

Part I: Discussió final

Les proteïnes morfogenètiques d'os, una família d'agents osteogènics potents, que pertanyen a la superfamília de pèptids TGF- β , indueixen l'osteogènesi endocondral i la reparació de fractures (Wozney *et al.*, 1988; Kingsley, 1994; Hogan 1996a, 1996b; Massagué 2001). Les cèl·lules de llinatge osteoblàstic expressen principalment BMP-2, -4, i -6 (Ghosh-Choudhury *et al.*, 1994; Boden *et al.*, 1994; Pereira *et al.*, 2000). Les BMPs realitzen una funció central en la diferenciació de cèl·lules mesenquimàtiques a llinatges osteogènics i potencien la funció diferenciada dels osteoblast (Hughes *et al.*, 1995; Thies *et al.*, 1992; Gazzero *et al.*, 1998). Aquestes substàncies actuen per difusió de manera "concentració-depenent" per determinar les característiques cel·lulars en l'embriogènesi i en la regeneració d'os (Jones *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 1998). Les BMPs, com altres factors de creixement, són regulades a nivell d'expressió i activitat funcional i els efectes de les BMPs poden ser modulats per un grup de polipèptids que antagonitzen la seva acció (Pereira *et al.*, 2000). Dins dels polipèptids que antagonitzen l'acció de les BMP, a través de complexos sistemes de retroalimentació negativa, s'hi troben noggin, follistatin, chordin i la família de gens DAN/cerberus, els quals estan compresos pel inductor del cap, cerberus i dels supressors de tumors DAN (Valenzuela *et al.*, 1995; Zimmerman *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1998; Piccolo *et al.*, 1998; Bouwmeester *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1998, Pearce *et al.*, 1999), que acaben, limiten i modulen les respostes cel·lulars de senyals instructius dins de camps cel·lulars (Perrimon *et al.*, 1999; Miyazono, 2000; Timothy *et al.*, 2000).

Mitjançant un procés meticulosament regulat, l'esquelatogènesi embrionària humana transforma cèl·lules mesenquimàtiques en sistemes orgànics articulats ben definits espacialment com són el cartílag, l'os i els teixits hematopoètics (Karsenty *et al.*, 1999; Ducy *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). En condicions normals d'esquelatogènesi, un augment en l'elaboració i activitat del morfogen BMP-4 es troba finament regulat per un nombrós grup de senyals negatius que inclouen –però no es limiten a– antagonistes

extracel·lulars de BMP-4 com ara noggin, gremlin, follistatin i chordin, generats per mecanismes de retroalimentació complexos (Perrimon *et al.*, 1999). En el nostre model (Fig. 4, esquerra), aquesta tensió dinàmica entre inducció i inhibició estableix un procés rigorosament controlat que regula l'aparició d'elements esquelètics en l'espai i el temps (Brunet *et al.*, 1998).

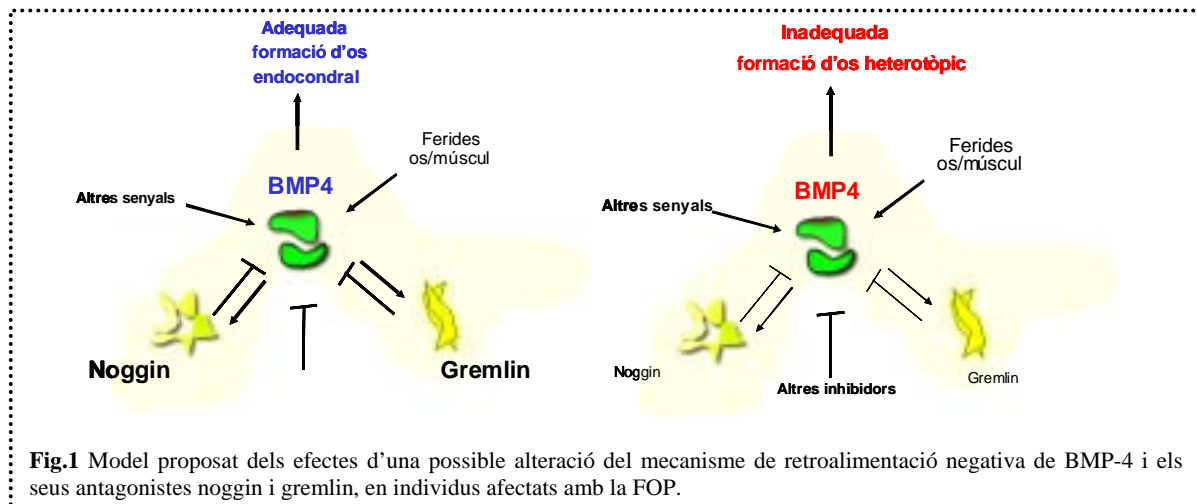


Fig.1 Model proposat dels efectes d'una possible alteració del mecanisme de retroalimentació negativa de BMP-4 i els seus antagonistes noggin i gremlin, en individus afectats amb la FOP.

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

Per avaluar variacions en l'expressió gènica dels antagonistes que poden provocar nivells alts de BMP-4 en línies cel·lulars transformades respecte línies control transformades, es varen analitzar els nivells d'expressió basal i induïts (amb rhBMP4) dels antagonistes de BMP-4 (noggin, follistatin, gremlin i chordin) coneguts per tenir funcions importants en el bloqueig de processos de desenvolupament (Perrimon *et al.*, 1999, Miyazono, 2000; Timothy *et al.*, 2000; Piccolo *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 1999). També es varen analitzar els nivells d'expressió de BMP-4 en diferents línies control.

Usant 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 (*Kaplan et al., 1993b; Kaplan et al., 1998; Gannon et al., 1998*). Els diferents nivells dels mRNA d'expressió basal de BMP-4 i dels antagonistes de BMP-4 (gremlin, noggin, follistatin i chordin) i els nivells d'expressió induïts amb hrBMP-4 d'aquests antagonistes, analitzats en diferents LCLs (FOP/control), ens va permetre postular que la resposta dels antagonistes noggin i gremlin en LCLs d'individus FOP pot trobar-se atenuada en relació a l'exentuat increment de BMP-4 en aquestes línies. 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. Si la tensió dinàmica entre inducció i inhibició es troba alterada o deixa de ser un procés rigorosament controlat pot conduir a un sobtada i descontrolada osteogènesi heterotòpica endocondral característica de FOP i altres malalties relacionades (*Connor et al., 1993; Kaplan et al., 1993a; Smith, 1998*) (fig.4, Dreta).

Tal com els nostres estudis preliminars havien suggerit, els resultats subsequents van corroborar que una alteració en l'equilibri d'un morfogen esquelètic i als seus antagonistes pot ser la causa directa o indirecta de mutacions en el gen responsable de la fibrodisplasia ossificadora progressiva. Es va demostrar que els nivells dels mRNAs d'expressió basal de BMP-4 tenien una variabilitat marcada (valors absoluts de fluorescència normalitzats amb GAPDH: en LCLs control: 4, 5, 1 i 3; en LCLs FOP: 6, 0.2, 2.7, 2) tant en LCLs FOP com en LCLs control, com es mostra en la fig.3 del treball 1. Aquest resultat fou totalment inesperat ja que la sobreexpressió de BMP-4 havia estat majoritàriament documentada en LCLs d'individus afectats amb 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 dels 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 al 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 està sobreexpressada sinó que probablement es troba desregulada, donant suport als resultats que advocaven a una alteració del mecanisme de retroalimentació negativa de BMP-4 i els seus antagonistes noggin i gremlin.

Els nivells basals de noggin i gremlin analitzats en el mateix model cel·lular, permeten observar que noggin i gremlin tenen un perfil d'expressió semblant a l'observat per BMP-4 en línies FOP però amb un grau d'intensitat inferior. La forta resposta de gremlin i noggin a la inducció amb hrBMP4 en LCLs control, independentment del creixement i de la densitat cel·lular i comparada amb 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 (un factor de transcripció, un mediador citoplasmàtic, un receptor.. etc), limitant la seva interacció sobre BMP-4.

No obstant, per tal de validar aquests supòsit, s'haurien d'avaluar els nivells proteínics de gremlin i noggin ja que no podem descartar modificacions a nivell postranscripcional. Petits canvis postranscripcionals poden afectar en gran mesura als valors funcionals proteínics de gremlin i noggin. *De Robertis et al., 2000* van demostrar que l'activitat del gradient de BMP-4 en embrions de vertebrats es veu determinat principalment per gradients oposats de chordin i altres molècules, essent l'activitat de chordin al mateix temps 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 rhBMP-4, podria ser la causa desencadenant del patró d'expressió observat per BMP-4 en línies FOP i també podria explicar 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, els quals també estan alterats. Aquests gradients podrien ser claus en la interpretació que cèl·lules mare pluripotents fan a l'hora de desencadenar una reacció, més robusta o més suau, de formació heterotòpica d'os. Per exemple, tot i que noggin té una expressió de teixit molt àmplia, l'única manifestació provocada per una mutació puntual en el gen noggin es troba restringida a una formació anormal de les articulacions. Una primera explicació d'aquest fet seria l'existència de diferències de dosis, teixit-específiques, dels membres de la família TGF- β , necessàries per l'activació del camí de transducció de senyal. Una segona explicació és que existirien mecanismes de redundància funcional per a la creació de gradients de membres de la família TGF- β (Piccolo *et al.*, 1996; Fainsod *et al.*, 1997).

Karen et al., 2001 van generar ratolins deficients en múltiples lligands i/o receptors de la família de les BMPs. Els fenotips dels dobles mutants suggerien que les BMPs tenen funcions solapants. Sorprenentment, alguns dels resultats dels fenotips dels dobles mutants resultaven ser menys severos que els fenotips corresponents a mutants senzills. Aquests resultats indiquen que la transducció del senyal de BMP-4 es troba estretament regulada i que són essencials els mecanismes de retroalimentació negativa durant el desenvolupament. Petits canvis en la transducció del senyal resulten en variacions dràstiques en les respostes fisiològiques (*Karen et al.*, 2001).

Comprendre l'acció dels morfogens requereix coneixement del temps. Una hipòtesi interessant "seqüencial dins el context cel·lular" proposa que baixes dosis de morfogens activen una resposta de baixa-concentració, la qual més tard, indueix una resposta d'elevada concentració (*Pages et al.*, 2000). De forma similar, en el nostre model el requeriment de gradients amb dosificació específica de teixit de membres de la família TGF- β (BMP-4) i antagonistes (família DAN i altres), pot ser la clau per entendre com cèl·lules mesenquimàtiques mare pluripotents responen o no responen per desencadenar una formació ectòpica d'os en llocs heterotòpics.

El resultat d'aquest estudi també suggereix un mecanisme per explicar la fisiopatologia de la formació heterotòpica d'os en aquest desordre, ja que la vida mitjana

de la proteïna morfogenètica és extremament abreviada (només pocs minuts) i és poc probable que concentracions de BMP-4 que indueixen osteogènesi es puguin aconseguir en llocs heterotòpics, a menys que el morfogen sigui alliberat en aquests llocs per cèl·lules circumdants o manufacturat per cèl·lules mesenquimàtiques mare pluripotents. *Shafritz et al., 1996* van proposar que en pacients amb FOP circularien limfòcits capaços d'expressar BMP-4 en sang perifèrica i que són reclutats per teixits conjuntius a conseqüència de lesions en teixits tous. Així, el col·làgen tipus IV, un constituent de la membrana basal de les cèl·lules endotelials, s'uneix amb molta afinitat a BMP-4 (*Shafritz et al., 1996*), fet que resulta en un increment de les concentracions locals. A altes concentracions, BMP-4 actua com a morfogen (*Olmsted et al., 1996; Shafritz et al., 1996; Gannon et al., 1997; Lanchoney et al., 1998*) capaç d'activar la seva pròpia expressió mesenquimàtica. Aquest mecanisme, reforçat per 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 (*Vainio et al., 1993*).

Una dificultat del model resideix en que estem poc informats de la concentració i forma del gradient combinatori que desencadena una resposta. En molts casos, la font del morfogen i dels antagonistes es fa evident mitjançant la distribució del seus RNAs missatgers, però necessitem saber la velocitat a la que les proteïnes són alliberades de la font proveïdora, la velocitat de la seva expansió i la seva estabilitat. També necessitem saber si aquests gradients, entre el morfogen i els seus antagonistes, es formen en el seu estat actiu o si són convertits en la seva condició activa durant o després de la formació del gradient. El coneixement sobre com els receptors interpreten aquests gradients i sobre com es distribueixen en les superfícies cel·lulars també serà de vital importància per a comprendre com realment funcionen els mecanismes de retroalimentació negativa en el desencadenament de respostes cel·lulars.

Tot i així hi ha un nombre de preguntes importants no contestades en aquest estudi. Primer, el gen responsable de FOP encara no ha estat identificat. Un estudi recent d'anàlisi de lligament per tot el genoma humà, realitzat en quatre famílies multigeneracionals de petit nombre afectades amb FOP, ha localitzat el gen de FOP en el braç llarg del cromosoma humà (4q27-31) (*Feldman et al., 2000*). Aquests resultats indiquen que la mutació responsable de la malaltia és improbable que resideixi en els gens *noggin* o *gremlin*. De fet, la regió que codifica pel gen *noggin* es troba lliure de mutacions en els individus FOP i ha estat del tot exclòs de la malaltia per anàlisi de lligament (*Xu et al., 2000*). Actualment s'està analitzant *gremlin*, com també altres gens dins la regió de lligament, per mutacions genètiques.

Els resultats que es presenten en aquest estudi poden, de fet, ajudar a identificar el gen responsable de FOP mitjançant una atenció central en porcions del camí de transducció de senyal de les BMPs. Aquí és on el gen responsable de FOP té més possibilitats de recaure i ja que els nostres resultats indiquen l'existència d'un defecte en la senyalització entre l'estímul de BMP-4 i els seus cognats antagonistes, és molt probable que la mutació responsable de FOP s'ubiqui en un dels gens codificadors de proteïnes mediadores o reguladores del camí de senyalització de BMP-4. Aquestes proteïnes inclouen els receptors de BMP-4, els BMPRIa/Ib/II, els transductors del senyal intracel·lulars, els Smad1/4/5, els Smads inhibidors, els Smad6/7 i i els factor nuclears activats per Smads, involucrats en l'activació transcripcional (*Ishida et al., 2000*).

Els gens candidats més probables de ser la causa genètica de FOP són: Smad1, NF- κ B, BMPRIb i la hydroxyprostaglandina deshidrogenasa (la funció de la qual indica un possible impacte sobre l'activitat i/o expressió de les BMPs) que es troben dins o en la proximitat de la regió de lligament del gen FOP. El DNA genòmic d'aquests gens es assíduament analitzat per mutacions en pacients amb FOP.

Segona, per diferents raons som incapaços d'examinar directament si el defecte en l'expressió dels antagonistes existeix en cèl·lules lesionals: a) No es troben generalment disponibles biòpsies d'espècimens; b) Aquestes són perilloses d'obtenir pel fet que una

intervenció quirúrgica precipita de forma inevitable una inflamació de FOP encara més agressiva; i c) Un control adequat “*in vivo*” seria difícil d’establir.

