

## Discussió

*In vivo* les proteïnes morfogenètiques d'os (BMPs) són úniques en la seva habilitat d'induir tot el programa d'osteogènesi endocondral a llocs heterotòpics (*Kaplan et al., 1993b; Kaplan et al., 1998., Gannon et al., 1998*); no obstant, les seves activitats estan rigorosament regulades per antagonistes específics (*Piccolo et al., 1999; Pizette et al., 1999, Merino et al., 1999*). Aquests inclouen noggin, chordin, cerberus (i proteïnes relacionades d'aquests), gremlin i follistatin (*Gazzerro et al., 1998; Perrimon et al., 1999; Vogt, 1999*).

Una sobreexpressió selectiva de la proteïna BMP-4 en limfòcits immortalitzats i en cèl·lules de lesions fibroproliferatives de pacients afectats amb FOP va suggerir que la sobreexpressió d'aquest morfogen podria estar involucrada en el guany de funció que condueix a una ossificació heterotòpica en pacients amb fibrodisplàsia ossificadora progressiva (*Olmsted et al., 1996; Shafritz et al., 1996; Gannon et al., 1997; Lanchoney et al. 1998*).

Es van avaluar possibles variacions en l'expressió gènica dels antagonistes de BMP-4, els quals en condicions normals bloquegen BMP-4 en molts processos de desenvolupament (*Perrimon et al., 1999; Miyazono, 2000; Timothy et al., 2000; Piccolo et al., 1998; Pearce et al., 1999*) i que hipotèticament provoquen nivells alts de BMP-4 en limfòcits immortalitzats d'individus FOP.

L'expressió dels antagonistes noggin i gremlin era lleugerament superior en les LCLs FOP en comparació amb les LCLs control, com es mostra a la fig. 3, fet que sorprèn, ja que l'expressió d'aquests antagonistes no va resultar ser tant intensa com s'esperava en relació al gran augment de BMP-4 observat en algunes cèl·lules FOP. A diferència, en els FOP no s'observa cap canvi en els nivells dels mRNAs de follistatin i chordin respecte als valors observats en les LCLs control. Aquests resultats suggereixen una possible pèrdua de la resposta de retroalimentació negativa en algun dels antagonistes de BMP-4, pels quals els nivells dels mRNAs de BMP-4 i conseqüentment l'activitat de la proteïna BMP-4 puguin trobar-se notablement elevats i continuats en els

individus FOP (*Shafitz et al., 1996; Gannon et al., 1997; Kaplan et al., 1998; Lanchoney et al., 1998*). Per entendre millor com aquest mecanisme de retroalimentació es troba malmès, es va analitzar l'expressió dels antagonistes noggin, gremlin, follistatin i chordin en diferents LCLs (FOP i control) estimulades amb hrBMP-4. L'avaluació de l'expressió es va dur a terme en tres experiments separats: a) En una LCL control i en una LCL FOP ; b) En una família FOP (mare no afectada, pare afectat i tres fills afectats) i c) En línies esporàdiques: 5 FOPs i 3 controls.

Usant un simple, rellevant i disponible sistema de cultiu de limfoblastoids, amb condicions de creixement cel·lular, estàndards, ha estat possible identificar una possible alteració en l'equilibri entre un morfogen esquelètic i els seus antagonistes en una malaltia humana d'esquelatogènesi heterotòpica que inhabilita de forma severa. Sota estimulació amb proteïna BMP-4 recombinant humana (rhBMP-4) les LCLs control exhibien un marcat increment en l'expressió dels mRNAs de noggin i gremlin, mentre que les cèl·lules FOP mostraven una resposta atenuada de noggin i gremlin. El fracàs en activar (upregulate) adequadament els nivells d'expressió de noggin i gremlin en LCLs FOP suggereix que els nivells d'aquests antagonistes en individus FOP poden trobar-se relativament baixos respecte als nivells observats per BMP-4. Aquests resultats donen suport als resultats inicials i recolzen la teoria que una alteració en el mecanisme de retroalimentació negativa pot provocar nivells alts de BMP-4 en individus FOP (*Shafitz et al., 1996; Gannon et al., 1997; Kaplan et al., 1998; Lanchoney et al., 1998*).

En línies FOP, com s'observa en la fig.3, existeix una enorme variabilitat del nivells dels mRNAs de BMP-4, amb desviacions estàndard molt grans ( $10 \pm 8$ ). Aquesta variabilitat també s'observa en els nivells basals de noggin i gremlin ( $3 \pm 1.5$ ,  $2 \pm 1.8$ ) fig.3. La raó principal d'aquesta variabilitat podria residir en una inadequada sincronització cel·lular. Una sincronització controlada de totes les línies cel·lulars emprades en futurs estudis serà crítica per entendre com el mecanisme de retroalimentació negativa es troba alterat en individus FOP.

L'ossificació heterotòpica en individus FOP comença durant la infància i es pot donar mitjançant trauma, provocat per cirurgia, fractures, ferides en teixits tous, immunitzacions intramusculars o anestèsies en processos odontològics (*Connor et al., 1982, Cohen et al., 1993*). El múscul esquelètic i les cèl·lules que deriven de múscul esquelètic són sensibles a concentracions de BMP-4 ambientals (*Nakate et al., 1994; Bostrom et al., 1995; Yoshimura et al., 2001*). A més la BMP-4 activa intensament l'expressió dels antagonistes extracel·lulars de BMP-4, els quals es difonen molt més ràpid que els membres de la família TGF- $\beta$  (*Pereira et al., 2000; Miyazono et al 2000*).

En el cas d'una resposta atenuada dels antagonistes extracel·lulars de BMP-4 en resposta a trauma en els teixits tous es permetria una ràpida expansió del gradient morfogenètic de BMP-4 que conduiria a una esquelatogènesi progressiva a través del camí endocondral. L'aparició de teixit preossi fibroproliferatiu altament vascularitzat, observat localment en resposta a la sobreexpressió de BMP-4, pot ser la conseqüència d'una debilitada resposta inhibitoria que permetria una ràpida formació d'os. Els nostres estudis proporcionen evidència que una desregulació de BMP-4, possiblement provocada per nivells reduïts dels antagonistes noggin i gremlin, es troba associat amb un desordre catastròfic d'osteogènesi heterotòpica.

Els resultats presentats en aquest treball donen suport a la hipòtesi que la inducció d'elements esquelètics heterotòpics en pacients amb FOP –i potser en altres desordres de formació heterotòpica d'os– poden estar rigorosament regulats en l'espai i el temps, mitjançant l'expressió de potents antagonistes de morfogènesi esquelètica.

## 2.4 Treball 2:

**“ Model de creixement cel·lular sincronitzat aplicat a quatre línies FOP i quatre 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 rhBMP-4”**

### **Resum**

Els alts nivells dels mRNAs d’expressió basal de BMP-4 en línies FOP –juntament a valors similars de noggin i gremlin tant en FOPs com en controls– van suggerir que l’expressió d’aquests antagonistes en línies FOP podria ser inadequadament baixa respecte a BMP-4. L’expressió atenuada de noggin i gremlin en resposta a rhBMP-4 en línies FOP va revelar una alteració del mecanisme de retroalimentació negativa en individus amb la malaltia. Després d’aquestes observacions vàrem postular que l’expressió de BMP-4 podria variar en relació al creixement i densitat cel·lular de les LCLs en cultiu, fruit d’una atenuada acció de noggin i gremlin, creant així gradients de BMP-4 semblants als de condicions fisiològiques.

En aquest estudi hem usat un model de creixement cel·lular sincronitzat i tècniques d’anàlisi d’expressió gènica per a correlacionar la variabilitat d’expressió observada per BMP-4, noggin i gremlin en línies FOP amb l’estat cel·lular respecte les línies control. Usant el mateix model, també s’han avaluat els nivells de noggin i gremlin en línies estimulades amb rhBMP-4. Els resultats, en aquest model, demostren que els nivells de BMP-4 tenen una variabilitat enorme tant en línies FOP com en línies control. Sorprenentment hem identificat un patró d’expressió de BMP-4 ben definit en línies FOP.

Les línies FOP no poden mantenir els nivells de BMP-4 al llarg del temps. El mateix perfil d’expressió ha estat detectat per noggin i gremlin amb una expressió menys intensa que l’observada per BMP-4. Els antagonistes gremlin i noggin responen a rhBMP-4 de

forma atenuada en línies FOP sempre en relació als seus valors inicials, existint també variabilitat d'expressió de noggin i de gremlin en línies FOP.

Aquests resultats donen sòlid suport a la hipòtesi que l'efecte primari de la mutació FOP és la de modificar el camí de transducció de les BMPs, afectant "upstream" efectors de les BMPs, creant així, en individus FOP, gradients de BMP-4 alterats com a efecte secundari.

## Materials i mètodes

\* *Els materials i mètodes que s'han aplicat en aquest treball són els mateixos que s'han descrit en materials i mètodes del treball número 1 (pàgina 30), però amb algunes variacions que s'indiquen a continuació:*

### *Tractament de les cèl·lules*

Les línies limfoblàstiques d'individus sans i d'individus afectats amb FOP es van mantenir i transferir en flascons de 75 ml (10ml de medi amb cèl·lules + 40 ml de medi de cultiu) i es van cultivar en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durant tres dies. La concentració de cèl·lules fou calculada de la següent forma: es va agafar de cada línia cel·lular 100ul de medi i s'hi afegia 20ul de "Tripan Blue" (substància química que és absorbida només per cèl·lules mortes, ja que les cèl·lules vives l'expulsen). L'addició d'aquest element serveix per a comptar les cèl·lules vives. Es varen agafar 10ul de la barreja i mitjançant un hemicitòmetre de Neubauer realitzem una estimació del nombre cel·lular. Es compten cinc quadrats de l'aparell i es fa el següent càlcul:

$$\frac{A+B+C+D+E}{5} \times 1.2 \text{ (factor de dilució)} \times 10^4 = \mathbf{X} \text{ cèl·lules /ml}$$

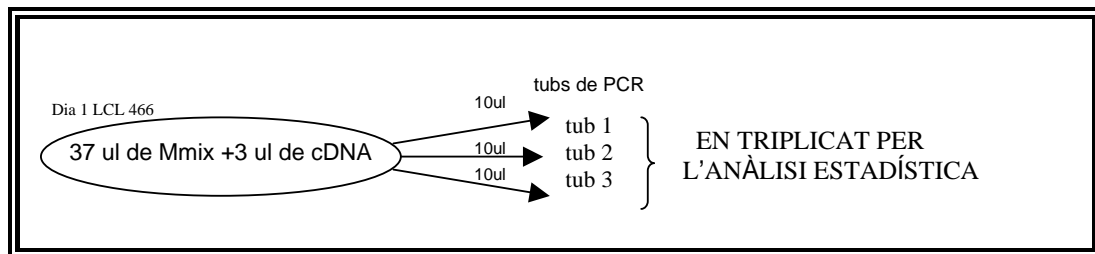
Es va partir d'una concentració inicial de 250000 cel/ml per línia cel·lular. Amb aquesta concentració es van generar totes les corbes de creixement cel·lular. L'experiment es va dur a terme amb l'ús de cinc flascons que se'ls va anomenar: dia 1, dia 2, dia 3, dia 4, i dia 5 i que es van preparar amb la concentració específica. Es van agafar diferents quantitats de volum de les LCLs en stock (ja que els ritmes de creixement no es trobaven sincronitzats) per tal d'obtenir 250000 cel/ml en totes les LCLs. Per exemple, en la línia 466 (corresponent a un individu afectat de FOP) es van centrifugar 20 ml (a una concentració de 1.5 milions de cel/ml) a 1200 rpm durant 10 minuts a temperatura ambient. El sobrenadant fou descartat i el sediment es va redissoldre en 33ml de medi cultiu per a obtenir aproximadament 10<sup>6</sup> cel/ml. Després es van transferir 5ml de la línia 466 a una concentració de 10<sup>6</sup> cel/ml a un flascó amb 15 ml de medi fresc, aplicant una dilució 1:4 per obtenir la concentració desitjada de 250000 cel/ml (dia 0). L'RNA de les cèl·lules es va aïllar en el dia corresponent per fer l'anàlisi d'expressió de BMP-4 i dels antagonistes noggin i gremlin.

### *Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)*

Els nivells dels mRNAs d'expressió basal dels diferents gens foren analitzats mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR), usant “primers” específics per BMP-4, noggin, gremlin i GAPDH. La reacció de PCR es va dur a terme amb l'ús de 0.01U/ul Taq DNA polimerasa (Life Technologies Inc.), 0.08ul de producte de RT /ul, 0.2mM de dATP, dGTP, dCTP i dTTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> i 0.5uM de cada un dels “primers” “forward” i “reverse” específics de BMP-4, noggin, gremlin i GAPDH.

### *Mètode*

El mateix mètode fou utilitzat per tots els gens analitzats i cada mostra es va córrer en triplicat per l'anàlisi estadística: Per cada gen es va crear un volum de PCR Màster Mix (descrita anteriorment) per la realització de 17 reaccions, corresponents a cinc dies de mostreig i cada dia es va analitzar per triplicat = a 15 reaccions, més 2 volums extra per tenir suficient volum. La reacció de PCR fou realitzada com s'indica a l'esquema següent:



Aquest mètode es va aplicar a tots els dies de la corba i a tots els gens analitzats (BMP-4, GAPDH, noggin i gremlin) de les vuit LCLs en cultiu (quatre controls i quatre FOPs). Es va monitoritzar de la mateixa forma l'expressió dels gens noggin i gremlin sota condicions induïdes amb rhBMP-4.

