

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ АКТИВАЦИИ RUNX2 ПРИ ИНДУКЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Громова Е. С., Азаркина К. Е., Костина Д. А.,
Переплетчикова Д. А., Смирнова Д. С., Малашичева А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург,
Россия

Контактная информация:
Громова Екатерина Сергеевна,
ФГБУН Институт цитологии РАН,
Тихорецкий пр., д. 4, Санкт-Петербург,
Россия, 194064.
E-mail: kate.gromova01@mail.ru

Статья поступила в редакцию 17.07.2024
и принята к печати 19.07.2024.

Резюме

Актуальность. Несмотря на то, что Runx2 является общепризнанным маркером и регулятором остеогенной дифференцировки, механизмы его регуляции, динамика активации в ходе остеогенной дифференцировки и взаимосвязь с другими генами и генными путями, связанными с остеогенной дифференцировкой, остаются неясными. **Цель** — проанализировать динамику активации Runx2 и влияние стабильного уровня белка на дифференцировочные процессы. **Материалы и методы.** В работе были использованы лентивирусные конструкции генетических изоформ RUNX2: RUNX2full (полноразмерный ген), RUNX2delta (укороченная последовательность), RUNX2stop (со стоп-кодонами), также была использована шпилечная конструкция на RUNX2 — shRUNX2 для подавления его активности. Для поддержания стабильного уровня белка в клетках использовали ингибитор протеасомной деградации MG132. Для анализа динамики активации Runx2 остеогенную дифференцировку индуцировали на разные временные сроки. Анализ результатов проводился методом вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени, окрашиванием ализариновым красным. **Результаты.** Стабилизация белка Runx2 при 24 часах индукции остеогенной дифференцировки способствует ее усилению. Также уровень транскриптов Runx2 не изменяется, но происходит активация генов-мишеней. **Заключение.** В процессе инициации остеогенной дифференцировки гингивальных фибробластов *in vitro* Runx2 регулируется как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях; накопление небольшого уровня транскриптов при индукции остеогенной дифференцировки и стабилизация белка Runx2, по-видимому, являются критически важными.

Ключевые слова: динамика активации Runx2, остеогенная дифференцировка клеток.

Для цитирования: Громова Е.С., Азаркина К.Е., Костина Д.А. и др. Исследование динамики активации Runx2 при индукции остеогенной дифференцировки. Трансляционная медицина. 2024; 11(3): 284-293. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-3-284-293. EDN: HLEVMD

INVESTIGATION OF THE DYNAMICS OF RUNX2 ACTIVATION DURING INDUCTION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION

Ekaterina S. Gromova, Ksenia E. Azarkina, Daria A. Kostina,
Daria A. Pereplechikova, Daria S. Smirnova, Anna B. Malashicheva

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint
Petersburg, Russia

Corresponding author:

Ekaterina S. Gromova,
Institute of Cytology of the Russian Academy
of Sciences,
Tikhoretsky Prospekt, 4, Saint Petersburg,
Russia, 194064.
E-mail: kate.gromova01@mail.ru

Received 17 July 2024; accepted 19 July
2024.

Abstract

Background. Despite the fact that Runx2 is a generally recognized marker and regulator of osteogenic differentiation, the mechanisms of its regulation, the dynamics of activation during osteogenic differentiation and the relationship with other genes and gene pathways associated with osteogenic differentiation remain unclear. **The aim** is to analyze the dynamics of Runx2 activation and the effect of stable protein levels on differentiation processes. **Materials and methods.** Lentiviral constructs of RUNX2 genetic isoforms were used in the work: RUNX2full (full-size gene), RUNX2delta (shortened sequence), RUNX2stop (with stop codon), a hairpin design on RUNX2 — shRUNX2 was also used to suppress its activity. The proteasome degradation inhibitor MG132 was used to maintain stable protein levels in cells. To analyze the dynamics of Runx2 activation, osteogenic differentiation was induced for different time periods. The results were analyzed by Western blotting, real-time PCR, and alizarin red staining. **Results.** Stabilization of the Runx2 protein at 24 hours of induction of osteogenic differentiation contributes to its strengthening. Also, the level of Runx2 transcripts does not change, but target genes are activated. **Conclusion.** During the initiation of osteogenic differentiation of gingival fibroblasts in vitro, Runx2 is regulated at both the transcriptional and post-transcriptional levels; accumulation of a small level of transcripts during induction of osteogenic differentiation and stabilization of the Runx2 protein seem to be critically important.

Key words: dynamics of Runx2 activation, osteogenic cell differentiation.

For citation: Gromova ES, Azarkina KE, Kostina DA, et al. Investigation of the dynamics of Runx2 activation during induction of osteogenic differentiation. *Translational Medicine*. 2024; 11(3): 284-293. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-3-284-293. EDN: HLEVMD

Список сокращений: ВКМ — внутриклеточный матрикс, кДНК — кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота, НЕК — клеточная линия на основе эмбриональных клеток почки человека, ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ФБС — фетальная бычья сыворотка, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, *BMP* — гены, кодирующие костно-морфогенетические белки, MMLV-RT — обратная транскриптаза вируса лей-

кемии мышей, *SPPI* — ген, кодирующий выработку белка остеопонтина, $TGF\beta$ — трансформирующий фактор роста β .

Введение

Runx2 — транскрипционный фактор и сигнальная молекула, играющая важную роль в процессах остеогенной дифференцировки остеобластов [1].

