

**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Expressió i modulació de gens del desenvolupament
ossi: els casos de la fibrodisplàsia ossificadora
progressiva (FOP) i de l'heteroplàsia
òssia progressiva (POH)**

Marc Tarrús de Vehí

Memòria de Tesi presentada per en Marc Tarrús de Vehí per optar al grau
de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Abril de 2003

Director de Tesi:

Dr. Simon Anthony Mackenzie

Professor Associat
Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Unitat Fisiologia Animal. Ciències.
Universitat Autònoma de Barcelona

Índex

Abreviatures	5
1. Introducció general	7
1.1. Regulació i diferenciació de condrocits i osteoblasts: una visió general	
2. PART I: La fibrodisplàsia ossificadora progressiva (FOP)	13
2.1. Introducció	14
2.1.1. La fibrodisplàsia ossificadora progressiva	
2.1.2. Sobreexpressió de BMP-4, el marcador molecular de la malaltia	
2.1.3. El morfogen BMP-4, un membre de la superfamília de factors de creixement transformants beta (TGF- β). Introducció als camins de transducció dels factors TGF- β	
2.1.4. Antagonistes de BMP-4	
2.2. Objectius dels treballs 1 i 2	27
2.3. Treball 1: Anàlisi, en LCLs humanes, de l'expressió endògena de BMP-4 i els seus antagonistes noggin, gremlin, chordin i follistatin i anàlisi de l'expressió dels antagonistes de BMP-4 en LCLs induïdes amb proteïna hrBMP-4 exògena	29
2.4. Treball 2 : Model de creixement cel·lular sincronitzat aplicat a 4 línies FOP i a 4 línies control: anàlisi de l'expressió endògena de BMP-4, gremlin i noggin i anàlisi dels antagonistes noggin i gremlin en línies estimulades amb proteïna hrBMP-4	51
2.5. Part I: Discussió final	89
3. PART II: L' heteroplàsia òssia progressiva (POH)	99
3.1. Introducció	100
3.1.1. L' heteroplàsia òssia progressiva (POH)	

- 3.1.2. La POH, les proteïnes G heterotrimèriques i el gen GNAS1
- 3.1.3. Mutacions amb guany de funció "gain-of-function mutations"
- 3.1.4. Mutacions amb pèrdua de funció "loss-of function mutations"
- 3.1.5. Mutacions observades en la síndrome d'AHO estan distribuïdes per tot el gen de GNAS1
- 3.1.6. Diferenciació cel·lular dirigida a fenotips osteogènics i/o adipogènics

3.2. Objectius dels treballs 3 i 4	113
3.3. Treball 3: Expressió específica de teixit de Nep55, Nesp-as, $Xl\alpha$ s i formes de $G_s\alpha$ en cèl·lules pre-osteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí i variabilitat d'expressió dels transcrits de Gnas en un fenotip osteogènic induït	115
3.4. Treball 4: Expressió d' $XL\alpha$ i $G_s\alpha$ en LCLs humanes, i reducció a la meitat, en individus POH, dels nivells basals d'mRNA de les formes expressades del gen GNAS1.....	143
3.5. Part II: Discussió final	161
4. Discussió general i conclusions	171
Annexos	181
5. Referències	199
6. Agraïments	223

Abreviatures

- AC:** Adenylyl cyclase (adenilat ciclase)
- AHO:** Albright hereditary osteodystrophy (osteodistrofia hereditària d'Albright)
- AMH:** Anti-Mullerian hormone (hormona anti-Mullerian)
- AP-1:** Activator protein-1 (proteïna activadora-1)
- aP2:** Adipocyte lipid-binding protein (proteïna d'unió a lipídics d'adipòcits)
- α -MEM:** Essential α -modified medium (medi essencial α -modificat)
- BMP:** Bone morphogenetic proteins (proteïnes morfogenètiques d'os)
- Cbfa:** Factor de transcripció de diferenciació osteoblàstica
- cAMP:** Cyclic adenosine monophosphate (monofosfat d'adenosina cíclic)
- cDNA:** Complementary DNA (DNA complementari)
- cGMP:** Cyclic guanosine Monophosphate (monofosfat de guanosina cíclic)
- CNS:** Central nervous system (sistema nerviós central)
- Co-Smads:** Common Smads proteins (proteïnes smads comunes)
- DNA:** deoxyribonucleic acid (àcid desoxiribonucleic)
- DPC:** Days postcoitum (dies postcoitum)
- EBV:** Epstein-Barr Virus (virus Epstein-Barr)
- FGFs:** Fibroblast growth factors (factors de creixement de fibroblast)
- FOP:** Fibrodysplasia ossificans progressiva (la fibrodisplàsia ossificadora progressiva)
- GAPDH** Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (gliceraldehid-6-fosfat deshidrogenasa)
- G3PDH:** Glycerol-3 phosphate dehydrogenase (glicerol-3- fosfat deshidrogenasa)
- GDFs:** Growth differentiating factors (factors de diferenciació del creixement)
- GDP :** Guanosine diphosphate (difosfat de guanina)
- GNAS1:** A gene that encodes the α -subunit of the stimulatory G protein (gen que codifica per la subunitat α de la proteïna G estimuladora)
- G_s α :** α -subunit of the stimulatory G protein (subunitat α de la proteïna G estimuladora)
- GTP:** Guanosine triphosphate (trifosfat de guanina)
- hMCS:** Human mesenchymal stem cells (cèl·lules mare mesenquimàtiques)
- hrBMP-4:** Human recombinant bone morphogenetic protein 4 (proteïna BMP-4 recombinant humana)
- I-Smads:** Inhibitory Smads (smads inhibidors)
- LCL:** Limfoblastoid cell lines (limfoblastoids immortalitzats)
- MAS:** McCune-Albright syndrome (la síndrome de McCune-Albright)
- MC3T3-E1:** Fibroblast pre-osteoblastic cell line derived from mice (fibroblast pre-osteoblàstic obtingut de *Mus musculus*)
- NCBI:** National Center for Biotechnology Information (Centre Nacional d'Informació Biotecnològica)
- Nesp55/Nesp:** Neuroendocrine stimulating protein (proteïna estimuladora neuroendocrina)
- Nesp-as:** Neuroendocrine stimulating protein antisense (proteïna estimuladora neuroendocrina antisentit)
- PCR:** Polymerase Chain Reaction (reacció en cadena de la polimerasa).
- Osfl:** Osteoblast specific transcription factors (factors de transcripció específics d'osteoblast).
- PHPIa:** Pseudohypoparathyroidism type Ia (pseudo-hipoparatiroidisme tipus Ia)
- PHrP:** Parathyroid hormone-related peptide (pèptid relacionat amb la hormona paratiroidea).
- PKA:** Protein kinase A. (proteïna kinasa A)
- PLA2:** Phospholipase A2 (fosfolipasa A2)
- PLC:** Phospholipase C (fosfolipasa C)
- POH:** Progressive osseous heteroplasia (l'heteroplàsia òssia progressiva)

G proteins: Heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins (proteïnes heterotrimèriques d'unió a nucleòtids de guanina)

PTH: Parathyroid hormone (hormona paratiroidea)

RGS: Regulators of G protein signaling (reguladors de la senyalització de les proteïnes G)

RNA: Ribonucleid acid (àcid ribonucleic)

RNA_m: RNA missatger

TGF- β : Transforming growth factor (factor de creixement transformant beta)

Xl α s/Gnasxl: Extra large guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating (proteïna estimuladora "extra-large" d'unió a nucleòtids de guanina).

1. Introducció general

L'esquelet, com cada òrgan, té un desenvolupament específic i una funció característica que defineixen, en termes biològics i patològics, la seva identitat. L'esquelet està compost de múltiples elements, d'origen i forma diversa, que es troben dispersats per tot el cos. La majoria d'aquests elements estan formats per dos teixits diferents, el cartílag i l'os. Cada teixit té les seves pròpies cèl·lules específiques, els condrocits en el cartílag i osteoblasts i osteoclasts en l'os i cada un d'aquests tipus cel·lulars té el seu propi camí de diferenciació, les seves funcions fisiològiques i consegüentment les seves patologies.

Durant les últimes dècades s'ha realitzat un esforç intens per entendre la complexitat d'aquests òrgan en termes de la biologia del desenvolupament, de la fisiologia i sobretot de condicions patològiques, ja que el complex món de l'os està dominat per l'impacte de malalties de formació ectòpica d'os, tals com la FOP (la fibrodisplàsia ossificadora progressiva) i la POH (l'heteroplàsia òssia progressiva) i també d'enfermetats degeneratives com ara l'osteoporosi. No és sorprenent, com ha passat en la majoria dels processos d'organogènesi, que estudis genètics realitzats en humans i ratolins hagin estat la força motriu que ha permès redefinir la biologia de l'os. Els estudis genètics han obert noves àrees de recerca, han elucidat, a nivell molecular, fenòmens ja coneguts i altres vegades han desafiat assumpcions de llibres de text que mai havien estat comprovades i transformant l'àrea profundament.

En mamífers, el desenvolupament de l'os és un procés embrionari tardà i l'últim aconteixement que es dona en el desenvolupament de l'esquelet. Un cop les condensacions mesenquimàtiques s'han format, entre 10.5 i 12.5 dies postcoitum (dpc, en ratolins), les quals prefiguren cada un dels futurs elements esquelètics, podran evolucionar per dues vies diferents. En elements esquelètics, que formen part del crani i clavícules, les cèl·lules de les condensacions mesenquimàtiques es diferencien directament a osteoblast els quals apareixen 15.5 dpc en el desenvolupament del ratolí (*Hall and Miyake, 1992; Huang et al., 1997*). Aquest procés s'anomena ossificació intramembranosa. Per la resta de l'esquelet, les cèl·lules de les condensacions

mesenquimàtiques es diferencien en condrocits formant el “cartilage anlagen” dels futurs ossos. A la perifèria de “l’anlage”, les cèl·lules del “pericondrium” es diferencien en osteoblasts, mentre que la perifèria de “l’anlage” es torna hipertròfic. Eventualment, la matriu que envolta aquests condrocits hipertròfics calcifica i una invasió de capil·lars sanguinis en el cartílag calcificat permet l’entrada d’osteoblasts (*Horton et al., 1993; Erlebacher et al., 1995*). Un cop la matriu òssia s’ha dipositat, la medul·la òssia es forma i apareixen els primers osteoclasts (*Hofstetter et al., 1995*). Així doncs, l’aparició seqüencial de “cartilage anlage”, calcificació del cartílag i finalment os, caracteritza l’ossificació endocondral.

Sense tenir en compte el procés d’ossificació, la diferenciació osteoblàstica precedeix la diferenciació osteoclàstica. Una característica peculiar de l’os resideix en la seva fisiologia, l’os és l’únic òrgan que conté un tipus cel·lular, l’osteoclast, que la seva única funció és la de destruir constantment l’òrgan que l’hostatja. Aquesta destrucció o reabsorció d’os succeeix durant tota la vida en individus sans i queda compensada per una formació nova d’os, en un procés que s’anomena remodelació òssia. És mitjançant remodelació òssia que la massa d’os es manté a un nivell constant entre el final de la pubertat i la fallida gonadal. La remodelació òssia és un procés afectat en l’osteoporosi, una malaltia caracteritzada a nivell cel·lular per un increment relatiu de la reabsorció d’os respecte la formació d’os (*Rodan et al., 1996*).

1.1 La regulació i la diferenciació dels condrocits i dels osteoblasts: una visió general

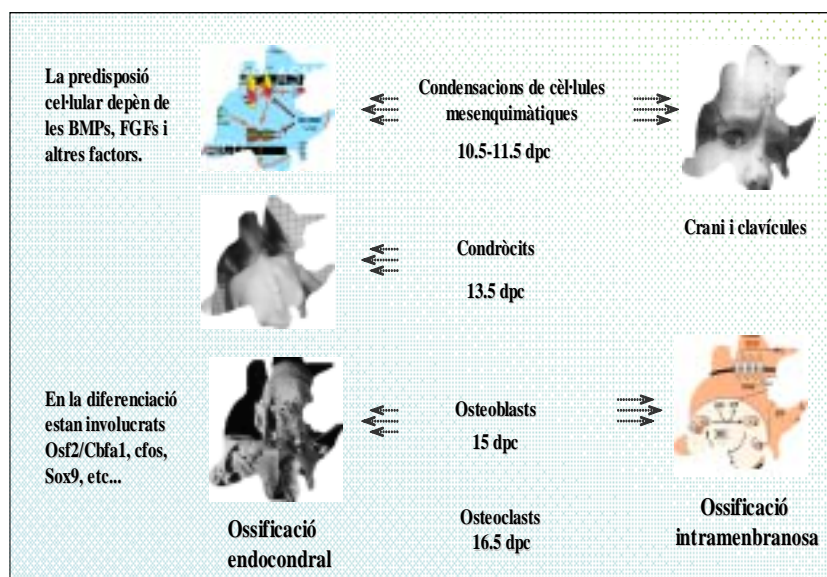
La formació de cartílag (condrogènesi) depèn d’una sèrie de passos coordinats que comencen amb la formació de les condensacions precartilaginoses, de la diferenciació subseqüent d’aquestes cèl·lules en condrocits i de la seva maduració progressiva. Aquest motlle de cartílag serà posteriorment ossificat per donar lloc a l’esquelet ossi. Diversos estudis donen suport a que la principal funció de les BMPs “bone morphogenetic proteins” seria la d’actuar com a importants senyals en la regulació de la formació del cartílag. Tot i així, el pas exacte en el qual les BMPs actuen encara no s’ha determinat.

