



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE FARMACIA**

# **“DETECCIÓN DE SITIOS DE UNIÓN PARA C/EBPB EN EL PROMOTOR P1 DEL GEN RUNX2”**

**POR MATIAS IGNACIO HEPP CASTRO.**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción  
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/patrocinante: Martin Alejandro Montecino Leonard  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción.

Febrero, 2008  
Concepción, Chile

## RESUMEN

Las proteínas RUNX son una familia de factores de transcripción que poseen un dominio de unión al ADN homólogo al dominio Runt de *Drosophila*. El gen que codifica para *Runx2* posee dos regiones promotoras (P1 y P2) las que comandan la expresión de 2 isoformas de esta proteína (tipos I y II). El promotor P1 regula la expresión de la isoforma tipo II de RUNX2, la cual es óseo específica. En este trabajo se determinó mediante análisis *in silico* del promotor P1, la presencia de sitios de unión consenso para los factores de transcripción C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins), considerando al factor C/EBP $\beta$ , como candidato de esta familia, ya que se ha visto relacionado en la regulación de la expresión de otros genes que influyen en el desarrollo óseo. Por esto pensamos que C/EBP $\beta$  podría estar regulando la expresión de RUNX2 II en células óseas. Para confirmar la funcionalidad de los sitios de unión identificados, determinamos mediante ensayos de retardo en gel (EMSA), que C/EBP $\beta$  es capaz de unirse específicamente *in vitro* al promotor P1. Esta unión fue confirmada en líneas celulares mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Estos resultados indican que el factor de transcripción C/EBP $\beta$  podría regular la expresión de RUNX2 II en células osteoblásticas, uniéndose a sus secuencias reguladoras dentro del promotor P1.

## SUMMARY

The RUNX proteins are a family of transcription factors that have a DNA binding domain homologous to the Runt domain of *Drosophila*. The gene that codifies for *Runx2* has two promoter regions (P1 and P2) that command the expression of two isoforms of this protein (types I and II). The P1 promoter regulates the expression of the type II isoform of RUNX2, which is bone specific. In this work we determined by *in silico* analysis of the P1 promoter, the presence of consensus binding sites for the C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) transcription factors, considering C/EBP $\beta$  as the likely candidate of this family, since it is involved in the regulation of the expression of other genes that also influence bone development. Therefore we postulated that C/EBP $\beta$  could be regulating the expression of RUNX2 II in bone cells. To confirm the functionality of the found binding sites, we determined that C/EBP $\beta$  is capable to bind *in vitro* specifically to the P1 promoter by electrical mobility shift assay (EMSA). This interaction was confirmed in cells lines expressing RUNX2 by means of chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). These results indicate that C/EBP $\beta$  transcription factor may be regulating the expression of RUNX2 II gene in osteoblastic cells by interacting to its regulatory sequences in the P1 promoter.

## INTRODUCCIÓN

La formación del tejido óseo durante el desarrollo embrionario y su posterior mantención después del nacimiento, es realizada por complejos proteicos que son esenciales en diferentes etapas de la formación, diferenciación y maduración de varios linajes celulares en este tejido, siendo uno de estos los osteoblastos. Es por esto, que es importante poder caracterizar los genes reguladores, vías de señalización y mecanismos moleculares que están involucrados en estos procesos de regulación de la función de los osteoblastos.

### **Familia de proteínas RUNX**

Las proteínas RUNX son una familia de factores de transcripción, también denominados Polyomavirus enhancer-binding protein2/Core-binding factor (Pebp2/Cbf). Estos factores son complejos heterodiméricos compuestos por 2 subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  es codificada por 3 genes diferentes que tienen como característica común poseer un dominio homólogo al dominio Runt de *Drosophila*. Este dominio se caracteriza por permitir la unión al ADN, y es requerido para la heterodimerización con la subunidad  $\beta$  (Ito et. al. 2003). Esta segunda subunidad en mamíferos es codificada por un solo gen (Ito et. al. 2003) y se la ha relacionado con la estabilización de las proteínas RUNX, ya que previene la ubiquitinación del dominio Runt y de esta manera evita la degradación de la subunidad  $\alpha$  (Huang et. al. 2001).

Se han descrito 3 tipos de proteínas RUNX (1, 2 y 3) (Otto et. al. 2003). En humanos, los genes de *RUNX* (1-3) han sido identificados y localizados en las regiones de los cromosomas 21q22.12, 6p21 y 1p36.1 y en ratón en los cromosomas 16, 17 y 4 (Levanon et. al. 2004 y Stock et. al. 2005). *RUNX1/Cbfa2/AML1/Pebp2 $\alpha$*  es

expresado preferentemente en tejido hematopoyético, contribuyendo de forma esencial en el proceso de hematopoyesis (Okuda et. al. 1996). Esto se ve reflejado en el hecho que el ratón knockout para este factor, es letal, observándose una hemorragia masiva, producto de un defecto en la angiogenesis atribuible a una pérdida de células madres hematopoyéticas (Takakura et. al. 2000). RUNX3/Cbfa3/AML2/Pebp2ac es expresado en tejido gástrico y tejido nervioso, donde actuaría específicamente como gen supresor de tumores en cáncer gástrico y en desarrollo de neuronas motoras del ganglio dorsal (Li et. al. 2002). RUNX2/Cbfa1/AML3/Pebp2aa es expresado en tejido óseo y cartilaginoso, donde cumpliría la función de regular diferentes genes específicos (Tabla 1) del desarrollo óseo (Otto et. al. 1997), la maduración de condrocitos hipertróficos (Takeda et. al. 2001) y la diferenciación osteoblástica (Komori et. al. 1997).

Tissue	Gene	Expressed in	Regulated by	Up/Down	Reference
Bone	Osteocalcin	Osteoblasts	Runx2	Up	Geoffrey (1995)
	Collagen $\alpha$ 1(I)	Osteoblasts	Runx2	Up	Ducy (1997)
	Bone sialoprotein	Osteoblasts	Runx2	Up or Down	Ducy (1997); Javed (2001)
	Ameloblastin	Odontoblasts	Runx2	Up	Dhamija and Krebsbach (2001)
	TGF- $\beta$ receptor I	Osteoblasts	Runx2	Up	Chang (1998); Ji (1998)
	C/EBP $\delta$	Osteoblasts	Runx2	Up	McCarthy (2000)
	Osteoprotegerin	Osteoblasts	Runx2	Up	Thirunavukkarasu (2000)
	RANKL	Osteoblasts	Runx2	Up	Geoffrey (2002); Kitazawa (1999)
	Osteopontin	Osteoblasts chondrocytes	Runx2	Up	Ducy (1997)
	Collagenase 3	Osteoblasts, hypertrophic chondrocytes	Runx2	Up	Jimenez (1999)
	Cartilage	Osteopontin	Osteoblasts chondrocytes	Runx2	Up
Collagenase 3		Osteoblasts, hypertrophic chondrocytes	Runx2	Up	Jimenez (1999)
Collagen X		Hypertrophic chondrocytes	Runx2	Up	Leboy (2001)
VEGF		Hypertrophic chondrocytes	Runx2	Up	Zelzer (2001)

**Tabla 1: Genes blanco de RUNX2 en tejido óseo** (Modificado de Otto et. al. 2003)

También se ha visto que la alteración en la expresión de este factor de transcripción está relacionada con el desorden esquelético autosómico dominante conocido como Displasia Cleidocraneal (CCD), el cual consiste en el no cierre de la fontanela del cráneo después del nacimiento y la mal formación de las clavículas. Esta se ha estudiado mediante mutaciones inactivantes del gen de *Runx2*, así como por

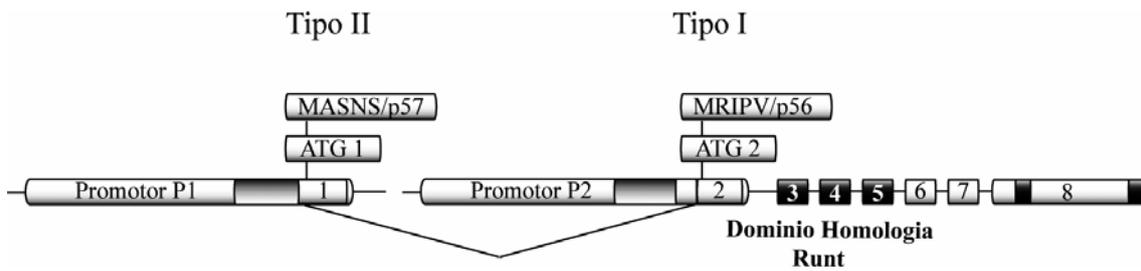
estudios realizados con ratones knockout heterocigotos para RUNX2, los que generan un fenotipo similar al presente en la CCD humana (Otto et. al. 1997; Komori et. al. 1997; Mundlos et. al. 1997).

### **Organización genómica del gen *Runx2***

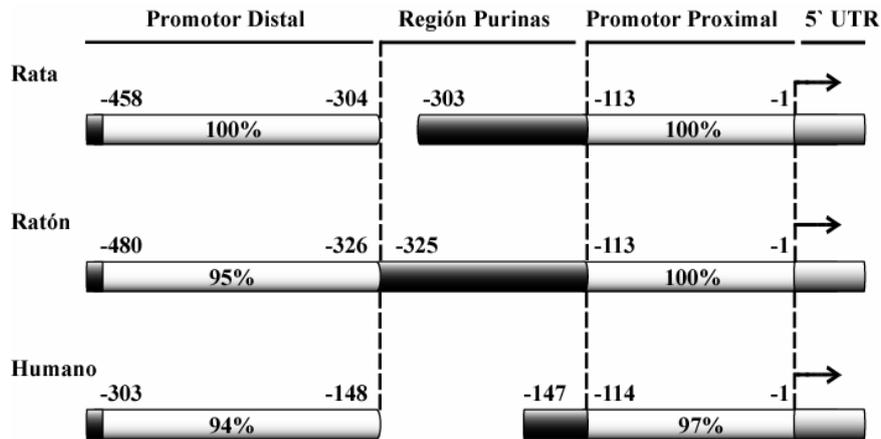
Los genes que codifican para las proteínas RUNX poseen una estructura genómica altamente conservada y la expresión de estas proteínas es comandada por dos regiones promotoras distintas (Rennert et. al. 2003). Estos dos promotores están separados por el exón 1 y un gran intrón de aproximadamente 96 Kb (Xiao et. al. 1998). Las 2 isoformas que presenta la proteína RUNX2 son la denominada PEBP2aA1 (Ogawa et. al. 1993), actualmente tipo I/p56 (Harada et. al. 1999) cuya transcripción comienza en el exón 2 con la secuencia N-terminal MRIPV comandada por el promotor P2, que genera una proteína de 513 aminoácidos (Drissi et. al. 2000). La segunda isoforma se denomina *til-1* (Stewart et. al. 1997) o tipo II/p57 cuya transcripción es iniciada en el exón 1 con la secuencia N-terminal MASNS bajo el mando del promotor P1 y posee 15 aminoácidos adicionales a la isoforma tipo I (Banerjee et. al. 2001 y Xiao et. al. 2001) (Figura 1).

Los genes que codifican para RUNX2 de rata, ratón y humano presentan una homología de secuencia en el promotor P1 entre ellos cercana a un 96% de identidad (Figura 2) (Levanon et. al. 2004; Drissi et. al. 2000).

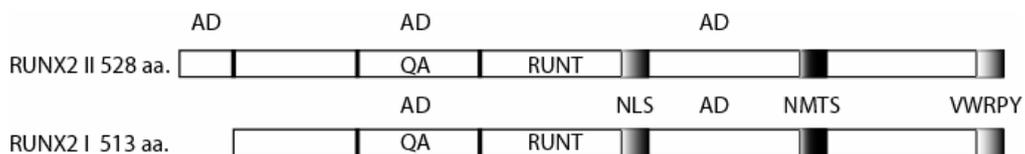
Los dominios funcionales de estas dos isoformas generadas son conservados: un dominio N-terminal rico en glutamina y alanina (QA), el dominio Runt de unión al ADN (RHD), una señal de interacción con la matriz nuclear (NMTS), una señal de localización nuclear (NLS) y un dominio C-terminal que incluye los residuos aminoacídicos VWRPY que interaccionan con el co-represor TLE/groucho (Thirunavukkarasu et. al 1998; Javed et. al. 2000; Zaidi et. al. 2001; Xiao et. al. 1999) (Figura 3). Las 2 isoformas son expresadas en tejido óseo y ambas son capaces de



**Figura 1: Organización genómica del gen *Runx2*.** Se indica con números los exones y el origen de las isoformas N-terminales que se generan. Se muestra además 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 MRIPV (modificado de Drissi et. al. 2000).



**Figura 2: Promotores P1 de *Runx2*.** Esquema comparativo de los promotores P1 del factor RUNX2 de rata, ratón y humano. Se destaca el porcentaje de homología y las posiciones de las regiones reportadas con respecto a la región 5' UTR (Modificado de Drissi et. al. 2000).



**Figura 3: Estructuras funcionales de las proteínas RUNX2.** Esquema de las estructuras de las proteínas RUNX2 I y II. Se destacan los dominios y regiones presentes en estas, QA región rica en glutamina y alanina, RUNT dominio Runt (unión al ADN), NLS señal de localización nuclear, NMTS señal de localización a la matriz nuclear, VWRPY secuencia de interacción con Groucho/TLE y AD dominios de transactivación (Modificado desde Stock et al., 2005 y Xiao et al., 1999).

modular la transcripción de genes óseos tanto en células osteoblásticas como no osteoblásticas (Xiao et. al. 1999; Javed et. al. 2001). A pesar de esto, las isoformas poseen una expresión diferencial durante el desarrollo; la proteína RUNX2 tipo I es expresada durante la diferenciación en osteoblastos tempranos y maduros, mientras que la isoforma tipo II se expresa en osteoblastos maduros y condrocitos hipertróficos (Stock et. al. 2005).

Estudios recientes en ratones knockout generados selectivamente para RUNX2 tipo II, demostraron que los ratones homocigotos sólo mostraron deficiencias en la formación ósea endocondral y no en la osificación intramembranosa. Los ratones heterocigotos presentaron esqueletos normales, con una leve osteopenia, lo que sugiere que la formación de hueso no es mediada exclusivamente por RUNX2 tipo II, siendo RUNX2 tipo I capaz de sustituir al menos parcialmente la función de RUNX2 tipo II (Xiao et. al. 2004). Esto sugiere un control diferencial de la transcripción para ambas isoformas mediada por la participación de secuencias regulatorias específicas dentro de cada región promotora del gen de *Runx2* y la presencia de factores específicos en cada uno (Banerjee et. al. 2001).

La proteína RUNX2 regula la transcripción de genes blancos gracias a la zona de unión al ADN (dominio Runt) y otros dominios de unión a proteínas como el coactivador transcripcional p300, que media la activación de la transcripción. De igual forma, Runx2 presenta el dominio de unión a la matriz nuclear (NMTS), el cual se ha descrito como fundamental para su actividad transactivadora (Xiao et. al. 1999 y Stock et. al. 2005).

### **Regulación de *Runx2***

Actualmente existe variada información sobre los factores y vías de señalización que regulan la expresión de RUNX2. El promotor P1 posee siete secuencias consenso para la unión de factores RUNX, tres de ellas presentes en la

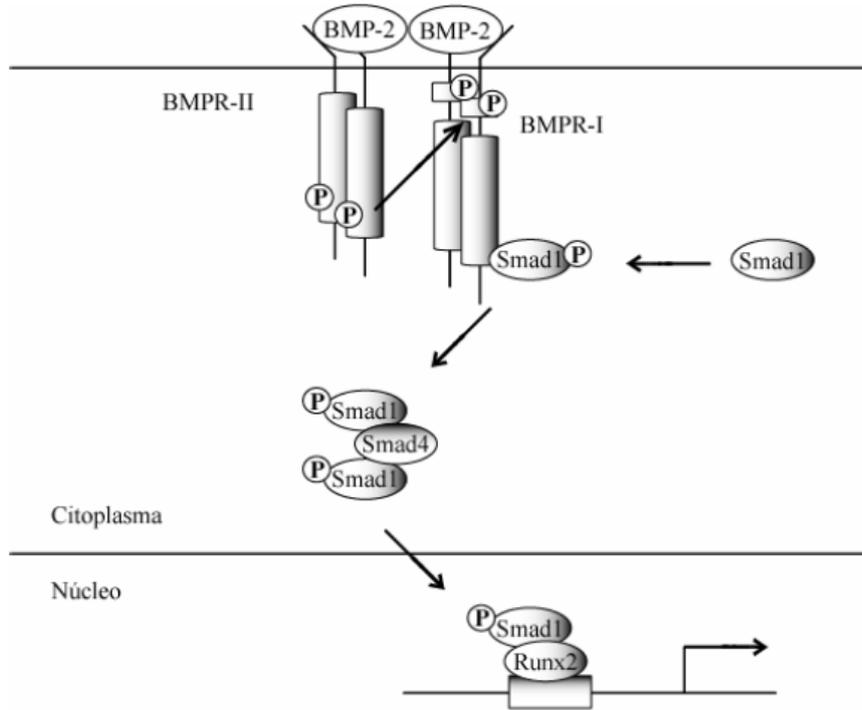
región 5'UTR, una en la parte distal del promotor y las otras tres en el promotor proximal, indicando una posible autorregulación en su expresión (Drissi et. al. 2000). Análisis del promotor P1 mediante deleciones sucesivas, revelaron que los 600 pares de bases mas próximos al sitio de inicio de transcripción en este promotor, tanto en rata como ratón, son suficientes para producir activación transcripcional (Drissi et. al. 2000, Otto et. al. 2003 y Tou et. al. 2003). Además en el promotor P1 se encontró una región consenso del tipo “enhancer” denominado CE1 (Cbfa1 Element 1) que estaría en la región distal del promotor y se encuentra conservado en humano, ratón y rata. Estas secuencias son reconocidas por factores que poseen actividad tipo NF-1 que uniría la isoforma NF1-A que actuaría como represor y tipo AP1 que posee actividad tipo FosB (Zambotti et. al. 2002). Se ha descrito además un elemento de respuesta para el receptor de vitamina D (VDRE), que funcionaría como regulador negativo de la expresión en presencia de  $1\alpha, 25$  dihidroxivitamina  $D_3$ , que se suma a la autorregulación mediada por RUNX2 II (Drissi et. al. 2002a; Drissi et. al. 2002b).

