



Eduardo Villarreal-Ramírez

Doctorado en Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



**Posgrado en ciencias Biomédicas
Instituto de Química**

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y
ESTRUCTURAL DE UNA PROTEÍNA
RECOMBINANTE DEL CEMENTO RADICULAR,
CEMP1**

T E S I S

Que para obtener el grado de académico de:

Doctor en ciencias

P r e s e n t a

M. en C. Eduardo Villarreal Ramírez



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO DE QUÍMICA



PDCB/grad/138/Jur/2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 247ª del 7 de octubre de 2009, designó el siguiente jurado para examen grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **EDUARDO VILLARREAL RAMÍREZ**, con número de cuenta 91022006, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y ESTRUCTURAL DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL CEMENTO RADICULAR, CEMP1"**, dirigida por el Dr. Abel Moreno Cárcamo..

Presidente: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Secretario: Dr. Jaime Mas Oliva
Vocal: . Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Vocal : Dr. Lauro Bucio Galindo
Vocal : Dr. Rafael A. Zubillaga Luna.

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, a 8 de octubre de 2009

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
RESPONSABLE
INSTITUTO DE QUÍMICA

DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. Mariano Martínez Vázquez
Coordinación de PDCB

FMM/alcM

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcB.unam.mx> E-mail: pdcB@servidor.unam.mx

Eduardo Villarreal-Ramírez

Doctorado en Ciencias Biomédicas

A Higinio Arzate

AGRADECIMIENTOS

APOYOS FINANCIEROS

A la dirección general de asuntos del personal académico (DGAPA) de la UNAM por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación, bajo el proyecto IN200908.

Al consejo nacional para la ciencia y la tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de esta investigación, bajo el proyecto 48638.

Al CONACYT por la beca otorgada bajo el número 172740.

A la coordinación de estudios de posgrado de la UNAM por el programa de fomento a la graduación.

COMITÉ TUTORAL

A mí comité tutorial, por haber sido guías, luces, durante todo mi periodo de doctorado. Por haber estado siempre atentos a esta investigación y dar su brillante crítica.

Al Dr. Arzate Higinio trabajador incansable, que dedica todo su tiempo a la noble tarea de la investigación científica. Hombre que ha abierto una brecha importante en la investigación de la biología bucal y la mineralización de los órganos dentarios. Por todas las enriquecedoras charlas y tu apoyo.

Al Dr. Mas oliva Jaime por su severidad, buen juicio, creador de un ambiente de trabajo fructífero en su laboratorio. Por invitarme a trabajar en su laboratorio y darme muchas lecciones. Aprecio el tiempo que me ha brindado.

Al Dr. Moreno Cárcamo Abel, tutor principal de esta tesis. Le agradezco permitirme trabajar en su equipo y mostrarme como debe ser la enseñanza.

A la Dra. Rodríguez Romero Adela, por sus contribuciones al trabajo experimental. Además de ser diseñadora activa de la presente tesis por sus acertados y puntuales comentarios.

Sin ellos el presente trabajo no hubiera sido posible.

REVISIÓN Y APROBACIÓN DE TESIS

Al Dr. Jaime Mas Oliva, por sus criticas invaluable para mi desempeño

Al Dr. Rafael Zubillaga Luna por haber aceptado ser parte del comité evaluador de esta tesis. Por sus aportaciones desde un punto de vista que enriquece el trabajo.

Al Dr. Lauro Bucio Galindo por participar en la revisión de esta tesis. Sus aportaciones desde el punto de vista físico.

Al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, excelente profesor y maestro. Un gran académico capaz de brindar su tiempo y conocimiento de una manera siempre amable, incluso para

quienes no somos sus alumnos directos.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García, quien tiene un gran amor por la ciencia y su divulgación en los mas insólitos lugares.

ASESORÍA ACADÉMICA Y TÉCNICA

Al Facultad y posgrado de Odontología de la UNAM y a todo su personal

Al Instituto de Química de la UNAM y a todo su personal.

Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y a todo su personal.

A la Dra. Argelia Almaguer Flores

A la Dra. Margarita Ivet Gil Chavarría

A la Dra. Deyanira Fuentes Silva

A la Dra. Cristina Piña Barba

A la Dra. Dra. Laurie Ann Ximénez Fyvie

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa

Al Dr. Pedro Bosch Giral

Al Dr. Enrique García Hernández

Al Dr. Miguel Herrera Robledo

Al Dr. José Reyes Gasga

Al Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda

Al Dr. Alejandro Sosa Peinado

A la M. en C. Blanca .Delgado Coello

Al M. en C. Jorge Bravo Martinez

Al M en C. Roberto Hernandez del LCM

Al Quim. Javier de la Mora Bravo

A nuestra secretaria de entidad académica, Alma Lidia Cortés Montes.

A todo el personal del Posgrado en doctorado de Ciencias Biomédicas.

A todo el personal de las bibliotecas del IFC, IQ y Posgrado de Odontología de la UNAM.

Al staff del laboratorio de biología periodontal y tejidos mineralizados: Juan Luis, Mara, Ana, Silvia, Pedro, Janeth, Enrique, Lia, Gonzalo y Lupita.

Al staff del 322N-IFC: Salvador, Víctor, Ernesto, Paola, Sandra, Azucena, Enrique, Armando, Danaí, Luis, Fatima, Malena y Sra Lupita.

PERSONALES

A mis amorosos y ejemplares Padres.

A mi novia Ivetcita Gil de mi corazón.

A mis inseparables hermanos.

Al equipo de handball de la UNAM y mis entrenadores: Gheorghe Gruia Marinescu, Lautaro Ponce y Antonio Favila.

A todos gracias, sin ustedes esto sin duda no habría sido posible.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	7
I. Biomineralización	8
II. Periodonto	9
III. Encía	10
IV. Hueso Alveolar	11
V. Ligamento periodontal	12
VI. Cemento Radicular	13
VII. Clasificación del Cemento Radicular	15
VIII. Proteínas Colágenas	16
IX. Proteínas no colágenas en la biomineralización	19
X. Proteína del Cemento 1 (CEMP1)	27
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Cultivo celular	32
2. Clonación y expresión de la hrCEMP1	32
3. Cromatografía de afinidad a iones metálicos	33
4. Cromatografía de afinidad a la hidroxiapatita	33
5. Inmunotransferencias	34
6. Cuantificación de puentes disulfuro en CEMP1	34
7. Determinación de los estados de agregación de CEMP1	35
8. Dicroísmo circular	35
9. Determinación de glicosilaciones en CEMP1	35
10. Desglicosilación de CEMP1	37
11. Fosforilaciones en CEMP1	37
12. Cristalización de fosfatos de calcio <i>in vitro</i>	38
13. Microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDX)	38
14. Patrón de difracción cristalino por microscopía electrónica de transmisión	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1. Sobreexpresión de la proteína recombinante CEMP1 y purificación.	40
2. Dicroísmo circular	41
3. Dispersión dinámica de luz	44
4. Puentes disulfuro	44
5. Glicosilaciones	46
6. Desglicosilaciones	46
7. Fosforilaciones en CEMP1	50
8. Columna de afinidad hidroxiapatita	52
9. Cristalización de fosfatos de calcio <i>in vitro</i>	55
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
APÉNDICE A PUBLICACIONES	72

RESUMEN

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado con características únicas; no presenta irrigación sanguínea, no tiene drenaje linfático, carece de inervación y posee un bajo recambio metabólico. Este tejido cubre la superficie radicular de los órganos dentarios y media la inserción de las fibras de colágenas (fibras de Sharpey), uniendo al diente con el hueso alveolar. El conocimiento sobre el complejo proceso que regula el metabolismo normal del cemento radicular sigue siendo limitado a la fecha. El cemento radicular se encuentra constituido por una fase mineral de hidroxiapatita, aproximadamente 50%, y de una fase orgánica de proteínas colágenas y no colágenas, aproximadamente 50%. Las proteínas no colágenas se han relacionado con el proceso de la cementogénesis tales como la osteopontina (OPN), la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN). Se ha sugerido que estas fosfoglucoproteínas son necesarias para la iniciación y la maduración de la formación de cristales. Sin embargo, estas moléculas no son cemento específicas. El cemento radicular contiene proteínas que parecen ser específicas del tejido, y estas incluyen a la proteína de adhesión de cemento (CUP) y la proteína CEMP1. La proteína CEMP1 inmunopurificada a partir de cementoblastos promueve la adhesión de células del ligamento periodontal, células osteoblásticas del hueso alveolar y fibroblastos gingivales de una manera dosis dependiente. La proteína CEMP1 se clonó recientemente y en experimentos *in vitro* presenta funciones tales como regulador del comportamiento cementoblástico y como un inductor de la diferenciación de células no osteogénicas hacia un fenotipo cementoblástico/osteoblástico. CEMP1 se encuentra altamente expresada a nivel de URNm, así como también a nivel de proteína en cementoblastos, en subpoblaciones celulares del ligamento periodontal, así como en las zonas perivasculares del ligamento periodontal y espacios endosteales de hueso alveolar. Actualmente el papel fisiológico de CEMP1 no se ha comprendido en su totalidad. En este trabajo de tesis hemos sobreexpresado la proteína recombinante humana CEMP1 en una línea celular de

fibroblastos gingivales humanos. La proteína purificada (hrCEMP1) tiene una M_r de 50, 000. La caracterización de hrCEMP1 indica que su estructura secundaria se compone principalmente de hojas beta (55%), mientras que las conformaciones al azar y alfa hélice corresponden al 35% y 10%, respectivamente. Se demostró que hrCEMP1 se encuentra N-glicosilada, fosforilada y posee gran afinidad por la hidroxiapatita. Aún más importante, nuestros resultados muestran que hrCEMP1 desempeña un papel importante durante el proceso de biomineralización, promoviendo la nucleación y la formación de cristales de fosfato octacálcico (OCP). Estas características hacen de CEMP1 un muy buen candidato para aplicaciones biotecnológicas para alcanzar la regeneración del cemento radicular y/o regeneración de tejidos óseos.

ABSTRACT

Cementum is a unique avascular mineralized connective tissue that covers the root dentine and provides the interface throughout the root surface is anchored to the collagen fibers of the periodontium (Sharpey's fibers). The knowledge about the complex process that regulates the cementum metabolism remains limited to date. Cementum is composed by 50% hydroxyapatite and 50% organic material, collagen and noncollagenous proteins. The non-collagen proteins that have been implicated in the process of cementogenesis are osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP) and osteocalcin (OCN). It has been suggested that these phosphoglycoproteins are necessary for the initiation and maturation of crystal formation. However, these molecules are not cementum-specific. Cementum contains molecules that appear to be specific, including the cementum attachment protein (CAP) and cementum protein 1 (CEMP1). Immunopurification of CEMP1 from cementoblasts promotes attachment of periodontal ligament cells, alveolar bone-derived cells, and gingival fibroblasts in a dose-dependent manner. Cementum protein 1 (CEMP1) has been recently cloned, and in vitro experiments have shown functions as a regulator of cementoblast behavior and inducer of differentiation of non-osteogenic cells toward a cementoblastic/osteoblastic phenotype. CEMP1 is highly expressed at the protein and mRNA levels in cementoblast, periodontal ligament cell subpopulations progenitor cells of the paravascular zone in the periodontal ligament and endosteal spaces of bone. Additionally the physiological role of CEMP1 has not been elucidated. In this study, we have produced a full-length human recombinant CEMP1 protein in a human gingival fibroblast cell line. The purified protein (hrCEMP1) has a Mr 50,000. Characterization of hrCEMP1 indicates that its secondary structure is mainly composed of beta-sheet (55%), where random coil and alpha helix conformations correspond to 35% and 10%, respectively. It was found that hrCEMP1 is N-glycosylated, phosphorylated and possesses strong affinity for hydroxyapatite. Even more important, our results show that hrCEMP1 plays a role during the

biomineralization process by promoting octacalcium phosphate (OCP) crystal nucleation. These features make CEMP1 a very good candidate for biotechnological applications in order to achieve cementum and/or bone regeneration.

ABREVIATURAS

A_{280} --- Absorbancia de 280 nm
 A_{324} --- Absorbancia de 324 nm
AMBN --- Ameloblastina
AMEL --- Amelogenina
Asp --- Ácido aspártico
BMP --- Proteína morfogénica ósea
BSA --- Albumina bovina sérica
BSP --- Sialoproteína ósea
CAP --- Proteína de adhesión del cemento radicular
CEMP1 --- Proteína del cemento 1
CGF --- Factor de crecimiento del cemento
D --- Dentina
DC --- Dicroísmo circular
DLS --- Dispersión Dinámica de Luz
DMEM --- Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMP1 --- Proteína de la matriz de la dentina 1
E --- Esmalte
EITF --- Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
ENAM --- Enamelina
FGH --- Fibroblastos gingivales humanos
Gla --- Ácido γ carboxiglutámico
Glu --- Ácido glutámico
HA --- Hidroxiapatita
hrCEMP1 --- Proteína recombinante humana CEMP1
IGF-1 --- Factor de crecimiento parecido a la insulina
IMAC --- Cromatografía de afinidad a iones metálicos
LPD --- Ligamento periodontal
MEB --- Microscopio electrónico de barrido
MET --- Microscopio electrónico de transmisión
 M_r --- Movilidad relativa
OC --- Osteocalcina
OCP --- Fosfato octacalcico
OPN --- Osteopontina
P --- Pulpa
PBS --- Solución amortiguadora de fosfato de sodio y cloruro de sodio.
rpm --- Revoluciones por minuto
SDS-PAGE --- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Ser --- Serina
SFB --- Suero fetal bovino
SIBLING --- Glicoproteínas tipo N y con ligandos a integrinas
SPARC --- Osteonectina
Thr --- Treonina
TFE --- Trifluoroetanol
TUFT1 --- Tuftelina
WB --- Western blot

INTRODUCCIÓN

La biomineralización ha tomado gran relevancia en las dos últimas décadas. Diversos investigadores se han dado a la tarea de estudiar el origen, componentes y mecanismos que regulan este fenómeno, con la finalidad de reproducirlo *in vitro* para desarrollar nuevos materiales¹ y regular la regeneración de tejidos mineralizados *in vivo*².

El papel de estas proteínas de la matriz extracelular respecto al fenómeno de la biomineralización no se ha dilucidado completamente a la fecha³. En este aspecto, las proteínas del cemento radicular parecen participar activamente en la regulación de la nucleación, crecimiento, tamaño y morfología de los cristales de hidroxiapatita (HA) *in vitro* e *in vivo*. CEMP1 es una proteína recientemente reportada y específica del tejido del cemento radicular, que sirve como único marcador biológico de este tejido a la fecha. CEMP1 es una proteína que se expresa espacialmente a través de la longitud del cemento radicular (ambos acelular y celular) y en células madre mesenquimales del ligamento periodontal⁴. Asimismo, CEMP1 regula la formación de la matriz mineralizada extracelular *in vitro*⁵. Estos datos en conjunto sugieren que la CEMP1 juega un papel clave durante la biomineralización del cemento radicular y probablemente de otros tejidos mineralizados.

I. Biomineralización

La biomineralización es un área de estudio multidisciplinaria que abarca tanto el terreno inorgánico como el orgánico y que estudia los procesos y mecanismos que utilizan los seres vivos para formar y depositar minerales. La biomineralización estudia la formación, estructura y propiedades de sólidos inorgánicos depositados por los seres vivos para formar biominerales^{6,3}. Los biominerales llegan a ser, incluso, especie-específicos y con muy distintas funciones. Este proceso biológico aún no se encuentra esclarecido por completo^{7,8}.

La biomineralización se encuentra difundida en todos los reinos de los seres vivos y se observa en 55 phyla. Estos organismos son capaces de formar alrededor de 60 diferentes tipos de minerales. Estos minerales se llaman en la literatura científica: minerales biogénicos, cerámicas biológicas, biominerales o biocompuestos⁶. Los biominerales están formados de sustancias inorgánicas (minerales), unidas a macromoléculas (lípidos, proteínas y polisacáridos). Los minerales son muy diversos, algunos de los más comunes son: carbonatos, fosfatos de calcio, silicatos, sulfatos y óxidos^{9,10}.

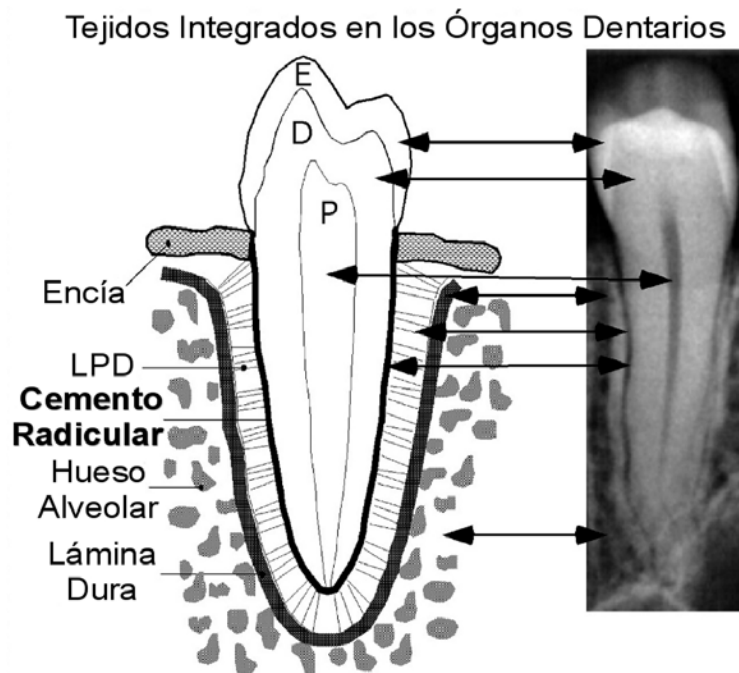
En los organismos multicelulares los biominerales son sintetizados mediante una serie de procesos coordinados por células; por ejemplo, los osteoblastos en el hueso y los odontoblastos en la dentina¹¹. Los tejidos mineralizados son formados dentro de una matriz extracelular. Las células y la matriz extracelular controlan de forma específica y ordenada el intervalo de tamaño, la geometría, la simetría, la orientación cristalina y la distribución de los cristales de hidroxiapatita, resultando partículas minerales dentro de proteínas estructurales. Las funciones de los biominerales son amplias, siendo una de las más conocidas proporcionar una mayor resistencia a la compresión a los tejidos^{3,12}.

En la cavidad bucal se localizan cuatro tejidos mineralizados: hueso alveolar, esmalte, dentina y cemento radicular. Tres de ellos forman parte de los órganos dentarios, pero se considerará al cemento radicular y mencionaremos brevemente a los tejidos asociados a éste.

II. Periodonto

El periodonto (peri: alrededor; odonto: diente) se define como el conjunto de tejidos de soporte de los órganos dentarios, formado por los siguientes tejidos: encía, ligamento periodontal (LPD), hueso alveolar y cemento radicular (Fig 1). La función principal del periodonto es permitir la inserción de los órganos dentarios dentro de los alveolos óseos, por lo cual se anclan a los procesos maxilar y mandibular, y mantiene la integridad de la función masticatoria. En estado de salud, estos tejidos se desarrollan y funcionan como una unidad; sin embargo, si alguno de estos cuatro tejidos presenta una alteración patológica sin tratamiento, la repercusión en los demás genera inestabilidad y puede provocar la pérdida de los órganos dentarios¹³. Por tanto, el periodonto es una unidad biológica funcional que además puede tener ciertos cambios con la edad y a consecuencia de alteraciones en el medio bucal^{14,15,16}.

El desarrollo de los tejidos periodontales tiene lugar durante la odontogénesis. Este proceso inicia en una fase temprana del desarrollo, cuando las células de la cresta neural migran hacia el primer arco branquial. En esta posición las células de la cresta neural forman una banda de ectomesénquima por debajo del epitelio del estomatodeum (la cavidad bucal primitiva). Después de que las células de la cresta neural han alcanzado su localización en los espacios maxilares y mandibulares, el epitelio del estomatodeum libera factores que inician las interacciones epitelio-mesénquima y se forma la lamina dental. Posteriormente, por medio de una serie de procesos coordinados, se inician los distintos estadios de la odontogénesis (estado de yema, estado de casquete y estado de campana con desarrollo de la raíz), y finalmente se forman los órganos dentarios y sus tejidos periodontal circundantes, incluido el hueso alveolar¹⁶.



III. Encía

Compuesta de epitelio gingival y tejido conectivo, forma parte de la mucosa bucal, recubre los procesos alveolares de la mandíbula y la maxila rodeando los cuellos de los dientes. La mucosa bucal es una membrana continua con la piel de los labios y con el epitelio de la faringe; puede ser dividida en tres regiones: 1) La mucosa masticatoria (incluye la encía y el paladar), 2) La mucosa especializada (cubre el dorso de la lengua) y 3) La mucosa de recubrimiento (recubre las regiones restantes). La encía, como parte de la mucosa masticatoria, rodea las porciones cervicales de los dientes y recubre el proceso alveolar.

La encía obtiene su forma final y su textura al tener la erupción de los dientes. Anatómicamente esta dividida en encía marginal y encía insertada. El color de la encía en estado de salud es rosa. Sin embargo, esto varía por la pigmentación de cada persona. La forma, contorno y la textura son determinadas por las estructuras subyacentes (hueso alveolar y eminencias radiculares). Es de consistencia dura y firme, se encuentra estrechamente adherida al hueso^{16,17}. Sus componentes principales son fibras de colágena, proteoglicanos, fibronectina,

tenascina y elastina en proporciones variables (60%), fibroblastos (5%), vasos sanguíneos y estructuras nerviosas (aproximadamente 35%). Su función principal es de protección para las estructuras profundas^{14,16}.

IV. Hueso alveolar

El hueso alveolar es un tejido conjuntivo mineralizado que anatómicamente contiene las raíces dentales de los maxilares superiores como de los inferiores, siendo el soporte primario de los órganos dentarios. El hueso alveolar, junto con el ligamento periodontal y el cemento radicular, constituyen el sistema de inserción y soporte de los dientes, cuya función principal es distribuir y reabsorber las fuerzas generadas por los contactos dentarios¹⁵. Aunque fundamentalmente comparable a otros tejidos óseos del cuerpo humano, el hueso alveolar está sujeto a un continuo y rápido remodelamiento del tejido debido a las demandas del proceso de masticación y a la erupción de los dientes. Este rápido remodelamiento del tejido también es contraproducente en la progresión de la enfermedad periodontal¹⁸.

Se han realizado pocos estudios sobre la biología molecular y celular de este tejido¹⁸; a pesar de ello, se sabe que el tejido está constituido por dos fases, la orgánica formada principalmente de fibras de colágena, y la inorgánica, que es el carbonato de hidroxapatita. La colágena tipo I constituye aproximadamente el 95% de la matriz orgánica; el remanente 5% está compuesto por numerosas proteínas no colágenas y proteoglicanos. La matriz orgánica es fortalecida por depósitos de sales de calcio¹⁹. Las sales minerales depositadas en la matriz orgánica del hueso constituyen el 50% de la composición total del tejido y están bajo control celular. La fase mineral se encuentran constituidas principalmente por calcio y fosfatos en forma de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ o hidroxapatita (HA) en cristales de forma cilíndrica con diámetros de 20 a 70 Å y longitudes de 50 a 100 Å.

Las apófosis alveolares, denominadas también procesos alveolares y bordes alveolares, forman parte de los huesos maxilares superior e inferior; no existe un límite anatómico preciso entre la porción basal o cuerpo del maxilar y los procesos alveolares propiamente dichos, pero si existen diferencias en cuanto la

funcionalidad de ambas estructuras. Los procesos alveolares corresponden a las porciones de los huesos maxilares que rodean y contiene los alvéolos dentarios que alojan la o las raíces de los órganos dentarios. La porción del hueso alveolar que limita direccionalmente al alvéolo, o sea aquella en la que se insertan las fibras periodontales, pertenece al periodoncio de inserción, junto con el cemento y el ligamento periodontal, formando el aparato de inserción del órgano dentario¹³.

V. Ligamento periodontal

El desarrollo del ligamento periodontal inicia con la formación de la raíz de los órganos dentarios, antes de su erupción. La proliferación continua del epitelio externo e interno del esmalte forma el asa cervical en la etapa de yema de la odontogénesis. Esta vaina de células epiteliales crece en forma apical y forma la vaina radicular epitelial de Hertwig, entre la papila dental y el folículo dental¹³. Después que las células de la vaina radicular epitelial de Hertwig se han separado, formando los restos epiteliales de Malassez, se inicia la separación de las células del folículo dentario emigrando hacia la superficie externa de la dentina radicular recién formada. Estas células foliculares migratorias se diferencian luego en cementoblastos y depositan cemento sobre la superficie de la dentina. Mientras, otras células del folículo dentario se diferencian en fibroblastos, los cuales sintetizan las fibras y la sustancia fundamental del ligamento periodontal. Las fibras del ligamento periodontal quedan incluidas en el cemento recién desarrollado y el hueso alveolar, las cuales al erupcionar el órgano dentario se orientan de manera característica²⁰.

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado y ampliamente vascularizado, que ocupa el espacio entre el cemento y el hueso alveolar. En la dirección coronal, el ligamento periodontal es continuo con la lamina propia de la encía y es separado de ésta por paquetes de fibras de colágena. El ligamento periodontal tiene la forma de un reloj de arena y la región más estrecha se encuentra a nivel medio de la raíz. El ligamento periodontal tiene un grosor de 0.15 mm a 0.4 mm, el tejido presenta un progresivo decremento en su grosor

conforme avanza la edad de las personas. Éste es un tejido conectivo fibroso producido principalmente por fibroblastos, con contribuciones menores de elementos vasculares¹⁷. Los fibroblastos del ligamento periodontal son poblaciones heterogéneas de células relacionadas en el mantenimiento, reparación y regeneración del propio ligamento periodontal y de tejidos adyacentes²¹. La función principal del ligamento periodontal es dar soporte al órgano dentario, manteniéndolo en su alvéolo, soportar las fuerzas masticatorias, por medio de fibras de colágena (fibras de Sharpey) dispuestas en forma de haces que se insertan en el hueso alveolar y en el cemento radicular; es esencial para la movilidad de los dientes y además actúa como receptor sensorial, necesaria para el posicionamiento oclusal^{14,16}.

