

NAJWAŻNIEJSZE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE PROCESU OSTEOLASTOGENEZY*

THE MOST IMPORTANT TRANSCRIPTIONAL FACTORS OF OSTEOLASTOGENESIS

Małgorzata WITKOWSKA-ZIMNY, Edyta WRÓBEL, Jacek PRZYBYLSKI

Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Wydział Nauki o Zdrowiu,
Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Jednym z kluczowych zagadnień dla zrozumienia organogenezy jest poznanie mechanizmów leżących u podstaw różnicowania komórek progenitorowych w wyspecjalizowane komórki poszczególnych tkanek. Rozwój metod biologii molekularnej w tym transkryptomiki oraz proteomiki umożliwia zidentyfikowanie i poznanie roli wielu czynników i mechanizmów regulujących i/lub wpływających na poziomie genetycznym na proces różnicowania, a także na zmiany w funkcjonowaniu już fenotypowo dojrzałych komórek. W ostatnich latach ukazało się wiele prac dotyczących mechanizmów procesu kościotworzenia. W niniejszym artykule podjęto próbę podsumowania roli najważniejszych czynników regulujących proces osteolastogenezy.

Słowa kluczowe: osteoblasty, czynniki transkrypcyjne, Runx2, Osterix, osteolastogeneza.

Summary: One of the key issues in understanding of organogenesis is investigation of the mechanisms underlying differentiation of progenitor cells into more specialized cells of individual tissues. Development of methods of molecular biology, transcriptomic and proteomic approaches leads to the identification of several factors and mechanisms regulating morphogenesis at the genetic level and affecting the function of already differentiated cells. In the last few years, several reports about osteolastogenesis have been published. This review presents recent findings on the role of the most important transcription factors supporting bone formation.

Key words: osteoblasts, transcriptional factors, Runx2, Osterix, osteolastogenesis.

WSTĘP

Specyficzna budowa tkanki kostnej, jej funkcja i metabolizm związane są z procesami kościotworzenia, resorpcji, homeostazy mineralnej oraz regeneracji kości. Procesy te opierają się na obecności wyspecjalizowanych rodzajów komórek tkanki kostnej: osteoblastów, osteocytów, osteoklastów. W zdrowej kości funkcjonowanie tych komórek, głównie osteoblastów i osteoklastów wymaga zachowania fizjologicznej równowagi. Oprócz elementów komórkowych tkanka kostna zawiera substancję (*matrix*) zewnątrzkomórkową, która składa się z części organicznej, w tym kolagenu

*Grant 3T08A 001 30 (KBN)

typu I (90%), osteokalcyny, osteopontyny, sialoprotein, osteonektyny, proteoglikanów i substancji nieorganicznej w postaci soli fosforanowo-wapniowych w formie hydroksyapatytu. Właściwymi komórkami kościotwórczymi są pochodzące z mezenchymalnej linii komórek macierzystych – MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) osteoblasty syntetyzujące białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Osteoblasty powstają z prekursorowych komórek kości pod wpływem wielu czynników, takich jak: czynniki wzrostu, hormony oraz cytokiny modulujące proces proliferacji, różnicowania i migracji komórek osteogennych. Różnicowanie w warunkach *in vitro* jest indukowane przez obecność substancji stanowiących czynniki wzbogacające medium hodowlane (deksametazon, kwas askorbinowy, witamina D₃). Efektem zmian powodujących różnicowanie się komórek prekursorowych w kierunku dojrzałych komórek kości są różnice w poziomie syntezy kluczowych wskaźników metabolizmu kostnego. Markerami procesu kościotworzenia, których obecność stwierdza się w hodowlach *in vitro*, są m.in.: alkaliczna fosfataza, osteopontyna, osteonektyna czy osteokalcyna. Wśród nich osteokalcyna jest białkiem wysokospecyficznym dla tkanki kostnej i charakterystycznym dla terminalnie zróżnicowanych osteoblastów. Proces różnicowania komórek kości może być monitorowany nie tylko za pomocą testów biochemicznych, ale także z wykorzystaniem obserwacji histologicznej i coraz częściej metod biologii molekularnej.

Procesy dojrzewania komórek osteogennych są wywołane i regulowane sygnałami na poziomie molekularnym. Genetyczne mechanizmy kontroli wzrostu i formowania kości są wśród kręgowców wysoce konserwatywne i regulowane przez stosunkowo małą liczbę, słabo jak dotąd poznanych czynników transkrypcyjnych [10, 27]. Zatem aby dokładnie zrozumieć mechanizmy molekularne leżące u podstaw rozwoju i wzrostu kości, prowadzone są badania począwszy od wykorzystania hodowli komórkowych *in vitro* po konstrukcje transgeniczných organizmów, pozwalające na badanie procesów kościotworzenia w układach *in vivo*.