Els estudis per a examinar l’expressió de BMP-4 i altres gens, majoritàriament antagonistes, en limfòcits no transformats ja s’estan realitzant en el nostre laboratori, però són difícils de dur-se a terme ja que aquests experiments només poden utilitzar mostres de sang obtingudes en condicions fisiològiques. No obstant, la presència de limfòcits productors de gradients de BMP-4 en els primerencs estadis histològics d’una lesió fibroproliferativa (*Karsenty et al., 1999*) ofereix una raó coherent en l’ús de les LCLs. Tot i que som conscients de les limitacions de l’ús de limfòcits transformats com a model cel·lular de la patogènesi de FOP, també hem de dir que aquestes línies cel·lulars són de gran vàlua per a indagar en la integritat del camí de transducció de senyalització de les BMPs.

Tercera, actualment no podem descartar pertorbacions en antagonistes addicionals com son follistatin, chordin i altres membres de la família DAN que podrien també contribuir a la patologia de FOP.

Els estudis en pacients de FOP addicionals i membres afectats de les poques famílies multigeneracionals existents es centraran en un futur en determinar si el fracàs en activar correctament noggin i gremlin es universal en tots els FOP o si existeix heterogeneïtat en les diferents línies avaluades. També s’utilitzarà un procés sistemàticament rigorós per a l’estudi de FOP, el fenotip dels individus o expressivitat de la malaltia es tindrà en compte alhora d’inferir una possible correlació amb el “down-regulation” de noggin i gremlin i altres antagonistes. Tot i així, els resultats presentats donen sòlid suport a la hipòtesi de que la inducció dels elements esquelètics heterotòpics en pacients amb FOP –i potser d’altres desordres de formació heterotòpica d’os– es poden trobar rigorosament regulats, en l’espai i el temps, per l’expressió de potents antagonistes de la morfogenesi esquelètica. Addicionalment, la identificació d’una paressi marcada en la resposta dels antagonistes noggin i gremlin en cèl·lules d’individus amb FOP té implicacions

importants en el tractament d'aquesta malaltia i també en la comprensió de com l'esqueletogènesi i l'osteogènesi es troben regulats en humans.

3. PART II

L'heteroplàsia òssia progressiva (POH)

Hipòtesi: Les mutacions inactivadores heterozigòtiques del gen GNAS1, a través d'una reducció funcional dels nivells dels mRNAs i/o proteïnes del gen GNAS1, alteren els camins cel·lulars de senyalització que dirigeixen la diferenciació osteoblàstica i adipocítica.

3.1 Introducció

3.1.1 L'heteroplàsia òssia progressiva

L'heteroplàsia òssia progressiva (POH) és una malaltia humana de formació ectòpica d'os que inhabilita de forma severa en individus afectats. La POH és un desordre genètic de teixit conjuntiu caracteritzat per la formació d'os en la pell durant la infància i amb una ossificació progressiva cutània, subcutània i de teixits conjuntius profunds que es dona durant tota la vida (*Kaplan and Shore, 2000*). El primer símptoma de la POH succeeix durant la infància amb l'aparició d'illes d'os heterotòpic en la pell i en el greix subcutani. Al llarg del temps, les illes d'os s'agrupen en plaques i progressen cap als teixits connectius més profunds, incloent-hi la cara, el múscul esquelètic, els tendons i els lligaments. Una ossificació extensiva dels teixits conjuntius més profunds resulta en una anquilosi de les articulacions afectades i en un retard del creixement de les extremitats (*Kaplan et al., 1994; Kaplan and Shore, 2000; Rosenfeld and Kaplan., 1995; Schimidt et al., 1994; Urtizberea et al., 1998*).



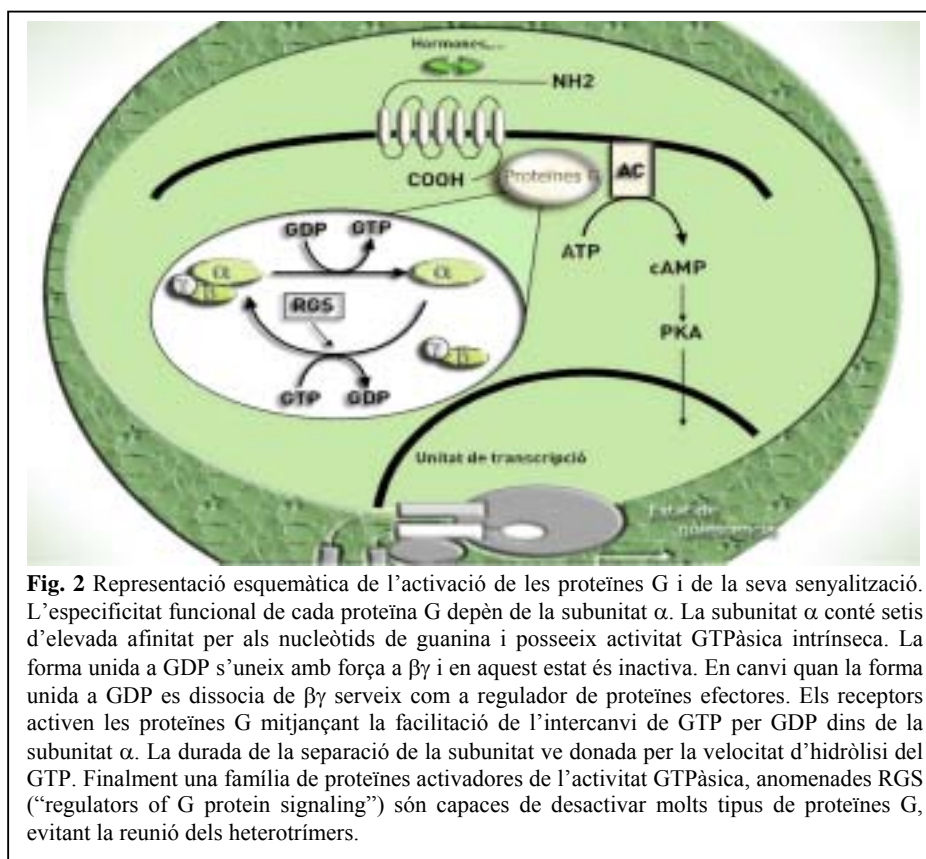
Alguns dels casos de la POH són esporàdics, mentre que altres són familiars (*Kaplan et al., 1994; Kaplan and Shore, 2001*). La descendència d'individus afectats amb POH poden heretar la malaltia de manera autosòmica dominant amb un ampli ventall d'expressió (*Kaplan et al., 1994; Urtizberea et al., 1998*). La POH ha estat identificada tant en homes com en dones sense que es doni localitat geogràfica específica o ètnica. Actualment no hi ha cap tractament efectiu o sistema preventiu per a la POH. La coalescència extensiva de les plaques ossificades en la pell i la lenta i inflexible progressió cap a una profunda ossificació heterotòpica, proposen perplexos dilemes terapèutics per a controlar el trencament de la pell, la infecció, la reparació de les ferides i el moviment de les articulacions (*Kaplan and Shore, 2000*).

L'ossificació heterotòpica en la POH succeeix predominantment a través del procés intramenbranós (*Kaplan et al., 1994; Kaplan and Shore., 2000; Rosenfeld and Kaplan., 1995; Schimidt et al., 1994; Urtizberea et al., 1998*). Malgrat això, s'han descrit en teixits conjuntius profunds d'individus POH, illes d'os disperses amb ossificació endocondral (*Athanasou et al., 1994; Rodriguez-Jurado et al., 1995*). La distribució anatòmica de les lesions suggereix que la patogènesi de la POH involucra diferenciació anormal de les cèl·lules mesenquimàtiques mare o de les cèl·lules precursoras més diferenciades que es troben a la pell, en greix subcutani, en múscul, en tendons i en lligaments. La formació d'os intramenbranosa que succeeix en el greix subcutani d'individus POH, indica una estreta relació entre la adipogènesi i l'osteogènesi en els teixits perifèrics, un fenomen ja observat en la medul·la òssia (*Athanasou et al., 1994; Beresford et al., 1992; Gordeladze et al., 1997; Nuttal et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Thompson et al., 1998*) i en les cèl·lules progenitores del mesoderm (*Poliard et al., 1995*).

3.1.2 La POH, les proteïnes G heterotrimèriques i el gen GNAS1

Un nombre extens d'hormones, neurotransmissors, citoquines, mediadors locals i estímuls sensorials exerceixen els seus efectes sobre les cèl·lules i els organismes mitjançant la unió a receptors acoblats a proteïnes G (*Farfel et al., 1996; Birnbaumer et al., 1990; Quarless et al., 1996; Uings et al., 2000*). Es coneixen més d'un miler de receptors, i cada dia se'n descobreixen més. Les proteïnes G heterotrimèriques transduïxen la unió "l·ligand-receptor" a respostes intracel·lulars, les quals sostenen respostes fisiològiques de teixits i d'organismes. (*Quarless et al., 1996; Uings et al., 2000*). Les proteïnes G consten de 3 subunitats (α , β , γ), cada una d'elles codificada per molts gens diferents.

La multiplicitat de les subunitats de les proteïnes G permet una combinació que, en part, contribueix a la capacitat que les proteïnes G tenen d'interaccionar amb un gran nombre de receptors i de proteïnes efectores. S'han identificat més de 100 receptors associats a proteïnes G. Els receptors mostren una estructura serpentina comuna que consta de 7 dominis trans-membrana i poden detectar senyals extracel·lulars tant diverses com llum, estímuls químics, hormones, factors de creixement i neurotransmissors (*Birnbaumer et al., 1990*). Les proteïnes G regulen molts sistemes de segons missatgers, incloent enzims com l'adenilat ciclase (AC), la fosfolipasa C (PLC), la fosfolipasa A2 i també canals iònics (*Farfel et al., 1996; Birnbaumer et al., 1990; Quarless et al., 1996; Uings et al., 2000*). Encara que existeixen molts productes gènics per cada subunitat (20 α , 6 β , i 12 γ), tant sols es poden distingir quatre classes de proteïnes G: Gs (estimuladora), que activa l'adenilat ciclase; Gi (inhibidora), que inhibeix l'adenilat ciclase; Gq, la subunitat que activa la fosfolipasa C; i G12 i G13, amb funció desconeguda.



Les proteïnes G són inactives quan l'estat heterotrímèric es troba unit a GDP (difosfat de guanina) i s'activen amb l'intercanvi de nucleòtids de guanina, un procés, catalitzat pel receptor, que resulta de la unió de GTP (trifosfat de guanina) a la subunitat α . La unió de GTP condueix a la dissociació de $G\alpha$ -GTP del complex $G\beta\gamma$ i a una activació immediata de molècules efectores "downstream" mediada per les subunitats lliures $G\alpha$ -GTP i $G\beta\gamma$ (Farfel et al., 1996; Birnbaumer et al., 1990; Quarless et al., 1996; Uings et al., 2000).

La desactivació de les proteïnes G és el factor-limitant per aturar les respostes cel·lulars i succeeix quan la subunitat $G\alpha$ hidrolitza el GTP a GDP. La resolució d'estructures de cristall de les proteïnes G heterotrímèriques, en les seves conformacions actives i inactives, ofereix un sistema estructural per entendre la funció d'aquests canvis

conformacionals en els camins de senyalització. A mesura que sorgeixen nous camins de senyalització que utilitzen proteïnes G per a la transducció del senyal, augmenta el coneixement de la diversitat existent dels complexos mecanismes de regulació de les proteïnes G (Uings *et al.*, 2000).

Les proteïnes G es defineixen per la subunitat α . La subunitat α de la proteïna G estimuladora ($G_s\alpha$) es troba ubiquament expressada i acobla múltiples receptors per estimular l'Adenilat ciclase i canals iònics específics (Farfel *et al.*, 1996; Birnbaumer *et al.*, 1990; Quarless *et al.*, 1996; Uings *et al.*, 2000). El gen humà GNAS1 que codifica per la subunitat α de la proteïna G estimuladora ($G_s\alpha$), és un dels pocs gens en el qual s'han caracteritzat mutacions activadores i inactivadores (Micheala *et al.*, 2000). Ubicat en el cromosoma 20q13 (Gejman *et al.*, 1991), el gen GNAS1 va ser originalment descrit com un gen compost de 13 exons que codifica $G_s\alpha$, la subunitat- α de les proteïnes G estimuladores heterotrimèriques (Kozasa *et al.*, 1988). L'expressió gènica en el locus de GNAS1 és complexa.

La unitat transcripcional de GNAS1 és iniciada per múltiples promotors i conté nombrosos processos d'*splicing* alternatiu. Tota aquesta activitat produeix almenys 3 transcrits diferents amb sentit (amb tres proteïnes diferents) i almenys un transcrit anti-sentit (Fig.2 i Fig.3).

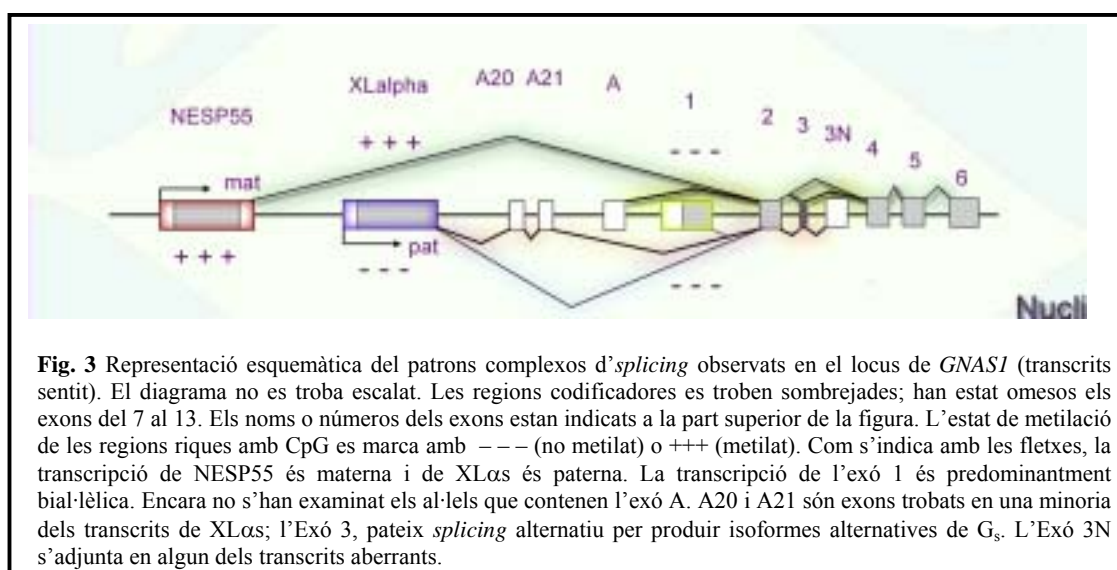
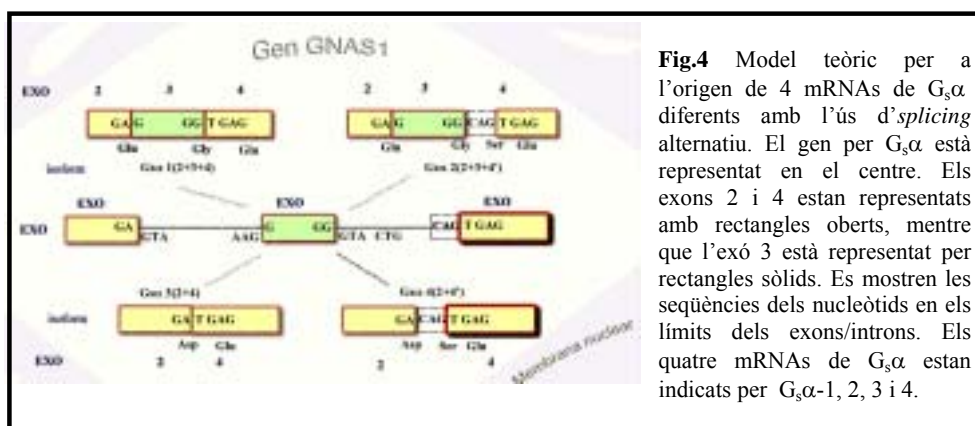


Fig. 3 Representació esquemàtica dels patrons complexos d'*splicing* observats en el locus de *GNAS1* (transcrits sentit). El diagrama no es troba escalat. Les regions codificadores es troben sombreades; han estat omesos els exons del 7 al 13. Els noms o números dels exons estan indicats a la part superior de la figura. L'estat de metilació de les regions riques amb CpG es marca amb --- (no metilat) o +++ (metilat). Com s'indica amb les fletxes, la transcripció de NESP55 és materna i de XLAs és paterna. La transcripció de l'exó 1 és predominantment bial·lèlica. Encara no s'han examinat els al·lels que contenen l'exó A. A20 i A21 són exons trobats en una minoria dels transcrits de XLAs; l'exó 3, pateix *splicing* alternatiu per produir isoformes alternatives de G_s . L'exó 3N s'adjunta en algun dels transcrits aberrants.

