo. A mi abuela por sus plegarias diarias, por sus bendiciones, por ese legado de vida que nos entrega a diario.

A mi madre... Solo tengo palabras de gratitud para ella. Gracias a ella soy lo que soy. Su ejemplo se convirtió en mis razones para no claudicar nunca.

A mi Padre por su cariño, sus palabras siempre tranquilizadoras y llenas de confianza hacia mí.

A Victor Hugo por hacer de mis metas las suyas. Por acompañarme a enfrentar este desafío. Por su apoyo incondicional, sus cuidados, su compañía, su amor durante todo este tiempo.

A mi hija Catalina. Por darme todos los motivos para no desfallecer. Por alegrar mi existencia con sólo una sonrisa. Por ser mi mayor fortaleza y a la vez mi mayor debilidad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xxii
ABSTRACT	xxiv
INTRODUCCIÓN	1
1.1. El factor de transcripción RUNX2.....	5
1.2. Expresión del promotor P1 del gen Runx2.....	9
1.3. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).....	11
1.4. Estructura de la cromatina.....	16
1.4.1. Metilación del ADN.....	18
1.4.2. Modificaciones covalentes de las histonas.....	20
1.4.2.1 Acetilación de histonas.....	21
1.4.2.2 Metilación de histonas.....	23
1.5. Enzimas modificadoras de histonas.....	29
1.5.1. Enzimas Metiltransferasas.....	29
1.5.1.1.WDR5	29
1.5.1.2. EZH2.....	30
1.5.1.3. PRMT5.....	32
1.5.2. Enzimas Demetilasas de histonas.....	34
1.5.2.1.NO66.....	34

1.5.2.2. JARID 1B.....	36
1.5.2.3. UTX.....	37
1.5.2.4. JMJD6.....	39
1.6. Regulación epigenética del gen Runx2 en células óseas.....	39
1.7. HIPOTESIS.....	43
1.8. OBJETIVOS.....	43
1.8.1. Objetivo General.....	43
1.8.2. Objetivos Específicos.....	44
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
2.1. Líneas Celulares.....	45
2.1.1. Cultivo de células mioblásticas de ratón, C2C12.....	45
2.1.2. Cultivo de células preosteoblásticas de ratón, MC3T3.....	46
2.1.3. Cultivo de Osteoblastos Primarios de Rata.	46
2.1.4. Cultivo de células HEK293.....	48
2.2. Aislamiento de ARN y RT-PCR.....	48
2.3. PCR en tiempo real.....	50
2.4. Preparación de extractos nucleares a partir de células en cultivo	52
2.5. Electroforesis de proteínas.....	53

2.6. Western blot.....	53
2.7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	54
2.8. Ensayos de silenciamiento génico (shRNA).....	58
2.8.1 Sobre-expresión de WDR5	59
2.9. Tinciones de NBT/BCIP y Rojo de alizarina	60
2.10. Análisis de datos.....	61
3. RESULTADOS	62
3.1. Diferenciación de células mesenquimáticas hacia los linajes osteoblastico y muscular	62
3.1.1. Células C2C12	62
3.1.2. Células MC3T3	65
3.2. Perfil de modificaciones post-traduccionales en las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2.	72
3.2.1. Modificaciones post-traduccionales en histonas asociadas al promotor P1 del gen Runx2 en células C2C12 diferenciadas a los linajes miogénico u osteogénico.	73
3.2.1.1. Células C2C12 diferenciadas al linaje muscular presentan enriquecimiento en trimetilación de la Lisina 27 de la histona H3, asociada al promotor P1 de Runx2.	73

3.2.1.2. Dimetilación simétrica de la Arginina 3 de la histona H4 está asociada con la represión transcripcional de Runx2.	74
3.2.1.3. La trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 está enriquecida en promotor P1 del gen Runx2 transcripcionalmente activo.	75
3.2.2. Modificaciones post-traduccionales en histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2 en células MC3T3 diferenciadas al linaje osteoblástico.	79
3.3. Presencia de enzimas modificadoras de histonas en el promotor P1 del gen Runx2.	83
3.3.1 Unión de enzimas modificadoras de histonas en el promotor P1 del gen Runx2 en células C2C12 diferenciadas a los linajes miogénico y osteogénico.	
3.3.1.1. Asociación de NO66 y JARID1B al promotor P1 de Runx2 en Células C2C12 diferenciadas al linaje muscular.	83
3.3.1.2. Reclutamiento de EZH2 y PRMT5 al promotor P1 de Runx2 en células C2C12 diferenciadas al linaje muscular.	85
3.3.1.3. WDR5 y UTX se unen al promotor P1 de Runx2 durante la diferenciación osteoblástica de células C2C12.	86
3.3.2. WDR5 y UTX son reclutadas al promotor P1 de Runx2 durante la diferenciación osteoblastica de células MC3T3.	93
3.4. Contribución de NO66 en la regulación transcripcional del gen Runx2.	
3.4.1. Silenciamiento de NO66 en células C2C12.	99
3.4.2. Silenciamiento de NO66 en células MC3T3.	101

3.5. Contribución de JARID1B en la regulación transcripcional del promotor P1 del gen Runx2.	107
3.5.1. Silenciamiento de JARID1B en células C2C12.	107
3.5.2. Silenciamiento de JARID1B en células MC3T3.	109
3.6. Rol de EZH2 en la regulación transcripcional de Runx2.	116
3.6.1. Silenciamiento de EZH2 en C2C12.	116
3.6.2. Silenciamiento de EZH2 en MC3T3.	118
3.7. Rol de PRMT5 en la regulación transcripcional de Runx2.	125
3.7.1. Silenciamiento de PRMT5 en células C2C12.	125
3.7.2. Silenciamiento de PRMT5 en células MC3T3.	126
3.7.3. Silenciamiento de COPR5 en células C2C12.	127
3.8. WDR5 regula la actividad transcripcional de Runx2.	137
3.8.1 Silenciamiento de WDR5 en células C2C12 diferenciadas a mioblastos y osteoblastos.	137
3.8.2. Silenciamiento de WDR5 en células MC3T3.	139
3.9. UTX contribuye a la regulación transcripcional de Runx2.	146
3.9.1. Silenciamiento de UTX en células C2C12.	146

3.9.2. Silenciamiento de UTX en células preosteoblásticas MC3T3.	147
3.10. Complejo WDR5/UTX.	155
3.11. Análisis en Osteoblastos primarios de rata (ROBs).	160
3.11.1. Ensayos de pérdida y ganancia de función de WDR5 en cultivos de osteoblastos primarios de rata (ROBs).	166
3.11.2. Ensayos de pérdida de función de UTX en cultivos de osteoblastos primarios de rata (ROBs).	167
4. DISCUSION.	174
4.1. Regulación de la expresión génica de Runx2-II/p57 mediante modificaciones covalentes en las colas de las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1.	179
4.1.1 Represión transcripcional del promotor P1 de Runx2.	179
4.1.2 Activación transcripcional del promotor P1 de Runx2.	193
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	202
6. ANEXOS.	204
7. BIBLIOGRAFIA.	214

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Proteínas con actividad histona-metiltransferasas de lisinas.....	26
Tabla 2: Proteínas histona-metiltransferasas de argininas, agrupadas según el tipo y grado de modificación.	26
Tabla 3: Proteínas con acción histona-demetilasas.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Programa de crecimiento y diferenciación Osteoblástico.....	4
Figura 2. Organización del gen Runx2.....	8
Figura 3. Vía de señalización de BMP-2.....	15
Figura 4. Modificaciones covalentes de las histonas.....	28
Figura 5. Modelo de control transcripcional del promotor P1 del gen Runx2 por mecanismos epigenéticos durante la diferenciación osteoblástica. ...	42
Figura 6. Diferenciación de células C2C12 hacia los linajes muscular y osteoblástico.....	68
Figura 7. Expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica y mio blástica en células C2C12.....	69
Figura 8. Diferenciación de células MC3T3.	70
Figura 9. Expresión de Runx2-II/p57 y Osteocalcina en células MC3T3.	71
Figura 10. Presencia de modificaciones epigenéticas represoras en el promotor P1 del gen Runx2, en células C2C12.	77
Figura 11. Análisis de mono y trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, en células C2C12.	78
Figura 12. Análisis de mono y trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, durante la diferenciación de células MC3T3.	81

Figura 13. Presencia de modificaciones represoras en el promotor P1 del gen Runx2 durante la diferenciación de células MC3T3.....	82
Figura 14. Perfiles de expresión y análisis de la unión de NO66 y JARID 1B al promotor P1 de Runx2 en C2C12.	89
Figura 15. Perfiles de expresión y análisis de la unión de EZH2 y PRMT5 al promotor P1 de Runx2 en C2C12.	90
Figura 16. Perfiles de expresión y análisis de la unión de WDR5 y UTX; en células C2C12.	91
Figura 17. Perfil de expresión y análisis de la unión de JMJD6 al promotor P1 de Runx2 en C2C12.	92
Figura 18. Perfiles de expresión y análisis de la unión de WDR5 y UTX; en células MC3T3.	95
Figura 19. Perfiles de expresión y análisis de la unión de NO66 y JARID1B en células MC3T3.	96
Figura 20. Perfiles de expresión y análisis de la unión de EZH2 y PRMT5 al promotor P1 de Runx2 en células MC3T3.	97
Figura 21. Perfil de expresión y análisis de la unión de JMJD6 al promotor P1 de Runx2 en células MC3T3.	98
Figura 22. Silenciamiento de NO66 en células C2C12.	102
Figura 23. Silenciamiento de NO66 en células C2C12.	103
Figura 24. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de NO66.	105

Figura 25. Silenciamiento de NO66 en células MC3T3.	106
Figura 26. Control del silenciamiento de JARID1B en células C2C12 .	111
Figura 27. Silenciamiento de JARID1B en células C2C12.	112
Figura 28. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de JARID1B.	114
Figura 29. Silenciamiento de JARID1B en células MC3T3.	115
Figura 30. Control del silenciamiento de EZH2 en células C2C12.	119
Figura 31. Silenciamiento de EZH2 en células C2C12.	120
Figura 32. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 27 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de EZH2.	122
Figura 33. Silenciamiento de EZH2 en células MC3T3.	124
Figura 34. Control del silenciamiento de PRMT5 en células C2C12.	129
Figura 35. Silenciamiento de PRMT5 en células C2C12.	131
Figura 36. Análisis de la dimetilación simétrica en el residuo de arginina 3 de la histona H4 en células C2C12 luego del silenciamiento de PRMT5.	132
Figura 37. Silenciamiento de PRMT5 en células MC3T3.	133
Figura 38. Silenciamiento de COPR5 en células C2C12.	134
Figura 39. Silenciamiento de COPR5 en células C2C12.	135
Figura 40. Análisis del reclutamiento de PRMT5 al promotor P1 de Runx2 y de la dimetilación simétrica en el residuo de arginina 3 de la histona H4 en células C2C12 luego del silenciamiento de COPR5.	136
Figura 41. Control del silenciamiento de WDR5 en células C2C12.	140

Figura 42. Silenciamiento de WDR5 en células C2C12.	142
Figura 43. Actividad de fosfatasa alcalina en células C2C12 infectadas con shWDR5.	143
Figura 44. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de WDR5.	144
Figura 45. Silenciamiento de WDR5 en células MC3T3.	145
Figura 46. Control del silenciamiento de UTX en células C2C12.	149
Figura 47. Silenciamiento de UTX en células C2C12.	151
Figura 48. Actividad de fosfatasa alcalina en células C2C12 infectadas con shUTX.	152
Figura 49. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 27 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de UTX.	153
Figura 50. Silenciamiento de UTX en células MC3T3.	154
Figura 51. WDR5 y UTX forman complejo en células osteoblásticas.	157
Figura 52. Análisis del reclutamiento de UTX y de la trimetilación en el residuo de lisina 27 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de WDR5.	158
Figura 53. Análisis del reclutamiento de WDR5 y de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de UTX.	159
Figura 54. Cultivo de osteoblastos primarios derivados de calvaria de rata (ROBs).	162

Figura 55. Expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica durante la diferenciación <i>ex vivo</i>	163
Figura 56. Expresión de Runx2 en osteoblastos primarios de rata.	164
Figura 57. Expresión de WDR5, NO66, JARID 1B, EZH2, UTX, PRMT5, JMJD6 en Osteoblastos primarios (ROBs).	165
Figura 58. Silenciamiento de WDR5 en osteoblastos primarios de rata. ...	169
Figura 59. Efecto de la sobre-expresión de WDR5 en cultivo de osteoblastos primarios.	171
Figura 60. Sobre-expresión de WDR5 en cultivo de osteoblastos primarios.....	172
Figura 61. Silenciamiento de UTX en osteoblastos primarios de rata. ...	173
Figura 62. Modelo de regulación epigenética de la transcripción del gen Runx2-II/p57 durante la diferenciación osteoblástica.	201

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosil-trifosfato
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas
BSA	Albúmina de suero bovino
Bsp	Sialoproteína ósea
C/EBP	Proteína de unión al elemento estimulador
	CAAT
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DNasal	Deoxirribonucleasa I
dNTP	Deoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamino tetraacetato de sodio
EMSA	Retardo de la movilidad electroforética en gel
g	gramo
h	Hora u horas
HAT	Histona acetiltransferasa

HDAC	Histona deacetilasas
HMT	Histona metiltransferasa
HDMT	Histona demetiltransferasa
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona H3
H4	Histona H4
HS	Suero de caballo
IgG	Inmunoglobulina G
KDa	kilo Dalton
KMT	Lisina metiltransferasa
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
uM	Micromolar
ml	Mililitro
ul	Microlitro
mg	Milígramo
ug	Micrógramo
mm	Milímetro
ng	Nanógramo

nm	Nanómetros
OC	Osteocalcina
Op	Osteopontina
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRMT	Metiltransferasa de arginina
rpm	Revoluciones por minuto
RNAi	Ácido ribonucleico de doble cadena de interferencia
RNA Pol II	RNA polimerasa II
ROB	Osteoblastos diploides primarios de rata
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida denaturantes por SDS
seg	segundos
shARN	Short hairpin
SWI/SNF	Switch Independent/Sucrose Non-Fermenting
TE	Tampón Tris-EDTA
U	Unidades
V	Volt

°C

grados Celcius

RESUMEN

El factor de transcripción Runx2 es esencial para el compromiso con el linaje osteoblástico. Esta función la realiza mediante el control de la expresión de genes fundamentales en el proceso de diferenciación ósea. La expresión de Runx2 es iniciada desde 2 promotores: P1 distal y P2 proximal, que dirigen la expresión de dos isoformas principales denominadas Runx2-I/p56 y Runx2-II/p57. Se ha demostrado que el promotor P1 controla la expresión de la isoforma Runx2-II en células osteoblásticas y que la estimulación de células pluripotenciales mesenquimales con la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) es capaz de inducir, específicamente, la expresión de esta isoforma. Esta elevada expresión de Runx2 es acompañada por un remodelamiento cromatínico en la región promotora P1, que es independiente de la actividad remodeladora de cromatina de complejos del tipo SWI/SNF, y es mediada por mecanismos epigenéticos; específicamente por la existencia de un patrón específico de modificaciones postraduccionales en las histonas H3 y H4 presentes en la región promotora proximal P1 que está asociado a la actividad transcripcional del gen Runx2-II/p57 en células osteoblásticas. Debido a la importancia que tienen estas modificaciones covalentes en las histonas como

un mecanismo de regulación de la expresión de genes maestros para la diferenciación osteoblástica, en esta tesis doctoral nos enfocamos en evaluar la contribución de proteínas con actividad metiltransferasa, como WDR5, EZH2 y PRMT5 y enzimas con actividad demetiltransferasa como NO66, JARID1B, UTX y JMJD6 en la actividad transcripcional del gen Runx2-II/p57.

En esta tesis demostramos que el complejo WDR5-UTX estimula la actividad transcripcional del promotor P1 de Runx2 y que esta regulación ocurre por un mecanismo concertado, que favorece el enriquecimiento de H3K4Me3 y el detrimento de H3K27Me3, en el promotor. En contraste encontramos que JARID1B media la represión transcripcional del gen. Esto fue demostrado mediante el uso de shRNA contra JARID1B en células mesenquimales C2C12 estimuladas con suero de caballo, donde encontramos que el silenciamiento de JARID1B resulta en la activación transcripcional de Runx2-II/p57. Adicionalmente, en células que no expresan Runx2-II/p57, detectamos el reclutamiento de las enzimas metiltransferasas EZH2 y PRMT5, junto a la enzima demetiltransferasa NO66 en el promotor P1 de Runx2; favoreciendo el estado represivo de la cromatina. Sin embargo, los ensayos de pérdida de función indican que estas enzimas no son necesarias para reprimir la transcripción del gen Runx2-II/p57.

ABSTRACT

The transcription factor Runx2 is essential for osteoblast lineage commitment. This function is performed by the control and regulation of the expression of key genes in the process of bone differentiation. Runx2 expression is initiated from two promoters: P1 distal, and P2 proximal. The promoters drive the expression of two major isoforms called Runx2-I/p56 and Runx2-II/p57, respectively. It has been demonstrated that the P1 promoter controls the expression of Runx2-II isoform in osteoblastic cells, and that the stimulation of pluripotent mesenchymal cells by bone morphogenetic protein -2 (BMP2) is able to specifically induce the expression of this isoform. The increased expression of Runx2 is accompanied by chromatin remodeling events in the P1 promoter region; specifically the establishment of a specific pattern of posttranslational modifications on the tails of histones H3 and H4 associated to the P1 promoter. Due to the importance of these covalent histone tail modifications as a mechanism for regulation of Runx2 expression, in this doctoral thesis we focused on assessing the contribution of proteins with methyltransferase activity, WDR5, EZH2 and PRMT5 or demethyltransferase activity NO66,

JARID1B, JMJD6 and UTX on the transcriptional regulation of the gene Runx2-II/p57.

We demonstrate that a complex formed by UTX-WDR5 regulates the transcriptional activity of Runx2 P1 promoter, and that this regulation takes place by a concerted mechanism that favors enrichment H3K4Me3, and H3K27me3 absence in the histone tails associated to the promoter. On the other hand, in a differentiation model where Runx2 is repressed, we found that JARID1B regulates transcriptional repression of the gene by actively demethylating H3K4me3. Additionally, in this differentiation model where cells do not express the Runx2, we detected that the methyltransferases EZH2 and PRMT5; and demethylase NO66 are recruited to the Runx2 P1 promoter.

1. INTRODUCCION

La formación del hueso se inicia en el periodo embrionario y en humanos ocurre hasta los 25 años, aproximadamente. Este proceso de osificación puede ocurrir mediante dos formas: osificación intramembranosa y osificación endocondral. En la primera, el hueso se genera directamente a partir del tejido conectivo. En zonas específicas del feto, y debido a una activa proliferación, las células madre mesenquimales se condensan y algunas se diferencian directamente hacia osteoblastos. Un ejemplo de este tipo lo constituyen los huesos planos del cráneo, parte del maxilar inferior y la mayor parte de la clavícula (Cohen, 2006; Geneser, 2000; Olsen y cols., 2000). Por otro lado, la osificación endocondral involucra un molde o precursor cartilaginoso desde el cual el hueso se desarrolla. Una vez que ocurre la formación del precursor cartilaginoso desde el mesénquima, los condrocitos que se encuentran en el centro se vuelven hipertróficos y posteriormente, mueren lo que inicia el proceso de mineralización del cartílago. Junto a esta mineralización ocurre una invasión de vasos sanguíneos, osteoclastos y células osteoprogenitoras, las cuales se diferencian hacia osteoblastos y comienzan a depositar hueso utilizando la matriz de cartílago dejada por los condrocitos como andamio.

Tanto el esqueleto axial como apendicular se forman por medio de este tipo de osificación (Cohen, 2006; Geneser, 2000; Olsen y cols., 2000).

Las células óseas se encuentran dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas ("mesenchymal stem cells"). Estas células pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos o mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes (Fernandez y col., 2006). La diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic hedgehog). También son esenciales el factor de transcripción *Runx2* (también llamado *Cbfa1*, "core-binding factor a-1") y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde células mesenquimales pluripotenciales (Yamaguchi y col., 2000, Aubin y col., 2000).

Los osteoblastos tienen la propiedad de depositar una matriz extracelular (formada principalmente por colágeno I) que posteriormente puede ser mineralizada, siendo fundamentales para la formación del esqueleto durante el desarrollo y posterior mantención de éste, después del nacimiento (Cruzat y col., 2009). El desarrollo del fenotipo osteoblástico maduro desde células pre-osteoblásticas ocurre como sigue: (I) mitogénesis de las células precursoras; (II) diferenciación hacia osteoblastos maduros capaces de sintetizar matriz

extracelular; y (III) mineralización de la matriz extracelular (Barrio y Etcheverry, 2006).

Tras el compromiso de linaje, las células osteoprogenitoras sufren una etapa de activa proliferación caracterizada por la producción de proteínas tales como histonas, fibronectina, colágeno I, c-Fos, c-Jun y p21 (Fig. 1)(Stein y col., 2004). A continuación, las células salen de mitosis, disminuye la expresión de genes que promueven la proliferación y comienzan a expresar genes tales como fosfatasa alcalina (ALP), sialoproteína ósea (BSP) y colágeno I, todos necesarios para producir y madurar la matriz extracelular osteogénica. Posteriormente, los osteoblastos comienzan a expresar genes involucrados en la mineralización de la matriz extracelular tales como osteocalcina (Stein y col., 2004), osteopontina y colagenasa (Owen y col., 1990; Jensen y col., 2010). Se ha determinado que este programa de expresión de genes y diferenciación celular es gobernado principalmente por la expresión y actividad del factor de transcripción Runx2, como queda de manifiesto en ratones nulos para esta proteína, los que mueren al nacer debido a una falta de mineralización de tejido óseo. De acuerdo con esto se ha demostrado que la haploinsuficiencia de Runx2 causa displasia cleidocranial en humanos, una condición caracterizada por clavículas hipoplásicas, defectos dentales, osificación retrasada de los huesos del cráneo, entre otras numerosas anomalías del esqueleto (Ducy y col., 1997; Otto y col., 1997).

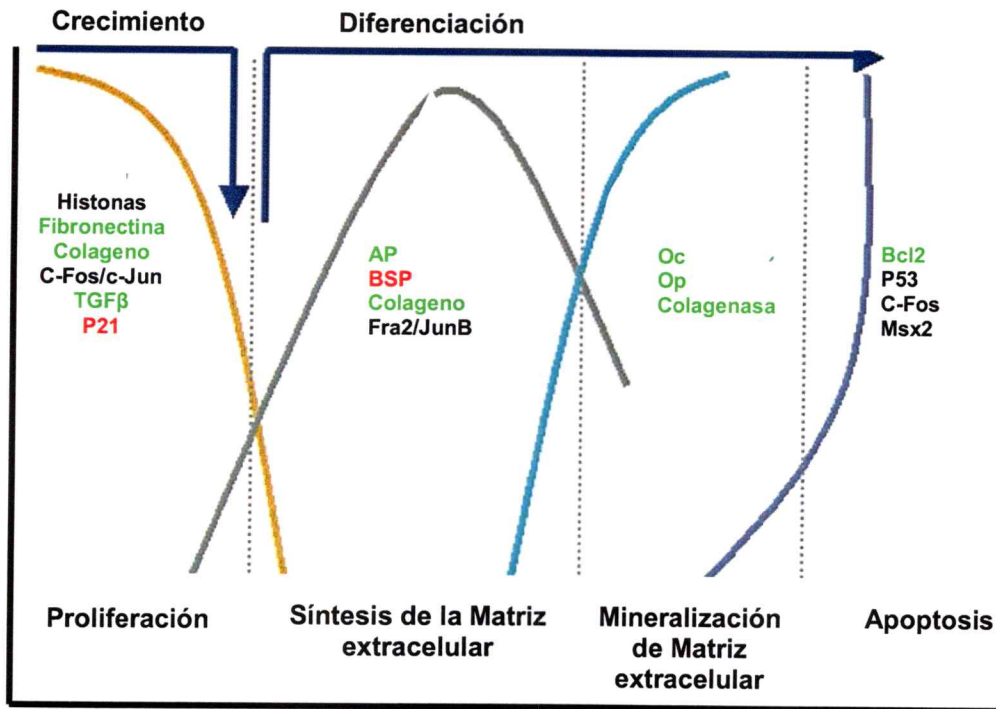


Figura 1. Programa de crecimiento y diferenciación Osteoblástico. El proceso de diferenciación osteogénica ocurre en tres etapas que se caracterizan por un patrón específico de expresión génica. En la etapa de proliferación ocurre la expresión de varios marcadores de ciclo celular que incluyen histonas; la etapa de maduración de la matriz extracelular es caracterizada por la expresión de proteínas relacionadas con este proceso que incluyen colágeno y fosfatasa alcalina (AP); y la etapa de mineralización de osteoblastos requiere la inducción de osteoclastina (OC) y osteopontina (Op), entre otros. Finalmente, se representa el ingreso de osteoblastos a un proceso de apoptosis. Los genes regulados positivamente están mostrados en verde y los regulados negativamente están mostrados con rojo (Stein y col., 2004).

Runx2 es frecuentemente descrito como el regulador maestro de la osteogénesis, al controlar la expresión de genes importantes para que ocurran las etapas de proliferación, diferenciación y maduración de los osteoblastos (Stein y col., 2004). Esta función vital de Runx2 en el evento de diferenciación osteoblástica justifica la importancia de analizar los mecanismos epigenéticos involucrados en su regulación transcripcional; evaluando la presencia de modificaciones covalentes de histonas y de proteínas involucradas con éstas modificaciones, al igual que estudiando las consecuencias de estas modificaciones en la actividad del gen.

1.1 El factor de transcripción Runx2

Los factores de transcripción Runx son factores heterodiméricos formados por subunidades α y β . En mamíferos, la subunidad β está codificada por un único gen mientras que la subunidad α está codificada por tres genes denominados Runx (Ito y col., 2003). Los genes Runx1, Runx2 y Runx3 codifican para reguladores de la expresión de genes tejido-específicos que participan en vías de diferenciación importantes para el desarrollo (Li y col, 2002).

Runx 1 se expresa en células totipotenciales hematopoiéticas, células endoteliales (Levanon y col., 2004), precursores neurales olfatorios (Theriault y col., 2005) y neuronas motoras colinérgicas. Estudios recientes indican que Runx1 es esencial para la diferenciación de neuronas de la raíz del ganglio

dorsal hacia el linaje nociceptor, estando involucrado de esta forma en la regulación de la respuesta al dolor (Chen y col., 2006; Kramer y col., 2006; Marmige y col, 2006; Yoshikawa y col., 2007; Samad y col., 2010; Ugarte y col., 2012).

Runx 3 participa en la generación de células T y en el desarrollo de neuronas propioceptivas. De igual manera se ha establecido su importancia como un factor supresor de tumores. (Chen y col., 2006; Kramer y col., 2006; Marmige y col., 2006; Yoshikawa y col., 2007; Samad y col., 2010).

Runx2 es esencial para la maduración de osteoblastos y el desarrollo osteogénico. Esta función la realiza mediante el control y la regulación de la expresión de genes fundamentales en el proceso de diferenciación ósea como colágeno tipo I, osteopontina (Op), sialoproteína ósea (Bsp) y osteocalcina (Oc) (Lian y col., 2004 y Karsenty y col., 2002). De igual manera se ha establecido que Runx2 regula la expresión del factor de transcripción osterix, el cual ha sido estrechamente relacionado con el proceso de osificación (Nakashima y col., 2002 y Sinha y col., 2010).

El gen Runx2 tiene una extensión aproximada de 220 Kb y posee 8 exones. La expresión de Runx2 es iniciada desde 2 promotores, denominados promotor P1 distal y promotor P2 proximal. Estos promotores dirigen la expresión de dos isoformas de Runx2 que difieren en su secuencia N-terminal (Geofroy y col., 1998; Pozner y col., 2000; Drissi y col., 2000). La transcripción de la isoforma

tipo I, denominada p56/tipo I de 513 aa (Harada y col., 1999), es dirigida por el promotor P2 y su transcripción se inicia en el exón 2. La transcripción de la segunda isoforma, denominada p57/tipo II de 528 aa, se inicia en el exón 1 es dirigida por el promotor P1 (Fig. 2). A pesar de que estas dos isoformas se expresan en tejido óseo, se han establecido funciones regulatorias distintas para ambas proteínas durante los estados de diferenciación de las células osteoblásticas. Es así como Runx2-I se expresa en precursores tempranos de osteoblastos y condrocitos; mientras que Runx2-II, es predominante en todo el tejido óseo (Stock y cols., 2005). Ambas proteínas tienen en común los mismos dominios funcionales: 1. Dominio rico en glutamina alanina (QA), 2. Dominio *runt* de unión al ADN (RHD), 3. Señal de localización nuclear (NLS), 4. Señal de interacción con la matriz nuclear (NMTS) y 5. Dominio de interacción con TLE/groucho (Stein y col., 2004).

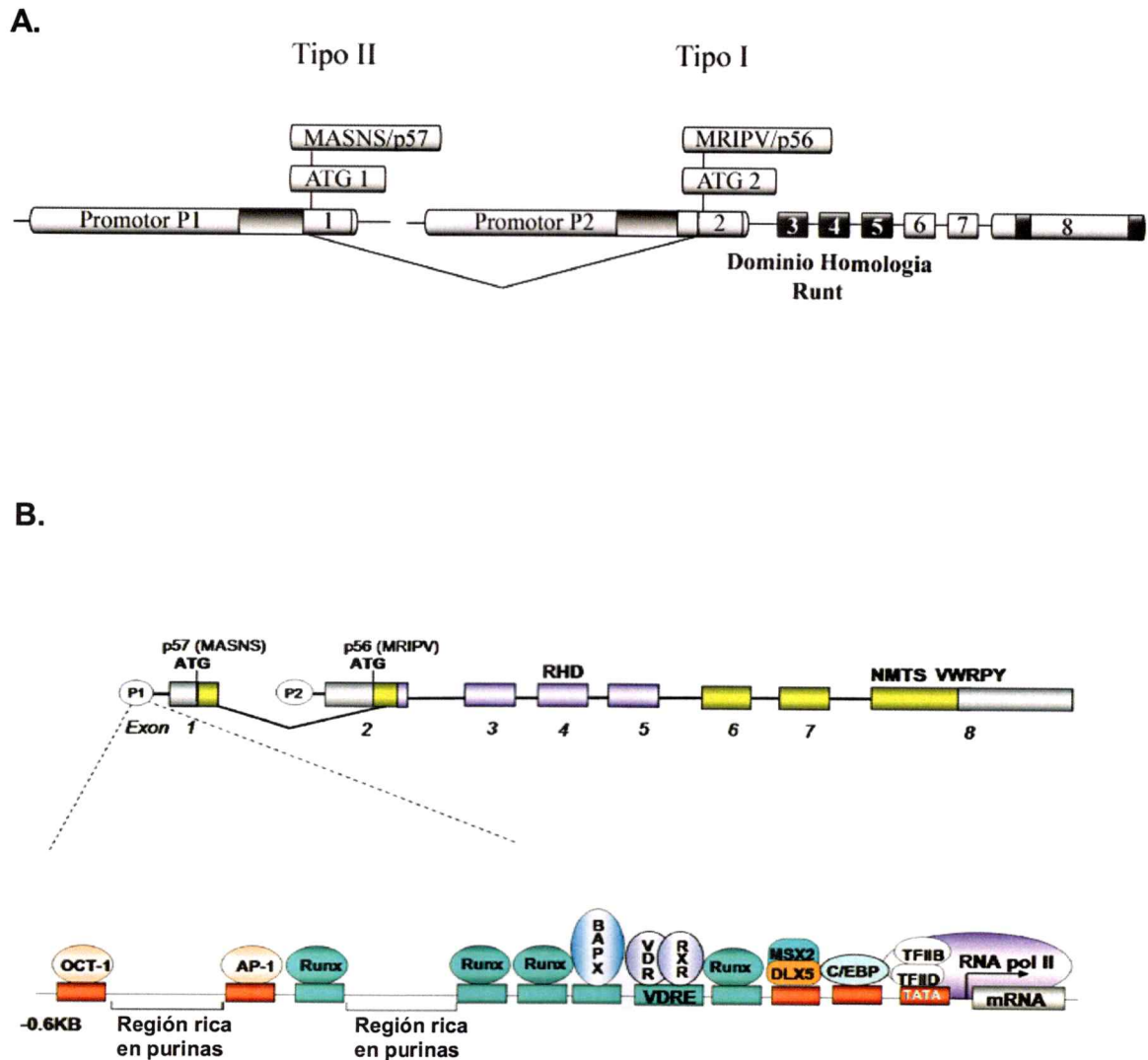


Figura 2. Organización del gen Runx2. **A.** Se indica con números los exones y el origen de las isoformas N-terminales que se generan. Se muestra el exón de origen para la isoforma tipo II (p57) y para la isoforma tipo I (p56). En el exón 1 se muestra el sitio de inicio de traducción con la secuencia MASNS y el exón 2 que contiene el sitio de inicio de traducción para la secuencia MRIPIV (Henriquez., 2009). **B.** Ilustración de algunos de los elementos identificados en los primeros 600 pb del promotor P1 (Javed y col., 1999).

1.2 Expresión del promotor P1 del gen Runx2.

El promotor P1 dirige la transcripción de Runx2-II/p57, la cual se inicia 400pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción. Esta región promotora se caracteriza por poseer una región rica en purinas dentro de los 500 pb proximales. Análisis de deleciones sucesivas del promotor han permitido establecer que los primeros 600 pb son suficientes para conferir activación transcripcional del promotor, obteniéndose de esta manera una actividad basal equivalente a una generada con una construcción de 3 Kb de secuencia promotora en células osteoblásticas (Drissi y col., 2000; Tou y col., 2003). Estos datos indican que dentro de estos 600 pb proximales del promotor es donde se producen las mayores acciones regulatorias. Sin embargo, también mediante el uso de deleciones sucesivas del promotor de ratón, se reportó la existencia de una actividad basal diferencial entre los 6 Kb y 600 pb en líneas celulares óseas. De igual manera el uso de ratones transgénicos que expresan dos construcciones de 3 y 1 Kb del promotor P1 controlando el gen reportero β -Galactosidasa, permitió establecer que sólo el constructo de 3 Kb se expresa en tejido óseo, no así el de 1 kb. Con estos resultados se ha planteado que la región comprendida entre 3 y 1 Kb del promotor P1 es necesaria para la expresión tejido específica del factor Runx2 (Yakeda y col., 2008).

En la región del promotor P1 de Runx2 se han identificado secuencias que son importantes en la regulación de la transcripción, las cuales son altamente conservadas entre especies (Figura 2B) (Fujiwara y col., 1999; Drissi y col.,

2000). Al respecto, Drissi y cols., identificaron 6 posibles sitios con secuencias consenso para la interacción del propio factor Runx2, sugiriendo que este factor podría regular su propia expresión (Drissi y col., 2000; 2002). De igual manera, se han descrito secuencias que corresponden a elementos de respuesta para hormonas esteroidales, específicamente a 1,25-(OH)₂-vitamina D3, la cual disminuye la expresión de Runx2 (Fig. 2B) (Drissi y col., 2002). Por su parte, el grupo de Zambotti, caracterizó un elemento "enhancer" en el gen de ratón de Runx2 (CE1 del inglés Cbfa1 Element 1) de aproximadamente 40 pb, ubicado en la región distal del promotor (posición -415 a -375) y que confiere una actividad específica para osteoblastos, siendo además conservada en el promotor de Runx2 en ratón, rata y humano (Zambotti y col., 2002). Mediante estudios de mutagénesis se determinó que estos sitios son reconocidos por factores con actividad tipo NF-1 y AP1. El sitio de unión para NF1 actúa como represor en células no osteoblásticas mediante la unión de la isoforma NF1-A, la cual no está presente en osteoblastos. Por otra parte, el sitio de unión para AP1 contribuye a la activación del promotor P1 mediada por la unión de FosB a CE1 en células osteoblásticas. Al realizar un análisis de más de 100 factores de transcripción que podrían regular la actividad del promotor P1, se identificó también al factor HIF2A como un potente activador. Otros resultados obtenidos mediante la técnica de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP), determinaron que HIF2A se une al promotor, específicamente en la región ubicada entre -112 y -89 (Zambotti y col., 2002).

Snail1 es otro factor de transcripción que participa en la regulación de Runx2-II/p57. Snail1 se une a un sitio de interacción (E-Box) ubicado en la posición -74 del promotor P1 y regula negativamente la expresión de Runx2-II/p57. Se ha demostrado que Runx2 suprime el crecimiento de los osteoblastos, el cual es fundamental para el desarrollo normal del esqueleto (Liu y col., 2002). En consecuencia, en etapas intermedias de la diferenciación osteoblástica, Runx2 es reprimido para posteriormente ser expresado nuevamente ya que su presencia es necesaria para la diferenciación terminal hacia osteocitos y para la finalización del proceso de mineralización (Komori., 2010).

1.3 Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs).

Las proteínas morfogenéticas óseas BMPs, son polipéptidos secretados que pertenecen a la superfamilia de factores de señalización TGF- β . Estas proteínas son indispensables durante el desarrollo embrionario determinando la formación del eje dorsoventral, así como de diversas estructuras, entre las que se destacan corazón, riñón y tejido esquelético (Chen y cols., 2004).

Los BMPs se unen a receptores serina/treonina quinasa de tipo I y II en la superficie celular. El receptor tipo II se autofosforila y posteriormente fosforila al receptor tipo I. Este receptor a su vez activa proteínas Smad regulatorias intracelulares mediante fosforilación. Las proteínas activadas por BMPs son los factores Smad 1, 5 y 8. Luego de su activación, heterodimerizan con Smads

del tipo 4, para posteriormente translocar al núcleo y controlar la transcripción de diversos genes blanco de la vía mediante la interacción con elementos de respuesta presentes en los promotores de estos genes, así como también a través de su interacción con otras proteínas regulatorias (Fig. 3). Las Smads inhibitorias son las 6 y 7, las cuales se unen a receptores de tipo I y compiten con los Smads activadores (Chen y col., 2004; Feng y Deryunck., 2005).

En la diferenciación osteoblástica, se ha demostrado que BMP2 induce un aumento en la expresión de genes involucrados con este proceso de diferenciación como osteocalcina y fosfatasa alcalina (Nishimura y col., 1998). En la línea celular precursora mesenquimal C2C12, BMP2 inhibe la diferenciación miogénica y paralelamente induce un fenotipo osteoblástico característico (Katagiri y col.,1994; Yamamoto y col., 1997). En este mismo contexto, Barnejee y col., (2001) reportaron que BMP2 ejerce un control diferencial en la expresión de las isoformas de Runx2; estimulando específicamente la expresión de la isoforma Runx2-II/p57, mientras que la expresión de la isoforma Runx2-I/p56 permanece constante (Barnejee y col., 2001). Esta regulación ocurre de forma indirecta debido a la ausencia de elementos de respuesta consenso para las proteínas Smads en el promotor P1 de Runx2 (Lee y col., 2005).

Las proteínas Dlx3, Dlx5, Msx2 y Hoxa10, son proteínas con homodominios, que responden a la estimulación por BMP2 mediando los efectos de esta vía uniéndose directamente al promotor P1 (Hassan y col., 2007; Hassan y col.,

2006; Lee y col., 2003; Lee y col., 2005). Se ha observado que Dlx3 aumenta su expresión considerablemente dentro de las dos primeras horas de estimulación con BMP2 en células C2C12, mientras que la expresión de Dlx5 ocurre a las ocho horas. Ambas proteínas son reguladores positivos de la isoforma Runx2-II/p57 mientras que Msx2 ha sido identificado como un regulador negativo. Estas proteínas son reclutadas al promotor P1 en diferentes etapas de la diferenciación osteoblástica. En cultivos de osteoblastos primarios, se reportó que solo Msx2 se encuentra unido al promotor cuando las células están en proliferación, manteniendo de esta forma un nivel basal de expresión de la isoforma Runx2-II/p57. A medida que las células se diferencian mediante la estimulación por BMP2, Msx2 abandona el promotor permitiendo la unión de Dlx3, Dlx5 favoreciendo la transcripción de la isoforma IIP57 y promoviendo así la diferenciación osteoblástica (Hassan y col., 2006). En el promotor P1 de Runx2 existen tres sitios de unión para Dlx5, Dlx3 y Msx2. Los sitios A y B están sobrepuestos y localizados en -564 hasta -553; el sitio C se localiza de -364 hasta -361 y el sitio D proximal que está ubicado de -56 hasta -53. Tanto Dlx3 como Dlx5 se unen con la misma afinidad a los sitios A/B y C mientras que la unión de Dlx5 al sitio D es más fuerte que la de Dlx3 (Hassan y col., 2006).

Otro factor importante en la regulación de Runx2 y que también es inducido por BMP2, es Hoxa10. Hoxa10 regula positivamente a Runx2 por medio de su interacción directa con el promotor P1 a través de un sitio ubicado entre -353 y



-351, lo que conduce a una remodelación cromatínica en el promotor P1 que incluye, un aumento en los niveles de acetilación general de las histonas H3 y H4, así como un aumento en la trimetilación de la lisina 4 en la Histona H3 (H3K4Me3), marcas que se correlacionan con actividad transcripcional. Hoxa10 también activa otros genes osteoblásticos como fosfatasa alcalina, osteocalcina y sialoproteína ósea asociándose temporalmente a estos promotores, por lo que se le ha atribuido una función importante en la formación del tejido óseo (Hassan y col., 2007).

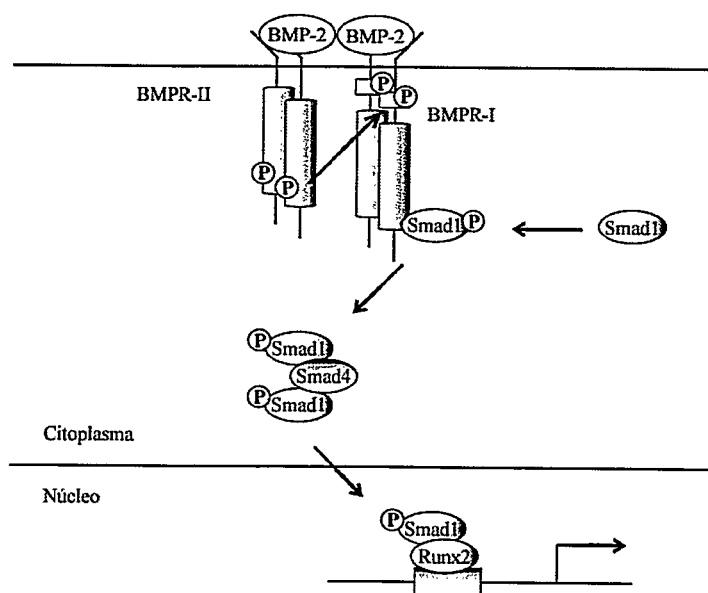


Figura 3. Vía de señalización de BMP-2. La señalización está mediada por la participación de receptores tipo I y II y sus moléculas corrientes abajo, representadas por Smad1, Smad 5 y 8 forman un complejo con Smad4 y son translocadas al núcleo donde interaccionan con otros factores de transcripción, como por ejemplo Runx2 (modificado de Chen y col, 2004).

1.4 Estructura de la cromatina.

En los eucariotas, el ADN se empaqueta asociándose con proteínas básicas denominadas histonas, constituyendo lo que se denomina la unidad fundamental de la cromatina, que es el nucleosoma. Cada nucleosoma está formado por un octámero de histonas que contiene dos subunidades de cada tipo (H2A, H2B, H3 y H4); sobre éste octámero se enrollan 147 pb de ADN, dando 1,7 vueltas aproximadamente (Kornberg y col, 1974; Luger y col., 1997). La cromatina se encuentra funcionalmente de varias formas: altamente condensada durante los procesos de mitosis y meiosis, y con distintos niveles de condensación en procesos de replicación activa, reparación del ADN y transcripción (Quina y col., 2006).

En los últimos años se ha demostrado que la cromatina puede regular procesos transcripcionales a través de combinaciones de modificaciones que remodelan su estructura (Cheng y Blumenthal, 2010). El término remodelación de cromatina es usado para describir un amplio rango de procesos bioquímicos que conducen a una estructura cromatínica reconfigurada, cambiando su accesibilidad a una variedad de elementos regulatorios (Hsieh y Fischer, 2005). De acuerdo con esto, existen varias formas en que la estructura de la cromatina puede ser remodelada:

1. La composición de los nucleosomas y su posicionamiento en el ADN pueden ser modificados por complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Hsieh y Fischer, 2005).

2. La metilación de citosinas por proteínas metiltransferasas de ADN puede proporcionar una marca estable y heredable, además de modular la estructura de la cromatina mediante el reclutamiento de complejos proteicos que se unen a ADN metilado y controlan la localización de los nucleosomas (Hsieh y Fischer, 2005; Clapier y Cairns, 2009; Rando y Chang, 2009).
3. Las modificaciones post-traduccionales de las colas de Histonas por enzimas acetiltransferasas y metiltransferasas pueden generar distintos estados de compactación de la cromatina y pueden reclutar una gran variedad de complejos de proteínas de unión a la cromatina que favorezcan o no la transcripción (Kouzarides., 2007).

Todos estos mecanismos también pueden actuar en concierto para definir un estado cromatínico más abierto o más cerrado, que temporalmente cambia la accesibilidad de la cromatina a reacciones enzimáticas específicas (Hsieh y Fischer, 2005; Rando y Chang, 2009). En este sentido, la forma más compacta de la cromatina se cree menos accesible por lo que constituye un pobre templado para la interacción de la ARN polimerasa durante el proceso de transcripción. De acuerdo con esto, los nucleosomas asociados con genes activos son más accesibles que los asociados con genes inactivos transcripcionalmente (Lee y Young, 2000; Segal y Widom, 2009).

1.4.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es la única modificación del ADN genéticamente programada en mamíferos. Esta modificación post-replicación, se localiza en la posición 5 del anillo de pirimidina de la citosina, en el contexto de la secuencia dinucleótido CpG (Caiafa y Zampieri, 2005; Tost, 2009).

Debido a su alta tasa de mutación, el dinucleótido CpG ha tendido a desaparecer durante la evolución. Sin embargo, a pesar de esto, a través del genoma se pueden encontrar algunos grupos de dinucleótidos CpG concentrados principalmente en las regiones promotoras, el primer exón e incluso hasta en el primer intrón de muchos genes. A estos grupos de CpGs, se les ha denominado isla CpG y a pesar de que el dinucleótido CpG es el mejor sustrato para las enzimas metiltransferasas de ADN; estas secuencias se encuentran esencialmente no metiladas contribuyendo al mantenimiento de la cromatina en un estado abierto y transcripcionalmente activo. Del mismo modo, la ausencia de metilación, les ha permitido a las islas CpG mantenerse conservadas a lo largo de la evolución, evitando sufrir mutaciones dependientes de desaminación (Dobosy y Selker, 2001; Caiafa y Zampieri, 2005; Tost, 2009).

Los parámetros que se utilizan para calificar a un grupo de dinucleótidos CpG, como isla CpG son: 1. Deben tener un tamaño mínimo de 500 pb; 2. Poseer un contenido de GC mayor al 50%. 3. Tener una razón de los dinucleótidos CpG observados versus los esperados, mayor a 0.6 (Caiafa y Zampieri, 2005).

En mamíferos, el metabolismo del carbono es el encargado de proporcionar el grupo metilo para todas las reacciones biológicas de metilación. Sin embargo, estas dependen de donadores de grupos metilo (Metionina y Colina) y de co-factores (Ácido Fólico, Vitamina B12 y Piridoxal Fosfato), para sintetizar el donador universal de metioninas, S-adenosil-L-metionina (SAM). Este durante la reacción de metilación, transfiere el grupo metilo a la citosina, liberando S-adenosil-homocisteina, que en altas concentraciones se comporta como un inhibidor de las enzimas que catalizan el proceso de metilación del ADN (Caiafa y Zampieri, 2005; Tost, 2009). Estas enzimas pertenecen a la familia de ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L). Con excepción de la DNMT2, que probablemente actúa como una ARN metiltransferasa *in vivo*, todas las DNMTs son esenciales para la viabilidad embrionaria (Caiafa y Zampieri, 2005; Siedlecki y Zielenkiewicz, 2006; Tost, 2009). La DNMT1 ha sido definida como una metiltransferasa de mantención, debido a que prefiere el ADN hemimetilado como sustrato y se localiza en la horquilla de replicación durante la fase S del ciclo celular, para metilar el ADN nuevamente sintetizado usando la hebra parental como templado. Consecuentemente, esta enzima es capaz de pasar la información epigenética a través de las generaciones celulares. Por otro lado, las enzimas DNMT3A, 3B y 3L son las encargadas de la metilación del ADN *de novo* (Dobosy y Selker, 2001; Caiafa y Zampieri, 2005; Tost, 2009).

Se ha propuesto que la metilación del ADN puede interferir con la transcripción de varias formas: Disminuyendo la flexibilidad del ADN y alterando el posicionamiento de los nucleosomas o inhibiendo la unión de los activadores transcripcionales a sus sitios de unión con el ADN (Segal y Widom, 2009). Esto último ocurriría mediante impedimento estérico producido por el ADN metilado ó por la unión de proteínas tales como MBD1-4 (proteína con dominio de unión al ADN metilado), MeCP2 (proteína de unión a CpG) y/o DNMTs, que impiden el acceso de los factores de transcripción y reclutan proteínas con funciones represivas, tales como HDACs y complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Dobosy y Selker, 2001; Tost, 2009).

1.4.2. Modificaciones covalentes de las histonas.

Las histonas son pequeñas proteínas básicas que están compuestas por un dominio globular que está en contacto directo con el ADN y por extensiones no globulares en el extremo N-terminal las cuales sobresalen desde el octámero nucleosomal. Estas extensiones son altamente conservadas en cuanto a secuencia, especialmente en algunos residuos básicos que están presentes a través de la evolución en una posición específica. Una característica importante de las histonas es que están sujetas a un gran número de modificaciones covalentes; las que incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación, entre otras (Marmostein, R., 2001).

La acetilación de histonas, en general, está asociada con activación génica. Por el contrario la metilación puede estar relacionada con estados activos o inactivos de expresión génica, dependiendo de cuál residuo esté siendo metilado (Zhang. X., 2012). Existen dos mecanismos bien caracterizados por los cuales las modificaciones covalentes de histonas ejercen su función. El primero es por medio de la alteración del contacto entre histonas ubicadas en nucleosomas adyacentes o entre histonas y la hebra de ADN. Y el segundo mecanismo, es mediante el reclutamiento de proteínas no histónicas que favorecen o no la transcripción mediante su actividad enzimática (actividad remodeladora en algunos casos) (Kouzarides., 2007; Li y col., 2007).

1.4.2.1 Acetilación de histonas

La acetilación de histonas es una modificación covalente que neutraliza la carga positiva del residuo de lisina, incrementando el grado de hidrofobicidad de las histonas, lo que conduce a reducir la afinidad de estos residuos N-terminales acetilados con el ADN (Henríquez y col., 2011). De esta manera se ha establecido que la acetilación promueve una conformación más abierta de la cromatina, favoreciendo el proceso de activación transcripcional mediante dos posibles mecanismos: el primero, permitiendo la unión de la maquinaria de transcripción y segundo, sirviendo como sitio de unión para factores que promueven la transcripción (Shahbazian y Grunstein., 2007).

Las proteínas encargadas de acetilar residuos de lisina son proteínas con actividad acetiltransferasa de histonas (HAT) y se agrupan en tres grandes familias: GNAT, MYST y CBP/P300. Algunas de estas enzimas poseen además un dominio de reconocimiento de histonas acetiladas, el cual se denomina bromodominio, que les permite ser reclutadas hacia las histonas acetiladas y mantener de esta forma los niveles de acetilación estables (Lee y col., 2007; Yang y col., 2008). Estas enzimas utilizan como grupo dador el grupo acetilo del Acetilcoenzima A (Lee y col., 2007). La acetilación es una modificación covalente reversible, siendo catalizada la remoción del grupo acetilo por enzimas con actividad HDAC ("Histone Deacetylases") (Kouzarides., 2007). Las HDACs promueven la represión transcripcional y se agrupan en cuatro clases: las de clase I, que agrupan las HDAC 1,2,3 y 8; las de clase II que reúnen las HDACs 4,5,6,7,9 y 10 ; las de clase IV, donde se agrupa la HDAC 11; y finalmente las de clase III, a la cual pertenecen las enzimas de la familia SIRT (SIRT1-7) (Poljak y col., 2014; Yang y col.,2003; Sengupta y col.,2004).