Otro tipo de regulación descrito hasta ahora considera a varios factores de crecimiento y citoquinas las cuales son capaces de regular o influenciar los niveles de expresión de RUNX2 a través de vías de señalización específicas, las que varían de un tipo celular a otro. Un ejemplo es la activación de la expresión de RUNX2 tipo II por BMP-2 (bone morphogenetic protein-2). BMP-2 pertenece a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que actúan intracelularmente a través de las proteínas Smad 1, 5 y 8, las que posterior a su activación, heterodimerizan con Smad 4 y así se traslocan al núcleo y median la transcripción de varios genes mediante elementos de respuesta e interacciones con otras proteínas regulatorias (Whitman et. al. 1998). Se ha descrito además la presencia de Smad inhibitorios (6 y 7) los cuales se unen a los receptores y producen una competencia con los Smad activadores (Yamaguchi et. al. 2000; Banerjee et. al. 2001; Chen et. al. 2004) (Figura 4). Por otra parte se ha descrito que los factores de transcripción que presentan homeodominios como Dlx5 y Msx2 promueven de forma preferencial la

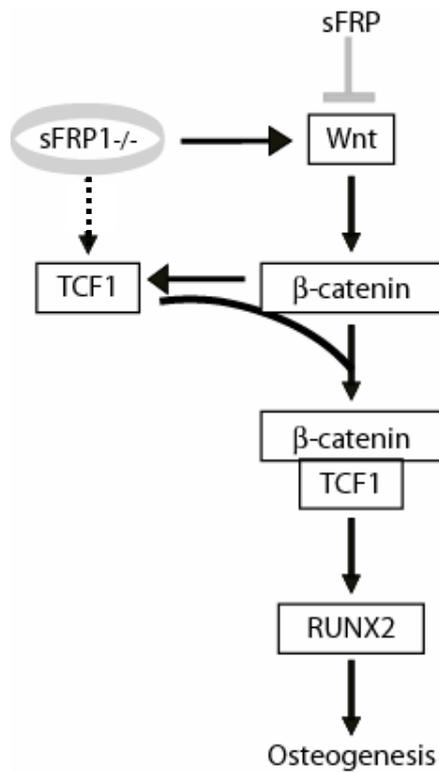
diferenciación del tejido óseo. *Dlx5* actuaría como un regulador positivo de la expresión de *RUNX2* tipo II, mientras *Msx2* ejercería un rol como represor de la diferenciación osteoblástica (Lee et. al. 2003; Lee et. al. 2005). Lo anterior sugiere la participación de factores adicionales que pueden ser estimulados por BMP-2 y que estos podrían llevar a la diferenciación del tejido óseo.

Junto a lo anterior existe evidencia que señala que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina también juega un rol importante, tanto en la diferenciación ósea como en la mantención de la masa ósea en adultos (Kato et. al 2005; Mbalaviele et. al. 2005; Hill et. al. 2005; Day et. al. 2005). Un estudio reciente en ratones *knockout* para sFRP1 (secreted frizzled related protein 1), un antagonista de Wnt relacionado con la desestabilización de  $\beta$ -catenina, mostraron un aumento en la señalización de la vía Wnt canónica asociado a un fenotipo con mayor masa ósea, caracterizado por un aumento en la expresión de *RUNX2* (Wang F. S. et. al. 2005). Este efecto puede ser reprimido por la presencia de sFRP1, indicando que el promotor de *Runx2* es blanco de la vía de señalización Wnt canónica, lo que contribuye a la maduración ósea y puede modular la diferenciación de este tejido (Figura 5) (Gaur et. al. 2005).

El modelo de estudio más utilizado para evaluar la interacción y participación de *RUNX2* en osificación es el gen de osteocalcina (OC) de rata. Se ha demostrado que *RUNX2* es esencial para la expresión de dicha proteína, en la etapa tardía de la diferenciación osteoblástica (Banerjee et. al. 1996). Mutaciones en los tres sitios de unión descritos para *RUNX* en el promotor de este gen, llevan a una disminución de la expresión de la proteína (Javed et. al. 1999). Dentro del contexto del promotor proximal de OC, se observó que *Runx2* puede interaccionar directamente con el factor de transcripción CCAAT/enhancer binding protein beta y delta (C/EBP $\beta$  y  $\delta$ ), el cual también posee sitios unión consenso presentes en el promotor de OC. La interacción de ambos factores actúa de forma sinérgica para favorecer el aumento en la expresión de OC (Gutiérrez S. et. al. 2002).



**Figura 4: Vías de señalización mediada por BMPs y Smads.** En la señalización participan receptores tipo I y II, lo que conlleva a la activación de la cascada de señalización corriente abajo, representadas por Smad1. Tanto Smad1, como Smad 5 y 8 forman un complejo con Smad4 y así son translocadas al núcleo donde interaccionan con otros factores de transcripción, por ejemplo RUNX2 (modificado de Chen et. al. 2004).



**Figura 5: Regulación de la osteogénesis mediada por  $\beta$ -catenina.** Resumen de la activación de RUNX2 por Wnt/TCF1 en la osteogénesis. La activación producida por la vía Wnt canónica, regula la inducción de la expresión de TCF1, lo que lleva a la traslocación de  $\beta$ -catenina al núcleo formando un complejo con TCF1, el cual después se une al promotor de *Runx2* para su inducción, también se señala con línea punteada, la inducción de TCF1 en ratones sFRP1  $-/-$  (modificado de Gaur et. al. 2005).

En otros estudios se observó que C/EBP $\beta$  es capaz de potenciar la actividad transcripcional de RUNX2 en la osteogénesis, aunque en células deficientes de Runx2, no es capaz de promover la diferenciación osteoblástica (Hata et. al. 2005). Además en nuestro laboratorio se demostró que el promotor P1 de *Runx2* responde positivamente a la sobreexpresión de C/EBP $\beta$ , activando la transcripción dependiente de dicho promotor (Tesis Doctoral, Berta Henríquez).

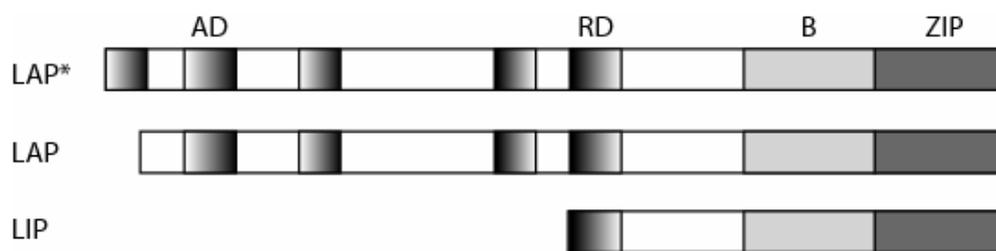
### **Proteínas CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs)**

Las proteínas C/EBPs son factores de transcripción críticos en proliferación y diferenciación celular de varios tejidos (mamario, mieloide y óseo, entre otros) (Lekstrom-Himes et. al. 1998; Kowenz-Leutz et. al. 1999; Gutierrez et. al. 2002; Villagra et. al. 2006). Estos factores pertenecen a una familia de 6 integrantes, los cuales son denominados por letras griegas, según sistema de nomenclatura creado por Cao:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  (Cao et. al. 1991). De éstos, los cuatro primeros son codificados desde genes que no poseen zonas intrónicas. En cambio C/EBP $\delta$  y  $\zeta$  incluyen en sus genes 2 y 4 zonas intrónicas respectivamente. Estructuralmente, estas proteínas poseen un dominio N-terminal de transactivación (TAD), un dominio central con 3 regiones regulatorias altamente conservado y un dominio C- terminal o cierre de leucina básico (b-ZIP), el cual está formado por una región de aminoácidos básicos que constituye el dominio de unión al ADN y por una región rica en leucina que forma el dominio de dimerización (Ramji D. et. al. 2002). La dimerización que sufren estos factores de transcripción es clave para que se produzca la unión al ADN. Esta unión puede formar homo o heterodímeros, la que puede llevar a producir activación o represión transcripcional (Vinson et. al. 1989; Hurst et. al. 1995).

Específicamente el factor de transcripción C/EBP $\beta$ , posee 3 isoformas descritas, con distintas masas moleculares: LAP\* (38 KDa), LAP (35 KDa) y LIP (20 KDa). Estas isoformas provienen de un ARNm común y su traducción diferencial se produce por

iniciación alternativa de la transcripción (Zahnow et. al. 1997). De esta manera, la isoforma LAP\* posee 3 dominios de activación y 2 dominios regulatorios, la isoforma LAP pierde un dominio de activación en el N-terminal y la isoforma LIP mantiene con respecto a las otras dos isoformas, solo un dominio regulatorio, perdiendo gran parte del N-terminal. El C-terminal en cambio se mantiene conservado para las 3 isoformas (Figura 6) (Ramji D. et. al. 2002).

Considerando los antecedentes expuestos y debido a la importancia de RUNX2 II, como un gen maestro en la regulación de la diferenciación ósea, nos centraremos en la búsqueda y en los análisis funcionales de secuencias de unión consenso para el factor de transcripción C/EBP $\beta$ , el cual podría estar regulando la actividad transcripcional del promotor P1 del gen RUNX2 II.



**Figura 6: Estructuras funcionales de las isoforma de C/EBP $\beta$ .** En el esquema, se especifican las 3 isoformas descritas para el factor de transcripción C/EBP $\beta$ . Se destacan los dominios o regiones presentes en cada isoforma: AD dominios de activación, RD dominios regulatorios, B región rica en aminoácidos básico (unión al ADN) y ZIP cierre de leucina (dimerización) (modificado de Ramji et. al. 2002).

## HIPOTESIS

El factor de transcripción C/EBP $\beta$ , contribuye positivamente en la regulación de la expresión del gen *Runx2* II, mediante su unión a sitios putativos presentes en el promotor P1 de este gen.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Identificar en el promotor P1 de *Runx2* los sitios putativos de unión para los factores de transcripción de la familia C/EBPs y analizar su funcionalidad tanto *in vitro* como *in vivo*.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

**1.- Identificar mediante programas específicos sitios de unión consensos para el factor de transcripción C/EBP dentro del promotor P1 de *Runx2*.** Para esto, primero se realizará la búsqueda *in silico* de las secuencias de los promotores de rata, ratón y humano, luego se obtendrán los alineamientos de las secuencias de estos promotores, para así finalmente realizar la búsqueda de los sitios de unión consenso para estos factores de transcripción en la secuencia de este promotor.

**2.- Producir y purificar las proteínas recombinantes His-C/EBP $\beta$  (LAP) y GST-RUNX2 II.** A partir de los plasmidos pQE80L-C/EBP $\beta$  LAP y pGEX-4T1-RUNX2 generados anteriormente, se obtendrán respectivamente ambas proteínas para los ensayos de retardo en gel (EMSA).

**3.- Estandarizar los ensayos de retardo en gel (EMSA).** Con el fin de obtener una señal clara y nítida de los retardos producidos por la unión proteína-ADN *in vitro* y así tener las condiciones óptimas para este ensayo. Además para éstos, se

utilizarán oligonucleótidos complementarios o fragmentos amplificados del promotor P1 obtenidos por PCR, como las proteínas recombinantes obtenidas anteriormente.

**4.- Verificar la unión de C/EBP $\beta$  y RUNX2 *in vivo* en células osteoblásticas y no osteoblásticas, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).** Esto se realizará para confirmar si los sitios de unión que se pudieran hallar en los análisis *in silico* y que posteriormente, por los ensayos de retardo en gel unan *in vitro* estos dos factores de transcripción, también lo hagan *in vivo*.

## MATERIALES Y METODOS

### 1.1 Análisis “in silico” de secuencias de ADN

Para estos análisis se utilizaron tres programas disponibles online, uno para obtener las secuencias del promotor P1 en diferentes especies y que corresponde al buscador de secuencias genómicas, Ensembl Genome Browse, disponible en <http://www.ensembl.org/index.html>. El otro programa se utilizó para realizar alineamientos de secuencias y se denomina ClustalW, con el cual se alinearon las secuencias del promotor P1 de RUNX2 de rata, ratón y humano para confirmar la identidad de estos promotores (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). El tercer programa fue utilizado para determinar sitios de unión putativos para factores de transcripción en una secuencia determinada de ADN. En este programa se analiza una secuencia nucleotídica determinada, con el fin de obtener sitios putativos con una identidad mínima de 85% con respecto a la secuencia consenso de un sitio de unión determinado para un factor de transcripción. El servidor se llama TFSearch y está disponible en <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>.

### 1.2 Líneas celulares.

Células *ROS 17/2.8*; tipo celular correspondiente a células de Osteosarcoma de rata (Majeska et. al. 1980). El cultivo se realizó en placas con medio F-12 (Gibco BRL), que se suplementó con suero fetal de bovino 5%, bicarbonato de sodio 1,18 mg/mL, CaCl<sub>2</sub> 0,8mM, HEPES 30mM. Células *H4-IIE*; tipo celular que corresponde a células epiteliales de hepatoma de rata (Benedict et. al. 1973). El cultivo se realizó en placas con medio MEM (Eagle) con L-glutamina 2 mM, que se ajustó con suero fetal de bovino 10%, bicarbonato de sodio 1.5 mg/mL, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y

piruvato de sodio 1.0 mM. A los medios de cultivo se les adicionó penicilina-estreptomicina 50 U/mL.

La incubación de las líneas celulares se realizó a 37°C en un ambiente de 5% CO<sub>2</sub>.

### **1.3 Aislamiento de ADN genómico desde líneas celulares**

Células ROS 17/2.8 fueron cultivadas en placas de 100 mm hasta 100% de confluencia. Luego las células se lavaron 2 veces con PBS a 4°C y se colectaron por raspado en 10 ml de PBS 4°C en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (ROCHE). Luego se centrifugaron por 5 minutos a 500xg y se lavaron con PBS. El pellet celular se resuspendió en 300 ul de buffer de digestión (NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 25 mM pH 8.0, SDS 0,5% y Proteinasa K 0,1 mg/mL) por placa de 100 mm y se incubó a 50°C por 12 horas. La mezcla se extrajo 2 veces con 1 volumen de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y dos veces con 1 volumen de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 5.000xg durante 15 minutos a temperatura ambiente cada vez. Luego se procedió con el protocolo de precipitación de ADN.

### **1.4 Purificación de oligonucleótidos**

La purificación de los oligonucleotidos específicos para los ensayos de retardo en gel se realizó por el método de electroforesis en un gel de Acrilamida al 12% con UREA al 10,5% p/v. Luego de realizada la electroforesis se procedió a cortar la banda en el gel correspondiente al oligonucleótido, se llevó a un tubo y se le agregó NaAc 0,3 M, se dejó en agitación por 16 horas a temperatura ambiente, se centrifugó y se transfirió a un tubo limpio. Luego se realizaron dos extracciones, una con fenol saturado y otra con cloroformo: alcohol isoamilico, se centrifugó y luego se precipitó

con NaAc 3M. El precipitado fue resuspendido en H<sub>2</sub>O y se realizó su cuantificación espectrofotométricamente.

### 1.5 Precipitación de ADN y Oligonucleótidos

La precipitación de ADN se realizó agregando 1/10 volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 a 3 volúmenes de Etanol absoluto a – 20 °C. La precipitación de oligonucleótidos se realizó agregando 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M pH 7,0 y 3 volúmenes de Etanol absoluto a –20 °C. La mezcla se mantuvo por 2 horas a –20 °C o 30 minutos a –80 °C y luego se centrifugó a 13.000xg durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado se lavó 2 veces con etanol 70% a –20 °C y se centrifugó a 13.000xg durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se centrifugó a 13.000xg durante 30 segundos a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol y el precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de buffer TE (pH 8,0) o agua.

### 1.6 Determinación de concentración de ADN y Oligonucleótidos

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando como factor de conversión 1 A<sub>260</sub> = 50 µg/ml. La pureza del ADN se determinó obteniendo la razón A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>. La concentración de oligonucleótidos se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando la siguiente fórmula:

$$C(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \frac{100}{1,50NA + 0,71NC + 1,20NG + 0,84NT}$$

donde NX es el número de nucleótidos X contenido en el oligonucleótido.

## **1.7 Obtención de ADN plasmidial**

El método utilizado fue el de extracción plasmidial por lisis alcalina con SDS combinado con purificación en columna, para así obtener DNA plasmidial de alta pureza. Esta se realizó a partir de 5 ml de medio de cultivo bacteriano (caldo LB-ampicilina), crecido entre 12 y 16 horas a 37°C con agitación. Luego de esto se realizó la purificación con el kit E.Z.N.A. Plasmid Miniprep (OMEGA Bio-Tek) siguiendo lo descrito en el manual del kit.

## **1.8 Transformación de bacterias competentes**

Se utilizaron bacterias de cepa *E. coli* CaCl<sub>2</sub> competentes DH5<sub>α</sub>, para obtención plasmidial y BL-21, para la expresión de proteínas recombinantes. Se tomaron por separado 100 ul de bacterias y se agregaron entre 10 y 100 ng de ADN plasmidial de interés, se mezclaron suavemente y se incubaron por 30 minutos en hielo. A continuación la mezcla fue incubada por 120 segundos a 42°C para dejarlo posteriormente 2 minutos en hielo. Se les adicionó 200 ul de medio de cultivo (caldo LB) y se incubaron a 37°C por 45 minutos con agitación constante. Posteriormente se sembraron 100 ul de esta mezcla en placas con medio de cultivo sólido (agar LB-ampicilina 50 mg/ml) y se dejó entre 12 y 16 horas de incubación en estufa a 37°C.