Кроме того, Runx2 является важной сигнальной молекулой и взаимодействует с разными сигналь-

ными путями: Wnt, Bmp и Notch [2]. Кальцификация является важным физиологическим процессом, который происходит как при нормальном развитии, так и при патологии, например, кальцификация опухолей [3].

Runx2 необходим при переходе прогениторных мезенхимных стволовых клеток в преостеобласты, а его активность имеет большее значение на ранних стадиях дифференцировки. Молодые остеобласты продуцируют различные белки, такие как остеокальцин, остеопонтин, костно-морфогенетические белки BMPs. Белки BMP являются активаторами Runx2, и их взаимодействие важно для процесса костеформирования [4]. Также Runx2 участвует и в других процессах, идущих во скелетогенезе, например, взаимодействие Runx2 и сигнального пути TGF- β регулирует дифференцировку хондроцитов и их предшественников [5].

Также на уровень белка Runx2 большое влияние оказывает убиквитин-зависимая деградация в протеасоме. Взаимодействие Runx2 и сигнального пути Notch представляет большой интерес для изучения воздействия на дифференцировку остеобластов, так как Notch является высококонсервативным сигнальным каскадом, который участвует в развитии и регенерации клеток костной ткани.

Также наблюдаются жесткие пространственно-временные паттерны экспрессии генов *RUNX*, что обеспечивает их продуктам экспрессии четкие биологические функции [6].

Несмотря на то, что Runx2 является общепризнанным маркером и регулятором остеогенной дифференцировки, механизмы его регуляции, динамика активации в ходе остеогенной дифференцировки и взаимосвязь с другими генами и генными путями, связанными с остеогенной дифференцировкой, остаются неясными. Таким образом, целью работы является исследование динамики ранней активации транскрипционного фактора Runx2 после индукции остеогенной дифференцировки.

Материалы и методы

В работе использовали первичные культуры гингивальных фибробластов человека, полученные из Покровского банка стволовых клеток [7]. Клеточные культуры регулярно проверяли на отсутствие микоплазмы.

Культивирование гингивальных фибробластов. Гингивальные фибробласты культивировали в модифицированной по Дюльбекко среде «Игла» (DMEM 1g/L D-glucose, Gibco, США) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС; HyClone, США), а также 2 mM L-глутамин и 1 %

пенициллин/стрептомицин (Gibco, США). Высеив клеток производили на желатиновую подложку (0,2 % в водно-солевом буфере). Условия культивирования стандартные — температура 37 °C с 5 % содержанием CO₂. Морфологическую оценку клеточной популяции производили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMil (Leica, США) при увеличении 20 $\times$. В экспериментах клетки культивировали до 7 пассажа.

Стабилизация уровня белка в клетках. На следующий день после посева клеток вводили ингибитор протеасомной деградации MG132 (10mM) (Sigma Aldrich, США). Инкубацию клеточной культуры с ингибитором проводили в течение 24 часов.

Запуск остеогенной дифференцировки клеток. Индукцию остеогенной дифференцировки проводили в среде с тем же составом, что и при рутинном культивировании клеток. Кроме того, в среду добавляли остеогенные факторы: 200 мкМ L-аскорбиновой кислоты, 10 mM β -глицерофосфата, 100 нМ дексаметазона (все Sigma Aldrich, США). Смена среды производилась 2–3 раза в неделю. Дифференцировку клеток оценивали методом окрашивания ализариновым красным.

Окрашивание клеток ализариновым красным и экстракция красителя уксусной кислотой. Ализариновое окрашивание клеток осуществлялось в промежутке с 7-го по 21-й день остеогенной дифференцировки, в зависимости от состояния клеток. Из лунок культурального планшета удаляли среду и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), далее фиксировали клетки в 70 % этаноле в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем лунки дважды промывали дистиллированной водой. В каждую лунку добавляли 200 мкл ализаринового красного и инкубировали в течение 20–40 минут при комнатной температуре. После окрашивания клетки промывали дистиллированной водой и фотографировали результаты. Для экстракции красителя в каждую лунку планшета добавляли 300 мкл 10 % уксусной кислоты и выдерживали 20–40 минут. Полученные экстракты переносили в 96-луночный планшет в трех технических повторах. Измерения производились на спектрофотометре Picon, оснащенном оптическим фильтром, поглощающим длину волны 450 нм.

Сборка и наработка вирусных частиц. В первый день в культуральные чашки (диаметром 10 см) высевали по 3 млн клеток линии НЕК293Т. Для получения одного вируса выделяли 6 чашек клеток. Через 24 часа, когда клетки достигали 70–80 % конфлюэнтности, в среду добавляли

трансфекционную смесь: на одну чашку — 15 мкг плазмиды интереса, 9,73 мкг psPAX2 и 5,27 мкг MD, 60 мкл PEI (полиэтиленимин), 1 мл OptiMEM (Gibco, США). Через 16–18 часов осуществляли смену среды. Через 24 часа среду с чашек собирали в специальные центрифужные пробирки (Beckman Coulter, США) и центрифугировали 2 часа при 42000 g и 4 °C. Затем концентрированные вирусные осадки ресуспендировали в 1 % бычьим сывороточном альбумине (BCA) в ФСБ. Аликвоты хранили при -80 °C.