Las HDACs, al igual que las proteínas HATs, también funcionan como subunidades catalíticas de complejos multiproteicos, que son reclutados a los genes blanco, a través de la interacción con factores de transcripción específicos. Una característica importante es que algunas subunidades de estos complejos tienen la capacidad de unirse a la cromatina o remodelarla, lo cual provee una importante plataforma para coordinar funciones de acetilasas

con otros mecanismos de regulación de la estructura cromatínica (Yang y Seto, 2008). Uno de estos complejos, es el complejo NuRD, el cual contiene dentro de sus subunidades a la proteína de unión a ADN metilado MBD2, la que es capaz de reconocer y unirse al ADN metilado. Es por esta razón que se ha asociado a este tipo de complejos, con el silenciamiento transcripcional dependiente de la metilación del ADN (Yang y Seto, 2008).

1.4.2.2 Metilación de histonas

La metilación como modificación covalente no altera la carga del residuo, pero genera un cambio en el tamaño y la basicidad, lo que podría interferir con interacciones intra o intermoleculares dentro de una fibra cromatínica. Alternativamente puede crear nuevos sitios de unión para proteínas que reconocen específicamente a proteínas metiladas por medio de dominios denominados Cromodominio, PHD o Tudor, entre otros (Kouzarides., 2007).

La metilación puede ocurrir en residuos de lisina y arginina. Esta modificación es catalizada por proteínas con actividad histona-metiltransferasa (HMTs), que utilizan como dador de grupos metilo a la s-adenosilmetionina (SAM). Las histonas metiltransferasas de lisinas (KMT) median la metilación en el N-terminal de la histona H3, que puede ocurrir en los residuos K4, K9, K27, K36 y K79; y en el residuo K20 de la histona H4 (Tabla 1). Estos residuos pueden ser mono, di o trimetilados lo que le confiere diversidad funcional en cada sitio de

metilación (Figura 4 A) (Zhang., 2012; Dawson., 2012). La metilación en residuos de arginina (R) ha sido reportada en R2, R8, R17 y R26 de la histona H3; y en R3 de la histona H4. Las proteínas que catalizan estas modificaciones son denominadas metiltransferasas de arginina específicas, PRMTs (Tabla 2). Para este caso, los residuos pueden ser mono y dimetilados, simétrica o asimétricamente (Figura 4B) (Martin y col., 2006).

A pesar de que la metilación de histonas fue considerada por un largo tiempo, como un proceso estable e irreversible, en los últimos años se identificó la existencia de proteínas con la capacidad de remover este tipo de marcas. La primera demetilasa identificada fue LSD1 (histone lysine demethylase). LSD1 es un amino-oxidasa nuclear FAD-dependiente que puede demetilar residuos de K4 y K9 de la histona H3 mono o dimetilados. Posteriormente se identificó una gran familia de histona demetilasas que contenían un dominio llamado Jumonji C. Este tipo de proteínas median la demetilación oxidativa por ataque de radicales involucrando Fe (II) y dioxigenasas dependientes de α -acetoglutarato (Shi y col., 2006; Agger y col., 2008). Las proteínas lisina-demetiladas están clasificadas, de acuerdo a la nueva nomenclatura, en distintos grupos dependiendo de su dominio de interacción y la especificidad de su sustrato (Tabla 3) (Dawson., 2012).

Respecto a las demetilasas de argininas, hasta el momento, no hay enzimas reportadas que cumplan esta función. En el 2007 se había descrito a JMJD6 como histona demetilasa de la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la

histona H4 (Agger y col., 2008); sin embargo, este resultado es controversial ya que no ha sido reproducido por ningún otro grupo (Unoki., 2013). Además, recientemente se demostró que JMJD6 es responsable de mediar la 5-hidroxilación en residuos de lisina en las histonas H2A, H2B, H3 Y H4. Esta 5-hidroxilación en residuos de lisina inhibe la N-acetilación y la N-metilación por acetiltransferasas y metilasas, lo que le atribuiría una función importante en procesos de regulación de expresión génica (Unoki., 2013).

Familia	ENZIMA	Nombre Común	Sustrato
KMT1	KMT1A	SUV39H1	H3K9me3
	KMT1B	SUV39H2	H3K9me3
	KMT1C	G9a/EHMT2	H3K9me2 H3K27me2
	KMT1D	GLP/EHMT1	H3K9me2
	KMT1E	ESET/SETDB1	H3K9me3
	KMT1F	SETDB2	H3K9me3
KMT2	KMT2A	MLL	H3K4me3
	KMT2B	MLL2	H3K4me3
	KMT2C	MLL3	H3K4me3
	KMT2D	MLL4	H3K4me3
	KMT2E	MLL5	H3K4me3
	WDR5	WDR5	H3K4me3
	KMT2F	hSET1A	H3K4me3
	KMT2G	hSET1B	H3K4me3
	KMT2H	ASH2	H3K4me3
KMT3	KMT3A	SET2	H3K36me3
	KMT3B	NSD1	H3K36me2 H4K20me2
	KMT3C	SMYD2	H3K36me2 H3K4me
	KMT3D	SMYD1	H3K4me
	KMT3E	SMYD3	H3K4me3
KMT4	KMT4	DOT1L	H3K79me2/3
KMT5	KMT5A	SET8	H4K20me1
	KMT5B	SUV420H1	H4K20me3
	KMT5C	SUV420H2	H3K4me2/3
KMT6	KMT6A	EZH2	H3K27me3
	KMT6B	EZH1	H3K27me3
KMT7	KMT7	SET7/9	H3K4me1
KMT8	KMT8	PRDM2/RIZ1	H3K9me3

Tabla 1: Proteínas con actividad histona-metiltransferasas de lisinas, agrupadas según el residuo modificado y el grado de modificación (Modificado de Zhang., 2012).

GRADO DE METILACIÓN EN ARGININA	ENZIMA	SUSTRATO
MMA Monometilarginina	PRMT7	Histona H3 Histona H4
ADMA Dimetilación asimétrica	PRMT1 PRMT2 PRMT3 PRMT4 O CARM1	Histona H3 Histona H4
SDMA Dimetilación simétrica	PRMT5 PRMT7	Histona H3 Histona H4

Tabla 2: Proteínas histona-metiltransferasas de argininas, agrupadas según el tipo y grado de modificación (Modificado de Dhar., 2013).

Residuo Modificado	Familia	ENZIMA	Nombre Común	Sustrato
LISINA	KDM1	KDM1A	LSD1	H3K4me1/2 H3K9me1/2
		KDM1B	LSD2	H3K4me1/2 H3K9me1/2
	KDM2	KDM2A	JHDM1A	H3K36me1/2
		KDM2B	JHDM1B	H3K36me1/2
	KDM3	KDM3A	JHDM2A	H3K9me1/2
		KDM3B	JHDM2B	H3K9me1/2
	KDM4	KDM4A	JMJD2A	H3K9me2/3 H3K36me2/3
			KDM4B	JMJD2B
		KDM4C	JMJD2C	H3K9me2/3 H3K36me2/3
			KDM4D	JMJD2D
	KDM5	KDM5A	JARID1A	H3K4me2/3
			JARID1B	H3K4me2/3
			JARID1C	H3K4me2/3
			JARID1D	H3K4me2/3
	KDM6	KDM6A	UTX	H3K27me2/3
		KDM6B	JMJD3	H3K27me2/3
	KDM7	KDM7A	JHDM1D	H3K9me1/2 H3K27me1/2
KDM7B			PHF2	H3K9me1/2
KDM7C			PHF8	H3K9me1/2 H3K27me1/2 H4K20me1

Tabla 3: Proteínas con acción histona-demetilasas , agrupadas según el sustrato modificado (Modificado de de Zhang., 2012).

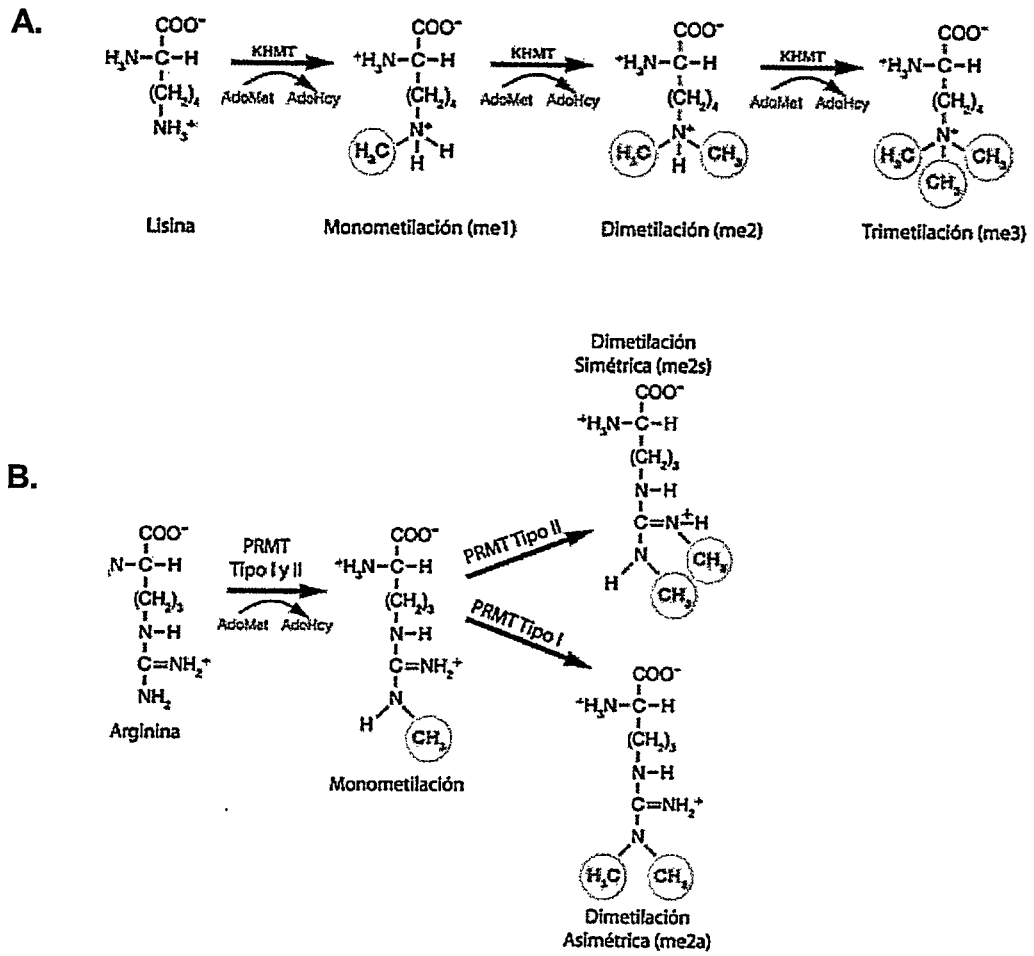


Figura 4. Modificaciones covalentes de las histonas. Estado de metilación de los residuos de lisina (A) y arginina (B). Modificado de Shilatifard., 2006.

1.5 Enzimas modificadoras de histonas.

1.5.1 Enzimas Metiltransferasas.

1.5.1.1 WDR5.

WDR5 es un gen inducido por BMP2 que codifica para una proteína con repeticiones WD en diversos tipos celulares (Gori y col., 2005). La cual forma parte de los seis complejos COMPASS existentes en mamíferos, que son ortólogos de los complejos COMPASS reportados en *Drosophila* y en levadura (Herz y col., 2012). Este complejo es responsable de mediar la trimetilación de la lisina 4 (H3K4Me3), modificación estrechamente asociada a actividad transcripcional de genes y que se encuentra enriquecida en regiones cercanas a los sitios de inicio de la transcripción (Ruthenburg y col., 2007).

Todos los complejos COMPASS se caracterizan por la presencia de las proteínas ASH2L, RBBP5 Y WDR5, las cuales pueden interaccionar con la proteína Set1 o con cuatro de las isoformas de la proteína MLL: MLL1, MLL2, MLL3 Y MLL4, constituyendo estas las subunidades catalíticas del complejo (Song., 2008; Shilatifard., 2012).

El rol de WDR5 en la esquelotogénesis de mamíferos fue primeramente evidenciado en ratones que sobreexpresaban la proteína, los cuales presentaron una aceleración del desarrollo óseo y aumento en el tamaño del húmero. La especificidad de la expresión de WDR5 se logró al poner este gen bajo el control de un segmento de 2.3 Kb del promotor del gen colágeno I α ,

que se ha demostrado que confiere expresión específica en células óseas (Gori y col., 2006).

En la diferenciación osteoblástica se ha observado que WDR5 se encuentra unida a promotores de genes blanco de la vía Wnt canónica, incluyendo al promotor P1 de Runx2 cuya expresión disminuye en ausencia de WDR5. De igual manera se observó una disminución en los niveles de histona H3 trimetilada en K4 en líneas celulares preosteoblásticas MC3T3 silenciadas para esta proteína con siRNA (Zhu y Col.; 2008). En conjunto estos antecedentes indican que la H3K4Me3 es una modificación importante en el control de la expresión de genes osteoblásticos como Runx2 y del proceso de diferenciación ósea.

1.5.1.2 EZH2

EZH2 es una proteína con acción metiltransferasa, miembro del complejo Polycomb (Aziz y col., 2010), la cual participa en la trimetilación de los residuos de K27 de la histona H3. Las proteínas pertenecientes a los complejos Polycomb han sido descritas como reguladores antagónicos importantes en eventos de diferenciación, proliferación celular, inactivación del cromosoma X y cáncer (Aziz y col., 2010, Schuettengrueber y col., 2007). En ratones se han descrito dos enzimas miembro del complejo Polycomb: las enzimas EZH1 y EZH2 (Dambacher y col., 2010). **EZH2**, junto con SUZ12 y Eed, conforman la base del complejo represor Polycomb 2 (PRC2), el cual es reclutado a la

cromatina donde la metiltransferasa EZH2 cataliza la H3K27Me3. Esta marca represiva sirve como plataforma para reclutar a un segundo complejo represor Polycomb, denominado PRC1, el cual estabiliza la represión por compactación de la cromatina o interfiere directamente con la maquinaria transcripcional básica. Se ha evidenciado que sin la actividad de EZH2, PRC1 no puede ser reclutado a la cromatina y la represión mediada por el complejo Polycomb no sucede (Cao y col., 2002; Rastelli y col., 1993).

Estudios previos han reportado que EZH2 está involucrada en controlar la expresión de genes musculares y en consecuencia participa activamente en el evento de diferenciación miogénica (Caretto y col., 2004). En dichos estudios se demostró que la sobre expresión de EZH2 inhibe la diferenciación muscular, a través de su dominio SET, requerido para la actividad metiltransferasa. En mioblastos indiferenciados, se encontró que EZH2 está asociado con el regulador transcripcional YY1 y que ambos se unen a la deacetilasa HDAC1 en regiones que incluyen genes musculares silenciados transcripcionalmente y que muestran una alta metilación de H3K27. Cuando ocurre el evento de diferenciación muscular se observa que la interacción de EZH2, HDAC1 y YY1 no ocurre y que los niveles de trimetilación de H3K27 disminuyen (Caretto y col., 2004).

1.5.1.3 PRMT5.

La proteína **PRMT5**, es una arginina metiltransferasa de tipo II que cataliza la dimetilación de residuos de arginina 2 y 3 en la histona H4 y de la arginina 8 de la histona H3 (Zhao y col., 2009; Dackwag y col., 2007). En consecuencia dependiendo del residuo metilado la función de PRMT5 puede estar relacionada con eventos de activación o de represión transcripcional. En particular la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (H4R3Me2s) está asociada a represión transcripcional (Pal y Sif., 2007).

En estudios realizados utilizando el locus del gen de β -globina como modelo se demostró que H4R3Me2s es una modificación represora que recluta enzimas involucradas con la metilación del ADN en este promotor (Q. Zhao y col., 2009). En particular en este trabajo se encontró que H4R3Me2s sirve como un sitio de unión directa para la DNMT3A (metiltransferasa de ADN *de novo*). La baja en los niveles de H4R3Me2s a través del silenciamiento de PRMT5 causó una disminución en la unión de DNMT3A al promotor de β -globina, una pérdida en la metilación del ADN y en consecuencia la activación del gen (Q. Zhao y col., 2009). De otra parte, se han reportado casos en los cuales PRMT5 puede actuar como activador debido a su interacción con coactivadores transcripcionales de la familia p160 (Dackwag y col., 2007). También se ha reportado que PRMT5 se encuentra asociada a complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes de tipo SWI/SNF, donde es responsable de la metilación de H3R8 (modificación asociada a activación transcripcional) y es

requerido en estadios tempranos de la diferenciación muscular. Estos estudios realizados en una línea celular NIH3T3 que constitutivamente expresan un vector antisentido para PRMT5, permitieron establecer que ésta enzima es requerida para la diferenciación mediada por el factor de transcripción MyoD. Se demostró la unión de PRMT5 al promotor de miogenina (gen blanco de MyoD) y un aumento en la dimetilación de la H3R8, en células diferenciadas. También se reportó que la unión de PRMT5 es requerida para la asociación de la proteína BRG1, la subunidad catalítica del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF; lo que conlleva a la activación de la expresión de miogenina. De esta manera células que tenían niveles reducidos de PRMT5 no lograban activar la expresión de miogenina y de otros genes miogénicos tardíos, provocando un bloqueo en el proceso de diferenciación (Dackwag y col., 2007, Dackwag y col., 2009).

PRMT5 en el núcleo puede formar complejo con la proteína **COPR5** (proteína cooperadora de PRMT5) e inducir la metilación preferencial de residuos de R3 sobre los residuos de R8 de la histona H4. Esto indica que COPR5 modula la especificidad del sustrato de PRMT5 (Lacroix., 2008). En este mismo trabajo se describió que COPR5, adicionalmente, posee un dominio que le permite unirse específicamente al extremo N-terminal de la histona H4. De esta manera actúa como una proteína adaptadora entre la cromatina y el complejo nuclear PRMT5.

La función cooperadora de COPR5 fue confirmada en líneas celulares de osteosarcoma humano, en las que usando shRNA (*short hairpin RNA*) para COPR5 se observó una reducción en el reclutamiento de PRMT5 a la región promotora del gen de la ciclina E1 (CCNE1), acompañada de una disminución de la H4R3Me2s (Lacroix., 2008).

1.5.2 Enzimas Demetiladas de histonas.

1.5.2.1 NO66.

NO66 es una proteína con dominio jumonji C que se caracterizó inicialmente debido a su interacción directa con el factor de transcripción osteoblástico osterix (Osx) e inhibe la activación de genes blanco de este factor (Shina y col., 2010). El knockdown de NO66 en preosteoblastos provoca una diferenciación acelerada hacia la diferenciación osteoblástica (Shina y col., 2010). Se ha establecido una función demetilasa de NO66 para residuos de lisina 4 y 36 de la histona H3; H3K4me3 y H3K36me3 (Sinha y cols.,2010). Por otra parte, mediante ensayos de inmunohistoquímica en secciones de tejido esquelético de embriones de ratón de 14.5 días, se confirmó la presencia de NO66 en huesos en desarrollo (Shina y col., 2010). En el mismo estudio, en células C2C12 que sobreexpresaban NO66 y estimuladas con BMP-2, se demostró que NO66 inhibe la expresión de genes específicos de osteoblastos como osteocalcina. De otra parte, mediante experimentos de ChIP en células preosteoblásticas MC3T3, tratadas con BMP2, se evaluó la asociación de

NO66 y los niveles de trimetilación en los residuos de lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) a la región promotora del gen de sialoproteína ósea (Bsp); observándose un incremento en los niveles de H3K4me3, en paralelo con el decrecimiento de NO66 en las células MC3T3 estimuladas con BMP2 (Sinha y col.,2010).

Recientemente utilizando ratones *knockout* para Osterix, se demostró que la función represora mediada por NO66 en el promotor de sialoproteína ósea (Bsp), ocurre mediante la demetilación de histonas y mediante la formación de complejos represores con otras proteínas modificadoras de histonas y con proteínas involucradas en la metilación del ADN (Shina y col., 2013). Específicamente, en este trabajo se reportó que NO66, además de interactuar con Osx, también forma complejos con DNMT1A , HDAC1 y HP1. **HP1** es una proteína que interactúa con DNMT1 in vivo e in vitro y que se ha demostrado que induce la actividad de DNMT1, provocando un incremento en la metilación del ADN (Shina y col., 2013). De esta manera los autores plantean que el promotor de Bsp es metilado previamente a la activación del gen en osteoblastos y que en este evento la participación de NO66 es fundamental por sus funciones como enzima demetilasa y por su capacidad de interactuar con HP1, DNMT1 Y HDAC1 (Shina y col., 2013).

1.5.2.2 JARID 1B

La proteína JARID 1B es una histona demetilasa con dominio jumonji, miembro del cluster JARID1 ó KDM5. Estas enzimas funcionan como represores transcripcionales a través de la remoción de grupos metilo en residuos de lisina 4 trimetilados de la histona 3 (H3K4me3) (Volkel y col., 2007).

Se ha reportado que **JARID1B** o PLU1, cumple un papel importante en la mantención de la capacidad proliferativa de células de varios tipos de cáncer (testicular, mamario y melanoma entre otros) a través de la represión de genes supresores de tumores, incluyendo a BRCA1 Y CAV1 (Verrier y col., 2011; Volkel., y col., 2007; Iwase y col., 2007; Yamane y col., 2007). La participación de JARID1B en la progresión tumoral está relacionada con su función como enzima demetilasa de una marca activadora y con su capacidad de formar complejos con otras proteínas que median modificaciones represivas. Por ejemplo en líneas celulares de cáncer mamario se ha demostrado que JARID 1B actúa como represor transcripcional mediante su interacción con complejos represores como enzimas HDAC de clase I y II (Tan y col., 2003). De otra parte, también se ha demostrado que JARID 1B interactúa con las proteínas G9a (Enzima metiltransferasa de H3K9), EZH2 (Enzima metiltransferasa de H3K27) y con la oncoproteína con dedos de zinc ZNF217 mediando la represión de genes supresores de tumores en varios tipos de cáncer (Banck y col., 2009).

Otros estudios han posicionado a JARID1B como represor de genes que se expresan durante el desarrollo. Para este caso se ha descrito que JARID1B se une a factores de transcripción del desarrollo como BF1 (Brain factor 1) y PAX9 (Paired box 9), los cuales interactúan con miembros de la familia corepresora Groucho y los reclutan hacia sus genes blanco (Tan y col.; 2003).

1.5.2.3 UTX

UTX es una proteína con actividad histona demetilasa de lisinas pertenecientes al grupo UTX/JMJD3 que demetila específicamente H3K27Me3/Me2 (Volkel y cols., 2007). Estudios de demetilación in vitro han demostrado la habilidad de UTX para convertir los residuos de lisina 27 de la histona H3K27 de un estado trimetilado a uno no metilado (Agger y col., 2007; Lan y col., 2007).

UTX forma parte de diferentes complejos multiproteicos. Por ejemplo se ha descrito que puede formar parte del complejo COMPASS/Trr, interactuando directamente con las proteínas MLL3, PTIP, ASC2, ASH2 y WDR5 (Issaeva y col., 2007). Otros estudios la han identificado formando parte de un complejo metiltransferasa perteneciente a la misma familia COMPASS/Trr, el cual contiene WDR5, MLL4 y PTIP (Eisenberg., 2010; Patel., 2007). La existencia de estos complejos sugiere la posibilidad de un mecanismo concertado entre enzimas modificadoras de dos marcas específicas la H3K4Me3 y la H3K27Me3. Para este caso específico la activación transcripcional mediada por

estos complejos, estaría relacionada con mantener los niveles de H3K4Me3 altos (marca asociada con activación transcripcional) a través de la acción de las proteínas WDR5, MLL2, MLL3 y MLL4; y a su vez mantener los niveles de la H3K27Me3 bajos mediante la acción de UTX (marca asociada a represión transcripcional).

En células neuronales, NT2/D1 estimuladas con ácido retinoico, se ha descrito que UTX es reclutado a los promotores de los genes homeóticos HOXA y HOXB. Este reclutamiento se correlaciona con la pérdida de H3K27Me3, la disociación de las enzimas SUZ12 y EZH2 en los promotores blanco y con la consiguiente activación de los genes (Agger y col., 2007).

En *Drosophila*, UTX puede formar complejos con miembros de la familia Trr participando así en el control de crecimiento celular, ya que el complejo "Trr/COMPASS-like" interactúa funcionalmente con las vías de señalización Notch y Rbf (Herz y col., 2010). Recientemente se ha demostrado que en el proceso de diferenciación muscular, el transactivador Six 4 es capaz de reclutar a UTX hacia la región regulatoria de genes musculares, como es el caso de miogenina y la quinasa CKm (Creatine kinase, muscle), provocando la pérdida de la marca H3K27me3 en la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción y la activación transcripcional de estos genes (Seenundun y col., 2010).

1.5.2.4. JMJD6.

JMJD6 es una proteína con dominio jumonji C identificada como la primera demetilasa de argininas (Chang y col., 2007). Sin embargo, recientemente se demostró que esta enzima no tiene ésta función demetilasa y que más bien participa en la regulación génica como una hidroxilasa de lisinas; mediando específicamente la 5 hidroxilación en las histonas H3 y H4 (Unoki y Col., 2013). Se ha establecido que esta hidroxilación inhibe posteriores eventos de acetilación y metilación y, como consecuencia se le asignó una participación importante en la regulación de la expresión génica (Unoki y Col., 2013).

1.6. Regulación epigenética del gen Runx2 en células óseas.

En el control de la diferenciación osteoblástica, se ha reportado la participación de proteínas con actividad deacetilasas de histonas y metiltransferasas. En el año 2006, Gori y col, reportaron que WDR5 participa en la diferenciación osteoblástica y que su sobreexpresión acelera este evento de diferenciación en la línea celular preosteoblástica MC3T3. Estudios posteriores, mediante ensayos de silenciamiento génico (siRNA), demostraron que la expresión de Runx2 disminuye significativamente cuando la expresión de WDR5 disminuye por efecto del silenciamiento. Este fenómeno ocurrió en paralelo con una baja significativa en los niveles de H3K4Me3 (Zhu y col., 2008). Lo anterior sugiere

una contribución relevante de H3K4Me3 en el mecanismo de control de la expresión de genes osteoblásticos y en el proceso de diferenciación ósea.

En estudios realizados en nuestro laboratorio, en la línea celular mioblástica de ratón C2C12, se determinó la existencia de secuencias reguladoras en el promotor P1 del gen Runx2, contenidas dentro de dos sitios hipersensibles a la digestión con DNAsa I, los que son aumentados por estimulación con BMP2 (Cruzat y col., 2009), en paralelo a un aumento en la transcripción de Runx2-*II/p57*. En este mismo trabajo se estableció que esta remodelación de la cromatina en la región promotora P1, es independiente de la actividad de complejos tipo SWI/SNF y se reportó un aumento en los niveles globales de acetilación de las histonas H3 y H4. Este aumento en acetilación se corresponde con la unión de p300 (una enzima con acción acetiltransferasa) al promotor P1. En base a estos y otros resultados nuestro grupo ha propuesto la existencia de mecanismos epigenéticos en la regulación transcripcional de Runx2, específicamente, modificaciones covalentes de las histonas H3 y H4 presentes en el promotor P1 (Cruzat y col., 2009).

Dicha propuesta ha sido explorada posteriormente en nuestro laboratorio demostrando que existe un patrón específico de modificaciones postraduccionales en las histonas H3 y H4 asociadas a la región promotora proximal P1. En células que expresan Runx2, estas marcas epigenéticas incluyen un aumento en la acetilación de la histona H3 en el residuo de lisina 9 (H3K9) y en la trimetilación en H3K4. En contraste, en células que no expresan

este gen, se encontraron mono, di y trimetilación de H3K9, monometilación de H3K4, trimetilación de H3K27, así como también aumento de la acetilación de la histona H4, específicamente en el residuo de lisina 12 (K12) y dimetilación simétrica de H4R3 (Ver resumen en figura 5). Esto también fue observado en células osteoblásticas primarias diferenciadas *ex vivo* y en la línea celular mesenquimal pluripotencial C3H10T1/2 estimulada con BMP2 (Henriquez., 2009; Tesis Doctoral). En esta tesis nos enfocamos en evaluar la participación de proteínas metilasas y demetilasas involucradas con tres de estas modificaciones reportadas. Una asociada a activación transcripcional, como H3K4Me3 y dos asociadas a represión transcripcional, como H3K27Me3 y H4R3Me2(s).

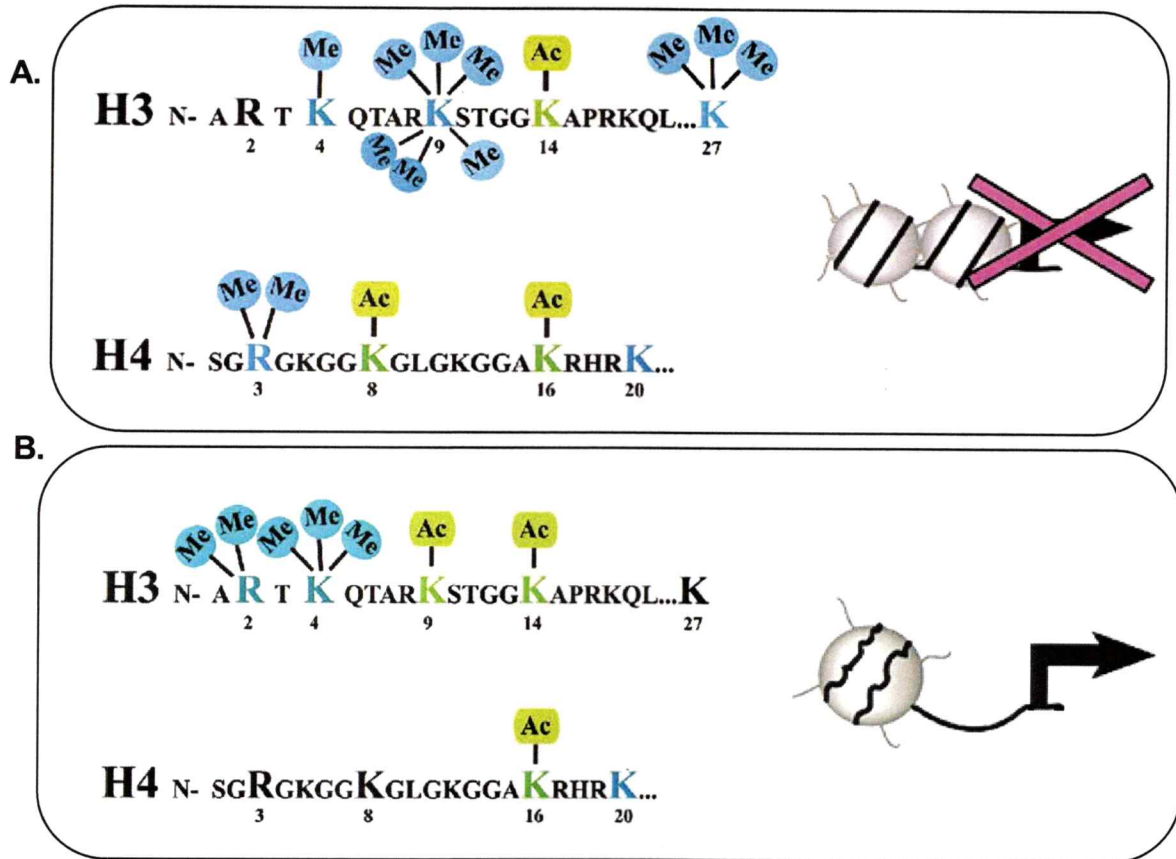


Figura 5. Modelo de control transcripcional del promotor P1 del gen Runx2 por mecanismos epigenéticos durante la diferenciación osteoblástica. En la Figura se muestran los residuos aminoacídicos de las regiones N-terminal de las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2 y sus modificaciones covalentes. Bajo cada residuo se identifica su posición en la estructura, destacándose los residuos de lisina y arginina que presentan modificaciones covalentes. Los círculos azules con el símbolo Me, indican metilación, mientras que los cuadrados verdes son el símbolo Ac, acetilación. **A.** Células que no expresan Runx2-II/p57. **B.** Células que expresan Runx2-II/p57 (Henriquez., 2009).

1.7 HIPOTESIS.

Basados en los antecedentes anteriormente expuestos postulamos la siguiente hipótesis y objetivos para esta tesis:

“Enzimas involucradas en modificaciones covalentes en residuos de lisina y arginina de las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, específicamente las metilasas **WDR5, EZH2 y PRMT5** y las demetilasas **NO66, UTX y JMJD6**, son fundamentales para la regulación de la expresión de este gen en células osteoblásticas”.

1.8 OBJETIVOS.

1.8.1 Objetivo General.

Demostrar la contribución de las metilasas WDR5, EZH2 y PRMT5 y demetilasas NO66, UTX y JMJD6; en la actividad transcripcional del gen Runx2 en células osteoblásticas, como enzimas responsables de las modificaciones covalentes para los residuos de lisina 4 y 27 de la histona H3 y arginina 3 de la histona H4, asociadas al promotor P1 de Runx2.

1.8.2 Objetivos Específicos

1.8.2.1 Evaluar la contribución de la metiltransferasa WDR5 y la demetilasa NO66 en la metilación y demetilación del residuo K4 de la histona H3 asociada al promotor P1 de Runx2.

1.8.2.2 Evaluar la contribución de la metiltransferasa EZH2 y la demetilasa UTX en la metilación y demetilación del residuo K27 de la histona H3 asociada al promotor P1 del gen Runx2.

1.8.2.3 Evaluar la contribución de las enzimas PRMT5 y JMJD6, como metilasa y demetilasa, respectivamente, sobre los niveles de metilación en el residuo R3 de la histona H4 asociada al promotor P1 del gen Runx2.

1.8.2.4 Evaluar la contribución de las metilasas y demetilosas señaladas anteriormente, en la regulación de la actividad transcripcional del gen Runx2 en células óseas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Líneas Celulares.

2.1.1 Cultivo de células mioblásticas de ratón, C2C12.

La línea celular C2C12 es una línea celular pluripotencial mesenquimal de ratón que puede diferenciarse a osteoblastos cuando es estimulada por el morfógeno BMP2, con la consecuente expresión de marcadores de diferenciación terminal osteoblástica como osteocalcina y Runx2 (Shea y cols., 2003); También puede diferenciarse a mioblastos bajo el estímulo con suero de caballo (De la Serna y cols., 2001). Para el desarrollo de esta tesis, se han usado células sometidas a los dos estímulos con el fin de obtener diferenciación osteogénica y miogénica. Para el primer caso, esta línea celular fué cultivada en medio DMEM 10%SFB y en estado de preconfluencia (tiempo cero) fue estimulada con BMP2 por periodos de 24, 48 y 72 horas, utilizando una concentración de 300ng/ml (Shea y col., 2003). Para la diferenciación miogénica, células C2C12 fueron cultivadas en medio DMEM, 10%SFB hasta alcanzar preconfluencia. Posteriormente estas células fueron cambiadas a medio DMEM con 5% de suero de caballo (HS) y cultivadas 48 y 96 horas

(Imbalzano y col., 2001). Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C en un ambiente de 95% de O₂ y 5 % CO₂.

2.1.2. Cultivo de células preosteoblásticas de ratón, MC3T3.

Las células pre-osteoblásticas de ratón MC3T3, fueron cultivadas para mantención en medio α -MEM sin ácido ascórbico, suplementado con 2,29 g/L de NaHCO₃ y 10 % suero fetal de bovino (Hyclone) y fueron subcultivadas cada tres días a una relación 1:6, utilizando TripSina-EDTA al 0,05 % (GIBCO). Para los experimentos de diferenciación, las células fueron traspasadas a medio de cultivo suplementado con ácido áscorbico (50 μ g/ml), a partir del tercer día (una vez que alcanzaron confluencia), el cual fue renovado cada dos días. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medios suplementados con 50 U/ml de penicilina-estreptomina (GIBCO), a 37°C en atmosfera húmeda con un 5% de CO₂.

2.1.3 Cultivo de Osteoblastos primarios de rata.

La obtención de osteoblastos primarios de rata se realizó según lo descrito por Owen y col (1990). Ratas Sprague Dawley de 20 días de preñez, se sacrificaron mediante anestesia con CO₂. Posteriormente el vientre de la rata se abrió quirúrgicamente con bisturí estéril utilizando la técnica de incisión tipo C. Las ratas nonatas, fueron colocadas en una placa y sacrificadas rápidamente por decapitación con tijera quirúrgica, todo bajo ambiente estéril

en cámara de flujo laminar. A continuación, la piel de la cabeza fue retirada con pinzas y tijeras para luego cortar la base del cráneo alrededor de los huesos de la calvaria. Obtenida la calvaria, se separó del material encefálico y se depositó en una placa con medio α MEM (GIBCO) sin suero y PBS 1X en proporción 1:1 suplementado con 100U/ml de penicilina-estreptomicina (Hyclone). Las piezas óseas se limpiaron del tejido fibroso, restos de piel y sangre, se traspasaron a una placa con PBS 1X suplementada con antibióticos y se cortaron en trozos pequeños, eliminando completamente las líneas de sutura. Todas las piezas se colocaron en un matraz con tapa, para realizar digestiones sucesivas. Por cada 20 cráneos se preparó una solución de 2.5mg/ml de tripsina (1:250 GIBCO) Y 2mg/ml de collagenasa P (Boheringer Mannheim) en PBS 1X, suplementada con antibióticos. Se realizaron 3 digestiones sucesivas con 10ml de solución de digestión a 37°C: **1.** 8 minutos. Sin agitación; **2.** 10 minutos, con agitación a 25rpm; **3.** 35 minutos a 60rpm. Finalizada cada digestión, el sobrenadante con las células liberadas del tejido óseo, fue filtrado en filtro de metal Swinnex 13mm (Millipore) y un filtro de propileno Swinnex de 25mm (Millipore). Las células fueron recuperadas en un tubo de 15ml y centrifugadas a 500g durante 5 minutos; resuspendidas en medio α MEM suplementado con 10% suero fetal bovino, cuantificadas en cámara Neubauer y sembradas en placas de 100mm. En cada placa de 100mm se sembraron 5×10^5 células y por cada placa de 35mm, 2×10^5 . Cuando los cultivos alcanzaron un 60% de confluencia, fueron tratados con tripsina+EDTA. Las células fueron sedimentadas mediante

centrifugación y cuantificadas en cámara de Neubaer y sembradas en placas de 100mm para los experimentos de silenciamiento o sobreexpresión. Las células fueron mantenidas en los siguientes medios de cultivo: del día 1 al 4, en medio de cultivo α MEM suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), del día 5 al día 9, en medio α MEM 10%SFB, 24ug/ml de ácido ascórbico y del día 10 en adelante, en medio BGjb (GIBCO) suplementado con 10%SFB, 50ug/ml de ácido ascórbico y 10mM de β -glicerolfosfato.

2.1.4 Cultivo de células HEK293.

Células HEK293FT generadas a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano fueron crecidas en medio DMEM (Hyclone SH30081.02) suplementado con 10% suero fetal bovino (Hyclone SH30070.01), 4 mM L-glutamina (Life technologies 25030-081), 100 U/ml penicilina/estreptomicina (Life Technologies 15070-063) y 1 mM piruvato (Sigma), a 37°C y 5% CO₂.

2.2. Aislamiento de ARN y RT-PCR.

Para determinar la expresión de genes asociados al fenotipo óseo en los distintos tipos celulares, se realizaron ensayos de RT-PCR para los ARNm de Runx2 y de marcadores de diferenciación osteoblástica como fosfatasa alcalina y osteocalcina. Para el caso de la línea celular C2C12, estas determinaciones

se realizaron en presencia y ausencia del estímulo con BMP2 y suero de caballo independientemente; mientras que para la línea celular MC3T3, se realizaron en los días 3, 5, 7 y 9 de cultivo.

Usando la misma metodología y partidores específicos (Anexo), se evaluó la expresión, a nivel de transcrito, de proteínas con actividad metilasa y demetilasa de las histonas H3 y H4. Específicamente, las metilasas WDR5, EZH2, PRMT5, COPR5 y demetilasas NO66, JARID 1B, UTX, y JMJD6.

Para todos los ensayos de RT-PCR, se aisló ARN desde células crecidas en placas de 35 mm. La extracción del ARN se realizó utilizando el agente TRIZOL (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido fue resuspendido en 12 μ l de agua libre de nucleasas filtrada a 0.2 micras. Se cuantificó, congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C .

Los ensayos de RT-PCR fueron realizados utilizando 2 μ g de ARN total y "kit" de transcripción reversa de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue mezclada con 0.25 μ g de oligo dT (Bursat y col.)¹²⁻¹⁸ (Invitrogen) en un volumen de 10 μ l. Luego, fue denaturada a 70°C por 5 minutos y rápidamente transferida a 4°C por 5 minutos. A continuación, se realizó la mezcla de transcriptasa reversa (RT) en un volumen total de 20 μ l (incluidos los 10 μ l de ARN denaturado) en presencia de 100 U de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), buffer M-MLVRT (Promega) 1X, 20 U de "RNase Inhibitor" (NEW ENGLAND BioLabs) y 0.5 mM de dNTPs (Invitrogen).

La mezcla fue incubada a 37°C por 1 hora y se detuvo la reacción a 4°C para luego diluirla 5 veces con agua libre de nucleasas.

La concentración de ADN y ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando como factor de conversión $1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ y $1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$, para ADN y ARN, respectivamente. La pureza del ADN se determinó obteniendo la razón $A_{260/280}$.

Luego de la obtención del ARN y de su posterior cuantificación se sintetizaron los correspondientes ADNc y se realizaron las reacciones de amplificación mediante PCR convencional y las respectivas cuantificaciones en PCR en tiempo real.

Los ADNc resultantes fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real, utilizando 5 μl de muestra en un volumen final de reacción de 20 μl .

2.3. PCR en tiempo real.

Para cuantificar la cromatina inmunoprecipitada y los cambios en los niveles de ARNm producidos en los diferentes ensayos, las muestras fueron analizadas por la técnica de PCR en tiempo real. Esta técnica permite cuantificar los productos de amplificación obtenidos en una reacción de PCR, a través de su comparación con una curva estándar y su normalización contra un producto de amplificación constante.

Mediante la utilización del reactivo SYBR Green I, el cual emite fluorescencia cuando se une al ADN doble hebra, se pueden detectar los productos de amplificación por PCR en el mismo instante en que son producidos. Esto permite, obtener curvas de producto de amplificación vs los ciclos de amplificación. Si se considera que en la fase inicial de las curvas, la cantidad de producto de PCR, es directamente proporcional al templado original, se puede determinar, la cantidad de templado que había en cada muestra originalmente. Si estos valores, se contraponen a los valores obtenidos con productos de amplificación de un gen o región del genoma que no sufre cambios en nuestro ensayo, se obtienen valores reales de los niveles de templado en cada muestra.

Todas las mediciones fueron realizadas utilizando el "kit" para PCR en tiempo real "Brilliant®SYBR® Green QPCR Core Reagent Kit" de STRATAGENE y un termociclador para PCR en tiempo real Mx3000P de STRATAGENE.

En todos los casos, las condiciones de PCR fueron ajustadas para que los partidores utilizados tuvieran la misma eficiencia, cercana al 100 %. Esta eficiencia fue determinada en cada condición y en cada tipo celular ensayado.

Los resultados de las determinaciones de niveles de ARNm fueron expresados como expresión relativa con respecto a un control, a través de la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Los resultados de las cuantificaciones de la cromatina inmunoprecipitada fueron expresados como % del input, determinados a partir de las curvas de calibración.

2.4 Preparación de extractos nucleares a partir de células en cultivo.

Extractos nucleares de C2C12, MC3T3 y ROBs se obtuvieron por el método de Dignam con algunas modificaciones (Dignam y cols., 1983). Las células se cultivaron en placas de 100, 60 o 35 mm de diámetro hasta confluencia. Posteriormente, estas fueron lavadas con PBS 1X a 4°C; se rasparon con espátula estéril y se colectaron en PBS frío suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. La suspensión celular fue centrifugada a 400g por 5 minutos a 4°C. El *pellet* celular obtenido se resuspendió en 5 volúmenes de tampón hipotónico A (10mM KCl, 10mM HEPES Ph 7.9, 1.5mM MgCl₂ y 1mM DTT), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y se incubó durante 10 minutos. Luego, la suspensión celular se liso mecánicamente a 4°C, utilizando un homogenizador de plástico, en el mismo tampón. La liberación e integridad de los núcleos se verificó por microscopía óptica observando los núcleos teñidos con azul de Tripán. El homogenizado celular se centrifugó a 800g durante 15 minutos a 4°C. El *pellet* nuclear se resuspendió en un tampón hipertónico C (420mM NaCl, 25% glicerol, 0,2 mM EDTA, 1mM DTT, 20 mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl₂) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas, y se incubó en un rotador continuo durante 60 minutos a 4°C. Se

centrifugó a 12000rpm durante 15 minutos a 4°C, tras lo cual la fracción soluble (extracto nuclear) se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta su utilización. Los extractos nucleares fueron cuantificados mediante el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, BIO-RAD) comparando contra una curva de calibración realizada con BSA.

2.5. Electroforesis de proteínas.

Las proteínas provenientes de los extractos nucleares se denaturaron en "buffer" de carga (50 mM Trizma·Cl pH 6,8, 1 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida (29:1)/SDS al 6% para visualizar proteínas mayores a 200 KDa y al 10% y 12% para proteínas menores a 200 KDa. La electroforesis se llevó a cabo a 150 V, en buffer de corrida (25 mM Trizma·Cl, 250 mM glicina, 0,1% SDS) y en una minicámara (Mini PROTEAN 3 System, BIO-RAD).

2.6. Western blot.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, BIO-RAD) en "buffer" de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Trizma.Cl, 0,037% SDS, 20% metanol) a 250 mA, durante 2 a 2,5 horas. Luego de lavar con PBS, se bloquearon los

sitios de unión inespecíficos, utilizando una solución de PBS/Tween 20 al 0.05% y leche descremada al 5%. Luego, la membrana se incubó con anticuerpo primario (ver anexos) en solución PBS/Tween 20 al 0.05% y leche descremada al 5%, por 16 horas a 4°C. Luego de lavar con PBS-Tween 20 0,05%, 3 veces durante 10 minutos cada vez, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario, dirigido contra el primer anticuerpo y acoplado a peroxidasa de rábano picante (Diarra-Mehrpour y col.) en solución PBS/Tween 20 al 0.05% y leche descremada al 5%, a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego de lavar con PBS-Tween 20 al 0,05%, 3 veces durante 10 minutos cada vez, la detección se llevó a cabo con reactivos para quimioluminiscencia ("Western blot plus chemiluminescence reagent", NEN LIFE SCIENCE) y se expuso a una placa de rayos X (BIOMAX XAR, KODAK) a temperatura ambiente.

2.7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Esta técnica permite conocer si una proteína se encuentra asociada a una región particular de un gen *in vivo*. La técnica consiste, en tratar células en cultivo con un agente entrecruzador (Formaldehído 4%, FA) que permite unir covalentemente proteínas asociadas y proteínas unidas al ADN. El entrecruzamiento se detuvo utilizando glicina 0.125M y se lavaron los extractos 3 veces por 5 minutos con PBS. Para los experimentos de ChIP para

determinar la unión de factores de transcripción o enzimas modificadoras de la cromatina, se llevó a cabo un segundo entrecruzamiento con EGS (ethylene glycol-bis/succinyl acid N-hydroxysuccinimide ester) 2mM en PBS, por 1 hora a temperatura ambiente. Este doble entrecruzamiento permite determinar unión de proteínas débilmente unidas a los promotores lo cual es imposible con entrecruzamiento sólo con FA (Zeng., 2006). Las placas fueron raspadas en PBS1X (suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas), posteriormente centrifugadas a 800g por cinco minutos. Los pellet fueron almacenados por congelamiento rápido en nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C hasta su utilización. Los pellet celulares fueron resuspendidos en Cell Lysis Buffer (CLB; HEPES 5 mM pH 8,0, KCl 85 mM, Triton X-100 0,5%, PMSF 1 mM) y se los disgregó utilizando un homogenizador con vástago de plástico por 30-40 golpes. Los extractos fueron centrifugados a 600 g por 5 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en buffer de sonicación (50 mM HEPES pH 7.9, 140 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, más inhibidores de proteasas). La cromatina fue fragmentada utilizando un sonicador de baño Bioruptor (Diagenode, Bélgica) por 60 minutos a máxima potencia, con intervalos de encendido-apagado de 15 segundos. El sonificado se centrifugó a 2600 g por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo donde fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su uso. Una alícuota de 20 μ L de cromatina fue usada para cuantificar la cromatina por absorción a 260 nm y para evaluar el

grado de fragmentación del ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ensayo de inmunoprecipitación se llevó a cabo como está descrito en Cruzat, 2009 yHenriquez, 2013. Se tomaron 25 µg de extracto de cromatina de tejido entrecruzado, medido a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras fueron pre-aclaradas con 2-4 µg de IgG control de ratón o conejo (Upstate) y 50 uL de proteína A o G agarosa (Santa Cruz Biotechnology), incubándolas 2 horas a 4°C en rotador continuo. Luego del preaclaramiento, las muestras fueron centrifugadas a 4000g por 5 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue traspasado a un tubo nuevo para luego incubar con 2-4 µg de anticuerpos específicos para las modificaciones o enzimas modificadoras por 12 horas a 4°C en un rotador continuo. Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla anexa. Posteriormente, se agregó 50 uL de proteína A o G-Agarosa y se incubó por 1 hora a 4°C en rotador continuo. Los pellets de proteína A o G-Agarosa inmunoprecipitados fueron lavados sucesivamente: 1 lavado con 500 uL de buffer de sonicación, (50 mM HEPES pH 7.8, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, más inhibidores de proteasas), 2 lavados con IP Wash buffer (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 500 mM LiCl, 1.0% desoxicolato de sodio, 1% NP40, más inhibidores de proteasas) y 1 lavado con buffer Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris pH 8.0, 0.25 mM EDTA). Entre cada lavado se centrifugó a 4000xg por 1 minuto a 4°C. A los inmunoprecipitados finales se les adicionó 100 µL de buffer de elución (50 mM NaHCO₃, 1% SDS) y se incubó a 65°C por 15 minutos. Se centrifugó 1 minuto

a 13.000g y el sobrenadante se traspasó a tubos nuevos. Se adicionó NaCl a una concentración final de 200 mM y se revirtió el entrecruzamiento incubando 12-16 horas a 65°C. Posteriormente, se adicionó Proteinasa K a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó a 42°C por 2 horas. Luego de este tratamiento el ADN se extrajo por el método de fenol/cloroformo y se precipitó con Etanol absoluto en presencia de 0,1 volúmenes de NaCH₃COO⁻ 3 M y glicógeno (20 µg). Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 µL de TE 1X pH 8.0 y se utilizaron 5 µL para cada reacción de PCR. Para todos los ensayos se realizaron controles con 2 o 4 µg de IgG inespecífica de ratón o conejo siguiendo todo el procedimiento anteriormente descrito para el resto de las muestras. La cuantificación de los precipitados se realizó mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la secuencia de ADN del promotor P1 de Runx2 (-118/+29). La cuantificación se llevó a cabo realizando curvas de input de la cromatina e interpolando los precipitados dentro de estas para obtener porcentajes de input de precipitación. En algunos experimentos como control de precipitación se utilizaron partidores contra el gen de PSD-95 de rata/ratón (-33/+118). Los experimentos de re-inmunoprecipitación de cromatina (re-ChIP) fueron realizados tal como fue descrito anteriormente en (Cruzat., 2009). Brevemente, los complejos inmunoprecipitados por ChIP fueron eluidos incubándolos con 25 µL de DTT 10 mM a 37°C por 30 minutos. Los precipitados fueron centrifugados a 5.000g por 5 minutos y el sobrenadante fue diluido en 500 µL con buffer de sonicación para repetir el

protocolo de CHIP.