Pomimo nieustających badań, dostarczających informacji o nowych czynnikach uczestniczących w procesie formowania, dojrzewania i funkcjonowania osteoblastów, wciąż niewiele wiadomo o ich wzajemnych powiązaniach i oddziaływaniach. Prawidłowy przebieg procesów metabolicznych komórek kości jest kluczowy dla właściwej makro- i mikrostruktury kości i w konsekwencji uzyskania odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej powstałej tkanki. Poznanie mechanizmów regulujących te procesy otworzy nowe możliwości dla leczenia schorzeń kości oraz ułatwi zrozumienie ich patomechanizmów, a także umożliwi sterowanie procesami zachodzącymi w żywych komórkach wykorzystywanych do regeneracji tkanki kostnej człowieka z użyciem metod inżynierii tkankowej.

1. GŁÓWNE CZYNNIKI TRANSKRYPCYJNE PROCESU KOŚCIOTWORZENIA: RUNX2 I OSTERIX

W powstawanie i regenerację każdej tkanki zaangażowana jest kaskada sygnałów polegająca na sekwencyjnym włączaniu kolejnych genów w odpowiedzi na czynniki wzrostu i regulatory transkrypcyjne. Początkowe etapy są pobudzane przez morfo-

geny wpływające na przyszły los komórki, na procesy różnicowania się i przemieszczania komórek embrionalnych, tworzenia się z nich tkanek, układania się ich w zawiązki narządów oraz dalszy rozwój ukształtowanych narządów. Wśród czynników wywierających wpływ na bardzo wczesne etapy formowania się poszczególnych komórek i tkanek, znaleźć można białka kontrolujące proliferację oraz różnicowanie większości typów komórek, takich jak: czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), transformujący czynnik wzrostu beta ($TGF-\beta$), insulinopodobne czynniki wzrostu (IGF), czy białka morfogenetyczne kości (BMPs) oraz niewielką grupę czynników specyficznych dla danego typu komórek i tkanek. Właściwe dojrzewanie i funkcjonowanie osteoblastów bezpośrednio związane jest z ekspresją kluczowych dla kościotworzenia dwóch czynników transkrypcyjnych: RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) i Osterix.

RUNX2

Program transkrypcyjnej kontroli proliferacji, wzrostu i różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w dojrzałe komórki kości jest kontrolowany głównie przez RUNX2 (znany także jako CBFA1, AML3, PEBP2 α C, OSF2). Liczne badania *in vitro* wskazały, że RUNX2 jest pozytywnym regulatorem ekspresji genów, których produkty stanowią białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak: kolagen typu I, osteopontyna, sialoproteiny oraz osteokalcyna [19].

RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) należy do rodziny Runt i jest uważany za nadrzędny regulator procesu kościotworzenia. Jego niedobór u homozygot prowadzi do różnych typów dysplazji kostnej, polegających na genetycznie uwarunkowanych zaburzeniach organizacji i modelowania układu kostnego [24]. RUNX2 uczestniczy również w procesach związanych z dojrzewaniem komórek tkanki chrzęstnej [23]. Ekspresję genu *Runx2* wykazano ostatnio także w innych typach tkanek: w tkance mózgowej, spermie, limfocytach T [20]. Postuluje się zatem jego epigenetyczną rolę w przekazywaniu informacji zakodowanej w postaci DNA.

Mechanizm regulacji ekspresji informacji genetycznej przez RUNX2 jest intensywnie badany od wielu lat. Określono jego potencjalne miejsce wiązania, między innymi, w regionie promotorowym sialoprotein, białek odpowiedzialnych za mineralizację tkanki kostnej (–84 do –79 i –184 do –179) [31]. Została również zidentyfikowana sekwencja konsensusowa (PuACCPuCa) określana jako OSE2 (*osteoblast specific element*), z którym oddziałuje RUNX2. Należy podkreślić, że pozostałe dwa regulatory z rodziny Runt: RUNX1 i RUNX3, uczestniczą w indukcji genów osteoblastycznych. Regulatory z rodziny Runt są białkami będącymi transkrypcyjnymi izoformami powstającymi z różnych promotorów (P1 i P2) tego samego genu. Locus tego genu znajduje się na 6 chromosomie człowieka i 17 mysim chromosomie. W wyniku złożonego procesu alternatywnego splicingu powstają trzy izoformy tego białka [23]. Powstawanie tych izoform jest gatunkowo specyficzne. RUNX3 został zidentyfikowany w komórkach mysich, natomiast nie występuje w tkankach ludzkich. Pozostałe dwie formy: RUNX1 i RUNX2 są obecne zarówno u człowieka, jak i u myszy i szczurów. Wykazano odrębny udział RUNX1 i RUNX2 w procesie