Лентивирусная трансдукция клеток. В исследовании использовали следующие лентивирусные конструкции: полноразмерная форма RUNX2Full, изоформа с укороченной последовательностью RUNX2delta, изоформа, несущая стоп-кодон RUNX2stop, шпилечная конструкция на ген RUNX2 — shRUNX2, в качестве контроля вирусной нагрузки — пустой вирусный вектор TRC. Лентивирусную трансдукцию клеток проводили с использованием OptiMEM и HeBr (полибрен) в концентрации 5 мкг/мл среды. Через 18–24 часа меняли на стандартную среду для культивирования или на среду для остеогенной дифференцировки.

Вестерн-блоттинг. Для проведения вертикального электрофореза в ПААГ (полиакриламидном геле) использовали белковые гомогенизированные клеточные лизаты. Для их приготовления применяли лизирующий буфер RIPA (Thermo Scientific, США) и коктейль ингибиторов протеаз (Roche, Германия). Перед обработкой лизирующим буфером и ингибиторами клетки промывали ФСБ дважды. После лизиса гомогенаты переносили в пробирки и помещали в лед на 10 минут, после чего тщательно перемешивали. Пробы центрифугировали 10 минут при 13200g и 4 °C. После центрифугирования супернатанты переносили в новые пробирки. Образцы хранились при -80 °C. Подготовка проб к измерению белка проводилась в соответствии с протоколом Thermo Scientific с использованием стандартов, приготовленных на основе BCA. Измерения проводили на приборе VarioScan (Thermo Scientific, США) при длине волны 450 нм. Для электрофореза в ПААГ брали 15–20 мкг белка и смешивали с буфером для нанесения (4x Лэмли буфер, Sigma Aldrich, США). ПААГ состоял из концентрирующего и разрешающего гелей (их процентность зависит от веса исследуемого белка). Для дальнейшей оценки веса белков использовалась белковая лестница Prestained Protein Marker IV (Servicebio, Китай). Электрофорез проводили 1 час 30 минут при напряжении 200 В. Для переноса белковых образцов на мембрану гель, нитроцеллюлозную мембрану, фильтровальную

бумагу и специальные губки вымачивали в буфере для переноса. Затем все элементы собирали в камеру для переноса в таком порядке: фильтровальная бумага, губка, фильтровальная бумага, нитроцеллюлозная мембрана, ПААГ с белковыми образцами и вновь фильтровальная бумага, губка, фильтровальная бумага. Перенос белков на мембрану осуществлялся в течение 30 минут в Trans-Blot Turbo Transfer System при стандартной программе (Bio-Rad, США). После переноса мембрану отмывали в ФСБ с добавлением 0,1 % детергента Tween-20 (Helicon, США). Блокирование неспецифического связывания антител проходило 1 час в 5 % растворе молока в ФСБ с 0,1 % Tween при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами мыши Runx2 1:100 (SantaCruz, США) в течение ночи при 4 °C. Инкубацию со вторичными козыми антителами 1:1000 (Abcam, США) проводили при комнатной температуре 1 час. Детекция пероксидазного сигнала от вторичных антител осуществлялась с помощью хемилюминесцентного проявителя ECL (Servicebio, Китай) на приборе Chemidoc (Bio-Rad, США). Изображения редактировали в программе paint.net. Количественная обработка результатов проводилась в программе Image J.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли при помощи реагента Тризол («Евроген», Россия) по рекомендациям производителя. Для обратной транскрипции и синтеза кДНК использовали набор реагентов MMLV RT («Евроген», Россия). Количественный анализ уровня экспрессии генов проводили с использованием коммерческих систем ПЦР в реальном времени SYBR Green («Евроген», Россия) при следующих условиях: 95 °C в течение 5 минут, затем 45 циклов — денатурация при 95 °C в течение 15 секунд и отжиг праймеров с амплификацией 60 секунд при 60 °C. ПЦР проводили в амплификаторе LightCycler 96 Roche в 96-луночных оптических микротитровальных планшетах (Applied Biosystems, США). Относительные уровни экспрессии генов-остеомаркеров (*RUNX2*, *SPPI*, *BMP2*, *BMP4*), гена-мишени сигнального пути Notch (*HEY1*) анализировали при помощи сравнительного метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Расчет количественной экспрессии генов интереса проводился относительно референсного гена *GAPDH*. ПЦР проводили в 3 технических повторах.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.0. Для сравнения двух групп был использован непарный t-критерий Стьюдента.

Результаты

1. Активация *Runx2* происходит на раннем сроке остеогенной дифференцировки

Runx2 — считается главным регулятором остеогенной дифференцировки. В литературе малое значение придается сроку, на котором происходит анализ активации, однако есть упоминание ее зависимости от срока дифференцировки [8]. Для изучения изменений динамики *Runx2* во времени, при смене стадий остеогенной дифференцировки, исследования изменений уровня транскрипционного фактора *Runx2* в динамике, клетки дифференцировали на разных сроках после индукции. В гингивальных фибробластах пик продукции *Runx2* наблюдается через 6 часов после запуска остеогенной дифференцировки (рис. 1). Таким образом, данное наблюдение говорит о том, что для инициации клеточной дифференцировки в гингивальных фибробластах изначально имеющийся уровень *Runx2* должен увеличиться для активации генов-мишеней.