Així doncs, les conseqüències de mutacions en el locus de GNAS1 poden ser complexes i potencialment afecten a múltiples productes gènics i/o a la possible expressió coordinada d'aquests productes. Tant en humans com en ratolins s'ha observat que $G_s\alpha$ està codificat pels exons 1-13 del gen GNAS1/gnas (humà/ratolí) i que una forma de $G_s\alpha$ més llarga (Xl α s/Gnasxl) és sintetitzada a partir d'un transcrit amb un primer exó específic de Xl α s que per *splicing* alternatiu s'uneix a l'exó 2 del gen GNAS1 (Hayward *et al.*, 1998a; Kehlenbach *et al.*, 1994). Existeixen quatre espècies primàries del transcrit $G_s\alpha$ ($G_s\alpha$ -1 a $G_s\alpha$ -4) que són resultat dels efectes combinatoris de dos processos d'*splicing* alternatiu (Kozasa *et al.*, 1988) Fig.4.



Els transcrits complets produeixen proteïnes de 52kDa (isoformes 1 i 2), mentre que l'eliminació per *splicing* alternatiu de l'exó 3 dóna lloc a unes isoformes reduïdes de 45kDa (isoformes 3 i 4) (Kozasa *et al.*, 1988). L'exó 3 codifica per una regió hidrofílica de petit tamany que pot tenir una possible funció en el sistema de l'adenilat ciclase. Addicionalment, l'ús alternatiu d'un seti acceptor en l'exó 4, situat 3pb "upstream", resulta en la inserció d'un residu de serina en les isoformes 2 i 4. Aquests seti podria tenir importància com a diana de fosforilació de la proteïna kinasa C. L'ús alternatiu d'aquest seti pot conferir a les proteïnes $G_s\alpha$ de propietats reguladores diferencials

(Kozasa *et al.*, 1988). Existeix un tercer transcrit anomenat Nesp55/Nesp. L'exó 1 de Nesp55 s'uneix per "splicing" alternatiu a l'exó 2 del gen GNAS1. Aquest transcrit codifica per a una proteïna que deriva exclusivament del primer exó de Nesp55, sense que es tradueixin la resta dels exons del gen GNAS1 (Ischia *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1999). Les funcions dels productes proteics dels transcrits XL α s i de Nesp55 es desconeixen. Finalment, un transcrit antisentit que es sintetitza a partir d'un promotor ubicat en la regió que s'extén de Nesp55 fins a XL α s, que s'expressa però que no codifica producte proteic, pot tenir implicacions en l'expressió de Nesp55 i XL α s. (Hayward and Bonthron, 2000; Wroe *et al.*, 2000), fig.5.

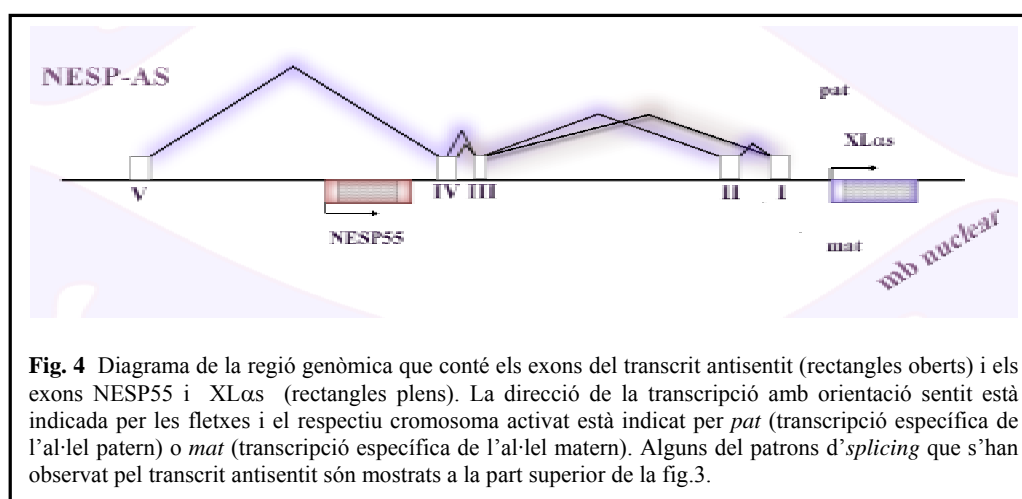


Fig. 4 Diagrama de la regió genòmica que conté els exons del transcrit antisentit (rectangles oberts) i els exons NESP55 i XL α s (rectangles plens). La direcció de la transcripció amb orientació sentit està indicada per les fletxes i el respectiu cromosoma activat està indicat per *pat* (transcripció específica de l'al·lel patern) o *mat* (transcripció específica de l'al·lel matern). Alguns del patrons d'*splicing* que s'han observat pel transcrit antisentit són mostrats a la part superior de la fig.3.

A més, per contribuir a la complexitat del locus de GNAS1 i als efectes de mutacions en aquest gen, els promotors dels múltiples transcrits de la unitat transcripcional es troben diferencialment imprintats. Els gens que es troben imprintats s'expressen només a partir d'un dels al·lells. De quin al·lel s'expressin ve determinat per l'origen patern (Bartolomei and Tilgman, 1997). En els teixits observats, els transcrits XL α s i Nesp-as són sintetitzats exclusivament de l'al·lel patern i Nesp55 és sintetitzat únicament de l'al·lel matern (Hayward and Bonthron, 2000; Hayward *et al.*, 1998a; Hayward *et al.*, 1998b; Peters *et al.*, 1999; Wroe *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1998). Tot i que G α s s'expressa de forma bial·lèlica (Hayward *et al.*, 1998a), sembla estar imprintat de forma teixit-específica en

algunes de les cèl·lules, com ara les del còrtex renal (lloc d'activitat de la PTH) i les del teixit adipós (Yu *et al.*, 1998; Aldred *et al.*, 2000; Micheala *et al.*, 2000).

Recentment s'han identificat les mutacions inactivadores del gen *GNAS1* com la causa de l'heteroplàsia òssia progressiva (Shore *et al.*, 2001). També s'ha trobat una mutació en el gen *GNAS1* en un nen afectat amb el "severe plate-like osteoma cutis" una variant de POH (Yeh *et al.*, 2000). L'osteodistròfia hereditària d'Albright (AHO) és una altra de les malalties humanes relacionades amb mutacions inactivadores en el gen *GNAS1* (Albright *et al.*, 1942; Barranco, 1971; Brook and Valman, 1971; Levine *et al.*, 2001; Weinstein *et al.*, 1990). El descobriment de mutacions inactivadores del gen *GNAS1* en pacients amb una extensa formació heterotòpica d'os, com les trobades en AHO, POC i POH, suggereix fermament que el gen *GNAS1* té una funció principal en la patologia d'aquestes malalties i s'espera que es produeixin valors reduïts de les diferents proteïnes del gen *GNAS1* en determinats tipus cel·lulars específics. La reducció dels nivells funcionals dels productes gènics de *GNAS1*, mRNAs i/o proteïnes, fa, suposadament, que no sigui possible mantenir un fre a la diferenciació osteogènica en llocs heterotòpics (Fig.5).

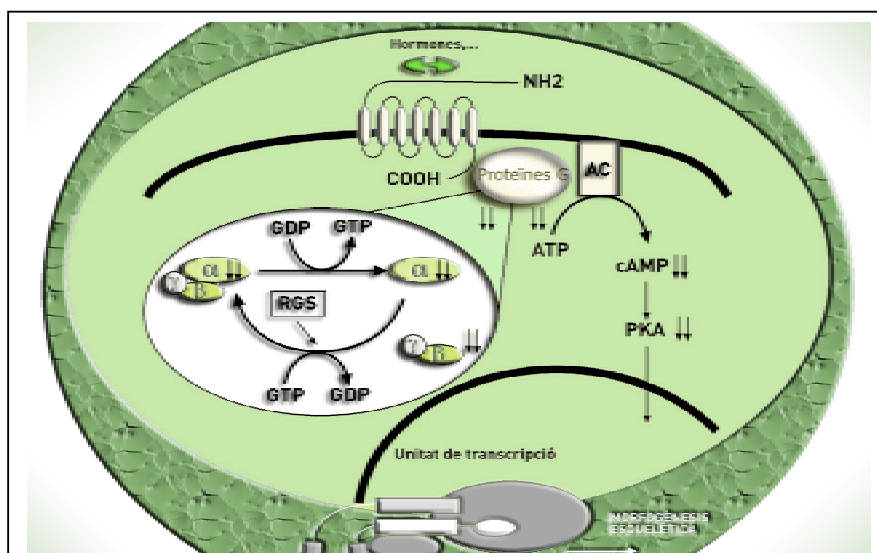


Fig. 6 Les mutacions inactivadores heterozigòtiques en el gen *GNAS1*, suposadament, provoquen nivells reduïts de les diferents subunitats α , les quals ocasionen una alteració en el cicle de les proteïnes G (nivells baixos de AMPc i de PKA), que activen, en cèl·lules mare mesenquimàtiques pluripotents, processos de formació ectòpica d'os d'acció incontrolada.

La importància de $G_s\alpha$ en la formació d'os també ha estat demostrada per la sobreexpressió d'aquest mitjançant mutacions somàtiques en el gen *GNAS1* trobades en la síndrome de McCune-Albright (MAS) (Schwindinger et al., 1992; Weinstein et al., 1991). La MAS es caracteritza per "Polyostotic fibrous dysplasia" (erosió de l'os esquelètic), pigmentació atípica de la pell i anormalitats endocrinològiques (Whyte, 1999). *GNAS1* és un dels pocs gens on s'hi ha caracteritzat mutacions activadores i inactivadores: mutacions amb guany de funció "Gain-of-Function Mutations (com l'oncogen *gsp*) i mutacions amb pèrdua de funció "Loss-of Function Mutations" (Micheala et al., 2000) Taula. N.1

3.1. 3 Mutacions amb guany de funció "gain-of-function mutations"

Les substitucions específiques d'aminoàcids que succeeixen en els codons 201 i 227 confereixen guany de funció de $G_s\alpha$. L'Arg201 es troba en el domini d'unió GDP/GTP de la subunitat α , mentre que el residu Gln227, ubicat en el domini G4, és necessari per l'activitat GTPàsica de $G_s\alpha$. Una substitució de qualsevol d'aquests aminoàcids provoca una activació constitutiva de $G_s\alpha$ i com a conseqüència de l'adenilat ciclasa (identificat en tumors de la pituïtària, tumors endocrins com ara adenoma i carcinoma de la pituïtària, i adenomas paratiroidals). Les mutacions activadores en el codó 201 poden portar a una condició coneguda com la síndrome de McCune Albright (Aldred et al., 2000, Micheala et al., 2000).

3.1. 4 Mutacions amb pèrdua de funció "loss-of function mutations"

Les mutacions inactivadores heterozigòtiques de $G_s\alpha$ resulten en una condició coneguda com l'osteodistròfia hereditària d'Albright (AHO), un desordre autosòmic dominant caracteritzat per l'obesitat, l'ossificació subcutània, la calcificació intracranial i per un grau variable de retard mental (Albright et al., 1942; Barranco, 1971; Brook and Valman, 1971, Levine et al., Weinstein et al., 1990). La variabilitat fenotípica creada per

l'efecte d'*imprinting* en el locus GNAS1 és aparent en pacients amb AHO. Hi ha dos possibles fenotips per AHO amb una expressivitat variable per la mateixa mutació i amb un efecte molt clar de l'origen patern o matern d'aquesta: 1) El pseudohipoparatiroidisme tipus Ia, PHPIa (de transmissió materna; nivells baixos de calci en el sèrum, nivells elevats de fosfat, de PTH i de TSH); i 2) El pseudohipoparatiroidisme, PPHP (de transmissió paterna i amb un perfil bioquímic normal). Ambdues condicions, pseudoPHP i PHPIa, tenen una deficiència del 50% de la proteïna $G_s\alpha$ i s'ha demostrat que les mutacions inactivadores de $G_s\alpha$ causen resistència a hormones i dismorfologies variables a l'esquelet. Tant pseudoPHP com PHPIa tenen una transmissió autosòmica dominant de les mutacions inactivadores de GNAS1 i pertanyen a la mateixa família. El fet que PHPIa s'hereti quasi sempre de forma materna i que pseudoPHP s'hereti de forma paterna, suggereix que les diferències d'expressió fenotípica són provocades per l'efecte d'*imprinting* en el gen GNAS1 (Davies and Hugues, 1993; Hayward et al., 1998a; Hayward et al., 1998b; Wilson et al., 1994).

També s'han trobat mutacions inactivadores de GNAS1 en malalties com el "plate-like osteoma cutis" i l'heterodisplàsia òssia progressiva com ja s'ha comentat anteriorment. Els efectes d'aquestes mutacions pot tenir conseqüències semblants als trobats en AHO. A continuació es mostra una taula comparativa d'aquestes malalties.

Taula 1. Característiques osteogèniques de desordres relacionats amb les proteïnes G				
Característiques	MAS	AHO	POH	POC
Mutació a GNAS1	si	si	si	si
Tipus de mutació a GNAS1	Somàtica activadora	Inactivadores (línia germinal)	Inactivadores (línia germinal)	Inactivadores (línia germinal)
Activitat de l'adenilat ciclasa	Augmentada	Disminuïda	Tendència a disminuir	Tendència a disminuir
Activitat osteoblàstica a llocs normotòpics	Aturada en la maduració	Normal	Normal	Normal
Activitat osteoblàstica a llocs heterotòpics	Nul·la	Activitat en la dermis i greix subcutani	Activitat en la dermis, greix subcutani i múscul esquelètic	Activitat en la dermis, greix subcutani i múscul esquelètic

Taula 1: Taula comparativa de desordres relacionats amb proteïnes G. La síndrome de McCune Albright (MAS), l'osteodistròfia hereditària d'Albright, el plate-like osteoma cutis (POC) i l'heteroplàsia òssia progressiva (POH) són les principals malalties humanes afectades per mutacions activadores o inactivadores de GNAS1.