## **1.9 Purificación de proteínas recombinantes**

### **1.9.1 Purificación de GST-RUNX2 II**

Para la expresión y purificación de la proteína GST-RUNX2 II se utilizaron bacterias *E. coli* BL-21 transformadas y una columna de afinidad con resina glutatión sefarosa 4B (Pharmacia Biotech) respectivamente. Brevemente, una colonia de cepa BL-21 competente transformada conjuntamente con el plásmido pRP4 y el plásmido

pGEX-4T1-RUNX2. Las colonias positivas fueron crecidas en 5 ml de medio de cultivo LB-ampicilina (50 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml), se incubó entre 12 y 16 horas a 37°C, con agitación constante. Luego el cultivo se traspasó a un matraz con 500 ml de medio LB-ampicilina (50 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml), se incubó por 6 horas a 25°C hasta una O.D.<sub>600</sub> aproximada de 0.8, y luego se indujo con isopropil β-D1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 25 μM por 1 hora a 25°C con agitación. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C, y el pellet resuspendido en 10 ml de una solución de PBS 1X, DTT 2 mM e inhibidores de proteasas. Luego el pelet fue lisado por sonicación (Misonix, Sonicator 3000), con 4 pulsos de 15 seg. a 27 Watts de potencia, seguido de 20 seg. de descanso entre cada pulso. El producto de la lisis fue centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante incubado en hielo por 30 minutos para posteriormente ser purificado en una columna de afinidad de glutatión sefarosa 4B. El lisado soluble se incubó con la resina por 20 minutos y posteriormente se cargó en una columna. La columna con la resina se lavó con 30 ml de solución PBS 1X, PMSF 0.5 mM, TPCK 7 μg/ml, DTT 5 mM y EDTA 1 mM. A continuación la proteína expresada fue eluída por varios pasos de buffer glutatión reducido (glutatión reducido 10mM, PMSF 0,5 mM, DTT 5mM), dejándolo actuar por 10 minutos y así obtener la proteína recombinante. Las proteínas fueron almacenadas a -80°C ajustando los valores en el buffer de KCl a 100 mM y de glicerol al 15%.

### **1.9.2 Purificación de His-C/EBPβ LAP**

Para la expresión y purificación de la proteína His-C/EBPβ se utilizaron bacterias *E. coli* BL-21 y una columna de afinidad con resina Ni-NTA (Qiagen) respectivamente. Brevemente, una colonia de cepa BL-21 competente fue transformada con el plásmido pQE80L-C/EBPβ LAP. Las colonias positivas fueron

crecidas en 5 ml de medio de cultivo LB-ampicilina (50mg/ml), se incubó entre 12 y 16 horas a 37°C, con agitación constante. Luego el cultivo se traspasó a un matraz con 500 ml de medio LB-ampicilina (50 mg/ml) y se incubó por 4 horas a 30°C hasta una O.D.<sub>600</sub> aproximada de 0.6 y luego se indujo con isopropil β-D1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 200 uM por 3 horas a 30°C con agitación. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 4800 rpm por 10 minutos a 4°C, y el pellet resuspendido en 20 ml de una solución de lisis PBS 1 X, DTT 5mM, Imidazol 10uM, NaCl 300mM, NaHPO 50mM e inhibidores de proteasas, para luego ser lisado por sonicación (Misonix, Sonicator 3000), con 4 pulsos de 15 seg. a 27 watts de potencia, seguido de 20 seg. de descanso entre cada pulso. El producto de la lisis fue centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, obteniendo un sobrenadante que fue filtrado con una malla de lana de vidrio. Posteriormente el sobrenadante fue incubado en hielo por 30 minutos y purificado en una columna de afinidad Ni-NTA. Previamente la columna fue lavada con aproximadamente 150 volúmenes de buffer de lavado PBS 1X, Imidazol 20uM, NaCl 300mM, NaHPO 50mM, DTT 1mM y PMSF 0,5mM. Para eluir la proteína His-C/EBPβ se utilizó un volumen de buffer de elución PBS 1X, Imidazol 150uM, NaCl 300mM, NaHPO 50mM, DTT 1mM y de PMSF 0,5mM recolectándose diferentes eluciones con la proteína recombinante. Las proteínas fueron almacenadas a -80°C ajustando los valores en el buffer de glicerol al 15%.

Luego se procedió a realizar la cuantificación de proteínas de cada eluato mediante el método de Bradford. Además, de cada eluato se tomó una alícuota de 20μl para análisis por Western blot.

### **1.10 Electroforesis de proteínas**

Las proteínas recombinantes se denaturaron con un volumen de buffer de carga (50 mM Trizma·Cl pH 6,8, 1 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Luego de centrifugar a 16.000xg

durante 2 minutos, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE) al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 V utilizando buffer de corrida (25 mM Trizma·Cl, 250 mM glicina, 0,1% SDS).

### **1.11 Western blot**

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas 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 un amperaje constante de 200 mA durante 2 a 2,5 horas. Para verificar la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con una solución de rojo Ponceau S 1X. Posterior a un lavado con PBS, la membrana se bloqueó con una solución PBS/Tween 20 0.05%/leche descremada 5%. La membrana se incubó con anticuerpos específicos, para C/EBP $\beta$  (C-19, Santa Cruz Biotechnology), para RUNX2 (S-19, Santa Cruz Biotechnology) y para GST (Rockland), en solución PBS/leche descremada 5% a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Luego se hicieron lavados sucesivos de 5 minutos con una solución PBS 1X-Tween 20 0,05%. La membrana se incubó con un segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo y que tiene acoplado la enzima peroxidasa de rabano picante (HRP), en una solución de PBS/leche descremada 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó con una solución de PBS-Tween 20 0,05%, 4 veces durante 5 minutos cada vez y la detección se llevó a cabo con reactivos para quimioluminiscencia (*Renaissance*, Western blot plus chemiluminescence reagent, NEN LIFE SCIENCE). La membrana posteriormente se expuso a un film fotográfico (BIOMAX XAR, KODAK) a temperatura ambiente.

### **1.12 Ensayo de interacción ADN-proteína**

Se realizó mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) (Paredes et. al. 2002. y Javed et. al. 1999). Brevemente, se utilizó un fragmento formado por oligonucleótidos de secuencias complementarias que contenían un sitio putativo para el factor de transcripción C/EBP $\beta$  o un fragmento generado por PCR del promotor P1 del gen RUNX2 que contiene el mismo sitio del oligonucleótido anterior, además de un sitio de unión para Runx2. La reacción fue realizada con 50 fmoles del ADN marcado y 50 ng de proteína recombinante, en un volumen final de 20  $\mu$ l en tampón de unión para proteínas recombinantes (100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.05 % NP-40, 0.5 mM PMSF, 1mM DTT, 10 % glicerol, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l poly (dI-dC) y 10 mM Tris-HCl pH 8.0). La mezcla se incubó por 30 minutos a 30°C. Los complejos formados fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (acrilamida/bis 60:1) al 3,5 % (0.5X TBE) no denaturante. Antes de cargar las muestras, el gel fue precorrido a voltaje constante de 200 V por 45 minutos a 4°C. Luego la electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 V por 100 ó 120 minutos, dependiendo del ensayo realizado, siendo después el gel secado y visualizado mediante autoradiografía en films fotográficos (X-BIOMAX XAR, KODAK) o revelado por densitometría en placa autorradiográfica y analizada en un Phosphoimager Bio-Rad, utilizando el Software Quantity One (Bio-Rad).

### **1.13 Marcaje de oligonucleótidos con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP**

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de EMSA se marcaron en el extremo 5', mediante T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs), en presencia de 30  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, NEN LIFE SCIENCE) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Luego de terminada la reacción se adicionó EDTA 0,5 mM, para detenerla. Los nucleótidos radiactivos no incorporados se eliminaron por

cromatografía de exclusión en columnas Spin Sephadex G-25 (BOEHRINGER MANNHEIM).

#### **1.14 Marcaje del fragmento de ADN con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-CTP**

El fragmento que contenía el sitio para C/EBP $\beta$  del promotor P1 fue marcado radiactivamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para esto se utilizó el oligonucleótido previamente marcado como se describe anteriormente o se incorporó a la mezcla de la PCR, 0.5 – 1.0  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-CTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, NEN LIFE SCIENCE). La mezcla de reacción de PCR fue: 2 ó 4 mM MgCl<sub>2</sub>, dependiendo del fragmento de ADN a amplificar, 0.2 mM dNTPs, 10 pmoles de cada oligonucleótido, 0.5 – 1.0  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-CTP en el caso de incorporar el P<sup>32</sup> radiactivo a la reacción, buffer Taq polimerasa 1X y 2.5 unidades de Taq Polimerasa (Invitrogen) en 50  $\mu$ l de reacción final. Se realizaron amplificaciones empleando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: -111/+15 y -179/-98, donde el número indica la posición en el promotor P1 del gen RUNX2, empleando la notación en sentido 5'-3' a partir de la posición -1 en la región promotora. Las condiciones para el termociclador (THERMO) fueron: denaturación 94°C x 30s, alineamiento 45 ó 46.6 °C, respectivamente x 30s, elongación 72°C x 30s y 25 ciclos de amplificación.

#### **1.15 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP Assay)**

Esta técnica básicamente permite conocer si una proteína se encuentra unida a una región de ADN dentro de un contexto nuclear particular. Brevemente, células en cultivo son tratadas con un agente entrecruzador que permite unir químicamente las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN. Luego al fragmentar mediante ultrasonido estos complejos entrecruzados, se obtendrán proteínas unidas a fragmentos de cromatina de un tamaño particular, para luego realizar una

inmunoprecipitación de la proteína de interés y arrastrar con ella los fragmentos de ADN con los cuales esta proteína se encontraba interaccionando en el momento del entrecruzamiento. Luego estos fragmentos de ADN pueden ser purificados y mediante la técnica de PCR analizar la presencia de una secuencia particular de ADN. El procedimiento detallado a continuación fue modificado a partir del protocolo descrito por Soutoglou y col. (2002), modificado en parte de la metodología publicada por Peggy Farnham en <http://mcardle.oncology.wisc.edu/farnham> (Weinmann and Farnham. 2002)

Las líneas celulares utilizadas fueron crecidas en placas de 100 mm hasta un 95% de confluencia. Luego cada placa de cultivo fue lavada dos veces con PBS frío agregándose 10 mL de buffer de entrecruzamiento (formaldehído 1% en PBS 1X) e incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y esporádica. El entrecruzamiento se detuvo con la adición de glicina a una concentración final de 0.125 M. Las células se lavaron con 10 ml de PBS frío y se colectaron por raspado en 10 ml de PBS frío en presencia de inhibidores de proteasas (ROCHE). La suspensión celular se centrifugó a 1000xg por 5 minutos a 4°C y las células se resuspendieron en 1 mL de buffer de lisis (50 mM HEPES pH 7.8, 3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM KCl, 0.1% NP-40, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas) por placa de 100 mm y se mantuvieron 10 minutos en hielo. El lisado celular se homogenizó en el mismo buffer utilizando un homogenizador Dounce con 15 golpes de pedestal suave tipo A. El extracto se centrifugó a 1500xg por 5 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 0.3 mL de buffer de sonicación A (50 mM HEPES pH 7.8, 140 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, más inhibidores de proteasas) por placa de 100 mm. El extracto celular se sonicó en un sonicador Misonix (modelo sonicador 3000) con 15 pulsos de 15 segundos e intervalos de descanso de 20 segundos empleando microtip en un 30% de potencia. El sonicado se centrifugó a 16.000xg por 10 minutos a 4°C y la fracción sobrenadante se alicuotó y congeló en nitrógeno líquido para guardarlo a – 80 °C

hasta su utilización. Una alícuota se utilizó para cuantificación de ADN a 260 nm y evaluar el grado de fragmentación del ADN genómico mediante un gel de agarosa al 1%.

El ensayo de inmunoprecipitación se realizó a partir de 8 U de absorbancia de extracto de cromatina entrecruzado, medido a una longitud de onda de 260 nm. Todas las muestras fueron preaclaramadas incubándolas 1 hora a 4°C en rotador continuo con 2.5 ug de IgG control de conejo y 50 uL de proteína A o G azarosa, dependiendo del isotipo del anticuerpo usado para la inmunoprecipitación. Para todos los ensayos realizados la concentración salina se mantuvo en 140 mM de NaCl en un volumen total de 500 uL en presencia de inhibidores de proteasas. Luego del preaclaramiento, las muestras fueron centrifugadas a 2000xg por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo. Se incubó con 5 ug de anticuerpo específico para la proteína a detectar, C/EBP $\beta$  (C-19, Santa Cruz Biotechnology) y Runx2 (M-70, Santa Cruz Biotechnology), por 12 horas a 4°C en rotador continuo. Luego se agregó 50 uL de proteína A o G y de BSA 1 mg/mL concentración final, se incubó por 1 hora a 4°C en rotador continuo y se centrifugó a 2000xg por 5 minutos y a 4°C. El sobrenadante se eliminó y los pellet de proteína A o G agarosa inmunoprecipitados fueron lavados sucesivamente con 500 uL de buffer de sonicación (10 mM HEPES pH 7.8, 10% v/v glicerol, 1.0 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 150 mM NaCl, más inhibidores de proteasas), buffer de sonicación B (50 mM HEPES pH 7.8, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, más inhibidores de proteasas), buffer LiCl (20 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% deoxicolato de sodio, más inhibidores de proteasas) y buffer TE (10 mM Tris pH 8.0, 0.25 mM EDTA). Entre cada lavado se dejó en rotador vertical por 5 minutos y luego se centrifugó a 2000xg por 5 minutos a 4°C. En el último lavado se reconstituyó el inmunoprecipitado con 100 uL de buffer de elución (20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5% SDS) y se incubó a 65°C por 15 minutos. Se centrifugó 1 min. a 10.000xg 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 en presencia de RNasa A a una concentración final 20 ug/mL, tras lo cual se agregó Proteinasa K a 100 ug/mL concentración final y se incubó a 42°C por otras 2 horas. El ADN se extrajo por el método de fenol/cloroformo y por último se precipitó con EtOH absoluto en presencia de NaAc 3 M y glicógeno. Luego el ADN se resuspendió en 30 uL de TE pH 8.0 y se utilizó 3 uL para cada reacción de PCR.

La mezcla de reacción usada para todas las PCR fue: 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 10 picomoles de cada oligonucleótido, 0.5 – 1.0 µCi de [α-32P] dCTP, buffer Taq polimerasa 1X y 2.5 unidades de Taq Polimerasa (Invitrogen). Las condiciones para el termociclador fueron: denaturación 94°C x 30s, alineamiento 60°C x 30s, elongación 72°C x 30s y 27 ciclos de amplificación. Se realizaron amplificaciones empleando la siguiente combinación de oligonucleótidos: -179/+147 donde el número indica la posición en el promotor P1 de RUNX2 empleando la notación en sentido 5'-3' a partir de la posición -1 en la región promotora.

Los fragmentos amplificados por PCR fueron sembrados en geles de acrilamida al 6% en tampón TBE 0.5X y corridos en el mismo tampón a 50 V de precorrida por 5 min y 200 V de corrida por 20 min. El gel se secó y luego se expuso a una placa de rayos X (X-BIOMAX XAR, KODAK) a temperatura ambiente o fue revelado por densitometría en placa autorradiográfica y analizada en un Phosphoimager Blo-Rad, utilizando el Software Quantity One (Bio-Rad). Este mismo software se utilizó para la cuantificación de las señales obtenidas.