*Tinció amb vista green, detecció i quantificació dels productes de PCR dels gens BMP-4, gremlin i noggin*

Les senyals lumíniques quantificades amb ImageQuant foren processades amb el programa Microsoft Excel i els resultats es van expressar de la següent forma:

<i>BMP-4 (Dia)</i>	<i>BMP-4 (Volum)</i>	<i>BMP-4 (Mitjana de 3 exp)</i>	<i>BMP-4, valors mitjans respecte a dia 1</i>	<i>Valors individuals respecte a dia 1</i>	<b>Valors mitjans de BMP-4 normalitzats amb GAPDH</b>
<b>Valors individuals normalitzat amb GAPDH</b>	<b>*Dv St</b>	<u>GAPDH (Dia)</u>	<u>GAPDH (volum)</u>	<u>GAPDH (Mitjana de 3 exp)</u>	<u>BMP-4, valors mitjans respecte a dia 1</u>

\* Desviació estàndard

Aquest mateix mètode d'anàlisi estadística també fou també aplicat als resultats d'expressió gènica obtinguts per gremlin i noggin.

*L'anàlisi d'expressió gènica (corresponent al dia 3 del model de creixement) dels gens humans de BMP-4 i GAPDH, realitzat en quatre LCLs control i quatre LCLs FOP*

Els mRNAs corresponents al dia 3 (màxima expressió de BMP-4) de totes les línies cel·lulars es va convertir a cDNA i es va realitzar l'anàlisi d'expressió gènica per PCR, usant les condicions anteriorment descrites, per als gens de BMP-4 i GAPDH. Per poder comparar l'expressió de BMP-4 en les diferents línies transformades (quatre controls i quatre FOPs), els productes de PCR de les LCLs, en triplicat, es van córrer tots junts en un gel d'agarosa al 1.2% per evitar variabilitat en el procés de tinció. Per a la detecció, quantificació i processament de les dades a analitzar, es va aplicar a les mostres el mètode descrit anteriorment.

*Tractaments de les LCLs amb hrBMP-4 aplicant el mateix model de creixement cel·lular*

Es va partir d'una concentració inicial de 250000 cel/ml per línia cel·lular, per així generar totes les corbes de creixement cel·lulars (com ja ha estat descrit).

Les cèl·lules es van tractar en relació a la seva concentració cel·lular estimada (en el model: de dia1 a dia 5, tractament amb 1, 1.5, 2, 2.5, 2 ng/ml respectivament de proteïna BMP-4 recombinant humana purificada (rhBMP-4, Genetics Institute, Cambridge, MA), es va procedir de la següent forma:



Concentració inicial en tots els flascons:  $2.5 \times 10^5$  cell/ml

Tractament	Flascó 1	Flascó 2	Flascó 3	Flascó 4	Flascó 5
Dia 1	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml	1ng/ml
Dia 2	-----	1.5 ng/ml	1.5 ng/ml	1.5 ng/ml	1.5 ng/ml
Dia 3	-----	-----	2 ng/ml	2 ng/ml	2 ng/ml
Dia 4	-----	-----	-----	2.5 ng/ml	2.5 ng/ml
Dia 5	-----	-----	-----	-----	2 ng/ml

Taula.1 Les línies cel·lulars es van tractar amb concentracions creixents de BMP-4 recombinant en relació a la seva densitat cel·lular.

*Tinció amb vista green, detecció i quantificació dels productes de PCR per noggin i gremlin en LCLs estimulades amb hrBMP-4*

Els senyals de llum quantificats amb ImageQuant foren processats amb el programa Microsoft Excel i els resultats es van expressar de la següent forma:

<i>Noggin (Dia)</i>	<i>Noggin valors individuals</i>	<i>Noggin (Mitjana de 3 exp)</i>	<b>Valors mitjans de noggin normalitzats amb GAPDH</b>	<b>Valors individuals normalitzats amb GAPDH</b>	<b>*Dv St</b>
<u>GAPDH</u> <u>(Dia)</u>	<u>GAPDH</u> <u>Valors</u> <u>individuals</u>	<u>GAPDH</u> <u>(Mitjana de</u> <u>3exp</u>	Els valors de gremlin es van analitzar de la mateixa forma		

\* Desviació estàndard

Com s'indica a la taula.2, es van obtenir els valors absoluts de noggin i gremlin normalitzats amb GAPDH.

## Resultats

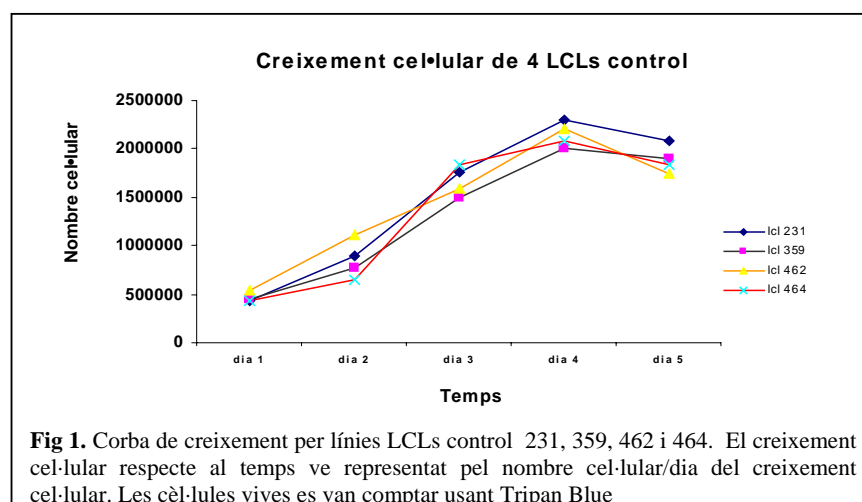
*Anàlisi de l'expressió endògena de BMP-4 en vuit LCLs diferents, realitzat en un model de creixement cel·lular sincronitzat*

Els alts nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 en línies –unit a valors similars de noggin i gremlin, tant en controls com en línies FOP- van suggerir que l'expressió d'aquests antagonistes podria trobar-se inadequadament baixa en individus afectats de la malaltia. L'atenuada resposta de noggin i gremlin ens va fer postular que l'expressió dels mRNAs de BMP-4 podria variar en relació al creixement cel·lular, creant-se gradients d'expressió similars als fisiològics analitzables mitjançant expressió gènica.

*Anàlisi, en línies control 231, 359, 462 i 464, de l'expressió endògena de BMP-4 normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia. Estudi realitzat en un model de creixement cel·lular sincronitzat.*

*Corba de creixement cel·lular sincronitzada per les línies control 231, 359, 462 i 464*

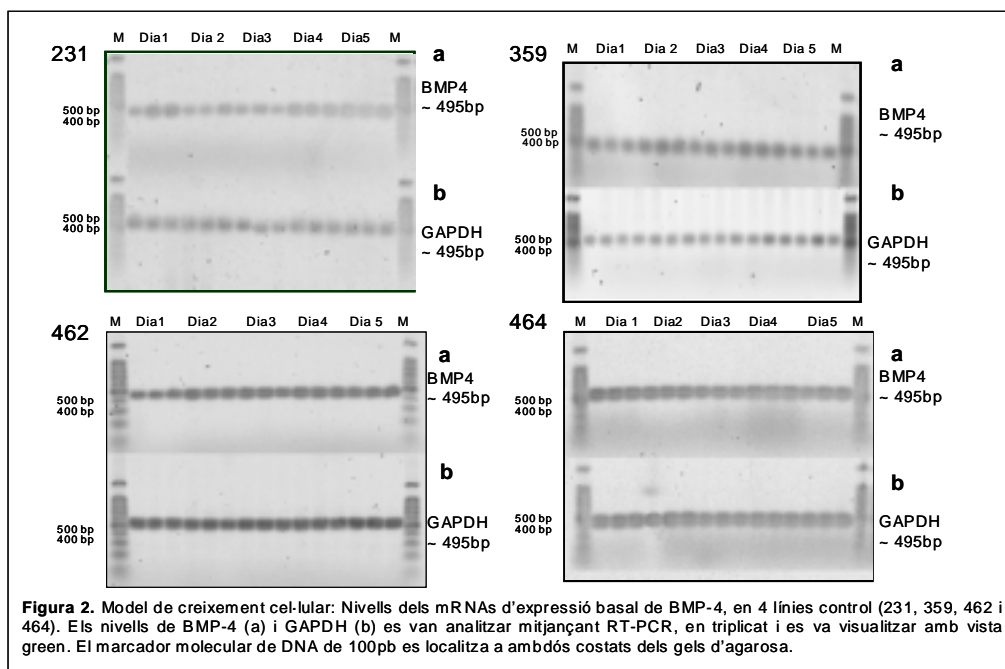
A sota es presenten els resultats obtinguts per al creixement cel·lular i per als nivells d'expressió basal de BMP-4 humà en les línies control 231, 359, 462 i 464. Per obtenir una correlació exacta de l'expressió de BMP-4 amb la densitat cel·lular, les cèl·lules vives es van comptabilitzar en el dia corresponent abans de l'aïllament de l'RNA. Cada línia es va cultivar com s'ha descrit en materials i mètodes i les cèl·lules es van comptar del dia 1 al dia 5 usant tinció amb "Tripan Blue".



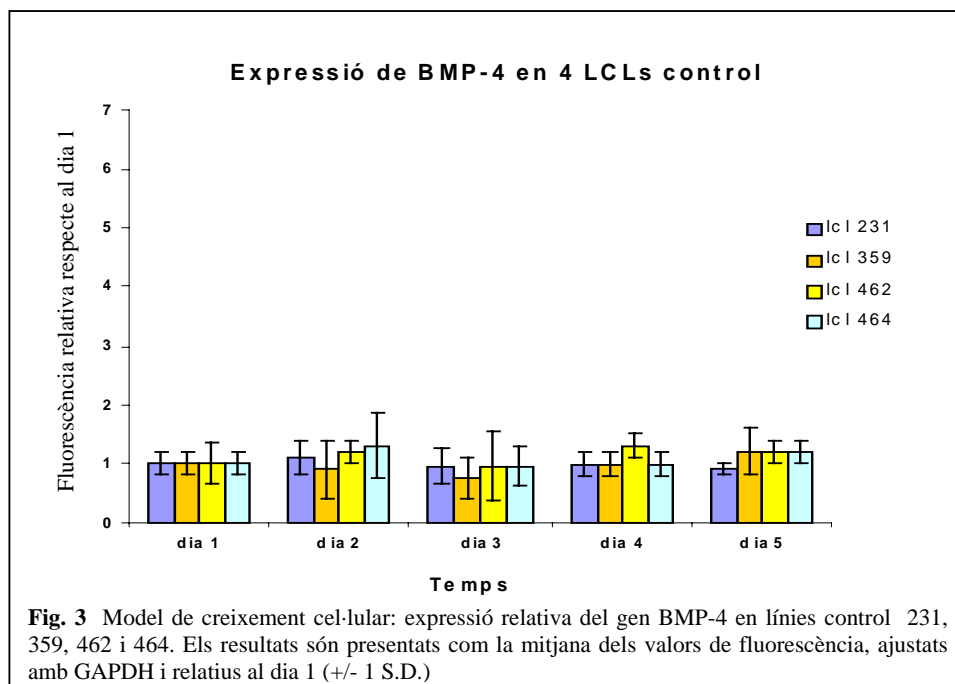
Com es mostra a la fig.1, totes les línies control tenen un ritme de creixement cel·lular similar. La densitat cel·lular s'incrementa progressivament fins arribar al màxim en el dia 4, després les cèl·lules comencen a morir per manca de medi fresc en el cultiu. El creixement cel·lular fou analitzat també en les línies FOP 463, 465, 466 i 995 en condicions normals i sota tractament amb rhBMP-4 humana. També es va analitzar en línies control estimulades. Totes les cèl·lules presentaven la mateixa cinètica de creixement cel·lular tant en condicions normals com en tractament.

*Anàlisi de l'expressió endògena de BMP-4 normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1 en les línies control 231, 359, 462 i 464: electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

A continuació s'il·lustren els resultats per a l'expressió endògena de BMP-4 normalitzada amb GAPDH obtinguts en quatre línies control diferents amb creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5). Els resultats s'expressen en triplicat per a millorar la significació d'aquests. Cada mostra es va obtenir com s'ha indicat en materials i mètodes i els productes de PCR es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa i quantificats per fluorescència amb l'ús del programa ImageQuant.



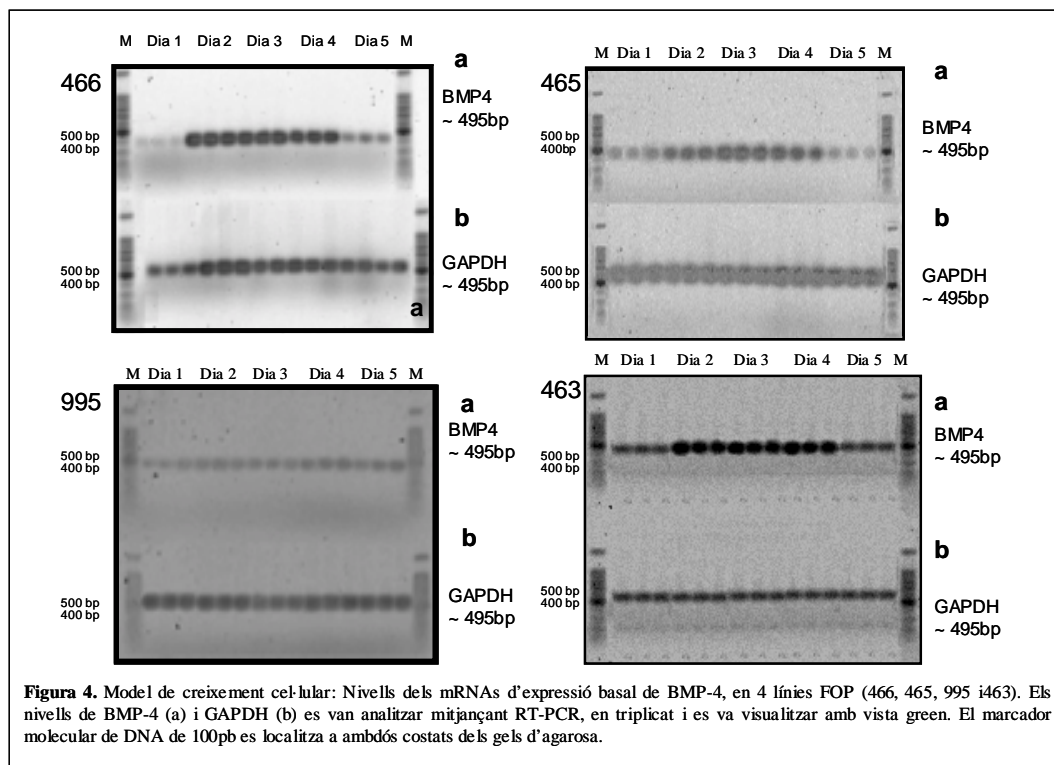
La fig. 2 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de BMP-4 i GAPDH analitzats en les línies control 231, 359, 462 i 464. Els productes de BMP-4 i GAPDH tenen tamany similar i es localitzen al voltant de la posició electroforètica del marcador molecular de 500 pb. A simple vista no podem detectar diferències significatives entre les línies control. Aquests valors lumínics es van analitzar meticulosament com s'ha descrit en materials i mètodes i a continuació són representats gràficament:



Representació gràfica dels nivells mitjans dels mRNAs d'expressió de BMP-4 de les línies control 231, 359, 462 i 469, corresponents als dies 1-5. Com s'observa, totes les línies control tenen el mateix perfil d'expressió. L'expressió de BMP-4 es manté constant al llarg del temps i de la densitat cel·lular.