VI. Cemento radicular

El cemento radicular, se describió en 1835 por dos pupilos de Purkinje (Fraenkel y Raschkow)²². Sin embargo, permanece como un tejido pobremente definido a nivel celular y molecular²³. Uno de los principales problemas para su análisis bioquímico es su distribución tan limitada²⁴.

El cemento radicular es un tejido mineralizado especializado que cubre la superficie de la raíz de los órganos dentarios y ocasionalmente en porciones de la corona¹⁶. A pesar de tener conocimiento de su existencia desde hace muchos años, el cemento radicular es el tejido del periodonto menos estudiado. De hecho, se conoce poco sobre su origen, diferenciación de los cementoblastos y la dinámica celular del tejido²³. La falta de conocimiento del tejido se encuentra relacionada con la dificultad para aislar una línea celular de cementoblastos y obtener extractos del tejido. El cemento llega a tener un grosor en la región cervical de 10 a 15 μm y en la región apical de 50 a 200 μm ¹⁴.

A diferencia del esmalte y la dentina, los cuales son tejidos con una clara diferencia en estructura y composición en su matriz extracelular cuando se comparan con el hueso, el cemento radicular no expresa proteínas específicas y aparentemente los dos tejidos tienen factores en común y pudieran estar regulados de forma similar (Tabla I)^{25,26}.

El cemento presenta muchas características comunes con el tejido óseo. Pero, a diferencia de éste, carece de aporte sanguíneo directo, al igual que de inervación y de drenaje linfático. El cemento radicular no sufre procesos de resorción y aposición fisiológica y se deposita durante toda la vida^{5,16,27}; es secretado por los cementoblastos en la superficie de la raíz de la dentina²⁸.

La cementogénesis comienza cuando las células del epitelio externo e interno del esmalte forman la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS) y células mesénquimales del folículo dental se encuentran en la proximidad de la superficie de la raíz en desarrollo²⁹. Las HERS son una bicapa celular formada a partir de la unión del epitelio interno y externo del esmalte y las cuales proliferan en dirección apical. Las células de la vaina epitelial de Hertwig proliferan y migran en dirección apical, a través de los tejidos ectomesenquimatosos dentales, donde se dividen en la papila y el folículo dental. Las células de la vaina epitelial de Hertwig migran de la raíz a la región del futuro ligamento periodontal donde se reasocian para formar los restos epiteliales de Malassez. No todas las células de la vaina epitelial de Hertwig migran al sitio del ligamento periodontal, algunas entran en apoptosis y algunas más permanecen en la superficie radicular. Una vez que se ha perdido la continuidad de las células de HERS, las células foliculares ectomesenquimatosas comienzan a depositar el cemento radicular sobre la dentina recién depositada y/o sobre la matriz secretada por las células de HERS³⁰. En estadios adultos se considera que existen poblaciones celulares progenitoras dentro del ligamento periodontal, las cuales se encuentran en las zonas paravasculares de los vasos sanguíneos; sin embargo, los factores que regulan el reclutamiento y la diferenciación no se conocen²⁹.

VII. Clasificación del cemento radicular

El cemento se clasifica por la presencia o ausencia de células dentro de su matriz y por la disposición de las fibras de colágena en la matriz. Diferentes formas de cemento se han descrito^{4,16}:

1. Acelular, el cemento acelular con fibras extrínsecas se encuentra en las

porciones coronal y media de la raíz; contiene principalmente fibras de Sharpey. Este tipo de cemento es una parte importante del aparato de adhesión y conecta a los órganos dentarios con la lámina dura del hueso alveolar.

2. Celular, el cemento celular estratificado se encuentra en el tercer tercio apical de la raíz. Este tipo de cemento contiene fibras intrínsecas, fibras extrínsecas y cementocitos. La inserción de las fibras de Sharpey provee el mecanismo de anclaje entre la raíz de los órganos dentarios y el ligamento periodontal^{16,17}.

El cemento esta constituido por dos fases: la fase mineral y la fase orgánica. La fase mineral esta constituida de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], con un porcentaje en peso de aproximadamente 45% al 50%³¹. La fase orgánica está compuesta principalmente por colágena tipo I, la cual constituye ~90% y colágena tipo III, el 5%³²; también están presentes colágenas tipos V, VI y XII³³. Las proteínas no colágenas identificadas en cemento son: fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, fibronectina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteoglicanos, vitronectina y varios factores de crecimiento¹⁷. Sin embargo, estas moléculas no son cemento específicas^{4,34,35}.

A la fecha se han descrito tres proteínas cemento específicas: proteína de Adhesión del cemento radicular (CAP)³⁶, factor de crecimiento del cemento (CGF)³⁷ y la proteína del cemento radicular 1(CEMP1)²⁷. Los ADNc de la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) y la proteína del cemento 1 se han clonado y secuenciado. Mientras, el factor de crecimiento del cemento (CGF) parece ser una isoforma del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y el gen que codifica para esta proteína no se ha aislado y clonado²⁷. Para entender el valor y la importancia de los resultados obtenidos en esta tesis es necesario hacer una breve descripción de las distintas proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización en los órganos dentarios y otros tejidos mineralizados. Conocer su posición en el genoma, sus características en secuencia, características bioquímicas y probables funciones, son fundamentales para poder comparar los hallazgos aquí descritos.

Tabla I: Proteínas de Matriz Extracelular y Factores de Crecimiento Presentes en Tejido Óseo y Cemento Radicular.

Tejido Óseo vs Cemento Radicular		
Molécula (Abreviación)	Tejido Óseo	Cemento
Colágena tipo I, III, V, VI and XII	+	+
Sialoproteína Ósea (BSP)	+	+
Osteopontina (OPN)	+	+
Proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1)	+	+
Sialoproteína de Dentina (DSP)	+	+
Fosfoproteína de la Dentina (DPP)	+	n.d.
Factor 45 osteoclasto/osteocito (OF45 o MEPE)	+	n.d.
Fibronectina (FN)	+	?
Tenascina	+	?
Osteocalcina (OC), Proteína G la ósea (BGP)	+	+ (*)
Glicoproteína Ácida Ósea 75 (BAG-75)	+	+
Vitronectina (VN)	+	?
Lumican	+	+
Fibromodulina	+	+
Versican	+	+
Decorina	+	+
Biglican	+	+
Osteoadherina (OSAD)	+	+
Amelogenina (AMEL)	n.d.	+
Amelina/ameloblastina (AMB)	n.d.	+
Albumina	+	+
Glicoproteína Alpha2HS	+	+
Factor de Crecimiento Transformante β 1 (TGF- β 1)	+	+
Proteínas Morfogénicas Óseas (BMPs)	+	+
Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas (PDGF) a,b	+	+
Factores de Crecimiento de Fibroblastos Fibroblast growth factors (FGFs)	+	+
Factores de Crecimiento Tipo-Insulina I (IGF-I) y II (IGF-II)	+	+
Factor de Crecimiento Derivado del Cemento (CGF)	-	+
Proteína de Adhesión del Cemento (CAP)	-	+
Proteína del Cemento 1 (CEMP1)	-	+

+*Presencia*

-*Ausencia*

n.d.- *Proteína no detectada.*

(*)-*Resultado inconsistente.*

?-*Cuestionable.*

VIII. Proteínas colágenas

La matriz extracelular de los tejidos conectivos representa una compleja combinación de diversas familias de proteínas, las cuales definen la integridad estructural y varias funciones fisiológicas. La familia de las proteínas colágenas tiene una extraordinaria heterogeneidad y son las proteínas más abundantes en el cuerpo de los vertebrados. Hoy día se conocen 27 tipos de colágenas, codificadas por 40 genes diferentes. La diversidad de las colágenas no solo concierne al ensamblaje molecular y a las estructuras supramoleculares, también se refleja en su distribución en los tejidos, función y patologías asociadas.

El nombre de colágenas es usado en forma genérica para proteínas que forman una triple hélice de tres cadenas polipeptídicas y todos los miembros de la familia de las colágenas forman estas estructuras supramoleculares en la matriz extracelular, aunque su medida, función y distribución en los tejidos puede variar considerablemente. Basados en su estructura y organización supramolecular, ellas pueden ser agrupadas en colágenas formadoras de fibras, colágenas asociadas a fibras (FACIT), colágenas formadoras de redes, colágenas de la membrana basal y otras con funciones únicas. A pesar de su diversidad estructural entre los diferentes tipos de colágenas, todos los miembros de la familia de las colágenas presentan una característica: tres cadenas polipeptídicas o diferentes cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas alfa, plegadas en una línea espiral con dirección izquierda, formando una triple hélice de dirección derecha. Las cadenas polipeptídicas pueden ser idénticas (homotrimeros) o diferentes (heterotrimeros).

Las colágenas tienen como característica primordial la presencia repetitiva de tres aminoácidos Gly-Xaa-Yaa en su secuencia de aminoácidos. Generalmente el aminoácido Xaa es prolina y el aminoácido Yaa es hidroxiprolina, lo cual le permite una configuración estable en la triple hélice. Después de las modificaciones postraduccionales, la colágena se secreta y se ensambla. Las colágenas más abundantes son las tipo I, II y III, encontradas en tendón y piel. La estructura de la colágena, en general, presenta patrones específicos, aunque todavía no bien comprendidos; pero se sugiere que están relacionados al arreglo de las triples

hélices en las fibras y en la inherente periodicidad de la estructura primaria³⁸.

Se ha descrito que los cristales de hidroxiapatita (HA) se forman inicialmente en los espacios conocidos como “gaps” de las fibras de colágena⁹ e incluso se han localizado proteínas nucleadoras de HA en esta misma zona, proteínas tales como DMP1³⁹. Estas fibras de colágena proporcionan una estructura que funciona como una plantilla sobre la cual se pueden formar núcleos minerales y crecer los cristales de HA⁴⁰.

IX. Proteínas no colágenas en la biomineralización

Amelogenina (AMEL)

La amelogenina (AMEL) es el mayor elemento de la matriz extracelular del esmalte y comprende el 95% del contenido orgánico. En humanos, AMEL es codificado por dos genes localizados en los cromosomas sexuales X y Y (AMELX y AMELY), en los locus Xp22.31-p22.1 y Yp11.2, respectivamente. La amelogenina en su forma más larga presenta 205 aminoácidos y una movilidad relativa (M_r) de 5,000 a 25,000. La variabilidad en la M_r se debe a las modificaciones proteolíticas después de su secreción al medio extracelular o por procesos de corte y empalme del transcrito del ARNm^{41,42}.

La amelogenina tiene un papel preponderante en la orientación del crecimiento cristalino de la hidroxiapatita del esmalte⁴³. Tiene una naturaleza hidrofóbica debido a su gran contenido de prolinas, glutaminas, histidinas y leucinas⁴⁴ y por su naturaleza química tiende a formar agregados; ésto ha causado dificultades en obtener datos estructurales. La estructura terciaria de esta proteína se desconoce, aunque han existido intentos de cristalización de esta proteína; otros estudios, utilizando dicroísmo circular (DC) y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (EITF), han demostrado que tiene elementos estructurales de hojas β y giros β ⁴⁵.

Enamelina (ENAM)

La enamelina es una glicoproteína fosforilada y constituye del 1-5% de la matriz extracelular del esmalte. El gen se encuentra en el cromosoma 4, locus 4q13.3 y codifica para una proteína de 1142 aminoácidos. ENAM es secretada como un precursor de 186 kDa. Mutaciones en el gen pueden causar amelogénesis imperfecta^{46,47}. Se han aislado enamelinas con una masa molecular de 25, 32, 45, 89, 142 y 155 kDa; sin embargo, el fragmento más estable es de 32 kDa. Por lo tanto, se reporta como una proteína de 32 kDa, hidrofílica y ácida, con un punto isoeléctrico (pI) de 3.2; es rica en prolina (18.8%), glicina (12.3%), treonina (10.4%) y ácido glutámico (9.4%). Tiene dos serinas fosforiladas y tres asparaginas glicosiladas. No se ha profundizado en el estudio de las propiedades estructurales de esta proteína ni sus interacciones con otros ligandos⁴⁸. Mediante inmunocitoquímica se ha observado una alta afinidad a los cristales de HA. En experimentos recientes de crecimiento de cristales en gel de agarosa se observó que ENAM causa una elongación de los cristales de HA. Por lo anterior se considera que su papel en la biomineralización es importante⁴⁹.

Tuftelina (TUFT1)

La tuftelina es una proteína ácida que en un principio fue clasificada dentro del grupo de las enamelinas. La tuftelina está localizada en el cromosoma 1, en locus 1q21. Contiene 389 aminoácidos y se calcula un peso molecular teórico de 43.8 kDa, presenta un potencial sitio de glicosilación N y 5 residuos de cisteína. Es una proteína que se ha conservado a través de 550 millones de años en la evolución de los vertebrados. Esta proteína se encuentra localizada en el espacio extracelular durante el desarrollo del esmalte, pero concentrándose en la unión amelodentinaria donde comienza la mineralización del esmalte. Con base en su expresión y localización se había sugerido que era una proteína involucrada en los estados iniciales de mineralización, probablemente en la nucleación^{50, 51, 52}.

Ameloblastina (AMBN)

El gen de la ameloblastina se encuentra cromosoma 4 y localizado en el locus 4q21. La AMBN tiene 447 aminoácidos y un masa molecular teórico de 42 kDa. La masa molecular de AMBN varía de 62, 27-29 y 13-17 kDa. La proteína de 62 kDa representa a la proteína completa sin proteólisis, mientras las proteínas de 27-29 kDa representan una proteólisis del carboxilo terminal y finalmente las proteínas de 13-17 kDa pertenecen a la proteólisis de amino terminal. Los productos de la proteólisis de la ameloblastina se han localizado entre los espacios interprismáticos del esmalte, lo que ha llevado a pensar que AMBN funcionaría como un espaciador entre los cristales de HA⁴⁸ y participe en el control de las estructuras prismáticas del esmalte. La ameloblastina contiene distintos motivos como: el motivo DGEA, motivo de unión a integrinas y el motivo VTKG, motivo de adhesión celular tipo trombospondina⁵³. Un estudio reciente en ratones no cauto al gen, demostró que la AMBN funciona como una proteína de adhesión celular que controla los estados de diferenciación de los ameloblastos. Los ratones no cauto para el gen AMBL desarrollaron una severa hipoplasia en el esmalte⁵⁴. La sobreexpresión de este gen en ratones transgénicos, se manifestó como malformaciones en los cristales de HA y desarrollo anormal del esmalte⁵⁵. Estos resultados confirman que la expresión temporal y espacial de la ameloblastina es necesaria para la mineralización correcta del esmalte.

Proteína de la matriz de la dentina (DMP1)

El gen de DMP1 fue mapeado en el cromosoma 4, locus 4q21 del genoma humano, donde residen otras proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización; estas proteínas se han agrupado en la familia de las proteínas SIBLING (small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein). DMP1 se expresa predominantemente en hueso y dentina⁵⁶. DMP1 contiene dominios ácidos ricos en Ser, Glu y Asp. Además de tener varios sitios consenso para fosforilación en serinas, se ha demostrado que DMP1 contiene 53 grupos fosfatos unidos a la proteína. La naturaleza ácida de la proteína es la responsable de los sitios de unión a Ca²⁺, propiedad considerada necesaria para que las proteínas participen

en el proceso de biomineralización⁵⁷.

En un estudio realizado por Foster y colaboradores, usando RT-PCR en tiempo real, demostraron la regulación de DMP1 por fosfato inorgánico [P(i)] en líneas de cementoblastos; a una dosis de 5 mM P(i), DMP1 tuvo un incremento en 30 veces sobre el control, la osteopontina se incrementó 3 veces, mientras otras proteínas mostraron una disminución en su expresión, como: BSP (25% a diferencia del control), osteocalcina (85%) y colágena I (50%). Este estudio sugiere que DMP1 tiene un papel importante en la homeostasis del P(i) durante la biomineralización⁵⁸.

Osteopontina (OPN)

La osteopontina es una fosfoglicoproteína rica en ácido siálico y en aminoácidos ácido aspártico, glutámico y serina. El gen de la OPN (SPP1) se encuentra en cromosoma 4, en el locus 4q21-q25. La OPN tiene de 264 a 301 aminoácidos dependiendo de la especie, presenta fosforilaciones y glicosilaciones. La osteopontina se aisló por primera vez de células epiteliales y células fibroblásticas que estaban bajo una patología maligna⁵⁹, se observó que la expresión de OPN se correlaciona con transformaciones malignas de células y metástasis de tumores. OPN es la única proteína SIBLING para la cual se tiene evidencia de participar en distintos pasos del desarrollo y progresión del cáncer⁶⁰. Posteriormente, una proteína similar se aisló de tejido óseo bovino y se le llamó sialoproteína ósea I⁶¹. El mismo grupo determinó la estructura primaria de la sialoproteína ósea I por secuenciación del ADNc preparado a partir de células de osteosarcoma (ROS 17/2.8)⁶². A partir del primer reporte, la OPN se ha aislado de muchos tejidos, células y fluidos corporales, incluidos riñón⁶³, células musculares lisas, macrófagos, sangre, orina y leche^{64,65}. También se le ha implicado en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos^{66,67}, como facilitar la adhesión de los osteoclastos a la matriz ósea por medio de la interacción con integrinas de la superficie celular $\alpha\nu\beta3$ y CD44⁶⁸.

OPN está asociada con una variedad de calcificaciones patológicas. Esto tiene lugar en sitios de calcificación ectópica, como placas arterioscleróticas⁶⁹, cálculos

renales⁷⁰, placa dental⁷¹ y en calcificaciones asociadas a tumores⁶⁰. En estudios *in vitro* se ha demostrado que OPN inhibe fuertemente la formación de HA en huesos, dientes y placas arterioscleróticas^{72,73} e inhibe la formación de oxalato de calcio, la principal fase mineral en los cálculos renales⁷⁴.

Sialoproteína ósea (BSP)

La sialoproteína ósea se expresa preferencialmente en los tejidos mineralizados, como hueso, dentina, cemento y cartílago. BSP se conocía bajo el nombre de sialoproteína ósea II, aunque ese nombre está en desuso⁷⁵. El gen de BSP fue nombrado IBSP y se localiza en el cromosoma 4, en el locus 4q21-q25. BSP tiene una masa molecular de 65 a 70 kDa, mientras su peso teórico basado en la secuencia de cDNA humana muestra una masa molecular de 33 kDa. BSP presenta un dominio RGD, dos dominios ricos en ácidos glutámico, varios residuos tirosina sulfatados en el carboxilo terminal y residuos fosfoserina. Interesantemente, una característica de BSP es el hecho de que la mitad de su masa corresponde a carbohidratos, contiene ácido siálico, galactosa, galactosamina, glucosamina y manosa. Se ha demostrado que BSP se une a la colágena tipo I¹⁴⁰.

BSP participa en dos procesos fundamentales: como una molécula de adhesión celular en la matriz extracelular y segundo, es una proteína nucleadora de cristales de HA en los tejidos mineralizados. Los argumentos de Hunter para considerar a BSP como una proteína nucleadora son los siguientes: (1) la BSP se expresa y se acumula en las áreas de mineralización de novo o primaria de los tejidos mineralizados; (2) las células osteoblásticas que forma el tejido mineral *in vitro* expresan BSP al inicio y durante la mineralización; (3) BSP es un nucleador de cristales hidroxiapatita en condiciones de subsaturación⁷⁶. BSP constituye del 8 al 12% de proteína total de las proteínas no colágenas presentes en el hueso alveolar y cemento, mientras que en dentina representa ~1%⁷⁵.

Osteonectina (SPARC)

El gen de la osteonectina se encuentra localizado en el cromosoma 5, en la posición 5q31.3-q32, llamado SPARC. Este gen se encuentra altamente conservado entre distintas especies, por ejemplo, el gen en nemátodos presenta una identidad con el gen de humanos de un 38 %. La osteonectina también es conocida como SPARC (Proteína Secretada, Ácida, Rica en Cisteínas) o BM-40, por lo que en lo subsiguiente, la referiremos como SPARC. La SPARC es una proteína con un peso molecular de 32 kDa en su secuencia, pero su masa molecular es de 43 kDa debido a los carbohidratos presentes. La SPARC humana consiste de 286 residuos de aminoácidos divididos en tres dominios⁷⁷. La SPARC es una glicoproteína de matriz extracelular con alta afinidad a los iones de Ca^{2+} y a colágena. Entre las numerosas funciones de SPARC se encuentran: organización y regulación de la matriz extracelular en tejidos mineralizados y no mineralizados. En ratones nocaouts para el gen que codifica para la SPARC, las fibras de colágena disminuyen su diámetro, reducen su fuerza a la tensión y resultan en dimensiones homogéneas^{78,79}. Otras funciones reportadas para SPARC: remodelación de tejidos, unión a factores de crecimiento, inhibición del ciclo celular, regulación de la producción de metaloproteinasas⁸⁰ e inhibición de la adhesión celular.

En experimentos *in vitro* con fibroblastos adheridos y con formas elongadas en cultivo, al agregar SPARC las células se despegan y redondean, mientras *in vivo* provoca una disrupción de las interacciones celulares. SPARC es una proteína altamente expresada en tejido óseo y en los tejidos de los órganos dentarios, dentina, cemento y en el ligamento periodontal, exceptuando al esmalte. Sorprendentemente, SPARC es expresada en altos niveles en el ligamento periodontal, el cual es un tejido que tiene poblaciones celulares con características de tejidos embrionarios. Sin embargo, los más altos niveles de SPARC se han observado en membranas fetales de humanos⁸¹. La SPARC se localiza en una gran variedad de células y tejidos por medio de inmunocitoquímica, RT-PCR e hibridaciones *in situ*; los tejidos incluyen: plaquetas, estómago, médula osea, tendón, mesenterio, arterias, piel, hígado y cornea⁸²; aunque también se ha localiza en tejidos bucales y tumorales⁶⁰, lo cual indica que

no es una proteína exclusiva de tejidos mineralizados y sus funciones son amplias.

Osteocalcina (OC)

La osteocalcina es una proteína de 45 a 50 residuos de aminoácidos, con un peso aproximado de 5-8 kDa. La OC se encuentra altamente conservada entre los vertebrados y se secretada principalmente por los osteoblastos. La OC, también llamada “Bone Gla Protein” o BGP, fue la primera proteína descubierta de una familia de proteínas con sitios de unión a calcio, dependientes de la vitamina K y no asociadas con la coagulación sanguínea. OC se secreta por células asociadas a los tejidos óseos y órganos dentarios (tejidos mineralizados), como osteoblastos, odontoblastos y cementoblastos. Es una de las proteínas no-colágenas más abundantes en los tejidos mineralizados de vertebrados, con alrededor del 10 al 20%. El gen de la osteocalcina (BGLAP) se encuentra ubicado en el cromosoma 1, locus 1q25-q31 y su nivel transcripcional es regulado por la vitamina D. Los elementos conservados en las secuencias conocidas de OC son: un puente disulfuro (Cys17-Cys23) y tres residuos ácidos g carboxiglutámicos localizados en las posiciones 11, 15 y 18, usando la numeración de la secuencia de *Argyrosomus regius*. Los residuos Gla se consideran facilitadores de la absorción de la OC a la hidroxiapatita⁸³. El amino terminal, del aminoácido 1 al 15, presenta considerables variaciones en secuencia entre las especies de vertebrados y al parecer es una estructura muy flexible, mientras el resto de la proteína presenta un núcleo compacto⁸⁴.

Estudios iniciales presentaron a la OC como una proteína con alta afinidad a la hidroxiapatita y con efecto en la formación del mineral en estudios *in vivo* e *in vitro*⁸⁵. Se han generado ratones transgénicos con nocaout en OC. Estos experimentos muestran que la OC funciona como un regulador negativo de la formación del hueso y no altera la resorción ósea o la mineralización. Los ratones nocaout presentaron un incremento progresivo en la masa ósea, aceleración en la tasa de formación de hueso y una maduración deteriorada del hueso, implicando que la OC estimula la maduración del hueso⁸⁶.

Proteína de adhesión del cemento radicular (CAP)

La proteína de adhesión del cemento radicular se aisló de extractos de cemento maduro, se purificó y se caracterizó parcialmente. Tiene una M_r de 54, 000 a 57,000, con una secuencia de aminoácidos que presenta cierta identidad con la colágena tipo I y XII. Sin embargo, no se ha encontrado reacción cruzada en inmunotrasferencias entre la CAP y estas colágenas, así como tampoco con otras moléculas de adhesión^{36,87}. CAP se inmunolocalizó en la matriz del cemento radicular humano, en células paravasculares del ligamento periodontal y en espacios endosteales del hueso alveolar, sitios reconocidos de células progenitoras del ligamento periodontal³⁰. La CAP se localiza en cementoblastos *in vitro*²⁹ e *in vivo*⁸⁸. La CAP muestra promover la migración y la adhesión de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar a la superficie radicular^{89,90}. Además la CAP induce la expresión de fosfatasa alcalina (ALP) y favorece la diferenciación de células mesenquimatosas indiferenciadas hacia un fenotipo mineralizante⁹¹. Tiene una alta afinidad por la fibronectina, la HA, la dentina y el cemento radicular, esto probablemente se deba a que tiene un motivo RGD en su secuencia^{29,36}. Anticuerpos específicos a CAP son capaces de identificar a las células progenitoras de los cementoblastos en el ligamento periodontal adulto humano⁹² e incluso participa en la diferenciación de estos progenitores *in vitro*⁹³. La CAP purificada por cromatografía de inmunoafinidad promueve una mayor adhesión de fibroblastos gingivales humanos *in vitro* en comparación con la colágena tipo I. En 2001 Saito y colaboradores generaron un anticuerpo monoclonal anti-CAP, denominado 3G9, con lo que se logró aislar la CAP de gérmenes dentarios de bovino. Esta proteína fue inmunolocalizada sobre la matriz del cemento radicular y en los cementoblastos. Los ensayos de adhesión *in vitro* realizados en este estudio mostraron que esta proteína promueve la adhesión de células del folículo dental. En lo referente a los eventos de señalización intracelular inducidos por la CAP durante la adhesión celular, se conoce que estimula la actividad de la MAP cinasa induciendo la expresión de fos en fibroblastos gingivales humanos. Aunque se desconoce el receptor de la CAP que desencadena dichos eventos celulares⁹⁴. Por las funciones biológicas que ha

mostrado la CAP se sugiere que ésta puede jugar un papel importante en la cementogénesis, así como en la regeneración periodontal.