2.8. Ensayos de silenciamiento génico (shRNA).

Con el fin de identificar proteínas involucradas en las modificaciones covalentes encontradas en las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, se realizaron ensayos de silenciamiento génico por shRNA con el sistema de tres plásmidos, para las enzimas descritas en la Tabla 4. En éste sistema uno de los plásmidos tiene el gen de interés y los otros dos son llamados plásmidos ayudantes que contienen genes que codifican para las proteínas virales G-VSVG, Gag-Pol y Rev. Para esto se utilizaron poblaciones de lentivirus generados en células HEK 293T crecidas en medio DMEM suplementado con SFB al 10%. Cultivos celulares en una confluencia de un 90% fueron transfectadas con lipofectamina 2000 (Invitrogen) con los siguientes plásmidos: plásmido pLK0.1 (hairpin-pLK0.1) y los plásmidos ayudantes VSV-g y Δ 8.9. Se recolectaron los sobrenadantes 72 horas después de la transfección, luego se filtraron y congelaron a -80°C . Los títulos de los sobrenadantes fueron cuantificados con el KIT de CLONTECH No 631235; para evaluar el número de copias/ml. De igual manera, se utilizó el Kit de CLONTECH No 631239 para evaluar la capacidad infectiva de cada uno de los lentivirus generados. Todas las etapas del procesamiento y manejo de las partículas lentivirales se llevó a cabo con un nivel de Bioseguridad 2, de

acuerdo a las recomendaciones de CONICYT y el National Institute of Health (NIH-USA), en una sala de cultivo especialmente acondicionada para este propósito en nuestro Centro de Investigaciones.

Para evaluar la contribución de estas proteínas modificadoras en la actividad transcripcional del gen Runx2, en células con shRNA para cada una de las metilasas y demetilasas, se realizaron estudios de RT-PCR acoplados a PCR en tiempo real, lo que nos permitió evaluar cambios en los niveles de ARNm de Runx2, Oc y miogenina. Además, para asociar la actividad de estas proteínas a los cambios en la actividad transcripcional del gen y a las modificaciones covalentes presentes en el promotor, se realizaron experimentos de ChIP. En estos experimentos se evaluó en primera instancia la unión de las enzimas al promotor, para confirmar el efecto del silenciamiento. Y en segunda instancia se evaluó el enriquecimiento de cada una de las modificaciones covalentes presentes en las histonas del promotor P1 del gen Runx2, en la situación control y con el shRNA respectivo.

2.8.1 Sobre expresión de WDR5.

Para evaluar la contribución de WDR5 en la regulación transcripcional del gen Runx2, cultivos de osteoblastos primarios de rata de 12 horas; fueron infectados con partículas lentivirales. Para este caso, el cDNA completo de WDR5 fue clonado de células C2C12, en un plásmido bicistrónico pCDH entre

los sitios XbaI y EcoRI. Este plásmido contiene un promotor CMV comandando la expresión de WDR5 y un promotor EF1 que dirige la expresión de GFP, a modo de verificar la infección de las células. Las muestras fueron colectadas y procesadas 48 y 96 horas después de la infección.

2.9. Tinciones de NBT/BCIP y Rojo de alizarina.

Las células fueron sembradas en placas de 35mm y fueron cultivadas en medio adecuado, dependiendo de la línea celular o de si era cultivo primario de osteoblastos primarios. El día de la tinción, las células fueron lavadas con PBS 1X y fijadas con una solución de paraformaldehído al 37% y etanol (proporción 1:1); posteriormente, fueron teñidas con NBT/BCIP (ROCHE 11681451001) por 30 minutos a 37°C, para detectar actividad de la enzima fosfatasa alcalina (AP). Por otra parte, para evaluar la formación de depósitos de calcio, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con una solución 1:1 de paraformaldehído 37% y etanol y finalmente, fueron tratadas con rojo de alizarina al 0.1% (Santa Cruz sc205998), por 15 minutos a temperatura ambiente.

2.10. Análisis de datos.

Todos los valores son presentados como promedios \pm error estándar (ES) para 3 o más experimentos independientes. Para los ensayos de ChIP, los análisis estadísticos fueron realizados usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnet. Para los análisis de expresión del ARNm y la cuantificación de proteína se realizó la prueba de t-student. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Graphpad Prism (California, USA).

3.RESULTADOS

3.1. Diferenciación de células mesenquimáticas hacia los linajes osteoblástico y muscular.

3.1.1. Células C2C12.

Las células C2C12 corresponden a una línea celular mioblástica que en cultivo se puede diferenciar rápidamente, formando miotubos contráctiles y expresando genes asociados con el linaje miogénico (Lee y col., 1999). De igual manera, se ha descrito que en presencia del morfógeno BMP2, estas células pueden diferenciarse al linaje óseo, en un proceso que se caracteriza por la expresión de genes marcadores tempranos y tardíos de la diferenciación osteogénica, (Lee y col., 1999; Balint y col., 2003). Entre estos marcadores óseos está el factor de transcripción Runx2, específicamente la isoforma II-p57, la cual aumenta su expresión en presencia del morfógeno (Shea y col., 2003). Lo anterior hace de este modelo celular, un sistema idóneo para estudiar mecanismos epigenéticos que controlan la activación y represión transcripcional de genes involucrados con el compromiso osteogénico, como es el caso de Runx2.

En nuestros experimentos, células C2C12 fueron cultivadas en medio DMEM con 10% SFB hasta alcanzar una confluencia del 40% (preconfluencia, pC), estado en el cual los cultivos fueron suplementados con suero de caballo (HS, 5%) para la diferenciación miogénica ó con BMP2 (300ng/ml) para la diferenciación ósea, por un periodo de 48 ó 72 horas.

Al diferenciar las células C2C12 hacia el linaje miogénico por 72 horas, se observó la presencia de células multinucleadas y la formación de miotubos (fig. 6A). Por el contrario, el tratamiento con BMP2 por 48 y 72 horas, indujo una morfología celular cuboidal, típica de células de osteoblásticas (fig. 6A).

Para confirmar la diferenciación de los cultivos, se evaluó la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (AP). Esta enzima es codificada por un gen que es considerado un marcador temprano de la diferenciación osteoblástica (Stein y col., 2001). Para medir la actividad de la enzima se utilizó el colorante NBT/BCIP en los cultivos diferenciados hacia los linajes óseo y muscular (Fig. 6B). La reacción de esta tinción se fundamenta en la utilización de un sustrato orgánico fosfatado, BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), el que bajo la acción de la enzima pierde su grupo fosfato. El bromo-cloro indolil liberado del grupo fosfato sufre primero una reacción de tautomerización y luego es oxidado por el NBT a DDIW (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro indigo white), la combinación de ambas reacciones genera una coloración azul de alta definición y sensibilidad (Hyung., 2006). Determinamos que después de 48 o 72 horas de

diferenciación, sólo las células incubadas con BMP2 formaban un precipitado de color azul, confirmando la diferenciación osteogénica de los cultivos (Fig. 6B). Contrario a lo anterior, en los cultivos diferenciados hacia el linaje miogénico no se observó coloración alguna, reflejando ausencia de actividad de AP (Fig. 6 B).

Para determinar si la diferenciación inducida por el tratamiento con HS o BMP2, observado a nivel morfológico, se correlacionaba con un cambio a nivel transcripcional, se evaluó mediante RT-PCR y WB, la expresión de genes marcadores de diferenciación miogénica y osteogénica. Para ello se utilizaron partidores específicos para amplificar mRNA del gen miogenina como marcador de diferenciación mioblástica; y para los mRNAs de Runx2-II/p57 y Osteocalcina (Oc), como marcadores de diferenciación osteoblástica. Los resultados demostraron que la inducción con BMP2 genera un aumento de tres veces en la expresión de la isoforma Runx2-II/p57 a las 48 horas y de ocho veces a las 72 horas de cultivo, respecto de la condición control (células en preconfluencia) (Fig. 7 A). Este incremento en el ARNm de Runx2-II/p57 se vio reflejado en los niveles de proteína Runx2-II/p57 detectados mediante western blot (Fig. 7 D). Al analizar la expresión de Oc, no se observó un incremento en su expresión a las 48 horas, pero si un aumento en la expresión del mensajero de 12 veces a las 72 horas de cultivo (Fig. 7B). Contrario a lo anterior, no se detectó expresión de miogenina, lo que es consecuente con el proceso de diferenciación hacia el linaje osteogénico que ocurrió producto de la inducción

con BMP2 (Fig. 7 C). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en los que se ha establecido que en la línea mesenquimal C2C12, BMP2 no sólo es capaz de inhibir la diferenciación miogénica, si no que induce un fenotipo osteoblástico característico (Katagiri y col, 1994).

En células C2C12 estimuladas con HS se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de ARNm de miogenina a las 48 y 72 horas de cultivo (Fig. 7 C). Además no se detectó expresión del ARNm ó de proteína de Runx2-III/p57 en los dos tiempos analizados (Fig 7 C y 7 D). Estos resultados confirman que en nuestras condiciones de cultivo estas células tienen una capacidad de diferenciación concordante con la reportada previamente por otros autores (Katagiri y col, 1994), siendo un modelo ideal para estudiar los mecanismos que controlan la activación y represión de Runx2.

3.1.2 Células MC3T3.

La línea celular MC3T3 derivada de calvaria de ratón, presenta un fenotipo preosteoblástico y representa un modelo de diferenciación ósea. Es ampliamente utilizada por su capacidad de recapitular con precisión los eventos celulares asociados a diferenciación ósea que ocurren *in vivo* (Barrio y Etcheverry, 2006). Por esta razón, durante esta tesis utilizamos las células MC3T3 como una línea celular que se diferencia exclusivamente hacia osteoblastos.

Las células fueron cultivadas hasta alcanzar confluencia (3 días) y posteriormente, tratadas con medio α MEM suplementado con ácido ascórbico (AA, 50 μ g/ml) por 9 días. AA es un fuerte inductor de la diferenciación osteoblástica *in vitro*, que favorece la mineralización y la formación de depósitos de calcio (Barrio y Etcheverry, 2006).

En la Figura 8 A se muestran fotografías de los cultivos de MC3T3 en dos tiempos (día 3 y 8); donde se observa que adquirieron una morfología cuboide característica de los osteoblastos (Barrio y Etcheverry, 2006). Al evaluar la actividad de fosfatasa alcalina, mediante el uso de NBT/BCIP, se observó la formación del precipitado de color azul en los dos tiempos analizados (3 días y 8 días)(Fig. 8 B). Se ha descrito que en la fase inicial de diferenciación, las células MC3T3 proliferan activamente y presentan una expresión mínima de marcadores de diferenciación terminal ósea (Wang y col., 1999; Barrio y Etcheverry, 2006). Una vez que la fase de síntesis de matriz extracelular se inicia, la expresión de marcadores osteoblásticos se activa en una secuencia temporal específica, siendo primero observada la expresión de AP seguida por BSP y Oc, en una etapa más tardía (Wang y cols., 1999) (Wang y col., 1999; Barrio y Etcheverry, 2006). De acuerdo con lo anterior, después de ocho días de diferenciación en cultivo, encontramos la aparición de nódulos de mineralización, demostrados por la tinción con rojo de alizarina (manchas de color rojo intenso (Fig. 8 B). Este compuesto es comúnmente utilizado en

ensayos bioquímicos para determinar la presencia de depósitos de calcio en células de la línea osteogénica (Hans y col.,2005).

A continuación, se evaluaron los niveles de expresión de Runx2-II/p57 y osteocalcina (Oc) mediante qRT-PCR. Encontramos que durante la diferenciación de células MC3T3, la expresión de ARNm de Runx2-II/p57 presenta niveles bajos de expresión en los primeros días de cultivo (1-3 días), los que se incrementan significativamente a partir del día 5, para mantenerse constantes hasta el día 9 (Fig. 9 A). Estos resultados son apoyados por datos de detección de la proteína por western blot donde se observa un aumento significativo desde el día 5 (Fig 9 C). Al analizar la expresión del ARNm de Oc observamos que su expresión se detecta a partir del día 5 de cultivo y aumenta progresivamente hacia el día 7 y 8 (Fig. 9 B).

En conjunto, estos resultados demuestran que esta línea celular representa un estado de expresión activo de Runx2 a nivel transcripcional, situación que nos permite utilizarla como modelo para estudiar los mecanismos que participan en el proceso de activación transcripcional del gen.



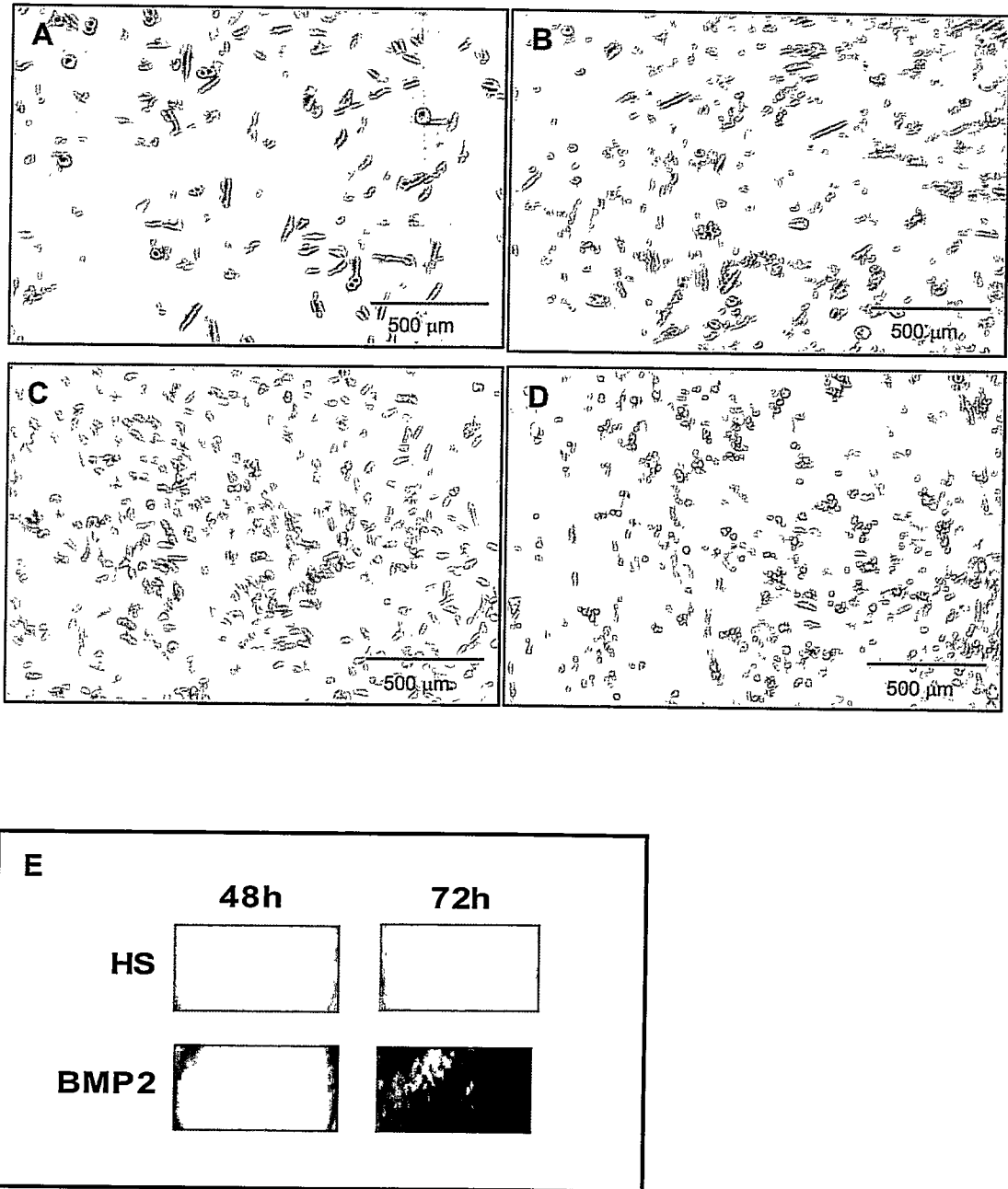


Figura 6. Diferenciación de Células C2C12 hacia los linajes muscular y osteoblástico.
 A. Células C2C12 crecidas en medio DMEM-F12 hasta alcanzar confluencia del 40% fueron posteriormente cultivadas en medio suplementado con suero de caballo (HS) al 5% durante 48 (A) ó 72 horas (B); ó con BMP-2 (300ng/ml) por 48 (C) y 72 horas (D). Magnificación de 40x.
 E. Tinción con NBT/BCIP, para evaluar la actividad de fosfatasa alcalina AP.

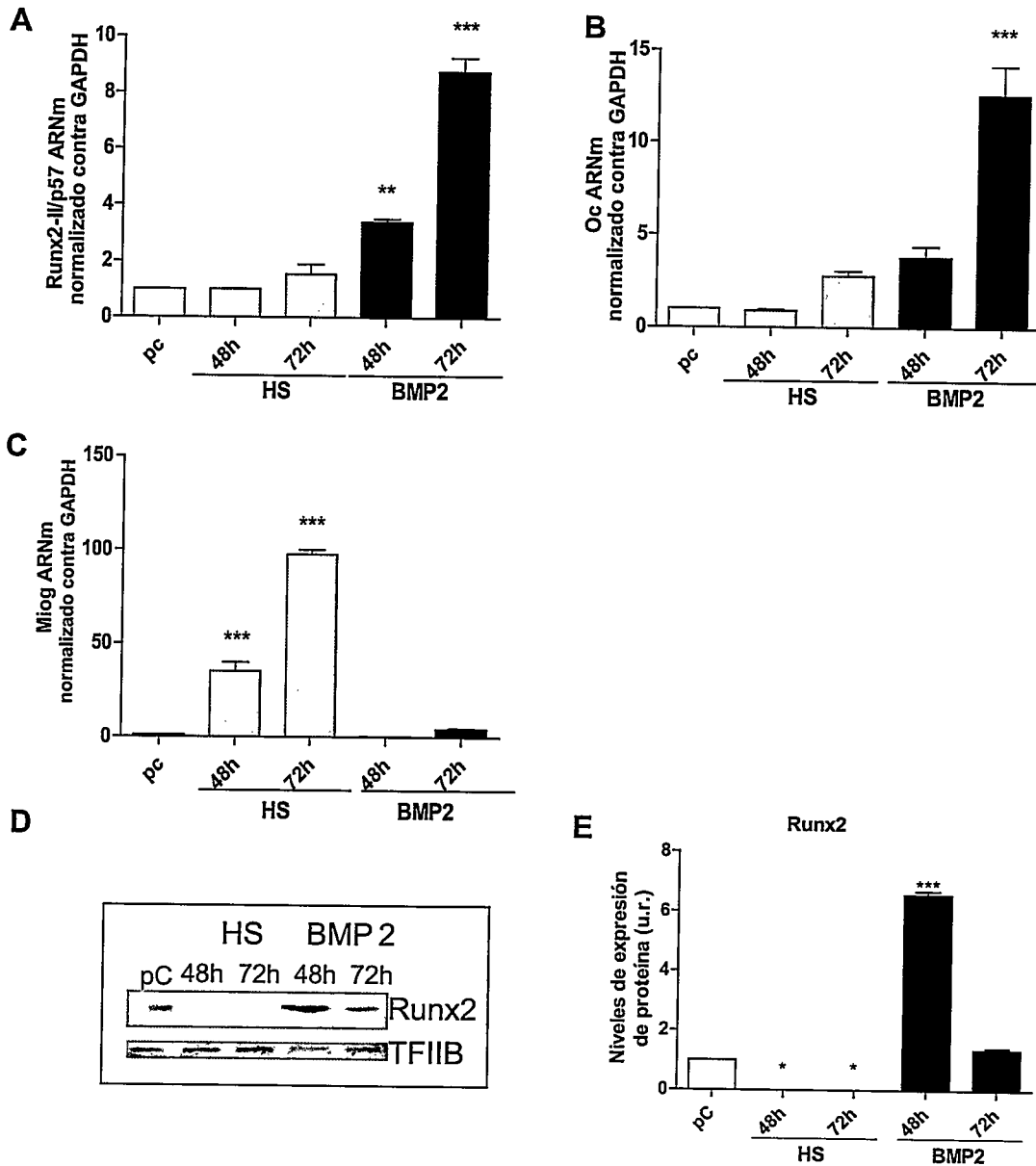


Figura 7. Expresión de Marcadores de diferenciación osteoblástica y mio-blástica en células C2C12. Expresión de ARNm de Runx2-II/p57 (A), osteocalcina (B) y miogenina (C) (Miog) en células C2C12. Los niveles de ARNm fueron obtenidos a partir de células C2C12 diferenciadas hacia linaje osteoblástico y mio-blástico como se indicó anteriormente. Los niveles de expresión fueron determinados mediante RT-PCR y normalizados con respecto a la expresión del gen constitutivo GAPDH. Las barras representan el promedio \pm E.S.M, de tres experimentos independientes. D. Expresión de proteína Runx2-II/p57, mediante ensayos de Western blot a partir de extractos nucleares obtenidos de células tratadas con suero de caballo (HS) o BMP2. E. Cuantificación por densitometría usando el programa imageJ. En todos los experimentos, diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Cada condición fue comparada con el punto de preconfluencia como grupo control (pC).

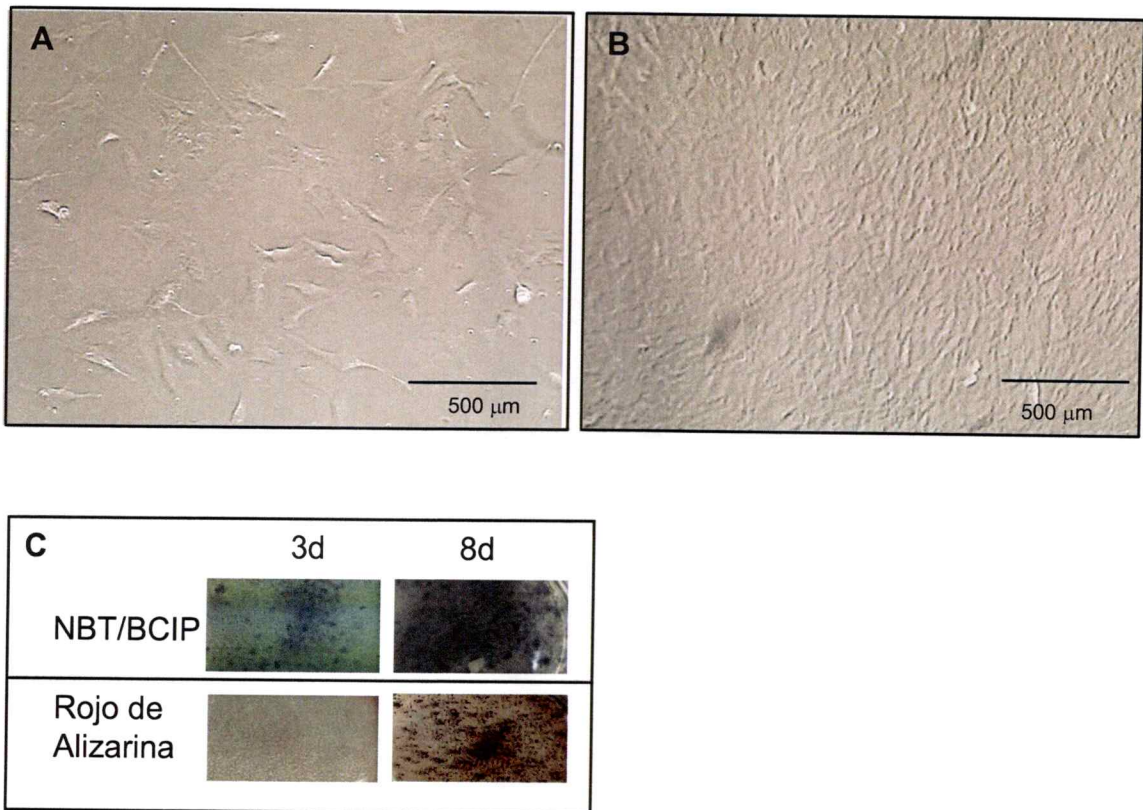


Figura 8. Diferenciación de Células MC3T3. Células MC3T3 fueron sembradas en placas de 35mm (para ARN) y placas de 100mm (para extractos nucleares). Cuando los cultivos alcanzaron confluencia (día 3) se cambió a medio suplementado con AA (50 μg/ml). **A.** Morfología de Células en confluencia, día 3 (A) y 5 días después de estimulación con AA (**B**). Magnificación de 40X. **C.** Tinción con NBT/BCIP, para evaluar la actividad de AP.

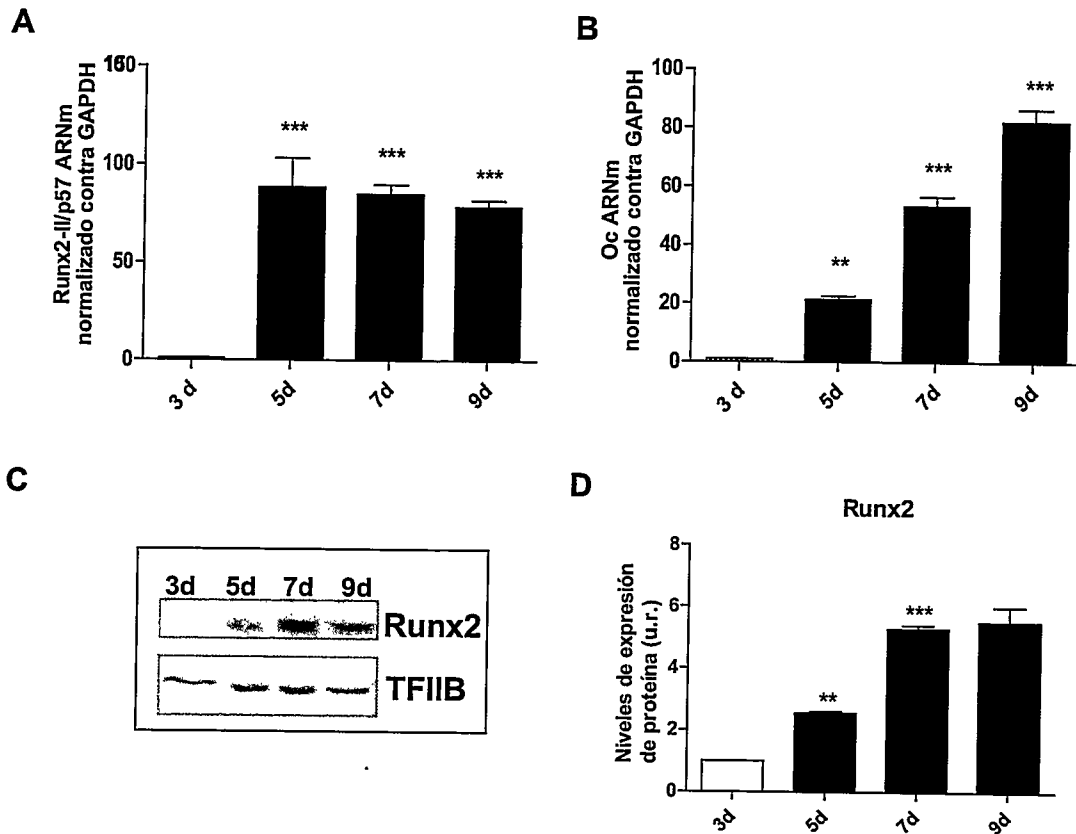


Figura 9. Expresión de Runx2-II/p57 y Osteocalcina en células MC3T3.

Células MC3T3 fueron sembradas en placas de 35mm y al tercer día de cultivo, cuando se alcanzó confluencia, el medio fue suplementado con AA. Expresión de ARNm de Runx2-II/p57 (A) y Oc (B), en células MC3T3 diferenciadas por nueve días. Los niveles de expresión fueron determinados mediante RT-PCR cuantitativo y normalizados con respecto a la expresión del gen constitutivo GAPDH. Las barras representan el promedio \pm E.S.M. de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$. Cada condición experimental fue comparada con la condición de tres días como grupo control (pC). C. Expresión de proteína Runx2-II/p57, mediante ensayos de Western blot a partir de extractos nucleares obtenidos de células MC3T3 crecidas por 3, 5, 7 y 9 días. D. Cuantificación por densitometría usando el programa imageJ.

3.2. Perfil de modificaciones post-traduccionales en las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2.

Como fue discutido anteriormente, existen distintos mecanismos por los cuales se puede regular la expresión de un gen en particular. Entre estos se encuentra la modificación covalente de residuos específicos en las colas de las histonas asociadas a los promotores de los genes. Estas modificaciones pueden favorecer o dificultar la interacción de la cromatina con factores involucrados en el control de la transcripción (Lizuka y Smith, 2003), o pueden servir como sitios de reconocimiento y reclutamiento para otras proteínas modificadoras, regulando así este proceso (Kouzarides., 2007). Al respecto, en nuestro laboratorio anteriormente se determinó la existencia de patrones de modificaciones post-traduccionales en las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, relacionados con activación y represión transcripcional (Henriquez., 2009). Para el caso específico de células que no expresan Runx2, se detectó la presencia de modificaciones asociadas a represión transcripcional como H3K27Me3 y H4R3Me2s. En contraste, en células que expresan Runx2 se observó un enriquecimiento en los niveles de H3K4Me3, marca asociada con activación transcripcional (Henriquez., 2009). Dentro de este contexto, en esta tesis quisimos evaluar la presencia de éstas y otras modificaciones en modelos de diferenciación mesenquimática en los que el gen Runx2 se encuentra inactivo y activo transcripcionalmente dependiendo

del grado de diferenciación y de igual manera, identificar enzimas capaces de catalizar estas modificaciones postraduccionales en estos tipos celulares.

3.2.1. Modificaciones post-traduccionales en histonas asociadas al promotor P1 del gen Runx2 en células C2C12 diferenciadas a los linajes miogénico u osteogénico.

Teniendo en cuenta el patrón de expresión del gen Runx2 exhibido por la línea celular mioblástica C2C12 diferenciada hacia el linaje osteogénico o miogénico (Fig 7), utilizamos ambos modelos de diferenciación para estudiar los mecanismos de activación y represión transcripcional de Runx2, respectivamente.

3.2.1.1. Células C2C12 diferenciadas al linaje muscular presentan enriquecimiento en trimetilación de la Lisina 27 de la histona H3, asociada al promotor P1 de Runx2.

La represión transcripcional durante el desarrollo representa un evento importante ya que permite controlar la expresión de genes linaje-específicos, así como también la expresión de secuencias no codificantes (Dambacher y Col., 2010). La trimetilación en la lisina 27 de la histona H3, es una modificación normalmente asociada a genes transcripcionalmente inactivos y se ha reportado que se encuentra enriquecida en el promotor, el cuerpo de los genes y en las regiones que flanquean estas zonas (Dambacher y Col., 2010).

Por lo anterior evaluamos la presencia de la H3K27Me3 en la región promotora P1 de Runx2 en células C2C12. Para ello se realizaron experimentos de ChIP en los que se midió el enriquecimiento de H3K27Me3 sobre la región -118+29 del promotor. Nuestros resultados demuestran que esta modificación está presente en las células en pC, y que posteriormente se enriquece en las células cultivadas en presencia de HS; condición de represión transcripcional de Runx2 (Fig. 10 A). Contrario a lo anterior, la presencia de esta modificación fue significativamente menor en las células diferenciadas hacia el linaje osteogénico (C2C12 estimuladas con BMP2) (Fig. 10 A).

Con estos resultados podemos concluir que existe un nivel de trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 asociada al promotor P1 del gen Runx2 que precede a la activación del gen. Estos niveles de H3K27Me3 aumentan significativamente cuando se produce la represión transcripcional del gen Runx2 en células que se comprometen con el linaje miogénico.

3.2.1.2. Dimetilación simétrica de la Arginina 3 de la histona H4 está asociada con la represión transcripcional de Runx2.

La metilación de residuos de arginina es una marca muy estable, para la que aún no se ha descrito enzimas capaces de removerla (Kouzarides 2007). Además, se ha reportado que esta modificación puede tener efecto sobre la presencia de otras modificaciones en la misma histona y/o modular la unión de proteínas efectoras (Di Lorenzo y Col., 2011). Se ha observado su presencia

en regiones promotoras de genes reprimidos, como es el caso del promotor del gen de la globina fetal (Rank y col., 2011). Mediante experimentos de ChIP se ha reportado también su presencia dentro de la región de control de impronta H19 (Jelinic y Col., 2006).

Basados en estos antecedentes evaluamos la presencia de esta modificación en el promotor P1 del gen Runx2 en células C2C12 diferenciadas a los linajes miogénico y osteogénico. Para ello, se extrajo cromatina a partir de células colectadas luego de 72 horas en cultivo y se realizaron experimentos de ChIP con un anticuerpo específico para H4R3Me2s. Encontramos que esta modificación se encuentra enriquecida en las histonas H4 presentes en el promotor P1 de células C2C12 cultivadas en medio suplementado con HS y no así en células en preconfluencia ó tratadas con BMP2 (Fig. 10 B). Estos resultados indican que esta modificación se encuentra asociada con un estado de represión transcripcional del gen Runx2.

3.2.1.3. La trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 está enriquecida en promotor P1 del gen Runx2 transcripcionalmente activo.

En el dominio N-terminal de la histona H3 se encuentra el residuo de lisina 4, el que puede ser metilado enzimáticamente. (Völkel y Angrand, 2007; Shilatifard, 2006; Martin y Zhang, 2005). Para analizar si esta lisina exhibe H3K4Me3 en el promotor P1 del gen Runx2, realizamos experimentos de ChIP, mediante el uso de un anticuerpo específico para esta modificación. Se observó que esta

modificación se encuentra enriquecida en el promotor P1 del gen Runx2 activo transcripcionalmente, lo cual ocurre en las C2C12 diferenciadas hacia el linaje osteogénico (BMP2) (Fig. 11 A). En contraste, la monometilación en el mismo residuo, se detecta en el promotor inactivo transcripcionalmente, es decir en las células C2C12 preconfluentes o en aquellas diferenciadas hacia el linaje muscular (Fig. 11 B). Estos resultados indican la existencia de una relación directa entre el tipo y grado de metilación de la lisina 4 de la histona H3 y la actividad transcripcional del gen Runx2.

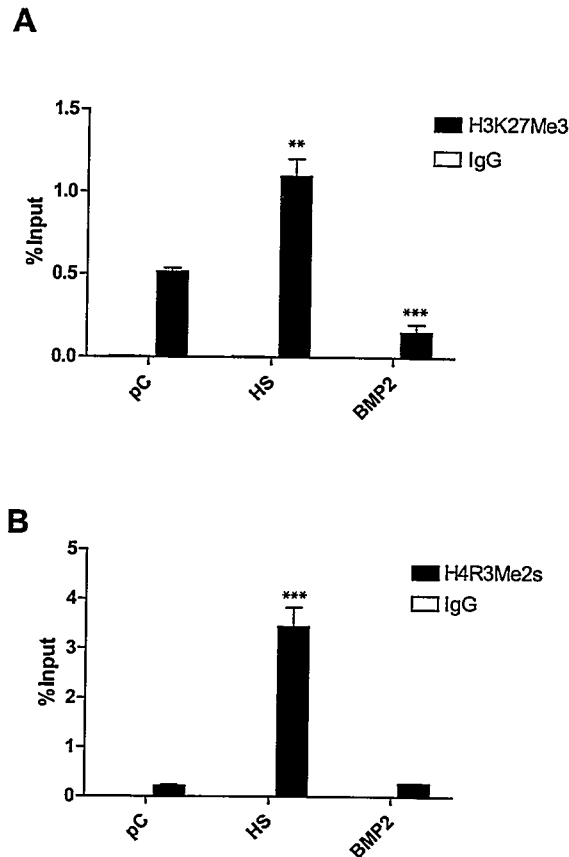


Figura 10. Presencia de modificaciones epigenéticas represoras en el promotor P1 del gen Runx2, en células C2C12. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizados con extractos entrecruzados de células C2C12 preconfluentes o diferenciadas a los linajes miogénico y osteogénico. Se utilizaron anticuerpos específicos para la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (A) y para la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (B). El ADN precipitado fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29 del promotor P1 del gen Runx2. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnet). Los grupos de HS (células tratadas con suero de caballo) y BMP2 fueron comparadas con la condición de células en preconfluencia (pC), como grupo control. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

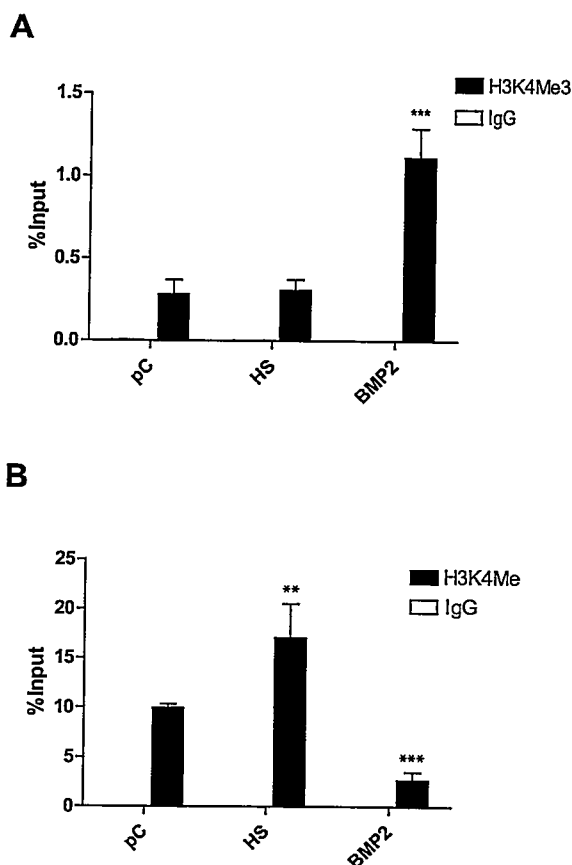


Figura 11. Análisis de mono y trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, en células C2C12. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron realizados con extractos entrecruzados de células C2C12 tratadas como se describe en la figura 10. Se utilizaron anticuerpos específicos para la trimetilación de la lisina 4 (**A**) y la monometilación de la lisina 4 (**B**) de la histona H3. El ADN precipitado fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29 del promotor P1 del gen Runx2. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). Los grupos de HS (células tratadas con suero de caballo) y BMP2 fueron comparadas con la condición de células en preconfluencia (pC), como grupo control. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.2. Modificaciones post-traduccionales en histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2 en células MC3T3 diferenciadas al linaje osteoblástico.

Las células MC3T3 en cultivo presentan un incremento en la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica a partir del día 5 de diferenciación, entre los cuales se incluyen Runx2-Il/p57 y Oc (Fig. 9). Por ello, esta línea celular fue usada como modelo para evaluar mecanismos involucrados en la activación transcripcional del gen Runx2.

A través de estudios de CHIP se evaluó, en primer lugar, la presencia de H3K4Me3 a los 5 y 8 días de cultivo. Esta modificación se encontró enriquecida a los cinco días de cultivo y con un aumento significativo hacia el día 8 (Fig. 12 A). Estos resultados confirman que esta modificación se encuentra fuertemente asociada a la actividad transcripcional del gen Runx2 durante la diferenciación osteoblástica.

Del mismo modo, se evaluó la presencia de H3K4Me en el promotor P1 en células MC3T3. Los resultados muestran un bajo enriquecimiento de esta modificación en las dos etapas de la diferenciación analizadas (Fig. 12 B). Estos resultados confirman que la presencia de H3K4Me se asocia con un estado de baja actividad transcripcional en el promotor P1 del gen Runx2.

Al determinar la presencia de las modificaciones represoras H3K27Me3 y H4R3Mes2 en las histonas asociadas al promotor P1, encontramos un bajo enriquecimiento de ambas marcas (Fig. 13 A y B). Estos resultados respaldan

lo encontrado en las células C2C12 diferenciadas con BMP2 y confirman que durante la activación transcripcional de Runx2 ocurre un enriquecimiento de H3K4Me3, no así de las marcas represoras H3K4Me, H3K27Me3 y H4R3Me2s.

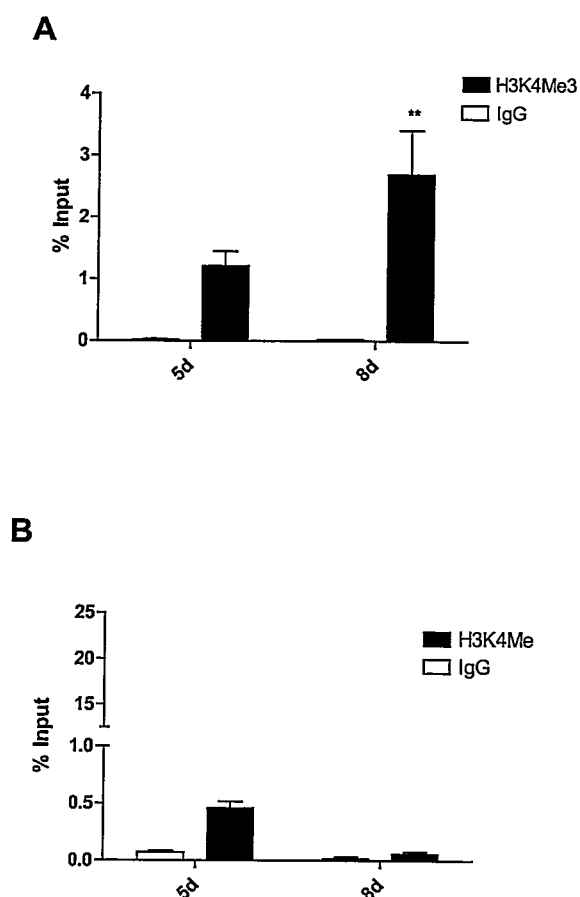


Figura 12. Análisis de la mono y trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3, en células MC3T3. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron realizados con extractos entrecruzados de células MC3T3 en los días 3 y 5 de cultivo. Se utilizaron anticuerpos específicos para la trimetilación de la lisina 4 (**A**) y la monometilación de la lisina 4 (**B**) de la histona H3. El ADN precipitado fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29 del promotor P1 del gen Runx2. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. Como grupo control se uso la condición de 5d. ** $p < 0.01$.

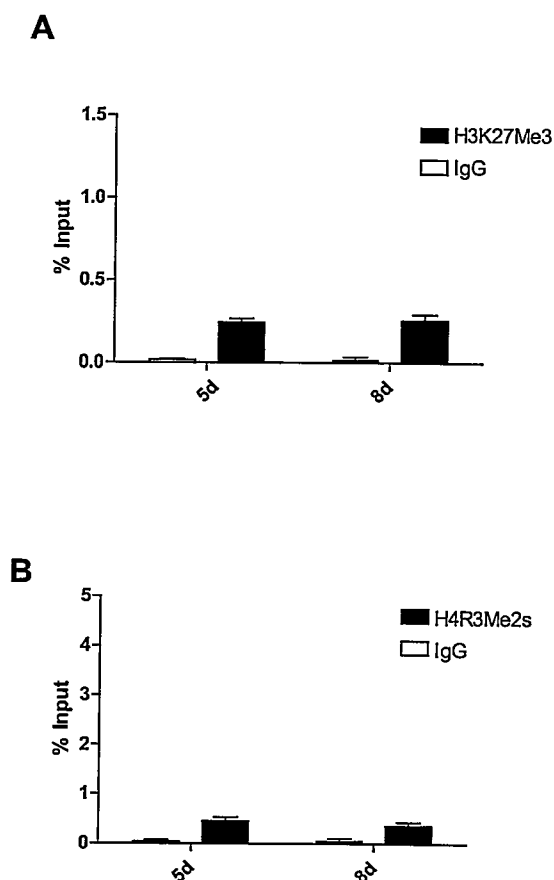


Figura 13. Presencia de modificaciones represoras en el promotor P1 del gen Runx2 durante la diferenciación de células MC3T3. Ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizados con extractos entrecruzados de células MC3T3 en el día 5 y 8 de diferenciación. Se utilizaron anticuerpos específicos para la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (**A**) y para la dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4 (**B**). El ADN precipitado fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29 del promotor P1 del gen Runx2. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Se utilizó el test t-student, como prueba estadística.

3.3. Presencia de enzimas modificadoras de histonas en el promotor P1 del gen Runx2.

Para comprobar la presencia de proteínas con actividad metiltransferasa o demetiltransferasa potencialmente responsables de la regulación transcripcional de Runx2, se evaluó la participación de las metiltransferasas WDR5, EZH2, PRMT5, COPR5; y las demetilasas NO66, JARID1B y UTX durante la diferenciación osteoblástica en los dos modelos celulares descritos anteriormente.

3.3.1 Unión de enzimas modificadoras de histonas en el promotor P1 del gen Runx2 en células C2C12 diferenciadas a los linajes miogénico y osteogénico.

3.3.1.1. Asociación de NO66 y JARID1B al promotor P1 de Runx2 en células C2C12 diferenciadas al linaje muscular.

Como primer análisis, se realizaron ensayos de western blot para detectar los niveles de expresión de las enzimas NO66 y JARID1B en células C2C12 diferenciadas hacia los linajes miogénico u osteogénico. Como se muestra en la figura 14A, la expresión de la proteína NO66 en las células C2C12 diferenciadas con BMP2 por 48 horas baja y disminuye aún más luego de 72 horas de diferenciación. Lo anterior explica la disminuida unión de ésta proteína al promotor P1 mediante experimentos de ChIP en estas mismas células (Fig. 14C). Contrario a lo anterior, la proteína NO66 fue detectada en

las condiciones de preconfluencia y diferenciación con suero de caballo por 48 horas. Posteriormente (96 horas), ésta expresión disminuye (Fig. 14 A). En concordancia con este resultado, los análisis de ChIP demuestran unión de NO66 al promotor P1 en las condiciones de preconfluencia y en células tratadas con suero de caballo por 48 horas (Fig. 14 C).

Los ensayos de western blot realizados para la demetilasa JARID1B en células C2C12, demostraron que ésta se expresa en los cultivos preconfluentes y que esta expresión, permanece constante luego de 48 horas de tratamiento con BMP2 o HS. Sin embargo, la concentración de JARID1B disminuye luego de 72 y 96 horas de estos tratamientos respectivamente (Fig 14 B). Por su parte, los experimentos de ChIP realizados a las 48 horas, demostraron que ésta enzima se encuentra unida al promotor cuando la expresión de Runx2-II/p57 es baja, como es el caso de las células en preconfluencia y bajo estimulación con HS (Fig 14 D). Esta unión al promotor P1 disminuye significativamente cuando las células son diferenciadas hacia el linaje osteoblástico (Fig 14 D).

Estos resultados demuestran que las demetilasas NO66 y JARID1B se unen al promotor P1 de Runx2 y que esta unión se relaciona con la represión del gen Runx2 observada durante la diferenciación miogénica de las células C2C12.

3.3.1.2. Reclutamiento de EZH2 y PRMT5 al promotor P1 de Runx2 en células C2C12 diferenciadas al linaje muscular.

Como se describió anteriormente, la represión transcripcional de Runx2 ocurrió en paralelo con un enriquecimiento de las marcas represoras H3K27Me3 y H4R3Me2s (Fig 10 A y B).

Para determinar la contribución de las enzimas metiltransferasas EZH2 y PRMT5 en la represión transcripcional de Runx2, se evaluó inicialmente sus perfiles de expresión mediante Western blot.

Estos análisis demostraron que sus niveles de expresión disminuyen durante la diferenciación osteoblástica, siendo más evidente después de 72 horas de tratamiento con BMP2 (Fig 15 A). Contrario a lo anterior, los niveles de expresión de la proteína EZH2 fueron altos en preconfluencia y estos disminuyeron solo levemente durante la diferenciación con HS (Fig 15 A). Respecto a la unión de EZH2 al promotor P1 de Runx2, los resultados obtenidos por ChIP, demostraron que EZH2 está asociada al promotor P1 en las células en preconfluencia y en las células tratadas con suero de caballo por 72 horas; y que ésta asociación disminuye significativamente cuando las células son diferenciadas al linaje óseo (Fig 15 C). Estos resultados sugieren un posible papel represor de EZH2 en este promotor e indican que sus niveles de expresión podrían contribuir con la activación transcripcional de Runx2 durante la diferenciación osteoblástica (Caretto y cols., 2004).

De igual manera, se analizaron los niveles de expresión de PRMT5 mediante western blot y se evaluó la unión de esta enzima al promotor P1 de Runx2. Detectamos altos niveles de expresión de la proteína PRMT5 en preconfluencia, los cuales permanecieron constantes hasta las 48 horas de diferenciación miogénica y para luego disminuir a las 96 horas de diferenciación (Fig 15 B). Por otra parte la expresión de PRMT5 permaneció constante en las células C2C12 diferenciadas hacia el linaje óseo. Respecto a la unión de PRMT5 al promotor P1 en los puntos analizados, se encontró que esta proteína interactúa con el promotor sólo en las células C2C12 diferenciadas al linaje miogénico, esto es, cuando el gen está reprimido transcripcionalmente (Fig 15 D). Estos resultados indican que el reclutamiento de PRMT5 al promotor P1 está asociado con el silenciamiento transcripcional de Runx2 en células no osteoblásticas.

3.3.1.3. WDR5 y UTX se unen al promotor P1 de Runx2 durante la diferenciación osteoblástica de células C2C12.

Tal como se discutió anteriormente las proteínas WDR5 y UTX forman parte del complejo MLL/COMPASS-like y han sido descritas como enzimas reguladoras de actividad transcripcional mediante su actividad metiltransferasa (H3K4Me3) o demetilasa (H3K27Me3).

Al analizar la expresión de las proteínas WDR5 y UTX, mediante Western blot, encontramos que en ambos casos ésta permanece constante, tanto durante la

diferenciación miogénica como osteogénica (Fig. 16 A y B). Después evaluamos la interacción de ambas con el promotor P1 de Runx2 mediante experimentos de ChIP usando anticuerpos específicos contra estas proteínas. Encontramos que WDR5 y UTX se encuentran unidas al promotor cuando las células son diferenciadas hacia el linaje osteoblástico (tratamiento con BMP2) (Fig 16 C y D). Este reclutamiento coincide con el enriquecimiento de H3K4Me3 en el promotor (Fig 11 A) y de igual manera, con los bajos niveles de H3K27Me3 detectados en este promotor luego del tratamiento con BMP2 (Fig 10 A). Contrario a lo anterior, durante la diferenciación muscular no se detecta la presencia de estas dos enzimas, situación que coincide con los bajos niveles de H3K4Me3 y el enriquecimiento de H3K27Me3 (Fig 16 C y D).

Estos resultados sugieren que el complejo "MLL/COMPASS-like", formado por las proteínas WDR5 y UTX, entre otras, contribuye en la activación transcripcional de Runx2 mediante el enriquecimiento en los niveles de H3K4Me3 y la reducción de H3K27Me3.

Finalmente, con el objetivo de determinar si JMJD6 participa como enzima demetilasa de H4R3Me2s, se evaluó su expresión y unión al promotor P1 de Runx2. Los resultados mostraron que la expresión de la proteína JMJD6 permanece constante en los dos modelos de diferenciación. Sin embargo, no se detectó su unión al promotor P1 en ninguna de las condiciones analizadas (Fig 17 A y B). Estos resultados confirman lo reportado recientemente por otros

autores, los cuales le atribuyen a JMJD6 funciones regulatorias no relacionadas con su actividad demetilasa (Unoki y Col., 2013).