*Anàlisi de l'expressió endògena de BMP-4 normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1 en les línies FOPs 463, 465, 466 i 995: electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

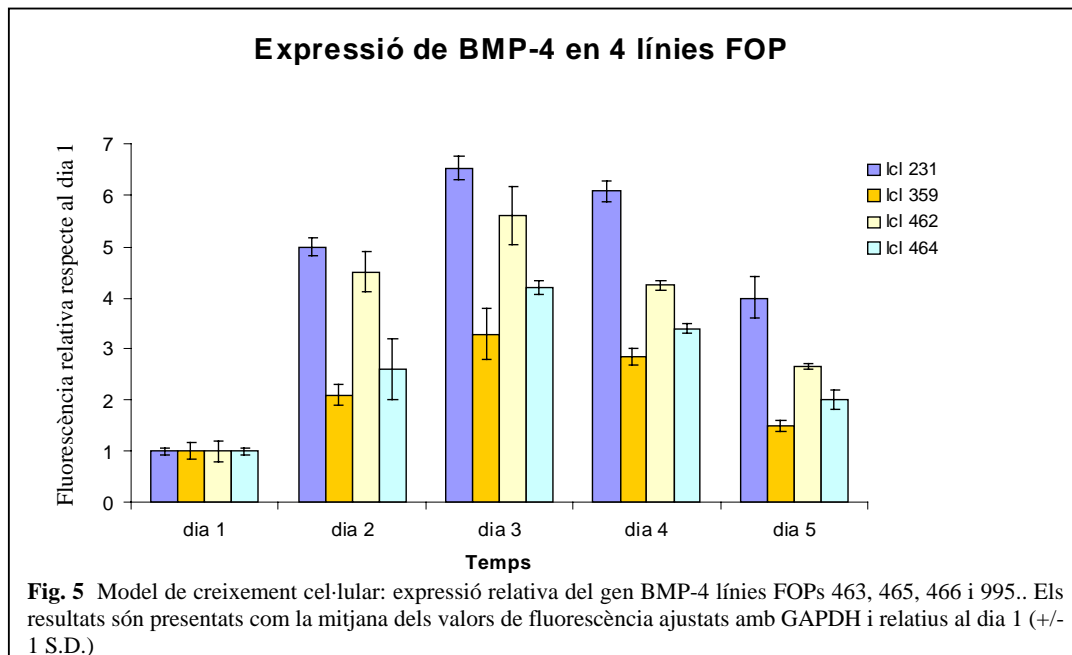
A continuació s'il·lustren els resultats per l'expressió endògena de BMP-4 normalitzada amb GAPDH obtinguts en quatre línies FOP diferents amb creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5).



La fig.4 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de BMP-4 i GAPDH analitzats en les línies FOPs 463, 465, 466 i 995. A simple vista podem detectar diferències d'expressió de BMP-4 en les línies FOP respecte al temps.

A continuació són representats gràficament els nivells mitjans dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 de les línies FOP 463, 465, 466 i 995, corresponents als dies 1-5.

She may—If



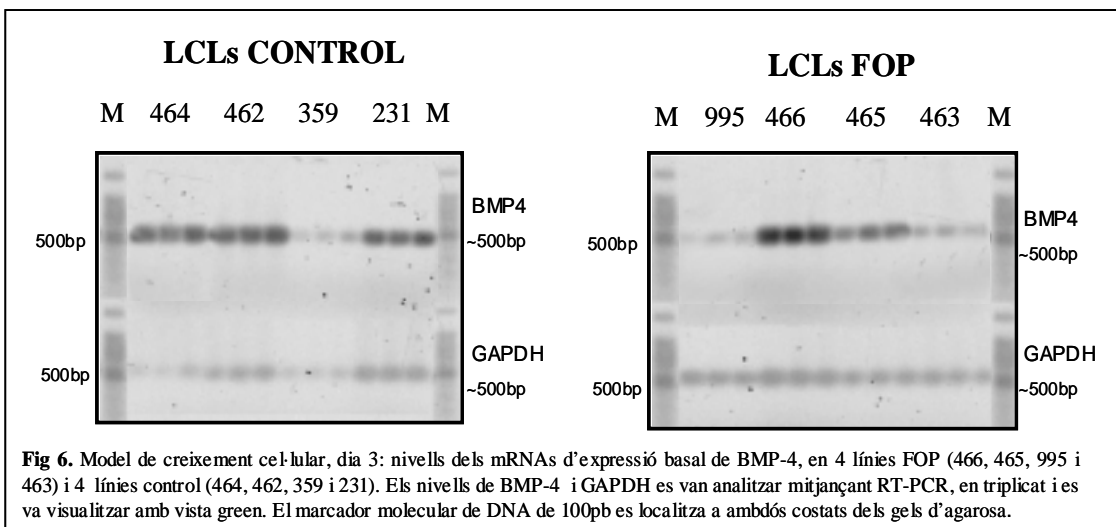
Com s'observa, totes les línies FOP tenen el mateix perfil d'expressió de BMP-4 i presenten diferències significatives respecte les línies control. L'expressió de BMP-4 incrementa progressivament, aconseguint el seu valor màxim en el dia tres i l'expressió disminueix quan les condicions de cultiu deixen de ser òptimes. Les línies FOP sembla que no són capaços de mantenir els valors de BMP-4 constants en relació a la seva densitat cel·lular.

*Anàlisi d'expressió gènica (corresponent al dia 3 del model de creixement) dels gens humans BMP-4 i GAPDH, realitzat en quatre LCLs control i quatre LCLs FOP*

La variabilitat dels nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 observada només en línies FOP va suggerir que el patró de sobreexpressió, descrit per BMP-4 i caracteritzat com el marcador molecular de la malaltia, podria ser inadequat. Per contra i amb conjunció amb els resultats d'una atenuada resposta de noggin i gremlin trobada en línies FOP, es pot postular que el defecte molecular podria residir en una regulació alterada de BMP-4 pels seus antagonistes noggin i gremlin o en altres paraules en una desregulació de BMP-4 provocada per una resposta atenuada dels antagonistes. Per a poder comparar l'expressió de BMP-4, en les diferents línies analitzades (quatre controls

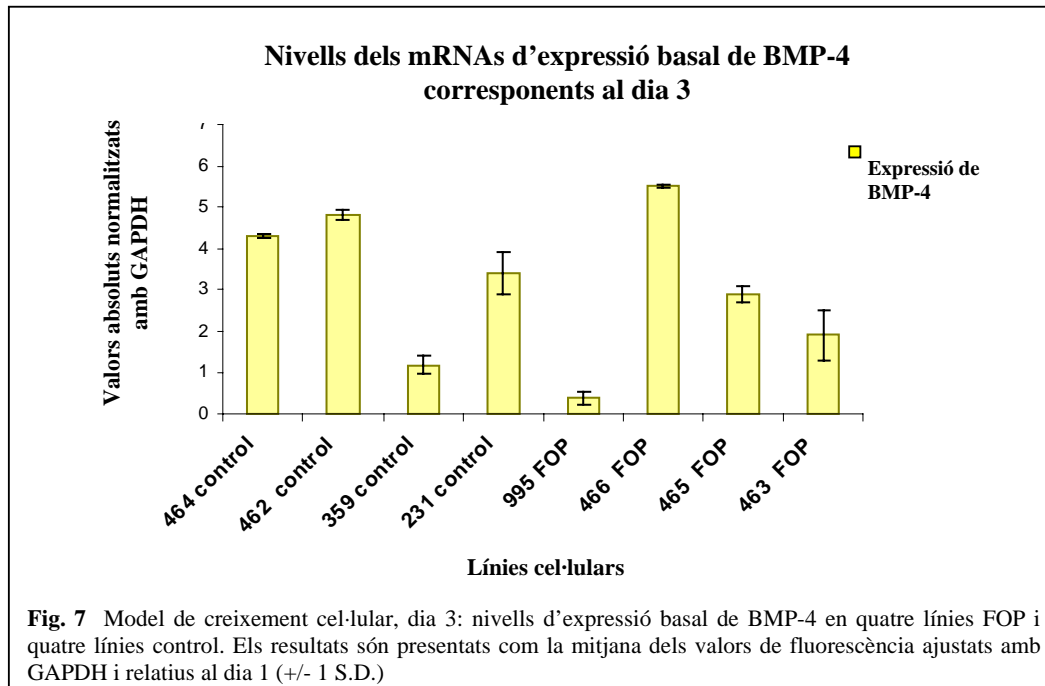
i quatre FOPs), els productes de PCR, corresponents al dia 3 (màxima expressió de BMP-4), es van córrer al mateix temps (evitant així variabilitat creada per “vista green”).

A continuació s’il·lustren els resultats obtinguts per l’expressió endògena de BMP-4 normalitzada amb GAPDH corresponent al dia 3 de la corba de creixement cel·lular. Els resultats s’expressen en triplicat.



La fig.6 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de BMP-4 i GAPDH analitzats en línies FOP 463, 465, 466 i 995 i en línies control 231, 359, 462 i 464, obtinguts en el dia 3 de la corba de creixement cel·lular. Els productes de BMP-4 i GAPDH es localitzen al voltant de la posició electroforètica del marcador molecular de 500 pb. A simple vista podem detectar variabilitat en l’expressió de BMP-4 tant en línies FOP com en línies control.

A continuació són representats gràficament els valors mitjans dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 de les línies FOP 463, 465, 466 i 995, corresponents al dia 3.



Com s'observa en la fig.7 en ambdues línies cel·lulars (FOPs i controls) existeix variabilitat d'expressió de BMP-4. Les LCLs provinents d'individus FOP no tenen un augment significatiu en l'expressió de BMP-4 respecte a les línies controls.

*Anàlisi de l'expressió endògena de noggin i gremlin, en vuit LCLs diferents, en un model de creixement cel·lular sincronitzat*

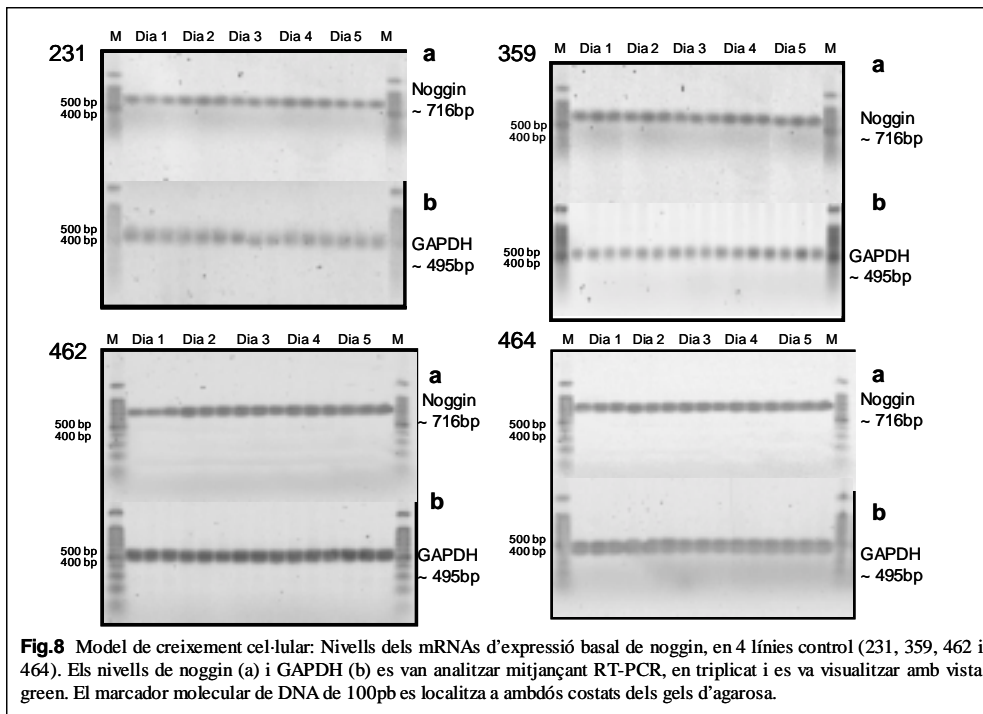
Els nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 observats en el model de creixement cel·lular van revelar un patró nou d'expressió només observat en línies FOP— Aquests resultats ens van fer hipotetitzar que el defecte molecular podria residir en una regulació alterada del mecanisme de retroalimentació de BMP-4 i els seus antagonistes noggin i gremlin.