3.1.5 Mutacions observades en AHO estan distribuïdes per tot el gen GNAS1

Les mutacions que predominen són petites insercions/deleccions i substitucions d'aminoàcids, però també han estat documentades mutacions sense sentit i mutacions puntuals que provoquen un inici alterat de la traducció o un mRNA amb “*splicing*” aberrant (Micheala *et al.*, 2000). La mutació més freqüent és una delecció de 4 pb en l'exó 7 que s'ha trobat en onze famílies distribuïdes per tot el món. En molts casos s'ha demostrat que aquestes mutacions sorgeixen de “*novo*” (Yu *et al.*, 1995). La majoria de les altres mutacions es troben únicament en famílies individuals, tot i que algun tipus d'agrupament és aparent, particularment en els exons 1, 4, 5, 10, i 13 (Micheala *et al.*, 2000).

La complexitat d'expressió gènica en el locus GNAS1 és probable que contribueixi específicament a la inducció osteogènica en llocs heterotòpics. Al igual que pseudoPHP, mutacions en el gen GNAS1 en individus POH són heretades de forma paterna, suggerint que patrons d'expressió similars en el locus GNAS1 poden resultar en variacions d'expressivitat en individus afectats amb la POH.

3.1.6 Diferenciació cel·lular dirigida a fenotips osteogènics i/o adipogènics

Les mutacions en el gen GNAS1 de pacients amb POH ens fa hipotetitzar que la regulació dels camins de senyalització mediat per els diferents transcrits de GNAS1 pot trobar-se alterada en cèl·lules mesenquimàtiques mare de teixits tous d'àmplia distribució. L'evidència experimental dona suport a l'existència de cèl·lules mare mesenquimàtiques multipotents que poden donar lloc a ambdós tipus cel·lulars: osteoblasts i adipòcits (Nuttall and Gimble, 2000). Addicionalment, experiments de transdiferenciació suggereixen que existeix un grau de plasticitat entre aquests tipus cel·lulars. S'ha demostrat en bastants estudis que les cèl·lules mare de l'estroma de la medul·la òssia poden desencadenar osteogènesi o adipogènesi (Gimble, 1990; Nuttall and Gimble, 2000; Nuttall *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999; Pittenger *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 1998) i que una regulació controlada recíproca de factors específics de llinatge

(osteoblasts/adipocits) determina la diferenciació cel·lular específica de llinatge (Ahdjoudj *et al.*, 2001; Sabatakos *et al.*, 2000).

Alguns tipus d'osteoporosi humana es caracteritzen per una disminució del nombre d'osteoblasts i un augment paral·lel d'adipòcits (Gimble *et al.*, 1996a; Nuttal and Gimble, 2000). La diferenciació cap a cèl·lules òssies o cèl·lules de greix està sota control hormonal i de factors locals (Dorheim *et al.*, 1993; Gimble *et al.*, 1996b, Gori *et al.*, 1999; Green and Kehinde, 1975; Lian *et al.*, 1999; Nuttall and Gimble, 2000; Pittenger *et al.*, 1999; Ranwala and Lazar, 2000; Thompson *et al.*, 1998; Yao *et al.* 1994). La dexametasona, les proteïnes formadores d'os (BMPs), la 1,25-dihydroxyvitamina D3, o l'àcid ascòrbic i el β -glicerol fosfat poden induir la diferenciació osteoblàstica, la qual es pot demostrar per l'expressió específica de marcadors osteoblàstics, com ara el Cbfa1, l'osteocalcina, la fosfatasa alcalina, el col·lagen tipus I i la deposició de minerals. La diferenciació adipogènica es pot induir mitjançant "isobutylmetilxantine" (IBMX), insulina, indometacina, dexametasona i tiazolidinedionas, els quals poden desencadenar l'expressió de gens específics d'adipòcits com ara "peroxisome proliferators-activated receptor gamma 2" (PPAR γ 2), el "CCAAT-enhancer binding proteins" (C/EBP), la "adipocyte lipid-binding protein" (aP2), el glicerol-3-fosfat deshidrogenasa (G3PDH) i finalment l'acumulació citoplasmàtica de lípids.

Dos receptors acoblats a proteïnes G (receptors pel glutamat i per l'hormona paratiroidea) han estat implicats en mediar la diferenciació osteoblàstica en cèl·lules pluripotents de l'estroma. La diferenciació adipocítica, com ja s'ha comentat, s'indueix amb IBMX, un potent nucleòtid cíclic, inhibidor de la fosfodiesterasa que augmenta els nivells intracel·lulars de l'AMPC i de l'GMPC i com a conseqüència activa les kinases que depenen de nucleòtids cíclics i aquestes, a nivells reduïts, desencadenen la formació ectòpica d'os a llocs heterotòpics. Les mutacions somàtiques activadores de GNAS1 en individus afectats amb la síndrome de McCune-Albright (MAS) i les mutacions inactivadores de la línia germinal de GNAS1 en pacients afectats amb l'osteodistrofia hereditària d'Albright (AHO) afecten cèl·lules mesenquimàtiques d'origen mesoderm o ectoderm (Farfel *et al.*, 1999).

Una aturada prematura en el desenvolupament de l'osteogènesi en ossos afectats d'individus amb MAS es deu a indicacions alterades en cèl·lules mesenquimàtiques precursors que es troben sota la influència de mutacions activadores de GNAS1. Com a contrast, les mutacions inactivadores de GNAS1 porten a una “down-regulation” dels camins moleculars catalitzats per l'adenilat ciclase i consegüentment a una diferenciació inadequada (a llinatges osteogènics) de cèl·lules mesenquimàtiques pluripotents. En el context del desenvolupament de l'os, el gen GNAS1 aparentment té la funció d'actuar com a regulador negatiu de l'osteogènesi heterotòpica.

En els POH, l'ossificació sorgeix en el greix dipositat en les capes més profundes de la dermis, del greix subcutani i del greix que es troba entre la musculatura esquelètica. S'ha descrit expressió imprintada de GNAS1 en teixit adipós (*Yu et al., 1998*). L'herència paterna de mutacions de GNAS1 en ratolins està associada amb un baix contingut de massa greixosa (permeten un augment potencial de l'osteogènesi) mentre que una herència materna d'aquestes mutacions està associada a un augment de pes dels nounats. Aquestes observacions suggereixen que l'expressió alterada de GNAS1 en els precursors d'adipòcits o adipòcits podria resultar amb una formació ectòpica d'os en individus POH (*Yu et al., 1998*).

3.2 Objectius dels treballs 3 i 4

En el trastorn de POH (treballs 3 i 4) l'objectiu serà caracteritzar el mecanisme molecular de la unitat transcripcional gnas/GNAS1 implicat en la regulació de la diferenciació osteogènica. En línies murines MC3T3-E1 i limfòcits transformats d'individus POH, s'analitzaran els següents apartats:

1. L'expressió, teixit-específica, de Nesp55, XLalpha, Nesp-as i $G_s\alpha$ en cèl·lules murines preosteoblàstiques MC3T3-E1 i la variabilitat d'expressió dels transcrits de Gnas en un fenotip osteogènic induït. També s'avaluarà, en un període de 28 dies de tractament amb suplementos osteogènics, l'expressió diferencial de Nesp55, XLalpha, Nesp-as i $G_s\alpha$ en cèl·lules murines preosteoblàstiques.
2. L'expressió, teixit-específica, de Nesp55, XLalpha, Nesp-as i $G_s\alpha$ en cèl·lules humanes transformades amb el virus Epstein-Bar i l'expressió de XLalpha i $G_s\alpha$ en cèl·lules LCLs humanes d'individus POH i en LCLs d'individus control.

3.3 Treball 3:

“Expressió específica de teixit de Nesp55, Nesp- α s, Xl α s i formes de G $_s$ α en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí i variabilitat d’expressió dels transcrits de Gnas en un fenotip osteogènic induït”

Resum

Les cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3E-1 de ratolí estimulades sota condicions apropiades són, principalment, cèl·lules pluripotents capaces de diferenciar-se als llinatges osteogènic, adipogènic i condrogènic. Per caracteritzar el mecanisme molecular de gnas/GNAS1 implicat en la regulació de la diferenciació osteogènica, es van dissenyar “primers” específics per a tots els transcrits de gnas coneguts. Aquests es van analitzar en cèl·lules MC3T3-1, trobant que l’antisentit, Nesp55, ambdues isoformes de G $_s$ α i una nova isoforma de G $_s$ α , mai detectada en un altre tipus cel·lular o teixit, s’expressen en les cèl·lules preosteoblàstiques, mentre que les isoformes de XLalpha no s’hi expressen.

En resultats preliminars s’observen variacions en l’expressió d’algunes de les formes de gnas de ratolí generades per “*splicing*” alternatiu. Aquestes observacions indiquen que Nesp55 i la nova isoforma de G $_s$ α redueixen l’expressió fins a valors no detectables coincidint amb una diferenciació més osteogènica, mentre que l’antisentit, l’isoforma de G $_s$ α amb l’exó 3 exclòs i XLalpha augmenten progressivament l’expressió en resposta a un fenotip més osteogènic. Per contra, la forma de G $_s$ α , més universalment expressada no va experimentar cap canvi significatiu respecte de les cèl·lules no estimulades. La inhibició de les isoformes Nesp55 i nova forma de G $_s$ α i una activació progressiva de les isoformes XLalpha, antisentit i G $_s$ α amb l’exó 3 exclòs, pot proporcionar un mecanisme coordinat que involucra la unitat transcripcional de Gnas en el procés de diferenciació osteogènica de cèl·lules pluripotents, suggerint que la predisposició de hMCS a dirigir-se a llinatges osteogènics i/o adipogènics està governat per múltiples interaccions entre els diferents transcrits de gnas.

Materials i mètodes

Condicions de cultiu per MC3T3-E1 (fibroblast preosteoblàstic)

Les cèl·lules MC3T3-E1 van ser una donació generosa del Dr. Irving Shapiro (Universitat de Pennsylvania).

Les MC3T3-E1 es van mantenir en medi essencial α -modificat (α -MEM) que contenia 10% "fetal bovine serum", suplementat amb solució antibiòtica-antimicòtica (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) i incubades a 5%CO₂ a 37°C. Les cèl·lules es van fer créixer a una densitat de 2.5×10^4 cèl·lules /cm² i es van subcultivar (a una proporció 1:10) de dues a tres vegades per setmana.

Disseny de "primers" de ratolí (Mus Musculus) específics per Nesp55, Xl α , G α i Nesp-antisentit:

Els "primers" s'han dissenyat a partir de les seqüències dels seus corresponents cDNAs complementaris que es troben disponibles a la web del "NCBI" (*National Center for Biotechnology Information*), utilitzant el programa informàtic *MacVector*TM 7.0.

Transcript	Forward	Reverse
Nesp55	5'- tca cta atg ggt gac tcc gtcc -3'	5'-tga act ggt tct cag ggt tgg c-3'
XLalpha	5'-cag tga tga gtc gga aga aggg -3'	5'-tga act ggt tct cag ggt tgg c-3'
Gnas	5'-gca gaa gga caa gca ggtc tacc -3'	5'-tca ggt ggg aag tcaa agt cgg g -3'
Neps-as	5'-tcagaa tcg gtc tcg gtc tcg tag-3'	5'-ttc gca gtg gtt tga agg tagg-3'

Taula.1: Seqüències 5' a 3', específiques per Nesp 55, Xlalpha, G α i Nesp-as de Mus Musculus

<u>Mus Musculus</u>	Producte de PCR esperat	Número GI		Tm obtinguda per Mac vector 7.0		% G+C	
		Forward	Reverse	Forward	Reverse	Forward	Reverse
Nesp55	289 bp	6754015	6754015	62°C	68°C	55	50
XLalpha	545 bp	4262550	4262550	68°C	66°C	55.2	56.9
G α	345 bp	6754013	6754013	72°C	72°C	56.5	56.5
Neps-as	535 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 per Nesp55, Xlalpha, Gnas i Nesp-as de Mus Musculus

Aïllament d'RNA total

L'RNA total es va aïllar de les cèl·lules utilitzant el reactiu “Trizol reagent” (BRL Life Technologies) seguint el protocol recomanat. La integritat de l'RNA purificat es va comprovar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa i es va guardar a elevades concentracions (>1 ug/ul) a -70°C . Abans de ser utilitzat per la RT-PCR, l'RNA es va tractar amb DNAsa I per així eliminar una possible contaminació de DNA genòmic en la reacció.

RT-PCR

Usant mètodes estàndard, la primera cadena de DNA complementari (cDNA) es va sintetitzar a partir d'1ug d'RNA total utilitzant l'enzim Superscript II retrotranscriptasa (BRL, Life Technologies) i “primers” oligo (dT) (42°C , 1 hora). Es va utilitzar per amplificació (PCR) una fracció de la primera cadena de DNA complementari. Els productes de la reacció es van analitzar per electroforesi amb gel d'agarosa al 1.5% i es van tenyir amb bromur d'etidi. En el cas de G_{α} es va tenyir el DNA amb “*vista green*” (Amersham, Arlington Heights, IL), detectar amb Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) i quantificar amb imageQuant (Molecular Dynamics).

Optimització per RT-PCR en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) dels “primers” dissenyats pels diferents transcrits de gnas

A continuació es presenten les condicions d'optimització per RT-PCR en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí (*Mus Musculus*) dels “primers” dissenyats pels diferents transcrits de gnas. Abans d'obtenir aquest resultat, les variables temperatura d'hibridació i concentració de Mg^{2+} per cada parell de “primers” (resultats no presentats) varen ser optimitzades. Els nivells d'expressió basal de totes les formes de Gnas es varen obtenir mitjançant corbes de saturació. Aquestes consistien en un mostreig seqüencial de reaccions de PCR cada cinc cicles, en un rang d'almenys quinze cicles depenent del tipus de gen analitzat. D'aquesta forma s'obté el nombre de cicles òptim per romandre en els valors d'amplificació lineals necessaris per a una quantificació vàlida. Per a l'anàlisi d'expressió gènica, el nombre de cicles usats pels diferents gens fou la següent: GAPDH (gliceraldehid-6-fosfat deshidrogenasa, 15 cicles), Nesp55 (30 cicles), XLalpha (35

cicles) i $G_s\alpha$ (35 cicles). La desnaturalització del motlle es va realitzar a 94°C durant 30s seguit d'una hibridació a 65°C durant 30s i finalment extensió dels "primers" a 72°C durant 30s.

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: ~ 25 cicles.

Nesp55: "Primers" ES 670/671; Producte de PCR: ~ < 289bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 65°C 30'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 35 cicles.

XLalpha: "Primers" ES 672/673; Producte de PCR: ~ < 546bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 65°C 30'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40cycles; Amplificació òptima esperada a: ~ 35 cicles.

$G_s\alpha$: "Primers" ES 674/675; Producte de PCR: ~ < 354bp; Condicions de PCR: 95°C 5' + (94°C 30'' + 65°C 30'' + 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40-45 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 35 cicles.