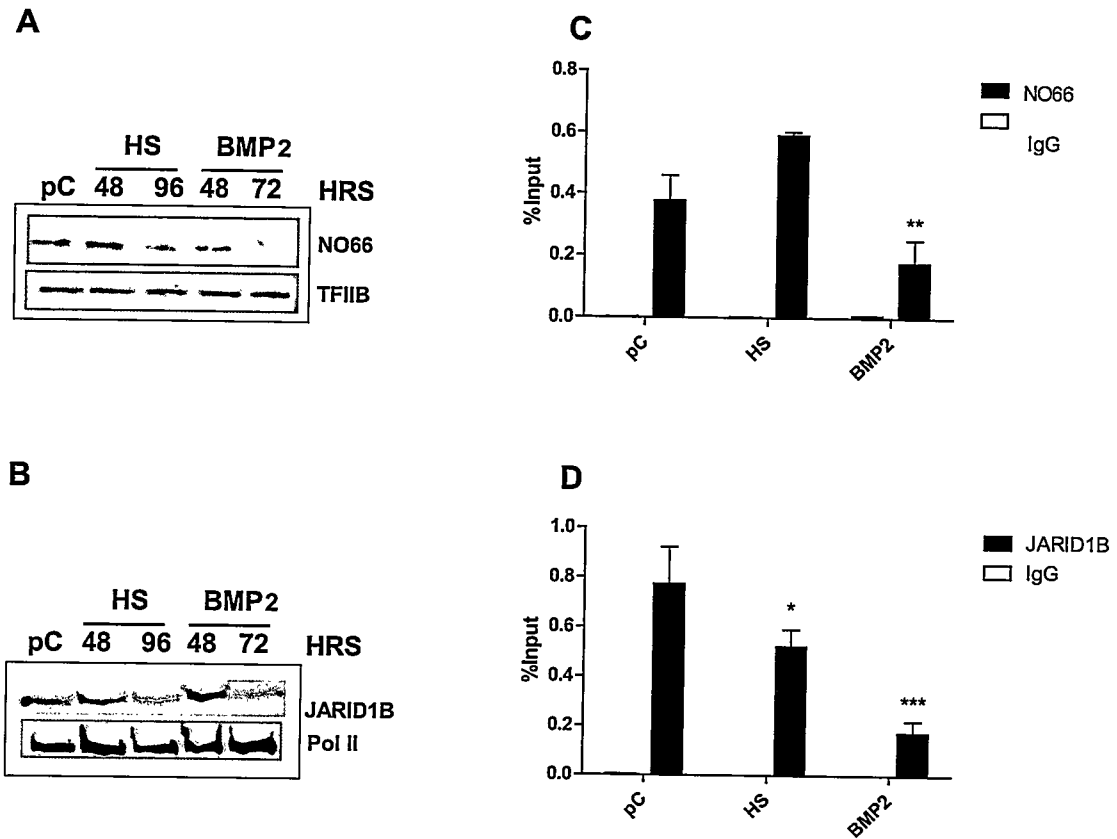


Figura 14. Perfiles de expresión y análisis de la unión de NO66 y JARID 1B al promotor P1 de Runx2 en C2C12.

A y B. Células C2C12 fueron cultivadas y tratadas con Suero de caballo (HS) o BMP-2 en diferentes tiempos. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpos específicos. **C y D.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de: Células C2C12 en preconfluencia, pC (40% confluencia), diferenciadas al linaje miogénico (HS) y óseo (BMP2) por 48 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). Los grupos de HS y BMP2 fueron comparadas con la condición de células en preconfluencia (pC), como grupo control. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

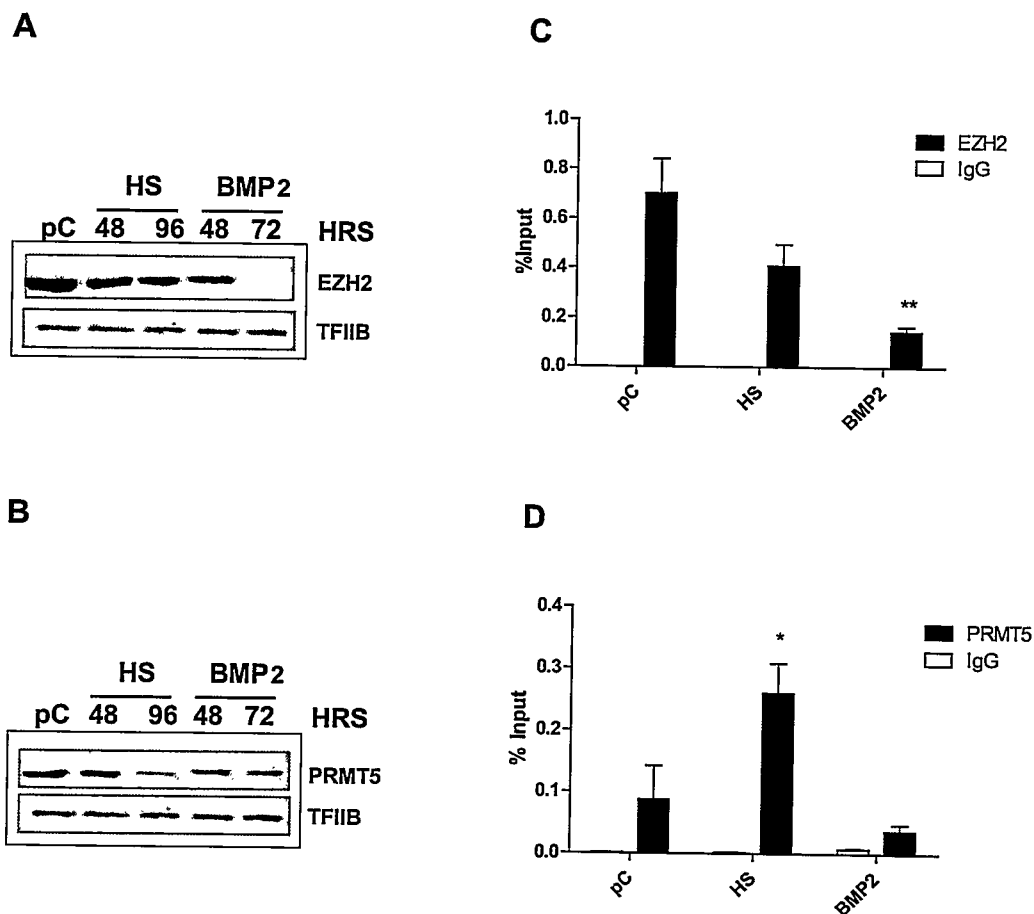


Figura 15. Perfiles de expresión y análisis de la unión de EZH2 y PRMT5 al promotor P1 de Runx2 en C2C12.

A y B. Células C2C12 fueron cultivadas y tratadas con Suero de caballo (HS) o BMP-2 en diferentes tiempos. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpos específicos. **C y D.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de: Células C2C12 en preconfluencia (40% confluencia), diferenciadas al linaje miogénico (HS) y óseo (BMP2) por 72 horas, izquierda. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). Los grupos de HS (células tratadas con suero de caballo) y BMP2 fueron comparadas con la condición de células en preconfluencia (pC), como grupo control. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

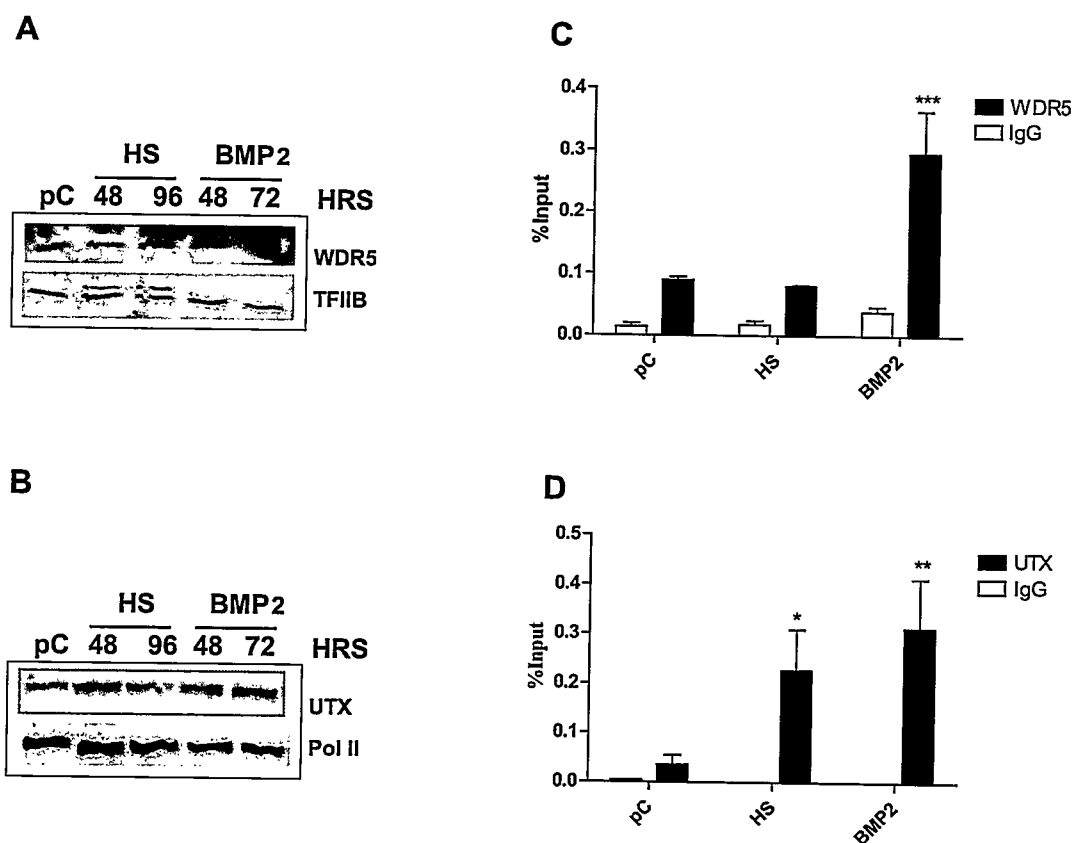


Figura 16. Perfiles de expresión y análisis de la unión de WDR5 y UTX; en células C2C12.

A y B. Células C2C12 fueron cultivadas y tratadas con Suero de caballo (HS) o BMP2 en diferentes tiempos. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpos específicos. **C y D.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de: Células C2C12 en preconfluencia (40% confluencia), diferenciadas al linaje miogénico (HS) y óseo (BMP2) por 72 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett).

La condición de preconfluencia (pC) fue utilizada como grupo control para los análisis estadísticos. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

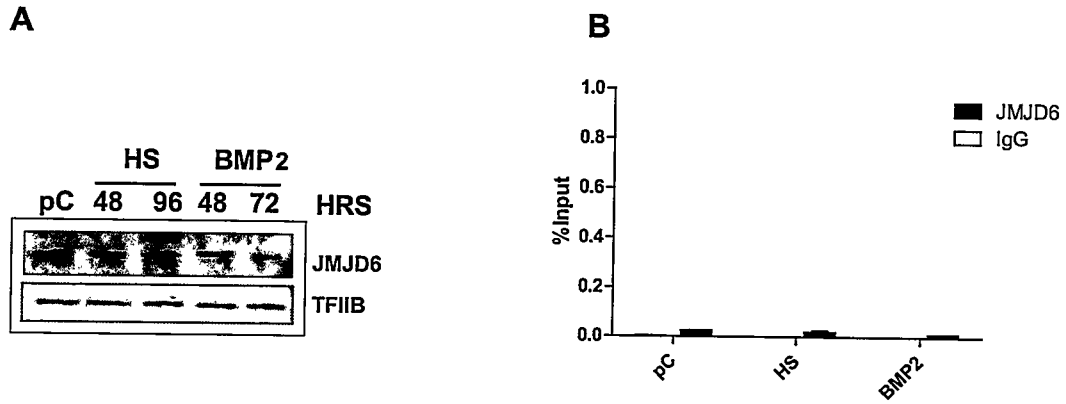


Figura 17. Perfil de expresión y análisis de la unión de JMJD6 al promotor P1 de Runx2 en C2C12.

A. Células C2C12 fueron cultivadas y tratadas con Suero de caballo (HS) o BMP2 en diferentes tiempos. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpo específico para JMJD6. **B.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de: Células C2C12 en preconfluencia (40% confluencia), diferenciadas al linaje miogénico (HS) y óseo (BMP2) por 72 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). La condición de preconfluencia (pC) fue utilizada como grupo control para los análisis estadísticos.

3.3.2. WDR5 y UTX son reclutadas al promotor P1 de Runx2 durante la diferenciación osteoblástica de células MC3T3.

A continuación se analizaron los perfiles de expresión, mediante western blot, de las enzimas descritas anteriormente en células MC3T3 luego de dos y cinco días de diferenciación (5d y 8d).

Como se muestra en la figura 18 (A y B), se encontró que la expresión de las enzimas WDR5 y UTX, miembros del complejo "MLL/COMPASS-like", se mantiene constante durante todo el proceso de diferenciación (temprana y tardía). Consecuentemente, los análisis de ChIP mostraron que estas dos proteínas están unidas al promotor P1 en etapas tempranas de la diferenciación y que esta unión se incrementa luego de 8 días de diferenciación (Fig 18 C y D), en paralelo con el incremento en la expresión de Runx2-II/P57 (Fig 9). Estos resultados confirman que la presencia de este complejo WDR5/UTX en el promotor P1 podría estar contribuyendo a regular la actividad del gen Runx2 mediante cambios epigenéticos mediados por sus actividades como enzima metiltransferasa y demetilasa, respectivamente.

El análisis de los perfiles de expresión de las proteínas NO66, JARID1B, EZH2 y PRMT5 mediante western blot, demostró que estas enzimas tienen una expresión que permanece relativamente constante en todos los días de diferenciación evaluados (Figs 19 y 20). A pesar de lo anterior, los ensayos de ChIP demostraron que ninguna de estas enzimas se une significativamente al

promotor P1 del gen Runx2, durante el proceso de diferenciación osteoblástica (Fig 19 y 20). Este resultado reafirmaría la función de todas estas enzimas como represoras del gen Runx2.

Finalmente, al analizar la expresión de la proteína JMJD6 en las células MC3T3 en diferenciación, encontramos que ésta se mantuvo constante (Fig. 21 A). Los resultados de ChIP demostraron que JMJD6 no es reclutada al promotor P1 del gen Runx2 durante la diferenciación osteogénica (Fig 21 B).

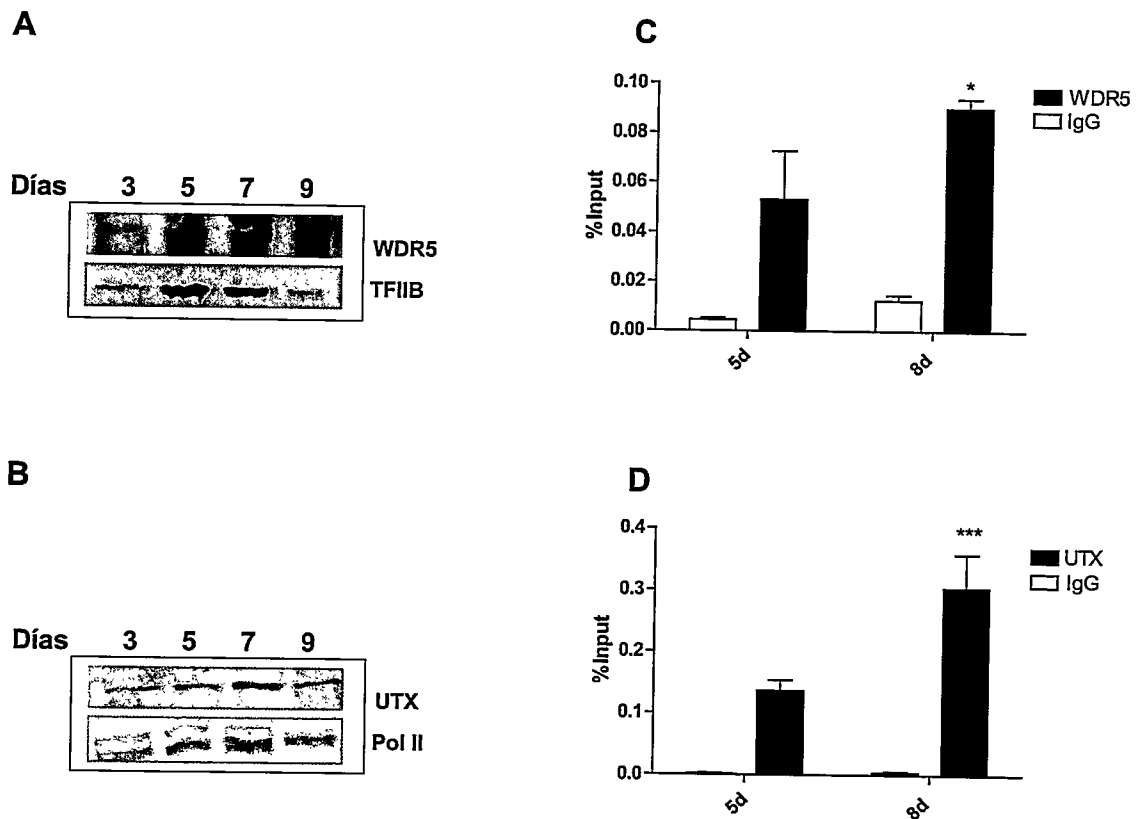


Figura 18. Perfiles de expresión y análisis de la unión de WDR5 y UTX en células MC3T3.

A y B. Células MC3T3 fueron cultivadas en medio suplementado con ácido ascórbico por 3,5,7 y 9 días. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpos específico para WDR5 y UTX. **C y D.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células MC3T3 de 3 y 8 días de cultivo. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

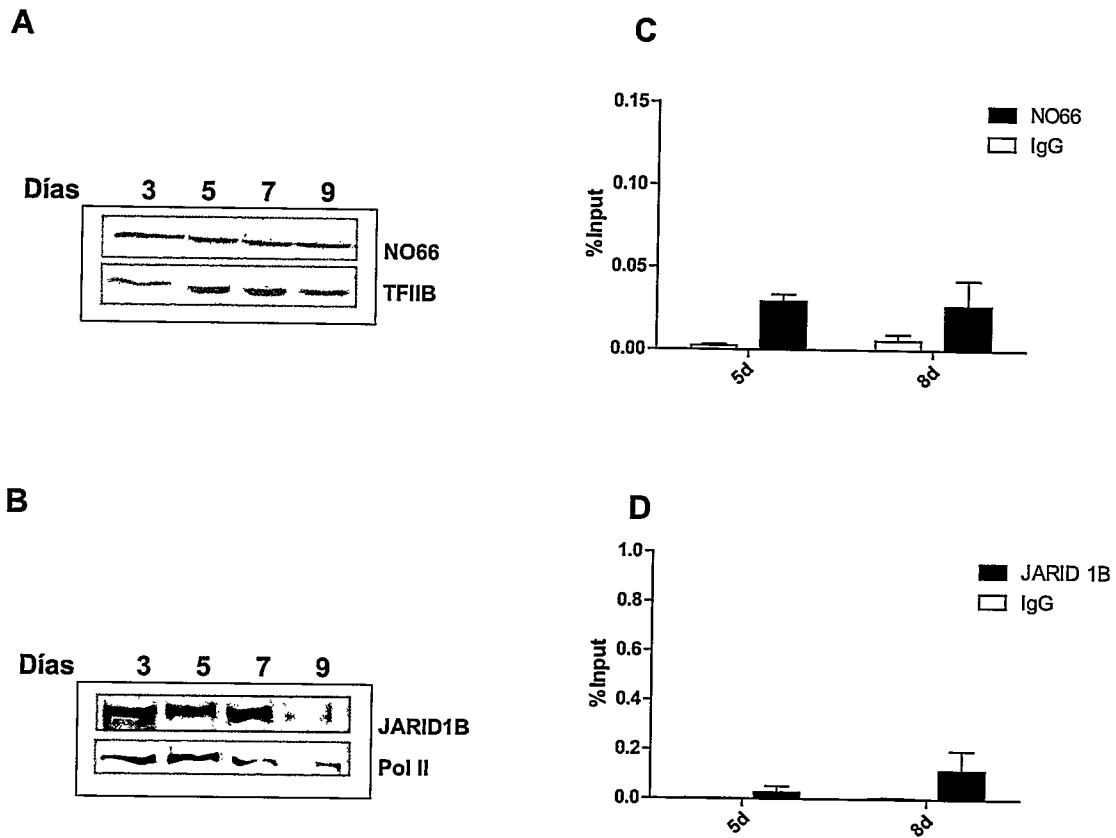


Figura 19. Perfiles de expresión y análisis de la unión de NO66 y JARID1B en células MC3T3.

A y B. Células MC3T3 fueron cultivadas en medio suplementado con ácido ascórbico por 3, 5, 7 y 9 días. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpos específico para NO66 y JARID1B. **C y D.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células MC3T3 de 3 y 8 días de cultivo. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, usando como grupo control la condición de día 5.

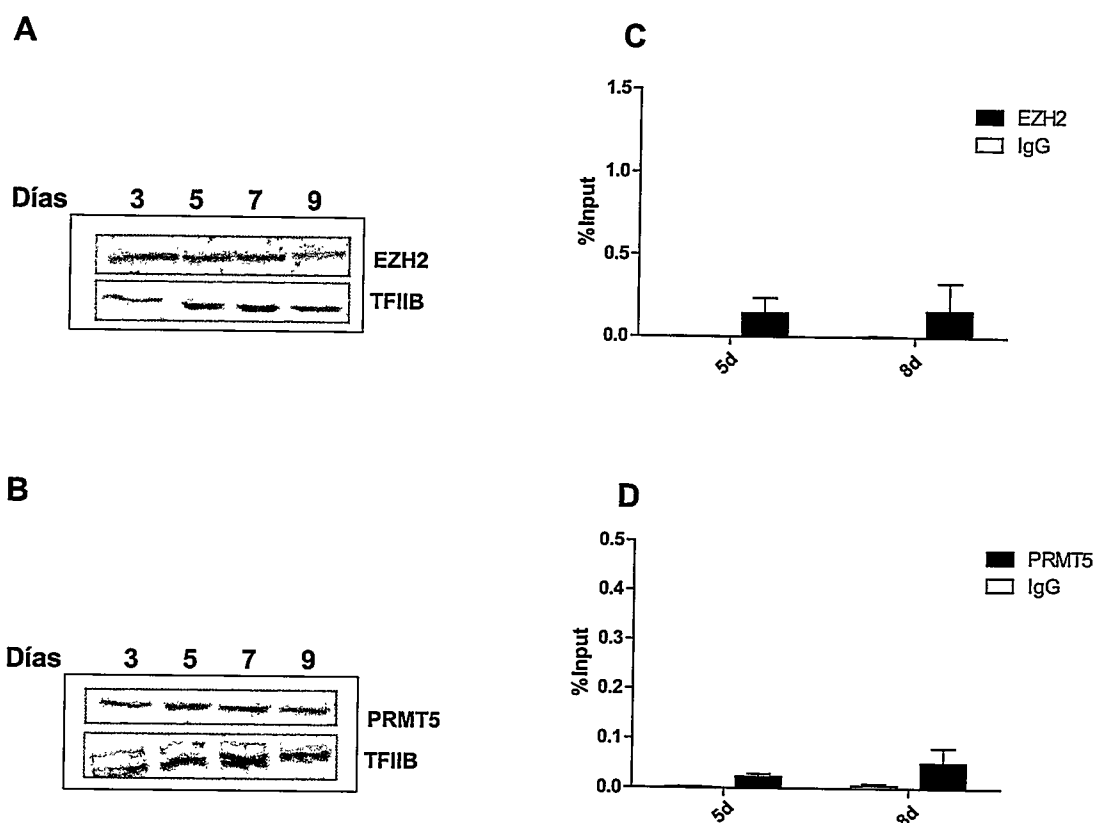


Figura 20. Perfiles de expresión y análisis de la unión de EZH2 y PRMT5 al promotor P1 de Runx2 en células MC3T3.

A y B. Células MC3T3 fueron cultivadas en medio suplementado con ácido ascórbico por 3, 5, 7 y 9 días. Los niveles de expresión de proteína fueron evaluados mediante Western blot, con anticuerpos específicos para EZH2 y PRMT5. **C y D.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células MC3T3 de 3 y 8 días de cultivo. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de día 5.

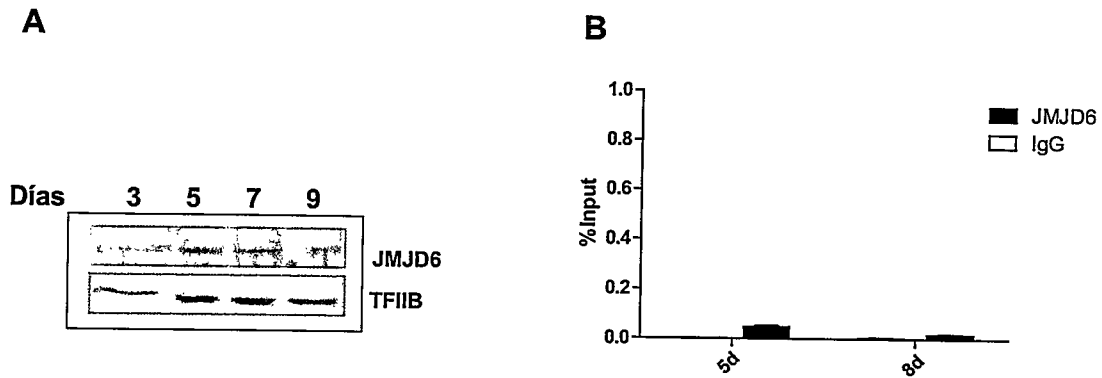


Figura 21. Perfil de expresión y análisis de la unión de JMJD6 al promotor P1 de Runx2 en células MC3T3.

A. Células MC3T3 fueron cultivadas en medio suplementado con ácido ascórbico por 3, 5, 7 y 9 días. Los niveles de expresión de proteína fue evaluada mediante Western blot, con anticuerpos específico para JMJD6. **B.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de: Células MC3T3 día 3 y 8 de cultivo. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, tomando como grupo control la condición del día 5.

3.4 Contribución de NO66 en la regulación transcripcional del gen Runx2.

Con el objetivo de determinar la contribución de NO66 en el proceso de inactivación transcripcional del gen Runx2-II/p57 a través de su actividad demetilasa de H3K4Me3, se realizaron experimentos de silenciamiento génico mediante el uso de vectores lentivirales en células C2C12 y MC3T3. La disminución en la expresión de NO66 se verificó mediante ensayos de qRT-PCR (Fig 22A) y Western blot (Fig 22 B), para demostrar un descenso de tanto el ARNm como la proteína NO66, respectivamente.

3.4.1 Silenciamiento de NO66 en células C2C12.

Células C2C12 fueron infectadas por 48 y 72 horas con partículas virales que codificaban shARNs contra NO66. Encontramos que el tratamiento disminuía en un 80% el ARNm (Fig 22 A), lo que se vio reflejado en la disminución de la proteína (60% aproximadamente) (Fig 22 B). A continuación evaluamos el efecto de esta disminución de la expresión de NO66 sobre los niveles de ARNm de Runx2-II/p57, a través de ensayos de qRT-PCR, en células C2C12 infectadas con shARN y diferenciadas hacia el linaje miogénico y osteogénico por 48 y 72 horas.

En las células C2C12 diferenciadas al linaje osteogénico (BMP2), los resultados demostraron que la disminución en la expresión de NO66, se traduce en un aumento en la expresión de Runx2-II/p57 y de osteocalcina a las 48 horas de tratamiento (Fig 23 A y C). Sin embargo, cuando este tratamiento

se extiende hasta las 72 horas, la expresión de estos dos genes no muestra diferencia significativa con la expresión obtenida bajo la condición control (Fig. 23 A y C). Debido a este resultado, los ensayos de ChIP para evaluar los cambios en la H3K4Me3 fueron también realizados a las 48 horas de tratamiento.

El análisis de la expresión de Runx2-II/p57 y Osteocalcina en condiciones de silenciamiento de NO66 por 48 o 72 horas y de diferenciación hacia el linaje miogénico, no reveló ningún cambio en la expresión de estos dos marcadores (Fig 23 B y D). De forma similar se determinó que no se afectó la expresión de miogenina cuando se disminuyó la expresión de NO66 (Fig 23 E y F), lo que permite concluir que NO66 no participaría en la regulación transcripcional de miogenina.

Para confirmar la función de NO66 como demetilasa de lisina 4 de la histona H3 en el promotor P1 de Runx2; se realizaron experimentos de ChIP en células C2C12 previamente tratadas con shARN dirigido a NO66 por 48 horas y diferenciadas hacia los dos linajes en estudio. Coincidente con una marcada disminución en la unión de NO66 sobre la región promotora P1 (Fig 24 A); se observó un aumento en los niveles de H3K4Me3 en las C2C12 diferenciadas a miotubos (Fig 24 B). Sin embargo, este enriquecimiento en H3K4Me3 no se tradujo en la activación transcripcional de Runx2-II/p57 (Fig 23 B). Por otra parte al analizar las células C2C12 diferenciadas hacia el linaje osteogénico (BMP2) en condiciones de expresión reducida de NO66, se observó un

enriquecimiento significativo en los niveles de H3K4Me3 que se relaciona bien con los aumentos en el mensajero de la isoforma p57 de Runx2 detectados (Fig 24 B).

3.4.2. Silenciamiento de NO66 en células MC3T3.

Células MC3T3 fueron infectadas al día 3 de cultivo con partículas lentivirales que codifican un shARN de NO66 por 48 horas (día 5). El silenciamiento de NO66 en las células MC3T3 se verificó mediante ensayos de RT-PCR (Fig 25 A) y Western blot (Fig 25 B), para demostrar la disminución del ARNm y de la proteína, respectivamente.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la disminución de la expresión de NO66 sobre los niveles de ARNm de Runx2-III/p57 y osteocalcina, a través de ensayos de RT-PCR en tiempo real. Encontramos que las expresiones de Runx2-III/p57 y de osteocalcina aumentaron respecto a las detectadas en la condición control, cuando la expresión de NO66 estuvo disminuida (Figura 25 C y D). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores, en los que se había reportado que en cultivos de MC3T3 transfectadas con siRNA para NO66, la expresión de genes como colágeno 1 α y Bsp aumentaron significativamente; lo que se tradujo en una aceleración en el proceso de diferenciación osteoblástico (Sinha y col., 2010).

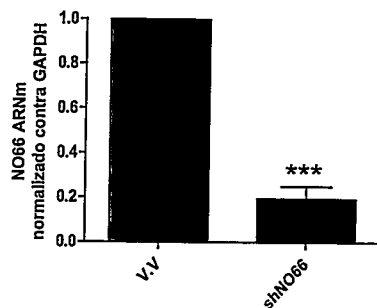
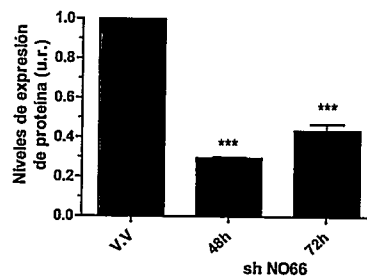
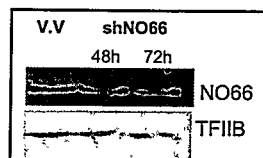
A**B**

Figura 22. Silenciamiento de NO66 en células C2C12 . **A.** ARN total fue extraído desde células C2C12 infectadas con el shRNA para NO66 ó el shRNA control (Virus vacío, V.V) y posteriormente cultivadas por 48 horas. Posteriormente el ARN fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para NO66. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, usando como control la condición de virus vacío V.V para el análisis. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de NO66. Extractos nucleares de células C2C12 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para NO66. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett) , usando como grupo control, la condición de virus vacío (V.V). *** $p < 0.001$.

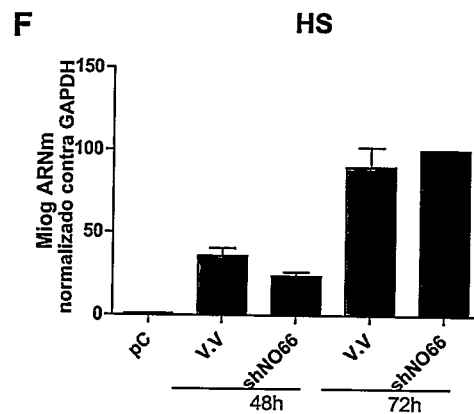
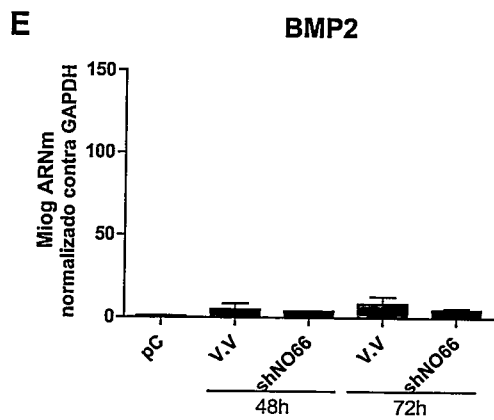
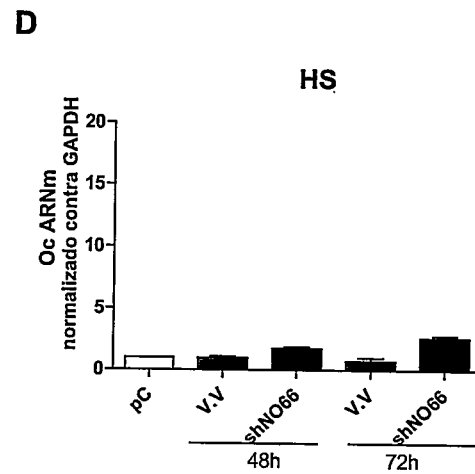
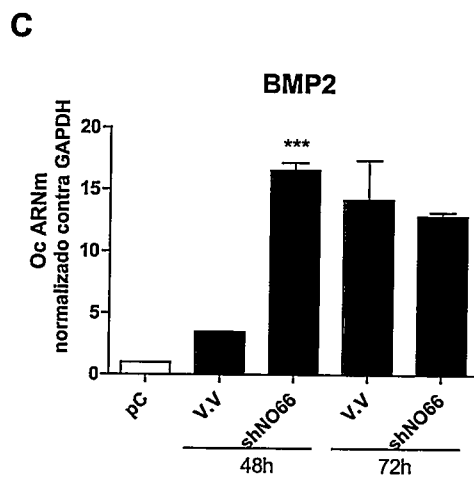
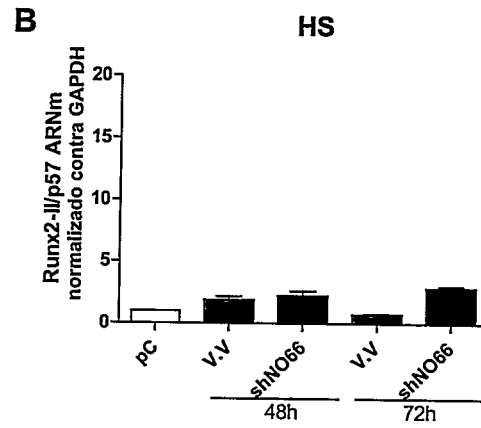
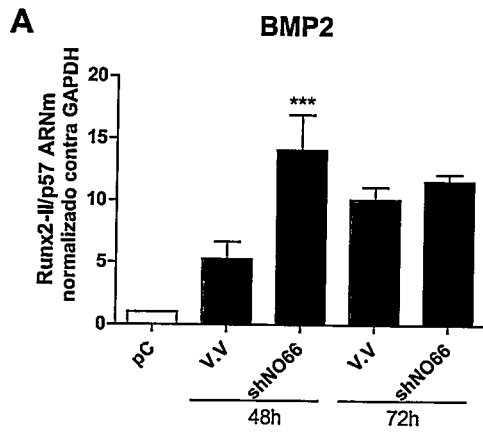


Figura 23. Silenciamiento de NO66 en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia, pC, (blanco) fueron infectadas con shRNA para NO66 (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57, **A** y **B**; Osteocalcina (OC), **C** y **D**; y miogenina (miog) **E** y **F**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de virus vacío en cada uno de los tiempos analizados. *** $p < 0.001$.

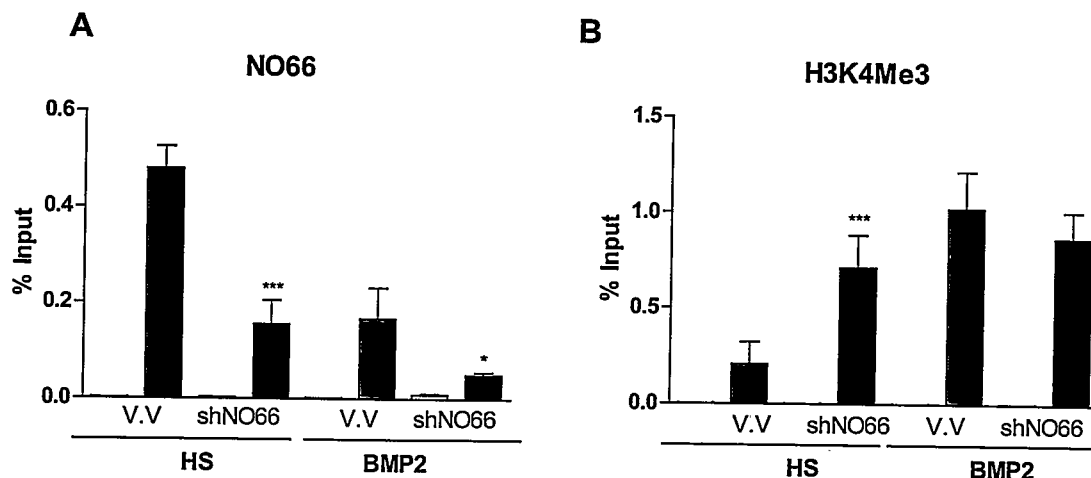


Figura 24. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de NO66. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para NO66 (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 48 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres experimentos representativos (dos cuantificaciones de cada uno). Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por t-student en los que se utilizó a la condición de V.V como control para cada uno de los tratamientos. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. **A.** Unión de NO66 al promotor P1 de Runx2-Iip57. **B.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. H3K4Me3.

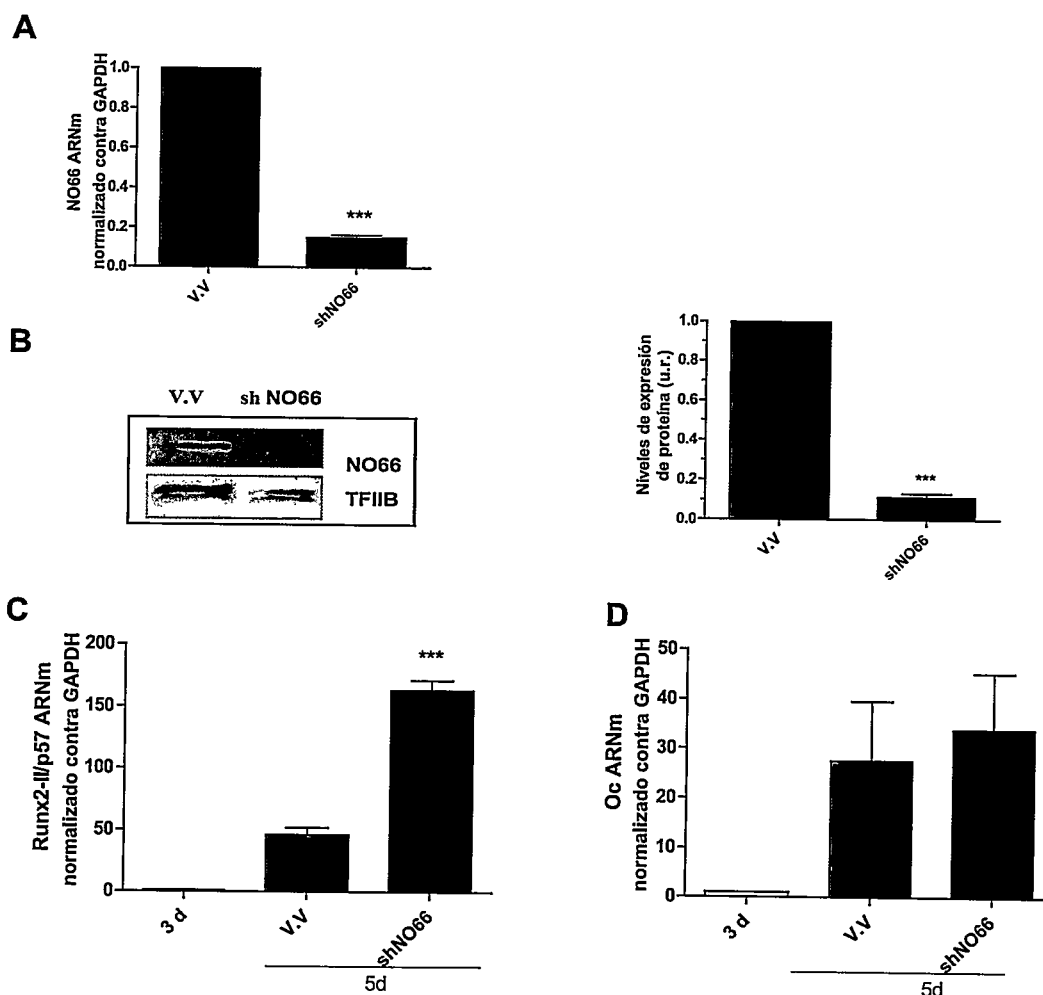


Figura 25. Silenciamiento de NO66 en células MC3T3. Células MC3T3 de 3 días de cultivo (blanco) fueron infectadas con shRNA para NO66 (negro) o shRNA control (V.V, gris). Las muestras fueron colectadas el día 5 de cultivo. **A.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para NO66. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de NO66. Extractos nucleares de células MC3T3 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para NO66. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. **C y D,** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-Il/p57 y osteocalcina (OC). Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V, en A, B, C y D. *** $p < 0.001$.

3.5. Contribución de JARID1B en la regulación transcripcional del gen Runx2.

JARID1B es una enzima con función demetilasa de H3K4Me3 y por lo tanto, ha sido clasificada como represor transcripcional (Volkel y col., 2007).

Por ello y para determinar su potencial función reguladora sobre la transcripción del gen Runx2-II/p57, se realizaron experimentos de silenciamiento génico de JARID1B y posteriormente se evaluó su efecto en la expresión de Runx2-II/p57.

3.5.1 Silenciamiento de JARID1B en células C2C12.

Células C2C12 preconfluentes fueron infectadas con partículas virales que codifican un shARN dirigido contra el mRNA de JARID1B. Posteriormente, se evaluó la eficiencia del silenciamiento mediante experimentos de qRT-PCR y Western blot (Fig 26 A y B). Encontramos que el shARN para JARID1B indujo una disminución del 80% de su ARNm (Fig. 26 A), y que se tradujo en la disminución del 80% de la proteína (Fig. 26 B).

Posteriormente, en células C2C12 diferenciadas a los linajes miogénico y osteogénico por 48 y 72 horas, se analizó el efecto de la disminución en la expresión de JARID1B sobre la transcripción de Runx2-II/p57, Osteocalcina y miogenina.

En células C2C12 estimuladas con BMP2, encontramos que la disminución de JARID1B se tradujo en un aumento de aproximadamente un 90% respecto de su control (V.V) en la expresión del ARNm de Runx2-II/p57 en etapas tempranas de diferenciación (48 horas) (Fig 27 A). En concordancia con lo anterior la expresión de osteocalcina también presentó un aumento significativo a las 48 y 72 horas de diferenciación respecto de su control (V.V) (Fig 27 C).

Interesantemente, el silenciamiento de JARID1B en células C2C12 tratadas con HS, se reflejó en un aumento en los niveles de ARN mensajero de la isoforma p57 de Runx2 respecto a la detectada en la condición control (V.V) (Fig. 27 B). También, bajo estas condiciones experimentales se detectó que la expresión del mensajero de osteocalcina aumentó significativamente a las 48 horas de tratamiento (Fig. 27 D). Este resultado demuestra que JARID1B es un componente relevante en el mecanismo de represión transcripcional de Runx2. Por otra parte, la expresión del ARNm de miogenina, también registró un aumento en condiciones de silenciamiento de esta enzima, lo que sugiere que JARID1B podría estar participando en la regulación transcripcional de este gen.

Para evaluar si la contribución de JARID1B en la regulación transcripcional de Runx2, está relacionada con su acción demetilasa de H3K4Me3, se realizaron ensayos de silenciamiento génico (mediante shARN-JARID1B), acoplados a experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina. Estos experimentos fueron realizados con muestras colectadas después de 48 horas de tratamiento, dado que la máxima respuesta transcripcional de la isoforma p57

de Runx2, en los dos tipos de tratamiento (HS y BMP2) ocurrió en este tiempo (Fig 27)

Encontramos que el knockdown de JARID1B, en las células tratadas con HS se traduce en una disminución significativa del reclutamiento de JARID1B a la región promotora P1 y se acompaña de un aumento de la H3K4Me3 en esta región del promotor. Estos resultados indican que JARID1B participaría en la represión transcripcional de Runx2-II/p57, mediante su acción demetilasa de H3K4Me3 (Fig 28 A y B).

3.5.2 Silenciamiento de JARID1B en células MC3T3.

Células MC3T3, en el día 3 de cultivo, fueron infectadas con las partículas lentivirales que codifican para el shARN-JARID1B y muestras de ARN y proteína fueron colectadas dos días después. En estas muestras se analizó la eficiencia del silenciamiento mediante qRT-PCR y western blot (Fig. 29 A y B). Detectamos una reducción en la expresión del ARNm de JARID1B del 80%, que se tradujo en la disminución del 70% de su proteína. Posteriormente, se evaluó la expresión del ARNm de Runx2-II/p57 y osteocalcina; encontrando que una baja de la enzima produce un aumento significativo en la expresión del mensajero de Runx2-II/p57 de aproximadamente un 30% a las 48 horas de diferenciación, comparada con la expresión detectada para la condición control (V.V) (Fig. 29 C). De igual manera los niveles de expresión del ARNm de

osteocalcina también se vieron aumentados significativamente (Fig 29 D). Estos resultados confirman lo encontrado en las células C2C12, es decir demuestran una activa participación de JARID1B en el control transcripcional de Runx2.

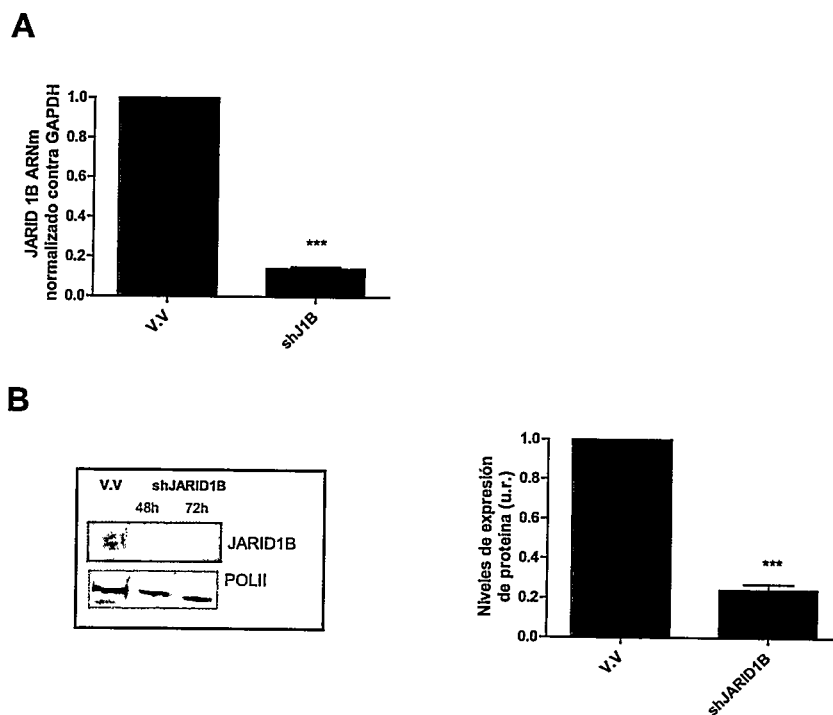


Figura 26. Control del silenciamiento de JARID1B en células C2C12 .
A. ARN total fue extraído desde células C2C12 infectadas con el shRNA para JARID1B (negro) ó el shRNA control (Virus vacío, V.V, gris) y posteriormente cultivadas por 48 horas. Posteriormente el ARN fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para JARID1B. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de JARID1B. Extractos nucleares de células C2C12 fueron analizados por PAGE-SDS al 6% y Western blot con anticuerpos específicos para JARID1B. Como control de carga se detectó la Pol II. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. Como grupo control se usó la condición de V.V. *** $p < 0.001$.

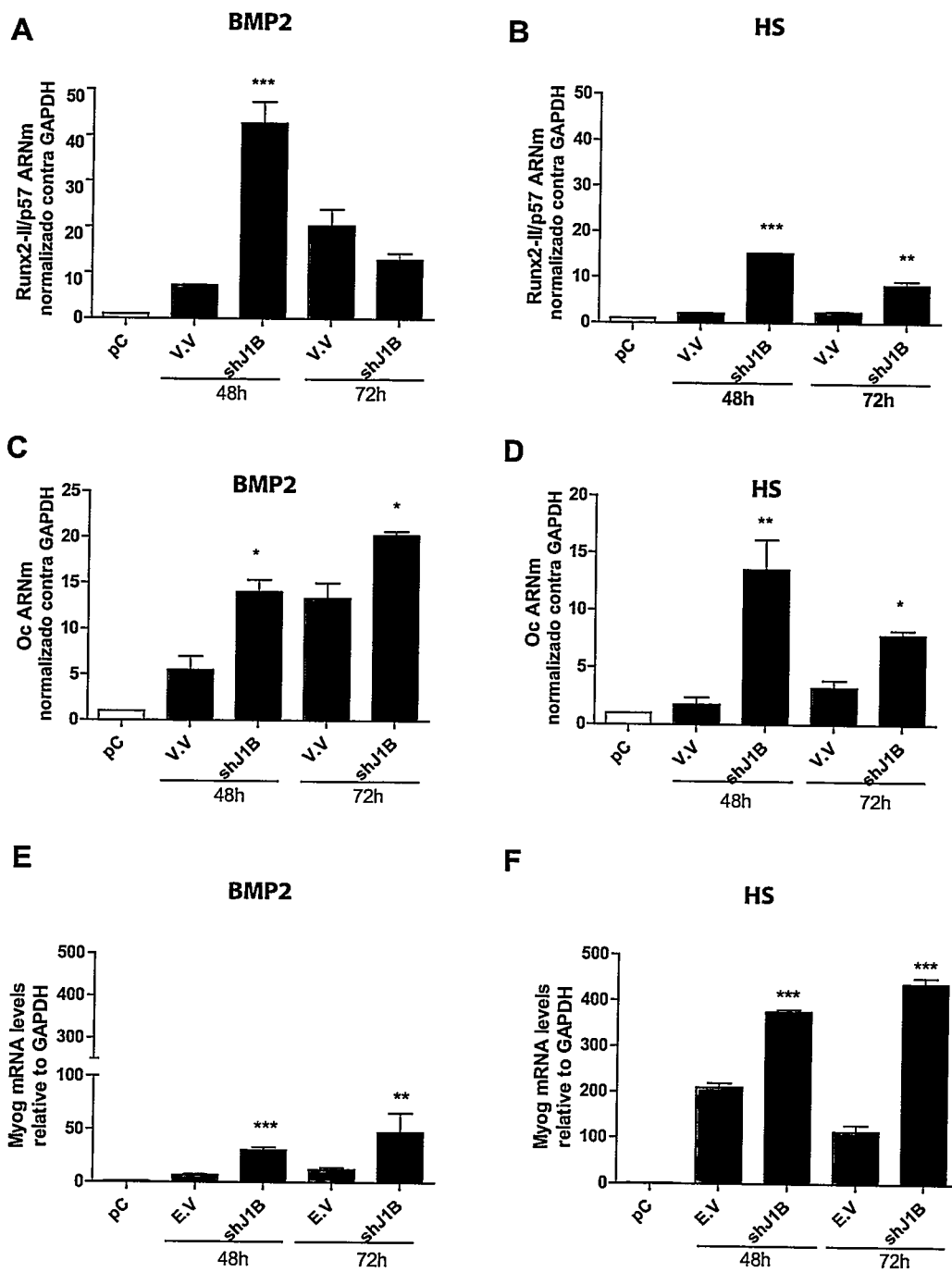


Figura 27. Silenciamiento de JARID1B en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia (blanco) fueron infectadas con shRNA para JARID1B (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP-2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57, **A** y **B**; Osteocalcina (OC), **C** y **D**; y miogenina (miog) **E** y **F**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. Como grupo control se usaron las condiciones de V.V en cada uno de los tiempos analizados. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

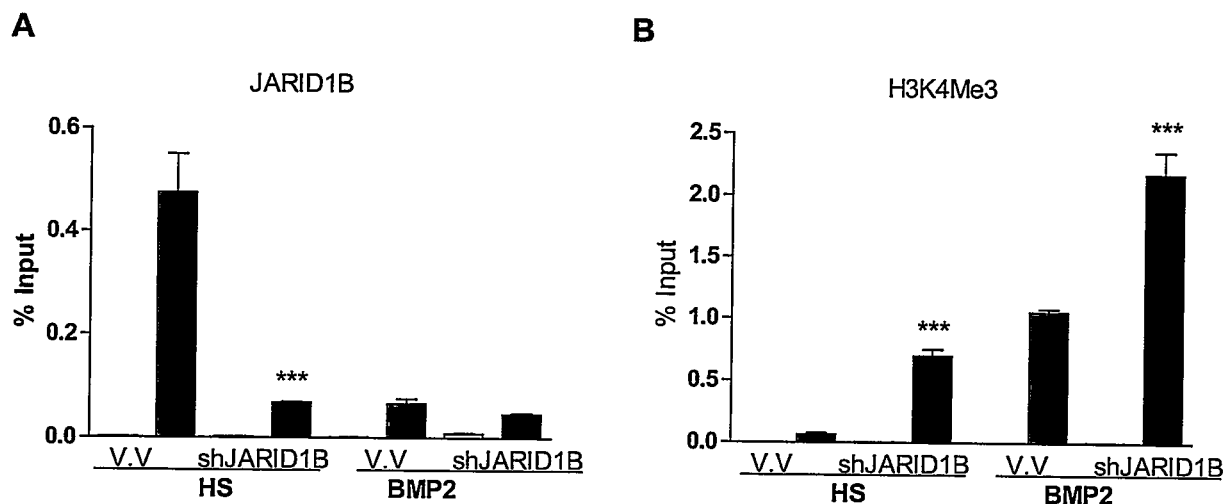


Figura 28. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de JARID1B. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para JARID1B (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 48 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres experimentos independientes cuantificados en duplicado. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando la condición de V.V como grupo control. *** $p < 0.001$ **A.** Unión de JARID1B al promotor P1 de Runx2-Iip57. **B.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. H3K4Me3.