## RESULTADOS

1.- **Análisis “*in silico*” del promotor P1 de *Runx2* II.** Con el fin de detectar nuevos sitios de unión putativos para factores de transcripción, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los promotores P1 del gen de *Runx2* de rata, ratón y humano desde la base de datos de Ensembl Genome Browser. Posteriormente, estas secuencias obtenidas fueron alineadas, utilizando el programa ClustalW. Con este fin, se alinearon 858 pb. del promotor de rata, 884 pb. del promotor de ratón y 699 pb. del promotor humano, abarcando la secuencia 5'UTR (64 pb.) y toda la zona corriente arriba en el promotor P1 proximal de *Runx2*. Este alineamiento confirmó la alta homología de secuencia entre los promotores de estas especies, alcanzando esta en promedio a valores sobre el 90% (Figura 2 y 7) (Levanon et. al. 2004; Drissi et. al. 2000). Resulta relevante destacar que las secuencias de rata y ratón presentan una homología de secuencia cercana al 100% y que el gen humano, a pesar de tener una zona de menor longitud en el promotor (región rica en purinas) (Figura 2), mantiene una alta homología con respecto a las secuencias promotoras de las otras dos especies (Figura 7). En la figura 7, los asteriscos denotan identidad de los nucleótidos en las tres especies, las líneas punteadas señalan la diferencia de longitud con respecto al alineamiento de mayor homología entre las secuencias.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