X. Proteína del cemento 1 (CEMP1)

La proteína del cemento 1 o CEMP1 es una proteína de 247 aminoácidos aislada a partir de una biblioteca de ANDc derivada de cementoblastos putativos humanos cultivados *in vitro*. El gen de CEMP1 se encuentra en el cromosoma 16 y en el locus 16p13.3. CEMP1 tiene un masa molecular teórica de 26 kDa, el análisis teórico de las modificaciones postraduccionales indica la presencia de sitios teóricos de glicosilación N y O, y fosforilación. Se predice la localización celular en el núcleo a pesar de no tener motivos de unión a ADN; no se encontró similitud significativa con ninguna otra proteína presente en las bases de datos.

La expresión *in vitro* de CEMP1 a nivel de ARNm y proteína se limita a cementoblastos putativos (células derivadas del cultivo del cementoblastoma humano) y una subpoblación de células derivadas del ligamento periodontal. En cortes histológicos de tejidos periodontales humanos su expresión y localización está restringida a subpoblaciones del ligamento periodontal con una posición paravascular, cementoblastos y células de los espacios endosteales, por lo que podría constituir un marcador biológico para cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal^{4,95}. No se detectó el ARNm ni la proteína en otros tejidos humanos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta²⁷.

También se ha demostrado que está involucrada en la regulación de la morfología, el depósito y la composición de los cristales de hidroxiapatita así como en la regulación de la expresión de ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos *in vitro*^{5,27}, por lo que es probable que juegue un papel destacado en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento. Recientemente se utilizó como marcador de cementoblastos derivados de las superficies radiculares de humano y además se confirmó su expresión en el cemento radicular, cementoblastos y células del ligamento periodontal⁹⁶. Otro estudio demostró que células derivadas del folículo dental tratadas con un extracto que contenía proteínas de matriz del esmalte se

diferenciaron hacia un fenotipo cementoblástico, expresando CEMP1 y CAP, activándose la fosforilación de Smad-1 y activando la vía de MAPK para la proliferación y diferenciación celular⁹⁷.

En experimentos de sobreexpresión de CEMP1 en células no mineralizantes, fibroblastos gingivales humanos, las células cambiaron a un fenotipo mineralizante cementoblástico-osteoblástico. Las células transfectadas produjeron una matriz mineralizada. La matriz mineralizada se analizó con EDS-X y los valores de las razones Ca/P fueron similares a los de la HA de origen biológico (1.67). En este estudio también se observó un incremento en la proliferación celular, y existen antecedentes de CEMP1 como un promotor de la proliferación celular. No obstante debe considerarse que CEMP1 promueve la expresión de las proteínas OPN y BSP, las cuales inducen también la proliferación celular. Si CEMP1 es capaz de inducir por sí misma la proliferación o por la inducción de otras proteínas, es un punto que aún está por dilucidar. Para caracterizar el fenotipo celular se seleccionaron genes asociados al fenotipo cementoblástico y se determinó si habían adquirido este fenotipo, analizándolos a nivel de ARNm y de proteína. Las moléculas asociadas a la fase mineral regulando la nucleación, el crecimiento y maduración de los cristales de hidroxiapatita, como BSP, OCN y OPN en las células transfectadas con CEMP1 fueron identificadas positivamente⁹⁸.

Los resultados permiten pensar que las células transfectadas con CEMP1 favorecen la cristalización de hidroxiapatita por la participación de las proteínas no colágenas. Las células transfectadas también mostraron la expresión de moléculas asociadas al proceso de biomineralización, como: AMBN, AMEL, ENAM, ALP, OPN, OC, BSP, CAP y Cbfa⁹⁸.

JUSTIFICACIÓN

Recientemente en el laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la facultad de Odontología, UNAM, se logró aislar el gen de la proteína del cemento 1 (CEMP-1 o CP-23). Además se ha reportado que el ARNm de CEMP1 se expresa en cementoblastos y células progenitoras de los espacios endosteales del hueso alveolar, pero no se detectó en fibroblastos gingivales ni osteoblastos alveolares. El análisis en diferentes tejidos de humano por medio de hibridación *in situ* y RT-PCR determinó que el ARNm no es expresado en cerebro, hígado, placenta, músculo esquelético, riñón páncreas, pulmón, bazo y colon (todos tejidos adultos). También participa en el proceso de mineralización de cementoblastos cultivados *in vitro*, regulando la morfología, crecimiento y composición de los cristales de hidroxiapatita.

Todos los resultados anteriores indican que el gen de CEMP1 participa de manera importante en la regulación positiva de la biomineralización. Los mecanismos específicos por los cuales actúa CEMP1 se desconocen a la fecha. Por ello, el determinar las características fisicoquímicas de CEMP1, la estructura secundaria, modificaciones postraduccionales y si promueve la nucleación de cristales de hidroxiapatita, adquiere relevancia para dilucidar los mecanismos que regulan el proceso de mineralización del cemento radicular y otros tejidos mineralizados.

HIPÓTESIS

CEMP1 es una proteína que presenta modificaciones postraduccionales (N-glicosilación y fosforilación), posee afinidad por la hidroxiapatita y regula la mineralización de los fosfatos de calcio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar las características fisicoquímicas y estructurales de CEMP1, así como su interacción en la mineralización de los fosfatos de calcio.

Objetivos específicos

- Determinar la estructura secundaria de hrCEMP1.
- Determinar la presencia de puentes disulfuro en hrCEMP1.
- Determinar si hrCEMP1 es una proteína glicosilada y los tipos de ésta.
- Determinar si hrCEMP1 posee afinidad por la hidroxiapatita.
- Determinar si hrCEMP1 participa en la formación de fosfatos de calcio *in vitro*.
- Analizar las relaciones Ca/P de los minerales por EDS-X y las morfologías de los cristales crecidos en la presencia y ausencia de hrCEMP1.
- Determinar el tipo fosfato de calcio formado en presencia de hrCEMP1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

Los fibroblastos gingivales humanos (FGH) se aislaron mediante la técnica de explante y crecidos como se ha descrito previamente⁹⁹. Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 µg/ml estreptomicina, 100 UI/penicilina). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, 100% humedad y 5% CO₂. En todos los procedimientos experimentales se usaron FGH entre el 2^{do} y 5^{to} pasaje.

2. Clonación y expresión de la hrCEMP1

La región codificante de CEMP1 (GenBank N^o NM_001048212) se clonó dentro del vector pENTR/SD/D (Invitrogen, carlsbad, CA). La construcción resultante pENTR/SD/D-CEMP1 cDNA se ligó al vector pcDNA 40 (+) [CEMP1-pcDNA40 (+)], con una cola de histidinas unida en el carboxilo terminal y resistencia a G418 (Invitrogen, carlsbad, CA), utilizando sitios de restricción EcoRI. El plásmido resultante, pcDNA40-CEMP1, se transfectó a fibroblastos gingivales humanos utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen, carlsbad, CA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Después de dos días de transfección las células se seleccionaron con 600 µg/ml de G418 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) durante ocho semanas. Las clonas positivas para el DNA introducido se monitoreó por Western Blot (anti 6X His y anti CEMP1). Después de las ocho semanas, los cultivos expandidos de FGH que expresaban CEMP1 de forma estable se mantuvieron en medio DMEM suplementado de la forma descrita anteriormente y G418 a una concentración de 200 µg/ml. CEMP1 se purificó recolectando el medio condicionante (libre de suero) utilizando cromatografía de inmovilización de afinidad, cromatografía de afinidad a iones metálicos y cromatografía de afinidad a hidroxapatita.

3. Cromatografía de afinidad a iones metálicos

La cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC, por sus siglas en inglés) es

un método ampliamente usado en la purificación de proteínas recombinantes¹⁰⁰. Consiste en la separación de macromoléculas basada en la unión de las proteínas y los iones metálicos. No todas las proteínas tienen afinidad para los iones metálicos, por lo que esta técnica se usa generalmente para la purificación de proteínas recombinantes. Las proteínas recombinantes generalmente tienen una bandera o cola de histidinas en el carboxilo terminal o el amino terminal que pueden actuar como un ligando a los iones metálicos divalentes¹⁰¹.

El medio condicionado se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se concentró y dializado contra 5 volúmenes de PBS utilizando una membrana de ultrafiltración de un corte de 10 kDa. Se utilizó la cromatografía de afinidad a Ni²⁺ (IMAC) en una columna HiTrap (Invitrogen, Carlsbad, CA). Utilizando el método convencional de gradiente escalonado de imidazol. La pureza de la proteína se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico a un 12%.

4. Cromatografía de afinidad a la hidroxiapatita

El uso de la cromatografía de afinidad a hidroxiapatita para proteínas fue introducido por Tiselius *et al.*, en 1956¹⁰². El mecanismo de adsorción y desadsorción es similar a los principios de la cromatografía de intercambio iónico. La matriz de hidroxiapatita presenta propiedades anfotéricas. La elución de proteínas en esta matriz se realiza por aniones (por lo general PO₄, los cuales compiten con los grupos carboxilo o los grupos fosfatos de las proteínas para los sitios calcio de HA), y por cationes (Na⁺, K⁺, o bien, de manera más eficaz, Ca²⁺ o Mg²⁺, los cuales compiten con los grupos básicos de las proteínas para los sitios fosfato de HA).

La cromatografía de afinidad a hidroxiapatita se realizó en una columna Econo-Pac CHT-II cartridge (Bio Rad) empacada con hidroxiapatita (1 mL). La columna se equilibró con una solución de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.2. Se inyectaron 50 µg de CEMP1 a la columna y las proteínas con uniones inespecíficas se eliminarán con 5 volúmenes de columna de solución de equilibrio. Las proteínas unidas a la columna se desadsorbieron con 5 volúmenes de columna de las siguientes

soluciones: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M de fosfato de sodio a un pH 7.2. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE 12% y Western blot.

5. Inmunotransferencias-Western blot

Se llevaron a cabo corridas en geles SDS-PAGE y posteriormente se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore Corp., Bedford MA), utilizando una cámara BIO-RAD modelo mini-protean II cell y un módulo a Mini Trans-Blot cell, con un voltaje de 50 V y un amperaje de 0.2 A. Se observó la electrotransferencia al teñir la membrana con rojo de Ponceau. Después se bloqueó con leche descremada al 5% y PBS (blotto) durante una hora. Posteriormente se incubó la membrana con solución blotto y el primer anticuerpo, a una dilución de 1-1000 para el anticuerpo anti-CEMP1 y 1-5000 para el anticuerpo a la bandera de histidinas, durante una noche a 4°C. Después se bloqueó nuevamente la membrana con blotto durante 1 hora. La membrana entonces se incubó con solución blotto y el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano, durante 1 h a 4°C y con una dilución de 1-1000. Finalmente se bloqueó la membrana con solución blotto, se lavó con PBS y con agua Milli-Q. La membrana de PVDF se reveló con quimioluminiscencia (enhanced chemiluminiscent HRP substrate (Millipore Billerica, MA) y/o 3,3' diaminobencidina (DAB), como previamente se ha descrito⁹⁸.

6. Cuantificación de puentes disulfuro en CEMP1

Para determinar la presencia de puentes disulfuro en hrCEMP1, la proteína se diluyó en una solución de clorhidrato de guanidina 6M y 200 mM de DDT, a una concentración de 2.5 mM. La proteína se redujo a 37°C toda una noche. Posteriormente la muestra se hirvió durante 5 minutos e inyectó a una columna precargada de filtración en gel (1.5×10 cm Sephadex G-10, Pharmacia) equilibrada con ácido acético 300 mM. La elución de la proteína se observó a una absorbancia de 280 nm (A_{280}). El estado de reducción de CEMP1 se evaluó mediante la cuantificación de los grupos tiol por medio del ensayo de 4,4-ditiodipiridina. La proteína recombinante humana CEMP1 se incubó con guanidina-

HCL 6M, 10 mM EDTA, 120 mM Na₂HPO₄, pH 6.6, DTPD (4,4'-dithiodipyridine) y se adicionó a una concentración final de 500 nM. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 25 °C y se monitorearon a una A₃₂₄ para estimar el número de residuos cisteína presentes¹⁰³.

7. Determinación de los estados de agregación de CEMP1

Los experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) se realizaron en un equipo Zetasizer Nano S (Malvern Instruments), el cual determina el tamaño molecular y cuenta con un controlador de temperatura, emplea 4 MW, 633 nm de semiconductores como fuente de luz láser y tecnología NIBS (Malvern Instruments, Ltd., Reino Unido). Durante los experimentos, la temperatura se mantuvo a 25 °C (0.1°C) a través de una unidad de Peltier. El análisis de los datos se realizó con el software nano Zetasizer S DTS (Malvern Instruments, Ltd., Reino Unido). La metodología consistió en filtrar una solución de proteína hrCEMP1 en PBS a una concentración de 0.2-1 mg/ml a través de un filtro con apertura de malla de 0.02 µm (Anodisc 13; Whatman) para remover cualquier partícula extraña. La solución se introdujo en una microcelda de 45 µl de volumen¹⁰⁴.

8. Dicroísmo circular

Esta técnica se utiliza para medir la actividad óptica de las moléculas asimétricas en solución, como proteínas y ácidos nucleicos. Las bandas de dicroísmo circular en proteínas ocurren en dos regiones del espectro: la región de 170 a 250 nm está determinada por contribuciones de enlace peptídicos, mientras que la banda en la región de 250 a 300 nm se origina a partir de los residuos de aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptofano)¹⁰⁵. Se determinó la estructura secundaria de hrCEMP1. Para obtener la mejor señal de dicroísmo circular en un intervalo de 170-250 nm, hrCEMP1 se resuspendió en una solución de PBS, a pH de 7.4, a una concentración de 0.2 mg/ml. Se utilizó el programa PROSEC 3.1 (Aviv Associates Inc., NJ) para la colecta de los datos y su manipulación.

Los espectros se registraron en un espectropolarímetro Aviv 62DS utilizando celdas de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, con un ancho de banda de 1.5 nm,

tiempo de integración de 0.3 segundos cada 0.5 nm y a lo largo de la región 190-260 nm del espectro electromagnético. Los datos se reportan como elipticidad molar por residuo promedio y en unidades de grado por centímetro cuadrado por decimol¹⁰⁶.

9. Determinación de glicosilaciones en CEMP1

Los glicoconjugados se forman cuando un mono, oligo o polisacárido se une a proteínas o lípidos, resultando en glicoproteínas y glicolípidos. Es común referirse a los carbohidratos unidos a las proteínas como glicanos¹⁰⁷. Los carbohidratos presentes en CEMP1 se marcaron con el kit ECL glycoprotein detection system (Amersham Biosciences, UK)". El kit permite la detección de carbohidratos presentes en las proteínas. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 12% y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore Corp., Bedford MA), posteriormente la membrana se sometió a una solución de metaperyodato de sodio a 10 mM y acetatos de sodio 100 mM, pH 5.5, en la oscuridad. Posteriormente las muestras se trataron con biotina hidrazida, la cual sera incorporada a los carbohidratos y se agregó un agente bloqueador provisto por el fabricante. Finalmente, la biotina se detectó por estreptavidina conjugada con peróxidasa de rábano usando quimioluminiscencia (enhanced chemiluminiscent HRP substrate, Millipore Billerica, MA).

10. Desglicosilación de CEMP1

Los glicanos en las proteínas se encuentran ligados a asparagina (N-ligados) y serina y treonina (O-ligados). Los glicanos participan en distintas funciones biológicas como el reconocimiento inmunológico, adhesión y señalización, entre otras. La diversidad de los glicanos unidos a las proteínas genera una gran heterogeneidad en la masa y la carga neta de las glicoproteínas¹⁰⁷.

Para estudiar la estructura y función de una glicoproteína, a menudo es deseable la eliminación de todos los glicanos o seleccionar una clase de ellos, lo cual permite la asignación de una función específica y determinar los cambios en la masa. El método más simple para evaluar el grado de desglicosilación de una

proteína es a través de los cambios en la movilidad relativa (M_r) en geles de poliacrilamida. Por lo tanto, se utilizaron 200 μg de hrCEMP1 para una digestión enzimática con 200 ng de N-glicosidasa F (Calbiochem® Glycoprotein Deglycosylation kit, Merck Biosciences Ltd., Nottingham, UK). Los 200 μg de hrCEMP1 se resuspendieron en 30 μl de agua milliQ. Se añadieron 10 μl de una solución de fosfato de sodio 250 mM, pH 7.0 y 2.5 μl de solución desnaturalizante (2% w/v SDS, 1 M β -mercaptoetanol). La mezcla se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregaron 2.5 μl de TRITON® X-100 (Sigma-Aldrich Company Ltd.). Los 200 ng de N-glycosidasa F se agregaron a la mezcla y se incubó durante 24 hrs a 37°C. El patrón de glicosilación se observó mediante SDS-PAGE al 12%.

11. Fosforilaciones en CEMP1

Las proteínas no colágenas asociadas a la fase mineral se encuentran fosforiladas en los residuos de serina y treonina. Los sitios de fosforilación tienen una alta capacidad de unión a los iones calcio y a la superficie de los cristales hidroxiapatita. Por lo tanto, se considera que están implicadas en la regulación de la formación de los cristales de HA durante la osteogénesis, dentinogénesis y cementogénesis¹⁰⁸. Para determinar si hrCEMP1 se encuentra fosforilada, se utilizó hrCEMP1 secretada del medio condicionado y purificada por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} . La proteína recombinante CEMP1 se separó en geles SDS-PAGE al 12% y se electrotransfirió como se describió anteriormente. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: conejo anti-fosfo-Tyr, conejo anti-fosfo-Ser y conejo anti-fosfo-Thr (Zymed, San Francisco, CA, USA) a una dilución de 1:1000 durante una noche a 4°C. El proceso de lavado, incubación con el segundo anticuerpo y revelado se han descrito anteriormente.

12. Cristalización de fosfatos de calcio *in vitro*

Para el crecimiento de cristales de fosfatos de calcio se utilizó un sistema de contradifusión en capilares^{109,110,76}. En un tubo capilar con un diámetro de 0.5 mm,

se colocó agarosa al 1% en el centro del capilar. En los extremos se inyectaron las soluciones de CaCl_2 (cloruro de calcio) 100 mM y NaH_2PO_4 (fosfato de sodio) 100 mM. Al difundir libremente las soluciones en el capilar se formarían cristales de fosfato de calcio a 37°C. Al gel de agarosa, antes de ser introducido al capilar, se añadió la proteína recombinante CEMP1 a una concentración de 20 µg de proteína por mililitro de agarosa. Después de haberse formado los cristales durante un período de 7 días, éstos fueron recuperados por la disolución del gel en agua milli Q caliente y posteriormente secados al aire.

13. Microanálisis de dispersión de energía de rayos X (EDX)

La composición elemental de los cristales formados por la inducción de hrCEMP1 dentro de los capilares se analizaron usando un microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol 5600, el cual tiene una microsonda Pentafet para microanálisis de energía dispersa de rayos X. Todos los análisis se hicieron a 20kV durante 300 segundos. La relación calcio/fósforo (Ca/P) se calculó mediante el análisis de porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro. Después de determinar la composición de los cristales se recubrieron con una capa de oro mediante espurreo catódico (100 nm) para evitar que se cargara la muestra y se lograra mejor calidad en las imágenes de MEB.

14. Patrón de difracción cristalino por microscopía electrónica de transmisión (MET)

Los cristales se montaron en un portamuestras de oro (150 mesh) para MET cubiertos con una capa carbón. De los cuales, se obtuvieron los patrones de difracción de electrones por medio de un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 CX. Los espectros de difracción fueron indexados siguiendo la siguiente fórmula $Rd = \lambda L$. Donde R es la distancia entre el centro y el punto en la placa donde se tiene un haz difractado; λ es la longitud de onda de los electrones; L es la longitud de la cámara y d es el espaciado entre planos cristalinos¹¹¹. Al final fueron comparados con las fichas ICDD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Sobreexpresión de la proteína recombinante CEMP1 y purificación.

La sobreexpresión de CEMP1 en los fibroblastos gingivales humanos (FGH) se realizó por la transfección (utilizando una construcción con el vector pcDNA40-CEMP1) del gen, que codifica para CEMP1, en estas células. Para confirmar la transfección estable de CEMP1, ésta se determinó mediante análisis de geles SDS-PAGE al 12% e inmunotransferencias utilizando el anticuerpo monoclonal anti-6XHis y el anticuerpo policlonal de conejo anti-CEMP1. Los resultados de los análisis muestran que ambos anticuerpos reconocen una especie de Mr 50,000, confirmando la expresión de la proteína CEMP1 (Figura 2), mientras que no se detectó la expresión de CEMP1 en FGH transfectados con el vector pcDNA40 vacío. La proteína recombinante CEMP1 contiene una bandera de histidinas en el carboxilo terminal, lo que permite la purificación directa de la proteína en un solo paso con la utilización de IMAC en una columna de afinidad a Ni²⁺. La pureza de hrCEMP1 es superior al 99%, sólo se detectó una sola banda al teñir los geles de poliacrilamida con plata, dicha tinción es capaz de detectar hasta 3 nanogramos de proteína¹¹².

La purificación de CEMP1 por medio de la columna de afinidad a Ni²⁺, IMAC, permitió que a partir de 1 litro de medio condicionante se obtuviera 1 miligramo de proteína pura. Después de los análisis de los geles de los SDS-PAGE al 12%, la proteína hrCEMP1 presentó una movilidad relativa (M_r) de 50,000 (Figura 2, línea 2). La identidad de hrCEMP1 se determinó mediante la técnica de WB utilizando dos anticuerpos específicos, anti-6xHis (Figura 2, línea 3) y anti-CEMP1 (Figura 2, línea 4). Con estos resultados mostramos la posibilidad de expresar a hrCEMP1, lograr purificarla con un alto nivel de pureza y con un rendimiento aceptable en una línea celular no mineralizante (FGH), lo cual permitió realizar las siguientes estrategias experimentales.

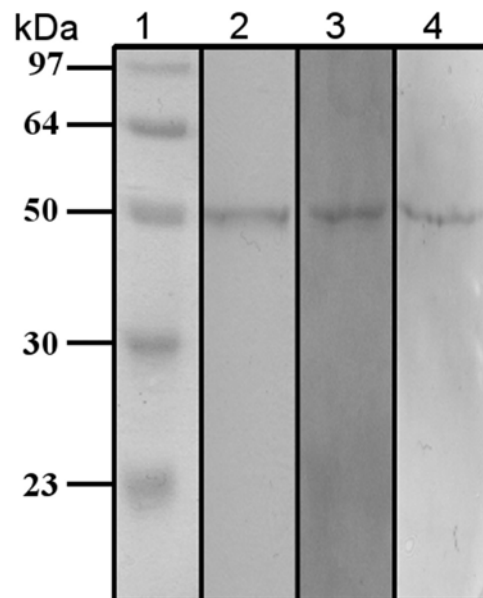


Figura 1: Purificación de hrCEMP1 (línea 2) y se confirma la identidad de hrCEMP1 [anti-6xhis (línea 3) y anti-CEMP1 (línea 4)].

2. Dicroísmo circular

Mediante dicroísmo circular se determinó la estructura secundaria de la proteína CEMP1. Las bandas de los espectros encuentran su máximo a los 218 nm, lo cual determina un mayor contenido de estructura en hojas β (Figura 3). Se realizaron experimentos con diferentes porcentajes de trifluoroetanol (20% y 40%) para identificar cambios en el contenido de la estructura, sin mostrar cambios significativos.

Los análisis de los espectros de DC que revelaron el contenido de estructura secundaria de hrCEMP1 se muestra en la tabla II. Es notable la mayor abundancia de hojas β . CEMP1 tiene una región en su secuencia de aminoácidos, del 30 al 110, que muestra una identidad del 40 % con la colágena X y presenta reacción cruzada contra anticuerpos específicos a la colágena X²⁷. Por lo anterior, se consideraba a CEMP1 como una proteína relacionada a la familia de las colágenas. Sin embargo, no cuenta con las repeticiones clásicas Gly x y. Es evidente la alta estructura desordenada presente en hrCEMP1. Es importante hacer notar que

estos resultados son consistentes incluso en la presencia de TFE a altas concentraciones (40%). La β -lactoglobulina es una proteína que tiene una estructura predominantemente β , 9 hojas β antiparalelas y una α -hélice. Pero al agregar TFE a una concentración del 10 al 20% se induce un cambio drástico en la conformación hacia una estructura que contiene predominantemente α -hélice. El TFE se conoce por estabilizar e inducir la estructura α -hélice en proteínas y péptidos. Sin embargo, las relaciones entre las estructuras inducidas con TFE y sus estructuras nativas no es clara¹¹³. hrCEMP1 ha mostrado no tener propensión a formar α -hélices debido a la interacciones locales promovidas por el TFE.

Recientemente se ha propuesto que proteínas con un alto nivel de estructura al azar pueden unirse a varios ligandos y ser multifuncionales; tales como las proteínas SIBLING y HMGI(Y)^{114,115}. Esta característica podría explicar la razón por la cual hrCEMP1 regula el crecimiento cristalino y la composición de los cristales de HA, así como también induce la expresión de proteínas relacionadas al proceso de biomineralización y promueve la diferenciación de células FGH hacia un fenotipo cementoblástico/osteoblástico^{98,27}. Es importante destacar que muchas de las proteínas asociadas al proceso de biomineralización en mamíferos tienen una mayor estructura β , como: AMEL^{45,116}, OPN¹¹⁷, DMP1¹¹⁸ y BSP¹¹⁹.