Anàlisi d'expressió dels transcrits Nesp 55, Xl α s, G $_s\alpha$ i Nesp-antisensit en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí (Mus Musculus) dirigides a un fenotip osteogènic

Per a la inducció del fenotip osteogènic, les cèl·lules preosteoblàstiques M3CT3-E1 de ratolí, a un 80% de confluència, varen ser tractades amb α -MEM suplementat amb 10mM β -glycerol phosphate, 50ug/ml àcid ascòrbic i 100nM de BMP-2 durant quatre setmanes per així obtenir una diferenciació cel·lular completa (mineralització). L'RNA va ser aïllat en temps diferents (1, 7, 14 i 28 després de la inducció) i els nivells d'expressió dels diferents transcrits varen ser avaluats mitjançant RT-PCR tant en cèl·lules MC3T3-E1 control com en cèl·lules tractades. El mateix mètode es va utilitzar en la determinació de l'activitat de la fosfatasa alcalina.

Determinació de l'activitat de la fosfatasa alcalina

L'activitat de la fosfatasa alcalina es va obtenir mesurant la formació de “*p-nitrophenol*” a partir “*p-nitrophenyl phosphate*” com ja havia esta descrita prèviament per *Harrisson et al., 1954*. Per obtenir els lisats de MC3T3-E1 les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS fred i van ser resuspeses en 0.5 ml de tampó de lisi (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGTA, 1.0 mM dithiothreitol, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1.0 mM sodi de orthovanadat, 10 mM NaF, 25 mM *p-nitrophenyl phosphate*, 0.1% SDS, 0.5 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride*, i 2.0 mg/ml *aprotinin* i *leupeptin*). Els lisats es van sonicar breumen en gel i es van centrifugar a 100,000g durant 35 minuts. Es va determinar l'activitat de la fosfatasa alcalina en els lisats cel·lulars usant el kit “*Alkaline Phosphatase Opt kit*” (Sigma Aldrich , St Louis, MO, USA). La concentració de proteïnes es va determinar pel mètode de *Bradford et al., 1976*. Els resultats estan expressats en nmols de *p-nitrophenol* alliberats per minut per microgram de proteïna.

Vermell d'Alizarin per la detecció de calci (assaig de mineralització)

Per la determinació del grau de mineralització assolit en els cultius, les plaques de creixement, en duplicat, es varen tenyir amb 2% vermell de Alizarin (Sigma Aldrich , st Louis, MO, USA), les quals foren fixades en paraformaldehid de la manera següent: el medi es va apartar de les cèl·lules, a continuació es va esbandir suaument amb ddH₂O i es va afegir 2 % de vermell d'Alizarin durant cinc minuts. Les plaques es van tornar a rentar amb ddH₂O i finalment les cèl·lules es varen preservar amb paraformaldehid.

Immunolocalització de G_sα en la placa de creixement òssia

La unió costocondral (la placa de creixement òssia), obteninguda a partir de rates de 21 dies d'edat, es va fixar amb formalina i es va incloure en parafina. Per a l'anàlisi immunohistoquímica, els blocs de teixit inclosos en parafina es van seccionar, deparafinar i incubar amb un anticòs primari anti-G_sα (durant tota la nit, a 4C), tot seguit rentats i incubats amb un anticòs secundari conjugat amb fosfatasa alcalina (30 minuts a 37C). Les làmines es van rentar i revelar amb un substrat cromogènic (BCIP/INT) i es van ressaltar amb hematoxilina (*Harlow and Lane, 1988*).

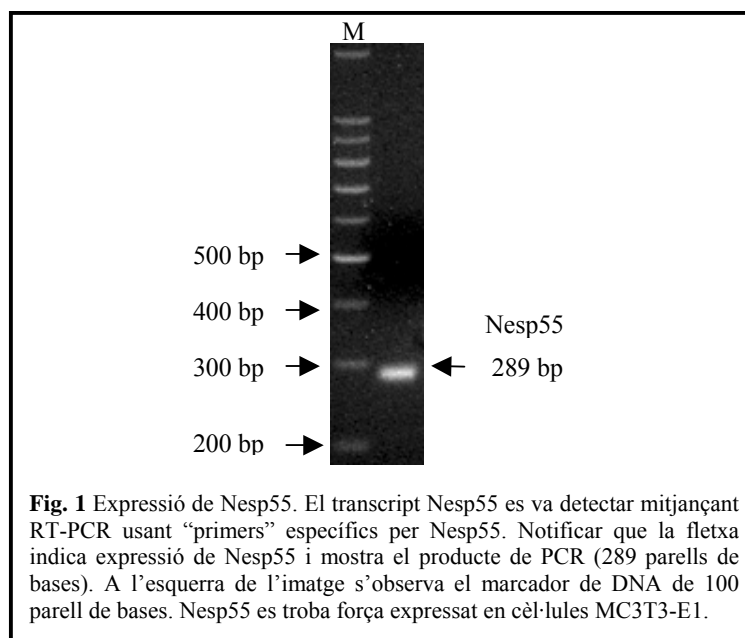
Resultats

Anàlisi de l'expressió basal de Nesp 55, $Xl\alpha$ s, $G_s\alpha$ i *Nesp-antisentit en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de Mus Musculus*

En aquest treball, s'ha utilitzat la línia cel·lular preosteoblàstica (MC3T3-E1) de ratolí com a possible model cel·lular per estudiar la funció dels diferents transcrits de gnas en el procés de diferenciació osteoblàstica. La cèl·lula MC3T3-E1 suplementada amb factors osteogènics tals com BMP-2, àcid ascòrbic i β -glicerol fosfat té la capacitat de diferenciar-se a un fenotip osteogènic. Aquest model preliminar podria ajudar-nos a entendre quins transcrits de GNAS1/gnas estan implicats en l'osteogènesi.

Expressió de Nesp55 en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de Mus Musculus

El producte de la reacció utilitzant “primers” específics per Nesp55, amb les condicions ja esmentades, fou analitzat mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 1.5% i tenyit amb bromur d'etidi.



A la fig.1 s'observa que el transcrit Nesp55 està present en cèl·lules preosteoblàstiques ja que el producte de PCR que es situa just per sota del marcador de DNA de 300pb correspon al tamany esperat de 289 pb. La identitat del producte de PCR es va seqüenciar

per a confirmar que realment es tractava de Nesp55. Com es pot observar, Nesp55 està força present en cèl·lules MC3T3-1.

A continuació es mostra la seqüència del producte reamplificat i la seva homologia (ANNEX1) amb la seqüència de l'mRNA que codifica per Nesp55.

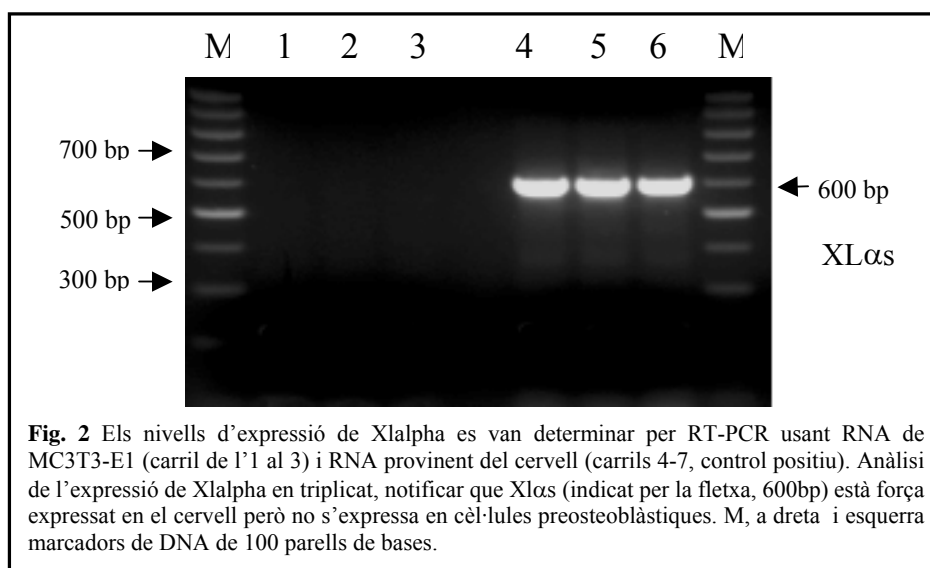
Seqüència corresponent al gen Nesp55

**tcagcactgctagtgnagatggngccactactgntaccctcantttacctnecgctggacactnagaacatccnccg
tgtcttcaacgactgccgtgacatcatccagencatgcatctccncaatanganctgctctaagaaggggaacacccaa
atthaattcagcantaagcacaattanntaagagtganacgtaatngtacaancagttggtcaccnaccatagggcat
gatcaaacngcaanccttccentntcennccagtgattntgaana**

Dels resultats obtinguts a través de la base de dades de seqüències: BLAST-PAIRWISE BLAST- BLAST 2 SEQUENCES, disponible a la web del "NCBI" (National Center for Biotechnology Information), es pot afirmar que la seqüència amplificada pels "primers" específics per Nesp55 pertany al gen Nesp55 ja que hi ha un 90% d'homologia, el 10% no homòleg es deu possiblement a errors que la taq polimerasa introdueix als fragments de DNA reamplificats. (ANNEX 1).

Xlalpha no s'expressa en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de Mus Musculus

Anàlisi dels productes de la reacció utilitzant "primers" específics per XLalpha (XL α s).



A la fig.2. s'observa que el transcrit $XL\alpha$, representat pel producte de PCR de 600bp, està present en cervell i no està present en cèl·lules MC3T3-E1. La identitat del producte de PCR (600 bp) es va seqüenciar per confirmar que realment es tractava de $XL\alpha$. Tot i que el producte de PCR no és l'esperat (545bp), la resolució de la seqüència d'aquest ens confirma que els "primers" dissenyats són específics pel transcrit $XL\alpha$. Probablement es tracti d'una nova isoforma de $XL\alpha$ que s'expressa en cervell. A continuació es mostra la seqüència del producte reamplificat i la seva homologia (ANNEX 2) amb la seqüència de l'mRNA que codifica per XLalpha.

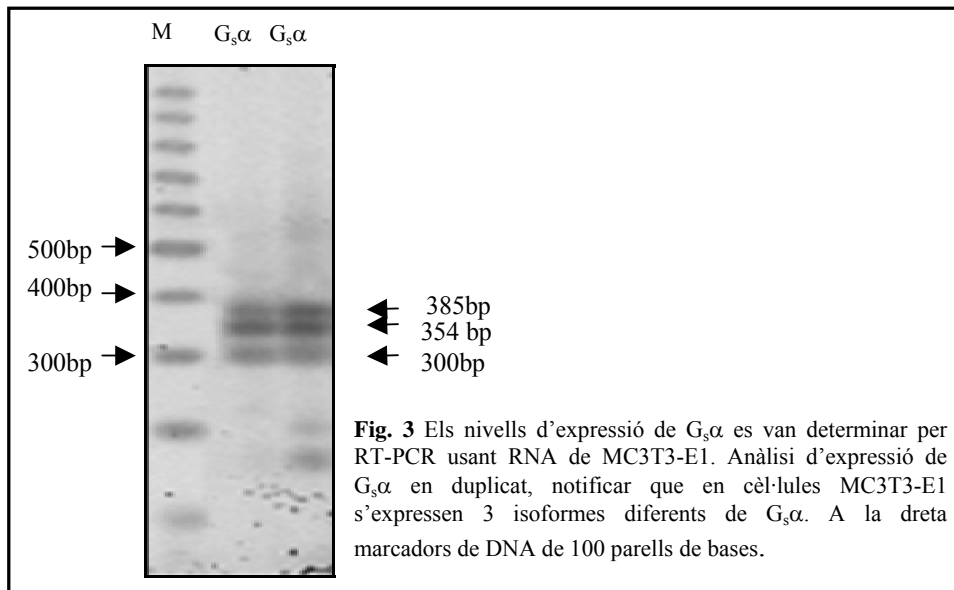
Seqüència corresponent al transcrit $XL\alpha$

**Cagctccacagggggcaccaggttgctcatggcgccacaatggttcaaggcctccttcaggtgttttgatgtcctgc
actttagtggccttctcaccategetgttgcctctgcagcctgcggtcctcttcgcccctcctcgtaaaccattaac
atgcaggatcctcatctgcttcacaatggtgctttgctttgccagactctccagcacctagaagcagcagggcgtgtga
cacatgtagtccatcttctcctcctccagttgcttgcgatgagcttgccttcttctatctgcgcgcttctgctcgcac
taatggcttcttgcgcacatctgttgcgctcctccataggatccttggccttcccgggctgagggatcgtgacgggta
cactcgatagaccgaagcagcttccgaaggtcgggtgaagaagtgcggactgggttgcctccgaccgtgtgctcc
ggggcaggccagggcggggttccgcccanaaccactggaagcagccggnggccccttctnccgactcatnactga
nnnnnnnnnnnc**

Dels resultats obtinguts es pot afirmar que la seqüència està directament relacionada amb una de les isoformes del transcrit $XL\alpha$ (ANNEX 2).

Expressió de diferents isoformes de $G_s\alpha$ en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de Mus Musculus

Els productes de la reacció amb l'ús de "primers" específics per $G_s\alpha$, amb les condicions ja esmentades fou analitzat, en duplicat, mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 1.5% i tenyit amb "vista green".



A la fig.3 s'observa que tres isoformes específiques de G₅α s'expressen en cèl·lules preosteoblàstiques. La identitat dels productes de PCR (385, 354, 300bp) es van seqüenciar per confirmar que realment es tractaven d'isoformes de G₅α. La senyal de 354pb correspon a la isoforma més abundant de G₅α que està present en múltiples teixits. La banda de més mobilitat electroforètica (300bp) correspon a una isoforma de G₅α que és producte de l'eliminació de l'exó 3 per *splicing* alternatiu (l'exó 3 té un tamany de 45nt) i es troba força expressada en cèl·lules MC3T3-E1. El producte de PCR de menys mobilitat electroforètica (385pb) correspon a una nova isoforma de G₅α. Aquesta isoforma no estat mai detectada en cap altre tipus de teixit o línia cel·lular.

Dels resultats obtinguts a través de la base de dades es pot afirmar que les seqüències amplificades corresponen a tres isoformes de G₅α. A continuació es mostren les seqüències dels productes reamplificats i la seva homologia amb la seqüència de l'mRNA que codifica per G₅α (ANNEX 3).

La nova isoforma de $G_s\alpha$

tctcggcaaagcccagctgcagaatgcagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgctgctgctgctgggtgctggag
 agtctggcaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaacggagagggcggcgaagaggaccgca
 ggctgcaaggagcaacagcgtggtgagaaggcactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaacca
 ttgtggccgcatgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtga
 tgaacg

 $G_s\alpha$

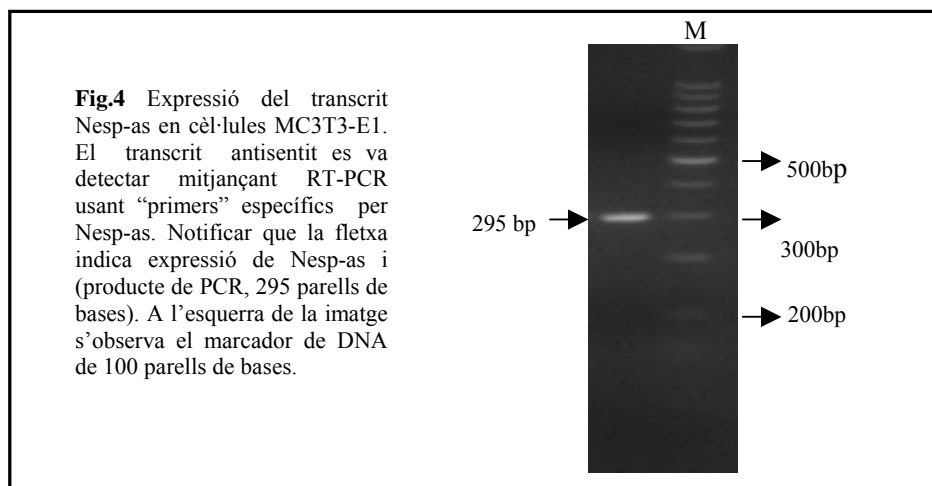
agaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgctgctgctgctgggtgctggagagtctggcaaaagcaccattg
 tgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaacggagagggcggcgaagaggaccgagctgcaaggagc
 aacagcgtggtgagaaggcactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggc
 cgcatgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtg
 atgaacgtg

La forma de $G_s\alpha$ generada per splicing alternatiu

tgagaaggcactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggccgcatgagca
 acctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtgatgaacgtgctg
 cagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgctgctgctgctgggtgctggagagtctggcaaaagcaccatt
 tgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaacg

Expressió del transcrit antisentit en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de Musculus

El producte de la reacció utilitzant “primers” específics per l’antisentit es va analitzar mitjançant electroforesi amb gel d’agarosa al 1.5% i tenyit amb bromur d’etidi.