osteogenezy: RUNX1 uczestniczy w kościotworzeniu na podłożu błoniastym (*osteogenesis membranacea*) co odpowiada zaangażowaniu tej izoformy we wczesne etapy osteoblastogenezy, a RUNX2 w kościotworzeniu śródchrzęstnym (*osteogenesis cartilaginea*), czyli w procesie dojrzewania osteoblastów [21]. Specyficzny mechanizm molekularny zaangażowania obu tych białek w procesy tworzenia tkanki kostnej nie został jak dotąd poznany.

Pozytywne regulatory transkrypcyjne promotorów, przy udziale których odbywa się transkrypcja RUNX, zostały dość wcześnie zidentyfikowane (białka morfogenetyczne kości, produkty genów homeotycznych), podczas gdy pierwsze doniesienia o białku, które hamuje ekspresję genu *Runx* zostały opublikowane w bieżącym roku [9]. Wykazano, że transkrypcyjnym represorem Runx2 jest Snail1. Tym samym poszerzona została grupa białek uczestniczących w kontroli wzrostu i przebudowy kości. Snail1 jest białkiem uczestniczącym w transformacji komórek nabłonkowych w mezenchymalne podczas rozwoju zarodkowego – EMT (ang. *epithelial to mesenchymal transition*) [9].

Oprócz bezpośredniego oddziaływania z DNA, RUNX2 wchodzi w interakcje z szeregiem innych białek regulatorowych, co wskazuje na złożony mechanizm kontroli osteoblastogenezy przez ten czynnik. Zidentyfikowanymi do tej pory transkrypcyjnymi koaktywatorami RUNX2 są p300 i CBP (*CREB-binding protein*), funkcjonujące jako adaptory transkrypcyjne w interakcjach z innymi białkami regulatorowymi w wielobiałkowych kompleksach aktywacyjnych. Poprzez bezpośrednie oddziaływanie z RUNX2 wzmacniają one RUNX2-zależną transkrypcję. Korepresorami RUNX2 są między innymi składniki wielobiałkowych kompleksów wpływających na deacetylację i kondensację chromatyny, takie jak: TLE (*transducin-like enhancer*), mSin3A oraz HDAC3/4/6 [23]. Wydaje się, że preferowane oddziaływanie RUNX2 z konkretnymi koaktywatorami lub korepresorami zależy od jego potranslacyjnych modyfikacji: fosforylacji, metylacji, acetylacji.

Osterix

Osterix (Sp7, Osx) jest kolejnym transkrypcyjnym regulatorem, charakterystycznym dla tworzenia kości i różnicowania komórek progenitorowych w osteoblasty. Białko to należy do rodziny Sp/XKLF czynników transkrypcyjnych. Wspólną cechą tych czynników jest obecność w cząsteczce konserwowanej domeny wiążącej DNA, składającej się z Cys2His2 palców cynkowych [32]. W 429-aminokwasowej cząsteczce oprócz motywu palców cynkowych Cys2His2 znajdującego się w części C-terminalnej można wyróżnić między 141 a 210 resztą aminokwasową domenę aktywacyjną bogatą w reszty prolinowe i glicynowe. Wykazano, że ekspresja Osterix jest zależna od RUNX2 i w komórkach pozbawionych genu *Runx2*, ekspresja Osterix nie zachodzi [26]. Jest to regulator specyficzny dla osteoblastów i jak dotąd nie zaobserwowano jego aktywności w innych typach komórek. Ekspresja wczesnych markerów różnicowania osteoblastów (osteopontyna, fosfataza alkaliczna) w komórkach ludzkiej linii osteosarkomy (MG63), nie jest zależna od Osterix [15]. Natomiast aktywacja późnych genów, np. osteokalcyny, jest skorelowana z obecnością tego regulatora, dlatego też przyjmuje się, że Osterix jest czynnikiem umożliwiającym postęp różnicowania komórek osteoprogenitorowych w dojrzałe osteoblasty [2].