Per comprendre millor com aquest mecanisme es troba alterat, hem analitzat gremlin i noggin usant les mateixes condicions que per BMP-4, postulant que es pot donar un patró d'expressió semblant per aquests antagonistes de BMP-4.

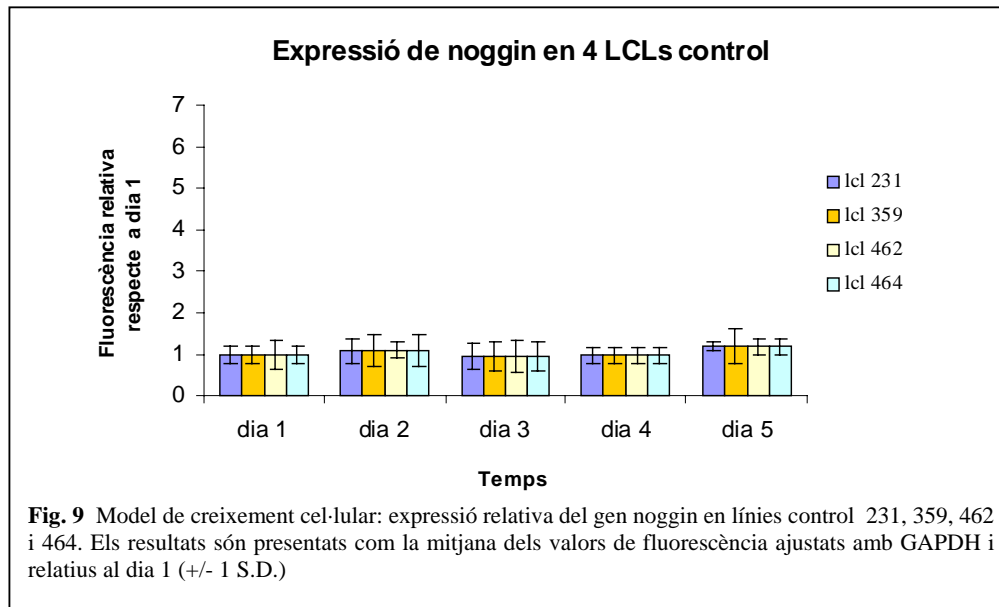
*Anàlisi, en línies control 231, 359, 462 i 464, de l'expressió endògena de noggin normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1, en un model de creixement cel·lular sincronitzat*

A continuació s'il·lustren els resultats per l'expressió endògena de noggin normalitzada amb GAPDH obtinguts en quatre línies control diferents amb creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5).



La fig.8 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de noggin i GAPDH analitzats en les línies control 231, 359, 462 i 469. Els productes de GAPDH i noggin ronden els 500 i 700pb respectivament. A simple vista no podem detectar diferències significatives entre les línies control.

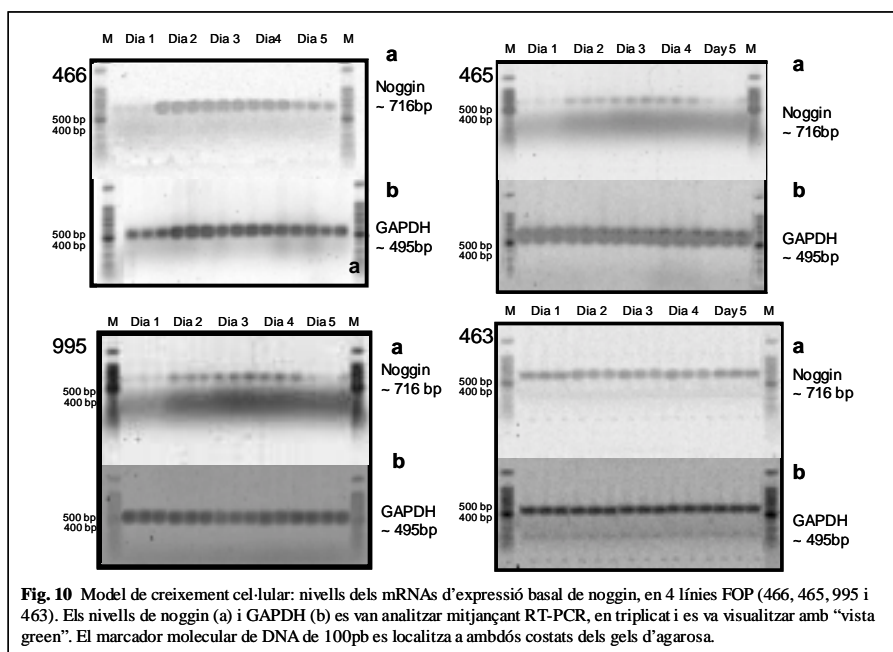
A continuació són representats gràficament els nivells mitjans dels mRNAs d'expressió basal de noggin de les línies control 463, 465, 466 i 995, corresponents als dies 1-5.



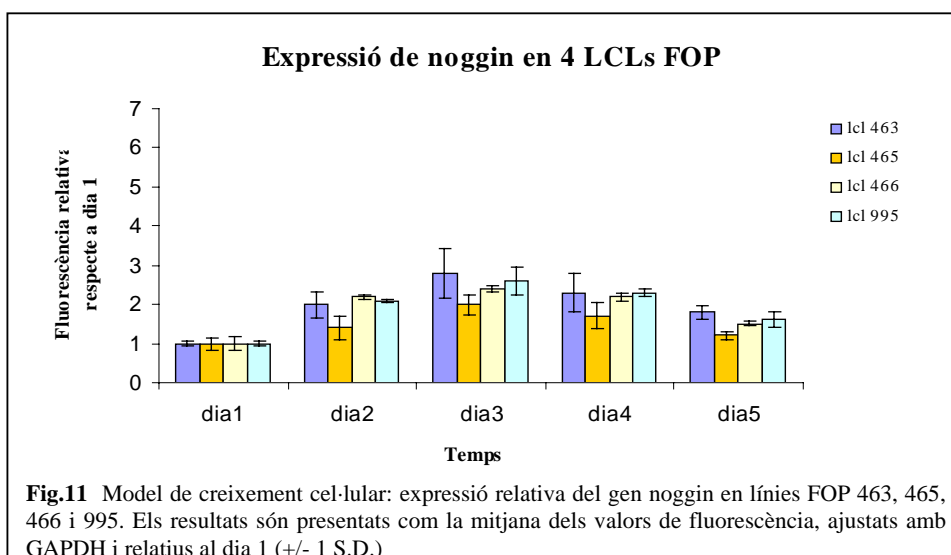
Com s'observa a la fig.9 totes les línies control tenen el mateix perfil d'expressió. L'expressió de BMP-4 es manté constant al llarg del temps i de la densitat cel·lular.

*Anàlisi, en les línies FOP 463, 465, 466 i 995 de l'expressió endògena de noggin normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1: electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

A continuació s'il·lustren els resultats per l'expressió endògena de noggin normalitzada amb GAPDH obtinguts en quatre línies FOP diferents amb creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5).



La fig.10 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de noggin i GAPDH analitzats en les línies FOP 466, 465, 995 i 463. A simple vista podem detectar diferències entre les línies FOP. Els valors lumínics es van analitzar com s'ha descrit en materials i mètodes i a continuació són representats gràficament:

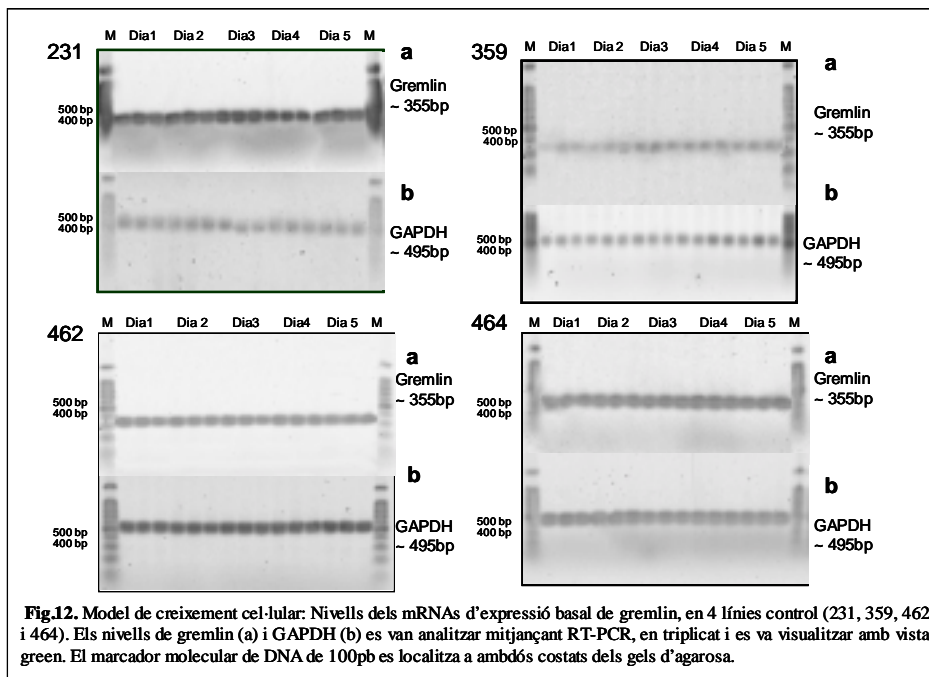


Representació gràfica dels nivells mitjans dels mRNAs d'expressió basal de noggin de les línies FOP 463, 465, 466 i 995 corresponents als dies 1-5. Tal com s'observa les línies cel·lulars FOP presenten diferències en l'expressió de noggin al llarg del temps i de

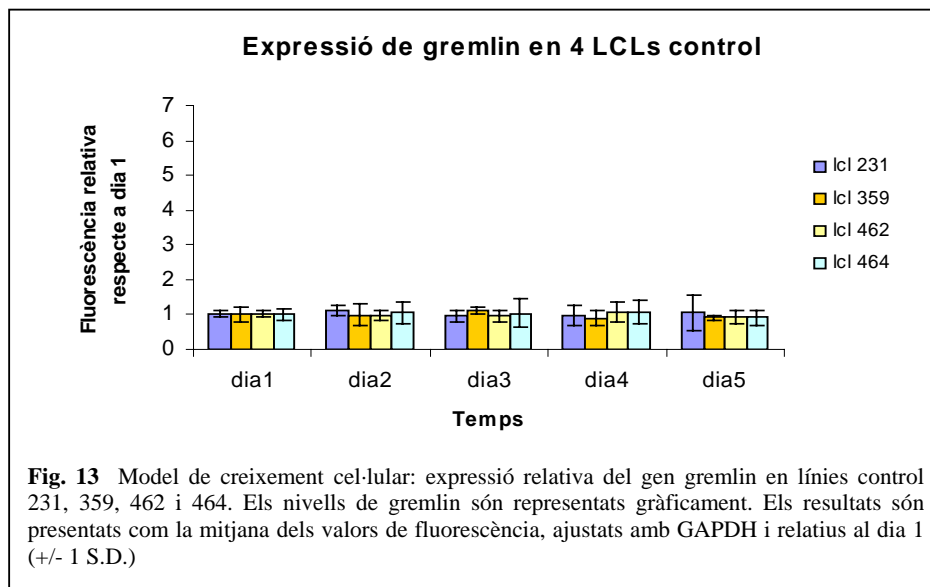
la densitat cel·lular en relació a les línies control. L'expressió de noggin incrementa progressivament, aconseguint el seu valor màxim en el dia 3 i disminueix quan les condicions de cultiu deixen de ser òptimes. Les línies FOP sembla que no són capaces de mantenir els valors de noggin constants, igual que BMP-4, en relació a la densitat cel·lular. Aquest patró d'expressió s'observa en totes les línies FOP.

*Anàlisi, en línies control 231, 359, 462 i 464, de l'expressió endògena de gremlin normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1, en un model de creixement cel·lular sincronitzat*

A continuació s'il·lustren els resultats per l'expressió endògena de gremlin normalitzada amb GAPDH obtinguts en quatre línies control diferents amb creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5).



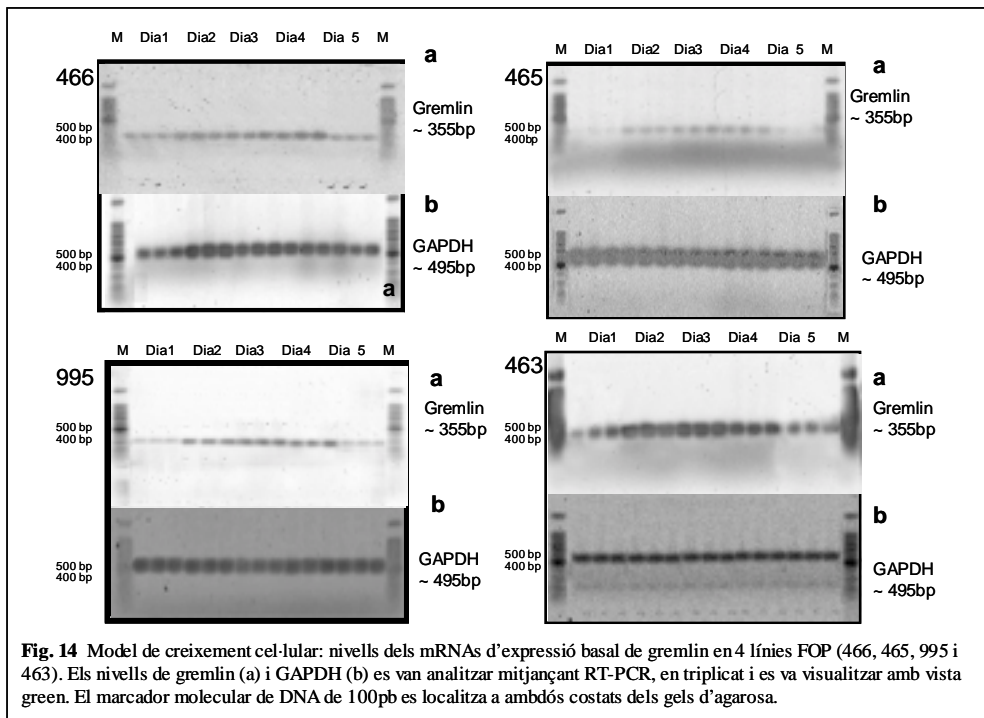
La fig.12 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de gremlin i GAPDH analitzats en les línies control 231, 359, 462 i 464. Els productes de GAPDH i gremlin ronden els 500 i 350pb respectivament.