Rata      CAGTC--AATCCCGCAAGGAGTTTGAAGCAGACCTTTGGA-AAGGTAAACTG--TTTT 55
Ratón     CGATCCCGATCCCGCAAGGAGTTTGAAGCAGAGCTCTGGA-AAGGTAAACTCCTTTTT 59
Humano    TAGTC--AAGCCTAGCAAGCAGTTTGAACCAGACCTTAAGGTAAACTTTTTTTTTTTT 58
          ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      ACAATGAGTTACAGATCTACAAGCTTAGGAAGACAAGCAG-----GAAAGAAGC- 104
Ratón     ACAATGAGTTACAGATCCCAAGCTTAGGAAGACAAGCAAAGGCAAACAGAAGGAAGC- 118
Humano    ACAATGAGTTACAGATTCACAAGTTTAAAGAACAGAAAAGGAAAACAGAAGGAATCC 118
          ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      AGCCACCTGGGAAATCCGAAGCAG--CCTGAAAGTGATACAATCCCAAGATGTGACCC 162
Ratón     AGCCACCTGGGAAATCCGAAGCAG--CCTGCAAGTGATACAATCCCAAGATGCGAATT 176
Humano    AGCCACCC-AGCAAATATGAAGCAGACCCAGAAATGTGATACAGTCCAAAGATGTGAAT 177
          ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      ACTGCGAAGCAGCA--GTTGTTGAGAACGCCGCAC--TCACCTGAAACAGTTTGTCTCAC 218
Ratón     ACTGCAAAGCAGCAGCTGTTGCTCAGAACGCCACACACTCAGTTGAGACAATTTGTCTCAC 236
Humano    ATTTGATATCATCTACTGTTGTTGAGAAATTCACACAGACTCTTGAGCCAATTTTGTTCAT 237
          ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      TTTTCCATAGACATAATAATGAAGGAAAGAGAGGGGGTACAGAAAAGAGAAGAAAAG 278
Ratón     TTTTCCATAGACATAATAATGAAGGAAAGGGAGGGGTAGAGAAGAGAGATGAAAAG 296
Humano    TTTTCCACAGACACAATAATGAACATAAAAAGAGGAGG-----CAAAAAGG 282
          ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      CAGACGAGGGAAGGAGGGGAGGGGGAGTAGGAGGTGTTAGAAAAGGAAAACCCCTAGCT 338
Ratón     CAGAGGAGGGAA-----GGGGAGTAGGAGGTGGCAGAAAAGGAAAACCCCTAGCT 347
Humano    CAGA-----GGTTGAGCGGGGA---GTAGAAAAGGAAAACCCCTAACT 321
          **** ----- ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      GCAGAGTTCTGCTCTCCAAGTCTTAACCTTACAGGAGTGTGGGCTCCTTCAGCATTTGT 398
Ratón     ACAGAGTTCTGCTCTCCAGAGCTTAACTTACAGGAGTGTGGGCTCCTTCAGCATTTGT 407
Humano    GCAGAGCTCTGCTCTACAATGCTTAACTTACAGGAGTGTGGGCTCCTTCAGCATTTGT 381
          ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      ATTCTATCCAAATCCTCATGAGTCACAAAATTAAGGCTATAACCTTCTGAATGCCAG 458
Ratón     GTTCTAGCCAAATCCTCATGAGTCACAAAATTAAGGCTATAACCTTCTGAATGCCAG 467
Humano    ATTCTATCCAAATCCTCATGAGTCACAAAATTAAGGCTATAACCTTCTGGATGCCAG 441
          ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      GAA-GGCCTCACCACAAGCCTTTTGTGAGAG-----AGGGAGAAAGGGAGGGGAGGAA 511
Ratón     GAA-GGCCTTACCACAAGCCTTTTGTGAGAGGAGAAAGGGAGAGAGAGGGGAGAGAGA 526
Humano    GAAAGGCCTTACCACAAGCCTTTTGT-----GAGAGAAAGAGAGAGAGAGAAA 489
          *** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *
Rata      G--GGAGAGAGAGAGGAAGGGAGGAGGAGAGAG-----CACCCATAAGTAAA 560
Ratón     GAGGAGAGAGAGAGGAGAGAGGAGGAGGAGAGACAGAGAACCCATAAGTAAA 586
Humano    G-----AG-----AG----- 492
          * ----- **
Rata      GAGACAGAAGGAAGGGAAGGGAGAGGACAAACAGAGAGAAAG-AGGGAGGGAGGGGAGA 619
Ratón     GAGACAGAAGGAAGGAAAGGGAGAGGACAAAGAGAAAGGAGGAGGGAGGGGAGGAGA 646
Humano    -----CAAGGGGAA----- 502
          ***** **
Rata      AGGAAAAGATTGAGAAAGAGGGAGGGGAGAGAGAAAGGGGGGAAAGCCACAGTGGTAGGC 679
Ratón     AGGAAAAGATTGAGAAAGAGGGAGGGGAGAGAGCAAGGGGG-AGCCACAGTGGTAGGC 705
Humano    -----AAGCCACAGTGGTAGGC 519
          *****
Rata      AGTCCCCTTTACTTT-GAGTACTGTGAGGTCACAAACCACATGATCTGTCTCTCCAGT 738
Ratón     AGTCCCCTTTACTTT-GAGTACTGTGAGGTCACAAACCACATGATCTGTCTCTCCAGT 764
Humano    AGTCCCCTTTACTTTAAGAGTACTGTGAGGTCACAAACCACATGATCTGCCTCTCCAGT 579
          *****
Rata      AATAGTGCTTGCAAAAAATAGGAGTTTAAAGCTTTTGCTTTTTTGGATTGTGTGAATGC 798
Ratón     AATAGTGCTTGCAAAAAATAGGAGTTTAAAGCTTTTGCTTTTTTGGATTGTGTGAATGC 824
Humano    AATAGTGCTTGCAAAAAAAGGAGTTTAAAGCTTTTGCTTTTTTGGATTGTGTGAATGC 639
          *****
Rata      TTCATTGCGCTCACAAAACACCACAGAACCACAAGTGCGGTGCAAACTTTCTCCAGGAGG 858
Ratón     TTCATTGCGCTCACAAAACACCACAGAACCACAAGTGCGGTGCAAACTTTCTCCAGGAGG 884
Humano    TTCATTGCGCTCACAAAACACCACAGAACCACAAGTGCGGTGCAAACTTTCTCCAGGAGG 699
          *****

```

**Figura 7: Alineamiento de secuencias del promotor P1.** Alineamiento realizado con las secuencias de rata, ratón y humano del promotor P1 del gen de *Runx2*. Se observa una homología entre las secuencias promotoras de las tres especies por sobre el 90% de identidad.

A continuación se realizó una búsqueda de sitios de unión para C/EBP $\beta$ , para lo cual nos guiamos por el sitio consenso descrito RTTGCGYAAY, donde R, puede ser A o G; Y, puede ser T o C (Tabla 2) (Osada et. al. 1996; Ramji et. al. 2002).

C/EBP $\beta$										
G (%)	23.2	0	0	92.9	1.0	77.8	1.0	0	0	9.1
A (%)	67.7	0	0	7.1	1.0	21.2	12.2	91.9	100	1.0
T (%)	2.0	100	100	0	2.0	1.0	35.4	0	0	63.6
C (%)	7.1	0	0	0	95.0	0	45.5	8.1	0	26.3
CONSENSO	A/G	T	T	G	C	G	C/T	A	A	T/C

**Tabla 2: Secuencia de unión consenso para C/EBP $\beta$ .** Donde se muestra la frecuencia de cada nucleótido en la secuencia consenso (Modificado de Osada et. al. 1996).

Primero mediante una búsqueda manual, no se encontró ningún sitio de unión con 100% de homología con el consenso de C/EBP $\beta$ . Por lo tanto se utilizó un programa de búsqueda de sitios de unión para factores de transcripción, disponible en la red. Se optó por el programa TFSearch, que utiliza TFMATRIX como matriz de secuencias de los sitios de unión consenso. Este programa permite elegir el porcentaje de homología mínimo para la búsqueda de sitios de unión para factores de transcripción, con respecto al sitio de unión consenso de éstos (score) y también se puede optar por la taxonomía de los factores de transcripción. Luego de la búsqueda de los sitios, se obtiene la secuencia nucleotídica numerada, destacándose los sitios de unión encontrados bajo la secuencia y en un costado el nombre del factor de transcripción, con acceso directo a las secuencias consensos utilizada por este programa, además del score de ese factor de transcripción hallado. Para esta búsqueda se utilizaron 600 nucleótidos corriente arriba a partir de la posición -1 en la región promotora del gen *Runx2*, incluyéndose además la secuencia iniciadora de transcripción. Con este análisis se lograron identificar, varios sitios de unión para factores de transcripción (Figura 8), entre los cuales se encontraron cuatro sitios de unión putativos para C/EBPs. Estos sitios se encuentran distribuidos de forma aleatoria; el sitio I está a 5 nucleótidos de la caja TATA del promotor P1, el sitio II está a aproximadamente 103

nucleótidos del sitio I, el sitio III a aproximadamente 206 nucleótidos del sitio II y el sitio IV a aproximadamente 170 nucleótidos del sitio III, todos ellos ubicados corriente arriba con respecto al sitio anterior. Encontramos además que estos sitios son conservados en rata y ratón. En el caso del promotor P1 humano esta distribución varía un poco, ya que como se mencionó anteriormente este promotor difiere en longitud con respecto a los promotores de rata y ratón, específicamente por la diferencia que existe entre la región rica en purinas presente en todos ellos. Dentro de esta búsqueda se detectaron también cuatro sitios de unión para el factor de transcripción RUNX, los que concuerdan con los elementos descritos por Drissi y colaboradores (Drissi et. al. 2000). De estos, tres se encuentran entre los sitios de unión I y II para C/EBPs y el otro está ubicado corriente abajo del sitio III para C/EBPs. También se confirmó la presencia de una caja TATA, ubicada a 20 nucleótidos del sitio de inicio de transcripción (Figura 8).

Database: TRANSFAC MATRIX TABLE, Rel.3.3 06-01-1998  
 Query: Promotor P1 RUNX2 rata (609 bases)  
 Taxonomy: Vertebrate  
 Threshold: 85.0 point  
 TFMATRIX entries with High-scoring:

1	GCCGCACTCA CTTGAAACAG TTTTGCTCAC TTTCCATAG ACATAATAAT	entry	score
	<-----	<a href="#">M00240</a>	Nkx-2, 100.0
		<a href="#">M00101</a>	CdxA 97.9
		<a href="#">M00101</a>	CdxA 90.7
		<a href="#">M00137</a>	Oct-1 90.5
		<a href="#">M00159</a>	<b>C/EBP 90.0</b>
		<a href="#">M00073</a>	deltaE 85.3
51	GAAGGAAAGA GAGGAGGGGT AGAGAAAAGA GAAGAAAGAG CAGACGAGGG	entry	score
	>	<a href="#">M00101</a>	CdxA 97.9
	->	<a href="#">M00137</a>	Oct-1 90.5
		<a href="#">M00079</a>	Evi-1 86.4
101	AAGGAGGGAA GGGGGGAGTA GGGAGGTGGT AGAAAGGAAA ACCCTTAGCT	entry	score
	----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1 96.5
		<a href="#">M00053</a>	c-Rel 90.9
		<a href="#">M00052</a>	NF-kap 85.4
151	GCAGAGTTCT GCTCTCCAAG TGCTTAACCT TACAGGAGTG TGGGCTCCTT	entry	score
	----->	<a href="#">M00240</a>	Nkx-2, 88.4
		<a href="#">M00033</a>	p300 88.1
201	CAGCATTTGT ATTCTATCCA AATCCTCATG AGTCACAAA ATTAAAAAGC	entry	score
	----->	<a href="#">M00199</a>	AP-1 94.3
		<a href="#">M00100</a>	CdxA 87.2
		<a href="#">M00100</a>	CdxA 87.2
		<a href="#">M00101</a>	CdxA 85.7
		<a href="#">M00159</a>	<b>C/EBP 85.4</b>
251	TATAACCTTC TGAATGCCAG GAAGGCCTCA CCACAGCCT TTTGTCAGAG	entry	score
	----->	<a href="#">M00271</a>	<b>AML-1a 100.0</b>
301	AGGGAGAAAG GGAGGGGGAG GAAGGGAGAG AGAGAGGAAG GGAGGAAGGG	entry	score
	----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1 88.7
351	AGAGAGAGCA CCCATAAGTA AAGAGACAGA AGGAAGGGAA GGGAGAGGAC	entry	score
	<-----	<a href="#">M00101</a>	CdxA 86.4
401	AACAGAAGAG AAGAGGGGAG GGGAGGGGAG AAGGAAAA AG ATTGAGAAAG	entry	score
	----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1 93.0
		<a href="#">M00083</a>	MZF1 93.0
		<a href="#">M00109</a>	<b>C/EBPb 90.6</b>
		<a href="#">M00077</a>	GATA-3 86.6
451	AGGGAGGGGA GAGAGAAAGG GGGGAAGCCA CAGTGCTAGG CAGTCCCCT	entry	score
	----->	<a href="#">M00083</a>	MZF1 96.5
		<a href="#">M00083</a>	MZF1 93.0
		<a href="#">M00240</a>	Nkx-2, 90.7
		<a href="#">M00109</a>	<b>C/EBPb 90.6</b>
		<a href="#">M00087</a>	Ik-2 86.4
		<a href="#">M00271</a>	<b>AML-1a 85.4</b>
501	TTACTTTGAG TACTGTGAGG TCACAAACCA CATGATTCTG TCTCTCCAGT	entry	score
	----->	<a href="#">M00271</a>	<b>AML-1a 100.0</b>
		<a href="#">M00101</a>	CdxA 93.6
		<a href="#">M00240</a>	Nkx-2, 90.7
		<a href="#">M00122</a>	USF 89.4
		<a href="#">M00271</a>	<b>AML-1a 88.7</b>
		<a href="#">M00217</a>	USF 88.6
		<a href="#">M00075</a>	GATA-1 87.8
		<a href="#">M00041</a>	CRE-BP 87.5
		<a href="#">M00239</a>	v-Erba 87.4
		<a href="#">M00039</a>	CREB 86.6
		<a href="#">M00087</a>	Ik-2 86.4
		<a href="#">M00123</a>	c-Myc/ 86.4
		<a href="#">M00041</a>	CRE-BP 86.2
		<a href="#">M00119</a>	Max 85.9
		<a href="#">M00101</a>	CdxA 85.7
		<a href="#">M00039</a>	CREB 85.6
551	AATAGTGCCTT GCAAAAATA GGAGTTTAA AGCTTTTGCT TTTTGGATT	entry	score
	----->	<a href="#">M00101</a>	CdxA 93.6
		<a href="#">M00216</a>	<b>TATA 87.8</b>
		<a href="#">M00148</a>	SRY 86.4
		<a href="#">M00101</a>	CdxA 85.7
		<a href="#">M00109</a>	<b>C/EBPb 85.5</b>
601	GTGTGAATG		

**Figura 8: Sitios de unión para factores de transcripción en el promotor P1 de *Runx2*.** A modo de ejemplo, en la imagen se muestra, la búsqueda realizada con TFSsearch en la secuencia del promotor P1 del gen *Runx2* de rata. En amarillo se destaca, sitio de unión para TBP (caja TATA), en azul, los sitios descritos para RUNX y en rojo, los sitios hallados para C/EBPs. Además el buscador señala el porcentaje de identidad (score) de cada sitio encontrado con respecto a la secuencia consenso descrita.

Luego de obtener el alineamiento y determinar los posibles sitios de unión para factores de transcripción en cada una de las especies analizadas, se determinó si los sitios de unión para C/EBPs, RUNX y TBP en el promotor P1 y en la región 5' UTR de este gen, son altamente conservados entre las tres especies analizadas (Figura 9).

Después de obtener estos resultados *in silico*, se optó por realizar ensayos de unión proteína - ADN solo con los sitios de unión I y II para C/EBPs presentes en el promotor P1 (Figura 10). Esto es apoyado por resultados recientes en nuestro laboratorio, en los cuales, mediante co-transfección transiente; de un constructo que abarca 288 pb. desde la zona de inicio de la transcripción del promotor P1 del gen *Runx2* y un constructo de expresión eucarionte para C/EBP $\beta$ , se genera un aumento en la actividad del promotor dependiente de la concentración de C/EBP $\beta$  (Tesis Doctoral, Berta Henríquez).



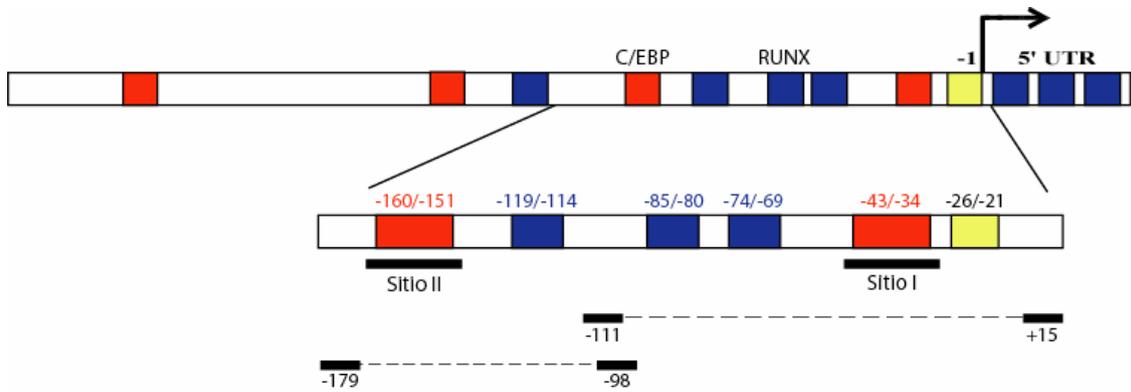
**2.- Generación de oligonucleótidos.** Para los análisis de interacción proteína-ADN que se realizaron mediante ensayos de retardo en gel, se generaron oligonucleótidos específicos para el promotor P1 del gen *Runx2*. Para esto se confeccionaron nueve oligonucleótidos; uno con el sitio de unión consenso para C/EBP $\beta$  (ATTGCGCAAT) (Osada et. al. 1996; Ramji et. al. 2002) (Tabla 3); otros cuatro que contienen solo uno de los sitios de unión para C/EBP $\beta$  (sitio I o II), incluyéndose tanto la versión silvestre como la mutante; también cuatro oligonucleótidos con los que se amplificó dos fragmentos de ADN, correspondientes a segmentos del promotor P1 de *Runx2* II, que incluyen en su región central los sitios de unión tanto para C/EBP $\beta$  como para RUNX2 (Figura 10).

Para la generación del oligonucleótido correspondiente al sitio I y II, se tomaron como molde las secuencias del promotor P1 de rata, ya que las secuencias de unión son conservadas en los promotores (Figura 9). Para la generación de la mutación del sitio I, se mutó el segundo y cuarto nucleótido del sitio de unión silvestre, siendo los cambios efectuados una timina por una guanina y una guanina por una citosina, respectivamente (Tabla 3) (Gutierrez S. et. al. 2002). En el caso de la mutación del sitio II, también se mutaron dos nucleótidos con respecto al sitio silvestre, el octavo y en noveno nucleótido, siendo ambos cambios adenina por citosina (Tabla 3) (Chen J. et. al. 2005).

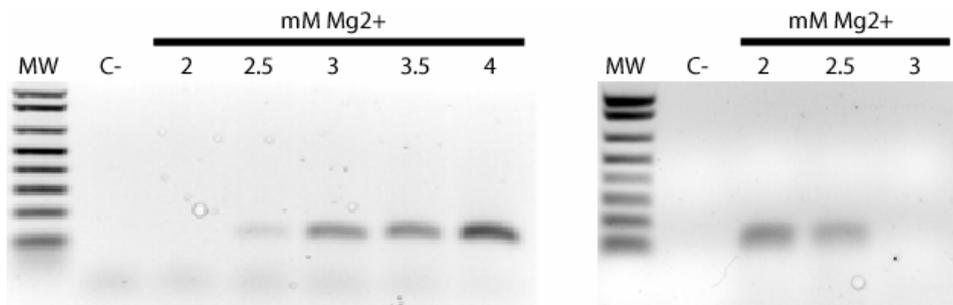
Oligonucleótido	Secuencia Oligonucleótido
Consenso	5` GACCT <b>ATTGCGCAAT</b> TGACC 3`
Sitio I Silvestre	5` CCAGTAATAGTGCT <b>TGCAAAAA</b> ATAGGAG 3`
Sitio I Mutante	5` CCAGTAATAGTG <b>CTC</b> <b>CAAAAA</b> ATAGGAG 3`
-111 Fragmento 126 pb.	5` GGCAGTCCCACTTTACTTTGAG 3`
+15 Fragmento 126 pb.	5` TGAAGCATTACACAATCCAAA 3`
Sitio II Silvestre	5` GAAAAAG <b>ATTGAGAAAG</b> AGGGAGGGGAGAG 3`
Sitio II Mutante	5` GAAAAAG <b>ATTGAGA</b> <b>CCG</b> AGGGAGGGGAGAG 3`
-179 Fragmento 82 pb.	5` GGAGGGGAGAAGGAAAAAGA 3`
-98 Fragmento 82 pb.	5` TAAAGTGGGACTGCCTACCA 3`

**Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados.** (En negrita los sitios de unión a C/EBPs, en rojo se marcan los nucleótidos mutados)

Para generar los fragmentos del promotor P1 se tomo ADN genómico obtenido de la línea celular ROS 17/2.8. La obtención del fragmento del promotor P1 con el sitio I se realizó utilizando la pareja de oligonucleótidos -111/+15, lo que genera un fragmento de ADN de 126 pb. Este fragmento contiene un sitio de unión para C/EBPs y dos sitios de unión para RUNX2 (Figura 10). El fragmento del promotor P1 con el sitio II para C/EBP se genero utilizando el set de oligonucleótidos -179/-98, los cuales amplifican un fragmento de ADN de 82 pb. que contiene un sitio de unión para C/EBPs y otro para RUNX2 (Figura 10). La estandarización de la amplificación de estos fragmentos mediante PCR se llevó a cabo a las temperaturas de 45 y 46.6°C; las condiciones óptimas de concentración de  $Mg^{2+}$  utilizadas en cada amplificación fueron de 4 y 2 mM respectivamente (Figura 11).