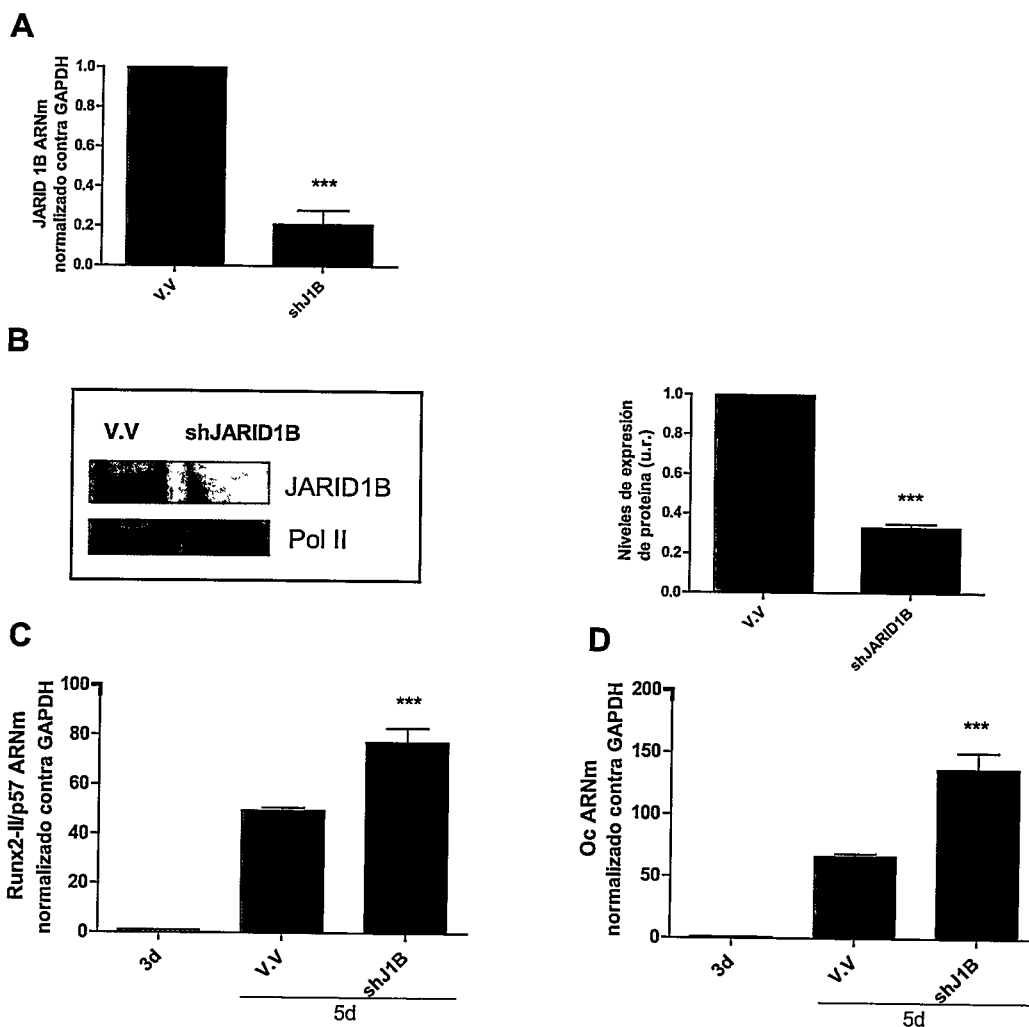


Figura 29. Silenciamiento de JARID1B en células MC3T3. Células MC3T3 de 3 días de cultivo (blanco) fueron infectadas con shRNA para JARID1B (negro) o shRNA control (V.V, gris). Las muestras fueron colectadas el día 5 de cultivo. **A.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para JARID1B. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de NO66. Extractos nucleares de células MC3T3 fueron analizados por PAGE-SDS al 6% y Western blot con anticuerpos específicos para JARID1B. Como control de carga se detectó La Pol II. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. **C.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57 y osteocalcina (OC). Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V, en A, B, C y D. *** $p < 0.001$.

3.6. Rol de EZH2 en la regulación transcripcional de Runx2.

Utilizando una estrategia experimental similar a lo expuesto anteriormente, evaluamos si EZH2 contribuye a la represión transcripcional de Runx2, mediando la trimetilación de la lisina 27 de las histonas H3 asociadas al promotor P1 de este gen.

3.6.1 Silenciamiento de EZH2 en C2C12.

Se realizaron los experimentos de silenciamiento génico de EZH2 en células C2C12 y se evaluó la expresión de los mensajeros de Runx2-III/p57, Oc y Miogenina.

El uso del shARN contra EZH2 llevó a una disminución de aproximadamente un 60% en la expresión de su ARNm, respecto al control (Fig 30 A), lo que se acompañó de una disminución del 80% en la proteína (Fig 30 B). La disminución en la expresión de EZH2 no indujo ningún cambio en la actividad transcripcional de Runx2 (Fig 31 A) en las células C2C12 tratadas con BMP2 por 48 o 72 horas; siendo estos resultados congruentes con los niveles de H3K27Me3 detectados mediante ChIP, en células bajo el mismo tratamiento (Fig 32 B).

Contrario a lo anterior, la expresión del ARN mensajero de osteocalcina se vio significativamente disminuida con el silenciamiento de EZH2 a las 72 horas de

cultivo (Fig 31 B). Con el fin de comprender este resultado inesperado, se evaluó la expresión del ARN mensajero de EZH1 bajo estas mismas condiciones experimentales. Los resultados mostraron que el knockdown de EZH2, provoca un aumento muy significativo en la expresión de EZH1, lo que podría explicar la disminución detectada en osteocalcina (Fig 31 G y H). Será necesario sin embargo, profundizar en este análisis; situación que escapa a los objetivos de ésta tesis.

De otra parte, el silenciamiento de EZH2 en células tratadas con HS (48 y 72 horas), no produjo cambios en la actividad transcripcional del gen Runx2-II/P57 ni en la de osteocalcina (Fig 31 B y D). A pesar de lo anterior, los resultados de ChIP en células C2C12 sometidas al mismo tratamiento confirmaron que el silenciamiento de EZH2 se asocia con una disminución de su unión al promotor P1 y con una disminución en los niveles de H3K27Me3 (Fig 32 A y B). Es importante comentar que si bien los porcentajes de input obtenidos a partir de la inmunoprecipitación de la H3K27Me3, no nos permiten agrupar los datos para realizar un test estadístico. Los resultados nos muestran una tendencia similar producto del silenciamiento de EZH2 (Fig 32).

Estos resultados nos permiten concluir que si bien la trimetilación de la lisina 27 mediada por EZH2 sería un componente importante en el mecanismo de silenciamiento transcripcional de Runx2-II/p57, no representa el mecanismo principal para prevenir la expresión de Runx2 durante la diferenciación miogénica.

De otra parte, tal como se ha reportado anteriormente en la literatura, el silenciamiento de EZH2 en células C2C12 diferenciadas al linaje miogénico, provocó una disminución altamente significativa en los niveles de expresión de miogenina (Fig 31 E y F) (Stojic., 2011).

3.6.2. Silenciamiento de EZH2 en MC3T3.

Células MC3T3 de día 3 de diferenciación fueron infectadas con partículas lentivirales que codificaban para el shARN de EZH2. El efecto del shARN para EZH2 se tradujo en una disminución en la expresión del ARNm de esta enzima de aproximadamente un 65% (Fig 33 A), lo cual se reflejó en una disminución del 85% de la proteína (Fig 33 B). El silenciamiento en EZH2 no indujo cambios en la expresión de los ARN mensajeros de Runx2-II/p57 y osteocalcina en el tiempo evaluado (48 horas post-infección) respecto a la expresión detectada en la condición control (V.V) (Fig 33 C y D). Resultado que se relaciona con los niveles mínimos detectados de H3K27 y con el bajo reclutamiento de esta enzima en el promotor P1 de Runx2 en células osteoblásticas MC3T3. De igual manera, estos resultados apoyan lo encontrado en las células C2C12 tratadas con BMP2, en los que tampoco se detectaron alteraciones en la expresión de Runx2, producto del silenciamiento de EZH2.

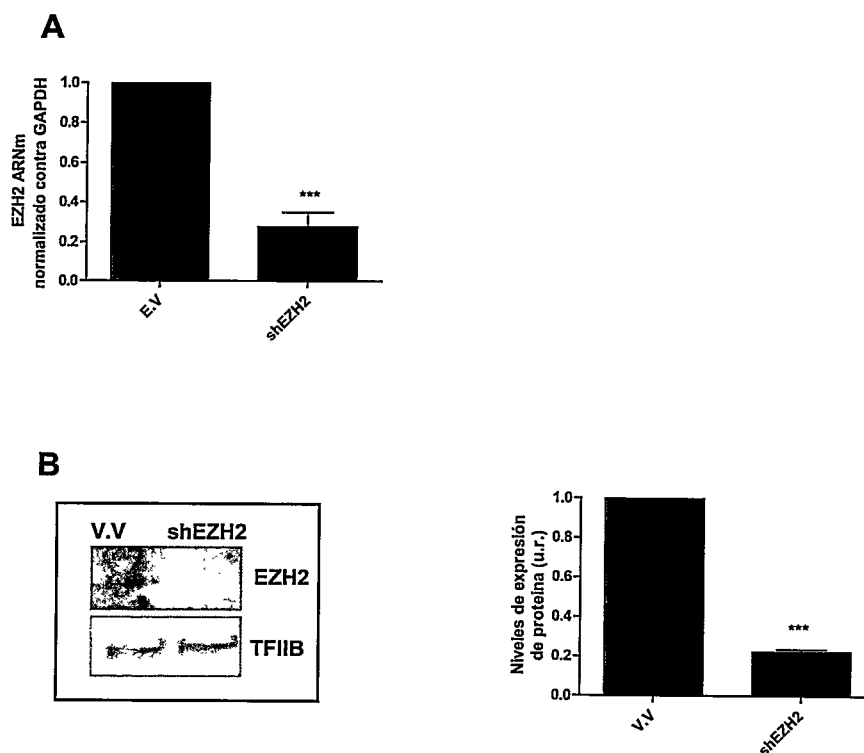


Figura 30. Control del silenciamiento de EZH2 en células C2C12 . A. ARN total fue extraído desde células C2C12 infectadas con el shRNA para EZH2 (negro) ó el shRNA control (Virus vacío, V.V, gris) y posteriormente cultivadas por 72 horas. Posteriormente el ARN fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para EZH2. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de EZH2. Extractos nucleares de células C2C12 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para EZH2. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. Como grupo control se utilizó la condición de V.V. *** $p < 0.001$.

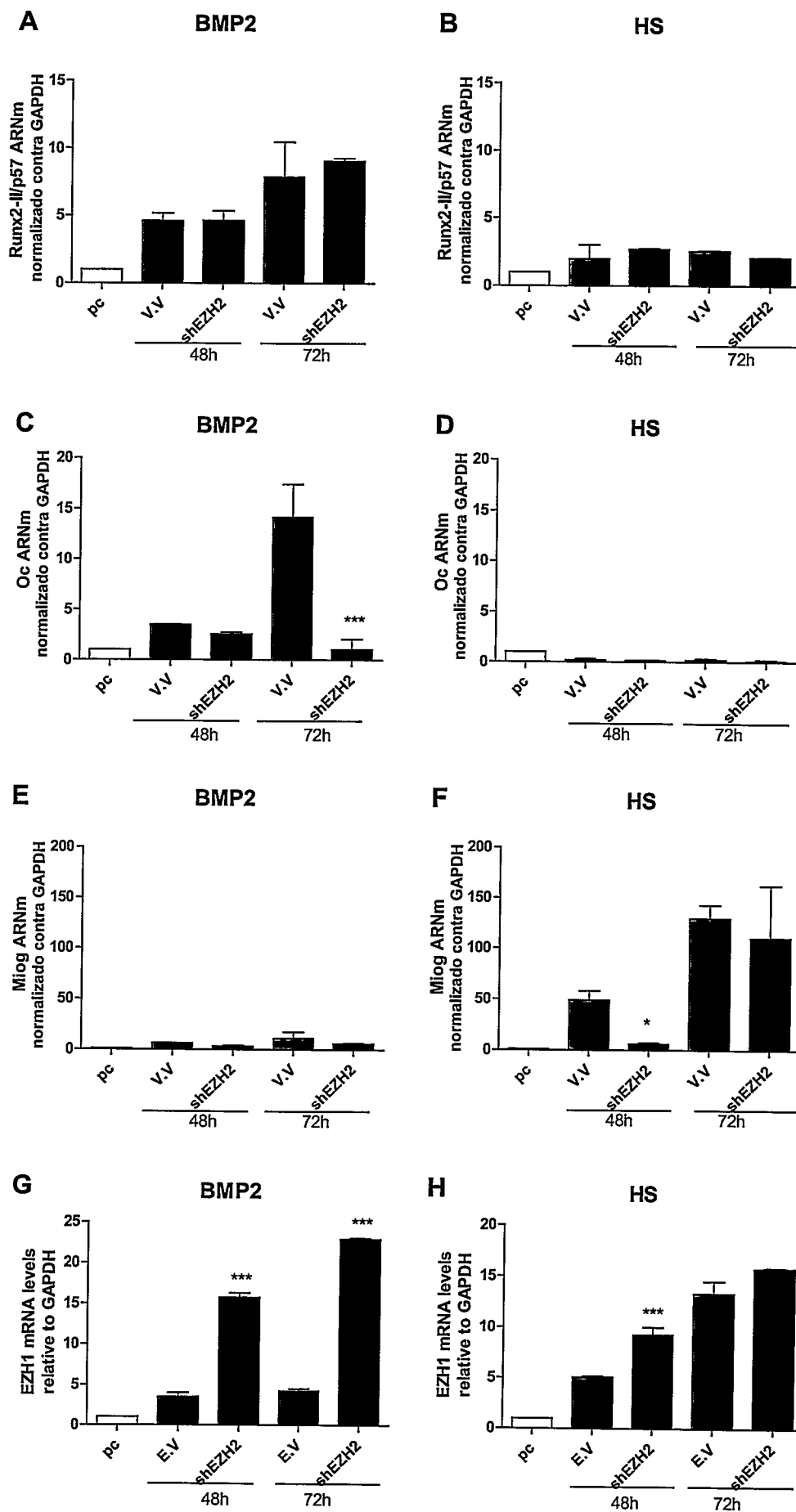


Figura 31. Silenciamiento de EZH2 en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia (blanco) fueron infectadas con shRNA para EZH2 (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57, **A y B**; Osteocalcina (OC), **C y D**; miogenina (miog) **E y F**; y EZH1, **G y H**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de VV en cada uno de los tiempos analizados. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

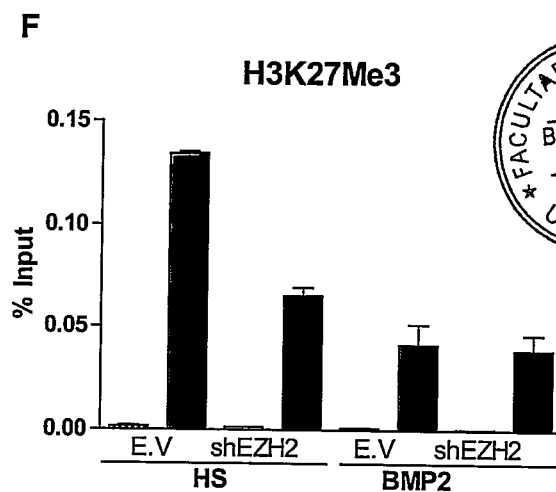
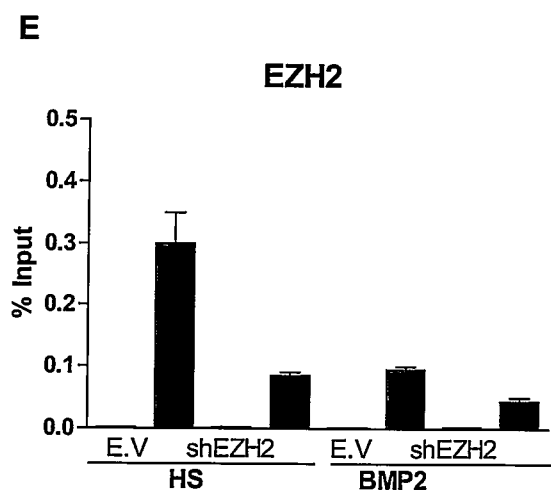
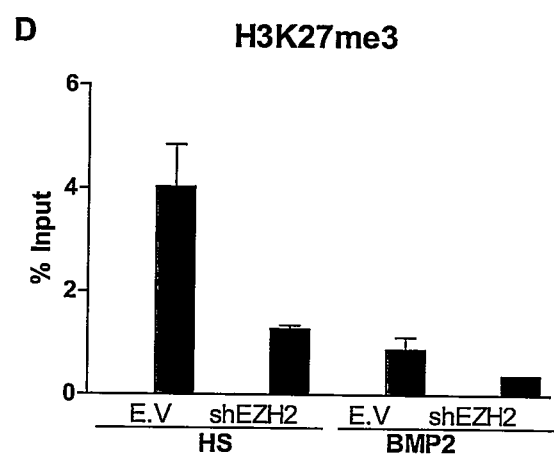
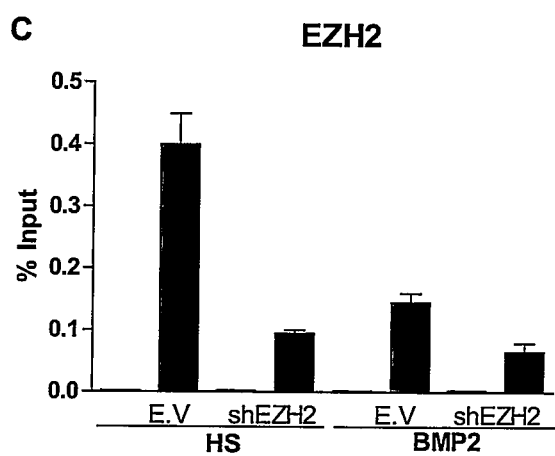
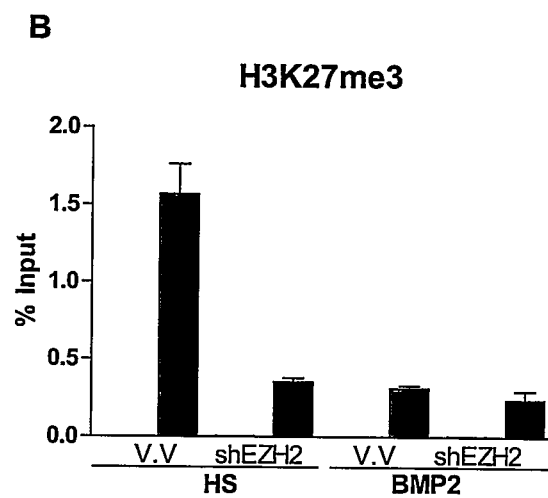
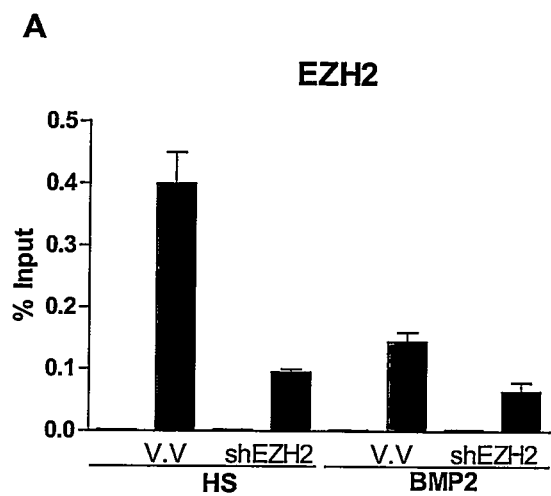


Figura 32. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 27 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de EZH2. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para EZH2 (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP-2 por 72 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes realizados; cada uno de ellos cuantificado por duplicado. Cada barra representa la media +/- E.S.M de esas dos cuantificaciones. **A,C y E.** Unión de EZH2 al promotor P1 de Runx2-Iip57. **B, D y F.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Me3.

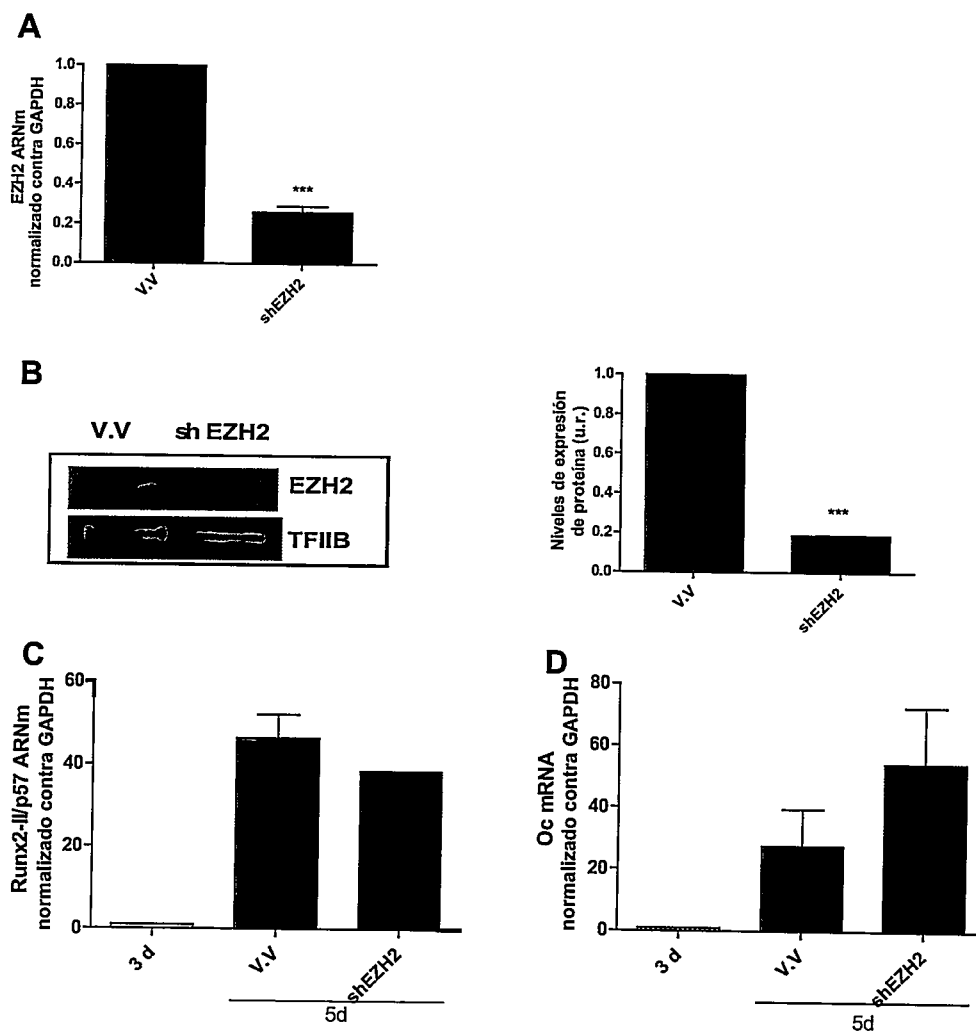


Figura 33. Silenciamiento de EZH2 en células MC3T3. Células MC3T3 de 3 días de cultivo (blanco) fueron infectadas con shRNA para EZH2 (negro) o shRNA control (V.V, gris). Las muestras fueron colectadas el día 5 de cultivo. **A.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para EZH2. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de EZH2. Extractos nucleares de células MC3T3 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para EZH2. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. **C.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57 y osteocalcina, Oc. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V, en A, B, C y D. *** $p < 0.001$.

3.7. Rol de PRMT5 en la regulación transcripcional de Runx2.

La dimetilación simétrica de la arginina 3 en la histona H4 (H4R3Me₂) es una marca asociada a represión transcripcional (Zhao y col., 2009). De igual manera, se ha descrito como enzima catalizadora de esta modificación a PRMT5 (Karkhanis., 2011, Migliori., 2012).

3.7.1. Silenciamiento de PRMT5 en células C2C12.

Cultivos de células C2C12 preconfluentes fueron infectados con partículas virales que codifican shARN contra PRMT5. El tratamiento llevó a una disminución de aproximadamente el 60% en el ARN mensajero de PRMT5 respecto a la condición control (Fig 34 A), lo que se tradujo en la disminución del 60% en la proteína (Fig 34 B).

Los resultados mostraron que esta disminución de PRMT5 no provocó cambios significativos en los niveles de expresión de Runx2-II/p57, osteocalcina y miogenina en los dos tiempos analizados (C2C12 tratadas con HS o BMP2) (Fig 35). Para evaluar el efecto del silenciamiento de PRMT5 sobre la presencia de la marca H4R3Me₂s en el promotor P1 del gen Runx2, se realizaron ensayos de CHIP con el uso de anticuerpos específicos contra PRMT5 y la modificación mencionada. Los resultados mostraron que, en paralelo con el silenciamiento de PRMT5, se detectó una disminución significativa de su reclutamiento al promotor (HS y BMP2) comparada con la

situación control (Fig 36 A). Esta disminución ocurrió en paralelo con la disminución de la marca H4R3Me2s en el promotor P1 (Fig 36 B). Sin embargo, es importante resaltar que a pesar de que la presencia de esta modificación en el promotor P1 disminuye, este cambio epigenético no fue suficiente para que el gen se activara transcripcionalmente durante la diferenciación muscular.

Estos resultados demuestran que si bien la presencia de PRMT5 en el promotor P1 de Runx2 es importante en la represión transcripcional del gen mediando el enriquecimiento de la marca H4R3Me2s, no representaría un mecanismo principal en el control de la expresión de Runx2 en la diferenciación miogénica de células C2C12.

3.7.2. Silenciamiento de PRMT5 en células MC3T3.

La infección de células MC3T3 fue realizada en el día 3 de cultivo y las muestras para análisis fueron colectadas 48 horas después. El shARN de PRMT5 condujo a una disminución en los niveles de expresión del ARNm PRMT5 de aproximadamente el 75% (Fig 37 A), que se tradujo en la disminución del 95% en la expresión de la proteína (Fig 37 B). Esta disminución en la expresión de esta metiltransferasa no afectó la expresión de los ARN mensajeros de Runx2-II/p57 y osteocalcina (Fig 37 C y D).

3.7.3. Silenciamiento de COPR5 en células C2C12.

Se ha descrito que PRMT5 puede metilar simétricamente los residuos de arginina 8 de la histona H3 y arginina 3 de la histona H4 (Lacroix., 2008). Recientemente, se ha demostrado que la especificidad del sustrato de PRMT5 es conferida por el coregulador COPR5 (Enzima cooperadora de PRMT5), la cual promueve la metilación preferencial por parte de PRMT5 de residuos de arginina 3 de la histona H4 sobre los residuos de arginina 8 en histona H3 (Lacroix., 2008). Evaluamos entonces la participación de COPR5 en la regulación transcripcional de Runx2-II/p57 y adicionalmente, analizamos su participación en el reclutamiento de PRMT5 al promotor y en los niveles de enriquecimiento de la H4R3Me2s en la misma región promotora.

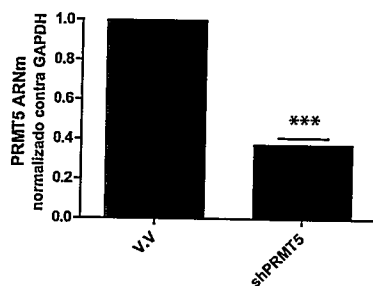
Siguiendo el mismo protocolo de infección descrito en materiales y métodos, células C2C12 fueron infectadas por 48 o 72 horas con partículas lentivirales que codifican un shARN dirigido contra el ARNm de COPR5. Los resultados mostraron una disminución en los niveles de expresión del mensajero de COPR5 de aproximadamente el 75% (Fig 38). Este silenciamiento no provocó cambios en la expresión de ARNm de Runx2-II/p57 y osteocalcina, bajo ninguno de los tratamientos (HS y BMP2) (Fig 39 A y B).

Posteriormente, muestras de cromatina entrecruzada de células C2C12 infectadas con shARNCOPR5 y tratadas con BMP2 o HS, fueron utilizadas para realizar ensayos de ChIP con anticuerpos específicos para detectar la

unión de PRMT5 y el enriquecimiento en la H4R3Me2S en el promotor P1. Es importante destacar que no fue posible detectar directamente la unión de COPR5 al promotor dado que hasta la fecha no existen anticuerpos disponibles que permitan reconocer específicamente esta proteína.

Los experimentos con shARNCOPR5 en células tratadas con HS, indican que como consecuencia del silenciamiento se produce una disminución del reclutamiento de PRMT5 al promotor P1 de Runx2 (Fig 40 A). De igual manera se observó que los niveles de enriquecimiento de la marca H4R3Me2s disminuyeron significativamente (Fig 40 B).

A



B

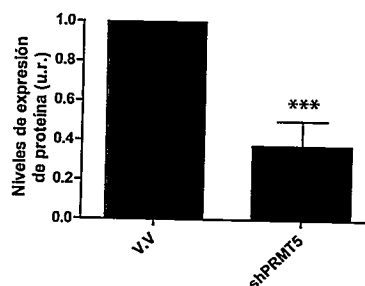
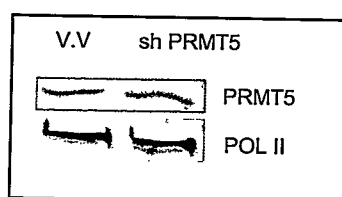


Figura 34. Control del silenciamiento de PRMT5 en células C2C12 .
A. ARN total fue extraído desde células C2C12 infectadas con el shRNA para PRMT5 (negro) ó el shRNA control (Virus vacío, V.V, gris) y posteriormente cultivadas por 72 horas. Posteriormente el ARN fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para PRMT5. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de PRMT5. Extractos nucleares de células C2C12 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para PRMT5. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control el V.V. *** $p < 0.001$.

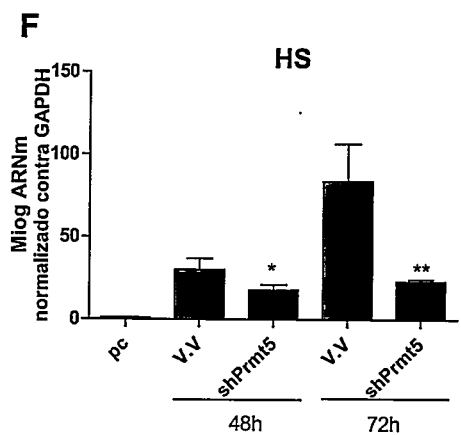
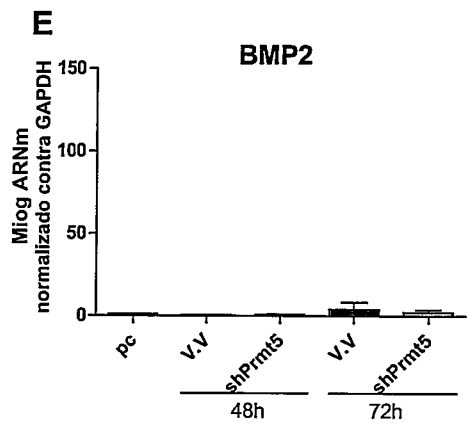
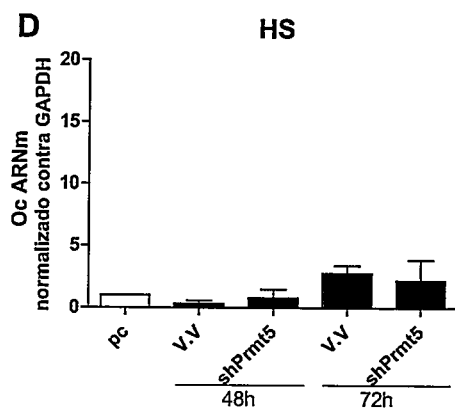
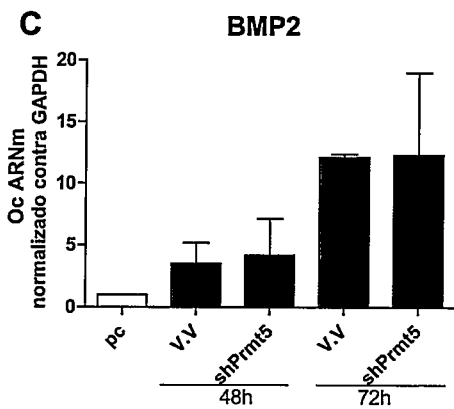
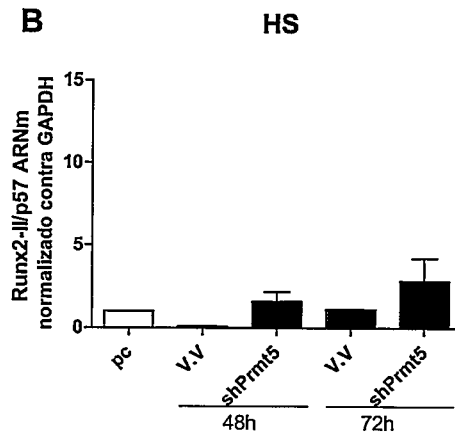
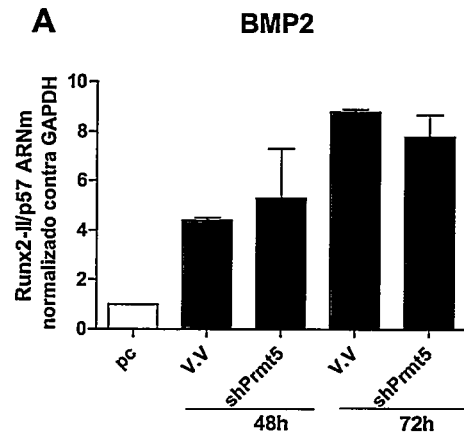


Figura 35. Silenciamiento de PRMT5 en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia (blanco) fueron infectadas con shRNA para PRMT5 (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57, **A** y **B**; Osteocalcina (OC), **C** y **D**; y miogenina (miog) **E** y **F**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V. * *p<0.01, * p<0.05.

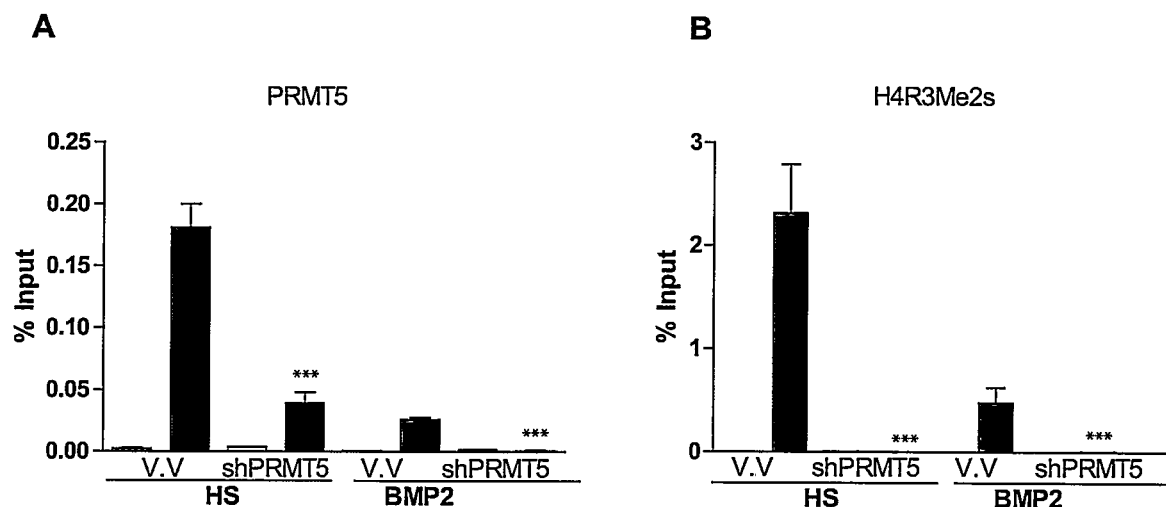


Figura 36. Análisis de la dimetilación simétrica en el residuo de arginina 3 de la histona H4 en células C2C12 luego del silenciamiento de PRMT5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para PRMT5 (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 72 horas. **A.** Unión de PRMT5 al promotor P1 de Runx2-IIP57. **B.** Enriquecimiento de dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4, H4R3Me2s. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V en cada uno de los tratamientos. . *** $p < 0.001$.

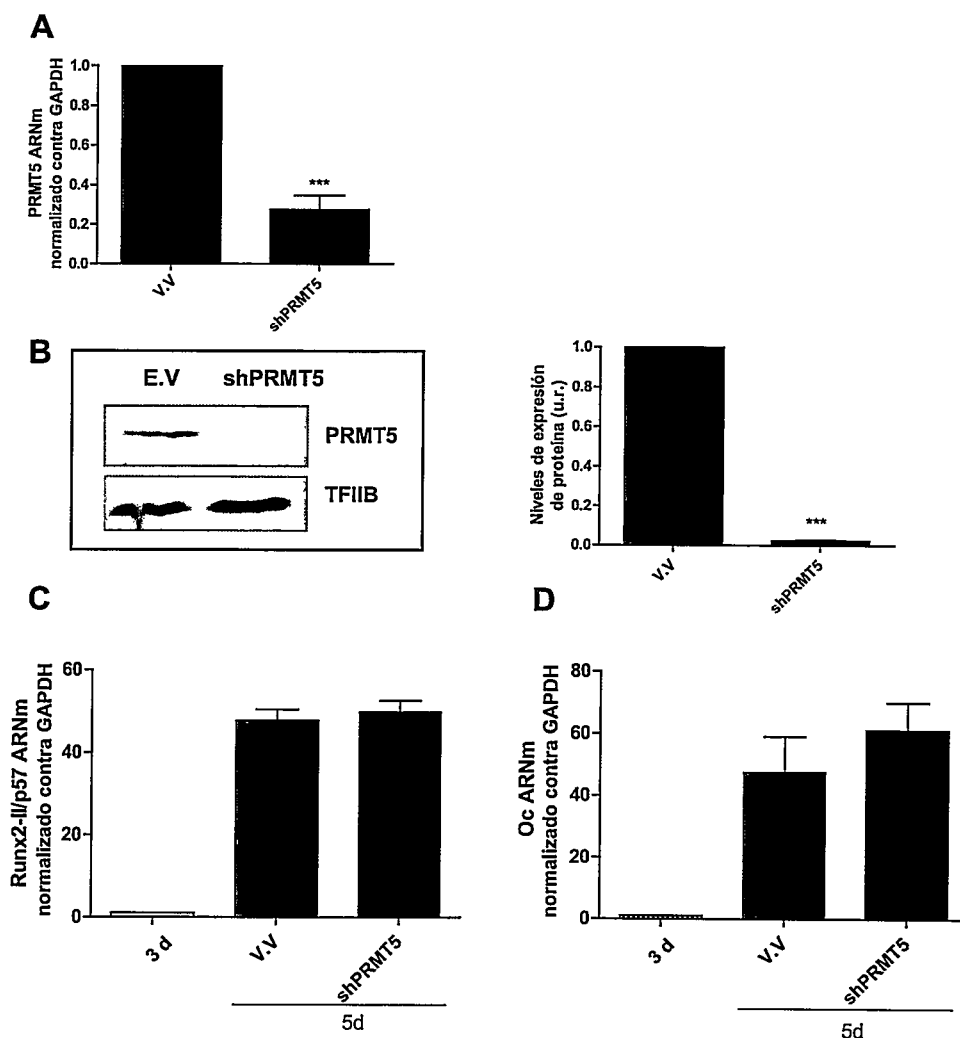


Figura 37. Silenciamiento de PRMT5 en células MC3T3. Células MC3T3 de 3 días de cultivo (blanco) fueron infectadas con shRNA para PRMT5 (negro) o shRNA control (V.V., gris). Las muestras fueron colectadas el día 5 de cultivo. **A.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para PRMT5. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de PRMT5. Extractos nucleares de células MC3T3 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para PRMT5. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. **C y D.** Análisis por RT-PCR de la expresión de Runx2-Ilp57 y osteocalcina (OC). Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V., en A, B, C y D. *** $p < 0.001$.

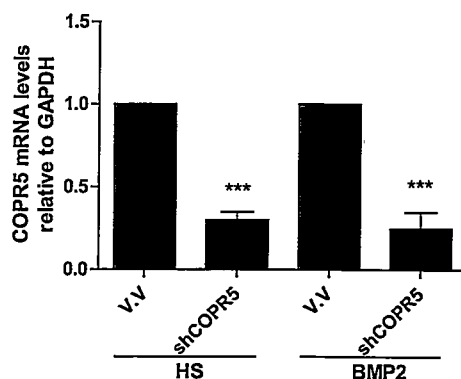


Figura 38. Silenciamiento de COPR5 en células C2C12.

Celulas C2C12 en 40% de confluencia fueron infectadas con partículas virales que codificaban para shARN de COPR5 o con shARN control (V:V); 6 horas después de la infección, las células fueron tratadas con medio suplementado con suero de caballo (HS) ó con BMP2, por 72 horas. Las muestras fueron colectadas y utilizadas para hacer extracción de ARN. El ARN fue cuantificado por RT-PCR con partidores específicos. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control el V.V en cada uno de los tratamientos. *** $p < 0.001$.

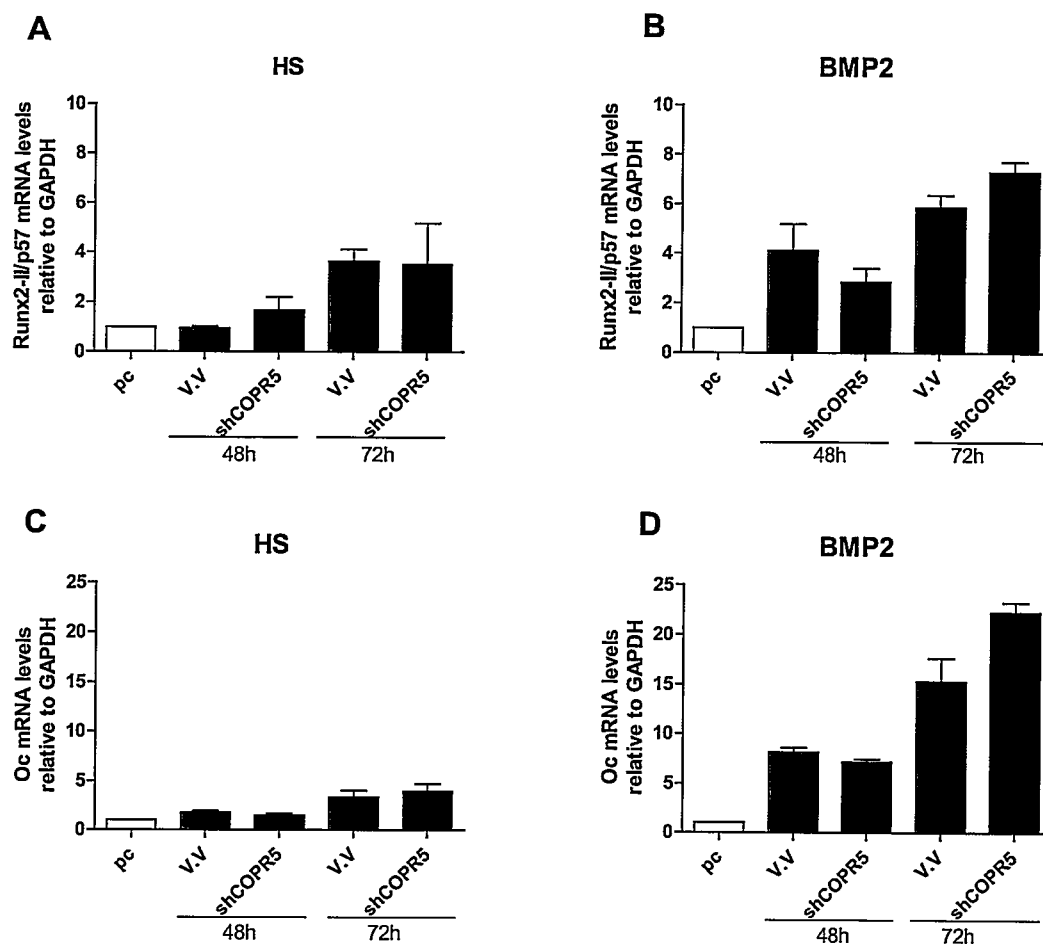


Figura 39. Silenciamiento de COPR5 en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia (blanco) fueron infectadas con shRNA para UTX (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP-2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-Il/p57, **A** y **B**; Osteocalcina (OC), **C** y **D**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Se utilizó la prueba estadística t-student utilizando como control, la condición de virus vacío V.V.

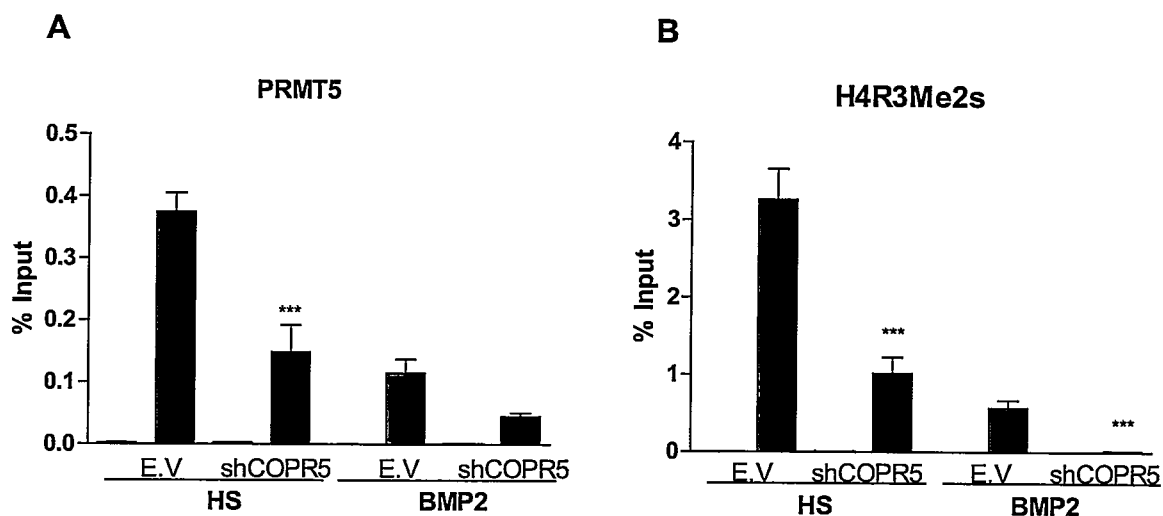


Figura 40. Análisis del reclutamiento de PRMT5 al promotor P1 de Runx2 y de la dimetilación simétrica en el residuo de arginina 3 de la histona H4 en células C2C12 luego del silenciamiento de COPR5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para COPR5 (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 72 horas. **A.** Unión de PRMT5 al promotor P1 de Runx2-IIP57. **B.** Enriquecimiento de dimetilación simétrica de la arginina 3 de la histona H4. H4R3Me2s. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media \pm E.S.M de dos cuantificaciones de tres experimentos realizados. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V en cada uno de los tratamientos. . *** $p < 0.001$.

3.8. WDR5 regula la actividad transcripcional de Runx2.

WDR5 es una proteína que forma parte de los complejos COMPASS, los cuales median la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3. Se ha descrito que WDR5 es la proteína efectora del complejo, mientras que las proteínas pertenecientes al grupo de las MLL son las subunidades catalíticas del complejo (Song., 2008).

3.8.1 Silenciamiento de WDR5 en células C2C12 diferenciadas a mioblastos y osteoblastos.

Cultivos de células C2C12 preconfluentes (40%) fueron infectados con un lentivirus que codifica un shARN contra el ARNm de WDR5, para ser posteriormente (6 horas después) estimulados con HS o BMP2. El silenciamiento de WDR5 se verificó mediante ensayos de RT-PCR y Western blot, para demostrar la disminución de tanto el ARNm como de la proteína WDR5, respectivamente. Encontramos que producto del tratamiento con el shARN contra WDR5, se disminuyó en un 70% la expresión del ARNm de la enzima (Fig 41 A) y en un 80% la proteína WDR5 después de 72 horas de infección (Fig 41 B).

A continuación, evaluamos el efecto de este silenciamiento sobre los niveles de ARNm de Runx2-II/p57, por medio de ensayos de RT-PCR en tiempo real. Encontramos que en las células estimuladas con BMP2, el silenciamiento de

WDR5 indujo una disminución significativa en la expresión de Runx2-II/p57 a las 72 horas (Fig 42 A). Esta baja en la expresión de Runx2 es acompañada por una disminución significativa en la expresión del ARNm de osteocalcina (Fig 42 C). De otra parte al analizar los niveles de expresión de Runx2-II/p57 y osteocalcina, en células C2C12 infectadas con shARN de WDR5 y estimuladas con suero de caballo (HS), no se observaron cambios significativos en sus ya previamente bajos niveles de expresión (Fig 42 B y D). Como control, también evaluamos los niveles de expresión del ARNm de miogenina, los cuales tampoco se vieron alterados como consecuencia del silenciamiento (Fig 42 E y F).

En forma complementaria, se evaluó la actividad de fosfatasa alcalina como marcador de compromiso osteogénico temprano mediante el uso del colorante NBT/BCIP. Los resultados mostraron ausencia de actividad de la enzima, en las células infectadas con el shARN/WDR5, respecto a la actividad mostrada por la condición control (Fig 43). Lo anterior concuerda con la disminución en la expresión de Runx2-II/p57, producto de la reducción de WDR5, al haberse establecido previamente que el gen de fosfatasa alcalina es un blanco directo de Runx2 (Stein y col., 2001).

Para evaluar si la participación de WDR5 en la diferenciación osteoblástica involucra la capacidad de mantener los niveles de trimetilación en los residuos de la lisina 4 de la histona H3 en la región del promotor P1 del gen Runx2, se realizaron ensayos de CHIP de muestras de C2C12 infectadas con shRNA

contra WDR5 (HS y BMP2). Los resultados mostraron que el silenciamiento de WDR5 se reflejó en una baja del reclutamiento de la enzima al promotor P1 y en una disminución significativa en los niveles de H3K4me3 (Fig 44).

Todos estos resultados indican un relevante rol de la marca H3K4Me3 en el control de la expresión de Runx2-II/p57 durante la diferenciación osteoblástica.