2. Влияние изоформ *Runx2* на способность клеток к минерализации ВКМ в условиях остеогенной дифференцировки клеток

Для изучения функционального влияния гена *RUNX2* на индукцию и поддержание остеогенной дифференцировки клеток были сконструированы лентивирусные конструкции, несущие

разные модификации гена *RUNX2*: *RUNX2full* — полноразмерный ген, *RUNX2delta* — укороченная последовательность гена, несущая стоп-кодон, *shRUNX2* — конструкция, образующая шпилечную структуру в транскрипте *RUNX2*. Окраска ализариновым красным на 7-й день дифференцировки гингивальных фибробластов демонстрирует активацию дифференцировочных процессов в клетках и при внесении активирующих конструкций, при этом конструкции с полноразмерным *RUNX2full* и с укороченной его вариацией *RUNX2delta* индуцируют дифференцировку с одинаковой интенсивностью (рис. 2). На 21-й день дифференцировки разница между образцами снижается, и гиперэкспрессия всех трех изоформ *RUNX2* и шпилечная конструкция *shRUNX2* приводят к росту потенциала клеток к минерализации (рис. 3). То есть подавления остеогенной дифференцировки на позднем сроке не происходит, по-видимому, наибольшее влияние на остеогенную дифференцировку оказывает воздействие на раннем сроке индукции.

В ответ на внесение лентивирусных конструкций *RUNX2full* и *RUNX2delta* при индукции остеогенной дифференцировки в гингивальных фибробластах с помощью вестерн-блоттинга было установлено усиление продукции белка *Runx2*, несущего полноразмерный ген *RUNX2* и уко-

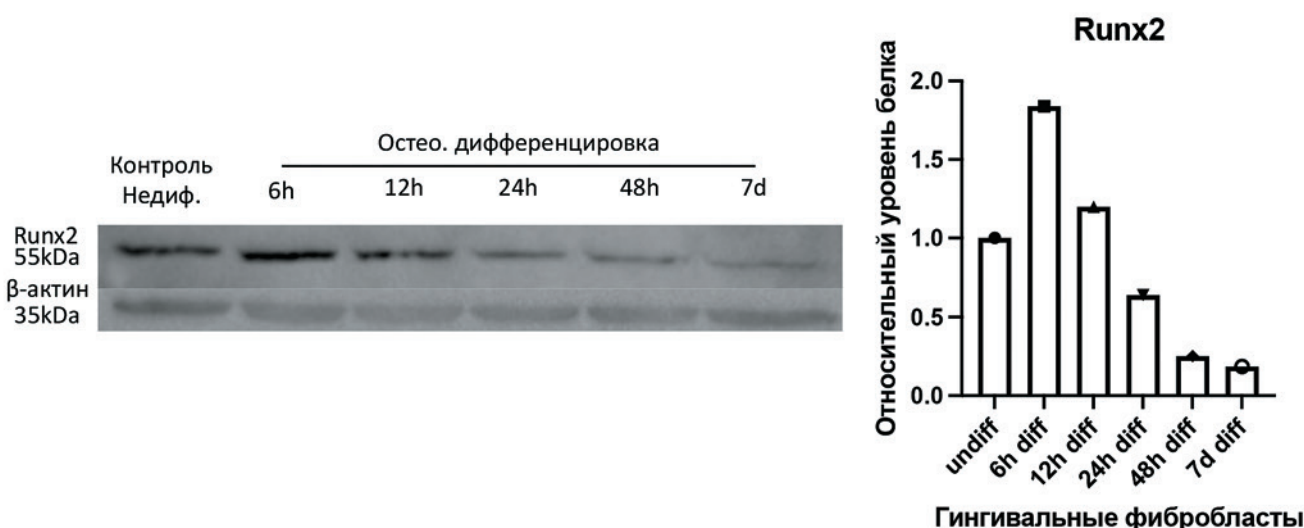


Рис. 1. Вестерн-блоттинг и денситометрия гингивальных фибробластов на *Runx2* и β -актин с контрольными недифференцированными клетками и остеогенной дифференцировкой на сроках 6, 12, 24, 48 часов и 7 дней

Figure 1. Western blotting and densitometry of gingival fibroblasts on *Runx2* and β -actin with control undifferentiated cells and osteogenic differentiation at 6, 12, 24, 48 hours and 7 days

роченную последовательность гена изоформы *RUNX2delta* (рис. 4).

Полученные данные дают понять, что лентивирусные генетические конструкции с изоформами

RUNX2 усиливают индукцию остеогенной дифференцировки. Поэтому следующей задачей было подобрать такие условия экспериментов, которые помогут оценить влияние Runx2 на запуск осте-