**Figura 10: Esquema representativo de los oligonucleótidos generados.** Se detalla la posición de los sitios de unión para C/EBP $\beta$  (rojo), RUNX2 (azul) y TBP (amarillo). Además se señalan las posiciones de los oligonucleótidos confeccionados.



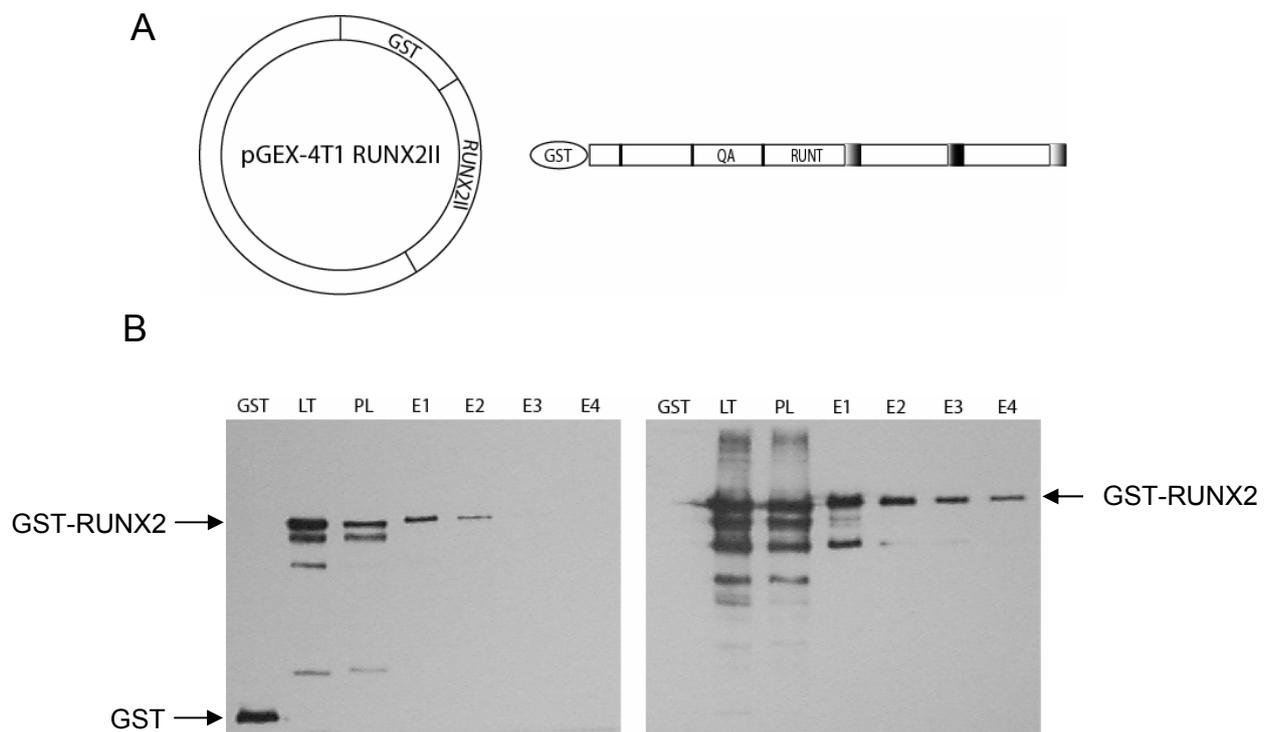
**Figura 11: Estandarización de la obtención de los fragmentos del promotor P1.** En la imagen se observa una fotografía de los geles de agarosa realizados, para visualizar los fragmentos de ADN del promotor P1, obtenidos por PCR. En ambos paneles se observan curvas de concentración de magnesio. En el panel de la izquierda se observa el fragmento de 126 pb. que contiene el sitio I de unión para C/EBPs, en el panel de la derecha se observa el fragmento de 82 pb. que contiene el sitio II de unión para C/EBPs.

### 3.- Purificación de proteínas recombinantes

**3.1.- Purificación de GST-RUNX2 II.** Con el fin de obtener proteína recombinante para los ensayos de interacción proteína-ADN, se realizó la inducción de la expresión y posterior purificación de la proteína GST-RUNX2 II, en bacterias BL-21 competentes transformadas con el vector pGEX4T1-RUNX2 II (Figura 12A). Luego de la inducción con IPTG, la proteína recombinante fue purificada con una columna de afinidad, obteniéndose diferentes eluciones, de las cuales se tomaron alícuotas para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (Tabla 4). A través de esta purificación se obtuvieron 585 ug. de proteína total, los cuales están divididos en cuatro eluciones, que tienen concentraciones de proteína entre 300 y 331 ng/ul. Posteriormente mediante Western blot realizados con anticuerpos dirigidos contra el epítipo GST o la proteína RUNX2, se pudo confirmar la calidad de la proteína recombinante obtenida (Figura 12B).

Elusión	Volumen	Concentración (ng/ul)	Proteína Total (ug)	Concentración (ng/ul) corregida
1	400	407	163	331
2	400	394	158	321
3	400	384	154	313
4	300	368	110	300

**Tabla 4: Concentración de proteína GST-RUNX2 II.**

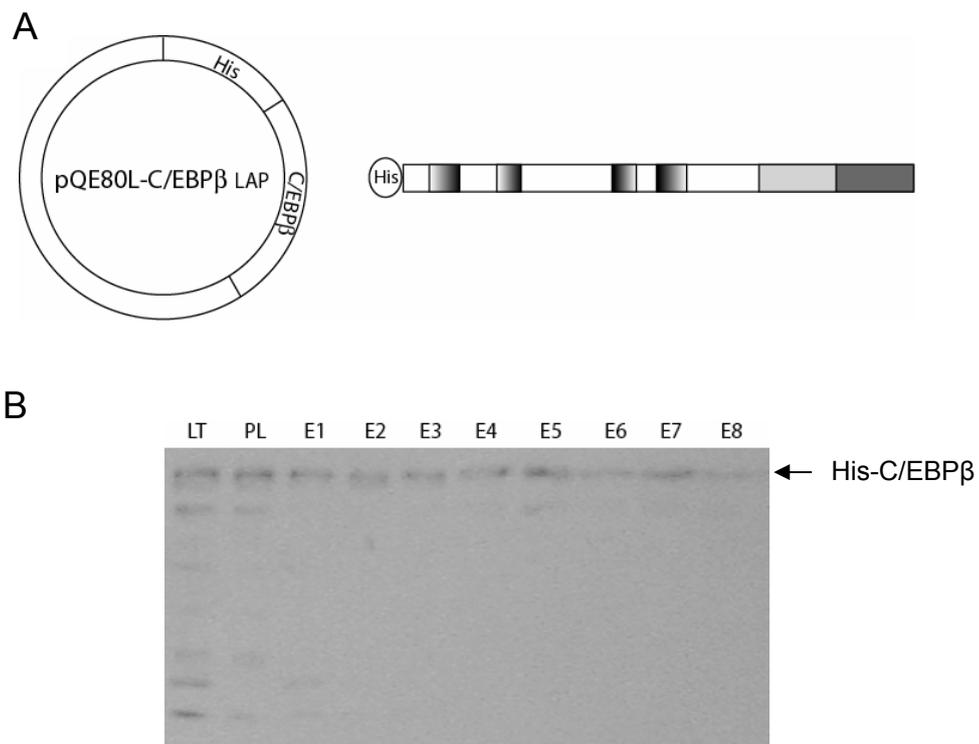


**Figura 12: Purificación de la proteína recombinante GST-RUNX2 II.** A) Representación esquemática del plasmido pGEX4T1-RUNX2 II y de la proteína recombinante GST-RUNX2 II. B) Ensayo de Western blot de la proteína purificada. En el panel de la izquierda se utilizó un anticuerpo específico para GST y en el panel de la derecha se utilizó un anticuerpo que reconoce la región amino terminal de RUNX2. GST, control de GST; LT, lisado total de las bacterias; PL, proteína que no se unió a la resina; E1-4, diferentes eluciones de la purificación de la proteína recombinante.

**3.2.- Purificación de His-C/EBP $\beta$  (LAP).** Con el fin de obtener proteína recombinante para los ensayos de interacción proteína-ADN, se realizó la inducción de la expresión y purificación de la proteína His-C/EBP $\beta$  (LAP), en bacterias BL-21 competentes transformadas con el vector pQE80L-C/EBP $\beta$  LAP (Figura 13A). Luego de la inducción con IPTG, la proteína recombinante fue purificada con una columna de afinidad tomándose alícuotas de las eluciones para determinar la cantidad de proteína por Bradford (Tabla 5). En esta purificación se obtuvieron 730 ug. de proteína total, los cuales están divididos en ocho eluciones que tienen concentraciones de proteína entre 22 y 508 ng/ul. Posteriormente mediante Western blot con un anticuerpo dirigido contra la proteína C/EBP $\beta$  se pudo corroborar la calidad de la proteína recombinante obtenida (Figura 13B).

Elusión	Volumen	Concentración (ng/ul)	Proteína Total (ug)	Concentración (ng/ul) corregida
1	545	299	163	252
2	491	602	296	508
3	760	192	146	162
4	462	72	33	61
5	668	52	35	44
6	560	41	23	35
7	545	37	20	31
8	500	27	14	22

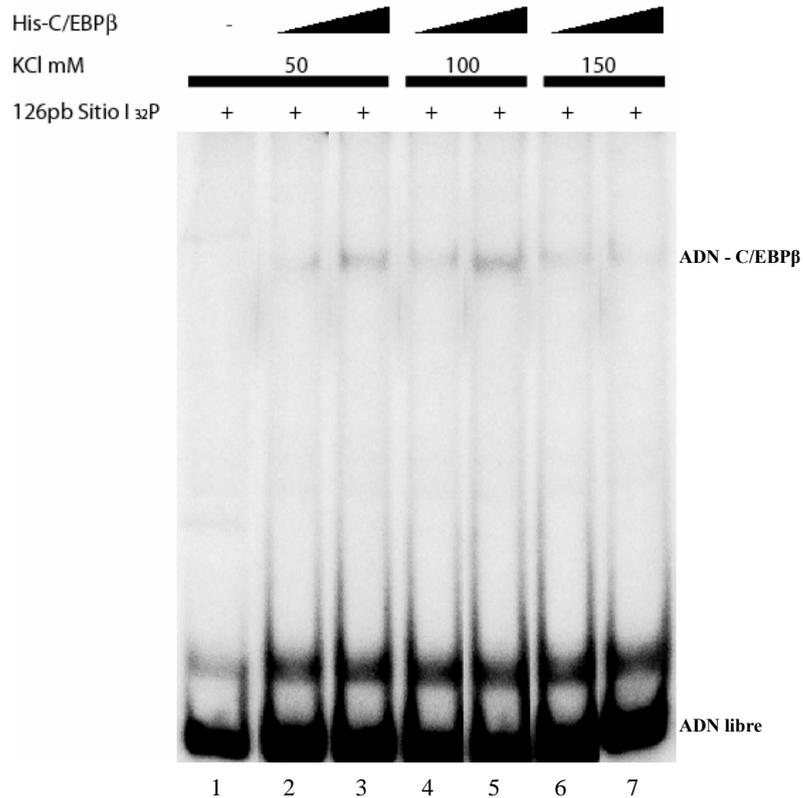
**Tabla 5: Concentración de proteína His-C/EBP $\beta$ .**



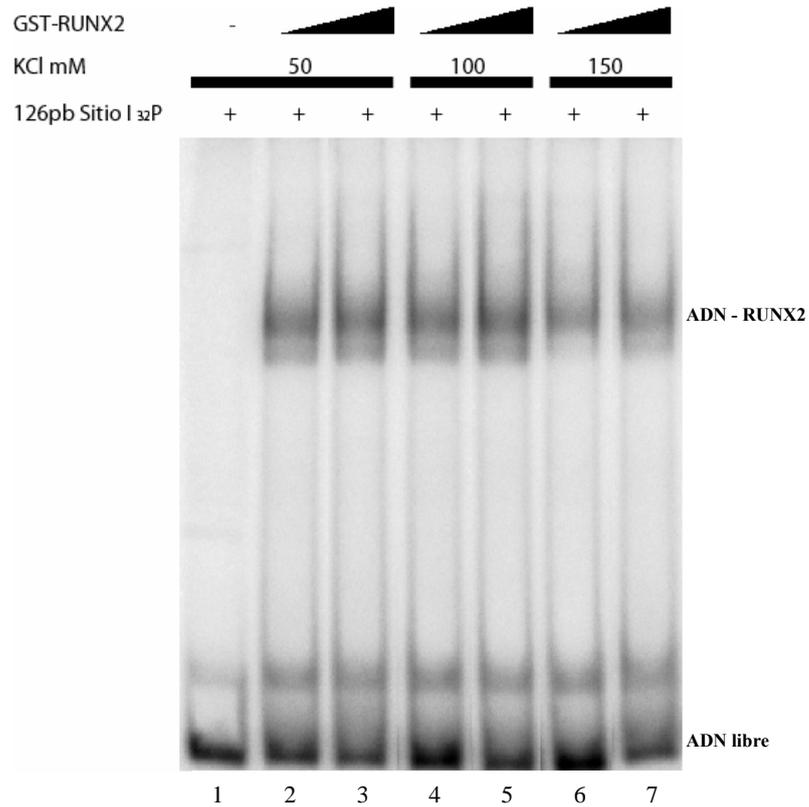
**Figura 13: Purificación de la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$  (LAP).** A) Representación esquemática del plasmido pQE80L-C/EBP $\beta$  LAP y de la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$ . B) Ensayo de Western blot de la proteína purificada utilizando un anticuerpo que reconoce la región carboxi terminal de C/EBP $\beta$ . LT, lisado total de las bacterias; PL, proteína que no se unió a la resina; E1-8, diferentes eluciones de la purificación de la proteína recombinante.

**4.- Estandarización de los ensayos de retardo en gel (EMSA).** Para la estandarización de este tipo de ensayos, se utilizó un fragmento de 126 pb. que contiene el sitio I de unión para C/EBPs, amplificado con los partidores -111/+15 y marcado radiactivamente con P<sup>32</sup> α-CTP.

Se determinó la cantidad óptima de proteína y la concentración salina a utilizar en los ensayos de retardo en gel (EMSA). La cantidad óptima de His-C/EBPβ (Figura 14) se definió utilizando cantidades de 25 y 50 ng de la proteína purificada y diferentes concentraciones salinas (50, 100 y 150 mM de KCl para cada cantidad de proteína analizada). También se determinó las condiciones óptimas para GST-RUNX2 (Figura 15). En ambos casos las condiciones definidas para un retardo más nítido fueron, una cantidad de proteína recombinante de 50 ng y una concentración de KCl de 100 mM. En ambos casos se utilizó buffer de unión Tris-Cl pH 7,4.



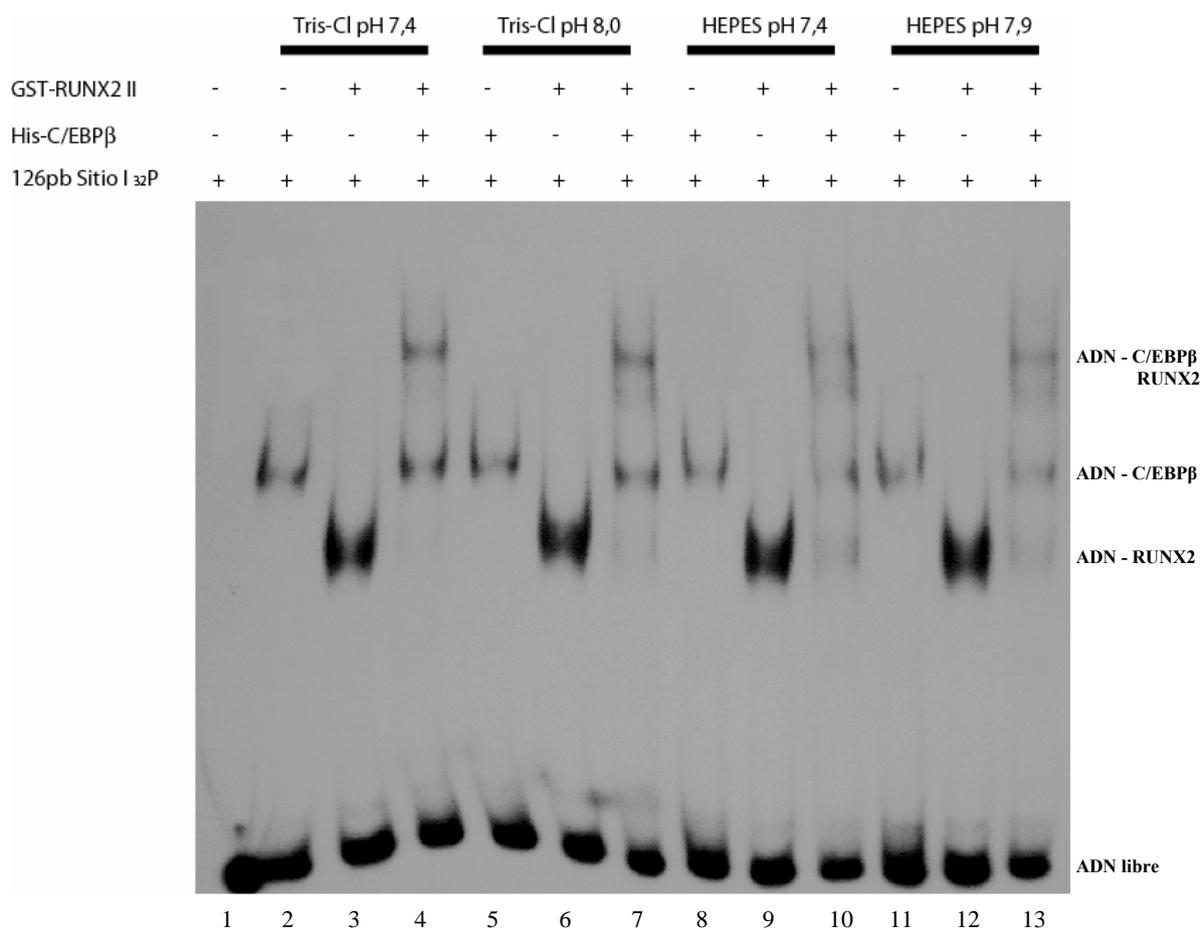
**Figura 14: Estandarización de la concentración salina y de proteína His-C/EBP $\beta$  a utilizar en los ensayos de retardo en gel.** En la imagen se muestra una foto de la exposición autoradiográfica del retardo en gel obtenido en las pruebas de concentración, tanto de KCl y proteína. Para este ensayo se utilizó un fragmento de 126 pb, que contiene el sitio I de unión para C/EBPs y dos sitios de unión para RUNX. Las concentraciones de KCl utilizadas fueron: 50, 100 y 150 mM; las concentraciones de proteína utilizadas fueron: 25 y 50 ng/ul, en orden creciente. En el primer carril se ve el ADN marcado sin proteína; en los carriles 2, 4 y 6, se utilizó concentración de KCl creciente y 25 ng/ul de proteína recombinante; los carriles 3, 5 y 7, concentración de KCl creciente y 50 ng/ul de proteína recombinante. En el costado derecho de la imagen, se señala el retardo obtenido para este ensayo.



**Figura 15: Estandarización de la concentración salina y de proteína GST-RUNX2 a utilizar en los ensayos de retardo en gel.** En la imagen se muestra una foto de la exposición autoradiográfica del retardo en gel obtenido en las pruebas de concentración, tanto de KCl y proteína. Para este ensayo se utilizó un fragmento de 126 pb, que contiene el sitio I de unión para C/EBPs y dos sitios de unión para RUNX. Las concentraciones de KCl utilizadas fueron: 50, 100 y 150 mM; las concentraciones de proteína utilizadas fueron: 25 y 50 ng/ul, en orden creciente. En el primer carril se ve el ADN marcado sin proteína; en los carriles 2, 4 y 6, se utilizó concentración de KCl creciente y 25 ng/ul de proteína recombinante; los carriles 3, 5 y 7, concentración de KCl creciente y 50 ng/ul de proteína recombinante. En un costado derecho de la imagen, se señala el retardo obtenido para este ensayo.

Luego, una vez que se tenían las cantidades de proteína recombinante y la concentración de KCl óptimas para el ensayo de retardo en gel, se procedió con la estandarización del buffer de unión proteína-ADN (Figura 16). Para esto se utilizaron cuatro buffers, los cuales fueron: Tris-Cl pH 7,4; Tris-Cl pH 8,0; HEPES pH 7,4 y HEPES pH 7,9. Con cada uno de estos buffers se realizaron ensayos de retardo en gel con las proteínas recombinantes individualmente o en combinación, utilizando cantidades equimolares de cada proteína y produciéndose la unión de ambas a un fragmento de ADN que posee los dos sitios de unión. El orden utilizado para mostrar los resultados de los ensayos de retardo en gel con diferentes buffers, fue siempre el mismo. Primero se muestra el ensayo con His-C/EBP $\beta$  solo, después el ensayo con GST-RUNX2 solo y para terminar, el ensayo con ambas proteínas. La unión de ambos factores se observa como un mayor retardo en el gel. De estos ensayos se pudo concluir que con el buffer Tris-Cl pH 8,0 se genera un retardo evidente.

Las condiciones obtenidas mediante esta estandarización, son las que posteriormente se utilizaron en todos los análisis de este tipo durante el trabajo de tesis.



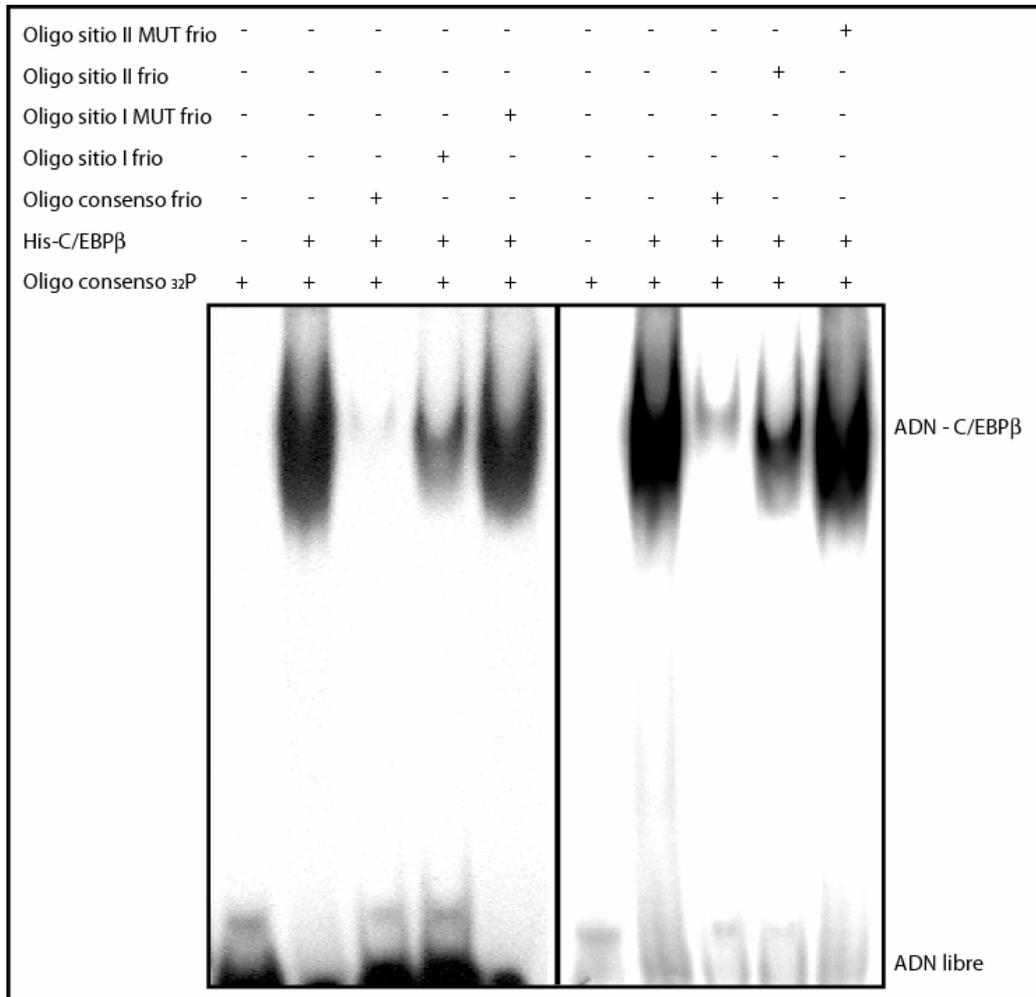
**Figura 16: Estandarización del buffer de unión a utilizar en los ensayos de retardo en gel.**

En la imagen se muestra una foto de la exposición autoradiográfica del retardo en gel obtenido en las pruebas de buffer de unión. Para este ensayo se utilizó el fragmento de 126 pb, que contiene el sitio I de unión para C/EBPs y dos sitios de unión para RUNX. La concentración de KCl utilizada fue de 100 mM y la cantidad de proteína fue de 50 ng/ul. Los buffer de unión analizados fueron según la aparición en la imagen; Tris-Cl pH 7.4, Tris-Cl pH 8.0, HEPES pH 7.4 y HEPES pH 7.9. En el primer carril se ve el ADN marcado sin proteína; en los carriles 2, 5, 8 y 11, se utilizó 50 ng de proteína recombinante His-C/EBPβ; en los carriles 3, 6, 9 y 12, se utilizó 50 ng de proteína recombinante GST-RUNX2; en los carriles 4, 7, 10 y 13, se realizó el ensayo en combinación con 50 ng de cada una de las proteínas recombinantes. En el costado derecho de la imagen, se señalan los retardos obtenidos para este ensayo.

## 5.- Unión de la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$ a su secuencia consenso.

Primero se confirmó que la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$  era capaz de unirse a su secuencia consenso y se verificó la afinidad de esta proteína recombinante por el sitio consenso. Brevemente, un oligonucleótido de doble hebra, uno de ellos marcado radiactivamente con P<sup>32</sup>  $\gamma$ -ATP, con la secuencia consenso de unión a C/EBP $\beta$ , fue incubada con este factor. Además se realizaron ensayos de competencia con oligonucleótidos fríos en una razón 100 veces mayor con respecto al oligonucleótido marcado, correspondientes a la secuencia consenso de unión para C/EBP $\beta$ , al sitio de unión I y II, tanto silvestre como mutante para estos sitios en el promotor P1 de *Runx2* (Figura 17).

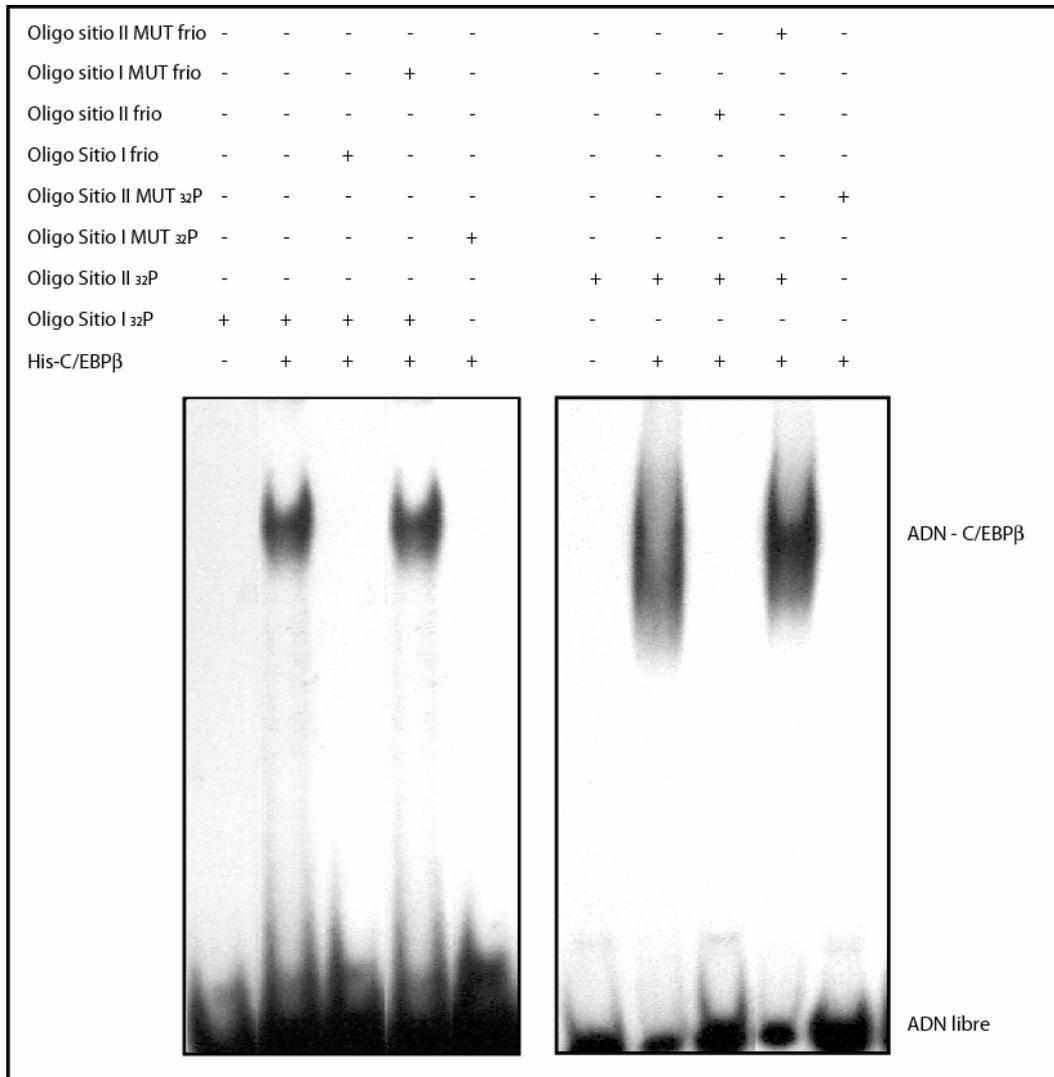
Mediante este retardo en gel, se logró demostrar la unión de la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$  al sitio de unión consenso para C/EBP $\beta$  (ATTGCGCAAT) y como era esperable, con una alta afinidad. Además mediante las competencias realizadas, se confirmó que tanto el sitio I como el sitio II presentan una menor afinidad por la proteína C/EBP $\beta$  recombinante, que la mostrada por la secuencia consenso. Esto debido a que aunque los oligonucleótidos que poseen los sitios I y II están en una razón 100 mayor a la del consenso, no son capaces de desplazar completamente la unión de His-C/EBP $\beta$  desde el oligonucleótido consenso. Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido mediante el análisis *in silico* (Figura 8). En el caso de los ensayos de competencia realizados con los oligonucleótidos que poseen los sitios de unión putativos a C/EBP mutantes, se observó que la unión al oligonucleótido consenso no es competida por los mutantes, ya que la intensidad del retardo en gel no disminuye en presencia de un exceso de estos oligonucleótidos mutantes (Figura 17).



**Figura 17: La proteína recombinante His-C/EBP $\beta$  se une a la secuencia consenso de C/EBPs.** Imagen de la exposición autoradiográfica del gel de retardo. En este se observa la unión de His-C/EBP $\beta$  al oligonucleótido que posee la secuencia consenso para estos factores de transcripción. Además se realizaron ensayos de competencia con el oligonucleótido consenso frío, el oligonucleótido con el sitio I silvestre y mutado (panel izquierdo), así como con el consenso frío, el oligonucleótido con el sitio II silvestre y mutado (panel derecho). Las competencias se realizaron con un exceso de oligonucleótido frío (100 veces) con respecto al oligonucleótido consenso marcado. En el costado derecho de la imagen se muestran los retardos obtenidos.

**6.- Unión de la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$  a los sitios de unión descritos en el análisis *in silico* del promotor P1.** Para verificar si los sitios de unión para C/EBP $\beta$  presentes en el promotor P1, son funcionales. Se realizó ensayos de retardo en gel, utilizando oligonucleótidos marcados que incluyeran los sitios I y II descritos. Además, para cada sitio se realizaron competencias adicionando un exceso de los oligonucleótidos correspondientes fríos, tanto en sus versiones silvestres y mutados (Figura 18).

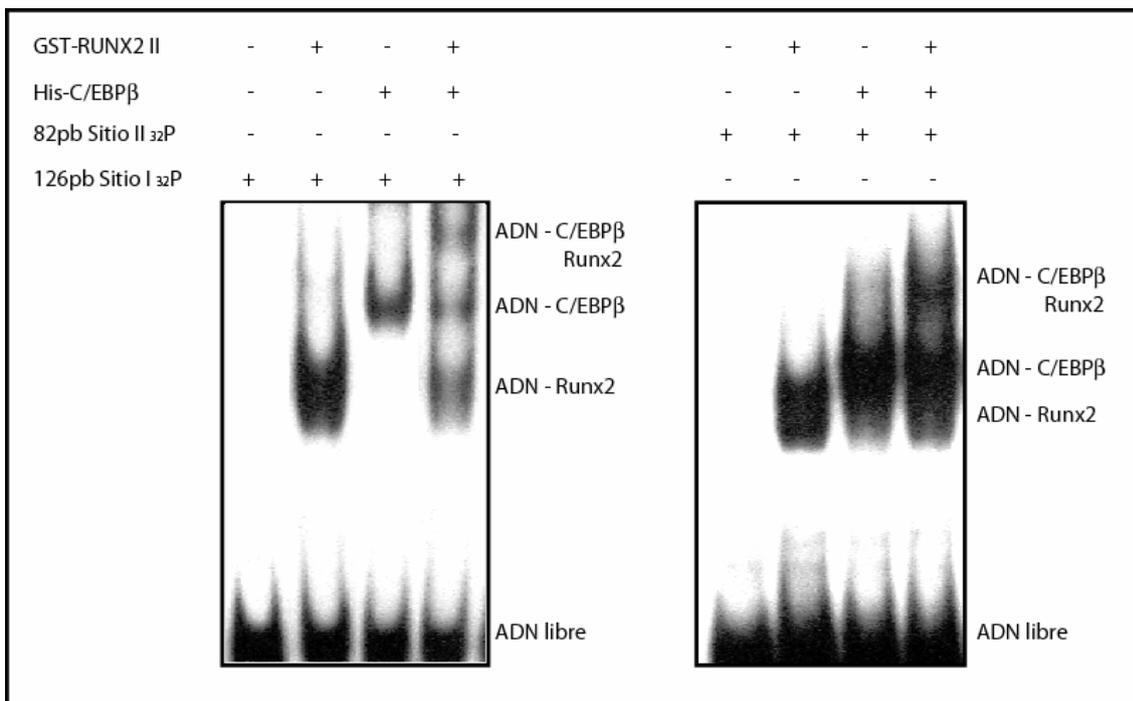
Mediante estos ensayos, se demostró que la proteína recombinante His-C/EBP $\beta$  se unía a las secuencias nucleotídicas de los sitios de unión analizados del promotor P1. Tanto para el sitio I como para el sitio II se obtuvo un retardo en el gel asociado a la unión de la proteína recombinante utilizada en este ensayo, observándose en ambos casos una afinidad de unión equivalente. En el caso de los ensayos de retardo realizados con los sitios de unión I y II mutados, no se observó retardo, que indica que estas mutaciones estarían impidiendo la asociación entre la proteína C/EBP $\beta$  y la secuencia nucleotídica de ambos sitios. Luego, por medio de las competencias, en ambos casos se observó que se producía la desaparición del retardo, cuando se competía con un exceso de la secuencia fría, indicando la especificidad de la interacción C/EBP $\beta$ -ADN cuando cualquiera de los dos sitios (I o II) fue evaluado. Por el contrario, cuando la sonda fría en exceso incluía al sitio mutado, no se apreció competencia, demostrando que es este elemento el reconocido por el factor C/EBP $\beta$  en el ensayo (Figura 18).