Pomimo dużego zaangażowania w proces różnicowania osteoblastów, mechanizm regulacyjny Osterix nie został dotychczas w pełni poznany. Wykazano natomiast interakcje regionu aktywacyjnego Osterix z wieloma regulatorami w tym: NFAT (*nuclear factor of activated T cell*) [18], podstawowym czynnikiem transkrypcyjnym – TF-IIB czy też czynnikiem remodulującym chromatynę – Brg-1 [15]. Z wykorzystaniem analizy MAL-DI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) zidentyfikowano RNA helikazę A (RHA) jako białko będące składnikiem zależnej od Osterix drogi regulacji uczestniczącej w procesie różnicowania osteoblastów [1]. Aktywność Osterix jest regulowana przez różne stopnie modyfikacji potranslacyjnych w tym fosforylację, glikozylację [7]. Wykazano, że kalcyneuryna, będąca fosfatazą białkową wpływa na funkcjonowanie Osterix przez bezpośrednią interakcję oraz zmianę jego potranslacyjnych form ufosforylowania. Zastosowanie inhibitora kalcyneuryny powodowało wzrost poziomu ufosforylowanej formy Osterix [31]. Nadal niewyjaśniony jest fakt, w jaki sposób fosforylacja Osterix przebiega i wpływa na jego funkcję.

2. BIAŁKA MORFOGENETYCZNE KOŚCI – BMPs

Białka morfogenetyczne kości – BMPs (ang. *Bone Morphogenetic proteins*), należące do nadrodziny β czynników transformujących wzrostu (TGF β) są ważnymi regulatorami procesu różnicowania i formowania tkanek, narządów w trakcie embriogenezy, w tym wzrostu i różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki osteogenne. BMPs pełnią także kluczową rolę w procesach regeneracji tkanek, w okresie post-embryonalnym [5] BMPs wpływają na sterowanie procesami odbudowy utraconych w wyniku procesu chorobowego tkanek i przywrócenie ich fizjologicznych funkcji. Opisywanych zostało kilkanaście białek należących do grupy BMPs, z których BMP2, BMP4, BMP7 przypisuje się rolę osteoindukcyjną. Białka morfogenetyczne kości poprzez aktywację wewnątrzkomórkowych białek Smad z udziałem dróg transdukcji sygnału, w których pośredniczą kaskady kinaz (MAP, ERK, PI3-K/AKT), wpływają na ekspresję wielu genów docelowych [30]. Bezpośrednio na sygnał BMPs odpowiadają wczesne białka embriogenezy zawierające homeodomeny (ang. *homeodomain proteins*) uczestniczące w rozwoju szkieletu (HOXA10, DLX3). Ponadto, wczesny czynnik transkrypcyjny osteoblastogenezy, RUNX2 jest ekspresjonowany w odpowiedzi na obecność BMP2 i to właśnie poprzez drogę transdukcji sygnału do jądra zależną od białek Smad [28, 33]. Leong i współpracownicy, po raz pierwszy wskazali udział palmitylacji BMP2, czyli dołączenia do cząsteczki BMP2 reszty kwasu palmitynowego w regulacji procesu różnicowania osteoblastów. Autorzy ci wykazali wpływ tej modyfikacji na ekspresję Osterix, w której uczestniczy białko BMP2. Inhibicja procesu palmitylacji hamowała różnicowanie i mineralizację osteoblastów, natomiast nie wpływała na proliferację komórek [20].

Mimo licznych badań regulacyjnej ścieżki sygnałowej zależnej od BMP2 nie jest ona nadal w pełni wyjaśniona. Pomimo iż nie są do końca poznane molekularne mechanizmy przekazywania sygnału przez BMPs, ludzkie rekombinowane BMP2 i BMP7 jest z powodzeniem wykorzystywane w aplikacji klinicznej, jako czynnik

wspomagający regenerację tkanki kostnej. Ma to miejsce w przypadkach zabiegów obarczonych wysokim ryzykiem wystąpienia zaburzeń zrostu kostnego [3, 4].

3. GENY HOMEOTYCZNE

Dowodzono, że podczas embriogenezy różnicowanie i powstawanie tkanek i narządów jest regulowane przez aktywację wielu czynników, w tym BMPs, genów homeotycznych HOX/HOM (ang. *homeobox genes*), ZPA (aktywność regulująca polaryzację tkanek, ang. *zone polarising activity*), FGF (czynnik wzrostu fibroblastów), czy SHH (*Sonic Hedgehog*). Spośród wielu czynników istotnych na poziomie organogenezy dla rozwoju szkieletu, należy wymienić geny należące do rodziny Dlx, HOX czy Msh.

HOXA10

HOXA10 (*homeobox protein A10*) to czynnik transkrypcyjny z rodziny białek HOX, kodowanych przez podklasę genów homeotycznych. Należy on do regulatorów kontrolujących przebieg embriogenezy u kręgowców. *Hox* i inne geny homeotyczne odpowiedzialne między innymi za osteoblastogenezę, funkcjonują także w komórkach dorosłych organizmów regulując proliferację, różnicowanie i dojrzewanie osteoblastów w procesach modelowania i regeneracji tkanki kostnej.