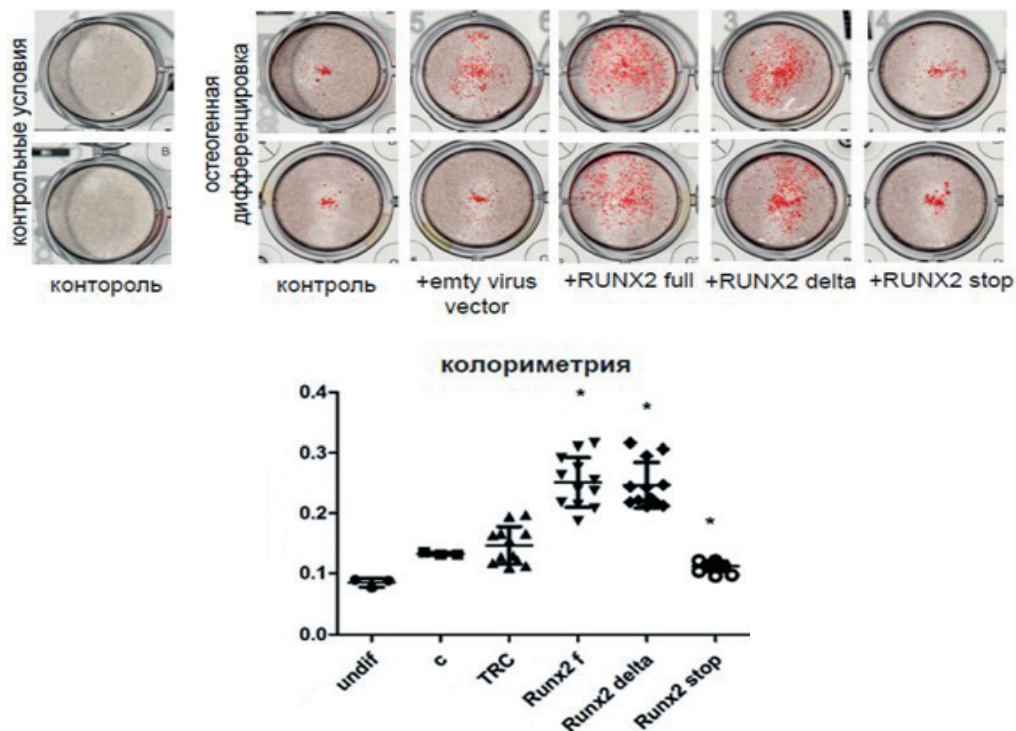


Рис. 2. Ализариновое окрашивание и колориметрия на гингивальных фибробластах с лентивирусами на 7-й день остеодифференцировки

Figure 2. Alizarin staining and colorimetry on gingival fibroblasts with lentiviruses on the 7th day of osteogenic differentiation

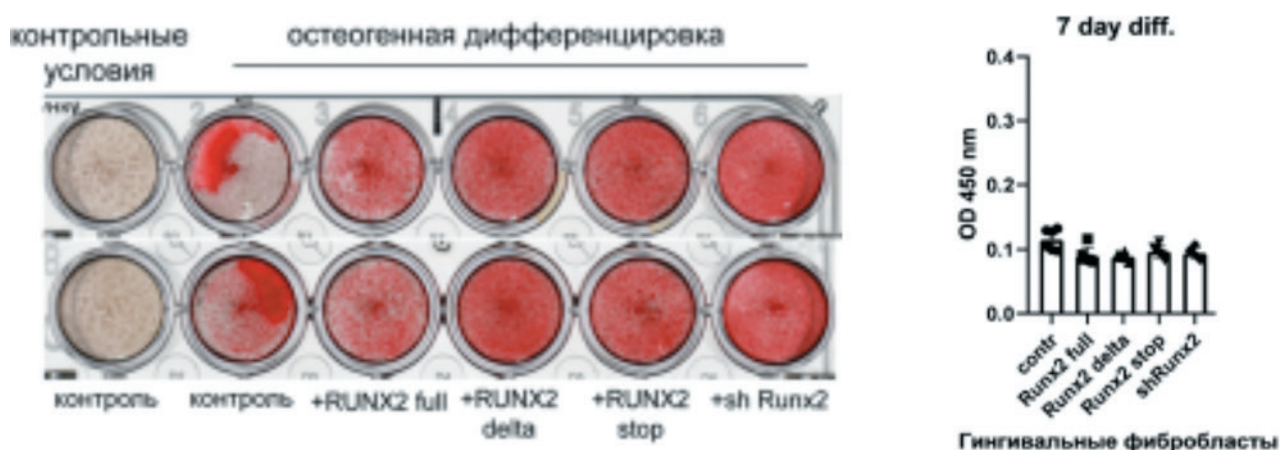


Рис. 3. Ализариновое окрашивание и колориметрия на гингивальных фибробластах с лентивирусами на 21-й день остеодифференцировки

Figure 3. Alizarin staining and colorimetry on gingival fibroblasts with lentiviruses on the 21st day of osteogenic differentiation

огенной дифференцировки на уровне изначально имеющегося в клетках белка.

3. Стабилизация уровня белка *Runx2* в гингивальных фибробластах при инициации остеогенной дифференцировки положительно влияет на гены-мишени

Для того чтобы проанализировать, как стабильный уровень транскрипционного фактора *Runx2* влияет на индукцию остеогенной дифференцировки, использовали ингибитор протеасомной деградации MG132.

С помощью ализаринового окрашивания было продемонстрировано, что ингибирование протеасомной деградации положительно влияет на биоминерализацию ВКМ в культуре фибробластов через 24 часа при инициации остеогенной дифференцировки (рис. 5).

На уровне мРНК *RUNX2* демонстрирует незначительное снижение экспрессии гена после ингибирования протеасомной деградации в гингивальных фибробластах через 24 часа после индукции остеодифференцировки (рис. 5).

Уровень экспрессии гена *SPPI*, кодирующего костный сиалопротеин остеопонтин, растет в ответ на стабильный уровень транскрипционного фактора *Runx2* в гингивальных фибробластах при индукции остеогенной дифференцировки.

Полученные результаты позволяют предположить, что постоянный уровень белка способствует

усилению дифференцировки, а индукция данного процесса сопровождается спадом активности ингибитора остеогенной дифференцировки остеопонтина и *BMP2*, рост которого обычно коррелирует с активацией экспрессии *RUNX2*.