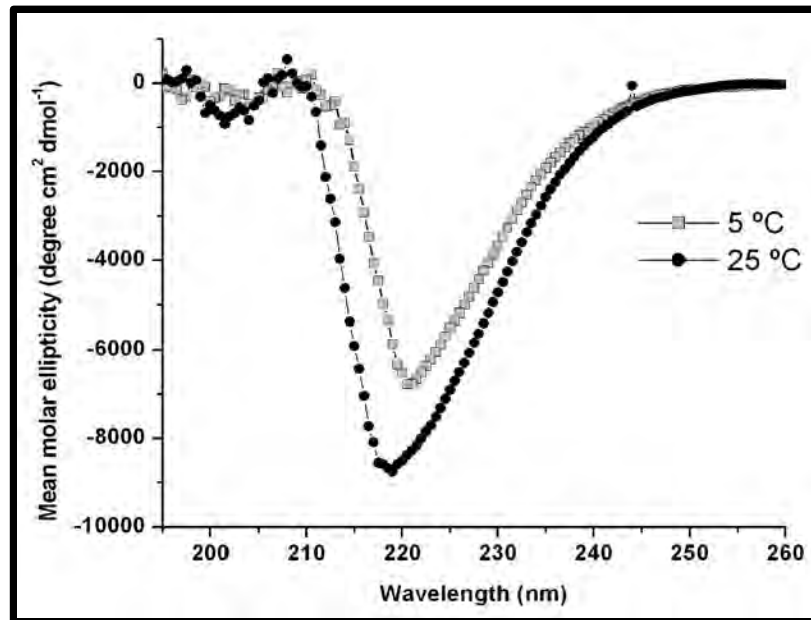


Figura 2: Estimación del contenido de estructura secundaria de hrCEMP1. hrCEMP1 se resuspendió en una solución de PBS.

Tabla 1: Porcentajes de estructura secundaria estimadas del análisis de los espectros de la figura 3 a través del programa CONTIN.

	205-260 nm (5 °C)	205-260 nm (25 °C)
Hélice	10.00%	10.50%
Antiparalela	32.40%	31.90%
Paralela	5.80%	5.80%
Giros beta	16.70%	16.70%

3. Dispersión dinámica de luz

Mediante dispersión dinámica de luz (DLS), se determinó que la proteína se encuentra principalmente como una partícula de 6.5 nm. Estos agregados contribuyen a una molécula única de M_r 50, 000 (Figura 4). Su contribución en volumen pertenece a una sola macromolécula, con M_r de 50, 000.

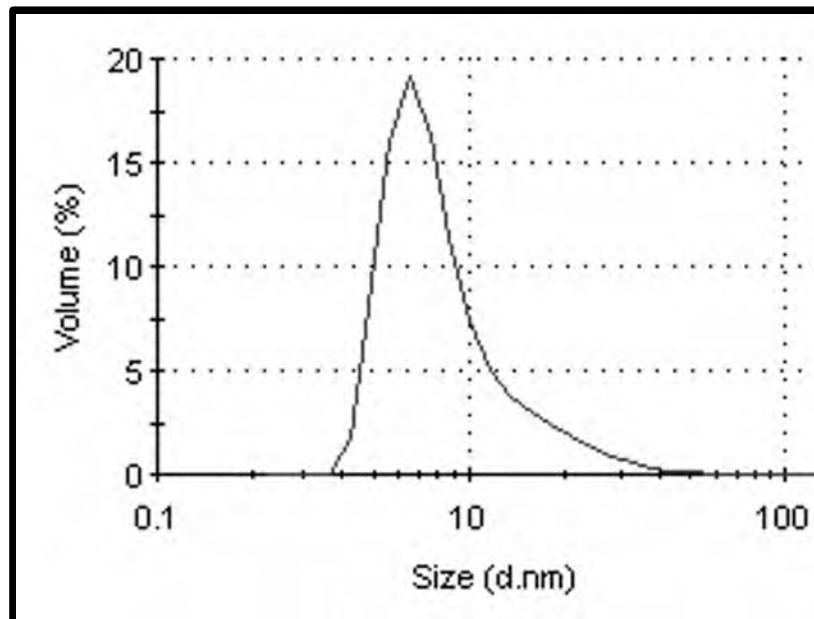


Figura 3: Análisis de DLS para hrCEMP1. Donde se confirma que la movilidad relativa de CEMP1 es de 50 000 y se observa que CEMP1 se encuentra

4. Puentes disulfuro

Se utilizó 4,4-ditiodipiridina para determinar la concentración de tioles o sulfhídricos libres por mol de proteína. Al estar los sulfhídricos libres la 4,4-ditiodipiridina se une a ellos. Como resultado de la reacción se libera 4-tiopiridona. La 4-tiopiridona presenta absorbancia a 324 nm. 10.2 tioles por proteína se encuentran libres en condiciones desnaturizantes, mientras 0.14 tioles libres por proteína se encuentran libres en condiciones nativas. La ausencia

de grupos sulfidrilos libres en hrCEMP1 fue demostrada debido a la falta de reacción con 4,4'-ditiodipiridina en condiciones desnaturalizantes. Por lo tanto, todos los residuos cisteína presentes en CEMP1 deben estar ligados por puentes de disulfuro.

Los puentes disulfuro generalmente estabilizan los elementos de estructura en las proteínas. Por ejemplo, en la osteocalcina se encuentra un puente disulfuro entre los aminoácidos cys 23 y cys 29 que estabiliza las cadenas α -helice⁸⁴; la osteonectina, entre los aminoácidos 54 y 286 cuenta con 7 puentes disulfuro¹²⁰. Uno de los puentes disulfuro, cys 138 y cys 248, estabiliza la unión osteonectina-colágena y favorece la formación de las asas para la unión a calcio¹²¹. Probablemente los puentes disulfuro presentes en CEMP1 estabilizan los elementos de estructura secundaria y permitan mantener sus funciones. La estructura secundaria determinada previamente como estructura en hojas β y al azar, principalmente, le permiten a CEMP1 la formación de asas y a su vez le permiten diferentes configuraciones.



Figura 4: Probables sitios de los puentes disulfuro en CEMP1

Con la finalidad de presentar los probables sitios de los puentes disulfuro en la secuencia de aminoácidos de CEMP1 se utilizaron los programas Disulfind¹²² y Metal Detector¹²³. Ambos presentaron las mismas predicciones (Figura 5).

5. Glicosilaciones

Para determinar si CEMP1 es una glicoproteína, se empleó un método de inmunodetección. En esencia este método permite la detección de motivos carbohidratos y se basa en la oxidación de los grupos hidroxilo por el metaperyodato de sodio y la subsiguiente formación de grupos aldehído, que se encuentran disponibles para reaccionar con la biotina. La unión del grupo aldehído con la biotina se detecta mediante la unión de la biotina a la estreptavidina. La estreptavidina se encuentra dentro de un complejo, estreptavidina-peroxidasa¹²⁴. Mediante esta técnica se determinó a CEMP1 como una glicoproteína con una M_r 50,000 (Figura 6). Se utilizó a la transferrina como control positivo.

La presencia de carbohidratos podría explicar los cambios en la movilidad relativa en CEMP1, aunque a la fecha se desconocen la función y los tipos de carbohidratos presentes en CEMP1. Se ha demostrado que las glicosilaciones en las proteínas relacionadas al fenómeno de la biomineralización juegan un papel fundamental en la unión a iones calcio y unión a colágena; como es el caso de SPARC, donde el dominio II o dominio tipo folistatina (FS) contiene dos sitios de glicosilación tipo N en Asp71 y Asp99 las cuales determinan la unión a la colagena¹²⁵.

6. Desglicosilaciones

Para determinar el cambio en la movilidad relativa de CEMP1 se trató con glicosilasas y se determinó el tipo de glicosilación presente (O-glicosilación o N-glicosilación). El análisis *in silico* se realizó con los programas NetNGlyc 1.0¹²⁶ y NetOGlyc 3.1¹²⁷, cuya función es predecir el tipo de glicosilación presente en una secuencia de aminoácidos y su posición en la misma. Los resultados en NetNGlyc 1.0 fueron los siguientes: 2 sitios de N-glicosilación Asn-X-Ser/Thr en las posiciones 20 y 25. Mientras, en NetOGlyc 3.1 los resultados fueron:

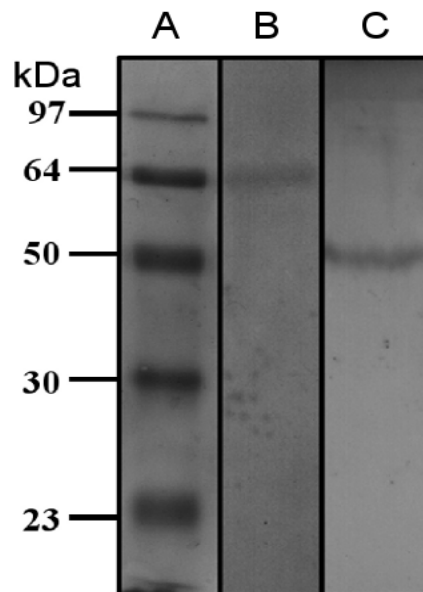


Figura 5: Identificación de glicosilación en hrCEMP1. En el carril B se muestra la reacción positiva al marcaje de los glicanos presentes en la transferina. En el carril C se muestra la reacción positiva al marcaje de los glicanos presentes en CEMP1.

13 sitios de O-glicosilación (S/T) en las posiciones 3, 4, 6, 8, 27, 30, 38, 162, 166, 171, 184, 186 y 200. Es importante hacer notar el mayor número de glicosilaciones tipo O, aunque con umbrales muy bajos; mientras las glicosilaciones tipo N son menores pero umbrales mayores (Figura 7).

En la etapa experimental, se utilizó el kit Glycoprotein Deglycosylation (Calbiochem, San Diego, CA) para desglicosilar 200 μ g de CEMP1 en cada experimento de desglicosilación, usando el protocolo estándar en condiciones desnaturizantes, y el resultado se visualizó por medio de geles de SDS-PAGE al 12%. Para comprobar la funcionalidad del kit se usó fetuina bovina como control (datos no presentados). La proteína recombinante CEMP1 fue sometida a un tratamiento con una mezcla de glicosidasas, las cuales incluyen: N-glicosidasa F, endo- α -N-acetilgalactosaminidasa, α 2-3,6,8,9-neuraminidasa, β 1,4-galactosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa.

Evidentemente, CEMP1 cambia su M_r sólo en presencia de glicosilasas tipo N

(Figura 8). El análisis de la movilidad electroforética concuerda con los resultados previos en bioinformática, en los cuales CEMP1 tiene valores altos para glicosilaciones tipo N y bajos para glicosilaciones tipo O. Los resultados experimentales muestran que CEMP1 sólo tiene glicosilaciones tipo N. Se realizó un electroforegrama para determinar la M_r de CEMP1. CEMP1 tuvo un cambio en la M_r de 50 000 a 39 000.

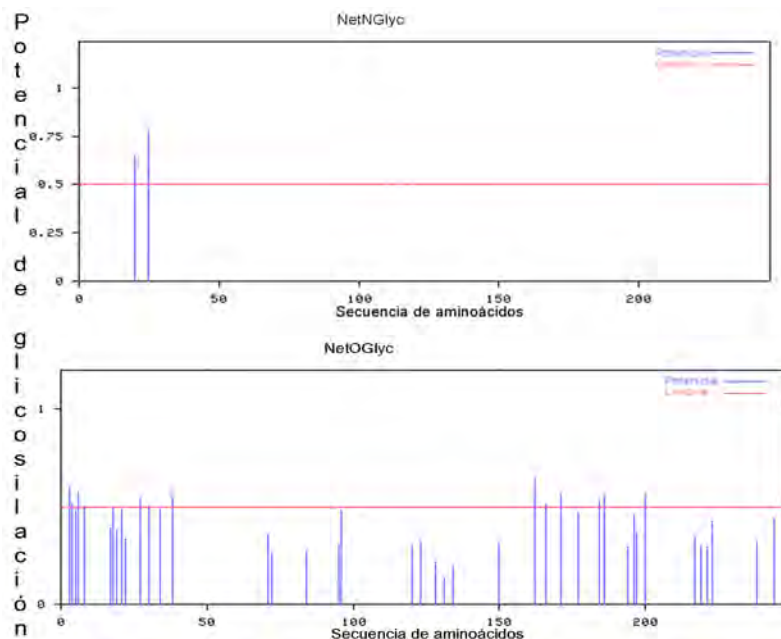


Figura 6: Potenciales sitios de glicosilación en CEMP1. En la gráfica obtenida con NetNGlyc se observan 2 sitios posibles de glicosilación tipo N. Mientras en la gráfica elaborada con NetOGlyc se muestran 13 posibles sitios de glicosilación tipo O.

En estudios previos refieren que la M_r de CEMP1 expresada en células procariontes es de 30,000²⁷, y la M_r de hrCEMP1 expresada en células eucariontes es de 50,000⁹⁸. Otros autores refieren que la M_r de hrCEMP1 es de 44, 000⁹⁵, donde CEMP1 se inmunoidentificó a partir de células del folículo dental *in vitro*, las cuales se consideran precursoras de fibroblastos del ligamento periodontal, cementoblastos y osteoblastos.

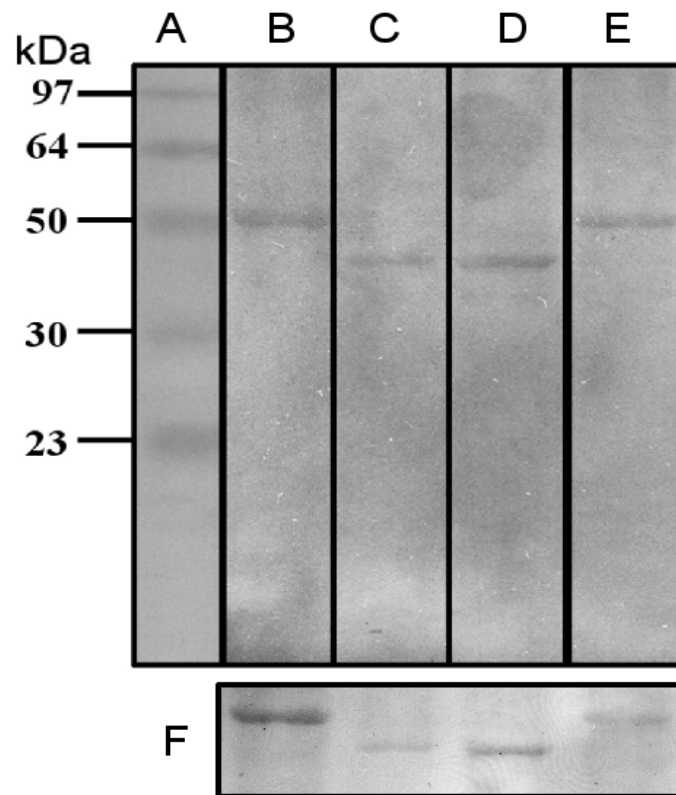


Figura 7: Determinación del N-glicosilación en hrCEMP1. C: Incubación de hrCEMP1 con distintas N y O glicosilasas. D: Incubación de hrCEMP1 con N glicosilasas. E: Incubación de hrCEMP1 con O glicosilasas. (F) Inmunoidentificación de hrCEMP1 antes y después de haberse expuesta a diversas glicosilasas.

La proteína recombinante humana CEMP1 contiene en el carboxilo terminal una bandera de 6 histidinas y el epítopo V5, estos aminoácidos añadidos a hrCEMP1 modifican su movilidad relativa entre 4,000 y 6,000, de acuerdo a la información provista por el fabricante. Las N-glicosilaciones en hrCEMP1 modifican la movilidad relativa en 11,000 y las fosforilaciones posiblemente modifiquen su M_r en 2,000. Estos datos dan sentido a todos los reportes previos y sugieren, que la movilidad relativa de CEMP1 humana es de aproximadamente 45,000, mientras que la movilidad relativa de hrCEMP1 es de aproximadamente de 50,000.

A la fecha el papel exacto de las glicosilaciones en CEMP1 se desconoce. Se considera que las glicosilaciones en las proteínas relacionadas al proceso de

biomineralización tienen un papel fundamental en la nucleación y formación de los cristales de HA. Los glicanos poseen una gran carga superficial, como el ácido siálico, dicha carga superficial facilita la unión de los iones calcio. Existen reportes donde los glicanos promueven la mineralización de la hidroxiapatita¹²⁸ y a sus vez están implicados en la osificación endocondral, remodelación ósea y reparación de las fracturas óseas¹²⁹.

7. Fosforilaciones en CEMP1

La secuencia de aminoácidos de CEMP1 posee múltiples sitios potenciales de fosforilación; estos resultados se obtuvieron con la herramienta bioinformática NetPhos 2.0¹³⁰, el cual analiza las fosforilaciones posibles y su posición en la secuencia de aminoácidos. Los resultados son los siguientes: 10 fosforilaciones en serinas (posiciones: 8, 17, 19, 22, 34, 84, 150, 166, 217 y 219) y 8 fosforilaciones en treoninas (posiciones: 21, 71, 96, 128, 186, 196, 223 y 244). Debe destacarse que las fosforilaciones en serinas son más abundantes y los valores calculados son más altos en comparación con los obtenidos en treoninas. No existen tirosinas en la secuencia de aminoácidos de CEMP1 (Figura 9).

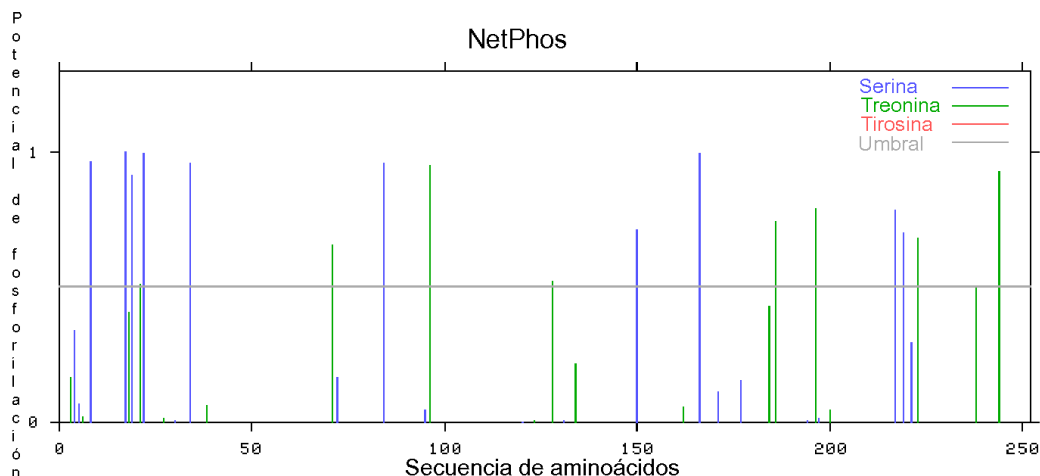


Figura 8: Sitios potenciales de fosforilación de CEMP1. El programa NetPhos determina 10 probables sitios de fosforilación en residuos Ser y 8 probables sitios de fosforilación en residuos Thr.

Debido a que experimentalmente se desconoce si hrCEMP1 posee fosforilaciones, nosotros examinamos mediante inmunoidentificación si hrCEMP1 esta fosforilada. Los anticuerpos anti-fosfotreonina y anti-fosfoserina (Zymed San Francisco, CA, USA) se utilizaron para determinar la reacción cruzada con hrCEMP1 (Figura 10). Ambos anticuerpos detectaron la misma especie (M_r 50,000), previamente identificada con los anticuerpos anti-CEMP1 y anti-6xhis.

CEMP1 de forma similar a las proteínas SIBLING, se encuentra fosforilada en los residuos ser y thr. Las proteínas de esta familia se encuentran altamente fosforiladas y presentan heterogeneidades en sus fosforilaciones dependiendo de su localización tisular^{131,57,132}. Las fosforilaciones se consideran sitios de unión para los iones calcio, por tanto es de vital importancia determinar si las fosforilaciones en CEMP1 son necesarias para su eficacia en el proceso de mineralización^{131,57}.

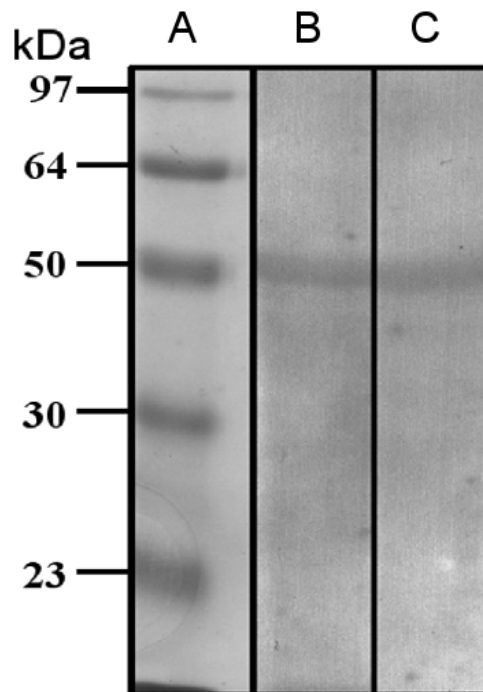


Figura 9: Inmunodetección de fosfoserinas y fosfotreoninas en hrCEMP1. En los carriles B y C se electrotransfirió hrCEMP1, mientras el carril estuvo expuesto al anticuerpo anti-fosfoserina, el carril C se expuso al anticuerpo anti-fosfotreonina.

8. Columna de afinidad hidroxiapatita

Las funciones específicas de las proteínas de matriz extracelular en el proceso de biomineralización no se conocen completamente a la fecha. Una de las aproximaciones para estudiar el fenómeno es medir la afinidad de estas proteínas a la hidroxiapatita (HA). Diversas proteínas se han reportado como afines a la HA, y como nucleadoras e inhibidoras de la HA^{133,134,135}. Dichas proteínas son ácidas y con un gran porcentaje de estructura al azar. Resultados previos han demostrado que CEMP1 juega un papel importante en la formación de HA^{27,5}. 50 µg de CEMP1 se inyectaron a una columna de hidroxiapatita y se eluyó a distintos gradientes de fosfatos de sodio pH 7.2. Este parámetro permite evaluar la afinidad de CEMP1 a la HA. CEMP1 presenta una fuerte afinidad a HA y se eluyó a una concentración de 300 mM de fosfato de sodio (Figura 11). Proteínas no relacionadas al proceso de biomineralización eluyen a concentraciones bajas de fosfatos de sodio, tabla III, entre 10 mM y 120 mM¹⁰², mientras que las proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización eluyen a concentraciones de hasta 200 mM de fosfatos de sodio¹³⁶. Los resultados demuestran que CEMP1 posee una muy alta afinidad por la HA. El mecanismo de interacción específica entre CEMP1 y la hidroxiapatita aún es desconocido; sin embargo, se propone que los dominios negativamente y positivamente cargados de la CEMP1 se unen a la superficie del mineral y son suficientes para lograr esta fuerte interacción (Tabla III).

El comportamiento de la CEMP1 *in vivo* depende de sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, afinidad a HA) y también de cómo se interrelacione con otros miembros de la matriz extracelular^{137,60}. La afinidad de la CEMP1 por la hidroxiapatita puede ser amplificadas por interacciones con otras proteínas e iones^{138,139}; factores que deben ser considerados para evaluar sus funciones *in vivo*¹⁴⁰. Además, las interacciones regionales podrían ser un camino por el cual la proteína puede presentar distintas funciones. La estrategia metodológica que se ha utilizado es un sistema por el cual la proteína con o sin modificaciones postraduccionales, refleja su naturaleza de unión a la hidroxiapatita.

Tabla II: Elución de proteínas no relacionadas al proceso de biomineralización en una columna de HA a un pH 7.2. Las concentraciones molares de elución de fosfato de sodio se presentan en la columna derecha.

BSA	0.07
Ovoalbúmina	0.05
Lisozima	0.08
Rnasa A	0.12
Mioglobina	0.12
Pepsina e	0.01
Anhidrasa carbónica	0.11

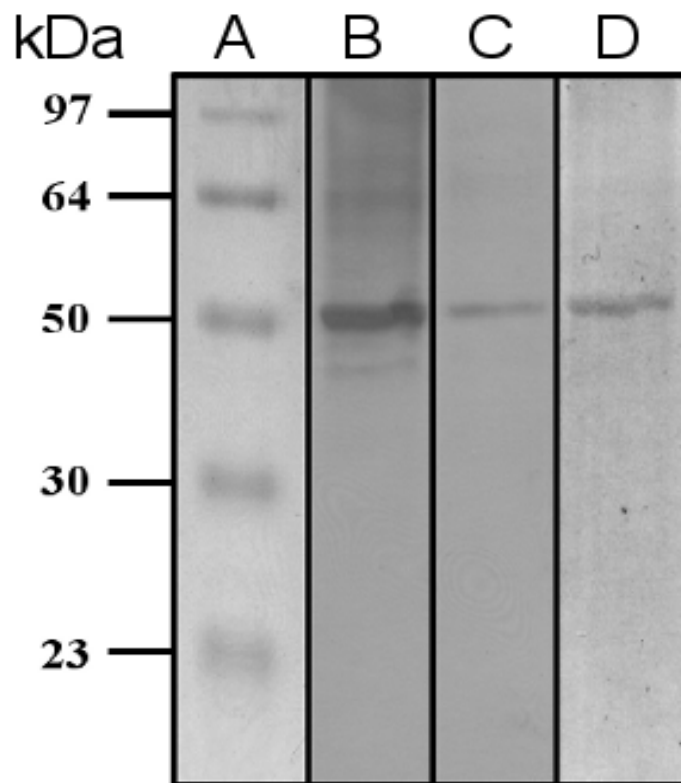


Figura 10: Afinidad de hrCEMP1 a hidroxiapatita.. Carril B una fracción de baja pureza de la purificación por IMAC e inyectada a una columna de HA. A una concentración de 300 mM de fosfato de sodio se eluyó a hrCEMP1 (carril C) y se comprobó su identidad por electroinmunotransferencia (carril D).