Badania przeprowadzone w ostatnich dwóch latach, wskazują na zależność ekspresji *Runx2* i genów RUNX2-zależnych (kodujących osteokalcynę, alkaliczną fosfatazę, sialoproteiny) od HOXA10. Wykazano także, że HOXA10 bezpośrednio i niezależnie od RUNX2, reguluje transkrypcję niektórych genów w trakcie osteoblastogenezy [13]. Zaproponowano dwa mechanizmy działania HOXA10: jako składnik BMP2 – kaskady sygnałowej poprzedzającej zaangażowanie RUNX2 w indukcję genów osteoblastotworzenia oraz jako czynnik remodelujący chromatynę w regionach promotorowych genów specyficznych dla tkanki kostnej i wpływający poprzez represję, aktywację czy atenuację na ich transkrypcję, współdziałając w tym procesie ze złożonym kompleksem czynników i wielopoziomym mechanizmem regulacyjnym programowanego kościotworzenia [12].

DLX

DLX (*distal-less homeodomain*) to rodzina regulatorów transkrypcyjnych zawierających homeodomenę aktywowanych przez osteogeny sygnał BMP2. Ekspresja DLX3 jest zsynchronizowana z etapami wzrostu osteoblastów i indukowana przez BMP2. Świadczy to o udziale tej cząsteczki w szlakach regulowanych przez białka morfogenetyczne kości. Nadekspresja DLX3 w komórkach progenitorowych osteoblastów wpływa na ekspresję markerów ich różnicowania: kolagenu typu I, osteokalcyny, alkalicznej fosfatazy [6]. Zaobserwowano endogenną aktywację ekspresji *Runx2* przez dwa regulatory należące do tej klasy białek: DLX3 i DLX5. Podobnie jak HOXA10, także DLX3 i DLX5 mogą uczestniczyć w osteoblastogenezie poprzez aktywację ekspresji genu *Runx*, ale również bezpośrednio i innych genów w sposób niezależny od RUNX2. Wykazano

bowiem, że DLX3 i DLX5 regulują syntezę RUNX2, ale na różnych etapach zaawansowania procesu różnicowania osteoblastów: DLX3 we wczesnych fazach osteoblastogenezy, podczas gdy DLX5 w dojrzałych osteoblastach [14]. Białka DLX mogą przyłączyć się do promotora *Runx2*, jednak dopiero po usunięciu z jego cząsteczki produktu innego genu homeotycznego – białka MSX (*mesh-less homeodomain*) pełniącego zwykle funkcję klasycznego represora. Miejsce wiązania DLX3 i DLX5 obok RUNX2 zostało zidentyfikowane między innymi w regionie promotorowym genu osteokalcyny oraz alkalicznej fosfatazy. Wykazano jednak, że w mutantach delecyjnych pozbawionych genu *Dlx5* proces różnicowania tkanki kostnej zachodzi. Sugeruje to udział białka DLX5 jako regulatora ekspresji jednego ze składników złożonego kompleksu aktywacyjnego, a nie głównego aktywatora transkrypcyjnego genów zaangażowanych w różnicowanie komórek osteogennych [35]. Specyficzny mechanizm regulacji ekspresji genu *Runx*, ale także innych genów RUNX2-zależnych z udziałem produktów kilku klas genów homeotycznych zaproponowany został w kilku ostatnich pracach przez zespół Jane B Lian [12].

MSX

Przykładami klasycznych białek represorowych w procesie embriogenezy są produkty genów homeotycznych *Msh* – MSX (*mesh-less homeodomain*). U ssaków rodzinę tę stanowią trzy białka: MSX1, MSX2, MSX3, z których MSX2 wydaje się kluczowy dla procesu osteoblastogenezy. Jego brak powoduje liczne defekty w budowie szkieletu [12]. Wykazano antagonistyczną rolę MSX2 w stosunku do DLX5 podczas proliferacji i różnicowania osteoblastów. DLX5 ulega aktywacji w późnych etapach osteoblastogenezy, co jest skorelowane ze zwiększeniem poziomu białek charakterystycznych dla terminalnie zróżnicowanych osteoblastów, np. osteokalcyny, podczas gdy MSX2 negatywnie wpływa na te procesy. Na podstawie przeprowadzonych badań przyjęto uważać, że MSX2 stymuluje proces proliferacji, natomiast hamuje etap różnicowania komórek osteogennych i zaproponowano modele oddziaływania białek MSX2 i DLX5 [34]. Pierwszy z nich zakłada powstawanie kompleksu RUNX2-MSX2 inaktywującego ekspresję *Runx2* i RUNX2-zależnych genów. Ze wzrastającym poziomem DLX5, powstaje kompleks DLX5-MSX2, a białko RUNX2 zostaje uwolnione i może wówczas aktywować poszczególne geny. Drugi model funkcjonowania DLX5 i MSX2 mówi o konkurowaniu obu tych białek o miejsca wiązania w promotorach genów specyficznych dla procesu osteoblastogenezy i wzajemnym regulowaniu własnej ekspresji. Niezależnie od prawdziwości zaproponowanych modeli dla właściwego przebiegu procesu osteoblastogenezy najważniejsze wydaje się zachowanie właściwej równowagi pomiędzy poziomem MSX2 i DLX5, występujących na terenie komórki.