A la fig.4 s'observa que el transcrit Nesp-as està present en cèl·lules preosteoblàstiques ja que el producte de PCR, que es situa just per sota del marcador de DNA de 300pb, correspon al tamany esperat de 295 pb. El producte de PCR va ser seqüenciat per confirmar que realment es tractava de nesp-as. Nesp-as no és gaire abundant en cèl·lules MC3T3-1. Per a la seva detecció la reacció de PCR es va dur a terme durant 40 cicles. A continuació es mostra la seqüència del producte reamplificat i la seva homologia (ANNEX 4) amb la seqüència de l'mRNA que codifica per Nesp-as.

Seqüència corresponent a Nesp-as

**tcacctctggctctgcagagagtgccccactgcgcaaggactgttggggccgaaaaggattaaccttatgaggagag
aagetggggtctgaagacccaatctcgctcggggcaaaaagaaggatgtacctacctcaaacctgcgaacttt
ctaaagctcgcgctcagcttgaggctgtaagtaaaagaaaggatgggtaaagaagagagaaggagtctcctcga
ggctcctctcgctaagtctcagactctga**

La seqüència amplificada pels “primers” específics per Nesp-as està directament relacionada amb el transcrit Nesp-as (ANNEX 4).

Representació gràfica de les condicions cícliques pels transcrits XLalpha, $G_s\alpha$, Nesp55 i Nesp-as de *Mus Musculus* en cèl·lules MC3T3-E1.

Per a realitzar els experiments d'expressió gènica per totes les formes de Gnas en cèl·lules MC3T3-E1 dirigides al fenotip osteogènic, es van haver de trobar les condicions lineals òptimes per a cada un dels transcrits expressats en aquestes cèl·lules. Les corbes de saturació s'expressen com a fluorescència relativa.

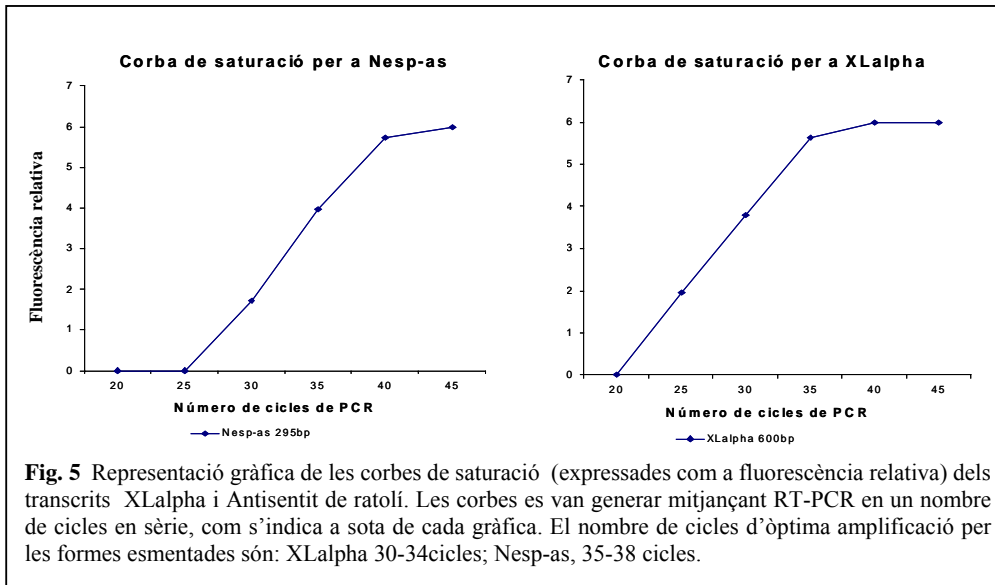


Fig. 5 Representació gràfica de les corbes de saturació (expressades com a fluorescència relativa) dels transcrits XLalpha i Antisentit de ratolí. Les corbes es van generar mitjançant RT-PCR en un nombre de cicles en sèrie, com s'indica a sota de cada gràfica. El nombre de cicles d'òptima amplificació per les formes esmentades són: XLalpha 30-34cicles; Nesp-as, 35-38 cicles.

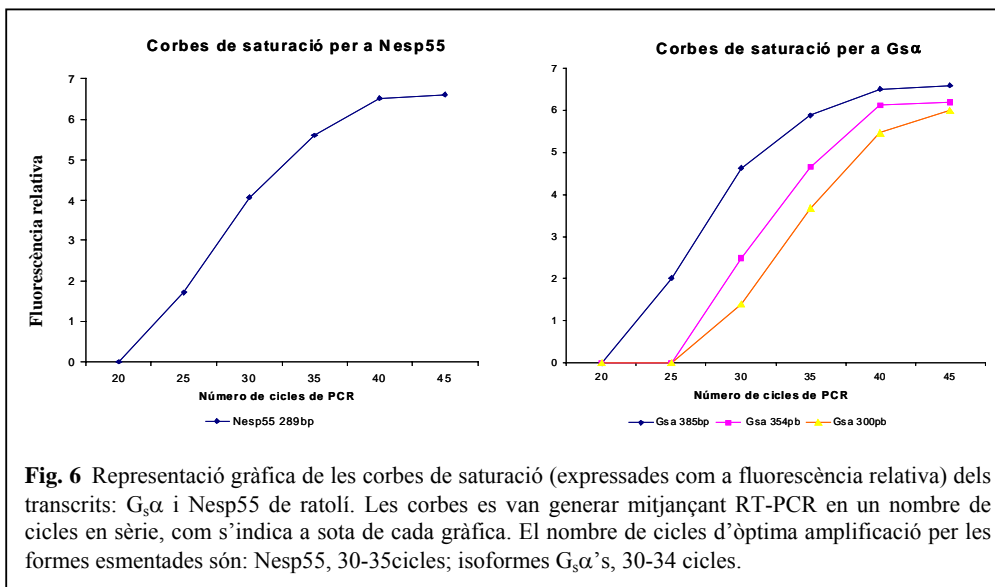
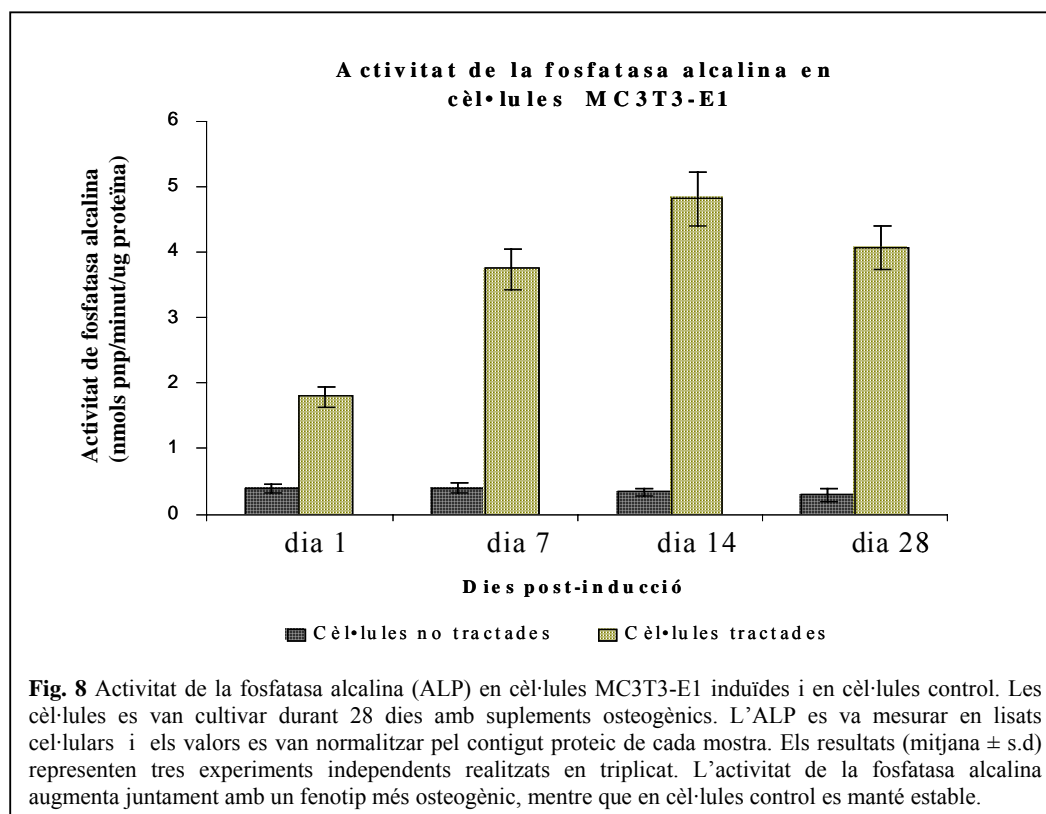


Fig. 6 Representació gràfica de les corbes de saturació (expressades com a fluorescència relativa) dels transcrits: $G_s\alpha$ i Nesp55 de ratolí. Les corbes es van generar mitjançant RT-PCR en un nombre de cicles en sèrie, com s'indica a sota de cada gràfica. El nombre de cicles d'òptima amplificació per les formes esmentades són: Nesp55, 30-35cicles; isoformes $G_s\alpha$'s, 30-34 cicles.

A les fig.5 i 6 hi ha representades les condicions òptimes per a una amplificació lineal dels transcrits XLalpha, G_sα, Nesp55 i Nesp-as de *Mus Musculus*. Totes les formes de G_sα s'amplifiquen linealment a 34 cicles. Cal notar que (figura 6, dreta) G_sα (385bp), la forma més ubiqüament expressada es troba, aproximadament, unes 10 vegades més expressada que les altres dues isoformes. XLalpha (figura 5, dreta) i Nesp55 (figura 6, esquerra) tenen unes condicions d'amplificació semblants a la forma més abundant de G_sα, arribant al seu òptim a 35 cicles. XLalpha es va amplificar a partir de teixit de cervell de ratolí ja que les cèl·lules MCT3T3-1 no l'expressaven. El transcrit antisentit (figura 5, esquerra) igual que la isoforma menys expressada de G_sα té una amplificació òptima a 35 cicles. Els nivells d'expressió d'algunes de les formes trobades en cèl·lules MC3T3-E1 (Nesp55, Nesp-as i la nova forma de G_sα) i la manca d'expressió de XLalpha pot ser que tinguin certa importància en la predisposició de les cèl·lules preosteoblàstiques a diferenciar-se a osteoblasts.

Detecció de la fosfatasa alcalina en cèl·lules MC3T3-E1 induïdes

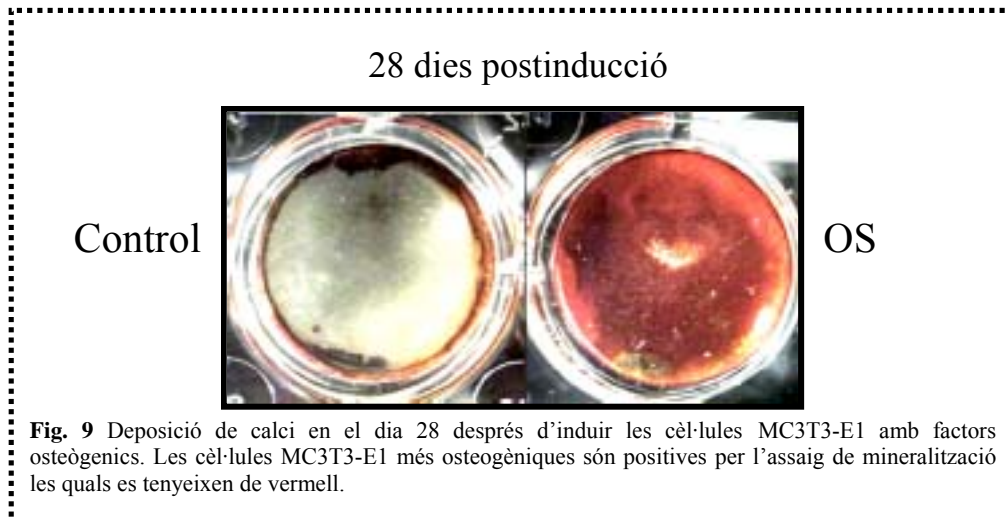
L'activitat de fosfatasa alcalina (ALP) es va calcular a temps diferents (dies 1, 7, 14 i 28) com s'ha descrit en materials i mètodes tant en cèl·lules MC3T3-E1 induïdes com en cèl·lules control. L'activitat de la fosfatasa alcalina fou normalitzada pel contingut proteic de les mostres.



La fig.8. ens mostra l'activitat de la fosfatasa alcalina en cèl·lules MC3T3-E1 induïdes i en cèl·lules MC3T3-E1 no induïdes. Les cèl·lules es van cultivar durant 28 dies amb suplementos osteogènics, mesurant l'activitat de la fosfatasa alcalina en els lisats cel·lulars. Els resultats es van normalitzar pel contingut proteic de cada mostra. Cada un dels valors (mitjana \pm s.d) representen tres experiments independents realitzats per triplicat. En cèl·lules induïdes, l'activitat de la fosfatasa alcalina augmenta juntament amb un fenotip més osteogènic, el qual és determinat per la deposició de calci (veure fig.9), mentre que en cèl·lules control es manté estable.

Detecció de la deposició de calci amb vermell d'Alizarin (assaig de mineralització)

La tinció del calci es va realitzar en els dies 1, 7, 14 (resultats no presentats) i 28 tal com s'ha descrit en materials i mètodes tant en cèl·lules MC3T3-E1 induïdes com en cèl·lules control.