Una sèrie d'experiments indicaven que la senyalització de les BMP és necessària per la formació de les condensacions precartilaginoses, per la diferenciació a condrocits, per la seva maduració i finalment pel manteniment de la condrogènesi (Sandrine Pizette et al., 2000). El factor de transcripció SOX9 és necessari en els passos primerencs de la diferenciació dels condrocits. Dos altres membres de la família SOX, L-SOX5 i SOX6, són necessaris per als passos següents en les rutes de diferenciació dels condrocits (de Crombrughe et al., 2000).

Les actuals direccions de recerca es concentren en la identificació de més factors de transcripció que siguin essencials en el procés de condrogènesi i entendre com funcionen permetrà poder controlar complexos programes genètics i alhora determinar com la seva expressió o activitat respon a les principals rutes de senyalització cel·lular. S'han establert, per exemple, enllaços entre SOX9 i citoquines, que se sap que influeixen la diferenciació condrocítica. El factor de transcripció SOX9 és una diana de senyalització pel pèptid relacionat amb la hormona paratiroida (Huang et al., 2001). Addicionalment, els factors de creixement de fibroblast augmenten l'expressió de SOX9 en cèl·lules de teixit en cultiu (Murakami et al., 2000). L'osteoblast és un tipus cel·lular d'origen mesenquimàtic que és responsable de la deposició de la matriu òssia o formació d'os. Sabem molt menys sobre el control molecular de la diferenciació osteoblàstica i de la seva funció del que es coneix sobre la diferenciació dels condrocits (fig.1).

Fig. 1

Model proposat per als diferents camins cel·lulars de senyalització. Esquerra: el procés de condrogènesi, hipertrofia del cartílag, degradació i substitució per os. S'anomena ossificació endocondral. Dreta: mecanisme d'esquelatogènesi que succeeix en alguns ossos del crani i clavícules. S'anomena ossificació intramenbranososa. En aquest tipus d'ossificació les cèl·lules mesenquimàtiques es condensen, el teixit es vascularitza i les cèl·lules es diferencien directament a osteoblasts.



A data d'avui s'ha demostrat que només uns pocs gens controlen la diferenciació osteoblàstica directament o indirecta com ara *Cbfa1* i “Indian hedgehog” (*Ihh*). Aquest coneixement limitat es pot atribuir parcialment al fet que els osteoblasts es podrien mirar, des d'una perspectiva genètica, com un fibroblast sofisticat. L'osteoblast expressa tots els gens que s'expressen en un fibroblast, un tipus cel·lular del qual poc es coneix en termes de diferenciació (*Aubin and Liu, 1996*), i pocs més. D'aquests gens extra un és “osteoblast-enriched (bone sialoprotein)”, però només un, “*in vivo*”, és vertaderament específic d'osteoblast (*osteocalcin*) (*Gerard Karsenty, 1999*).

Recentment s'han trobat elements “cis-acting” específics d'osteoblast que es troben en gens expressats exclusivament o principalment en osteoblasts, suggerint que altres factors de transcripció, específics d'aquest tipus cel·lular, estan encara per descobrir (*Ducy and Karsenty, 1995; Rossert et al., 1996; Dodig et al., 1996*). Es va caracteritzar parcialment un d'aquests factors de transcripció que ha estat provisionalment anomenat *Osf1* (*Schinke and Karsenty, 1999*). Les cèl·lules del llinatge osteoblàstic expressen principalment BMP-2, -4 i -6 (*Ghosh-Choudhury et al., 1994; Boden et al., 1997; Pereira et al., 2000*). Les BMPs són factors de creixement que juguen una funció central en la diferenciació de cèl·lules mesenquimàtiques a cèl·lules de llinatge osteoblàstic i potencien la funció diferenciada dels osteoblasts (*Hughes et al., 1995; Thies et al., 1992; Gazerro et al., 1999*). En el teixit ossi, les BMPs desencadenen una funció autocrina en la formació de l'esquelet i les deficiències en alguna de les BMPs, com ara la BMP-7, condueixen a anormalitats en la formació de l'esquelet (*Luo et al., 1995*). La identificació i la caracterització funcional d'aquests i altres factors és doncs necessària per a millorar, en un futur, la nostra comprensió del control molecular implicat en la diferenciació osteoblàstica.

En aquest treball es presenten una sèrie d'experiments realitzats en dues malalties humanes diferents caracteritzades per la formació ectòpica d'os d'origen divers: a) La FOP (la fibrodissplàsia ossificadora progressiva) una atterradora aflicció humana de formació ectòpica d'os. En els FOP les lesions fibroproliferatives evolucionen a través del procés endocondral, fins a os laminar madur amb elements de medul·la òssia (*Kaplan et al., 1993b; Gannon et al., 1998*), i b) La POH (l'heteroplàsia òssia progressiva), és un

transtorn de diferenciació mesenquimàtica caracteritzat per l'ossificació de la dermis i per una ossificació heterotòpica cutània, subcutània i de teixits conjuntius profunds. En individus POH, el procés intramenbranós predomina respecte el procés endocondral (*Frederick Kaplan and Eileen Shore, 2000*).

L'ossificació heterotòpica resulta d'alteracions en la regulació normal de l'osteogènesi que condueixen a una interpretació errònia de cèl·lules mesenquimàtiques pluripotents. Els desordres genètics d'osteogènesi heterotòpica són de gran vàlua per avançar en el coneixement de la regulació de l'esquelet. La identificació del gen danyat en aquests desordres i l'elucidació dels camins molecular alterats, com a efecte secundari d'aquestes mutacions genètiques, proporcionaran informació capital per al desenvolupament de tractaments de molts desordres embriogènics o postnatsals amb formació heterotòpica d'os.

Per concloure la introducció general i introduir les dues malalties sobre les que s'ha realitzat el treball de recerca i que seran descrites en detall, mostrem a continuació dues taules comparatives entre l'heteroplàsia òssia progressiva (POH) i la fibrodisplàsia ossificadora progressiva (FOP).

Taula 1: Característiques clíniques;

Taula 2: Característiques patològiques i de laboratori.

Taula 1. Característiques clíniques d'ossificació heterotòpica en POH i FOP

<i>Característica</i>	<i>POH</i>	<i>FOP</i>
Distribució sexual	Dones = homes	Dones = homes
Transmissió genètica	Autosòmic dominant	Autosòmic dominant
Malformació congènita dels dits grossos	--	+
Ossificació cutània	+	--
Ossificació subcutània	+	--
Ossificació del múscul	+	+
Ossificació: de superficial a profunda	+	--
Severa limitació de moviment	+	+
Inflamacions severes	--	+
Ossificació ectòpica després d'injeccions intramusculars	--	+
Ossificació ectòpica després de trauma	±	+
Patrons regionals de progressió	--	+
Disposició de tractament definitiu	--	--

Taula 2. Característiques patològiques i de laboratori de POH i FOP

<i>Característica</i>	<i>POH</i>	<i>FOP</i>
Mecanisme d'ossificació predominant	Intramembranós	Endocondral
Inflamació perivascular i infiltració en múscul	--	+
Medul·la òssia en os ectòpic	--	+
Resistència a PTH	--	--
Patologia	No coneguda	Associada a un augment de l'expressió de BMP-4
Mutacions genètiques	Mutacions inactivadores de la subunitat- α de les proteïnes G estimuladores de l'adenilat ciclase	No coneguda

2. PART I:

La fibrodisplàsia ossificadora progressiva (FOP)

Hipòtesi: L'efecte primari de la mutació FOP és la de modificar el camí de transducció de les BMPs, afectant efectors "upstream" de les BMPs i creant així, en línies d'individus amb FOP, gradients de BMP-4 alterats com a efecte secundari.

2.1 Introducció

2.1.1 La fibrodisplàsia ossificadora progressiva

La fibrodisplàsia ossificadora progressiva (FOP) és una malaltia rara, de caràcter autosòmic dominant caracteritzada per la malformació congènita dels dits grossos dels peus i per una formació progressiva d'os heterotòpic que inhabilita de forma severa (fig. 1A i C; Schroeder and Zasloff, 1980; Connor and Evans 1982a, 1982b; Connor et al., 1993; Kaplan et al., 1993a, 1998; Smith 1998). Freqüentment, els primers indrets amb formació heterotòpica d'os es troben dins de les lesions fibroproliferatives que apareixen en la part superior de l'esquena i coll (fig. 1B). L'ossificació heterotòpica en pacients amb FOP segueix uns patrons anatòmics d'aparició predita (Kaplan et al., 1990; Cohen et al., 1993; Rocke et al., 1994) i condueix a una anquilosi òssia extraarticular de pràcticament totes les articulacions tant de l'esquelet axial com de l'esquelet de les extremitats (Connor and Evans, 1982a; Cohen et al., 1993; Kaplan et al., 1993b; Rocke et al., 1994; Shah et al., 1994). Això provoca que el moviment a les zones afectades sigui impossible de realitzar (fig. 1C). La mort ve molt sovint determinada a partir de complicacions de la malaltia que condueixen a una rigorosa restricció del toràx (Connor and Evans, 1982a; Kussmaul et al., 1998).

L'ossificació heterotòpica s'indueix amb un mínim dany en els teixits tous, però també es pot donar sense que es detecti cap trauma (Connor and Evans, 1982a; Janoff et al., 1994; Luchetti et al., 1996; Glaser et al., 1998). La primera aparició patològica és una infiltració limfocítica perivascular al múscul esquelètic aparentment normal (Gannon et al., 1998). La primerenca i transitòria fase inflamatòria és seguida per una degeneració de les cèl·lules musculars i per inflamacions causades per teixits tous fibroproliferatius molt vascularitzats que són indistingibles a nivell histològic de la fibromatosi juvenil agressiva (Gannon et al., 1998). Les lesions fibroproliferatives evolucionen, mitjançant el procés endocondral, a os laminar madur amb elements de medul·la òssia (Kaplan et al., 1993b; Gannon et al., 1998). Durant l'embriogènesi la formació d'os endocondral es detecta inicialment per una condensació de cèl·lules mesenquimàtiques, seguit de la

diferenciació d'aquestes cèl·lules a condrocits i subseqüentment la substitució de cartílag per os (*Ducy et al., 1998*).

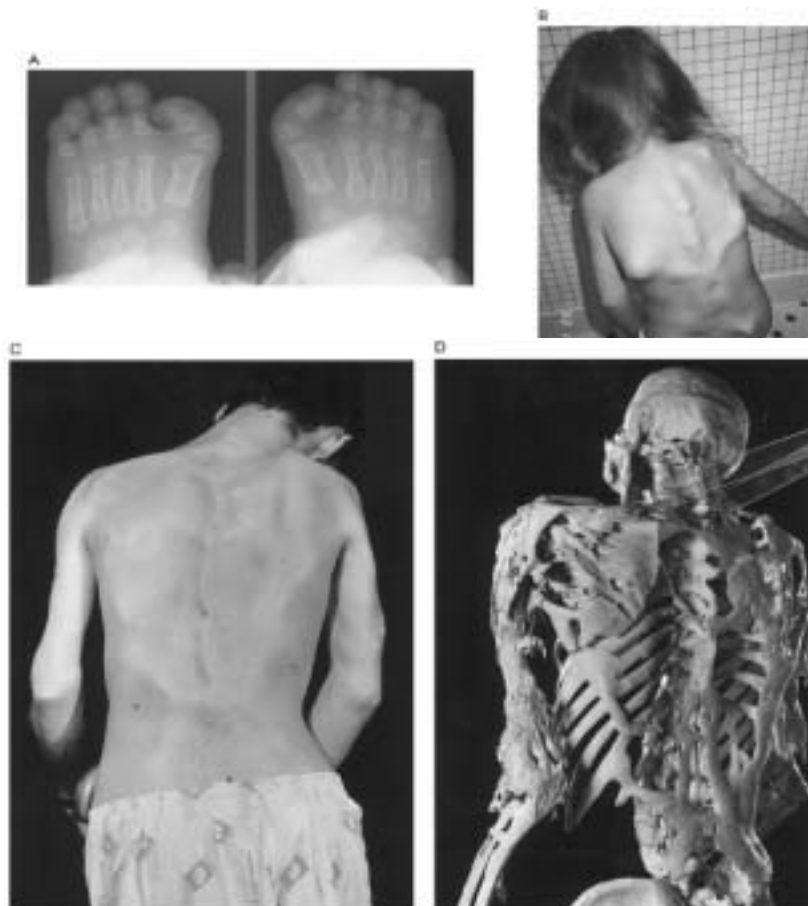


Fig. 1 Característiques clíniques de FOP. *A*, Radiografies dels peus d'un nen de quatre mesos d'edat afectat amb FOP, s'observen les malformacions congènites dels dits grossos del peu amb falanges proximals amb forma delta. *B*, Nòduls de teixit tou de forma múltiple (lesions preòssies fibroproliferatives) en l'esquena d'una nena afectada amb FOP de quatre anys d'edat. Aquestes lesions preòssies fibroproliferatives són freqüentment la primera indicació d'ossificació ectòpica. *C* i *D*, manifestació clínica i esquelet d'un home amb FOP. La postura rígida d'aquest home de vint-i-cinc anys fou provocada per una anquilosi de la columna vertebral, espatlles i colzes. Va morir de pneumònia a l'edat de quaranta anys

Estudis recents han identificat factors de transcripció - tals com *Cbfa1* (*Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Mundlos et al., 1997; Otto et al., 1997*) i *Sox9* (*Bi et al., 1999*)- que dirigeixen la formació del cartílag i de l'os. Tot i així, es coneix molt poc sobre els senyals que inicien la diferenciació de les cèl·lules cap als camins osteogènics o condrogènics. És probable que el defecte genètic responsable de la FOP resideixi en un senyal inductor.