3.8.2. Silenciamiento de WDR5 en células MC3T3.

Los ensayos de silenciamiento de WDR5 fueron realizados en células MC3T3 siguiendo un protocolo similar al descrito anteriormente en esta tesis. El silenciamiento de WDR5 condujo a una disminución de aproximadamente el 80% de su ARNm respecto al control (Fig 45 A), lo que se vio reflejado en la disminución del 70% de la proteína WDR5 (Fig 45 B). Esta condición se tradujo en una significativa disminución en los ARN mensajeros de Runx2-II/p57 y osteocalcina (Fig 45 C y D), resultados que confirman lo obtenido en el modelo celular C2C12 diferenciado hacia el linaje osteoblástico mediante el tratamiento con BMP2.

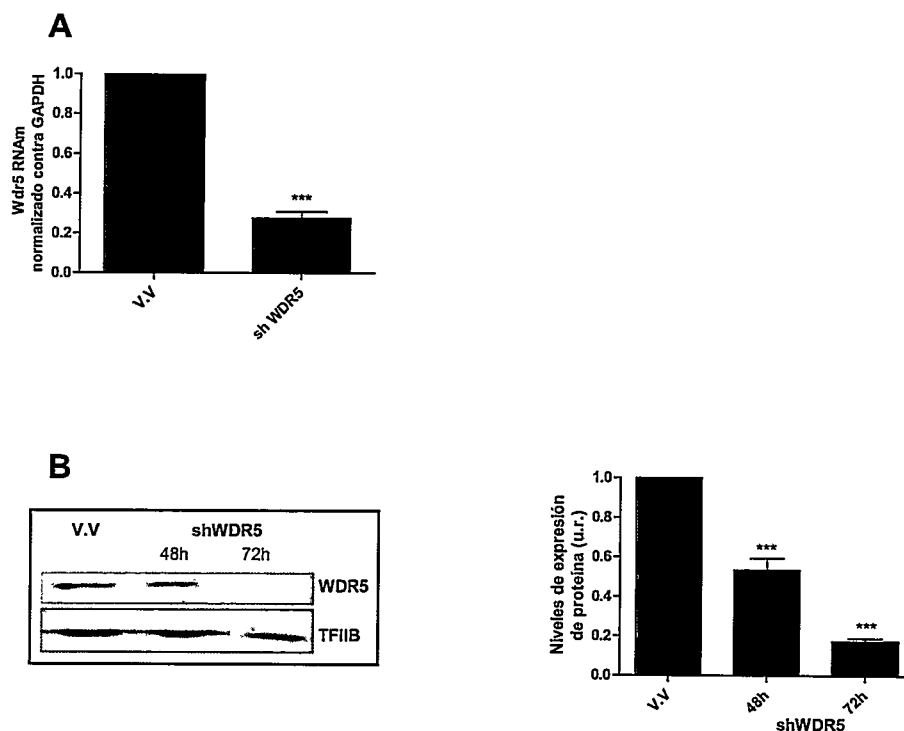


Figura 41. Control del silenciamiento de WDR5 en células C2C12 .
A. ARN total fue extraído desde células C2C12 infectadas con el shRNA para WDR5 ó el shRNA control (Virus vacío, V.V) y posteriormente cultivadas por 72 horas. Posteriormente el ARN fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para WDR5. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, usando como control la condición de virus vacío V.V para el análisis. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de WDR5. Extractos nucleares de células C2C12 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para WDR5. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett) , usando como grupo control, la condición de virus vacío (V.V). *** $p < 0.001$.

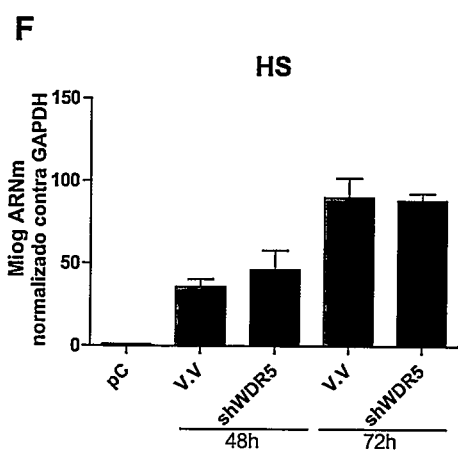
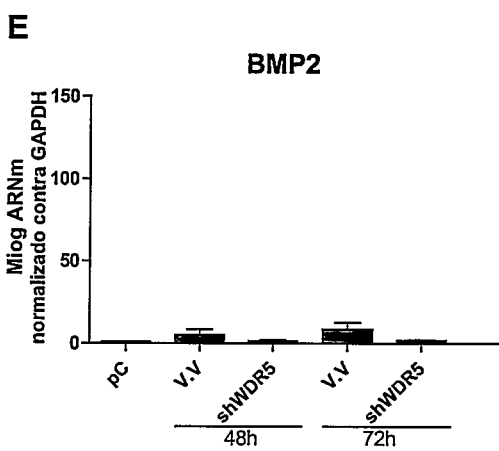
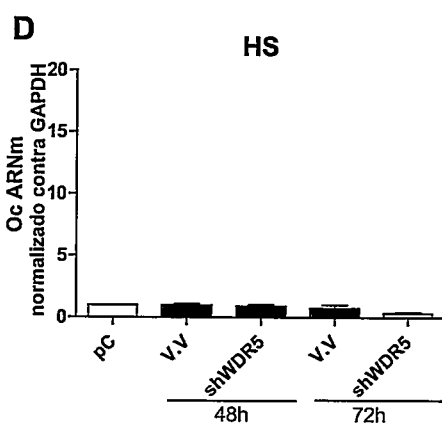
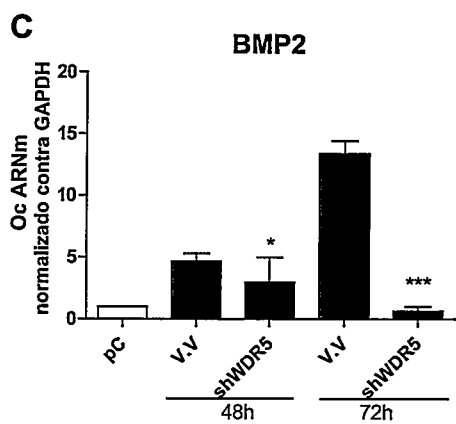
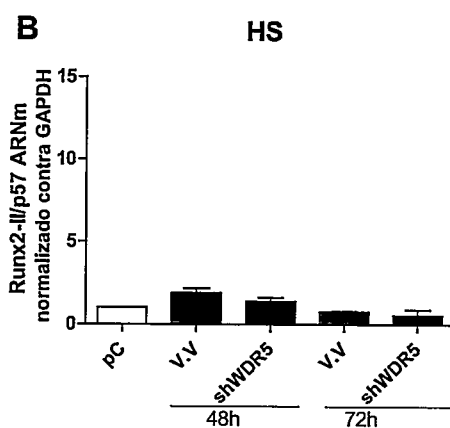
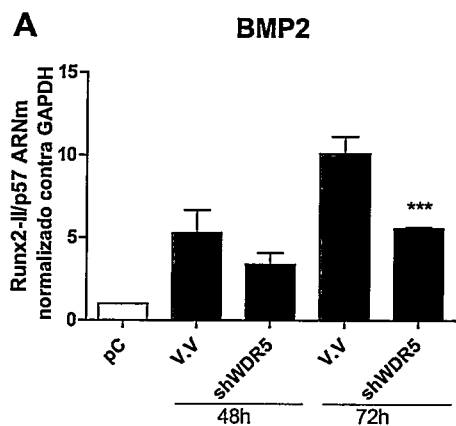


Figura 42. Silenciamiento de WDR5 en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia (blanco) fueron infectadas con shRNA para WDR5 (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57, **A** y **B**; Osteocalcina (OC), **C** y **D**; y miogenina (miog) **E** y **F**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control las condiciones de V.V en cada uno de los tiempos. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

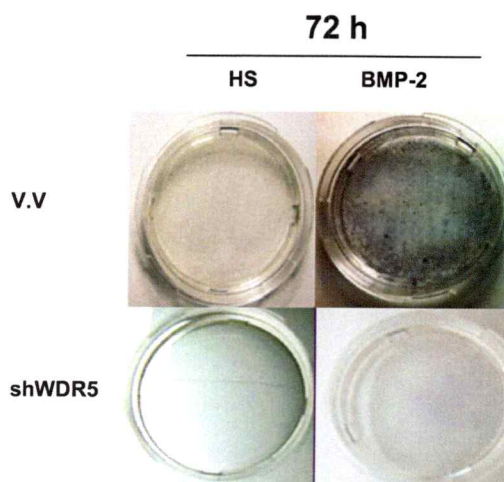


Figura 43. Actividad de Fosfatasa Alcalina en células C2C12 infectadas con shWDR5. Células C2C12 en preconfluencia fueron infectadas con shRNA control (V.V) ó shRNA para WDR5; seis horas después las células fueron cultivadas con medio DMEM/F12 suplementado con BMP2 (diferenciación ósea) ó suero de caballo (HS) para diferenciación miogénica. 72 horas después, las células fueron teñidas con NBT/BCIP para detectar actividad de fosfatasa alcalina.

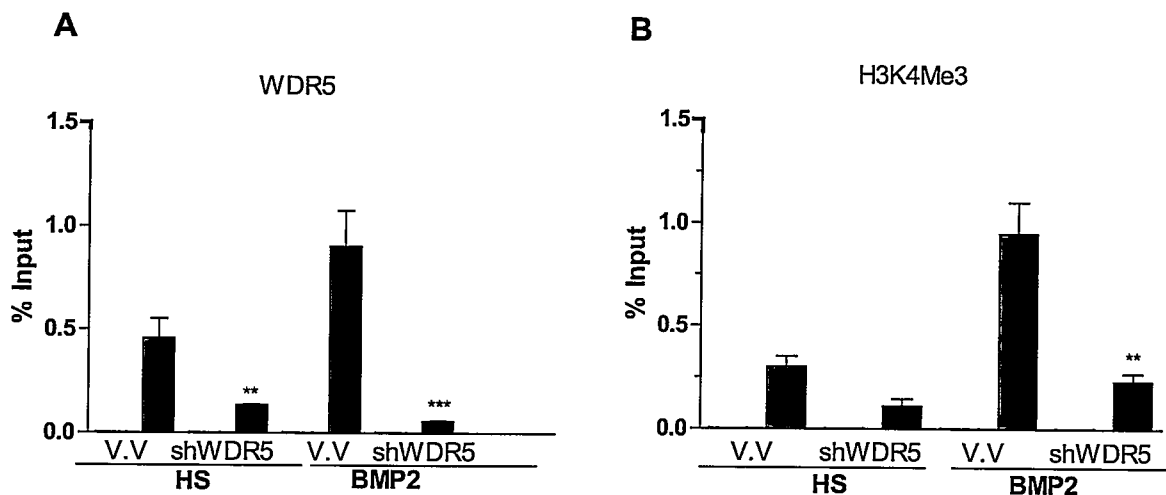


Figura 44. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de WDR5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para WDR5 (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 72 horas. **A.** Unión de WDR5 al promotor P1 de Runx2-Irf57. **B.** Enriquecimiento de la triimetilación de la lisina 4 de la histona H3. H3K4Me3. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student utilizando como grupo control la condición de V.V en cada uno de los tratamientos. *** $p < 0.001$.

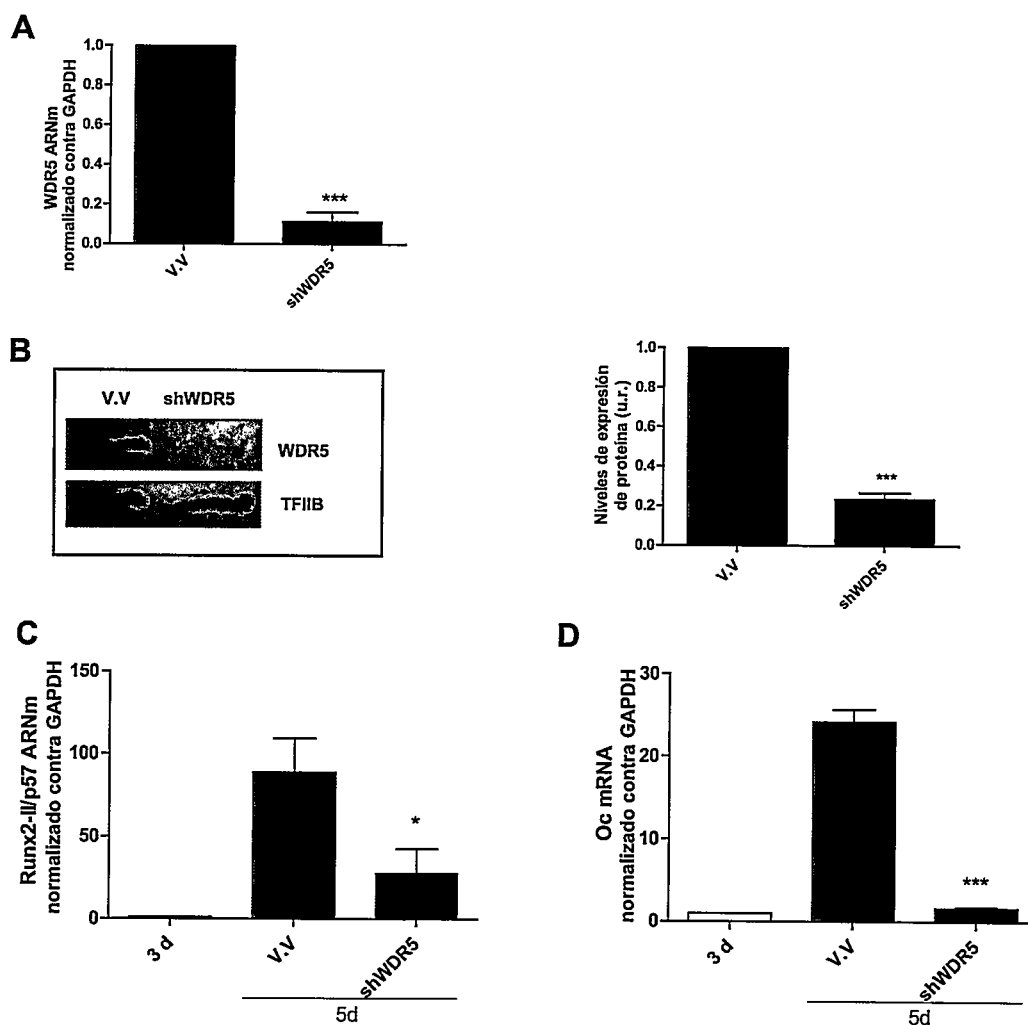


Figura 45. Silenciamiento de WDR5 en células MC3T3. Células MC3T3 de 3 días de cultivo (blanco) fueron infectadas con shRNA para WDR5 (negro) o shRNA control (V.V, gris). Las muestras fueron colectadas el día 5 de cultivo. **A.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para WDR5. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de WDR5. Extractos nucleares de células MC3T3 fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para WDR5. Como control de carga se detectó el factor de transcripción general TFIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. **C y D.** Análisis por RT-PCR de la expresión de WDR5, Runx2-II/p57 y osteocalcina (OC). *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V, en A, B, C y D. *** $p < 0.001$.

3.9. UTX contribuye a la regulación transcripcional de Runx2.

3.9.1. Silenciamiento de UTX en células C2C12.

Para evaluar la participación de UTX en la regulación de la actividad transcripcional de Runx2, se realizaron experimentos de silenciamiento de UTX con shRNA, codificados por partículas lentivirales en células C2C12. Este silenciamiento de UTX llevó a una disminución significativa (aproximadamente un 80%) de su ARNm respecto al control (Fig 46 A), que también se tradujo en una disminución del 60% en la expresión de la proteína UTX (Fig 46 B).

La infección con shARN contra UTX en células estimuladas con BMP2 condujo a una disminución significativa en la expresión de los ARN mensajeros de Runx2-II/p57 y Oc (Fig. 47 A y C), lo que indica que la presencia de UTX en la diferenciación osteogénica es fundamental para la expresión de Runx2-II/p57. Por otra parte, la disminución en la expresión de UTX en células estimuladas con HS no indujo cambios en los niveles de expresión de Runx2-II/p57 y Oc (Fig 47 B y D). Por el contrario, los niveles de ARNm de miogenina se vieron afectados significativamente, mostrándose una reducción en su expresión, lo cual está de acuerdo con lo reportado por el grupo de Seenundun para la diferenciación muscular (Seenundun y col., 2010).

En concordancia con lo anterior, el análisis de actividad de la enzima fosfatasa alcalina, realizado con el colorante NBT/BCIP en cultivos de células C2C12 tratadas con BMP2, mostró que en ausencia de UTX, esta actividad está

disminuida (Fig 48). Lo que demuestra que en ausencia de UTX la expresión de genes tempranos de diferenciación osteogénica, como fosfatasa alcalina, se ven directamente afectados.

Todos estos resultados indican que UTX participaría en el proceso de diferenciación osteoblástica mediante la regulación de la actividad transcripcional del gen Runx2-II/p57. Para confirmar si esta función depende de su actividad como enzima demetilasa de la marca H3K27Me3, se realizaron ensayos de silenciamiento génico con shRNA contra UTX, acoplados a experimentos de ChIP. El silenciamiento de UTX se reflejó en una disminución significativa de la unión de UTX al promotor P1 (Fig 49 A). Cabe resaltar que en las células C2C12 tratadas con BMP2, este bajo enriquecimiento de UTX en el promotor estuvo acompañado con un aumento significativo en los niveles de H3K27Me3 (Fig. 49 B).

3.9.2. Silenciamiento de UTX en células preosteoblásticas MC3T3.

Utilizando la misma estrategia experimental explicada anteriormente, cultivos de células MC3T3 fueron infectados con shARN para UTX y posteriormente las muestras fueron colectadas 48 horas post-infección. Se determinó que el silenciamiento de UTX se refleja en una reducción de aproximadamente el 60% del ARN mensajero de esta enzima (Fig 50 A) y en una disminución del 80% de la proteína UTX (Fig 50 B). Tal como se detectó en las células C2C12 tratadas

con BMP2, el silenciamiento de UTX en las células MC3T3 provocó una disminución significativa en los niveles de los ARN mensajeros de Runx2-II/p57 y Oc (Fig 50 C y D).

En conjunto todos estos resultados, permiten concluir que UTX regula la activación transcripcional de Runx2, mediante su actividad como enzima demetilasa de la marca represiva H3K27Me3.

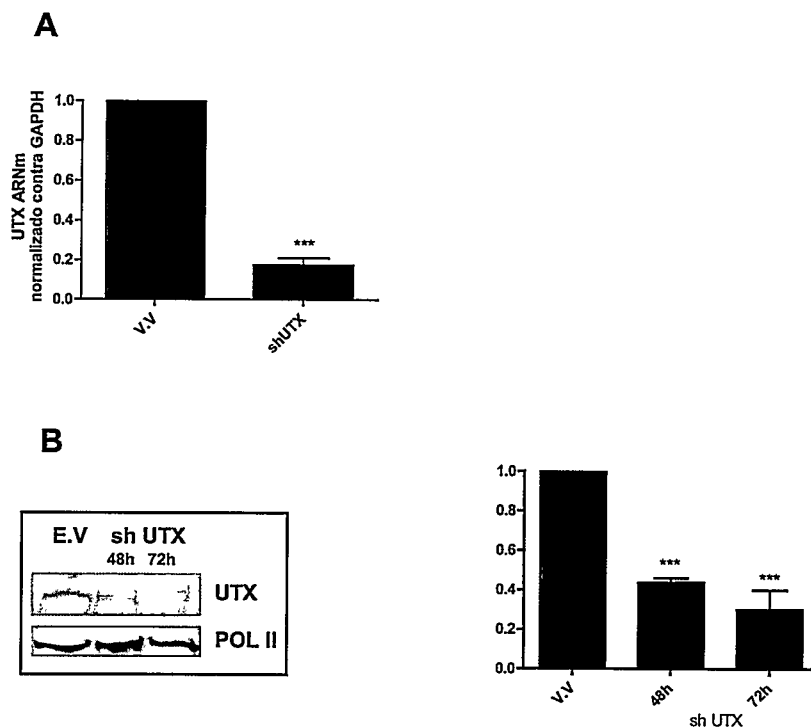


Figura 46. Control del silenciamiento de UTX en células C2C12 . A. ARN total fue extraído desde células C2C12 infectadas con el shRNA para UTX (negro) ó el shRNA control (Virus vacío, V.V, gris) y posteriormente cultivadas por 72 horas. Posteriormente el ARN fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para UTX. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, usando como control la condición de virus vacío V.V para el análisis. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de UTX. Extractos nucleares de células C2C12 fueron analizados por PAGE-SDS al 6% y Western blot con anticuerpos específicos para UTX. Como control de carga se detectó la Pol II. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett) usando como grupo control, la condición de virus vacío (V.V). *** $p < 0.001$.

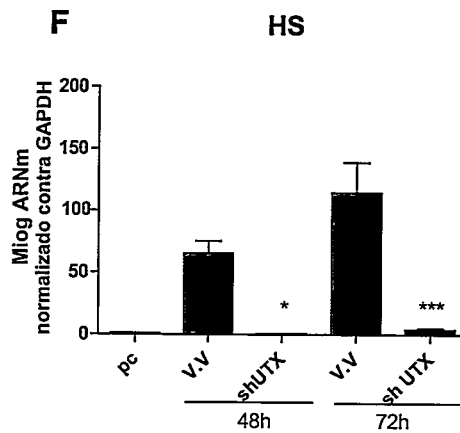
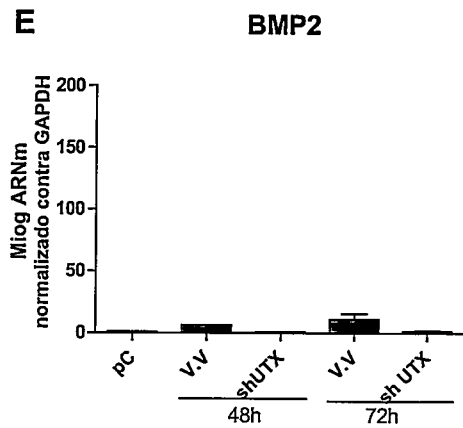
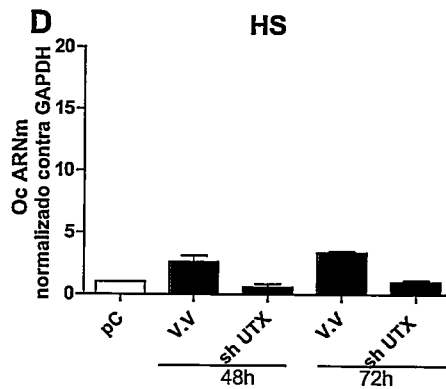
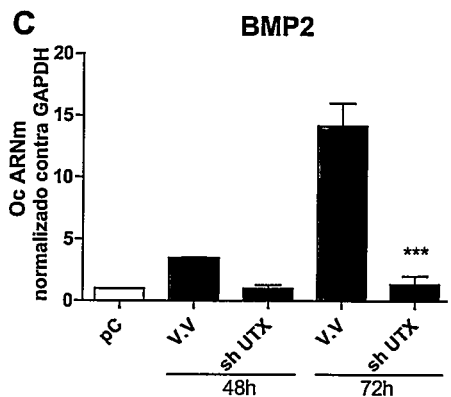
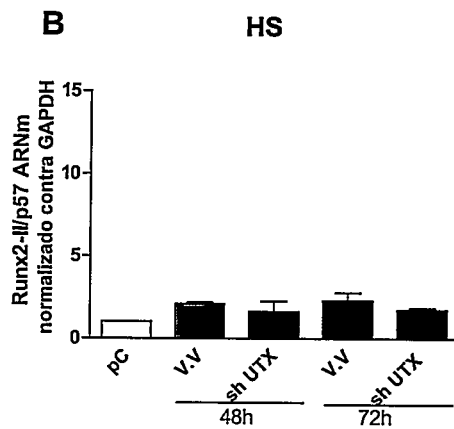
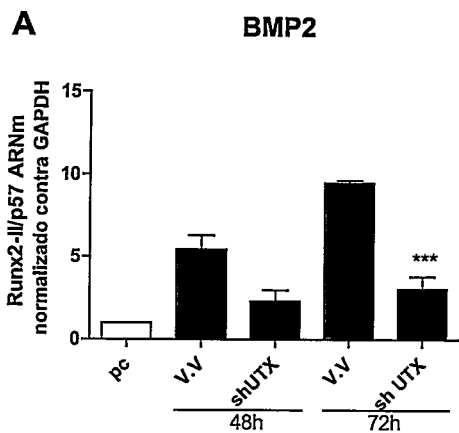


Figura 47. Silenciamiento de UTX en células C2C12. Células C2C12 en preconfluencia (blanco) fueron infectadas con shRNA para UTX (negro) o shRNA control (V.V, gris); seis horas después fueron estimuladas con suero de caballo (HS, derecha) o con BMP-2 (izquierda). Las muestras fueron colectadas a las 48 y 72 horas. RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57, **A** y **B**; Osteocalcina (OC), **C** y **D**; y miogenina (miog) **E** y **F**. Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, en los que se utilizó a la condición de V.V como control para cada uno de los tiempos analizados. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

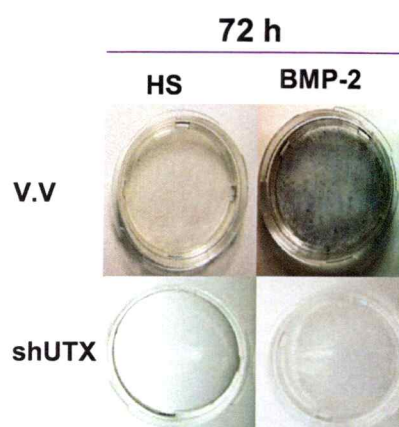


Figura 48. Actividad de Fosfatasa Alcalina en células C2C12 infectadas con shUTX. Células C2C12 en preconfluencia fueron infectadas con shRNA control (V.V) ó shRNA para UTX; seis horas después las células fueron cultivadas con medio DMEM/F12 suplementado con BMP2 (diferenciación ósea) ó con suero de caballo (HS) para diferenciación miogénica. 72 h después, las células fueron teñidas con NBT/BCIP para detectar actividad de fosfatasa alcalina.

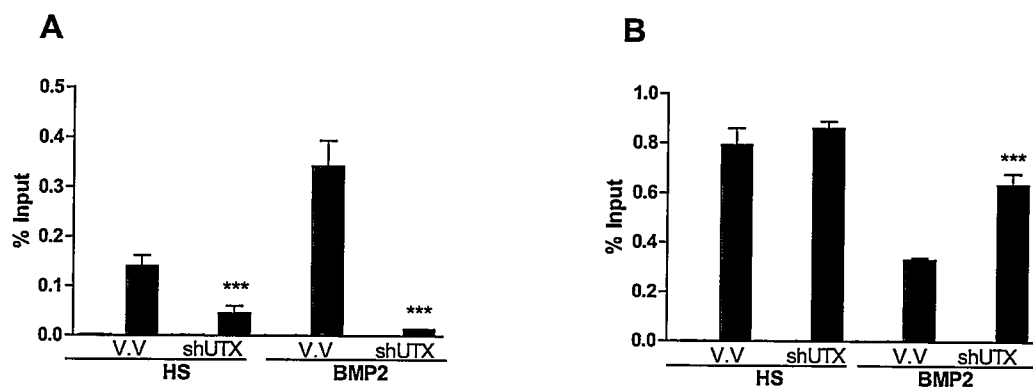


Figura 49. Análisis de la trimetilación en el residuo de lisina 27 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de UTX. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para UTX (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 72 horas. **A.** Unión de UTX al promotor P1 de Runx2-IIP57. **B.** Enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Me3. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando el V.V como grupo control de cada tratamiento. *** $p < 0.001$.

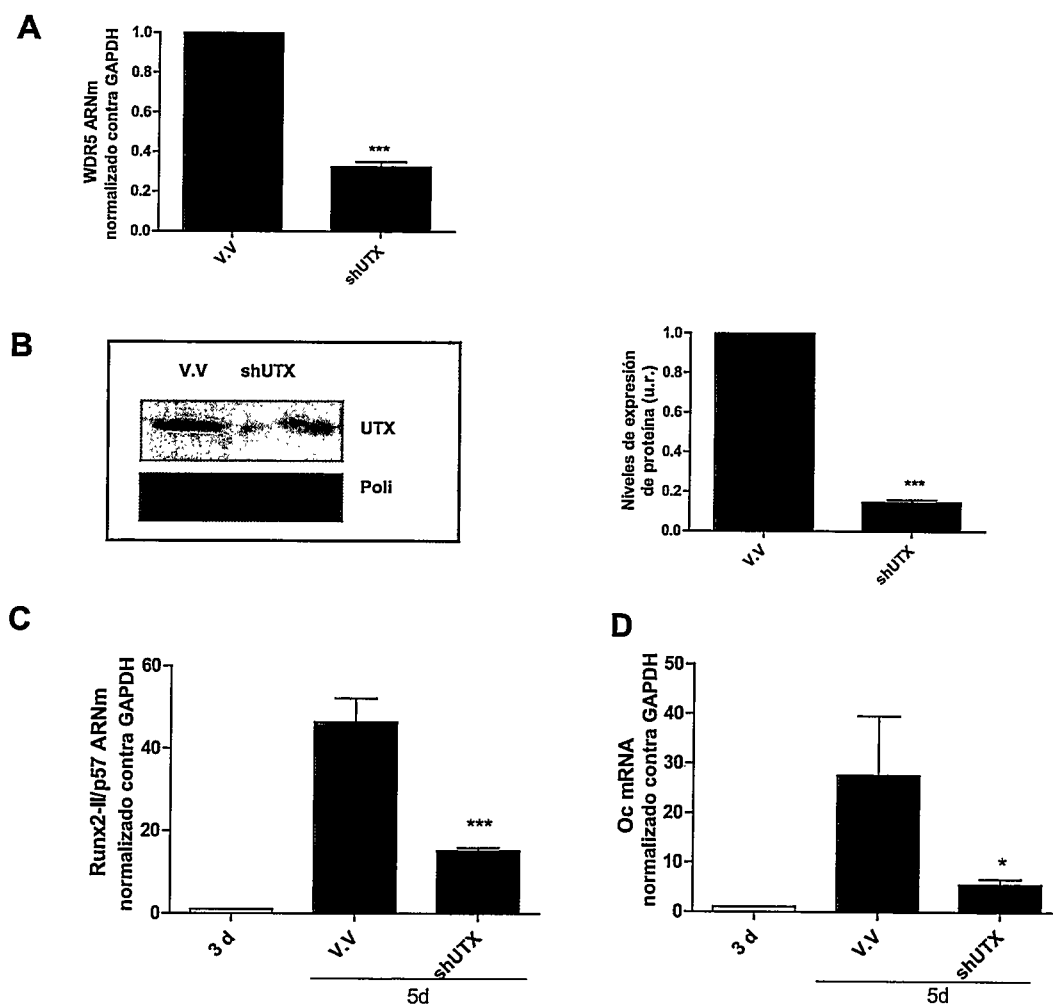


Figura 50. Silenciamiento de UTX en células MC3T3. Células MC3T3 de 3 días de cultivo (blanco) fueron infectadas con shRNA para UTX (negro) o shRNA control (V.V, gris). Las muestras fueron colectadas el día 5 de cultivo. **A.** RNA total analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para UTX. **B.** Análisis por Western blot de la expresión de UTX. Extractos nucleares de células MC3T3 fueron analizados por PAGE-SDS al 6% y Western blot con anticuerpos específicos para UTX. Como control de carga se detectó la Pol II. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J, de tres experimentos independientes. **C y D.** Runx2-II/p57 y osteocalcina (OC). Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student (A, B, C y D) *** $p < 0.00$, * $p < 0.05$.

3.10. Complejo WDR5/UTX.

Se ha reportado que WDR5 y UTX pueden formar parte del complejo “MLL/COMPASS-like”, interactuando directamente con las proteínas MLL3 y/o MLL4, entre otras (Issaeva y col., 2007; Eisenberg ., 2010; Patel., 2007). La formación de estos complejos sugiere, por lo tanto, la existencia de un mecanismo concertado entre enzimas catalizadoras de dos marcas específicas, la H3K4Me3 y la H3K27Me3 (Lee y Col, 2007).

Se procedió entonces a evaluar la existencia de un complejo WDR5/UTX en nuestros modelos experimentales, combinando ensayos de Co-inmunoprecipitación (IP) y experimentos de **reChIP**, usando anticuerpos específicos para WDR5 y UTX. La interacción WDR5/UTX fue demostrada utilizando extractos nucleares de células preosteoblásticas MC3T3 confluentes (día 5 de cultivo) como fuente de proteína. Como se describió anteriormente, en el día 5 de cultivo las células MC3T3 alcanzan el pico transcripcional de la isoforma Runx2-II/p57; lo que permite verificar que cuando el gen Runx2 se encuentra activo transcripcionalmente, WDR5 forma un complejo con UTX (Fig 51 A).

Una vez comprobada esta interacción, evaluamos la unión simultánea de ambas proteínas al promotor P1 del gen Runx2 mediante ensayos de re-ChIP. Los extractos de cromatina fueron precipitados primeramente con el anticuerpo antiUTX para luego ser reprecipitados con el anticuerpo antiWDR5. Los

resultados obtenidos demuestran la unión de estas dos proteínas en el mismo promotor P1 de Runx2 (Fig 51 B). Para complementar los experimentos anteriores, se repitieron ensayos de pérdida de función de WDR5 y de UTX acoplados a ensayos de ChIP en células C2C12 tratadas con BMP2, pero evaluando esta vez la presencia de las dos enzimas en el promotor y el enriquecimiento de las dos modificaciones (H3K4Me3 y H3K27Me3).

Los resultados del silenciamiento de WDR5 en células C2C12 mostraron una disminución significativa de la unión de esta enzima al promotor P1, que transcurrió en simultáneo con una baja en el enriquecimiento de la H3K4Me3 (Fig 52 A y B). De igual manera se detectó una disminución significativa en la unión de UTX al promotor, la cual estuvo acompañada por un aumento significativo en los niveles de H3K27Me3 (Fig 52 C y D).

Por su parte, la inhibición en la expresión de UTX se vió reflejada en una disminución del reclutamiento de esta enzima al promotor P1, junto a un aumento en los niveles de H3K27Me3 (Fig 53 A y B). También se detectó una disminución significativa en la unión de WDR5 y la baja en los niveles de H3K4Me3 (Fig 53 C y D). Estos resultados indican que, en la diferenciación osteoblástica, la presencia del complejo WDR5/UTX promovería la existencia de un mecanismo concertado de activación transcripcional, en el cual ciclos de metilación de H3K4, mediados por WDR5, están coordinados con la demetilación de H3K27, mediada por UTX.

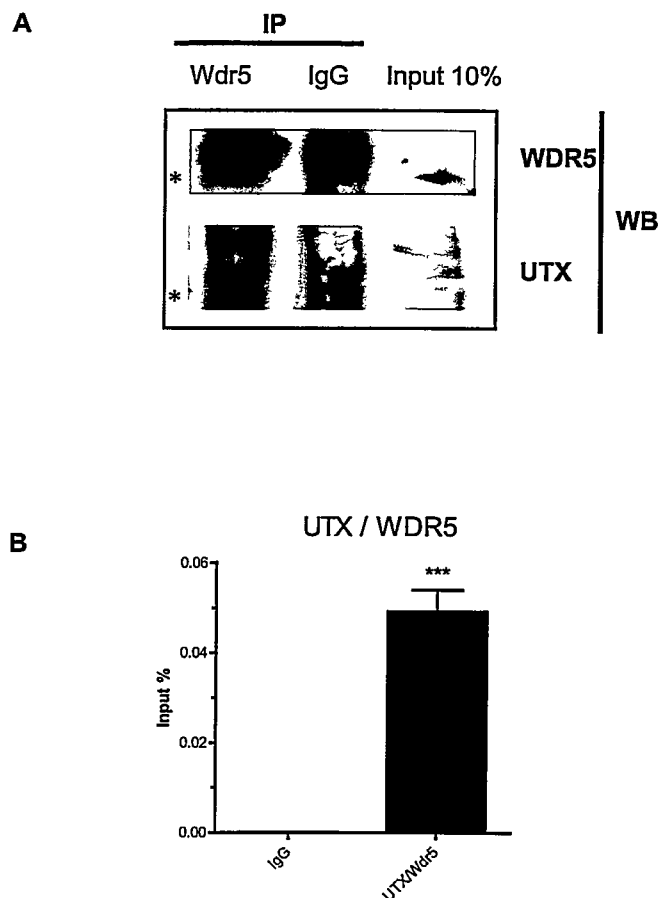


Figura 51. WDR5 y UTX forman complejo en células osteoblásticas. Células MC3T3 fueron cultivadas por 5 días en presencia de Ácido ascórbico (50 ug/ml). Para los experimentos de IP, las células fueron raspadas y utilizadas para la obtención de extractos nucleares; y para los ensayos de re-ChIP fueron tratadas con formaldehído y EGS para obtener extractos entrecruzados. **A.** Inmunoprecipitación (IP) realizada con el anticuerpo específico para la proteína WDR5 y los ensayos de Western blot fueron realizados con anticuerpos específicos para las proteínas WDR5 y UTX. Como control se utilizó la IgG normal correspondiente. **B.** re-ChIP UTX/WDR5. Para inmunoprecipitar se utilizaron combinaciones de anticuerpos específicos contra UTX/WDR5. Como control de precipitación se utilizó IgG de la misma especie de proveniencia del anticuerpo. El ADN precipitado fue cuantificado mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29 del promotor P1 de Runx2. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. *** $p < 0.001$.

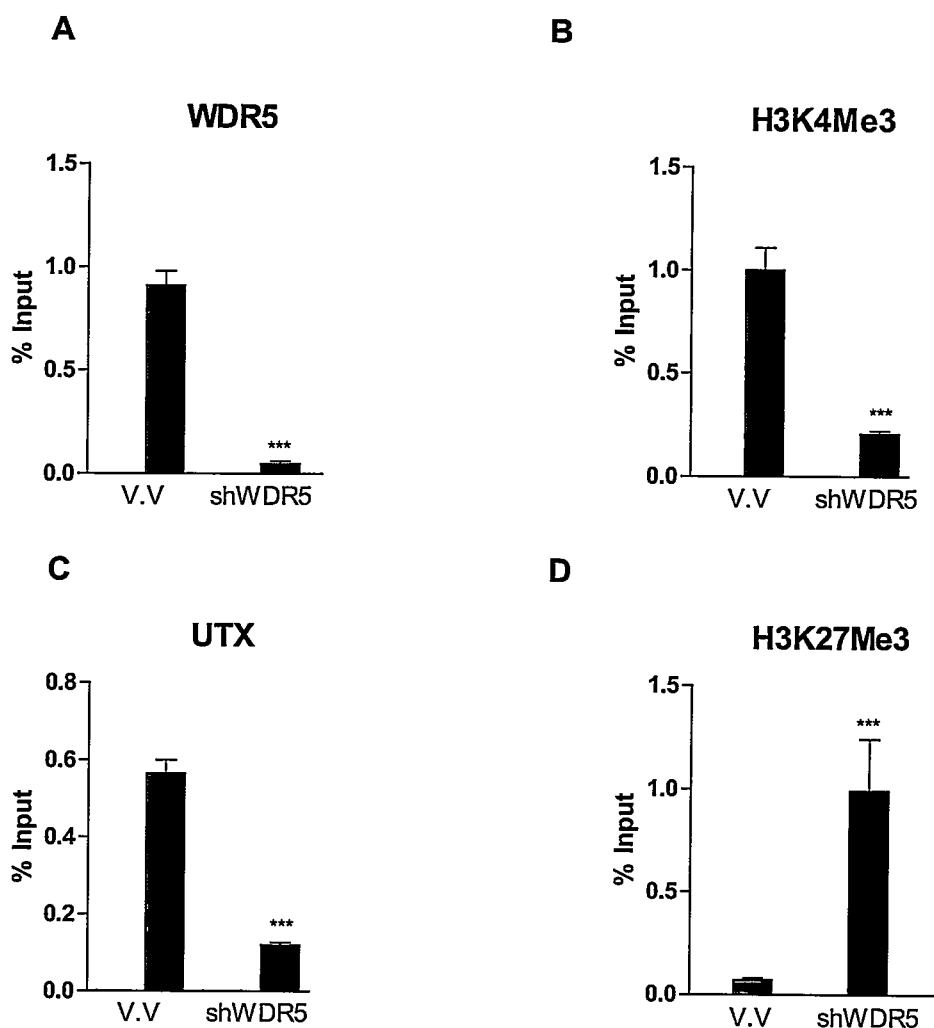


Figura 52. Análisis del reclutamiento de UTX y de la trimetilación en el residuo de lisina 27 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de WDR5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para WDR5 (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con BMP2 por 72 horas. **A.** Unión de WDR5 al promotor P1. **B.** Enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. H3K4Me3. **C.** Unión de UTX al promotor P1DE Runx2-II/p57. **D.** Enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Me3. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando la condición de V.V como grupo control. *** $p < 0.001$.

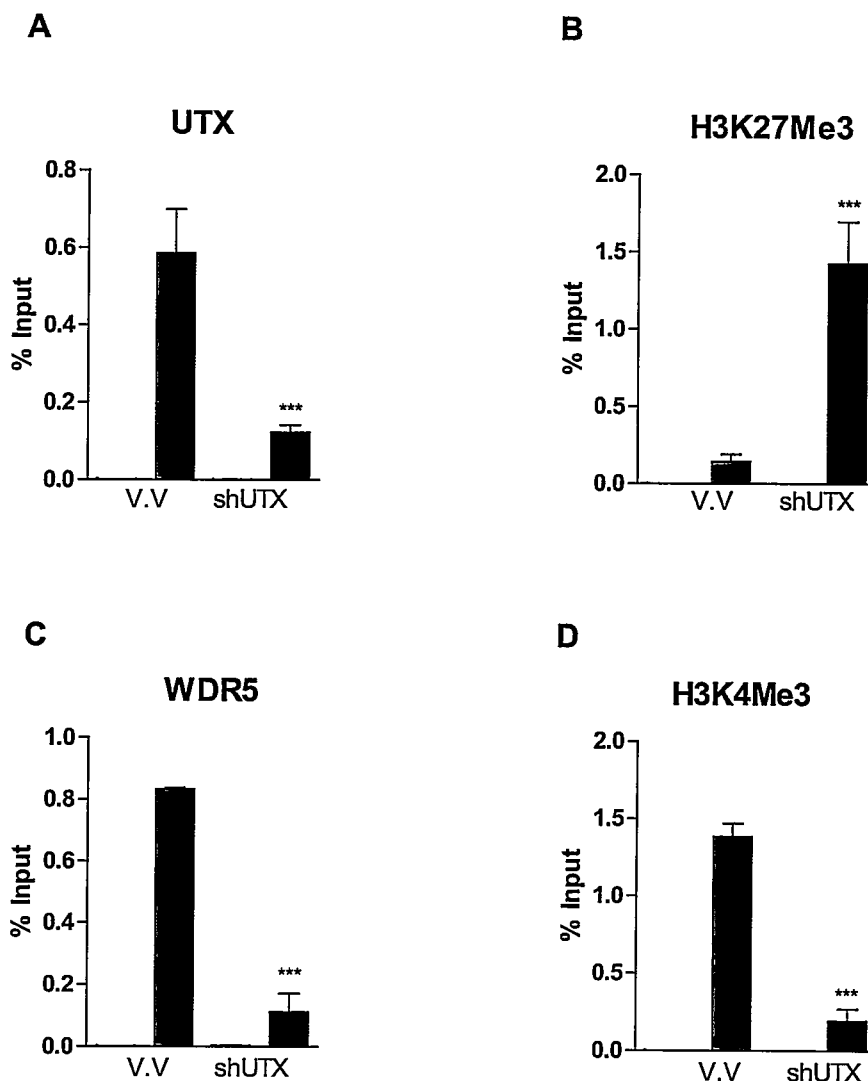


Figura 53. Análisis del reclutamiento de WDR5 y de la trimetilación en el residuo de lisina 4 de la histona H3 en células C2C12 luego del silenciamiento de UTX. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para UTX (negro) ó shRNA control (E.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con BMP-2 por 72 horas. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control el V.V de cada tratamiento. *** $p < 0.001$. **A.** Unión de UTX al promotor P1 de Runx2-II/p57. **B.** Enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Me3. **C.** Unión de WDR5 al promotor P1 de Runx2-II/p57. **D.** Enriquecimiento de la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3. H3K4Me3.

3.11. Análisis en Osteoblastos primarios de rata (ROBs).

Para corroborar los resultados obtenidos en las líneas celulares C2C12 y MC3T3 en cultivos de osteoblastos diploides primarios, se analizaron muestras de pre-osteoblastos aislados desde embriones (E20) de rata (ROBs) (Figura 54). Este tipo celular ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio, dado que cuando son traspasadas a cultivo primario pueden reproducir el proceso completo de diferenciación osteoblástica, pasando por etapas de proliferación activa (d1-d5), síntesis y maduración de matriz extracelular (d6-d10) y finalmente, mineralización activa de esta matriz (d10-d20) (Owen y cols., 1990). Al evaluar la presencia de actividad de fosfatasa alcalina mediante el uso de NBT/BCIP, se detectó actividad desde el día 3 de cultivo, observándose una coloración azul tenue, que se hizo más intensa a medida que aumentaban los días de diferenciación *ex vivo* (Fig. 54 B). De igual manera, se evaluó la presencia de mineralización en la matriz extracelular y formación de depósitos de calcio mediante el uso de rojo de alizarina desde el día 13 de cultivo (Fig 54 C).

Durante este proceso de diferenciación *ex vivo* se observó el aumento de la transcripción de Runx2-II/p57 desde día 5 de cultivo (Fig 55A), lo que no sólo se correlaciona con niveles crecientes de la proteína Runx2-II/p57 (Fig 56), sino que también con una alta expresión del gen de Osteocalcina en el día 7 (Fig 55 B). De otra parte se analizó la expresión de las proteínas con acción metilasa WDR5, EZH2, PRMT5 y demetilasa NO66, JARID 1B, JARID 1C,

UTX y JMJD6 (Fig 57). Los resultados mostraron que WDR5 se encuentra expresada en los primeros días de diferenciación (día 3 y 5) y a partir del día 7 muestra una disminución de su expresión evidente. Estos resultados pueden relacionarse con la activación transcripcional de la isoforma p57, la cual ocurre en los primeros días de diferenciación tal como se muestra en la figura 55 A. De igual manera, detectamos que la expresión de UTX es muy marcada en los primeros días de diferenciación para luego permanecer relativamente constante en todos los días de cultivo analizados, lo que también apoya la función de esta enzima como activadora de la transcripción de Runx2-II/P57.

Respecto a la expresión de las proteínas EZH2, PRMT5, NO66 y JARID1B, los resultados indican que estas proteínas se expresan en los primeros días de diferenciación, y que esta expresión disminuye progresivamente a medida que aumentan los días de cultivo.

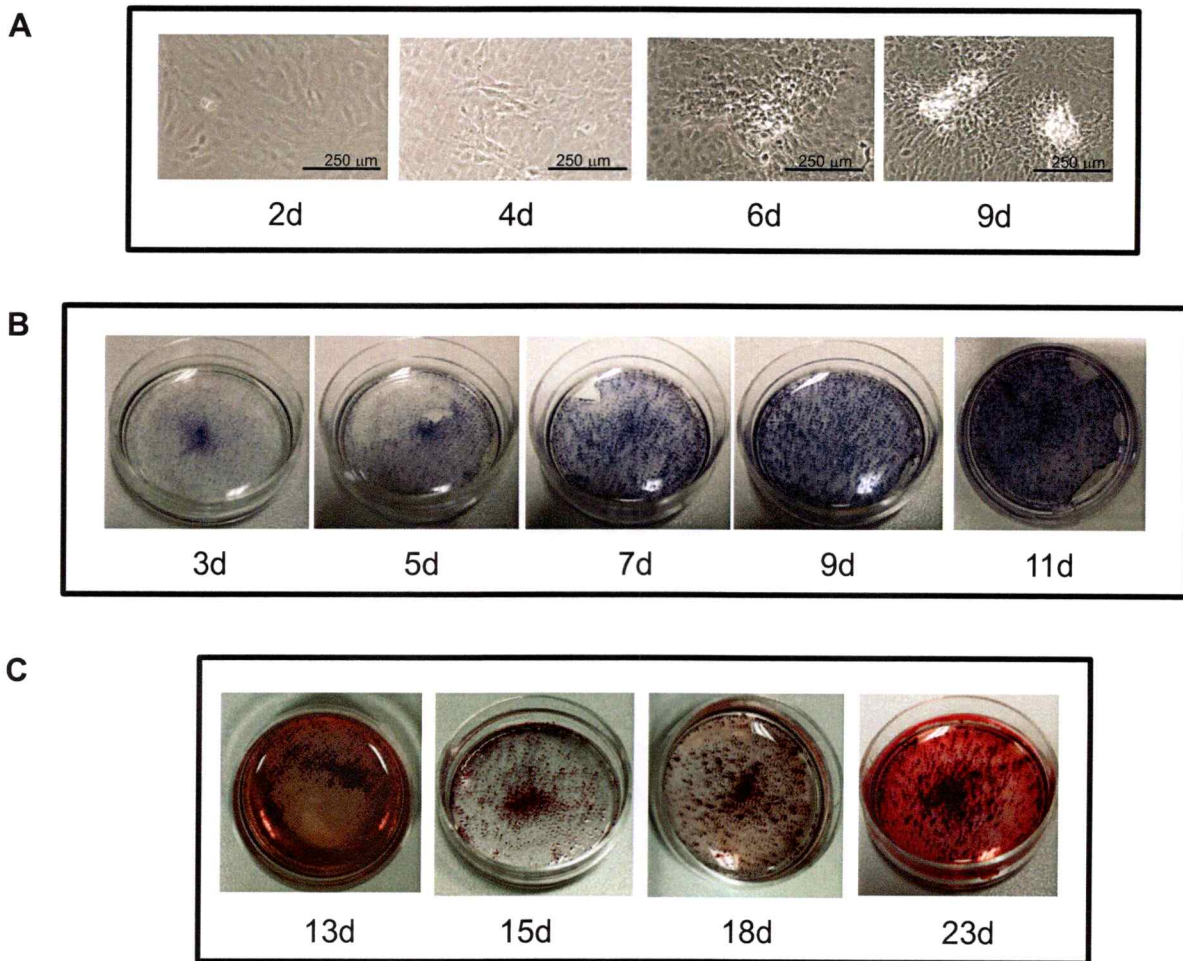


Figura 54. Cultivo de osteoblastos primarios derivados de calvaria de rata (ROBs). **A.** Cultivo de osteoblastos primarios obtenidos desde calvarias de ratas no natas de 20 días de gestación. Una vez realizada la disección, las células fueron sembradas en placas de 100mm y cultivadas hasta alcanzar un estado de preconfluencia; posteriormente fueron tratadas con tripsina y expandidas a placas de 100mm o de 35mm para coloración. En la zona inferior de cada panel se indica el día en cultivo de las células postpasaje. Días 2 a 4: Células en etapa de proliferación activa. Días 6 a 9: Células en etapa de síntesis y maduración de la matriz extracelular, entre las cuales se observa la formación de nódulos de mineralización. **B.** Tinción con NBT/BCIP para evaluar actividad de fosfatasa alcalina. **C.** Tinción con rojo de alizarina para evaluar mineralización y formación de depósitos de calcio.