Обсуждение

Динамика активации *Runx2* и влияние на остеогенную дифференцировку клеток

В ходе проведенных экспериментов мы показали, что накопление белка *Runx2* происходит уже через 6 часов после индукции остеогенной дифференцировки в культуре гингивальных фибробластов. Также все генетические изоформы *RUNX2* имеют сходное воздействие на способность клеток к минерализации ВКМ через 7-й и 21-й дни индукции остеогенной дифференцировки. Напротив, стабильный уровень белка, сохранившийся в клетках через 24 часа после инициации остеогенной дифференцировки, продемонстрировал рост таких генов-мишеней транскрипционного фактора *Runx2*, как *SPPI* (остеопонтин) и *BMP4*.

Остеобласты способны активно вырабатывать внеклеточный матрикс (ВКМ).

Развитие мезенхимных предшественников и преостеобластов контролируется транскрипционным фактором *Runx2*. Он считается основным регулятором процесса превращения остеобластов

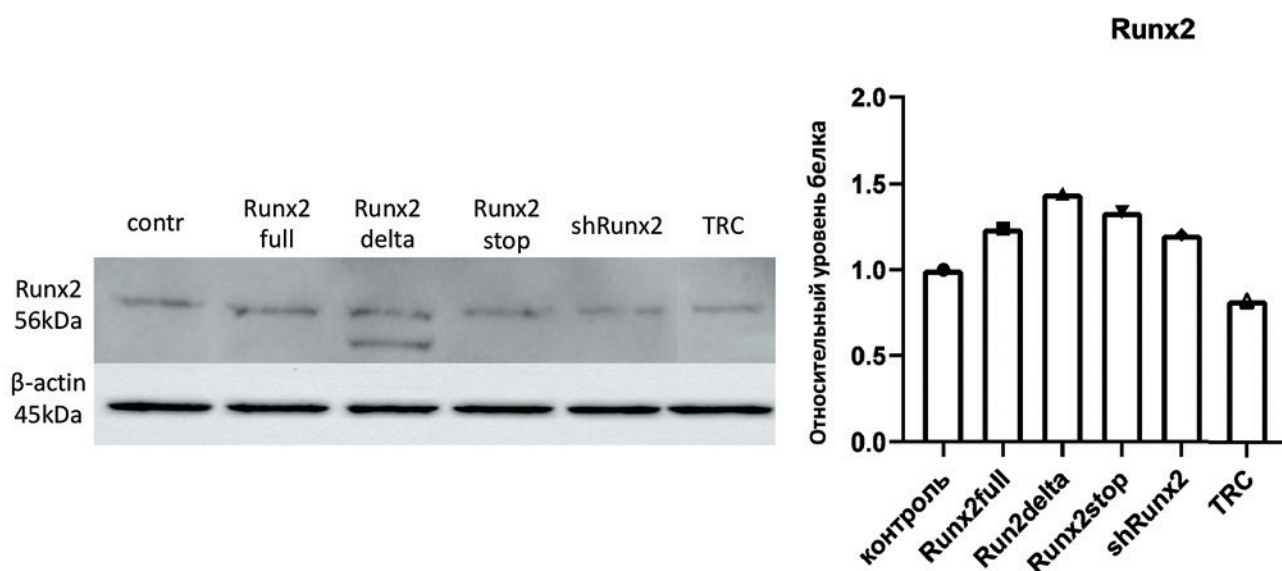


Рис. 4. Вестерн-блоттинг и денситометрия гингивальных фибробластов на *Runx2* и β -актин при индукции остеодифференцировки, 7 дней

Figure 4. Western blotting and densitometry of gingival fibroblasts for *Runx2* and β -actin during induction of osteogenic differentiation, 7 days