WNT

Białka WNT (*Wingless-type*) są glikoproteinami uczestniczącymi w regulacji rozwoju embrionalnego, a także w proliferacji i różnicowaniu wielu typów komórek, w tym osteoblastów. Przekazywanie sygnału w komórce za pośrednictwem ścieżki sygnałowej zależnej od WNT odbywa się kilkoma drogami, które zawsze aktywo-

wane są po związaniu białek WNT z receptorem śródbłonkowym Frizzled (Fzd) i jego koreceptorem. Aktywacja określonej ścieżki zależy od rodzaju liganda WNT oraz od warunków panujących w komórce. Obecnie wykryto 19 ligandów WNT oraz 10 różnych podtypów receptorów Fzd. Udowodniono, że związanie białek WNT z receptorem śródbłonkowym Fzd i jego koreceptorem, białkiem LRP-5/6 (*lipoprotein-related protein 5 and 6*) na powierzchni progenitorowych komórek osteoblastów, hamuje degradację β -kateniny. Następuje wtedy wzrost ilości β -kateniny w cytoplazmie, co skutkuje jej transportem do jądra komórkowego i stymulacją ekspresji genów warunkujących różnicowanie osteoblastów. Proces ten odbywa się za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych, w tym RUNX2 [36, 11].

PODSUMOWANIE

Kość jest tkanką wysoce dynamiczną ulegającą stale procesowi przebudowy poprzez osteogenezę i osteoresorpcję. Zaburzenie równowagi pomiędzy tymi procesami mogą doprowadzić do patologii kości, takich jak np. osteoporoza, w której obserwuje się przewagę osteoresorpcji nad procesem kościotworzenia. Homeostaza ta uzależniona jest od wielkości populacji komórek tkanki kostnej oraz ich aktywności, która jest regulowana poprzez czynniki transkrypcyjne specyficzne tkankowo, jak i szereg produktów genów homeotycznych aktywnych zarówno w trakcie organizacji tkanek i narządów w okresie embrionalnym, jak i w dojrzałej tkance kostnej.

Czynniki transkrypcyjne regulują ekspresję genów aktywnych w określonej tkance poprzez interakcje z kofaktorami, koaktywatorami, kompleksami aktywującymi chromatynę czy wreszcie z podstawowymi zespołami transkrypcyjnymi [8, 16, 25]. Prolifercja i różnicowanie komórek progenitorowych osteoblastów kontrolowane jest przez wiele szlaków, w tym także przez kaskadę fosforylacyjną, w której uczestniczy szlak kinaz białkowych PKC (*protein kinase C*), PKA (*protein kinase A*), MAP (*mitogen-activated protein kinase*) czy ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) [37, 22]. Kluczowym czynnikiem uczestniczącym w bezpośredniej aktywacji genów specyficznych dla osteogenezy jest białko RUNX2, co zostało potwierdzone zarówno dla komórek ludzkich, jak i zwierzęcych. Niekwestionowana jak dotąd, pozostaje rola Osterix w późnych etapach różnicowania preosteoblastów w dojrzałe komórki występujące w tkance kostnej. Na różnicowanie komórek linii osteogennej wpływają także czynniki uważane do tej pory za białka biorące jedynie udział w embriogenezie, np. produkty genów homeotycznych Hoxa10, Dlx, Wnt. Ich udział w regulacji tego procesu ma złożony charakter i wymaga kontynuowania prac doświadczalnych, które zapewniłyby wyjaśnienie ich roli i oddziaływań z innymi uczestnikami kaskady sygnałowej w procesie osteoblastogenezy. Obok wymienionych powyżej regulatorów, ważną rolę w osteogenezie odgrywają także czynniki niespecyficzne dla tkanki kostnej, takie jak: insulinopodobne czynniki wzrostu – IGF (*insulin-like growth factor*), czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), transfor-mujący czynnik wzrostu beta (TGF- β). Niezwykle ważne