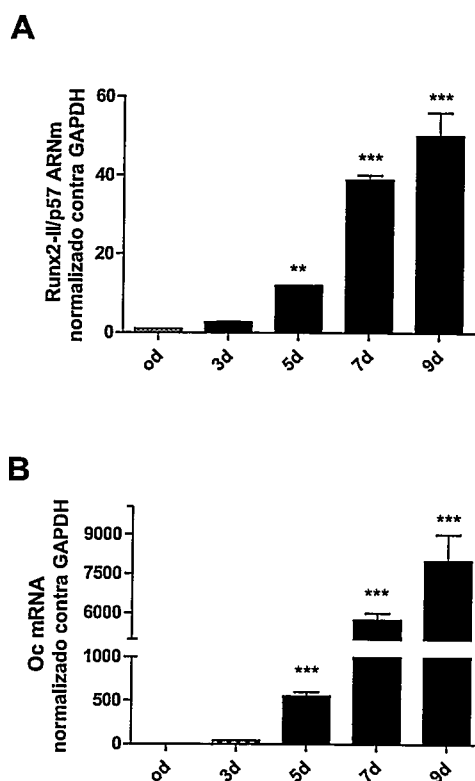


Figura 55. Expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica durante la diferenciación *ex vivo*. Expresión de ARN mensajero de Runx2-II/p57 (**A**) y Osteocalcina (**B**). ARN total obtenido desde osteoblastos primarios de rata entre los días 0 (día en el que alcanzaron la preconfluencia y se hizo la expansión) al día 8 de cultivo. Estas muestras fueron analizadas por RT-PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para los mensajeros de Runx2-II/p57 y Oc. Los resultados son presentados como expresión relativa de los genes con respecto al control (día 0) normalizados contra la expresión de Gliceraldehído-3-Pdeshidrogenasa (GAPDH). Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). Como grupo control se usó el día 0. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

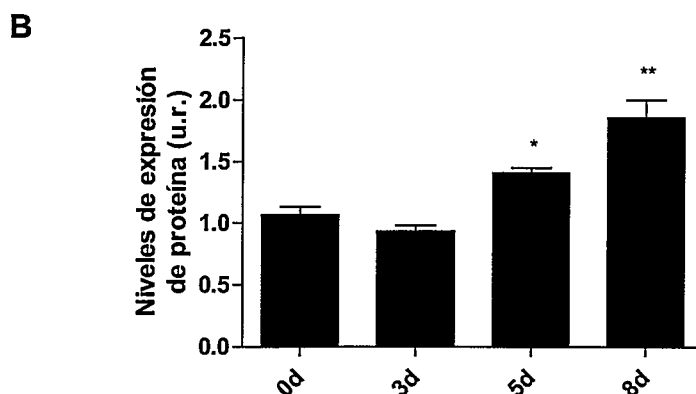
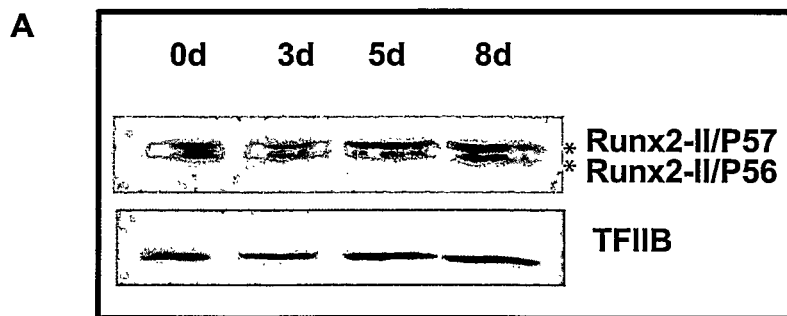


Figura 56. Expresión de Runx2 en osteoblastos primarios de rata.
A. Análisis por Western blot de la expresión del factor de transcripción Runx2. Extractos nucleares (20ug) de osteoblastos primarios de rata (ROBs) en cultivo fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot, con el anticuerpo Runx2. Como control de carga se detectó por re-blotaje de la misma membrana el factor de transcripción general TFIIB. **B.** Cuantificación por densitometría usando el programa ImageJ. Diferencias significativas fueron evaluadas por test de t-student, utilizando como grupo control el día 0. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Figura 57. Expresión de WDR5, NO66, JARID 1B, EZH2, UTX, PRMT5, JMJD6 en Osteoblastos primarios (ROBs).

Análisis por Western blot de la expresión de proteínas con acción metilasa y demetilasa. Extractos nucleares (20ug) de osteoblastos primarios de rata (ROBs) en cultivo fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y 6% y Western blot, con los anticuerpos descritos en la figura. Como control de carga se detectó por re-broteo de la misma membrana el factor de transcripción general TFIIB y Pol II.

3.11.1. Ensayos de pérdida y ganancia de función de WDR5 en cultivos de osteoblastos primarios de rata (ROBs).

Para confirmar el rol de WDR5 en la regulación de la actividad transcripcional de Runx2, hicimos uso de las partículas lentivirales que codifican shARN contra el ARNm de WDR5 o un vector que contiene el cDNA de WDR5 y que permite su sobreexpresión. Osteoblastos primarios en el día 2 de cultivo se infectaron por 48 horas (día 4 de cultivo) y 96 horas (día 6 de cultivo), para luego extraer ARN total. Encontramos que el tratamiento con el shARN específico para WDR5 llevó a una disminución de aproximadamente un 70% en la expresión de su mensajero respecto al control hacia el día 6 de cultivo (Fig 58 A). Esto se tradujo en una baja significativa en los ARN mensajeros de Runx2-II/p57 y osteocalcina a los cuatro días de tratamiento (Fig 58 B y C). Estos resultados fueron congruentes con lo encontrado en las líneas celulares C2C12 diferenciadas con BMP2 y MC3T3.

En el caso de los experimentos de sobre-expresión de WDR5 (Fig 60), encontramos que posterior a 96 horas de infección (día 6 de cultivo), los niveles de ARNm de WDR5 aumentaron aproximadamente 200 veces comparadas al virus control que solo codifica GFP (Fig 59 A), mientras que los niveles de proteína detectados mediante Western blot fueron de tres veces respecto al virus control GFP (Fig 59 B). La sobreexpresión de WDR5 en estas células llevó a un aumento de alrededor de tres veces en los niveles de ARNm de Runx2-II/p57 y de dos veces de aumento en los niveles de ARNm de

osteocalcina (Fig 59 C y D). De igual manera, mediante el uso de rojo de alizarina, se observó mayor formación de depósitos de calcio en los cultivos en los que WDR5 estaba sobre-expresado (Fig 59 E).

En conjunto estos resultados confirman el rol de WDR5 sobre la actividad transcripcional de Runx2 e indican la importancia de la marca H3K4Me3 en las colas de las histonas asociadas al promotor P1 de Runx2 durante el control de la expresión del gen en la diferenciación osteoblástica.

3.11.2. Ensayos de pérdida de función de UTX en cultivos de osteoblastos primarios de rata (ROBs).

Finalmente, realizamos ensayos de silenciamiento génico (shRNA contra UTX) en cultivos de osteoblastos primarios (**ROBs**), siguiendo las estrategias experimentales señaladas anteriormente. Los resultados muestran una disminución del 60% y 80% en el ARN mensajero de la enzima a los 2 y 4 días post-infección (Fig 61 A). Se observó que esta disminución en la expresión de UTX induce una disminución significativa en la expresión del mensajero de Runx2-II/p57 en los tiempos analizados (Fig 61 B). De igual manera, al analizar los niveles de expresión del ARNm de Oc, se observó que también muestra una disminución significativa respecto a la exhibida por la condición control (Fig 61 C). Estos resultados corroboran lo establecido anteriormente con los modelos de diferenciación osteoblástica en las líneas celulares C2C12 y MC3T3. Permitiendo concluir que UTX participa en la diferenciación

osteoblástica mediante la regulación de la actividad transcripcional del gen Runx2-II/p57.

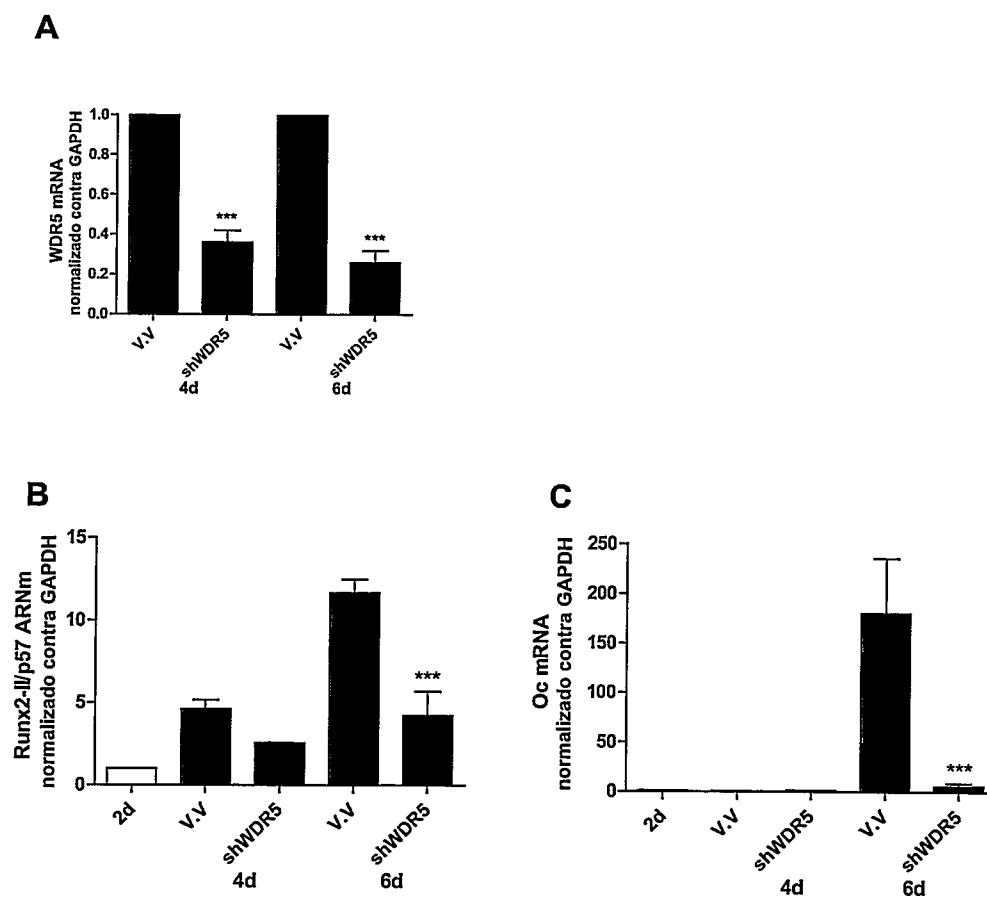


Figura 58. Silenciamiento de WDR5 en osteoblastos primarios de rata. Cultivo de osteoblastos primarios de día 2 (40%confluencia) fueron infectados con shRNA para WDR5 (negro) o control (E.V, gris), y las muestras fueron colectadas a los 4 y 6 días. shRNA para WDR5 (negro) o shRNA control (V.V, gris). El RNA total fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para Runx2-II/p57 (A) y osteocalcina ,OC (B). Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. B. Análisis por RT-PCR de la expresión de WDR5. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, usando como grupo control la condición de V.V en cada uno de los tiempos analizados. *** $p < 0.001$.

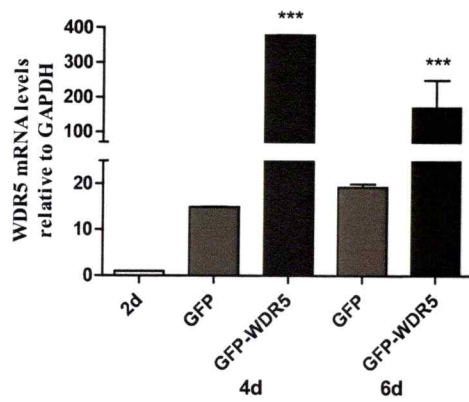
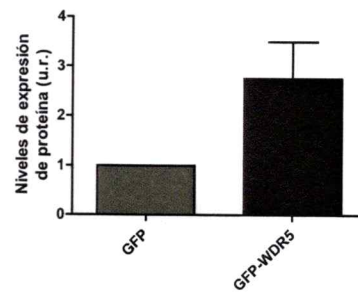
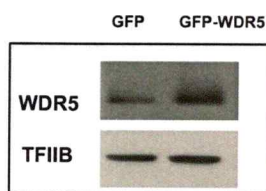
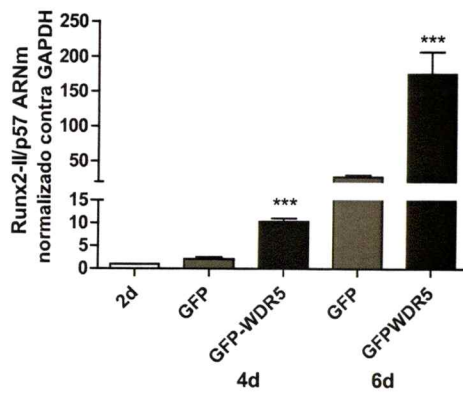
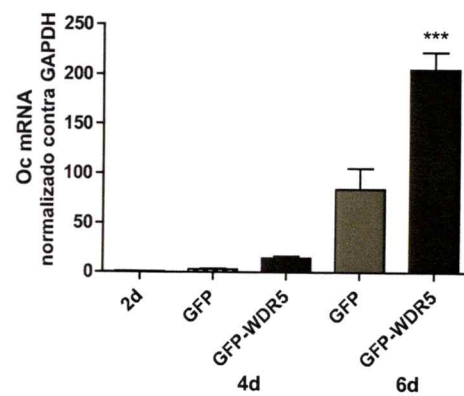
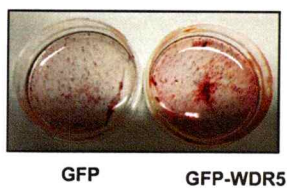
A**B****C****D****E**

Figura 59. Efecto de la sobre-expresión de WDR5 en cultivo de osteoblastos primarios. Cultivo de osteoblastos primarios en 40% de confluencia (día 2 de cultivo) fueron infectados con sobrenadantes virales. Para este caso el cDNA completo de WDR5 fue clonado de células C2C12, en un plásmido bicistrónico pCDH entre los sitios XbaI y EcoRI. Este plásmido contiene un promotor CMV comandando la expresión de WDR5 y un promotor EF1 que dirige la expresión de GFP. Las muestras fueron colectadas y procesadas 48 y 96 horas (día 4 y 6 de cultivo) después de la infección. El RNA total fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para WDR5 (**A**), Runx2-II/p57 (**C**) osteocalcina-Oc (**D**). Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. GFP-WDR5 (negro) o GFP (gris). **B**. Análisis por Western blot de la expresión de WDR5. Extractos nucleares de cultivos de osteoblastos primarios, fueron analizados por PAGE-SDS al 10% y Western blot con anticuerpos específicos para WDR5. Como control de carga se detectó TFIIIB. A la derecha se encuentra la cuantificación por densitometría utilizando el programa IMAGE J. **E**. Tinción con rojo de alizarina para evaluar mineralización de la matriz extracelular y formación de depósitos de calcio. **D**. Expresión de ARN mensajero de WDR5. Cada barra representa la media \pm E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, usando como grupo control de comparación la condición de GFP. *** $p < 0.001$.

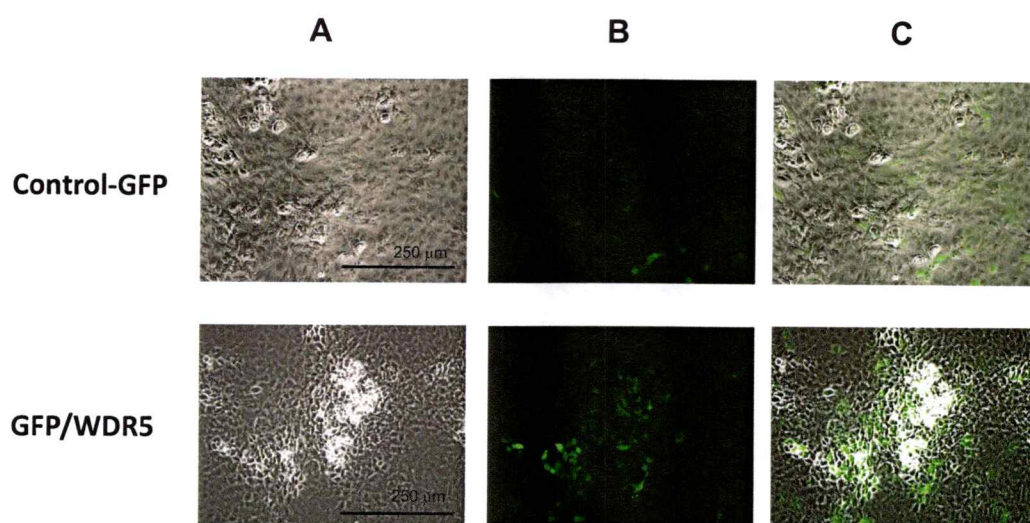


Figura 60. Sobre-expresión de WDR5 en cultivo primario de osteoblastos. Cultivo de osteoblastos primarios en 40% de confluencia (día 2 de cultivo) fueron infectados tal como se describió en la figura 59. 4 días posteriores a la infección se adquirieron imágenes utilizando un microscopio de epifluorescencia con un objetivo 40x en campo claro (**A**) ó fluorescencia para determinar la infección con GFP (**B**). **C.** Superposición de A y B.

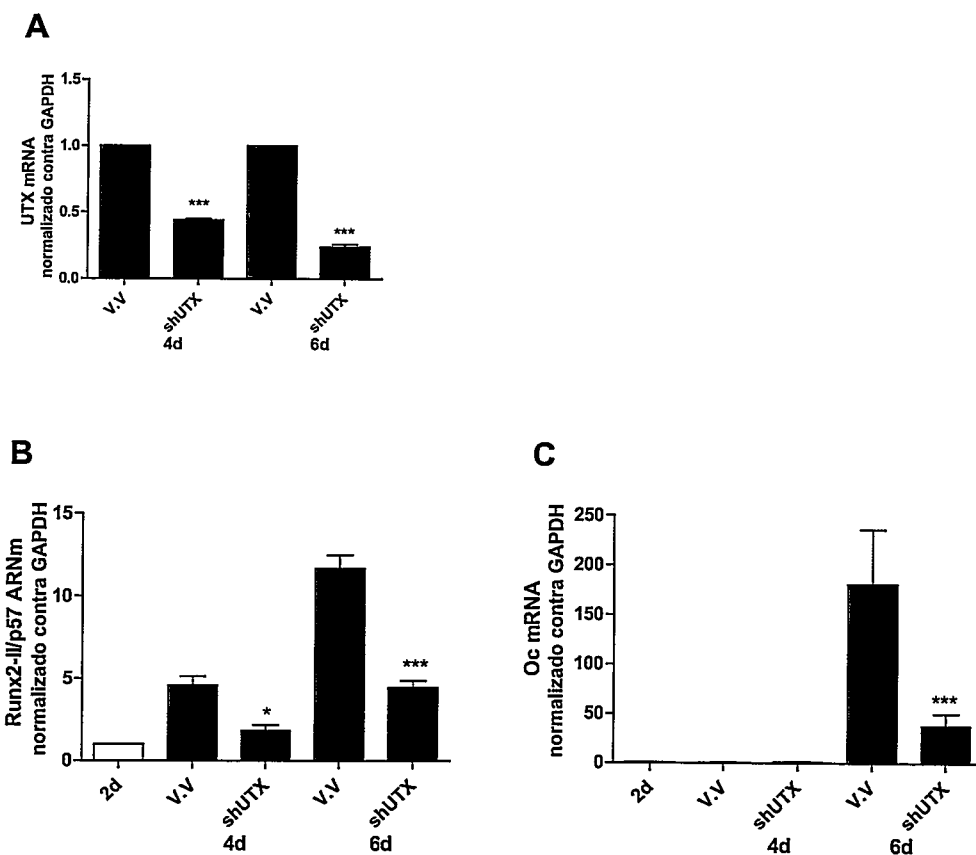


Figura 61. Silenciamiento de UTX en osteoblastos primarios de rata. Cultivo de osteoblastos primarios de 2 días de cultivo (40%confluencia) fueron infectados con shRNA para UTX (negro) o control (E.V, gris), y las muestras fueron colectadas a los 4 y 6 días. El RNA total fue analizado por RT-PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para UTX (A), Runx2-II/p57 (B) y osteocalcina ,OC (C). Los resultados fueron normalizados contra la expresión de GAPDH. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student, utilizando como grupo control la condición de V.V para cda uno de los tiempos evaluados. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

4. DISCUSION

El desarrollo embrionario es un proceso que está acompañado por una regulación espacial y temporal de los patrones de expresión génica. Este control de la expresión génica es modulado en gran parte por los ya planteados mecanismos de regulación epigenética. La epigenética forma parte de las redes de control en el proceso de diferenciación de células madre (Dambacher., 2010).

Las células madre o células troncales, son células que derivan de la masa celular interna del blastocisto, pueden autoreplicarse y por su característica de ser pluripotentes, pueden dar origen a células de las tres capas germinales. Esta capacidad de auto-replicación y de pluripotencia es mediada por la presencia de varios factores de transcripción tales como OCT4, NANOG y SOX2, los cuales muestran una alta expresión en células troncales no diferenciadas y se encuentran unidos a promotores de genes como KLF4 y otros promotores de genes relacionados con proliferación celular (Vandenberg y col., 2010, Wang y col., 2006). Al respecto, se ha determinado que en algunos casos, estos factores también se unen a los promotores de genes reguladores o genes maestros linaje-específicos y de diferenciación celular para inhibir su expresión (Boyer y col., 2005). Cuando ocurre la diferenciación celular, las células troncales disminuyen la expresión de genes relacionados

con pluripotencia y aumenta la expresión de genes linaje-específicos que hasta ahora estaban reprimidos o silentes (Woong y col., 2012). Esta activación en la expresión de genes involucra cambios epigenéticos en los promotores mediados por la presencia de modificaciones postraduccionales en las colas de las histonas y por la presencia de enzimas modificadoras, entre otros mecanismos (Woong y col., 2012). Como se mencionó anteriormente, las modificaciones en las colas de las histonas controlan el acceso de elementos regulatorios de la transcripción a los promotores de los genes. Mediante análisis de Chip-seq se ha descrito por ejemplo, que existen diferencias en el estado epigenético entre una célula somática y una célula troncal. Específicamente, se ha descrito la presencia de dominios bivalentes (regiones con enriquecimiento en H3K27Me3 y H3K4Me3) en los promotores de los genes de las células troncales y que esta bivalencia se pierde con el evento de diferenciación celular (Mikkelsen y col., 2007). De esta manera se ha asociado la presencia de dominios bivalentes al silenciamiento de promotores que se encuentran en un equilibrio por la presencia de marcas activadoras y represoras, pero que están listos o preparados para ser activados transcripcionalmente, los cuales han sido denominados promotores "*latentes*" (Mikkelsen y col., 2007). Con base en lo anterior, los promotores han sido clasificados como activos, reprimidos o promotores "*latentes*" (Mikkelsen y col., 2007). En esta última categoría también se han agrupado a promotores de genes que aunque no presenten esa bivalencia H3K4Me3/H3K27Me3, tienen la

propiedad de ser activados transcripcionalmente, lo que le confiere a la célula cierta plasticidad durante el evento de la diferenciación celular. Nuestros resultados demostraron que en células progenitoras mesenquimales, el promotor P1 de Runx2, se encuentra inactivo transcripcionalmente y está enriquecido con modificaciones represoras como H3K27Me3 y H3K4Me. También encontramos que estos enriquecimientos cambian durante el evento de diferenciación celular para favorecer o desfavorecer la activación transcripcional del gen. De esta manera, nosotros planteamos que el promotor P1 de Runx2, puede ser considerado como un promotor en estado de latencia, que se encuentra inactivo en células osteoprogenitoras para posteriormente ser activado durante el evento de diferenciación osteogénica. Para que este evento ocurra es fundamental la presencia de enzimas modificadoras que formando complejos, medien esta activación y favorezcan el reclutamiento de la maquinaria transcripcional del gen.

El factor de transcripción Runx2, es indispensable para regular las etapas tempranas y tardías del proceso de diferenciación osteogénico (Cohen., 2006). Existen dos isoformas (p56 y p57) descritas para Runx2, cuyas expresiones son comandadas por los promotores P2 y P1 respectivamente. Se ha descrito que la expresión de la isoforma II/P57 es la única que aumenta durante el proceso de diferenciación osteoblástica, lo que le confiere un rol importante en este proceso. Al respecto, en nuestro laboratorio, usando líneas celulares de osteosarcoma y hepatocitos de rata, se demostró la existencia de un patrón

específico de modificaciones covalentes en el promotor P1 de Runx2, asociado a activación y a represión transcripcional (Henriquez., 2009).

En esta tesis se evaluaron mecanismos epigenéticos involucrados en el control de la expresión del gen Runx2-II/p57 durante la diferenciación osteoblástica de células C2C12 y MC3T3. Específicamente, nuestros objetivos se abocaron a evaluar la contribución de las histonas metiltransferasas WDR5, EZH2 y PRMT5 y de las demetilinas NO66, JARID1B, UTX y JMJD6, sobre la actividad transcripcional del gen Runx2. Estas enzimas son responsables de las modificaciones covalentes en los residuos de lisina 4 y 27 de la histona H3 y arginina 3 de la histona H4. Demostramos la participación del complejo WDR5 y UTX en la activación transcripcional de Runx2, mediante un mecanismo concertado que mantiene altos los niveles de H3K4Me3 y un bajo enriquecimiento de la H3K27Me3 en el promotor P1. También describimos que la enzima JARID1B participa en la represión de Runx2-II/p57 a través de su acción como enzima demetilasa de H3K4Me3.

Los primeros análisis de esta tesis doctoral estuvieron dirigidos a la caracterización de la respuesta transcripcional en las líneas celulares C2C12 y MC3T3. La línea celular C2C12 constituye un modelo biológico idóneo para estudiar los eventos asociados con represión y activación transcripcional del gen Runx2-II/p57 (Katagiri y col., 1994; Lee y col., 2000; Banerjee y col., 2001). Lo anterior debido a que es una línea celular bipotencial comprometida hacia el linaje miogénico que en cultivo adquiere un fenotipo muscular característico,

acompañado por un aumento en la expresión de genes relacionados con la diferenciación muscular, pero que en presencia de BMP2 se activa la transcripción de genes involucrados con el linaje osteoblástico como Runx2 (Cruzat y col., 2009, Katagiri y col., 1994).

En nuestros ensayos de diferenciación, las células C2C12 cultivadas con medio suplementado con suero de caballo, presentaron un fenotipo muscular acompañado de un aumento en la expresión de miogenina en los tiempos evaluados (Fig 7 C). En contraste, la presencia de BMP2 indujo una disminución en la expresión de este gen, lo que ocurrió en paralelo con el aumento en la expresión del ARNm y de la proteína Runx2-II/p57 (Fig 7 A). Esta activación transcripcional de Runx2-II/p57 se vio reflejada a nivel funcional por un aumento en la expresión del gen osteocalcina (Fig 7 B) y un incremento en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (Fig 6 B). Los eventos de activación transcripcional de la isoforma P57 y osteocalcina, fueron comparables con lo observado en la línea celular preosteoblástica MC3T3. En estas muestras de 3, 5, 7 y 9 días de diferenciación se detectó presencia tanto del ARNm, como de la proteína Runx2-II/p57 (Fig 9 A). Estos resultados validan el uso de estas dos líneas celulares para el estudio de los mecanismos epigenéticos que controlan la expresión del factor de transcripción Runx2, específicamente para determinar las enzimas metilasas y demetilasas involucradas con este proceso.

4.1. Regulación de la expresión génica de Runx2-II/p57 mediante modificaciones covalentes en las colas de las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1.

Estudios previos de nuestro laboratorio han reportado la existencia de un patrón específico de modificaciones covalentes en las colas de las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2. De igual manera se señaló que este patrón se encuentra asociado a los estados transcripcionales activo e inactivo del gen (Henriquez., 2009). Específicamente en células que expresan Runx2, se detectó un enriquecimiento de la H3K4Me3 y un aumento en los niveles de acetilación global de las histonas H3 y H4 en el promotor P1. En contraste, en células que no expresan Runx2 se reportó un enriquecimiento de marcas represoras como H3K4Me, H3K9Me, H3K9Me2, H3K9Me3, H3K27Me3 y H4R3Me2S (Henriquez., 2009).

4.1.1 Represión transcripcional del promotor P1 de Runx2.

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar la participación de las enzimas NO66, JARID1B, EZH2 y PRMT5 en la represión transcripcional del gen Runx2. Lo anterior, mediante la remoción de la H3K4Me3 por NO66 y/o JARID1B; el enriquecimiento de la H3K27Me3 mediado por EZH2 el aumento en los niveles de H4R3Me2s catalizados por PRMT5. Al realizar los análisis de expresión de ARN mensajero de marcadores de diferenciación miogénica y

osteogénica, en nuestro modelo de células C2C12 cultivadas con suero de caballo (HS) se demostró ausencia de expresión para Runx2 y expresión altamente significativa del gen miogenina. Esto es apoyado por reportes en la literatura, en donde se utilizó a esta línea celular como modelo para analizar los mecanismos asociados a activación transcripcional del promotor de miogenina en la diferenciación muscular (Seenundun y col., 2010; Stojic y col., 2011, Cruzat y col., 2009). Estos resultados confirman que las células C2C12 diferenciadas al linaje muscular representan un buen modelo de inactividad transcripcional del promotor P1 de Runx2.

La trimetilación en la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Me3) es una modificación asociada a represión transcripcional que ha sido reportada en modelos celulares diversos (Kouzarides., 2007; Seenundun., 2010; Schuettengruber., 2007). Esta marca es catalizada por los complejos Polycomb (PRC2), los cuales están compuestos por las proteínas Eed, Suz12 y una de las subunidades catalíticas EZH1 o EZH2 (Aloia y col., 2013). Estas enzimas y la presencia de H3K27Me3 estarían promoviendo el silenciamiento transcripcional y la compactación de la cromatina (Francis y col., 2004). Los resultados obtenidos de los experimentos de CHIP muestran que EZH2 está unida al promotor P1 cuando el gen está inactivo transcripcionalmente, lo que se representa en la condición de preconfluencia y de diferenciación hacia el linaje miogénico de las células C2C12 (Fig 15 C). Si bien el reclutamiento de EZH2 al promotor P1 es concomitante con un aumento en H3K27Me3 (Fig 10

A y 14 C); nuestros resultados utilizando shARN contra EZH2, muestran que la expresión de Runx2-II/p57 no se induce en células C2C12 tratadas con HS (Fig 31 B). Estos resultados nos permiten concluir que a pesar de que la H3K27Me3 es una modificación que está presente en el promotor P1 cuando el gen está inactivo, su sola remoción no consigue activar la expresión del gen, lo que indica que posiblemente se requiera de la presencia de otras modificaciones activadoras y de otras enzimas modificadoras de histonas que favorezcan la activación del gen para este caso en particular. Estos resultados son homologables a lo descrito por el grupo de Stojic para la regulación transcripcional de miogenina, donde se observó que el silenciamiento de EZH2 no indujo aumentos en la expresión del gen (Stojic., 2011).

El mecanismo por el cual el promotor P1 de Runx2 permanece inactivo transcripcionalmente a pesar de la disminución en los niveles de H3K27Me3 detectados como consecuencia del shARN de EZH2, podría explicarse por varios factores:

-En la diferenciación miogénica, detectamos la unión al promotor P1 de las enzimas demetilasas NO66 y JARID1B que demetilan la H3K4Me3 (Fig 14 D y E). También se detectó la unión de PRMT5, metilasa de la H4R3Me2s (Fig 15 D). Pese al silenciamiento de EZH2, todas estas otras enzimas seguirían unidas al promotor y en consecuencia continuarían mediando la presencia de modificaciones represivas que impiden la activación transcripcional de Runx2.

-Se ha descrito que la H3K27Me3 y la H3K9Me3 son marcas asociadas con represión transcripcional que pueden actuar por mecanismos epigenéticos diferentes. De esta manera se ha definido a H3K27Me3 como una marca que puede reprimir la expresión de genes "potencialmente expresables", como es el caso de genes relacionados con el desarrollo embrionario y miembros de las familias *Hox*, *Pas* y *Sox* (Boyer y col., 2006; Lee y col., 2006). Por otra parte H3K9Me3 es considerada como una marca represiva más permanente, que incluso suele designarse a la formación de heterocromatina en las regiones cromosómicas (Kim., 2013). Luego de analizar la presencia de H3K9Me3 en el promotor P1 de *Runx2* en células C2C12 diferenciadas a los dos linajes (Resultados posteriores al término de ésta tesis) encontramos enriquecimiento de esta modificación cuando el gen está inactivo transcripcionalmente.(Anexo 6.1). Por lo tanto, postulamos que posiblemente la presencia en el promotor de H3K9Me3 esté evitando que la activación del gen ocurra a pesar de la disminución en los niveles de H3K27Me3 detectados producto del shARN de EZH2.

-Tal como se describió anteriormente para que un promotor se active transcripcionalmente se requiere de la ocurrencia de eventos simultáneos que favorezcan esa activación. Se ha descrito por ejemplo que para la activación de genes *Hox* en *Drosophila*, se requiere de la disminución de marcas represoras y el enriquecimiento de marcas activadoras; esto significa que deben ser reclutadas al promotor varias enzimas con funciones totalmente diferentes que

estén favoreciendo ese proceso de activación o de represión. Por esta razón nosotros pensamos que el sólo silenciamiento de EZH2 no es suficiente para activar la expresión del promotor P1 de Runx2.

-La existencia de un mecanismo de compensación por EZH1. Lo anterior debido a la presencia exacerbada de EZH1 producto del silenciamiento de EZH2, situación detectada en nuestros experimentos y que podría estar compensando la función de EZH2. De esta manera, es posible que en nuestro modelo de diferenciación ósea, EZH1 cumpla una función represora en el promotor P1 cuya actividad sea entre otras, el reclutamiento de proteínas involucradas en represión transcripcional. Al respecto, se ha descrito que EZH1 es capaz de compactar la cromatina en ausencia de su actividad metilasa (Margueron 2008), lo que podría ser extrapolado a la represión detectada en el gen de Runx2-II/p57.

Congruente con lo anterior, el silenciamiento de shEZH2 en células diferenciadas al linaje óseo no genera cambios en la expresión de Runx2-II/p57. Esto conjunto a los resultados expuestos anteriormente, indican que EZH2 no es un regulador principal de la represión transcripcional de Runx2-II/P57. Por el contrario, proponemos la existencia de un mecanismo concertado mediado por la presencia de varios complejos enzimáticos que catalizan la presencia de varias modificaciones asociadas con represión transcripcional.

Otra modificación que encontramos asociada al promotor P1 de Runx2 durante la represión transcripcional es H4R3Me2s. Esta modificación, mediada por PRMT5, ha sido relacionada con inactividad transcripcional e incluso se ha descrito su vinculación con metilación de ADN y silenciamiento transcripcional en el locus de la β -globina (Zhao y col., 2009). Es importante destacar que PRMT5, también puede actuar como activador transcripcional en eventos de diferenciación. Por ejemplo durante la diferenciación muscular se demostró su participación en la activación de genes miogénicos, a través de la dimetilación de H3R8 (Dacwag y col., 2009). Nuestros resultados demostraron que la H4R3Me2s se encuentra enriquecida en el promotor P1 únicamente en la condición de células tratadas con HS por 72 horas (Fig. 10 B) y que este evento coincide con el reclutamiento de PRMT5 a la misma región promotora, no así en la condición de preconfluencia (pC) (Fig 15 D). Estos resultados relacionan a H4R3Me2s y a PRMT5 como elementos que están presentes en el promotor P1 cuando el gen está reprimido transcripcionalmente, más no se encuentran presentes en el promotor cuando éste podría ser potencialmente activado (condición de pC). Lo que podría sugerir que la H4R3Me2s, en el contexto del promotor P1, podría estar actuando como un mecanismo reforzador del silenciamiento del gen, no siendo el único responsable sobre la represión del mismo.

Los ensayos de shARN contra PRMT5 en células C2C12 diferenciadas al linaje mioblástico no muestran inducción en la expresión de Runx2-II/p57, a pesar de

que los niveles de H4R3Me2s disminuyen significativamente como consecuencia del silenciamiento de PRMT5 (Fig 36 B). Estos resultados podrían ser explicados por:

-la presencia de proteínas con acción represora como NO66, JARID1B y EZH2 que estén catalizando modificaciones represivas como H3K4Me, H3K27Me3, entre otras; las cuales fueron detectadas con un alto enriquecimiento cuando las células fueron tratadas con HS por 72 horas.

-La ausencia de proteínas con acción activadora como WDR5 y UTX en el promotor, que favorecen la presencia de modificaciones activadoras y la remoción de modificaciones represoras como la H3K27Me3 en el promotor P1.

-Se ha descrito que la función represora de PRMT5 en el promotor de genes como la B-globina está relacionada con catalizar el enriquecimiento de la H4R3Me2s y con el reclutamiento de enzimas metiltransferasas de ADN (Zhao y col., 2009). En este trabajo se demostró que la H4R3Me2s es requerida para la metilación del ADN mediante su unión directa con la metiltransferasa de ADN, DNMT3A. La pérdida de H4R3Me2S a través del silenciamiento de PRMT5 causó una disminución en la unión de DNMT3A al promotor de B-globina, la consecuente demetilación del ADN y la activación del gen. En el contexto del promotor P1 de Runx2 , análisis bioinformáticos han revelado que los 600 pb proximales al sitio de inicio de transcripción no posee CpG que constituyan un blanco metilable (Xiao y cols., 2001). Este hecho explicaría que

no exista respuesta en la expresión de Runx2 detectada en nuestros experimentos de shARN contra PRMT5 en células C2C12 diferenciadas al linaje muscular.

Todos estos resultados, son congruentes con datos de nuestro laboratorio en donde se ha detectado el enriquecimiento de PRMT5 y de H4R3Me2s en el promotor P1 de Runx2, en muestras de cultivo de neuronas hipocampales (obtenidos a partir de embriones E18), donde la expresión de Runx2-II/p57 es nula. De otra parte, ensayos de pérdida de función de PRMT5 en estos cultivos de neuronas hipocampales, tampoco indujo la activación transcripcional de Runx2-II/p57; lo cual respaldaría los datos obtenidos en esta tesis. (Tesis Doctoral en curso, datos no publicados. Aguilar, R.).

Como se discutió anteriormente, se ha postulado que la actividad de PRMT5 es regulada por la enzima COPR5. La formación de este complejo favorece la represión transcripcional a través de la H4R3Me2s (Lacroix y cols., 2008). Nuestros resultados de silenciamiento para COPR5 en mioblastos (C2C12+HS) mostraron que en ausencia de COPR5, la unión de PRMT5 al promotor P1 y los niveles de H4R3Me2s disminuyeron significativamente. Estos resultados sugieren que en el promotor P1 de Runx2, COPR5 podría funcionar como proteína cooperadora que le confiere a PRMT5 especificidad preferencial para catalizar la marca H4R3Me2s, tal como fue demostrado para el promotor del gen de la ciclina E1 (Lacroix y Col., 2008). Sin embargo para confirmar esta afirmación se hace necesario confirmar la existencia del complejo en el núcleo

y en el promotor mismo mediante experimentos de re-Imunoprecipitación de cromatina (re-ChIP) y complementar los resultados obtenidos en los ensayos de silenciamiento génico para COPR5 realizando los análisis a nivel de expresión de proteína, los cuales no fueron realizados en éste trabajo por carecer de anticuerpos disponibles en el mercado para ésta proteína.

Altos niveles de H3K4Me han sido previamente observados corriente arriba y en el cuerpo de genes activos transcripcionalmente pero no en el sitio de inicio de la transcripción (Barski y col., 2007). Además, en plantas esta modificación ha sido asociada a represión transcripcional (Van Dijk y cols., 2005). La respuesta transcripcional que se asocia con una marca específica depende de la presencia de factores específicos que reconozcan y se unan a la marca, mediando posteriormente cambios moleculares que afecten la transcripción. Las enzimas que se unen a H3K4Me3 pueden tener actividades muy variadas, determinando diferentes respuestas en contextos celulares distintos. Las demetilasas miembro de la familia JARID, demetilasas específicas de la H3K4, actúan como represores transcripcionales al convertir H3K4Me3 a los estados de di y mono-metilación. Esto se ha observado en células madre de ratón en donde las proteínas de la familia JARID1 son reclutadas a los genes *Hox*, lo que se correlaciona con el silenciamiento de estos genes y la diferenciación de estas células (Agger y col., 2008). Por lo anterior, la regulación de las concentraciones de enzimas que median respuestas transcripcionales al

interaccionar con las modificaciones de histonas juega un papel importante en la contribución de la marca a la represión o activación de un gen.

En el contexto del promotor P1 de Runx2 se ha demostrado que células que no expresan Runx2 presentan enriquecimiento en marcas represoras como la H3K4Me (Henriquez., 2009). Esta observación fue corroborada en nuestros experimentos de células C2C12 donde encontramos enriquecimiento de la marca en las condiciones de preconfuencia y diferenciación a miotubos, situación en la que el gen está inactivo transcripcionalmente. De igual manera, encontramos presencia de las enzimas demetiladas JARID1B y NO66 en el promotor P1 de Runx2 en estas células.

La participación de JARID1B mediando la remoción de la H3K4Me3 durante la represión transcripcional ha sido descrita en genes involucrados con el desarrollo embrionario, la diferenciación neuronal y algunos tipos de cáncer (Cellot y col., 2013, Schmitz 2011). Apoyando esto, encontramos que al hacer uso de shARN contra JARID1B en células C2C12 diferenciadas al linaje miogénico se indujo la expresión de Runx2-II/p57 y de Oc. Esta respuesta transcripcional de Runx2-II/p57, se relaciona con el aumento en los niveles de H3K4Me3 en el promotor P1. Estos resultados son congruentes con lo reportado por el grupo de Schmitz y colaboradores, en células madre de ratón, en el promotor del gen *Cebpa*, donde se describe un aumento en H3K4Me3 ocasionado por el uso de un shARN contra JARID1B. Además, se ha demostrado que esta enzima forma complejos con proteínas con actividad

represora como EZH2, G9a y HDAC1, alterando los enriquecimientos de H3K27Me3, H3K9Me3 y los niveles de acetilación de las histonas, en promotores blanco, respectivamente (Schmitz y col., 2011, Hasan y col., 2013). En este contexto, con el fin de explicar estos resultados, también evaluamos la presencia de otras modificaciones represoras y activadoras en el promotor P1 que nos explicaran la inducción del gen Runx2-II/p57 detectada. Encontramos disminuciones significativas en el enriquecimiento de H3K27Me3 y H3K9Me3; e interesantemente, detectamos un enriquecimiento en los niveles de H3K27Ac en células tratadas con el shARN (Anexo 6.2). Todos estos resultados permiten proponer que la función represora mediada por JARID1B en el promotor P1 de Runx2 ocurre mediante su actividad demetilasa de H3K4Me3 y su habilidad para interactuar con otras proteínas, alterando el enriquecimiento de marcas represoras como H3K27Me3 y H3K9Me3 e incluso modificando los niveles de acetilación de las histonas.

En congruencia con lo reportado para la diferenciación miogénica, los experimentos de shARN de JARID1B en células estimuladas con BMP2, mostraron que el silenciamiento de esta enzima indujo un aumento significativo en la expresión de Runx2-II/p57 y de osteocalcina; lo que se vio respaldado por el enriquecimiento en la marca H3K4Me3 detectada en los experimentos de ChIP (Fig. 28 B).

NO66 es una proteína con dominio JmjC que tiene actividad demetilasa dual para las marcas H3K4Me3 y H3K36Me3, ambas asociadas a transcripción

activa (Sinha y col., 2010). Previamente se había descrito que NO66 interactúa con osterix regulando negativamente la actividad transcripcional mediada por este factor de transcripción (Sinha y Col., 2010). En el mismo trabajo se demostró que el silenciamiento de NO66 mediante shRNA, induce un aumento en la expresión de genes como osteocalcina y sialoproteína ósea (Sinha y col., 2010). En nuestros modelos de diferenciación, encontramos que NO66 se encuentra unida al promotor P1 en células que no expresan Runx2-II/p57. Concomitante con lo anterior, detectamos un bajo enriquecimiento de H3K4Me3, lo que a su vez fue consecuente con una baja expresión de la isoforma p57 de Runx2. Interesantemente, los resultados mostraron que al silenciar la expresión NO66 no se induce la expresión del ARN mensajero de Runx2-II/p57. A pesar de lo anterior, los resultados de silenciamiento acoplados a ensayos de ChIP, detectaron un aumento en los niveles de H3K4Me3, lo que no es congruente con la ausencia de expresión de Runx2-II/p57. En la búsqueda de una explicación para estos resultados inesperados, evaluamos el enriquecimiento de las marcas H3K27Me3, H3K9Me3 y H3K27Ac después de la infección con el shARN contra NO66. Encontramos una reducción altamente significativa en el enriquecimiento de las marcas represoras H3K27Me3 y H3K9Me3 (Anexo 6.3); sin embargo, contrario a lo encontrado para JARID1B, detectamos que los niveles de acetilación de la lisina 27 no aumentaron. Estos resultados indican que para que ocurra la activación transcripcional de Runx2-II/p57, se requiere del reclutamiento de

enzimas modificadoras al promotor P1, que favorezcan la presencia de modificaciones activadoras y desfavorezcan el enriquecimiento de modificaciones represoras. En el momento de redactar esta tesis, no es posible proponer un mecanismo basado en datos existentes, que explique la ausencia de acetilación de la lisina 27 en la histona H3 pese a la disminución de la marca H3K27Me3 detectada en las células tratadas con el shARN de NO66. Sin embargo los datos indican que en este evento, las enzimas involucradas en mediar la acetilación en los residuos de lisina 27 no fueron reclutadas al promotor P1.

Al respecto, datos previos de nuestro laboratorio han demostrado la participación del coactivador p300 en la activación transcripcional del gen Runx2-II/p57 (Datos no publicados). Este coactivador ha sido descrito como una proteína con acción acetiltransferasa cuyo principal blanco de acetilación lo constituyen los residuos de lisina 27 y por tanto es una proteína asociada a activación transcripcional. Los cambios detectados en las modificaciones H3K27Me3, H3K27Ac, producto de los ensayos de pérdida de función de NO66 y JARID1B, nos permiten sugerir una probable participación de p300 en éste evento. Sin embargo, esta posibilidad deberá ser explorada experimentalmente.

Por otra parte, en los modelos de diferenciación ósea utilizados en esta tesis, los resultados de ChIP demostraron que la unión de NO66 a la región promotora P1 en células diferenciadas al linaje osteoblástico es inicialmente

baja y que disminuye aún más a medida que la expresión de Runx2-II/p57 aumenta. Esta situación coincide con el enriquecimiento de la H3K4Me3 encontrado en esta misma condición. Además se observó que el silenciamiento de NO66 produjo un aumento en el enriquecimiento de la H3K4Me3 en el promotor P1, que se tradujo en el incremento de la expresión de la isoforma p57 de Runx2. Estos resultados son homologables a lo descrito por el grupo de Sinha en células C2C12 estimuladas con BMP2, donde se demostró que el silenciamiento de NO66 provoca una celeridad de la diferenciación osteogénica, mediante el aumento de la expresión de sialoproteína ósea y osteocalcina.

En conjunto la evidencia obtenida en esta tesis nos permite proponer un modelo para la represión transcripcional de Runx2-II/p57 mediante mecanismos epigenéticos que se resume en la figura 62. En este modelo, en etapas tempranas del desarrollo, en las células mesenquimales, el promotor P1 presenta enriquecimiento en las modificaciones H3K4Me y H3K27Me3, las cuales son mediadas por las enzimas JARID1B y EZH2, respectivamente. Luego en una etapa de represión del gen como por ejemplo por estimulación con suero de caballo, las células diferenciadas a miotubos exhiben un aumento en la unión de estas enzimas que ocurre concomitantemente con el enriquecimiento de las modificaciones H3K4Me y H3K27Me3. Además, en esta condición de represión el promotor P1 también muestra altos niveles de enriquecimiento de H4R3Me2s la cual está siendo catalizada por PRMT5. La

presencia de todas estas modificaciones represivas y la formación de complejos represores de enzimas modificadoras de histonas sería fundamental para mantener la represión transcripcional de Runx2.

4.1.2 Activación transcripcional del promotor P1 de Runx2.

La trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4Me3) es una modificación que ha sido descrita en diversos organismos. Se ha detectado su enriquecimiento en regiones corriente arriba de genes activos transcripcionalmente, en sitios cercanos al inicio de la transcripción. De igual manera, su presencia ha sido detectada junto a niveles altos de acetilación y reclutamiento de la RNA polimerasa (Kouzarides., 2007). En nuestros experimentos encontramos que H3K4Me3 se encuentra enriquecida en el promotor P1 de Runx2 en células que expresan activamente el gen. Estos resultados son congruentes con reportes previos en los que se ha detectado la presencia de esta modificación en el promotor P1 de Runx2, en células mesenquimales estromales ST2 (Takeda y col., 2007) y células MC3T3 diferenciadas a osteoblastos (Zhu y col., 2008). Esta modificación en las histonas es catalizada por los complejos tipo COMPASS, constituidos por los complejos MLL1-4. Formando parte integral de todos los complejos COMPASS se encuentra la proteína estructural WDR5, la cual ha sido descrita como esencial para el desarrollo osteoblástico (Zhu y col., 2008). Además, se ha

determinado que la sobre-expresión de WDR5 causa una aceleración del desarrollo óseo en embriones de 17.5 días (Gori y col., 2005).

Nuestros resultados indican que concomitante con el enriquecimiento de H3K4Me3 en los nucleosomas asociados al promotor P1 de Runx2, WDR5 se une al mismo promotor. Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por otros autores, en los que se detectó la unión de WDR5 al promotor P1 de Runx2 en células diferenciadas al linaje osteoblástico (Zhu y col., 2008). Por otra parte, es importante destacar que NO66 y JARID1B, enzimas capaces de de-metilar este residuo, exhiben un patrón de unión opuesto al de WDR5, encontrándose unidas cuando los niveles de H3K4Me3 son muy bajos

Los experimentos de pérdida de función y de sobre-expresión de WDR5 demuestran que tiene participación en la regulación de la actividad transcripcional de Runx2 durante la diferenciación osteogénica. Las células tratadas con shRNA anti-WDR5 exhibieron una disminución aproximadamente del 50% en los niveles de expresión de Runx2-II/p57 y fueron incapaces de expresar otros genes tempranos y tardíos de la diferenciación osteogénica. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores, en los que se ha reportado que la haploinsuficiencia de Runx2-II/p57 induce alteraciones en el proceso de osificación e incluso altera la expresión de genes de diferenciación temprana y tardía (Komori y col., 1997).

La participación de WDR5 en el compromiso osteogénico, involucra la vía Wnt canónica y genes blanco de esta vía, como Runx2-II/p57, cuya expresión, en conjunto con genes óseo específicos como Oc, disminuye en ausencia de la proteína WDR5. (Zhu y col., 2008). El hallazgo que el enriquecimiento de la marca H3K4Me3 en el promotor P1 se reduzca cuando WDR5 es silenciado, es consistente con estudios realizados en embriones de *Xenopus laevis* en los que se demostró, mediante inmunofluorescencia, que la presencia de esta enzima es fundamental para mantener el enriquecimiento de H3K4Me3 (Wysocka y col., 2005).

Por otra parte, los experimentos de sobre-expresión de WDR5 en osteoblastos primarios demostraron aumentos significativos en la expresión de Runx2-II/p57 y Oc. Además que en los cultivos se pudo observar aumento en la formación de depósitos de calcio en la matriz extracelular, signo de diferenciación osteogénica favorecida. Estos datos se complementan con reportes anteriores en los que se observó una celeridad de la diferenciación osteoblástica inducida por la sobre-expresion de WDR5 en embriones de 17,5 días (Gori y col., 2005).

De esta forma, postulamos que la marca epigenética H3K4Me3 es importante para la regulación de la expresión de Runx2-II/p57, marca que es generada y mantenida por los complejos MLL/COMPASS, con WDR5 como proteína adaptadora. Experimentos futuros se abocarán a dilucidar el tipo de complejo MLL encargado de catalizar esta marca y de activar la transcripción del gen en estas condiciones.