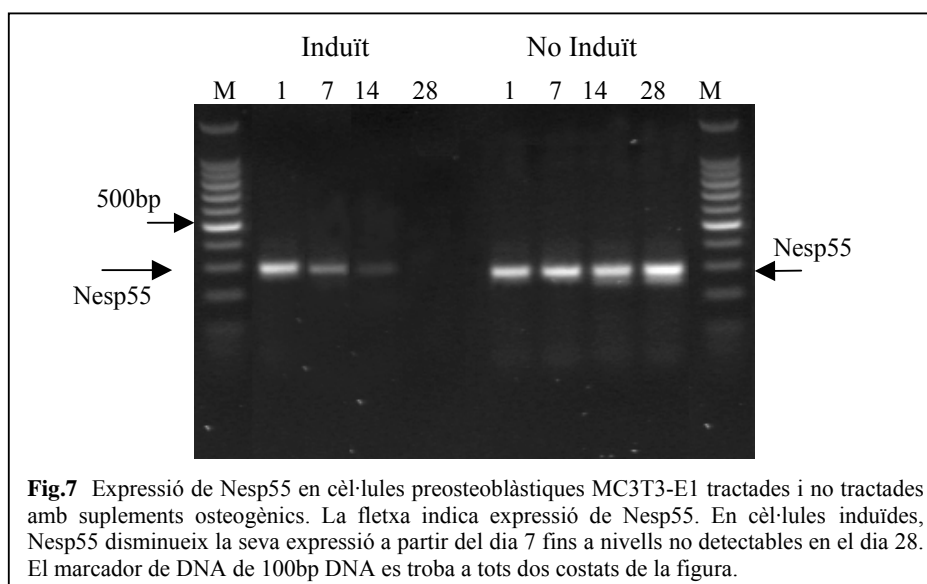
En cèl·lules MC3T3-E1, després de 28 dies de tractament, s'observa l'efecte sinèrgic del β -glicerol fosfat, de l'àcid ascòrbic i de la proteïna recombinant BMP-2 (fig.9). Les cèl·lules dirigides a un fenotip osteogènic experimenten una deposició progressiva de calci que assoleix el seu màxim el dia 28. Les cèl·lules control mantenen els nivells de calci constants respecte al temps. Aquests resultats, juntament amb l'increment en l'activitat de la fosfatasa alcalina, donen suport al fet que les cèl·lules MC3T3-E1 es poden diferenciar a osteoblasts, fent possible doncs l'ús de la tecnologia dels transcrits de gnas en un model cel·lular de diferenciació osteogènica ben establert. Aquest model ens permetrà estudiar la funció que tenen les diferents isoformes de gnas en la diferenciació osteogènica que pateixen certs tipus cel·lulars.

*Anàlisi de l'expressió gènica dels transcrits Nesp55, Xl α s, G $_s$ α i Nesp-antisentit en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí (*Mus Musculus*) dirigides cap a un fenotip osteogènic*

A continuació es presenten els resultats d'expressió gènica obtinguts pels transcrits de Nesp55, Xl α s, G $_s$ α i Nesp-as de ratolí en cèl·lules MC3T3-E1 analitzats en els dies 1, 7, 14 i 28 en cèl·lules MC3T3-E1 sota inducció osteogènica.

Expressió del transcrit Nesp55 en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí dirigides cap a un fenotip osteogènic

Per correlacionar alguna possible funció de Nesp55 en el procés d'osteogènesi, vam analitzar en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí induïdes amb suplementes osteogènics, l'expressió de Nesp55 en els dies 1, 7, 14 i 28 del tractament. Els productes de la reacció, amplificats amb "primers" específics per Nesp55 usant les condicions ja esmentades, es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 1.5% i tenyir amb bromur d'etidi.

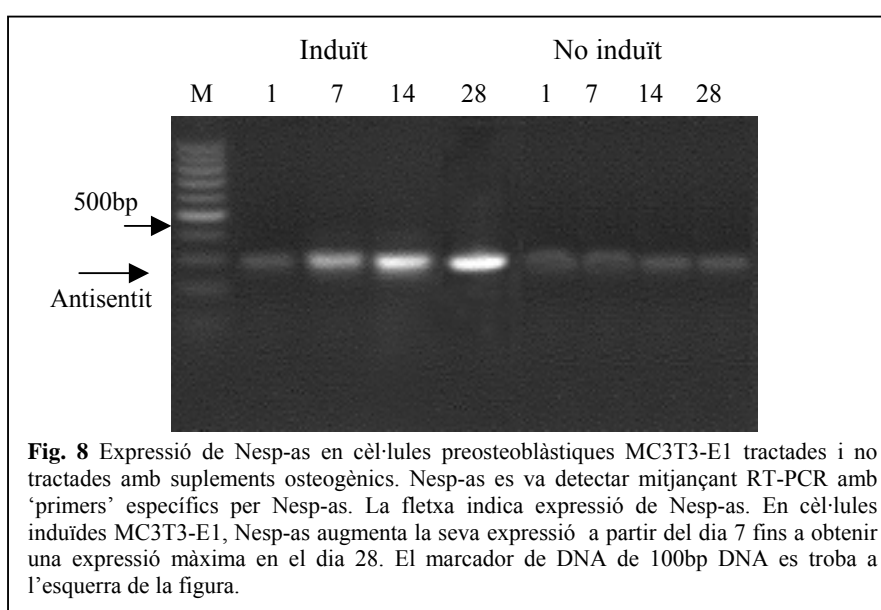


La fig.7 ens mostra l'expressió de Nesp55 respecte al temps en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 tractades i no tractades amb suplementes osteogènics. Les cèl·lules no tractades expressen Nesp55 sense que s'apreciï cap variació significativa respecte al temps. En canvi en cèl·lules induïdes MC3T3-E1, Nesp55, en el dia 7

disminueix la seva expressió fins a nivells no detectables en el dia 28. Aquest resultat preliminar és important ja que indica que Nesp55 pot tenir alguna funció en la predisposició de certs tipus cel·lulars per desencadenar una resposta osteogènica.

Expressió gènica de Nesp-as en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí dirigides cap a un fenotip osteogènic

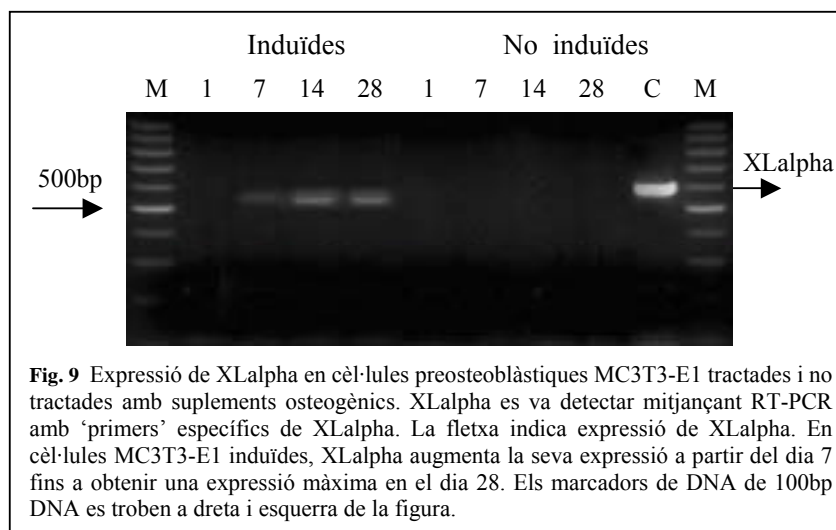
L'expressió de Nesp-as es va analitzar en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí els dies 1, 7, 14 i 28 després d'induir-les amb suplementos osteogènics.



La fig.8 ens mostra l'expressió de Nesp-as respecte al temps en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 tractades o no tractades amb suplementos osteogènics. Les cèl·lules no tractades expressen Nesp-as sense que s'apreciï variació significativa respecte al temps. En canvi en cèl·lules induïdes MC3T3-E1, Nesp-as, en el dia 7, augmenta la seva expressió fins a valors màxims en el dia 28. Aquests resultats indiquen que Nesp-as podria tenir alguna funció en la predisposició de certs tipus cel·lulars a desencadenar una resposta osteogènica, probablement en el bloqueig d'alguna de les formes de gnas.

Anàlisi de l'expressió de XLalpha en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí dirigides cap a un fenotip osteogènic

L'expressió de XLalpha es va analitzar en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí els dies 1, 7, 14 i 28 després d'induir-les amb suplementos osteogènics.



La fig.9 ens mostra l'expressió de XLalpha respecte al temps en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 tractades o no tractades amb suplementos osteogènics. Les cèl·lules que no han estat tractades no expressen XLalpha i no s'aprecia variació respecte al temps. En canvi en cèl·lules induïdes MC3T3-E1, XLalpha, en el dia 7, comença a expressar-se, augmentant la seva expressió fins a valors màxims en el dia 14 i mantenint-los fins al dia 28. Aquests resultats indiquen que XLalpha també podria tenir alguna funció en el procés d'osteogènesi. El transcrit XLalpha es troba poc expressat. També hem de fer esment que la forma de Xlapha que s'expressa en cèl·lules MC3T3-E1 estimulades difereix en tamany de la expresada en el cervell de rata (control positiu, ~600bp). El producte de PCR de Xlapha es localitza entre els marcadors de 600bp i 500bp amb un pes molecular de 550nt, al qual pertany a la forma de XLalpha generada per *splicing* alternatiu (manca de l'exó 3, ~45nt), la seqüència de la qual es va usar per dissenyar els "primers" per amplificar la forma completa de Xlapha. El producte reamplificat fou seqüenciat per tal de confirmar la seva identitat. Aquest resultat ens suggereix que la forma escurçada de XLalpha podria tenir alguna funció en la formació ectòpica d'os.

Expressió de les isoformes de $G_s\alpha$ en cèl·lules preosteoblàstiques (M3CT3-E1) de ratolí dirigides cap a un fenotip osteogènic

L'expressió de $G_s\alpha$ es va analitzar en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí en els dies 1, 7, 14 i 28 després d'induir-les amb suplementos osteogènics. El productes de la reacció, es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 2.5% i visualitzats amb "vista green".

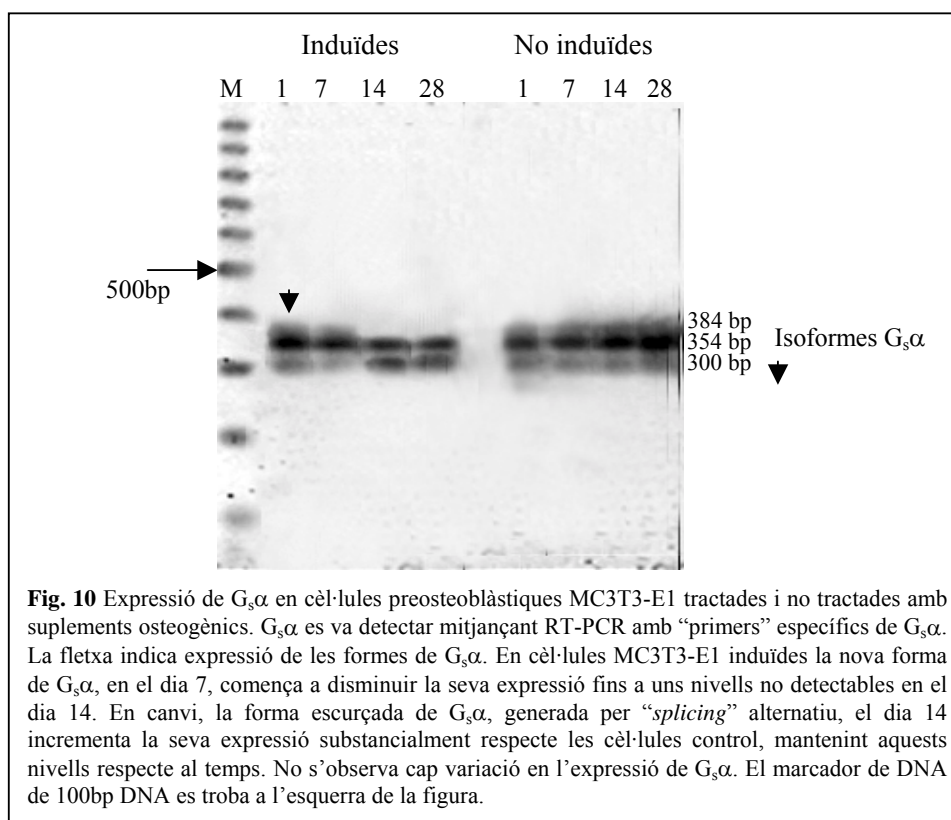


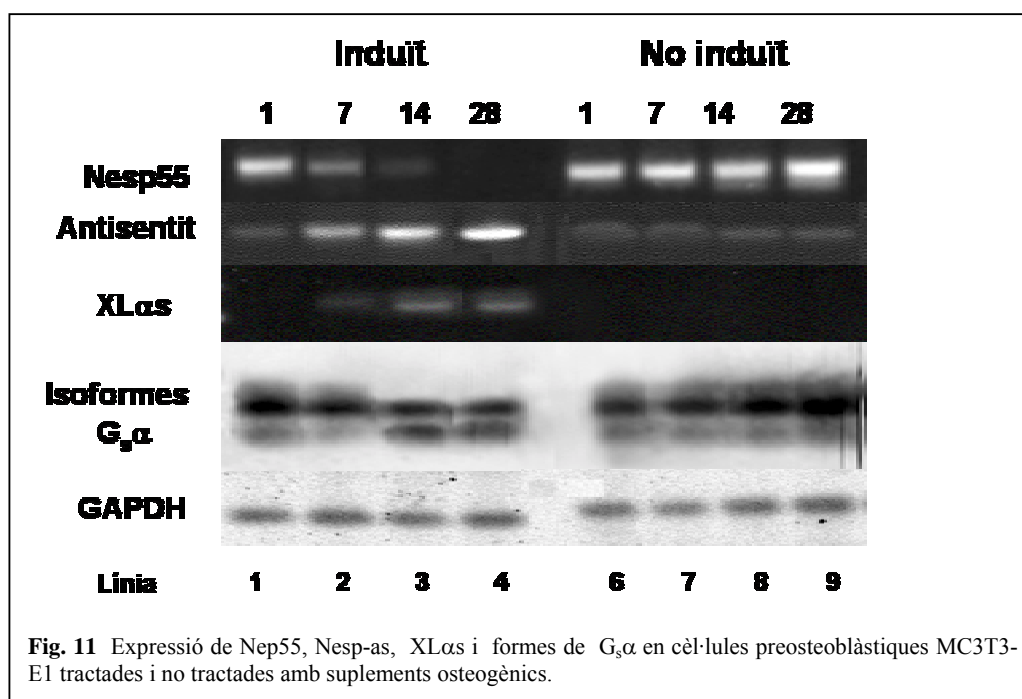
Fig. 10 Expressió de $G_s\alpha$ en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 tractades i no tractades amb suplementos osteogènics. $G_s\alpha$ es va detectar mitjançant RT-PCR amb "primers" específics de $G_s\alpha$. La fletxa indica expressió de les formes de $G_s\alpha$. En cèl·lules MC3T3-E1 induïdes la nova forma de $G_s\alpha$, en el dia 7, comença a disminuir la seva expressió fins a uns nivells no detectables en el dia 14. En canvi, la forma escurçada de $G_s\alpha$, generada per "splicing" alternatiu, el dia 14 incrementa la seva expressió substancialment respecte les cèl·lules control, mantenint aquests nivells respecte al temps. No s'observa cap variació en l'expressió de $G_s\alpha$. El marcador de DNA de 100bp DNA es troba a l'esquerra de la figura.