są wzajemne oddziaływania i proporcje pomiędzy poszczególnymi czynnikami regulacyjnymi. Wiele badań przeprowadzono na komórkach szczurzych, mysich, czy ludzkich lini komórkowych, które są komórkami pochodzącymi z osteosarkomy (UMR-106, ROS17/2.8, SAOS-2, HOS). Jednak szlaki regulacyjne i drogi transdukcji sygnału w tych układach doświadczalnych mogą nie odpowiadać tym występującym w zdrowych, ludzkich komórkach tkanki kostnej. Niezwykle ważne jest zatem usystematyzowanie wiadomości w tym zakresie oraz dalsze poszerzenie naszej wiedzy na podstawie obserwacji z użyciem ludzkich, prawidłowych komórek osteogennych, dla lepszego poznania procesu proliferacji, różnicowania oraz podstaw molekularnych mechanizmów rozwoju i regeneracji tkanki kostnej. Z punktu widzenia praktyki klinicznej, w tym zwłaszcza w przypadkach konieczności substytucji tkanki kostnej, nie mniej ważne wydaje się poznanie biologicznych interakcji między materiałem implantacyjnym wykorzystywanym w medycynie regeneracyjnej kości, a aktywnością transkrypcyjną implantowanych komórek. Z pewnością wiedza ta przyczyni się do możliwości sterowania funkcjami komórek kości, podczas gojenia się skomplikowanych złamań czy też uzupełniania ubytków tkanki kostnej z wykorzystaniem metod inżynierii tkankowej.

PODZIĘKOWANIA

Pragniemy podziękować dr hab. Małgorzacie Lewandowskiej-Szumieł za cenne uwagi dotyczące tekstu.

LITERATURA

- [1] AMORIM BR, OKAMURA H, YOSHIDA K, QIU L, MORIMOTO H, HANEJI T. The transcriptional factor Osterix directly interacts with RNA helicase A. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **355**: 347–351.
- [2] BAEK WY, LEE MA, JUNG JW, KIM SY, AKIYAMA H, DE CROMBRUGGHE B, KIM JE. Positive Regulation of Adult Bone Formation by Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix. *J Bone Miner Res* 2009; **24**: 1055–1065.
- [3] BESSA PC, CASAL M, REIS RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2008; **2**: 81–96.
- [4] BESSA PC, CASAL M, REIS RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med* 2008; **2**: 1–13.
- [5] BOBIS S, JAROCHA D, MAJKA M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; **44**: 215–230.
- [6] CHOI SJ, SONG IS, RYU OH, CHOI SW, HART PS, WU WW, SHEN RF, HART TC. A 4 bp deletion mutation in DLX3 enhances osteoblastic differentiation and bone formation *in vitro*. *Bone* 2008; **42**: 162–171.
- [7] CHU S, FERRO TJ. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene* 2005; **348**: 1–11.
- [8] COOPER JA, JR., BAILEY LO, CARTER JN, CASTIGLIONI CE, KOFRON MD, KO FK, LAURENCIN CT. Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament. *Biomaterials* 2006; **27**: 2747–2754.
- [9] DE FRUTOS CA, DACQUIN R, VEGA S, JURDIC P, MACHUCA-GAYET I, NIETO MA. Snail1 controls bone mass by regulating Runx2 and VDR expression during osteoblast differentiation. *EMBO J* 2009; **28**: 686–696.
- [10] FLORES MV, TSANG VW, HU W, KALEV-ZYLINSKA M, POSTLETHWAIT J, CROSIER P, CROSIER K, FISHER S. Duplicate zebrafish runx2 orthologues are expressed in developing skeletal elements. *Gene Expr Patterns* 2004; **4**: 573–581.