2.1. 2 Sobreexpressió de BMP-4, el marcador molecular de la malaltia

La causa molecular i la patogènesi de FOP encara no es coneixen. La sobreexpressió de la proteïna morfogenètica formadora d'os (BMP-4) en limfoblastoids immortalitzats (Shafritz *et al.*, 1996; Lanchoney *et al.*, 1998) i en cèl·lules de teixit fibroproliferatiu (Gannon *et al.*, 1997) es va associar amb la condició FOP. Els elevats nivells basals de BMP-4 en els FOP es deuen a un increment de la velocitat de transcripció (Olmsted *et al.*, 1996). Tot i així, l'expressió de BMP-4 no es troba per sobre dels valors normals en totes les línies d'individus amb FOP (Shafritz *et al.*, 1996; Viridi *et al.*, 1999) i no han estat identificades mutacions en el gen de BMP-4 en pacients amb FOP (Xu and Shore., 1998), indicant que el defecte molecular es troba en un altre lloc, potser en algun component del camí de transducció del senyal de BMP-4 que actua incrementant els nivells d'expressió del gen BMP-4 o que altera l'acció correcta d'algun dels seus inhibidors. La FOP és una malaltia genètica estranya. El predomini general de FOP és de 0.6 afectats per milió de nounats (Connor and Evans, 1982b; Delatycki and Rogers, 1998). L'organització IFOPA (Organització Internacional de la FOP) ha situat el predomini de FOP a Europa en 0.8 afectats de FOP per milió de nounats. Per incompatibilitat física, la descendència en individus FOP és baixa, i molts dels casos de FOP sembla que apareixen per mutacions espontànies (Kaplan *et al.*, 1993a). Estudis d'anàlisi de lligament per tot el genoma humà realitzat en quatre famílies amb individus afectats amb FOP van demostrar homogeneïtat del locus i lligament del gen FOP a un segment de 36-cM localitzat en el braç llarg del cromosoma 4 humà (Feldman *et al.*, 2000).

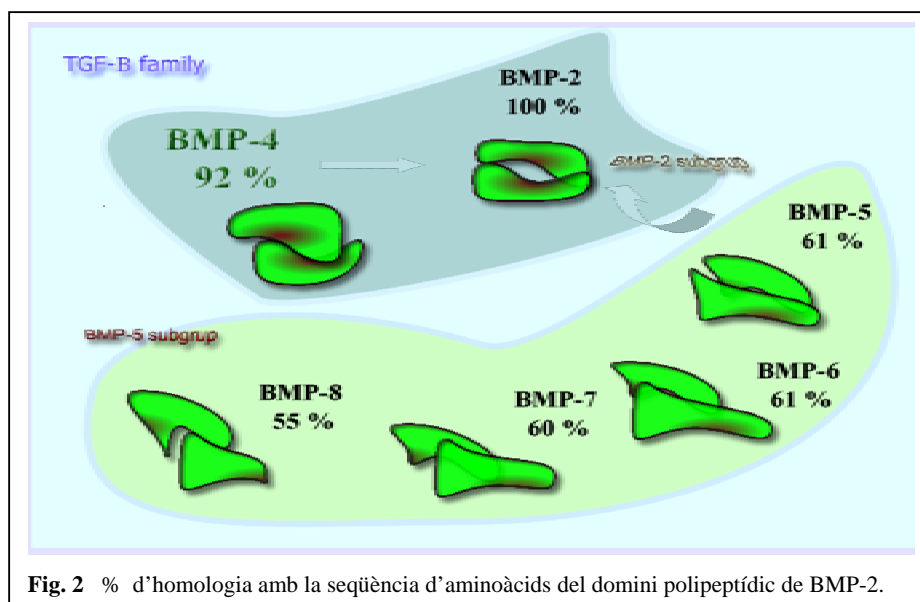
2.1. 3 El Morfogen BMP-4 és un membre de la superfamília de factors de creixement transformants beta (TGF- β). Introducció als camins de transducció de TGF- β

El factor de creixement transformant beta (TGF- β) és un potent inhibidor del creixement que actua en nombroses cèl·lules que inclouen cèl·lules epitelials, cèl·lules endotelials vasculars, cèl·lules hematopoiètiques i limfòcits (Roberts and Sporn, 1990; Miyazono *et al.*, 1994; Blobe *et al.*, 2000). Les pertorbacions i la pèrdua en el control de

la regulació del creixement són passos crucials en el procés d'oncogènesi. El TGF- β també és un potent inductor de teixit, el qual pot oferir un microambient favorable per al creixement de cèl·lules transformades. Han estat identificades en mamífers tres isoformes de TGF- β , i.e. TGF- β 1, TGF- β 2, i TGF- β 3, amb estructures i activitats biològiques "in vitro" similars (Roberts and Sporn, 1990). Moltes altres proteïnes també tenen estructures essencialment similars a TGF- β i estan referides de forma col·lectiva com la superfamília TGF- β . La superfamília TGF- β inclou més de trenta proteïnes en mamífers, per exemple activines, les proteïnes morfogenètiques formadores d'os (BMPs) i l'hormona anti-Mulleriana (AMH) (Kawabata and Miyazono, 2000). Els factors de diferenciació del creixement (GDFs) també pertanyen a la superfamília TGF- β . Alguns d'ells inclouen GDF-5, GDF-6, i GDF-7, són proteïnes "BMP-like", però altres només han estat parcialment caracteritzades i no s'han classificat. Els morfogens són pèptids secretats que difonen a partir de la seva font (així doncs establint gradients) i que actuen sobre receptors transmembrana per definir les característiques de les cèl·lules.

Nombrosos estudis donen suport que la funció de les BMPs és la d'actuar o funcionar com a morfogens en el desenvolupament dels animals. (Cooke, 1995; Neumann et al., 1997; Podos et al., 1999; Gurdon et al., 2001). Moltes de les BMPs actuen com a inductores de l'osteogènesi endocondral i de la cicatrització de fractures (Wozney et al., 1988; Kingsley, 1994; Hogan, 1996a, 1996b; Massague, 2000). Les BMPs són úniques en la seva habilitat d'induir "in vivo" tot el programa d'osteogènesi endocondral a llocs heterotòpics (Kaplan et al., 1993b; Kaplan et al., 1998; Gannon et al., 1998). Encara que tenen una funció predominant en l'esqueletogènesi, les funcions de les BMP també inclouen desenvolupament del somita, formació de les extremitats, determinació del llinatge de la cresta neural i desenvolupament de ronyons, dents, pulmons, cor, fetge, intestins, testicles, pell i esquelet (Kawabata et al., 2000; Massague, 2000).

Dels membres de la superfamília TGF- β , les BMPs són les més conservades a nivell filogenètic i són reguladores del desenvolupament animal amb una distribució ubíqua (Kawabata *et al.*, 2000). fig.2.



Entre les BMPs, la BMP-4 desencadena una funció vital i seminal en la inducció de tot el mesoder (*Kingsley, 1994*). Han estat descrites múltiples BMPs o proteïnes osteogèniques (OPs), incloent BMP-2, -3 (o osteogenina), -4, -5, -6, -7 (o OP1) i -8 (o OP2) (*Luo et al.*, 1995; *Macias et al.*, 1997; *Kawabata et al.*, 2000).

Les BMPs són conegudes: a) per la seva funció en el desenvolupament i diferenciació embrionari, b) per tenir modestes propietats mitogèniques en cèl·lules esquelètiques, c) per induir la diferenciació de cèl·lules mesequimàtiques a cèl·lules osteogèniques i d) per potenciar la funció diferenciada dels osteoblast (*Hogan, 1996*). Les BMPs augmenten la síntesi de col·làgen i inhibeixen l'expressió de col·lagenasa 3 en els osteoblasts (*Kawabata, 1998*), suggerint que les BMPs deuen exercir una funció en el manteniment de la massa òssia mitjançant una disminució en la degradació de col·làgen.

Les cèl·lules de llinatge osteoblàstic expressen BMP-2, -4, i -6, i la BMP-6 promou els efectes dels glucocorticoides sobre la diferenciació osteoblàstica (*Dijke et al.*, 2000; *Kawabata, 1998*). Aquest fet indica que les BMPs poden actuar com a reguladors locals

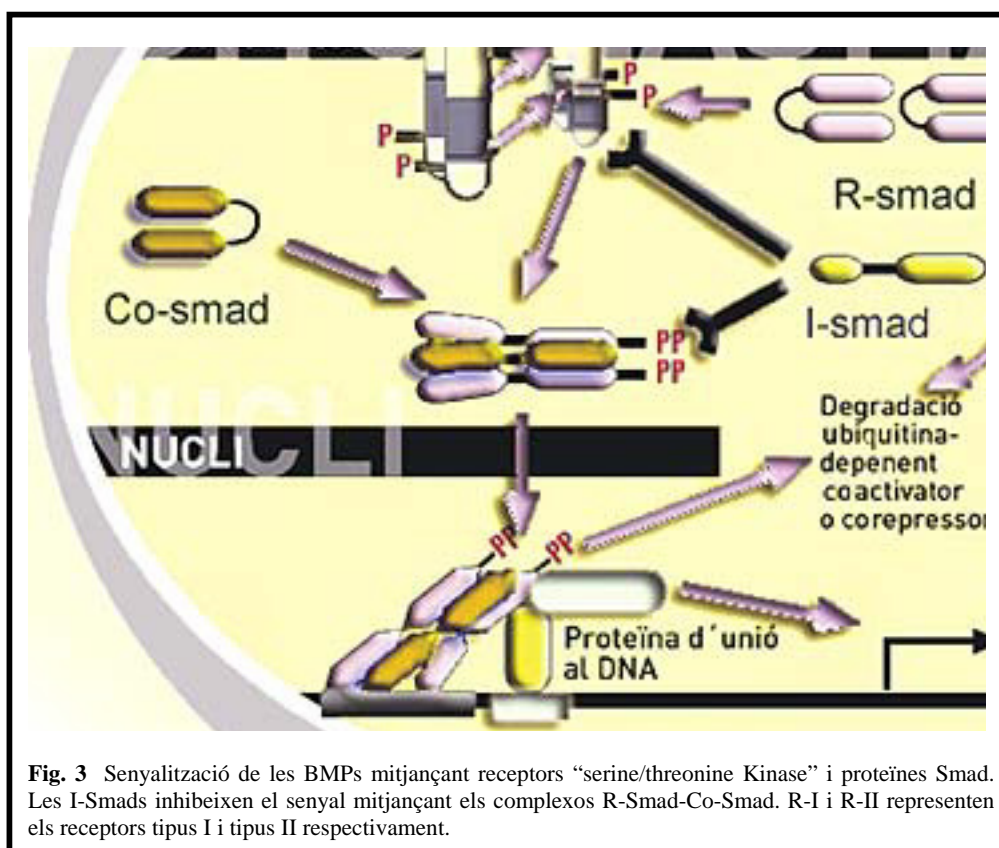
de la diferenciació i funció osteoblàstica. Els reguladors locals de les cèl·lules esquelètiques poden ser modulats a nivell de síntesi, d'unió a receptors i d'unió a proteïnes (Kingsley, 1994; Derynck, 1998; Miyazono et al., 2000). Malauradament, hi ha poca informació sobre la regulació de les BMPs a aquests nivells. Els receptors per les BMPs s'han caracteritzat i han estat publicades múltiples proteïnes d'unió específiques per BMP-2 i BMP-4 (Heldin et al., 1997; ten Dijke et al., 2000). S'ha demostrat que les BMPs controlen la proliferació i la diferenciació dels osteoblasts i que indueixen la formació ectòpica d'os "in vivo" quan són implantades dins del teixit muscular (Heldin et al., 1997; ten Dijke et al., 2000). No obstant, la base molecular de les funcions de les BMPs està encara per analitzar.

Les BMPs exerceixen els seus efectes biològics mitjançant complexos heteromèrics transmembrana de receptors Ser/Thr quinasa tipus I i tipus II que després propaguen el senyal a unes proteïnes intermediàries, les Smads (Kingsley, 1994; Derynck, 1998; Miyazono et al., 2000). Tot i la seva habilitat per unir-se als receptors tipus I i tipus II de forma separada, les BMPs necessiten les interaccions estèriques d'aquests receptors per aconseguir una unió i transducció de senyal òptima (Miyazono et al., 2000).

Les proteïnes intracel·lulars Smads tenen una funció crítica en transmetre els senyals extracel·lulars (cas de les BMPs) al nucli. Les Smads es subdivideixen en tres classes: les "Smad Receptor-Regulated Smads" (R-Smads), les "Common Smads Proteins" (Co-Smads), i les "Inhibitory Smads" (I-Smads), cada una té la seva funció característica. Les R-Smads (Smad 1, 5, i 8) són fosforil·lades pel receptor tipus I en el motiu SSXS ubicat en el terminal-carboxil. (Massague et al., 2000; Miyazono, 2000). Un cop fosforil·lades, les R-Smads es dissocien del receptor, s'uneixen a les Co-Smad (Smad4) i entren al nucli.

Dins del nucli, els complexos heteromèrics Smads funcionen com a efectors de la senyalització de les BMPs mitjançant la regulació de la transcripció de gens específics. Els Smads poden reconèixer específicament promotors diana mitjançant l'associació amb altres coactivadors o corepressors que s'uneixen al DNA. Els Smads, que són activats per les BMPs, depenen del teixit o tipus cel·lular.

Així doncs, els Smads s'uneixen amb cofactors o corepresors diferents de forma específica segons el tipus cel·lular (*Massague et al., 2000; Myiazono, 2000*) (Fig. 3).



Els gens Hox (*Francis et al., 1994*), els gens hedgehog (*Bitgood et al., 1995*), els gens pels factors de creixement de fibroblast (*Bitgood et al., 1995*) i els gens Ras/Raf/AP-1 poden potencialment participar en la senyalització de la BMP-4 (*Xu et al., 1996*). L'acció que realitzen les BMPs en el desenvolupament pot ser modulada "in vivo" per pèptids secretats com ara chordin, noggin, follistatin i gremlin (*Bitgood et al., 1995; Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996; Valenzuela et al., 1995*) els quals tenen una afinitat elevada per les BMPs i inhibeixen competitivament la unió de les BMPs amb els seus receptors transmenbrana (*Sasai et al., 1995*).

2.1.4 Antagonistes de BMP-4

La proteïna BMP-4 és un morfogen molt potent i es troba sobreexpressada únicament en limfòcits transformats i altres cèl·lules de lesions fibroproliferatives de pacients afectats amb FOP (*Shafritz et al., 1996; Lanchoney et al., 1998*). Tot i aquestes observacions, la regió del gen de BMP-4 que codifica per la proteïna no es troba mutada en els FOP (*Shore et al., 2000*). A més, el locus de BMP-4 ha estat exclòs de la condició mitjançant anàlisi de lligament (*Feldman et al., 2000*). Tot plegat suggereix que l'efecte primari de FOP no es localitza en el gen BMP-4 sinó que més aviat podria recaure en algun dels components del camí de senyalització de la BMP-4 o de camins interaccionants. Recentment s'han identificat un gran nombre de proteïnes secretades com a antagonistes de les funcions exercides per les BMPs. Aquests antagonistes comparteixen la propietat funcional d'unir-se específicament a les BMPs, evitant així la interacció amb els seus receptors (*Piccolo et al., 1996*) fig.4. Destacarem noggin i gremlin per l'importància d'aquests en la modulació de BMP-4 en línies cel·lulars d'individus FOP.

Noggin: noggin fou aïllat inicialment de *X. Laevis* en base a la seva habilitat per recuperar el desenvolupament dorsal en embrions ventralitzats mitjançant tractament amb UV (*Smith and Harland, 1992*). Noggin s'expressa durant les fases primerenques de la gastrulació en l'organitzador Spemann (teixit que desencadena una funció central en especificar les característiques cel·lulars dorsals tant en l'ectoderm (placa neural) com en el mesoderm (somita i notocord), on promou el desenvolupament de teixits dorsals, com són el teixit muscular i el teixit nerviós (*McMahon et al., 1998*).

El gen noggin, el qual codifica per una proteïna de 232 aminoàcids que és secretada en l'espai extracel·lular, fou mapejat en el braç llarg del cromosoma 17, regió 17q22 (*Valenzuela et al., 1995*). *Brunet et al., 1998* van utilitzar com a model un ratolí "knockout" per noggin, demostrant que l'expressió del gen noggin és essencial per un desenvolupament apropiat de l'esquelet. En aquests mutants homozigòtics pel gen noggin, les vèrtebres, les costelles i les extremitats es trobaven totes afectades. Noggin es

coneix per unir-se i antagonitzar BMP-2, -4, i -7, tenint molta afinitat per BMP-2 i -4 (Groppe *et al.*, 2002). Zimmerman *et al.*, 1996 van demostrar que noggin inhibeix l'activitat de BMP-4 de forma competitiva unint-se a BMP-4 i interferint conseqüentment amb l'habilitat de BMP-4 a interaccionar amb els seus receptors cel·lulars cognats.

Fins fa poc, l'estructura tridimensional dels antagonistes de BMP-4 i els mecanismes estructurals implicats en la seva funció inhibidora no eren coneguts. Groppe *et al.*, 2002 van publicar l'estructura cristal·lina de l'antagonista noggin unit a BMP-7, la qual mostra que noggin inhibeix la senyalització de les BMPs bloquejant les interfícies moleculars dels epitops d'unió als receptors tipus I i tipus II. La afinitat seti-específica de variants no funcionals de noggin per BMP-7 es correlaciona amb alteracions en la formació d'os i apoptosi en el desenvolupament de les extremitats dels pollets, el que demostra que noggin funciona segregant els seus lligands com a complex inactiu. Noggin conté una "cystine knot topology" similar a les BMPs; així doncs, lligands i antagonistes sembla que hagin evolucionat d'un gen ancestral comú.

Gremlin: Hsu *et al.*, 1998 van identificar gremlin en *Xenopus* després d'examinar molècules capaces d'induir un eix secundari en l'embrió *Xenopus*. Gremlin realitza una funció com a mediador durant el creixement de les extremitats en vertebrats, tant en ratolins (Zuniga *et al.*, 1999) com en aus (Merino *et al.*, 1999b), on es troba coexpressat amb BMP-2, -4, i -7 (factors coneguts per les seves funcions en el desenvolupament de les extremitats). L'habilitat de gremlin a unir-se i bloquejar l'activitat de BMP-2, -4, i -7 ha estat demostrada tant "in vivo" com "in vitro" (Hsu *et al.*, 1998; Merino *et al.*, 1999b).

Gremlin no tan sols participa en la embriogènesi primerenca, sinó que la seva expressió també es troba finament regulada en diversos teixits adults de rata, amb una expressió abundant en el cervell, la melsa, el ronyó i testicles i es troba particularment expressat en cèl·lules altament diferenciades, suggerint funcions i mecanismes funcionals específics en teixits adults (Topol *et al.*, 1997). Es va utilitzar la tècnica de mapeig amb radiació híbrida per localitzar el gen humà gremlin al cromosoma 15q13-q15, una regió que ha estat associada amb nombroses malalties humanes (Topol *et al.*, 2000b). El

cDNA humà de *gremlin* codifica per una proteïna de 184 aminoàcids que conté informació per un pèptid de secreció. L'inhibidor gremlin també és membre de la "cysteine knot superfamily". La proteïna s'ha conservat al llarg de l'evolució i es troba present tant en formes solubles com en formes associades a la cèl·lula. Actualment encara no es disposa d'informació sobre l'estructura tridimensional de gremlin.

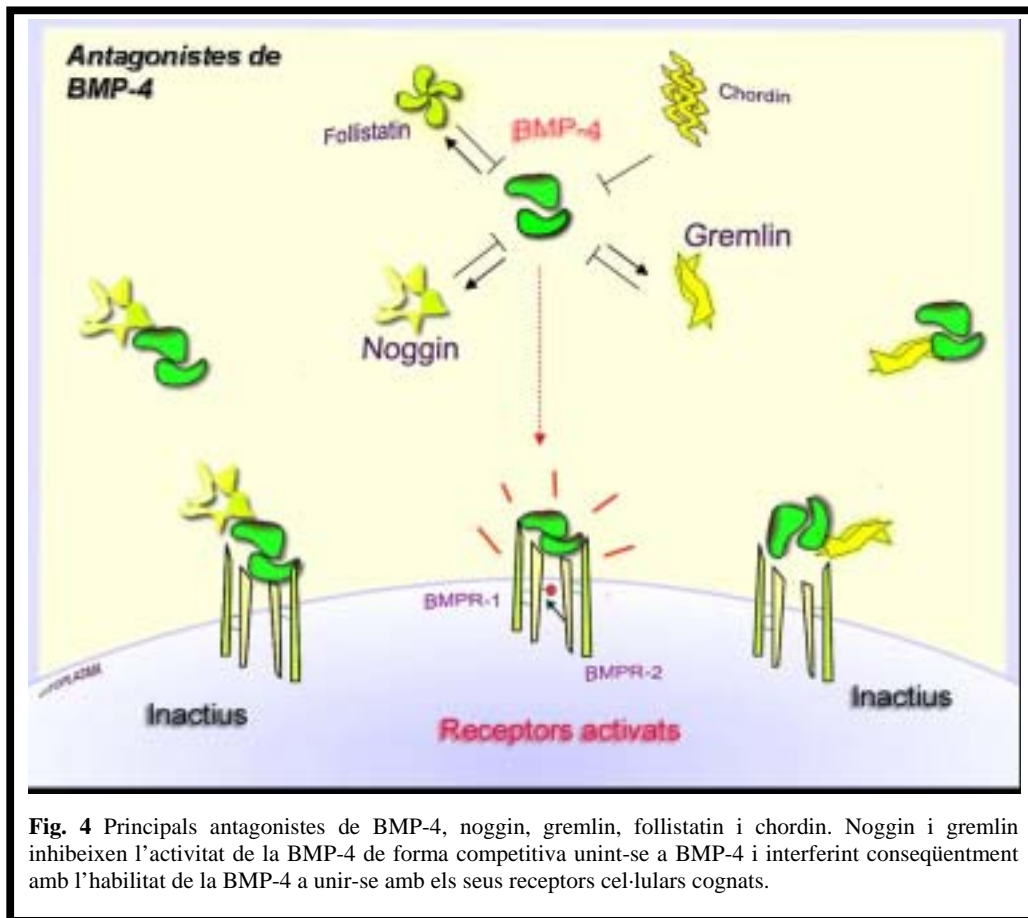


Fig. 4 Principals antagonistes de BMP-4, noggin, gremlin, follistatin i chordin. Noggin i gremlin inhibeixen l'activitat de la BMP-4 de forma competitiva unint-se a BMP-4 i interferint conseqüentment amb l'habilitat de la BMP-4 a unir-se amb els seus receptors cel·lulars cognats.

Perquè hi ha tants antagonistes de les BMPs? Una raó important podria residir en què aquests antagonistes tenen perfils d'expressió diferents, els quals "*in vivo*" regulen diverses respostes biològiques. Noggin i chordin són secretats per l'organitzador Spemann, indueixen teixit neural a partir de l'ectoderm i també dorsaltitzen el mesoderm ventral (Piccolo *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1996). L'inhibidor cerberus realitza una funció essencial en la formació d'estructures "head-like". La caronte, una proteïna

semblant a cerberus, realitza una funció crítica en l'establiment de l'asimetria "dreta-esquerra" durant el desenvolupament embrionari (Rodriguez Esteban *et al.*, 1999; Yokouchi *et al.*, 1999). El desenvolupament de les extremitats es troba sota el control de diferents antagonistes de les BMPs, que inclou els inhibidors noggin, chordin, follistatin i gremlin, els quals tenen funcions distintes en la morfogènesi de les extremitats (McMahon *et al.*, 1998; Capdevila *et al.*, 1999; Merino *et al.*, 1999).

Una altra raó important pot ser que aquests antagonistes tenen afinitats diferents per les diferents formes de BMP-4 (algunes d'elles anomenades factors de diferenciació/creixement o GDFs) així també com per altres factors. Tant noggin com chordin s'uneixen a les BMPs directa i específicament, bloquejant l'activitat de les BMPs. Noggin s'uneix a BMP-2, BMP-4 i GDF-6 amb molta afinitat però té poca afinitat per BMP-7 (Zimmerman *et al.*, 1996; Chang and Hemmati-Brivanlou, 1999). L'inhibidor follistatin va ser originalment identificat com un antagonista de les "activins", però també es va demostrar que s'uneix amb molta afinitat a les BMPs (Yamashita *et al.*, 1995; Iemura *et al.*, 1998). Caronte s'uneix a BMP-4, BMP-7 i a nodal, però no a "activin A" (Rodriguez Esteban *et al.*, 1999; Yokouchi *et al.*, 1999). Cerberus tot i no unir-se a TGF- β , pot unir-se a múltiples factors de creixement, que inclou les BMPs, les "nodal-like proteins" i "Wnt", una proteïna no lligada a la superfamília TGF- β (Hsu *et al.*, 1998; Piccolo *et al.*, 1999). De forma interessant, la unió de cerberus a aquests factors de creixement es dona en setis d'unió diferents localitzats dins la molècula Cerberus- (Piccolo *et al.*, 1999). Com a contrast, algun dels antagonistes de les BMPs, poden interaccionar amb dominis de les BMPs similars, donant-se aquest mecanisme d'acció en el cas de noggin que competeix amb cerberus, gremlin i DAN per la unió a BMP-2 (Hsu *et al.*, 1998).

Una tercera raó podria ser que aquests antagonistes es difonen en els teixits a velocitats diferents. Per exemple, chordin amb un tamany de ~120 kDa és el més voluminós de tots els antagonistes. Aquest tamany fa que es difongui pels teixits amb menys eficiència (Piccolo *et al.*, 1996). La creació de gradients de morfogens, com ara els de BMP-4, són molt importants per a la formació d'estructures en el desenvolupament

embrionari (*Shimizu and Gurdon, 1999*): les BMPs i les activines segons les seves concentracions, activen gens diana de forma diferencial. Un gradient d'activitat de BMP-4 es produeix per la interacció entre la BMP-4 i els seus antagonistes noggin o chordin (*Holley et al., 1996*). Les altes concentracions de BMP-4 indueixen la formació de la sang en els embrions de *Xenopus*, mentre que una pèrdua completa de l'activitat de les BMPs, provocada per chordin resulta en neurogènesi. Igual d'important, les concentracions baixes de BMP-4, parcialment antagonitzades per chordin, condueixen a la formació de múscul. Aquests antagonistes de les BMPs també poden exercir els seus efectes mitjançant mecanismes de retroalimentació negativa; l'expressió de noggin és induïda per BMP-2, BMP-4 i BMP-6 en cèl·lules osteoprogenitores i noggin al mateix temps bloqueja la bioactivitat de les BMPs (*Gazzerò et al., 1998*). Cal comentar que TGF- β 1 indueix, de forma transitòria, l'expressió de noggin (*Gazzerò et al., 1998*), i això indica que els camins de transducció de les BMPs es troben "cross-regulated" per TGF- β 1 mitjançant noggin.

2.2 Objectius dels treballs 1 i 2

L'estudi de l'alteració dels mecanismes moleculars implicats en el desencadenament de l'osteogènesi i l'esqueletogènesi heterotòpica que es dona en nombroses malalties humanes serà el principal objectiu d'aquest treball. Concretament, aquest treball de Tesi Doctoral s'ha centrat en dos rars trastorns humans caracteritzats per una severa formació ectòpica d'os de naturalesa distinta: la fibrodisplàsia ossificadora progressiva (FOP), de causa genètica desconeguda i amb formació d'os d'origen endocondral i l'heteroplàsia òssia progressiva amb mutació al gen *GNAS1* i formació ectòpica d'os intramembranosa.

En la malaltia de FOP (treballs 1 i 2) l'objectiu serà l'estudi de l'expressió gènica, tant en condicions normals com induïdes, de proteïnes que intervenen en el desenvolupament osteogènic. Aquest estudi utilitzarà, com a model cel·lular, limfòcits transformats d'individus sans o afectats amb FOP. En particular s'analitzarà :

1. Els nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 i antagonistes de BMP-4 (noggin, gremlin, follastitin i chordin).
2. L'expressió dels antagonistes de BMP-4 (noggin, gremlin, follastitin i chordin) sota la inducció amb rhBMP-4.
3. En un model de creixement cel·lular sincronitzat: a) Nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 i antagonistes de BMP-4 (noggin i gremlin), b) Variabilitat d'expressió de BMP-4 en el dia de màxima expressió i c) Expressió dels antagonistes de BMP-4 (noggin i gremlin) sota la inducció amb rhBMP-4.

2.3 Treball 1:

“ Anàlisi, en LCLs humanes, de l’expressió endògena de BMP-4 i els seus antagonistes noggin , gremlin, chordin i follistatin i anàlisi de l’expressió dels antagonistes de BMP-4 en LCLs induïdes amb hrBMP-4 exògena “

Resum

La formació de l’esquelet requereix senyals inductius que es troben equilibrats de forma meticulosa amb senyals d’antagonistes en un sistema de retroalimentació negativa estretament regulat. En aquest estudi s’han utilitzat tècniques d’anàlisis d’expressió gènica i mètodes de quantificació amb fluorescència per avaluar la diferència d’expressió de BMP-4 i antagonistes de BMP-4 (noggin, gremlin, follistatin i chordin) en LCLs FOP respecte LCLs control. Addicionalment s’ha analitzat la diferència d’expressió dels antagonistes de BMP-4 (noggin, gremlin, follistatin i chordin) entre les LCLs induïdes amb la proteïna hrBMP-4 i les LCLs no tractades. Els resultats demostren que pel que fa als nivells observats en cèl·lules control, l’expressió de BMP-4 es troba elevada en les LCLs FOP. També demostren que les cèl·lules FOP tenen una resposta atenuada dels antagonistes noggin i gremlin relativa a la elevada expressió de BMP-4. A més, sota estimulació amb la proteïna rhBMP-4, les LCLs control exhibeixen un marcat increment en l’expressió de noggin i gremlin, mentre que en cèl·lules FOP responen a BMP-4 recombinant de forma dramàticament atenuada. El fracàs d’activar apropiadament l’expressió de noggin i gremlin en resposta a BMP-4 observat en les LCLs d’individus FOP suggereix que els nivells d’expressió dels antagonistes es troben inadequadament baixos respecte als alts nivells observats en l’expressió de BMP-4. Aquests resultats revelen una possible alteració del mecanisme de retroalimentació negativa pel qual l’expressió de BMP-4 podria ser notablement elevada i sostinguda en individus FOP.

Materials i mètodes

Individus humans

Els pacients amb FOP, les cèl·lules dels quals es van utilitzar en aquests estudi, han estat descrits prèviament (*Shafritz et al., 1996*). Els participants es van avaluar clínicament per confirmar el seu estat FOP abans de començar els estudis moleculars. Es va obtenir un consentiment oficial i mostres de sang de cada un dels pacient seguint els protocols estàndard de les revisions dels protocols institucionals del “Children Hospital of Philadelphia”, Universitat de Pennsylvania. Es van transformar limfòcits perifèrics amb el virus Epstein-Barr (EBV) (*Shafritz et al., 1996*).

Línies cel·lulars

Les cèl·lules (LCLs) transformades amb el virus Epstein-Barr es varen fer créixer amb medi de cultiu “Roswell Park Memorial Institute 1640” (RPMI-1640; Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD) suplementat amb “fetal bovine serum” (15%), penicilina G (100 u/ml), streptomicina (100 µg/ml) i amphotericina B (250 ng/ml) i mantingudes a 37°C amb 5% CO₂. Cinc línies cel·lulars derivaven d’una família que incloïa la mare no afectada, el pare afectat i tres fills afectats. Dues línies cel·lulars derivaven d’una segona família que incloïa un pare no afectat i un fill afectat.

Disseny de “primers” humans (Homo sapiens sapiens), específics per BMP-4, noggin, gremlin, chordin i GAPDH

Els “primers” s’han dissenyat a partir de les seqüències dels seus corresponents cDNAs complementaris que es troben disponibles a la web de NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilitzant el programa informàtic MacVectorTM 7.0.

Transcript	“Forward”	“Reverse”
BMP-4	5'- tca cta atg ggt gac tcc gtcc -3'	5'-tga act ggt tct cag ggt tgg c-3'
Noggin	5'-cag tga tga gtc gga aga aggg -3'	5'-tga act ggt tct cag ggt tgg c-3'
gremlin	5'-gca gaa gga caa gca ggtc tacc -3'	5'-tca ggt ggg aag tcaa agt cgg g -3'
Chordin	5'-gca gaa gga caa gca ggtc tacc -3'	5'-tca ggt ggg aag tcaa agt cgg g -3'
GAPDH	5'-gca gaa gga caa gca ggtc tacc -3'	5'-tca ggt ggg aag tcaa agt cgg g -3'

Taula 1: Seqüències 5' a 3' específiques dels gens humans BMP-4, noggin, gremlin, chordin i GAPDH

<u>Homo sapiens sapiens</u>	Producte de PCR esperat	Número GI		T _m obtinguda amb Mac vector 7.0		% G+C	
		Forward	Reverse	Forward	Reverse	Forward	Reverse
BMP-4	500 bp	6754015	6754015	62°C	68°C	55	50
Noggin	740 bp	4262550	4262550	68°C	66°C	55.2	56.9
gremlin	345 bp	6754013	6754013	72°C	72°C	56.5	56.5
Chordin	535 bp	7229395	7229395	72°C	72°C	56.5	56.5
GAPDH	~495 bp	7229395	7229395	72°C	72°C	56.5	56.5

Taula 2: Producte de PCR esperat, número Gi (NCBI), temperatura d'hibridació i % G+C pels gens humans de BMP-4, noggin, gremlin, chordin i GAPDH.

Aïllament d'RNA amb TRIzol® Reagent

Les cèl·lules es van sedimentar mitjançant centrifugació i el sobrenedant es va descartar. Tot seguit 1 mL del reactiu TRIzol es va afegir al sediment i immediatament després es va resuspendre pipetejant per així lisar les cèl·lules. El lisat cel·lular es va incubar cinc minuts a 15-30°C per permetre un dissociació complerta dels complexos nucleoproteics, després s'hi va afegir 0.2 mL de chloroform/mL de reactiu TRIzol inicialment usat, els tubs es van tancar i sacsejar vigorosament durant quinze minuts i es varen incubar a T^a ambiental durant tres minuts. Tot seguit les mostres es van centrifugar a 12,000 x g durant quinze minuts a 2-8°C. La fase aquosa resultant (on queda l'RNA) es va precipitar afegint 0.5 mL d'Isopropyl alcohol per 1 mL de reactiu TRIzol usat inicialment, les mostres es van barrejar per inversió repetida i es va deixar incubar les mostres a 15-30°C durant deu minuts. Després les mostres es van centrifugar durant deu minuts a 12,000 x g a 4°C. El sobrenedant es va decantar i s'hi va afegir 1 mL de 75% ethanol per mL de TRIzol usat inicialment per a rentar el sediment. El sobrenedant es va decantar amb cura i el sediment d'RNA es va deixar assecar breument per eliminar els residus d'etanol. Per acabar, el sediment d' RNA fou dissolt amb 40ul d'aigua lliure d'RNases (de 20ul a 100ul dependent del nombre de cèl·lules) i incubades a 55-60°C durant deu minuts per a facilitar la seva dissolució.

Quantificació d'RNA total

L'RNA es mesura directament en solucions aquoses de forma diluïda o no diluïda. Els tampons aquosos amb baixa concentració iònica. (e.g. tampó TE) són ideals per aquest mètode. La concentració es determina al mesurar a 260 nm contra el blanc i després avaluant via factors de conversió. La absorbància d'una unitat O.D equival aproximadament a 40 µg/ml d'RNA (40ng/ul).

Mètode

Les al·liqüotes de 2 ul d'RNA total obtingudes a partir d'una LCL es van diluir en 68ul d'aigua DEPCc (aigua tractada amb un inhibidor de ribonucleases) i la concentració es va mesurar per espectrometria (concentració es dona: C x factor de dilució = ng/ul)

La quantitat d'RNA recuperat es va calcular de la següent manera:

	260nm	280nm	A260/A280	[] ng/ul	Factor dilució	[] final ug/ul
Mostra	1.558	0.809	1,932	62	X 35	2,170

Dilució de les solucions stock

Es van diluir les mostres en relació a la seva concentració per obtenir així 5ug d'RNA total (per la síntesi de cDNA)

	[ug/ul]Final	Dilució (S+H ₂ O)	[ug/ul]	RNA (ul) + dH ₂ O + 1ul oligo dT
Mostra	2,170	10 ul + 10 ul (1/1)	1,085	4.6 6.4 1

Mètode usat en la reacció de retro- transcripció (RT)

Per la síntesi de la primera cadena de cDNA es va utilitzar la SUPERSRIPT II (Life Technologies Inc). Per la reacció de RT: es va usar un volum de 20ul de solució per 5µg d'RNA total. La síntesi de cDNA es realitza en dos etapes: RT1 i RT2.

RT1

En aquest cas es van utilitzar “primers” Oligo(dT)12-18 per capturar tot l’RNAm. Els components de la reacció es varen afegir en un tub de micro-centrifugació, lliure de nucleases:

1 µl d’oligo (dT)12-18 (500 µg/m) + 5 µg d’RNA total (mostres) + aigua destil·lada fins a 12µl

La barreja s’escalfà fins a 70°C durant deu minuts i tot seguit es posà en gel (4°C) i s’afegiren 8ul de la “Master Mix” per començar la RT2.

RT2

Els components de la reacció foren afegits en un tub de microcentrifugació, lliure de nucleases:

Master Mix
4 µl 5X First Strand Buffer + 1 µl 10 mM dNTP Mix
2 µl 0.1 M DTT + 1 ul Superscript

Per a realitzar la reacció, la temperatura inicial de l’instrument es situa a 42°C. Un cop hem introduït la solució “Master Mix” als tubs, s’incuba durant cinquanta minuts a 42°C, la reacció s’inactiva a 70°C durant quinze minuts (programa) i després es transfereixen els tubs al gel, en aquest punt els cDNAs es poden guardar a -20°C o usar per la PCR.

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

Els nivells dels mRNAs d’expressió basal foren analitzats mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) usant “primers” específics pels gens de BMP-4, noggin, gremlin, chordin, follistatin i GAPDH. La reacció de la PCR es va dur a terme amb l’ús de: 0.01u/µl de Taq DNA polimerasa (Life Technologies Inc.), 0.08µl de producte de RT /µl, 0.2mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP, 1.5mM de MgCl₂, 0.5µM de cada un dels

“primers” “forward” i “reverse” específics de BMP4, noggin, gremlin, chordin, follistatin i GAPDH.

Mètode

Preparació de la PCR “Master Mix” (per tots els gens): per tenir un volum suficient per totes les mostres, sempre incloïem a la “Master Mix” un o dos volums extra. Aquest mètode s’usava pel que fa a un sol gen en concret.

	ul
Volum de MMx per mostra :	
10X PCR “buffer”	1
50 mM Mg ⁺⁺	0.3
10mM dNTPs	0.2
10mM “primer” (forward)	0.4
10mM “primer” (reverse)	0.4
dH ₂ O	6.8
5 U/ul taq	0.1

Al cDNA de cada mostra s’afegia separatament: 8ul de MMx + 2ul de cDNA. Es van analitzar els nivells d’expressió de BMP-4, noggin, gremlin, chordin, follistatin i GAPDH en 7 línies humanes, realitzant 3 experiments per cada una de les mostres.

Electroforesi amb gel d’agarosa

Els productes de PCR es van analitzar carregant les mostres en gels d’agarosa al 1.2%. Tot i que s’aconsella que per productes de PCR de 300 a 800 parells de bases, les mostres s’haurien de carregar en gels del 2%-2.5% nosaltres vàrem utilitzar gels 1.2% ja que a elevades concentracions d’agarosa el DNA no quedava correctament tenyit. Un gel de tamany gran al 1.2% s’obté barrejant 1.5 g d’agarosa en 125ml de tampó 1 x TAE. L’agarosa es dissol en el tampó TAE escalfant-la amb el microones, sempre tenint en compte de no arribar a l’ebullició per evitar variacions en la concentració del gel. Les mostres es preparen de la següent manera: 10ul mostra + 2 ul de “loading buffer”

(Promega, “blue/ orange 6x loading dye”). Com a marcador molecular s’afegia 4ul of 100bp de DNA ladder (“molecular marker”, Stratagene, la Jolla, CA).

Tinció amb vista green, detecció i quantificació dels productes de PCR

Els productes de la reacció foren analitzats per electroforesi amb gel d’agarosa al 1.5% i tenyits amb vista green (Amersham, Arlington Heights, IL), detectats amb Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) i quantificats amb imageQuant (Molecular Dynamics). Les senyals de llum quantificades amb ImageQuant es van processar amb el programa Microsoft Excel i els resultats es van expressar de la següent forma:

BMP-4 (Dia)	BMP-4 (Volum)	BMP-4 (Mitjana de 3 exp)	GAPDH (Dia)	GAPDH (volum)	GAPDH (Mitjana de 3 exp)	Valors mitjans normalitzats respecte GAPDH	*Dv St
* Desviació estàndard							

Per a cada gen (BMP4, noggin, gremlin, follistatin, chordin), l’expressió en LCLs d’individus FOP es compara amb l’expressió obtinguda en LCLs control (arbitràriament ajustats al valor d’1). L’anàlisi estadística es basa en els resultats obtinguts en tres experiment separats.

Optimització per RT-PCR dels “primers” dissenyats per als gens de BMP4, noggin, chordin, follistatin, gremlin i GAPDH BMP-4 en LCLs humanes tant en individus FOP com en individus no afectats.

A continuació es presenten les condicions d’optimització per la RT-PCR en LCLs humanes dels “primers” dissenyats per als gens de BMP4, noggin, chordin, follistatin, gremlin i GAPDH. Abans d’aquests resultats, les variables temperatura d’hibridació i concentració de Mg²⁺, per cada parell de “primers” (resultats no presentats), varen ser optimitzades. Es varen obtenir mitjançant corbes de saturació els nivells d’expressió basal de tots els gens. Les corbes de saturació consistien en un mostratge seqüencial de reaccions de PCR cada 5 cicles en un rang de almenys 15 cicles depenent del tipus de gen analitzat, obtenint-se així el nombre de cicles òptim i romandre en els valors lineals d’amplificació necessaris per a una vàlida quantificació. Per a l’anàlisi d’expressió

gènica, el número de cicles usats pels diferents gens fou la següent: GAPDH (gliceraldehid-6-fosfat deshidrogenasa, 15 cicles), BMP-4 (30 cicles), noggin (30 cicles), gremlin (30 cicles), follistatin (35 cicles), chordin (35 cicles). La desnaturalització del motlle es va realitzar a 94°C durant 30s seguit d'hibridació a 55°C durant 30s (exceptuant noggin) i finalment extensió dels "primers" a 72°C durant 30s. El gen noggin fou amplificat usant les condicions prèviament descrites (*Kersent et al., 1999*).

GADPH: "Primers" ES 633/634; Producte de PCR: ~ < 500bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 55°C 30'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 10-15-20-25 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 15 cicles.

BMP4: "Primers" ES 649/110; Producte de PCR: ~ 500bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 55°C 60'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 20-25-30-35 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 30 cicles.

Noggin: "Primers" ES 655/656; Producte de PCR: ~ 716bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 65°C 60'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 20-25-30-35 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 30 cicles.

Gremlin: "Primers" ES 659/660; Producte de PCR: ~ 355bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 55°C 60'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 30 cicles.

Chordin: "Primers" ES 661/662; Producte de PCR: ~ 450bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 65°C 60'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 35 cicles.

Follistatin: "Primers" ES 650/651; Producte de PCR: ~ 375bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 65°C 60'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40 cicles. Amplificació òptima esperada a: 30 cicles.

Línies cel·lulars, tractaments amb proteïna BMP-4 recombinant humana (rhBMP-4) i anàlisi per RT-PCR de les mostres

Una línia cel·lular derivava d'un individu afectat amb FOP. Una altre línia addicional provenia d'un individu no afectat. Dues línies cel·lulars derivaven d'una segona família que incloïa un pare no afectat i un fill afectat. Les cèl·lules es van dividir 1:2 i es van cultivar durant 24h abans d'administrar-les-hi els tractaments. Aproximadament $1-2 \times 10^6$ cèl·lules es van dipositar en medi fresc que contenia BMP-4 recombinant pur (rhBMP4, Genetics Institute, Cambridge, MA) amb les següents concentracions: 0 ng/ml, 2.76 ng/ml i 13.8

ng/ml, i sis hores més tard recollides per l'anàlisi d'expressió gènica usant el mètode descrit anteriorment.

Anàlisi per Northern blot de noggin, gremlin, follistatin i chordin en LCLs humanes induïdes o no induïdes amb hrBMP-4

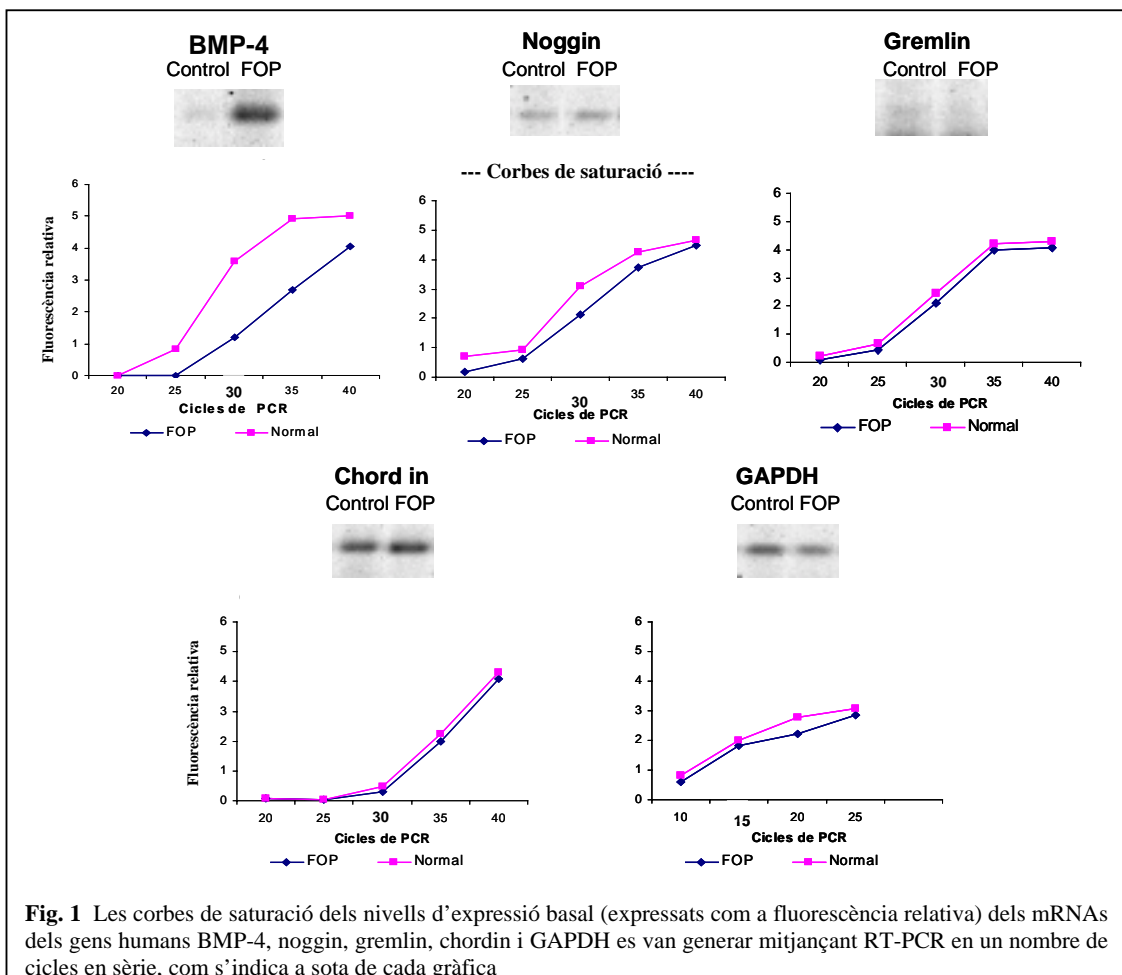
L'RNA cel·lular total fou aïllat com s'ha descrit prèviament. L'RNA obtingut es va quantificar i es van carregar 10 µg d'RNA de mostres control i mostres FOP en gels de formaldeid-agarosa. El gel es va tenyir amb bromur d'etidi per visualitzar els marcadors d'RNA i els RNA ribosòmics, i així confirmar una càrrega equiparable de les diverses mostres experimentals. L'RNA es va transferir en una membrana "GeneScreen nylon" carregada positivament (DuPont, Wilmington, DE) i la uniformitat en la transferència es va confirmar mitjançant la revisualització amb bromur d'etidi del RNA ribosòmic. El cDNA de noggin humà d'1.0 kb de tamany amb dianes de restricció Bam HI/Not I (un regal de Regeneron), el cDNA de chordin humà de 3.8 kb amb dianes Hind III/Xba (cordialitat de E.M. De Robertis, University of California, Los Angeles, CA), el cDNA de gremlin humà de 240 bp amb Hind III/Eco RI, i el cDNA de follistatin de 285 bp amb Pst I/EcoRI (regals generosos de l'institut genètic, Universitat de Pennsylvania) es van purificar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa i es van marcar radioactivament amb [α - 32 P] trifosfat de desoxi-cisteïna i [α - 32 P] de desoxi-adenina (50mCi cada un, obtenint una activitat específica de 3,000 Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, MA) usant el "kit" de "random-priming, Prime it" (Stratagene la Jolla, CA).

Les hibridacions es van dur a terme a 42°C durant 16–72h, seguides de dos rentats a temperatura ambient durant quinze minuts en 1 X sal de citrat de sodi (SSC) i un tercer rentat es va realitzar a 65°C durant trenta minuts amb 0.5 X SSC per noggin, 1 X SSC per chordin i gremlin, i 0.2X SSC per follistatin. El material radioactiu unit fou visualitzat mitjançant autoradiografia amb un film Kodak model X-AR5 (Eastman Kodak, Rochester, NY), usant les pantalles intensificadores de llum Cronex Plus (DuPont) o Biomax MS (Eastman Kodak). Les hibridacions relatives es van determinar per densitometria. Les anàlisis presentades són representatives de tres incubacions.

Resultats

Optimització per RT-PCR dels “primers” dissenyats per als gens de BMP-4, noggin, chordin, gremlin i GAPDH en LCLs humanes tant en individus FOP com en individus no afectats.

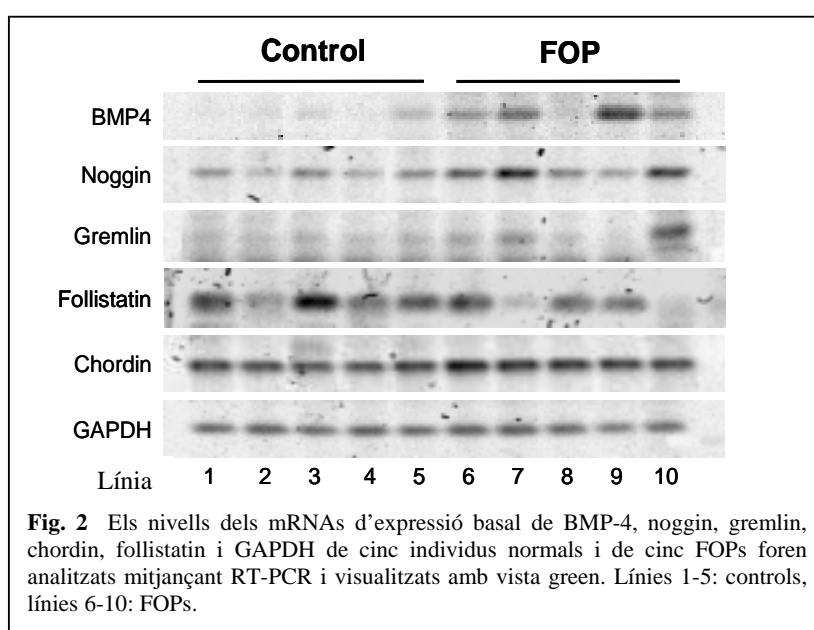
Per a realitzar l’anàlisi d’expressió gènica dels gens de BMP-4, noggin, chordin, gremlin i GAPDH en cèl·lules transformades, prèviament es van haver de trobar les condicions d’amplificació linial òptimes pel que fa als gens (en FOPs i controls) expressats en aquestes cèl·lules. Les corbes de saturació s’expressen com a fluorescència relativa.



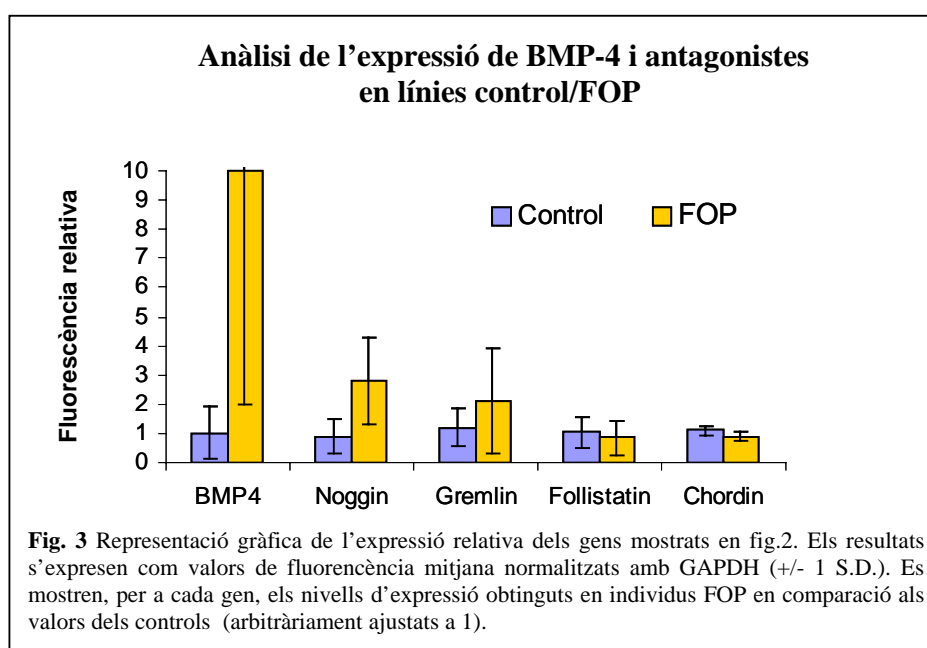
A la fig.1 hi ha representades les condicions per l'obtenció d'una amplificació lineal òptima dels gens de BMP-4, noggin, gremlin, chordin, i GAPDH. BMP-4, noggin i gremlin són linealment amplificats a 30 cicles. Chordin es troba menys expressat en LCLs humanes obtenint el seu òptim a 35 cicles, finalment GAPDH s'amplifica linealment a 15 cicles. L'anàlisi per RT-PCR dels nivells d'mRNA l'expressió basal d'aquests gens en dues línies limfoblastoids humanes, derivades d'un pacient amb FOP i de la seva mare no afectada, va revelar nivells alts d'expressió de BMP-4 en LCLs d'individus FOP, mentre que els nivells de noggin, gremlin i chordin, tres antagonistes de BMP-4, eren semblants en ambdues línies cel·lulars. Per a follistatin va donar resultats similars als observats per noggin, gremlin i chordin (resultats no presentats).

Anàlisi per RT-PCR dels nivells d'expressió basal dels mRNAs de BMP-4, noggin, chordin, follistatin, gremlin i GAPDH

A continuació es mostren els resultats d'expressió gènica obtinguts per BMP-4, noggin, chordin, follistatin i gremlin, realitzats en 5 LCLs provinents d'individus sans i en 5 LCLs d'indivus FOP. Els resultats s'expressen com a valors de fluorescència mitjana normalitzats amb GAPDH (+/- S.D.). Cada mostra s'ha obtingut com s'ha descrit a materials i mètodes. Els productes de PCR foren analitzats mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa i quantificats amb ImageQuant.



Al gel de la fig.2, s'hi mostren els senyals de llum dels productes de PCR corresponents a BMP-4, noggin, chordin, follistatin, gremlin i GAPDH provinents de cinc LCLs d'individus normals (Fig.2, a l'esquerra) i de cinc LCLs d'individus amb FOP (Fig.2, a la dreta). Aquests resultats es van analitzar tal com s'ha descrit en materials i mètodes i es representen gràficament com es mostra a la fig.3.



L'anàlisi de BMP-4 en un total de cinc LCLs d'individus FOP va donar nivells d'expressió mitjans notablement elevats respecte als nivells observats en cinc LCLs control, mentre que els nivells dels mRNAs de follistatin i chordin van resultar ser indistingibles entre les LCLs controls i les LCLs FOP. Sorprenentment, els nivells d'expressió de noggin i gremlin es trobaven lleugerament elevats en cèl·lules FOP (fig. 3).

En línies FOP, com s'observa a la fig.3, existeix una enorme variabilitat del nivells dels mRNAs de BMP-4, amb desviacions estàndard molt grans. Aquesta variabilitat també s'observa en els nivells d'expressió basal de noggin i gremlin (fig.3). L'origen

d'aquesta variabilitat en línies FOP no es coneix. La immortalització dels limfòcits amb el virus Epstein-Barr (EBV) pot induir a la transcripció de gens que normalment no es troben expressats en limfòcits "in vivo" (Liebowitz *et al.*, 1993). Així doncs, la variabilitat en l'expressió de BMP-4 observada en les LCLs de pacient amb FOP podria ser el resultat de la transformació amb el virus Epstein-Barr (Shafritz *et al.*, 1996). Tot i així, BMP-4 no experimenta aquesta variabilitat en línies control, indicant que la transformació amb EBV no en deu ser la causa. Una altra possibilitat podria residir en que cada cèl·lula, sigui FOP o control, expressa BMP-4 de forma específica segons el seu contingut genètic (Connor *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1993). Aquest fet s'observa en línies control tractades amb les mateixes condicions de cultiu potser perquè les cèl·lules escollides per a la realització dels experiments contenen, més o menys, una dotació genètica semblant. Una altra possibilitat podria recaure en una aberrant sincronització del creixement cel·lular de les línies FOP, on l'expressió de BMP-4 no seria homogènia en totes les línies i la seva expressió podria ser més intensa depenent de la densitat cel·lular ja que el morfogen BMP-4 actua amb dependència en la formació de gradients (Bostrom *et al.*, 1995).

Com més gran sigui el nombre de cèl·lules expressant BMP-4 més probable és que incrementi el nombre de gradients de BMP-4 capaços de desencadenar el camí de senyalització de la BMP-4. Finalment la variació que s'ha observat podria ser el resultat de la metodologia de PCR emprada ja que aquesta tècnica no es infal·lible.

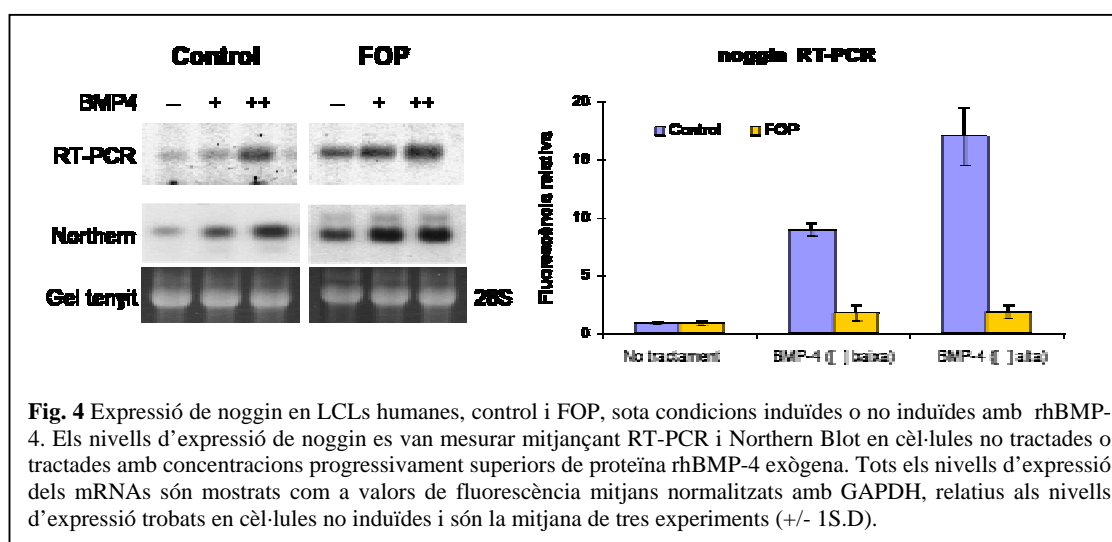
Anàlisi per Northern blot i RT-PCR de noggin, gremlin, follistatin i chordin en LCLs humanes induïdes o no induïdes amb hrBMP-4

Tenint en compte que noggin, gremlin, chordin i follistatin poden formar circuits de retroalimentació negativa amb el morfogen BMP-4, es va suggerir en base a previs resultats obtinguts, que els nivells d'RNA missatger de noggin, gremlin, follistatin i chordin podrien trobar-se inapropiadament reduïts en LCLs FOP relatius al notable augment de BMP-4 en aquestes línies. Per comprovar aquesta possibilitat i simular millor el microambient en el que les cèl·lules afectades experimenten un augment temporal i limitat en l'activitat de BMP-4, vàrem tractar ambdues cèl·lules, controls i FOPs, amb la

proteïna BMP-4 recombinant humana i seguidament es van mesurar els nivells dels antagonistes noggin, gremlin, follistatin i chordin per RT-PCR i Northern Blot anàlisi.

Expressió de noggin en LCLs humanes estimulades amb proteïna rhBMP-4

Es van tractar una línia cel·lular control, derivada d'un individu no afectat, i una línia FOP, derivada d'un individu afectat, amb rhBMP-4 durant 6h i posteriorment es van mesurar els nivells d'expressió de noggin mitjançant RT-PCR i Northern blot tal com s'ha descrit en materials i mètodes .

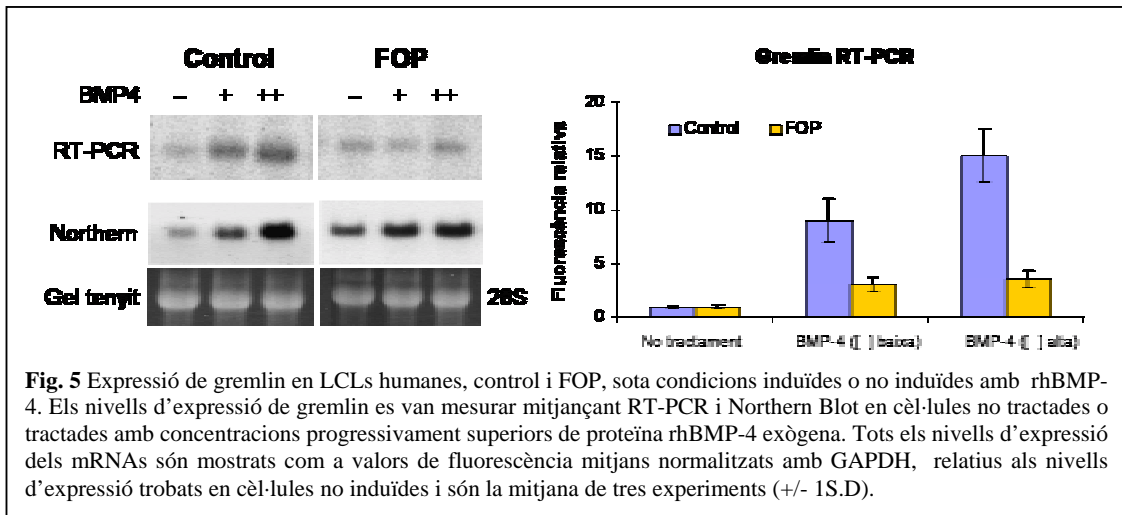


A la fig.4 s'observen els nivells d'expressió gènica de noggin en LCLs humanes tractades o no tractades amb rhBMP-4. Els nivells d'expressió són mostrats com valors de fluorescència mitjans, normalitzats amb GAPDH, relatius als nivells d'expressió trobats en cèl·lules no induïdes i són la mitjana de tres experiments (+/- 1S.D).

Tal i com es mostra a la fig.4, l'expressió de noggin en cèl·lules FOP augmenta dràsticament en resposta a l'estimulació amb hrBMP-4 mentre que la seva expressió en LCLs control augmenta lleugerament .

Expressió de gremlin en LCLs humanes estimulades amb proteïna rhBMP-4

Es van tractar una línia cel·lular control i una línia FOP amb hrBMP-4 durant sis hores i posteriorment es van mesurar els nivells d'expressió de gremlin com s'ha descrit en materials i mètodes .



Com es mostra a la fig.5, l'expressió de gremlin en cèl·lules FOP augmenta notablement en resposta a BMP-4 recombinant mentre que la seva expressió en LCLs control, al igual que noggin, augmenta lleugerament.

Expressió de follistatin en LCLs humanes estimulades amb proteïna rhBMP-4

Es van mesurar els nivells d'expressió de follistatin usant les mateixes línies cel·lulars i el mateix mètode que el descrit per noggin.

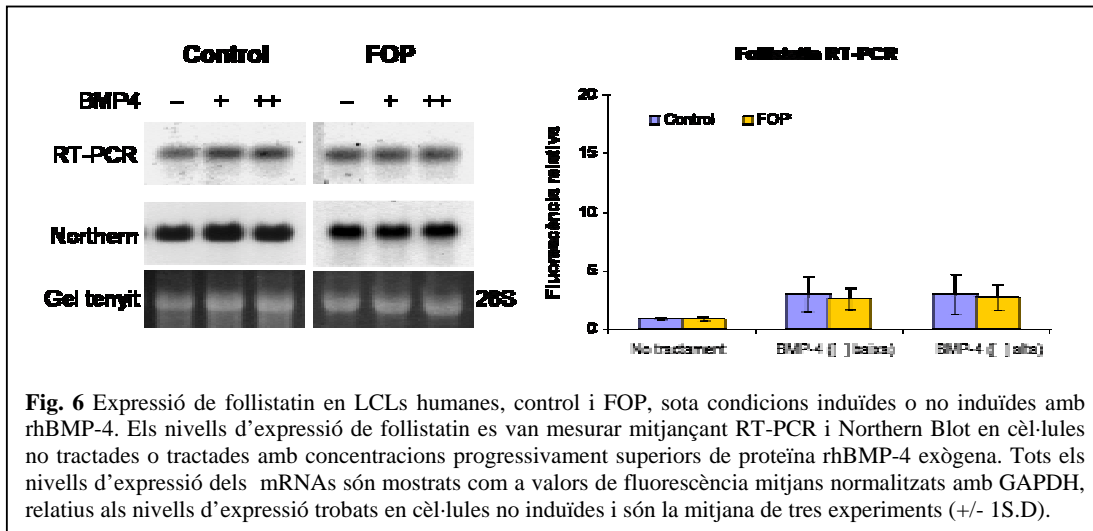


Fig. 6 Expressió de follistatin en LCLs humanes, control i FOP, sota condicions induïdes o no induïdes amb rhBMP-4. Els nivells d'expressió de follistatin es van mesurar mitjançant RT-PCR i Northern Blot en cèl·lules no tractades o tractades amb concentracions progressivament superiors de proteïna rhBMP-4 exògena. Tots els nivells d'expressió dels mRNAs són mostrats com a valors de fluorescència mitjans normalitzats amb GAPDH, relatius als nivells d'expressió trobats en cèl·lules no induïdes i són la mitjana de tres experiments (+/- 1S.D).

A la fig.6 s'observen els nivells d'expressió gènica de follistatin en LCLs humanes tractades o no tractades amb rhBMP-4. Observem que follistatin manté els seus nivells en línies FOP semblants respecte a les línies controls en resposta a BMP-4 recombinant.

Expressió de chordin en LCLs humanes estimulades amb proteïna rhBMP-4

Es van mesurar els nivells d'expressió de chordin usant les mateixes línies cel·lulars i el mateix mètode que el descrit per noggin.

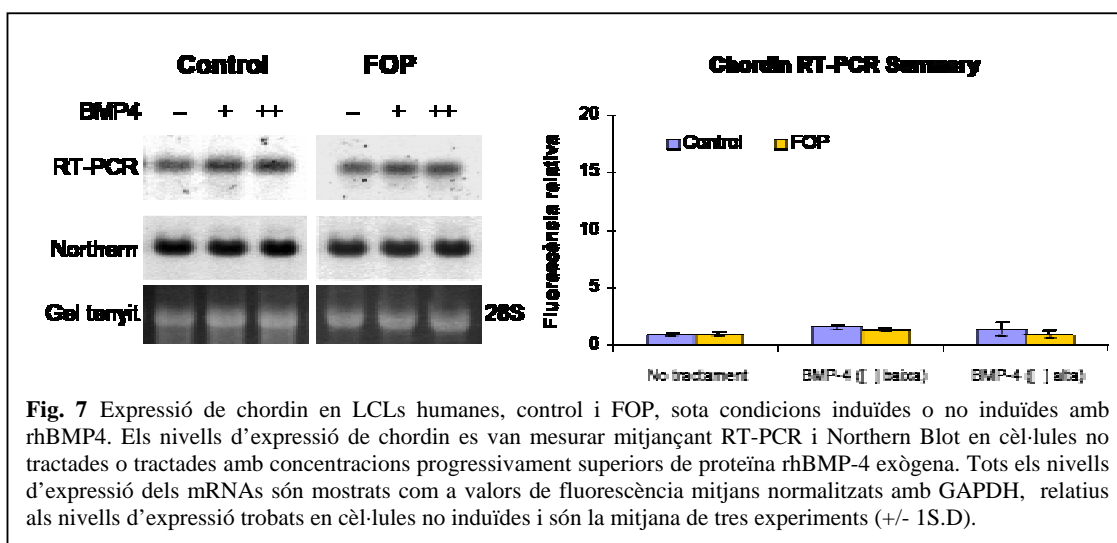
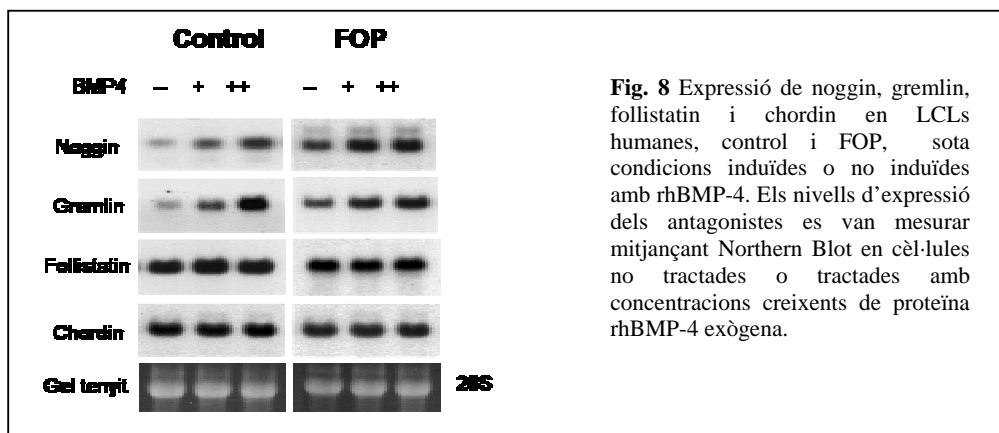


Fig. 7 Expressió de chordin en LCLs humanes, control i FOP, sota condicions induïdes o no induïdes amb rhBMP4. Els nivells d'expressió de chordin es van mesurar mitjançant RT-PCR i Northern Blot en cèl·lules no tractades o tractades amb concentracions progressivament superiors de proteïna rhBMP-4 exògena. Tots els nivells d'expressió dels mRNAs són mostrats com a valors de fluorescència mitjans normalitzats amb GAPDH, relatius als nivells d'expressió trobats en cèl·lules no induïdes i són la mitjana de tres experiments (+/- 1S.D).

A la fig.7 s'observen els nivells d'expressió gènica de chordin en LCLs humanes tractades o no tractades amb rhBMP-4. Com s'observava amb follistatin, chordin també manté els seus nivells constants tant en línies FOP com en línies control.

Resum de l'expressió de noggin, gremlin, follistatin i chordin en LCLs humanes tractades amb rhBMP-4.

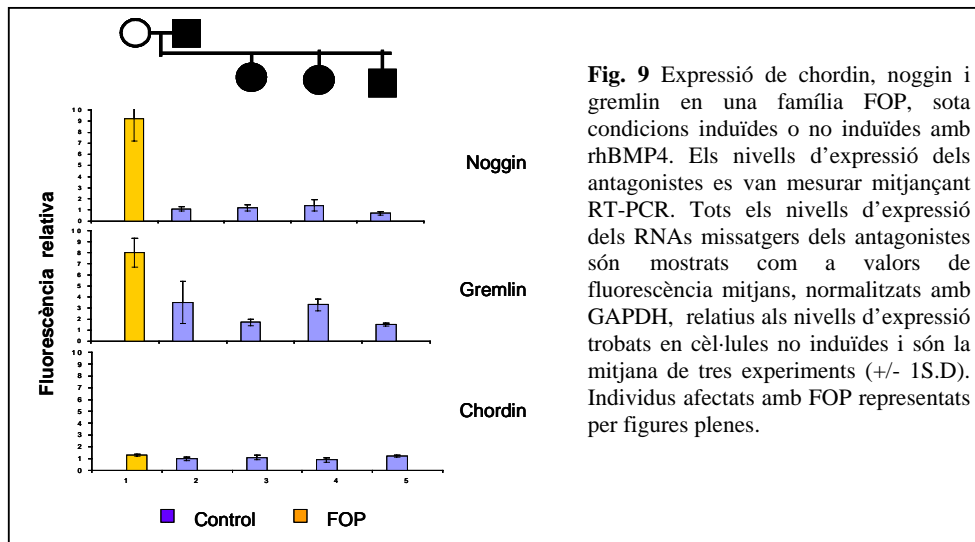
La fig.8 mostra un resum de l'expressió dels antagonistes de BMP-4 en LCLs humanes estimulades amb proteïna recombinant BMP-4 i analitzades amb Northern blot.



En línies LCLs control sota estimulació amb rhBMP-4, l'expressió de noggin i gremlin experimenta un augment progressiu, mentre que follistatin i chordin mantenen constants els seus valors d'expressió. Les Línies FOP presenten valors semblants tant en condicions normals com estimulades.

Expressió de noggin, gremlin i chordin en LCLs humanes d'una família FOP estimulades amb proteïna rhBMP-4

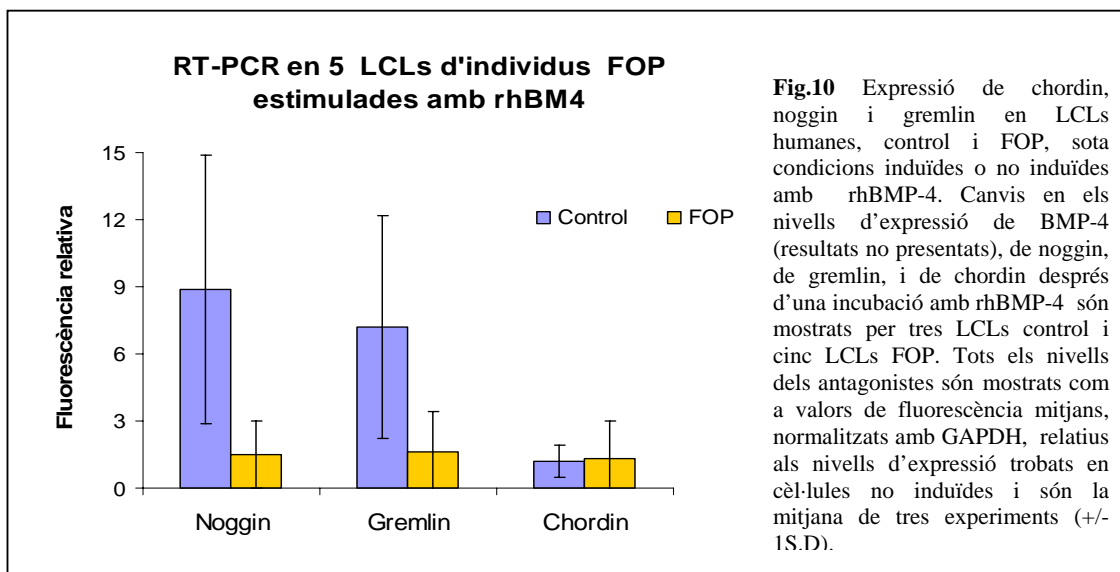
L'estudi es va extendre a l'incloure tots els membres d'una família FOP (mare no afectada, pare afectat i tres fills també afectats). Els nivells d'expressió de noggin, gremlin i chordin es van mesurar per RT-PCR usant el mateix mètode de quantificació.



Les LCLs de tots els membres afectats d'una família FOP presentaven una atenuada resposta de noggin i gremlin comparat amb els nivells obtinguts en LCLs de la mare no afectada (fig.9). Els nivells de chordin es van mantenir immutables sota totes les condicions experimentals. Els resultats correlacionen la malaltia de FOP amb una resposta atenuada de noggin i gremlin al tractament amb proteïna BMP-4 recombinant

Expressió de noggin, gremlin i chordin en LCLs humanes de 5 esporàdics afectats de FOP després d'estimulació amb proteïna rhBMP-4

Resultats similars es van obtenir en un total de tres LCLs control i cinc LCLs FOP. Els nivells d'expressió de noggin, gremlin i chordin es van mesurar mitjançant RT-PCR, com s'ha descrit en materials i mètodes.



Com s'observa a la fig.10, els nivells dels RNAs missatgers de noggin i gremlin van augmentar notablement en LCLs control sota estimulació amb proteïna recombinant, mentre que aquest augment es va veure clarament atenuat en LCLs FOP. De nou, els nivells dels RNAs missatgers de chordin no es van veure alterats sota tractament amb BMP-4 exògena en cap de les línies analitzades. A més l'expressió de BMP-4 es va mostrar del tot insensible a rhBMP-4 en totes les LCLs analitzades, exclouent per tant, sota les nostres condicions experimentals, una autoregulació de BMP-4.