**Figura 18: La proteína recombinante His-C/EBPβ se une a los sitios de unión presentes en el promotor P1.** Imagen de la exposición autoradiográfica del gel de retardo. En éste se observa el ensayo de interacción entre His-C/EBPβ y los oligonucleótidos que poseen la secuencia de unión, tanto silvestre como mutante. En el panel izquierdo los ensayos realizados para el sitio de unión I y en el panel derecho, para el sitio II. Además, se realizaron ensayos de competencia con los oligonucleótidos no marcados, ya sea silvestre o mutante, para cada sitio, en una razón 100 veces mayor a la del oligonucleótido marcado. En el costado derecho de la imagen se muestran los retardos obtenidos.

**7.- Ensayos de unión a fragmentos de ADN que poseen los sitios hallados *in silico* para C/EBPs y los sitios descritos para RUNX en el promotor P1.** Para verificar si las proteínas recombinantes GST-RUNX2 y His-C/EBP $\beta$  reconocen sus sitios respectivos de forma simultánea en un segmento del promotor P1 del gen *Runx2*. Se generó, mediante PCR, dos fragmentos del promotor marcados con P<sup>32</sup>. Uno de éstos posee en la región central, un sitio de unión para C/EBP y otro sitio de unión para RUNX muy cercano. En el caso del fragmento que contenía el sitio I para C/EBP $\beta$ , también incluía dos sitios de unión para RUNX cercanos. Luego de la obtención de los fragmentos, se los incubó con GST-RUNX2 y His-C/EBP $\beta$  por si solos o en combinación y se visualizó la interacción por EMSA (Figura 19).

El análisis de los datos demuestra la unión independiente de cada una de las proteínas recombinantes, tanto al fragmento que contenía el sitio I, como al sitio II. En los ensayos de unión con ambas proteínas se observó que son capaces de unirse simultáneamente al mismo segmento del promotor P1, ya que, se aprecia un retardo mayor con respecto a los retardos producidos en los análisis con las proteínas recombinantes por si solas (Figura 19).



**Figura 19:** Las proteínas recombinantes His-C/EBP $\beta$  y GST-RUNX2 II se unen simultáneamente a segmentos del promotor P1 de *Runx2*. Imagen de la exposición autoradiográfica del gel de retardo. Mediante PCR se generaron fragmentos del promotor P1 que incluyen el sitio de unión I (panel izquierdo) y el sitio de unión II para C/EBPs (panel derecho). Además ambos fragmentos poseen sitios de unión para RUNX2. La unión de ambas proteínas se observa como un retardo mayor para ambos segmentos. En el costado derecho de la imagen se indican los retardos obtenidos, ya sea para los ensayos simples o dobles.

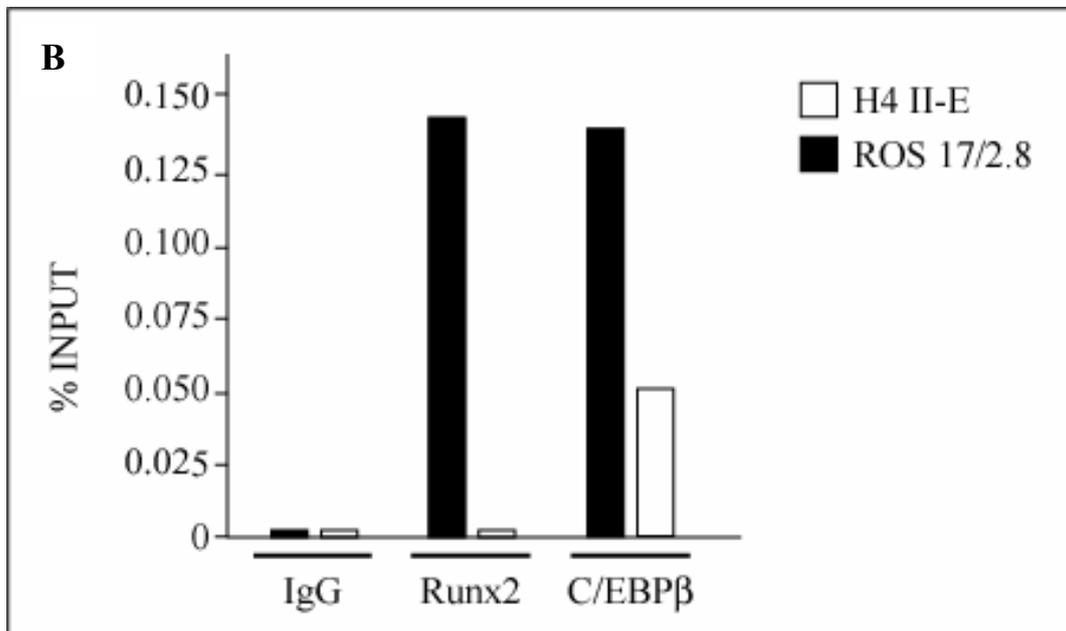
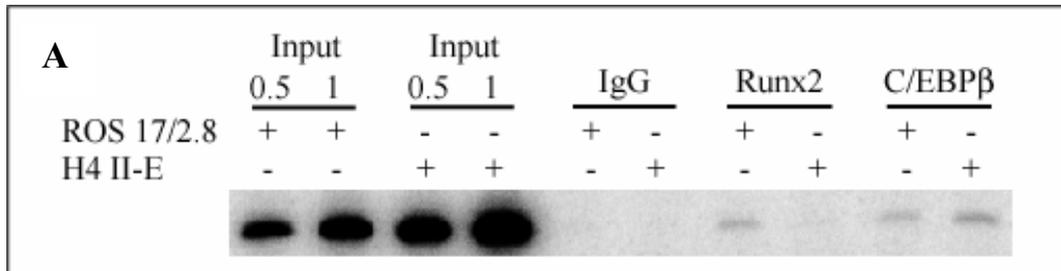
**8.- Ensayos de unión ADN-proteína *in vivo*, mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).** Nuestros resultados demuestran que los sitios I y II son capaces de unir *in vitro* His-CE/BP $\beta$  y GST-RUNX2 (Figura 18 y 19). Por ello, a continuación se evaluó la unión de ambos factores de transcripción al promotor P1, en una línea celular de carácter osteoblástico que expresa el gen *Runx2* (ROS 17/2.8) y otra de carácter no osteoblástico que no lo expresa (H4-II-E).

Mediante ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina en células H4 II-E, se encontró que el factor de transcripción RUNX2 no se une a la secuencia del promotor P1 proximal, lo que se correlaciona con la ausencia de expresión de RUNX2 en esta línea celular. En cambio en células ROS 17/2.8, RUNX2 se une a la secuencia estudiada del promotor P1 proximal, en concordancia con los altos niveles de expresión del gen *Runx2* en esta línea celular (Figura 20 A y B).

Al evaluar la interacción del factor C/EBP $\beta$ , se encontró que este se une al promotor P1 proximal del gen *Runx2*, tanto en células osteoblásticas como no osteoblásticas (Figura 20 A). Además se encontró que este factor de transcripción se une en menor porcentaje al promotor P1 proximal en células H4 II-E (no osteoblásticas), que al promotor P1 proximal de células ROS 17/2.8 (Figura 20 B). Este resultado sugiere la participación del factor C/EBP $\beta$  en la activación del gen *Runx2* en células osteoblásticas.

Como control negativo de inmunoprecipitación, se utilizó una fracción de IgG purificada de conejo inespecífica.

En su conjunto, estos resultados sugieren que el fenotipo osteoblástico estaría asociado a una mayor unión de factores de transcripción regulatorios al promotor P1 proximal del gen *Runx2* II.



**Figura 20: Análisis por Inmunoprecipitación de Cromatina de los factores de transcripción RUNX2 y C/EBP $\beta$  en el promotor P1 del gen *Runx2* de rata.** Extractos de cromatina de células ROS 17/2.8 y H4 II-E fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo específico para las proteínas antes señaladas y analizados por PCR con partidores específicos. A) Autoradiografías de los geles obtenidos para el promotor P1 proximal de *Runx2* II. Se utilizó un Input 0,5% para la cuantificación. Se señalan los anticuerpos utilizados en la parte superior de la figura. B) Gráfico resumen de la cuantificación por fosforimager de las señales obtenidas en el gel. La gráfica representa la cuantificación relativa de 2 experimentos de inmunoprecipitación independientes y la técnica de PCR radiactivo realizada por duplicado en cada ensayo.

## DISCUSION

En este trabajo de tesis nos centramos en detectar y comprobar sitios de unión para el factor de transcripción C/EBP en el promotor P1 del gen *Runx2*, tanto *in vitro* como *in vivo*, esto mediante ensayos de retardo en gel e inmunoprecipitación de cromatina, respectivamente. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que los 288 pb. más proximales al sitio de inicio de transcripción del promotor P1 del gen RUNX2, son activados transcripcionalmente por la sobreexpresión de C/EBP $\beta$  (Tesis Doctoral, Berta Henríquez), sugiriendo que el promotor P1 puede ser regulado por este factor.

Existe evidencia que sugiere que la regulación osteoblástica en células mesenquimales de médula ósea es controlada por hormonas, factores de crecimiento y citoquinas a través de factores de transcripción específicos. Uno de estos factores de transcripción sería RUNX2, el cual es esencial en la formación ósea (Yamaguchi et. al. 2000). Esto se confirmó en embriones de ratones deficientes de RUNX2, los cuales exhiben pérdida completa de la formación ósea, lo que se mantiene hasta el nacimiento, donde mueren sin poder respirar. Además células aisladas de la calvaria de estos embriones, muestran una pérdida de expresión de osteocalcina en comparación con un cultivo control realizado. Esto apoya lo anterior, con respecto a que RUNX2 es esencial en la osteogénesis, especialmente en el desarrollo de los osteoblastos, donde es el encargado de regular diferentes genes, tales como osteocalcina, osteopontina, entre otros (Komori et. al. 1997). La proteína RUNX2 está presente en células progenitoras óseas, osteoblastos inmaduros y condrocitos hipertróficos (Takeda et. al. 2001; Komori et. al. 1998; Banerjee et. al. 1996).

Por otra parte se ha visto que el factor de transcripción C/EBP $\beta$  ayuda en la expresión de genes específicos de los osteoblastos y es importante durante la regulación osteoblástica. Esto se sustenta en experimentos de actividad del promotor del gen de osteocalcina en respuesta a una expresión forzada de los miembros de la familia C/EBPs (Gutiérrez S. et. al. 2002).

La actividad de las proteínas RUNX y la activación transcripcional de los genes regulados por éstas durante el desarrollo óseo, puede ser regulado en parte por el control de los niveles celulares de las proteínas RUNX y C/EBP, o por una cooperación funcional entre estos dos factores de transcripción (Gutiérrez S. et. al. 2002; McCarthy et. al. 2000). RUNX2 y C/EBP $\beta$  o  $\delta$ , pueden cooperar funcionalmente para producir la regulación positiva del gen de osteocalcina, esto a través de un sinergismo mediado por la interacción física entre RUNX2 y C/EBP $\beta$  en el elemento de unión para C/EBP en el promotor de osteocalcina (Hata et. al. 2005; Gutiérrez S. et. al. 2002). En este sentido *Runx2* es considerado un gen maestro en la regulación del proceso de osteogénesis (Komori et. al. 1997), modulando, en conjunto con C/EBP $\beta$  y otras proteínas la expresión del gen de osteocalcina (Gutiérrez S. et. al. 2002; Javed et. al. 1999).

Mediante análisis *in silico* de los 600 pb. corriente arriba del inicio de transcripción del promotor P1 del gen *Runx2*, detectamos sitios de unión putativos para la familia de factores C/EBPs, que se encuentran cercanos a sitios de unión descritos para RUNX2, los cuales son necesarios para modular la actividad y autorregular la expresión del gen de *Runx2* (Drissi et. al. 2000). Esto nos llevó a considerar la situación descrita en el promotor de osteocalcina, el cual es regulado por ambos factores de transcripción (C/EBP $\beta$  y RUNX2) (Hata et. al. 2005; Gutiérrez S. et. al. 2002; Javed et. al. 1999).

Por esto es que estudiamos la capacidad de estos sitios para unir el factor de transcripción C/EBP $\beta$ . Nuestros resultados sugieren que los dos sitios de unión para C/EBP analizados mediante los ensayos de retardo en gel serían funcionales *in vitro*, dado que ambos estarían uniendo C/EBP $\beta$  con afinidad semejante. Esto también se confirmó mediante ensayos de competencia entre la secuencia consenso de unión para C/EBP $\beta$  descrita previamente (Osada et. al. 1996) y los oligonucleótidos fríos correspondientes a cada sitio de unión estudiado (I y II). Con la intención de corroborar lo anterior, se determinó que mutaciones realizadas a estos dos sitios (Gutiérrez S. et. al. 2002; Chen J. et. al. 2005), impiden la unión de C/EBP $\beta$  al promotor P1 proximal. En ese mismo sentido el oligonucleótido mutante frío no es capaz de competir por la interacción entre C/EBP $\beta$  y su sitio de unión silvestre, demostrando que éste es el elemento reconocido por este factor. Además, se pudo observar que C/EBP $\beta$  y RUNX2 pueden unirse simultáneamente a un mismo segmento del promotor P1, lo que se puede asemejar a lo descrito en el gen de osteocalcina, donde se observa sinergismo cuando ambos factores interactúan en el contexto del promotor de este gen (Hata et. al. 2005; Gutiérrez S. et. al. 2002).

Los ensayos realizados *in vivo*, demuestran que tanto RUNX2 como C/EBP $\beta$  son capaces de unirse al promotor P1 del gen *Runx2*, lo cual difiere según sea el contexto celular en el que este gen se encuentre, ya que la unión de estos factores puede estar controlada por diferentes mecanismos, sean estos epigenéticos o que involucren remodelación de cromatina. Por ejemplo, la activación transcripcional del gen de osteocalcina es acompañada por remodelación de la cromatina en la región promotora, reflejado por la presencia de dos sitios hipersensibles a DNasa I (Montecino et. al. 1996). Los sitios de unión para RUNX2 en el promotor de osteocalcina son necesarios para que se produzca la remodelación cromatínica, sin embargo la remodelación nucleosomal también permite exponer mejor los sitios de unión a dicho factor (Gutiérrez et. al. 2000). Esto demuestra que Runx2, además de

ser un activador transcripcional, puede facilitar la modificación y organización cromatínica (Villagra et. al. 2002; Javed et. al. 1999). También, se ha propuesto que la unión de RUNX2 y C/EBP $\beta$  al promotor del gen de osteocalcina, sería un evento temprano durante los procesos de remodelación de la cromatina y la activación transcripcional de éste gen (Villagra et. al. 2006).

Es conocido que RUNX interactúa con proteínas co-reguladoras con actividad HAT (acetiltransferasas de histonas) o con actividad HDAC (deacetilasas de histonas) (Kitabayashi et. al. 1998; Lutterbach et. al. 1998). A su vez C/EBP $\beta$  se ha asociado con el reclutamiento de complejos que modifican la cromatina y regulan la transcripción de genes mieloides (Kowenz-Leutz et. al. 1999). En este mismo sentido, en el promotor P1 de *Runx2* se detectaron dos sitios hipersensibles a DNasa I, los cuales en las etapas tempranas de la diferenciación osteoblástica son débiles, correlacionándose con una baja expresión de este factor de transcripción y con un estado basal de acetilación de histonas. En células que adquieren un compromiso osteoblástico, se observa un aumento en la intensidad de la hipersensibilidad a DNasa I en el promotor P1, lo que se asocia a un incremento en la acetilación de histonas en esta región, a una mayor unión al promotor de factores de transcripción regulatorios y a una mayor expresión de RUNX2 (Tesis Doctoral, Fernando Cruzat).

En células de origen osteoblástico *ROS 17/2.8* (osteosarcoma), que expresan RUNX2, se observa que los dos factores de transcripción (C/EBP $\beta$  y RUNX2) analizados en este trabajo de tesis se unen al promotor P1 proximal del gen *Runx2*. A pesar de que se ha observado que C/EBP $\beta$  coopera con RUNX2 promoviendo la osteogénesis, en ratones nulos para el factor C/EBP $\beta$  no se reportó un fenotipo óseo. Esto podría deberse a que existe la posibilidad de redundancia funcional con otros integrantes de esta familia de factores de transcripción (Nerlov. 2007).

En el caso de células no osteoblásticas *H4-IIE* (hepatoma) que no expresan RUNX2, no se detecta unión del factor de transcripción Runx2 al promotor P1 proximal. Por el contrario, el factor de transcripción C/EBP $\beta$  se estaría uniendo al promotor P1 proximal tanto en la línea celular hepática como en las células de origen osteoblástico. Esta unión de C/EBP $\beta$  también se observó previamente en células bipotenciales C2C12 no tratadas con BMP-2 (Tesis Doctoral, Fernando Cruzat), las que solo expresan RUNX2 a niveles muy bajos. Resultados previos demuestran que C/EBP $\beta$  contribuye a la expresión de fosfatasa alcalina y de otros marcadores osteogénicos como osteocalcina y colágeno tipo IA. Además, ensayos realizados con una mutante de C/EBP $\beta$ , la cual no posee el dominio de unión al ADN pero si mantiene la capacidad de interactuar con RUNX2, permitiendo concluir que esta mutante inhibe la acción osteogénica de RUNX2 (Hata et. al. 2005). También, ensayos realizados con un mutante dominante negativo de RUNX2 en células mesenquimales deficientes para este factor de transcripción, indican que C/EBP $\beta$  por sí solo podría promover diferenciación osteoblástica, sugiriendo que este factor puede estar regulando el desarrollo óseo por mecanismos dependientes e independientes de Runx2 (Hata et. al. 2005). Otros resultados descritos anteriormente en el promotor de colágeno tipo IA (Col1A), demuestran que la isoforma truncada de C/EBP $\beta$  (LIP) es capaz de reprimir la expresión de dicho gen, provocando pérdida de masa ósea (Harrison et. al. 2005). Además se ha visto que LIP puede actuar como un dominante negativo de C/EBP $\beta$  bloqueando la adipogénesis. Es por esto que se ha postulado a C/EBP $\beta$  como un factor de transcripción clave en la definición del balance entre adipogénesis y osteogénesis *in vivo* (Hata et. al. 2005; Harrison et. al. 2005). En otros estudios se observó que LIP es capaz de potenciar la actividad transcripcional de Runx2 en la osteogénesis, aunque en células deficientes de RUNX2, no es capaz de promover la diferenciación osteoblástica (Hata et. al. 2005). Esto podría explicar el hecho que, aunque C/EBP $\beta$  se este uniendo al promotor P1 del gen *Runx2*, no sea suficiente para producir la activación de este gen, proceso que podría requerir la