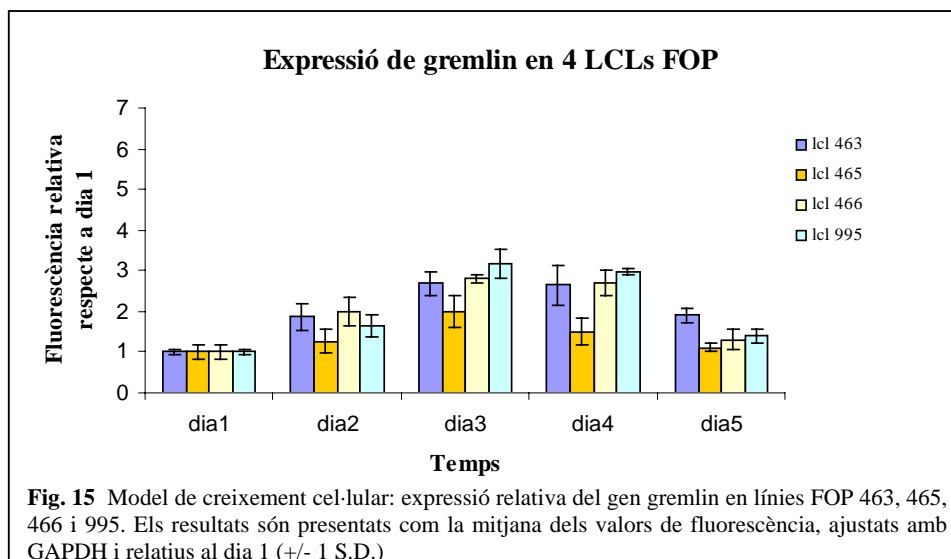
La representació gràfica dels nivells mitjans dels mRNAs d'expressió basal de gremlin de les línies control 231, 359, 462 i 464, corresponents als dies 1-5, permet observar que totes les línies control tenen el mateix perfil d'expressió. L'expressió de BMP-4 es manté constant al llarg del temps i de la densitat cel·lular

*Anàlisi, en les línies FOP's 463, 465, 466 i 995, de l'expressió endògena de gremlin normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1: electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

A continuació s'il·lustren els resultats per l'expressió endògena de gremlin normalitzada amb GAPDH obtinguts en quatre línies FOP diferents amb creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5).



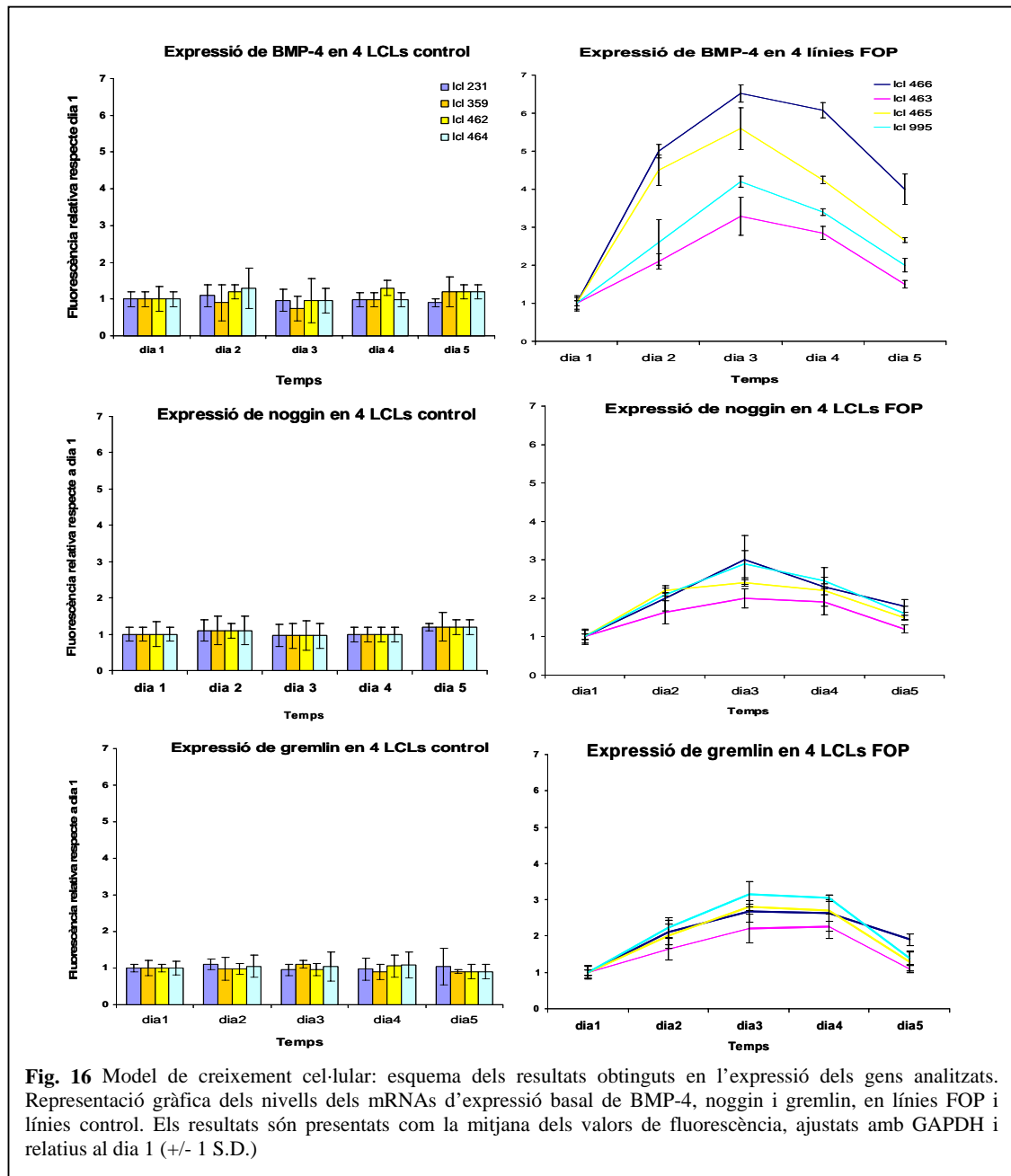
La fig.14 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de gremlin i GAPDH analitzats en les línies FOP 466, 465, 995 i 463. Els productes de GAPDH i gremlin ronden als 500 i 350pb respectivament. A simple vista podem detectar diferències entre les línies control.



En la representació gràfica dels nivells mitjans dels mRNAs d'expressió de gremlin de les línies FOP 463, 465, 466 i 995, corresponents als dies 1-5 s'observa que les línies FOP tenen varicions en l'expressió de gremlin al llarg del temps i de la densitat cel·lular en relació a les línies controls. L'expressió de gremlin, igual que el vist per noggin, incrementa progressivament, aconseguint el seu valor màxim en el dia 3 i disminueix quan les condicions de cultiu deixen de ser òptimes. Les línies FOP sembla que tampoc són capaces de mantenir els valors de gremlin constants, en relació a la densitat cel·lular igual que per BMP-4. Aquest patró d'expressió s'observa en totes les línies FOP.

Expressió endògena, en línies control 231, 359, 462 i 464 i en línies FOP 463, 465, 466 i 995, de BMP-4, noggin i gremlin, normalitzada amb GAPDH i arbitràriament ajustada al dia 1: representació gràfica de tots els valors de llum.

A continuació presentem un esquema dels resultats obtinguts per BMP-4, noggin i gremlin tant en línies FOP com en línies control.



**Fig. 16** Model de creixement cel·lular: esquema dels resultats obtinguts en l'expressió dels gens analitzats. Representació gràfica dels nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4, noggin i gremlin, en línies FOP i línies control. Els resultats són presentats com la mitjana dels valors de fluorescència, ajustats amb GAPDH i relatius al dia 1 (+/- 1 S.D.)



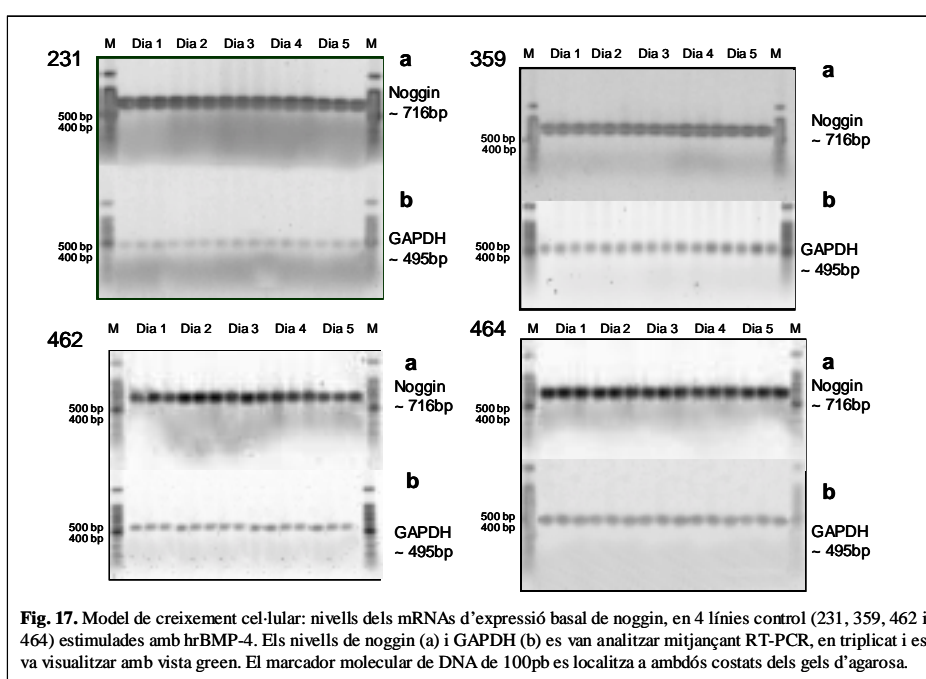
A l'esquerra de la fig. 16 s'il·lustren els valors, obtinguts en línies control, de BMP-4, noggin i gremlin relatius al dia 1 de la corba de creixement i normalitzats amb GAPDH. Aquestes línies mantenen l'expressió de BMP-4, noggin i gremlin constant al llarg del temps. A la dreta de la fig.16 es mostren els resultats d'expressió per BMP-4, noggin i gremlin en línies FOP. A diferència del que s'observa en línies d'individus sans, BMP-4 incrementa la seva expressió al llarg del temps i la màxima expressió s'obté en el dia 3 coincidint també amb una major densitat cel·lular. Cada línia cel·lular FOP presenta el mateix patró d'expressió, tot i que existeix variabilitat d'expressió de BMP-4 en les diferents línies FOP. Noggin i gremlin presenten el mateix perfil d'expressió que BMP-4 tant en línies control com en línies FOP, però en aquestes últimes l'expressió dels antagonistes es menys intensa que l'observada per BMP-4.

*Anàlisi de l'expressió de noggin i gremlin en cèl·lules limfoblastoïdes (quatre línies FOP i quatre línies control) estimulades amb proteïna BMP-4 recombinant humana (rhBMP-4)*

Els nivells dels mRNAs d'expressió basal de noggin i gremlin, analitzats en el model de creixement cel·lular, tenien patrons d'expressió similars, tant en línies FOP com en línies control, als observats per BMP-4. Sorprenentment, l'expressió dels antagonistes en línies FOP sembla ser de dues a tres vegades menys intensa que l'expressió de BMP-4, mentre que en controls es mantenen semblants als nivells de BMP-4. Aquests resultats juntament amb la variabilitat trobada de BMP-4 en ambdós tipus cel·lulars (FOP/control), clarament indiquen que el defecte molecular en individus FOP condueix a una desregulació de BMP-4 causada pels seus antagonistes noggin i gremlin o a una alteració de la resposta de retroalimentació negativa entre BMP-4 i els seus antagonistes gremlin i noggin. Per a reforçar aquesta hipòtesi, vàrem analitzar els antagonistes noggin i gremlin en LCLs induïdes amb proteïna BMP-4 recombinant humana (rhBMP-4), aquests anàlisis es va realitzar sotmetent a les LCLs a les condicions de creixement cel·lular sincronitzat.