Se ha demostrado que la activación transcripcional de algunos genes HOX es un proceso que requiere de la presencia de marcas epigenéticas activadoras, la remoción coordinada de marcas represivas y el desplazamiento de las proteínas del grupo Polycomb desde regiones regulatorias. La ocurrencia de estos eventos en paralelo permite asegurar una estricta regulación transcripcional durante la diferenciación celular (Copur y col., 2013). De igual manera se ha establecido que la ausencia de proteínas del grupo Polycomb suele verse acompañada por el reclutamiento de enzimas con actividad histona-demetilasa como JMJD3 y UTX, que catalizan la remoción de la marca H3K27Me3 de los promotores y conducen a un estado activo de la cromatina (Copur y col., 2013). Nuestros resultados mostraron que UTX se encuentra enriquecido en el promotor P1 de Runx2 en células diferenciadas al linaje osteogénico. Este reclutamiento coincide con una pérdida de la unión de su enzima antagonista, EZH2 y con la remoción de la marca H3K27Me3 en la región promotora. Interesantemente, encontramos que en la diferenciación miogénica, el promotor P1 mostró un enriquecimiento en H3K27Me3 que estuvo acompañado por el reclutamiento de UTX. La razón por la cual UTX no está demetilando la H3K27Me3 en esta situación no es clara, sin embargo, es posible que la actividad de esta enzima esté siendo modulada por la presencia de otras marcas epigenéticas o de otras enzimas presentes, tal como fue reportado para el promotor de CKm (Jhonson y col. 1989).

La participación de UTX en la diferenciación osteogénica quedó ratificada con los experimentos de shARN donde se apreció que la pérdida de UTX causó un aumento en los niveles de H3K27Me3. Este silenciamiento también tuvo efectos negativos en la expresión de genes asociados a diferenciación osteogénica temprana y tardía, como fue el caso de AP y Oc. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores para el promotor de miogenina en donde se demostró que la participación de UTX en la activación transcripcional de este gen, está relacionado con su función como enzima demetilasa de la marca represiva H3K27Me3 (Seenundun y col., 2010). Todos estos resultados en conjunto, nos indican que UTX es responsable de remover la marca H3K27Me3 en el promotor P1 de Runx2 durante la diferenciación osteogénica y que de esta manera, participa en la activación transcripcional de Runx2- β /p57.

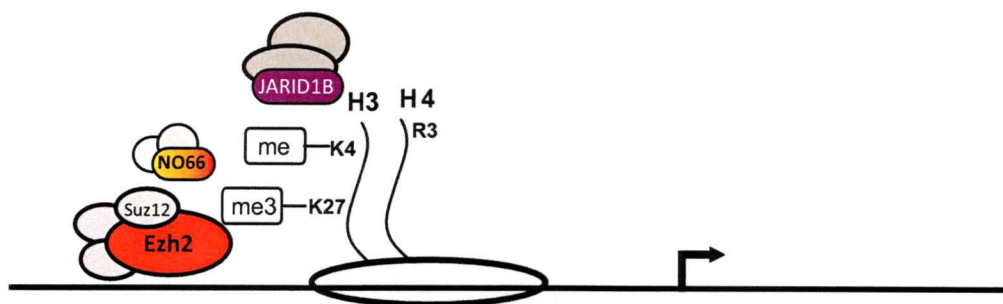
Tal como se discutió anteriormente, se ha reportado que UTX puede asociarse a WDR5, en los complejos MLL3/HALR(KMT2C), MLL4/HALR (KMT2D) y PTIP (Cho y cols., 2007; Issaeva y col., 2007; Lee y col., 2007). La formación de estos complejos provee un mecanismo por el cual los promotores pueden pasar de un estado transcripcionalmente reprimido a un estado transcripcionalmente activo (Seenundun y col., 2007). En concordancia con lo anterior, al analizar la existencia del complejo WDR5/UTX en células osteoblásticas, nuestros experimentos de IP y de reChIP demuestran que estas proteínas están formando parte de un mismo complejo que a su vez está

presente en el promotor P1 cuando el gen está transcripcionalmente activo. Estos resultados son respaldados por nuestras observaciones utilizando shARN contra WDR5 en células C2C12 diferenciadas al linaje óseo, donde observamos que la disminución en la expresión de WDR5 generó una disminución en la H3K4Me3. Además, esto ocurrió en paralelo con un decrecimiento del reclutamiento de UTX al promotor P1 y un aumento altamente significativo en los niveles de H3K27Me3 en la misma región. De igual manera, con el shARN de UTX se observó que la unión de WDR5 al promotor P1 disminuyó y que esta disminución estuvo acompañada de una baja en los niveles de H3K4Me3. Estos resultados indican que WDR5 y UTX, actúan concertadamente catalizando funciones distintas como metiltransferasa y demetilasa que favorecen la activación de Runx2-II/p57. Cabe resaltar que los resultados obtenidos para WDR5 y UTX fueron confirmados en cultivos primarios de osteoblastos obtenidos a partir de embriones de rata de 20 días. Esta aproximación nos permitió homologar los resultados obtenidos en los modelos de diferenciación de las líneas celulares C2C12 y MC3T3, con un modelo mucho más fisiológico, que nos permite recapitular eficientemente las etapas de diferenciación osteogénica.

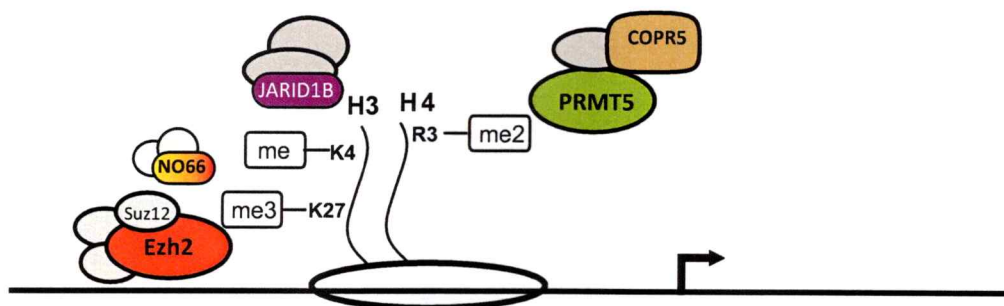
En conjunto, la evidencia presentada nos permite proponer un modelo que se resume en la figura 62. En este modelo, en etapas tempranas del desarrollo, en las células mesenquimales, el promotor P1 presenta enriquecimiento en las modificaciones H3K4Me y H3K27Me3 y en las enzimas NO66, JARID1B y

EZH2. Luego en una etapa temprana de activación, como por ejemplo, por estimulación con BMP2, las células preosteoblásticas exhiben un aumento en la marca H3K4Me3 y una disminución en los niveles de H3K27Me3, los cuales están siendo mediados por la presencia del complejo que contiene WDR5/UTX en el promotor P1. La presencia de este complejo permite mediante un mecanismo concertado aumentar la transcripción de Runx2-II/p57. Es importante destacar que el reclutamiento del complejo WDR5/UTX ocurre en paralelo con la desaparición de las enzimas EZH2, NO66 y JARID 1B de la región promotora, lo que favorece la activación del gen.

A



B



C

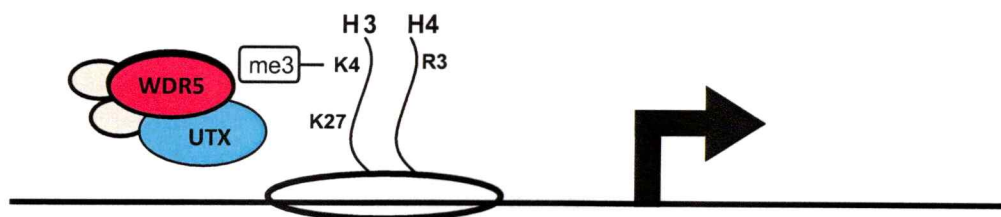


Figura 62. Modelo de regulación epigenética de la transcripción del promotor P1 del gen Runx2-II/p57 durante la diferenciación osteoblástica. En la figura se muestran los residuos aminoacídicos de las regiones N-terminales de las histonas H3 y H4 asociadas al promotor P1 del gen Runx2, sus modificaciones covalentes y las enzimas con acción metiltransferasa o demetilasa que catalizan estas modificaciones. Cada residuo tiene su posición en la estructura de las histonas H3 y H4. Los cuadros con el símbolo Me, ubicados al lado de cada residuo, indican metilación y el número hace referencia al grado de la modificación. El tamaño de la flecha indica el nivel de transcripción del gen Runx2. **A.** Células mesenquimales pluripotentes. **B.** Células que no expresan Runx2-II/p57. **C.** Células que expresan Runx2-II/p57.



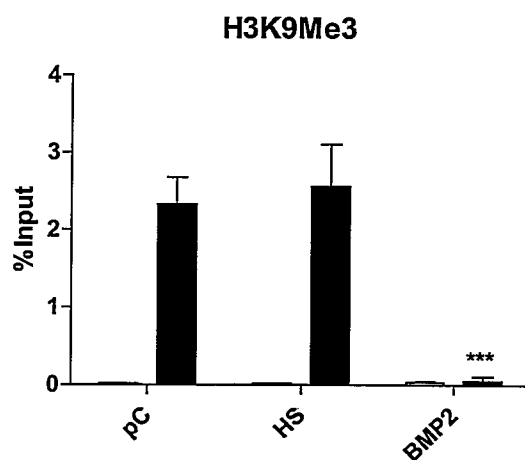
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Esta tesis doctoral se centró en identificar la participación de las enzimas metiltransferasas WDR5, EZH2, PRMT5 y las demetilasas NO66, JARID1B, UTX y JMJD6 en la regulación transcripcional del promotor P1 del gen Runx2.

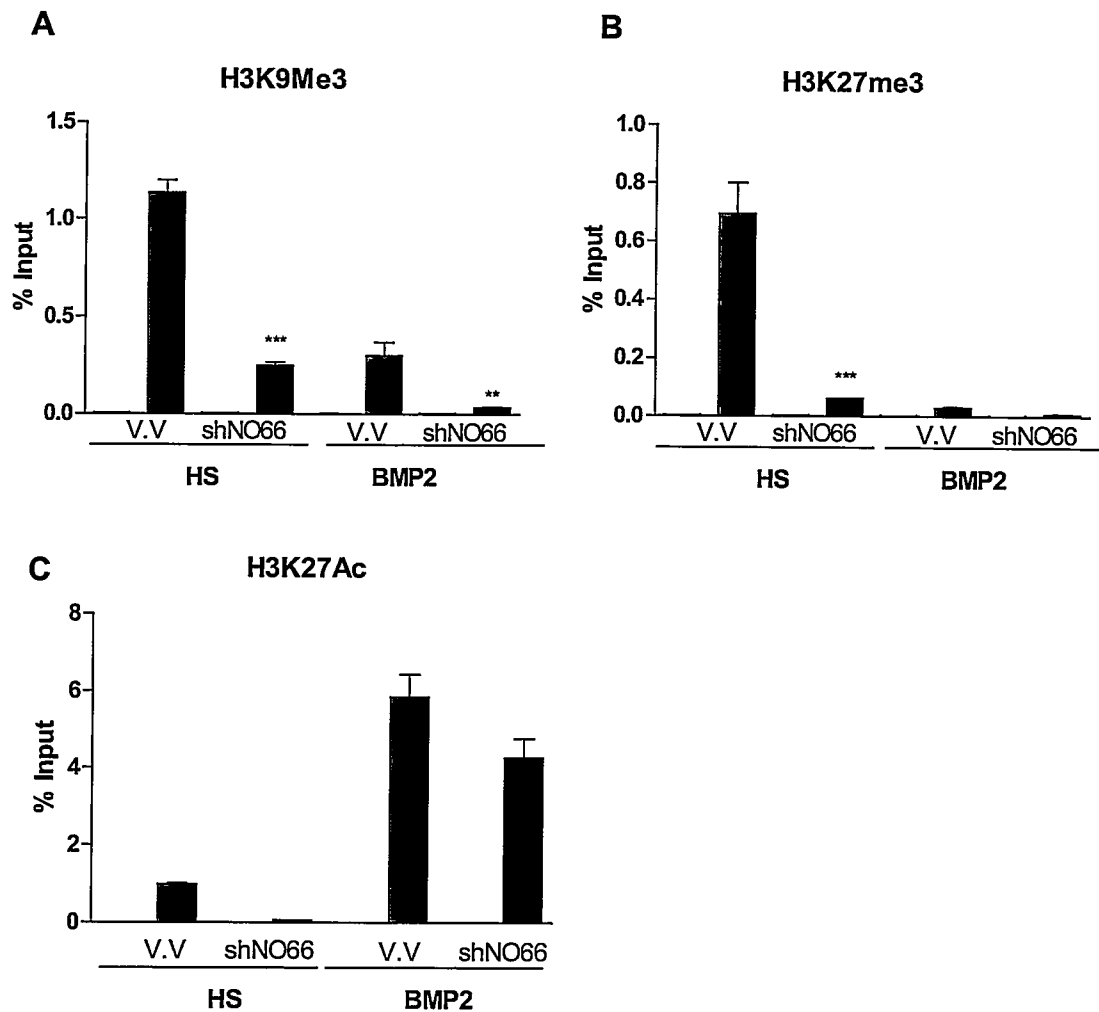
Los resultados nos permiten concluir que la existencia de modificaciones covalentes específicas en las histonas H3 y H4 asociadas a la activación e inactivación del gen reportadas por otros autores y confirmadas en esta tesis, están directamente relacionadas con la presencia de enzimas con acción metiltransferasa, demetilasa, acetiltransferasa y deacetiltransferasa, que forman complejos en el promotor P1 de Runx2. Estos complejos pueden estar compuestos por enzimas con funciones totalmente distintas, pero que en conjunto catalizan la presencia de modificaciones en diferentes residuos de las histonas que favorecen la activación o represión transcripcional de un gen. Concluimos que la formación del complejo que contiene WDR5-UTX, participa en la activación transcripcional del gen mediante un mecanismo concertado que le permite al promotor tener altos niveles de H3K4Me3 y muy baja presencia de H3K27Me3. Por otra parte, concluimos que en células que no expresan Runx2-II/p57, la demetilasa JARID1B contribuye con la represión transcripcional del promotor P1. Esta regulación no solo está siendo mediada

por su acción demetilasa de residuos trimetilados de H3K4 sino que posiblemente participe formando complejos con proteínas modificadoras que favorecen la presencia de modificaciones represoras y otras proteínas que desfavorecen los niveles de acetilación en el promotor P1. De otra parte, también concluimos que cuando el gen está inactivo transcripcionalmente las enzimas NO66, EZH2 y PRMT5 son reclutadas al promotor P1, favoreciendo el estado represivo de la cromatina. Sin duda será necesario que se profundice en trabajos futuros en el entendimiento de su participación en este proceso.

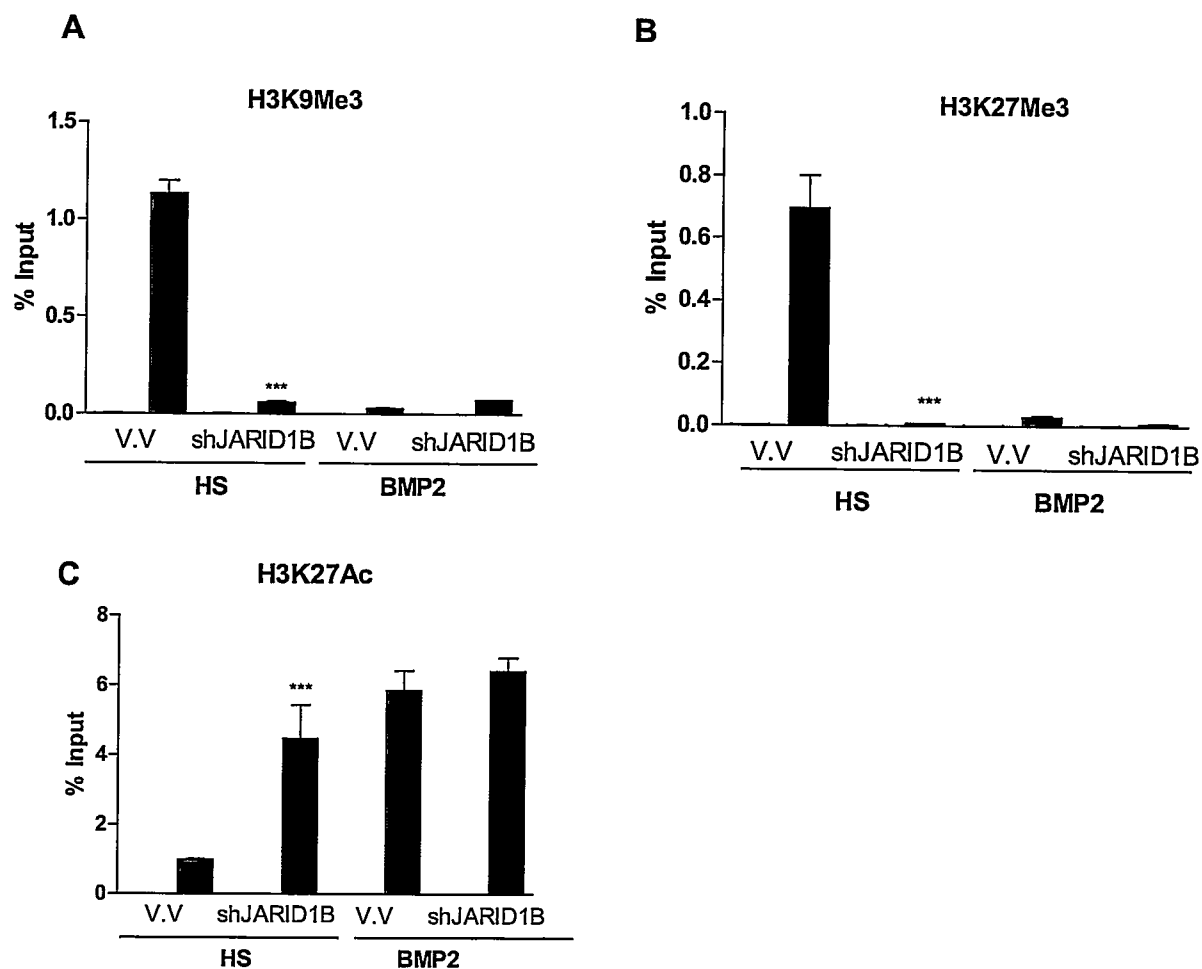
6. ANEXOS.



Anexo 6.1. Analisis de la trimetilación en el residuo de lisina 9 de la histona H3, en células C2C12. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) fueron realizados con extractos entrecruzados de células C2C12 tratadas con suero de caballo (HS) o BMP2 por 72 horas. Se utilizaron anticuerpos específicos para la trimetilación de la lisina 9. El ADN precipitado fue cuantificado por PCR en tiempo real utilizando partidores específicos par la región -118/+29 del promotor P1 del gen Runx2. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres ensayos realizados independientemente y con dos cuantificaciones cada uno. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test ANOVA de una vía (Test de Dunnett). La condición de preconfluencia (pC) fué usada como grupo control. *** $p < 0.001$.



Anexo 6.2. Análisis de la H3K27Me3, H3K9Me3 y H3K27Ac en células C2C12 luego del silenciamiento de NO66 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para NO66 (negro) ó shRNA control (V.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 48 horas. **A.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Me3. **B.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 9 de la histona H3. H3K9Me3. **C.** Enriquecimiento de acetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Ac. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres experimentos independientes cuantificados en duplicado. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. La condición de V.V fue usada como grupo control. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.



Anexo 6.3 Análisis de la H3K27Me3, H3K9Me3 y H3K27Ac en células C2C12 luego del silenciamiento de JARID1B Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) realizada a partir de extractos entrecruzados de células C2C12 infectadas con shRNA para JARID1B (negro) ó shRNA control (V.V, gris); posterior a la infección el medio de cultivo fue suplementado con suero de caballo (HS) o con BMP2 por 48 horas. **A.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Me3. **B.** Enriquecimiento de trimetilación de la lisina 9 de la histona H3. H3K9Me3. **C.** Enriquecimiento de acetilación de la lisina 27 de la histona H3. H3K27Ac. Las muestras fueron cuantificadas mediante PCR en tiempo real utilizando partidores específicos para la región -118/+29. Cada barra representa la media +/- E.S.M de tres experimentos independientes cuantificados en duplicado. Diferencias estadísticamente significativas fueron medidas por test t-student. La condición de V.V fue usada como grupo control. *** $p < 0.001$.

Antisense 5' TGT AGC TGG CCC TTA AGG ATT CGG G 3'

6.4.7 Sialoproteína Ósea (Ratón)

Sense 5'CGA TAG TTC CGA AGA GGA 3'

Antisense 5' CCG CTA ACT CAA AAG TCT GT3'

6.4.8 Miogenina (Ratón)

Sense 5' TGG AGC TGT ATG AGA CAT CCC 3'

Antisense 5' TGG ACA ATG CTC AGG GGT CCC 3'

6.4.9 WDR5 (Rata/Ratón)

Sense 5' CCA GTC CAA CCT CAT CGT CT 3'

Antisense 5' CAT CAC GGT TGA AAT GAA CG 3'

6.4.10 EZH2 (Ratón)

Sense 5' CAT TTC ATA CGC TCT TCT GTC GAC 3'

Antisense 5' CCC TCC AGA TGC TGG TAA CAC T 3'

6.4.11 PRMT5 (Ratón)

Sense 5' GGA ACT CTG AAG CGG CTA TG 3'

Antisense 5' GTG TGT AGT CGG GGC ATT CT 3'

6.4.12 COPR5 (Ratón)

Sense 5' AGC TGA AAG CAG ACC AAG GA 3'

Antisense 5' TCT TCG GCA TCA TCA AAC TG 3'

6.4.13 NO66 (Ratón)

Sense 5' ACT TTG CTC CTG TCG ATG CT 3'

Antisense 5' AGC ATG TGG ACT TGG GTT TC 3'

6.4.14 JARID 1B (Ratón)

Sense 5' AGT GGC TTT CCT GTT CGA GA 3'

Antisense 5' AAG CAC ATG CCC ACA TAC AA 3'

6.4.15 JARID 1C (Ratón)

Sense 5' GCC ACA CTT GAG GCC ATA AT 3'

Antisense 5' CTC CAG GAG TGT GCT GTC AA 3'

6.4.14 UTX (Rata/Ratón)

Sense 5' ACA GTA ATA CGT GGC CTT GCT GGA 3'

Antisense 5' TTC ATC TGC TGG TTG TAA CAA CTG 3'

6.4.15 JMJD6 (Ratón)

Sense 5' GAG GGA ACC AAC AGG ATG AA 3'

Antisense 5' CTG GCA AAG TTC TGG GTG AT 3'

6.5 Secuencia de oligonucleótidos utilizados para clonar WDR5

Mouse

Wdr5 Cl Fw XbaI ggcttc tctaga ATGGCCACAGAGGAGAAGAAGC

Wdr5 Cl Rv EcoRI tggagc- gaattc TTAGCAGTCACTCTTCCACAGTTTGA

6.6 Secuencia de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

6.6.1 Promotor P1 de Runx2

Sense (-118) 5' GTG GTA GGC AGT CCC ACT TT 3'

Antisense (+29) 5' TGT TTG TGA GGC GAA TGA AG 3'

6.6.1 Promotor P1 de PSD95

6.6.1.1 Promotor P1 de PSD95 ratón

Sense (-33) 5' GGA GGG GTG AGA ACC CAC CGA 3'

Antisense (+118) 5' CTC CCC CTC CCC ACG GCT TC 3'

6.6.1.2. Promotor P1 de PSD95 rata

Sense (-33) 5' GGA GGG GTG AGA ACC CAC CGA 3'

Antisense (+118) 5' CTC CCC CTC CCC ACT GCT CC 3'

6.7. Anticuerpos de Inmunoprecipitación de cromatina y Western blot.

Inmunoprecipitación		
Histona H3 trimetil Lys9	Ab8898 Abcam	Prot A/Agarosa
Histona H3 (mono metil K4)	Ab8895 Abcam	Prot A/Agarosa
Histona H3 (tri metil K4) Inmunoprecipitación	Ab8580 Abcam	Prot A/Agarosa
Dimetil-Histona H4 (Arg3)	Ab5823 Abcam	Prot A/Agarosa
Tri-Metil-Histona H3 (Lys27)	07-449 Upstate	Prot A/Agarosa
WDR5	Ab56919 Abcam	Prot G/Agarosa
NO66	Sc3354c5a Sta Cruz	Prot G/Agarosa
JARID1B	Ab50958 Abcam	Prot A/Agarosa
JARID1C	Ab34718 Abcam	Prot A/Agarosa
EZH1	Ab13665 Abcam	Prot A/Agarosa
EZH2	07-689 Millipore	Prot A/Agarosa
EZH2	39901 Active Motif	Prot A/Agarosa
JMJD3	Ab38113 Abcam	Prot A/Agarosa
UTX/KDM6A	Ab91231 Abcam	Prot A/Agarosa
PRMT5 (JBP1)	BD611539 Bpharmigen	Prot G/Agarosa

JMJD6	Ab83523 Abcam	Prot A/Agarosa
Normal Rabbit IgG	12-370 Upstate	Prot A/Agarosa
Normal mouse IgG	12-371 Upstate	Prot A/Agarosa
Western blot		
α TFIIB (C-18)	sc-225 Santa Cruz	
RNA-Pol sc899	Sc-899 Santa Cruz	
Runx2 (S-19)	sc-12488 Santa Cruz	
WDR5	Ab56919 Abcam	
NO66	Sc3354c5a Sta Cruz	
JARID1B	Ab50958 Abcam	
JARID1C	Ab34718 Abcam	
EZH2	39901 Active Motif	
JMJD3	Ab38113 Abcam	
UTX/KDM6A	Ab91231 Abcam	
PRMT5 (JBP1)	BD611539 Bpharmigen	
JMJD6	Ab83523 Abcam	

7. BIBLIOGRAFIA

- Aloia, L., Di Stefano, B., Croce, Di. 2013. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development*. Jun;140(12):pp2525-34.
- Aubin, J.E. 2000. Osteogenic cell differentiation. En: Davies JE ed. *Bone Engineering*. : Davies JE (ed).pp. 19-30. Toronto.
- Agger, K., Christensen, J., Cloos, P.A. y Helin,K. 2008. The emerging functions of histone demethylases. *Curr Opin Genet Dev*. 18: pp159-168.
- Aziz, A., Liu, Q., Dilworth, J.2010. Regulating a master regulator. *Epigenetis* 5: 8. pp691-694.
- Balint, E., Lapointe, D., Drissi, H., van der Meijden, C., Young, DW., van Wijnen, AJ., Stein, JL., Stein, GS., Lian, JB. 2003. Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. May 15;89(2):pp401-26.
- Banck, M., Li, S., Wang, Ch., Beutler, A., Walsh, M. 2009. The ZNF217 oncogene is a candidate organizer of repressive histone modifiers. *Epigenetics* 4:2, pp100-106.
- Banerjee, C., Javed, A., Choi, J.-Y., Green, J., Rosen, V., Van Wijnen., A., Stein, J., Lian, J. B., and Stein, G. 2001. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 N-terminal Isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the Osteoblas phenotype. *Endocrinology*. 142(9):pp 4026-4039.
- Barrio, D. A. and S. B. Etcheverry. 2006. Vanadium and bone development: putative signaling pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 84(7): pp677-86.
- Berger, S. The complex language of chromatin regulation during transcription. 2007. *Nature*. 447:pp 407- 412.
- Barski ,A., Cuddapah, S., Cu,i K., Roh, TY., Schones, DE., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. May 18;129(4):pp 823-37.
- Benoit, YD., Laursen, KB., Witherspoon, MS., Lipkin, SM., Gudas, LJ. 2013. Inhibition of PRC2 histone methyltransferase activity increases TRAIL-mediated apoptosis sensitivity in human colon cancer cells. *J Cell Physiol*. Apr;228(4):pp764-72.
- Bernstein, B., Meissner, A., Lander, E. 2006. The mammalian epigenome *Cell*. 128(4):pp669-81.

- Bosé, J., Gruber, A., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Kontgene, F., Lengeling, A. 2004. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *Journal of Biology*. 3: pp15-19.
- Boyer, L., Lee, T., Cole, M., Johnstone, S., Levine, S., Zucker, J., Guenther, M., Kumar, R., Murray, H., Jenner, R., Gifford, D., Melton, D, Jaenisch, R and Young, R. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:pp 947–956.
- Caiafa, P., Zampieri M. 2005. DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. *J Cell Biochem* 94(2):pp257-65.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. y Zhang, Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: pp1039-1043.
- Cha, T., Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B,Hung MC. 2005.
Akt-Mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Science*. 310:pp306-315.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y. and R. K. Bruick.. 2007. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*. 318:pp444-447.
- Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G. 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*.22(4):pp233-241.
- Chen, C., Broom, D., Liu, Y., de Nooij, JC., Li, Z., Cen, C., Samad, OA., Jessell, TM., Woolf, CJ., Ma, Q. 2006 Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron*. Feb 2;49(3):pp365-77.
- Cheng, X., Blumenthal, R., 2010. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*. Apr 13;49(14):pp2999-3008.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, RS., Zhang, Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. Nov 1;298(5595):pp1039-43.
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G., Sartorelli, V. 2004. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes & Development* 18:pp2627-2638.
- Cellot, S., Hope, KJ., Chagraoui, J., Sauvageau, M., Deneault, É., MacRae, T, Mayotte, N., Wilhelm, BT., Landry, JR., Ting, SB., Krosi, J., Humphries, K.,

- Thompson, A., Sauvageau, G. 2013. RNAi screen identifies Jarid1b as a major regulator of mouse HSC activity. *Blood*. Aug 29;122(9):pp1545-55.
- Clapier, C., and Cairns. B. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 78:pp273-304.
- Cloos, P., Christensen, J., Agger, K., Helin, K. 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & Development*. 22:pp1115-1134.
- Copur, Ö., Müller, J. 2013. The histone H3-K27 demethylase Utx regulates HOX gene expression in *Drosophila* in a temporally restricted manner. *Development*. Aug;140(16):pp3478-85.
- Cruzat F, Henriquez B, Villagra A, Hepp M, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Imbalzano AN, Stein GS, Montecino MA. 2009. Swi/Snf-Independent Nuclease Hypersensitivity and Increased Histone Acetylation At The P1 Promoter Accompany Active Transcription Of The Bone Master Gene Runx2. *Biochemistry*. 48(30):pp7287-95.
- Dacwag, C., Bedford, M., Sif, S. and A. Imbalzano. 2009. Distinct Protein Arginine Methyltransferases Promote ATP-Dependent Chromatin Remodeling Function at Different Stages of Skeletal Muscle Differentiation. *Mol. Cell. Biol*. 29:pp1909-1921.
- Dacwag, C., Ohkawa, Y., Pal, S., Sif, S. and A. Imbalzano. 2007. The Protein Arginine Methyltransferase Prmt5 Is Required for Myogenesis because It Facilitates ATP-Dependent Chromatin Remodeling. *Mol. Cell. Biol*. 27(1):pp 384-394.
- Dawson, MA., Kouzarides, T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*. Jul 6;150(1):pp12-27.
- Dambacher, S., Hahn, M., Schotta. 2010. Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity* 105:pp 24-37.
- De la Serna, I., Carlson, K., Imbalzano, A. 2001. Mammalian SWI/SNF Complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nature Genetics*-27,pp187-190.
- de Frutos, CA., Dacquin, R., Vega, S., Jurdic, P., Machuca-Gayet, I., Nieto, MA .2009. Snail1 controls bone mass by regulating Runx2 and VDR expression during osteoblast differentiation. *EMBO J*. Mar 18;28(6):pp686-96.
- Dhar, S., Vemulapalli, V., Patananan, AN., Huang, GL., Di Lorenzo, A., Richard, S., Comb, MJ., Guo, A., Clarke, SG., Bedford, MT. 2013. Loss of the major Type I arginine methyltransferase PRMT1 causes substrate scavenging

by other PRMTs. *Sci Rep.*;3:pp1311.

- Dobosy, J. R. and E. U. Selker 2008. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci* 58(5-6):pp721-7.
- Drissi, H., Luc, Q., Shakoory, R., Chuva de Sousa Lopes, S., Choi, J-Y., Terry, A., Hu, M., Jones, S., Neil, J., Lian, J. B., Stein, J., Van Wijnen, A. J., and Stein, G. 2000. Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J. Cell. Phys.* 184:pp341-350.
- Drissi, H., Pouliot, A., Koolloos, C., Stein, J., Lian, J., Stein, G., and van Wijnen, A. 2002. 1, 25-(OH)₂-vitamin D₃ suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Experimental Cell Research*. 274:pp323-333.
- Di Lorenzo, A. Bedford, M. 2011. Histone arginine methylation. *FEBS Letters* 585:pp2024-2031.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., and Karsenty, G. 1997. *Osf/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89:pp747-754.
- Eisenberg, J. Shilatifard A. 2010. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. *Dev. Biol.* 339:pp240-49.
- Feng, X., and R. Derynck. 2005. Specificity and Versatility in TGF- β Signaling Through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:pp659-693.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera Gracia MA, del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*; 11:ppE47-51.
- Francis, NJ., Kingston, RE., Woodcock, CL. 2004. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*. Nov 26;306(5701):pp1574-7.
- Gori, F., Friedman, L., and M. Demay. 2006. *Wdr5*, a WD-40 protein, regulates osteoblast differentiation during embryonic bone development. *Dev. Biol.* 295:pp498-506.
- Geoffroy, V., Corral, D.A., Zhou, L., Lee, B., and Karsenty, G. 1998. Genomic organization, expression of the human CBFA1 gene and evidence for alternative splicing event affecting protein function. *Mammalian Genome*. 9: pp54-57.
- Gutierrez, S., Javed, A., Tennant, D., van Rees, M., Montecino, M., Stein, G., Stein, J., and Lian, J. 2002. CCAAT/Enhancer-binding proteins (C/EBP) β and δ activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J. Biol.Chem.*, 277: pp1316-1323.
- Hanoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R., Hay D. 2010. Post-translational modification by SUMO. *Toxicology*. 278.pp 288-293.

- Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T., and Nakatsuka, T. 1999. *Cbfa1* isoforms exert functional differences in osteoblast differentiations. *J. Biol. Chem.* 274:pp6972-6978.
- Hasan, UA., Zannetti, C., Parroche, P., Goutagny, N., Malfroy, M., Roblot, G., Carreira, C., Hussain, I., Müller, M., Taylor-Papadimitriou, J., Picard, D., Sylla, BS., Trinchieri, G., Medzhitov, R., Tommasino, M. 2013. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med.* Jul 1;210(7):pp1369-87.
- Hassan, M.Q., Tare, R., Lee, S.H., Mandeville, M., Weiner, B., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. 2007. HOXA10 controls osteoblastogenesis by directly activating bone regulatory and phenotypic genes, *Mol. Cell. Biol.* 27, pp 3337-3352.
- Hassan, M.Q., Tare, R.S., Lee, S.H., Mandeville, M., Morasso, M.I., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. 2006 BMP2 Commitment to the Osteogenic Lineage Involves Activation of *Runx2* by DLX3 and a Homeodomain Transcriptional Network. *J. Biol. Chem.* 281, pp40515 – 40526.
- He, L.J., Cai, MY., Xu, GL., Li, JJ., Weng, ZJ., Xu, DZ., Luo, GY., Zhu, SL., Xie, D. 2012. Prognostic significance of overexpression of EZH2 and H3k27me3 proteins in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.*;13(7):pp3173-8.
- Henriquez, B., Hepp, M., Merino, P., Sepulveda, H., van Wijnen, AJ., Lian, JB., Stein, GS., Stein, JL., Montecino, M. 2011. C/EBP β binds the P1 promoter of the *Runx2* gene and up-regulates *Runx2* transcription in osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* Nov;226(11):pp3043-52.
- Henriquez, B. C. 2009. Mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación transcripcional del gen *Runx2*: Rol de las modificaciones covalentes de las histonas H3 y H4 en el promotor P1. Departamento de Biología Celular y Molecular (Concepción. Universidad de Concepción), pp.181.
- Herz, H., Madden, L., Chen, Z., Bolduc, C., Buff, . 2010. The H3K27Me3 demethylase dUTX is a suppressor of Notch- and Rb-dependent tumors in *Drosophila*. *Mol. Cell. Biol.* 30:pp2485-97.
- Hong, S., Cho, Y.W., Yu, L.R., Yu, H., Veenstra, T.D., and K. Ge. 2007. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:pp18439–18444.
- Hsieh, TF., Fischer, RL. 2005. Biology of chromatin dynamics. *Annu Rev*

Plant Biol.; 56:pp327-51.

- Hyung, S., Jun, W., Young-Nam, C., and Chaekyun K., 2006. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *J Immunoassay Immunochem.* **27** (1): pp 31-44.
- Issaeva, I., Zonis, Y., Rozovskaia, T., Orlovsky, K., Croce, CM., Nakamura, T., Mazo, A., Eisenbach, L., Canaani, E. 2007. Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. *Mol Cell Biol.* Mar;27(5):pp 1889-903.
- Ito, Y., and K., Miyazono. 2003. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Curr. Op. Gen. Develop.* **13**: pp 43-47.
- Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, HH., Whetstine, JR., Bonni, A., Roberts, TM., Shi, Y. 2007. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell.* Mar 23;128(6):pp 1077-88.
- Jarome, TJ., Kwapis, JL., Werner, CT., Parsons, RG., Gafford, GM., Helmstetter, FJ. 2012. The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for protein synthesis in fear memory reconsolidation. *Learn Mem.* Jun 20;19(7):pp 300-6.
- Javed A, Gutierrez S, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. 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.* Nov;19(11):7491-500.
- Javed, A., Barnes, G., Jasanya, B. O., Stein, J. L., Gerstenfeld; L., Lian, J. B, and Stein, G. 2001. *Runt* homology transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol. and Cell. Biol.* **21**(8):pp 2891-2905.
- Jelinic, P., Stehle, J and Shaw, P. 2006. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol.* **4**, e355.
- Jenuwein, T., and Allis, D. 2001. Translating the histones code. *Science.* **293**: 1074-1080.
- Karkhanis, V., Hu, YJ., Baiocchi, RA., Imbalzano, AN., Sif, S. 2011. Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development. *Trends Biochem Sci.* Dec;36(12):pp 633-41.
- Karsenty, G., and Wagner, E. F. 2002 Reaching a genetic and molecular

understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2, pp 389–406.

-Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell. Biol.* 127: pp 1755-1766.

- Kim, W., Bird, G.H., Neff, T., Guo, G., Kerényi, M.A., Walensky, L.D., Orkin, S.H. 2013. Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer. *Nat Chem Biol.* Oct;9(10):pp 643-50.

-Komori T. 2010. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol.*;658:pp 43-9.

-Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. -H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., and Kishimoto, T. 1997. Targeted Disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblast. *Cell*, 89:pp 755-764.

- Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* May 24;184(4139):pp 868-71.

-Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* .128, pp693-705.

- Kramer, I., Sigrist, M., de Nooij, J.C., Taniuchi, I., Jessell, T.M., Arber. 2006. S. A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron.* Feb 2;49(3):pp 379-93.

- Lacroix, M., Messaoudi, S., Rodier, G., Le Cam, A., Sardet, C., G, Fabrizio, E. 2010. The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO reports* VOL 9, N 5. pp 452-458.

-Lan, F., Bayliss, P., Rinn, J., Whetstine, J., Wang, J., Chen, S., Iwase, S., Alpatov, R., Issaeva, I. 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 449:pp 689-694.

-Lee, M.H., Javed, A., Kim, H. J., Shin, H. I., Gutierrez, S., Choi, J. Y., Rosen, V., Stein, J., van Wijnen, A., Stein, G., Lian, J., and H. M. Ryoo. 1999. Transient Upregulation of CBFA1 in Response to Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor b1 in C2C12 Myogenic Cells Coincides With Suppression of the Myogenic Phenotype but is Not Sufficient for Osteoblast Differentiation. *J. Cell. Biochem.* 73:pp 114–125.

-Lee, K.K. y Workman, J.K. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, pp 284-295.

- Lee, MG., Villa, R., Troger, P., Norman, J., Yan, KP. 2007. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 318:pp 447-50.
- Lee, T. I. and R. A. Young. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34:pp 77-137.
- Levanon, D., and Y., Groner. 2004. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene*. 23: pp 4211–4219.
- Li, Q., Ito, L., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X., Lee, K., Nomura, S., Lee, C., Han, S., Kim, H., 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., and Ito, Y. 2002. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 109:pp113-124.
- Lian, J. B., Javed, A., Zaidi, S. K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., and Stein, G. S. 2004. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: Role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* 14. pp 1–41.
- Iizuka, M., Smith, MM. 2003. Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev*. Apr;13(2):pp154-60.
- Luger, K., Mäder, A., Richmond, R., Sargent, D., Richmond, T. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: pp251-260.
- Manish, M., Yongsheng, J., Yeoh., K, Quek, T., Ito, K., Salto-Tellez., M. 2009. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* Volume 1796, Issue 2, December, pp315–331.
- Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, CL., Dynlacht, BD., Reinberg, D. . 2008 Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* Nov 21;32(4):pp503-18.
- Marmorstein, R. 2001. Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nature Reviews*, 2:pp422-432.
- Martin, C., Zhang, Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:pp838:849.
- Migliori, V., Müller, J., Phalke, S., Low, D., Bezzi, M., Mok, WC., Sahu, SK., Gunaratne J, Capasso P, Bassi C, Cecatiello V, De Marco, A., Blackstock, W., Kuznetsov, V., Amati, B., Mapelli, M., Guccione. 2012. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin

maintenance. *E.Nat Struct Mol Biol.* 8;19(2):pp136-44.

-Mikkelsen. T., Ku, M., Jaffe, D., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., - Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T., Koche, R., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E., and Bernstein B. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448: pp553-560.

-Miranda, T., Jones, P. 2007. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213(2):pp384-90.

-Mohan, M., Lin, C., Guest, E., Shilatifard, A. 2010. Licensed to elongate: a molecular mechanism for MLL-based leukaemogenesis. *Nature Reviews Cancer* 10, pp 721-728.

-Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Min Deng, J., Behringer, R., and Crombrughe, B. 2000. The novel Zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 108:pp17-29.

-Nakayama, J., Rice, J., Strahl, B., Allis, C.D., and S. Grewal. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science.* Apr 6;292(5514):pp 110-3.

-Nishimura, R., Kato, Y., Chen, D., Harris, S.E., Mundy, G.R. y Yoneda, T. 1998. Smad 5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem* 273, pp 1872-1879.

- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W. H., Beddington, R. S. P., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., and Owen, M. 1997. *Cbfa1*. a candidate gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89:pp 765-771.

-Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B., Stein, G. S. Progressive Development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell Physiol.* 143:pp 420-430.

- Pal, S., Sif, S. 2007. Interplay between chromatin remodelers and protein arginine methyltransferases. *J Cell Physiol.* Nov;213(2):pp306-15.

-Patel, SR., Kim, D., Levitan, I., Dressler, GR. 2007. The BRCT-domain containing protein PTIPT links PAX2 to a histone H3, lysine 4 methyltransferase

complex. *Dev. Cell* 13:pp 580-92.

- Phimphilai, M., Zhao, Z., Boules, H., Roca, H., Franceschi, RT. 2006. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res.* Apr;21(4):pp 637-46.

- Poljak, M., Lim, R., Barker, G., Lappas, M. 2014. Class I to III Histone Deacetylases Differentially Regulate Inflammation-Induced Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Primary Amnion Cells. *Reprod Sci.* Jan 15.

- Quina, AS., Buschbeck, M., Di Croce, L. 2006. Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol.* Nov 30;72(11):pp 1563-9.

- Rando, O., and Chang, H. 2009. "Genome-wide views of chromatin structure." *Annu Rev Biochem* 78:pp 245-71.

- Rank, G., Cerruti, L., Simpson, R., Moritz, R., Jane, S and Zhao, Q. 2010. Identification of a PRMT5-dependent repressor complex linked to silencing of human fetal globin gene expression. *Blood* 116:pp 1585-1592.

- Rastelli, L., Chan, CS., Pirrotta, V. 1993. Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in *Drosophila* and their dependence on Enhancer of zeste function. *EMBO J.* pr;12(4):pp 1513-22.

- Ruthenburg, AJ., Li, H., Patel, DJ., Allis CD. 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Dec;8(12):pp983-94.

- Samad, A., Liu Y, Yang. F., Kramer, I., Arber, S., Ma, Q. 2010. Characterization of two Runx1-dependent nociceptor differentiation programs necessary for inflammatory versus neuropathic pain. *Mol Pain.* Jul 30; pp 6:45.

- Schmitz, SU., Albert, M., Malatesta, M., Morey, L., Johansen, JV., Bak, M., Tommerup, N., Abarrategui, I., Helin, K. 2011. Jarid1b targets genes regulating development and is involved in neural differentiation. *EMBO J.* Nov 16;30(22):pp 4586-600.

- Seenundun, S., Rampalli, S., Qi-Cai, L., Aziz, A., Pali, C., Hong, S., Blais, A., Brand, M., Ge, K., Dilworth, F. 2010. UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *The EMBO journal.* Vol 29. No 8.

- Segal, E., Widom, J. 2009. "What controls nucleosome positions?" *Trends Genet* 25(8):pp 335-43.

- Shea, CM., Edgar, CM., Einhorn, TA., Gerstenfeld, LC. 2003. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and

osteogenesis. *J Cell Biochem.* Dec 15;90(6):pp 1112-27.

- Shi, X. y col. 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.* 442:pp 96-99.

-Shi, Y. and J. Whetstine. 2007. Dynamic Regulation of Histone Lysine Methylation by Demethylases. *Mol Cell.* 25:pp 1-14.

- Siedlecki, P., Zielenkiewicz, P. 2006. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol* 53(2):pp 245-56.

-Simon JA¹, Kingston RE. 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Oct;10(10):697-708.

- Song, JJ., Kingston, RE., J. 2008. WDR5 interacts with mixed lineage leukemia (MLL) protein via the histone H3-binding pocket. *Biol Chem.* Dec 12;283(50):pp 35258-64.

- Stewart, M., Terry, M., O'Hara, M. O., Blyth, K., Baxter, E., Cameron, E., Onions, D. E., and Neil, J. C. 1997. Proviral insertions induce the expression of bone-specific isoforms of PEBP2 α A (CBFA1): Evidence for a new *myc* collaborating oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:pp 8646-8651.

- Soutoglou, E. and Talianidis, L. 2002. Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science,* 295:pp 1901-1904.

-. Subramaniam, M., Yongsheng, C., Guan, K., Quek, T., Ito, K. 2009. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* Volume 1796, Issue 2, December, pp 315-331.

-Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B. and G. Cavalli. 2007. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax proteins. *Cell.* 128: pp 735-745.

-Sengupta, N., and E. Seto. 2004. Regulation of Histone Deacetylase Activities. *J. Cell. Biochem.* 93:pp 57-67.

-Shahbazian, M.D y Grunstein, M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76,pp 75-100.

-Shea, C., Edgar, C., Einhorn, T., and L., Gerstenfeld. 2003. BMP Treatment of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells Induces Both Chondrogenesis and Osteogenesis. *J. Cell. Biochem.* 90: pp 1112-1127.

-Shi, X. y col., 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature.* 442:pp 96-99.

- Shilatifard., Ali. 2012. The COMPASS family of Histone H3K4 Methylases: Mechanism of Regulation in Development and Disease Pathogenesis. *Annu. Rev.Biochem.* 81:pp 65-95.
- Sinha, K., Yasuda,H., Coombes,M., Dent, S.,Crombrugge, B. 2010. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor Osterix by NO66, a jumonji family histone demethylase. *The EMBO Journal.* 29,pp 68-79.
- Song., Ji-Joon and Kingston., R. 2008. WDR5 Interacts with Mixed Lineage Leukemia (MLL) Protein via the Histone H3-binding pocket. *Journal of Biological Chemistry.* Vol 283. No. 50:pp 35258-35264.
- Speck, N., Gilliland, D.G. 2002. Core-binding actors in hematopoiesis and leukemia. *Nat. Rev. Cancer.* 2:pp 502-513.
- Stojic, L., Jasencakova, Z., Prezioso, C., Stützer, A., Bodega, B., Pasini, D., Klingberg ,R., Mozzetta, C., Margueron, R., Puri, PL., Schwarzer, D., Helin, K., Fischle, W., Orlando ,V. 2011. Chromatin regulated interchange between polycomb repressive complex 2 (PRC2)-Ezh2 and PRC2-Ezh1 complexes controls myogenin activation in skeletal muscle cells. *Epigenetics Chromatin.* 5;pp 4:16.
- Takada, I., Mihara, M., Suzawa, M., Ohtake, F., Kobayashi, S., Igarashi, M., Youn, MY., Takeyama, K., Nakamura, T., Mezaki, Y., Takezawa, S., Yogiashi, Y., Kitagawa, H., Yamada, G., Takada, S., Minami, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Kato, S. 2007. A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol.* 2007 Nov;9(11):pp 1273-85.
- Tahiliani, M., Mei, P., Fang, R., Leonor, T., Rutenberg, M., Shimizu, F., Li,J., Rao, A. and Shi, Y. 2007. The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature* 447, pp 601-605.
- Tan , K., Shaw, A., Madsen, B., Jensen, K., Taylor-Papadimitriou, J. and Freemont, P. 2003. Human PLU-1 has transcriptional repression properties and interacts with the developmental transcription factors BF-1 and PAX9. *J.Biol.Chem.* 278, pp 20507-20513.
- Theriault, F., Roy, P. and S. Stifani. 2004. AML1_Runx1 is important for the
- Tou, L., Quibria, N., Alexander, J. 2003. Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol Cell Endocrinol.* Jul 31;205(1-2):pp 121-9.
- Tost, J. 2009. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Methods Mol Biol* 507:pp 3-20.
- Ugarte, G., Opazo, T., Leisewitz, F., van Zundert, B., Montecino, M. 2012. Runx1 and C/EBP β transcription factors directly up-regulate P2X3 gene transcription. *J Cell Physiol.* Apr;227(4):pp 1645-52.

- Unoki, M., Masuda, A., Dohmae, N., Arita, K., Yoshimatsu, M., Iwai, Y., Fukui, Y., Ueda, K., Hamamoto, R., Shirakawa, M., Sasaki, H., Nakamura, Y. 2013. Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6). *J Biol Chem.* Mar 1;288(9):pp 6053-62.
- Van Dijk, K., Marley, KE., Jeong, BR., Xu J, Hesson, J., Cerny, RL., Waterborg, JH., Cerutti, H. 2005. Monomethyl histone H3 lysine 4 as an epigenetic mark for silenced euchromatin in *Chlamydomonas*. *Plant Cell. Sep;17(9):pp 2439-53.*
- Vandenberg, D., Snoek, T., Mullin, N., Yates, A., Bezstarosti, K., Demmers, J., Chambers, I., and Poot, R. 2010. An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 6: pp369–381.
- Verrier, L., Vandromme, M., Trouche, D. 2011. Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biol Cell.* Aug;103(8):pp 381-401.
- Völkel, P., and P., Angrand. 2007. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie.* 89:pp 1-20.
- Wang, D., K. Christensen, et al. 1999. "Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential." *J Bone Miner Res* 14(6): pp 893-903.
- Wang, J., Rao, S., Chu, J., Shen, X., Levasseur, D., Theunissen, T and Orkin, S. 2006. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444: 364–368,
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T. 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*;21:pp 393-411.
- Xiao Z., Liu S., Hinson T., Quarles L.. 2001 Characterization of the upstream mouse Cbfa1/Runx2 promoter. *J Cell Biochem.*;82(4):pp647-59.
- Xu, X., Hoang, S., Mayo, MW., Bekiranov, S. 2010. Application of machine learning methods to histone methylation ChIP-Seq data reveals H4R3me2 globally represses gene expression. *BMC Bioinformatics.* Jul 23;pp 11:396.
- Yang, X., and E., Seto. 2003. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr. Opin. Gen.Dev.*13:pp 143–153.
- Yang, X-J., and Seto, E. 2008. Lysine Acetylation: Codified Crosstalk with Other Posttranslational Modifications. *Mol. Cell.* 31:pp 449-461.

- Zambotti, A., Makhluf, H., Shen, J., and Ducy, P. 2002. Characterization of an osteoblast-specific enhancer element in the CBFA1 gene. *J. Biol. Chem.* 277 (44):pp41497-41506.
- Zhang, Q., Ramlee, MK., Brunmeir, R., Villanueva, CJ,, Halperin, D., Xu, F. 2012. Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. *Cell Cycle.* Dec 1;11(23):pp 4310.
- Zhang, Y., Wu, S. 2011. CDK1-Mediated phosphorylation of EZH2 regulates its stability. *J. Biol. Chem.*10.pp 1074.
- Zhu, E., Demay, M. and F. Gori. 2008. Wdr5 Is Essential for Osteoblast Differentiation. *J. Biol. Chem.* 283:pp 7361-7367.