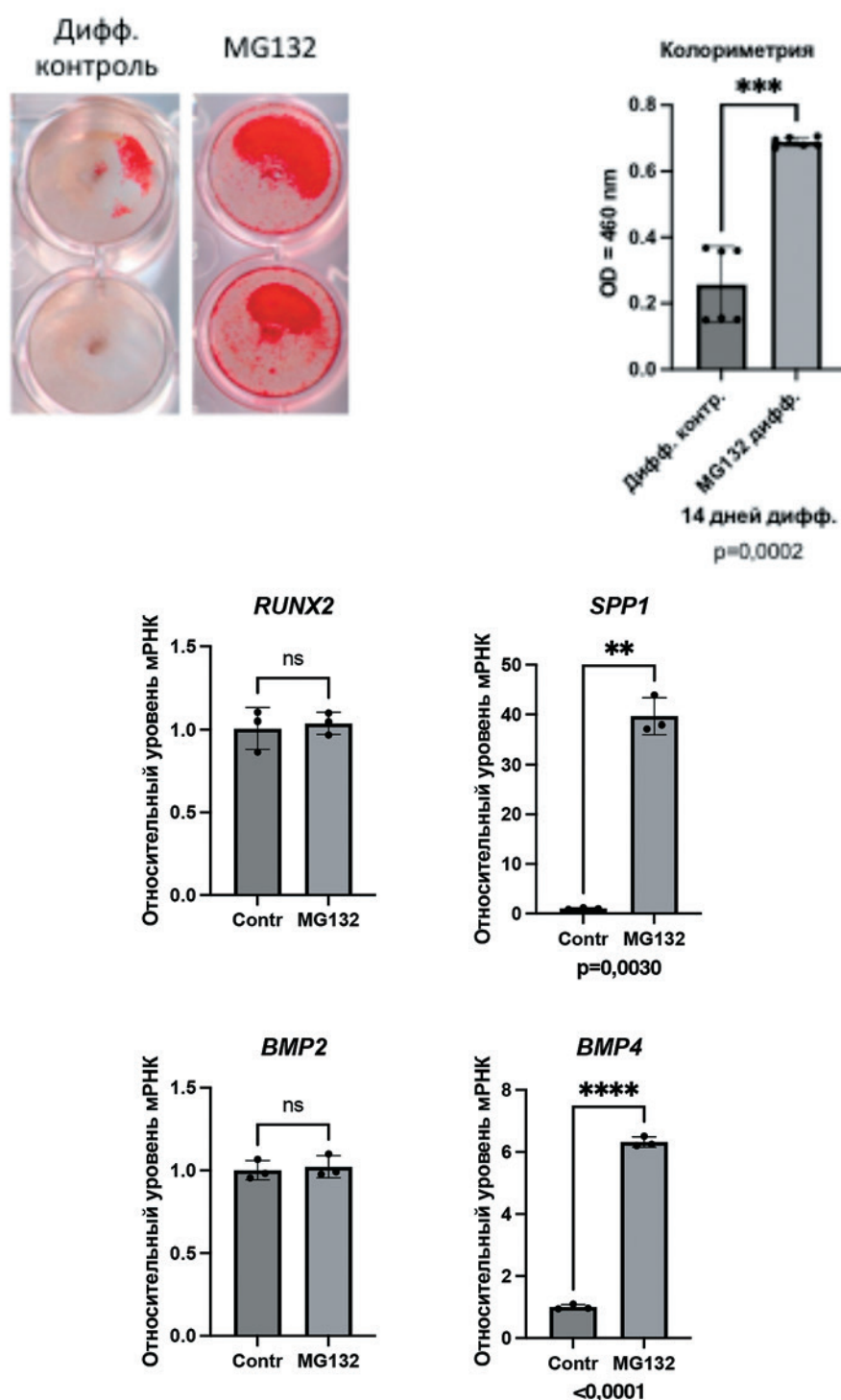


Рис. 5. Ализариновое окрашивание и колориметрия гингивальных фибробластов в условиях остеогенной дифференцировки с ингибитором протеасом и ОТ-ПЦР гингивальных фибробластов при индукции остеодифференцировки через 24 часа культивирования в присутствии ингибитора протеасом MG132 на RUNX2, его гены-мишени BMP2,4, SPP1

Достоверность сравниваемых значений (непараметрический t-критерий): ns — не существенно, ** — $P < 0,01$; **** — $P < 0,0001$.

Figure 5. Alizarin staining and colorimetry of gingival fibroblasts under conditions of osteogenic differentiation with a proteasome inhibitor and RT-PCR of gingival fibroblasts during induction of osteogenic differentiation after 24 hours of cultivation in the presence of MG132 proteasome inhibitor on RUNX2, its target genes BMP2,4, SPP1

Reliability of the compared values (nonparametric t-test): ns — not significant, ** — $P < 0.01$; **** — $P < 0.0001$.

в костную ткань, а также формирования кости. Гены-мишени фактора Runx2, такие как *BGLAP*, отвечают за выработку белка остеокальцина (*OCN*). Этот белок взаимодействует с ВКМ, что приводит к минерализации последнего. Особенность гена *BGLAP* заключается в том, что он работает только в остеобластах и не встречается в других типах клеток [9]. Процесс дифференцировки включает три этапа, каждый из которых характеризуется уникальным набором молекулярных маркеров [8].

Наши эксперименты демонстрируют, что наибольший уровень накопления транскрипционного фактора Runx2 в клетке происходит на раннем сроке остеогенной дифференцировки гингивальных фибробластов — через 6 часов после индукции. Также обе генетические изоформы *RUNX2full* и *RUNX2delta* проявляют одинаковые потенциалы к индукции остеогенной дифференцировки.

Убиквитинирование является одной из модификаций белков, в том числе принимающих участие в процессах деградации белка. Протеасомный путь деградации белков является собой не что иное, как ряд последовательных ферментативных реакций, которые активируют убиквитин (E1), переносчики убиквитина (E2) и убиквитинлигазы (E3). Убиквитинлигаза E3 является регуляторным фактором 1 убиквитина Smad (*Smurf1*). Было показано, что гиперэкспрессия *Smurf1* ингибирует дифференцировку остеобластов. И наоборот, при недостатке *Smurf1* достигалось увеличение образования костной массы посредством контроля деградации в протеасоме MEKK2-киназа-МАРК-киназа 2 [10].

Известно, что несколько убиквитинлигаз E3 участвуют в убиквитинировании Runx2 и отрицательно влияют на остеогенную дифференцировку остеобластов [10]. Также сообщается о наличии другого механизма, приводящего к убиквитинированию, и связанной с ним деградации. Иницируются данные реакции комплексом циклин D1/CDK4, и контроль осуществляется посредством фосфорилирования. Кроме того, было обнаружено, что фосфорилирование определенного остатка серина (S294) запускает ацетилирование Runx2, что объясняет его транскрипционную активность и защищает его от деградации [10].

Противоположный убиквитинированию эффект осуществляет ацетилирование, которое оказывает на Runx2 протективное влияние и мешает деградации белка. Runx2 подвергается целому спектру различных посттрансляционных модификаций, с помощью которых происходит регуляция.