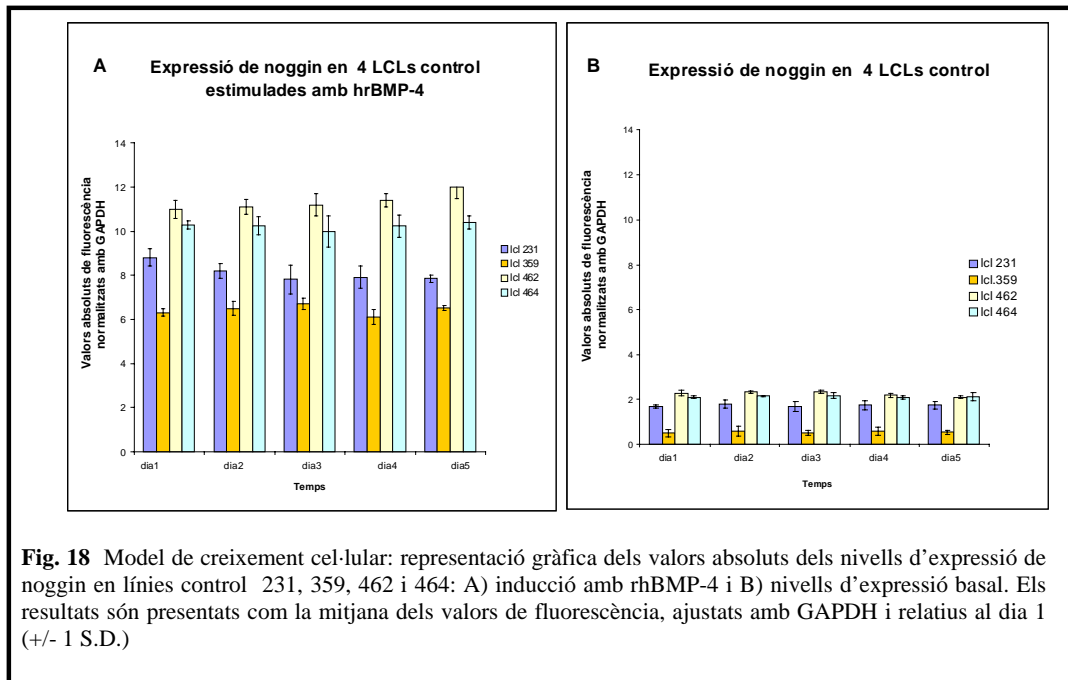
*Model de creixement cel·lular sincronitzat: anàlisi de l'expressió de noggin en línies LCLs control 231, 359, 462 i 464 estimulades amb rhBMP-4: electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

A continuació es presenten els resultats obtinguts per l'expressió de noggin normalitzada amb GAPDH realitzat en quatre línies control diferents estimulades amb hrBMP-4. A les cèl·lules també se'ls va aplicar el mateix model de creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5) i els resultats s'expressen en triplicat per l'anàlisi estadística.



La fig.17 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de noggin i GAPDH analitzats en les línies control 231, 359, 462 i 464. Els productes de BMP-4 i GAPDH ronden els tamanys de 500 i 700pb respectivament i es localitzen al voltant de la posició electroforètica del marcador molecular de 600 pb.

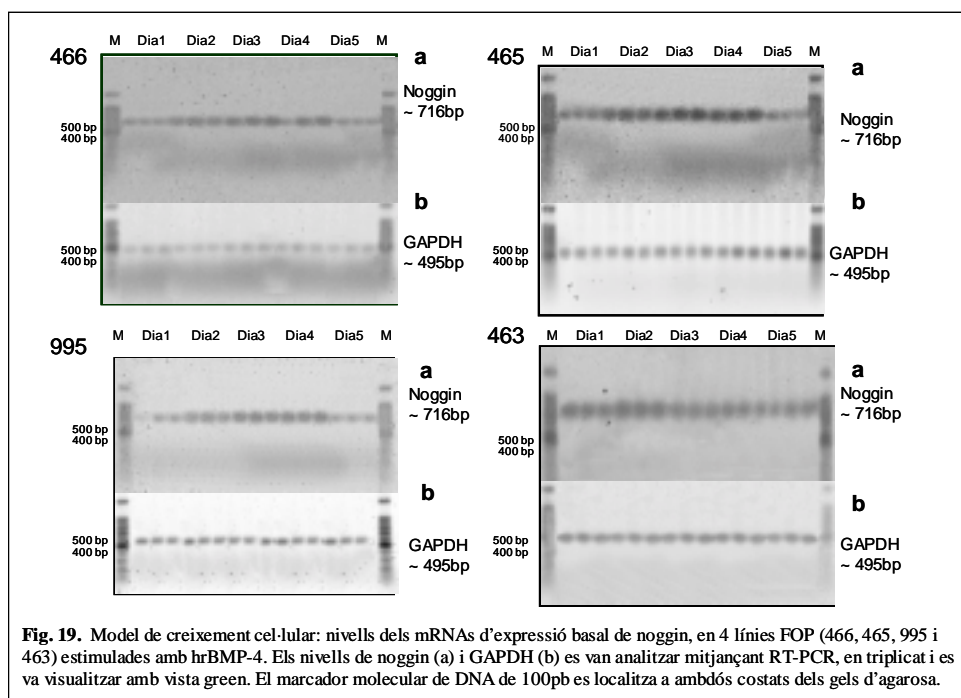
A la fig.18 es troben representats els valors absoluts mitjans dels mRNAs d'expressió basal de noggin (fig.18B) i els valors absoluts mitjans d'expressió de noggin sota estimulació amb rhBMP-4 (fig.18A), analitzats del dia 1 al dia 5 corresponents a la corba de creixement cel·lular de les línies control 231, 359, 462 i 464.



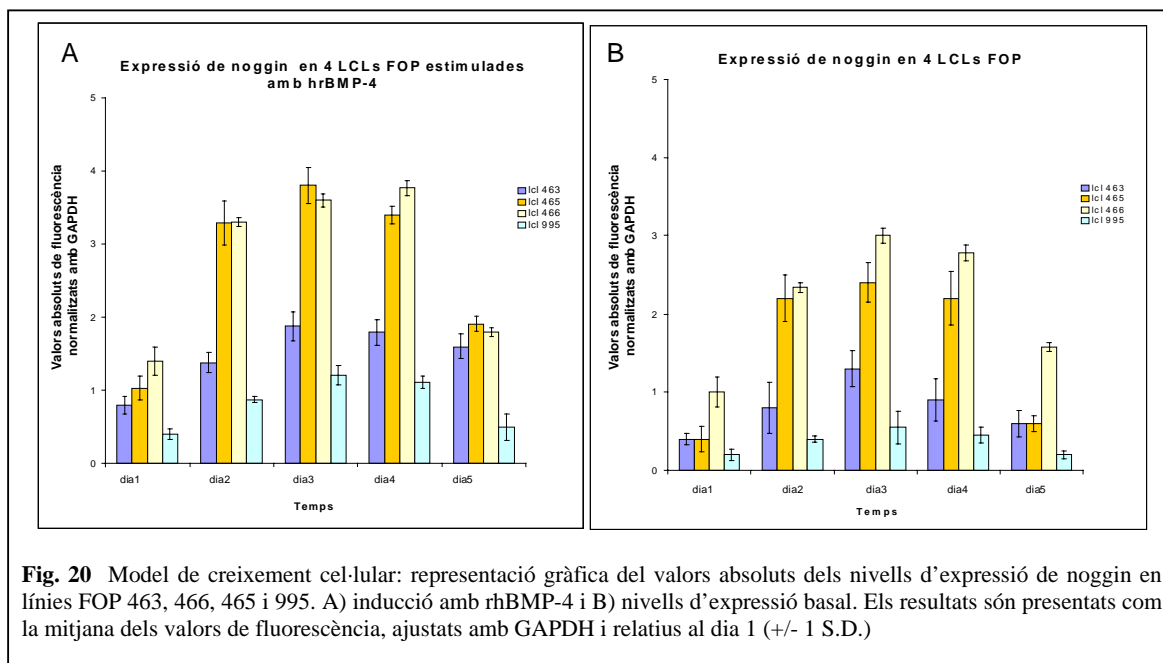
Com es mostra a la fig.18A, l'expressió de noggin augmenta dràsticament en resposta rhBMP-4. En algunes línies control existeix un increment de l'expressió de noggin, fins a deu vegades respecte a línies control no induïdes. Aquest augment tendeix a ser constant en tots els intervals de temps analitzats en relació a l'expressió basal de cada línia en concret. Tant en condicions induïdes com en condicions no induïdes les línies control tenen el mateix perfil d'expressió de noggin en relació a la densitat cel·lular (fig.18) ja que en els dos casos es mantenen els valors de noggin constants al llarg del temps.

*Model de creixement cel·lular sincronitzat: anàlisi de l'expressió de noggin en LCLs FOP 463, 465, 466 i 995 estimulades amb rhBMP-4. Electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

A continuació es presenten els resultats obtinguts per l'expressió de noggin normalitzada amb GAPDH realitzat en quatre línies FOP diferents estimulades amb hrBMP-4. A les cèl·lules també se'ls va aplicar el mateix model de creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5) i els resultats s'expressen en triplicat per a l'anàlisi estadística.



La fig.19 mostra les senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de noggin i GAPDH analitzats en les línies FOP 463, 465, 466 i 995.

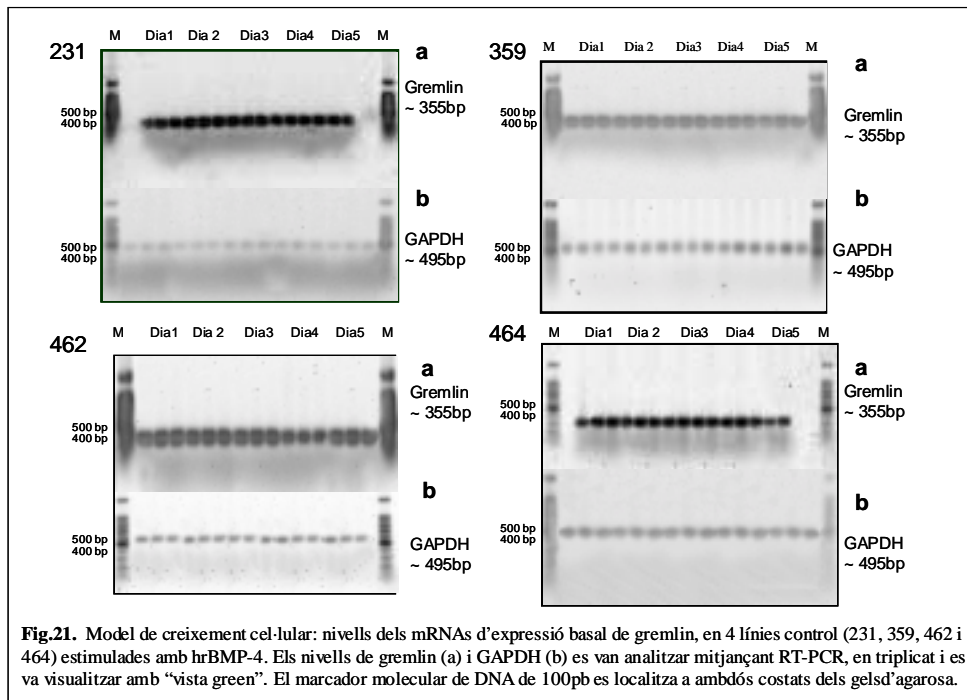


A la fig.20 s'hi troben representats els valors absoluts mitjans dels mRNAs d'expressió basal de noggin (fig.20B) i els valors absoluts mitjans d'expressió dels

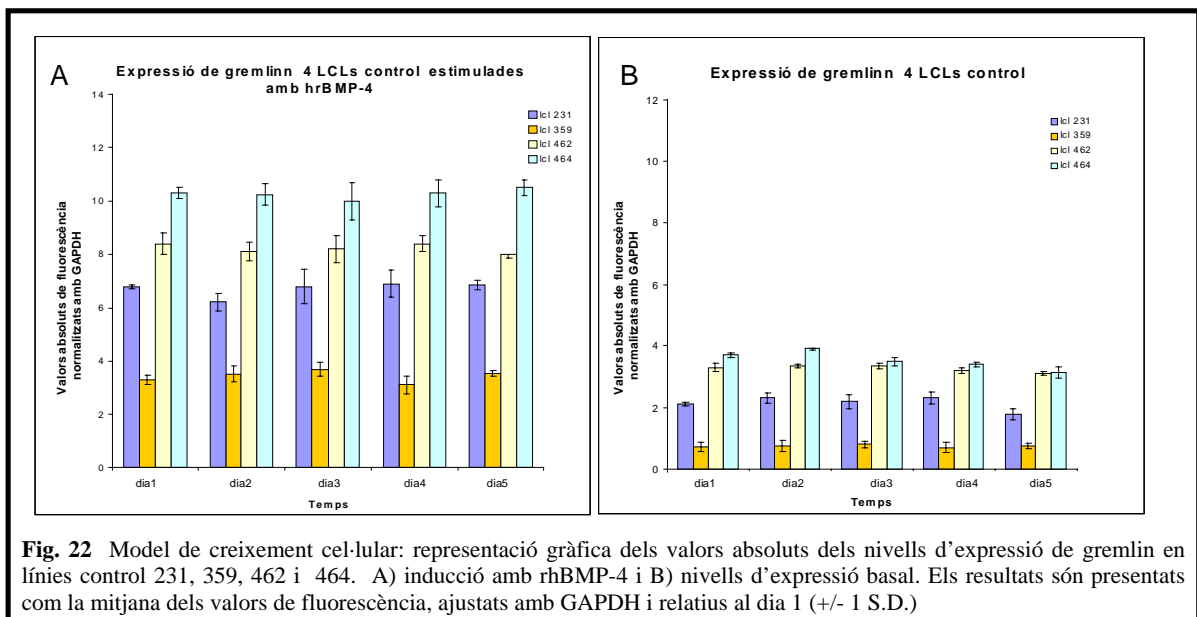
mRNAs de noggin després d'estimulació amb rhBMP-4 (fig.20A), analitzats del dia 1 al dia 5 corresponents a la corba de creixement cel·lular de les línies FOP 463, 465, 466 i 995. Com es mostra en la fig.20A, l'expressió de noggin augmenta en resposta a rhBMP-4. Les línies FOP estimulades experimenten un increment en l'expressió de noggin, de dues a tres vegades, respecte als valors obtinguts en línies FOP no tractades, però la resposta és més atenuada que l'experimentada per cèl·lules control tractades. Tant en condicions induïdes com en condicions no induïdes les línies FOP tenen el mateix perfil d'expressió de noggin (fig.20), ja que en ambdues condicions augmenta l'expressió de noggin progressivament al llarg del temps obtenint la màxima expressió en el dia 3. La variabilitat d'expressió de noggin que s'observa en línies FOP sota condicions estimulades ve determinada per l'expressió basal de noggin en cada una de les línies.

*Model de creixement cel·lular sincronitzat: anàlisi, en les línies control 231, 359, 462 i 464 estimulades amb rhBMP-4, de l'expressió de gremlin normalitzada amb GAPDH. Electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum*

A continuació es presenten els resultats obtinguts per l'expressió de gremlin normalitzada amb GAPDH realitzat en quatre línies control diferents estimulades amb hrBMP-4. A les cèl·lules també se'ls va aplicar el mateix model de creixement cel·lular sincronitzat (anàlisi realitzat del dia 1 al dia 5) i els resultats s'expressen en triplicat per l'anàlisi estadística.



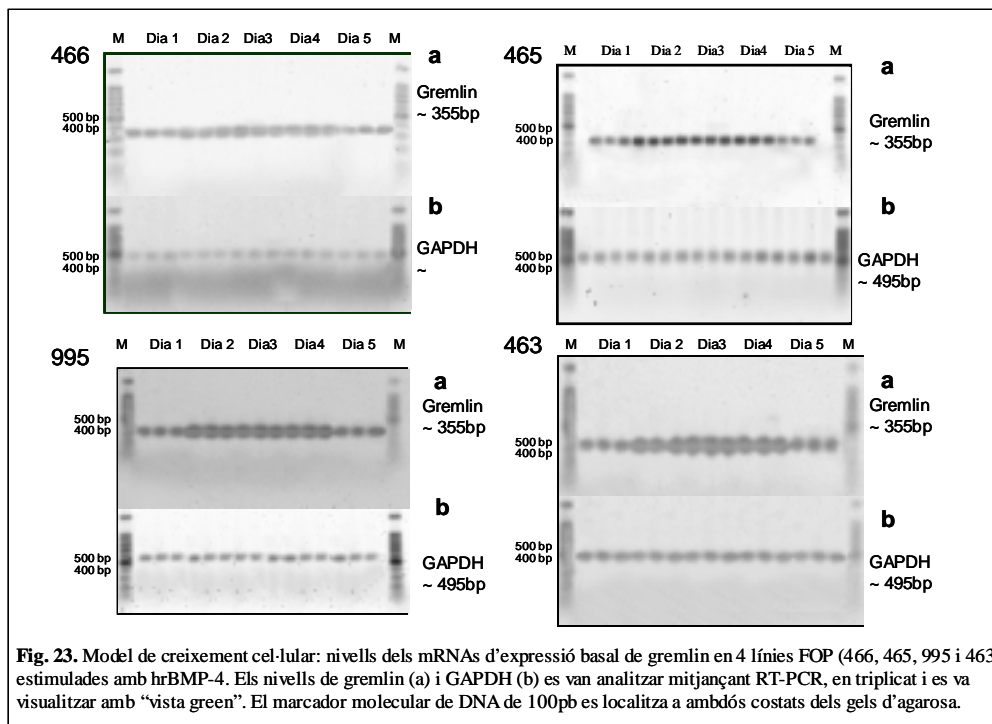
La figura. 21 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de gremlin i GAPDH analitzats en les línies control 231, 359, 462 i 464. Els productes de BMP4 i GAPDH ronden els 500 i 350pb respectivament.



A la fig.22 s'hi troben representats els valors absoluts mitjans dels mRNAs d'expressió basal de gremlin (fig.22B) i els valors absoluts mitjans d'expressió dels mRNAs de gremlin sota inducció amb rhBMP-4 (fig.22A), analitzats del dia 1 al dia 5 corresponents a la corba de creixement cel·lular de les línies control 2-31, 359, 462 i 464. Com es mostra en la fig.22A, l'expressió de gremlin augmenta considerablement en resposta a rhBMP-4. En algunes línies control existeix un increment en l'expressió de gremlin fins a vuit vegades respecte a línies control no tractades. Aquests augment tendeix a ser constant en tots els intervals de temps analitzats en relació a l'expressió basal de cada línia en concret. Tant en condicions induïdes com en condicions no induïdes les línies control tenen el mateix perfil d'expressió de gremlin (fig.22) ja que ambdues condicions mantenen els valors de gremlin constants al llarg del temps.

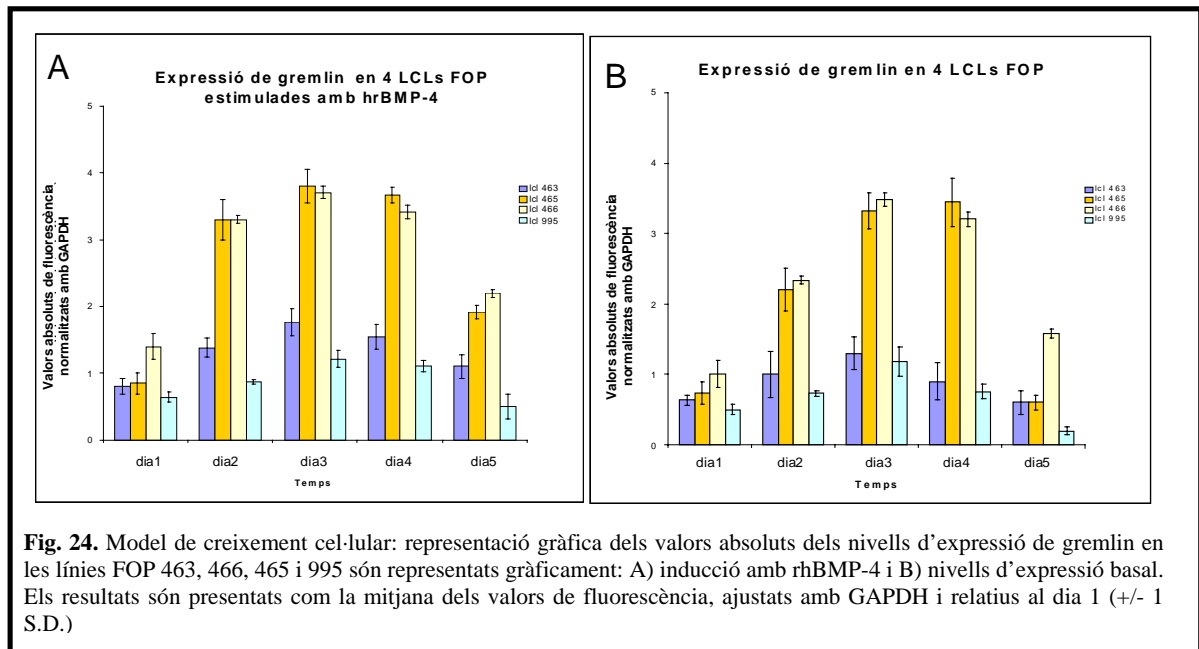
Anàlisi, en línies FOP 463, 465, 466 i 995 estimulades amb rhBMP-4, de l'expressió de gremlin normalitzada amb GAPDH: electroforesi amb gel d'agarosa i representació gràfica dels valors de llum.

A continuació es presenten els resultats obtinguts per l'expressió de gremlin normalitzada amb GAPDH realitzat en 4 línies FOP diferents estimulades amb hrBMP-4.



La fig. 23 mostra els senyals de llum dels productes de PCR corresponents als gens de gremlin i GAPDH analitzats en les línies FOP 463, 465, 466 i 995. Aquests valors lumínics es van analitzar com s'ha descrit en materials i mètodes i a continuació són representats gràficament:



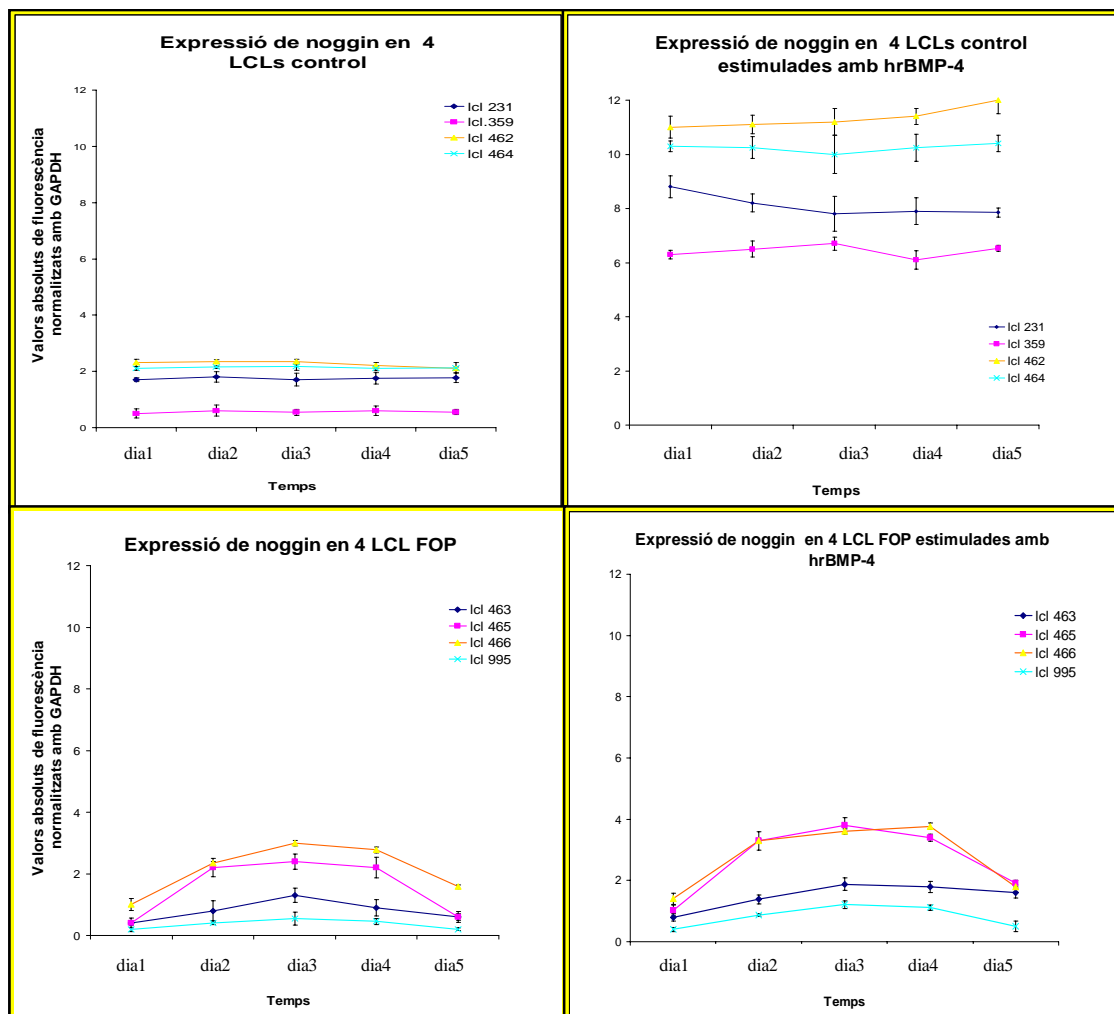


A la fig.24 s'hi troben representats els valors absoluts mitjans dels mRNAs d'expressió basal de gremlin (fig.24B) i els valors absoluts mitjans d'expressió dels mRNAs de gremlin sota inducció amb rhBMP-4 (fig.24A), analitzats del dia 1 al dia 5 corresponents a la corba de creixement cel·lular de les línies FOP 463, 465, 466 i 995. Com es demostra a la fig.24A, l'expressió de gremlin augmenta en resposta a rhBMP-4. Les línies FOP estimulades experimenten poc increment en l'expressió de gremlin respecte als valors de línies FOP no tractades. La resposta és significativament més atenuada que l'experimentada per cèl·lules control tractades. Tant en condicions induïdes com en condicions no induïdes les línies FOP tenen el mateix perfil d'expressió de gremlin (fig.24), ja que ambdues condicions augmenten l'expressió de gremlin progressivament al llarg del temps obtenint la màxima expressió en el dia 3. La variabilitat d'expressió de gremlin que s'observa en línies FOP sota condicions estimulades ve determinada per l'expressió basal de noggin de cada línia específica.

Anàlisi, en línies control 231, 359, 462 i 464 i en línies FOP 463, 465, 466 i 995 estimulades amb rhBMP-4, de l'expressió de gremlin i noggin normalitzada amb GAPDH: representació gràfica dels valors lumínics.