- [11] GIULIANI N, COLLA S, MORANDI F, LAZZARETTI M, SALA R, BONOMINI S, GRANO M, COLUCCI S, SVALDI M, RIZZOLI V. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood* 2005; **106**: 2472–2483.
- [12] HASSAN MQ, TARE RS, LEE SH, MANDEVILLE M, MORASSO MI, JAVED A, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem* 2006; **281**: 40515–40526.
- [13] HASSAN MQ, TARE R, LEE SH, MANDEVILLE M, WEINER B, MONTECINO M, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB. HOXA10 controls osteoblastogenesis by directly activating bone regulatory and phenotypic genes. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 3337–3352.
- [14] HASSAN MQ, SAINI S, GORDON JA, VAN WIJNEN AJ, MONTECINO M, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB. Molecular switches involving homeodomain proteins, HOXA10 and RUNX2 regulate osteoblastogenesis. *Cells Tissues Organs* 2009; **189**: 122–125.
- [15] HATTA M, YOSHIMURA Y, DEYAMA Y, FUKAMIZU A, SUZUKI K. Molecular characterization of the zinc finger transcription factor, Osterix. *Int J Mol Med* 2006; **17**: 425–430.
- [16] ISA ZM, SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, SEABOLD D, STANFORD CM. Effects of fluoride-modified titanium surfaces on osteoblast proliferation and gene expression. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; **21**: 203–211.
- [17] JEONG JH, JIN JS, KIM HN, KANG SM, LIU JC, LENGNER CJ, OTTO F, MUNDLOS S, STEIN JL, VAN WIJNEN AJ, LIAN JB, STEIN GS, CHOI JY. Expression of Runx2 transcription factor in non-skeletal tissues, sperm and brain. *J Cell Physiol* 2008; **217**: 511–517.
- [18] KOGA T, MATSUI Y, ASAGIRI M, KODAMA T, DE CROMBRUGGHE B, NAKASHIMA K, TAKAYANAGI H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005; **11**: 880–885.
- [19] KOMORI T. [Mechanism of transcriptional regulation by Runx2 in osteoblasts]. *Clin Calcium* 2006; **16**: 801–807.
- [20] LEONG WF, ZHOU T, LIM GL, LI B. Protein palmitoylation regulates osteoblast differentiation through BMP-induced osterix expression. *PLoS ONE* 2009; **4**: e4135.
- [21] LI Y, XIAO Z. Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Med Hypotheses* 2007; **68**: 169–175.
- [22] LIEDERT A, KASPAR D, CLAES L, IGNATIUS A. Signal transduction pathways involved in mechanical regulation of HB-GAM expression in osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **342**: 1070–1076.
- [23] MAKITAN, SUZUKI M, ASAMI S, TAKAHATA R, KOHZAKI D, KOBAYASHI S, HAKAMAZUKA T, HOZUMI N. Two of four alternatively spliced isoforms of RUNX2 control osteocalcin gene expression in human osteoblast cells. *Gene* 2008; **413**: 8–17.
- [24] MARIE PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2008; **473**: 98–105.
- [25] MASAKI C, SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, SEABOLD D, STANFORD C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. *Clin Oral Implants Res* 2005; **16**: 650–656.
- [26] NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER RR, DE CROMBRUGGHE B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; **108**: 17–29.
- [27] NEMOTO Y, HIGUCHI K, BABA O, KUDO A, TAKANO Y. Multinucleate osteoclasts in medaka as evidence of active bone remodeling. *Bone* 2007; **40**: 399–408.
- [28] NOHE A, KEATING E, KNAUS P, PETERSEN NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 2004; **16**: 291–299.
- [29] OKAMURA H, AMORIM BR, WANG J, YOSHIDA K, HANEJI T. Calcineurin regulates phosphorylation status of transcription factor osterix. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **379**: 440–444.
- [30] OSY CZKA AM, LEBOY PS. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology* 2005; **146**: 3428–3437.
- [31] PAZ J, WADE K, KIYOSHIMA T, SODEK J, TANG J, TU Q, YAMAUCHI M, CHEN J. Tissue- and bone cell-specific expression of bone sialoprotein is directed by a 9.0 kb promoter in transgenic mice. *Matrix Biol* 2005; **24**: 341–352.
- [32] PHILIPSEN S, SUSKE G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 2991–3000.

- [33] PHIMPHILAI M, ZHAO Z, BOULES H, ROCA H, FRANCESCHI RT. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res* 2006; **21**: 637–646.
- [34] RYO HM, LEE MH, KIM YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene* 2006; **366**: 51–57.
- [35] SAMEE N, GEOFFROY V, MARTY C, SCHILTZ C, VIEUX-ROCHAS M, LEVI G, DE VERNEJOL MC. Dlx5, a positive regulator of osteoblastogenesis, is essential for osteoblast-osteoclast coupling. *Am J Pathol* 2008; **173**: 773–780.
- [36] WESTENDORF JJ, KAHLER RA, SCHROEDER TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004; **341**: 19–39.
- [37] WIREN KM, TOOMBS AR, ZHANG XW. Androgen inhibition of MAP kinase pathway and Elk-1 activation in proliferating osteoblasts. *J Mol Endocrinol* 2004; **32**: 209–226.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 13.06. 2009 r.

Przyjęto: 21.09. 2009 r.

Małgorzata Witkowska-Zimny

Zakład Biofizyki i Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny;

ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

E-mail: mwitkowska@wum.edu.pl