La alta afinidad entre CEMP1 y la hidroxiapatita sugiere una interacción proteína-mineral, y su participación durante el proceso de biomineralización del cemento radicular y otros tejidos mineralizados. En futuros estudios debe determinarse la constante de asociación entre CEMP1 y HA. Sin embargo, la alta concentración de fosfato de sodio a la cual se eluye CEMP1 podría anticipar una constante alta de asociación entre HA y CEMP1. Del mismo modo debe ser considerado el papel del ambiente iónico entre la afinidad de HA y CEMP1. El Ca^{2+} es uno de los elementos principales de la celda de unidad de la hidroxiapatita y el hueso, afectando la unión proteína-HA. El Mg^{2+} es un fuerte inhibidor de la mineralización en condiciones de fuerza iónica variable y disminuye la unión entre proteína y HA¹⁴¹.

Se sugiere que la CEMP1 interacciona fuertemente con la HA a través de sus dominios negativamente y positivamente cargados, facilitando la mineralización en etapas tempranas, colaborando en el depósito mineral y el crecimiento de cristales de fosfato octacálcico (OCP); también que regula el proceso de maduración de cristales de HA y de igual forma su interacción con otras proteínas de la matriz extracelular, facilitando la mineralización del tejido. CEMP1 además promueve la actividad de la fosfatasa alcalina, promoviendo la mineralización del cemento radicular⁹⁸.

9. Cristalización de fosfatos de calcio *in vitro*

El objetivo experimental fue determinar el papel de CEMP1 en el proceso de biomineralización y su efecto en la morfología de los cristales de fosfatos de calcio. Para ello se utilizó la técnica de contradifusión en agarosa, figura 12. Esta técnica es la más ampliamente usada para caracterizar el efecto de las macromoléculas de matriz extracelular en el proceso de biomineralización¹⁰⁹.



Figura 11: Capilares para el crecimiento de cristales de fosfatos de calcio.

En experimentos control de cristalización *in vitro*, los fosfatos de calcio presentan formas de agujas que en cúmulos se llaman whiskers¹⁴². (Figura 15A). La concentración de proteína utilizada en nuestros experimentos fue de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la figura 15B se observa una modificación al hábito cristalino de los fosfatos de calcio debido a la adición 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, en 7 días de crecimiento. La CEMP1 es un factor determinante en el cambio del crecimiento, morfología y organización de los cristales de fosfatos de calcio. El mecanismo por cual se realiza este cambio no está determinado. La morfología de los cristales de hidroxiapatita que crecieron en ausencia de hrCEMP1 tienen una morfología macroscópica de placas y una morfología microscópica de agujas concentradas en esferas, mientras que, los cristales crecidos en presencia hrCEMP1 tienen una morfología de drusas y agujas y esta morfología es más ordenada (figura 13).

El análisis elemental de los cristales determinó que los cristales crecidos en ausencia de hrCEMP1 tienen una relación Ca/P de 1.6, el cual es igual al valor teórico de la HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ¹⁴³. En las condiciones experimentales, utilizando hrCEMP1, se determinó que la relación Ca/P es 1.3 $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, de acuerdo a los valores teóricos reportados corresponde al mineral de OCP¹⁴³ (Figura 14).

Posteriormente se indexaron todos los patrones de difracción; 10 patrones de

difracción experimentales y 7 patrones de difracción control. Para indexar los patrones de difracción se midió la distancia entre el punto central y los difractados. Estos datos fueron utilizados en la ecuación descrita en los materiales y métodos. Los valores de R fueron comparados con la ficha cristalográfica de los fosfatos de calcio (HA, archivo ICDD: 24-0033) (OCP, archivo ICDD: 26-1056). Los patrones de difracción de los cristales control presentan índices de Miller (hkl: 1 0 2; hkl: 3 0 0 y hkl: 2 1 1) y distancias interplanares (3.17 Å, 2.72 Å y 2.81 Å) representativas para HA. Distintamente los cristales crecidos en presencia de hrCEMP1 presentan índices de Miller (hkl: 2 2 1; hkl: -1 2 2 y hkl: -4 -4 1) y distancias interplanares de 3.74 Å, 2.94 Å and 2.15 Å, los cuales corresponden claramente al fosfato de calcio cristalino de OCP (Figura 15).

Los patrones de difracción de los cristales control demostraron que el mineral cristalizado en el sistema de doble difusión es hidroxiapatita. Todos los cristales experimentales pertenecen a fosfato octacálcico (OCP). Generalmente los cristales de OCP que crecen en sistemas *in vitro* mediante síntesis química presentan formas de placas^{144,145}, mientras que los cristales de OCP sintetizados a partir de una plantilla proteica presentan formas de esferulitos y drusas¹⁴⁶. Estos experimentos demuestran que CEMP1 es una proteína que promueve el cambio del hábito cristalino y determina la formación de cristales de fosfato octacalcico en morfologías específicas.

En la mayoría de los casos conocidos de biomineralización se ha observado que la nucleación y la orientación de los cristales formados es un proceso altamente controlado; por ello se ha asumido tácitamente que el proceso de la nucleación es el primer paso para la formación de los minerales⁴⁰. La precipitación de fosfatos de calcio *in vitro* frecuentemente involucra la formación de una fase desordenada y soluble, tras la cual se da una transformación a una fase menos soluble y usualmente mucho más ordenada (de acuerdo con la ley Ostwald-Lussac, sucede cuando el núcleo formado inicialmente es completamente diferente de la estructura final). Sin embargo, si una plantilla para la nucleación se

encuentra presente, la fase madura puede ser inducida directamente¹⁴⁷. Por lo tanto, son posibles dos formas en las cuales los núcleos de los cristales pueden ser formados.

Estudios iniciales sobre mineralización en invertebrados mostraron que la utilización del método de formación de precursores minerales en organismos vivos es posible. La primera evidencia inequívoca de la presencia de una fase transitoria de precursores minerales en la biomineralización se presentó por Lowenstam *et al.*¹⁴⁸, en sus estudios de la formación de magnetita en los dientes de la rádula del los quitones (*Cryptochiton stelleri*); dichos estudios mostraron que la primer fase mineral formada en los dientes de los quitones es un óxido de hierro hidratado paracristalino, llamado ferrihidrita y finalmente este mineral tuvo una transformación hacia magnetita cristalina¹⁴⁹. Aportaciones recientes nos hacen ver que este sistema es más común de lo esperado. Existen pruebas solidas en vertebrados¹⁵⁰ donde la primera fase mineral es un fosfato de calcio amorfo (ACP), posteriormente se forma una fase de OCP y finalmente HA¹⁵¹.

La actual teoría de biomineralización indica que en la formación del tejido mineralizado primero se da la nucleación de fosfatos de calcio amorfo (ACP) y posterior a ésto, hay una transformación en fase solida a OCP que finalmente se transforma en HA³. Nuestras datos indican que CEMP1 participa en la nucleación y estabilización de una fase mineral soluble y poco ordenada de fosfato octacálcico con respecto a la hidroxiapatita, ésto en etapas tempranas de la formación del tejido del cemento.

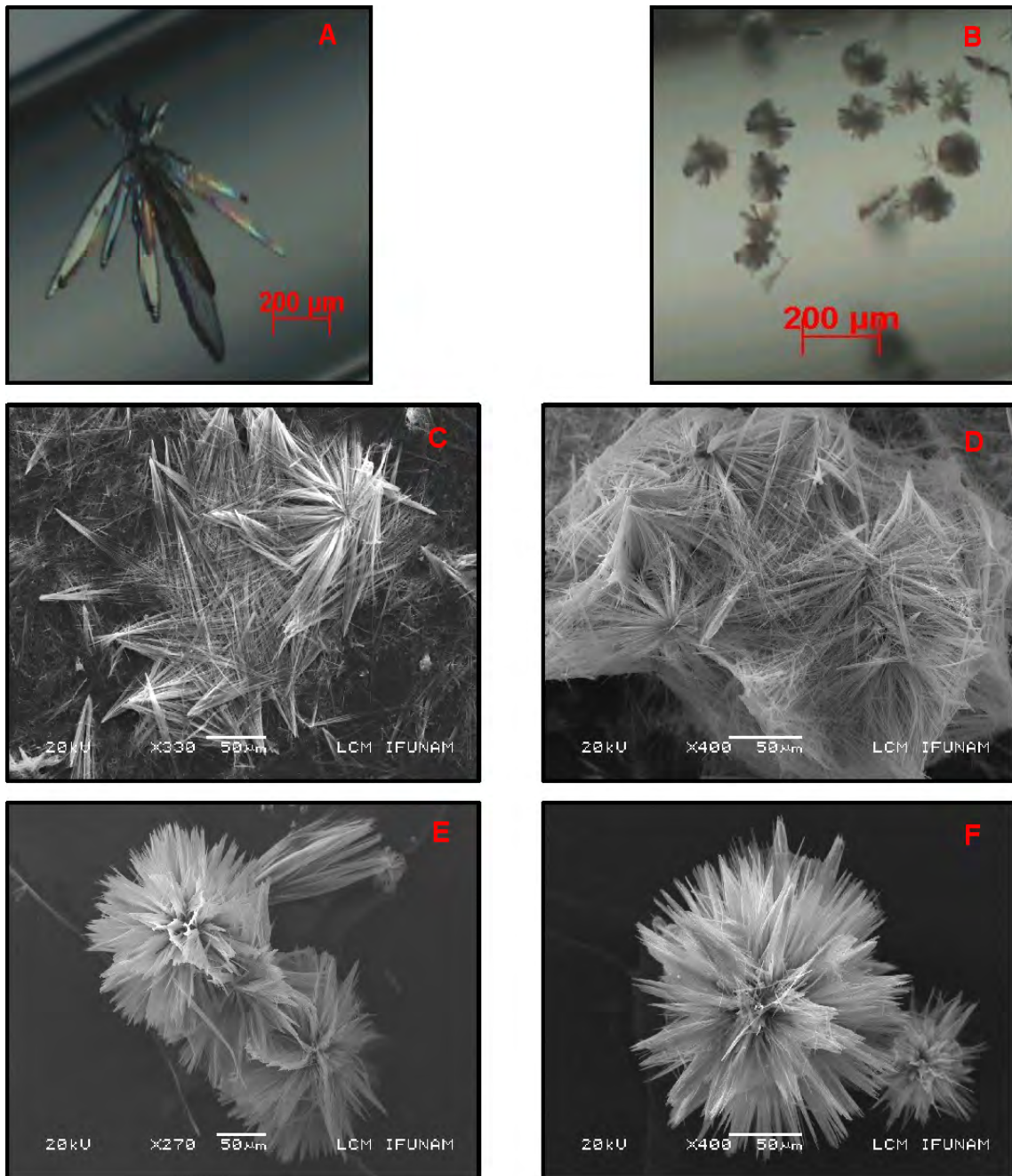


Figura 12: Cristales de fosfatos de calcio. Las imágenes A y B corresponden a la vista macroscópica de los experimentos control y experimental, respectivamente. Las imágenes C y D corresponden a la vista microscópica de los cristales control, es decir, en ausencia de hrCEMP1. Las imágenes E y F pertenecen a los cristales crecidos en presencia de hrCEMP1.

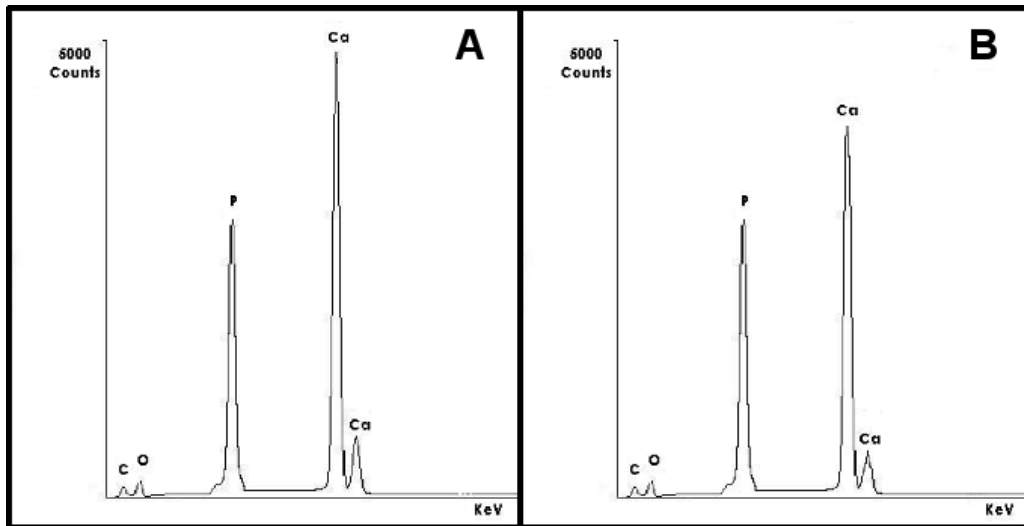


Figura 13: Espectros de EDS. Panel A se presenta el espectro de EDS correspondiente al control. Panel B: espectro de EDS de los cristales en presencia de hrCEMP1. Los espectros son similares pero la relación Ca/P entre ellos no es la misma.

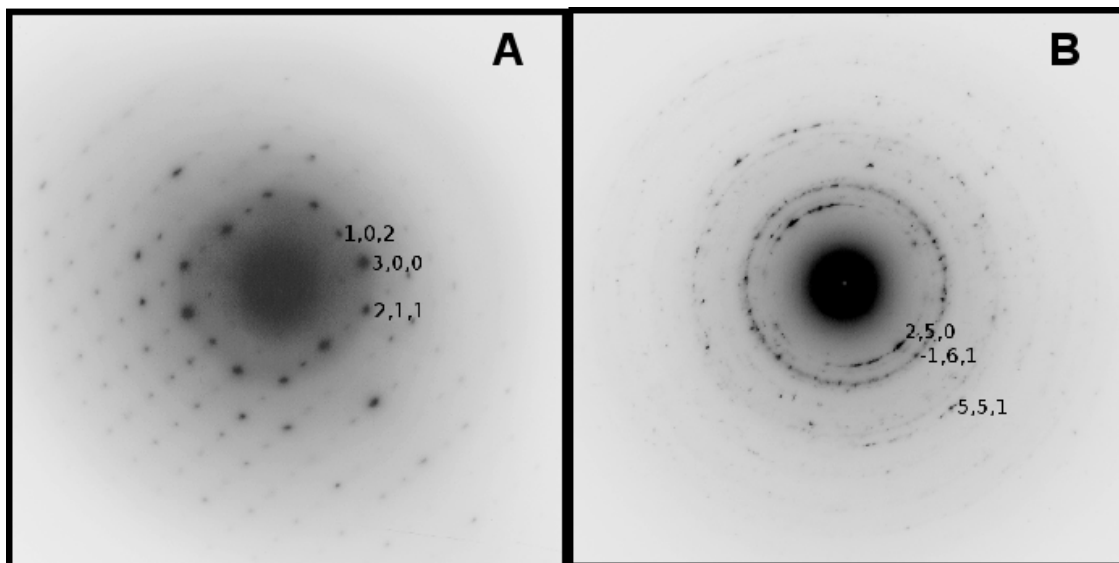


Figura 14: Patrones de difracción. La imagen A corresponde a los cristales crecidos en ausencia de hrCEMP1, mientras la imagen B corresponde a los cristales en presencia de hrCEMP1.

En conjunto los resultados de este trabajo muestran que la CEMP1 biológicamente activa juega un papel importante durante el proceso de mineralización. Esta proteína es fundamental para la síntesis de cristales de fosfato octacálcico en forma de agujas y es responsable de la nucleación de los mismos. El fosfato octacálcico es una fase transitoria durante el crecimiento de cristales biológicos. En cristales pequeños, el fosfato octacálcico es precursor de la hidroxiapatita y sólo puede ser detectado en cristales grandes a causa de su transformación cinética lenta. Este proceso se reporto en calcificaciones normales (esmalte, dentina, cemento, hueso) y patológicas (calcificaciones renales).

Estos datos, abren la puerta a CEMP1 como un posible agente terapéutico y se apoyan en las evidencias que muestran a CEMP1 como un factor importante en el proceso de mineralización biológica del cemento radicular e inductor de cambios fenotípicos de células no osteogénicas hacia un fenotipo osteoblástico/cementoblástico.

Otras moléculas relacionadas al proceso de mineralización tales como BMP-2, 4 y 7 inducen la reparación/regeneración de tejido mineralizado¹⁵². La liberación sostenida de BMP-2 utilizando la estrategia de terapia génica induce la formación de hueso *in vivo*¹⁵³. La proteína recombinante humana amelogenina (rHAM(+)), también es efectiva para inducir la regeneración *in vivo* de todos los tejidos de soporte del órgano dentario después de la creación de periodontitis experimental en perros, donde el reclutamiento de las células progenitoras mesenquimales es un factor clave durante la regeneración de tejidos periodontales¹⁵⁴. La amelogenina y otras proteínas tales como OCN, BSP y OPN tienen la habilidad para unirse, regular el crecimiento y nuclear cristales de hidroxiapatita así como para promover la mineralización⁵⁷.

Las nuevas estrategias terapéuticas tales como el uso de andamios de PLGA para aplicaciones de ingeniería de tejidos podrían ser aplicadas para demostrar la capacidad de una proteína para lograr la regeneración de los tejidos mineralizados. Estas estrategias podrían abrir nuevas estrategias para el

Eduardo Villarreal-Ramírez

Doctorado en Ciencias Biomédicas

desarrollo de nuevos dispositivos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad periodontal y otras enfermedades óseas, utilizando como principio a la proteína recombinante humana CEMP1.

CONCLUSIONES

Los estudios sobre la función y la estructura de CEMP1 se han limitado por las dificultades en el aislamiento de la proteína a partir de cemento radicular humano y/o bovino, debido principalmente al bajo recambio metabólico, la cantidad de tejido que se deposita y su enclaustramiento en la matriz mineralizada compuesta principalmente de hidroxiapatita.

En este estudio se describe la producción, purificación y caracterización de la proteína recombinante humana CEMP1. Se mostró que CEMP1 posee modificaciones post-traduccionales, N-glicosilación y fosforilación. También se demuestra que la proteína recombinante humana CEMP1 desempeña un papel importante en el proceso de mineralización, nucleando cristales de fosfato octacálcico y regulando el crecimiento de éstos. Los resultados proveen las bases de futuros estudios para el análisis de las características de dicha proteína hacia nuevas estrategias terapéuticas, con el objetivo de tratar las diferentes afecciones de los tejidos mineralizados y para promover la regeneración del cemento radicular y/o hueso en tejidos adultos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barthelat F. Biomimetics for next generation materials. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* **365**, 2907-2919(2007).
2. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol. 2000* **41**, 196-217(2006).
3. Mann S. *Biom mineralization*. (Oxford University Press, USA: 2002).
4. Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J. Dent. Res* **81**, 541-546(2002).
5. Alvarez-Pérez MA, Pitaru S, Alvarez Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* **143**, 1-13(2003).
6. Lowenstam HA & Weiner S. *On Biom mineralization*. (Oxford University Press, USA: 1989).
7. Subburaman K, Pernodet N, Kwak SY, DiMasi E, Ge S, Zaitsev V, Ba X, Yang NL, Rafailovich M. Templated biom mineralization on self-assembled protein fibers. *PNAS* **103**, 14672-14677(2006).
8. Margolis HC, Beniash E, Fowler C.E. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res* **85**, 775-793(2006).
9. Mann, S. Molecular recognition in biom mineralization. *Nature* **332**, 119-124(1988).
10. Weiner S & Addadi L. Biom mineralization. At the cutting edge. *Science* **298**, 375-376(2002).
11. Sarikaya M. Biomimetics: materials fabrication through biology. *PNAS* **96**, 14183-14185(1999).
12. Sarikaya M, Tamerler C, Jen AK, Schulten K, Baneyx F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat Mater* **2**, 577-585(2003).
13. Cho MI & Garant, PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000* **24**, 9-27(2000).
14. Nanci, A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. (Mosby: 2007).
15. Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Ortiz-López J, Arzate H. X-ray microanalysis of human cementum. *Microsc Microanal* **11**, 313-318(2005).
16. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry, 2 Volumes*. (Wiley-Blackwell: 2008).
17. Bartold PM & Narayanan AS. *Biology of the Periodontal Connective Tissues*. (Quintessence Publishing (IL): 1998).
18. Sodek J & McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol 2000* **24**, 99-126(2000).
19. Lima E, Bosch P, Lara V, Villarreal E, Piña C, Torres G, Martín S, León B. Metal corrosion in bones implanted with Zinalco--a SAXS and NMR study. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* **76**, 203-210(2006).
20. Bhaskar S & Orban BJ. *Histología y embriología bucal de Orban*. (Ed Acuario: 1994).
21. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech* **60**, 491-502(2003).

22. Robinson, H.B. International Association for Dental Research: Proceedings of the Seventeenth General Meeting Hotel Cleveland, Cleveland, Ohio March 18 and 19, 1939. *J Dent Res* **18**, 213-303(1939).
23. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000* **24**, 73-98(2000).
24. Bartold, P.M. & Narayanan, A.S. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol. 2000* **40**, 29-49(2006).
25. Furtado-Gonçalves P, Antonio-Sallum E, Wilson-Sallum A, Zaffalon Casati M, Toledo S, Nociti Jr. FH. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci* **4**, 651-658(2005).
26. Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* **126**, 256-269(1999).
27. Alvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez-Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* **38**, 409-19(2006).
28. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int. J. Dev. Biol* **45**, 695-706(2001).
29. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J* **6**, 2990-2995(1992).
30. Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P Jr. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* **228**, 651-663(2003).
31. MacNeil RL & Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol 2000* **19**, 8-20(1999).
32. Christner P, Robinson P, Clark CC. A preliminary characterization of human cementum collagen. *Calcif Tissue Res* **23**, 147-150(1977).
33. Grzesik WJ & Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med* **13**, 474-484(2002).
34. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone Miner* **18**, 15-30(1992).
35. Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-Chávez A, Reyes-Gasga J, Ximénez-Fyvie LA. Electron microscopy, micro-analysis, and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res* **79**, 28-34(2000).
36. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodont Res* **25**, 99-105(1990).
37. Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H. Isolation and partial characterization of a growth factor from human cementum. *Bone Miner* **18**, 187-198(1992).
38. Brinckmann J, Notbohm H, & Müller P. *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly*. (Springer: 2005).
39. He, G. & George, A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *J Biol Chem* **279**, 11649-11656(2004).
40. Bonucci, E. *Calcification in Biological Systems*. (CRC: 1992).
41. Fincham AG, Hu Y, Lau EC, Slavkin HC, Snead ML. Amelogenin post-secretory processing during biomineralization in the postnatal mouse molar tooth. *Arch Oral*

Biol **36**, 305-317(1991).

42. Fincham AG, Moradian-Oldak, J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* **126**, 270-299(1999).

43. Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J Struct Biol* **149**, 182-190(2005).

44. Eastoe JE. Organic matrix of tooth enamel. *Nature* **187**, 411-412(1960).

45. Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science* **307**, 1450-1454(2005).

46. Kelley JL & Swanson WJ. Dietary change and adaptive evolution of enamelin in humans and among primates. *Genetics* **178**, 1595-1603(2008).

47. Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, Papagerakis P, Hunter GK, Feng JQ, Yamakoshi F, Simmer JP. Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. *J Dent Res* **76**, 1720-1729(1997).

48. Kobayashi K, Yamakoshi Y, Hu JC, Gomi K, Arai T, Fukae M, Krebsbach PH, Simmer JP. Splicing determines the glycosylation state of ameloblastin. *J Dent Res* **86**, 962-967(2007).

49. Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, Papagerakis P, Hunter GK, Feng JQ, Yamakoshi F, Simmer JP. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem* **283**, 10858-10871(2008).

50. Strawich E & Glimcher MJ. Tooth 'enamelines' identified mainly as serum proteins. Major 'enamelin' is albumin. *Eur J Biochem* **191**, 47-56(1990).

51. Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Termine JD, Young MF. Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* **266**, 16021-16028(1991).

52. Mao Z, Shay B, Hekmati M, Fermon E, Taylor A, Dafni L, Heikinheimo K, Lustmann J, Fisher LW, Young MF, Deutsch D. The human tuftelin gene: cloning and characterization. *Gene* **279**, 181-196(2001).

53. Fukumoto S, Yamada A, Nonaka K, Yamada Y. Essential roles of ameloblastin in maintaining ameloblast differentiation and enamel formation. *Cells Tissues Organs* **181**, 189-195(2005).

54. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* **167**, 973-983(2004).

55. Paine ML, Wang HJ, Luo W, Krebsbach PH, Snead ML. A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. *J Biol Chem* **278**, 19447-52(2003).

56. Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW, Kunieda T, Castranio T, Scott G, Bonewald LB, Mishina Y. The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res* **82**, 776-780(2003).

57. Qin C, Baba O, Butler W. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 126-136(2004).

58. Foster BL, Nociti FH Jr, Swanson EC, Matsa-Dunn D, Berry JE, Cupp CJ, Zhang P,

Somerman MJ. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. *Calcif Tissue Int* **78**, 103-112(2006).

59. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* **16**, 885-893(1979).

60. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 212-226(2008).

61. Franzén, A. & Heinegård, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J* **232**, 715-724(1985).

62. Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *PNAS* **83**, 8819-8823(1986).

63. Craig AM, Smith JH, Denhardt DT. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. *J Biol Chem* **264**, 9682-9689(1989).

64. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* **107**, 1055-1061(2001).

65. Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A, Tenen DG. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta* **996**, 43-48(1989).

66. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM* **95**, 3-13(2002).

67. Gravallesse EM. Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J Clin Invest* **112**, 147-149(2003).

68. Chellaiah MA & Hruska KA. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int* **72**, 197-205(2003).

69. O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb* **14**, 1648-1656(1994).

70. Okada A, Nomura S, Saeki Y, Higashibata Y, Hamamoto S, Hirose M, Itoh Y, Yasui T, Tozawa K, Kohri K. Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. *J Bone Miner Res* **23**, 1629-1637(2008).

71. Kido J, Kasahara C, Ohishi K, Nishikawa S, Ishida H, Yamashita K, Kitamura S, Kohri K, Nagata T. Identification of osteopontin in human dental calculus matrix. *Arch Oral Biol* **40**, 967-972(1995).

72. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* **22**, 147-59(1993).

73. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J* **300 (Pt 3)**, 723-728(1994).

74. Wang L, Guan X, Tang R, Hoyer JR, Wierzbicki A, De Yoreo JJ, Nancollas GH. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of calcium oxalate crystallization. *J Phys Chem B* **112**, 9151-9157(2008).

75. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* **10**, 79-

98(1999).

76. Hunter GK & Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *PNAS* **90**, 8562-5(1993).

77. Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res* **86**, 296-305(2007).

78. Bradshaw AD, Puolakkainen P, Dasgupta J, Davidson JM, Wight TN, Sage EH. SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol* **120**, 949-955(2003).

79. Lane TF & Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* **8**, 163-173(1994).

80. Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* **121**, 1433-1444(1993).

81. Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M. Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* **43**, 308-319(2002).

82. Maillard C, Malaval L, Delmas PD. Immunological screening of SPARC/Osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* **13**, 257-264(1992).

83. Frazão C, Simes DC, Coelho R, Alves D, Williamson MK, Price PA, Cancela ML, Carrondo MA. Structural evidence of a fourth Gla residue in fish osteocalcin: biological implications. *Biochemistry* **44**, 1234-1242(2005).

84. Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DS. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* **425**, 977-980(2003).

85. Flade K, Lau C, Mertig M, Pompe W. Osteocalcin-Controlled Dissolution–Reprecipitation of Calcium Phosphate under Biomimetic Conditions. *Chem Mater* **13**, 3596-3602(2001).

86. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* **23**, 187-196(1998).

87. Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent. Res* **70**, 1272-1277(1991).

88. Barkana I, Alexopoulou E, Ziv S, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Pitaru S, Vardimon AD, Nemcovsky CE. Gene profile in periodontal ligament cells and clones with enamel matrix proteins derivative. *J Clin Periodontol* **34**, 599-609(2007).

89. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodont Res* **30**, 360-368(1995).

90. Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cells. *J Periodont Res* **33**, 126-129(1998).

91. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodont Res* **31**, 144-148(1996).

92. Bar-Kana I, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. Cementum attachment protein manifestation is restricted to the mineralized tissue forming cells of the

periodontium. *Eur J Oral Sci* **106 Suppl 1**, 357-364(1998).

93. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* **29**, 242-248(2001).

94. Saito M & Narayana AS. Signaling reactions induced in human fibroblasts during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* **14**, 65-72(1999).

95. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* **329**, 283-294(2007).

96. Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, Oka H, Kudo Y, Sato S, Ogawa I, Miyaichi M, Takata T. Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells in vitro and in vivo. *Bone* **39**, 1035-1042(2006).

97. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Vaysse F, Roméas A, Arzate H, Conte-Auriol F, Farges JC, Salles JP, Brunel G. Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue Cell* **39**, 257-66(2007).

98. Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández AL, Suárez-Franco JL, Chavarría IG, Villarreal-Ramírez E, Arzate H. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 763-9(2007).

99. Narayanan AS & Page RC. Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva. *J Biol Chem* **251**, 5464-5471(1976).

100. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* **3**, 263-281(1992).

101. Gaberc-Porekar V & Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* **49**, 335-360(2001).

102. Hjerten S, Levin O, Tiselius A. Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch Biochem Biophys* **65**, 132-155(1956).

103. Riener CK, Kada G, Gruber HJ. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* **373**, 266-276(2002).

104. Moreno A, Mas-Oliva J, Soriano-Garca M, Oliver-Salvador C, Bolaños-García M. Turbidity as a useful optical parameter to predict protein crystallization by dynamic light scattering. *J Mol Struct* **519**, 243-256(2000).

105. Greenfield, N.J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* **1**, 2876-2890(2006).

106. Mendoza-Espinosa P, Moreno A, Castillo R, Mas-Oliva J. Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 8-15(2008).

107. Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153-64(2005).

108. He G, Ramachandran A, Dahl T, George S, Schultz D, Cookson D, Veis A,

- George A. *J Biol Chem* **280**, 33109-33114(2005).
109. Silverman L & Boskey AL. Diffusion Systems for Evaluation of Biomineralization. *Calcif Tissue Int.* **75**, 494-501(2004).
 110. García-Ruiz, J.M. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Meth Enzymol* **368**, 130-154(2003).
 111. Yacaman J & Reyes MYJ. *Microscopia electronica : una vision del microcosmos (Ciencia y Tecnologia)*. (Fondo de Cultura Economica: 1995).
 112. Walker JM. *The Protein Protocols Handbook*. (Humana Press: 2009).
 113. Shiraki K, Nishikawa K, Goto Y. Trifluoroethanol-induced stabilization of the alpha-helical structure of beta-lactoglobulin: implication for non-hierarchical protein folding. *J Mol. Biol* **245**, 180-194(1995).
 114. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res. Commun* **280**, 460-465(2001).
 115. Dunker AK & Obradovic Z. The protein trinity--linking function and disorder. *Nat Biotechnol* **19**, 805-6(2001).
 116. Lakshminarayanan R, Yoon I, Hegde BG, Fan D, Du C, Moradian-Oldak J. Analysis of secondary structure and self-assembly of amelogenin by variable temperature circular dichroism and isothermal titration calorimetry. *Proteins* **76**, 560-569(2009).
 117. Kaartinen MT, Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem* **274**, 1729-1735(1999).
 118. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* **2**, 552-558(2003).
 119. Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem* **276**, 36839-48(2001).
 120. Hohenester E, Maurer P, Hohenadl C, Timpl R, Jansonius JN, Engel J. Structure of a novel extracellular Ca²⁺ binding module in BM-40. *Nat Struct Biol* **3**, 67-73(1996).
 121. Hohenester E, Sasaki T, Giudici C, Farndale RW, Bächinger HP. Structural basis of sequence-specific collagen recognition by SPARC. *PNAS* **105**, 18273-18277(2008).
 122. Ceroni A, Passerini A, Vullo A, Frasconi P. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic Acids Res* **34**, W177-181(2006).
 123. Lippi M, Passerini A, Punta M, Rost B, Frasconi P. MetalDetector: a web server for predicting metal-binding sites and disulfide bridges in proteins from sequence. *Bioinformatics* **24**, 2094-2095(2008).
 124. Wilchek M & Bayer EA. Labeling glycoconjugates with hydrazide reagents. *Meth Enzymol* **138**, 429-442(1987).
 125. Kaufmann B, Müller S, Hanisch FG, Hartmann U, Paulsson M, Maurer P, Zaucke F. Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity. *Glycobiology* **14**, 609-19(2004).
 126. Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino

acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633-1649(2004).

127. Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153-164(2005).

128. Jiménez-Corona A, Pérez A, Mas-Oliva J, Moreno A. Effect of Osteopontin, Chondroitin Sulfates (B, C), and Human Serum Albumin on the Crystallization Behavior of Hydroxyapatite in Agarose and Silica Hydrogels. *Cryst Growth Des* **8**, 1335-1339(2008).

129. Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG, Fedarko NS. Age-related Changes in Human Bone Proteoglycan Structure. Impact of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* **277**, 43638-43647(2002).

130. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* **294**, 1351-62(1999).

131. George A & Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev* **108**, 4670-93(2008).

132. Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem* **102**, 912-24(2007).

133. Fujisawa R, Wada Y, Nodasaka Y, Kuboki Y. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta* **1292**, 53-60(1996).

134. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, Goldberg HA. Delineation of the Hydroxyapatite-nucleating Domains of Bone Sialoprotein. *J Biol Chem* **278**, 7949-7955(2003).

135. Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, Chambers AF, Hunter GK, Goldberg HA. Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* **27**, 795-802(2000).

136. Wuttke M, Müller S, Nitsche DP, Paulsson M, Hanisch FG, Maurer P. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding. *J Biol Chem* **276**, 36839-48(2001).

137. Bornstein P & Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 608-616(2002).

138. Yin A, Margolis HC, Yao Y, Grogan J, Oppenheim FG. Multi-component adsorption model for pellicle formation: the influence of salivary proteins and non-salivary phospho proteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* **51**, 102-110(2006).

139. Kandori K, Masunari A, Ishikawa T. Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. *Calcif Tissue Int* **76**, 194-206(2005).

140. Wazen RM, Tye CE, Goldberg HA, Hunter GK, Smith CE, Nanci A. In vivo functional analysis of polyglutamic acid domains in recombinant bone sialoprotein. *J Histochem Cytochem* **55**, 35-42(2007).

141. Roy M & Nishimoto S. Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: Calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* **31**, 296-302(2002).

142. Tas A. Formation of calcium phosphate whiskers in hydrogen peroxide (H₂O₂) solutions at 90 degrees C. *J Am Ceram Soc* **90**, 2358-2362(2007).
143. Driessens F & Verbeeck R. *Biomaterials*. (CRC: 1990).
144. Kamitakahara M, Ito N, Murakami S, Watanabe N, Ioku K. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite from octacalcium phosphate: effect of hydrothermal temperature. *J Ceram Soc Jpn* **117**, 385-387(2009).
145. Horváthová R, Müller L, Helebranta A, Greilb P, Müller F. In vitro transformation of OCP into carbonated HA under physiological conditions. *Mater Sci Eng C* **28**, 1414-1419(2008).
146. Tarasevich BJ, Howard CJ, Larson JL, Snead ML, Simmer JP, Paine M, Shaw WJ. The nucleation and growth of calcium phosphate by amelogenin. *J Cryst Growth* **304**, 407-415(2007).
147. Weiner S, Dove PM. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effects. In: Dove PM, DeYoreo JJ, Weiner S (eds) *Biomaterialization. Reviews in mineralogy and geochemistry*, vol 54. Mineral. Soc. Am., Washington, DC, pp 1-30 (2003).
148. Towe KM & Lowenstam HA. Ultrastructure and development of iron mineralization in the radular teeth of *Cryptochiton stelleri* (Mollusca). *J Ultrastruct Res* **17**, 1-13(1967).
149. Towe KM & Lowenstam HA. Ultrastructure and development of iron mineralization in the radular teeth of *Cryptochiton stelleri* (Mollusca). *J Ultrastruct Res* **17**, 1-13(1967).
150. Crane NJ, Popescu V, Morris MD, Steenhuis P, Ignelzi MA Jr. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone* **39**, 434-442(2006).
151. Grynopas MD & Omelon S. Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals? *Bone* **41**, 162-164(2007).
152. Nakashima M & Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* **21**, 1025-1032(2003).
153. Kempen DH, Yaszemski MJ, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Britson J, Maran A, Classic KL, Dhert WJ, Lu L. Non-invasive monitoring of BMP-2 retention and bone formation in composites for bone tissue engineering using SPECT/CT and scintillation probes. *J Control Release* **134**, 169-176(2009).
154. Haze A, Taylor AL, Haegewald S, Leiser Y, Shay B, Rosenfeld E, Gruenbaum-Cohen Y, Dafni L, Zimmermann B, Heikinheimo K, Gibson CW, Fisher LW, Young MF, Blumenfeld A, Bernimoulin JP, Deutsch D. Regeneration of bone and periodontal ligament induced by Recombinant amelogenin after periodontitis. *J Cell Mol Med* (2009).doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00700.x

APÉNDICE A PUBLICACIONES

Biochemical and Biophysical Research Communications 384 (2009) 49–54



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Characterization of recombinant human cementum protein 1 (*hrCEMP1*): Primary role in biomineralization

Eduardo Villarreal-Ramírez^a, Abel Moreno^b, Jaime Mas-Oliva^c, Juan Luis Chávez-Pacheco^a, A. Sampath Narayanan^d, Ivet Gil-Chavarría^a, Margarita Zeichner-David^e, Higinio Arzate^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados, Facultad de Odontología, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

^b Instituto de Química, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

^c Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. 04510, Mexico

^d Department of Pathology, School of Medicine, University of Washington, Seattle 98195, USA

^e Center for Craniofacial Molecular Biology, University of Southern California, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2009

Available online 23 April 2009

Keywords:

Cementum
Biomineralization
Cementum protein 1
Mineralized tissues
Hydroxyapatite
Octacalcium phosphate
Periodontal regeneration

ABSTRACT

Cementum protein 1 (CEMP1) has been recently cloned, and *in vitro* experiments have shown functions as regulator of cementoblast behavior and inducer of differentiation of non-osteogenic cells toward a cementoblastic/osteoblastic phenotype. In this study, we have produced a full-length human recombinant CEMP1 protein in a human gingival fibroblast cell line. The purified protein (*hrCEMP1*) has a M_r 50,000. Characterization of *hrCEMP1* indicates that its secondary structure is mainly composed of β -sheet (55%), where random coil and alpha helix conformations correspond to 35% and 10%, respectively. It was found that *hrCEMP1* is N-glycosylated, phosphorylated and possesses strong affinity for hydroxyapatite. Even more important, our results show that *hrCEMP1* plays a role during the biomineralization process by promoting octacalcium phosphate (OCP) crystal nucleation. These features make CEMP1 a very good candidate for biotechnological applications in order to achieve cementum and/or bone regeneration.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cementum is a unique avascular mineralized connective tissue that covers the root surface of teeth and provides the interface through which the root surface is anchored to collagen Sharpey's fibers of the periodontal ligament. Nevertheless, the complex processes that regulate cementogenesis and normal cementum metabolism remain unclear to date. Recent evidence indicates that cementum formation is critical for appropriate maturation of the periodontium [1]. Recently we have isolated and characterized a human cementum protein which we named Cementum Protein 1 (CEMP1), (GenBank Accession No. NP_001041677; HGNC: ID 32553) [2]. Antibodies against this protein recognize the cementoid layer and adjacent cementoblastic cell layer, cementocytes, progenitor cells located near the blood vessels in the periodontal ligament, cells located in the endosteal spaces of human alveolar bone, dental follicle-derived cells and human periodontal ligament cells [2–4]. CEMP1 mRNA is highly expressed in cementoblasts, subpopulations and progenitor cells of the human periodontal ligament [5]. *In vitro* experiments showed that CEMP1 promotes cell attachment, differ-

entiation [6,7], and deposition rate, composition, and morphology of hydroxyapatite crystals formed by human cementoblast cells [7]. Since CEMP1 is synthesized by cementoblast cells and, a restricted periodontal ligament cell subpopulations (cementoblast precursors), it is suggested that this molecule is a cementum-specific biological marker and it might play a role as regulator of cell differentiation. Furthermore, CEMP1 transfection into non-osteogenic cells such as adult human gingival fibroblasts results in differentiation of these cells into a "mineralizing" cell phenotype [8]. Although the physiological function of CEMP1 is not completely understood, it is our hypothesis that this molecule plays an important role during the cementogenesis process and also as an inducer of the formation of mineralizing nodules and calcium deposition during hydroxyapatite formation. Therefore, the aim of the present study was to characterize the physico-chemical characteristics of *hrCEMP1* expressed in a human gingival fibroblast cell line and determine post-translational modifications and their influence on CEMP1's functional properties during the mineralization process.

Materials and methods

Expression and purification of CEMP1. The open reading frame of CEMP1 (GenBank Accession No. NP_001041677), was subcloned

* Corresponding author. Fax: +52 5556225563.

E-mail address: harzate@servidor.unam.mx (H. Arzate).

into the pENTR/SD/D vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the resultant pENTR/SD/D-CEMP1 cDNA construct ligated into a pcDNA40(+) vector pcDNA40-CEMP1(+). Human gingival fibroblasts (HGF) were isolated and grown as previously described [3]. The plasmid pcDNA40-CEMP1(+) was transfected into human gingival fibroblasts cells as described elsewhere [8].

Recombinant human CEMP1 protein collected from conditioned media of HGF expressing CEMP1 was purified by Ni²⁺ affinity chromatography (HiTrap Chelating HP column, Invitrogen, Carlsbad, CA). Determination of protein purity was performed by 12% SDS-PAGE.

Western blot analysis. Recombinant human CEMP1 (10 µg) was separated by 12% SDS-PAGE and electroblotted onto Immobilon-P (PVDF) nitrocellulose membrane (Millipore Corp., Bedford, MA). Anti-hrCEMP1 and anti-6XHis (C-term) polyclonal antibodies were used to specifically identify the CEMP1 gene product and the fused histidines. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG was used and secondary antibody and detection was performed as previously described [2].

Hydroxyapatite affinity chromatography. To determine if hrCEMP1 has affinity to hydroxyapatite, an Econo-Pac CHT-II cartridge (1 mL) (Bio Rad, Hercules, CA) was used. The column was equilibrated with 10 mM sodium phosphate, pH 7.2. Fifty micrograms of purified hrCEMP1 was loaded and unbound proteins removed with a solution containing 10 mM sodium phosphate, pH 7.2. Bound proteins were eluted with a solution containing 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 M sodium phosphate, pH 7.2. Fractions were subjected to 12% SDS-PAGE and Western blotting.

Circular dichroism spectroscopy. hrCEMP1 protein was dissolved in PBS, pH 7.4, at 200 µg/mL. The concentration was calculated from the absorption at 280 nm using an extinction coefficient of 28,125 M⁻¹ cm⁻¹ and deduced from the amino acid sequence [9]. CD spectra were recorded in thermostatted (25 °C) quartz cells of 1-mm optical path length within a wavelength range of 190–260 nm using a AVIV62DS spectropolarimeter. The molar ellipticity (θ) expressed in degrees cm² dmol⁻¹ was calculated on the basis of a mean residue of M, 50,000. Five spectra were accumulated to improve the signal to noise ratio. A baseline with buffer (PBS, pH 7.4) was recorded separately and subtracted from each spectrum. The program CONTIN was used to calculate secondary structure content [10].

Dynamic light scattering (DLS). Light scattering experiments were performed using a Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Ltd., UK) molecular sizing instrument which employs a 4 mw, 633 nm semiconductor laser as light source and NIBS technology (Malvern Instruments, Ltd., UK) [11]. During experiments the temperature was held at 25 (0.1 °C) via a Peltier unit. Data analysis was performed using the Zetasizer Nano S DTS software package (Malvern Instruments, Ltd., UK).

Presence of cysteine disulfide bonds. Human recombinant CEMP1 at a 2.5 mM concentration was dissolved with 6 M guanidine-HCl containing 200 mM DTT. The protein was reduced at 37 °C overnight, and boiled for 5 min before the protein was loaded into a gel filtration column (1.5 × 10 cm Sephadex G-10, Pharmacia, Uppsala, SW) equilibrated with 300 mM acetic acid. The reduction state of hrCEMP1 was assessed by quantitation of thiols using an assay for dithiodipyridine. Briefly, hrCEMP1 was incubated with 6 M guanidine-HCl, 10 mM EDTA, 120 mM Na₂HPO₄, pH 6.6, and DTPD (4,4'-dithiodipyridine) added to a final concentration of 500 nM. Samples were incubated for 30 min at 25 °C and the A₃₂₄ was monitored to estimate the number of cysteine residues present.

Glycosylation analysis. Carbohydrates contained in hrCEMP1 were determined using the ECL glycoprotein detection system (Amersham Biosciences, UK). Briefly, samples were separated by 12% SDS-PAGE and electro-transferred as described above. Oxida-

tion was carried out in the dark with 10 mM sodium metaperiodate dissolved in 100 mM acetate buffer, pH 5.5. Samples were treated with biotin hydrazide to incorporate biotin into the oxidized carbohydrate and biotin was detected by the horseradish peroxidase-conjugated streptavidin system using enhanced chemiluminescence (ECL, Millipore Corp., Bedford, MA).

Release of N-linked oligosaccharides. N-Glycans were released from 200 µg of hrCEMP1 by enzymatic cleavage using peptide N-glycosidase F (Calbiochem® Glycoprotein Deglycosylation kit, Merck Biosciences Ltd., Nottingham, UK). The protein was resuspended with 10 µL of 250 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 and 2.5 µL of denaturation solution (2% w/v SDS, 1 M β-mercaptoethanol). The mixture was heated at 100 °C for 5 min. One unit of PNGase F was added and incubated for 24 h at 37 °C. The N-linked glycosylation pattern of hrCEMP1 was resolved by 12% SDS-PAGE.

hrCEMP1 phosphorylation. According to 'in silico' analysis, hrCEMP1 possesses multiple potential phosphorylation sites. Eighteen phosphorylation sites (10 serine, 8 threonine) were predicted by the NetPhos 2.0 program [2]. Tyrosine is not present in the hrCEMP1 amino acid sequence. To determine if serine and threonine phosphorylation is present in hrCEMP1, hrCEMP1 secreted to the media and purified by Ni²⁺ affinity chromatography was used. Human recombinant CEMP1 was subjected to 12% SDS-PAGE and electrotransferred as described above. Membranes were blocked as described, and incubated with primary polyclonal antibodies against phosphothreonine and phosphoserine (Zymed, San Francisco, CA, USA). After washing, membranes were incubated with the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody. Membranes were washed and detection of secondary antibody performed as previously described.

hrCEMP1 effect on apatite formation. To determine if hrCEMP1 promotes apatite formation, a capillary counterdiffusion system was used [13–15]. Briefly, 1% (w/v) agarose gel containing 20 µg/mL of hrCEMP1 was poured into the capillaries (0.5 mm diameter and 30 mm long). The ends of the capillaries were injected with 100 mM CaCl₂ and 100 mM NaH₂PO₄. All experiments were carried out at 37 °C. After 7 days, the crystals were recovered by dissolving the gel in hot milli Q water and air-dried.

Energy-dispersive X-ray micro-analysis (EDX). The composition of crystals formed by induction of hrCEMP1 into the capillaries was analyzed using a Jeol 5600 scanning electron microscope fitted with a detector of energy dispersive X-ray microanalysis microprobe. All analyses were performed at 20 kV for 300 s [16]. Crystals were analyzed in low vacuum and the calcium/phosphate (Ca/P) ratio was calculated from the intensity of the peaks present in the EDX pattern. After determining the composition of the crystals, they were covered with a thin gold film, 100 nm thick, to avoid electron disturbances that could interfere with the SEM images.

Electron diffraction pattern by transmission electron microscopy. Crystals were mounted on carbon-coated 150-mesh gold grids and examined for diffraction techniques. D-spacings of diffraction patterns were calibrated against those used as gold standard with identical diffraction conditions. The mineral phase was analyzed by means of a JEOL 100 CX analytical transmission microscope employing 100 kV.

Results and discussion

Isolation of human CEMP1 by recombinant expression

Previously, we have expressed hrCEMP1 in a prokaryotic expression system; however, this system is not able to express the full-length recombinant CEMP1 [2]. In this study, human recombinant CEMP1 was expressed in human-derived gingival fibroblasts as a secreted 6XHis fusion protein and latter purified

by affinity chromatography using a Ni^{2+} column. The yield of recombinant CEMP1 per liter of serum-free media was about 1 mg. After SDS-PAGE and coomassie blue staining, the protein presented a M_r 50,000 (Fig. 1A, lane 2). The identity of the human recombinant protein was determined by Western blot analysis using a specific polyclonal antibody against the 6XHis tag (Fig. 1A, lane 3) and a specific polyclonal antibody against hrCEMP1 (Fig. 1A, lane 4). Both antibodies recognized a single protein species of M_r 50,000 which is almost twice the theoretical molecular mass deduced from the cDNA sequence (25.9 kDa) [2]. This data shows that we are able to produce the full-length recombinant human CEMP1 in high yields using a human gingival fibroblasts-derived cell line.

hrCEMP1 secondary structure

Circular dichroism of hrCEMP1 showed that the spectra bands present its maximum value at 218 nm. This determines that the secondary structure present in hrCEMP1 is mainly composed of β -sheet. CD spectra analysis revealed 10% α -helix, 32.4% β -anti-parallel, 5.8% β -parallel, 16.7% β -turn and 35% random coil (Fig. 1B). This result was consistent even when different concentrations of trifluoroethanol (20% and 40%) were used in order to determine if a change in the structure could be induced. Recently, it has been shown that proteins with high percentages of random coil structure are multifunctional and allow proteins to have diverse binding properties such as SIBLING and HMGI(Y) [16,17]. This feature might explain why hrCEMP1 regulates crystal growth and composition of hydroxyapatite crystals [7]. CEMP1 also induces the expression of proteins related to mineralization and promotes *in vitro* osteoblastic and/or cementoblastic cell differentiation of HGF [8].

Dynamic light scattering and cysteine disulfide bonds

Dynamic light scattering analysis revealed that hrCEMP1 aggregates mainly as 6.50 nm particles. Such aggregates are

contributed by one type of molecule with a M_r 50,000 (Fig. 1C). Our results showed that hrCEMP1 did not react with sulfhydryl groups. Therefore, all cysteine residues present in hrCEMP1 might be linked to disulfide bridges. Disulfide bridges generally play a role stabilizing protein structure [18–20]. From our results we infer that disulfide bridges contribute to hrCEMP1's secondary structure stabilization.

hrCEMP1 glycosylation and N-linked oligosaccharides

According to *in silico* analysis (NetNGlyc, neural net bioinformatic program) [12], hrCEMP1 possesses two N-glycosylation sites Asn-X-Ser/Thr in amino acids 20 and 25. After digestion of the protein with PNGase F, our results demonstrate that hrCEMP1 is a glycoprotein with a M_r 50,000 and shifted from M_r 50,000 (Fig. 2C) to a M_r 39,000 species (Fig. 2F and G), which represents 22% of N-glycosylation of hrCEMP1. O-linked glycosylation (Ser/Thr) predicted 13 sites by *in silico* analysis. After digestion with endo- α -N-acetylgalactosaminidase, α 2-3,6,8,9-neuraminidase, β 1,4-galactosidase, and β -N-acetylglucosaminidase, there were no changes in hrCEMP1's M_r (2H). Western blots performed with the digestions described above, cross-reacted with anti-CEMP1 polyclonal antibody (Fig. 2I).

By comparison with the theoretical protein molecular mass for hrCEMP1 (25.9 kDa) deduced from the cDNA sequence, a contribution of 43.5% by post-translational modifications is present in hrCEMP1. However, it is important to consider that V5 epitope and 6XHis tag included into the vector contribute with 5 kDa to the M_r of hrCEMP1. Although the precise role of attached carbohydrates in hrCEMP1 is unknown, glycosylation may affect hrCEMP1's function during the mineralization process. Glycans have been associated to this process because their anionic surface can bind a large number of Ca^{2+} ions and regulate hydroxyapatite crystal growth [21]. Glycans are also implicated in the regulation of endochondral ossification, bone remodeling and fracture healing [22].

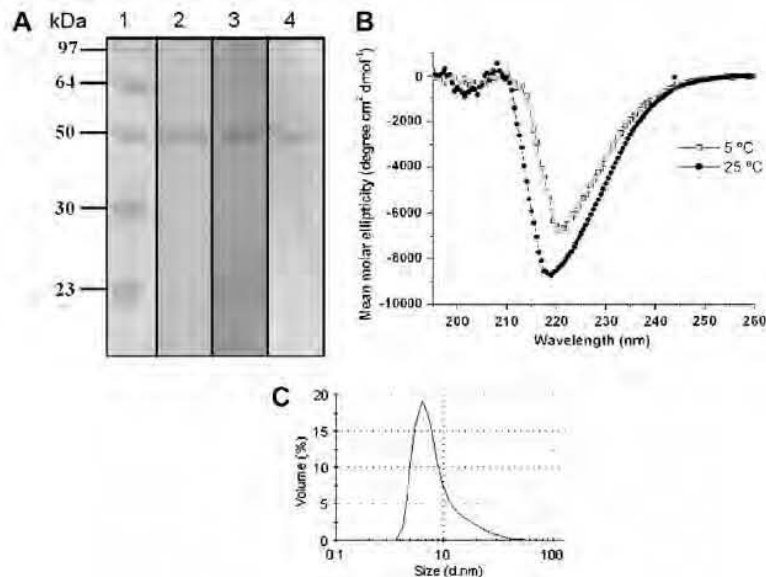


Fig. 1. SDS-PAGE showed a M_r 50,000 species representing hrCEMP1 (A, lane 2). Western blot confirmed the identity of hrCEMP1. Anti-6XHis antibody (A, lane 3), anti-hrCEMP1 (A, lane 4). Circular dichroism revealed that hrCEMP1 is mainly structured as β -sheet and random coil (B). Dynamic light scattering shows that hrCEMP1 aggregates mainly at 6.50 nm and represents a single molecule of M_r 50,000 (C).

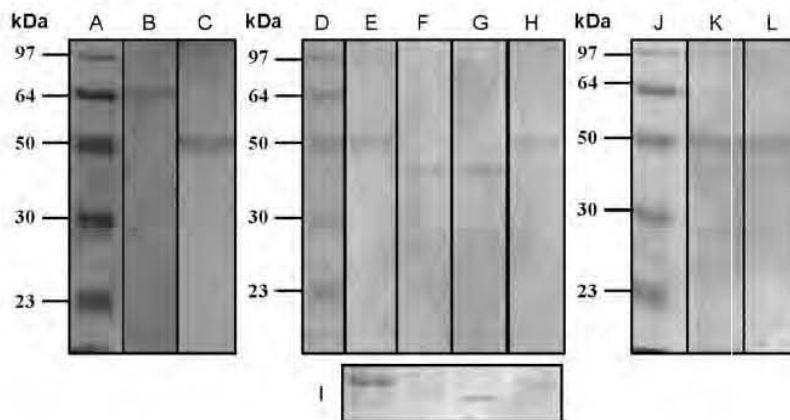


Fig. 2. Transferrin glycoprotein control (B). Human recombinant CEMP1 represents a glycoprotein (C). Deglycosylation of hrCEMP1, Human recombinant CEMP1 SDS–PAGE silver stained (D). Incubation of hrCEMP1 with a mixture of *N*-linked and *O*-linked deglycosylated enzymes shows a M_r 11,000 difference respect to untreated samples (E). *N*-Deglycosylated enzyme shows a change of hrCEMP1's by 43.5% (F). *O*-Deglycosylated shows no change in hrCEMP1' M_r (G). Western blot shows that species mentioned above cross-reacted with anti-hrCEMP1 polyclonal antibody (H). Western blot reveals that hrCEMP1 is phosphorylated at threonine (I) and serine residues (I).

hrCEMP1 phosphorylation

Detection of phosphorylation was done using anti-phospho-serine and threonine antibodies. Our data indicates that both antibodies cross-reacted with the hrCEMP1 M_r 50,000 species (Fig. 2K and L). The presence of phosphate favors Ca^{2+} binding to the protein [23,24] and proteins associated to the mineralization process such as: BSP, OPN and DSSP are highly phosphorylated at the threonine and serine residues [25]. This data suggests a role for hrCEMP1 at the early stages of mineralization during octacalcium phosphate formation (OCP).

Human recombinant CEMP1 possesses strong affinity for hydroxyapatite

Previous results have shown that CEMP1 plays a role during the mineralization process [7]. The data presented in Fig. 3 shows that hrCEMP1 purified from HGF/CEMP1 conditioned media possesses affinity for hydroxyapatite and the species with a M_r 50,000 was recovered only when the column was washed with 300 mM sodium phosphate pH 7.2 (Fig. 3B). The identity of the eluted protein as hrCEMP1 was confirmed using the polyclonal antibodies against 6XHis tag and hrCEMP1 (Fig. 3C and D), respectively. Proteins not

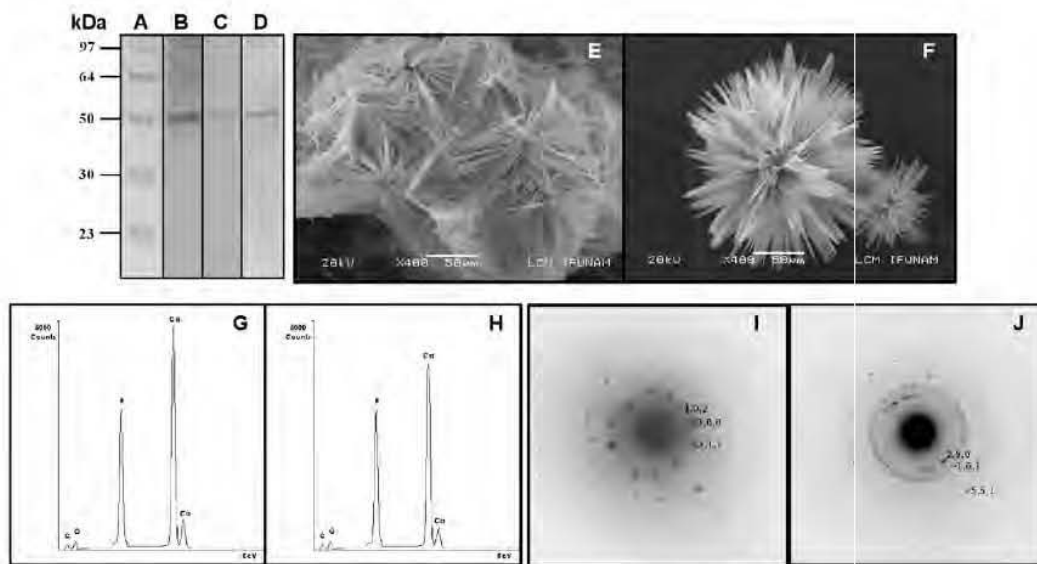


Fig. 3. Hydroxyapatite affinity of hrCEMP1. SDS–PAGE Coomassie-stained hrCEMP1 (B). CEMP1 binding to hydroxyapatite column (C). Eluted fraction cross-reacted with anti-hrCEMP1 polyclonal antibody (D). Hydroxyapatite crystal morphology shows raft-plaque-like features of control crystals (E). Crystals formed in presence of hrCEMP1 acquired a drusa and needle-like morphology (F). EDX analyses reveal prominent peaks of P and Ca^{2+} for control crystals which represent hydroxyapatite (G). Crystals formed in presence of hrCEMP1 correspond to OCP (H). Electron diffraction pattern of hydroxyapatite monocrystal (I) and OCP experimental crystals formed under hrCEMP1's induction (J).

related to the mineralization process elute at lower concentrations of sodium phosphate [26], whereas proteins implicated with the biomineralization process elute at concentrations between 200 and 300 mM sodium phosphate. Accordingly to this result, *hrCEMP1* expressed in a prokaryote system present the same affinity to hydroxyapatite (data not shown), as the protein expressed in eukaryotic cells. These results indicate that *hrCEMP1* possesses intrinsic properties to bind to hydroxyapatite even without post-translational modifications.

hrCEMP1 effect on apatite formation

The morphology of apatite crystals grown in absence of *hrCEMP1* had raft-plaque-like shape and microscopic crystals with a globular-spherulite-like shape (Fig. 3E). However, crystals grown in the presence of *hrCEMP1* showed drusa-like shape and a combined drusa-like and needle-like morphology (Fig. 3F). Human recombinant CEMP1 induces the formation of polymorphous crystals as confirmed by X-ray diffraction. Elemental analysis performed with EDX determined the Ca/P ratio to be 1.67 for control crystals, equal to the theoretical Ca/P ratio of 1.67 for hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) according to ICDD file: PDF#24-0033 (Fig. 3G). Whereas, experimental conditions using *hrCEMP1* determined that the crystals are OCP, $(\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5\text{H}_2\text{O})$ and EDX elemental analysis determined a Ca/P ratio of 1.33 according to ICDD file: PDF#26-1056 (Fig. 3H). Furthermore, diffraction patterns for the crystals formed under control and experimental conditions were analyzed and index assigned. Diffraction patterns for the control conditions represent hydroxyapatite according to the Miller index (*hkl*: 1 0 2; *hkl*: 3 0 0 and *hkl*: 2 1 1) with interplanar distances of 3.17 Å, 2.72 Å and 2.81 Å, respectively (Fig. 3I). Crystals formed in presence of *hrCEMP1* represent OCP according to the Miller index (*hkl*: 2 2 1; *hkl*: -1 2 2 and *hkl*: -4 -4 1) with interplanar distances of 3.74 Å, 2.94 Å and 2.15 Å, respectively (Fig. 3J).

Taken all together, these results demonstrated that biologically active *hrCEMP1* plays a role during the biomineralization process, that it is required for the synthesis of needle-shaped OCP crystals and responsible for OCP crystal nucleation activity. OCP is found to be a transient phase during the growth of biological crystals. In small crystals, OCP is completely transformed into HA by hydrolysis and can only be detected in larger crystals because of its slow kinetics of transformation. OCP has also been presumed a necessary precursor of biological apatites in both normal (enamel, dentine, cementum, and bone) and pathological (e.g., phosphatic renal stones) calcifications.

The initial basis of CEMP1's as a possible therapeutic agent rests on evidence showing that CEMP1 has a role during the biological mineralization process of cementum-like tissue, and that induces *in vitro* phenotypic changes from non-osteogenic cells to an osteoblastic/cementoblastic phenotype [8]. Accordingly, other molecules related to the mineralization process such as BMP-2, 4 and 7 have been established to induce reparative/regenerative mineralized tissue formation [27]. Sustained delivery of BMP-2 using gene therapy has shown to induce bone formation *in vivo* [28]. Recombinant human amelogenin protein (rHAM(+)), has also been shown to be effective to induce *in vivo* regeneration of all tooth-supporting tissues after creation of an experimental periodontitis model in dogs, where the recruitment of mesenchymal progenitor cells is a key factor during the formation of regenerated periodontal tissues [29]. Amelogenin and other proteins such as OCN, BSP and OPN have the ability to bind and to regulate hydroxyapatite crystal growth and nucleation as well as to promote mineralization [30,31]. New therapeutic strategies such as the use of PLGA scaffolds for tissue engineering applications could be applied to demonstrate the ability of a single protein to bring about regeneration of mineralized tissues. These strategies could pave the way

for development of new therapeutic devices for treatment of periodontal and bone diseases based on recombinant human CEMP1.

Conclusions

Studies on the function and structure of CEMP1 have been hampered by the difficulties in the isolation of protein from human and/or bovine cementum, due mainly to its low metabolic turnover rate, the amount of tissue being deposited and, its entrapment in hydroxyapatite. In this study, we showed the production, purification and characterization of a full-length *hrCEMP1* employing for its synthesis an eukaryotic system. In addition, we demonstrated that CEMP1 is post-translational modified, N-glycosylated and phosphorylated. We also showed that *hrCEMP1* plays a role during the mineralization process by promoting OCP crystal growth. These results provide the basis for future studies analyzing the potential characteristics of this novel protein towards new therapeutic strategies in order to treat individuals affected by disorders affecting mineralized tissues and to promote regeneration of cementum and/or bone in adult tissues.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Pedro Bosch and Dr. José Reyes. This study was supported by funds from DGAPA-UNAM (IN200908), CONACYT 48638 to H.A. and 82888 to A.M.

References

- [1] D.D. Bosshardt, S. Zaizal, M.D. McKee, A. Nanci, Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum, *Anat. Rec.* 250 (1998) 13–33.
- [2] M.A. Alvarez-Perez, S. Narayanan, M. Zeichner-David, B. Carmona-Rodriguez, H. Arzate, Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23), *Bone* 38 (2006) 409–419.
- [3] A.S. Narayanan, R.C. Page, Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5464–5471.
- [4] M. Zeichner-David, K. Oishi, E. González, Z. Su, V. Zakartchenko, L.S. Chen, H. Arzate, P. Bringas, Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development, *Dev. Dyn.* 228 (2003) 651–663.
- [5] H. Arzate, L.F. Jiménez-García, M.A. Alvarez-Pérez, A. Landa, I. Bar-Kana, S. Pitaru, Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned medium-derived protein, *J. Dent. Res.* 81 (2002) 541–546.
- [6] H. Arzate, J. Chimal-Monroy, L. Hernández-Lagunas, L. Díaz de León, Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells, *J. Periodont. Res.* 31 (1996) 144–148.
- [7] M.A. Alvarez-Pérez, S. Pitaru, O. Alvarez-Fregoso, J. Reyes Gasga, H. Arzate, Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 1–13.
- [8] B. Carmona-Rodriguez, M.A. Alvarez-Pérez, A.S. Narayanan, M. Zeichner-David, J. Reyes-Gasga, J. Molina-Guáneros, A. García-Hernández, J. Suárez-Franco, I. Gil Chavarría, E. Villarreal-Ramírez, H. Arzate, Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358 (2007) 763–769.
- [9] P. Mendoza-Espinosa, A. Moreno, R. Castillo, J. Mas-Oliva, Lipid dependant disorder-to-order conformational transitions in apolipoprotein CI derived peptides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 8–15.
- [10] S.W. Provencher, J. Glöckner, Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism, *Biochemistry* 20 (1981) 33–37.
- [11] A. Moreno, J. Mas-Oliva, M. Soriano-García, C. Salvador-Oliver, V.M. Bolaños-García, Turbidity as a useful optical parameter to predict protein crystallization by dynamic light scattering, *J. Mol. Struct.* 519 (2000) 243–256.
- [12] N. Blom, T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence, *Proteomics* 4 (2004) 1633–1649.
- [13] L. Silverman, A.L. Boskey, Diffusion systems for evaluation of biomineralization, *Calcif. Tissue Int.* 75 (2004) 494–501.
- [14] C.E. Tye, K.R. Rattray, K.J. Warner, J.A.R. Gordon, J. Sodek, G.K. Hunter, H.A. Goldberg, Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7949–7955.
- [15] J.M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization, *Methods Enzymol.* 368 (2003) 130–154.

- [16] F.J. Cuisinier, R.W. Glaisher, J.C. Voegel, J.L. Hutchison, E.F. Brès, R.M. Frank, Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction, *Ultramicroscopy* 36 (1991) 297–305.
- [17] A.K. Dunker, Z. Obradovic, The protein trinity-linking function and disorder, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 805–806.
- [18] Q.Q. Hoang, F. Sichiari, A.J. Howard, D.S.C. Yang, Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure, *Nature* 425 (2003) 977–980.
- [19] E. Hohenester, P. Maurer, C. Hohenadl, R. Timpl, J.N. Janssonius, J. Engel, Structure of a novel extracellular Ca^{2+} -binding module in BM-40, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 67–73.
- [20] B. Kaufmann, S. Müller, F. Hanisch, L. Hartmann, M. Paulsson, P. Maurer, F. Zaucke, Structural variability of BM-40/SPARC/osteonectin glycosylation: implications for collagen affinity, *Glycobiology* 14 (2004) 609–619.
- [21] C.C. Chen, A.L. Boskey, Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth, *Calcif. Tissue Int.* 37 (1985) 395–400.
- [22] W.J. Grzesik, C.R. Frazier, J.R. Shapiro, P.D. Sponseller, P.G. Robey, N.S. Fedarko, Age-related changes in human bone proteoglycan structure: impact of osteogenesis imperfecta, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 43638–43647.
- [23] M.A. Torres-Quintana, S. Lécolle, M. Goldberg, Effects of inositol hexasulphate, a casein kinase inhibitor, on dentine phosphorylated proteins in organ culture of mouse tooth germs, *Arch. Oral. Biol.* 43 (1998) 597–610.
- [24] S. Jonó, C. Peinado, C.M. Giachelli, Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 20197–20203.
- [25] M. Zeichner-David, F. Hall, R. Williams, F. Thiemann, S. Yen, M. MacDougall, H.C. Slavkin, Characterization of protein kinases involved in dentinogenesis, *Connect. Tissue Res.* 33 (1995) 87–95.
- [26] S. Hjerten, O. Levin, A. Tiselius, Protein chromatography on calcium phosphate columns, *Arch. Biochem. Biophys.* 65 (1956) 132–155.
- [27] M. Nakashima, Induction of dentin formation of canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP)-2 and 4, *J. Dent. Res.* 73 (1994) 15515–15522.
- [28] B. Yue, B. Lu, K.R. Dai, X.L. Zhang, C.F. Yu, J.R. Lou, T.T. Tang, BMP2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats, *Calcif. Tissue Int.* 77 (2005) 395–403.
- [29] A. Haze, A.L. Taylor, S. Haegewald, Y. Leiser, et al., Regeneration of bone and periodontal ligament induced by recombinant amelogenin after periodontitis, *J. Cell. Mol. Med.* (2009), doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00700.x.
- [30] Q.Q. Hoang, F. Sichiari, A.J. Howard, D.S. Yang, Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure, *Nature* 425 (2003) 977–980.
- [31] G.K. Hunter, H.A. Goldberg, Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8562–8565.

Available online at www.sciencedirect.com

Biochemical and Biophysical Research Communications 358 (2007) 763–769

www.elsevier.com/locate/ybbrc

Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts

Bruno Carmona-Rodríguez ^a, Marco Antonio Álvarez-Pérez ^a, A. Sampath Narayanan ^b,
Margarita Zeichner-David ^c, José Reyes-Gasga ^d, Juan Molina-Guarneros ^e,
Ana Lilia García-Hernández ^a, José Luis Suárez-Franco ^a, Ivet Gil Chavarría ^a,
Eduardo Villarreal-Ramírez ^a, Higinio Arzate ^{a,*}

^a Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Odontología, UNAM, Cd. Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510, México

^b Department of Pathology, School of Medicine, UW, Seattle, USA

^c Center for Craniofacial Molecular Biology, School of Dentistry, USC, Los Angeles, USA

^d Instituto de Física, UNAM, México

^e Facultad de Medicina, UNAM, México

Received 17 April 2007

Available online 11 May 2007

Abstract

We recently presented evidence showing that a human cementoblastoma-derived protein, named Cementum Protein 1 (CEMP1) may play a role as a local regulator of cementoblast differentiation and cementum-matrix mineralization. This protein was shown to be expressed by cementoblasts and progenitor cells localized in the periodontal ligament. In this study we demonstrate that transfection of CEMP1 into human gingival fibroblasts (HGF) induces mineralization and expression of bone and cementum-matrix proteins. The transfected HGF cells had higher alkaline phosphatase activity and proliferation rate and they expressed genes for alkaline phosphatase, bone sialoprotein, osteocalcin, osteopontin, the transcription factor Runx2/Cbfa1, and cementum attachment protein (CAP). They also produced biological-type hydroxyapatite. These findings indicate that the CEMP1 might participate in differentiation and mineralization of nonosteogenic cells, and that it might have a potential function in cementum and bone formation.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cementum Protein 1 (CEMP1); Mineralization; Human gingival fibroblasts; Bone; Cementum

Cementum is a unique avascular mineralized connective tissue that covers the root dentine and provides the interface through which the root surface is anchored to the collagen Sharpey's fibers of the periodontium. The complex processes that regulate normal cementum metabolism remain unclear to date. Cementum-forming cells (cementoblasts) have the primary function of making and secreting the extracellular matrix proteins required for cementum mineralization. Several proteins have been implicated in the process of cementogenesis; these include collagens types I and III, alkaline phosphatase (ALP) [1,2], phosphopro-

teins like osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP), and osteocalcin (OCN) [3,4]. It has been suggested that these phosphoproteins are necessary for the initiation and maturation of crystal formation [5,6].

Recently we isolated and characterized a human Cementoblastoma-derived protein which we referred as Cementum Protein 1 (CEMP1), and CP-23 (GenBank Accession No. NM_001048212; HGNC: ID 32553) [7]. CEMP1 is highly expressed at the protein and mRNA levels in cementoblasts, subpopulations of periodontal ligament cells, as well as in progenitor cells located in the paravascular zone of the periodontal ligament and endosteal spaces of bone [8]. In vitro experiments showed that the CEMP1 promotes cell attachment and differentiation

* Corresponding author. Fax: +52 5556225563.

E-mail address: harzate@servidor.unam.mx (H. Arzate).

[9,10]. This protein has also been implicated in regulating the deposition rate, composition, and morphology of hydroxyapatite crystals formed by putative human cementoblast cells [10]. However, the physiological function of CEMPI is not clear. The finding that CEMPI is synthesized by cementoblast cells and by restricted periodontal ligament cell population indicated that CEMPI may play a role as a local regulator of cell differentiation and extracellular matrix mineralization. We have examined this possibility in this study and we show that overexpression of CEMPI induces expression of bone and cementum-matrix proteins in nonosteogenic cells such as human gingival fibroblasts.

Materials and methods

Cell culture. Human gingival fibroblasts (HGF) were isolated and grown as previously described [11]. Cells between the 2nd and 5th passage were used for the experiments. The cells were grown in medium with 10% FBS (cell proliferation) or in mineralizing media (10% FBS, 10 mM β -glycerolphosphate and 50 μ g/mL of freshly prepared ascorbic acid).

Construction of pcDNA40-CEMP1-6xHis expressing vector and transfection into human gingival fibroblast cells. The coding region of CEMPI (GenBank Accession No. NM_001048212) was subcloned into the pENTR/SD/D vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The resultant pENTR/SD/D-CEMP1 cDNA construct was ligated into a pcDNA40 (+) vector (CEMP1-pcDNA40 (+)) with a 6xHis tag-COOH terminal (Invitrogen, Carlsbad, CA). The plasmid, pcDNA40-CEMP1, was transfected into HGF cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Control HGF cells were transfected with pcDNA40 (+) vector. Stably expressing cells were selected with 600 μ g/mL of G418 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) up to eight weeks.

Cell proliferation. To determine whether HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) alone have different proliferation rates, cells were plated at 2.5×10^3 into 48-well culture plates and incubated overnight in 10% FBS. Cells were harvested by trypsinization (0.05% trypsin and 0.02% EDTA) and counted in a model ZBI coulter counter (Coulter Electronics, Hiialeah, FL). Cell number was assessed at 0, 24, 48, 72, and 96 h.

Northern blot. Northern blot was performed as described elsewhere [7]. Briefly, RNA was extracted using an Oligotex Direct mRNA Mini Kit (Quiagen, Valencia CA). Five micrograms of mRNA was size-fractionated by electrophoresis, transferred onto N^+ nylon membranes and UV-crosslinked. The blots were pre-hybridized at 68 °C and hybridized overnight with a full length CEMPI cDNA probe, DIG-labeled (500 ng/mL). Blots were washed twice, 5 min each in 2x SSC (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.1% SDS) and twice 5 min each in 0.1x SSC/0.1% SDS at 68 °C. DNA-RNA hybrid, was detected with anti-DIG-AP conjugated antibody (1:10,000 diluted). Signal detection was performed with CDPStar (Boehringer Mannheim, Germany) ready to use. They were then exposed to X-ray films.

In situ hybridization. HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) cells cultured as described above were plated at low density (5×10^2) in 8-well Lab-Tek chamber slides and cultured for 3 days. Slides were treated with Proteinase K (20 μ g/mL) for 30 min, washed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, and washed with 0.1 M triethanolamine (TEA), pH 8.0; with acetic anhydride in 0.1 M TEA, pH 8.0, followed by PBS. The antisense and sense digoxigenin (DIG)-labeled CEMPI RNA probes were synthesized according to the labeling protocol in a kit (DIG Labeling Kit; Roche). Sections were prehybridized for 1 h at 68 °C and then incubated with Dig-labeled probe over night at 68 °C, followed by a stringency wash. Hybridization signal was detected with alkaline phosphatase conjugated anti-Dig and visualized with NBT/BCIP (Roche) under a light microscope [12].

Mineralization assays. HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) were plated at high density (2×10^5) in 24-well plates and

allowed to attach for 1 day. Cells were treated with DMEM medium supplemented with 10% FBS and mineralizing media. Cells were cultured for 3, 7, and 14 days. At each term the cells were fixed in 96% ethanol for 10 min, and insoluble calcium nodules were detected using a saturated solution of Alizarin red S pH 4.2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Residual stain was removed with PBS and the presence of nodules was documented by light microscopy.

Energy-dispersive X-ray micro-analysis. The composition of the mineral in the extracellular matrix formed by HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) was analyzed by means of a Leica-Cambridge 440 scanning electron microscope fitted with a Pentafet energy-dispersive X-ray micro-analysis microprobe. All analyses were carried out at 20 kV for 300 s [13].

Alkaline phosphatase activity. HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) cells were plated at 2×10^5 in 24-well culture plates and cultured for 3, 7, and 14 days in the conditions described above. Alkaline phosphatase activity (ALP) was determined as described by Lowry et al., [14]. The activity was expressed as nanomoles of *p*-nitrophenol per minute per milligram of protein. Protein content was determined using BSA as standard as described elsewhere [15].

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) cells were plated in six-well plates at 5×10^6 density, and cultured described above. Total cellular RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Quiagen, Valencia CA, USA) as previously described [16]. One μ g of total RNA was used to perform one-step RT-PCR (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol during 35 cycles in a thermal cycler (MJ Research, Watertown, MA, USA). Previously published primer sequences and reaction conditions were used for amplification of the following molecules: ALP, OCN, OPN, COL I, BSP, Cbfa1 [16], GAPDH, CEMPI [7], and CAP. The β -actin was used as internal control under the same conditions.

Western blot. Human gingival fibroblasts (HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) alone) were treated as described above and cultured during 3, 7, and 14 days and conditioned media collected as described elsewhere [8]. At term, Phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), 5 μ M leupeptin and 10 μ g/ml aprotinin were added to the conditioned media. Total protein concentration was determined using BSA as a standard as described elsewhere [15]. Equal amounts of total protein were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with rabbit antiserum to human recombinant CEMPI antibody, mouse anti-6xHis (C-term) monoclonal antibody HRP, goat anti-human alkaline phosphatase, mouse anti-bovine CAP (3G9), rabbit anti-human OPN (LF-123), rabbit anti-human BSP (LF-100), both a gift from Dr. Larry W. Fisher (NIH, Bethesda, MD, USA), and mouse anti-human OCN. Peroxidase-conjugated-goat-anti rabbit or goat anti-mouse IgG were used and secondary antibody detection was performed using enhanced chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA). The reference protein (GAPDH) was used as internal control.

Statistical analysis. Data were analyzed using Student's *t* test. Data were shown as means \pm SE from at least three independent experiments. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed with Sigma Stat V 3.1 software (Jandel Scientific Ashburn, VA).

Results

Expression of CEMPI in human gingival fibroblast cells

Cells transfected with CEMPI contained a band of approximately 5.0 Kb size, and this band was not present in mRNA obtained from HGF cells transfected with empty pcDNA40 vector (Fig. 1A). *In situ* hybridization using an antisense probe corresponding to the coding sequence of human CEMPI revealed high-level expression in the

transfected HGF (Fig. 1B-a). No expression was found in cells transfected with pcDNA40 empty vector (Fig. 1B-b).

Western analysis using an anti-6XHis monoclonal antibody (Fig. 1C, lane 2), and a polyclonal antibody against hrCEMP1 (Fig. 1C, lane 4) revealed the presence of a protein migrating with ~50 kDa protein corresponding to the molecular size of CEMP1.

Cell proliferation

To determine if expression of CEMP1 affected HGF proliferation, we measured the rate of proliferation. The HGF expressing CEMP1 proliferated at higher rate at all times tested, and the rate was ~2-fold as much as cells transfected with the empty vector (Fig. 2A).

CEMP1 expression induces mineralization phenotype

HGF transfected with CEMP1-pcDNA40 (+) and control HGF were cultured in mineralizing media and examined by Alizarin red S staining. Calcium nodules characteristics of “mineralizing-like” cells were detected in cells expressing CEMP1 (Fig. 2B-a, b, and c). They were not detected in control HGF cells transfected with the empty vector (Fig. 2B-d, e, and f). We determined the composition and Ca/P ratio of the mineralized extracellular matrix deposited. HGF expressing CEMP1 revealed prominent energy peaks for calcium and phosphorous similar to

those for biological apatite (Fig. 3A). HGF-CEMP1 cells had 68, 70, and 63 atomic percentage of Ca^{2+} at 3, 7, and 14 days of culture respectively, whereas phosphorous represented 24, 21, and 32 atomic percentage. The Ca/P ratio values were of 1.7, 1.2, and 1.9 at 3, 7, and 14 days of culture, respectively, and correspond well with the biological hydroxyapatite value. Control cultures showed negligible amounts of Ca^{2+} (0.7, 0.0, and 0.25 at 3, 7, and 14 days, respectively); whereas phosphorous represented 0.31, 0.36, and 0.99 of atomic percentage at 3, 7, and 14 days of culture. The Ca/P ratio represented 0.2, 0.0, and 0.1 at 3, 7, and 14 days of culture.

CEMP1 expression promotes alkaline phosphatase activity in human gingival fibroblast cells

ALP activity of cells expressing CEMP1 after 3, 7, and 14 days was of 4, 5, and 4.5-fold as much as controls (Fig. 3B). These differences were statistically significant ($P < 0.001$, $n = 3$).

Characterization of the phenotype expressed by HGF cells expressing CEMP1

Since HGF cells transfected with CEMP1 showed a mineralized-like cell phenotype, we limited our analysis to genes that have been associated with as bone and cementum. One-step RT-PCR using primers for the housekeep-

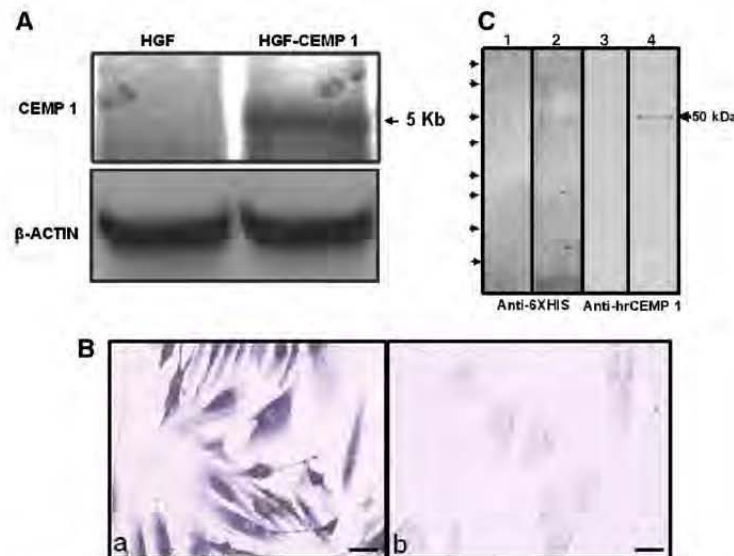


Fig. 1. Northern blot confirmed that HGF were stably expressing CEMP1 mRNA protein after transfection and cell selection with G418 were performed (A). CEMP1 mRNA transcripts are only expressed in HGF (B-a). Human gingival fibroblasts transfected with empty pcDNA40 vector do not express CEMP1 transcripts (B-b). Bar = 100 μm . Western blots for 6XHis-COOH and CEMP1. HGF transfected with CEMP1 protein expressed a 50 kDa species (C, lanes 1 and 3, respectively, for anti-6XHis-COOH and anti-CEMP1). HGF transfected with pcDNA40 empty vector were negative with the antibodies tested (C, lanes 1 and 3, respectively, for anti-6XHis-COOH and anti-CEMP1). Arrows from top to bottom indicate 250, 148, 60, 52, 42, 30, 17, and 6 kDa.

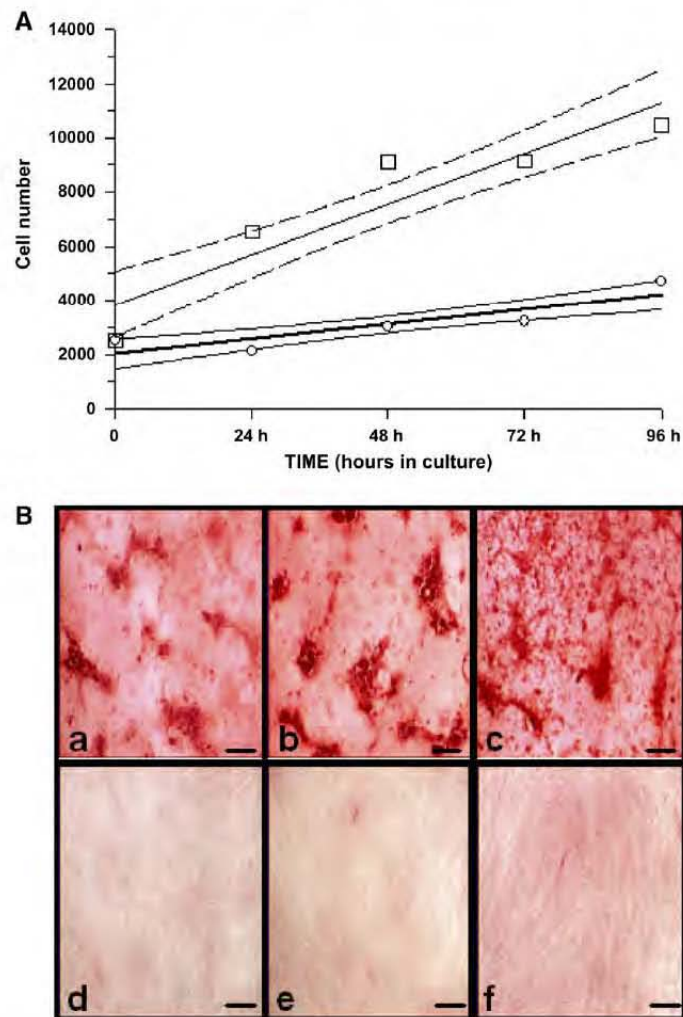


Fig. 2. (A) Transfection and stable expression of human CEMP1 on HGF enhances their proliferation rate. Human gingival fibroblasts expressing CEMP1 gene (□) showed a linear growth which was drawn (correlation coefficient $r = 0.90$) and the regression equation was computed ($y = 1852(x) + 3854$). The 95% confidence intervals are shown (dashed lines). Human gingival fibroblasts transfected with empty vector (○) showed the same linear growth (correlation coefficient $r = 0.81$) and the regression equation was computed ($y = 547(x) + 2012$). The 95% confidence intervals are shown (solid lines). (B) CEMP1 protein expression promotes calcium nodule formation by human gingival fibroblasts. Panel of HGF transfected with CEMP 1, cultured for 3, 7, and 14 days and stained with Alizarin red S to detect insoluble calcium nodules (B-a, b, and c). Control HGF transfected with empty pDNA40 vector stained as described (B-d, e, and f for 3, 7, and 14 days of culture respectively). Bar = 100 μ m.

ing gene GAPDH along with primers for the gene being analyzed were used. Fig. 4A shows that, as expected, the only mRNA expressed by HGF cells is collagen type I, with the exception of a slight band of alkaline phosphatase after 14 days in culture. All "mineralized-tissue" markers tested were expressed in CEMP1 transfected HGF at all stages tested. CAP mRNA was strongly expressed after 3 days in culture. The bone specific transcription factor and mineralizing marker Cbfa1 was also expressed in these cells

and the level of expression was similar at 3, 7, and 14 days of culture.

Western blot

We performed Western blots to determine if expression of mRNAs is associated with protein production. Fig. 4B shows that with the results obtained using RT-PCR analysis, the CEMP1-transfected cells express ALP, BSP, CAP,

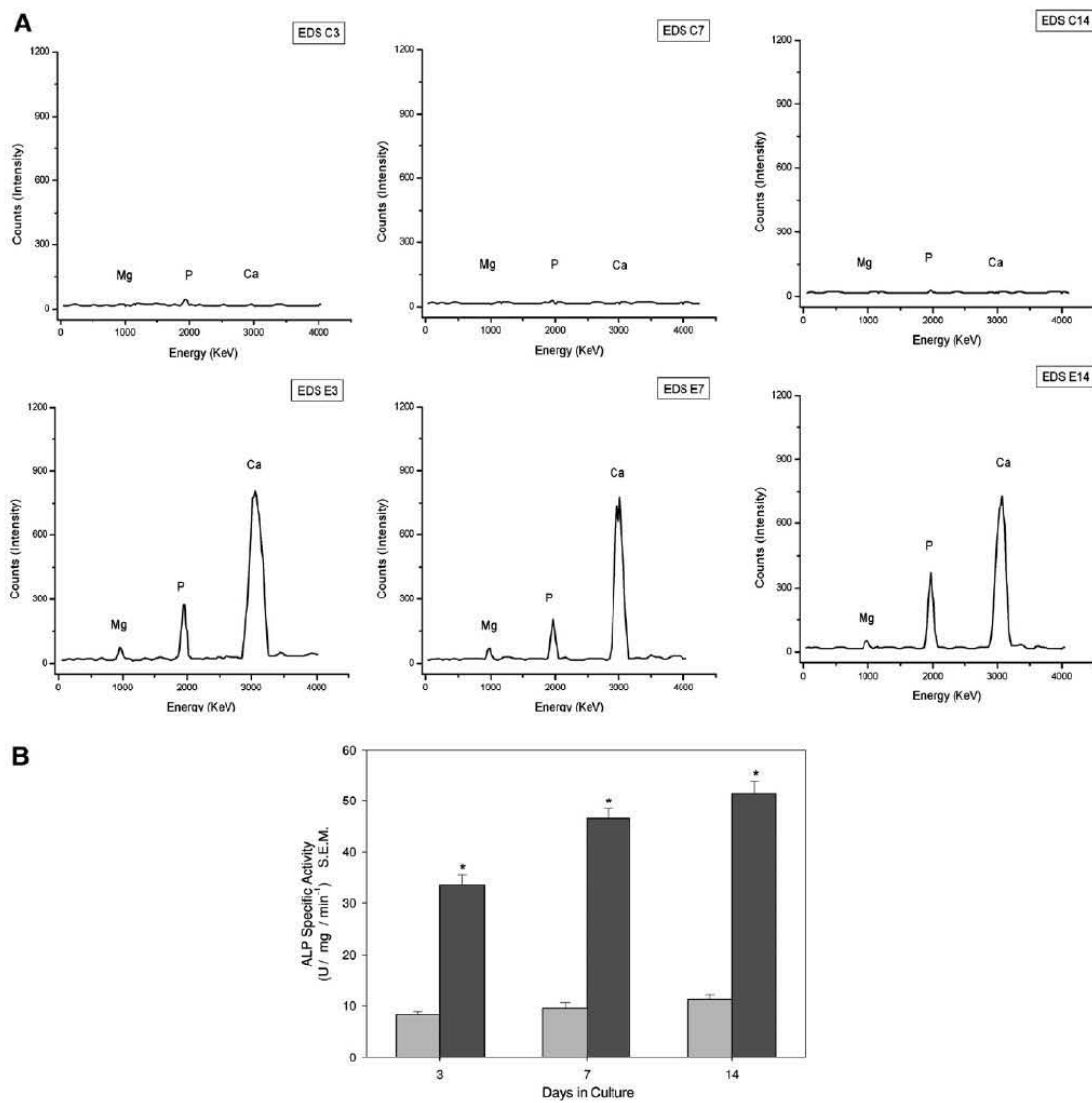


Fig. 3. Representative energy-dispersive X-ray microanalysis spectrum of mineralized areas of control HGF cultured for 3, 7, and 14 days (A, upper panel) transfected with pcDNA empty vector. Prominent energy peaks for calcium and phosphorous similar to those for biological hydroxyapatite were determined in mineralized selected areas of HGF transfected with CEMP1 at 3, 7, and 14 days of culture (A, lower panel). (B) ALP specific activity determined by biochemical method in HGF transfected and stably expressing CEMP1 had ALP activity by 4, 4.5, and 5-fold higher (■) compared to HGF transfected with pcDNA empty vector (□) at 3, 7, and 14 days of culture, respectively ($n = 3$). * $P < 0.001$.

CEMP1, OCN, and OPN at all days tested. These proteins were not detectable in the control HGF. OCN levels were at maximum value at the end of 14 days. CAP, a protein shown to be expressed in cementum, and CEMP1 were also present at all culture times, reaching highest levels after 14 days.

Discussion

Our data show that HGF overexpressing CEMP1 express ALP, OCN, BSP, and CAP. Because these proteins are not present in untransfected cells in significant levels, our results indicate that transfection of CEMP1 induces

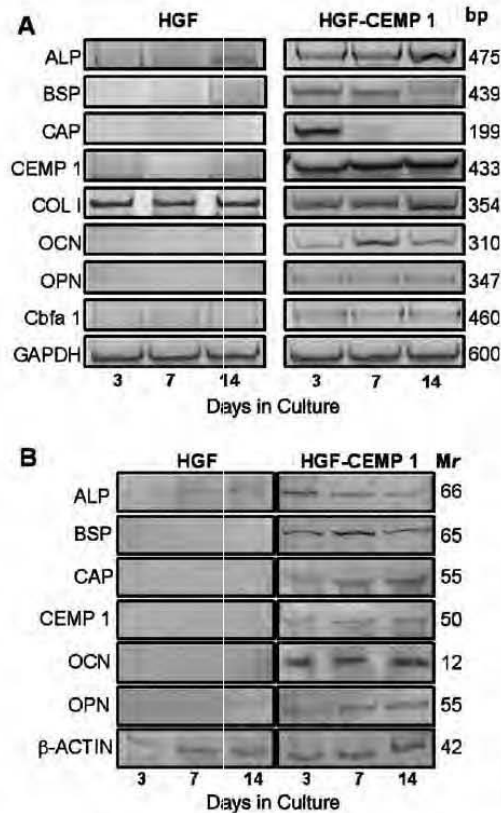


Fig. 4. Representative image of RT-PCR analysis of extracellular matrix mRNA expression in both HGF-CEMP1-pcDNA40 (+) and HGF-pcDNA40 (+) alone. ALP, BSP, CAP, type I COL, CEMP1, OCN, and OPN, molecules characteristic of osteoblastic and cementoblastic phenotype (A). (B) Genetically modified human gingival fibroblasts secrete cementum and bone-associated molecules. Western blot analyses of ALP, BSP, CAP, CEMP1, OCN, and OPN expression. Molecules were detected in the conditioned medium. Analyses were performed at 3, 7, and 14 days of culture.

expression of these proteins. These results are consistent with the possibility that the CEMP1 participates in the mineralization process of human putative cementoblasts in vitro [10]. They also explain the wide distribution of CEMP-1 throughout cementum and its expression by putative cementoblastic populations in vivo and in vitro [7,8].

We examined a wide variety of genes involved in mineralization. Transfection of CEMP1 resulted in induction of ALP activity. This early-stage differentiation marker, increased significantly, indicating that CEMP1 expression may stimulate differentiation to a "mineralizing-like" cell phenotype and its increase is also associated to the continuous growth of cementum [17]. The possibility that addition of organophosphates such as β -glycerophosphate to the cultures alone is responsible for the mineralization is

excluded because CEMP1 transfected HGF produced biological-type hydroxyapatite, as revealed by the prominent energy peaks for Ca^{2+} and P and Ca/P ratios similar to those for biological apatite [18]. Furthermore, HGF transfected with vector alone did not produce the hydroxyapatite crystals.

Proteins such as OCN, BSP, and OPN which have affinity for the mineral phase that control the nucleation; crystal growth and mineral maturation of the apatite crystals were also expressed. Maximum levels of BSP expression occur during initial stages of mineralization and diminish at the onset of mineralization [19]. Osteocalcin reached highest expression level at the initial stages of the mineralization process; however, protein levels increased in a time-dependent manner and reached maximum level at the onset of mineralization, indicating that it probably acts as a promoter and as inhibitor/moderator of mineralization [20]. In contrast, OPN mRNA maintained low expression levels during the initial culture period and decreased at the mineralization stage. However, OPN protein level manifested time dependent increase. Expression of type I collagen mRNA was higher in control HGF at the early stage of culture and then became similar to the CEMP1 transfected HGF cells at later days in culture. These results support the concept that in matrix-mediated mechanisms for mineral formation, type I collagen defines the framework for mineral deposition, and by itself is not sufficient to support nucleation of hydroxyapatite [21]. From these results we infer that CEMP1 expression in HGF cells provides a microenvironment that favors calcium crystallization mainly by the participation of acidic proteins such as OPN, BSP, and OCN.

CEMP1 also induces Cbfa1 expression. The Cbfa1 is a transcription factor necessary for mineralization of bone and cartilage [22]. It was expressed at the mRNA level at all time points tested in CEMP1 transfected HGF although, 2-fold higher levels of expression were observed at middle stages of mineralization. Although Cbfa1 has been thought of as an osteoblast-specific factor, its expression has been detected in odontoblasts, periodontal ligament cells and cementoblasts [23]. This molecule plays an important role in early specification of the mineralizing cell phenotype and our results indicate that CEMP1 regulates expression of Cbfa1. The finding that CAP was expressed at the mRNA and protein levels through the culture terms indicates that CEMP1 may regulate CAP expression during the mineralization, suggesting that it may be a positive regulator of the mineralization process. This is consistent with the recent findings showing that human-derived cementoblasts express CEMP1 [24]. Expression of CEMP1 also increases proliferation. Increased proliferation upon expression of a gene not normally expressed in cells appears to be a common phenomenon, because the expression of osterix in NIH3T3 fibroblasts and bone marrow stromal cells results in an increased rate of proliferation [25].

Our report demonstrates for the first time that CEMPI can promote osteoblastic and/or cementoblastic cell differentiation of HGF in vitro. This work is fundamentally different from others which have used BMP-2, BMP-7, and Runx2 genetically engineered nonosteogenic cells such as skin and human gingival fibroblasts to promote its in vivo conversion to a mineralizing osteoblastic phenotype and initiate osteogenesis in vivo [26]. Nevertheless, our results show that CEMPI expression into HGF has the potential to overcome cell source and indicates that CEMPI may be necessary for induction of matrix mineralization and conversion of nonosteogenic cells to a mineralizing phenotype in vitro.

Finally, our report is the first one demonstrating that CEMPI can promote proliferation and differentiation of adult HGF to a “mineralizing-like” cell phenotype and we have provided evidence that CEMPI expression has the ability to induce formation of mineralized nodules and calcium deposition in nonosteogenic cells. These results suggest that CEMPI might have a potential function in cementum and bone formation.

Acknowledgments

This study was supported by funds from DGAPA-UNAM IN204705-3, CONACYT 48638 to H.A.; DE012346 to M.Z.D.; DE08229, DE13069 to A.S.N.

References

- [1] K.A. Johnson, L. Hessle, S. Vaingankar, C. Wennberg, S. Mauro, S. Narisawa, J.W. Goding, K. Sano, J.L. Millan, R. Terkeltaub, Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (2000) R1365–R1377.
- [2] D. Miao, A. Scutt, Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage, *J. Histochem. Cytochem.* 50 (2002) 333–340.
- [3] D.D. Bosshardt, S. Zalzal, M.D. McKee, A. Nanci, Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum, *Anat. Rec.* 250 (1998) 13–33.
- [4] A. Nanci, Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density, *J. Struct. Biol.* 126 (1999) 256–269.
- [5] H.I. Roach, Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bonesialoprotein in bone mineralization and resorption, *Cell. Biol. Int.* 18 (1994) 617–628.
- [6] J. Chen, Q. Zhang, C.A. McCulloch, Sodek, Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SSP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin), *Histochem. J.* 23 (1991) 281–289.
- [7] M.A. Álvarez-Pérez, S. Narayanan, M. Zeichner-David, B. Rodríguez Carmona, H. Arzate, Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23), *Bone* 38 (2006) 409–419.
- [8] H. Arzate, L.F. Jiménez-García, M.A. Álvarez-Pérez, A. Landa, I. Bar-Kana, S. Pitaru, Immunolocalization of a human cementoblastoma conditioned medium-derived protein, *J. Dent. Res.* 81 (2002) 541–546.
- [9] H. Arzate, J. Chimal-Monroy, L. Hernández-Lagunas, L. Díaz de León, Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells, *J. Periodont. Res.* 31 (1996) 144–148.
- [10] M.A. Álvarez Pérez, S. Pitaru, O. Álvarez-Fregoso, J. Reyes Gasga, H. Arzate, Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 1–13.
- [11] A.S. Narayanan, R.C. Page, Biochemical characterization of collagens synthesized by fibroblasts derived from normal and diseased human gingiva, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5464–5471.
- [12] M. Zeichner-David, K. Oishi, E. González, Z. Su, V. Zakartchenko, L.S. Chen, H. Arzate, P. Bringas, Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development, *Dev. Dyn.* 228 (2003) 651–663.
- [13] F.J. Cuisinier, R.W. Glaisher, J.C. Voegel, J.L. Hutchinson, E.F. Bres, R.M. Frank, Compositional variations in apatites with respect to preferential ionic extraction, *Ultramicroscopy* 36 (1991) 297–305.
- [14] O.H. Lowry, N.R. Roberts, M.-L. Wu, W.S. Hixon, E.J. Crawford, The quantitative histochemistry of brain I. Enzyme measurement, *J. Biol. Chem.* 207 (1954) 19–37.
- [15] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [16] H. Arzate, M.A. Álvarez, A.S. Narayanan, Cyclosporin A promotes mineralization by human cementoblastoma-derived cells in culture, *J. Periodont. Res.* 40 (2005) 218–224.
- [17] T. Van den Bos, W. Beertsen, Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect and relation to cementum growth rate, *J. Periodont. Res.* 34 (1999) 1–6.
- [18] T. Van den Bos, G. Handoko, A. Niehof, L.M. Ryan, S.P. Coburn, M.P. Whyte, W. Beertsen, Cementum and dentin in hypophosphatasia, *J. Dent. Res.* 84 (2005) 1021–1025.
- [19] H. Arzate, M.A. Álvarez-Pérez, O. Álvarez-Fregoso, A. Wusterhaus-Chávez, J. Reyes-Gasga, L.A. Ximénez-Fyvie, Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells, *J. Dent. Res.* 79 (2000) 28–34.
- [20] B. Ek-Rylander, M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard, G. Andersson, Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14853–14856.
- [21] A. George, J. Hao, Role of phosphophoryn in dentin mineralization, *Cell. Tissue. Org.* 181 (2005) 232–240.
- [22] A.L. Bronckers, M.A. Engelse, A. Cavender, J. Gaikwad, R.N. D'Souza, Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues, *Mech. Dev.* 101 (2001) 255–258.
- [23] M. Kitagawa, H. Tahara, S. Kitagawa, H. Oka, Y. Kudo, S. Sato, I. Ogawa, M. Miyaichi, T. Takata, Characterization of established cementoblasts-like cells from human cementum-lining cells in vitro and in vivo, *Bone* 39 (2006) 1035–1042.
- [24] Q. Tu, P. Valverde, J. Chen, Osterix enhances proliferation and osteogenic potential of bone marrow stromal cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 341 (2006) 1257–1265.
- [25] P.H. Krebsbach, K. Gu, T. Renny, R.T. Franceschi, R.B. Rutherford, Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7 transduced human gingival fibroblasts form bone in vivo, *Hum. Gene. Ther.* 11 (2000) 1201–1210.
- [26] R.B. Rutherford, M. Moalli, R.T. Franceschi, D. Wang, K. Gu, P.H. Krebsbach, Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo, *Tissue. Eng.* 8 (2002) 441–452.