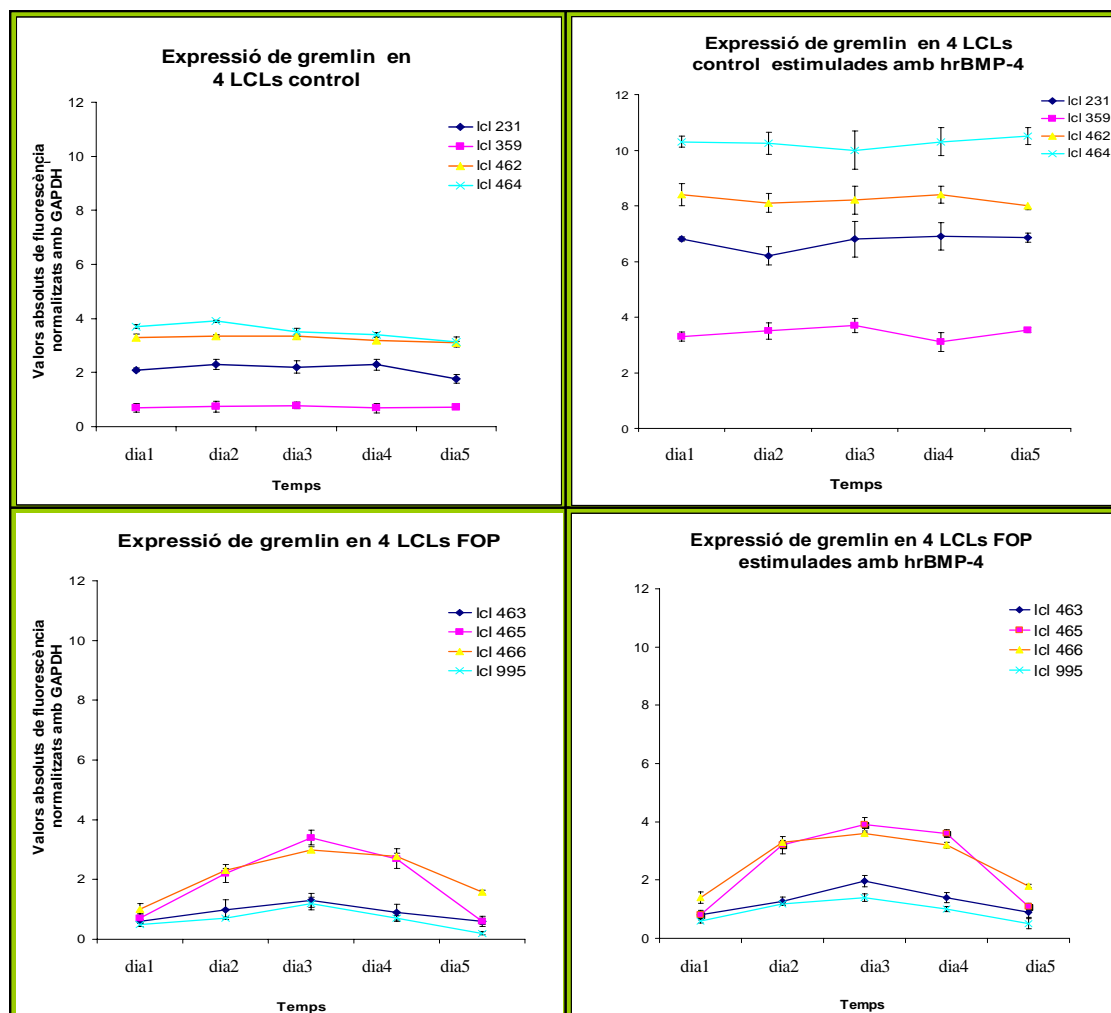
A continuació presentem un esquema dels resultats obtinguts per noggin i gremlin tant en línies FOP com en línies control estimulades amb rhBMP-4.

Noggin:



**Fig. 25a** Model de creixement cel·lular: esquema dels valors absoluts en línies no tractades i en línies tractades amb rhBMP-4. Representació gràfica dels mRNAs d'expressió basal de noggin, en línies FOP i en línies control. Els resultats són presentats com la mitjana dels valors de fluorescència, ajustats amb GAPDH i relatius al dia 1 (+/- 1 S.D.)

Gremlin



**Fig. 25b** Model de creixement cel·lular: esquema dels valors absoluts en línies no tractades i en línies tractades amb rhBMP-4. Representació gràfica dels mRNAs d'expressió basal de gremlin, en línies FOP i en línies control. Els resultats són presentats com la mitjana dels valors de fluorescència, ajustats amb GAPDH i relatius al dia 1 (+/- 1 S.D.)

A la figura 25a i a la figura 25b es presenten els valors d'expressió absoluts per als gens de noggin i de gremlin respectivament (els valors són normalitzats amb GAPDH), analitzats en línies FOP i línies control tant en condicions normals com en condicions induïdes. Les línies control responen intensament al tractament amb rhBMP-4 mostrant, respecte les línies no tractades, nivells d'expressió alts per noggin i gremlin; mentre que línies FOP responen al tractament de forma atenuada. Aquesta resposta observada en les línies cel·lulars, siguin controls o FOPs, ve marcada pels valors inicials de noggin i gremlin expressats en cada una de les línies cel·lulars.

## Discussió

Els morfogens són molècules senyalitzadores que organitzen grups de cèl·lules en estructures cel·lulars ben definides. Aquests morfogens formen gradients de concentracions que, provinents de fonts localitzades, determinen la predisposició i les característiques de les cèl·lules que els perceben (Cooke, 1995; Neumann et al., 1997). Un gradient morfogenètic és un concepte important en biologia del desenvolupament, perquè descriu un mecanisme pel qual l'emissió d'un senyal, provinent d'una part de l'organisme pot determinar la localització, la diferenciació i la caracterització de moltes cèl·lules circumdants (Neumann et al., 1997., Podos et al., 1999; Gurdon et al., 2001).

Quan un senyal s'uneix al seu receptor es desencadena un camí de transducció intracel·lular específic que condueix a canvis transcripcionals i/o postrcripcionals en cèl·lules receptores. Finalment, aquests camins de transducció del senyal regulen una varietat de desenllaços cel·lulars, que inclouen canvis en les característiques cel·lulars i respostes morfogenètiques (Perrimon et al., 1999). Aquí, no només és important limitar les respostes a un subconjunt de cèl·lules dins d'òrgans o teixits específics, sinó també generar respostes distintes als diferents llinars de senyals percebuts. En aquest sentit, els mecanismes de retroalimentació solen fer sovint aquestes funcions (Timothy et al., 2000).

Aquests mecanismes de retroalimentació negativa ofereixen un sistema efectiu, al llarg del temps, per acabar, limitar o modular respostes cel·lulars a senyals instructives dins de camps cel·lulars (Perrimon et al., 1999; Miyazono, 2000; Timothy et al., 2000). Existeix una clara evidència que alguns lligands secretats actuen com a morfogens, formant gradients d'ampli ventall que desencadenen respostes diferencials dins d'un camp de cèl·lules equivalents (Jones et al., 1998). Mitjançant un procés regulat meticulosament, l'esqueletogènesi embrionària humana transforma cèl·lules mesenquimàtiques en sistemes orgànics articulats ben definits espacialment, com ara el cartílag, l'os i els teixits hematopoiètics (Karsenty et al., 1999, Ducky et al., 1998). Un dels enigmes per resoldre en la biologia de l'esquelet fa referència als senyals moleculars que són necessaris i suficients per induir una adequada formació de l'esquelet. (Karsenty

*et al.*, 1999). Sota condicions normals d'esqueletogènesi, un augment en la síntesi i activitat del morfogen BMP-4, es troba finament regulat per un nombre de senyals negatius que inclouen –però no es limiten a– antagonistes extracel·lulars de BMP-4 tals com noggin, gremlin, follistatin i chordin, generats per mecanismes de retroalimentació complexos (*Brunet et al.*, 1998; *Perrimon et al.*, 1999).

Els diferents nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 i dels antagonistes gremlin, noggin, follistatin i chordin, com també els nivells induïts amb hrBMP-4 d'aquests antagonistes, analitzats en diferents LCLs humanes (FOP/control) ens va permetre postular que la resposta dels antagonistes noggin i gremlin en LCLs transformades d'individus FOP poden trobar-se atenuades en relació a l'increment de BMP-4 en aquestes LCLs. Aquests resultats també revelen una possible pèrdua del mecanisme de retroalimentació negativa pel qual l'activitat de BMP-4 es troba alterada en els individus FOP. En línies FOP sota condicions estimulants, com s'observava en la fig.3 del treball 1, existeix una enorme variabilitat dels nivells d'mRNA de BMP-4, amb desviacions estàndard molt grans ( $10 \pm 8$ ). Aquesta variabilitat també s'observa en els nivells basals de noggin i gremlin ( $3 \pm 1.5$ ,  $2 \pm 1.8$  respectivament) fig.3 treball 1.

L'origen d'aquesta variabilitat en línies FOP no es coneix. Els limfòcits immortalitzats amb el virus Epstein-Barr poden expressar, “*in vivo*”, gens que normalment no es troben expressats en limfòcits (*Liebowitz et al.*, 1993). Així doncs, la variabilitat en l'expressió de BMP-4 en LCLs de pacients amb FOP podria ser el resultat de la transformació amb el virus Epstein-Barr (*Shafritz et al.* 1996). Tot i així, BMP-4 no va experimentar aquesta variabilitat en línies cel·lulars transformades control tractades de forma idèntica, indicant que la transformació amb EBV no deu ser-ne la causa. Una altra possibilitat, podria residir en que cada cèl·lula específica, sigui FOP o control, respon a l'expressió de BMP-4 de forma diferent segons el seu contingut genètic (*Connor et al.*, 1993; *Cohen et al.*, 1993). Això no s'observa en línies control tractades amb les mateixes condicions de cultiu potser perquè les cèl·lules escollides contenen, més o menys, un equipament genètic semblant. Una altra possibilitat podria recaure en una sincronització aberrant 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 de la formació de gradients (Bostrom et al., 1995). Com més gran sigui el nombre de cèl·lules expressant BMP-4 més probable és que es creïn més gradients de BMP-4 capaços de desencadenar el camí de senyalització de les BMPs. Finalment, la variació que s'ha observat podria ser el resultat de la metodologia de PCR emprada.

Els resultats obtinguts en LCLs d'individus FOP amb una variabilitat enorme d'expressió en alguns dels gens analitzats, van ser de nou avaluats mitjançant tècniques d'expressió gènica en un model de creixement cel·lular ben sincronitzat. L'expressió induïda dels antagonistes gremlin i noggin amb hrBMP-4 varen ser també analitzats en aquest model. També es va analitzar, usant les mateixes condicions, els valors d'expressió de BMP-4 de totes les línies quan l'expressió de BMP-4 i el creixement cel·lular, en les diferents LCLs, eren màxims, fets que es donaven en el dia 3 de la corba de creixement cel·lular. Els resultats presentats en aquest treball demostren que els nivells d'mRNA d'expressió basal de BMP-4 tenen una variabilitat d'expressió marcada (valors absoluts de fluorescència normalitzats amb GAPDH: LCLs control: 4, 5, 1 i 3, LCLs FOP: 6, 0.2, 2.7, 2) tant en LCLs FOP com en LCLs normal, com es mostra a la fig.3.

Aquest resultat fou totalment inesperat ja que la sobreexpressió de BMP-4 havia estat majoritàriament documentada en LCLs d'individus FOP (Olmsted et al., 1996; Shafritz et al., 1996; Gannon et al., 1997; Lanchoney et al., 1998). Com a contrast a aquests resultats, va ser identificat un patró ben definit en els nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 en línies FOP no observat en línies control. Les línies control tendeixen a mantenir els nivells de BMP-4 similars als valors observats en el primer dia de la corba de creixement. En canvi les línies FOP són incapaces d'equilibrar l'expressió de BMP-4 respecte el primer dia, augmentant l'expressió de BMP-4 en relació a la densitat cel·lular. Aquesta troballa observada en quatre LCLs FOP suggereix que BMP-4 no es troba sobreexpressada sinó que es troba desregulada, donant suport als resultats que advocaven per una alteració del mecanisme de retroalimentació negativa de BMP-4 i els seus antagonistes noggin i gremlin en una malaltia d'osteogènesi humana.

Els nivells dels mRNAs d'expressió basal de noggin i gremlin es varen analitzar en el mateix model cel·lular i es va observar que noggin i gremlin tenen un perfil d'expressió semblant a l'observat per BMP-4 en línies FOP però amb un grau inferior d'intensitat. L'expressió dels antagonistes en línies FOP sembla ser de dues a tres vegades inferior comparat amb l'expressió de BMP-4, mentre que en les línies control l'expressió es manté de forma similar.

Tal com es plantejava a les nostres hipòtesis, en aquest estudi hem corroborat que una alteració en l'equilibri entre un morfogen de l'esquelet i els seus antagonistes pot ser l'efecte directe o indirecte de mutacions en el gen responsable de la fibrodisplàsia ossificadora progressiva. En el mateix model de creixement cel·lular estudis posteriors en l'anàlisi d'expressió dels antagonistes noggin i gremlin en LCLs tractades amb hrBMP-4 van revelar que els valors absoluts dels mRNAs d'ambdós antagonistes en LCLs control, incrementaven dràsticament respecte a l'expressió basal d'aquests. L'increment es va observar en cada una de les línies analitzades. Com a contrast, en totes les línies FOP es va observar una resposta debilitada dels antagonistes gremlin i noggin en relació a la seva expressió basal. La forta resposta de gremlin i noggin a la inducció amb hrBMP4 en LCLs control, independentment del creixement i de la densitat cel·lular, comparada amb la resposta feble en línies FOP, consolida la hipòtesi que la mutació causant de la malaltia podria afectar algun factor que interacciona amb la senyalització de les BMPs. Aquest factor podria ser un gen codificador d'una molècula essencial en l'activació de gremlin i noggin, limitant la seva interacció sobre BMP-4.

*De Robertis et al., 2000* van demostrar que l'activitat del gradient de BMP-4 en embrions de vertebrats es veu determinada principalment per gradient oposats de chordin i altres molècules, essent l'activitat de chordin determinada per la proteasa "xolloid". De la mateixa forma, l'atenuada variabilitat d'expressió de gremlin i noggin observada en línies FOP, en resposta a rhBMP4, pot ser la resposta al patró d'expressió de BMP-4 observat en línies FOP, i podria explicar també l'existència de múltiples variants de la

malaltia, des de formes severes fins a variants més suaus segons l'expressió del gen FOP (*Connor et al., 1993; Cohen et al., 1993*).

Els diferents tipus de mutacions en el gen FOP poden tenir efectes diferents en l'expressió de la malaltia en termes de formació de gradients de BMP-4, segons cada localització als diferents teixits. Aquests gradients de BMP-4 vindrien regulats, al seu torn, per una acció inhibidòria dels gradients de noggin i gremlin que també estan alterats. A altes concentracions, la BMP-4 actua com a morfogen (*Olmsted et al., 1996; Shafritz et al. 1996; Gannon et al., 1997; Lanchoy et al., 1998*) capaç d'activar la seva pròpia expressió mesenquimàtica (*Vainio et al., 1993*). Una atenuada resposta o defecte en el mecanisme autocrí de retroalimentació negativa entre BMP-4 i els seus antagonistes permetria una formació més ràpida de gradients de BMP-4 que iniciarien processos endocondrals en tipus cel·lulars específics. Com més gran fos el gradient i nombre de cèl·lules mesenquimàtiques pluripotents receptores d'aquests senyals, més robusta seria la reacció que conduiria al desenvolupament de lesions preòssies fibropoliferatives.