presencia de RUNX2. Una interpretación alternativa es que este resultado se debiera a la presencia de la isoforma LIP, lo que podría estarse traduciendo en represión producto ya sea por la falta de los dominios activadores de las isoformas largas de C/EBP $\beta$  (LAP o LAP\*) o porque el dominio de transactivación que mantiene esta isoforma corta de C/EBP $\beta$ , pueda aún reclutar otros complejos regulatorios incapaces de activar la transcripción (Ramji et. al. 2002; Kowenz-Leutz et. al. 1999).

En conclusión, nuestros resultados obtenidos mediante ensayos dirigidos a los sitios de unión para el factor de transcripción C/EBP $\beta$  en el promotor P1 del gen RUNX2, tanto *in vitro* como *in vivo*, indican que este factor se uniría a estos elementos. Además C/EBP $\beta$  en conjunto con RUNX2, se estarían comportando como reguladores positivos de la actividad transcripcional del promotor P1 en células osteoblásticas. En su conjunto estos resultados permiten postular al factor C/EBP $\beta$  como un factor clave dentro del mecanismo general de regulación de la expresión de RUNX2 y por lo tanto como un componente esencial en el proceso de diferenciación osteoblástica.

## REFERENCIAS

Banerjee, C., S. W. Hiebert, et al. (1996). An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4968-73.

Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. (2001). Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology*. 142:4026–4039.

Benedict WF, et al. (1973). Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mammalian cell culture--IV. Stimulation of the enzyme activity in established cell lines derived from rat or mouse hepatoma and from normal rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 22: 2766-2769.

Cao Z., Umek R. and McKnight S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Dev.* 5: 1538-1552.

Chen D., Zhao M. and Mundy G. (2004). Bone morphogenetics Proteins. *Growth Factors*. 22: 233-241.

Chen J., Zhao M., Rao R., Inoue H. and Hao C.M. (2005). C/EBP $\beta$  and its binding element are required for NF $\kappa$ B-induced COX2 expression following hypertonic stress. *J. Biol. Chem.* 280: 16354-16359.

Day T. F., Guo X., Garrett-Beal L. and Yang Y. (2005). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Developmental Cell*, 8: 739–750.

Drissi H, Luc Q, Shakoory R, Chuva De Sousa Lopes S, Choi JY, Terry A, Hu M, Jones S, Neil JC, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Stein GS. (2000). Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J Cell Physiol* 184:341–350.

Drissi, H., Pouliot, A., Stein, J., van Wijnen, A., Stein, G., and Lian, J. (2002a). Identification of novel protein/DNA interactions within the promoter of Bone-related transcription factor Runx2/Cbfa1. *J. Cell Biochem.* 86:403-412.

Drissi H, Pouliot A, Koolloos C, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ. (2002b) 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Exp Cell Res*, 274:323–333.

Gaur T., Lengner C., Hovhannisyan H., Bhat R., Bodine P., Komm B., Javed A., van Wijnen A., Stein J., Stein G., and Lian L. (2005). Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 280: 33132–33140.

Gutiérrez J, Sierra J, Medina R, Puchi M, Imschenetzky M, van Wijnen A, Lian J, Stein G, Stein J, and Montecino M. (2000). Interaction of CBFR/AML/PEBP2R Transcription Factors with Nucleosomes Containing Promoter Sequences Requires Flexibility in the Translational Positioning of the Histone Octamer and Exposure of the CBFR Site. *Biochemistry.* 39: 13565-13574.

Gutierrez S., Javed A., Tennant D., van Rees M., Montecino M., Stein G., Stein J., Lian J. (2002) CCAAT/Enhancer-binding proteins (C/EBP)  $\beta$  and  $\delta$  activate osteocalcin gene transcription and synergize with Runx2 at the C/EBP element to regulate bone-specific expression. *J. Biol. Chem.* 277: 1316 –1323.

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: 6972-6978.

Harrison JR, Huang YF, Wilson KA, Kelly PL, Adams DJ, Gronowicz GA, Clark SH. (2005). Col1a1 promoter-targeted expression of p20 CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta), a truncated C/EBPbeta isoform, causes osteopenia in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 280: 8117-8124.

Hata K, Nishimura R, Ueda M, Ikeda F, Matsubara T, Ichida F, Hisada K, Nokubi T, Yamaguchi A, Yoneda T. (2005). A CCAAT/enhancer binding protein beta isoform, liver-enriched inhibitory protein, regulates commitment of osteoblasts and adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1971-1979.

Hill T., Später D., Taketo M., Birchmeier W. and Hartmann C. (2005). Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Prevents Osteoblasts from Differentiating into Chondrocytes. *Developmental Cell*. 8: 727–738.

Huang, G., K. Shigesada, et al. (2001). Dimerization with PEBP2 $\beta$  protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Embo J* 20(4): 723-733.

Hurst H.C. (1995). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile*. 2:101-168.

Ito Y. and Miyazono K. (2003). RUNX transcription factors as key targets of TGF- $\beta$  superfamily signaling. *Current Opinion in Genetic and Development*. 13: 43-47.

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

Javed, A., Guo, B., Hiebert, S., Choi, J., Green, J., Zhao, S., Osborne, M., Stifani, S., Stein, J., Lian, J., van Wijnen, A., Stein, G. (2000). Groucho/TLE/R-esp protein associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF( $\alpha$ )/AML/PEBP2( $\alpha$ )) dependent activation of tissue specific gene transcription. *J. Cell. Sci.* 113: 2221-2231.

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 contextdependent activity of Cbfa proteins. *Mol. and Cell. Biol.* 21: 2891-2905.

Kato M., Patel M., Levasseur R., Lobov I., Chang B., Glass II D., Hartmann C., Li L., Hwang T., Brayton C., Lang R., Karsenty G. and Chan L. (2005). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of Cell Biology*. 157: 303-314.

Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K. and Ohki M. (1998). Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation *The EMBO Journal*. 17: 2994–3004

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: 755-764.

Komori T. and Kishimoto T. (1998). *Cbfa1* in bone development. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8: 494-499.

Kowenz-Leutz E. and Leutz A. (1999). A C/EBP $\beta$  Isoform Recruits the SWI/SNF Complex to Activate Myeloid Genes. *Molecular Cell*. 4: 735–743.

Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, and Ryoo HM (2003). BMP-2-induced Runx2 Expression Is Mediated by Dlx5, and TGF- $\beta$ 1 Opposes the BMP-2-induced Osteoblast Differentiation by Suppression of Dlx5 Expression. *J. Biol. Chem*. 278: 34387–34394.

Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, Kim JI, Kim BG, Hwang YS, Wozney JM, Chi XZ, Bae SC, Choi KY, Cho JY, Choi JY and Ryoo HM (2005). Dlx5 Specifically Regulates Runx2 Type II Expression by Binding to Homeodomain-response Elements in the Runx2 Distal Promoter *J. Biol. Chem*. 280: 35579–35587.

Lekstrom-Himes J. and Xanthopoulos K. (1998). Biological Role of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Family of Transcription Factors. *J. Biol. Chem*. 273: 28545–28548.

Levanon D, Groner Y (2004). Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene*. 23: 4211-4219.

Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee W, Han SB, Kim HM, Kim WJ, 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 SC, Ito Y (2002). Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell*. 109: 113–124.

Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, Hiebert SW. (1998). ETO, a Target of t(8;21) in Acute Leukemia, Interacts with the N-CoR and mSin3 Corepressors. *Mol. And Cell. Biol.* 18: 7176–7184.

Majeska, R., Rodan, S., and Rodan, G (1980). Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology*, 107: 1494-1503.

Mbalaviele G., Sheikh S., Stains J., Salazar V., Cheng S., Chen D. and Civitelli R. (2005).  $\beta$ -Catenin and BMP-2 Synergize to Promote Osteoblast Differentiation and New Bone Formation. *J. Cell. Biochem.* 94: 403–418.

McCarthy TL, Ji C, Chen Y, Kim KK, Imagawa M, Ito Y, Centrella M. (2000). Runt domain factor (Runx)-dependent effects on CCAAT/ enhancer-binding protein delta expression and activity in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 275: 21746-21753.

Montecino M, Lian J, Stein G, Stein J. (1996). Changes in chromatin structure support constitutive and developmentally regulated transcription of the bone-specific osteocalcin gene in osteoblastic cells. *Biochemistry.* 35: 5093-5102.

Mundlos S., Otto F, et al. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5): 773-9.

Nerlov C. (2007). The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell. Biol.* 17:318-324.

Ogawa, K., Maruyama, M., Kagoshima, H. et. al. (1993). PEBP2/PBA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophilla* runt gene and the human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6859-6863.

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

Osada S., Yamamoto H., Nishihara T. and Imagawa M. (1996). DNA Binding Specificity of the CCAAT/Enhancer-binding Protein Transcription Factor Family. *J. Biol. Chem.* 271: 3891–3896.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 89: 765–771.

Otto F, Lübbert M and Stock M (2003). Upstream and Downstream Targets of RUNX Proteins. *J. Cell. Biochem.* 89: 9–18.

Paredes R., Gutiérrez J., Gutierrez S., Allison L., Puchi M., Imschenetzky M., van Wijnen A., Lian J., Stein G., Stein J., and Montecino M. (2002). Interaction of the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 receptor at the distal promoter region of the bone-specific osteocalcin gene requires nucleosomal remodelling. *Biochem J.* 363: 667–676.

Paredes R, Arriagada G, Cruzat F, Villagra A, Olate J, Zaidi K, van Wijnen A, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M. (2004). Bone-specific transcription factor Runx2 interacts with the 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to up-regulate rat osteocalcin gene expression in osteoblastic cells. *Mol Cell Biol.* 24: 8847-8861.

Ramji D.P. and Foka P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *J. Biochem.* 365: 561-575.

Rennert, J., Coffman, J., Mushegian, A., and Robertson, A. (2003). The evolution of Runx genes I. A comparative study of sequences from phylogenetically diverse model organisms. *BMC Evol. Biol.* 3:1-11.

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

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 bonespecific isoforms of PEBP2 $\alpha$ A (CBFA1): Evidence for a new myc collaborating oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8646-8651.

Stock M. and Otto F. (2005). Control of RUNX2 Isoform Expression: The Role of Promoters and Enhancers. *Journal of Cellular Biochemistry*. 95: 506–517.

Takakura N., Watanabe T., Suenobu S., Yamada Y., Noda T., Ito Y., Satake M. and Suda T. (2000). A Role for Hematopoietic Stem Cells in Promoting Angiogenesis. *Cell*. 102: 199-209.

Takeda, S., Bonnamy, J-P., Owen, M., Ducy, P., and Karsenty, G. (2001). Continuous expresión of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mouse. *Genes and Development*. 15: 467-481.

Thirunavukkarasu, K., Mahajan, M., McLarren, K., Stifani, S., and Karsenty, G. (1998). Two domains unique to osteoblast specific transcription factor Osf2/Cbfa1 contribute ti its transactivation function and its inability to heterodimerize with Cbfbeta. *Mol. Cell. Biol*. 18: 4197-4208.

Tou L, Quibria N, Alexander JM. (2003) Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol Cell Endocrinol*. 205: 121-129.

Villagra A, Gutiérrez J, Paredes R, Sierra J, Puchi M, Imschenetzky M, Wijnen Av A, Lian J, Stein G, Stein J, Montecino M. (2002). Reduced CpG methylation is associated with transcriptional activation of the bone-specific rat osteocalcin gene in osteoblasts. *J. Cell. Biochem*. 85: 112-122.

Villagra V., Cruzat F., Carvallo L., Paredes R., Olate J., van Wijnen A.J., Stein G.S., Lian J.B., Stein J.L., Imbalzano A.N. and Montecino M. (2006) Chromatin Remodeling and Transcriptional Activity of the Bone-specific Osteocalcin Gene Require CCAAT/Enhancer-binding Protein  $\beta$ -dependent Recruitment of SWI/SNF Activity. *J. Biol. Chem*. 281: 22695 - 22706.

Vinson C.R., Sigler P.B. and McKnight S.L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*. 246: 911-916.

Wang F., Lin C., Chen Y., Wang C., Yang K., Huang Y., Sun Y. and Huang H. (2005). Secreted Frizzled-Related Protein 1 Modulates Glucocorticoid Attenuation of Osteogenic Activities and Bone Mass. *Endocrinology*. 146: 2415–2423.

Weinmann, A.S. and Farnham, P.J. (2002) Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods*. 26: 37-47.

Whitman, M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGF-  $\beta$  superfamily. *Genes. Dev.* 12:2445-2462.

Xiao ZS, Thomas R, Hinson TK, Quarles LD. (1998). Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor. *Gene*. 214:187-197.

Xiao ZS, Hinson TK, Quarles LD. (1999). Cbfa1 isoform overexpression upregulates osteocalcin gene expression in non-osteoblastic and pre-osteoblastic cells. *J. Cell. Biochem.* 74:596-605.

Xiao ZS, Liu SG, Hinson TK, Quarles LD. (2001). Characterization of the upstream mouse Cbfa1/Runx2 promoter. *J. Cell. Biochem.* 82:647-659.

Xiao ZS, Hjelmeland AB, and Quarles LD. (2004). Selective deficiency of the “bone-related” Runx2-II unexpectedly preserves osteoblast-mediated skeletogenesis. *J. Biol. Chem.* 279:20307–20313.

Yamaguchi A, Komori T, and Suda T. (2000). Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews* 21: 393–411.

Zahnow C., Younes P., Laucirica R. and Rosen J. (1997). Overexpression of C/EBP $\beta$ -LIP, a Naturally Occurring, Dominant-Negative Transcription Factor, in Human Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1887–91.

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

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: 41497–41506.