A la fig.10 s'observa expressió de les formes de $G_s\alpha$ en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 tractades o no tractades amb suplementos osteogènics. El dia 7 la nova forma de $G_s\alpha$, en cèl·lules induïdes MC3T3-E1 cèl·lules, comença a disminuir la seva expressió fins a uns nivells no detectables en el dia 14, mentre que en les cèl·lules control els nivells basals d'mRNA romanen constants. Aquests resultats suggereixen que aquesta forma de $G_s\alpha$ podria tenir alguna funció en el control de l'estat cel·lular de tipus cel·lulars amb capacitat de diferenciar-se a altres línies cel·lulars. També observem, en el dia 14, que la forma escurçada de $G_s\alpha$, generada per "splicing" alternatiu, incrementa la seva

expressió substancialment respecte a les cèl·lules control, mantenint aquests nous nivells respecte al temps. L'activació d'aquesta forma també podria estar afectant l'estat específic d'aquestes cèl·lules. No s'observa variació de $G_s\alpha$ en les cèl·lules induïdes respecte a les cèl·lules control.

Resum de l'expressió de Nep55, Nesp-as, XLas i formes de $G_s\alpha$ en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí en un fenotip osteogènic induït

La fig.11 presenta un resum de l'expressió dels transcrits Nep55, Nesp-as, XLas i formes de $G_s\alpha$ en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí en un fenotip osteogènic induït.



Les cèl·lules MC3T3-E1 expressen Nesp-as, Nep55, ambdues isoformes de $G_s\alpha$ i una nova isoforma de $G_s\alpha$. Vàrem analitzar la contribució que les diferents isoformes de gnas poden tenir quan les cèl·lules MC3T3-E1 s'han orientat cap a un fenotip osteogènic. Els nostres resultats indiquen variacions en l'expressió d'algunes de les formes de gnas de ratolí generades per “*splicing*” alternatiu. Nep55 i la nova isoforma de $G_s\alpha$ redueix la

seva expressió fins a valors no detectables coincidint amb una diferenciació més osteogènica, mentre que l'antisentit, la isoforma de $G_s\alpha$ amb l'exó 3 exclòs i XLalpha augmenten progressivament la seva expressió en resposta a un fenotip més osteogènic. Per contra, $G_s\alpha$ no experimenta cap canvi significatiu respecte a cèl·lules no estimulades.

Immunolocalització de $G_s\alpha$ en la placa de creixement òssia

Per tal d'observar la distribució de $G_s\alpha$ en els diferents llinatges osteogènics, $G_s\alpha$ es va immunolocalitzar en la placa de creixement de ratolí utilitzant un anticòs policlonal específic de $G_s\alpha$ (descriu en materials i mètodes).

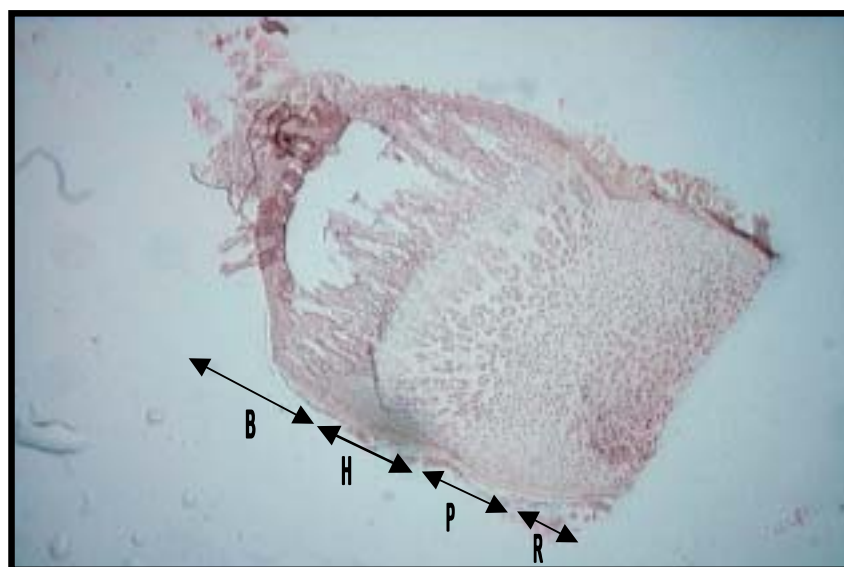


Fig. 12 Immunolocalització de $G_s\alpha$ en la placa de creixement òssia. Les unions costocondrals de rata es van incloure en parafina, seccionar i incubar amb l'anticòs anti- $G_s\alpha$. Les làmines es van rentar i l'anticòs unit es va detectar amb un anticòs secundari conjugat amb fosfatasa alcalina. Cal notar la distribució de $G_s\alpha$ en condrocits, osteoblast i osteòcits. H, condrocits hipertròfics, P, condrocits proliferatius, R, condrocits en repòs i B, os.

A la fig.12 s'observa la distribució de la proteïna $G_s\alpha$ en els diferents tipus cel·lulars presents en la unió costocondral (placa de creixement). $G_s\alpha$ s'expressa abundantment en condrocits en repòs, disminueix en condrocits proliferatius i condrocits hipertròfics i torna a augmentar en osteoblasts i osteòcits. També s'observa que hi ha cert nivell l'expressió en el pericondrium. La distribució que s'observa és una incògnita i només es podrà entrar en detall quan estudiem l'expressió diferencial dels diferents transcritps de

$G_s\alpha$ ja que l'anticòs policlonal utilitzat no ens dóna informació de quines formes del gen g_n s s'expressen o deixen d'expressar-se en els diferents tipus cel·lulars.

Discussió

In vivo, la formació d'os és un procés complex on els passos de reclutament i replicació de cèl·lules mesenquimàtiques precursoras d'osteoblast, diferenciació d'aquests a preosteoblasts i una ràpida maduració a osteoblast, resulten, finalment, en una acumulació i mineralització de la matriu extracel·lular (Quarles et al., 1992; Quarles et al., 1996; Arun Seth et al., 2000; Abrens, 1993; Torii et al., 1991).

El locus GNAS1 és un model excel·lent per a explorar la funció de control sobre l'osteogènesi, ja que mutacions inactivadores en aquests locus són la causa genètica de bastants desordres amb formació ectòpica d'os, entre ells la POH (l'heteroplàsia òssia progressiva). GNAS1 és un dels pocs gens en el quals s'han caracteritzat mutacions activadores i inactivadores (Micheala et al., 2000). El locus Gnas/GNAS1 presenta un patró únic d'expressió de proteïnes. Els transcrits del gen GNAS1 expressats per múltiples promotors (P1, P2 i P3), tot i codificar per proteïnes diferents, són enllaçats per *splicing* alternatiu a l'exó 2, compartint en comú els exons 2-13 de la unitat transcripcional. És interessant notar que un tercer transcrit dins la regió P1-P2, tant en humans com en ratolins, s'ha demostrat que s'expressa en alguns teixits (Hayward and Bonthron, 2000).

La línia cel·lular preosteoblàstica MC3T3-E1 que deriva de la calba de ratolí, quan es suplementa amb factors osteogènics, pateix, en un període de 28 a 35 dies, una seqüència de desenvolupament ordenada, temps-depenent, que condueix a la formació de nòduls d'os disposats en múltiples capes (Seth et al., 2000; Torii et al., 1991). Aquest patró de desenvolupament es caracteritza per la replicació dels preosteoblasts seguit d'una aturada del creixement i de l'expressió de característiques osteoblàstiques tals com la maduració de la matriu i la formació eventual de nòduls en múltiple capa amb una matriu extracel·lular mineralitzada (Quarles et al., 1992; Quarles et al., 1996; Arun Seth et al., 2000; Abrens, 1993). Aquest sistema de cultiu d'osteoblasts "*in vitro*" és biològicament rellevant pel fet que la seqüència temporal de gens expressats els quals codifiquen per marcadors específics d'osteoblast segueixen el mateix patró específic d'expressió gènica i

distribució cel·lular dels ossos neonatals llargs (*Arun Seth et al., 2002*). Per veure si es podrien utilitzar les cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí com a model per l'estudi de la funció dels diferents transcrits de Gnas en el procés d'osteogènesi, es varen cultivar les cèl·lules MC3T3-E1 en condicions osteogèniques per estimular la diferenciació d'aquestes a d'osteoblasts (*Bellows et al., 1989; Beresford et al., 1993; Buttery et al., 2001*).

Vàrem comprovar que les cèl·lules MC3T3-E1, després d'induir-les amb àcid ascòrbic, β -glycerol phosphate i BMP-2 exògena (*Torii et al., 1991*) durant un període de 28 dies, es podien diferenciar selectivament a osteoblast. Aquesta diferenciació a osteoblasts va ser suggerida per la demostració d'una discreta mineralització de nòduls d'os, com també per un augment de l'activitat de la fosfatasa alcalina. Per a caracteritzar el mecanisme molecular de gnas/GNAS1 implicat en la regulació de la diferenciació osteogènica de certs tipus cel·lular, es van dissenyar "primers" específics per a tots els transcrits de gnas coneguts, aquests es van analitzar en cèl·lules MC3T3-1. Abans de dissenyar "primers" específics per totes les formes de Gnas, vàrem utilitzar, en cèl·lules MC3T3-E1 control, els "primers" usats per *Tao li et al. 2000*. Malauradament cap de les condicions de PCR descrites pels transcrits de gnas va tenir una amplificació exitosa. Les raons d'aquest fracàs no es coneixen tot i haver provat gran nombre de condicions de PCR a més de les descrites per *Tao li et al., 2000*. Si els "primers" van ser publicats de forma incorrecta és quelcom que es manté en l'anonimat.

Després d'aquesta inconveniència tècnica, un nou arsenal de "primers" fou dissenyat per poder detectar totes les formes de Gnas mitjançant RT-PCR. Les seqüències pels "upstream primers" (forward) es van obtenir dels diferents promotors o primers exons dels diversos transcrits de Gnas, mentre que les seqüències pels "downstream primers" varen ser tots dissenyats a partir de seqüències localitzades en l'exó 5 del locus gnas. El sistema descrit en materials i mètodes es va utilitzar per a Nesp55, Xlalpha i G α .

Aquesta estratègia difereix de l'usada per *Vu and Hoffman, 1996*, on els "downstream primers" de tots els transcrits sentit tenen la mateixa seqüència, aquesta localitzada en l'exó 2. El fet de no haver utilitzat la mateixa tecnologia que la usada per

Tao li et al., 2000 pot explicar el perquè els “primers” publicats no havien funcionat en els nostres experiments. En canvi els “primers” per Nesp-as, varen ser dissenyats a partir de l'exó 1 (“reverse”) i de l'exó 4 (“forward”), localitzats a la regió P1-P2 del locus de Gnas.

Els “primers” dissenyats varen ser avaluats, trobant que l'antisentit, Nesp55, ambdues isoformes de $G_s\alpha$ conegudes i una nova isoforma de $G_s\alpha$, mai detectada en un altre tipus cel·lular o teixit, s'expressen en les cèl·lules preosteoblàstiques, mentre que les isoformes de XLalpha no s'hi expressen. L'expressió específica de teixit de Nesp55, Gnas-as i tres isoformes de $G_s\alpha$ va ser demostrada per primera vegada en cèl·lules MC3T3-E1 preosteoblàstiques. El que més va sorprendre va ser la detecció en cèl·lules MC3T3-E1 d'una forma més allargada de $G_s\alpha$, mai detectada en un altre tipus cel·lular o teixit amb uns nivells d'mRNA d'expressió basals semblants a la isoforma de $G_s\alpha$ generada per “splicing” alternatiu. Aquesta troballa suggereix que la unitat transcripcional gnas/GNAS1 és força més complexa del que es creia (*Hayward et al., 1998a and b; Hayward et al., 2000; Hayward et al., 2001*).

L'obtenció de resultats positius en diferents transcrits de Gnas en cèl·lules Preosteoblàstiques MC3T3-E1 ens va encoratjar a intentar comprendre amb més detall com es troba regulada la seva expressió cel·lular. Es varen utilitzar tècniques d'anàlisi d'expressió gènica per a analitzar la contribució que les diferents isoformes de gnas poden tenir quan les cèl·lules MC3T3-E1 s'han orientat cap a un fenotip osteogènic.

Aquestes observacions indiquen que Nesp55 i la nova isoforma de $G_s\alpha$ redueixen l'expressió fins a valors no detectables coincidint amb una diferenciació més osteogènica, mentre que l'antisentit, la isoforma de $G_s\alpha$ amb l'exó 3 exclòs i XLalpha (no detectada en cèl·lules MC3T3-E1 control) augmenten progressivament l'expressió en resposta a un fenotip més osteogènic. Per contra, la forma de $G_s\alpha$, més universalment expressada (*Farfel et al., 1996; Birnbaumer et al., 1990*) no va experimentar cap canvi significatiu respecte de les cèl·lules no estimulades. L'activació i inactivació d'algunes de les formes

de gnas en el procés de mineralització observat en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí ens dóna certa idea de com el procés d'osteogènesi pot ésser regulat.

Encara que s'han observat diferències clares en l'expressió dels diferents transcrits de gnas en cèl·lules induïdes respecte de cèl·lules no induïdes, aquests resultats s'haurien de repetir usant RT-PCR semiquantitatiu, per obtenir així resultats més sòlids respecte als valors d'expressió obtinguts amb l'anàlisi per PCR convencional. L'anàlisi d'expressió dels diferents transcrits hauria de ser quantificada en triplicat i normalitzada amb GAPDH. No podem excloure que les diferències en expressió podrien ser degudes a variacions creades en la manipulació de les mostres. Aquest mètode no es va aplicar a les cèl·lules MC3T3-E1 ja que un model "knockout" per al gen gnas estava a punt de poder ser usat. Les cèl·lules mesenquimàtiques mare portadores de mutacions heterozigòtiques són un model més adequat per estudiar els efectes de mutacions inactivadores de GNAS1 en els processos d'osteogènesi.

Tot i que el sistema àcid ascòrbic/ β -GP/ BMP-2, utilitzat per a induir les cèl·lules MC3T3-E1 cap a un fenotip osteoblàstic és un model ben definit i caracteritzat (*Torii et al., 1999*), és important esmentar que existeix una limitació en l'ús d'aquest model: L'estudi podria estar reflexant processos transcripcionals addicionals de cèl·lules MC3T3-E1 immortalitzades. Estudis recents d'expressió gènica global en cèl·lules immortalitzades de teixit de càncer de colon van suggerir que aquestes cèl·lules immortalitzades proporcionaven models adequats "in vitro" de les mateixes cèl·lules en condicions fisiològiques. Tot i així es va recomenar precaució en la utilització d'aquestes cèl·lules per a la interpretació de dades d'expressió individual de gens (*Zhang et al., 1997*). Així doncs, seria d'interès demostrar en osteoblasts normals provinents de fonts diferents (cèl·lules de la calva i d'ossos llargs) els mateixos resultats d'expressió obtinguts per a les formes de gnas en cèl·lules MC3T3-E1.

Com a resum, en aquest estudi s'ha demostrat que múltiples formes del gen GNAS1/gnas s'expressen en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí. A més, també s'ha demostrat que quan les cèl·lules estan orientades cap a un llinatge osteogènic existeixen notables diferències en l'expressió dels transcrits de gnas. La inhibició de les

isoformes Nesp55 i la nova forma de $G_s\alpha$ i una activació progressiva de les isoformes XLalpha, antisentit i $G_s\alpha$ amb l'exó 3 exclòs pot proporcionar un mecanisme coordinat que involucra la unitat transcripcional de gnas en el procés de diferenciació osteogènica de cèl·lules pluripotents, suggerint que la predisposició de hMCS a dirigir-se a llinatges osteogènics o adipogènics està governat per múltiples interaccions entre els diferents transcrits de gnas.