В ходе экспериментов на клеточных линиях остеобластов человека было обнаружено, что уровни белка Runx2 и мРНК не соответствуют друг другу [11]. Дальнейшие исследования показали, что мРНК *RUNX2* ассоциирована с полисомами только в дифференцированных остеобластных клетках, а в предшественниках остеобластов и неостеобластных клетках — нет. Эти результаты свидетельствуют о том, что экспрессия *RUNX2* регулируется на уровне трансляции [11].

Также эндогенный уровень белка Runx2 растет от эффекта ингибитора протеасомы 26S, но при этом повышения уровня мРНК не наблюдалось [12]. Однако ингибирование протеасом индуцировало остеогенную дифференцировку: увеличилась экспрессия генов, кодирующих белки остеокальцин и щелочную фосфатазу.

Полученные в данном исследовании результаты демонстрируют, что постоянный уровень белка Runx2 не влияет на изменение уровня транскриптов гена *RUNX2*, однако уровень экспрессии генов-мишеней изменяется. Также подавление протеасомной деградации белка Runx2 приводит к усилению биоминерализации у гингивальных фибробластов. Экспрессия генов, регулирующих выработку морфогенетических костных белков *Bmp 2* и *4*, в гингивальных фибробластах происходит по-разному: уровень транскриптов *BMP2* не изменяется, а *BMP4* растет, что говорит о влиянии постоянной концентрации белка Runx2 в клетке на некоторые гены-мишени в ходе остеогенной дифференцировки.

Заключение

Наше исследование продемонстрировало, что пик накопления белка транскрипционного фактора Runx2 в процессе остеогенной дифференцировки гингивальных фибробластов происходит через 6 часов после индукции, далее его уровень снижается, по-видимому, из-за наличия убиквитин-зависимой протеасомной деградации, а на поздних сроках уровень белка не изменяется. Также данные указывают, что именно на раннем сроке остеогенной дифференцировки клеток возможно повлиять на этот процесс в клетках. Так, нами было выявлено, что стабильный уровень транскрипционного фактора Runx2 при индукции остеогенной дифференцировки усиливает экспрессию таких генов-мишеней, как *SPP1* и *BMP4*. То есть Runx2 имеет тонкую настройку при инициации остеогенной дифференцировки на уровне мРНК и белка, а неизменный уровень транскриптов при сочетании со стабильным уровнем белка Runx2 оказывает прямое влияние на способность клеток к биоминерализации.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 23-15-00320. /

Research is supported by a grant from The Russian Science Foundation №23-15-00320.

Список литературы / References

1. Xu J, Li Z, Hou Y, Fang W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res*. 2015 Dec 15;7(12):2527–2535. PMID: 26885254; PMCID: PMC4731654.
2. Rutkovskiy A, Stensløkken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res*. 2016 Sep 26;22:95–106. DOI: 10.12659/msmbr.901142.
3. Ferreira LB, Gimba E, Vinagre J, et al. Molecular Aspects of Thyroid Calcification. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 19;21(20):7718. DOI: 10.3390/ijms21207718.
4. Toth Z, Ward A, Tang SY, McBride-Gagy S. Sexual differences in bone porosity, osteocyte density, and extracellular matrix organization due to osteoblastic-specific Bmp2 deficiency in mice. *Bone*. 2021 Sep;150:116002. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116002.
5. Chen Y, Mehmood K, Chang YF, et al. The molecular mechanisms of glycosaminoglycan biosynthesis regulating chondrogenesis and endochondral ossification. *Life Sci*. 2023 Dec 15;335:122243. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.122243.
6. Mevel R, Draper JE, Lie-A-Ling M, et al. RUNX transcription factors: orchestrators of development. *Development*. 2019 Sep 5;146(17):dev148296. DOI: 10.1242/dev.148296.
7. Lobov A, Kuchur P, Khizhina A, et al. Mesenchymal Cells Retain the Specificity of Embryonal Origin During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells*. 2024 Jan 13;42(1):76–89. DOI: 10.1093/stmcls/sxad081.
8. Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, et al. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene*. 2004 May 24;23(24):4315–29. DOI: 10.1038/sj.onc.1207676.
9. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997 May 30;89(5):747–54. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80257-3.
10. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*. 2014 Oct 23;28:269–86. DOI: 10.22203/ecm.v028a19.
11. Sudhakar S, Katz MS, Elango N. Analysis of type-I and type-II RUNX2 protein expression in osteoblasts.

Biochem Biophys Res Commun. 2001 Aug 10;286(1):74–79. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5363.

12. Uyama M, Sato MM, Kawanami M, Tamura M. Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib. *Genes Cells*. 2012 Jul;17(7):548–58. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01611.x.

Информация об авторах:

Громова Екатерина Сергеевна, старший лаборант-исследователь лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Азаркина Ксения Евгеньевна, старший лаборант-исследователь лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Костина Дарья Алексеевна, научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Смирнова Дарья Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Переpletчикова Дарья Александровна, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., заведующая лабораторией регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН.

Information about the authors:

Ekaterina S. Gromova, Senior Research Laboratory Assistant at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Ksenia E. Azarkina, Senior Research Laboratory Assistant at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Daria A. Kostina, Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institution Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Darya V. Smirnova, Junior Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Daria A. Perepletchikova, Junior Researcher at the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences;

Anna B. Malashicheva, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences.