

REGULACIÓ D'OSTERIX, UN
GEN CLAU PER A LA
DIFERENCIACIÓ
OSTEOBLÀSTICA INDUÏDA
PER BMP-2

TESI DOCTORAL
ARNAU ULSAMER RIERA
2009



Programa de Doctorat de BIOMEDICINA
Bienis 2003-2005

REGULACIÓ D'OSTERIX, UN GEN CLAU PER A LA
DIFERENCIACIÓ OSTEUBLÀSTICA INDUÏDA PER
BMP-2

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr Francesc
Ventura Pujol al Departament de Ciències Fisiològiques II de la
Universitat de Barcelona

Arnau Ulsamer Riera

Dr Francesc Ventura Pujol

Memòria presentada per Arnau Ulsamer Riera per optar al grau de Doctor
per la Universitat de Barcelona.

El pensament lúcid requereix més valor que intel·ligència
(Thomas Szasz)

Quienes van muy deprisa hacia ninguna parte
cierran el paso sin un solo resquicio
a quienes queríamos llegar lentamente a un destino
(Jorge Riechmann)

La voluntat de renunciar a la independència
i d'estar en harmonia amb un grup
és l'aliment del que es nodreixen els demagogs
(Paul Waltzalawick)

INDEX:

INTRODUCCIÓ

1-El desenvolupament de l'os.....	1
1.1- Cèl·lules mesenquimals d'origen mesodèrmic	
1.1.1 Elements esquelètics derivats del mesoderm paraxial	
1.1.2 Elements esquelètics derivats de la placa lateral del mesoderm	
1.2- Elements esquelètics derivats de la cresta neural	
1.3- Elements esquelètics derivats de les cèl·lules mare mesenquimals en l'organisme adult	
2-La superfamília TGF β	9
2.1- Membres de la superfamília TGF β	
2.1.1 TGF β <i>sensu stricto</i>	
2.1.2 Les Activines i les Inhibines	
2.1.3 Les BMPs	
2.1.4 Antagonistes de les BMPs	
2.2- Receptors de la superfamília TGF β	
2.2.1 Els coreceptors:	
2.3- Via de les Smads	
2.4- Vies independents de Smads	
2.4.1 Les MAPK	
2.4.1.1 ERK1 i ERK2	
2.4.1.2 TAK1 i les SAPK (JNK i P38-MAPK)	
2.4.1.2.1 JNK	
2.4.1.2.2 P38-MAPK	
2.4.1.2.3 És realment la via de TAK1 independent de les smads?	
2.4.2 La cua citoplasmàtica de BMPRII i la fosforilació de LIMK1	
2.5- Altres vies relacionades amb BMP	
2.5.1 Les BMPs i la via de Wnt	
2.5.2 Les BMPs i la via de Shh	
2.6- Les Smads com a factors de transcripció	
2.6.1 Intraccions de les Smads i altres factors de transcripció:	
2.6.2 Co-activadors i co-repressors de les Smads	

3- La diferenciació dels llinatges mesenquimals.....	39
3.1- Miogènesi	
3.2- Adipogènesi	
3.2.1 Regulació transcripcional de l'adipogènesi	
3.3- La diferenciació de l'os	
3.3.1 La formació del patró de l'esquelet	
3.3.2 Mecanismes d'ossificació	
3.3.3 Mecanismes de formació del cartílag i de l'os	
3.3.4 Factors de transcripció implicats en la condrogènesi	
3.3.5 Runx2, un factor implicat en la condrogènesi i l'osteogènesi	
3.3.6 Factors de transcripció implicats en l'osteogènesi	
3.3.6.1 Les smads en la transcripció de gens osteogènics	
3.3.6.2 Osterix	
3.3.6.3 ATF4	
3.3.6.4 Factors de transcripció amb homeodomini implicats en l'osteogènesi	
3.3.6.5 p53 com a factor de transcripció	
3.3.6.6 Altres factors implicats en l'osteogènesi	
4- El nostre model, les cèl·lules C2C12.....	65
OBJECTIUS.....	67
RESULTATS	
1-Regulació d'Osterix per BMP-2.....	69
2-Identificació de nous gens <i>downstream</i> de BMP-2.....	91
DISCUSSIÓ.....	97
CONCLUSIONS.....	113
MATERIALS I MÈTODES.....	115
BIBLIOGRAFIA.....	141
APÈNDIX.....	175

INTRODUCCIÓ

*Dai diamanti non nasce niente,
dal letame nascono i fiori*
Fabrizio De André

1-El desenvolupament de l'os

La diferenciació cel·lular és un dels camps de la biologia on s'han fet més avenços en els darrers anys. L'estudi de com les cèl·lules totipotents van especialitzant-se fins a donar lloc a cèl·lules cada cop més especialitzades ha permès somiar en arribar a regenerar teixits i fins i tot, òrgans sencers del cos humà.

L'estudi de la diferenciació cel·lular s'ha focalitzat històricament en el desenvolupament embrionari, el qual es caracteritza per una successió de processos molt organitzats on les cèl·lules diferencien a llinatges ben definits durant la formació de teixits específics o bé es mantenen parcialment o totalment indiferenciades, mantenint així la presència de poblacions de cèl·lules mare i progenitores en cada teixit.

També en l'organisme adult es dona constantment la diferenciació de cèl·lules pluripotents a cèl·lules madures d'un determinat llinatge, el descobriment de cèl·lules pluripotencials en adults, tals com les cèl·lules mare mesenquimals, ha incrementat l'interès en l'estudi de com les cèl·lules mesenquimals diferencien a diferents llinatges, entre ells l'os.

El destí de cada cèl·lula depèn de senyals externs en forma de factors que regulen el manteniment de la pluripotencialitat o la diferenciació de les cèl·lules. Aquests factors de diferenciació s'uneixen a receptors cel·lulars per iniciar cascades de senyalització que definiran l'expressió de gens específics per a cada llinatge. L'estat de diferenciació d'una cèl·lula depèn de canvis en el patró d'expressió dels seus gens. Els processos que regulen aquest patró i que permeten que es mantingui en les cèl·lules filles són estudiats per l'epigenètica.

Abans d'estar diferenciades a un determinat llinatge, les cèl·lules ja poden estar determinades per diferenciar a aquest, és el que en anglès s'anomena *commitment* (compromís). Aquest fenomen ja es va descriure en els primers experiments de l'embriologia clàssica en que es transplantaven cèl·lules aparentment no diferenciades d'un lloc a l'altre de l'embrió i s'observava que les cèl·lules diferenciaven al llinatge del lloc d'on provenien, per exemple en les cèl·lules de les diferents regions dels somites (Chevallier et al., 1977). Així va aparèixer el concepte de memòria cel·lular.

La diferenciació d'una cèl·lula a un determinat llinatge pot no ser irreversible i en els últims anys l'estudi de les transicions cel·lulars d'un llinatge a un altre ha tingut molt de ressò. L'estudi de la capacitat de cada llinatge per desdiferenciar-se o transdiferenciar a d'altres té importància no només en l'estudi del desenvolupament normal sinó també d'estats patològics tals com malformacions o el càncer (Derynck and Akhurst, 2007).

El nostre grup s'interessa pels mecanismes regits per la citoquina BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) que porten al desenvolupament del teixit ossi, és a dir l'osteogènesi. Les cèl·lules que donaran lloc a l'os són cèl·lules d'origen mesenquimal que, a més del llinatge osteoblàstic, també poden diferenciar a condroblasts, tenòcits,

INTRODUCCIÓ

adipòcits i mioblasts. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per una elevada plasticitat, és a dir que poden transdiferenciar a molts llinatges. Però a pesar de compartir aquesta característica, no totes tenen el mateix origen en el desenvolupament:

Durant el desenvolupament embrionari, les cèl·lules mesenquimals que donaran lloc a l'esquelet provenen principalment del mesoderm però algunes de les que donaran lloc a les estructures craniofacials deriven de la cresta neural, d'origen ectodèrmic (Wagers and Weissman, 2004) les quals es converteixen en cèl·lules mesenquimals per un procés de transdiferenciació conegut com a transició Epiteli-Mesènquima o EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transicion). (Scott Gilbert, *Developmental Biology* 2003; (Matsuoka et al., 2005).

En l'organisme adult existeixen les cèl·lules mare mesenquimals que, al igual que les cèl·lules mesenquimals embrionàries, poden donar lloc a adipòcits, mioblasts, condrocits o osteoblasts entre d'altres llinatges.

1.1 Cèl·lules mesenquimals d'origen mesodèrmic

El mesoderm és la capa germinal que dona lloc als òrgans interns que es troben entre la paret ectodèrmica i els teixits endodèrmics. En l'estadi embrionari de Nèurula, el tronc del mesoderm es divideix en quatre regions, les quals s'especifiquen al llarg de l'eix mediolateral (és a dir del centre cap als costats). L'aparició d'aquestes regions ve determinada pel gradient en la concentració de BMP i el seu competidor Noggin (Pourquie et al., 1996; Tonegawa et al., 1997).

Aquestes quatre regions són 1) el cordamesoderm, que és el precursor de la notocorda, 2) el mesoderm paraxial, que donarà lloc als somites, dels quals deriven els teixits connectius dorsals 3) el mesoderm intermig, que dona lloc al sistema urogenital i 4) la placa lateral del mesoderm, que dona lloc al cor, els vasos sanguinis, el sistema circulatori i les extremitats (excepte la musculatura).

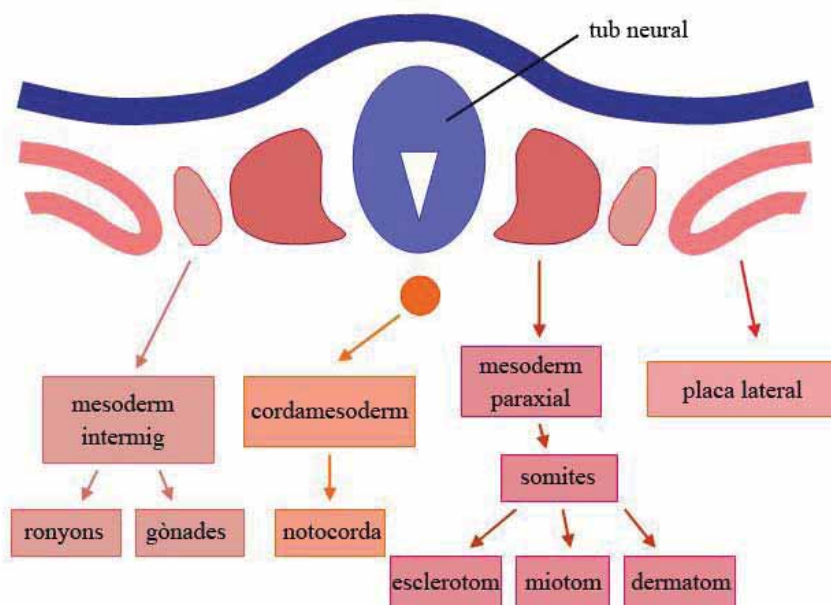


Figura1 Regions en les que es divideix el mesoderm d'un vertebrat.
Esquema adaptat de Scott F. Gilbert, Developmental Biology 3rd edition

INTRODUCCIÓ

Així doncs, les dues estructures mesodèrmiques que donen lloc a les cèl·lules mesenquimals precursors d'elements esquelètics són a) el mesoderm paraxial i b) la placa lateral del mesoderm.

1.1.1 Elements esquelètics derivats del mesoderm paraxial:

El mesoderm paraxial dona lloc a unes estructures metamèriques anomenades somites. Tot i ser estructures transitòries, els somites tenen una gran importància en l'organització del patró segmental dels embrions dels vertebrats, doncs donen lloc a les cèl·lules que formaran la musculatura esquelètica, les vèrtebres, les costelles i a estructures dorsals com la dermis. A més determinen les vies de migració de les cèl·lules de la cresta neural. El nombre total de somites varia segons l'espècie, 50 en pollastres, 65 en ratolins i més de 500 en algunes serps.

El procés de separació dels somites del mesoderm no segmentat és controlat per Notch a través d'una cascada d'expressió de diferents gens, entre els que destaca *Hairy1*, un factor de transcripció homòleg al gen de segmentació de *Drosophila*, la qual cosa indica que es tracta d'un mecanisme altament conservat.

A pesar de tenir un aspecte morfològic idèntic, cada somita dona lloc a diferents estructures segons el punt on es troba situat en l'eix antero-posterior. La identitat dels somites es manté, doncs s'ha comprovat experimentalment que si es transplanten somites de la regió toràcica al coll, es desenvoluparan costelles a la regió del coll. Aquesta identitat dels somites ve determinada per l'expressió de diferents gens *Hox* (Kieny et al., 1972; Nowicki and Burke, 2000).

Quan els somites maduren queden dividits en regions segons els senyals que reben. Les cèl·lules de la regió ventral-medial reben senyals de la notocorda que secreta la citoquina Sonic hedgehog (*Shh*) i en resposta expressen el gen *pax1*, d'aquestes cèl·lules en deriva l'Esclerotom, les cèl·lules del qual diferenciaran al llinatge condroblàstic (Johnson et al., 1994; Smith and Tuan, 1995).

La resta del somita es divideix en tres regions. Les cèl·lules de la porció més dorsal venen determinades per dos factors secretats pel tub neural, *NT-3* i *Wnt1* i donaran lloc a la dermis. Les cèl·lules en les dues porcions laterals de la part dorsal donaran lloc al miotom el qual donarà lloc als mioblasts. En ambdós casos s'expressa *MyoD*, un factor clau per la miogènesi, però per diferents mecanismes segons els senyals rebuts.

La secció del miotom més propera a la placa lateral donarà lloc als mioblasts "hipaxials" els quals expressen *Pax3* en resposta a *BMP-4* que és secretat per la placa lateral i es combina amb *Wnt* secretat per l'epidermis. La secció més propera al tub neural donarà lloc als mioblasts "epaxials" els quals expressen *Myf5* en resposta a *Wnt1* i *Wnt3a* que secreta el tub neural. Tant *Pax3* com *Myf5* faran que s'expressi *MyoD*.

INTRODUCCIÓ

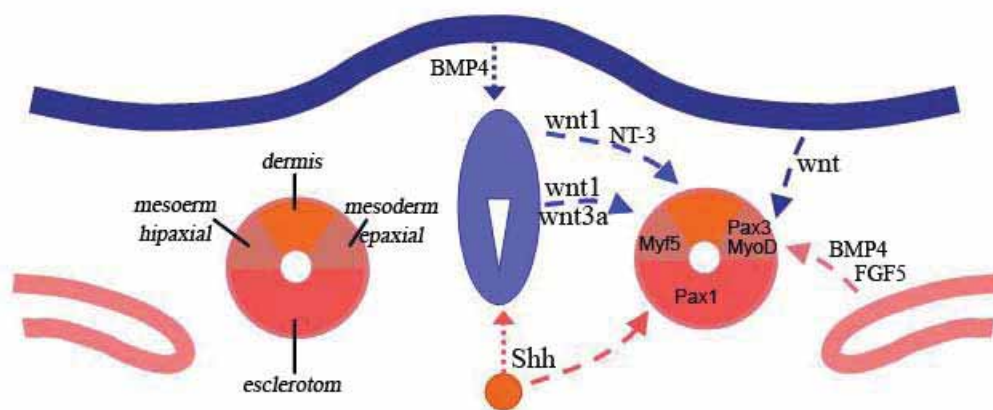


Figura 2: Principals senyals extracel·lulars que regulen la diferenciació de les diferents regions del mesoderma i principals factors que indueixen.

Esquema adaptat de Scott F. Gilbert, *Developmental Biology 3rd edition* i de Cossu et al., 1996

1.1.2 Elements esquelètics derivats de la placa lateral del mesoderma:

La placa lateral es diferencia en 2 capes, la parietal o somàtica i la visceral o esplànica. El desenvolupament de les extremitats comença quan cèl·lules mesenquimals proliferen des d'un punt de l'eix antero-posterior de la capa parietal que ve determinat pel patró d'expressió dels gens *hox*. Per exemple, en els peixos, amfibis, ocells i mamífers, els primordis que donaran lloc a les extremitats anteriors es troben a la regió més anterior d'expressió de *hoxc-6*, la posició de la primera vèrtebra toràctica. (Burke and Tabin, 1996; Nelson et al., 1996).

La placa lateral del mesoderma forma totes les estructures de l'extremitat menys la musculatura, però indueix els mioblasts a migrar des dels somites i entrar al primordi de l'extremitat per formar la musculatura de l'extremitat. Les cèl·lules de la placa lateral junt amb els mioblasts provinents dels somites s'acumulen sota l'ectoderma i també formen part d'aquest primordi que serà el punt des d'on es desenvoluparan les extremitats. El senyal per la formació d'aquest primordi que envia la mateixa placa lateral del mesoderma a l'ectoderma és FGF10 i provoca que aquest iniciï la formació d'una estructura anomenada AER (Apical Ectodermal Ridge). Quan s'inserten gotes de FGF10 ectòpicament en l'ectoderma apareixen noves extremitats (Ohuchi et al., 1997; Sekine et al., 1999).

Les extremitats es formen en tres dimensions. Membres de la família de citocines FGF (Fibroblast Growth Factor) són els principals reguladors de l'eix proximal-distal, l'eix antero-posterior és regulat per Shh (Sonic hedgehog) i l'eix dorsal-ventral és regulat, almenys en part, per Wnt7a, que pertany a la família Wnt. S'ha postulat que les BMPs estan involucrades en la mort cel·lular necessària per la formació dels dígits i les articulacions. Per altra banda, també s'ha implicat les BMPs en la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals a cartílag.

INTRODUCCIÓ

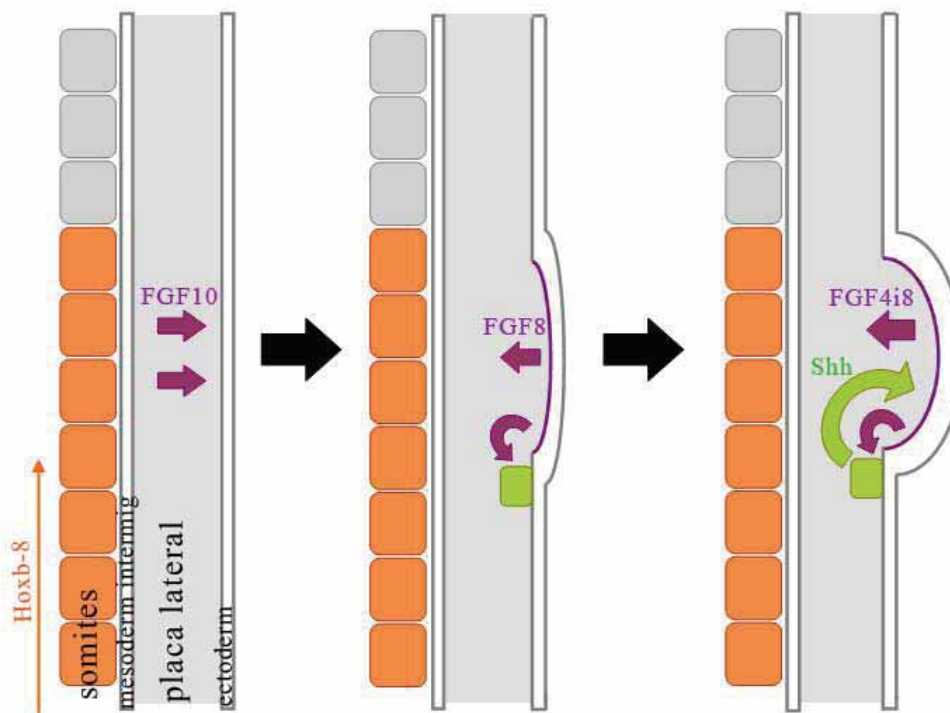


Figura 3: Esquema de la formació de les extremitats induïda per factors de les famílies FGF i Shh i que es donen per interacció del mesoderm de la placa lateral i l'ectoderm.
Esquema adaptat de Scott F. Gilbert, Developmental Biology 3rd edition

La conversió de cèl·lules mesenquimals en nòduls de teixit cartilaginós estableix on es formaran els límits dels ossos. El mesènquima no forma aquests nòduls en presència de vasos sanguinis, una de les primeres indicacions de la formació del cartílag és la regressió dels vasos sanguinis a la regió on es formarà el nòdul (Yin and Pacifici, 2001). Proteïnes de la família Wnt poden intervenir en el procés regulant les molècules d'adhesió tals com la N-cadherina (Hartmann and Tabin, 2001; Tufan and Tuan, 2001).

1.2 Elements esquelètics derivats de la cresta neural:

El crani dels vertebrats deriva de dos llinatges diferents de cèl·lules mesenquimals. Per una banda, una població de cèl·lules del mesoderm paraxial donarà lloc als ossos més posteriors. Per altra banda, la cresta neural (d'origen ectodèrmic) produeix els cartílags i els ossos de les estructures més anteriors del crani (Couly et al., 1992); Revisat a Scott F Gilbert, Developmental Biology 2003).

Les cèl·lules derivades de la cresta neural formen bastants dels ossos del crani però difereixen de les cèl·lules originades en el mesoderm en que poden fer-ho per dos mecanismes diferents. L'Ossificació Endocondral, que és el mecanisme que també utilitzen les cèl·lules del mesoderm i l'Ossificació Dermal o Intramembranosa, que és exclusiva d'aquestes, doncs no s'ha descrit fins al moment ossificació intramembranosa derivada de les cèl·lules del mesoderm (Matsuoka et al., 2005).

La transformació fenotípica del llinatge epitelial al mesenquimal és coneguda com a transició epitelial-mesenquimal o EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition). Aquest

INTRODUCCIÓ

procés té lloc durant el desenvolupament embrionari, en la curació de les ferides i en les metàstasis tumorals.

El teixit epitelial serveix de límit entre el medi exterior i les estructures internes, per tant té estructura de barrera constituïda per fortes unions cèl·lula-cèl·lula. Això fa que les cèl·lules que el componen estiguin polaritzades i unides a una làmina basal. Les cèl·lules mesenquimals, en canvi, són més mòbils i es troben envoltades de matriu extracel·lular.

En el cas de les cèl·lules de la cresta neural, la transició del llinatge epitelial al llinatge mesenquimal té lloc a partir d'una capa simple de cèl·lules del neuroepiteli. Aquest procés comprèn una sèrie de canvis morfològics: En primer lloc es perden les unions cèl·lula-cèl·lula, que són els desmosomes, les unions estretes o impermeables i les unions adherents. El trencament de les unions cel·lulars comporta la pèrdua de la polaritat i el trencament de la làmina basal. Aquests canvis van acompanyats de canvis en el citoesquelet amb l'aparició de fibres d'estrés i un increment de la mobilitat cel·lular (Kang and Svoboda, 2005; Zavadil and Bottinger, 2005).

Una diferència important entre les cèl·lules mesenquimals derivades de la cresta neural i les del mesoderm és que les primeres segueixen un patró definit, és a dir que semblen estar pre-programades: En la regió cranial les cèl·lules de la cresta neural migren a les seves respectives destinacions i mitjançant experiments de transplantament s'ha demostrat que el manteniment d'aquesta organització és molt important en la formació del patró del cap i que els gens *hox* són essencials per a mantenir-la (Couly et al., 1998; Noden, 1983).

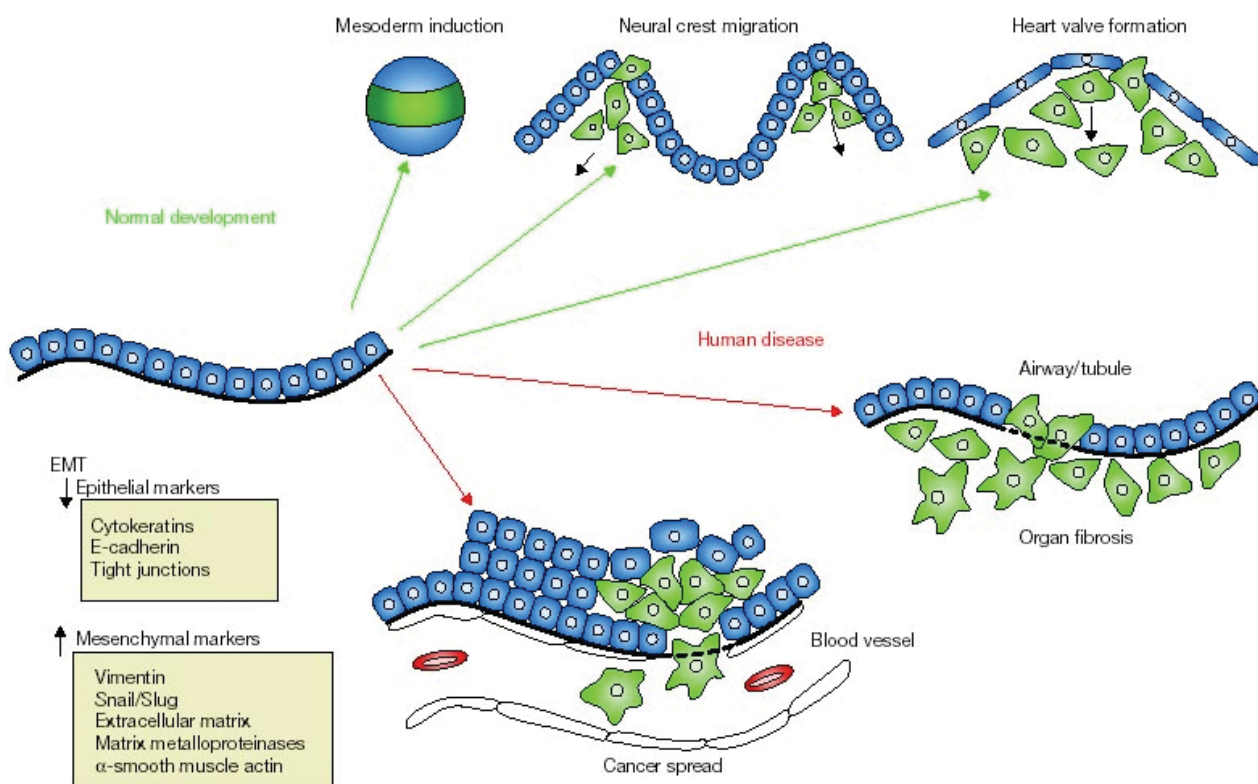


Figura 4: Processos del desenvolupament i de la patogènesi en que està implicada la Transició Epiteli-Mesènquima. *Extret de Derynck and Akhurst, 2007*

INTRODUCCIÓ

El paper de TGF β en la transició epiteli-mesènquima de la cresta neural ha estat àmpliament descrit i està relacionat amb la formació de les dents i el cartílag de Meckel (Chai et al., 2003; Chai et al., 1994; Hall and Ekanayake, 1991). A pesar de que els 3 diferents subtipus de TGF β tenen efectes molt semblants en cèl·lules en cultiu, TGF β -3 sembla ser el subtipus més actiu en aquest fenomen (Chai et al., 2003; Derynck and Akhurst, 2007; Zavadil and Bottinger, 2005).

Diverses vies de senyalització activades per TGF β estan implicades en la transició epiteli-mesènquima. L'activació de RhoA i la seva kinasa efectora p160^{ROCK}, així com Cdc42, p38 i les Smads estan relacionades amb la formació de fibres de stress en resposta a TGF β en la transició epiteli-mesènquima (Derynck and Akhurst, 2007; Derynck and Zhang, 2003).

1.3 Elements esquelètics derivats de les cèl·lules mare mesenquimals en l'organisme adult:

La majoria de teixits d'origen mesenquimal són remodelats al llarg de la vida d'un organisme. En organismes adults, aquest procés requereix un subministre continu de noves cèl·lules suggerint l'existència de cèl·lules que, sigui localment o a través de la circulació, tenen la capacitat de proliferar i diferenciar a múltiples llinatges.

En els últims anys, nombrosos experiments han demostrat que la medul·la òssia, a més de cèl·lules hematopoiètiques, conté poblacions de cèl·lules estromals que en les condicions adequades poden diferenciar a nombrosos teixits mesenquimals tals com fibroblasts, osteoblasts, condroblasts o adipòcits (Friedenstein et al., 1966; Vaananen, 2005). Aquestes cèl·lules són conegudes com a cèl·lules mare mesenquimals (mesenchymal stem cells o MSC) i poden trobar-se fins i tot en la medul·la òssia d'individus d'edat avançada, tot i que el seu nombre pot disminuir amb l'edat (Prockop et al., 2003).

Les cèl·lules mare mesenquimals s'han trobat també en molts altres teixits d'organismes adults, tals com la sang, la placenta, el líquid amniòtic, el cor, el múscul esquelètic, el teixit adipòs o el pàncreas, però la medul·la òssia és la font més ben caracteritzada. Pel moment, però, encara no s'han definit inequívocament marcadors per aquesta població de cèl·lules.

Durant molts anys s'havia considerat que les cèl·lules mare d'un teixit en particular podien renovar-se i diferenciar només als llinatges cel·lulars del teixit al qual pertanyien. Però els darrers anys s'ha observat que les cèl·lules reservori dels teixits poden diferenciar, en les condicions apropiades, a llinatges molt més diferents del que es creia. S'ha demostrat que les cèl·lules mare d'organismes adults poden diferenciar a llinatges cel·lulars d'altres òrgans tan *in vitro* com *in vivo* i fins i tot transdiferenciar a llinatges derivats d'altres capes germinals. Aquest descobriment ha estat un canvi de paradigma i ha donat lloc a parlar de la plasticitat de les cèl·lules mare adultes (Anderson et al., 2001; Blau et al., 2001; Deng et al., 2008; Grove et al., 2004; Prockop, 2003; Wagers and Weissman, 2004).

Les cèl·lules mare són cèl·lules no diferenciades definides per la seva capacitat d'autorenovar-se i de poder diferenciar a nivell d'una sola cèl·lula a un llinatge diferent

INTRODUCCIÓ

i madur. Es classifiquen segons la seva capacitat com a *totipotents* quan poden diferenciar a qualsevol llinatge embriònic o no (aquestes són les cèl·lules ES de la *inner cell mass* de l'embrió primerenc), *pluripotents* quan són capaces de diferenciar a tots els llinatges de l'embrió, *multipotents* quan són capaces de diferenciar a diversos llinatges cel·lulars, *oligopotents* quan només poden diferenciar a uns pocs llinatges restringits o bé *unipotents* quan poden diferenciar a un sol llinatge madur.

Les cèl·lules mare hematopoiètiques són les cèl·lules multipotents més ben caracteritzades, però les cèl·lules mare mesenquimals últimament han adquirit molta importància, doncs la seva capacitat per donar lloc a múltiples llinatges mesenquimals junt amb el fet d'haver estat aïllades en ratolins i humans, les situa com a excel·lents candidates per a ser utilitzades en medicina regenerativa (Noth et al., 2008; Pittenger et al., 1999).

Les cèl·lules mare mesenquimals poden diferenciar a diversos tipus cel·lulars com fibroblasts, miòcits, osteoblasts, condrocits i adipòcits. Tant en cèl·lules en cultiu com en ratolins s'ha observat que l'estimulació paracrina i autocrina per part de TGF β és important per a l'expansió de les poblacions progenitores de cèl·lules mare mesenquimals. TGF β inhibeix la diferenciació d'aquestes cèl·lules i estimula la seva proliferació abans que no madurin, mentre que les BMP estimulen la diferenciació d'aquestes cèl·lules als llinatges adipogènic, condroblàstic o osteoblàstic (Derynck and Akhurst, 2007).

Les cèl·lules mesenquimals humanes poden diferenciar al llinatge osteogènic quan són cultivades en presència de dexametasona, beta-glicerol fosfat i àcid ascòrbic en un medi amb 10% de FBS (Pittenger et al., 1999). S'ha descrit la inducció d'Osterix, que és un marcador d'osteoblasts madurs i el protagonista d'aquesta tesi, en resposta a BMP-2 en cèl·lules mesenquimals humanes (Celil and Campbell, 2005; Celil et al., 2005).

INTRODUCCIÓ

2-La superfamília TGF β

Els membres de la superfamília TGF β (Transforming Growth Factor β) són citocines que contolen una gran quantitat de processos cel·lulars com la proliferació, la diferenciació o l'apoptosi. Les seves accions tenen un paper central en els processos relacionats amb el desenvolupament, també són essencials en processos tals com la autorenovació cel·lular, la diferenciació a diferents llinatges i el manteniment d'aquests. Els membres d'aquesta família es troben presents des de les mosques als humans, la qual cosa dóna una idea de la seva gran importància (Derynck and Akhurst, 2007; Massagué, 2000; Patterson and Padgett, 2000; Shi and Massagué, 2003; Ten Dijke et al., 2002) (Figura 5).

L'estructura dels membres de la superfamília TGF β es caracteritza per contenir sis dominis cisteïna molt conservats. La seva forma activa és un dímer estabilitzat per interaccions hidrofòbiques, les quals són reforçades per ponts disulfur. Aquestes unions s'anomenen nus cisteïna (Sun and Davies, 1995).

La forma dels membres de la superfamília TGF β recorda una figura de papallona feta amb les mans per a fer ombres xineses, en que cada mà seria un monòmer. El canell representaria la hèlix β central, els dits les dues làmines β que es troben aliniades i el polze seria la regió N-terminal (Feng and Derynck, 2005; Shi and Massagué, 2003).

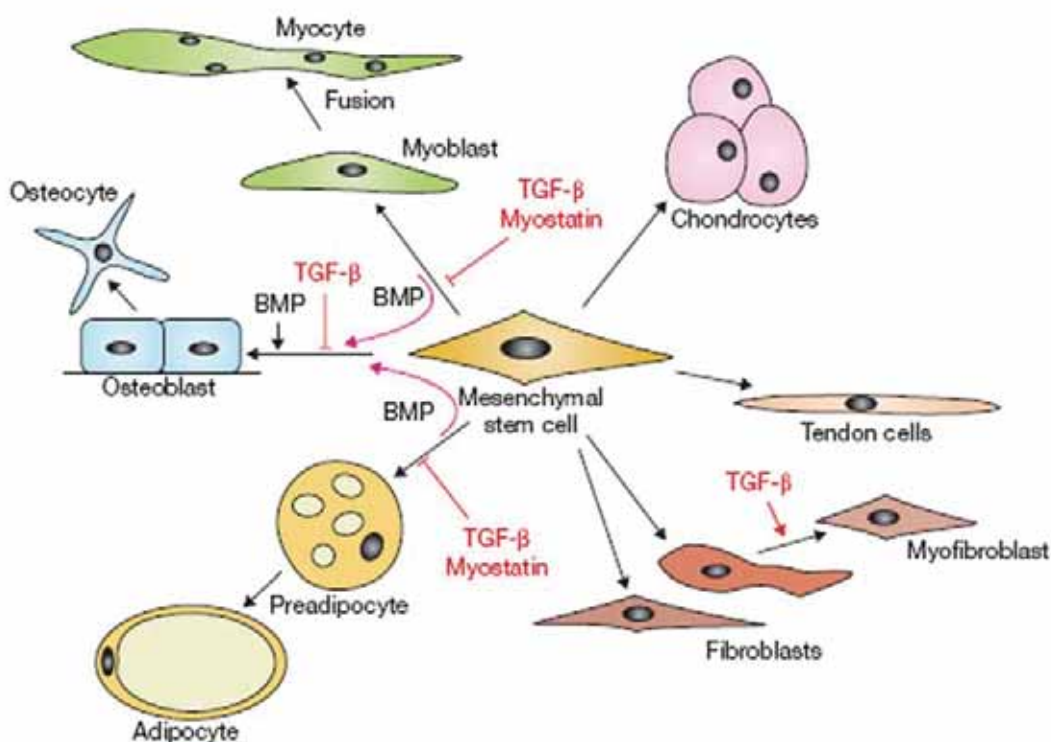


Figura5: Processos de diferenciació de les cèl·lules mesenquimals regulats per la superfamília TGF β , extret de *Derynck and Akhurst, 2007*

INTRODUCCIÓ

Alguns membres de la superfamília TGF β (GDF9, BMP15, GDF3, Lefty1 i Lefty2) tenen una substitució serina en lloc de la cisteïna que en la resta de membres està involucrada en la formació del pont disulfur entre molècules, per això en aquestes proteïnes l'associació dels dímers és més làbil.

La majoria de les citoquines de la superfamília TGF β (TGF β , MIS, dpp, activines, inhibines i BMPs) són secretades com a un complex latent que ha de ser activat per processament proteolític per tal de ser funcional. La latència és un mecanisme per controlar l'activitat dels factors de creixement el qual permet que les citoquines puguin circular inactives fins arribar al seu lloc d'acció o bé regular la biodisponibilitat i la capacitat de difusió d'aquestes (Gleizes et al., 1997).

Quan les citoquines de la superfamília TGF β són sintetitzades contenen uns propèptids a la part més N-terminal que són proteolitzats intracel·lularment. No obstant ser secretades ja proteolitzades, la part C-terminal que dona lloc a la citoquina madura roman associada amb el seu propèptid per mitjà d'interaccions no covalents creant un complex latent del qual s'han de separar per dur a terme la seva acció biològica. (Gleizes et al., 1997; Rifkin, 2005).

El processament proteolític té lloc en una seqüència RXK/RR i la duen a terme una família de proteases anomenada SPC (Subtilisin-like Proprotein Convertase). El membre més conegut d'aquesta família és la Furina, de la qual s'ha demostrat la capacitat de proteolitzar les formes precursors de TGF β i BMP4 (Cui et al., 2001; Cui et al., 1998; Yoshida et al., 2001).

2.1-Membres de la superfamília TGF β

La superfamília TGF β consisteix en més de 35 membres en vertebrats, els quals s'agrupen en famílies com són TGF β *sensu stricto*, BMP (Bone Morphogenetic Protein), GDF (Growth and Differentiation Factor), Activines, Inhibines, MIS (Muellerian Inhibiting Substance), Nodal i Lefty.

El dendrograma en que s'organitza la superfamília TGF β varia segons el programa i les seqüències utilitzades per a fer la comparativa. La figura 6, es basa en la classificació de Chang et al (Endocrine Review 2002), de Ducy i Karsenty (Kidney Int 2000) i Kishigami i Mishina (Cytokine and Growth Factor Reviews 2005) les quals són bastant coherents amb la classificació de Massagué de l'any 1998 (Chang et al., 2002; Ducy and Karsenty, 2000; Kishigami and Mishina, 2005; Massague, 1998).

Alguns autors classifiquen els membres de la superfamília TGF β en dues grans branques, en una hi serien TGF β *sensu stricto*, les Activines, Nodal, Lefty i GDF8 (també anomenat Miostatina) mentre que en l'altra hi trobaríem les BMPs, la resta de GDFs i MIS (Massague, 2008).

A la figura 6 hem destacat les famílies més estudiades i que comentarem a continuació, que són TGF β *sensu stricto*, Activines i BMPs.

INTRODUCCIÓ

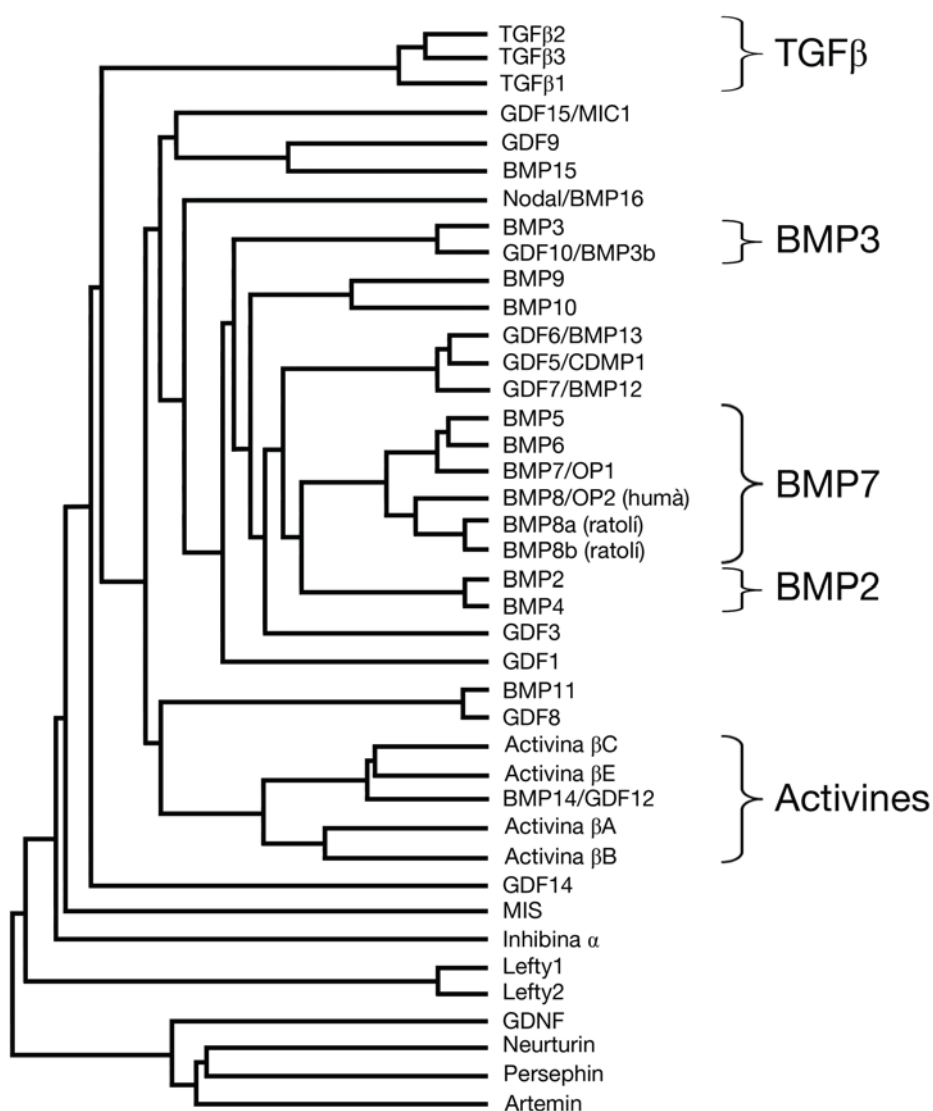


Figura 6: Dendrograma dels membres de la superfamília TGFβ basat en *Chang et al (Endocrine Review 2002)*, *Ducy and Karsenty (Kidney Int 2000)* i *Kishigami i Mishina (Cytokine and Growth Factor Reviews 2005)*

2.1.1 TGFβ *sensu stricto*

El TGFβ és la citoquina que dona nom a tota la superfamília, n'existeixen 3 isoformes que tenen funcions lleugerament diferents: TGFβ-1, TGFβ-2 i TGFβ-3. Aquestes isoformes comparteixen un 64-82% d'homologia entre elles (revisat a Massague, 2000) i la més ben caracteritzada d'elles, i a la que sovint es refereix la literatura quan parla de TGFβ, és TGFβ-1.

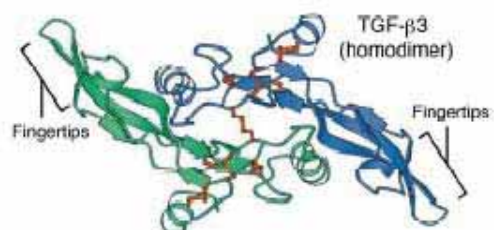


Figura7: estructura de TGFβ-3
Shi and Massague 2003

INTRODUCCIÓ

TGF β es troba implicada en molts aspectes de la fisiologia, però és especialment coneguda pel seu paper regulador del cicle cel·lular en diferents tipus cel·lulars. La parada del cicle en resposta al TGF β es produeix en el “punt de restricció” al final de la fase G1 per mitjà de la inhibició de les CDKs, les quals fosforilen la proteïna pRB entre d’altres, i l’activació de proteïnes citostàtiques com p15^{INK4B} i p21^{CIP} junt amb la repressió d’oncogens com *c-myc* (Datto et al., 1995; Hannon and Beach, 1994; Massague and Gomis, 2006).

Els efectes citostàtics de TGF β tenen un paper supressor de l’aparició i la progressió de tumors. S’han observat molt freqüentment mutacions en el receptor T β RII en càncers de colon de tipus MSI (Microsatellite Instability) o mutacions de Smad4 en càncers gastrointestinals. (Duff and Clarke, 1998; Levy and Hill, 2006; Massague, 2008).

Paradoxalment, el TGF β com a citoquina pot actuar com un agent tumorigènic. A nivell del sistema immunològic, actua inhibint la resposta immunitària dels limfòcits tipus T que podrien actuar contra alguns antígens tumorals, facilitant d’aquesta manera la progressió de certs processos cancerígens (Massague, 2008; Thomas and Massague, 2005). També s’ha descrit la implicació de TGF β en processos angiogènics (Blobe et al., 2000) la qual cosa involucra aquest factor en la malignització de processos tumorals.

Els ratolins knock-out per TGF β -1 no tenen ninguna anormalitat embrionària, però al néixer se’ls hi detecten inflamacions multifocals que comencen 3 setmanes després del naixement amb resultat letal, a més s’observen defectes en l’hematopoiesi i la vasculogènesi. Per tant, s’ha deduit que TGF β -1 és un regulador essencial del sistema immunitari, la formació de vasos sanguinis i l’hematopoiesi (Dickson et al., 1995; Kulkarni et al., 1993). Els ratolins knock-out per TGF β -3, en canvi, moren a les poques hores de néixer amb malformacions en el paladar, deduint-se d’aquest fet que l’isoforma TGF β -3 sí que es troba implicada en el desenvolupament embrionari (Proetzel et al., 1995).

El TGF β -2 es troba implicat en molts processos del desenvolupament, entre ells el desenvolupament de l’esquelet. Els ratolins knock-out pel lligand TGF β -2 tenen múltiples defectes en el desenvolupament i moren al cap de poc de néixer, observant-se ossificació reduïda i paladar fes entre d’altres defectes en l’esquelet, especialment a nivell craniofacial (Sanford et al., 1997).

Els receptors pel TGF β també estan implicats en la formació de l’esquelet. En ratolins knock-out pel gen TGFBR2 (que codifica pel receptor T β RII) condicionats per expressar la mutació específicament en la cresta neural, s’observen defectes semblants als comentats pel knock-out de TGF β 2 com el paladar fes i altres defectes en el patró esquelètic, també en aquest cas especialment en el crani (Ito et al., 2003). També en famílies de pacients que presenten mutacions en els gens TGFBR1 i TGFBR2 s’han observat craniosistosi, paladar fes i altres defectes en el desenvolupament cranioencefàlic i de l’esquelet (Loeys et al., 2005).

Els lligands TGF β indueixen la internalització dels seus receptors en endosomes, es creu que aquest procés podria ser necessari per a la senyalització eficient de TGF β a través de les Smads (Hayes et al., 2002; Penheiter et al., 2002). Les proteïnes SARA i Dab2 s’uneixen tant als receptors com a la Smad2 i promouen la seva fosforilació (Di Guglielmo et al., 2003; Hocevar et al., 2001).

INTRODUCCIÓ

Existeixen dues vies d'internalització, una és dependent de clatrina i l'altra de caveolina i s'ha detectat internalització dels receptors de TGF β per ambdues vies. En el cas de la primera, no està clar si la clatrina intervé en el procés d'internalització (Di Guglielmo et al., 2003; Penheiter et al., 2002). La caveolina és una proteïna present en les invaginacions de la membrana plasmàtica anomenades caveoles. S'ha proposat que aquests compartiments regulen el turnover dels receptors i l'activació de les R-smads (Razani et al., 2001).

Smad2 i Smad3 poden unir-se als microtúbuls fins que la cèl·lula és estimulada per TGF β (Dong et al., 2000), també la unió d'aquesta citoquina fa que es fosforili la proteïna ELF, una β -espectrina, i d'aquesta manera s'associa amb Smad3 i Smad4, la qual cosa és necessària per la senyalització per aquesta via (Tang et al., 2003c).

2.1.2 Les Activines i les Inhibines

Les Activines, com la resta de membres de la superfamília TGF β estan formades per dímers. En aquest cas poden ser homodímers o heterodímers formats per unes subunitats anomenades β A i β B. També existeixen les subunitats β C i β E però les úniques formes biològicament actives observades són les combinacions de les dues primeres (Harrison et al., 2005).

Les unitats de l'Activina β A i β B poden heterodimeritzar amb la subunitat α de la Inhibina per formar la Inhibina A (quan es combina amb β A) o la Inhibina B (quan es combina amb β B). El paper inhibitori de les Inhibines és degut a la competició pels receptors de tipus II de les Activines a través de les seves subunitats β (Gray et al., 2000).

La Fol·listatina és una proteïna soluble que té la capacitat d'unir-se a les Activines amb gran afinitat i inhibir les seves funcions biològiques. L'Activina que es troba circulant està unida a la Fol·listatina, és a dir en la seva forma inactiva. (de Winter et al., 1996; Nakamura et al., 1990).

Les Activines i Inhibines es van localitzar inicialment en els teixits gonadals, doncs és on són més abundants, però també s'han trobat en la placenta, el cervell, les glàndules adrenals, la medulla òssia, la glàndula pituitària, la columna vertebral i els ronyons (Meunier et al., 1988).

Inicialment es va identificar la funció de les activines com a reguladores de la secreció de l'hormona FSH (Follicle Stimulating Hormone) (Ling et al., 1986; Vale et al., 1986) però posteriorment s'han identificat altres funcions importants en la proliferació cel·lular, la diferenciació, l'apoptosi, el metabolisme, l'homeostasi, la resposta immunitària o la cicatrització de ferides (Chen et al., 2006).

Les Activines senyalitzen a través dels seus receptors, els quals fosforilen les Smads 2 i 3, però que també activen vies independents de Smads com MEKK1-p38 i Rock-MEKK1-JNK, a través de les quals intervenen en el control de la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració de les cèl·lules epitelials (Zhang et al., 2005).

Les Activines antagonitzen la senyalització de les BMPs a través de la competició pels receptors o les proteïnes Smad (Candia et al., 1997; Piek et al., 1999).

INTRODUCCIÓ

2.1.3 Les BMPs

Els factors de la família BMP controlen molts processos relacionats amb el desenvolupament però són especialment coneguts pel seu paper en la formació dels ossos dels vertebrats participant tant en l'esqueletogènesi com en l'osteogènesi.

El terme BMP (Bone Morphogenetic Protein) es va introduir per descriure components de la matriu òssia que eren capaços d'induir formació ectòpica d'os quan eren implantats intramuscularment o subcutàniament en ratolins (Urist, 1965). La identitat de les BMP no va ser descoberta fins a finals dels anys 80 quan es van identificar BMP-1, BMP-2 i BMP-3. Amb l'excepció de la primera, es van identificar aquestes seqüències com part de la superfamília TGF β . BMP-1 no està relacionada amb les altres BMPs sinó que és una proteasa que processa les fibres de Procol·lagen i Chordin (revisat a Li and Cao, 2006).

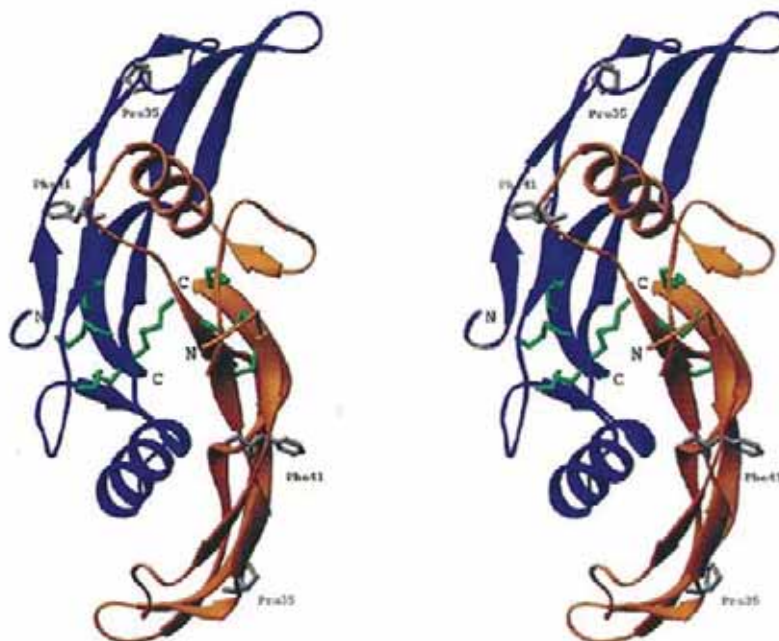


Figura 8: estructura d'un dímer de BMP-2 en 3D, un monòmer en blau i l'altre en taronja. Si es desenfoca la vista es pot veure una sola figura en 3 dimensions. (Scheufler et al., 1999)

Els membres de la família BMP se secreten com a proteïnes precursors amb una regió hidròfoba d'entre 50 i 100 aminoàcids. El monòmer de BMP madura és derivat de la regió carboxiterminal del precursor i és obtingut per processament proteolític (Massague, 1990; Wu et al., 2007). Fins a dia d'avui, s'han caracteritzat més de 20 membres de la família BMP. Nombrosos estudis indiquen que les BMPs són factors de creixement essencials pel desenvolupament embrionari i l'homeostasi dels teixits en adults.

Tots els membres contenen set dominis cisteïna, sis dels quals constitueixen el nus de cisteïnes característic de la superfamília TGF β , el setè té la funció de formar dímers amb un altre monòmer (Revisat a Li and Cao, 2006). La unió entre els dos monòmers té

INTRODUCCIÓ

lloc mitjançant un pont disulfur, la conformació dimèrica de les BMP és un requeriment absolut per a la seva acció biològica (Eimon and Harland, 1999).

Els membres de la família BMP estan molt conservats entre diferents espècies, fins a l'extrem que en *Drosophila*, la substitució del seu homòleg *decapentapègic* (*dpp*) pel gen *bmp4* humà recupera totalment el fenotip *wild-type* (Padgett et al., 1993). També a la inversa, els homòlegs de *Drosophila* Dpp i 60A poden induir la formació d'os quan són inoculats subcutàniament en rates tot seguint una seqüència d'events cel·lulars que inclou la formació de cartílag prèvia a l'ossificació, comparable a inocular BMP-2 o BMP-7 (Sampath et al., 1993). Aquests fets demostren que la funcionalitat d'aquestes proteïnes s'ha conservat en branques evolutives tant diferents com els protostomats i els deuterostomats, separades fa més de 600 milions d'anys.

Els membres de la família BMP es divideixen en 3 grups principals degut a la seva homologia. El primer grup inclou BMP-2 i BMP-4, homòlegs del gen de *Drosophila decapentaplegic* (*dpp*). El segon, BMP-5, BMP-6, BMP-7 (OP1) i BMP-8 (OP2), l'homòleg de *Drosophila* dels quals és 60A. El tercer grup inclou GDF5, GDF6 (BMP-13) i GDF7 (BMP-12). Per altra banda, hi ha BMP-9 i BMP-10 que formen un petit subgrup i BMP-3 i GDF10 que en formen un altre. Cada membre de la família BMP té diferents funcions i s'uneix a cada combinació de receptors amb diferents afinitats.

BMP-2 i BMP-4 són els membres de la família més implicats en l'osteogènesi, tot i que també estan implicats en altres aspectes del desenvolupament, especialment en el desenvolupament embrionari. Tot i la seva funció parcialment redundante, els ratolins knock-out per qualsevol dels 2 són inviàbles. Els ratolins deficientes per BMP-2 no s'arriben a desenvolupar per defectes en l'amnion/corion i en el desenvolupament cardíac. Els ratolins deficientes per BMP-4 no poden establir el patró de diferenciació del mesoderm i moren entre els 6,5 i els 9,5 dies de gestació (Wu et al., 2007).



Figura 9: Efecte d'inocular quirúrgicament una bola impregnada amb BMP-2 entre els dits d'un pollastre. S'observa l'aparició d'un dit ectòpic en el lloc on s'ha inoculat BMP-2 (Gañan et al., 1996)

INTRODUCCIÓ

BMP-2 i BMP-4 són coneguts per especificar el destí cel·lular durant l'embriogènesi i determinar l'eix dorso-ventral. Estan involucrats en el desenvolupament del sistema nerviós, el cor, l'intestí i el ronyó (Leboy, 2006). En quant a la formació de l'esquelet, a més del seu paper essencial en l'osteogènesi i la dentició, les BMPs tenen la capacitat d'induir la formació ectòpica d'os en cèl·lules no osteogèniques (Ganan et al., 1996; Urist, 1965) (Figura 9).

BMP-7 té un paper ben caracteritzat en el desenvolupament del ronyó; els ratolins knock-out per BMP-7 moren poc després de néixer amb defectes severos en el desenvolupament renal. BMP-7 sembla actuar com a factor de supervivència per cèl·lules mesenquimals renals i permetre que aquestes puguin respondre als senyals que promouen la formació de nefrones (Patel and Dressler, 2005).

BMP-2, BMP-4 i BMP-7 són les BMPs més ben estudiades en quant a la seva capacitat d'induir la formació de l'os tant *in vitro* com *in vivo*, però en estudis recents s'ha suggerit que BMP-6 i BMP-9 poden ser més efectives en promoure la formació d'os ectòpica (Blunk et al., 2003; Cheng et al., 2003). Per altra banda, BMP-3, tot i ser membre de la família de les BMPs, sembla inhibir més que no pas activar l'osteogènesi.

La BMP-3 és el membre de la família BMP més abundant en l'os desmineralitzat, constituint aproximadament el 65% de les BMPs totals. El ratolí knock-out per BMP-3 és viable tot i que presenta una elevada densitat en els ossos. En experiments de coexpressió s'ha observat com la BMP-3 té la capacitat d'inhibir els efectes osteogènics de BMP-2 tot i que no forma heterodímers amb aquesta. S'ha proposat que BMP-3 senyalitzaria a través de la via de les Activines (Daluisi et al., 2001).

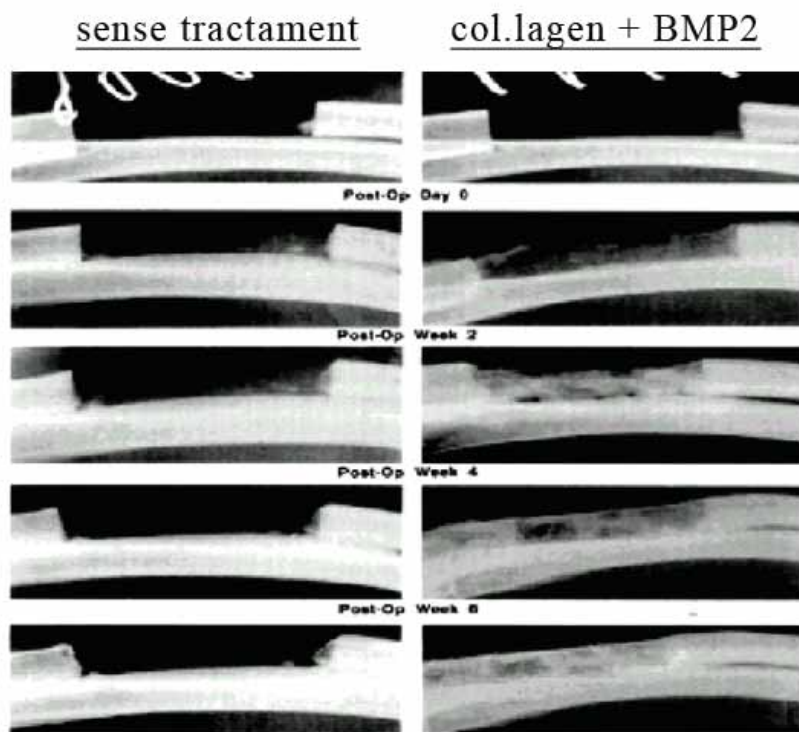


Figura 10 Efecte del tractament amb col·lagen i BMP-2 en la recuperació d'una fractura òssia severa en tibia de conill. *Hollinger et al 1998*.

INTRODUCCIÓ

BMP-5 i BMP-6 són membres de la família BMP que encara no han estat àmpliament estudiats. Els ratolins knock-out per BMP-5 i BMP-6 són viables i fèrtils, però en ambdós casos (sobretot en el primer) s'observen defectes en l'esquelet (King et al., 1994; Solloway et al., 1998).

Les BMP consisteixen una eina terapèutica per a les fractures òssies cada vegada més utilitzada. En la figura 10 veiem l'efecte de l'aplicació de BMP-2 en una fractura severa de tibia de conill (Hollinger, 1998). L'Agència Europea per l'Evaluació de productes medicinals va autoritzar l'any 2002 l'ús d'implants de BMP-2 recombinant (1,5 mg/ml) pel tractament de les fractures agudes de tibia (Nordsletten, 2006) el qual és comercialitzat amb el nom de Dibotermia Alfa (Wyeth Farma).

2.1.4 Antagonistes de les BMPs

Per tal de regular el potent paper de les BMPs a nivell fisiològic, existeixen diferents molècules que són secretades en diferents fases del desenvolupament, la funció de les quals és unir-se a les BMPs inactivant-les d'aquesta manera i creant gradients de concentració. Algunes d'aquestes molècules s'han descrit, per exemple Noggin, Chordin, Fol·listatina, DAN, Cerberus, Sclerostin o Gremlin (Balemans and Van Hul, 2002; Leboy, 2006).

En *Drosophila* existeixen antagonistes similars, per exemple Sog (short gastrulation) és l'homòleg de Chordin i antagonitza la funció de Dpp i Screw, que són homòlegs de les BMP i altres membres de la superfamília TGF β (Holley et al., 1995).

Noggin va ser identificat en *Xenopus* per la seva capacitat de promoure el desenvolupament dorsal (Smith and Harland, 1992). Concretament, té un paper central en el desenvolupament de teixits dorsals com el múscul o el teixit nerviós. Els ratolins knock-out per Noggin es caracteritzen per abundants defectes en el desenvolupament que s'observen en el patró de les extremitats i l'esquelet en general i en defectes en el tub neural (Brunet et al., 1998; McMahon et al., 1998).

S'ha proposat que la proteïna Noggin està implicada en la fibrodisplàsia ossificadora progressiva (en anglès FOP), una malaltia genètica caracteritzada per la progressiva ossificació endocondral dels músculs i severos defectes en la dentició. S'ha proposat que el defecte en la proteïna Noggin produiria un guany de funció de BMP-4 que seria en última instància el causant de la FOP (Kan et al., 2004) tot i que aquest efecte no està clar (Xu et al., 2000).

Noggin pot unir-se i antagonitzar la funció de BMP 2, 4 i 7 impedit la seva unió als receptors (Zimmerman et al., 1996). La funció de Noggin és parcialment redundat amb Chordin, doncs en ratolins knock-out per un d'ells l'altre pot rescatar part de la funció (Bachiller et al., 2000).

Chordin també està implicat en la formació de l'eix dorsoventral i la diferenciació del teixit nerviós i, al igual que noggin, també se l'ha involucrat en l'esqueletogènesi. Els ratolins knock-out són viables tot i que mostren defectes en el desenvolupament de l'oïda i en el patró del sistema cardiovascular, el crani i la faringe. Al igual que Noggin, s'uneix a BMP 2, 4 i 7 impedit la seva unió als receptors (Scott et al., 2000).

INTRODUCCIÓ

CHL (Chordin-Like protein) és una molècula homòloga de Chordin que presenta un bon nombre d'isoformes en humans i ratolins. Segons ha estat descrit, s'expressa en les cèl·lules mesenquimals no esquelètiques, per la qual cosa se li ha inferit una funció important en l'esqueletogènesi (Nakayama et al., 2001).

La Fol·listatina està implicada principalment en el cicle reproductiu però també en aspectes del desenvolupament. Els ratolins knock-out per la Fol·listatina presenten defectes en les gònades i també en l'esquelet. Al igual que en el cas de les Activines, la Fol·listatina és capaç d'unir-se i inactivar a les BMPs, especialment BMP-7 però també BMP 2 i 4, tot i que amb menor afinitat que en el cas de les Activines. El mecanisme d'acció de la Fol·listatina és diferent de Noggin i Chordin, així com aquestes impedeixen la unió de les BMPs amb els seus receptors, la Fol·listatina participa de la unió amb el receptor formant-se un complex trimèric (Iemura et al., 1998).

S'ha descrit un altre grup de proteïnes que antagonitzen l'efecte de BMP que es caracteritzen per tenir un domini anomenat Can, tot i que fora d'aquest domini tenen poca homologia entre elles. Algunes d'aquestes proteïnes són: DAN, Cerberus i Gremlin, les quals semblen unir-se a les BMPs per un mecanisme semblant al de Noggin i Chordin (Balemans and Van Hul, 2002).

Una altra proteïna que antagonitza l'efecte de les BMP és Sclerostin, la qual és codificada pel gen SOST, que s'ha relacionat amb la formació del patró esquelètic. S'ha observat que Sclerostin pot unir-se *in vitro* a BMP 5 i 6 però no a BMP-4. (Balemans and Van Hul, 2002). Recentment s'ha descrit que el patró d'expressió de SOST coincideix amb el d'Osterix (Ohyama et al., 2004).

2.2-Receptors de la superfamília TGF β

Els membres de la superfamília TGF β són lligands que inicien la senyalització intracel·lular unint-se a 2 tipus de receptors diferents, anomenats tipus I i tipus II, els quals es caracteritzen per tenir activitat serina-treonina kinasa. La unió del lligand als receptors provoca la formació d'un complex heteromèric en que el receptor de tipus II fosforila al receptor de tipus I. L'organització dimèrica dels lligands fa pensar que s'uneixen formant un complex amb 2 receptors de tipus I i 2 receptors de tipus II (Feng and Derynck, 2005).

Els receptors de tipus I tenen una seqüència rica en residus de Glicina i Serina anomenada seqüència GS i que es troba molt propera al domini kinasa. Quan després de la unió del lligand es forma el complex amb els 2 receptors de cada tipus, els receptors de tipus II fosforilen les seqüències GS dels receptors de tipus I. Aquesta fosforilació activa el receptor de tipus I, que s'autofosforilarà a través de la seva activitat kinasa (Derynck and Zhang, 2003; Shi and Massague, 2003).

En humans existeixen 5 receptors de tipus II i 7 de tipus I. Fins a la unió del lligand, els receptors de tipus I i de tipus II romanen en forma d'homodímers a la superfície cel·lular sense una gran afinitat per formar heterodímers amb els receptors de l'altre tipus. A pesar que teòricament tots els receptors de tipus II podrien combinar-se amb tots els receptors de tipus I, en realitat només es donen algunes combinacions, tot i que de moment no es coneixen els mecanismes d'aquesta exclusivitat. A més, el nombre de

INTRODUCCIÓ

l·ligands (el genoma humà en codifica entre 29 i 42) excedeix àmpliament el nombre de combinacions que es donen entre receptors de tipus I i tipus II.

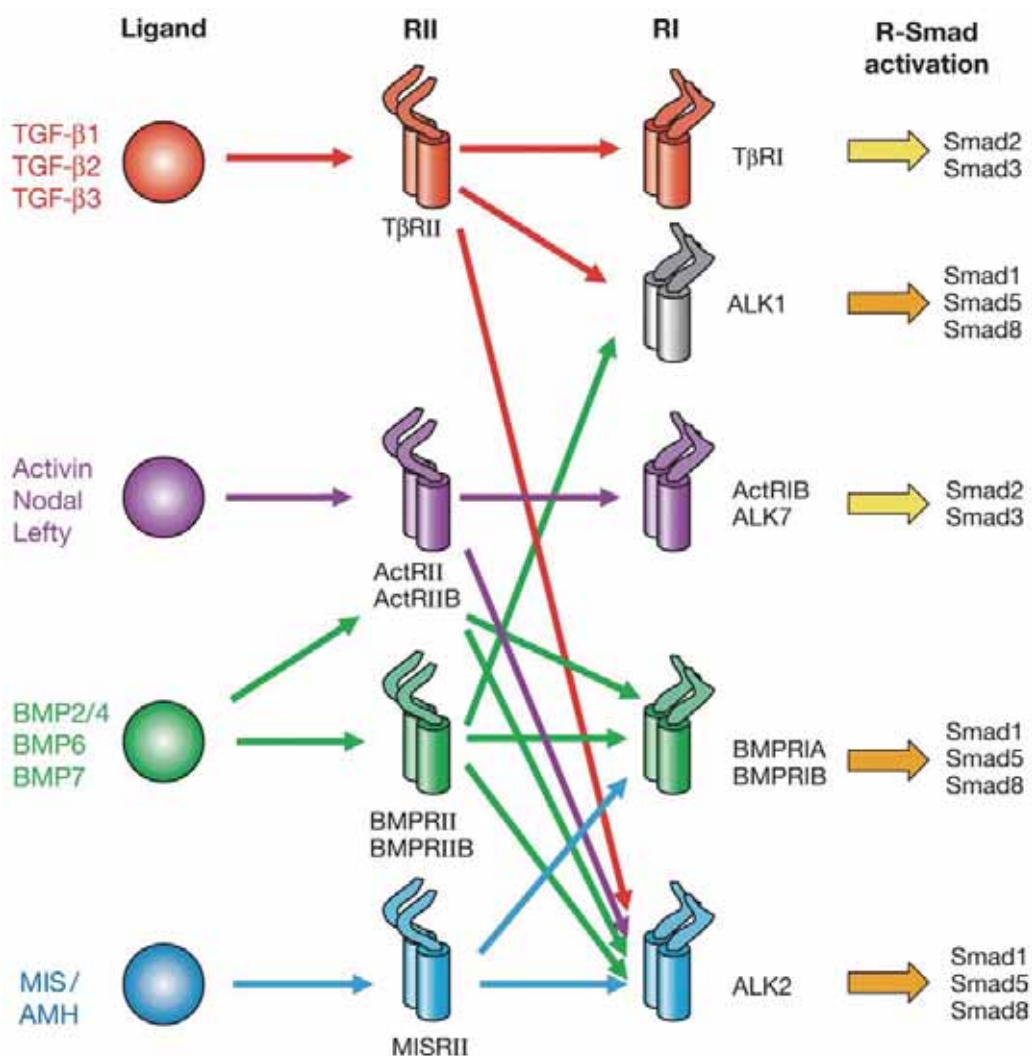


Figura 11 combinacions possibles de receptors de tipus I i de tipus II i R-Smads activades en cada cas (ALK2=ActRIA; ALK4=ActRIB; ALK3=BMPRIA; ALK6=BMPRIB; ALK5=T β RI). Extret de *Feng and Derynck, 2005*.

Molts l·ligands s'uneixen amb una elevada afinitat a receptors de tipus II o bé de tipus I, mentre que d'altres s'uneixen eficientment només a combinacions heteromèriques. TGF β -1, TGF β -3 i les Activines s'uneixen eficientment als seus respectius receptors de tipus II (T β RII i ActRII/ActRIIB) sense necessitat de receptor de tipus I, tot i que el l·ligand entra en contacte amb ambdós receptors per tal d'estabilitzar el complex (Boesen et al., 2002; Greenwald et al., 2004).

BMP-2 i BMP-4 no s'uneixen molt eficientment al receptor de tipus II (BMPRII) però en canvi s'uneixen millor als receptors de tipus I (BMPRIA o ALK3 i BMPRIB o ALK6) per la qual cosa necessiten el complex heteromèric per unir-s'hi amb elevada afinitat (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000). TGF β -2 i BMP-7 requereixen tant l'ectodomini del receptor de tipus II com el del receptor de tipus I (del Re et al., 2004; Greenwald et al., 2003).

INTRODUCCIÓ

Normalment els receptors que uneixen TGF β i Activines, fosforilen les R-Smads 2 i 3 mentre que els receptors que s'uneixen a les BMPs activen les R-smads 1, 5 i 8. Ara bé, la combinació de receptors de tipus I i de tipus II als que s'uneix el lligand pot variar radicalment la resposta intracel·lular: la unió de TGF β a T β RII combinat amb T β RI (també anomenat ALK5) activa la ruta clàssica de TGF β , és a dir que fosforila Smad2 i Smad3, però si s'uneix a la combinació de T β RII combinat amb ALK1 activarà a Smad1, 5 i 8, que són les Smads característiques de la senyalització per BMP. (Feng and Derynck, 2005; Shi and Massague, 2003).

La combinació T β RII-ALK1 promou la proliferació i migració de cèl·lules endotelials, mentre que la combinació T β RII-T β RI inhibeix aquestes respostes. Aquesta contraposició d'accions de les diferents combinacions de receptors determina el balanç en la migració i proliferació de cèl·lules endotelials (Goumans et al., 2003; Goumans et al., 2002) i és un exemple de la importància del context cel·lular en la resposta a un determinat senyal.

Els receptors BMPRIA i BMPRIB combinen clàssicament amb BMPRII però també amb ActRII (Macias-Silva et al., 1998; Nishitoh et al., 1996) i s'ha descrit que la combinació ActRI amb ActRII pot transduir el senyal induït per BMP-7 (Macias-Silva et al., 1998). A més, s'ha descrit que en absència de lligand ja existeixen tant combinacions heteromèriques BMPRIA/BMPRII i BMPRIB/BMPRII com homomèriques BMPRIA/BMPRIA, BMPRIB/BMPRIB i BMPRII/BMPRII i que la presència del lligand incrementa tant la formació d'homodímers com d'heterodímers (Gilboa et al., 2000; Herpin and Cunningham, 2007).

El tipus de receptors que s'expressen en una cèl·lula és important a l'hora de diferenciar cap a un determinat llinatge. Tot i que en general tenen funcions similars, s'ha descrit que BMPRIA té més tendència a promoure diferenciació al llinatge adipogènic mentre que BMPRIB té més tendència a induir la diferenciació al llinatge osteogènic (Chen et al., 1998a).

2.2.1 Els coreceptors:

L'eficiència d'unió del lligand de la superfamília TGF β al complex del receptor pot ser modificada per la presència de coreceptors a la membrana cel·lular. Per exemple, el Betaglicà i l'Endoglina són 2 coreceptors que s'uneixen a TGF β amb elevada afinitat i cooperen perquè alguns dels membres de la superfamília TGF β s'uneixin amb major afinitat als receptors.

El Betaglicà, també conegut com a T β RIII, és un receptor molt abundant que s'expressa de forma ubiqua en la superfície cel·lular. És necessari per la unió de TGF β -1 i TGF β -2 a T β RII. En el cas de TGF β -2, que té poca afinitat pel receptor T β RII, la presència del Betaglicà és imprescindible per a la senyalització (Lopez-Casillas et al., 1994; Lopez-Casillas et al., 1993). La regulació de l'expressió del Betaglicà a la superfície cel·lular per part de la proteïna GIPC pot definir la magnitud de la resposta de TGF β (Blobe et al., 2001). A més, el domini citoplasmàtic del Betaglicà interactua amb T β RII que el fosforila, això desencadena la interacció del Betaglicà amb la β -arrestina que modula la internalització dels complexos dels receptors TGF β (Chen et al., 2003).

INTRODUCCIÓ

Recentment s'ha descrit que el Betaglicà també és receptor per BMP, la qual s'hi uneix de forma directa i independentment de la unió als seus receptors. Diferents membres de la família BMP s'uneixen al Betaglicà amb diferents afinitats. Segons aquest estudi, l'afinitat de BMP-2 pel Betaglicà és de l'ordre de l'afinitat per TGF β -1. Com a coreceptor, el Betaglicà incrementa lleugerament la capacitat dels receptors BMPRIA i BMPRIB (ALK3 i ALK6) d'unir-se a la BMP-2 (Kirkbride et al., 2008).

Les BMPs també tenen el seu coreceptor específic: DRAGON que pertany a la família de proteïnes RGM (Repulsive Guidance Molecule) i potencia l'acció de la BMP en cèl·lules embrionàries del sistema nerviós (Samad et al., 2005). DRAGON pot unir-se tant a BMP-2 i BMP-4, com als receptors de tipus I (ALK2, ALK3 i ALK6) i de tipus II (ActRII i ActRIIB). Aquesta proteïna, que es troba ancorada a la membrana citoplasmàtica, és molt versàtil doncs també produeix unions cèl·lula-cèl·lula en neurones (Samad et al., 2004). Recentment s'ha proposat que altres membres de la família RGM podrien ser coreceptors per BMP, però se'n desconeix el mecanisme (Xia et al., 2007).

L'Endoglina és una glicoproteïna amb funció de receptor accessori pels membres de la superfamília TGF β que s'expressa principalment en cèl·lules endotelials però també en molts altres teixits, entre ells cèl·lules estromals com els fibroblasts de la medul·la òssia. L'Endoglina pot unir-se a TGF β -1 i TGF β -3 a través del receptor T β RII i a l'Activina-A i la BMP-7 a través dels receptors d'Activines de tipus II. També pot unir-se a la BMP-2 a través dels receptors de tipus I BMPRIA i BMPRIB (ALK3 i ALK6) (Barbara et al., 1999). L'efecte de l'Endoglina és diferent d'altres coreceptors, doncs en cèl·lules endotelials potencia la senyalització de TGF β a través de la combinació T β RII-ALK1, que és la que porta a l'activació de les Smads típiques de BMP i indirectament inhibeix la senyalització per la via T β RII-T β RI i l'activació de les Smads 2 i 3 (Lebrin et al., 2004).

La proteïna transmembrana BAMBI (BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor) és un pseudoreceptor descobert en *Xenopus*, el qual s'associa amb els receptors de la superfamília TGF β de forma estable, impeding la formació de complexos actius, interferint així en la senyalització de BMPs, Activines i TGF β . L'homòleg de mamífers de BAMBI és Nma, el qual està relacionat estructuralment als receptors de tipus I pel que fa al seu domini extracel·lular, però perd l'activitat serina/treonina kinasa en el seu domini intracel·lular. (Grotewold et al., 2001; Onichtchouk et al., 1999).

La via més coneguda i estudiada que s'inicia per la unió dels lligands de la superfamília TGF β als seus receptors és la Via de les Smads, però també es coneixen altres vies de transducció de senyal iniciades pels receptors de la superfamília TGF β anomenades Vies Independents de Smads, les quals en els darrers anys, a partir de noves observacions, han crescut en rellevància .

INTRODUCCIÓ

2.3-Via de les Smads

Hi ha 8 proteïnes que són membres de la família Smad. Funcionalment es poden agrupar en 3 classes: les Smads receptors (R-Smads), la Smad cooperadora (Co-Smad) i les Smads inhibidores (I-Smads). Les Smads receptors són Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 i Smad8. La Smad cooperadora és Smad4 i les Smads inhibidores són Smad6 i Smad7.

En general, les Smads 2 i 3 s'activen per acció del TGF β i les Activines mentre que les Smads 1, 5 i 8 són específiques per BMP (Shi and Massague, 2003) tot i que, tal com hem vist en el capítol dels receptors, aquests són els que determinen quines Smads receptors s'activaran.

Amb la fosforilació del receptor de tipus I s'inicia la senyalització per la via de les Smads. El loop L45 del receptor, el qual es troba adjacent a la regió GS (seqüència rica en Glicina i Serina), és clau en el reclutament de les R-Smads (Chen et al., 1998b; Chen and Massague, 1999; Feng and Derynck, 2005). Les R-Smads s'associen transitòriament amb els receptors i són fosforilades en el motiu SXS de la regió C-terminal, la qual cosa els hi provoca un canvi de conformació que els hi permetrà interactuar amb la Smad4. La fosforilació de les R-Smads per part del receptor de tipus I pot ser modulada per la interacció de proteïnes com SARA i les I-Smads (Shi and Massague, 2003).

La seqüència del loop L45 està constituïda per 9 aminoàcids i varia segons el receptor determinant així quines R-smads s'hi uniran. La seqüència del loop L45 de T β RI i ActRIB és idèntica i activa Smad2 i Smad3. La seqüència del loop L45 dels receptors BMPRIA i BMPRIB varia en 4 aminoàcids respecte la seqüència de les primeres i el loop L45 de ALK1 i ALK2 varia en 7 aminoàcids. En experiments de substitució del loop L45 d'un receptor pel d'un altre s'ha comprovat que efectivament és aquesta seqüència d'aminoàcids la que determinarà quines seran les R-Smads activades (Chen et al., 1998b).

Les Smads 2 i 3 són fosforilades pels receptors T β RI i ActRIB i ALK7, mentre que les Smads 1, 5 i 8 són substrats per BMPRIA, BMPRIB, ALK1 i ALK2. L'eficiència de l'activació de les Smads depèn del receptor i del lligand que s'hi uneix, tot i que encara manca un estudi exhaustiu que caracteritzi aquests processos (Feng and Derynck, 2005).

Les Smads interactuen amb el loop L45 dels receptors a través del seu domini MH2, que conté un loop que s'anomena L3. La seqüència de L3 també és comuna per les Smads 2 i 3 i les Smads 1, 5 i 8 i difereix en 2 aminoàcids entre els 2 grups. També en aquest cas, s'ha observat que realitzant experiments de substitució del loop L3 de les Smads d'un grup pel de l'altre canvia la seva capacitat de respondre a uns receptors o altres (Lo et al., 1998), tot i que en aquest cas les seqüències adjacents al loop també intervenen en la interacció i en algun cas, com Smad1, impedeixen el canvi d'identitat quan se substitueix el loop L3 però no les seves seqüències adjacents (Chen and Massague, 1999). A més, la seqüència GS del receptor també té un rol important en establir la unió receptor-Smad a través del domini MH2 d'aquesta última (Wu et al., 2000).

INTRODUCCIÓ

En l'estat basal, els dominis MH1 i MH2 de les R-Smads es troben units de forma que s'inhibeixen mútuament. Amb la fosforilació del domini MH2, canvia la conformació i això permet que els dominis se separin i puguin interactuar amb altres proteïnes (Revisat a Massague, 1998).

Les R-Smads fosforilades formen complexos heteromèrics amb la Smad4 que és la Smad cooperadora. Aquests complexos heteromèrics són els que poden translocar al nucli on s'uniran a l'ADN per transcriure gens concrets. L'estequiometria d'aquests complexos és variable, doncs es poden formar tant heterotrímers amb 2 R-smads i una Smad4 com heterodímers amb una de cada. En els complexos de transcripció de cada gen diana es troben heterodímers o heterotrímers depenent dels factors de transcripció amb els quals interactuin (Chacko et al., 2001; Derynck and Zhang, 2003; Wu et al., 2001).

En absència de lligand, les R-Smads es troben majoritàriament al citoplasma mentre que la Smad4 es troba distribuïda entre el nucli i el citoplasma. Amb la unió d'una citoquina de la superfamília TGF β als seus receptors, les R-Smads corresponents són activades tal com hem vist, formen complexos amb la Smad4 i passen a trobar-se localitzades majoritàriament al nucli (Shi and Massague, 2003; Xu et al., 2002).

La Smad4 no és necessària per la translocació de les R-Smads al nucli tot i que cotransloca amb aquestes. Les R-Smads poden entrar al nucli tant en la seva forma fosforilada (activa) com no fosforilada (inactiva). En estudis recents s'ha descrit que les proteïnes Imp7 i Imp8 són indispensables per l'acumulació nuclear de les R-smads activades en resposta als senyals extracel·lulars. Aquest mecanisme està conservat en *Drosophila*, on trobem *msk*, l'ortòleg d'aquests gens, el qual realitza la mateixa funció.

Un cop al nucli, les R-Smads són constantment desfosforilades provocant la dissociació dels complexos Smad i l'exportació de les R-Smads inactives al citoplasma. Pel que fa a l'entrada de R-Smads no fosforilades al nucli, es creu que hi juguen un paper tant vies dependents d'Importina β 1 com independents d'aquesta (Shi and Massague, 2003; Xu et al., 2007; Yao et al., 2008).

La Smad4 es troba movent-se constantment entre el nucli i el citoplasma degut a que a més del senyal NLS (Nuclear Localization Signal) a la regió MH1, conté un senyal NES (Nuclear Export Signal). S'ha suggerit que quan Smad4 es troba acomplexada amb les R-Smads el senyal NES podria quedar enmascarat permetent així la permanència dels complexos Smads al nucli (Derynck and Zhang, 2003).

Xenopus té 2 isoformes de Smad4 (α i β), Smad4 β no té seqüència NES i es troba sempre al nucli, mentre que Smad4 α , que té una seqüència NES, es troba en forma citoplasmàtica fins a l'arribada d'un estímul de la família TGF β (Masuyama et al., 1999; Watanabe et al., 2000).

El mecanisme pel qual les Smads 2 i 3 són activades pel receptor de tipus I és regulat per unes proteïnes que es caracteritzen per tenir un domini anomenat FYVE (que deu el nom a les inicials de les 4 proteïnes on va ser localitzat). Aquestes proteïnes interactuen amb el receptor i amb les Smads i intervien en l'endocitosi d'aquest complex en els endosomes (Mao et al., 2000; Tsukazaki et al., 1998). S'ha demostrat que l'endocitosi

INTRODUCCIÓ

dels receptors és un mecanisme important per a la senyalització de TGF β (Di Guglielmo et al., 2003; Hayes et al., 2002; Panopoulou et al., 2002).

Una d'aquestes proteïnes amb domini FYVE és SARA, la qual pot unir-se a Smad 2 i 3, però no a les Smads 1, 5 ni 8, i que té una elevada afinitat per PI3P (Phosphatidyl Inositol 3-Phosphate). Hgs és una altra proteïna d'aquesta família involucrada en l'endocitosi. Tant SARA com Hgs són potenciadores de l'efecte de TGF β i les Activines.

Dab2 (Disabled-2) és una proteïna que interactua amb el complex de receptors T β RII-T β RI i Smads 2 i 3. La seva acció consisteix en estabilitzar la interacció entre Smad i el receptor (Hocevar et al., 2001). La capacitat de Dab2 d'interactuar amb la Clatrina i la seva localització en les vesícules recobertes per aquesta proteïna, fan pensar que Dab2 podria estar implicada en la internalització dels receptors de TGF β mediada per Clatrina.

Pel que fa a les Activines, la proteïna Dok-1 interacciona amb Smad3 quan les Activines s'uneixen als receptors, constituint un component important en aquesta via (Yamakawa et al., 2002). Encara no s'ha descrit cap proteïna que interactui amb les smads 1, 5 i 8 per transduir el senyal de les BMPs.

Les I-smads compliquen encara més el que hem explicat fins ara. Smad 6 i 7 inhibeixen l'acció dels membres de la superfamília TGF β per diferents mecanismes, el principal d'ells és interferint en l'activació de les R-Smads per part del receptor. Les I-Smads s'associen amb els receptors de tipus I competint per la unió de les R-Smads i impeding-ne la fosforilació (Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997).

Les Smads 1 i 5 indueixen l'expressió de Smad6, mentre que la Smad3 està involucrada en la inducció de la Smad7. Podem dir que la senyalització a través de les Smads pròpies de BMP indueix una retroalimentació negativa a través de l'expressió de Smad6, mentre que les Smads característiques de TGF β indueixen una retroalimentació negativa a través d'induir l'expressió de Smad7, tot i que tant BMP com TGF β també poden induir la Smad inhibidora de l'altra via (Denissova et al., 2000; Ishida et al., 2000).

Smad6 inhibeix tant la senyalització de BMP com de TGF β amb major efectivitat en el primer cas, mentre que Smad7 inhibeix la senyalització iniciada per TGF β més efectivament que la iniciada per BMP (Hanyu et al., 2001; Shi and Massague, 2003).

Les Smads 6 i 7 interaccionen amb els receptors de tipus I a través dels seus dominis MH2. A més, en el cas de la Smad7, la regió N-terminal incrementa la interacció del domini MH2 amb el receptor T β RI. La proteïna STRAP-1, que conté un domini WD40 que facilita la interacció proteïna-proteïna, interacciona amb els receptors de TGF β i coopera amb la Smad7 en la inhibició de la senyalització via TGF β (Datta and Moses, 2000; Hanyu et al., 2001).

A més de competir amb les R-Smads per la unió als receptors de tipus I, Smad6 inhibeix la unió de Smad1 amb Smad4 (Hata et al., 1998). Una altra acció de Smad 6 i 7 és inhibir la senyalització de la superfamília TGF β interaccionant amb unes proteïnes amb activitat E3-ubiquitina lligada anomenades Smurf (Smad Ubiquitin Regulatory

INTRODUCCIÓ

Factor) i mobilitzar aquestes lligases cap a la degradació dels receptors de tipus I per la via proteasomal. La Smad6 s'uneix a Smurf1, mentre que la Smad7 s'uneix tant a Smurf1 com a Smurf2. (Ebisawa et al., 2001; Kavsak et al., 2000; Murakami et al., 2003). A més, Smurf1 està implicada en la unió de Smad7 al complex del receptor (Suzuki et al., 2002).

A més de ser induïdes per les mateixes citoquines de la superfamília TGF β , altres factors poden induir les I-Smads inhibint d'aquesta manera la senyalització per la via de les Smads: EGF, IFN γ , TNF α , IL1 i LPS entre d'altres, indueixen l'expressió de Smad7 activant vies *downstream* com la via Jak/STAT en resposta a IFN γ o la via NF- κ B en resposta a citoquines inflamatòries com TNF α , IL1 o LPS (Bitzer et al., 2000; Itoh et al., 2000; Massague, 2000; Moustakas et al., 2001).

La degradació per via de la ubiquitinació i el proteasoma també regula els nivells de Smads post-traduccionalment. Les proteïnes Smurf pertanyen a la família HECT (Homologous of the E6-AP Carboxi Terminus) i són E3-ubiquitina lligases. Smurf1 i Smurf2 antagonitzen la senyalització de diferents membres de la superfamília TGF β mitjançant la interacció amb les R-Smads i induint-ne la degradació (Arora and Warrior, 2001).

Smurf1 interacciona amb Smad1 i Smad5 regulant d'aquesta manera la resposta a les BMPs, mentre que Smurf2 interacciona amb un espectre més ampli de R-Smads interferint en la senyalització tant de BMPs com de TGF β i Activines (Derynck and Zhang, 2003).

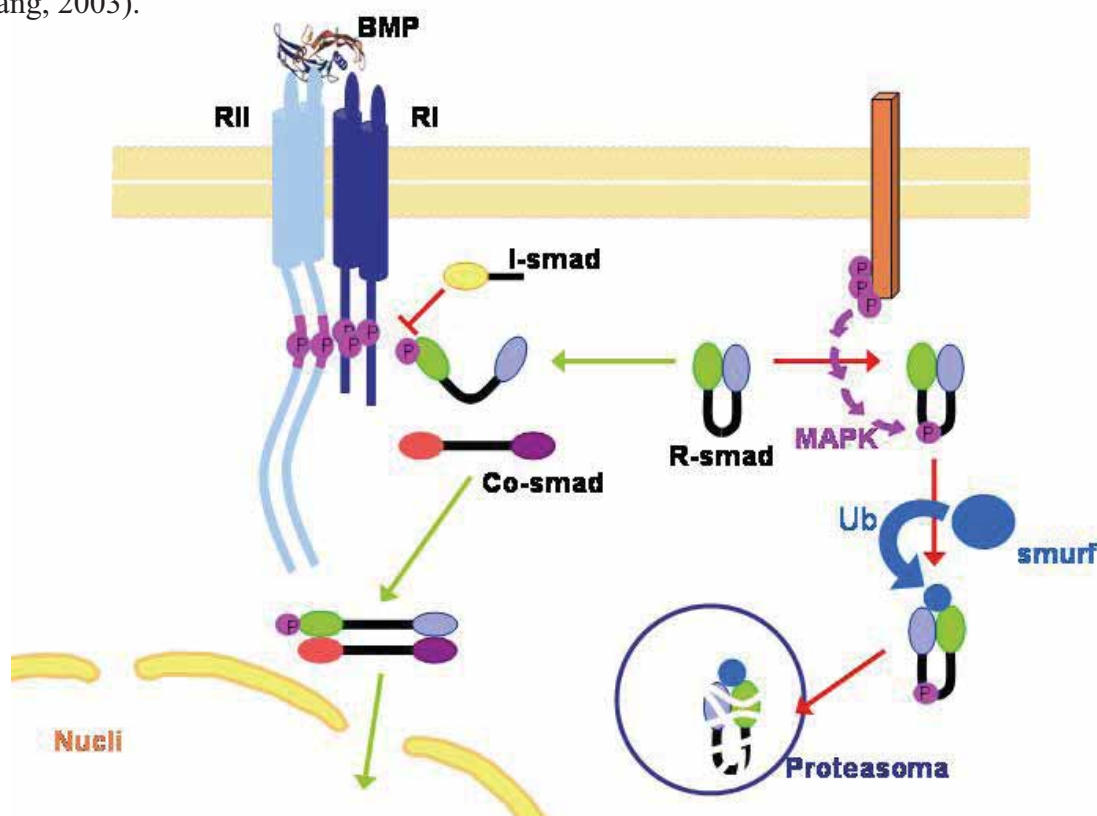


Figura 12: Representació de la via de les Smads, les fletxes verdes indiquen l'activació de les R-Smad i la seva activitat, mentre que les vermelles indiquen la seva inhibició o degradació.

INTRODUCCIÓ

2.4-Vies independents de Smads

A més d'activar les R-Smads, les citoquines de la superfamília TGF β poden activar altres vies com les MAPKs o les proteïnes G. En alguns casos l'activació d'aquestes vies és deguda a l'activitat transcripcional de les Smads, però en altres casos la ràpida activació (5-15 minuts) indica que és un fenomen independent de la transcripció (Massague, 2000).

Es poden classificar les vies independents de Smads en 3 tipus. 1) Vies de senyalització independents de Smads que modifiquen directament la funció de les Smads 2) Proteïnes la funció de les quals és modificada per les Smads i que actuen en altres vies 3) Proteïnes que són fosforilades directament pels receptors de les Smads i que senyalitzen de forma completament independent de les Smads (Moustakas and Heldin, 2005).

S'ha proposat que la manera en que les BMP s'uneixen als seus receptors determina el tipus de via –dependent o independent de Smads- que s'activarà. Per exemple, si la BMP-2 s'uneix a un receptor de tipus I i després es recluta el receptor de tipus II s'activaria la via de p38-MAPK, però si s'uneix a un complex preformat de receptor tipus I i tipus II s'activaria la via de les Smads (Gilboa et al., 2000; Nohe et al., 2002).

2.4.1 Les MAPK

Les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) són enzims expressats ubiqüament que regulen un ampli espectre de funcions de virtualment tots els tipus cel·lulars mitjançant l'addició d'un grup fosfat a diferents proteïnes.

Les MAPK són les últimes d'una cascada de tres components que es fosforilen successivament: Les MAPK són fosforilades per les MAPKK les quals són fosforilades per les MAPKKK. Aquestes últimes, al ser les primeres en activar-se, són les responsables d'integrar els diferents senyals i de l'especificitat en l'activació de les MAPK (Revisat a Cuevas et al., 2007).

Existeixen 3 grans grups de MAPK caracteritzats en cèl·lules de mamífer: Són les proteïnes ERK, les JNKs i p38. Les proteïnes ERK 1 i 2 són activades per receptors de membrana i regulen la proliferació cel·lular i la diferenciació. Les vies de JNK (c-Jun-NH2-terminal kinases) i p38-MAPK són activades generalment quan les cèl·lules són tractades amb citoquines proinflamàtores o sotmeses a estrès ambiental, per això JNK i p38 són conegudes també com a proteïnes kinasa activades per estrès o SAPK (Stress Activated Protein Kinase). No obstant, les SAPK també intervien en molts altres processos tals com la proliferació, la diferenciació i la supervivència en resposta a estímuls extracel·lulars.

2.4.1.1 ERK1 i ERK2

Les proteïnes ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) ERK1 i ERK2 foren identificades com a proteïnes amb activitat kinasa membres d'una via activada per factors de creixement. Ambdues s'expressen de forma ubiqüa i tenen un 83% d'homologia entre elles. L'activació d'aquestes proteïnes està involucrada en moltes

INTRODUCCIÓ

respostes cel·lulars com la mobilitat, la proliferació, la diferenciació o la supervivència (Raman et al., 2007).

Les proteïnes MEK1 i MEK2 són MAPKK que fosforilen residus específics en ERK1 i ERK2. En aquesta via les isoformes de Raf són les principals MAPKKK. A-Raf, B-Raf i C-Raf són activades per una combinació d'unions de proteïnes G de la família Ras que les fosforilen en la seva regió N-terminal.

Aquesta ruta, a més de regular la proliferació i l'apoptosi, està implicada en la diferenciació de cèl·lules postmitòtiques. Aquesta via pot regular factors de transcripció específics de diferents llinatges tals com MyoD (Zetser et al., 2001) Sox9 (Murakami et al., 2004; Murakami et al., 2000) i PPAR γ (Adams et al., 1997).

En la diferenciació del llinatge osteoblàstic, la via d'ERK-MAPK ha estat implicada en la resposta a diversos factors i també a senyals del complex de la matriu i les Integrines o estímuls mecànics (Xiao et al., 2002; Yao et al., 2001). S'ha observat que l'activació de MEK1 és estimuladora de gens osteogènics, concretament l'increment de la transcripció i la fosforilació de Runx2 per aquesta via és imprescindible per la seva activitat com a factor clau de l'osteogènesi (Franceschi et al., 2003; Ge et al., 2007; Xiao et al., 2002).

Paral·lelament, altres estudis han mostrat un rol de les ERK-MAPK antagonista de l'osteoblastogènesi. L'estimulació de les ERK via MEK1 per part de l'EGF (Epidermal Growth Factor) provoca la fosforilació d'un residu en la regió linker de Smad1 fent que es localitzi fora del nucli, impeding així la seva activitat com a factor de transcripció (Aubin et al., 2004; Kretschmar et al., 1997).

La via d'Erk-MAPK, quan és activada en resposta a factors de creixement mitogènics o mutants oncogènics de Ras, a més de a Smad1 també pot fosforilar a Smad 2 i 3, inhibint-les (Kretschmar et al., 1997; Kretschmar et al., 1999; Pera et al., 2003). Altres estudis, però, han conclòs que la via de Ras/MAPK no afecta la capacitat de les Smads de translocar al nucli (de Caestecker et al., 1998; Engel et al., 1999).

Sobre la capacitat de les BMP d'activar Erk1 i Erk2 hi ha estudis contradictoris, tot i que l'aparent contradicció podria radicar en que són estudis fets en diferents models cel·lulars. Alguns grups han observat que les BMP activen Erk 1 i 2, d'altres que aquestes no es veuen afectades per la presència de BMP i d'altres han observat que BMP reprimeix l'activitat de les Erk (Lou et al., 2000; Qi et al., 2004; Vinals et al., 2002).

En el cas de TGF β , la seva capacitat d'induir les proteïnes Erk està més consensuada (Hartsough et al., 1996; Mulder and Morris, 1992). S'ha descrit que l'activació de la via Ras/Erk-MAPK pot induir l'expressió de TGF β -1 amplificant així la resposta a aquesta citoquina.

2.4.1.2 TAK1 i les SAPK (JNK i P38-MAPK)

Tant TGF β com les BMPs poden activar TAK1 (TGF β -Activated Kinase 1) que és una MAPKKK i es troba *upstream* de les vies de p38-MAPK, JNK i NF- κ B. En ambdós casos l'activació de TAK1 és mediada per TAB1 (TAK1-Binding protein1) que

INTRODUCCIÓ

augmenta l'activitat kinasa de TAK1 induint-ne l'autofosforilació (Kishimoto et al., 2000). El complex de senyalització de TAK1 inclou les proteïnes adaptadores TAB2 i TAB3 així com la proteïna TRAF6 que és una E3-ubiquitina lligasa (Wang et al., 2001).

Recentment s'ha descrit que la unió del lligand TGF β al seu receptor recluta TRAF6 el qual ubiquitina a TAK1 i d'aquesta manera l'activa, permetent que aquest activi a p38-MAPK. El lloc d'interacció del receptor T β RI amb TRAF6 està conservat en el receptor BMPRI1B, suggerint aquest fet que es tracta d'un mecanisme conservat també en la via de les BMPs. Smad7 interacciona amb TAK1, MKK3 i p38 i podria actuar com a acoblador d'aquestes proteïnes amb el Receptor de tipus I (Edlund et al., 2003; Sorrentino et al., 2008).

També s'ha postulat que la proteïna XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis) és la responsable de la interacció entre els receptors de tipus I i tipus II de les BMPs i TAK1 (Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Shibuya et al., 1996; Yamaguchi et al., 1999). Per altra banda, s'ha descrit que TAK1 també pot ser activada en resposta a estrès (Shirakabe et al., 1997), citocines inflamatòries com IL-1 (Ninomiya-Tsuji et al., 1999) o LPS (Lee et al., 2000a).

La MAPKKK TAK1 activa a diferents MAPKK, entre elles MKK3 i MKK6 les quals activen a la MAPK p38. MKK6 pot activar a les 4 isoformes de p38-MAPK que són α , β , γ i δ , mentre que MKK3 només pot activar les isoformes α , γ i δ però no la β (Craig et al., 2000; Moriguchi et al., 1996; Nebreda and Porras, 2000). TAK1 també activa a MKK4 que activa la via de JNK (Shirakabe et al., 1997) i NF- κ B (Ninomiya-Tsuji et al., 1999) però no pot activar les MAPKK que activen les ERK (Fanger et al., 1997). A més s'ha observat que TAK1 està involucrada en la via de senyalització de Wnt (Smit et al., 2004).

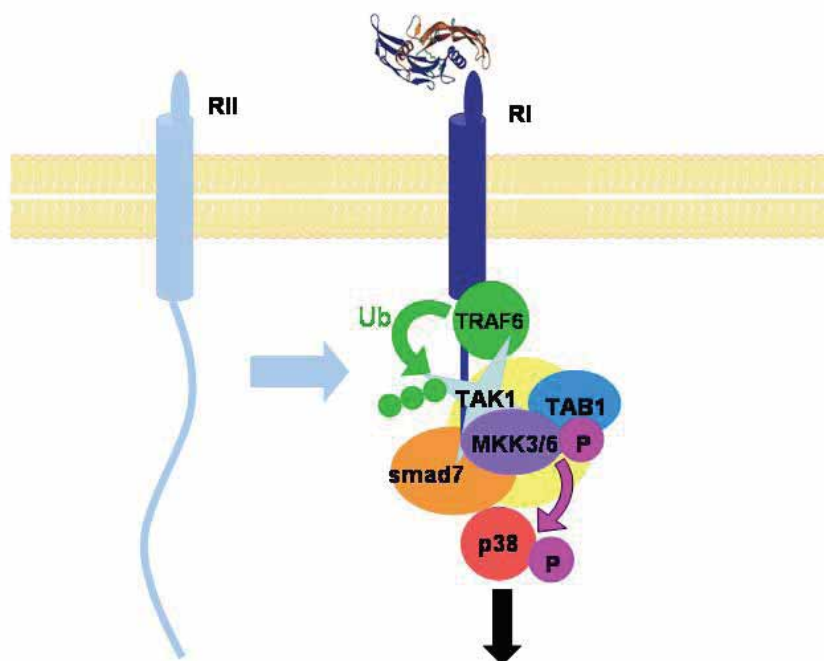


Figura13 Esquema de les vies independents de les Smads i les principals proteïnes implicades.

INTRODUCCIÓ

P38 també pot ser activada directament per TAB1, aquest descobriment va ser sorprenent perquè és el primer cas observat d'una MAPK que és activada per una proteïna que no té activitat kinasa (Johnson, 2002). Aquest descobriment es va donar a partir d'experiments realitzats en cèl·lules 293 en que es va descriure que en alguns casos TAB1 pot interaccionar i activar a p38-MAPK α per una via alternativa i independent de TAK1, MKK3 i MKK6 i que seria activada per TNF α .. S'ha proposat que TAB1 tindria la capacitat de provocar l'autofosforilació de p38-MAPK α però no altres isoformes de p38 (Ge et al., 2002).

2.4.1.2.1 JNK

Les JNK són el grup de MAPK que tenen un rol menys definit en l'osteogènesi. No obstant, Guicheux et al han descrit la seva inducibilitat per BMP-2 i la seva implicació en l'estimulació de la diferenciació al llinatge osteoblàstic. Els autors observaren que l'activació de JNK i p38 era posterior a la de les R-Smads i igualment transitòria. Usant SP60015, un inhibidor específic de JNK, observaren una disminució dosi-dependent en l'expressió d'Osteocalcina (Guicheux et al., 2003).

El mecanisme pel qual la BMP-2 activaria JNK no està encara ben definit, però recentment s'ha postulat que PKD podria estar implicada en l'activació tant de JNK com p38 a través de la fosforilació de les seves respectives MAPKK, les quals són MKK4 per JNK i MKK 3 i 6 per p38 (Lemonnier et al., 2004).

2.4.1.2.2 P38-MAPK

P38 ha estat involucrada en molts processos de diferenciació de les cèl·lules mesenquimals. S'ha descrit la implicació de p38 α en l'adipogènesi i la seva implicació en la regulació positiva de PPAR γ i C/EBP β (Engelman et al., 1999; Engelman et al., 1998). Per altra banda, la sobreexpressió de TAK1 en condrocits estimula la síntesi del col·lagen de tipus II mimetitzant la resposta a TGF β i BMP (Qiao et al., 2005). També s'ha relacionat la via de p38 en la diferenciació de cèl·lules C2C12 a mioblasts i la formació de miotubs així com la seva capacitat d'activar MyoD (Cuenda and Cohen, 1999; Zetser et al., 1999).

En treballs previs del nostre grup es va examinar el rol de p38 en l'osteogènesi. En el treball de Viñals et al (Viñals et al., 2002) es descriu la inducció de p38 per BMP-2 en cèl·lules C2C12, començant a apreciar-se als 15 minuts d'afegir-hi aquesta citoquina i arribant al màxim al cap d'una hora. L'estimulació es mantenia fins a les 4 hores i ja no era apreciable a les 8 hores.

Els últims anys s'han publicat diferents treballs en que es descriu l'efecte de la p38-MAPK induïda per BMP en la inducció de gens marcadors de l'osteogènesi tals com la Fosfatasa Alcalina i l'Osteocalcina (Gallea et al., 2001; Guicheux et al., 2003; Lai and Cheng, 2002), Osterix (Celil et al., 2005; Wang et al., 2007) i Col·lagen tipus I, Fibronectina i Osteopontina (Lai and Cheng, 2002).

La via de p38 també ha estat implicada en molts altres processos i explica les diferents respostes que en alguns casos es dona a un mateix estímul en un mateix context cel·lular, per exemple l'activació de p38-MAPK per TGF β és imprescindible per a

INTRODUCCIÓ

l'inducció de l'apoptosi i la transició epiteli-mesènquima, però no per la parada del cicle cel·lular (Yu et al., 2002).

2.4.1.2.3 És realment la via de TAK1 independent de les Smads?

S'ha demostrat que en alguns casos TAK1 pot interaccionar amb les Smads, inferint-se d'aquesta observació que la via de TAK1-p38 podria no ser tant independent de Smads. En primer lloc s'ha observat que la via de les Smads i la via de TAK1 conflueixen en l'activació d'ATF2 (Sano et al., 1999), també s'ha documentat la interacció de TAK1 amb la Smad6 (Kimura et al., 2000) i la Smad7 (Yanagisawa et al., 2001).

Recentment s'ha observat que TAK1 pot interaccionar directament amb totes les Smads. En els casos en que s'ha estudiat, la interacció es dona entre el domini kinasa de TAK1 i el domini MH2 de les Smads. La presència de TAK1 *wild type* o constitutivament activa no evita la fosforilació de les R-Smads però s'ha observat que disminueix el potencial transactivador de Smad1 i evita la translocació al nucli de Smad1 i Smad3, suggerint aquests fets una competència entre la via de TAK1 i les Smads a l'hora d'activar diferents gens. Aquests experiments s'han confirmat en cèl·lules C2C12 (Hoffmann et al., 2005).

Un mutant de TAK1 que no té activitat kinasa mostra una capacitat significativament reduïda per unir-se a les Smads. S'ha observat que tant les R-Smads com les I-Smads predominantment s'uneixen a la forma activa de TAK1.

En l'esmentat estudi, Hoffman i col·laboradors suggereixen que la fosforilació de les R-Smads disminuiria la seva unió a TAK1 (excepte en el cas de Smad3) permetent així la seva activitat. També es descriu en aquest estudi que la presència de IL1, citoquina activadora de TAK1, inhibiria la translocació de les Smads al nucli però d'una forma independent de p38 perquè SB203580 (inhibidor farmacològic de p38) no té ningun efecte en aquest fenomen.

Les I-Smads també poden regular la via independent de Smads, s'ha demostrat que Smad6 pot unir-se a TAK1 i reprimir-ne l'activitat (Kimura et al., 2000). S'ha observat que receptors de tipus I mutants defectius per la fosforilació de les R-Smads poden activar altres vies, entre elles p38, en resposta a TGF β (Yu et al., 2002).

2.4.2 La cua citoplasmàtica de BMPRII i la fosforilació de LIMK1

El receptor BMPRII té una cua citoplasmàtica de 600 aminoàcids. Aquest domini es troba present en la forma d'splicing més abundant del receptor i no és necessari per a la senyalització a través de la via de les Smads (Nishihara et al., 2002; Wieser et al., 1993). No s'ha observat aquest domini citoplasmàtic en els receptors de tipus II per TGF β ni per Activines (Moustakas and Heldin, 2005).

S'ha observat que mutacions en el domini citoplasmàtic del receptor BMPRII estan implicades en la HPP (Hipertensió Pulmonar Primària), una malaltia autosòmica dominant caracteritzada per la proliferació de la musculatura llisa vascular que comporta una elevada pressió de les artèries pulmonars. Aquestes transporten la sang poc oxigenada del cor que ha de fer un treball extra per bombejar-la podent-se produir una parada cardíaca en conseqüència.

INTRODUCCIÓ

LIMK1 és una proteïna que regula el citoesquelet d'actina mitjançant la fosforilació de la Cofilina en la seva serina 3 que queda inactivada.. (Edwards and Gill, 1999; Foletta et al., 2003; Scott and Olson, 2007). LIMK1 interacciona amb la cua citoplasmàtica de BMPRII a través dels seus domini LIM i el resultat d'aquesta interacció és la inhibició de l'activitat de LIMK1. La presència de BMP alleuja aquesta inhibició permetent la fosforilació i inactivació de la Cofilina per part de LIMK1, la qual cosa comporta canvis en el citoesquelet d'actina.

Una de les mutacions de la cua citoplasmàtica de BMPRII més freqüents en la HPP evita la unió amb LIMK1 i la seva inhibició, suggerint aquest fet una possible involucració de LIMK1 en la HPP.

Per altra banda BMP fosforila LIMK1 per via de Cdc42 i PI3K, sent les proteïnes PAKs (p21-Activated Kinases) les efectores d'aquesta fosforilació (Edwards et al., 1999; Gamell et al., 2008; Lee-Hoeflich et al., 2004). Aquest és un fenomen totalment independent de la via de les Smads.

Cdc42 pertany a la família Rho de proteïnes G petites (Raftopoulou and Hall, 2004). La capacitat de BMP-7 per activar Cdc42 de forma independent de les Smads ja havia estat descrita per Lee-Hoeflich et al i resultats del nostre grup han confirmat que aquest efecte també el pot induir BMP-2 en cèl·lules C2C12. L'activació de PI3K i AKT per BMP-2 en cèl·lules C2C12 ja havia estat descrita pel nostre grup (Vinals et al., 2002) i ha estat confirmada en altres treballs que l'han examinada en d'altres models (Sugimori et al., 2005).

A més, Rac i Cdc42 regulen l'activació de les vies de JNK i p38-MAPK mitjançant la interacció amb MAPKKKs *upstream* d'aquestes vies independents de smads (revisat a Moustakas and Heldin, J Cell Sci 2005) i s'ha descrit recentment que en resposta al fàrmac lovastatina, l'activació de PI3K activa a AKT i Erk1/2 induint d'aquesta manera l'expressió de BMP-2 que òbviament repercuteix en la diferenciació osteoblàstica (Ghosh-Choudhury et al., 2007).

2.5- Altres vies relacionades amb BMP

Les vies de transducció de senyal no són pas circuits tancats, sinó que es relacionen entre elles d'una forma dinàmica. A tall d'exemple comentaré algunes de les vies de transducció de senyal que es relacionen amb les vies induïdes per BMPs, sense pretendre fer una revisió exhaustiva.

2.5.1 Les BMPs i la via de Wnt

Les proteïnes Wnt són una família molt conservada de proteïnes secretades que poden senyalitzar per vàries vies, la més coneguda de les quals és la via canònica que s'indueix per la unió de Wnt als seus receptors Frizzled (Fzd) i a uns coreceptors anomeants LRP.

La via de Wnt està implicada en molts processos fisiològics i del desenvolupament tals com la polaritat i la migració cel·lular i la diferenciació a múltiples llinatges, entre ells el llinatge ossi (Cadigan and Liu, 2006; Rawadi et al., 2003). Els factors de la família

INTRODUCCIÓ

Wnt estan implicats en la formació del patró embrionàric de l'esquelet i en l'osteogènesi; els ratolins mutants per les Wnts, els seus coreceptors LRP o proteïnes intermediàries de la via canònica presenten un ampli espectre de defectes esquelètics (revisat a de la Fuente and Helms, 2005).

Recentment s'ha descrit un mecanisme de sinèrgia entre les BMPs i la via canònica de Wnt en que s'integren els dos senyals en la fosforilació d'una R-Smad. Tal com hem vist anteriorment, els receptors de tipus I de la superfamília TGF β tenen la capacitat de fosforilar les R-Smads per activar-les, mentre que les MAPK tenen la capacitat de fosforilar algunes R-Smads en la seva regió *linker* inhibint-les. Fuentealba et al (Fuentealba et al., 2007) han descrit que GSK3 fosforila la Smad1 prèviament fosforilada per les MAPK provocant la seva degradació en el proteasoma.

La unió del lligand Wnt3a al seu receptor LRP6 activa la via canònica de Wnt i provoca la inactivació de GSK3 que deixa de fosforilar Smad1 impedit així la seva degradació i permetent augmentar la durada de la senyalització induïda per la fosforilació activadora per part dels receptors de BMP de tipus I. Aquest és un mecanisme de sinèrgia entre les dues citoquines.

2.5.2 Les BMPs i la via de Shh

Els membres de la família Hedgehog (Hh) són factors de senyalització implicats en el desenvolupament i en la formació del patró del cos conservats des de les mosques als vertebrats. En mamífers se'n coneixen tres membres: Sonic, Desert i Indian Hedgehog, abreujats respectivament Shh, Dhh i Ihh.

Així com en *Drosophila* Hh activa a *dpp* en alguns dels discs imaginals, en mamífers també s'observa la mútua regulació positiva entre BMP i Ihh. Ambdues proteïnes colocalitzen en el desenvolupament embrionari. El promotor de *ihh* conté diversos llocs d'unió per les Smads i és activat pel tractament amb BMPs mentre que la sobreexpressió de Ihh incrementa l'expressió de BMPs tal i com s'ha comprovat en condrocits (Bitgood and McMahon, 1995; Minina et al., 2001). També s'ha observat que el tractament amb un anticòs específic contra Ihh inhibeix la inducció de l'expressió de Runx2 i Osteocalcina en resposta a BMP (Long et al., 2004).

La regulació de l'expressió d'Ihh per part de les Smads és directa tal i com demostren Seki and Hata en el seu article (Seki and Hata, 2004). També la proteïna Gli, que és un mediador de la resposta intracel·lular induïda per Ihh regula de forma directa BMP-4 i BMP-7 unint-se als seus promotors (Kawai and Sugiura, 2001). A més s'ha observat que Shh incrementa l'acció transcripcional de Smad1 fusionada a Gal4 de llevat en cèl·lules C3H10T1/2 que és una línia de cèl·lules mesenquimals pluripotencials (Spinella-Jaegle et al., 2001).

2.6 Les Smads com a factors de transcripció

A més de transduir el senyal des dels receptors fins al nucli, les R-Smads i la Co-Smad actuen com a factors de transcripció. Normalment les Smads actuen formant part de complexos de nucleoproteïnes que consisteixen, a més de les Smads pròpiament, en altres factors de transcripció, elements d'ADN d'unió a les Smads i co-activadors transcripcionals.

INTRODUCCIÓ

Les Smads tenen poca força intrínseca per unir-se a l'ADN i s'uneixen a les seves respectives seqüències d'unió de forma menys afí que la majoria de factors de transcripció. S'ha observat que sovint les Smads aprofiten la major afinitat per l'ADN dels factors amb els quals s'acomplexen per unir-se conjuntament a les regions promotores dels seus gens diana comuns. Per aquest motiu és freqüent que una seqüència d'unió a l'ADN per un factor que interacciona amb les Smads estigui proper a un lloc d'unió a l'ADN per Smad permetent la unió conjunta d'ambdós components del complex a l'ADN (Feng and Derynck, 2005).

El lloc d'unió a l'ADN per Smad3 i Smad4 és la seqüència palindròmica 5'-GTCTAGAC-3', (Zawel et al., 1998) la meitat d'aquesta seqüència és la caixa SBE (Smad Binding Element) 5'-GTCT-3' (Shi et al., 1998). Aquesta interacció inclou ponts d'hidrogen de la Smad amb els 2 nucleòtids de Guanina del SBE.

Paral·lelament a la seqüència SBE es caracteritza una seqüència anomenada caixa CAGA, i la importància de les bases limítrofes a aquesta. Concretament es descriu que la seqüència 5'-AGCCAGACA-3' és més eficient unint Smad4 que 5'-AGACAGACA-3' (Dennler et al., 1998). En l'article de Zawel et al, s'havia descrit que la seqüència 5'-AGACA-3' uneix Smad3 i Smad4 (Zawel et al., 1998).

La seqüència CAGA és complementària a la seqüència SBE i en alguns treballs es consideren equivalents. Tot i això, altres treballs demostren que ambdues seqüències tenen un paper diferent. S'ha descrit que un *reporter* luciferasa pel motiu SBE pot ser activat tant pel receptor ALK1ca com pel receptor ALK5ca, mentre que un altre *reporter* luciferasa pel motiu CAGA només pot ser activat pel receptor ALK5ca però no per ALK1ca en cèl·lules endotelials (Goumans et al., 2002).

Com hem vist al capítol de receptors, ALK5 activa les Smads 2 i 3 i ALK1 les Smads 1 i 5. Així doncs, s'ha proposat que la caixa CAGA és específica per les R-Smads 2 i 3 mentre que la seqüència SBE és polivalent per totes les R-Smads. A part de la diferent afinitat per les R-Smads activades per BMP o TGF β , en general està força acceptat que la seqüència consens que uneix millor a la Smad cooperadora (Smad4) és 5'-CAGAC-3' (Dennler et al., 1998).

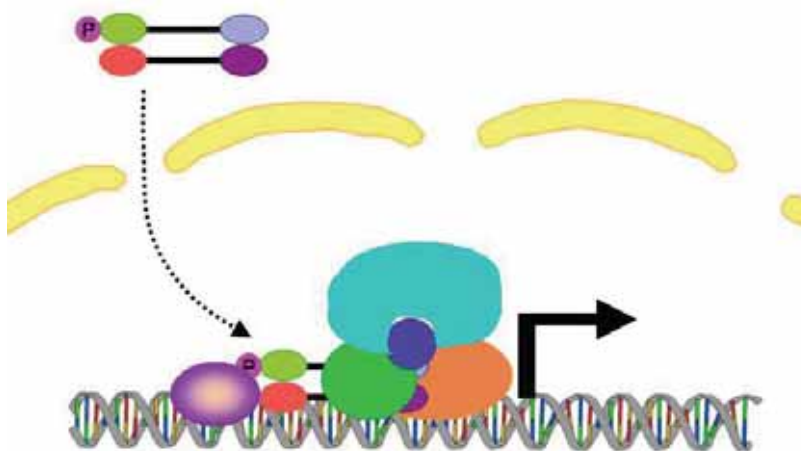


Figura14 Representació de l'entrada d'un heterodímer de smads al nucli on s'uneix amb altres factors per transcriure gens diana específics.

INTRODUCCIÓ

En absència d'un factor de transcripció adjuvant que interaccioni amb les Smads i que s'uneixi a l'ADN en un lloc adjacent al SBE, són necessaris diversos llocs SBE perquè la resposta sigui efectiva. El lloc SBE pot incrementar també l'afinitat de l'altre factor pel seu lloc d'unió a l'ADN, com és el cas de Sp1 i c-Jun quan interactuen amb Smad3 (Feng et al., 2000; Qing et al., 2000).

Smad1 i el seu homòleg de *Drosophila* Mad poden unir-se a la seqüència SBE, però tenen major afinitat per la seqüència GCCG, anomenada BRE (BMP Responsive Element) que dona especificitat per la resposta a BMP. La seqüència consensus completa és 5'GCCGnCGC3' tot i que s'ha observat unió de Smad1 a diferents variacions d'aquesta seqüència (Kim et al., 1997; Korchynskyi and ten Dijke, 2002; Kusanagi et al., 2000).

En cèl·lules no estimulades, Smad1 i Smad5 es troben al citoplasma i als microtúbuls. Després de l'activació dels receptors per part de les BMP, les Smads 1 i 5 fosforilades en el seu extrem carboxi-terminal transloquen al nucli junt amb la Smad4 (Canalis et al., 2003).

La Smad2 no pot unir-se a l'ADN així que s'ha postulat que s'hi uneix formant complexos amb la Smad4. Tot i així s'ha identificat un splicing alternatiu de Smad2 que s'ha hipotetitzat que sí li permetria unir-se a l'ADN i participar en la resposta a les Activines (Yagi et al., 1999).

2.6.1 Interaccions de les Smads i altres factors de transcripció:

Les Smads s'uneixen físicament a un gran nombre de factors de transcripció. Aquestes interaccions poden ser tant a través del seu domini MH1 com MH2, depenent del cas. L'activació d'altres vies de senyalització també influeix en aquestes unions. Aquesta versatilitat explica la complexitat i la dependència del context cel·lular així com la varietat de regions d'ADN on es poden unir els complexos formats per les Smads. A continuació revisaré alguns factors que s'uneixen a les Smads implicades en la resposta a les BMPs.

-Dlx1-Smad4: Dlx1 interacciona amb Smad4 i bloqueja senyals de proteïnes TGF β en l'hematopoiesi i probablement també la neurogènesi (Chiba et al., 2003).

-Hoxc-8-Smad1: Smad1/4 interacciona amb Hoxc-8 i evita que aquest s'uneixi a l'homeodomini del promotor de la *osteopontina*, així evita la repressió transcripcional d'aquest gen i permet la resposta de la *osteopontina* a les BMP (Shi et al., 1999).

-Receptor d'estrogens-Smad1/3/4: Smad4 pot unir-se al receptor nuclear d'estrogens E α i reprimir així la resposta a andrògens (Wu et al., 2003). L'estrogen indueix la interacció entre el receptor i la Smad1 per inhibir l'activitat Smad (Yamamoto et al., 2002) tot i que aquesta interacció encara està poc caracteritzada.

-Runx-Smad1/2/3/5: Els gens de la família Runx cooperen amb Smad3. Runx1 i Runx3 s'uneixen al promotor del gen IgCa en seqüències adjacents a un SBE i cooperen amb Smad 3 i 4 per induir transcripció en resposta a TGF β (Zhang et al., 2000). Per altra banda, la cooperació de Smad 3 i 4 amb Runx2 comporta la repressió de l'activitat de

INTRODUCCIÓ

Runx2 en el promotor de l'*osteocalcina* en cèl·lules mesenquimals, és a dir a la repressió de gens osteogènics (Alliston et al., 2001).

-GATA-Smad1: Els factors de transcripció GATA, que regulen la diferenciació cel·lular, interaccionen amb les proteïnes Smad i modulen la resposta a les BMP. Smad1 interacciona amb GATA 4, 5 i 6 per regular la transcripció dels gens de *smad7* (Benchabane and Wrana, 2003) i *nkx2.5*, un gen essencial per a la diferenciació dels cardiomiocits (Brown et al., 2004).

-YY1-Smads 1, 2, 3 i 4: YY1 és un factor de transcripció que conté dits de zinc i que té la capacitat d'interaccionar amb les Smads 1 i 4. Depenent del tipus cel·lular i dels gens diana, YY1 pot actuar com a repressor o bé com a activador en la via de senyalització de BMP. En el cas del promotor de *nkx2.5*, YY1 coopera amb BMP en la formació de les cèl·lules cardíques. YY1 també pot interactuar amb les Smads 2 i 3 amb conseqüències biològiques diferents (Kurisaki et al., 2003)

-GATA-YY1-Smad1: Per tal de regular el promotor de *nkx2.5*, les proteïnes GATA i YY1 han d'interaccionar. Així doncs, un complex que conté Smads, YY1 i GATA regula a *nkx2.5* en resposta a BMP (Lee et al., 2004). YY1 i GATA també interaccionen amb Smad3 en resposta a TGF β (Blokzijl et al., 2002).

-Sp1-Smad 2 i 4: Les proteïnes Sp són factors de transcripció que es caracteritzen per unir-se a l'ADN mitjançant dits de zinc. Sp1 actua com a coactivador induint la transcripció de p15^{Ink4B} i p21^{Cip1}. S'ha descrit que Sp1 s'associa a través d'un domini ric en glutamina amb Smad 2, 3 i 4 (Feng et al., 2000; Pardali et al., 2000). En la via de TGF β la interacció amb Sp1 intervé en la transcripció de gens com l'*a2(I) col·lagen*, la *integrina β 5*, la smad inhibidora *smad7* i el gen *pai1*.

- β -catenina-Smad1/2/3/4 i Lef1/TCF Smad1/2/3/4: En el promotor del gen *myc*, que conté llocs d'unió per Smad i TCF, BMP pot induir la interacció de Smad1 amb β -catenina i TCF4 per estimular la transcripció de *myc* (Hu and Rosenblum, 2005). La interacció entre aquests factors s'ha demostrat que regula altres gens implicats en el desenvolupament (Hussein et al., 2003; Lei et al., 2004).

La BMP-2 atenua la senyalització per la via canònica de Wnt a través de la formació de complexos entre Dvl-1 i Smad1, resultant en una disminució en els nivells de β -catenina nuclear (Liu et al., 2006).

La cooperació d'Activina i Wnt en la senyalització que porta a la diferenciació cel·lular deriva d'interaccions entre les Smads i els efectors de la via de Wnt. La senyalització de la via Wnt és mediada per les proteïnes LEF1 o TCF (que contenen la caixa HMG) i el seu coactivador β -catenina. Smad3 i Smad4 poden associar-se i cooperar amb LEF1/TCF en el promotor del gen *twin* a *Xenopus* (Labbe et al., 2000; Nishita et al., 2000).

Smad 2 i 3 també interaccionen amb l'Axina, un regulador negatiu de la via de Wnt. TGF β indueix la dissociació del complex Smad3/Axina i això permet a l'Axina potenciar la senyalització de TGF β /Smad3 (Furuhashi et al., 2001).

INTRODUCCIÓ

-NICD-Smad1/3: Notch és un receptor que senyalitza a través d'endocitació de la seva regió extracel·lular i l'alliberament de la porció anterior, la qual arriba fins al nucli on interacciona amb CSL/RBP-J κ que és un repressor. La presència de NICD allibera els gens de la repressió i en permet la transcripció. TGF β i BMP regulen l'expressió de gens de la via Notch de diferents maneres. En el cas de TGF β a través de l'activació de Smad3 i en el cas de les BMP a través de l'activació de Smad1. Ambdues R-Smads interaccionen amb NICD (Blokzijl et al., 2003; Dahlqvist et al., 2003; Itoh et al., 2004; Zavadil et al., 2004). La interacció Smad1-NICD és estabilitzada per l'associació amb els coactivadors p300/CBP i P/CAF (Itoh et al., 2004).

L'efecte d'aquesta regulació depèn del context cel·lular. En la miogènesi, l'expressió de Hes i Hey1 de la via Notch és necessària per la inhibició de la diferenciació provocada per TGF β /BMP, és a dir que ambdues vies cooperen (Blokzijl et al., 2003; Dahlqvist et al., 2003) mentre que en cèl·lules endotelials l'expressió de Herp2 en resposta a Notch inhibeix la migració cel·lular induïda per Id1 que és activada per BMP (Itoh et al., 2004) és a dir que ambdues vies tenen un efecte antagònic.

-P53-Smad2/4: La senyalització de la via TGF β també sinergitza amb la proteïna supressora de tumors p53 que regula la proliferació cel·lular, l'apoptosi i la diferenciació. La senyalització per les vies de TGF β i BMP provoca la formació d'un complex p53-Smads que activa la transcripció de gens diana amb diferents llocs d'unió tant per p53 com Smad (Cordenonsi et al., 2003; Takebayashi-Suzuki et al., 2003).

-NF- κ B i Smad3: La senyalització de la via TGF β pot cooperar amb NF- κ B a través de la interacció de Smad3 amb la subunitat p52 de NF- κ B en llocs d'unió a l'ADN adjacents per NF- κ B i Smads (Lopez-Rovira et al., 2000). Donat que tant NF- κ B com les R-Smads interaccionen amb CBP/p300, la seva cooperació comporta un increment en el reclutament de CBP/p300.

2.6.2 Coactivadors i corepressors de les Smads

Coactivadors:

Les interaccions de les Smads amb els coactivadors CBP/p300 permeten que el complex incrementi l'activitat transcripcional dels factors que el componen, facilitant la interacció amb el complex de la ARN-polimerasaII (Derynck and Zhang, 2003; Shi and Massague, 2003).

CBP i p300 tenen activitat Histona Acetil-Transferasa que els hi permet modificar l'estructura de la cromatina. Les R-Smads interaccionen amb p300 o CBP a través del seu domini MH2, en aquests complexos la Smad4 actua com a coactivadora estabilitzant la unió de les R-Smads amb CBP/p300 (Feng et al., 1998).

La proteïna MSG1 que interacciona amb p300/CBP pel seu domini C-terminal i amb el domini MH2 de Smad4 pel seu domini N-terminal, pot incrementar la capacitat transactivadora de les Smads (Shioda et al., 1998). També GCN5, que és una proteïna associada a p300/CBP, pot unir-se a les R-Smads tant de la via de TGF β com de BMP i incrementar-ne el potencial transactivador (Kahata et al., 2004).

INTRODUCCIÓ

PCAF, ARC 105 i Swift són altres coactivadors específics per la via de TGF β però no per la via de les BMP.

Corepressors:

Diversos proto-oncogens com *c-ski*, *c-myc* i *evi-1* reprimeixen la senyalització de TGF β /Smad en les cèl·lules tumorals. c-Ski, a més, interacciona amb la via de BMP, interromp la interacció de les R-Smads amb Smad4 i recluta els corepressors N-CoR o mSin3 interactuant amb histones desacetilases, reprimint l'acció de les Smads de les dues maneres (Luo et al., 1999; Wu et al., 2002).

Evi-1 és un factor de transcripció que conté dits de zinc i que reprimeix la senyalització mediada per Smads per totes les vies. Evi-1 interactua amb el domini MH2 de les R-Smads i per tant reprimeix la seva funció transactivadora. En conseqüència, Evi-1 reprimeix l'expressió gènica que és activada per l'Activina, TGF β i BMPs. L'activitat repressora de Evi-1 requereix l'associació amb el corepressor CtBP (Alliston et al., 2005; Izutsu et al., 2001; Kurokawa et al., 1998).

Un altre factor de transcripció amb dits de zinc, SIP1, interacciona amb el domini MH2 de les Smads (Postigo et al., 2003; Verschueren et al., 1999) i reprimeix la transcripció mediada per aquestes. SIP1 depèn d'un lloc d'unió a l'ADN per exercir la seva funció repressora de les Smads. S'ha descrit que SIP1 s'uneix al promotor de la *fosfatasa alcalina* per reprimir-ne l'expressió (Tylzanowski et al., 2001).

Tob és una proteïna que pertany a la família de Tob/BTG de proteïnes amb activitat antiproliferativa i participa en la regulació de la senyalització tant de la via de TGF β com de BMPs. Tob interacciona amb les Smads activades per BMP i inhibeix l'efecte estimulador en la funció dels osteoblasts i la deposició de teixit ossi. A més, Tob s'uneix a les Smads inhibidores potenciant la seva interacció amb els receptors i inhibint la senyalització de TGF β a nivell de receptor (Yoshida et al., 2000; Yoshida et al., 2003).

La inhibició de la diferenciació osteoblàstica per part de TGF β és mediada en part per la interacció de Smad3 amb Runx2. La repressió de Runx2 per part de Smad3 no requereix unió de Smad3 al receptor ni impedeix la unió de Runx2 a l'ADN. De fet, depenent de la seqüència d'ADN, Smad3 coopera o reprimeix a Runx2. En la seqüència d'unió de Runx2 al promotor de l'*osteocalcina* Smad3 té un efecte repressor, en general s'ha observat un efecte repressor en cèl·lules mesenquimals i activador en cèl·lules epitelials (Alliston et al., 2001).

En osteoblasts i altres cèl·lules mesenquimals, aquesta repressió de Runx2 per Smad3 és mediada pel reclutament de la Histona IIa desacetilasa, específicament HDAC4 i HDAC5, provocant per exemple la repressió del promotor de l'*osteocalcina* (Kang et al., 2005).

TGF β inhibeix la miogènesi mitjançant Smad3 que interacciona amb el domini HLH de MyoD i Miogenina impedit la heterodimerització amb E12/47 impedit així la seva unió a l'ADN. Smad3 també interacciona amb MEF2C que és un coactivador necessari per a la transcripció eficient dels factors de transcripció bHLH miogènics. Aquesta

INTRODUCCIÓ

interacció amb Smad3 evita que MEF2C s'associï amb el complex proteic de MyoD amb GRIP1, un coactivador de MEF2C (Liu et al., 2004a).

Smad 6 i 7, a més d'interaccionar amb els receptors de tipus I per evitar l'activació de les R-Smads, poden actuar com a factors de transcripció. Smad6 és un repressor que interactua amb el correpressor CtBP i forma complexos que han estat observats al promotor de *idl* reprimint-ne la transcripció (Lin et al., 2003).

Smad6 també pot interaccionar amb factors amb homeomini i funcionar com a corepressor (Bai et al., 2000). Smad7 pot ser acetilada per p300, el que indica que possiblement també tingui un paper dintre del nucli (Gronroos et al., 2002).

INTRODUCCIÓ

3- La diferenciació dels llinatges mesenquimals

Molts factors estan implicats en la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals, entre ells les BMPs. Aquests factors inicien les vies de senyalització que portaran a la diferenciació cel·lular mitjançant la regulació dels factors de transcripció específics de cada teixit.

Com veiem al primer punt de la introducció, les cèl·lules diferencien als diversos llinatges en un procés que inclou diversos passos, podent estar determinades per un llinatge abans d'observar-se fenotípicament.

Els principals llinatges als quals poden diferenciar les cèl·lules mesenquimals són els llinatges condrogènic, osteogènic, miogènic i adipogènic, a continuació revisaré les generalitats dels passos que les porten a diferenciar a aquests llinatges, fent especial incidència en el paper de les BMPs.

3.1-Miogènesi

Les BMP actuen com a reguladors negatius de la diferenciació muscular. La miogènesi s'inicia en el dermomiòtom dels somites, on cèl·lules expressant Myf5 o Pax3 activen a MyoD. Els senyals positius per a l'inici de la diferenciació muscular provenen principalment de Wnt, Sonic hedgehog i Noggin mentre que BMP-4 és el principal regulador negatiu d'aquesta (revisat a Palacios and Puri, 2006; figura 2 de la introducció).

La formació del múscul esquelètic durant l'embriogènesi dels vertebrats requereix la diferenciació d'un llinatge precursor mesodèrmic, l'aturada del cicle cel·lular dels mioblasts i l'activació transcripcional de molts gens estructurals del llinatge muscular. Els factors de tipus bHLH (basic helix-loop-helix) MyoD, Miogenina, Myf5 i MRF4 actuen en diferents punts de la diferenciació al llinatge miogènic per establir la identitat del mioblast i controlar la diferenciació terminal tot activant els gens estructurals musculars (revisat a Molkentin and Olson, 1996).

La combinació de diferents senyals extracel·lulars controla el patró espai-temporal d'expressió de dos d'aquests factors de la família bHLH, que són Myf5 i MyoD (Buckingham et al., 2003; Cossu and Borello, 1999; Cossu et al., 1996). Tot i que ambdós factors són necessaris per a la iniciació del programa de diferenciació muscular, només el ratolí knock-out per *myf5* resulta en una reducció de la miogènesi (Braun and Arnold, 1996).

Es considera que Myf5 pot compensar la pèrdua de MyoD en el ratolí knock-out per aquest. De totes maneres, el fenotip de pèrdua d'estructures musculars és molt més greu en el doble mutant MyoD/Myf5 produint-se la mort d'aquests ratolins poc després del naixement (Rudnicki et al., 1993). MyoD i Myf5 es troben activades en diferents subpoblacions del mesoderm i tenen la funció de reprimir l'expressió de Pax3 perquè les cèl·lules diferenciïn al miòtom, on la diferenciació muscular té lloc amb l'expressió de MRF4, MEF2 i Miogenina (revisat a Palacios and Puri, 2006).

La família Wnt també regula la miogènesi a través de la unió als receptors Frizzled, la qual provoca la repressió de GSK-3 i promou la translocació de la Beta-catenina al

INTRODUCCIÓ

nucli. En aquesta inducció hi té un paper rellevant Pax7 que s'activa per la via canònica de Beta-catenina (Cossu and Borello, 1999; Logan and Nusse, 2004; Polesskaya et al., 2003; Reya and Clevers, 2005).

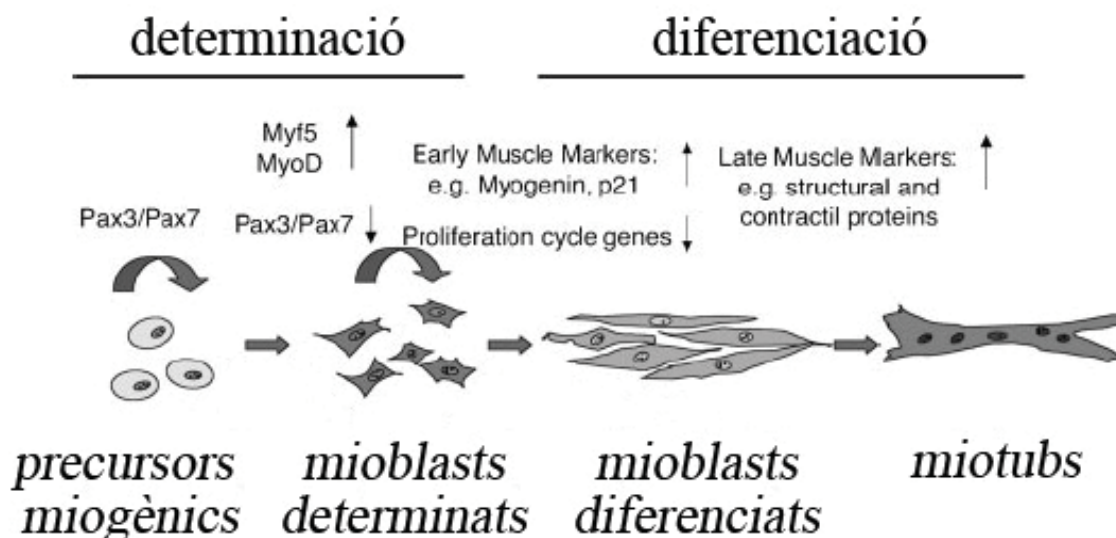


Figura 15 Principals passos i marcadors de la diferenciació mioblàstica
Palacios and Puri, J Cell Physiology, 2006

La fusió dels mioblasts comença quan aquestes cèl·lules surten del cicle cel·lular. Aquesta situació es pot reproduir *in vitro* depleccionant el medi de cultiu de factors de creixement, llavors les cèl·lules surten del cicle cel·lular, secreten Fibronectina a la matriu extracel·lular i s'uneixen entre elles a través de la Integrina $\alpha 5\beta 1$ que és receptor de la Fibronectina (Boettiger et al., 1995; Menko and Boettiger, 1987). El següent pas és l'alineament dels mioblasts en cadenes, aquest pas és regulat per les glicoproteïnes de la membrana cel·lular, entre les quals hi ha Cadherines i CAM (Knudsen et al., 1990). El tercer pas és la fusió, en la qual els ions de calci i unes metal·loproteases anomenades Meltrines són crucials. Finalment s'activa una altra proteïna bHLH, la Miogenina, que regula la diferenciació.

3.2-Adipogènesi:

El llinatge adipòs també deriva de cèl·lules mesenquimals pluripotentials i BMP, en aquest cas la BMP-4, té una importància central en el seu procés de diferenciació. Les cèl·lules precursors del llinatge adipòs diferencien seguint una sèrie de passos que veurem a continuació, en el primer d'ells les cèl·lules queden restringides al llinatge adipòs però encara no expressen els marcadors de diferenciació dels adipòcits madurs, es diu que estan determinades (Revisat a Otto and Lane, 2005).

Els adipòcits que formen el teixit adipòs deriven de preadipòcits que són reclutats de cèl·lules mesenquimals pluripotents de l'estroma vascular del teixit. El desenvolupament de les cèl·lules mesenquimals a adipòcits madurs es divideix en quatre passos: 1) Determinació al llinatge adipòs, 2) Proliferació dels preadipòcits, 3) Sortida del cicle cel·lular i 4) Diferenciació terminal.

INTRODUCCIÓ

La determinació al llinatge adipós és el resultat d'una combinació de senyals que recluten les cèl·lules mesenquimals pluripotencials que esdevenen preadipòcits. En aquest procés tenen lloc divisions cel·lulars asimètriques en les quals una cèl·lula filla roman pluripotent mentre que l'altra queda restringida al llinatge adipós (Bowers et al., 2006).

La proliferació de les cèl·lules determinades al llinatge adipós amplifica la població de preadipòcits fins que la confluència provoca l'aturada del creixement, és a dir del cycle cel·lular. En l'últim pas, la diferenciació terminal dels preadipòcits no proliferatius a adipòcits madurs és induïda per una combinació de senyals. Una expansió clonal mitòtica amplificarà la població d'adipòcits madurs. Així doncs, la determinació d'una sola cèl·lula al llinatge adipós pot portar a la producció d'un gran nombre d'adipòcits madurs (Bowers et al., 2006).

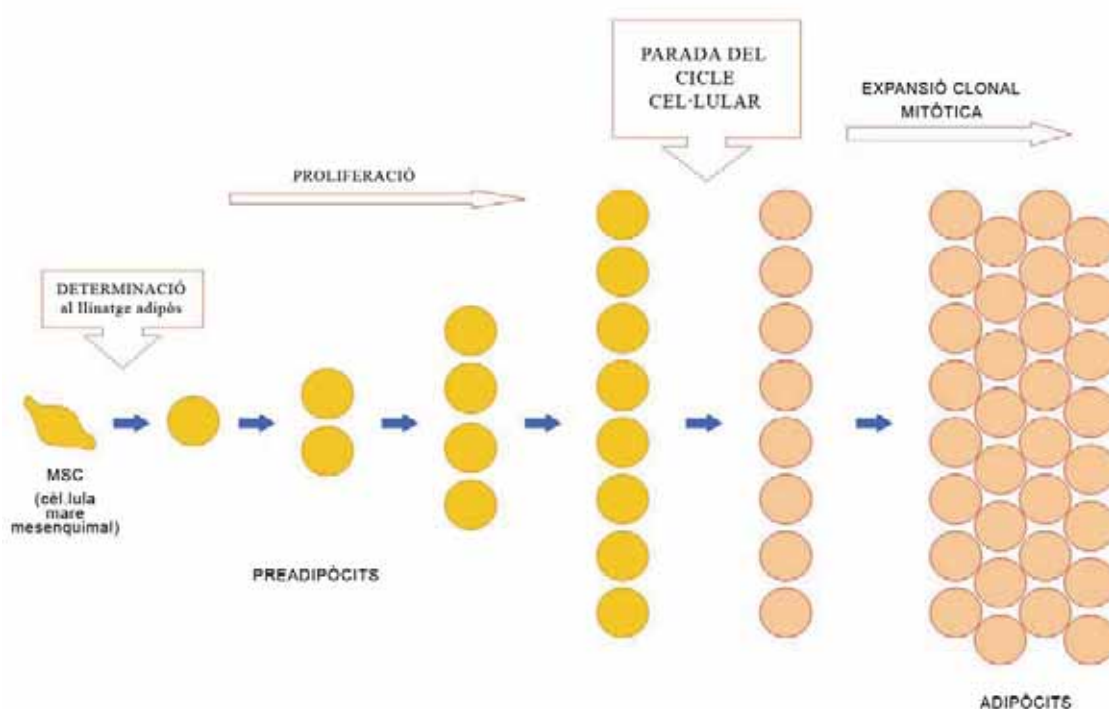


Figura 16 Passos principals de la diferenciació al llinatge adipocític. Adaptació de la figura de Bowers and Lane, *Cell cycle* 2007

Després del tractament de cèl·lules pluripotents C3H10T1/2 amb BMP-4 durant el període de proliferació post-confluència, aquestes comencen a expressar marcadors del llinatge adipós com triglicèrids citoplasmàtics i l'expressió de C/EBP α i PPAR γ . A més, quan s'afegeixen inductors de la diferenciació, el nombre de cèl·lules augmenta dràsticament, produint-se expansió clonal mitòtica (Tang et al., 2004).

El mateix experiment utilitzant BMP-2 no resultà en diferenciació al llinatge adipós de les cèl·lules C3H10T1/2, deixant clar un rol diferent per BMP-2 i BMP-4 en la diferenciació als diferents llinatges derivats de les cèl·lules mesenquimals.

Per comprovar aquest efecte *in vivo*, cèl·lules C3H10T1/2 prèviament tractades amb BMP-4 foren implantades en ratolins atímics. Les cèl·lules implantades es diferencien a un teixit indistingible del teixit adipós de l'epidídim del mateix animal. En el mateix

INTRODUCCIÓ

experiment dut a terme amb cèl·lules C3H10T1/2 que no havien estat tractades amb BMP-4 no es donà diferenciació al llinatge adipós (Tang et al., 2004).

Nombrosos gens de la via Wnt estan activats en la diferenciació inicial al llinatge adipogènic (Bowers and Lane, 2008). No obstant, la inhibició de la via canònica de Wnt potencia la diferenciació terminal dels preadipòcits, desprenent-se d'aquestes observacions que la via Wnt pot ser un regulador positiu dels preadipòcits però sembla regular negativament la diferenciació terminal al llinatge adipós. S'ha demostrat que les cèl·lules osteoblàstiques secreten factors paracrins que inhibeixen l'adipogènesi. Per exemple Wnt10b, el qual és un activador de la diferenciació osteoblàstica, inhibeix l'adipogènesi (Bennett et al., 2005; Ross et al., 2000; Zhou et al., 2008).

Altres factors implicats en la diferenciació terminal dels adipòcits són insulina, IGF-1, els glucocorticoids i AMPc (Amri et al., 1986; Smith et al., 1988; Spiegelman and Green, 1980; Student et al., 1980). L'activitat mitòtica també sembla ser imprescindible per a l'inici de l'adipogènesi, doncs la disrupció de la senyalització de C/EBP β inhibeix l'expansió clonal mitòtica i en conseqüència l'adipogènesi (Tang et al., 2003a; Tang et al., 2003b; Zhang et al., 2004).

3.2.1 Regulació transcripcional de l'adipogènesi

La família C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) conté un domini bZIP (basic region/leucine zipper) que li permet unir-se a l'ADN i formar homodímers o heterodímers amb els altres membres d'aquesta família. També s'ha descrit la capacitat de membres de la família C/EBP de formar heterodímers amb membres de la família Smad (revisat a Nerlov, 2008).

C/EBP β i C/EBP δ són els factors implicats en els primers passos de la diferenciació al llinatge adipogènic. Tot i la seva expressió bastant primerenca, aquests factors no poden unir-se a l'ADN fins que la cèl·lula entra en la fase S, d'aquí la importància de mantenir l'activitat mitòtica per la diferenciació inicial al llinatge adipós (Tang and Lane, 1999), en aquesta etapa de l'adipogènesi els adipòcits es repliquen per expansió clonal mitòtica. C/EBP β i C/EBP δ activen un altre membre de la família, C/EBP α , el qual intervé en l'aturada de l'expansió mitòtica dels pre-adipòcits i en la transcripció de nombrosos gens específics de l'adipogènesi. C/EBP β i C/EBP δ també són responsables d'activar PPAR γ (Wu et al., 1995).

La família de receptors nuclears PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) pot interaccionar amb l'ADN a través del receptor Retinoid X. L'heterodímer s'uneix directament a l'ADN i pot interactuar amb diversos coactivadors i corepressors (Francis et al., 2003). PPAR γ és un regulador clau de l'adipogènesi, s'indueix durant la diferenciació al llinatge adipós i és responsable de l'activació de molts gens involucrats en l'adipogènesi tals com *lipoprotein lipasa* (Schoonjans et al., 1996), *acyl coenzima A sintasa* (Schoonjans et al., 1995) o *fosfoenolpiruvat carboxiquinasa* (Tontonoz et al., 1994). Els lligands de PPAR γ inclouen àcids grassos i derivats. Existeixen diferents isoformes de PPAR γ (PPAR γ_1 , PPAR γ_2 i PPAR γ_3) totes elles s'expressen en el teixit adipós.

La família SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) són factors de transcripció que contenen el domini bHLH-leucine zipper, que regulen la transcripció de

INTRODUCCIÓ

molts gens que són importants en el metabolisme del colesterol i els àcids grassos. S'han identificat 3 membres de la família (SREBP-1a, SREBP-1c i SREBP-2). Els membres d'aquesta família s'expressen com a proteïnes precursors que romanen unides al reticle endoplasmàtic fins que es donen baixos nivells de colesterol, moment en el qual s'alliberen i es transloquen en l'aparell de Golgi, on són processades abans de ser alliberades i viatjar al nucli, on participen en la transcripció de *ppary* i de gens implicats en la síntesi de triacilglicerol i també en la síntesi, desaturació i captació d'àcids grassos.

Al mateix temps, el teixit adipós i el teixit ossi estan en contacte regulant-se mútuament en l'organisme adult. La Leptina, una hormona produïda pels adipòcits, és un regulador de la massa òssia. Els ratolins que perden la Leptina (*ob/ob*) o el seu receptor (*db/db*) són obesos, estèrils i tenen una elevada reabsorció òssia (Ducy et al., 2000a), també en pacients lipodistròfics s'ha descrit un excés d'activitat dels osteoblasts (Elefteriou et al., 2004).

La Leptina no actua directament sobre els osteoblasts sinó que actua sobre l'hipotàlam, el qual regula la remodelació de l'os per dues vies antagòniques (revisat per Karsenty, 2006). Una via és la regulació del sistema nerviós autònom simpàtic que actua sobre el receptor $Ad\beta_2$ dels osteoblasts, tal com indica l'elevada formació d'os que no pot ser compensada per perfusió de Leptina en els ratolins knock-out per aquest receptor. La cascada *downstream* d' $Ad\beta_2$ provoca la inhibició de la proliferació dels osteoblasts i l'activació de RANKL, la molècula responsable de la diferenciació dels osteoclasts i per tant, indirectament, de la reabsorció òssia.

Per altra banda, la Leptina activa el gen *cart* (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) de l'hipotàlam, que per mecanismes desconeguts provoca que els osteoblasts expressin menys RANKL i per tant es diferenciïn menys osteoclasts i hi hagi menys reabsorció òssia.

Per completar el cicle, recentment s'ha descobert que l'os també regula al teixit adipós: l'Osteocalcina, una proteïna secretada exclusivament per osteoblasts, regula negativament la formació de teixit adipós així com el metabolisme energètic mitjançant l'activació de la Insulina i de la citoquina Adiponectina. Per altra banda, els ratolins knock-out per un altre gen dels osteoblasts, la proteïna tirosina fosfatasa OST-PTP són hipoglicèmics i estan protegits contra l'obesitat. S'ha proposat que OST-PTP i Osteocalcina, ambdues proteïnes expressades en osteoblasts, tenen efectes contraris (Lee et al., 2007). Aquest és un exemple de la interacció fisiològica entre les proteïnes secretades per diferents teixits que demostra la importància d'estudiar certs fenòmens *in vivo* en animals.

INTRODUCCIÓ

3.3 La diferenciació de l'os

3.3.1 La formació del patró de l'esquelet

Dins de l'esqueletogènesi, cal distingir entre dos processos que estan relacionats però són diferents: La formació del patró dels ossos i la formació del teixit ossi, que és coneguda com a osteogènesi. En general es tracta de processos independents tot i que s'ha trobat algun element regulador comú com el factor *Satb2* que reprimeix l'expressió de *hoxa2*, que intervé en la formació del patró de l'esquelet, al mateix temps que activa *runx2*, un gen clau en l'osteogènesi (Dobrevá et al., 2006; Karsenty and Wagner, 2002).

Hi ha un gran nombre de molècules senyalitzadores que tenen un paper central en el control del desenvolupament esquelètic tals com les BMPs, TGF β , FGF, Wnt o Hedgehog. Com hem vist en l'anterior apartat, també la Leptina, que és una hormona, relaciona el metabolisme, el sistema nerviós simpàtic i el desenvolupament de l'os (Nakashima and de Crombrughe, 2003; Takeda et al., 2002).

Les BMPs intervenen tant en l'osteogènesi com en l'esqueletogènesi. En el nostre cas ens centrarem en el paper de les BMP en l'osteogènesi, doncs és el nostre camp d'estudi, tot i que per contextualitzar aquest procés tot seguit veurem alguns aspectes de la formació del patró de l'esquelet.

Els rol dels gens *hox* en la formació del patró de l'esquelet ha estat intensament estudiat (Kmita and Duboule, 2003). La funció general dels factors de transcripció Hox és donar identitat regional a les cel·lules al llarg dels eixos del cos, un aspecte destacat dels gens *hox* és que s'organitzen en grups de paràlegs formats normalment per quatre membres. Així per exemple, eliminant la funció dels paràlegs *hox10* les vèrtebres lumbar es transformen en toràciques (Wellik and Capecchi, 2003). En humans s'han identificat 39 gens *hox* organitzats en quatre clusters compostos per 13 gens paràlegs amb altres gens *hox* dels altres clusters respectivament (Li and Cao, 2006).

Els factors de transcripció Hox controlen la formació del patró antero-posterior del cos durant el desenvolupament embrionari, tots els membres d'aquesta família presenten homeodominis. El fet que *Hoxc8*, *Hoxa9* i *Hoxa13/d13* interaccionin amb les proteïnes Smad suggereix la possibilitat de que actuïn *downstream* de BMP o TGF β (Liu et al., 2004b; Shi et al., 1999; Williams et al., 2005).

Les mutacions dels gens *hox* normalment donen lloc a múltiples defectes en l'esquelet. Per exemple, els ratolins mutants per *hoxa2* presenten transformacions homeòtiques dels ossos del crani i també defectes en la condrogènesi afectant l'expressió de *Sox9* i *Runx2*. També els mutants per *Hoxc8*, *Hoxd4* o *Hoxa11* presenten defectes severes en l'esquelet (Li and Cao, 2006).

Hi ha un gran nombre d'estudis que relacionen la família Hox i les BMPs, la interacció es dona de dues maneres: *Hoxc8* i *Hox13* interaccionen amb les Smads en els complexos de transcripció (Shi et al., 1999; Williams et al., 2005). A un altre nivell, l'expressió dels gens *hox* i els gens induïts per les BMPs es regulen mútuament; BMP-2 indueix l'expressió ectòpica de *Hoxd11* i *Hoxd13* en el mesènquima de les extremitats anteriors i *Hoxa13* en la regió anterior de la massa muscular de les extremitats, mentre que els seus antagonistes *Noggin* i *Chordin* inhibeixen aquesta expressió (Hashimoto et

INTRODUCCIÓ

al., 1999; Hirsinger et al., 1997). Per altra banda, *Hoxa13* i *Hoxd13* poden activar el promotor de *bmp4* i d'aquesta manera induir la formació de cartílag determinant el patró de l'esquelet (Suzuki et al., 2003).

3.3.2 Mecanismes d'ossificació

La formació de l'esquelet en vertebrats té lloc per 2 mecanismes diferents: l'ossificació intramembranosa i l'ossificació endocondral. Tal i com hem vist en el primer punt de la introducció, la primera només es dona en algunes cèl·lules mesenquimals derivades de la cresta neural, mentre que la segona es dona tant en les cèl·lules mesenquimals que provenen de la cresta neural com en les derivades del mesoderm; més del 95% de l'esquelet dels vertebrats està format per ossificació endocondral. Ambdós tipus d'ossificació s'inicien per senyals que proveeixen informació de patró al mesènquima per generar els primordis de cada element del futur esquelet. Aquests senyals indiquen la situació de cada primordi en tres dimensions (Johnson and Tabin, 1997; Tickle, 1995).

La condensació és el primer estadi del desenvolupament esquelètic i té lloc quan una població de cèl·lules mesenquimals s'agreguen facilitant la regulació selectiva de gens específics (Hall and Miyake, 2000). Les condensacions s'han de cenyir a un tamany crític i les cèl·lules han d'interactuar dins de la condensació tant per proliferar com per aturar el creixement. Aquests processos estan regulats per BMP-2 i BMP-4 (Hall and Miyake, 1995). La sobreexpressió d'aquests factors en embrions de pollastre causa grans increments de tamany i malformacions esquelètiques (Wu et al., 2007).

El destí d'aquests primordis mesenquimals varia segons si es tracta d'ossificació intramembranosa o endocondral. En el primer cas, les cèl·lules de les condensacions mesenquimals diferencien directament a osteoblasts, mentre que en el cas de l'ossificació endocondral diferencien a condrocits que formen els cartíl·lacs que seran substituïts per os més endavant (Erlebacher et al., 1995).

Tant en l'ossificació intramembranosa com en l'ossificació endocondral els osteoblasts tenen un paper central, doncs produeixen la matriu extracel·lular i la seva mineralització i també regulen els osteoclasts i l'homeostasi de calci a la sang (Nakashima and de Crombrughe, 2003). Els osteoblasts que participen en l'ossificació d'un o altre tipus són fenotípicament indistingibles entre ells (Ducy et al., 2000b; Fang and Hall, 1997) tot i que s'han observat diferències en la composició de la matriu que secreten (Abzhanov et al., 2007).

INTRODUCCIÓ

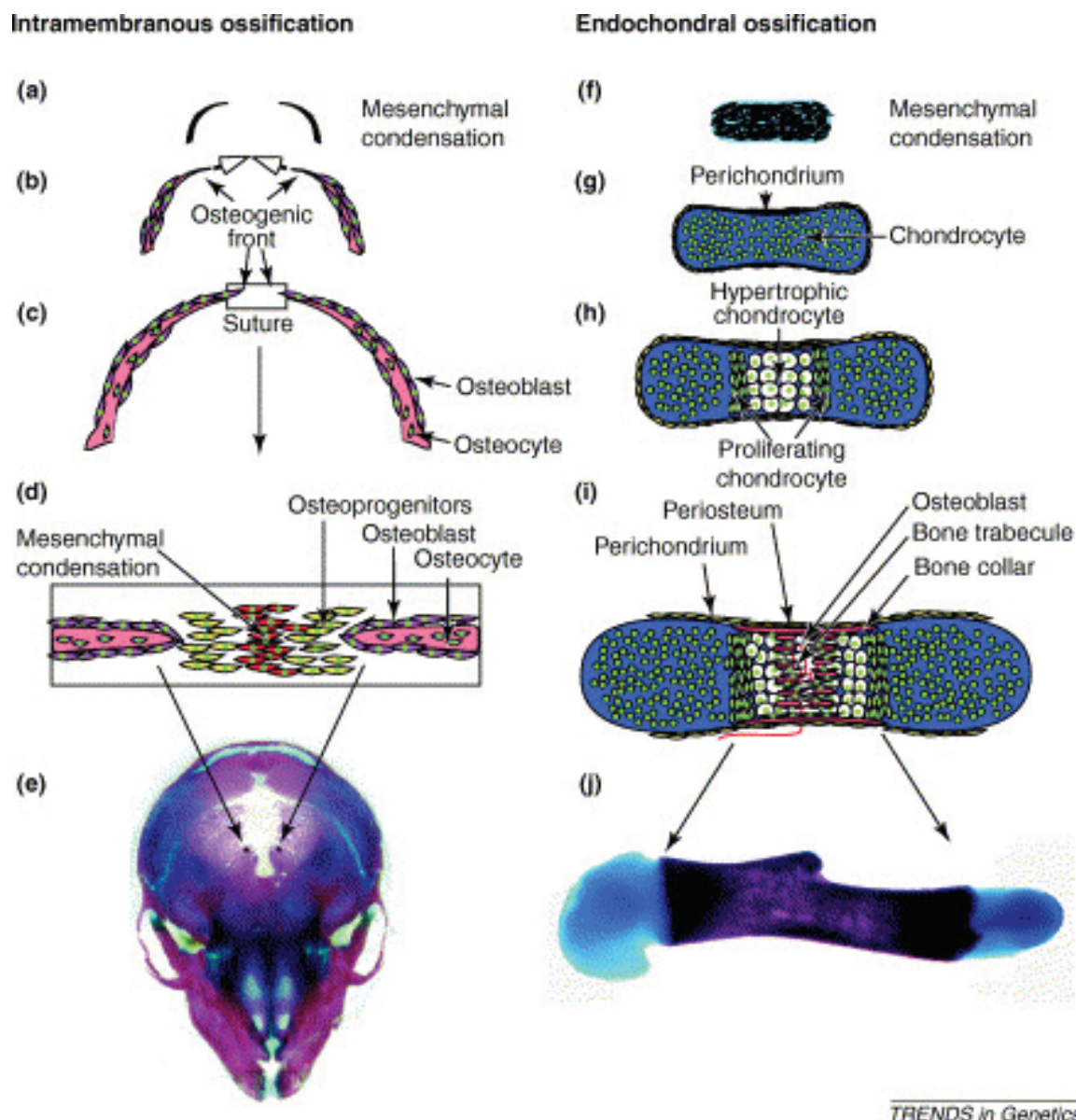


Figura 17: Principals passos de l'ossificació intramembranosa i l'ossificació endocondral en ratolí. Les figures (e) i (l) són un crani i un fúmur tenyits amb Vermell d'Alizarina que tenyeix la matriu òssia mineralitzada i Blau Alcian que tenyeix proteoglicans sulfatats específics de cartílag. Extret de Nakashima i de Crombrughe 2003.

3.3.3 Mecanismes de formació del cartílag i de l'os

S'ha proposat que condrocits i osteoblasts deriven d'un llinatge progenitor comú que pot diferenciar a ambdós llinatges cel·lulars (Fang and Hall, 1997). Durant la substitució del cartílag per os, una part del cartílag no és substituït i roman a llocs com el nas, les orelles, la gola, els discs intervertebrals o les articulacions, només en aquest últim cas es coneixen alguns dels mecanismes que permeten la permanència del cartílag.

El crani és la regió del cos on la formació de l'os és més complexa. Els primers elements de l'esquelet que apareixen durant el desenvolupament del crani són estructures cartilaginoses, evolucionades a partir de modificacions d'elements ancestrals de vertebrats més primitius, col·lectivament conegudes com a condrocrani. Part del

INTRODUCCIÓ

condrocrani dóna lloc a l'esquelet que circumda el nas, els ulls, l'oïda interna i la base del cervell, el qual és conegut com a neurocrani. El condrocrani derivat dels arcs branquials dóna lloc a bona part de l'esquelet facial i és conegut com a esplanocrani. Un tercer component del crani apareix més tard i aquest és el que, a diferència dels anteriors, s'origina per ossificació intramembranosa, és conegut com a dermatocrani (Erlebacher et al., 1995).

A part del condrocrani, l'ossificació endocondral té lloc en la majoria d'ossos de l'esquelet, principalment en la formació dels ossos llargs. L'ossificació endocondral és un procés amb múltiples passos, el primer d'ells consisteix en que les cèl·lules de les condensacions mesenquimals diferencien a condrocits, els quals sintetitzen proteïnes que formaran la matriu extracel·lular específica del cartílag que expressa marcadors específics com l'Agrecà o el Col·lagen $\alpha 1(\text{II})$. Aquestes cèl·lules formaran la placa de creixement dels ossos endocondrals, que és el motlle de cartílag que més endavant serà substituït per os (Erlebacher et al., 1995).

En els ossos llargs, els condrocits es comprimeixen constituint el centre primari d'ossificació i proliferen cap als extrems, que s'anomenen epífisis, constituint dos fronts que s'allunyen en sentit oposat. Mentre els condrocits del centre del motlle de cartílag hipertroficien, els dels extrems continuen proliferant i el motlle continua creixent, sempre seguint la mateixa dinàmica des del centre (que s'anomena diàfisi) cap a les epífisis; aquest procés és el responsable del creixement longitudinal dels ossos.

Les cèl·lules de la cua de l'avenç diferencien a condrocits prehipertrofics i després a hipertrofics. Els condrocits hipertrofics secreten una matriu extracel·lular que es caracteritza per contenir Col·lagen $\alpha 1(\text{X})$ que mineralitza i allibera factors que modulen la correcta distribució espai-temps dels condrocits de la placa de creixement. Finalment, els condrocits hipertrofics aturen el cicle cel·lular i entren en apoptosi alliberant factors com VEGF que promouen la invasió de vasos i osteoblasts (Revisat a Karsenty and Wagner, 2002 i Yoon and Lyons, 2004).

Quan la placa de creixement queda establerta apareix el pericondri, una estructura especialitzada consistent en capes de cèl·lules mesenquimals que envolten el cartílag. Al centre dels elements esquelètics, on el pericondri limita amb els condrocits hipertrofics, les cèl·lules mesenquimals que el formen diferencien a osteoblasts (Kronenberg, 2003). Aquests osteoblasts són els que envaeixen la matriu mineralitzada del cartílag junt amb vasos sanguinis i osteoclasts (Vu et al., 1998).

Els osteoclasts deriven de les cèl·lules hematopoiètiques i coexisteixen en l'os amb els osteoblasts permetent un equilibri dinàmic entre la síntesi i la destrucció del teixit ossi. Els osteoclasts també són importants en la formació de l'os perquè degraden la matriu del cartílag i els remanents d'aquesta matriu serveixen de punt de suport perquè els osteoblasts ocupin aquests espais i els reomplin amb matriu òssia. Al mateix temps, els osteoblasts del periosti produeixen una matriu cel·lular que constituirà el "bone collar".

Les vies paral·leles de diferenciació als llinatges condrocític i osteoblàstic, amb tots els seus passos, han d'estar exquisidament coordinades durant l'ossificació endocondral. El pas final de la diferenciació condrocítica és la mort dels condrocits hipertrofics. Aquest punt té lloc en conjunció amb la degradació de la matriu extracel·lular del cartílag i la

INTRODUCCIÓ

substitució dels condrocits morts per osteoblasts, els quals dipositen una nova matriu (Nakashima and de Crombrughe, 2003)

Al mateix temps, les cel·lules mare hematopoiètiques interaccionen amb l'estroma per establir la medul·la òssia que donarà lloc a la producció de cel·lules hematopoiètiques durant la vida adulta (Kronenberg, 2003).

La família de citoquines BMP té la capacitat de promoure tant la formació de cartílag com d'os, regulant directament l'expressió de molts gens específics implicats tant en la diferenciació osteoblàstica com condroblàstica (Wozney, 1989; Yoon and Lyons, 2004).

Les BMPs intervenen en la diferenciació condroblàstica, doncs s'ha demostrat experimentalment que poden diferenciar cel·lules C3H10T1/2 al llinatge condrogènic quan són cultivades a elevada confluència (Denker et al., 1999; Haas and Tuan, 2000; Ju et al., 2000; Majumdar et al., 2001). La confluència mimetitzava l'efecte de l'hipertrofia dels condrocits. Un mecanisme pel qual BMP induïx la condrogènesi és l'activació de la N-cadherina, promovent així la interacció cel·lula-cel·lula (Revisat a Yoon and Lyons, 2004).

Les BMPs intervenen en la formació del motlle de cartílag interactuant amb la via de Ihh/PTHrP. Ihh (Indian hedgehog) manté els condrocits en la fase proliferativa mitjançant l'activació de PTHrP (Parathyroid Hormone-related Peptide), el qual inhibeix a Ihh retroactivament. El PTHrP és expressat en les cel·lules del pericondri, als extrems del motlle i inhibeix la diferenciació hipertrofica dels condrocits mantenint-los en l'estadi proliferatiu. La retroalimentació negativa de PTHrP sobre Ihh determina la longitud del motlle de cartílag (Kronenberg, 2003).

Les BMPs promouen l'expressió de Ihh a través de les Smads mentre que els factors de transcripció de la família Gli, que estan *downstream* de Ihh, promouen l'expressió de BMP-4 i BMP-7, formant un *loop* positiu. Ihh regula PTHrP independentment de la senyalització de BMP. S'ha proposat que BMP actuaria estímulant els primers estadis del desenvolupament del llinatge condroblàstic, és a dir la condensació del mesènquima i l'estadi proliferatiu (Kronenberg, 2003).

A part de les BMPs, hi ha altres molècules implicades en la regulació de la formació de l'os durant el desenvolupament, com FGF, Wnt i els membres de la família Hedgehog. També TGF β té un paper en la diferenciació dels osteoblasts, s'ha observat que la sobreexpressió de TGF β -2 en ratolins provoca una reducció de la massa òssia junt amb un increment del nombre d'osteòcits (Erlebacher and Derynck, 1996).

Els membres de la família FGF (Fibroblast Growth Factor) antagonitzen l'acció de BMP en la condrogènesi i s'expressen principalment en les cel·lules del pericondri. L'activació del receptor FGFR3 inhibeix l'expressió de BMP-4 al cartílag i al pericondri. Es creu que el balanç entre BMPs i FGF és essencial per a la regulació del balanç entre proliferació i diferenciació dels condrocits (Minina et al., 2002; Naski et al., 1998).

INTRODUCCIÓ

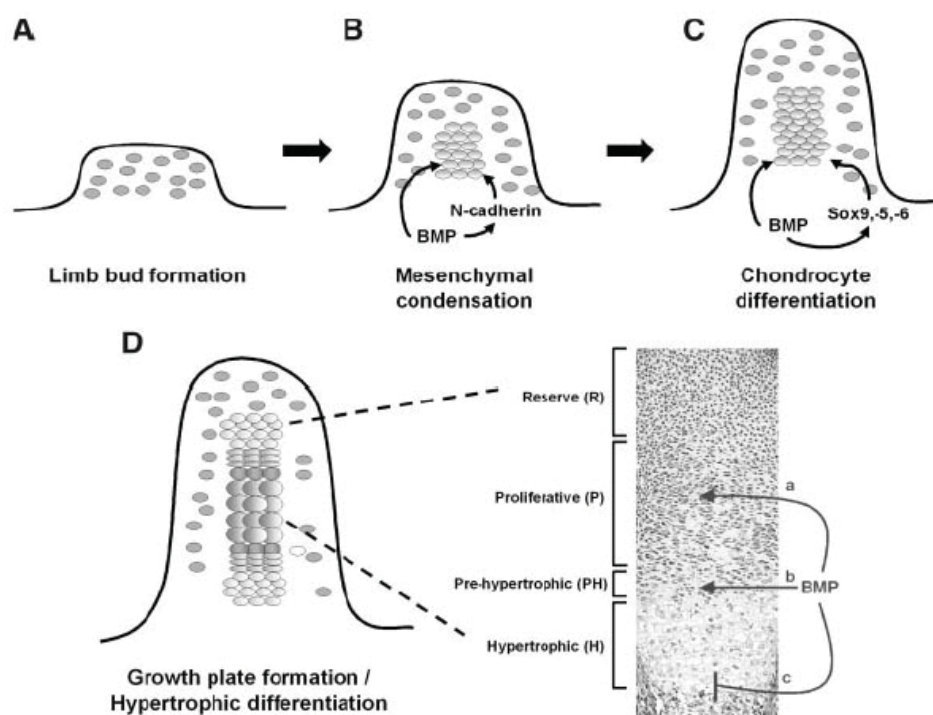


Figura 18, Paper de BMP en les condensacions del mesènquima i formació de la placa de creixement de cartílag que donarà lloc a l'os endocondral. A i B, el senyal de BMP promou la condensació mesenquimal. C, BMP promou la condrogènesi a través de l'expressió de factors de transcripció de la família Sox. D, Paper de BMP en la placa de creixement, on promou (a) la proliferació, (b) la hipertrofia dels condrocits i (c) inhibeix la diferenciació terminal. *Extret de Yoon and Lyons 2004.*

En el procés de formació de l'os, en general es consideren 3 tipus cel·lulars, els preosteoblasts diferencien a osteoblasts, els quals diferenciaran a osteòcits en la matriu òssia. Aquestes transicions involucren canvis morfològics que inclouen reducció del tamany cel·lular i canvis en els orgànuls intracel·lulars.

Els preosteoblasts dels mamífers es localitzen distants de la superfície de l'os i no dipositen matriu òssia tot i que ja expressen molècules precursors del col·lagen de tipus I que després de les corresponents modificacions postraduccionals s'engalzaran en les fibres de col·lagen. Un bon nombre de marcadors específics d'os es troben ja en els preosteoblasts, com l'Osteonectina, la Fosfatasa Alcalina, PTH/PTHrP o vàries Integrines (Manolagas, 2000 i revisat a Franz-Odenaal et al., 2006).

Els osteoblasts dipositen la matriu extracel·lular que mineralitza formant el teixit ossi, deixen de dividir-se i expressen marcadors que no s'observen en els preosteoblasts, tals com Osteocalcina, Bone Sialoprotein, BMPRI, Receptor de la vitamina D3, Vitronectina i diverses BMPs. Tot i això s'ha descrit que existeix heterogeneïtat entre els osteoblasts i que només alguns expressen alguns marcadors tals com Msx2 o c-Fos (Candelieri et al., 2001).

Es distingeixen sovint dos estadis de diferenciació entre els osteoblasts, els osteoblasts primerencs i els osteoblasts madurs. Els marcadors més característics dels primers serien el Col·lagen de tipus I i la Fosfatasa Alcalina, mentre que els osteoblasts madurs

INTRODUCCIÓ

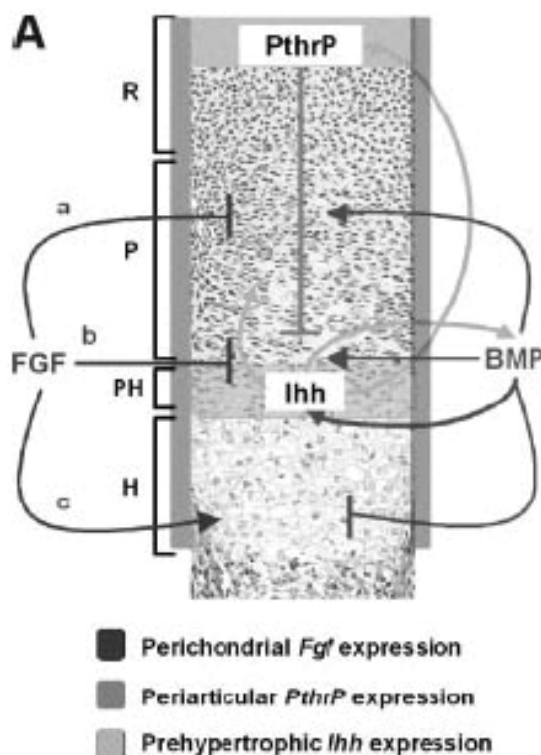
es caracteritzen per expressar fortament l'Osteocalcina (Nakashima and de Crombrughe, 2003).

Els osteoblasts poden tenir diferents destins, principalment diferenciar a osteòcits o bé la mort programada per apoptosi. La proporció d'osteoblasts que segueixen cada possible destí varia entre espècies. En humans, més de dues terceres parts dels osteoblasts entren en apoptosi i entre el 10 i el 30%, segons la font consultada, es transformen en osteòcits. En alguns peixos els ossos madurs són acel·lulars, en aquest cas tots els osteoblasts moren per apoptosi i no hi ha osteòcits (Revisat a Franz-Odendaal et al., 2006).

Figura 19, Antagonisme entre BMP i FGF en l'ossificació endocondral.

Els FGF (a) inhibeixen la proliferació, (b) inhibeixen la hipertròfia dels condrocits i (c) promouen la diferenciació terminal.

Extret de Yoon and Lyons, 2004



Tot i ser el principal llinatge cel·lular dels ossos, els osteòcits han estat molt menys estudiats que els seus precursors osteoblasts. Els osteòcits conformen un 90-95% del total de cèl·lules de l'esquelet adult, mentre que els osteoblasts són un 5% i els osteoclasts menys de l'1%. Els osteòcits són viables durant anys, fins i tot dècades, mentre que els osteoblasts viuen unes setmanes i els osteoclasts només uns dies. La principal característica dels osteòcits és la formació de dendrites que connecten els osteòcits amb les cèl·lules de la superfície de l'os (revisat a Bonewald, 2007).

En els osteòcits s'observa una reducció en el reticle endoplasmàtic i l'aparell de Golgi respecte als osteoblasts, aquests canvis són deguts a que en aquest llinatge madur disminueix la síntesi i la secreció de proteïnes. També disminueixen els nivells de marcadors com l'Osteocalcina, Bone Sialoprotein, Col·lagen de tipus I o la Fosfatasa Alcalina (Franz-Odendaal et al., 2006).

Immertsos en la matriu òssia, els osteòcits tenen un paper important com a sensors de la pressió i els senyals d'estrés que rep l'os, a més es comuniquen amb els osteòcits veïns a través de les seves dendrites que s'insereixen en els canals que atravessen la matriu (Palumbo et al., 1990).

INTRODUCCIÓ

Es creu que els osteòcits poden regular la remodelació de l'os, tot i que encara no hi ha estudis concloents al respecte. Sí que s'ha observat que els osteòcits expressen gran quantitat de Sclerostina, una proteïna que té la funció d'inhibir la formació d'os per part dels osteoblasts (revisat a Bonewald, 2007).

3.4 Factors de transcripció implicats en la condrogènesi

Els factors de transcripció que permeten induir el llinatge condrogènic *downstream* de BMP pertanyen principalment a la família Sox. Les proteïnes de la família Sox es caracteritzen perquè contenen la caixa HMG (High Mobility Group), que té una elevada homologia amb la caixa SRY del factor determinant del sexe.

Sox9 és un dels principals factors de transcripció implicats en la condrogènesi. En cèl·lules mesenquimals *sox9*^{-/-} no es dona diferenciació a condrocits. Els ratolins knock-out per Sox9 no són viables i els heterozigots moren al naixement, així que s'ha hagut d'estudiar l'efecte de suprimir-lo en quimeres. La pèrdua de Sox9 comporta que no es formi el motlle de cartílag (Bi et al., 1999).

L'haploinsuficiència de Sox9 provoca una malaltia anomenada *Campomelic dysplasia* que es caracteritza per hipoplàsia dels ossos endocondrals, fenotípicament s'observa una torsió dels ossos llargs i paladar fes tant en humans com en ratolins (Bi et al., 2001).

S'ha observat que Sox9 s'expressa en totes les cèl·lules condroprogenitores i en els condrocits, però no en els condrocits hipertròfics. S'ha suggerit que Sox9 podria regular la diferenciació dels condrocits induint les condensacions mesenquimals condrogèniques i la diferenciació dels condrocits però impedit que aquests diferenciïn a condrocits hipertròfics (Zhao et al., 1997; revisat per Nakashima and de Crombrughe, Mouse Development: Patterning, Morphogenesis and Organogenesis).

S'ha descrit que les BMPs promouen l'expressió de Sox9 *in vivo* (Healy et al., 1999; Theodosiou and Tabin, 2005); tot i que resultats del nostre grup indiquen que BMP-2 no activa a Sox9 però sí a Sox6 en cèl·lules C3H10T1/2 (Fernandez-Lloris et al., 2003).

L-Sox5 i Sox6 són altres membres de la família expressats junt amb Sox9 durant la condrogènesi. L-Sox5 és la isoforma llarga de Sox5. Al igual que Sox9, L-Sox5 i Sox6 no s'expressen en els condrocits hipertròfics, però es diferencien de Sox9 en que no presenten un domini transactivador (Lefebvre et al., 1998).

L-Sox5 i Sox6 tenen funcions parcialment redundants, la pèrdua d'un d'ells pot ser compensada per l'altre, i tenen la funció de mantenir les cèl·lules en el llinatge condroblàstic. Els ratolins knock-out per ambdós gens presenten una condrodisplàsia severa (Smits et al., 2001). Sox6 és el responsable de mediar efectes de BMP-2 en la condrogènesi tals com la inducció del Col·lagen II α 1 (Fernandez-Lloris et al., 2003).

L'expressió de Sox9 per part de BMP indueix el Col·lagen de tipus II. La inducció de Sox9 és anterior a L-Sox5 i Sox6. A més, en cèl·lules ATDC5, que són un llinatge condrogènic més madur, les BMPs promouen un increment de l'expressió de Col·lagen de tipus X, un marcador de la matriu extracel·lular dels condrocits hipertròfics, així com també la parada del cicle cel·lular i l'inici de la diferenciació terminal. L'efecte de BMP

INTRODUCCIÓ

és produït tant a través de la ruta de les Smads com per la via independent de Smads que comprèn la fosforilació de p38-MAPK (Nakamura et al., 1999).

El receptor FGFR3 està implicat en el control de la proliferació dels condrocits, es creu que el seu lligand és FGF18. La funció de FGF és inhibir la proliferació de condrocits a través del receptor FGFR3, donat que aquest receptor té la capacitat d'induir la fosforilació, activació i la localització nuclear de STAT1, un factor de transcripció que incrementa l'expressió de p21, proteïna coneguda pel seu paper inhibidor del cicle cel·lular.

La senyalització per la via de FGFR3 té la capacitat d'inhibir l'expressió d'Ihh, la qual és estimuladora del cicle cel·lular dels condrocits, i al mateix temps induir Sox9 que n'estimula la diferenciació. Per la seva banda, Ihh estimula l'expressió de PTHrP (Revisat a Karsenty and Wagner, 2002)

PTHrP pot activar la proteïna Sox9 incrementant-ne la capacitat d'unir-se a l'ADN i l'activitat transcripcional. El mecanisme pel qual PTHrP realitza aquesta acció és a través de la unió a un receptor de membrana anomenat PPR el qual activa la via de la PKA que fosforila directament a Sox9 (Huang et al., 2000)

Mitjançant l'ús d'un sistema Cre-LoxP que permet inactivar Sox9 específicament abans del moment del desenvolupament en que les condensacions mesenquimals es formarien, s'ha observat que no es formen condensacions mesenquimals ni s'expressa Runx2, és a dir que Sox9 és necessari per a l'expressió de Runx2 en la diferenciació al·línatge condroblàstic (Akiyama et al., 2002)

3.3.5 Runx2, un factor implicat en la condrogènesi i l'osteogènesi

La diferenciació d'osteoblasts i condrocits està regulada per una sèrie de factors de transcripció expressats en una seqüència temporal ben definida. Runx2 (també conegut com Cbfa1) és un factor clau per a la formació del cartílag i de l'os i s'expressa tant en condrocits com en osteoblasts. Mutacions heterozigòtiques en el seu gen causen la displàsia cleidocranial, que es caracteritza per malformacions òssies.

Així doncs, Runx2 té 2 funcions diferents en la formació de l'os: Per una banda estimula la diferenciació dels condrocits hipertròfics, un pas que permet que aquests morin per ser substituïts pels osteoblasts, i per altra banda és necessari per la diferenciació dels osteoblasts. La seva expressió s'inicia en el moment de la formació de les condensacions mesenquimals que donaran lloc als següents estadis del desenvolupament de l'os (Nakashima and de Crombrughe, 2003).

Runx2 i Cbfb són dues subunitats d'un complex heteromèric que funciona com a factor de transcripció. En mamífers existeixen 2 homòlegs de Runx2: Runx1 que es troba implicat en l'hematopoesi i Runx3 que sovint es troba inactivat en càncers d'òrgans de l'aparell digestiu. Totes 3 subunitats Runx heteromeritzen amb la mateixa subunitat Cbfb i s'uneixen a la seqüència PyGPyGGTPy. En *Drosophila* existeix un homòleg anomenat *runt* i que es troba implicat en la segmentació (Komori, 2006; Nakashima and de Crombrughe, 2003).

INTRODUCCIÓ

En ratolins knock-out per Runx2 l'expressió dels marcadors dels condrocits hipertròfics i la mineralització de la zona hipertròfica distal es veuen clarament disminuïdes en molts dels elements de l'ossificació endocondral. El desenvolupament de l'esquelet dels ratolins knock-out per Runx2 no pot progressar més enllà de la formació dels primordis del cartílag. Els fetus moren al naixement i no tenen ni cartílag ni os (Komori et al., 1997).

En estudis on s'ha clonat Runx2 en un promotor que provoca la seva sobreexpressió específicament en condrocits i s'han generat ratolins transgènics amb aquesta construcció, l'ossificació endocondral es veu accelerada. No obstant, la sobreexpressió de Runx2 específicament en condrocits en ratolins knock-out per Runx2 només rescata parcialment el fenotip, es recupera el motlle de cartílag *wild type* però no existeix diferenciació al llinatge osteoblàstic ni per tant ossificació. Aquests experiments indiquen que el paper de Runx2 en condrocits i osteoblasts és independent (Takeda et al., 2001).

Per altra banda, si es generen ratolins transgènics en que el promotor en que es clona Runx2 és el d'un gen de l'osteogènesi com el *col·lagen* de tipus I, s'observa un increment en els marcadors de l'osteogènesi primerenca, però l'expressió de l'Osteocalcina es veu reduïda així com la diferenciació dels osteoblasts a osteòcits. Així doncs, s'ha proposat que Runx2 podria estar induint els primers estadis de la diferenciació osteoblàstica però inhibint la maduració dels osteoblasts (Liu et al., 2001).

Cbfb és necessària per a la funció de Runx2 en el desenvolupament ossi, tot i que el fenotip ossi dels ratolins deficientes per Cbfb és més lleu que el dels ratolins deficientes per Runx2, indicant aquest fet que Runx2 pot regular la formació d'os en alguna mesura en absència de Cbfb (Nakashima and de Crombrughe, 2003).

A pesar de ser un gen clau en el desenvolupament del cartílag, Runx2 és suprimit en les primeres etapes de la formació d'aquest per la proteïna Sox9 (i probablement també Sox8). En estadis posteriors, l'expressió dels factors Sox és reprimida per a permetre a Runx2 coordinar la hipertròfia dels condrocits (Zhou et al., 2006).

També s'ha observat la implicació de Runx3 en el desenvolupament del cartílag. Runx2 i Runx3 estan involucrats en la inducció de l'expressió de Ihh en condrocits hipertròfics, els quals per la seva banda estan involucrats en la inducció de l'expressió de Runx2 en les cèl·lules del pericondri. És a dir, hi ha una relació entre la maduració dels condrocits i la diferenciació dels osteoblasts del pericondri en l'ossificació endocondral i Ihh intervé en aquesta relació (Komori, 2005; Komori, 2006).

S'ha descrit que cèl·lules d'origen cranial derivades de ratolins Runx2^{-/-} diferencien espontàniament al llinatge adipocític i que en presència de BMP-2 poden diferenciar a condrocits però no a osteoblasts. És a dir que Runx2 és imprescindible per a la diferenciació de cèl·lules mesenquimals al llinatge osteoblàstic induïda per BMP-2 (Kobayashi et al., 2000).

Runx2 és un factor clau per a l'inici de l'osteogènesi, però hi ha estudis que indiquen que la sobreexpressió forçada d'aquest provoca problemes en la maduració dels osteoblasts en els últims estadis de diferenciació. S'ha proposat que la isoforma II de Runx2 seria la responsable d'aquesta acció. Així com la isoforma I de Runx2

INTRODUCCIÓ

incrementa l'expressió d'Osteocalcina, que és un marcador d'osteoblasts madurs, la isoforma de tipus II sembla inhibir-la. Així doncs, s'ha proposat que la isoforma de Runx2 de tipus II podria estar involucrada en la inhibició de la maduració dels osteoblasts (Liu et al., 2001).

En resum, s'ha proposat que Runx2 seria el factor de transcripció responsable del desenvolupament dels osteoblasts inmadurs, però inhibiria la diferenciació a osteoblasts més madurs (Komori, 2006).

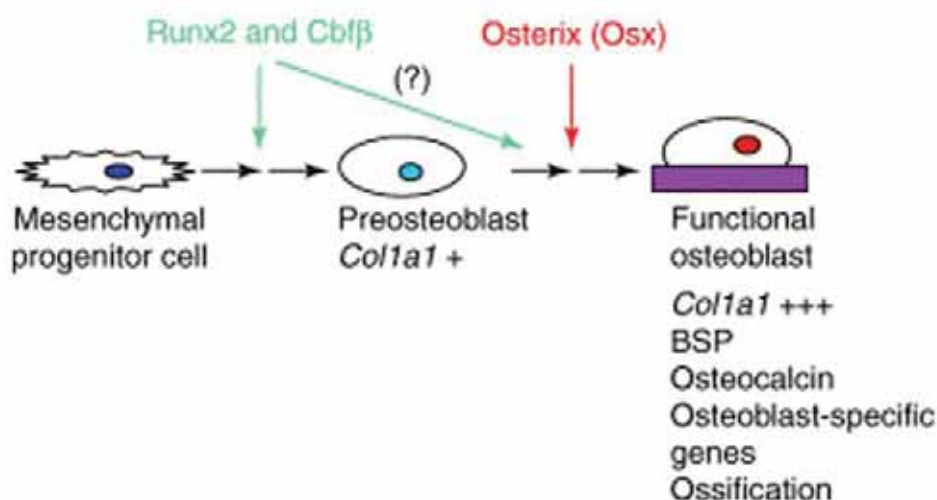


Figura 20 Regulació molecular de l'osteogènesi per part dels factors "clau" proposat per Nakashima and de Crombrughe, 2003 i Komori, 2006.

Tant Smad1 com Smad3, R-Smads activades per BMP i TGF β respectivament, interaccionen amb Runx2 i estan implicades en la regulació de la seva activitat transcripcional (Zhang et al., 2000). També pRb interacciona amb Runx2 i sembla tenir un efecte sinèrgic en l'activació de gens osteoblàstics (Thomas et al., 2001).

Les modificacions post-traduccionals són un altre mecanisme pel qual l'activitat de Runx2 és controlada. Les Integrines estimulen la via de ERK/MAPK per fosforilar i estimular l'activitat transcripcional de Runx2. S'ha descrit que l'activació de MEK1, que activa les ERK-MAPK, fosforila Runx2 i incrementa la capacitat transactivadora de Runx2 sobre el promotor de l'*osteocalcina* (Frendo et al., 1998; Xiao et al., 2000).

L'observació que la via de ERK1 i ERK2 està implicada en l'activació de Runx2 per mitjà de la fosforilació d'aquest s'ha confirmat *in vivo* mitjançant ratolins transgènics dominant negatius o que sobreexpressen MEK1, un activador de ERK1/2, confirmant així la importància de ERK1 i ERK2 en la fosforilació i increment de l'activitat transcripcional de Runx2 (Ge et al., 2007; Xiao et al., 2002), per altra banda l'AMPc sembla activar-ne la degradació per via de la ubiquitinació i la degradació al proteasoma (Tintut et al., 1999).

També FGF2 per unió al seu receptor FGFR2 pot estimular la via d'ERK/MAPK fosforilant Runx2 i incrementant el seu potencial transactivador en el promotor del gen de l'*osteocalcina*. A més, FGF2 estimula PKC δ , una altra kinasa que incrementa l'activitat transcripcional de Runx2 però fosforilant-lo en un altre lloc (Kim et al., 2003).

INTRODUCCIÓ

El complex Beta-catenina/TCF1 potencia l'expressió de Runx2 i l'activitat del promotor d'aquest, així Runx2 indueix la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals a preosteoblasts inhibint la seva diferenciació a adipòcits tot i que s'ha suggerit la possibilitat que aquestes cèl·lules encara mantinguin la capacitat de diferenciar a condrocits (Komori, 2006).

En ratolins *ihh*^{-/-}, Runx2 s'expressa en condrocits però no en les cèl·lules del pericondri, suggerint aquest fet que Ihh és responsable d'induir el paper de Runx2 en la diferenciació dels osteoblasts (Franceschi et al., 2007).

La quantitat de proteïna Runx2 varia poc al llarg del procés de diferenciació dels llinatges cartilaginós i ossi, la qual cosa fa pensar que la regulació d'aquest factor de transcripció no és tant a nivell d'incrementar la seva expressió sinó de variar la seva capacitat transactivadora. Per exemple les histones desacetilases (HDAC) i el seu factor accessori mSin3a, s'uneixen a Runx2 i mantenen la cromatina desacetilada, és a dir en un estat inactiu (Imai et al., 2004).

3.3.6 Factors de transcripció implicats en l'osteogènesi

Tot i que els 2 tipus d'ossificació semblen molt diferents, els osteoblasts d'ambdós casos són indistingibles, suggerint aquest fet que factors comuns controlen la diferenciació dels osteoblasts en ambdós tipus d'ossificació (Nakashima i de Crombrughe, Mouse Development: Patterning, Morphogenesis and Organogenesis).

3.3.6.1 Les Smads en la transcripció de gens osteogènics

Les Smads com a factors de transcripció juguen un paper molt important en la transducció dels senyals que portaran a la diferenciació osteoblàstica. Poden induir la diferenciació osteoblàstica de cèl·lules mesenquimals com les C2C12 (Yamamoto et al., 1997) tot i que no amb la mateixa eficiència que les BMPs o altres membres de la superfamília TGF β o els seus receptors constitutivament activats. Això pot ser degut a diversos motius, per una banda a que altres vies de senyalització independents de Smads siguin essencials per a l'activació dels gens específics de l'osteogènesi, i per altra banda que els Smads actuïn en el nucli junt amb altres factors de transcripció regulats per una via independent de Smads (revisat a Wan and Cao, 2005).

Els ratolins knock-out per Smad 1 i per Smad5 no són viables, però la importància de la Smad1 en la formació de l'os es demostrà en un experiment en que aquesta es delectonà específicament en osteoblasts utilitzant un sistema Col1-cre (Cao and Chen, 2005).

La identificació de Tob, una proteïna que inhibeix l'acció de BMP a través de la seva associació amb les Smads 1 i 5 va permetre generar ratolins knock-out per Tob en els quals aquestes Smads veuen la seva activitat incrementada i en conseqüència s'observen major nombre d'osteoblasts i l'ossificació es veu incrementada (Yoshida et al., 2000).

L'acció més ben descrita de les Smads com a factors de transcripció implicats en la formació de l'os és a través de la interacció amb Runx2, la qual s'ha descrit que media les activitats tant de TGF β com de BMP-2. La unió de la forma fosforilada de la Smad5

INTRODUCCIÓ

a Runx2 activa gens específics de l'osteogènesi tals com la *fosfatasa alcalina* (Afzal et al., 2005; Thirunavukkarasu et al., 2001).

La pèrdua del domini d'unió a les Smads de Runx2 i la conseqüent incapacitat d'interacció entre Runx2 i Smads comporta la pèrdua de l'expressió d'altres marcadors osteoblàstics tals com Col·lagen de tipus I, Osteopontina, BSP (Bone Sialoprotein) i Osteocalcina, tot i que aquest últim marcador no es veu afectat en altres estudis similars (Javed et al., 2008). També la interacció Smad3-Runx2 està implicada en la inducció de OPG (Osteoprotegerin), una glicoproteïna que inhibeix la diferenciació dels osteoclasts (Lee et al., 2000b).

També és molt freqüent la interacció de les Smads amb factors de transcripció homeòtics per a activar els gens de l'osteogènesi. Smad1 i Smad4 activen la transcripció dels gens de l'*osteopontina* i de *opg* a través de la interacció amb HoxC8 (Wan et al., 2001; Yang et al., 2000). Smad6 pot heterodimeritzar amb HoxC8 i inhibir la interacció amb la Smad1 (Bai et al., 2000).

També s'ha observat la presència d'elements de resposta a BMP (BRE) específics per la unió de Smad1 i Smad5 en el promotor de *msx2*, un gen involucrat en la formació de l'os, com veurem més endavant. En aquest cas, el lloc d'unió per les Smads es troba situat al costat d'una caixa homeobox TAAT i ambdues seqüències són imprescindibles per la resposta a BMP (Brugger et al., 2004).

3.3.6.2 Osterix

Osterix (Sp7 en humans) és un factor de transcripció específic d'osteoblasts identificat per Nakashima et al l'any 2002 mitjançant PCR supressiva substractiva sobre ARN missatger extret de cèl·lules C2C12 induïdes per BMP-2.

En el primer treball en que es va descriure Osterix ja es van caracteritzar els ratolins knock-out per aquest gen. Així com els heterozigots eren normals i fèrtils, els homozigots morien al cap de poc de néixer, observant-se que el desenvolupament del cartílag era normal però que no es produïa osteogènesi ni endocondral ni intramembranosa, tot i que la diferenciació al llinatge condroblàstic sí que té lloc amb normalitat i per tant hi ha una certa mineralització del teixit cartilaginós a causa de la matriu secretada pels condrocits hipertròfics (Nakashima et al., 2002).

En els knock-out per *osterix*, enlloc de teixit ossi, un teixit mesenquimal dens emergeix del pericondri/periosti i envaeix la zona dels condrocits hipertròfics, cal senyalar que aquestes cèl·lules mesenquimals que substitueixen el teixit ossi no proliferen i l'expressió de Col·lagen de tipus 1 (Colla1) es troba molt reduïda, mentre que els transcrits de marcadors osteogènics com Osteocalcina, Osteonectina, Osteopontina o BSP (Bone SialoProtein) no són detectables.

Els nivells d'expressió de Runx2 en els ratolins knock-out per Osterix es troben a nivells comparables als de ratolins *wild type*, suggerint aquest fet que Runx2 actua *upstream* d'Osterix. Així com en els ratolins knock-out per Runx2 no es dona invasió per part dels vasos sanguinis de la zona dels condrocits hipertròfics ni es troben osteoclasts funcionals, en els ratolins knock-out per Osterix sí que es conserven aquests estadis de l'ossificació endocondral (Nakashima and de Crombrughe, 2003).

INTRODUCCIÓ

Els factors de transcripció uneixen seqüències específiques d'ADN presents en les regions promotores dels gens i, generalment, formen un complex amb la ARN polimerasa II que permet l'inici de la transcripció (Tjian and Maniatis, 1994). Moltes regions promotores contenen una caixa TATA aproximadament uns 30 parells de bases abans del seu inici de transcripció, la qual uneix TFIID, un factor essencial per a la transcripció de l'ARN missatger (Roeder, 1991). Hi ha gens, però, que enlloc de caixa TATA tenen altres seqüències que permeten la unió del complex de la ARN polimerasa II.

La família de factors de transcripció Sp, els quals s'uneixen a l'ADN mitjançant *zinc fingers* tenen la capacitat d'unir-se a regions riques en GCs (Dynam & Tjian, 1983) i es creu que tenen la capacitat de reclutar TFIID i permetre d'aquesta manera la unió de la ARN polimerasa II i l'inici de la transcripció. S'ha descrit que en promotors que enlloc de caixa TATA contenen una altra seqüència, l'activació pot ser fins i tot més forta que en el cas dels promotors amb TATA (Colgan and Manley, 1995; Pugh and Tjian, 1991).

Degut als seus *zinc fingers*, Osterix/Sp7 es classificà com a membre de les proteïnes Sp, que pertanyen a la família Krüppel, i per tant s'inferí que és un d'aquests factors de transcripció capaç d'induir gens que no tenen caixa TATA en el seu promotor. A més, en la mateixa regió promotora d'Osterix no hi ha caixa TATA. En el treball de Nakashima et al, (Cell 2002) es descriu que Osterix és capaç d'unir-se a regions riques en GC dels promotors de Col.lagen de tipus *coll1a1* i *col2a1*.

En humans, els membres de la família Sp es troben situats en el genoma propers a diferents clusters de gens de la família Hox. Així, Sp2 i Sp6 es troben lligats al cluster Hox-B, Sp3 i Sp5 estan lligats al cluster de Hox-D i Sp4 a Hox-A.

A més de la capacitat d'unir-se a les seqüències riques en GC, la regió N-terminal d'Osterix conté un domini d'activació de la transcripció i s'ha observat que la seva localització està restringida al nucli.

S'ha descrit que NFATc1, un factor de transcripció implicat en l'osteogènesi i en la inducció de la formació d'osteoclasts, interacciona amb Osterix formant un complex en el promotor del *col.lagen1a1* i ambdós factors de transcripció cooperen en la inducció d'aquest gen (Koga et al., 2005).

S'ha proposat que Osterix podria induir la proliferació cel·lular, però en altres estudis es demostra que inhibeix el creixement dels osteoblasts, quelcom coherent amb l'estadi madur d'aquestes cèl·lules que donaran lloc als osteòcits, cèl·lules que no es divideixen. Per altra banda, s'ha demostrat que la proteïna Osterix inhibeix la senyalització per la via de Wnt, tal com es demostra per la inhibició de la inducció del *reporter* TOP-Flash per part de la Beta-catenina en presència d'Osterix (Zhang et al., 2008).

3.3.6.3 ATF4

ATF4 (Activating Transcription Factor 4) és un factor de transcripció bZIP (basic leucine zipper) que pertany a la família CREB/ATF. ATF4 és fosforilat per RSK2, la mutació del qual provoca defectes en l'esquelet. S'ha descrit que ATF4 s'associa indirectament amb Runx2 per promoure la diferenciació terminal dels osteoblasts a

INTRODUCCIÓ

través de la inducció de l'expressió de l'Osteocalcina, un marcador d'osteoblasts madurs (Tominaga et al., 2008; Xiao et al., 2005).

ATF4 té la capacitat d'induir l'expressió d'un promotor que conté la seqüència Ose1 que es considera un lloc d'unió per Runx2, s'ha proposat que ATF4 heterodimeritza amb C/EBP β per unir-se a aquesta seqüència i induir l'expressió de l'osteocalcina (Yang et al., 2004).

En ratolins deficientes per ATF4 l'osteogènesi té lloc, però la massa òssia es veu reduïda, així com el nombre de trabècules. Aquest fenotip és degut a defectes en la diferenciació terminal dels osteoblasts que s'observa en la disminució de l'expressió de marcadors del llinatge terminal com el Col·lagen de tipus I i l'Osteocalcina. Per això es proposa que ATF4 fosforilat per RSK2 podria ser un factor clau en la diferenciació terminal dels osteoblasts (Yang et al., 2004).

3.3.6.4 Factors de transcripció amb homeodomini implicats en l'osteogènesi

Els factors de transcripció amb homeodomini són proteïnes que contenen un domini proteic de 60 aminoàcids anomenat homeodomini que conté una estructura d'helix-volta-helix per la qual s'uneixen a l'ADN. El lloc d'unió per les proteïnes que contenen un homeodomini conté una seqüència TAAT al centre i les bases adjacents són les responsables de restringir les interaccions entre els factors específics i les seqüències d'unió presents en la regió reguladora dels seus gens diana. A més, l'associació heteromèrica amb altres factors de transcripció i co-factors també contribueix a fer més específica aquesta unió (Catron et al., 1993; Gehring et al., 1994).

Els principals factors amb homeodomini involucrats en l'osteogènesi pertanyen a les famílies Dlx i Msx.

-La família Dlx

La família de factors de transcripció Dlx (Distal-less homeobox) va ser identificada per la seva homologia al factor de transcripció Distal-less (Dll) de *Drosophila* (Porteus et al., 1992; Simeone et al., 1994). Posteriorment s'han identificat i clonat gens homòlegs a *dll* en moltes espècies que van des de l'hidra a l'home. En vertebrats, els homeodomini d'aquests gens comparteixen una gran homologia amb l'homeodomini de Dll de *Drosophila*. Durant els estadis larvaris de *Drosophila* l'activitat de Dll és necessària pel desenvolupament de les extremitats i per la correcta organització de l'eix proximal-distal (Cohen et al., 1989; Cohen and Jurgens, 1989).

Els gens *dlx* s'organitzen per parelles cap-i-cua encarades pel seu extrem 3', és a dir que es transcriuen de forma convergent. Es coneixen 7 membres de la família Dlx en humans i ratolins que formen les següents parelles: Dlx1 i Dlx2, Dlx5 i Dlx6, Dlx3 i Dlx7. L'excepció a aquesta organització és Dlx4 que es troba proper a Dlx 3 i 7 però no s'ha observat que formi tàndem amb cap altre gen (Merlo et al., 2000).

Cada membre d'aquests tàndems té més homologia amb un factor Dlx d'un altre tàndem que amb el seu acompanyant. Això ha permès dividir els membres de la família Dlx en 2 subfamílies segons la seva homologia; En una hi ha Dlx1, Dlx6, Dlx7 i Dlx4 i en l'altra Dlx2, Dlx3 i Dlx5 (Merlo et al., 2000).

INTRODUCCIÓ

Cada parella de gens *dlx* va associada a un cluster de gens *hox*. En humans, *dlx3*, *dlx4* i *dlx7* es troben al cromosoma 17q21, prop del cluster *hox-B*. Els gens *dlx1* i *dlx2* estan lligats al cluster *hox-D*, al cromosoma 2. Finalment, *dlx5* i *dlx6* estan lligats al cluster *hox-A* al cromosoma 7. Aquesta relació entre els gens *dlx* i els clusters *hox* també és present en el genoma de ratolí i fins i tot en *Drosophila*, on *dll* localitza proper al complex *hom-C* (Merlo et al., 2000).

La configuració dels gens *dlx* en parelles que es transcriuen convergentment està molt conservada, doncs s'ha observat en la ascidia *Ciona intestinalis* (Di Gregorio et al., 1995). La distància que separa les parelles és relativament petita doncs oscil·la entre les 2 i les 10 kilobases en tots els casos descrits. En artròpodes només hi ha un gen *dll*, la qual cosa fa pensar que aquesta peculiar forma d'organització aparegué després de la divergència del llinatge precursor dels artròpodes i el llinatge que donà lloc als vertebrats (Zerucha et al., 2000).

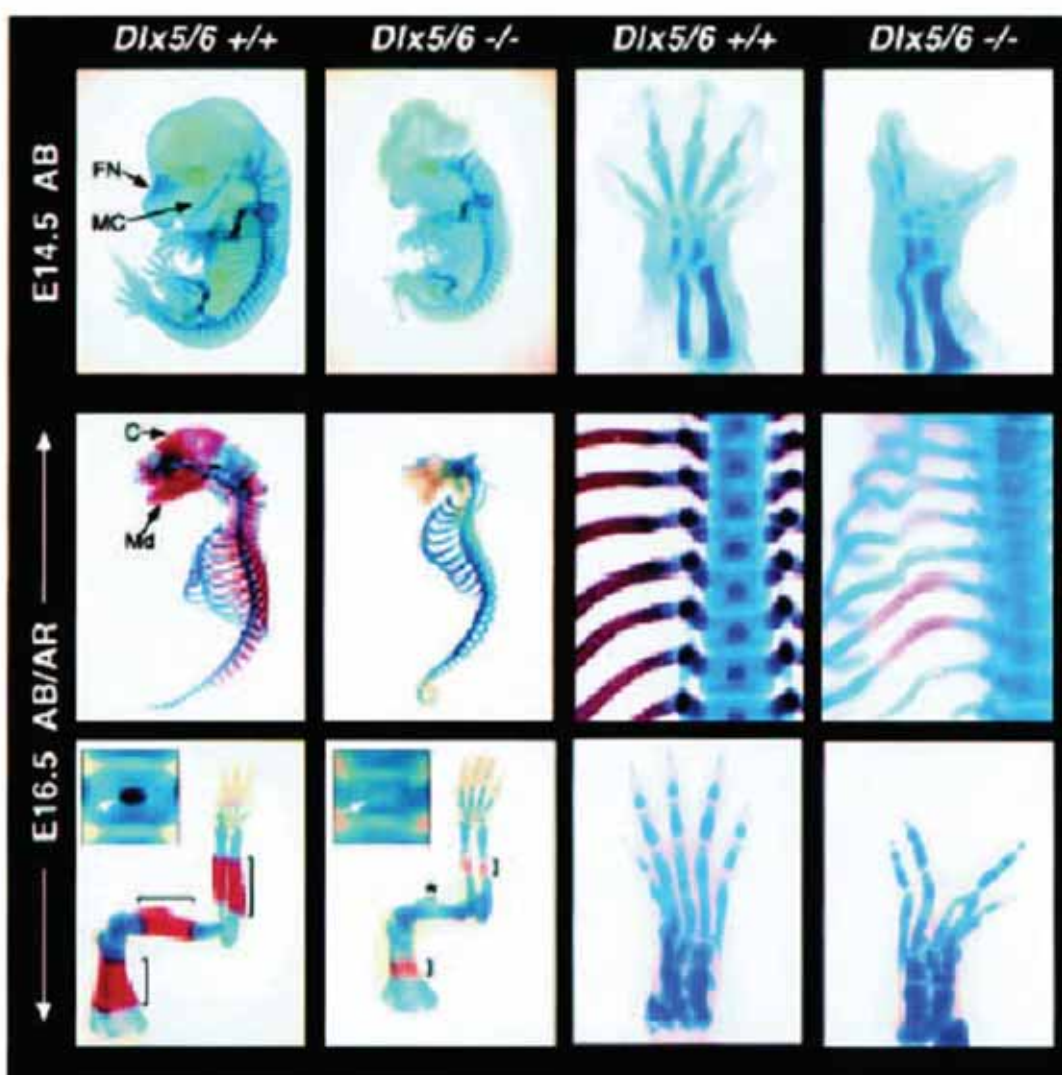


Figura 21 Ratolí doble knock-out per Dlx5 i Dlx6. En la primera filera veiem una tinció amb Blau Alciana que mostra l'absència dels cartílags de Meckel, nasal i del dígit central, en els mutants el dia 14,5 de gestació. En la segona i tercera fileres veiem una tinció amb Blau Alciana i Vermell d'Alizarina que mostra l'absència d'ossos cranials, maxil·lars i mandibulars, així com malformacions en vèrtebres, costelles i extremitats, en embrions mutants de 16.5 dies. Extret de Robledo et al., 2002.

INTRODUCCIÓ

S'ha proposat que aquesta configuració dels gens *dlx* en parelles properes i transcrites de forma convergent podria conferir un avantatge evolutiu. A nivell funcional s'han descrit *enhancers* compartits pels gens *dlx* d'un mateix tàndem. Aquestes seqüències s'extenen uns centenars de bases de longitud i són el lloc d'acció potencial de molts factors de transcripció, s'ha demostrat que alguns d'aquests factors són gens de la mateixa família Dlx (Revisat a Depew et al., 2005).

En un treball del grup de John Rubenstein, identificaren una seqüència d'uns centenars de bases present en la regió intergènica dels homòlegs de *dlx5* i *dlx6* de peix zebra (en peix zebra, l'homòleg de *dlx5* s'anomena *dlx4*) molt conservada i la clonaren junt amb el promotor mínim de la β -globina en un vector *reporter*. Observaren que el patró d'expressió d'aquest *reporter* en ratolins transgènics era molt similar a la de Dlx5 i Dlx6 en el cervell anterior (forebrain) i la regió nasal, tot i que no s'expressava en altres indrets tals com els arcs branquials (Depew et al., 2005).

D'aquesta manera, els autors demostraren que entre el tàndem de *dlx5* i *dlx6* existeix una seqüència concreta que regula ambdós gens, tot i que amb preferència pel primer. Es tracta d'una caixa homeòtica palindròmica, l'estructura de la qual serà àmpliament comentada en la discussió d'aquesta tesi doctoral, aquesta seqüència és TAATTA i els autors descriueren que s'hi poden unir funcionalment tant Dlx1, com Dlx2, com el mateix Dlx5 (Depew et al., 2005).

En el mateix treball, experimentant amb ratolins knock-out per Dlx1/2 arribaren a la conclusió que la funció de Dlx1 i/o Dlx2 és necessària per directament o indirecta regular l'expressió de Dlx5 i Dlx6 al cervell anterior (forebrain) via el seu *enhancer* intergènica. No obstant això, els autors també conclouen que altres factors de transcripció han d'estar implicats en la regulació de la regió intergènica de *dlx5* i *dlx6* (Depew et al., 2005; Zerucha et al., 2000).

També en el cas del tàndem format per *dlx1* i *dlx2* s'ha observat una seqüència altament conservada en la regió intergènica (Zerucha et al., 2000). La regulació creuada entre gens d'una mateixa família ha estat descrita també pels gens de la família *hox*. També en el cas dels gens *hox* s'han descrit *enhancers* compartits (Gould et al., 1997; van der Hoeven et al., 1996).

Funcions dels factors de transcripció Dlx:

Bona part dels treballs sobre el paper de la família Dlx en el desenvolupament s'han centrat en els Arcs Branquials (també coneguts com a arcs faringis). Aquestes estructures, presents en el desenvolupament dels vertebrats, són metamèriques, és a dir compostes per segments homòlegs repetitius organitzats longitudinalment. El primer arc faringi conté el cartílag de Meckel, el qual dona lloc al premaxil·lar i el maxil·lar, l'os zigomàtic, una part de l'os temporal i la musculatura de la zona.

La família Dlx també ha estat molt estudiada en el desenvolupament del cervell anterior (forebrain). Dlx5 i Dlx6 tenen un complex patró d'expressió en teixits neuronals i regulen molts gens importants pel desenvolupament neuronal com ara *mash* (Zerucha et al., 2000; Zhao et al., 1994).

INTRODUCCIÓ

Dlx1 participa en el desenvolupament craniofacial, concretament en el desenvolupament de les dents i les mandíbules (Shigetani et al., 2002; Thomas et al., 1997), també Dlx5 i Dlx6 s'expressen en el desenvolupament del cervell anterior (forebrain) (Simeone et al., 1994) i són importants pel desenvolupament del bulb olfactiu (Koga et al., 2005; Long et al., 2003).

Dlx5 i Dlx6 tenen un paper central en la formació de l'os. A diferència dels altres membres de la família Dlx dels mamífers, Dlx5 i Dlx6 s'expressen en tots els elements esquelètics a partir del moment de la formació del cartílag inicial (Simeone et al., 1994; Zhao et al., 1994). L'expressió de Dlx5 s'observa en tots els ossos durant la diferenciació osteoblàstica i desapareix en els osteòcits completament diferenciats (Merlo et al., 2000).

En la formació del crani, l'expressió de Dlx1 i Dlx2 precedeix la de Dlx5 i Dlx6, concretament al telencèfal i el diencèfal (Liu et al., 1997). Als 9.5 dies de desenvolupament del ratolí, Dlx1 i Dlx2 ja són expressats en el primer arc branquial tant a la zona proximal (que donarà lloc al maxil·lar) com a la zona distal (que donarà lloc a la mandíbula), mentre que Dlx3, Dlx5 i Dlx6 només s'expressen a la porció mandibular del primer arc branquial (Depew et al., 2005).

Aquest patró d'expressió temporal i la possibilitat que Dlx1 i Dlx2 s'uneixin a la regió intergènica del tàndem format per Dlx5 i Dlx6, són fets que suggereixen que en alguns casos Dlx1 i Dlx2 podrien regular l'expressió de Dlx5 i Dlx6 (Depew et al., 2005).

En humans, Dlx5 i Dlx6 estan considerats candidats a ser responsables d'una malaltia hereditària anomenada SHFM1 (Split Hand/Foot Malformations 1) doncs s'ha observat que l'herència d'aquesta malaltia està lligada al cromosoma 7q21.1, que és la zona del genoma on es troben *dlx5* i *dlx6* (Merlo et al., 2002).

Dlx5 s'expressa als osteoblasts de tot l'esquelet, tot i que les anomalies que s'observen en els ratolins knock-out per Dlx5 estan restringides als ossos craniofacials. En ratolins *dlx5*^{-/-}*dlx6*^{-/-} a més d'una severa afectació de l'esquelet craniofacial s'observa la pèrdua dels dígitos centrals tant en les extremitats anteriors com en les posteriors (Robledo et al., 2002).

En els ratolins doble knock-out *dlx5*^{-/-}*dlx6*^{-/-}, l'ossificació en les extremitats, les vèrtebres i les costelles també es veu retardada en l'embriogènesi, desprenent-se d'aquesta observació la possible involucració d'aquests gens en l'ossificació endocondral. L'observació que la maduració dels condrocits també es veu retardada en aquests mutants no s'ha pogut explicar encara doncs Dlx5 i Dlx6 s'expressen en el pericondri i no en els condrocits (Robledo et al., 2002).

Dlx3 és un factor de transcripció important en diversos aspectes del desenvolupament. La disrupció d'aquest gen causa la malaltia hereditària TDO (Tricho-Dento-Osseous Syndrome) (Price et al., 1998). Aquesta malaltia es caracteritza per defectes en la dentició i els ossos craniofacials. L'any 1999, Morasso et al, observaren que els ratolins mutants per Dlx3 morien en l'estadi embrionari, entre els dies 9.5 i 10 degut a defectes en la placenta (Morasso et al., 1999).

INTRODUCCIÓ

El patró d'expressió, la regulació transcripcional i l'estructura de la proteïna de Dlx3 estan molt conservades en els vertebrats, així com el seu lloc d'unió a l'ADN (Morasso et al., 1995; Feledy et al., 1999).

Dlx4 ha estat identificat com a oncogen implicat en el càncer d'ovari i la seva expressió ha estat relacionada amb l'angiogènesi i la supervivència de cèl·lules tumorals inhibint-ne l'apoptosi. No s'ha observat que aquest membre de la família Dlx estigui relacionat amb la formació de l'esquelet (Hara et al., 2007; Sun et al., 2006).

La família Msx

Msx2 és un factor de transcripció molt important en el desenvolupament de l'esquelet. En ratolins deficientes per Msx2, es donen defectes tant en el desenvolupament ossi com en el dels òrgans d'origen ectodèrmic. En humans, una mutació en el gen de Msx2 causa la craniosinostosi, una malaltia caracteritzada per un excés de formació d'os en les sutures del crani (Satokata et al., 2000; Ma et al., 1996).

Tant els ratolins knock-out per Msx1 com per Msx2 presenten anomalies en el desenvolupament dels ossos del crani. En els dobles mutants *msx1-/-msx2-/-* les anomalies en el desenvolupament dels ossos cranials són molt més severes, indicant aquest fet que Msx1 i Msx2 tenen funcions redundants en la formació dels ossos del crani (Satokata et al., 2000).

Dels 2 factors, Msx2 és el que ha estat més estudiat pel seu paper en l'osteogènesi, tot i que el mecanisme exacte encara no està massa clar. Per una banda hi ha estudis que suggereixen que Msx2 inhibeix la diferenciació dels precursors dels osteoblasts i dels osteoblasts inmadurs (Liu et al., 1999), mentre que altres estudis demostren que Msx2 promou la diferenciació i la proliferació dels osteoblasts (Ishii et al., 2003; Ichida et al., 2004). En ratolins knock-out per Msx2, a més dels defectes en l'ossificació cranial, s'observa una disminució en l'expressió de Runx2 (Nakashima and de Crombrughe, 2003).

S'ha descrit un antagonisme funcional entre Dlx5 i Msx2 en la regulació de diversos gens, entre ells alguns dels marcadors del llinatge osteogènic. Veurem aquest tema detalladament en la discussió.

3.3.6.5 p53 com a factor de transcripció

P53 és una proteïna àmpliament coneguda pel seu paper en la supressió de tumors. Els individus que hereden una mutació en p53 són molt propensos a patir tumors i sovint desenvolupen càncers durant la infància o l'adolescència, aquest fenotip es coneix com a síndrome de Li-Fraumeni i es caracteritza per la predisposició a patir diferents tipus de tumor, inclòs l'osteosarcoma. La proteïna p53 *wild type* respon a diferents tipus d'estrés cel·lular, tals com l'activació d'oncogens o danys en l'ADN, activant gens diana que bloquegen la proliferació cel·lular o indueixen l'apoptosi.

P53 és regulada negativament per Mdm2, una E3-ubiquitina lligasa. L'expressió de Mdm2 segueix a la de p53 a la qual s'uneix i en reprimeix la funció interferint en l'associació d'aquesta amb factors de transcripció i portant-la a degradació per mitjà del proteasoma. Tant els ratolins knock-out per Mdm2 com els knock-out per p53 moren en

INTRODUCCIÓ

la fase embrionària, en canvi, els ratolins doble mutants *mdm2*^{-/-} i *p53*^{-/-} són viables (revisat a Michael and Oren 2002 i Zambetti et al., 2006).

A més del seu control de la proliferació i el cicle cel·lular, p53 ha estat implicada en el control de la diferenciació de diversos tipus cel·lulars (revisat a Almog and Rotter 1997). La conclusió de la majoria dels estudis és que p53 promou la diferenciació cel·lular, la qual cosa és coherent amb el paradigma de la biologia que contraposa proliferació cel·lular i diferenciació. No obstant, dos estudis independents (Wang et al., 2006; Lengner et al., 2006) han descrit que p53 és un agent repressor de l'osteogènesi.

En el primer estudi, Wang et al van examinar l'estructura i el metabolisme ossi en ratolins knock-out per p53. Observaren un augment en el nombre i el tamany de les trabècules així com un augment en la proliferació i la diferenciació dels osteoblasts. Observaren també un augment en l'expressió d'Osterix en els osteoblasts dels ratolins *p53*^{-/-} però no d'altres factors clau pel desenvolupament ossi tals com Runx2 o ATF4. Sorprenentment, s'observà també una elevada activitat dels osteoclasts.

Segons aquest article de Wang et al, la repressió de p53 és exercida sobre el promotor d'*osterix*. Ho estudiaren en cèl·lules C2C12 (que també són el nostre model) i observaren que l'efecte té lloc en la regió més proximal a l'inici de transcripció. També descrigueren que p53 no s'uneix directament a aquesta regió, que un mutant de p53 que no pot unir-se a l'ADN continua reprimint Osterix i que els nivells d'expressió de Dlx5 no varien en presència de p53 (Wang et al., 2006).

En l'altre estudi, Lengner et al creen un ratolí en que *mdm2* està deletat en osteoblasts i en conseqüència p53 es troba hiperactivat. En conseqüència, els ossos d'aquests ratolins són més curts i porosos. A diferència de l'estudi de Wang et al, aquí els autors sí observaren una reducció de Runx2 tant a nivell de transcripció com a nivell d'expressió de la proteïna. És interessant assenyalar que no observaren un augment de l'apoptosi degut a l'hiperactivitat de p53 (Lengner et al., 2006).

En conclusió, es pot afirmar que p53 és un regulador negatiu de la diferenciació osteoblàstica, tot i que encara no es coneix per quin mecanisme.

3.3.6.6 Altres factors implicats en l'osteogènesi:

Twist és un factor helix-loop-helix implicat en la diferenciació mesodèrmica. Els ratolins knock-out per aquest gen moren en la fase embrionària a causa de defectes en el desenvolupament del tub neural i el crani. En els ratolins heterozigots, s'observa un increment del creixement de les cèl·lules cranials amb elevada activitat de la Fosfatasa Alcalina i producció de Col·lagen de tipus I, la qual cosa sembla indicar que Twist seria un regulador negatiu de la proliferació dels osteoblasts (Yousfi et al., 2001; Howard et al., 1997).

També s'ha observat la implicació en la proliferació dels osteoblasts de gens com *delta-fosB* i *fral*, els quals expressats en ratolins transgènics donen un fenotip osteoscleròtic amb una elevada formació i proliferació d'osteoblasts i en conseqüència una incrementada massa òssia (Nakashima and Crombrughe, 2003).

INTRODUCCIÓ

Krox20 és un factor de transcripció amb dits de zinc que s'expressa en condrocits hipertròfics i els osteoblasts dels ossos endocondrals. Els ratolins *krox20*^{-/-} presenten anomalies en l'esquelet tals com la disminució de la longitud dels ossos llargs, reducció de les trabècules i porositat. Encara no es coneix el mecanisme de l'acció d'aquest gen (Levi et al., 1996).

INTRODUCCIÓ

4- El nostre model, les cèl·lules C2C12

Les línia cèl·lular C2C12 són cèl·lules de ratolí diploides. Estan determinades al llinatge muscular, però es mantenen indiferenciades quan es cultiven en medi DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementades amb un 20% de FBS (Fetal Bovine Serum). Van ser obtingudes per Helen Blau et al, aïllant un clon de cèl·lules d'una línia preexistent anomenada C2 (Blau et al., 1983; Blau et al., 1985).

La línia cel·lular C2 va ser obtinguda l'any 1977 per Yaffe i Saxel a partir de cèl·lules del múscul de la cuixa de ratolins de la soca C3H. Es van lesionar els músculs dels animals mitjançant fórceps i 70 hores després es van aïllar les cèl·lules miogèniques (Yaffe and Saxel, 1977).

Les C2C12 tenen morfologia de fibroblasts i estan determinades a diferenciar al llinatge mioblàstic, per això es diu que són pre-mioblasts. Constitueixen un model molt útil per tal d'estudiar la diferenciació al llinatge muscular, doncs fàcilment poden diferenciar a mioblasts, expressar proteïnes musculars com la Creatinina kinasa i formar miotubs multinucleats.

El tractament de les cèl·lules C2C12 amb BMP-2 causa un canvi en el llinatge de destí de mioblàstic a osteoblàstic, per això també s'utilitzen àmpliament com a model cel·lular per a estudiar la formació ectòpica d'os produïda per BMP (Katagiri et al., 1994).

Després de l'addició de BMP-2 s'observa la transdiferenciació de les cèl·lules al llinatge osteoblàstic i la repressió dels marcadors del llinatge muscular tals com MyoD (Lee et al., 2003a). Les cèl·lules C2C12 poden tornar a diferenciar al llinatge muscular quan es retira el BMP del medi (Katagiri et al., 1994).

Els cultius de C2C12 diferencien a miotubs multinucleats quan la concentració de FBS en el medi de cultiu es redueix al 5%, per això és important que sempre tinguin una elevada concentració de FBS al medi, en el nostre cas les cultivem amb un 15% de FBS (Katagiri et al., 1994). També és fonamental evitar que arribin a confluència, doncs perden capacitat de diferenciació.

Així com les cèl·lules C2C12 responen a les BMPs diferenciant al llinatge ossi, pràcticament no expressen marcadors del llinatge condrogènic en resposta a aquesta citoquina. Els mioblasts aïllats en cultius primaris, en canvi, sí que poden diferenciar al llinatge condrogènic de manera semblant als fibroblasts (Li et al., 2005).

La presència de FBS en el medi de cultiu impedeix la diferenciació al llinatge miogènic però no a l'osteoblàstic, doncs s'ha observat l'expressió de la Fosfatasa Alcalina iduïda per BMP-2 en presència de FBS 15% en el medi de cultiu (Katagiri et al., 1994).

El tractament de les cèl·lules C2C12 amb TGF β -1 també inhibeix la formació de miotubs així com l'expressió dels marcadors del llinatge miogènic Miogenina i MyoD. (Katagiri et al., 1994).

OBJECTIUS

- Identificació de les vies de transducció de senyal induïdes per BMP-2 i altres mecanismes moleculars involucrats en l'activació d'Osterix.

a) -Anàlisi de la regió promotora d'*osterix* i identificació de les regions de resposta a BMP-2.

b) -Identificació dels factors de transcripció que s'uneixen a aquestes regions i estudi de la seva regulació en resposta a BMP-2.

-Establiment de clons estables induïbles que ens permetin estudiar *in vivo* la regulació transcripcional d'Osterix.

-Estudi d'altres gens modulats transcripcionalment per BMP-2 i la seva implicació en l'osteogènesi.

RESULTATS

Excellence does not require perfection
Henry James

1. La regulació d'Osterix per BMP-2.

La diferenciació de cèl·lules pluripotencials als diferents llinatges és un procés que està regulat per mecanismes moleculars precisos. El descobriment de factors de transcripció “clau” per a cada llinatge demostra que la diferenciació cel·lular està finament regulada a nivell transcripcional. Com hem vist en la introducció, hi ha factors clau que regulen la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals a cada llinatge. MyoD i Myf5 són els factors de transcripció bHLH que regulen la diferenciació al llinatge mioblàstic. Els membres de la família Sox són “clau” per a la diferenciació dels condrocits, mentre que membres de la família PPAR regulen la diferenciació de les cèl·lules pluripotencials al teixit adipós.

En la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals al llinatge osteogènic, s'ha postulat Osterix com un dels factors de transcripció “clau” en la diferenciació osteoblàstica, doncs regula gens importants per a l'osteogènesi més tardana i s'ha descrit que en ratolins knock-out per Osterix no es produeix mineralització de l'os (Nakashima et al., 2002).

La pregunta que intentarem respondre és: qui regula el gen regulador? Nakashima et al van identificar Osterix a partir de l'ARN missatger de cèl·lules C2C12 estimulades per BMP-2, per tant BMP-2 és un activador d'Osterix. Ara bé, per mitjà de quin o quins mecanismes? Quins factors de transcripció hi estan implicats?

En el moment de començar la present recerca no es coneixia la importància d'alguns factors de transcripció essencials per a l'osteogènesi, i per tant candidats a regular Osterix, tansols s'havia postulat que Runx2 podria estar-hi involucrat degut a la observació que en ratolins knock-out per Osterix la expressió de Runx2 continua als nivells dels ratolins *wild type*, mentre que en els knock-out per Runx2 Osterix no s'expressa, suggerint aquests fets que Runx2 és un gen *upstream* d'Osterix i que actua en estadis anteriors del desenvolupament osteoblàstic (Nakashima et al., 2002).

Runx2 és un factor de transcripció imprescindible per a la diferenciació osteoblàstica i actua en els primers estadis d'aquesta diferenciació, en el pas de la cèl·lula mesenquimal pluripotencial a preosteoblast. En aquest estadi, els preosteoblasts encara no expressen marcadors osteoblàstics i encara tenen la capacitat de diferenciar a condrocits (Akiyama et al., 2002; Akiyama et al., 2005). Una altra acció de Runx2 és estimular la hipertròfia dels condrocits, un pas que fa que aquestes cèl·lules morin i siguin substituïdes per cèl·lules òssies.

Tal i com hem vist en la introducció, els gens de la família Dlx, especialment Dlx3 i Dlx5, són candidats a regular l'osteogènesi. L'any 1997 Ryoo et al varen descriure la implicació del factor de transcripció Dlx5 en la diferenciació osteoblàstica. Poc després, Miyama et al (1999) descrigueren que l'acció de Dlx5 era en resposta a l'estimulació per BMP-2 (Miyama et al., 1999; Ryoo et al., 1997).

RESULTATS

L'any 2003, Lee et al demostraren que Dlx5 promou la transcripció de Runx2 i Osterix, efectuant l'acció sobre aquest últim per una via independent de Runx2. Mitjançant una construcció *antisense* per Dlx5, demostraren que Dlx5 és imprescindible per a l'expressió d'Osterix en resposta a BMP, doncs fins i tot amb l'addició de BMP l'expressió d'Osterix en els *antisense* és nul·la (Lee et al., 2003a; Lee et al., 2003b).

L'experimentació que presentaré a continuació ha estat centrada en la regulació del promotor del gen *osterix* en les primeres hores d'acció de BMP-2. Ja en el primer treball en descriure la inducció d'Osterix per BMP-2 en cèl·lules C2C12 (Nakashima et al., Cell 2002, *supplementary data*) observaren la inducció d'Osterix en cèl·lules C2C12 per northern blot a les 6h arribant al seu màxim entre les 12 i les 24 hores i desapareixent a les 48 hores.

S'han descrit 2 pics d'inducció d'Osterix en cèl·lules C2C12 tractades amb BMP-2, el primer aproximadament a les 6 hores i l'altre una setmana després de la primera (Lee et al., 2003b). Aquestes observacions suggereixen que l'activació d'Osterix per BMP-2 és de forma indirecta, és a dir que hi està implicada la transcripció prèvia d'altres gens *downstream* de BMP-2.

El nostre estudi de la resposta d'Osterix a BMP-2, dut a terme en cèl·lules C2C12, ens indica que aquest comença a observar-se a nivell d'ARN missatger a les 2 hores d'afegir BMP-2 a les cèl·lules en cultiu, mentre que a nivell de proteïna comença a ser perceptible a les 4 hores d'afegir la BMP-2.

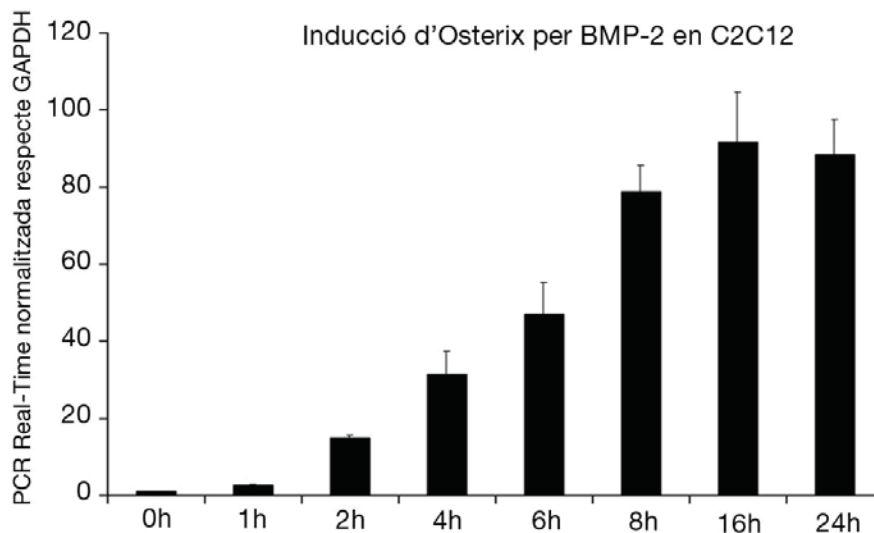


Figura 22 *Time course* de l'expressió de l'ARN missatger d'Osterix. Cèl·lules C2C12 confluents deplecionades de sèrum O.N. van ser tractades amb BMP-2 2nM el temps indicat. Es mostren els resultats obtinguts per PCR Real-Time en 6 experiments independents. Les barres de desviació representen la Desviació Típica. (Aquests resultats són obtinguts en col·laboració amb altres membres del grup).

Vam procedir a analitzar el grau de conservació de l'ADN no codificant a la regió del voltant de l'inici de transcripció d'*osterix* per tal d'esbrinar quina regió del promotor podria ser la responsable de la resposta a l'estimulació amb BMP. Bo i utilitzant la base

RESULTATS

de dades Blast de l'NCBI, vam identificar dues regions a l'ADN no codificant que es troba a 5' del gen *Osterix*, molt conservades entre humans i ratolins, que van ser anomenades Cluster I i Cluster II.

Tal com es pot veure a la figura 23, on es representa el promotor murí d'*Osterix*, el Cluster I està en la regió més distal i abarca des de -5758 fins a -4228, mentre que el Cluster II engloba la regió més proximal, de -1812 fins a l'inici de transcripció. L'homologia entre humà i ratolí del Cluster I és d'un 83%, mentre que en el cas del Cluster II és d'un 81% .

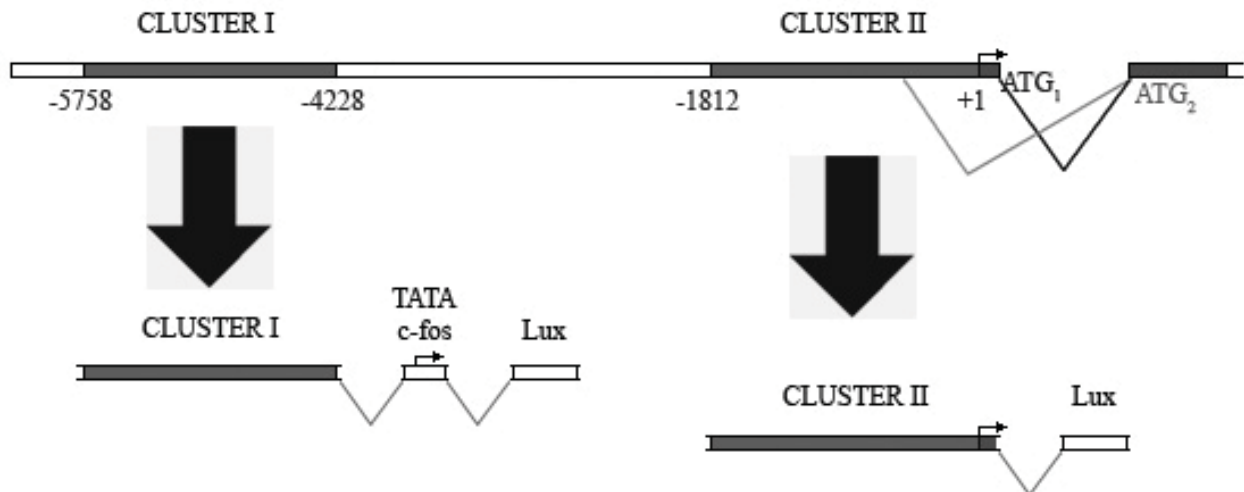


Figura 23 primeres construccions en el *reporter* luciferasa pGL-2 de les regions més conservades del promotor d'*osterix*

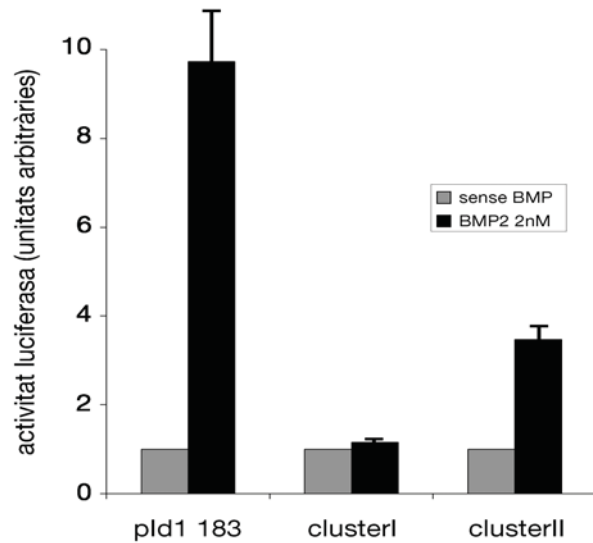
A partir d'ADN genòmic de ratolí i mitjançant la PCR, vam obtenir aquestes regions d'ADN i les vam clonar en un vector d'expressió *reporter* per luciferasa (Fig 23). En el cas del Cluster I, que dista 4 kilobases de l'inici de transcripció, vam afegir una caixa TATA del gen *c-fos* per assegurar la presència d'un lloc d'unió de la ARN polimerasa II. En el cas del Cluster II, va ser clonat de -1812 fins a +93 per tal de fer la construcció *reporter*.

Vam realitzar l'assaig luciferasa de les dues construccions tant en presència com en absència de BMP-2. Com a control de l'experiment vam transfectar en paral·lel el promotor mínim del gen *idl*, que respon clarament a BMP-2 (López-Rovira et al., 2002). Tot i que la resposta d'*idl* a BMP-2 és per acció directa de les Smads, i per tant més primerenca, hem comprovat que l'estabilitat de la luciferasa en C2C12 és duradora i que, per tant, l'activitat luciferasa que observem en els assaigs correspon a la luciferasa acumulada. En aquest sentit, el promotor d'*idl* és un bon control per analitzar la resposta transcripcional induïda per BMPs.

Tal com veiem al gràfic de la figura 24, que representa els resultats dels assaigs luciferasa, l'única construcció que respon a la inducció amb BMP-2 és el Cluster II (-1812 a +93), així doncs vàrem procedir a analitzar la construcció del *reporter* del Cluster II.

RESULTATS

Fig 24. Luciferasas de les construccions *reporter* del ClusterI i del ClusterII. Triplicats de les cèl·lules transfectades amb els respectius *reporters* van ser deplecionades 16-20h +/- BMP-2 2nM. Es mostren els resultats de 5 experiments independents. Les barres de desviació representen la Desviació Típica. S'ha utilitzat pld183-lux com a control.



Vam analitzar la resposta a BMP-2 de successives deleccions del Cluster II començant per l'extrem 5'. Els enzims de restricció utilitzats foren SpeI (-981 a +93), SmaI (-312 a +93), SacI (-174 a +93) i Kpn21 (-114 a +93). Tal com s'observa a la figura 25, la delecció de la seqüència que va de -1812 a -114 del promotor d'Osterix tan sols provoca lleugeres variacions en l'activitat luciferasa en resposta a BMP-2. En canvi, l'eliminació de la regió que va de -114 a -51 provoca que es perdi completament la capacitat de resposta a BMP-2. Així vam identificar aquesta regió de 63 pb, la regió mínima de resposta a BMP-2, i la vàrem anomenar promotor mínim (ens referirem a aquesta seqüència d'ADN com a promotor mínim).

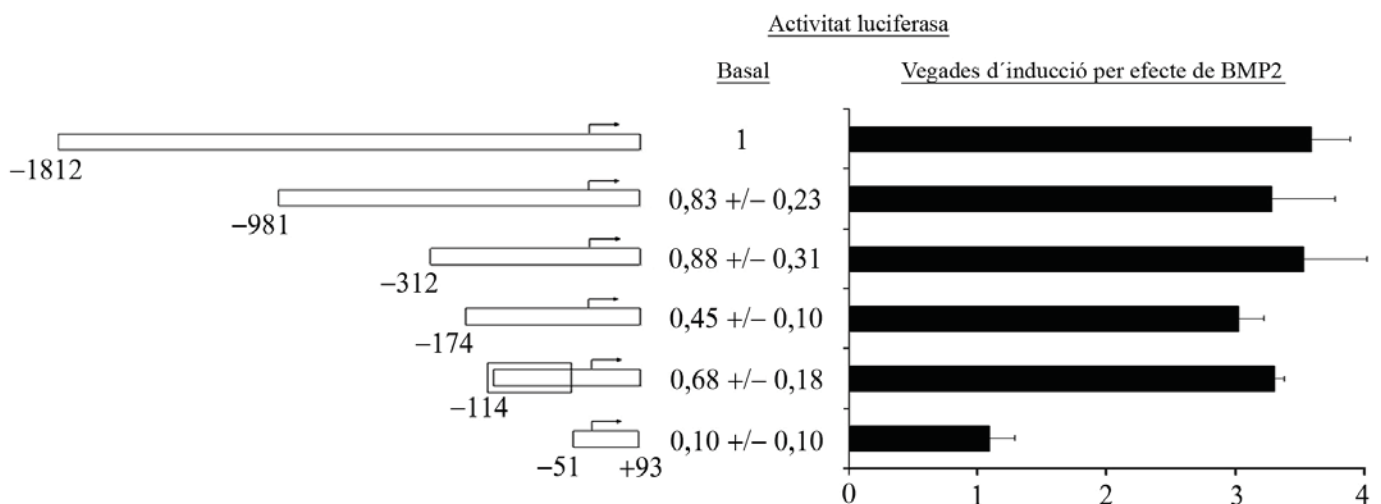


Figura 25: Lectures de l'activitat luciferasa de les deleccions del cluster II clonat en el vector *reporter*. Triplicats de les cèl·lules transfectades amb els respectius *reporters* van ser deplecionades 16-20h +/- BMP-2 2nM. Es mostra el resultat de 7 experiments independents. Les barres de desviació representen la Desviació Típica. L'Activitat Basal (en absència de BMP-2) es mostra normalitzada respecte la construcció -1812/+93. El requadre -114/-51 representa la regió del promotor induïble per BMP-2.

RESULTATS

El fet que la construcció del Cluster I no respongués a BMP-2 en les cèl·lules C2C12 i la seva posició allunyada de l'inici de transcripció, va fer-nos pensar que potser la seva funció és potenciadora, per aquest motiu vam procedir a clonar el Cluster I davant d'una de les construccions més petites del Cluster II, concretament CII-Sac (-174 a +93). No obstant, no vam observar que la addició del Cluster I modifiqués la capacitat de resposta a BMP-2 de la construcció CII-Sac sola. Per tant, tot i ser una regió molt conservada del promotor, sembla que el Cluster I no respon a BMP-2 en cèl·lules C2C12 ni com a activador ni com a repressor, almenys en les primeres hores d'inducció (Fig 26).

S'han identificat 2 isoformes del gen *osterix* en humans (Milona et al., 2003), la forma llarga (més abundant) i la forma curta (menys abundant). Aquestes 2 isoformes difereixen en el seu extrem 5' donat que utilitzen 2 primers exons diferents.

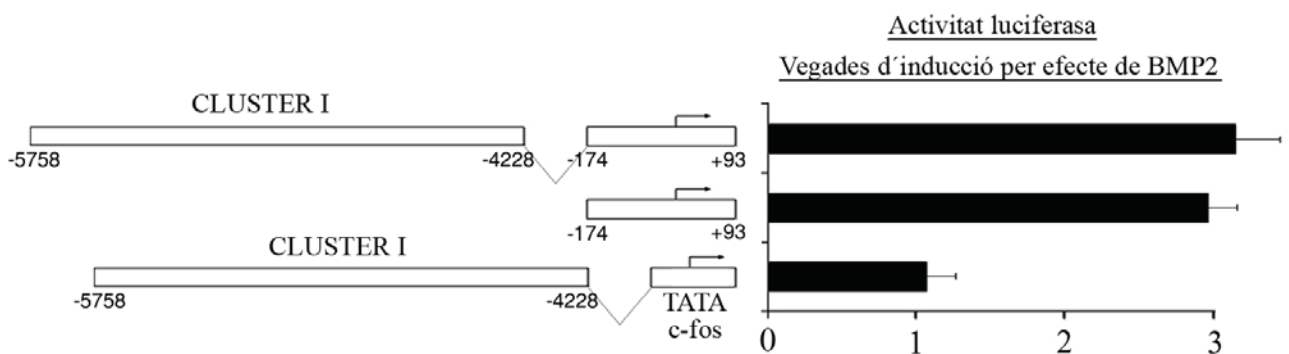


Figura 26: Resultat de l'activitat luciferasa de la construcció *reporter* del Cluster I clonada junt amb un inici de transcripció heteròleg o bé junt amb una de les construccions més petites de resposta a BMP-2. Es mostra el resultat de 3 experiments independents realitzats amb els anteriors.

Segons s'ha descrit, la forma llarga d'Osterix és la més abundant i per això és la que s'utilitza per contar a partir de l'inici de transcripció (Lu et al., 2006; Gao et al., 2004). L'altre inici de transcripció, el de la forma curta, es troba a -586 i no té seqüència Inr (iniciadora) ni tampoc caixa TATA, però també vam provar la capacitat de resposta a BMP-2 de la regió 5' a aquest inici de transcripció. En els assaigs luciferasa per aquesta construcció tansols vam observar en algun cas una inducció molt dèbil de l'activitat luciferasa, concloent-se de l'estudi que la isoforma que s'indueix per BMP-2 és principalment la forma llarga, mitjançant la deleció de la seqüència proximal d'aquesta, vam identificar el promotor mínim.

Per tal d'estudiar el promotor mínim, vam clonar aquest fragment de DNA de -114 a -51, substituint la regió de -52 a +93 per la caixa TATA del gen *c-fos* per tal de contar amb un inici de transcripció ben descrit i descartar que els efectes observats fossin deguts a interaccions amb la unió del complex iniciador de la transcripció.

L'estructura d'aquesta regió substituïda (-52 a +93) que conté l'inici de transcripció d'*osterix*, no conté caixa TATA, que és el lloc més ben descrit d'unió de TFIID i el complex de proteïnes responsables de l'inici de la transcripció. En canvi, conté una seqüència rica en Citosines (de -52 a -25) i també la seqüència Inr consensus (PyPyA(+1)NT/APyPy), que és una seqüència típica d'inici de la transcripció (Smale

RESULTATS

and Kadonaga, 2003) i presenta una analogia funcional amb la caixa TATA quan aquesta no es troba present en un promotor (revisat a Smale, 1997). La substitució d'aquesta regió per la caixa TATA del gen *c-fos*, pràcticament no varia l'activitat del promotor mínim d'*osterix*, mentre que el promotor mínim de *c-fos* per si sol no respon a BMP-2 (figura 28).

Vam procedir a analitzar el promotor mínim d'*osterix*. En primer lloc vam utilitzar el programa Blast, disponible a la pàgina web del NCBI per analitzar la conservació d'aquesta seqüència d'ADN. Com es pot comprovar a la figura 27, aquesta seqüència està altament conservada entre humans i altres espècies de vertebrats.

Bo i utilitzant el programa d'anàlisi de l'ADN Matinspector (Genomatix), vam identificar 3 possibles llocs d'unió de Factors de Transcripció en aquesta regió mínima: CCGCTGGG que és una regió similar al lloc d'unió de Smad1 (GCGnCGGC), la seqüència CAGACAGA que conté una regió canònica d'unió per Smad4 (CAGAC) i una repetició de forma palindròmica, TAATTA d'una homeobox (TAAT), que és el lloc d'unió consensu per a proteïnes que contenen un homeodomini. Per tal d'analitzar la importància de cadascuna de les caixes per separat, vam fer mutants per cadascuna d'elles (fig 28) i vam clonar les respectives seqüències de nou al vector *reporter* de luciferasa.

```
ratolí 5'CCGGAGTCTTCTCCGCTGGGAAAGCTGTAATTAGAGGGTGGATCCCTACAGACAGAGAGCAG3'  
rata 5'CCGGAGTCTTCTCCGCTGGGAAAGCTGTAATTAGAGGGTGGATCCCTACAGACAGAGAGCAG3'  
humà 5'CTGGAGCCTTCTCCGCTGGGAAAGCTGTAATTAGAGGGTGGATCCCTACAGACAGAGAGCAG3'  
ximpanzé 5'CTGGAGCCTTCTCCGCTGGGAAAGCTGTAATTAGAGGGTGGATCCCTACAGACAGAGAGCAG3'  
vaca 5'CCGGAGCCTTCTCCGCTGGGAAAGCTGTAATTAGAGGGTGGATCCCTACAGACAGAGAGCAG3'  
gos 5'CCGGAGCCTTCTCCGCTGGGAAAGCTGTAATTAGAGGGTGGATCCCTACAGACAGAG3'
```

Figura 27: conservació del promotor mínim de resposta a BMP-2 d'*osterix* (-114/-52) entre diferents espècies, analitzat amb el programa ECR Browser (NCBI Decode.org).

L'anàlisi de l'activitat luciferasa de les diferents mutacions mostra que el mutant de la caixa homeobox (TAATTA) perd la capacitat de respondre a BMP-2 mentre que no s'observen efectes significants per la resta de mutacions, només una petita disminució en els nivells basals, però no en la inducibilitat per BMP, de la mutació en la caixa CAGAC (figura 28).

La caixa homeobox TAAT és específica per a tots els factors de transcripció que contenen un homeodomini, així que vam voler comprovar la capacitat de diferents factors amb homeodomini per activar la construcció *reporter* del promotor mínim d'*Osterix*. Vam cotransfectar vectors d'expressió per Dlx3, Dlx5, Prx1A i Prx1B amb la construcció *reporter* de luciferasa pel promotor mínim. Com es pot veure a la figura 29, només Dlx5 activa el promotor mínim. Aquest efecte concorda amb el fet que Dlx5 és activat en resposta a BMP (Miyama et al., 1999) i que ja altres treballs apuntaven la possibilitat que aquesta proteïna fos mitjancera en la inducció d'*Osterix* en resposta a BMP-2 (Lee et al., 2003b).

RESULTATS

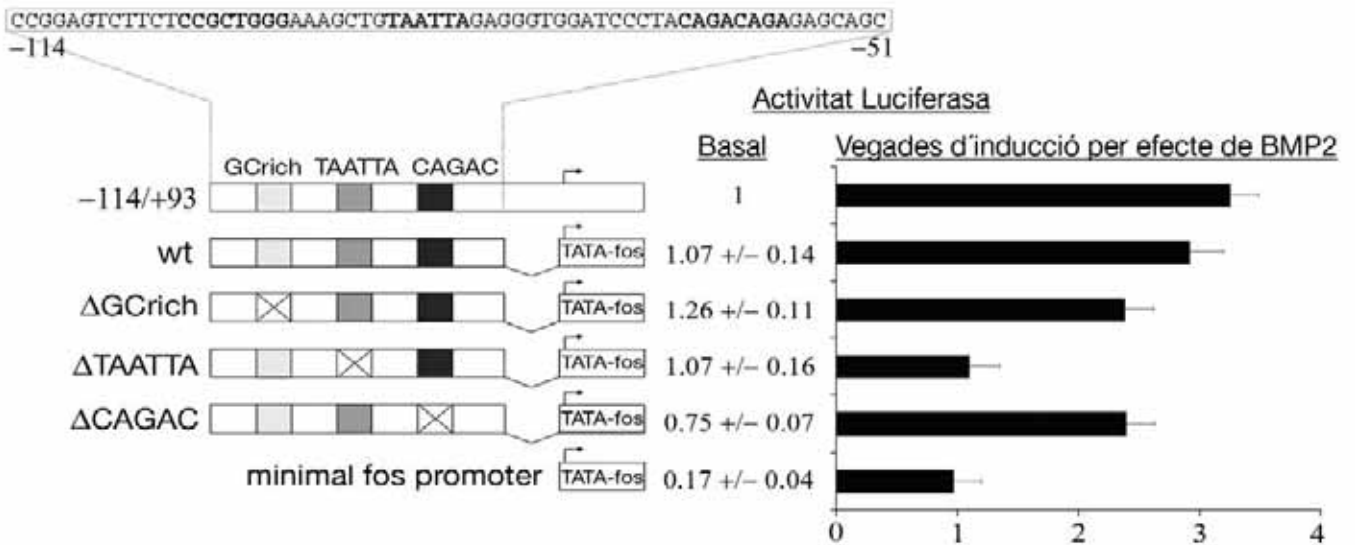


Figura 28. Efecte de mutar les possibles caixes d'unió de factors de transcripció sobre l'activitat basal i l'inducibilitat per BMP-2 del promotor mínim d'*osterix* amb la seva seqüència 3' endògena o bé clonat junt amb un lloc d'unió de la ARN polimerasa II heteròleg del gen *c-fos*. Es mostra el resultat de 5 experiments independents realitzats com en els casos anteriors.

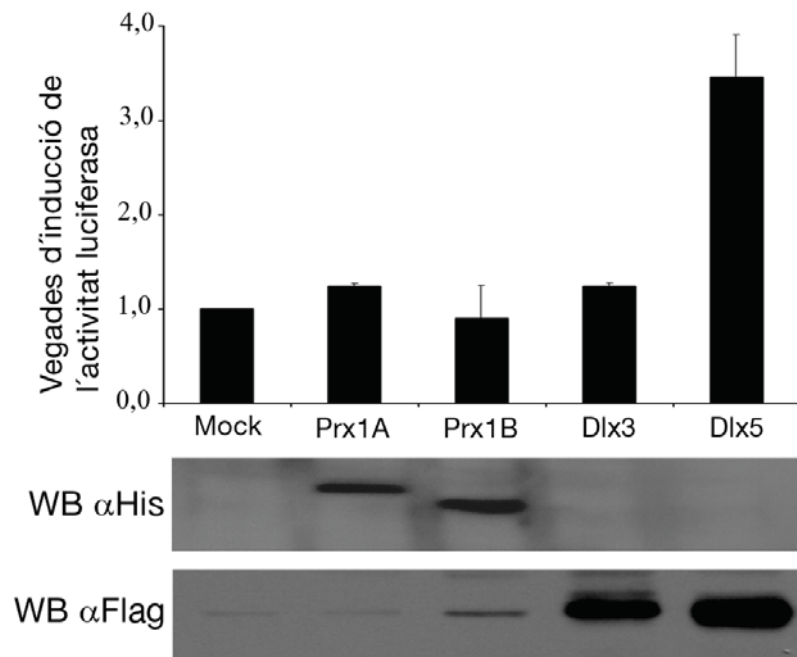


Figura 29. Efecte de co-transfectar el *reporter* luciferasa del promotor mínim d'*osterix* junt amb un vector d'expressió per diferents proteïnes amb Homeodomini: Prx1A, Prx1B, Dlx3 i Dlx5. Es mostra el resultat de 4 experiments independents realitzats com en els casos anteriors.

Prx1A i Prx1B també s'uneixen a una caixa homeòtica similar (Norris et al, 2001), però no hem observat ningun efecte d'inducció de l'activitat luciferasa (figura 29). Més sorprenent va ser que Dlx3, tot i ser el membre de la família Dlx més homòleg a Dlx5 i estar implicat en les primeres etapes del desenvolupament de l'os (Hassan et al., 2006), no induïx la construcció del promotor mínim. Aquest fet és especialment sorprenent

RESULTATS

tenint en compte que la seqüència present al promotor d'*osterix* coincideix plenament amb la seqüència consensu d'unió a l'ADN de Dlx3, que és (A/C/G)TAATT(G/A)(C/G) (Feledy et al., 1999), sobre aquest tema tornarem a incidir en la discussió.

La família de factors de transcripció Msx ha estat postulada com a antagonista de la família Dlx en diferents escenaris del desenvolupament de vertebrats (Zhang et al., 1997; Bendall and Abate-Shen, 2000; Bryan and Morasso, 2000; Phillips et al., 2006). Els membres de la família Msx normalment actuen com a repressors transcripcionals (Davidson, 1995; Feledy et al., 1999; Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Així com Msx1 seria antagonista de Dlx3 (Bryan and Morasso, 2000), Msx2 es postula com a antagonista de Dlx5, però en la bibliografia existeixen diferents propostes respecte al possible mecanisme. En alguns models s'ha postulat que Msx2 inhibeix l'efecte de Dlx5 unint-se a aquest heterodimèricament (Zhang et al., 1997, Newberry et al., 1998), mentre que a d'altres models s'ha proposat que Msx2 competeix amb Dlx5 per la unió a l'ADN en les caixes homeobox (TAAT) de la regió promotora d'alguns gens concrets (Kim et al., 2004; Hassan et al., 2004). En aquest mecanisme també sembla estar-hi implicat, almenys en alguns casos, Dlx3 (Hassan et al., 2004).

Tant *dlx5* com *msx2* són gens activats en resposta a BMP-2 en cèl·lules C2C12 (Hassan et al., 2006). Així que vam provar de cotransfectar el promotor mínim d'*osterix* amb diferents proporcions de Dlx5 i Msx2 per veure com podien afectar a la transcripció d'aquest en resposta a BMP-2. Tal i com es pot apreciar a la figura 30, la presència de Msx2 contrarresta l'activació del promotor mínim per part de Dlx5.

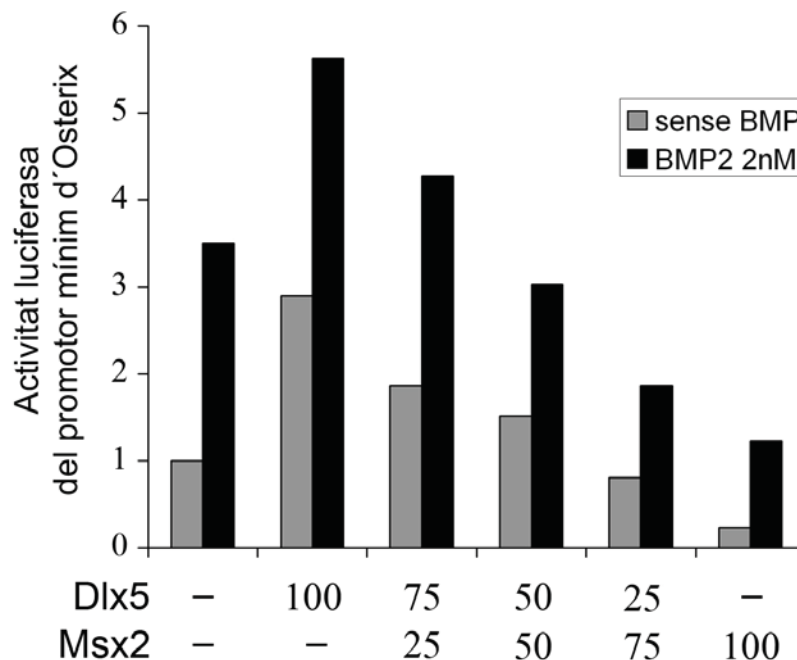


Figura 30. Efecte d'expressar Msx2 i Dlx5 sobre el *reporter* luciferasa del promotor mínim d'*osterix*. Es mostra el millor de diferents experiments realitzat com en els casos anteriors.

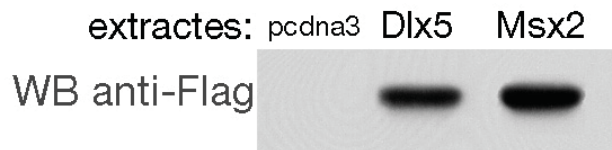
Per comprovar la capacitat d'unió d'aquests factors al promotor d'*osterix*, vam estudiar la capacitat d'extractes nuclears obtinguts de cèl·lules 293 transfectades amb Dlx5 o Msx2 (ambdós dissenyats per expressar el marcador Flag) per unir-se a oligonucleòtids

RESULTATS

wild type o bé amb les mutacions Δ TAAT o Δ CAGAC. Aquests oligonucleòtids van ser dissenyats en la seva forma biotinilada per la qual cosa poden ser fàcilment immunoprecipitats amb estreptavidina-agarosa.

El resultat, tal i com es pot apreciar en la figura 31, indica que el Dlx5 no pot unir-se a l'ADN del promotor mínim quan la caixa TAAT es troba mutada, però s'hi uneix amb força quan aquesta es troba present. Per altra banda, Msx2 no s'uneix a cap dels oligonucleòtids, tot i que en una exposició prolongada s'observen traces de la seva expressió. Els experiments d'immunoprecipitació per Dlx5 i Msx2 van ser realitzats en paral·lel.

control d'expressió:



IP amb estreptavidina:

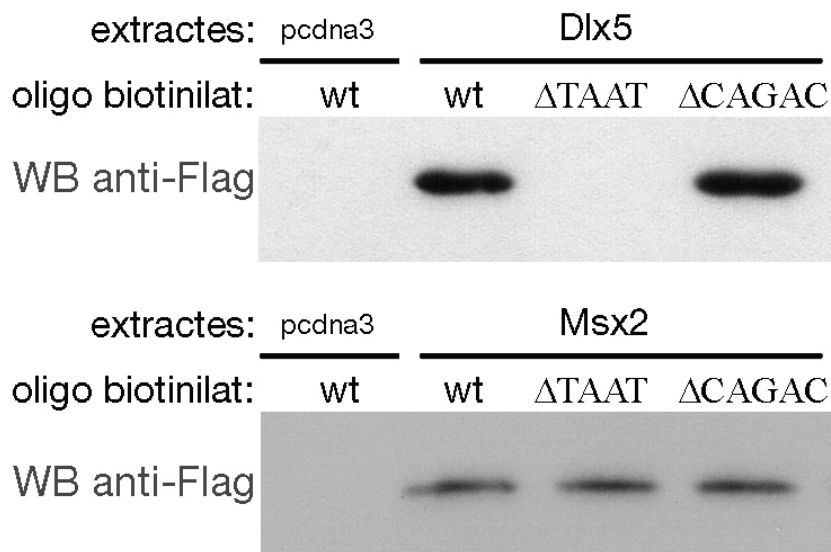


Figura 31: pull-down amb oligonucleòtids biotinilats wt (*wild type*) o mutats incubats amb extractes de cèl·lules 293 transfectades amb vectors d'expressió per Dlx5 o Msx2 marcats amb l'epítot Flag. Ambdós assajos han estat realitzats en paral·lel.

Per tal d'assegurar-nos que efectivament Dlx5 s'uneix a la caixa TAATTA del promotor d'*osterix*, vam procedir a efectuar assaigs de retard de banda (EMSA), on s'observa la incapacitat de la proteïna Dlx5 d'unir-se al promotor d'*osterix* quan la caixa TAATTA es troba mutada. Per tal de fer aquest experiment vam produir proteïna Dlx5-GST i la vam incubar amb els 4 mutants del fragment de resposta mínima marcats amb γ ATP. A la figura 32 s'observa clarament com el Dlx5 no pot unir-se a l'ADN quan la caixa TAATTA es troba mutada.

RESULTATS

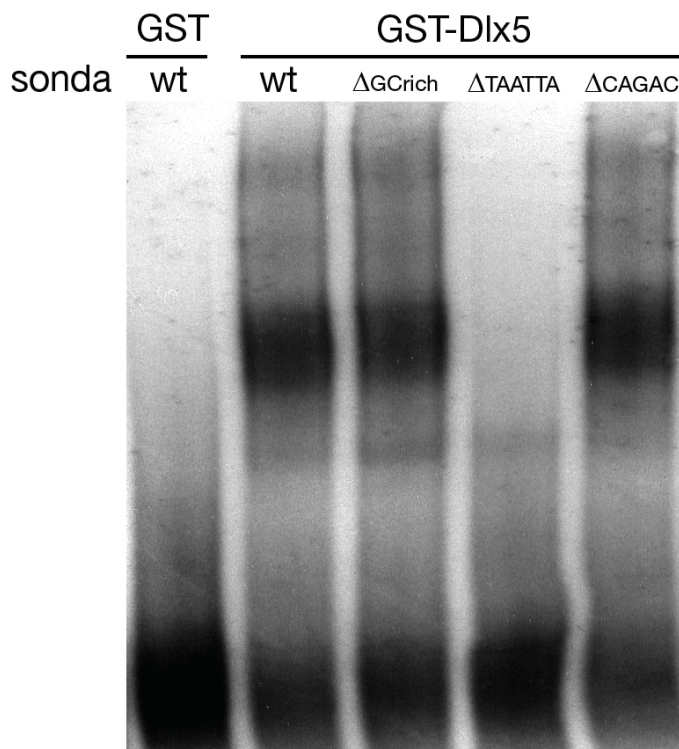


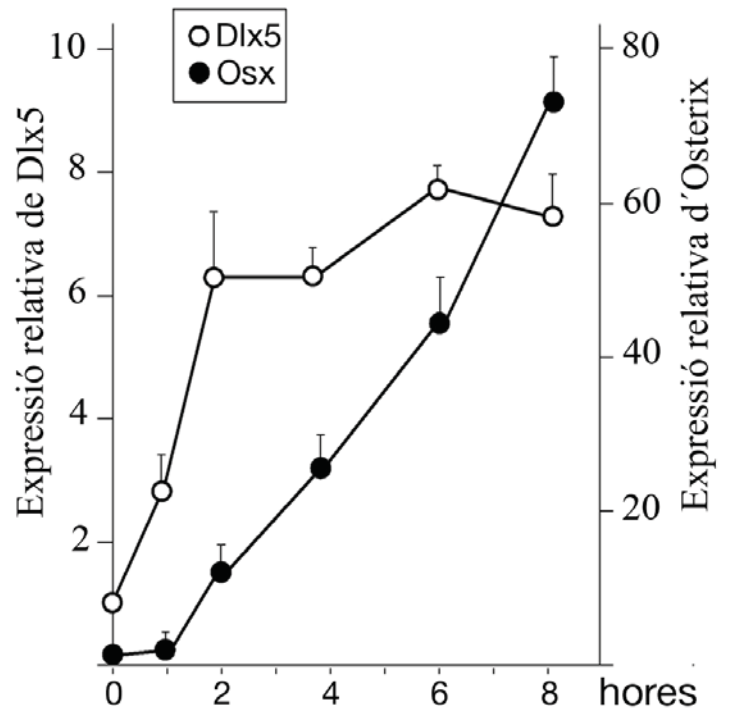
Figura 32: Assaig de Retard en Banda (EMSA) d'Oligonucleòtids del promotor mínim, wt o mutants, marcats amb ^{32}P incubats amb proteïna GST-Dlx5 recombinant.

Ja havia estat descrit en la bibliografia que Dlx5 s'activa en resposta a BMP-2 en cèl·lules C2C12 per acció de la via de les Smads (Ryoo et al., 2006; Lee et al., 2003a). Mancava comprovar si aquesta activació era anterior a la d'Osterix, la qual cosa ens serviria per recolzar la hipòtesi que Dlx5 és un gen *upstream* d'Osterix. Tal com es pot veure a la figura 33, l'ARN de Dlx5 s'indueix 1-2h després d'afegir BMP-2 al medi i es manté elevat fins a les 8 hores. La inducció d'Osterix per BMP-2, en canvi, és posterior, resultat que està en concordància amb el que s'havia observat en altres treballs (Nakashima and de Crombrughe, 2002 apèndix) Hem observat resultats similars en la línia cel·lular MC3T3-E1, la qual és model d'osteoblasts més madurs.

Per tal de comprovar que la unió de Dlx5 al promotor d'*osterix* és funcional, vam dissenyar experiments de silenciació i sobreexpressió de Dlx5 en cèl·lules C2C12 i vam estudiar-ne l'efecte en l'expressió d'*osterix*, tant sobre el gen endogen com realitzant assajos luciferasa en cèl·lules transfectades amb el promotor mínim.

RESULTATS

Fig 33. *Time course* de l'ARN missatger de *dlx5* i *osterix* en cèl·lules C2C12 confluents induïdes per BMP-2 2nM fins a les 8h. Es mostren els resultats obtinguts per PCR Real-Time en 3 experiments independents. Les barres de desviació representen la Desviació Típica.



Per a realitzar els experiments d'interferència d'ARN ens vam servir de 3 siRNAs comercials, 2 contra Dlx5 (J9 i J10) i un control negatiu amb una seqüència "scrambled" que ha estat dissenyada per no interferir amb la transcripció de cap seqüència d'ARN coneguda d'humà, rata o ratolí. Vam assegurar-nos de que tots 3 siRNAs fossin produïts i purificats amb la mateixa tecnologia i en els mateixos buffers d'igual puresa, doncs hem observat que aquest punt és clau per descartar efectes inespecífics del siRNA control quan es vol fer experiments de silenciament.

RESULTATS

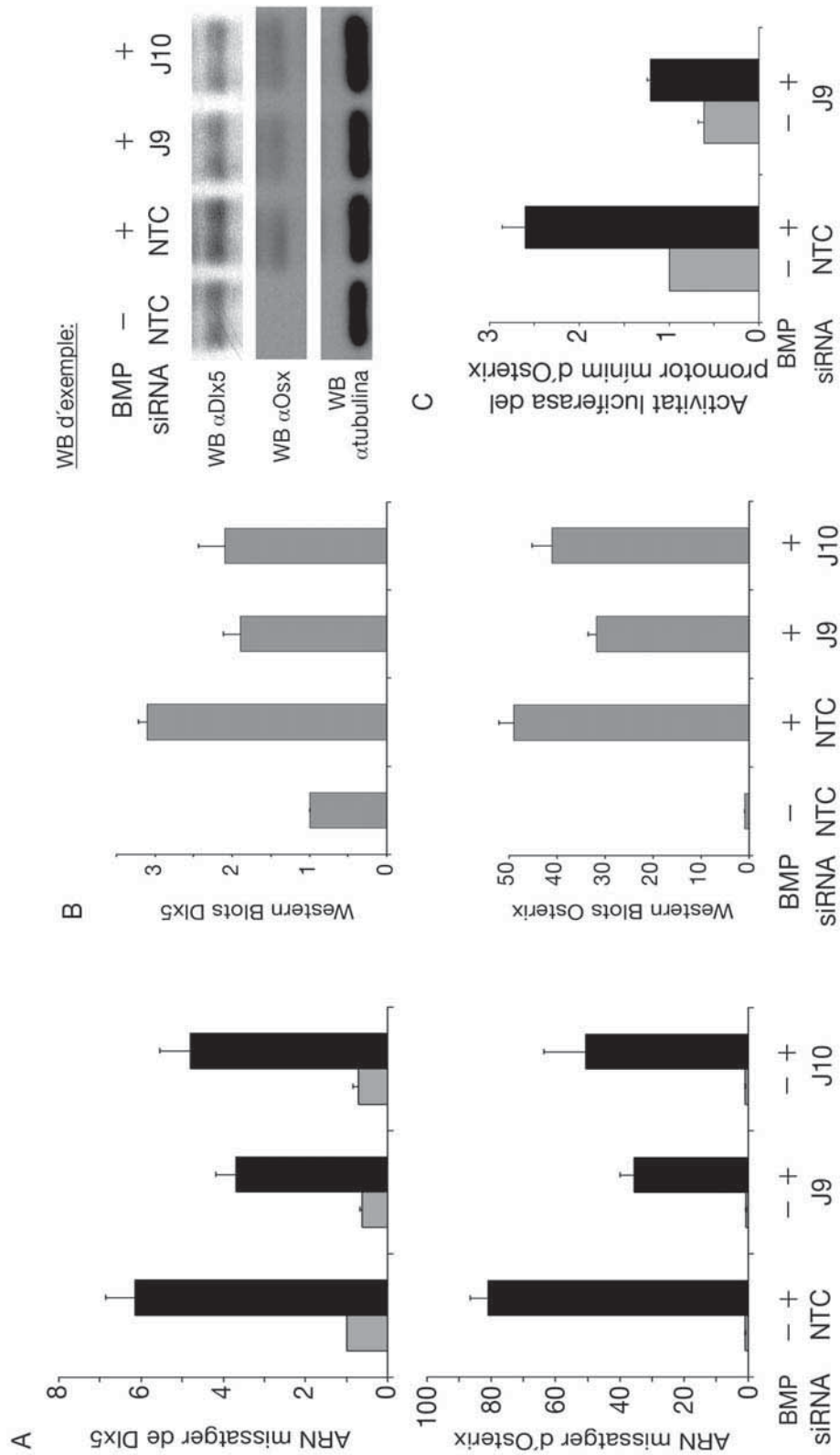


Figura 34. Silenciació mitjançant siRNAs. Cèl·lules C2C12 van ser transfectades amb 200 pmols de siRNAs contra Dlx5 o un control *scrambled*, deplecionades O.N. i tractades +/- BMP-2 durant 8 hores. Es detecta A) per PCR Real-Time, es mostra el resultat de 5 experiments normalitzats respecte GAPDH. B) Per Western-Blot, quantificats mitjançant el programa Bio-

RESULTATS

Rad Molecular Imager, es mostra un WB d'exemple C) Co-transfecció amb el promotor mínim i assaig luciferasa, es mostra el resultat de 4 experiments realitzats com en els casos anteriors.

Ambdós siRNAs, i especialment J9, disminueixen la expressió de Dlx5 tant en presència com en absència de BMP-2, tal i com es pot apreciar a la figura 34. Aquest fet provoca una disminució d'Osterix tant a nivell del seu ARN missatger (fig 34A) com de la seva proteïna (fig 34B). També vam provar de co-transfectar el siRNA J9 conjuntament amb el *reporter* del promotor mínim, observant-se una clara disminució de l'activitat de la luciferasa tant en el seu nivell basal com en la seva inducibilitat per BMP-2 (fig 34C).

Aquest experiment demostra que la silenciació de Dlx5 reprimeix l'expressió d'Osterix i tenint en compte els experiments anteriors, podem deduir que aquest efecte és pel fet d'impedir la unió del Dlx5 a la regió del promotor mínim d'*osterix*.

Per tal d'estudiar l'efecte de la sobreexpressió de Dlx5, vam procedir a transfectar diferents vectors d'expressió de Dlx5 conjuntament amb el *reporter* del promotor mínim (fig 35) o bé en solitari per estudiar l'efecte en el gen *osterix* endogen. En ambdós casos l'addició de BMP-2 provoca un efecte additiu que no pot ser explicat per la inducció del Dlx5 endogen, doncs la sobreexpressió produïda per la transfecció d'aquest és molt superior a la inducció de la forma endògena. Aquest efecte de Dlx5 no s'aprecia al co-transfectar el promotor mínim d'*osterix* en la forma mutada que no conté la caixa TAATTA (fig 35).

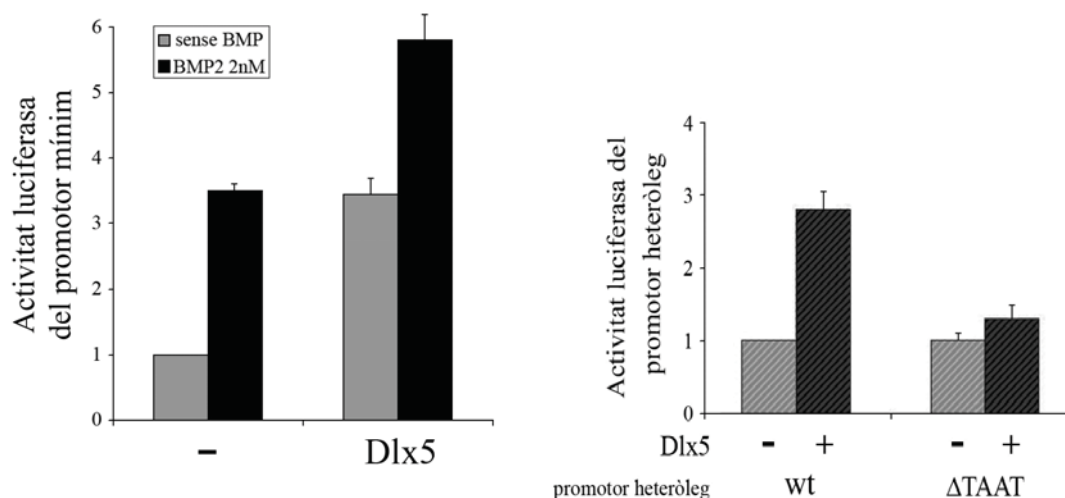


Figura 35. Efecte additiu de BMP-2 en la sobreexpressió de Dlx5 sobre el *reporter* del promotor mínim d'*osterix*, es mostren els resultats de 7 assaigs luciferasa d'experiments independents realitzats com en els casos anteriors. Al gràfic de la dreta es mostra l'efecte de Dlx5 en el promotor d'*osterix* heteròleg wt o Δ TAAT.

Aquest efecte additiu que observem demostra que si bé BMP-2 regula el promotor d'*osterix* a través de la unió de Dlx5 al seu promotor, aquest efecte no és únicament a través d'induir l'expressió de Dlx5.

La primera hipòtesi que ens vam plantejar fou que la via de les Smads, la via de transducció de senyal activada per BMP-2 més estudiada i caracteritzada, podria estar

RESULTATS

implicada directament en la regulació d'Osterix i no només a través d'activar Dlx5. La lleugera variació en l'activitat basal luciferasa de la construcció mutant per la caixa CAGAC i la proximitat d'aquesta al lloc d'unió de Dlx5, sumat al fet que *osterix* estigui activat transcripcionalment per BMP-2, apuntaven en aquesta direcció.

Cal dir que la regió del promotor on hi ha major presència d'elements susceptibles de ser units per les Smads ha estat deletada en l'estudi del promotor sense cap variació en la resposta a BMPs, concretament existeix un lloc canònic per la unió de Smad1 a -654 de l'inici de transcripció, en una regió d'ADN que segons un estudi recent es troba molt metilada (Lee et al., 2006b).

Ni en els experiments de co-transfecció de les Smads amb el promotor mínim ni amb el Cluster II sencer vam observar cap inducció de l'activitat luciferasa, ni en experiments de Pull-down i EMSA vam observar cap unió de les Smads 1, 4 i 5 al promotor d'*osterix*. No obstant, tenint en compte que la caixa CAGAC –que és una seqüència canònica d'unió a l'ADN per Smad4– està molt propera al lloc d'unió a l'ADN de Dlx5 i que en la bibliografia existeix l'antecedent de que un altre membre de la família Dlx –concretament Dlx1– interactua amb la Smad4 (Chiba et al., 2003), vam pensar en la possibilitat de que Smad4 interaccionés físicament amb el Dlx5.

Per estudiar la possible interacció de Dlx5 i Smad4, vam co-transfectar Flag-Smad4 en presència o absència de His-Dlx5 i vam immunoprecipitar aquest últim. No vam observar coimmunoprecipitació de Smad4 en cap cas. Vam repetir aquest experiment múltiples vegades sempre amb resultat negatiu, tal i com s'observa a la figura 36. També vam provar el mateix experiment per veure si Dlx5 immunoprecipitava amb les Smads 1 i 5 que són les Smads receptores per BMP, però tampoc en aquest cas vam observar cap resultat que recolzés aquesta hipòtesi.

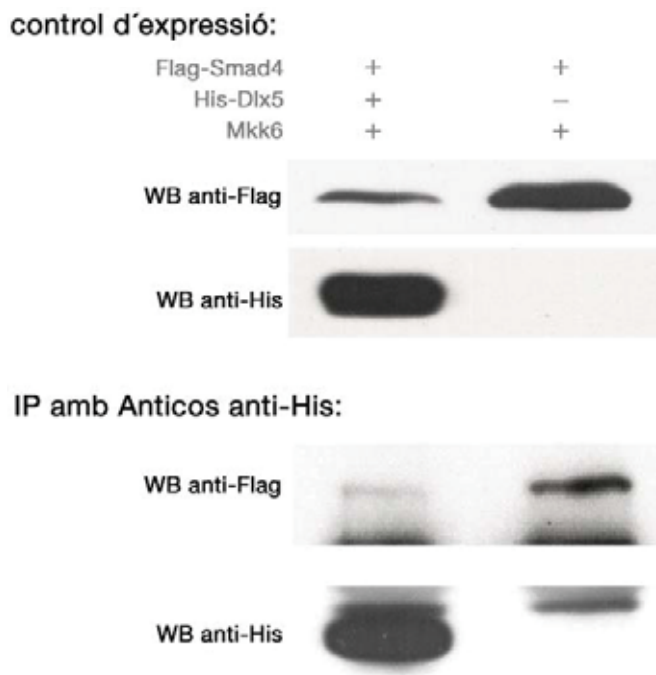


Figura 36. Immunoprecipitació de Dlx5 i Smad4. Es mostra un experiment en que s'ha realitzat la immunoprecipitació de His-Dlx5 amb un anticòs α -His.

RESULTATS

La següent hipòtesi va ser plantejar-nos si BMP-2 podria provocar aquest efecte additiu a la unió de Dlx5 al promotor d'*osterix* per una via independent de Smads.

Tal i com hem vist a la introducció, existeixen vies independents de les Smads *downstream* dels receptors de BMP. És el cas de la proteïna la via de p38-MAPK. S'havia demostrat en articles recents que l'activació de p38-MAPK està involucrada en l'expressió d'Osterix (Celil et al., 2005, Wang et al., 2007), així doncs vam plantejar-nos si p38-MAPK podria regular a Dlx5 i de quina manera.

Vàrem cotransfectar el *reporter* del promotor mínim d'Osterix amb un vector per la proteïna Mkk6 constitutivament activada, la qual activa a p38-MAPK a través de la seva fosforilació (Engelman et al., 1999; Nebreda and Porras 2000). El resultat, el qual es pot observar en la figura 37, indica que per si sol, l'Mkk6 ja incrementa l'activitat del *reporter* del promotor mínim, però és al cotransfectar-lo amb Dlx5 que s'observa clarament com l'Mkk6 realitza un efecte additiu al Dlx5 comparable al de BMP-2. Cal esmentar, però, que la suma de Mkk6 i BMP-2 al Dlx5 té un efecte encara major que els 2 factors per separat, podria ser que aquest efecte indiqui la participació d'altres factors en el procés o bé que el mutant de Mkk6 constitutivament actiu indueixi un efecte quantitativament molt superior a l'activació fisiològica induïda per BMP-2.

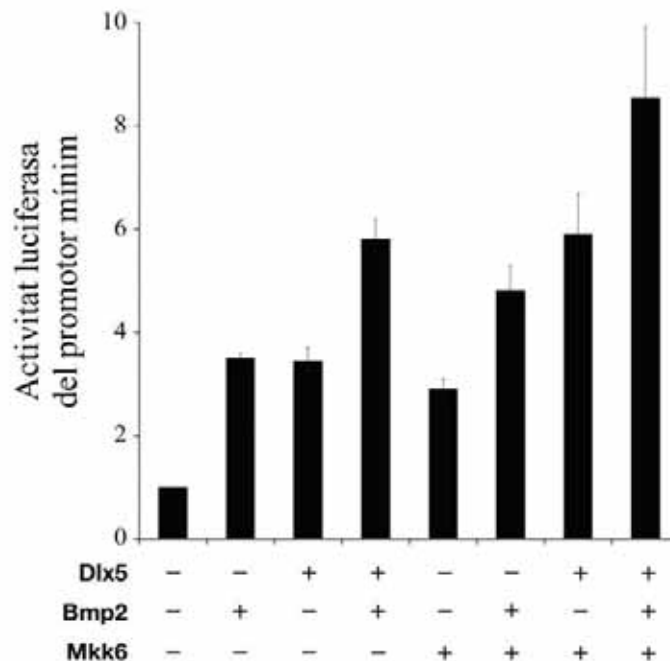


Fig 37. Efecte en l'activitat del *reporter* luciferasa del promotor mínim de co-transfectar amb un plàsmid codificant per una forma constitutivament activa de Mkk6. Es mostra el resultat de 3 experiments independents realitzats com els anteriors. (Aquests resultats són obtinguts en col·laboració amb altres membres del grup).

Quedava resoldre com la p38-MAPK podia tenir aquest efecte d'incrementar el potencial d'acció de Dlx5. Vàrem fixar-nos que en la proteïna Dlx5 existeixen seqüències consensu d'aminoàcids amb residus serina que podrien ser fosforilats per MAPKs. També havíem observat que l'expressió de Dlx5 en Western Blot es veu en

RESULTATS

forma de dues bandes, la més retardada de les quals podria correspondre a una fosforilació. Així doncs vam procedir a estudiar l'efecte de la via p38-MAPK en la fosforilació de Dlx5.

Tal com es pot veure en la figura 38A, la co-transfecció de Mkk6 amb Dlx5 incrementa la banda més retardada en el Western blot contra Dlx5, la qual desapareix si s'afegeix SB203580 al medi. De la mateixa manera, la addició de Fosfatasa Alcalina reverteix totalment la banda retardada, tal i com es pot veure a la figura 38B en que el Dlx5 ha estat marcat amb ³⁵S-metionina i tractat amb Fosfatasa Alcalina.

La fosforilació de Dlx5 també va ser estudiada utilitzant la proteïna recombinant GST-Dlx5 fosforilada *in vitro* amb γ 32P-ATP per una forma constitutivament activa de p38-MAPK. (fig 38C)

Per tal de comprovar que efectivament BMP és la responsable de l'activació de p38, vam estudiar el grau de fosforilació de Dlx5 endogen i l'activació de p38 en extractes de cèl·lules C2C12 a les 0, 2 i 4 hores de ser tractades amb BMP-2 2nM. (fig 38D). Efectivament, p38-MAPK fosforilada s'observa a partir de les 2 hores d'afegir BMP-2 a les cèl·lules C2C12 i al mateix temps s'incrementa la banda més retardada de Dlx5 respecte la banda inferior i la seva expressió total.

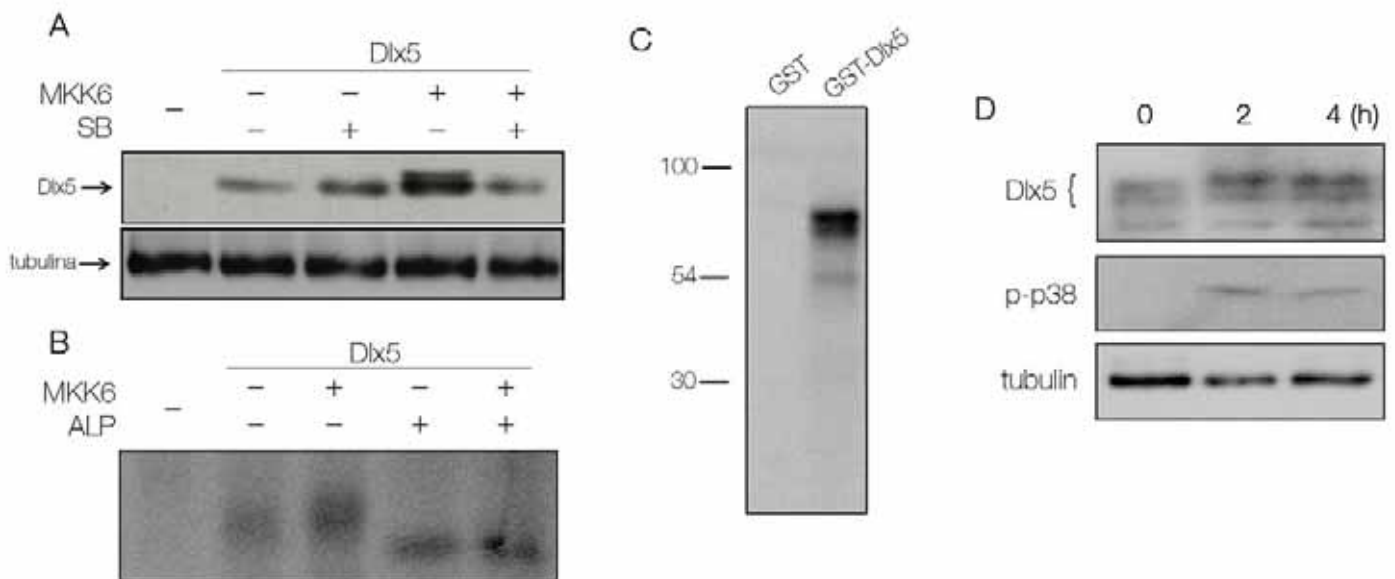


Fig 38. A) Western Blot on s'observa o no una banda retardada per efecte de Mkk6 i SB203580 10 μ M sobre la proteïna Dlx5 expressada en cèl·lules HEK-293. B) Efecte sobre la banda retardada de Dlx5 de tractar amb Fosfatasa Alcalina extractes de cèl·lules 293 marcades amb ³⁵S-Metionina. El Dlx5 ha estat immunoprecipitat amb els anticossos policlonals C-20 i Y-20 de Santa Cruz. C) Fosforilació *in vitro* de GST-Dlx5 mitjançant p38 activada i ³²P, resultat en gel SDS-PAGE i visualitzat per autoradiografia D) BMP-2 fosforila p38 *in vivo* en cèl·lules C2C12. S'ha usat un anticòs contra la forma fosforilada de p38 (p-p38).

RESULTATS

En aquest punt ens vam preguntar si aquesta fosforilació de Dlx5 podria incrementar la seva afinitat per l'ADN o bé la seva vida mitja abans de ser degradat. Vam fer un experiment de retardament de banda (EMSA) utilitzant GST-Dlx5 tractat o sense tractar amb p38-MAPK constitutivament activada. Tal i com es pot veure a la figura 39, la fosforilació de Dlx5 no sembla incrementar la seva afinitat per l'ADN, observant-se una intensitat de la banda retardada similar en ambdós casos. Tampoc vam observar diferències en la vida mitja de Dlx5 en presència o absència de Mkk6 quan tractàvem les cèl·lules amb cicloheximida (fig 39).

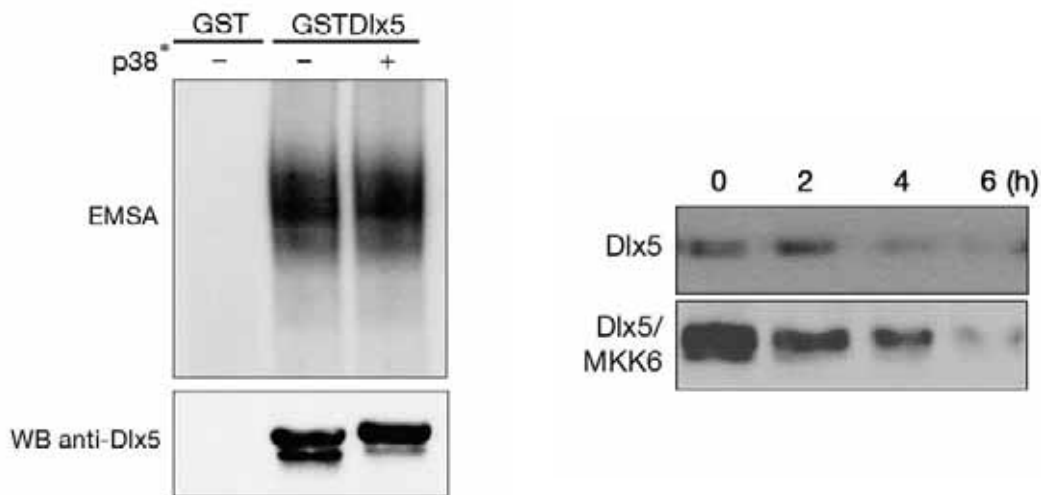


Figura 39. A l'esquerra, EMSA utilitzant la sonda wt del promotor mínim i GST-Dlx5 incubat amb ^{32}P +/- p38-MAPK activada. A la dreta, cèl·lules HEK-293 transfectades amb les construccions indicades i 24 h més tard tractades amb cicloheximida els temps indicats. Dlx5 és detectat per Western Blot.

El següent pas va ser veure la unió de Dlx5 fosforilat o sense fosforilar al promotor endogen d'*Osterix*, per a fer això vam fer un assaig de precipitació de cromatina (Chromatin IP). Aquesta tècnica permet estudiar la unió de proteïnes específiques a un lloc del genoma o bé els co-factors units a aquestes proteïnes, doncs en aquest experiment les cèl·lules han estat tractades amb formaldehid i les proteïnes es troben unides a l'ADN i entre sí de forma covalent.

Les cèl·lules van ser transfectades amb Flag-Dlx5 sol o junt amb Mkk6 i vam immunoprecipitar els complexos proteics units al promotor amb anticossos contra: Flag (per precipitar el Flag-Dlx5), p300, Histona3 acetilada, RNAPolimerasaII i contra IgG com a control negatiu. El resultat que es pot observar a la figura 40 fou que el Dlx5 és capaç d'unir-se al promotor d'*osterix* endogen *in vivo* i per sí sol és capaç de reclutar p300, Histona 3 acetilada i la RNA polimerasa II. Sembla que la fosforilació de Dlx5 faci que la unió d'aquest a l'ADN i el reclutament de p300 siguin més intensos, podent indicar aquest fet que algun altre factor o co-factor podria interactuar amb Dlx5 fosforilat a l'hora de formar el complex que s'uneix al promotor d'*osterix*.

RESULTATS

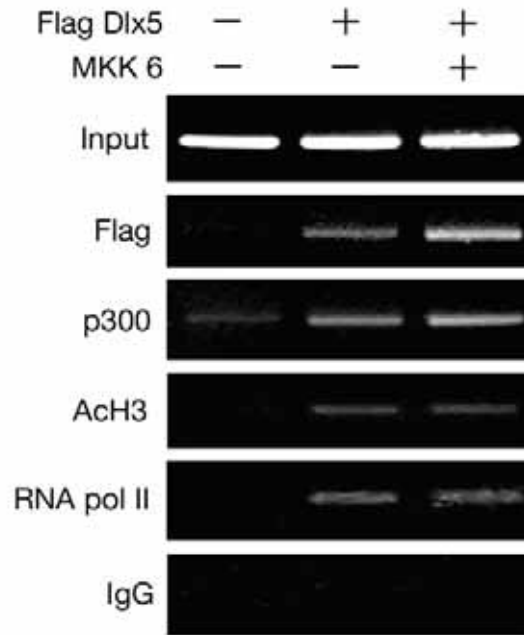


Fig 40. CHIP (immunoprecipitació de cromatina). Es van transfectar cèl·lules C2C12 amb les construccions indicades. Els complexos ADN-proteïna es van incubar amb anticossos contra Flag, p300, Histona 3 acetilada, ARN polimerasall i IgG com a control -.

Per tal de comprovar si la interacció de p300 amb Dlx5 té un rol funcional, vam co-transfectar un vector d'expressió de p300 o bé la seva forma mutada (que no té activitat Histona acetil-transferasa) amb el promotor mínim d'*osterix*, observant-se en el corresponent assaig luciferasa que efectivament la p300 pot incrementar el potencial de transactivació de Dlx5 mentre que la forma mutada no té aquest efecte. Aquesta observació és coherent amb el treball de Wang et al, en que ja s'havia observat que p300 podria ser un co-activador d'Osterix. (Wang et al., 2006). (figura 41)

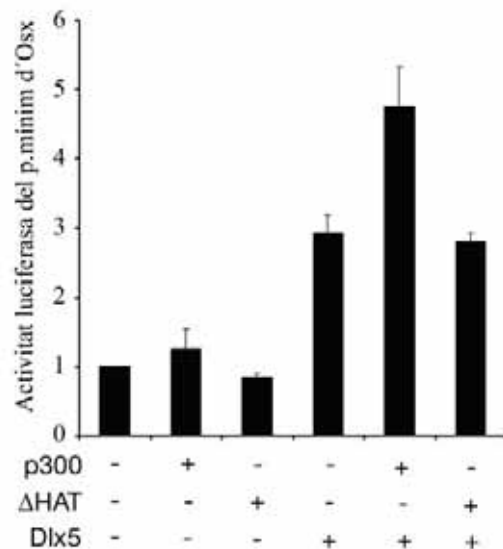


Figura 41. Efecte de p300 o la seva forma mutant (que perd l'activitat histona acetil-transferasa) sobre el *reporter* luciferasa del promotor mínim d'*osterix*. 3 experiments independents van ser realitzats com en els casos anteriors.

Per tal d'estudiar millor l'efecte en Dlx5 de la fosforilació per p38-MAPK, el nostre grup de recerca va generar mutants de Dlx5 en que els residus de serina 34 i 217 van ser substituïts per alanina. Aquestes mutacions van ser incorporades a un vector d'expressió

RESULTATS

bacteriana, per produir proteïna recombinant GSTser34/217alaDlx5 (que anomenarem GSTDlx5mut).

Les formes GSTDlx5 i GSTDlx5mut van servir per estudiar la fosforilació de Dlx5 per p38-MAPK *in vitro*. Vam procedir a realitzar un assaig kinasa amb la presència d'una forma p38-MAPK constitutivament activa i el GSTDlx5 en la seva forma wt o mutada. Tal i com es pot veure en la figura 42, p38 no pot fosforilar la forma mutada mentre sí que ho fa en la forma *wild type*.

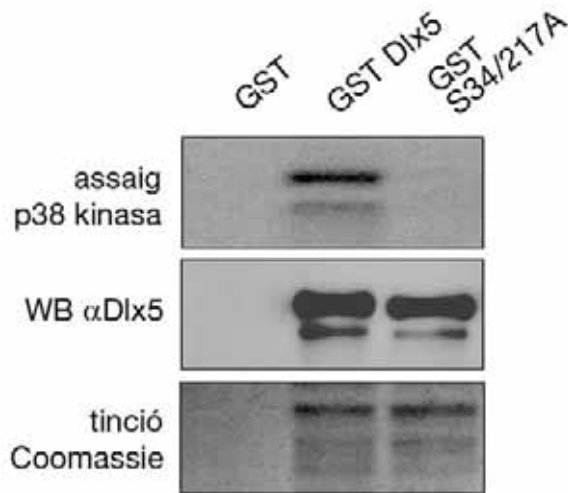


Figura. 42. Fosforilació de GSTDlx5 i el mutant S34/217A *in vitro* mitjançant p38-MAPK constitutivament activa i ³²P, visualitzat mitjançant Autoradiografia, Western-Blot o tinció de Coomassie en un gel SDS-PAGE.

Aquests resultats demostren que en el nostre model de cèl·lules C2C12 l'efecte de BMP-2 en la inducció d'Osterix és a través de la inducció de Dlx5 i que la fosforilació d'aquest per part de p38MAPK incrementa el seu potencial transactivador. Però aquests resultats només els havíem vist en cèl·lules C2C12 que són pre-mioblasts de ratolí amb capacitat de diferenciar a llinatge osteoblàstic. Volíem veure si aquests efectes s'observaven també en un llinatge osteoblàstic més madur.

Teníem a la nostra disposició cèl·lules SaOs2, que són cèl·lules d'osteosarcoma humà, les quals expressen marcadors de llinatge osteoblàstic sense necessitat de BMP-2. En aquest model Osterix s'expressa en absència de BMP-2 mentre que en les cèl·lules C2C12 la proteïna d'osterix s'indueix a les 8-16 hores d'haver afegit BMP-2.

Vam transfectar el *reporter* del promotor mínim d'*osterix* en cèl·lules SaOs2 i vam observar que l'efecte de l'addició de BMP-2 en la inducció de l'activitat luciferasa és més modest que en les C2C12, probablement perquè l'activitat basal també és més elevada. L'efecte en l'activació del promotor mínim al co-transfectar Dlx5, en canvi, es manté (figura 43).

RESULTATS

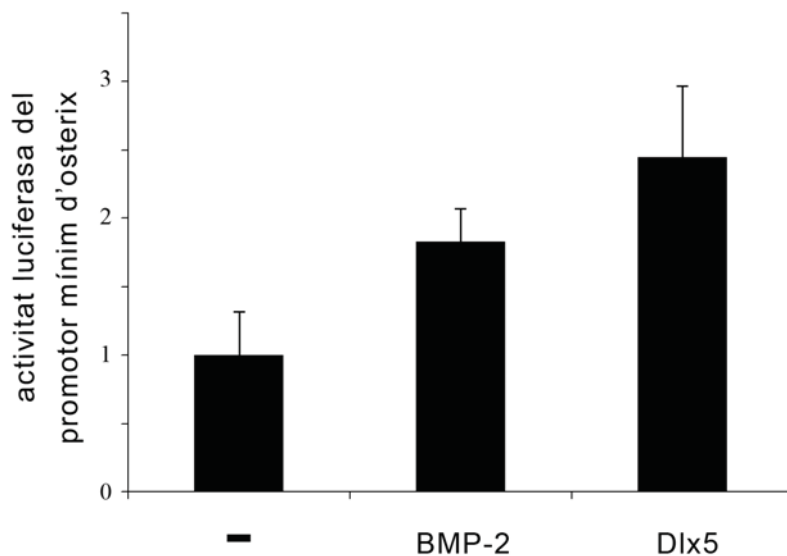


Figura 43. Transfecció del *reporter* del promotor mínim d'*osterix* en cèl·lules SaOs2. La lectura de l'activitat luciferasa es va realitzar 24 hores després d'afegir BMP-2 2nM.

Tal i com hem vist a la introducció, s'ha publicat recentment en la bibliografia que p53 és un regulador negatiu d'Osterix, però no es coneix per mitjà de quin mecanisme (Wang et al., 2006). Els autors de l'estudi havien clonat el promotor d'Osterix, i havien realitzat assaigs luciferasa en C2C12 analitzant l'efecte de deleccionar aquest d'una manera similar al que hem fet nosaltres. En el seu cas estudiaven la capacitat de la proteïna p53 o mutants d'aquesta per silenciar l'activitat del promotor.

L'estudi de les deleccions els va portar a aïllar el promotor mínim que hem descrit, considerant erròniament la caixa TAATTA com una caixa TATA on s'uneix l'ARN polimerasa II; van concloure que p53 té una acció repressora de la regió d'ADN que nosaltres hem descrit com al promotor mínim d'*osterix*. També havien arribat a la conclusió que l'acció repressora de p53 és independent de la unió directa d'aquesta a l'ADN però que podia estar relacionada amb p300. En el citat estudi també s'estudia si p53 podria estar reprimint l'expressió de l'ARN missatger de Dlx5 però els autors no van observar variacions en aquest.

Nosaltres ens vam preguntar si l'acció de p53 podria ser deguda a que aquesta proteïna estigués segrestant Dlx5 sense variar-ne els nivells d'expressió, la qual cosa explicaria també la relació de p300 amb aquest fenomen. Per això vam fer una sèrie d'experiments d'Immunoprecipitació per tal de buscar una possible interacció directa entre p53 i Dlx5. Tal i com es mostra a la figura 44, en cap dels experiments vam aconseguir observar unió de p53 a Dlx5.

RESULTATS

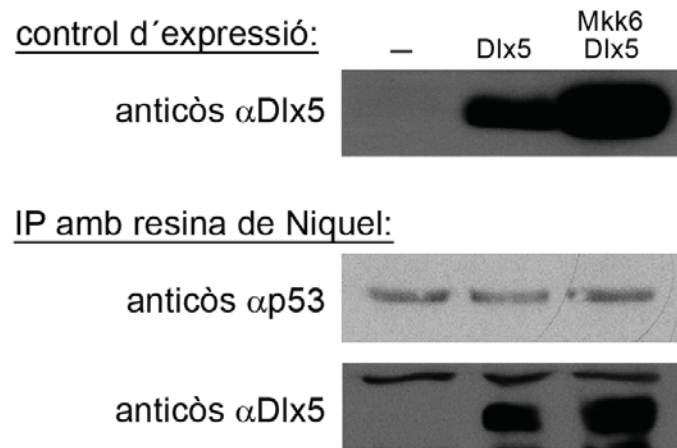


Figura 44. Estudi de la possible immunoprecipitació de p53 i HisDlx5. Incubació de *Ni-beads* (resina amb níquel) amb extractes de cèl·lules transfectades amb les construccions indicades i posterior immunoprecipitació. S'ha estudiat per WB el possible enriquiment per la proteïna p53 posteriorment a la immunoprecipitació.

Val a dir que de moment no contem amb un mètode ben descrit per induir p53 en les cèl·lules C2C12, així que vam estudiar l'efecte de p53 sobre osterix utilitzant un clon de cèl·lules SaOs2 que són defectives per p53 però que han incorporat establement una construcció de p53 induïble per la simple addició de Doxiciolina. (Bensaad et al., 2006)

Vam caracteritzar aquest model i vam veure que, tal i com s'havia publicat, la presència de p53 és màxima a les 24 hores d'afegir doxiciolina, així que vam mirar l'efecte de p53 en Osterix a les 24 hores d'inducció amb doxiciolina en presència o absència de BMP-2. Vam realitzar un experiment de Western blot per estudiar què passa amb Osterix en aquests clons al expressar-se p53. Efectivament, la inducció de p53 reprimeix l'expressió d'Osterix i tal com es pot veure a la figura 45, podem observar que l'efecte repressor de p53 té lloc tant en cèl·lules tractades amb BMP-2 com en cèl·lules sense tractar.

RESULTATS

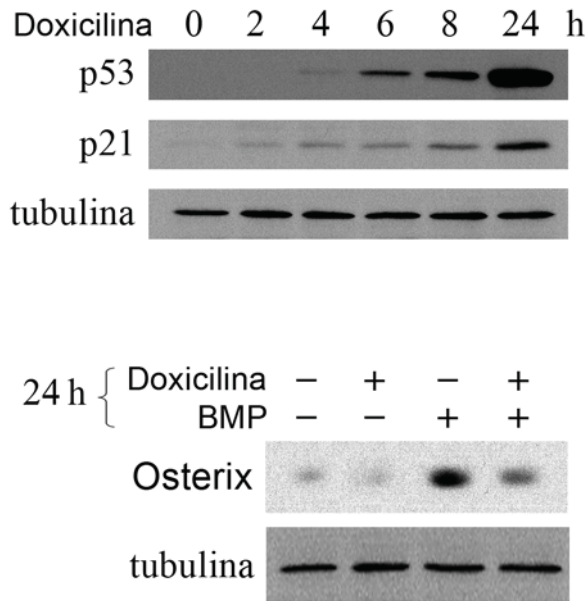


Figura 45. *Time course* de cèl·lules SaOs2 induïbles, tractades amb Doxiciclina 2µg/ml. Estudi per Western Blot de l'expressió de les proteïnes p53, p21 i Osterix.

No obstant el que està publicat, no vam observar efecte de p53 sobre el promotor mínim d'*osterix* al transfectar la construcció *reporter* d'aquest al clon induïble de cèl·lules SaOs. L'activitat luciferasa es mantenia al mateix nivell en presència o en absència de doxiciclina durant 24 hores (figura 46). Val a dir que els experiments publicats al treball de Wang et al estaven realitzats en cèl·lules C2C12 on p53 podria comportar-se de manera diferent.

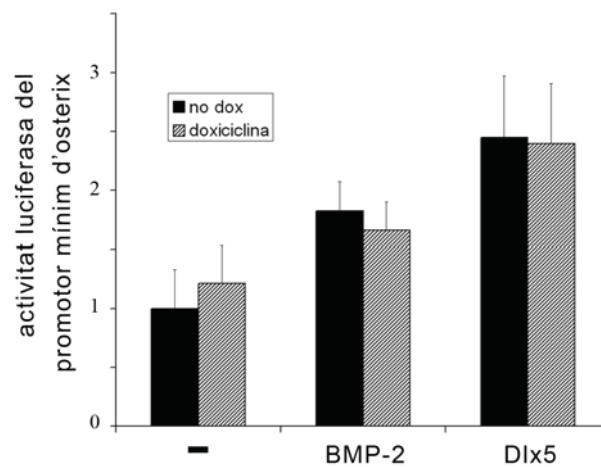


Fig 46: transfecció del *reporter* del promotor mínim d'*osterix* en cèl·lules SaOs induïbles +/- doxiciclina 2µg/ml que força l'expressió de p53.

RESULTATS

2-Recerca de nous gens *downstream* de BMP-2

2.1 PCR sobre cADN substret per hibridació

La substracció d'ADN és una tècnica que permet comparar entre l'ARN missatger de 2 poblacions de cèl·lules a les quals s'ha fet un tractament diferent i obtenir així una col·lecció de gens que són expressats diferencialment en una població respecte a l'altra. Existeixen diferents mètodes de substracció, molts dels quals comprenen la hibridació de cADN d'una població (*tester*) amb un excés de cADN d'una segona població (*driver*) i la separació de la fracció que no hibrida.

No obstant ser mètodes molt usats, tenen la limitació que no són gaire eficients per la identificació de trànscripats poc abundants, com per exemple certs factors de transcripció, doncs la quantitat d'ARN missatger d'aquests gens és molt inferior a la d'altres gens. A més, aquestes tècniques normalment necessiten gran quantitat d'ARN missatger de partida.

La PCR sobre cADN substret per hibridació permet amplificar fragments de cADN diferencialment expressats i simultàniament suprimir els fragments de cADN no desitjats gràcies a uns adaptadors amb seqüències repetides invertides que s'uneixen als trànscripats de cADN i supprimeixen selectivament l'amplificació per PCR d'aquells trànscripats no desitjats. A més, aquest mètode de substracció permet igualar la quantitat d'ARN missatger de diferents gens, permetent -segons s'ha descrit- un enriquiment de fins a 1000 vegades dels trànscripats menys abundants (Diatchenko et al., 1996).

Per realitzar aquesta tècnica vam partir d'ARN missatger de cèl·lules C2C12 tractades amb o sense BMP-2 durant 6 hores, que posteriorment vam retro-transcriure a ADN per poder-lo manipular. Cadascuna de les poblacions va ser digerida, dividida en 2 i cada meitat va ser unida a adaptadors diferents. Els adaptadors estaven desfosforilats per un dels extrems de forma que només es podien enganxar a l'ADN en un sentit.

La primera hibridació consisteix a incubar l'ADN unit als adaptadors (*tester*) amb un excés d'ADN de l'altra condició (*driver*), aquest pas permet que només quedin lliures les molècules de cADN que es trobin en una població però no en l'altra. També permet normalitzar els cADNs que s'expressen en menor quantitat dins d'una mateixa població, això és gràcies a que els cADNs més abundants s'uneixen a les seves cadenes complementàries generant-se homohíbrids amb iguals adaptadors amb més facilitat que els que corresponen a gens menys expressats (Diatchenko et al., 1996).

En la segona hibridació s'ajunten les mostres amb els 2 adaptadors diferents encara hibridades amb l'excés d'ADN *driver* i es realitza una breu incubació amb una polimerasa a 75 °C per omplir els extrems en el cas que només hi hagi un adaptador lligat. En la PCR els cADNs que només es troben en la població *tester* seran amplificats i la diferència entre diferents poblacions de cADN serà normalitzada en part.

Vam fer un control de la substracció on vam comprovar que havíem aconseguit enriquir el cADN de 2 factors de transcripció dels quals ja estava descrita la seva inducció per BMP-2: Cbfa1 i Id1. La figura 47 mostra l'ampliació del trànscripats per aquests gens en la mostra substrete i sense substreure en els cicles 18, 23, 28 i 33 d'una

RESULTATS

PCR. En el cas de la mostra sense substreure, el senyal per aquests gens apareix més tard, en el cas de Runx2 l'augment és més notable que en el cas d'Id1 el qual a les 6 hores d'afegir la BMP-2 ja no està tant sobreexpressat. Lamentablement, no disposàvem d'encebadors per a cap gen reprimit per BMP-2.

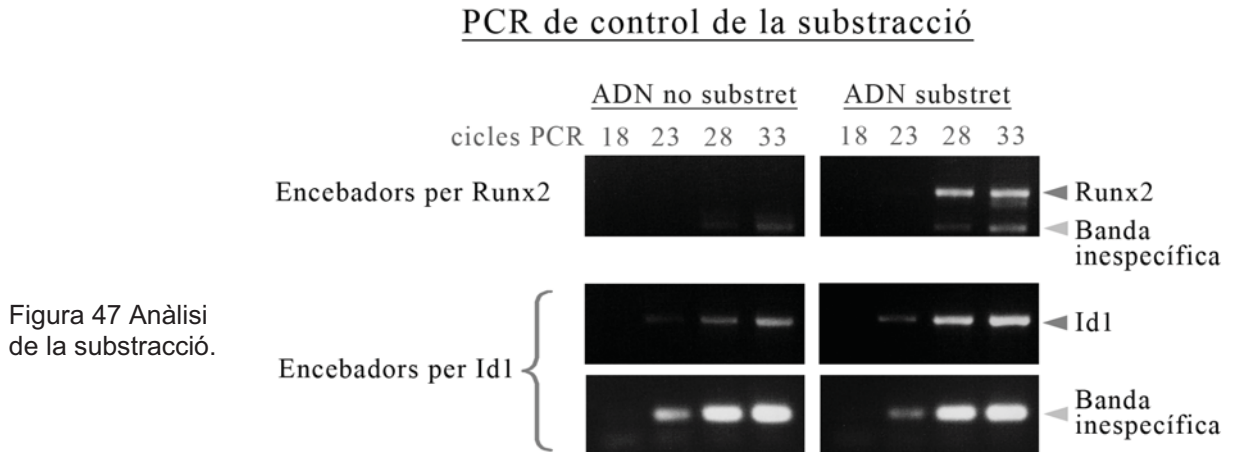


Figura 47 Anàlisi de la substracció.

Un cop comprovada l'eficiència de la substracció vam procedir a clonar els trànscripats amplificats per PCR en un vector TOPO TA-cloning, el qual conté topoisomerasa I en el seu lloc de clonatge la qual facilita la inserció de fragments amplificats per PCR. Els clons de bacteres transformades amb el producte de la PCR constitueixen dues llibreries de trànscripats induïts o reprimits per BMP-2 a les 6 hores de tractament de cèl·lules C2C12.

Sobre cada colònia vam poder amplificar l'insert mitjançant els encebadors que el mateix kit de clontech proporciona. En alguns casos no detectàvem cap insert o en detectàvem més d'un, però amb paciència vam arribar a recuperar 58 inserts de gens candidats a ser induïts per BMP-2 i 41 de gens candidats a ser reprimits. Vam transferir el producte d'ampliació d'aquests gens a una membrana de nylon i vam hibridar amb els productes de les PCR de la segona hibridació digerint els adaptadors per evitar unions inespecífiques.

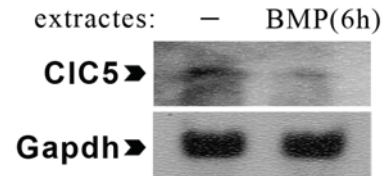
El resultat del Dot-Blot, bàsicament orientatiu, indicava que alguns trànscripats estaven enriquits per una de les condicions, d'altres eren falsos positius. Vam seqüenciar els que semblaven tenir expressió diferencial, alguns es corresponien a seqüències que no codificaven per a cap gen conegut mentre que d'altres sí codificaven per gens coneguts, per exemple *β-espectrina 2*, *supervillina* o *miosina VI*. Vam decidir estudiar un dels candidats a ser reprimits per BMP: *clc5*, un canal de clor implicat en la malaltia de Dent la qual afecta principalment la reabsorció renal però també a la renovació de l'os.

Vam usar l'amplificació de l'insert com a sonda en un assaig northern-blot. Vam tractar de nou cèl·lules C2C12 +/- BMP-2 2nM durant 6 hores i vam hibridar l'ARN missatger extret amb les sondes marcades amb $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP. Vam observar que BMP disminuïa la quantitat d'ARN missatger de *clc5*. Vam confirmar aquests resultats fent un time-course que vam analitzar per PCR Real-Time on efectivament la BMP-2 disminueix l'expressió d'ARN missatger de *clc5* fins a aproximadament un 40% de la

RESULTATS

seva expressió inicial. El màxim de la repressió que observem té lloc entre les 4 i les 8 hores (fig 48).

northern blot:



PCR Real Time:

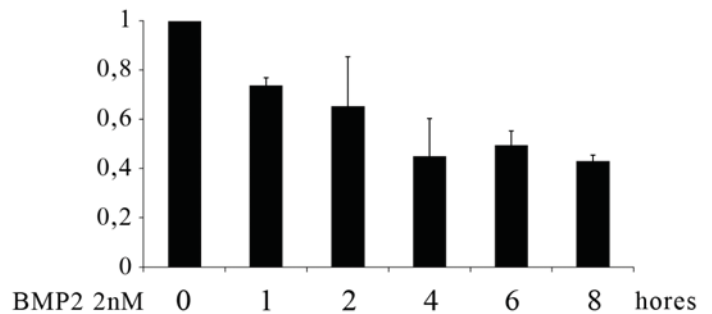


Figura 48 Efecte de BMP-2 en l'expressió de *clc5*, per Northern-Blot i per PCR Real-Time.

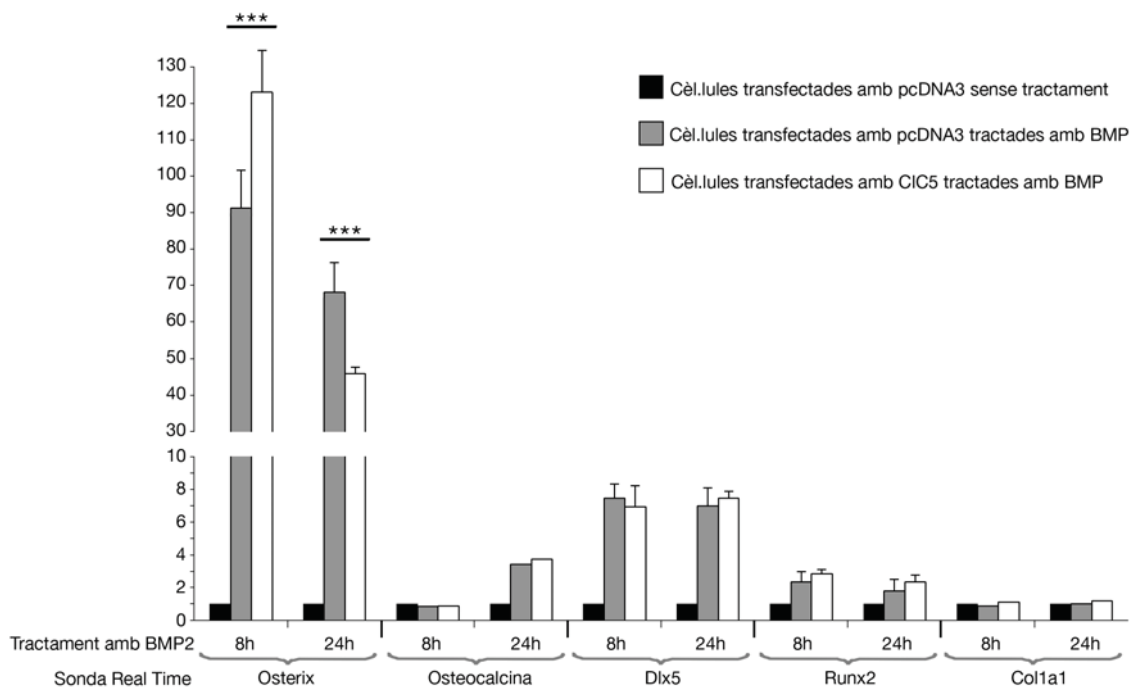


Figura 49 Transfecció d'un vector codificant per Clc5 en cèl.lules C2C12 i anàlisi de l'efecte en l'ARN missatger de gens marcadors osteoblàstics per PCR Real-Time

El següent pas va ser buscar si la inhibició del Clc5 per BMP-2 té algun sentit fisiològic, així que vam demanar un vector d'expressió pel Clc5 de rata (Steinmeyer et

RESULTATS

al., 1995; Lloyd et al., 1996), -el qual és molt similar al CIC5 de ratolí- i vam transfectar cèl·lules C2C12 amb aquest. Esperàvem veure algun efecte en algun gen per la incapacitat de BMP-2 de reprimir un gen sobreexpressat per mitjà d'un vector sota el control d'un promotor de citomegalovirus.

Vam estudiar el comportament de l'ARN missatger d'Osterix, Osteocalcina, Runx2, Dlx5 i Col·lagen1 a les 8 i a les 24 hores de tractar amb BMP-2 2nM. Només en el cas d'Osterix vam observar un comportament diferent en les cèl·lules tractades amb BMP, a les 8 hores el transcrit d'Osterix havia augmentat en un 25% mentre que a les 24 hores havia disminuït un 33% respecte a les cèl·lules control (figura 49). El fet que ni els nivells d'expressió de l'ARN missatger de Runx2 ni de Dlx5 es vegin afectats per la sobreexpressió del CIC5 fa pensar en la possibilitat d'una via diferent de regulació d'Osterix per BMP-2.

2.2 Construcció de clons induïbles per Dlx5 i Osterix

Els clons induïbles constitueixen una eina molt eficaç per estudiar la funció d'un gen en concret, doncs el fet que només se sobreexpressi el gen desitjat permet estudiar la seva funció independentment de la via de transducció de senyal que l'ha activat. A més és una eina molt més fina que la transfecció d'un plàsmid per a observar l'efecte de la sobreexpressió d'un gen, doncs al existir una sola còpia (o poques) del gen en cada cèl·lula la expressió d'aquest és més fisiològica. Una altra avantatge és que evita la transfecció amb liposomes, la qual sembla afectar a les cèl·lules: En el cas concret d'Osterix hem observat que la transfecció d'un plàsmid disminueix l'expressió del gen endogen.

L'any 1998 Chambard i Pognonec van descriure un mètode per obtenir clons de cèl·lules sota un promotor del tipus Tet-off, és a dir que l'expressió del gen en qüestió es troba reprimida en presència de tetraciclina en reduïdes quantitats: 30 ng/ml són suficients per reprimir l'expressió del gen induïble i no afecten a la fisiologia de les cèl·lules (Chambard and Pognonec, 1998).

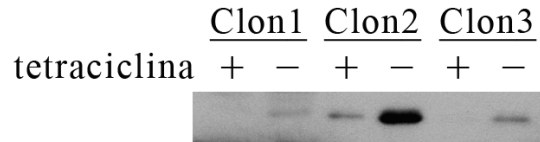
Vam plantejar-nos que obtenir clons induïbles per Osterix i Dlx5 ens permetria tenir una eina molt útil per estudiar l'efecte d'aquests gens en un context en que no estiguessin activades les vies de senyalització *downstream* de BMP-2.

Vam clonar Flag-Dlx5 i Flag-Osterix en el plàsmid PTISN que conté el promotor que respon al transactivador regulable per tetraciclina i codifica per una resistència a la geneticina i vam transfectar-lo a cèl·lules PT-Puro que són C2C12 transfectades establement pel transactivador (Viñals et al, 2004).

Vam tractar les cèl·lules amb Geneticina durant 10 dies i vam seleccionar els clons de cèl·lules resistents a aquests antibiòtics. A la figura 50 es mostra un Western-Blot en que s'observa la inducció d'alguns dels clons induïbles per Osterix. En el cas de Dlx5 no és possible realitzar un Western-Blot doncs existeix una banda inespecífica que coincideix amb el tamany de Flag-Dlx5, en aquest cas l'estudi de la expressió induïble es va fer per PCR real-time, confirmant-se la presència de clons induïbles per Dlx5 i la seva capacitat per estimular el promotor mínim d'*osterix*.

RESULTATS

Clons d'Osterix:



time course del clon2:

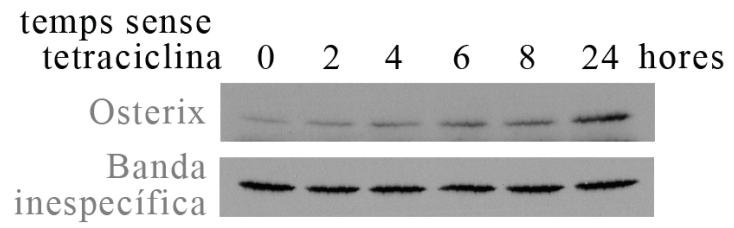


Figura 50. Screening per Western-Blot dels clons induïbles d'Osterix. S'ha utilitzat l'anticòs M2 α -Flag perquè la construcció incorpora aquest epítip.

RESULTATS

DISCUSSIÓ

*Dans les champs de l'observation,
l'hasard ne favorise que les esprits préparés.*
Louis Pasteur.

En aquesta tesi doctoral hem descrit els mecanismes moleculars pels quals el senyal de BMP-2 indueix l'expressió d'Osterix en les cèl·lules mesenquimals pluripotencials. Hem demostrat la involucració tant de les vies dependents de Smad com de les vies independents de Smads, aportant dades novedoses en l'estudi de la biologia molecular de la diferenciació dels teixits ossis.

No obstant, cal dir que hi ha altres factors implicats en el desenvolupament de l'os que també poden regular tant Osterix com altres proteïnes igualment essencials per a l'osteogènesi, i que per tant aquesta recerca no constitueix un punt i final sinó una contribució, en forma de resultats experimentals, a l'encaix d'unes peces més en el trencaclosques de la biologia del desenvolupament.

Consideracions tècniques

En la bibliografia existent sobre el desenvolupament de l'os, la inactivació o sobreexpressió de les diferents molècules implicades en aquest, siguin citoquines, kinases, receptors de membrana o factors de transcripció, dona el mateix fenotip en humans que en ratolins, això ens ha permès utilitzar indistintament gens d'humans i ratolins en els experiments de sobreexpressió que hem realitzat (Robledo et al., 2002; Karsenty and Wagner 2002; Karsenty, 2006).

L'experimentació que es presenta en aquesta tesi ha estat realitzada *in vitro* o en cèl·lules en cultiu. És important assenyalar que els efectes que veiem en els nostres experiments són coherents amb nombroses observacions presents en la bibliografia dutes a terme *in vivo* en animals.

La línia cel·lular més emprada en els nostres experiments ha estat la línia C2C12, de cèl·lules mesenquimals determinades al llinatge miogènic però que diferencien fàcilment al llinatge osteoblàstic en presència de BMP (Katagiri et al., 1994).

La línia C2C12 és un model típic per estudiar la diferenciació al llinatge osteoblàstic, el mateix gen *osterix* es va descobrir en un experiment de substracció de gens induïts per BMP-2 en aquesta línia cel·lular (Nakashima et al., 2002). No obstant, per poder concloure que els efectes observats en els nostres experiments no es deuen a efectes aïllats en una sola línia cel·lular, alguns dels experiments han estat repetits en altres llinatges cel·lulars com MC3T3 o SaOs2 que són línies d'origen mesenquimal més diferenciades al llinatge osteoblàstic.

Hem explicat en la introducció l'origen mesenquimal dels osteoblasts. Mirant pel microscopi òptic, els osteoblasts en cultiu són pràcticament indistingibles dels fibroblasts, la única diferència morfològica es troba fora de la cèl·lula en forma de matriu extracel·lular mineralitzada. La majoria de gens expressats en fibroblasts també ho són en osteoblasts i viceversa, tot i que els osteoblasts, tal com hem vist, expressen una sèrie de marcadors característics com Runx2, Osteocalcina o Osterix. Basant-se en aquestes observacions, el professor Gerard Karsenty ha proposat que els osteoblasts podrien ser considerats fibroblasts sofisticats (Ducy et al., 2000b).

DISCUSSIÓ

L'ús de la luciferasa per estudiar la resposta de les regions promotores de diferents gens a un gran nombre d'estímuls està molt extès en la bibliografia. L'estabilitat de la luciferasa dins de les cèl·lules ha estat estudiada en diferents tipus cel·lulars observant-se una gran variació de la vida mitja d'aquesta segons el tipus cel·lular, des de les 3 hores fins a les 12 hores (Thompson et al., 1991; Houten et al., 2007). En el nostre cas hem observat que l'estabilitat de la luciferasa en les cèl·lules C2C12 és molt elevada i que l'activitat luciferasa que mesuram en els assajos és l'acumulació de la luciferasa produïda en les últimes hores.

Aquesta observació ens ha permès utilitzar el promotor mínim de resposta a BMP del gen *idl* (López-Rovira et al., 2002) com a control dels nostres assajos luciferasa aplicats al promotor d'*osterix*. Tot i que *idl* és un gen de resposta directa a BMP i *osterix* ho és de resposta més tardana, l'acumulació de luciferasa per acció de BMP-2 en les cèl·lules transfectades amb Id1 era perfectament observable a les ~20 hores de tractament que és quan veiem els efectes màxims de BMP-2 en el promotor *reporter* d'*osterix*.

La regulació d'Osterix per BMP-2

Com hem explicat en el capítol de resultats, existeixen 2 isoformes d'Osterix amb 2 inicis de transcripció diferents, la forma curta i la forma llarga. El primer exó de cada isoforma és diferent, mentre que el segon exó, el qual conté la major part de la seqüència codificant, és comú per ambdues isoformes.

Segons s'ha descrit en la bibliografia, la forma llarga és la considerada més abundant en la majoria de models cel·lulars estudiats. Quantitativament s'ha observat que la forma llarga és entre 25 i 42 vegades més abundant que la curta en cèl·lules ATDC5 (Nishio et al., 2006). També la forma llarga fou la que descrigueren originalment Nakashima et al (Cell 2002) en cèl·lules C2C12 tractades amb BMP-2.

La isoforma curta d'Osterix no comprèn alguns nucleòtids de la zona n-terminal, la qual cosa fa pensar que ambdues formes poden tenir funcions diferents i possiblement també estar regulades de forma diferent. La regió del promotor immediatament a 5' de l'inici de transcripció de la forma curta es troba fortament metilada, la qual cosa permet hipotetitzar que la forma curta s'expressaria en situacions més restringides (Lee et al., 2006b).

En els nostres experiments hem clonat ambdues regions 5' als respectius inicis de transcripció en el mateix vector *reporter* de luciferasa, la qual cosa ens ha permès observar que BMP-2 indueix amb més força la regió 5' a l'inici de transcripció de la forma llarga en cèl·lules C2C12, la qual cosa està d'acord amb la bibliografia, tal com hem explicat. També la sonda que hem utilitzat en l'experimentació mitjançant PCR Real Time inclou l'exó de la forma llarga.

Hem caracteritzat la resposta d'Osterix a BMP-2 en cèl·lules C2C12 observant que la inducció de l'ARN missatger comença a produir-se al voltant de les 2 hores assolint el seu pic màxim a les 8 hores, pic que és sostingut fins a les 24 hores. Existeix un article en la bibliografia que proposa un segon pic d'expressió d'Osterix als 7 dies d'estimulació amb BMP-2 en cèl·lules C2C12, però nosaltres ens hem limitat a estudiar l'efecte durant les primeres 24 hores (Lee et al., 2003b).

DISCUSSIÓ

Fins al moment actual, a més del que descrivim en aquest treball, s'han descrit en el promotor d'*osterix* altres 3 llocs d'unió funcionals per diferents factors de transcripció que són NF- κ B, MyoD i Runx2 (Lu et al., 2006; Hewitt et al., 2008; Nishio et al., 2006).

Observant els resultats publicats en la bibliografia, veiem que els llocs d'unió per NF- κ B i MyoD són els que semblen activar Osterix amb més força. No obstant, el cas de l'activació per MyoD cal considerar-lo amb prudència al tractar-se d'un factor tradicionalment lligat al llinatge muscular, la implicació del qual en la diferenciació del llinatge osteoblàstic es troba encara en una fase d'estudi incipient, doncs no s'ha demostrat encara un paper fisiològic d'aquest factor bHLH en l'osteogènesi (Hewitt J et al., 2008). A més, s'ha descrit que tant l'addició de BMP-2 al cultiu com la sobreexpressió de Dlx5 en C2C12 bloqueja l'expressió de MyoD (Lee et al., 2003a).

En el nostre estudi del promotor d'*osterix* per deleció, la pèrdua del lloc d'unió per NF- κ B, situat a -214 de l'inici de transcripció de la isoforma llarga del gen, produeix una disminució dels nivells basals d'*osterix* però no de la inducibilitat per BMP-2, suggerint aquest fet que es tracta de dues vies d'inducció d'Osterix totalment independents.

El lloc d'unió per Runx2 present en el promotor d'Osterix, es troba situat a -712 pb de l'inici de transcripció de la isoforma llarga d'Osterix, una regió que no respon a BMP-2. Segons s'ha descrit al treball de Nishio et al (Gene 2006), la co-transfecció de Runx2 junt amb un *reporter* de luciferasa al qual s'ha clonat aquesta regió del promotor d'*osterix*, produeix un augment de l'activitat luciferasa de 2 vegades en cèl·lules ATDC5. Lamentablement, en el treball de Nishio et al no s'ha estudiat l'efecte la fosforilació de Runx2 per la via de ERK-MAPK en l'activació del promotor.

Límitrofe al lloc d'unió de Runx2 al promotor d'*osterix*, es troba una caixa TAAT palindròmica idèntica a la que uneix Dlx5 en la regió proximal del promotor. Tenint en compte que s'ha demostrat la interacció física entre ambdós factors de transcripció (Roca et al., 2005), no es pot descartar que s'uneixin juntament en aquesta regió del promotor tal com s'ha vist en altres promotors, no obstant la BMP no incrementa molt fortament els nivells d'expressió de Runx2, així que la possible cooperació amb Dlx5 en el promotor podria ser conseqüència de l'activació de diferents vies de transducció de senyal induïdes per diferents factors de creixement.

Existeixen dues regions molt conservades entre diferents espècies de mamífers en el promotor d'*osterix*, de moment encara no es disposa de les seqüències d'altres vertebrats més allunyats filogenèticament. D'aquestes dues regions, que vam anomenar Cluster I i Cluster II, només la segona, que és la més proximal a l'inici de transcripció, respon a l'estimulació per BMP-2. Mitjançant l'anàlisi per deleció del promotor d'*osterix* hem aïllat la regió mínima de resposta a BMP-2, que es troba entre -114 i -51, concretament en la seqüència TAATTA que és un lloc d'unió doble palindròmic per factors de transcripció amb homeodomini. La seqüència on s'uneix el Runx2 no es troba en la regió de resposta a BMP-2 que hem descrit.

En el moment del descobriment d'Osterix, la hipòtesi més acceptada en la bibliografia era que aquest havia de ser una diana directa de Runx2. Lee et al (2003b) observaren

DISCUSSION

expressió d'Osterix en cèl·lules derivades de ratolins Knock-out per Runx2 mitjançant l'expressió forçada de Dlx5. Per la qual cosa conclogueren que Runx2 no és imprescindible per a l'expressió d'Osterix en resposta a BMP, si bé descriuen un efecte sinèrgic d'aquest amb la addició de BMP-2.

A més, s'ha descrit que en cèl·lules defectives per Runx2 l'addició de BMP-2 estimula l'expressió d'*osterix*, mentre que es veu reduïda en cèl·lules defectives per Dlx5 (Lee et al., 2003b). En un altre treball s'ha observat que l'expressió d'una forma dominant negativa de Runx2 no bloqueja la inducció d'*osterix* per BMP-2 (Celil and Campbell, 2005).

Cal dir que si bé s'ha descrit en la bibliografia que en ratolins knock-out per Runx2 no es dona expressió d'Osterix, no s'ha aclarit en quina mesura aquest fenomen és un efecte directe de la unió de Runx2 al promotor d'Osterix o bé la conseqüència indirecta de que Runx2 sigui un factor imprescindible pel desenvolupament del cartílag i la determinació al llinatge osteoblàstic, passos previs a la diferenciació osteoblàstica on intervé Osterix.

A pesar de la similitud estructural entre Dlx3 i Dlx5, que són paràlegs de segon ordre dins de la família Dlx, i de que tots dos gens són induïts per BMP-2 en cèl·lules C2C12 i està descrita la seva implicació en l'osteogènesi (Hassan et al., 2004; Hassan et al., 2006), els nostres resultats indiquen que Dlx3 no té la capacitat d'activar el promotor mínim a través de la caixa TAATTA present en aquest i a través de la qual Dlx5 realitza la seva funció.

El lloc consensus d'unio de l'homòleg de Dlx3 a l'ADN va ser descrit en *Xenopus* (Feledy et al., 1999). Aquesta seqüència consensus és (A/C/G)TAATT(G/A)(C/G) i és exactament igual a la que està present al promotor d'*osterix*. No obstant, això no és suficient perquè Dlx3 faci la mateixa funció que fa Dlx5 al promotor d'*osterix*.

Una possible explicació a aquest fenomen seria que altres factors o co-factors interaccionessin amb el Dlx5 en el promotor d'*osterix*. Seria interessant estudiar el potencial d'interacció de Dlx3 i Dlx5 amb altres proteïnes per entendre les seves diferències funcionals. També cal dir que si bé el lloc d'unio de Dlx3 a l'ADN és present al promotor d'Osterix, la transactivació de l'ADN per part de Dlx3 es dona per 2 regions d'aquest factor diferents de l'homeodomini, la regulació de les quals encara no ha estat del tot definida (Bryan and Morasso, 2000).

S'ha descrit recentment una mutació de Dlx3 present en individus afectats per una síndrome anomenada TDO (Tricho-Dento-Osseous) que es caracteritza per una elevada densitat i gruïdor dels ossos. Transfectant la forma mutada de Dlx3 en cèl·lules C2C12 s'ha observat una forta inducció de l'expressió de Runx2 i Osterix, mentre que la forma *wild type* de Dlx3 només indueix lleument l'expressió de Runx2, la qual cosa és coherent amb les nostres observacions (Choi et al., 2008).

El fet que l'ossificació en els ratolins knock-out per Dlx5 estigui retardada però no desapareguda ha plantejat que algun altre gen podria tenir una funció redundat amb Dlx5 (Ducy et al., 2000). Tot i que el membre de la família Dlx més homòleg a Dlx5 és Dlx3, Dlx5 es troba formant tàndem amb Dlx6 i s'ha descrit que el ratolí doble knock-

DISCUSSION

out per Dlx5 i Dlx6 té efectes més severes en l'esquelet que el knock-out de Dlx5 sol, per la qual cosa ambdós gens poden tenir funcions redundants (Robledo et al., 2002).

La regió intergènica que regula el tàndem Dlx5/Dlx6 és una doble caixa homeobox palindròmica (TAATTA). S'ha descrit que el tàndem Dlx1/Dlx2 està implicat en la regulació del tàndem Dlx5/Dlx6 en el desenvolupament del crani a través d'aquesta seqüència TAATTA present en la regió intergènica (Depew et al., 2005; Merlo et al., 2000). Recentment s'ha proposat un paper per Dlx2 en la diferenciació osteoblàstica (Li et al., 2008).

En ratolins knock-out per Dlx5 s'observen alteracions en elements esquelètics derivats tant del domini proximal com distal del primer arc branquial. La presència de defectes en l'arc mandibular en ratolins Dlx5^{-/-}, en els quals Dlx 1,2,3 i 6 s'expressen amb tota normalitat, suggereix que la redundància entre gens Dlx no està generalitzada sinó que només es dona en casos específics (Depew et al., 1999, 2002 i 2005).

Molt probablement existeix una implicació de més d'un factor de la família Dlx en la diferenciació osteoblàstica, especialment en l'ossificació intramembranosa. La relació d'aquesta família de factors de transcripció amb les vies de transducció de senyal induïdes per BMP constitueix un camp encara poc estudiat i força prometedora.

Hem observat que Msx2, un altre gen amb homeodomini implicat en l'osteogènesi i induït per BMP-2, té un efecte repressor en el promotor mínim de resposta a BMP-2 d'*osterix*. Al co-transfectar un plàsmid codificant per aquest gen junt al *reporter* s'observa una disminució tant en els nivells basals com en l'inducibilitat per BMP-2 d'aquesta zona del promotor. Si es co-transfecta Msx2 juntament amb Dlx5 s'observa com tenen un efecte antagonic sobre el promotor: mentre que Dlx5 l'estimula, Msx2 el reprimeix.

L'antagonisme entre Dlx5 i Msx2 en diferents models cel·lulars ha estat estudiat en nombrosos treballs previs, en els quals existeixen observacions discrepants respecte al mecanisme de competició entre ambdós factors de transcripció. Segons alguns autors aquest antagonisme s'explica per una competició pel lloc d'unió a l'ADN, mentre que altres autors proposen una interacció a nivell proteïna-proteïna que explicaria la repressió d'un factor per l'altre.

En la majoria de casos descrits, els gens Dlx tenen una funció activadora mentre que els membres de la família Msx sovint tenen una funció repressora (Catron et al., 1996; Woloshin et al., 1995). En la majoria de casos, l'acció repressora dels factors Msx és a través de la interacció amb altres factors més que no pas per acció directa sobre l'ADN, per exemple Msx1 interacciona amb la proteïna TBP (TATA-Binding Protein) i Msx2 amb TFIIF (General Transcription Factor IIF), ambdues proteïnes molt importants per a la transcripció (Catron et al., 1995; Zhang et al., 1996).

Les proteïnes Dlx5 i Msx2 heterodimeritzen pels seus homeodomini, que són els residus per on aquestes proteïnes poden unir-se a l'ADN. Aquesta interacció provoca la recíproca inhibició de la seva activitat transcripcional mentre estan unides entre si. Aquesta interacció té una gran importància fisiològica doncs el patró d'expressió d'ambdós gens se solapa durant el desenvolupament de ratolí, especialment en el desenvolupament del crani i les extremitats (Zhang et al., 1997).

DISCUSSIÓ

L'antagonisme entre aquests factors s'ha descrit en la regulació de l'*osteocalcina*, un gen marcador d'osteoblasts madurs. També en aquest cas la co-transfecció de Msx2 reprimeix l'activitat del promotor de l'*osteocalcina* clonat en un vector *reporter* luciferasa, tot i que els autors descriuen que la unió de Msx2 a l'ADN no és necessària per la seva acció repressora. La co-transfecció de Dlx5 junt amb Msx2 reverteix aquesta repressió. També en aquest cas s'ha descrit que l'antagonisme entre ambdós factors es dona independentment de la unió a l'ADN (Newberry et al., 1998).

En un altre article en que també s'ha estudiat la regulació del promotor del gen de l'*osteocalcina*, sí que s'ha observat unió de Msx2 al promotor d'aquest gen. En aquest cas els autors proposen un model temporal d'ocupació del lloc d'unió a l'ADN en que a mesura que avança la diferenciació osteoblàstica diferents factors de transcripció amb homeodomini anirien ocupant la caixa TAAT (Hassan et al., 2004).

En experiments d'immunoprecipitació de cromatina realitzats en cèl·lules C2C12, s'ha observat que Msx2 s'uneix al promotor de l'*osteocalcina* en la fase de proliferació prèvia a la diferenciació osteoblàstica, reprimint-ne l'expressió. Es proposa que Msx2 se separa del promotor quan les cèl·lules aturen el cicle cel·lular i llavors s'observa el reclutament de Dlx3 que intervé en l'inici de l'expressió de l'*osteocalcina* en l'etapa de maduració de la matriu. Per últim, es recluta Dlx5 en l'etapa final de la diferenciació osteoblàstica, quan es comença a mineralitzar la matriu (Hassan et al., 2004).

En el cas de la Fosfatasa Alcalina, un altre marcador de la diferenciació osteoblàstica induïda per BMP-2, també s'ha descrit l'antagonisme entre Dlx5 i Msx2 amb funció activadora i repressora respectivament. En aquest cas també s'ha descrit la unió de Msx2 al promotor i la competició amb Dlx5 pel lloc d'unió a l'ADN. Segons descriuen els autors, l'addició de BMP-2 fa variar la ràtio entre Dlx5 i Msx2 incrementant la presència de Dlx5, fet que permet la inducció del promotor de la Fosfatasa Alcalina en cèl·lules C2C12. El lloc d'unió pel qual competeixen Dlx5 i Msx2 és una seqüència TAAT, però en aquest cas no és doble i palindròmica com en el promotor d'*osterix* (Kim et al., 2004).

Els nostres resultats mostren que Msx2 reprimeix el promotor mínim d'Osterix però no s'hi pot unir. En aquest sentit, les nostres observacions concorden amb el model en que l'antagonisme entre Msx2 i Dlx5 es produeix per una interacció entre ambdues proteïnes i no per una competició pel lloc d'unió a l'ADN. En els nostres experiments d'immunoprecipitació mitjançant oligonucleòtids biotinilats, hem pogut observar la unió de Dlx5 a la caixa TAAT doble palindròmica del promotor d'*osterix*, mentre que no hem observat en cap cas la unió de Msx2. No es pot descartar que els mecanismes de l'antagonisme entre Dlx5 i Msx2 siguin diferents segons el context cel·lular.

En un article recent s'ha suggerit que Runx2 i Msx2 indueixen l'expressió d'Osterix en cèl·lules mesenquimals i en cèl·lules C2C12 (Matsubara, et al., 2008). En aquest treball es confirma la capacitat de Runx2 d'induir l'expressió d'Osterix, però també es confirmen les observacions prèvies del grup de Hyun-Mo Ryoo (Lee et al., 2003b) referents a la capacitat de Dlx5 d'induir l'expressió d'Osterix en cèl·lules defectives per Runx2. També s'observa en aquest treball que BMP-2 produeix una variació molt petita en l'expressió de Runx2. Els autors conclouen que Osterix pot ser regulat per mecanismes tant dependents com independents de Runx2.

DISCUSSION

En aquest mateix treball, s'ha observat que la silenciació de Msx2 disminueix la capacitat de BMP-2 per induir Osterix, aquesta observació es descriu en un context de cèl·lules mesenquimals defectives per Runx2. Les nostres observacions van en sentit contrari, doncs els nostres resultats indiquen una acció repressora de Msx2 sobre la regió promotora d'*osterix* induïble per BMP-2 (Matsubara, et al., 2008).

En el treball de Matsubara et al. no es mostra l'efecte de sobreexpressar Msx2 en els nivells d'*osterix* ni l'efecte de la silenciació de Msx2 sobre l'expressió d'Osterix en cèl·lules *wild type*, per la qual cosa són resultats que s'han de considerar amb prudència. Seria interessant realitzar experiments de transfecció de Msx2 en diferents contextos cel·lulars per veure l'efecte en l'expressió d'Osterix.

Hem demostrat que la unió de Dlx5 al promotor d'*osterix* és la responsable de mediar la resposta d'aquest a BMP-2:

En primer lloc, demostrem que la inducció de l'ARN d'*osterix* per BMP-2 requereix 6-8 hores mentre que la inducció de *dlx5* és molt més ràpida, homologable a la de *idl*, un dels gens millor caracteritzats de resposta a BMP-2 mediada directament per la fosforilació de les proteïnes Smad. L'expressió de Dlx5 induïda per BMP precedeix no només la d'Osterix sinó també la d'altres marcadors de la diferenciació terminal d'osteoblasts com l'Osteocalcina o la Fosfatasa Alcalina (Hassan et al., 2006).

Mitjançant els assajos de retardament en banda i la precipitació d'oligonucleòtids biotinitats, hem pogut descriure el lloc d'unió de Dlx5 al promotor d'*osterix*, el qual consisteix en una doble seqüència TAAT disposada de forma palindròmica. A més, mitjançant la immunoprecipitació de cromatina (ChIP) hem descrit que la unió de Dlx5 al promotor és suficient per reclutar P300, la Histona 3 Acetilada i la ARN-polimerasa II, en un complex que probablement deu incorporar altres factors.

Els experiments de sobreexpressió i silenciació de Dlx5 ens han permès observar que els nivells d'Osterix, tant a nivell d'ARN missatger com de proteïna, varien correlativament amb els de Dlx5. Les nostres observacions són coherents amb el treball precedent del grup de Hyun-Mo Ryoo en que s'havia estudiat l'efecte de la silenciació de Dlx5 mitjançant construccions d'ARN *antisense* i s'observava una reducció en els nivells d'Osterix (Lee et al., 2003a).

Hem descrit l'efecte activador de Dlx5 sobre el promotor mínim que engloba els nucleòtids que van de -114 a +93. També hem observat la capacitat de Dlx5 d'activar un *reporter* del promotor mínim que va de -114 a -54 clonat junt amb un inici de transcripció heteròleg, així com la seva incapacitat d'activar una variant en que s'havia introduït una mutació en la caixa TAATTA de resposta a BMP-2.

Hem observat que l'expressió d'Osterix és sensible a la presència de Cicloheximida, un inhibidor de la síntesi proteica, aquest efecte havia estat descrit també per altres grups (Lee et al., 2003a i 2003b; Harris et al., 2003).

En altres treballs presents en la bibliografia, s'havia descrit que el pretractament de cèl·lules C2C12 amb cicloheximida no bloqueja la transcripció de l'ARN missatger de Dlx5 per efecte de BMP-2, mentre que la sobreexpressió forçada de formes

DISCUSSIÓ

constitutivament actives dels receptors BMPRIA i BMPRIB n'indueixen l'expressió sense necessitat d'afegir BMP-2. També la sobreexpressió de les R-Smads 1 i 5 indueixen l'expressió de Dlx5 en absència de tractament amb BMP. Aquestes dades demostren que Dlx5 és un gen activat directament per les Smads 1 i 5 fosforilades per acció de BMP-2 i que no és necessària la síntesi de nova proteïna per la transcripció del gen de *dlx5* (Lee et al., 2003a).

Així doncs, en conjunt les nostres dades ens permeten afirmar que Dlx5 té un paper essencial en la inducció d'Osterix en resposta a BMP-2. No obstant, l'observació que BMP-2 provoca un efecte additiu sobre la transfecció de Dlx5, indica que l'efecte inductor de BMP-2 sobre el promotor d'*osterix* no pot ser degut únicament a la inducció de l'expressió de Dlx5.

Vam estudiar el possible efecte de les Smads en la regulació d'Osterix. A pesar que no hi ha antecedents en la bibliografia que descriguin la implicació de les Smads en la regulació d'Osterix, diferents observacions indicaven la seva possible implicació: En primer lloc, la lleugera variació en l'activitat basal luciferasa de la construcció del promotor mínim mutant per la caixa CAGAC, que és la seqüència d'unió canònica per la Smad4. En segon lloc, la proximitat d'aquesta caixa CAGAC al lloc d'unió de Dlx5. En tercer lloc el fet que *osterix* estigui activat transcripcionalment per BMP-2, que activa la via de les Smads.

Tot i dedicar-hi no pocs esforços, no hem trobat una implicació funcional de la caixa CAGAC en la regulació d'*osterix*. La transfecció de les Smads 1, 4 o 5 junt amb el promotor d'*osterix*, tant la regió mínima de resposta a BMP (-114 a +93) com la regió conservada evolutivament que va de -1812 a +93, només comporta petites variacions en l'activitat del *reporter* de luciferasa, la qual probablement és produïda indirectament per l'activació de Dlx5 en resposta a les Smads.

Existeix un precedent en la bibliografia en que un membre de la família Dlx, concretament Dlx1, interacciona amb Smad4. Aquesta interacció és funcional i té un efecte inhibidor de la via de l'Activina A en l'hematopoiesi. Vam hipotetitzar una possible interacció entre Dlx5 i Smad4 amb efecte sinèrgic sobre l'expressió d'Osterix a través de les caixes TAATTA i CAGAC.

Nombrosos experiments d'immunoprecipitació de Dlx5 amb les Smads 1, 4 i 5, utilitzant diferents anticossos, resines i tampons, van donar tots ells resultat negatiu. Tampoc vam observar un efecte sinèrgic al co-transfectar les proteïnes Smads junt amb Dlx5 en el promotor mínim d'*osterix*.

P38-MAPK és una kinasa implicada en molts aspectes del desenvolupament. La seva acció *downstream* de BMP està molt conservada: en *Drosophila* el gen *D-p38b* intervé en la morfogènesi de les ales induïda per Dpp, la mutació d'un lloc fosforilable de *D-p38b* indueix alteracions similars a la inactivació de *dpp* (revisat a Nebreda and Porras 2000).

P38-MAPK està implicada en diferents aspectes de la diferenciació de les cèl·lules mesenquimals a diferents llinatges. Per exemple, s'ha descrit la involucració d'aquesta kinasa en la diferenciació de fibroblasts al llinatge adipocític o l'aparició dels miotubs

DISCUSSIÓ

en la diferenciació al llinatge mioblàstic de cèl·lules C2C12 (Engelman et al., 1998; Engelman et al., 1999; Cuenda and Cohen, 1999).

La implicació de p38 en diferents passos de la diferenciació al llinatge osteoblàstic ja havia estat descrita, si bé són poques les accions concretes descrites per aquesta kinasa en l'osteogènesi. Com hem vist en la introducció, hi ha nombroses contradiccions en la bibliografia. En línies generals podríem dir que p38 indueix l'expressió de marcadors de l'osteogènesi primerenca com la Fosfatasa Alcalina, però reprimeix marcadors més tardans com l'Osteocalcina. En el nostre treball demostrem un mecanisme d'acció directa de p38 en l'osteogènesi a través de la fosforilació de Dlx5.

La proteïna MKK6, una MAPKK, fosforila i activa les quatre isoformes de p38 (p38 α , p38 β , p38 γ i p38 δ). L'inhibidor farmacològic SB203580 inactiva preferencialment les isoformes p38 α i p38 β (Revisat a Nebreda and Porras, 2000). Els nostres resultats demostren que l'activació de p38 té un efecte additiu amb Dlx5 sobre l'activitat del promotor d'*osterix*.

Els nostres resultats demostren la fosforilació de Dlx5 per acció de p38-MAPK tant *in vitro* com *in vivo*. En un assaig mitjançant una forma de p38 constitutivament activa, s'observa com aquesta fosforila a Dlx5. També hem observat que la fosforilació de Dlx5 és induïda per l'addició de BMP-2 o la co-expressió de MKK6 constitutivament activa, mentre que és bloquejada per la inhibició farmacològica de p38 mitjançant l'inhibidor SB203580.

L'addició de BMP-2 a cèl·lules C2C12 provoca la fosforilació de p38, que s'observa a les 2 hores i es manté a les 4 hores d'afegir la citoquina al medi. L'addició de Fosfatasa Alcalina reverteix la fosforilació observada per Western Blot en Dlx5 en forma de banda retardada.

La co-transfecció de la forma constitutivament activa de MKK6 amb Dlx5 incrementa l'activitat transcripcional d'aquest a nivell del promotor d'*osterix*, aquest increment d'activitat transcripcional es veu mermat en el cas de transfectar la forma mutant de Dlx5 S34/217A (resultats d'altres membres del grup).

La fosforilació de Dlx5 no sembla incrementar la seva afinitat pel motiu TAATTA del promotor d'*osterix*, doncs no s'observa modificació de la capacitat d'unir la sonda que presenta aquest motiu en un assaig de retardament en banda. Tampoc sembla modificar la vida mitja de Dlx5, doncs no s'observen diferències en el temps de degradació entre la forma Dlx5 *wild type* i el mutant de fosforilació.

A diferència dels procariotes, en les cèl·lules eucariotes l'estat normal de la cromatina és no permissiu a la transcripció. Normalment la cromatina bloqueja l'associació de TFIID i la ARN-polimerasa II, ambdós factors imprescindibles per a la transcripció. Les Histona acetil-transferases són els enzims que acetilen les Histones desbloquejant el seu efecte inhibidor de la transcripció (Scott F Gilbert, Developmental Biology).

P300/CBP és una Histona acetiltransferasa que, segons s'ha descrit, és reclutada al promotor de l'*osteocalcina* en resposta a senyals osteogènics (Lee et al., 2006a; Sierra et al., 2003) i s'uneix a JunB per activar el promotor de *dmp1* (Dentin Matrix Protein1), una proteïna activa en teixits mineralitzats que té la capacitat d'induir la diferenciació

DISCUSSIÓ

de les cèl·lules mare de la polpa dental al llinatge odontoblàstic (Narayanan et al., 2004; Pang et al., 2007).

Les proteïnes acetiladores i desacetiladores regulen les histones H3 i H4 en els promotors de diversos gens osteogènics. HDAC4 inhibeix l'activitat de Runx2 i els ratolins knock-out per HDAC4 presenten severos defectes en l'esquelet. En el nostre assaig d'immunoprecipitació de cromatina veiem que la presència de Dlx5 és suficient per reclutar la polimerasaII i la Histona H3 en la seva forma acetilada al promotor d'*osterix* endogen *in vivo*. També hem demostrat que p300 és reclutada per Dlx5 al promotor proximal d'Osterix i que la seva activitat Histona acetil-transferasa està involucrada en la inducció d'Osterix per BMP-2 mediada per Dlx5.

Es pot hipotetitzar que la fosforilació de Dlx5 per p38-MAPK incrementa la capacitat d'aquest de reclutar altres factors i co-factors que s'uneixen al complex de transcripció de l'ADN, tals com p300 i probablement també els complexos remodeladors de la cromatina SWI/SNF, tal com ha estat demostrat en el promotor de *junB*, *dmp1*, *myoD* i *mef2*.

Podem concloure que l'efecte de BMP-2 sobre el promotor d'*osterix* és causat per la inducció de l'expressió de Dlx5 per la via de les Smads i per la fosforilació post-traducciona d'aquest per p38, una proteïna MAPK activada en resposta a BMP-2 per una via independent de Smads. Per tant proposem una xarxa reguladora on BMP activa l'expressió d'*osterix* per dues vies que conflueixen en Dlx5. Per una banda, les Smads indueixen l'expressió de Dlx5, i per altra banda, la via independent de Smads mediada per p38-MAPK n'incrementa el potencial transactivador.

Aquest mecanisme d'activació de Dlx5 per les dues vies, podria estar involucrat en l'activació transcripcional d'altres gens osteogènics i també en d'altres llinatges, on podria mantenir-se aquest mecanisme a través d'altres membres de la família Dlx. aquests llocs de fosforilació descrits en Dlx5 també es troben conservats en Dlx3 i Dlx6.

Els efectes de Dlx5 i BMP-2 sobre el promotor mínim d'*osterix* es poden observar en un context cel·lular més diferenciat al llinatge osteoblàstic. En les cèl·lules SaOs2 l'expressió de la proteïna d'Osterix s'observa abans de l'addició de BMP i augmenta amb l'addició de BMP-2. El promotor mínim caracteritzat en C2C12 manté la inducibilitat per BMP-2 en les cèl·lules SaOs tot i que aquesta és menor. També el Dlx5 pot activar el promotor mínim d'*osterix* en aquest context cel·lular.

P53 té un paper negatiu en el desenvolupament ossi, els ratolins deficientes per p53 mostren una major formació òssia i la deficiència de p53 confereix una major capacitat osteoclastogènica sense afectar la diferenciació dels osteoclasts o la reabsorció òssia, tractant-se d'un efecte dels osteoblasts deficientes en p53 sobre els osteoclasts (Wang et al., 2006).

S'ha descrit la cooperació de p53 amb les vies induïdes per TGF β i BMP en el desenvolupament de *Xenopus*. S'ha demostrat que la proteïna p53 de *Xenopus* pot interaccionar amb totes les R-Smads i formar un complex amb aquestes en els promotors d'alguns gens (Takebayashi-Suzuki et al., 2003).

DISCUSSIÓ

S'ha proposat la possible regulació de l'Osteocalcina per part de p53, basant-se en la diferent expressió d'aquest marcador en cèl·lules defectives per p53 i en l'observació d'un patró d'expressió similar d'ambdues proteïnes en la diferenciació de cèl·lules ROS 17/2.8 (Schwartz et al., 1999; Chandar et al., 2000).

Segons les observacions de Wang et al (2006), l'efecte de p53 sobre el promotor d'*osterix* té lloc sense unir-se a l'ADN i es dona a través de la regió que nosaltres hem caracteritzat com a promotor mínim de resposta a BMP-2. A més, descriuen que la presència de p53 afecta la resposta d'Osterix a BMP-2. Aquestes dades ens van portar a investigar la possible interacció de p53 amb Dlx5. En els experiments d'immunoprecipitació realitzats no hem observat interacció física entre aquestes dues proteïnes.

L'expressió forçada de p53 en cèl·lules SaOs inhibeix els nivells d'expressió de la proteïna d'Osterix tant en presència com en absència de BMP-2. No obstant no hem pogut veure el mateix efecte sobre el promotor mínim d'*osterix*.

Les diferències observades entre la proteïna d'Osterix i l'activitat del promotor poden ser degudes a que en els experiments amb el *reporter* la BMP va ser afegida en el mateix moment que la doxiciclina que no indueix p53 fins al cap de 4 hores, i per tant la lucifereasa acumulada per efecte de BMP abans que no s'expressi p53 pot enmascarar-nos els resultats. No es coneix la vida mitja de la proteïna luciferasa en cèl·lules SaOs, la qual pot variar molt segons el tipus cel·lular.

En el treball de Wang et al es postula que l'acció de p53 sobre el promotor d'Osterix podria ser a través d'impedir que p300 s'uneixi a la regió del promotor que respon a BMP-2, la nostra observació de que Dlx5 recluta p300 al promotor d'Osterix és coherent amb aquesta hipòtesi.

En un estudi en que s'utilitzaren osteoblasts defectius per p53, s'observà que aquests són refractaris a l'efecte negatiu de la inhibició de p38 mitjançant SB203580. No obstant, els autors conclouen que l'efecte de p38 sobre l'expressió d'*osterix* és independent de p53 (Wang et al., 2007).

Un altre possible mecanisme pel qual p53 pot relacionar-se amb la regulació d'Osterix és a través de la regulació recíproca amb p38. P38 pot fosforilar i activar p53 en les serines 15, 33 i 46, mentre que p53 pot induir l'expressió de PPM1D, una fosfatasa que inactiva a p38. S'ha descrit la presència de PPM1D en U2OS i SaOs2, ambdues són línies d'osteosarcoma (Huang et al., 1999; Sánchez-Prieto et al., 2000; Perfettini et al., 2005; Lu X et al., 2005).

DISCUSSIÓ

Model molecular de la diferenciació d'osteoblasts.

Runx2 és un factor de transcripció essencial per a la diferenciació osteoblàstica. Probablement per la seva importància fisiològica, és un gen regulat per múltiples vies de senyalització. Runx2 pot ser activat i fosforilat per PKA o les MAPK les quals poden ser activades per nombrosos senyals que poden provenir tant de la matriu extracel·lular com de factors osteogènics. A més, Runx2 pot interaccionar amb múltiples proteïnes com PTH o les Smads.

Hi ha estudis que indiquen que la sobreexpressió forçada de Runx2 provoca problemes en la maduració dels osteoblasts en els últims estadis de diferenciació. S'ha proposat que la isoforma II de Runx2 seria la responsable d'aquesta acció. Així com la isoforma I de Runx2 incrementa l'expressió d'Osteocalcina, que és un marcador d'osteoblasts madurs, la isoforma de tipus II sembla inhibir-la. Així doncs, s'ha proposat que la isoforma de Runx2 de tipus II podria estar involucrada en la inhibició de la maduració dels osteoblasts (Liu et al., 2001).

L'expressió de Runx2-II colocalitza amb BMP-2 i Dlx5 durant el desenvolupament dels ossos del crani. S'ha proposat que l'expressió d'aquesta isoforma és regulada específicament per Dlx5 (Hassan et al., 2006; Lee et al., 2005).

Aquesta hipòtesi situaria Dlx5 com un gen clau pel desenvolupament de l'os, doncs estaria regulant 2 dels principals factors clau de l'osteogènesi: Runx2 i Osterix. No obstant, el fenotip dels ratolins knock-out per Dlx5, si bé presenta defectes en l'ossificació, especialment a nivell cranial, no és pas tant severa com caldria esperar d'un factor que controla els principals factors de l'osteogènesi. Tampoc el ratolí doble mutant Dlx5^{-/-}-Dlx6^{-/-} presenta defectes en l'osteogènesi tan severos com els ratolins knock-out per Runx2 i Osterix (Robledo et al., 2002).

En un estudi *in vitro*, s'ha suggerit la possibilitat que Dlx5 reguli a Runx2 (Lee et al., 2005) però s'ha descrit que l'expressió de Runx2 no es veu afectada en ratolins knock-out per Dlx5, la qual cosa indica que Runx2 no es troba *downstream* de Dlx5 o bé que ambdós factors de transcripció actuen en vies independents (Ducy et al., 2000).

A pesar que tant BMP-2 com TGFβ-1 poden estimular l'expressió de Runx2, aquest només activa marcadors osteogènics quan és induït per BMP-2. Per tant Runx2 per sí sol és insuficient per mediar la diferenciació osteoblàstica induïda per BMPs i forçosament ha d'interaccionar amb altres factors (Lee et al., 2003a).

Dlx5 és un gen regulat per BMP-2 i BMP-4 d'una forma bastant exclusiva. S'ha estudiat l'efecte en l'expressió de Dlx5 al tractar cèl·lules C2C12 amb diferents factors: VitaminaD3, Dexametasona, FGF2, TGFβ1, GDF5, GDF6 i GDF7, però només BMP-2 i BMP-4 indueixen l'expressió de Dlx5 (Lee et al., 2003a)

La silenciació de Dlx5 bloqueja totalment l'activació de Runx2 induïda per BMP-2, però no interfereix en l'activació de Runx2 induïda per TGFβ1. La sobreexpressió de Runx2, en canvi, no té efecte sobre l'expressió de Dlx5 (Lee et al., 2003a).

S'ha descrit la capacitat de les BMPs d'induir l'expressió de nombrosos factors de transcripció amb homeodomini implicats en la diferenciació osteoblàstica, a més de

DISCUSSIÓ

Dlx5 també Dlx3 i Msx2 són induïts per BMP i implicats en l'osteogènesi. El patró temporal d'expressió d'aquests gens en l'osteogènesi difereix entre ells. Msx2 és expressat en l'estadi proliferatiu més inicial, Dlx3 és expressat principalment en les cèl·lules osteoprogenitores i Dlx5 en osteoblasts més madurs (Komori, 2006; Hassan et al., 2006).

En el cas del promotor d'un altre gen involucrat en l'osteogènesi, l'*osteocalcina*, s'ha descrit que tant Msx2, com Dlx5 com Dlx3 s'uneixen al promotor tot i que en estadis diferents de la diferenciació cel·lular i amb diferent efecte (Hassan et al., 2004).

L'observació d'aquest patró d'expressió, així com l'associació selectiva d'aquests factors a diferents promotors de gens osteogènics, ha portat a proposar una organització jeràrquica de diferents factors amb homeodomini que constituïren una xarxa que controlaria la progressió, diferenciació i maduració dels osteoblasts (Hassan et al., 2004 i 2006; Lee et al., 2005).

Un altre mecanisme que involucra aquests factors de transcripció en l'osteogènesi és la seva capacitat per interaccionar físicament entre sí. Aquesta interacció s'ha demostrat en el promotor de *bone sialoprotein*, un marcador de l'osteogènesi, on Runx2 i Dlx5 s'uneixen conjuntament en 2 seqüències d'ADN adjacents induint l'activació del promotor (Roca et al., 2005).

En els primers estadis de la diferenciació osteogènica, les cèl·lules precursors dels osteoblasts en les condensacions mesenquimals que donaran lloc als ossos, diferencien primer a preosteoblasts, un procés en el qual Runx2 i Cbfb tenen un paper central. En aquest estadi, els preosteoblasts no expressen encara els típics marcadors osteoblàstics, es creu que aquests preosteoblasts, que expressen Runx2 encara poden diferenciar tant al llinatge osteoblàstic com al condroblàstic.

S'ha proposat en diferents estudis que Osterix és necessari per a la diferenciació dels preosteoblasts a osteoblasts funcionals, perdent així les cèl·lules la capacitat de diferenciar a altres llinatges, fet que seria coherent amb la observació de que els osteoblasts defectius per Osterix expressen gens característics dels condrocits.

Basant-se en l'observació dels ratolins knock-out per Runx2 i Osterix i els estudis realitzats fins al moment, es va proposar que Osterix havia de ser un gen regulat directament per Runx2 i s'ha proposat que Osterix podria ser el gen responsable de segregar el llinatge osteoblàstic d'aquest llinatge preosteoblàstic bipotencial (Nakashima and Crombrughe, 2003).

Tant Dlx5 com Osterix són necessaris per a l'expressió del Col·lagen de tipus I i l'Osteocalcina en osteoblasts, suggerint aquest fet que ambdós factors podrien interaccionar en la regulació de certs marcadors osteogènics (Nakashima et al., 2002; Koga et al., 2005; Hassan et al., 2004; Lee et al., 2006a).

S'ha descrit la capacitat d'Osterix d'induir Fosfatasa Alcalina, Col·lagen i Osteocalcina (Nakashima et al., 2002), també la cooperació amb NFAT, un factor de transcripció involucrat en la diferenciació dels osteoclasts, junt amb el qual regula la formació de l'os (Koga et al., 2005).

DISCUSSION

No obstant, encara es coneixen poc els efectes concrets d'Osterix i quins gens regula per induir la mineralització. En aquest sentit els clons induïbles d'Osterix que hem generat poden constituir una eina molt útil per estudiar els esdeveniments de la diferenciació osteoblàstica que tenen lloc *downstream* d'Osterix.

Recerca de nous gens regulats per BMP-2

Existeixen diverses tècniques per la detecció de nous gens diferencialment expressats en resposta a estímuls extracel·lulars. La tècnica més emprada en els darrers anys han estat els microarrays que permeten estudiar l'expressió diferencial d'un gran nombre de gens, però són poc eficients en la detecció de transcrits poc abundants.

La PCR supressiva substractiva és una tècnica que permet enriquir transcrits poc abundants i diferencialment transcrits en dues poblacions cel·lulars diferents. L'avantatge d'aquesta tècnica és que s'utilitza el cADN d'una i altra població per substreure recíprocament els gens comuns i l'ús d'adaptadors units als transcrits obtinguts que permeten normalitzar els transcrits menys expressats reduint fins a 1000 vegades la diferència en l'abundància amb els més expressats.

Per la nostra experiència, podem afirmar que la PCR supressiva constitueix un mètode molt poc eficient per a l'aïllament de nous gens induïts per un factor de creixement. La gran quantitat de falsos positius i seqüències no identificades a les bases de dades fan que aquesta tècnica impliqui molta feina per pocs resultats, altres tècniques aparegudes recentment com el "Chip on ChIP", que combina la Immunoprecipitació de cromatina amb el microarray, estan demostrant ser molt més efectives per localitzar gens induïts per factors específics. No obstant, l'ús d'aquesta tècnica ens ha permès trobar un gen que podria tenir certa rellevància en la senyalització per BMP-2.

Clc5 (canal de clor 5) és una proteïna que pertany a la família dels canals de clor. A diferència d'altres membres d'aquesta família, Clc5 es troba localitzat als endosomes i intervé en l'endocitosi. Fins al moment, s'havia descrit la seva presència al tub proximal del ronyó on la seva funció és la de contribuir a la reabsorció proteica de proteïnes petites com l'Albúmina (Sasaki et al., 2001; Piwon et al., 2000).

L'absència de Clc5 produeix la malaltia de Dent que té un fenotip d'afectació principalment renal, però que també produeix una elevada renovació de l'os (Revisat per Guggino, 2007), la qual cosa va cridar la nostra atenció. Hem demostrat que Clc5 és un gen transcrit en les cèl·lules C2C12 i que la BMP-2 reprimeix la seva transcripció, també hem demostrat que l'expressió d'un vector codificant per aquest canal en cèl·lules C2C12 modifica l'expressió d'*osterix*.

Tot i que pel moment desconeixem el mecanisme d'aquesta acció, la funció de Clc5 en l'endocitosi ens dona una pista de quina podria ser la seva acció en la diferenciació osteoblàstica. Diferents receptors per diversos factors de creixement han de ser endocitats per a la seva òptima senyalització intracel·lular. Entre ells TβRI i TβRII (Revisat a Chen, 2008; Di guglielmo et al., 2003) i BMPRI i BMPRII (Hartung et al., 2006), l'endocitosi dels receptors de BMP podria influir en la regulació d'alguns gens *downstream* com ara *osterix*.

DISCUSSION

Per altra banda, el grup de William Guggino (Hryciw et al., 2003) ha demostrat la interacció de Clc5 amb la Cofilina, una proteïna implicada en la reorganització del citoesquelet d'actina que regula molts processos, entre ells l'endocitosi (Bamburg, 1999; Okreglak and Drubin, 2007) i que és fosforilada per acció de BMP-2 a través de la proteïna LIMK1 que s'uneix a la cua citoplasmàtica del recetor de tipus II de les BMPs (Edwards et al., 1999; Scott and Olson 2007; Gamell et al J Cell Sci 2008). El grup de William Guggino proposa que la fosforilació de la Cofilina reprimeix l'endocitosi a través de la seva unió Clc5.

D'aquesta manera, BMP-2 podria actuar sobre el Clc5 de dues maneres, per una banda reprimint-ne la transcripció i per altra banda a través de la regulació de la Cofilina que interacciona físicament amb el canal de clor5 en els endosomes.

DISCUSSION

CONCLUSIONS

BMP-2 induïx la isoforma llarga d'Osterix en cèl·lules C2C12 i SaOs2. En cèl·lules C2C12 la transcripció de l'ARN missatger d'*osterix* comença a induir-se al voltant de les 2 hores, arriba al seu màxim a les 8 hores i es manté estable fins a les 24 hores. L'expressió de la proteïna Osterix s'observa a partir de les 4 hores d'afegir BMP-2.

El lloc d'unió de Runx2 present en el promotor d'*osterix* és dispensable per la inducció en resposta a BMP-2 en cèl·lules C2C12. L'eliminació del lloc d'unió per NF-κB provoca una disminució de l'activitat basal del promotor d'*osterix* però no la seva inducció per BMP-2 en cèl·lules C2C12.

La inducció del promotor d'*osterix* per BMP-2 es dona a través d'una doble caixa TAAT palindròmica (TAATTA) que es troba en la part més proximal del promotor. La mutació d'aquesta caixa elimina la inducció del promotor d'*osterix* per BMP-2.

L'expressió ectòpica de Dlx5, però no d'altres proteïnes amb homeodomini, en cèl·lules C2C12 activa la transcripció del promotor mínim d'*osterix* en resposta a BMP-2, mentre que l'expressió ectòpica de Msx2 en reprimeix l'activitat. L'efecte de Dlx5 és degut a la unió directa a la seqüència TAATTA present en el promotor mínim d'*osterix* mentre que Msx2 no té la capacitat d'unir-se a aquesta seqüència.

L'expressió de Dlx5 en resposta a BMP-2 precedeix l'expressió d'Osterix i la seva silenciació o sobreexpressió provoca l'efecte correlatiu en Osterix. Dlx5 s'uneix al promotor d'*osterix* endogen *in vivo* i n'activa la transcripció reclutant la RNA polimerasa II, p300 i incrementant la acetilació de la Histona H3.

CONCLUSIONS

No hem observat capacitat d'unió de les proteïnes Smad1 i Smad4 al promotor d'Osterix de forma directa, però indirectament intervenen en l'expressió d'aquest mitjançant la inducció de Dlx5 en resposta a BMP-2.

p38-MAPK s'activa en resposta a BMP-2 en cèl·lules C2C12 i fosforila a Dlx5. Aquesta fosforilació n'augmenta el potencial transactivador sobre el promotor d'*osterix*. No hem observat que la fosforilació de Dlx5 per p38-MAPK alteri la vida mitja o la afinitat per l'ADN de Dlx5.

Dlx5 integra les vies dependents i independents de Smad induïdes per BMP-2 en la diferenciació osteoblàstica.

P53 regula negativament l'expressió d'Osterix per un mecanisme desconegut. No hem observat unió directa de p53 a Dlx5 ni efecte de p53 en la regió de resposta a BMP-2 del promotor d'*osterix*.

BMP-2 reprimeix la transcripció del gen de *clc5*, un canal de clor involucrat en l'endocitosi. L'expressió forçada de ClC5 interfereix en la transcripció d'Osterix però no d'altres marcadors de diferenciació osteoblàstica. Aquesta observació suggereix la possible implicació de l'endocitosi en la regulació d'Osterix.

MATERIALS I MÈTODES

*“tu que ya eras torpe de racionalista,
no lo tienes fácil -satanás te asista-
siendo sólo fea, siendo sólo arpía,
nunca serás bruja de categoría”*

Javier Krahe

1. Bactèries

S'han utilitzat bactèries de les soques JM109, XL1-blue, TOP10 i DH5 α de *E. coli* (*Escherichia coli*).

Creixement en medi líquid o sòlid:

Les bactèries es fan créixer en medi LB a 37°C.

Per al creixement en medi líquid, cal garantir una bona oxigenació del cultiu, sobretot si és tota una nit, no omplir el recipient més d'una tercera part i fer créixer en agitació (200 rpm aproximadament).

Per creixement en medi sòlid, s'utilitzen plaques de petri amb LB-agar que s'incuben a 37°C en posició invertida. La majoria de soques de *E. coli* formen colònies a les 16 hores d'haver plaquejat, cal evitar que s'estiguin més estona a l'incubador perquè poden aparèixer colònies satèl·lit. Les plaques es poden conservar a 4°C, a aquesta temperatura les colònies de *E. coli* tenen el creixement aturat.

Les bactèries en medi líquid es poden congelar. Es fa créixer un cultiu fins a saturació, s'afegeix un 15% de glicerol i es pot congelar a -80°C.

Els stock Glicerol poden conservar-se durant anys, però poden acabar fent-se malbé

Medi LB: (per 1L)

10 g Bacto-triptona
5 g extracte de llevat
10 g NaCl

Preparació de cèl·lules competents:

- Picar en un vial de bactèries congelades en glicerol (no cal descongelar-les). Posar la punta en un tub estèril de 15 ml que contingui 3 ml LB.
- Incubar a 37°C O.N. (Over Night ~ 16 hores)
- Fer una dilució 1:50 (1 ml en 50 ml LB).
- Incubar en un shaker 2h a 37°C (pot ser en 2 falcons de 50)
- Medir la densitat òptica a $\lambda=600\text{nm}$. –Primer fer un blanc amb LB sol-, La lectura ha de donar un valor entre 0'3 i 0'5 lo qual vol dir que les bactèries es troben en la fase de creixement exponencial.
- Mantenir 30' en gel i acte seguit centrifugar a 2500 RPM a 4°C durant 15 min.
- Resuspendre en CaCl_2 0'1M* procedint de la següent manera: primer en 1 ml i resuspendre, després en 3 ml i resuspendre i finalment en 20ml i

Agafar la punta amb una pipeta prèviament descontaminada, estem treballant sense antibiòtic i és fàcil que se'ns contamini

*aprofitar els 30' per fer el CaCl_2 * i posar la centrifuga a 4°C*

MATERIALS I MÈTODES

resuspendre (millor deixar una estona en gel cada vegada que anem a augmentar el volum)

- Mantenir 30' en gel. Centrifugar 15' a 4°C a 2500 RPM
- Tornar a resuspendre en CaCl₂ primer en 1ml i després en 5ml.
- Deixar aquests 5ml O.N. en gel (en la càmera freda)

Les competents arriben a la màxima eficiència el dia següent de fer-les, però si es desitja ja es poden utilitzar.

Es poden deixar a la càmera freda fins a una setmana, però si es desitja congelar-les:

- Xoc DMSO: Afegir 175ul DMSO als 5ml de competents, barrejar suaument i deixar en gel 5 min.
- Afegir la mateixa quantitat de DMSO altra vegada i barrejar per inversió.
- Fer alíquotes de 0'5ml i congelar a -80°C.

* Usar sempre CaCl₂ hidratat, no la forma anhidra, i esterilitzar per filtració (filtre de 0,2um). Per 50 ml de CaCl₂-2H₂O 0,1M s'ha de posar 0'735g de CaCl₂-2H₂O en 50ml de H₂O.

Transformació:

- Afegir 50-200 ng de vector o ¼ del producte de lligació (prèviament cal haver inactivat la lligasa) a 100 µl de bacterias competents en un eppendorf en gel.
- Barrejar i deixar en gel 10-30 minuts.
- Xoc tèrmic d'entre 30s i 2 minuts (depèn de la soca bacteriana) en un bany a 42°C.
- Ràpidament tornar a posar en gel i mantenir 5 minuts.
- Afegir 300µl de LB sense antibiòtic a l'eppendorf i incubar 50 minuts a 37°C en agitació.
- Plauejar en una placa d'agar sòlid amb l'antibiòtic corresponent a la resistència del plàsmid amb que haguem transformat.

La lligasa s'inactiva escalfant el producte de la lligació a 65°C durant 15 minuts.

Producció de proteïnes recombinants:

- Transformar bacterias amb el plàsmid d'expressió on hem clonat la proteïna que volem expressar en forma recombinant.
- Créixer bacterias transformades en 15 ml de LB + antibiòtic O.N (fins a saturació).
- Diluir els 15 ml de cultiu saturat en 250 ml. Créixer durant 1h30' a 37°C en agitació.
- Medir l'absorbància a λ₆₀₀, ha de ser un valor entre 0,3 i 0,5. Preferiblement proper a 0,5.
- Quan arribem a la densitat desitjada, enretirar 1 ml que serà el control no induït.
- Afegir IPTG perquè quedi a una concentració de 0,3mM. Deixar 2h-2:30 a l'incubador a 37°C en moviment.
- Centrifugar 10' a 6000rpm, a partir d'aquí treballar sempre a 4°C.
- Resuspendre el pelet en Tampó de lisi NP-40 + inhibidors.
- Sonicar (sempre en gel) 3 pulsos de 20s, deixar una estona entremig, cal evitar que pugui la T^a del tub.

Usar un falcon de 50 ml. Recordar que cal que quedi aire per créixer les bacterias.

Es pot augmentar la concentració de NaCl del tampó de lisi. aconseguirem S'ha de veure un lleuger viratge en el color, si no el veiem és que cal sonicar més.

MATERIALS I MÈTODES

- Agitar en gel 20' en posició horitzontal. Enretirar una altra alíquota, serà el control d'inducció per IPTG.
 - Centrifugar a 15000g durant 15', agafar el sobrenedant i descartar el pelet (es pot conservar per si no hagués solubilitzat bé la proteïna).
 - Incubar amb glutathion-beads, primer se'ls hi ha de treure l'etanol i equilibrar amb el buffer NP40 que estem utilitzant.
 - Agitar a 4°C entre 1hora i O. N.
 - Centrifugar 2' a 4°C a 2000rpm i afegir nou tampó de lisi amb inhibidors. Repetir el rentat 3-5 vegades. Al final resuspendre les boletes en 400 µl de tampó. Augmentar el Glicerol al 20% (el tampó en té la meitat).
 - Aliquotar i guardar a -20°C.
- Es pot valorar l'eficiència de la recuperació de proteïna corrent-la en un gel d'acrilamida junt amb una recta patró amb diferents quantitats conegudes de proteïna. S'observa mitjançant tinció de comassie.

Opcionalment es poden dialitzar les proteïnes:

- Afegir 1 ml de Glutació 50 mM en 10 mM Hepes a la proteïna recombinant, i portar a pH=8. Deixar 15' en agitació a T^a ambient.
- Fer un spin a velocitat màxima
 - Agafar el sobrenedant i introduir en una bossa de diàlisi. Segellar els extrems amb pinces.
 - Posar en 1 vas amb 1 litre de tampó de diàlisi (10mM Tris pH7,5 i 10% glicerol). Deixar O.N. en agitació a 4°C.
 - Canviar el tampó de diàlisi i deixar 2 hores més.
 - El contingut de la bossa és la proteïna recombinant dialitzada.
 - Passar a eppendorfs i guardar a -20°C (o millor encara a -80°C).

2. Cultius cel·lulars eucariotes

És important ser nets per evitar contaminacions, especialment si hem treballat prèviament amb bacteries. Rentar-se les mans amb etanol abans de començar i si treballem amb guants eliminar el talc esbandint-los amb aigua.

Medi de cultiu:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementat amb:
15% FBS (Fetal Bovine Serum)
50 U/ml penicil·lina
50 µg/ml sulfat d'estreptomicina
2 mM piruvat sòdic

Diferenciació amb BMP-2:

Després de realitzar proves amb diferents concentracions, vam arribar a la conclusió que la concentració 2nM de BMP-2 és suficient per a la diferenciació osteoblàstica de les cèl·lules C2C12 i també hem usat aquesta concentració en les cèl·lules SaOs-2.

La BMP-2 s'ha aplicat sempre en medi sense FBS. Inicialment vam realitzar proves amb Horse Serum al 2% i/o β-Glicerol Fosfat i Vitamina C a

MATERIALS I MÈTODES

diferents concentracions, sense observar diferències notables en els marcadors de l'osteogènesi.

Incubadors:

37°C

5% o 10% de CO₂

Cèl·lules utilitzades:

C2C12:

Cultivades al 10% de CO₂ i evitant que arribin a confluència en cap moment.

293:

Cultivades al 5% de CO₂.

SaOs-2:

Cultivades al 5% de CO₂.

Protocol per congelar cèl·lules

Preparar els criotubs. Cada vial ha d'anar rotulat amb el nom de les cèl·lules, la data de congelació i el nom de l'investigador.

Tripsinitzar les cèl·lules i resuspendre en DMEM 15 % FBS, agafar una alíquota per contar-les i mentrestant centrifugar (1200rpms) i eliminar el sobrenedant.

el sobrenedant es pot eliminar per decantació., Sempre dins de la campana!

Resuspendre les cèl·lules en DMEM 15% FBS i portar a un volum de 0,9 ml / vial. (normalment es congela mig milió de cèl·lules per vial).

Afegir el DMSO (0,1 ml / vial) i alíquotar en els criotubs.

el DMSO s'ha d'afegir amb cura, fent-lo lliscar per la paret del tub.

Emboliquem els tubs en paper i després en paper d'alumini. Portar-ho a -80°C sense perdre temps. Esperar 24 hores abans de passar les cèl·lules al tanc de nitrogen.

Protocol per descongelar cèl·lules:

-Preparar una placa amb medi de cultiu abundant.

-Descongelar les cèl·lules en un bany a 37°C durant 1 minut. Si no s'han descongelat del tot, resuspendre amb medi de cultiu i transferir desseguida a la placa.

-Posar a l'incubador i quan ja estan enganxades a la placa (3-4 hores aprox) canviar el medi de cultiu per eliminar el DMSO.

Alternativament, es pot eliminar el DMSO centrifugant les cèl·lules a 1200 RPM 4 min en medi abundant. Resuspendre bé abans de plaquejar.

3. Aïllament i manipulació d'àcids nucleics

Precipitació d'ADN:

- 1-Afegir un 10% del volum d'Acetat sòdic 3M.
 - 2-Afegir 3 volums d'Etanol absolut o 1 volum d'Isopropanol
 - 3-Barrejar per inversió i deixar al congelador un mínim de 30 minuts.
 - 4-Precipitar centrifugant a 4°C a velocitat màxima durant 15min.
 - 5-Descartar el sobrenedant i afegir etanol 70% a -20°C. Centrifugar a velocitat màxima 10 minuts més.
 - 6-Descartar el sobrenedant apurant amb una pipeta. Deixar assecar bé.
 - 7-Resuspendre en TE (o en aigua estèril) tan bon punt s'ha assecat l'etanol.
- No esperar més del compte, doncs cal evitar que es ressequi.

Pot estar-se al congelador més de 30 minuts, i fins i tot una nit.

Quantificació d'àcids nucleics:

Si s'utilitza un espectrofotòmetre, tenir en compte que la llum UV pot necessitar uns minuts per establir-se.

-Llegir l'absorvència a $\lambda 260$ i a $\lambda 280$ amb l'espectrofotòmetre en una cubeta de quarç o en el nanodrop.

La concentració d'ARN i d'ADN de cadena senzilla és el resultat de multiplicar el valor de l'absorvència a $\lambda 260$ per $\sim 0,04$ mg/ml

La concentració d'ADN de doble cadena és el resultat de multiplicar el valor de l'absorvència a $\lambda 260$ per $\sim 0,05$ mg/ml

La puresa de la mostra s'obté al dividir el valor de l'absorvència a $\lambda 260$ (absorció àcids nucleics) pel valor de l'absorvència a $\lambda 280$ (absorció proteïnes).

per fer bones real-times és òptim que la ràtio ràtio $\lambda_{260} / \lambda_{280}$ sigui superior a 1.8.

Miniprep, protocol mínim:

- Picar les colònies i fer créixer en 3 ml de LB, de 12 a 16 hores.
- Transferir el contingut a un eppendorf centrifugant 3'a 10000g tantes vegades com calgui. Descartar el sobrenedant.
- Resuspendre les cèl·lules en 150 ul de TE, evitar els grumolls.
- Afegir 150 μ l de Tampó de Lisi (barrejar per inversió) i deixar en gel 5'
- Afegir 150 μ l de Acetat Sòdic 3M pH5,2 (barrejar per inversió) i deixar en gel 5'
- Centrifugar 5' a 10000g a 4°C. Agafar el Sobrenedant i descartar el pellet.
- Afegir Isopropanol 1:1 o Etanol 3:1, millor que sigui fred. VORTEXAR i deixar com a mínim 30' al congelador (es pot deixar O.N.)
- Centrifugar a 10000g 20' a 4°C. Eliminar el Sobrenedant desseguida. Afegir Etanol al 70% (fred) a sobre i centrifugar 15' a 10000g.

MATERIALS I MÈTODES

-Treure i deixar assecar bé l'Etanol. Quan estigui completament sec, afegir 50-100 μ l d'aigua destilada estèril i 1:50 de RNAsa de l'stock (1 μ g/ μ l). Si costa de resuspendre el pellet escalfar-lo a 50 °C.

*Centrifugar a 13000g en comptes de 10000, em sembla que millora l'eficiència.

Obtenció d'ADN genòmic:

1/ Tripsinitzar i recollir una placa 100 mm confluent "a tope" en un falcon de 15ml (estèril, s'entén). Posar en fred desseguida.

2/ Rentar 2 vegades amb PBS fred estèril (resuspenent i centrifugant). Mantenir en fred per evitar l'acció de les nucleases.

3/ Resuspendre en *Buffer Digestió*. Es recomana utilitzar el mateix volum que ocupen les cèl·lules.

Per ser més precisos:

Si tenim menys de 3×10^7 utilitzar 300 μ l.

Si en tenim més, utilitzar 1 ml de buffer per cada 10^8 cèl·lules.

4/ Incubar les cèl·lules a 50°C en agitació (vigorosa) durant 12-18 hores.

5/ Extreure l'ADN amb Fenol/Cloroform. Si les fases no es resolen bé, afegir novament un volum de buffer de digestió. Si en la interfase apareix precipitat blanc, repetir el fenol/cloroform.

6/ Precipitar afegint 1 volum de Isopropanol fred i un 10% de Acetat sòdic 3M, pH5.2. S'ha de notar la precipitació desseguida (es pot deixar 30' en congelador). Centrifugar, rentat etanol 70%, tornar a centrifugar i deixar assecar.

7/ Resuspendre en TE, no en aigua, doncs es trencaria.

Per tal d'evitar el trencament de l'ADN genòmic al passar per la punta de la pipeta, es pot tallar els primers milímetres de la punta per eixamplar el diàmetre de l'orifici d'aquesta.

IMPORTANT: Mai resuspendre l'ADN genòmic amb una pipeta (es trenca)
No congelar-lo (mantenir-lo a la nevera, pot durar un parell de setmanes o més)

Buffer de Digestió:

100 mM NaCl

10 mM Tris pH 8

25 mM EDTA pH 8

0.5% SDS

0.1 mg/ml proteinasa K (Fresca! Afegir-la cada vegada)

Preparació de mostres d'ADN per a seqüenciar:

Mix:

2 μ l Big Dye (està al congelador)

2 μ l Buffer (està a la nevera)

3'2 pmol primer (només 1!)

DNA motllo { 50-100 ng si és de Cadena Senzilla
200-500 ng si és de Cadena Doble
30-90 ng si és producte de PCR

Aigua destilada fins arribar a 10 μ l

PCR:

3' a 94°C
25 x { 30'' a 94°C
5'' a la T^a adequada segons el primer (no més de 60)
4' a 60°C
4' a 72°C

Purificació:

- Vortexar columna G50 i acte seguit arrancar la part inferior i fer ¼ de volta al tap.
- Centrifugar 2' a 7000 RPMs en un eppendorf sense tapa.
- Descartar el líquid eluit i afegir 10 µl d'aigua estèril al centre.
- Tornar a centrifugar 2' a 7000 RPMs.
- Posar columnes en nous eppendorf estèrils i afegir els 10 µl de producte de la PCR.
- Centrifugar 1' a 10000 RPMs. L'eluit és la mostra a seqüenciar.
- Assecar a l'Speed Vac fins que s'assequi (uns 15 minuts). No arrancar la tapa de l'eppendorf.
- Embolicar en paper de plata i guardar a -20°C fins a portar-ho al servei de seqüenciació. Posar-hi el nom i numerar-ho en sèrie de números naturals consecutius partint de l'1 (és a dir 1, 2, 3,...)

Gel d'ARN

Es posa un bany a escalfar a 65°C

Es dissol l'agarosa i el tampó MOPS en aigua destil·lada en un erlenmeyer, però sense posar el volum corresponent al formaldehid (5,4 % del volum) que es posarà al final.

Escalfar al microones perquè es dissolgui l'agarosa, quan aquesta estigui dissolta deixar atemperar al bany a 65°C, tapant el broc.

Quan s'ha atemperat s'afegeix el formaldehid (a la campana de tòxics), es barreja i s'aboca a la cubeta on es gelificarà.

Càrrega de mostres:

S'afegeix 20µg/ml de bromur d'etidi al tampó (diluïnt 1:20 un stock 400µg/ml).

S'afegeix el tampó de mostra d'ARN (5 vegades el volum de la mostra, que queda diluïda 1:6).

per 100 ml (gel al 1,2 %): 1,2g d'agarosa, 10 ml de tampó MOPS10x i 84,6ml d'aigua. Després de bullir afegir 5,4 ml de formaldehid.

Utilitzar l'stock de formaldehid que està al 36%

Tapar parcialment el broc de l'erlenmeyer o impedir que l'agarosa bulli més estona de la necessària perquè no se'ns evapori l'aigua..

MATERIALS I MÈTODES

S'escafa la mostra a 65°C durant 10' per tal de linearitzar l'ARN i acte seguit es posa en gel 5'. Les mostres estan a punt per carregar al gel.

MOPS 10x

MOPS 0,2M

Acetat sòdic mM

EDTA 5mM

Ajustar a pH 7,4

Protegir de la llum

Tampó de mostra d'ARN

Glicerol 6,6 %

Formamida 50%

Formaldehid 6%

Tampó MOPS 1x

Enrasar amb aigua DEPC.

Es prepara a la campana de tòxics!!

Northern Blot

Transferència:

Muntar sobre un suport sobre una cubeta amb SSC 10x

1-Posar un paper de filtre sobre el suport, en contacte amb la cubeta a banda i banda.

2-Col·locar a sobre el gel cap per avall.

3-Col·locar-hi la membrana també cap per avall.

4- Col·locar 3 papers Watman

5- Col·locar 10 cm de paper de filtre i un pes a sobre.

Fixació:

En un paper de filtre, deixar la membrana a 80°C durant 2 hores.

Abans de fixar, es pot observar l'ARN ribosòmic al transiluminador i marcar a quina alçada es troba

Prehibridació:

-Bullir l'ADN d'esperma de salmó 5 min a 95°C i posar en gel desseguida.

-Preparar la solució de prehibridació en el següent ordre:

1er) 5 ml formamida

2on) 2,5 ml SSPE 20x

3er) 1 ml de solució Denhart

4t) 0,25 ml SDS 20%

5è) 0,2 ml d'ADN d'esperma de salmó

6è) 1,05 ml d'aigua estèril

-Posar amb la membrana dins d'un tub d'hibridació

-Hibridar a 42°C durant 3 hores

Hibridació:

-Resuspendre la sonda: 41µl TE + 4µl sonda.

-Bullir 5 minuts a 95°C per desnaturalitzar, posar en gel desseguida

MATERIALS I MÈTODES

- Resuspènre la sonda en un tub del kit *Random primer* (Amersham Biosciences)
- Afehir 5µl de nuclètid αdCTP i posar a 37°C durant 15 minuts.
- Bullir 5 minuts i deixar 5 minuts més en gel. Fer un spin.
- Afehir 2 ml de sulfat de dextrà al 50% a la solució de prehibridació.
- Afehir la sonda al tub d'hibridació procurant que no caigui directament sobre la membrana i que es dissolgui bé abans d'inclinar el tub.
- Incubar a 42°C O.N.

Rentats:

- 1er rentat amb 2xSSC i 0,1% SDS, 50°C durant 30 minuts.
- 2on rentat amb 0,1xSSC i 0,1% SDS 50 °C durant 45 minuts.

Visualització:

Es pot usar una pantalla phosphoimager o una pel·lícula fotogràfica especial per a fòsfor.

SOLUCIONS:

SSPE 20x: (per 1 litre)

175,3g NaCl
27,6g NaH₂PO₄-H₂O
7,4g EDTA, pH 7,4

SSC 20x: (per 1 litre)

175,3g NaCl
88,22g citrat sòdic, pH 7

Denhart 50x: (per 0,5 litres)

5g Ficol (type 400, Pharmacia)
5g polivinilpirrolidona
5g BSA (Albúmina de Sèrum Boví)

ADN d'esperma de salmó:

L'stock es prepara a 10 mg/ml en aigua, se sonica (2 pulsos d'un minut a màxima potència) i es guarda congelat a -20°C.

Aïllament d'ARN mitjançant Ultraspec (Ultraspec 10500, Biotecx)

Abans de començar, l'Ultraspec ha d'estar a Temperatura ambient, en cas contrari ens farà grumolls i quedarà repartit de manera diferent en els pouets.

- Posar 0.5 ml Ultraspec / pouet C6 o equivalent (treballar a la campana de tòxics). IMPORTANT REMENAR BÉ L'ULTRASPEC ABANS D'AGAFAR-NE.
- Deixar les plaques amb l'Ultraspec en gel i anar movent-les de tant en

*Quan treballem amb ARN hem d'estar segurs de treballar en una zona lliure de nucleases
Utilitzar sempre material estèril, guants prèviament rentats amb etanol*

*L'ultraspec conté fenol,
llençar les puntes al recipient adequat*

MATERIALS I MÈTODES

tant (uns 5 minuts).

-Amb la pipeta resuspendre i netejar els pouets i anar transferint a eppendorf estèrils en gel.

-Guardar-ho a -80°C . En principi l'ARN es conserva bé en l'Ultraspec per uns dies, però millor no abusar.

-Deixar descongelar els eppendorf en gel. Poden tardar ben bé una hora, mentrestant posar la centrífuga a refredar.

-Afegim $100\mu\text{l}$ Cloroform / eppendorf. 15 segons de vòrtex al màxim i deixar 5 minuts en gel.

-Centrifugar 20' a 9000G en fred. No centrifugar a més velocitat perquè el fenol faria petar els eppendorf.

-Recollir la fase aquosa superior evitant que ens entri la interfase. Millor perdre una part del volum que acostar-se massa. (Continuar treballant en gel)

-Afegir Isopropanol fred (0.8 volums) i deixar 30' al congelador.

-Centrifugar 30' a 13000 RMPs (18000G) a 4°C .

-Retirar el Sobrenedant sense tocar el pellet. Pot fer-se per decantació.

-Afegir $500\mu\text{l}$ d'Etanol 70% fet en Aigua DEPC i Fred. Es pot fer un petit vòrtex per fer saltar el pellet.

-Centrifugar 10' a 13000 RPM a 4°C .

-Procedir a assecar amb pipeta i puntes estèrils. Al final es pot deixar 10-15 minuts sota la làmpara i es pot usar el buit per assecar les últimes gotes de la paret.

-Resuspendre en $15\mu\text{l}$ d'aigua DEPC, escalfar 10 minuts a $55-60^{\circ}\text{C}$ al bany sec i congelar a -80°C .

-Al descongelar, és el moment de resuspendre amb pipeta i puntes estèrils. Aquest pas és important!

Tinc la impressió que si està més d'una setmana, després surt molt brut.

Aprofitar la centrífuga per rotular eppendorf nous.

Pot estar-se al congelador més de 30 minuts, i fins i tot una nit.

Si s'usa el buit posar puntes blanques (d'obertura mínima) però igualment no acostar-se gaire al pelet.

Retrotranscripció

Hem usat el Kit Ready-To-Go T-Primed First-Strand, que ja conté l'Oligo-dT incorporat en les columnes (Kit Ready-To-Go T-Primed First-Strand, 27-9263-01, Amersham)

-Normalment usem $5\mu\text{g}$ per fer la RT i omplim amb aigua DEPC fins al $33\mu\text{l}$. Si no temim prou RNA per agafar $5\mu\text{g}$ es pot fer la RT amb menys quantitat (teòricament podem baixar fins a 100ng , però no funciona igual de bé).

-Posar l'RNA que està en un volum de $33\mu\text{l}$ a escalfar a 65°C durant 5 minuts.

-Transferir a un bany a 37°C durant 5 minuts més. Posar-hi també els tubs de la RT.

-Passar l'RNA als tubs per la RT però NO BARREJAR!!

-Incubar a 37°C uns 5 minuts i llavors sí barrejar els tubs Vortexant.

-Fer un spin després del vòrtex i deixar a 37°C durant una hora. La RT està feta i a punt per la Real Time.

Rotular els tubs d'RT que anem a utilitzar

PCR Real time:

Important per la Real Time:

- Que la llum no toqui els oligos.
- Intentar usar pipetes que mai no hagin tocat el gen amplificat.
- Carregar sobre una peça fosca i sòlida que permeti apretar al posar els taps.
- Centrifugar les plaques abans de posar a la PCR.

Quantitats per pouet en una placa de 96 d'applied:

Per una banda: 1µl mostra + 10.25µl H₂O estèril.

Per altra banda: 1.25 µl primer + 12.5 µl TaqPolimerasa (2x).

- De cada mostra faig triplicats per a cada sonda.

Sondes utilitzades per les PCR Real-Times:

Un truc per no descomtar-se és marcar les vores dels pous amb un rotulador. En les plaques de 96 wells, inserir puntes grogues als forats que hi ha entre pouets per senyalitzar els pous a omplir cada vegada

Construccions d'ADN:

Gels d'agarosa:

- La concentració d'agarosa al gel varia segons el tamany de l'ADN que volem observar. Els gels es preparen i es corren en TAE 0,5x.
- Escalfem l'erenmeyer al microones fins que bulli. De tant en tant, mentre s'escalfa, és convenient anar agitant per evitar grumolls.
- Quan s'ha atemperat, afegir el Bromur d'etidi. No refredar-lo massa perquè sinó solidifica.
- Posar 8 µl d'EtiBr (400µg/ml) per 100 ml de gel. Agitar una mica l'erenmeyer, i aboquar el contingut al suport de gels.
- Posar la pinta que ens crearà els pous, si apareixen bombolles: retirar-les amb una punta.
- Netejar l'erenmeyer.

Mostres

- Loading Dye: està 6x, el volem 1x.

5 µl de mostra

1 µl loading dye.

- “Gene RulerTM.DNA Ladder Mix”: és el marcador de pesos. Normalment diluïm la concentració comercial: 0,50µg/µl → 0,25µg/µl.

- Posem 4µl del marcador. Tindrem 1µg de DNA en el marcador. Sabent quina quantitat hi ha, ens permetrà inferir a *grosso modo* quina quantitat hi ha a les mostres.

- Preparem les mostres en eppendorfs estèrils.

Loading Dye:

60% Glicerol

60mM EDTA

Blau Bromofenol

MATERIALS I MÈTODES

TAE 50x:

Tris-HCl pH8	0,242 g/l
Àcid acètic	57.1 ml/l
EDTA	50 mM

Córrer les mostres

El buffer d'electroforesi es recicla.

No s'ha de posar el buffer d'electroforesi per sobre de la marca de la cubeta (si ho fem, parpellejarà).

-Podem carregar uns 50µl en els pous grans i 25µl en els petits.

-Córrer a 100V.

A mesura que avança en el gel va perdent senyal de Bromur d'Etidi. Si volem veure mostres grosses (ex. 10kb) cal deixar-lo córrer una miqueta més. Si volem veure coses petites no deixar que el front passi més enllà de la meitat.

Si es vol fotografiar el gel: Sempre treballar amb un guant per tocar el gel i l'altra mà lliure per manipular la càmera. Mai tocar amb guant la càmera.

Per aïllar un fragment d'ADN

Utilitzar el transiluminador de llum UV per localitzar les bandes que ens interessin en un gel d'agarosa.

IMPORTANT: protegir-se la cara, especialment els ulls.

Tallar les diferents bandes que amb un bisturí diferent, que sigui nou o rentat amb aigua i sabó.

Aïllament bandes amb Glassmilk (Geneclean)

-Resuspendre en NaI pH 8,8

-Disoldre a 50°C 10-15 min, agitar de tant en tant

-Afegir resina Glassmilk, vortexar enèrgicament i deixar reposar 1 hora, agitar de tant en tant.

-Realitzar 3 rentats amb New Wash Buffer, precipitant la resina Glassmilk centrifugant 2 minuts a velocitat màxima.

-Assecar bé l'etanol per aspiració i deixar evaporar les restes.

-Resuspendre la resina en Tris 10mM pH 7,5

-Realitzar 3 precipitacions centrifugant 2 minuts a velocitat màxima i agafar només l'eluit perdent volum, cal eliminar totalment la resina encara que sigui a costa de perdre volum.

Lligacions:

Per calcular la proporció de molècules d'insert i de vector:

$$ngv = \frac{ngi \cdot Lv}{ri / v \cdot Li} \quad \text{o el que és el mateix} \quad ngi = \frac{ngv \cdot Li \cdot ri / v}{Lv}$$

MATERIALS I MÈTODES

ngv = ng vector (normalment partim de 100ng)
 ngi = ng insert
 Lv = Longitud del vector
 Li = Longitud de l'insert
 ri / v = ratio insert / vector (normalment = 3)

Preparar la lligació en gel:

100ng de vector
x ng d'insert
2 μ l de buffer T4 lligasa 10x
1 μ l T4 lligasa
portar a un volum de 20 μ l en aigua

IMPORTANT: El buffer T4 lligasa conté ATP i es fa malbé si es congela i descongela sovint. Fer alíquotes el primer cop que s'utilitza (sempre en gel).

Incubació de la lligació:

Si estem lligant extrems cohesius: Deixar O. N. (~16h) en un bany a 16°C.

Si estem lligant extrems roms: Deixar 2h a T^a ambient

Si estem lligant un extrem rom i un extrem cohesiu:

- 1er) Deixar O.N. en un bany a 16°C
- 2on) Afegir 2 μ l més de buffer T4 lligasa i 0,5 μ l de lligasa
- 3er) Deixar 2h a T^a ambient

IMPORTANT: Cal inactivar la lligasa abans de transformar (65°C 10 min).

Transfecció:

PEI:

Hem usat PEI de ExGen500TM

Preferiblement treure l'FBS de les cèl·lules.

- Diluir 10 μ g d'ADN en 250 μ l de NaCl (Filtrat) i vortexar
- Diluir 50 μ l de PEI en 200 μ l de NaCl (Filtrat)
- Afegir el PEI diluït a l'ADN diluït (en aquest ordre)
- Vortexar immediatament.
- Incubar la barreja 10' a T^a ambient.
- Afegir a les cèl·lules i agitar la placa de cultiu
- Si és possible: Centrifugar la placa 5' a ~1400RPM (~280g)
- Passades 2-3h, recordar tornar a posar FBS si l'havíem tret.

FUGENE:

(Fugene6 Transfection Reagent, Roche)

- Sembrar les cèl·lules a una densitat d'entre el 50 i el 80%.
- Utilitzar la relació de Fugene:ADN adient pel tipus cel·lular, per les C2C12 la ràtio òptima és 6:1.
- Diluir 6 μ l de fugene en 74 μ l medi d'Optimem introduint-lo directament en el líquid sense que toqui les parets del tub, barrejar colpejant amb els dits o fent vòrtex de 1s. Deixar reposar 5'.

MATERIALS I MÈTODES

- Diluir l'ADN en Optimem fins a un volum de 20 μ l.
- Llençar gota a gota els liposomes de fugene sobre l'ADN diluït. Barrejar colpejant amb els dits o fent vòrtex de 1s. Deixar reposar $\geq 15'$.
- Afegir a les cèl·lules. No cal treure els antibiòtics ni l'FBS del cultiu.

La ratio Fugene(μ l):ADN(μ g) ha estat provada amb el plàsmid pId1-183lux induïble per BMP-2 i amb un plàsmid codificant per la proteïna GFP. Les proporcions estudiades van ser 3:1, 3:2 i 6:1, sent aquesta última la que demostra ser més efectiva en les cèl·lules C2C12.

LIPOFECTAMINA 2000 / LTX:

Per transfectar amb lipofectamina és imprescindible haver retirat els antibiòtics del medi de cultiu.

-Transfecció de siRNA amb Lipofectamina 2000:

- Diluir 200 pmols de siRNAs en 500 μ l d'Optimem
- Diluir 10 μ l de Lipofectamina 2000 en 500 μ l d'Optimem. Vòrtex suau i deixar reposar 5'.
- afegir el siRNA diluït a la lipofectamina diluïda i barrejar per inversió.
- Esperar 20'-30' abans de transfectar.

-Transfecció amb Lipofectamina LTX:

- Plauejar les C2C12 perquè estiguin al 60% en el moment de transfectar.
- Hem observat que la proporció òptima Lipofectamina:ADN és
- Diluir l'ADN en 0,5 ml d'Optimem. Afegir-hi directament la lipofectamina i barrejar per inversió.

Estudi comparatiu de la transfecció mitjançant lipofectamina 2000 o lipofectamina LTX en cèl·lules C2C12:

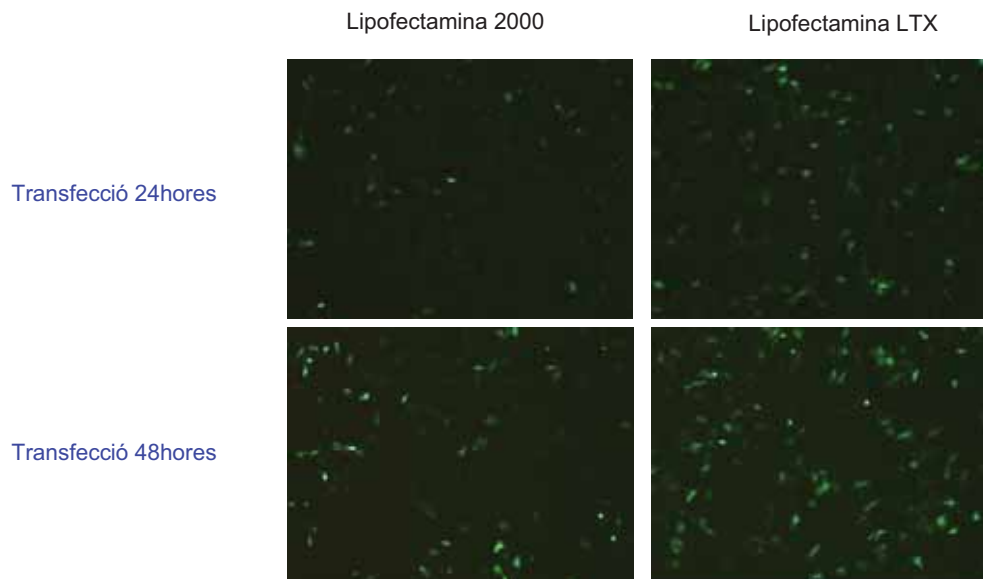


Figura 51. Les cèl·lules són C2C12 i es trobaven al 70% en el moment de la transfecció amb plàsmid GFP.

Transfectant amb Lipofectamina 2000 s'observa una parada del cycle cel·lular i la viabilitat de les cèl·lules és d'aproximadament el 80%
 Transfectant amb Lipofectamina LTX no s'observa parada del cycle cel·lular i la viabilitat de les cèl·lules és d'aproximadament el 98%.
 En conclusió, la lipofectamina LTX és més eficient, mata menys cèl·lules i no para el cycle cel·lular de les cèl·lules C2C12.

Efecte de la transfecció d'un plàsmid sobre l'expressió d'*osterix*:

Hem observat que la transfecció de les cèl·lules C2C12 amb un plàsmid qualsevol, té un efecte negatiu en la inducció de l'ARN missatger d'*osterix*. La transfecció de siRNAs, en canvi, no afecta l'expressió d'*osterix*.

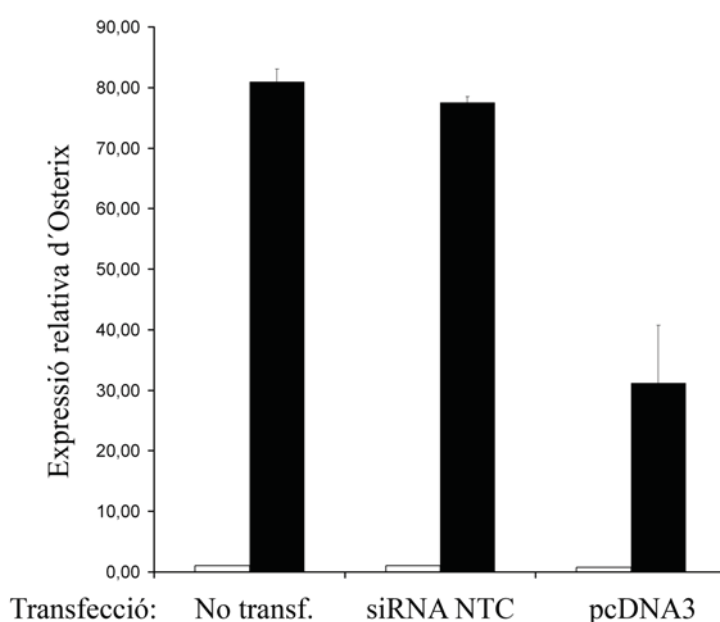


Figura 52. Cèl·lules C2C12 sense transfectar, transfectades amb un siRNA *scrambled* o amb un plàsmid buit. Com es pot observar, l'inducibilitat per BMP-2 es veu mermada en el cas de transfectar amb un plàsmid.

4. Assajos luciferasa

Cal remarcar que per a una bona inducció del *reporter* del promotor d'*osterix* cal que les cèl·lules estiguin en perfecte estat, s'hagin cultivat amb la quantitat correcta de FBS (15-20%) i no hagin arribat a confluència en els passis previs, doncs aquest fet impediria l'òptima diferenciació de les cèl·lules C2C12. Per altra banda, cal que sí es trobin en estat de confluència per primer cop en el moment d'afegir la BMP-2.

El control del bon funcionament de la BMP-2 i de la correcta diferenciació de les cèl·lules ha estat el reporter p183-lux del gen *idl* (López-Rovira et al., 2002). Vam considerar com a indicador d'una bona diferenciació osteoblàstica una inducció del *reporter* del promotor d'*idl* superior a 7 vegades respecte a l'activitat basal.

MATERIALS I MÈTODES

És important que les cèl·lules estiguin ben distribuïdes en la placa C6 per evitar que ens arribin a confluència abans de passar-les.

Les transfeccions han estat realitzades amb Fugene6 (Roche) en proporció Fugene:ADN 6(μ l):1,2(μ g). En totes les condicions s'ha introduït 1 μ g de plàsmids *reporter* o d'expressió. En el cas del *reporter* sol, s'ha afegit plàsmid pcDNA3 o pcDNA3.1 en la mateixa quantitat que els plàsmids d'expressió presents en les altres condicions. A més, s'ha afegit en totes les condicions 0,2 μ g d'un plàsmid codificant per β -Gal com a normalitzador de l'eficiència de transfecció.

1-Es transfecta les cèl·lules C2C12 al 60% de confluència en una placa Costar de 6 pous (C6) amb el reporter del p. mínim, el plàsmid per β Gal i opcionalment els corresponents vectors d'expressió.

2-Passades 12 hores es transfereixen les cèl·lules a plaques Costar de 24 pous (C24), per cada pouet de C6 fem 6 pouets de C24. Es tracta de passar les cèl·lules abans que arribin a confluència en la C6.

3-Quan arriben a confluència en la C24, es depleciona el medi de FBS +/- BMP-2 2nM (3 pous de cada) i es deixa 16-20 h.

4-Les cèl·lules es tracten amb el tampó de lisi del kit Luciferase assay system (Promega) i l'activitat β -galactosidasa amb el β -galactosidase detection kit II (Clontech). L'activitat d'ambdues reaccions es mesura al luminòmetre durant intervals de 15 segons.

5. Proteïnes:

Recollida de mostres:

Tampons de lisi usats:

Tritó X-100

50 mM Tris-HCl pH7,5
100 mM NaCl
5 mM EDTA
1% Tritó X-100

NP-40 (L'utilitzem per fer immunoprecipitacions)

50 mM Tris pH7,5
50 mM NaCl
10% Glicerol

*Utilitzar el tampó NP40
sempre que volguem
immunoprecipitar amb
anticòs anti-Flag*

Inhibidors (Afegir-los a última hora, el PMSF anar-lo renovant cada vegada)

MATERIALS I MÈTODES

Inh. de	Dissolvent	stock	utilitzem a	Dilució
Proteases				
Leupeptina	Aigua	5 mg/ml	5 µg/ml	1:1000
Aprotinina	Hepes 10mM pH8	2 mg/ml	2 µg/ml	1:1000
Pepstatina	10% Àcid acètic 90% Etanol	1 mg/ml	5 µg/ml	1:1000
Benzamidina	Aigua	10 mg/ml	100 µg/ml	1:100
PMSF	Isopropanol	100 mM	1mM	1:100
Inh. de fosfatases				
NaF	Aigua	1M	10 mM	1:100
β-Glicerol fosfat	Aigua	1M	10 mM	1:100
Ortovanadat sòdic	Aigua, pH10	100 mM	200 µM	1:500

Western blot:

Muntatge dels gels:

-Netejar els vidres de suport amb alcohol fregant amb un paper.
ATENCIÓ: n'hi ha de 1.5 i 0.75 mm!!

-Muntar els vidres en el suport aliniant-los en una superfície absolutament plana.

-Preparar el Gel de Resolució afegint el TEMED i l'APS a l'últim moment just abans de posar en el suport. REMENAR BÉ i sense perdre temps, introduir el gel al suport amb cura i no sobrepasant l'alçada de la pinça. Deixar aproximadament 2 cm pel gel concentrador. Desseguida després de carregar, afegir isopropanol.

-Quan s'observa diferència entre l'H₂O i el gel, significa que aquest ja ha polimeritzat. Es pot mirar com està el gel sobrant que no s'ha carregat. Un cop gelificat, netejar l'isopropanol que queda sobre el gel.

-Preparar el Gel Concentrador, també afegint el TEMED i l'APS a l'últim moment, i afegir. Posar la pinça i recobrir amb gel concentrador

Encendre el bany i posar les mostres a bullir (si les mostres ja estaven bullides no cal, però igualment es poden escalfar perquè facilita carregar).

ATENCIÓ: al tancar el suport, fer-ho molt delicadament, es trenca amb facilitat

En comptes d'isopropanol, es pot afegir butanol o aigua sobre el gel, l'objectiu és que quedi una interfase ben plana

La distància que hi ha d'haver des del fons del pou fins al running ha de ser superior al doble de la profunditat del pou

MATERIALS I MÈTODES

Gel de Resolució:

Gel Resolució	7.5	8	9	10	12	15	
Acrilamida 40%	1,88	2	2,25	2,5	3	3,75	ml
LOWER Buffer 4x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	ml
H₂O milliQ	5,62	5,5	5,25	5	4,5	3,75	ml
APS (penúltim)	100	100	100	100	100	100	µl
TEMED (últim)	5	5	5	5	5	5	µl

Gel concentrador (Stacking buffer):

Acrilamida 40%	0,525 ml
UPPER Buffer 4x	1,25 ml
H₂O milliQ	3,225 ml
APS (penúltim)	25 µl
TEMED (últim)	5 µl

LOWER Buffer 4x:

1,5 M Tris-HCl pH8,8

0,4% SDS

Portar a pH08,8

UPPER Buffer 4x:

0,5 M Tris-HCl pH6,8

0,4%SDS

Portar a pH=6,8

- Muntar el gel en la cubeta amb tampó d'electroforesi.
 - Descongela i prepara les mostres a la concentració calculada. No deixar l'LSBx4 en gel perquè l'SDS precipitaria. BARREJAR SEMPRE.
 - Al bullir les mostres (10') fer pressió a sobre perquè no saltin els taps (perdríem volum).
 - Fer un spin a les mostres després de bullir-les.
 - Carregar amb la xeringa Hamilton (si són vidres de 0,75) o amb pipeta (si són d'1,5).
 - Conectar a la font. Fixar el voltatge a 50V. Quan ha superat del tot l'Stacking gel es pot augmentar el voltatge (a ~ 100V).
 - Parar el gel quan les proteïnes que ens interessin han corregut 2/3 aproximadament.
 - Tallar 6 papers Watman 7 x 9 cm. (5,8 x 8,5)
 - Fer TAMPÓ TRANSFERÈNCIA (10x → 1x) afegint 20% METANOL.
 - Posar-se guants per manipular la membrana, tocar-la només amb pinces.
 - Tallar una membrana d'*immobilon*® (PVDF) i activar en metanol 2'. Després deixar-la en tampó de transferència fins que s'hi enfonsi.
 - Desmuntar l'aparell d'electroforesi i alliberar el gel fent lleugera palanca per separar els vidres, tallar el gel concentrador i les bandes laterals del gel de resolució i després també lleugera palanca per treure el gel.
- IMPORTANT: Mullar-se els guants en tampó d'electroforesi o de transferència per agafar el gel, això evitarà que es trenqui.

El gel es pot tallar fàcilment, però una gilette és ideal per tallar els laterals del gel de resolució

MATERIALS I MÈTODES

-Posar el gel desseguida en tampó de transferència i deixar una estona abans de muntar la transferència.

Muntatge de la transferència:

-Sobre la part negra s'hi posa l'esponja mullada amb tampó transferència, 3 papers watman tb xopats amb tampó de transferència i a sobre el gel amb la mateixa orientació amb que l'hem tret del vidre (millor si fem un senyal), així després tindrem l'orientació original (al revés de com l'hem tret del vidre). A sobre s'hi posa la membrana *immobilon*® prèviament activada..

A sobre la membrana s'hi posen 3 papers watman tb xopats en tampó de transferència i amb una pipeta de cultius es rodola per sobre per treure'n les bombolles. Finalment, l'altra esponja xopada i es tanca.

-Es posa la "sandwichera" amb la butxaca de gel i un iman per remenar a sobre l'agitador. El tampó de transferència ha de cobrir del tot la membrana (omplir fins dalt). Es deixa 1h i 30 min a 80V (si no són molt grans). Per veure que el buffer està en bon estat, controlar que a l'inici l'amperatge no passa de 300 ampers, en cas contrari no reutilitzar més el tampó de transferència.

-Quan traiem de la transferència és important no deixar assecar, posem ràpidament en llet 5% (5g llet pols/100 ml TBS).

-Deixem bloquejant en llet 5% 1h.

Tampó d'electroforesi (10x):

0,25 M Tris

2 M Glicina

1% SDS

Tampó de Transferència (10x):

0,25 M Tris

2 M Glicina

Afegir Metanol 20% quan fem la dilució 1x

Preparem l'anticòs primari:

Albúmina 3%

TBS-T 1x

Azida sòdica 0,02% (1:1000 stock)

Anticòs a la dilució necessària

*Albumina: Es pot utilitzar
Albumin fractionV*

*L'Azida sòdica és tòxica,
tenir-ho en compte al
preparar l'Stock*

-Es posa la membrana en una bossa de plàstic (que es fa segellant) i s'hi afegeixen els 3-4 ml d'anticòs. S'acaba de segellar completament i es deixa ON a 4°C.

-L'anticòs primari es recicla i es guarda a la nevera.

-Es fan 3 rentats amb TBS-T (T pot ser tween o tritó) 10' cada rentat —els primers rentats sempre més ràpids). I un últim rentat amb TBS 1x.

-Incubar amb l'Ab 2ari:

-anti-mouse 1:5000 en llet 1% + TBS-tween (1x)

Ab anti-goat 1:2000 “

Ab anti rabbit 1:3000 “

MATERIALS I MÈTODES

-3 rentats amb TBS-T (x10'). El secundari és el que dóna més brutícia. Rentar fins a 6 vegades (Millor fer rentats curts, doncs la peroxidasa de l'anticòs secundari perd l'activitat si es renta massa estona).

-1 rentat 1' amb TBS sense Tween.

-Revelar. Hem utilitzat ECL o ECL plus.

-Posar sobre una placa que evita que l'aigua s'escampi les membranes i cobrir-les amb la solució de revelat completament escampant i agitant la mescla perquè es reparteix bé (1 min si és ECL normal o 5 min si és ECL plus).

Revelat manual:

- Posar dins el plàstic i la placa
- Revelar amb llum vermella
- Posar la pel·lícula i tancar
- Provar diferents temps d'exposició, començant per temps més curts i cada vegada més llargs.
- Preparar les solucions (les cubetes s'han de posar en ordre abans de tancar la llum). Deixar ben neta la sala de revelat!

Si volem reutilitzar les membranes les rentem amb TBS-T i TBS, les podem guardar uns dies a 4°C. Si no, les assequem i les haurem de tornar a activar en metanol quan les vulguem utilitzar.

Anticossos primaris usats i dilució:

α -Tubulina (Sigma) 1:5000

α -Beta-Actina (santa cruz) 1:200

α -Flag M2 (Sigma) 1:1000

α -His 27-4710 (Sigma) 1:1000

α -p-p38 (Cell Signaling) 1:1000

α -Dlx5 C-20 (Santa Cruz) 1:500

α -Dlx5 Y-20 (Santa Cruz) 1:500

α -Osterix ab22552 (abcam) 1:1000

α -p53 Clone DO-7 (Neomarkers) 1:200

α -p21 sc-397 Extrem C-terminal (Santa Cruz) 1:200

Alguns anticossos, com M2 Flag de Sigma, milloren amb l'us.

Stripping Western Blot

S'incuba la membrana amb 2% de SDS, 67,5 mM de Tris pH=7,5, 0,1 M β -Mercaptoetanol.

per 100 ml

10 ml SDS 20%

6,75 ml Tris 1M pH=7,5

0,7 ml β -mercaptoetanol 14,3M

Agitar entre 30' i 1h a temperatura entre 50 i 65°C.

Rentar amb TBS-T a temperatura ambient. Fer com a mínim 5 rentats de com a mínim 10'. Canviar de recipient.

A més temperatura i més temps, més intens serà l'stripping

és molt important eliminar bé el β -mercaptoetanol, si no ho fem bé la membrana no servirà per a fer nous blots.

MATERIALS I MÈTODES

Tornar a bloquejar la membrana amb llet al 5%, ja podem procedir com en un western blot normal.

SOLUCIONS:

Tampó de Laemli (4x)

- Posar 12,5 ml Tris 1 M pH=6,8 i afegir H₂O miliQ fins a 20ml.
- Afegir-hi 4g de SDS
- Escalfar al microones i remenar cada cop que bulli fins a desaparèixer l'escuma.
- Ajustar el volum a 24-25 ml i transferir a un falcon
- Comprovar el pH i regular-lo a 6,8 si ha variat.
- Afegir 20 ml de Glicerol
- Afegir 6 ml de β -mercaptoetanol
- Afegir Blau de Bromofenol al gust (~5mg)

6.Unions Proteïna-Proteïna

Immunoprecipitació:

Els assajos d'immunoprecipitació es poden realitzar en cèl·lules en cultiu sobre proteïnes endògenes o bé sobreexpressades. També es poden realitzar *in vitro*.

- Es renten les cèl·lules amb PBS fred i es lisen amb tampó NP40 i inhibidors de proteases i fosfatases.
- Una part (10%) de l'extracte proteic se separa per fer un WB de comprovació de l'expressió, la resta (90%) s'incuba amb l'anticòs contra la proteïna que volem immunoprecipitar, la incubació es fa en fred i en agitació d'entre 2 hores i O.N.
- Es centrifuga 4°C durant 2' a velocitat màxima i s'agafa el sobrenedant. Es diposita en un eppendorf nou.
- S'afegeixen 30 μ l de mescla de boles de sefarosa unides a proteïna A i proteïna G i s'incuba 1-2 hores (en fred i en agitació).
- Fer 5 rentats amb el mateix tampó NP40 amb inhibidors, centrifugar 5' a 2000rpm, descartar el sobrenedant sense apurar i resuspendre amb més NP40. No centrifugar a més velocitat perquè faríem malbé les boles de sefarosa. Mantenir les mostres sempre fredes i afegir PMSF cada hora.
- Al tercer rentat canviar de tub per eliminar les restes que queden adherides a la paret.
- En l'últim rentat, deixar la sefarosa amb un volum de 90 μ l de tampó NP40 i afegir 30 μ l de LSB4x. Bullir i analitzar per WB.

Immunoprecipitació amb Ni-Beads:

- Lisar el contingut de les plaques amb buffer NP-40 0,2% i inhibidors de proteases i fosfatases. IMPORTANT: afegir 10 mM de Imidazol pH 7
- Centrifugar 5 minuts a 4°C i recollir el sobrenedant en un tub nou.

MATERIALS I MÈTODES

- Afegir 25µl de Ni-Beads (conservat en Aigua i Azida sòdica)
- Deixar O.N. en agitació a 4°C
- Fer 4 rentats amb buffer NP-40 amb inhibidors i imidazol pH 7 (fer els rentats a velocitat baixa ~3000 RPM i a 4°C).
- Bullir amb LSB 1x 10 minuts i després descartar la resina.

Assaig kinasa amb ³²P:

Activació de P38-MAPK:

GST-p38 expressada en bacteries és activada amb MBP-MKK6-DD (ràtio 5:1) Buffer: 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 2mM DTT pH 7,5 i ATP fins a 200µM. Guardar a -20°C.

- Descongelar les proteïnes recombinants.
 - Abans d'usar la p38 constitutivament activa centrifugar 5' a 4°C a velocitat màxima per precipitar els agregats que es puguin haver format.
 - Es prepara el buffer 2x: 50mM Tris-HCl pH7,5, 10mM MgCl₂, 2mM DTT.
 - Es preparen els tubs amb:
 - 4µl ATP 10mM
 - 4µl p38 constitutivament activa
 - La quantitat necessària de GST Dlx5.
 - La meitat del volum de Buffer 2x.
- Es deixa a 30°C durant 20' perquè es protueixi la reacció kinasa.

7. Assajos d'unió a l'ADN:

Anellament d'Oligos

En un eppendorf:

Oligo 1 (100µM)

Oligo 2 (100µM)

Tampó d'Anellament 1x (diluir de 10x)

Enrasar amb aigua fins a 20µl

Tampó d'Anellament:

100mM Tris-HCl pH=7,5

1M NaCl

10mM EDTA

- Escalfar la barreja a T^a 10 graus superior a la temperatura de Melting que posa al full dels Oligos.
- Manteni a aquesta temperatura 10'
- Deixar refredar lentament dins del bloc tèrmic (1 hora).
- Guardar a -20°C

Fosforilació d'Oligos

En un eppendorf:

2µl Oligos anellats

1µl Buffer A 10x (Conté MgCl₂) El buffer A ve junt amb la T4PNK

1µl ATP 10mM

MATERIALS I MÈTODES

1µl T4PNK (T4 Poli Nucleotid Kinasa)
5µl aigua estèril

- Incubar 30' a 37°C
- Incubar 10' a 70°C (per inactivar l'enzim)

Obtenció d'extractes de proteïnes nuclears:

Treballar sempre a 4°C.

- Rentar les plaques amb PBS fred
- Deixar en un volum d'1 ml de PBS i processar immediatament.
- Recollir les cèl·lules amb un scraper netejant amb aigua destil·lada entre cada condició. Posar en un eppendorf (en gel).
- Centrifugar a 4°C 1' a 500-1000RPM. Descartar sobrenedant.
- Afegir 1 ml de Tampó A (complementada amb inhibidors de fosfatases i proteases).
- Deixar 20' en gel durant els quals fer 3 o 4 vegades 20 segons de vòrtex a màxima potència. IMPORTANT: Portar totes les mostres tan en paral·lel com sigui possible.
- Centrifugar a 4°C durant 5' a 1000g.
- Descartar el sobrenedant i tornar a afegir 1 ml de Tampó A (complementat amb inhibidors).
- Vortexar de nou i deixar 5' en gel.
- Tornar a centrifugar a 4°C durant 5' a 1000g, descartar el sobrenedant i afegir 50µl de Tampó C (Complementat amb inhibidors).
- Deixar reposar 20' en gel.
- Resuspènere el pelet colpejant amb els dits o fent un vòrtex suau.
- Centrifugar a 4°C a velocitat màxima durant 5 minuts.
- Recollir el sobrenedant sense tocar el pelet i guardar immediatament a -80C.

Tampó A:

HEPES-KOH pH=7,9	10mM
MgCl ₂	1,5mM
KCl	10mM

Tampó C:

HEPES-KOH pH=7,9	20mM
Glicerol	25%
NaCl	420mM
MgCl ₂	1,5mM
EDTA	0,2mM

Inhibidors (Afegir-los a última hora, el PMSF anar-lo renovant cada vegada)

DTT	0,5mM	(Agent reductor)
PMSF	1mM	} Inhibidors proteases
Benzamidina	0,1mg/ml	
Ortovanadat sòdic	0,1mM	} Inhibidors fosfatases
NaF	20mM	

MATERIALS I MÈTODES

β -Glicerol fosfat 10mM

Marcatge d'Oligonucleòtids amb $\gamma^{32}\text{P}$

S'utilitza $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP perquè és el substrat més habitual de les kinases
IMPORTANT: Treballem al laboratori d'Isòtops, protegits amb guants (dobles guants pels principiants), bata, una pantalla de metacrilat i amb dosímetre i un contador Géiger disponible.

Posem el bany del laboratori d'isòtops a escalfar a 37°C.
Preparem la reacció (podem fer-ho fora del laboratori d'isòtops fins que posem el $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP):

-20pmol Oligos anellats (2 μl de l'anellament, diluïts 1:10)	2 μl
-Tampó A de PNK que conté MgCl_2 (diluïm 1:10)	2 μl
-Aigua destil·lada estèril	9 μl
-T4-PNK (Poli Nucleotid Kinasa)	1 μl
-20pmol $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (està a 3,3pmol/ μl)*	6 μl

*Hem utilitzat $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP d'Amersham

Deixar 30' a 37°C.

Parar la reacció amb 1 μl de EDTA 0,5M

Purificar mitjançant columna sephadex G-50 (hem d'eliminar els nucleòtids de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP sobrants).

Es pot guardar en un pot de plom a 4°C.

Si hem perdut molt de volum, es pot diluir la sonda fins als 10-20 μl de volum total

Assaig de retardament en banda (EMSA o Band Shift)

Demandar permís a la persona responsable d'isòtops perquè s'ha de córrer a la cambra freda. Protegir una àrea de treball de la cambra freda de possibles contaminacions i senyalitzar amb el paper groc corresponent als isòtops de fósfor.

Es corren els complexos proteïnes-oligonucleòtids en un gel d'acrilamida no desnaturalitzant:

Acrilamida al 40%	Depèn de la concentració que volgüem.
TBE 10x	1,25 ml
Glicerol	0,5 ml
Aigua destil·lada	fins a 50 ml

En últim lloc:

APS	385 μl
TEMED	50 μl

-No hi ha gel concentrador, posar la pinta directament procurant que no quedin bombolles.

-Normalment hem usat gels de acrilamida al 5%

-La concentració de TBE utilitzada ha estat normalment 0,25x però es pot jugar amb la concentració per millorar l'eficiència.

-Tenir en compte la concentració de Tampó TBE que hem usat per fer el gel a l'hora de córrer, ha de ser la mateixa concentració.

-Cal fer un pre-running del gel abans de carregar-li les mostres perquè

Afegir gel sobre la pinta perquè al solidificar s'encongeix i podriem perdre els pous dels extrems

Quan el gel ha solidificat, netejar els pous amb TBE perquè sovint hi queden restes d'acrilamida

Si es deixa el gel unes hores muntat amb el tampó, fa el mateix efecte que el pre-running. No cal fer-lo de nou

MATERIALS I MÈTODES

s'equilibri amb el tampó: Es posa a córrer a un amperatge de 25 mA fixant el voltatge equivalent i s'espera fins que l'amperatge hagi baixat fins a ~15 mA.

-Preparació de les mostres:

~5 µl d'extractes cel·lulars (o ~100ng de proteïna purificada)
10 µl de binding buffer 2x
1 µg Poli dI/dC (stock a 1 µg/µl en NaCl 150mM i Tris-HCl 10mM pH =7,5). Dependent de la seqüència d'unió del factor estudiat, es pot usar Poli dC/dG.

Enrasar amb aigua a 19 µl
Afegir 1µl de sonda radioactiva i barrejar

Incubar 20' a T^a ambient.

Fer un spin abans de carregar, (especialment si treballem amb proteïna recombinant, que forma agregats amb facilitat).

-Primer es carrega Sample Buffer d'ADN que ens servirà per visualitzar el front i es fa córrer 10' abans de carregar la mostra (si es barrejés amb la mostra ens podria interferir en el resultat). Es pot carregar una quantitat major en un dels extrems, ens servirà per recordar l'orientació quan l'haguem desmuntat.

-Carregar les mostres amb precaució. Tenir a punt un recipient de vidre per les puntes usades. Abridar-se abans d'entrar a la cambra freda!!

-El gel pot córrer entre 3 i 6hores.

-Traslladar al laboratori d'isòtops per desmuntar. Desmuntar en una cubeta, i transferir el gel a paper Wattman i cobrir amb film transparent de cuina.

-Assecar a l'assecador de gels durant 2 hores a 80°C.

-Tancar en un caset amb pel·lícula per fòsfor radiactiu.

-Netejar la cubeta i la zona de treball. Comprovar amb el géiger.

És important carregar tots els pous per evitar que el front es torci.

Quan tornem a muntar el gel després de carregar-lo, homogenitzar el tampó de la cubeta superior i inferior

Quan treiem de l'assecador, posar desseguida al caset per evitar que s'arrugui. La pel·lícula la podem posar més tard.

TBE 5x

0,45M Tris-base

0,45M Àcid bòric

10mM EDTA

portar a pH=8

Binding

<u>Buffer</u>	1x	2x
DTT	1 mM	2 mM
Tris pH7,5	40 mM	80 mM
Glicerol	10%	20%
Sacarosa	10%	20%
MgCl ₂	5 mM	10 mM
KCl	70 mM	140 mM
EDTA	0,1 mM	0,2 mM

8. Generació de clons estables induïbles Tet-Off

Les cèl·lules PT-Puro, derivades de C2C12, contenen el transactivador que respon a la tetraciclina incorporat de forma estable. Les cultivem amb puromicina (perquè el transactivador va acompanyat d'una resistència a aquest antibiòtic) fins al moment de transfectar.

-El dia abans de transfectar, retirar la puromicina

Transfectem un plàsmid PTISN que respon al transactivador en que hem clonat els nostres gens d'interès (en el nostre cas Dlx5 i Osterix). PTISN porta una resistència a la Geneticina (G418).

-Transfectar amb fugene (proporció μl fugene: μg ADN = 6:1) en placa de 6 cm de diàmetre, confluència 60%.

-Al dia següent expandir a una placa més gran (10cm de diàmetre)

-A les 4 hores de passar a una placa més gran, afegir:

Geneticina (G418) 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tetraciclina 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

-Canviar el medi cada 2 dies (sempre amb els antibiòtics). Les cèl·lules comencen a morir al cap d'una setmana.

-Quan només queden clons aïllats, utilitzar uns cilindres de vidre (anomenats O-rings) per passar-los a una nova placa:

-S'unta un extrem de l'O-ring amb vaselina estèril i, utilitzant unes pinces, es coloca al voltant d'un clon mentre es decanta la placa per retirar el medi.

-S'afegeix 50 μl de tripsina dins de l'O-ring i al cap de 2 minuts resuspendre el contingut, agafar amb la pipeta i transferir a una nova placa (costar de 24 pous) amb medi i antibiòtics.

-A partir d'aquí anar expandint els clons per separat fins que en tinguem suficient per fer l'screening i congelar.

Els clons induïbles d'Osterix han estat comprovats per Western Blot.

Els clons induïbles de Dlx5 han estat comprovats per PCR-Real Time i per la seva capacitat d'induir el promotor mínim d'Osterix.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

LLIBRES:

Mouse Development: Patterning, Morphogenesis and Organogenesis. Ed. Janet Rossant/ Patrick P.L. Tam. ©2002 Academic Press.

La lógica de lo viviente, una historia de la herencia. François Jacob, col·lecció Metatemas. Editorial Tusquets.

Developmental Biology, Seventh Edition, Scott F. Gilbert.
© 2003 by Sinauer Associates Inc.

Biología molecular de la Célula, tercera edición. Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson. Ediciones Omega.

ARTICLES:

Abzhanov, A., Rodda, S.J., McMahon, A.P. and Tabin, C.J. (2007) Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development*, **134**, 3133-3144.

Adams, M., Reginato, M.J., Shao, D., Lazar, M.A. and Chatterjee, V.K. (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*, **272**, 5128-5132.

Afzal, F., Pratap, J., Ito, K., Ito, Y., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Lian, J.B. and Javed, A. (2005) Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol*, **204**, 63-72.

Akiyama, H., Chaboissier, M.C., Martin, J.F., Schedl, A. and de Crombrughe, B. (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*, **16**, 2813-2828.

Akiyama H, Kim JE, Nakashima K, Balmes G, Iwai N, Deng JM, Zhang Z, Martin JF, Behringer RR, Nakamura T, de Crombrughe B. (2005) Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci*, **102**, 14665-14670.

Alliston, T., Choy, L., Ducy, P., Karsenty, G. and Derynck, R. (2001) TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *Embo J*, **20**, 2254-2272.

Alliston, T., Ko, T.C., Cao, Y., Liang, Y.Y., Feng, X.H., Chang, C. and Derynck, R. (2005) Repression of bone morphogenetic protein and activin-inducible transcription by Evi-1. *J Biol Chem*, **280**, 24227-24237.

Almog N, Rotter V. (1997) Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*, **1333**, F1-27.

BIBLIOGRAFIA

- Amri, E.Z., Dani, C., Doglio, A., Etienne, J., Grimaldi, P. and Ailhaud, G. (1986) Adipose cell differentiation: evidence for a two-step process in the polyamine-dependent Ob1754 clonal line. *Biochem J*, **238**, 115-122.
- Anderson, D.J., Gage, F.H. and Weissman, I.L. (2001) Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*, **7**, 393-395.
- Arora, K. and Warrior, R. (2001) A new Smurf in the village. *Dev Cell*, **1**, 441-442.
- Aubin, J., Davy, A. and Soriano, P. (2004) In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev*, **18**, 1482-1494.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Kemp, C., Belo, J.A., Anderson, R.M., May, S.R., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Harland, R.M., Rossant, J. and De Robertis, E.M. (2000) The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. *Nature*, **403**, 658-661.
- Bai, S., Shi, X., Yang, X. and Cao, X. (2000) Smad6 as a transcriptional corepressor. *J Biol Chem*, **275**, 8267-8270.
- Balemans, W. and Van Hul, W. (2002) Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol*, **250**, 231-250.
- Bamburg JR. (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 185-230.
- Barbara, N.P., Wrana, J.L. and Letarte, M. (1999) Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*, **274**, 584-594.
- Benchabane, H. and Wrana, J.L. (2003) GATA- and Smad1-dependent enhancers in the Smad7 gene differentially interpret bone morphogenetic protein concentrations. *Mol Cell Biol*, **23**, 6646-6661.
- Bendall, A.J., Abate-Shen C. (2000) Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*, **247**, 17-31.
- Bennett, C.N., Longo, K.A., Wright, W.S., Suva, L.J., Lane, T.F., Hankenson, K.D. and MacDougald, O.A. (2005) Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3324-3329.
- Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, **126**, 107-120.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. and de Crombrughe, B. (1999) Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet*, **22**, 85-89.
- Bi, W., Huang, W., Whitworth, D.J., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R. and de Crombrughe, B. (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6698-6703.
- Bitgood, M.J. and McMahon, A.P. (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, **172**, 126-138.
- Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A.A., Rojkind, M. and Bottinger, E.P. (2000) A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev*, **14**, 187-197.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R. and Weimann, J.M. (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, **105**, 829-841.
- Blau HM, Chiu CP, Webster C. (1983) Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*, **32**, 1171-1180.

BIBLIOGRAFIA

- Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, Webster SG, Miller SC, Webster C. (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science*, **230**, 758-766.
- Blobe, G.C., Liu, X., Fang, S.J., How, T. and Lodish, H.F. (2001) A novel mechanism for regulating transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling. Functional modulation of type III TGF-beta receptor expression through interaction with the PDZ domain protein, GIPC. *J Biol Chem*, **276**, 39608-39617.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P. and Lodish, H.F. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*, **342**, 1350-1358.
- Blokzijl, A., Dahlqvist, C., Reissmann, E., Falk, A., Moliner, A., Lendahl, U. and Ibanez, C.F. (2003) Cross-talk between the Notch and TGF-beta signaling pathways mediated by interaction of the Notch intracellular domain with Smad3. *J Cell Biol*, **163**, 723-728.
- Blokzijl, A., ten Dijke, P. and Ibanez, C.F. (2002) Physical and functional interaction between GATA-3 and Smad3 allows TGF-beta regulation of GATA target genes. *Curr Biol*, **12**, 35-45.
- Blunk, T., Sieminski, A.L., Appel, B., Croft, C., Courter, D.L., Chieh, J.J., Goepferich, A., Khurana, J.S. and Gooch, K.J. (2003) Bone morphogenetic protein 9: a potent modulator of cartilage development in vitro. *Growth Factors*, **21**, 71-77.
- Boesen, C.C., Radaev, S., Motyka, S.A., Patamawenu, A. and Sun, P.D. (2002) The 1.1 A crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain. *Structure*, **10**, 913-919.
- Boettiger, D., Enomoto-Iwamoto, M., Yoon, H.Y., Hofer, U., Menko, A.S. and Chiquet-Ehrismann, R. (1995) Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol*, **169**, 261-272.
- Bonewald, L.F. (2007) Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci*, **1116**, 281-290.
- Bowers, R.R., Kim, J.W., Otto, T.C. and Lane, M.D. (2006) Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13022-13027.
- Bowers, R.R. and Lane, M.D. (2008) Wnt signaling and adipocyte lineage commitment. *Cell Cycle*, **7**, 1191-1196.
- Braun, T. and Arnold, H.H. (1996) Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *Embo J*, **15**, 310-318.
- Brown, C.O., 3rd, Chi, X., Garcia-Gras, E., Shirai, M., Feng, X.H. and Schwartz, R.J. (2004) The cardiac determination factor, Nkx2-5, is activated by mutual cofactors GATA-4 and Smad1/4 via a novel upstream enhancer. *J Biol Chem*, **279**, 10659-10669.
- Brugger, S.M., Merrill, A.E., Torres-Vazquez, J., Wu, N., Ting, M.C., Cho, J.Y., Dobias, S.L., Yi, S.E., Lyons, K., Bell, J.R., Arora, K., Warrior, R. and Maxson, R. (2004) A phylogenetically conserved cis-regulatory module in the Msx2 promoter is sufficient for BMP-dependent transcription in murine and Drosophila embryos. *Development*, **131**, 5153-5165.
- Brunet, L.J., McMahon, J.A., McMahon, A.P. and Harland, R.M. (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*, **280**, 1455-1457.
- Bryan JT, Morasso MI. (2000) The Dlx3 protein harbors basic residues required for nuclear localization, transcriptional activity and binding to Msx1. *J Cell Sci*, **113** (Pt 22), 4013-4023.

BIBLIOGRAFIA

- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D. and Relaix, F. (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat*, **202**, 59-68.
- Burke, A.C. and Tabin, C.J. (1996) Virally mediated misexpression of Hoxc-6 in the cervical mesoderm results in spinal nerve truncations. *Dev Biol*, **178**, 192-197.
- Cadigan, K.M. and Liu, Y.I. (2006) Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, **119**, 395-402.
- Canalis, E., Economides, A.N. and Gazzerro, E. (2003) Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*, **24**, 218-235.
- Candeliere, G.A., Liu, F. and Aubin, J.E. (2001) Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone*, **28**, 351-361.
- Candia, A.F., Watabe, T., Hawley, S.H., Onichtchouk, D., Zhang, Y., Derynck, R., Niehrs, C. and Cho, K.W. (1997) Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development*, **124**, 4467-4480.
- Cao, X. and Chen, D. (2005) The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, **357**, 1-8.
- Catron, K.M., Iler, N. and Abate, C. (1993) Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. *Mol Cell Biol*, **13**, 2354-2365.
- Catron KM, Wang H, Hu G, Shen MM, Abate-Shen C. (1996) Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech Dev*, **55**, 185-199.
- Catron KM, Zhang H, Marshall SC, Inostroza JA, Wilson JM, Abate C. (1995) Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. *Mol Cell Biol*, **15**, 861-871.
- Celil, A.B. and Campbell, P.G. (2005) BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem*, **280**, 31353-31359.
- Celil, A.B., Hollinger, J.O. and Campbell, P.G. (2005) Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem*, **95**, 518-528.
- Chacko, B.M., Qin, B., Correia, J.J., Lam, S.S., de Caestecker, M.P. and Lin, K. (2001) The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat Struct Biol*, **8**, 248-253.
- Chai, Y., Ito, Y. and Han, J. (2003) TGF-beta signaling and its functional significance in regulating the fate of cranial neural crest cells. *Crit Rev Oral Biol Med*, **14**, 78-88.
- Chai, Y., Mah, A., Crohin, C., Groff, S., Bringas, P., Jr., Le, T., Santos, V. and Slavkin, H.C. (1994) Specific transforming growth factor-beta subtypes regulate embryonic mouse Meckel's cartilage and tooth development. *Dev Biol*, **162**, 85-103.
- Chambard JC, Pognonec P. (1998) A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3443-3444.
- Chandar N, Donehower L, Lanciloti N. (2000) Reduction in p53 gene dosage diminishes differentiation capacity of osteoblasts. *Anticancer Res*, **20**, 2553-2559.
- Chang, H., Brown, C.W. and Matzuk, M.M. (2002) Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*, **23**, 787-823.

BIBLIOGRAFIA

- Chen YG. (2008) Endocytic regulation of TGF-beta signaling. *Cell Res*. Epub ahead of print.
- Chen, D., Ji, X., Harris, M.A., Feng, J.Q., Karsenty, G., Celeste, A.J., Rosen, V., Mundy, G.R. and Harris, S.E. (1998a) Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol*, **142**, 295-305.
- Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J. and Blobel, G.C. (2003) Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science*, **301**, 1394-1397.
- Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N. and Massague, J. (1998b) Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev*, **12**, 2144-2152.
- Chen, Y.G. and Massague, J. (1999) Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem*, **274**, 3672-3677.
- Chen, Y.G., Wang, Q., Lin, S.L., Chang, C.D., Chuang, J. and Ying, S.Y. (2006) Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)*, **231**, 534-544.
- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J.P., Park, J.Y. and He, T.C. (2003) Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, **85-A**, 1544-1552.
- Chevallier, A., Kieny, M. and Mauger, A. (1977) Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol*, **41**, 245-258.
- Chiba, S., Takeshita, K., Imai, Y., Kumano, K., Kurokawa, M., Masuda, S., Shimizu, K., Nakamura, S., Ruddle, F.H. and Hirai, H. (2003) Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15577-15582.
- Choi SJ, Song IS, Ryu OH, Choi SW, Hart PS, Wu WW, Shen RF, Hart TC. (2008) A 4 bp deletion mutation in DLX3 enhances osteoblastic differentiation and bone formation in vitro. *Bone*, **42**, 162-71.
- Cohen, S.M., Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G. and Jackle, H. (1989) Distal-less encodes a homeodomain protein required for limb development in Drosophila. *Nature*, **338**, 432-434.
- Cohen, S.M. and Jurgens, G. (1989) Proximal-distal pattern formation in Drosophila: cell autonomous requirement for Distal-less gene activity in limb development. *Embo J*, **8**, 2045-2055.
- Colgan, J. and Manley, J.L. (1995) Cooperation between core promoter elements influences transcriptional activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1955-1959.
- Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Insinga, A., Imbriano, C. and Piccolo, S. (2003) Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell*, **113**, 301-314.
- Cossu, G. and Borello, U. (1999) Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. *Embo J*, **18**, 6867-6872.
- Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996) How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet*, **12**, 218-223.

BIBLIOGRAFIA

- Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., Ruhin, B. and Le Douarin, N.M. (1998) Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development*, **125**, 3445-3459.
- Couly, G.F., Coltey, P.M. and Le Douarin, N.M. (1992) The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development*, **114**, 1-15.
- Craig, R., Larkin, A., Mingo, A.M., Thuerauf, D.J., Andrews, C., McDonough, P.M. and Glembotski, C.C. (2000) p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem*, **275**, 23814-23824.
- Cuenda, A. and Cohen, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 4341-4346.
- Cuevas, B.D., Abell, A.N. and Johnson, G.L. (2007) Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene*, **26**, 3159-3171.
- Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G. and Christian, J.L. (2001) The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev*, **15**, 2797-2802.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G. and Christian, J.L. (1998) BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J*, **17**, 4735-4743.
- Dahlqvist, C., Blokzijl, A., Chapman, G., Falk, A., Dannaeus, K., Ibanez, C.F. and Lendahl, U. (2003) Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development*, **130**, 6089-6099.
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamonde, M.E., Gamer, L.W., Agius, E., Stevenson, S.L., Cox, K., Rosen, V. and Lyons, K.M. (2001) Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet*, **27**, 84-88.
- Datta, P.K. and Moses, H.L. (2000) STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol*, **20**, 3157-3167.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y. and Wang, X.F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5545-5549.
- Davidson D. The function and evolution of Msx genes: pointers and paradoxes. (1995) *Trends Genet*, **11**, 405-411.
- de Caestecker, M.P., Parks, W.T., Frank, C.J., Castagnino, P., Bottaro, D.P., Roberts, A.B. and Lechleider, R.J. (1998) Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev*, **12**, 1587-1592.
- de la Fuente, L. and Helms, J.A. (2005) Head, shoulders, knees, and toes. *Dev Biol*, **282**, 294-306.
- de Winter, J.P., ten Dijke, P., de Vries, C.J., van Achterberg, T.A., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschueren, K. and van den Eijnden-van Raaij, A.J. (1996) Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol*, **116**, 105-114.
- del Re, E., Sidis, Y., Fabrizio, D.A., Lin, H.Y. and Schneyer, A. (2004) Reconstitution and analysis of soluble inhibin and activin receptor complexes in a cell-free system. *J Biol Chem*, **279**, 53126-53135.

BIBLIOGRAFIA

- Deng, Z.L., Sharff, K.A., Tang, N., Song, W.X., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Bennett, E., Reid, R., Manning, D., Xue, A., Montag, A.G., Luu, H.H., Haydon, R.C. and He, T.C. (2008) Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci*, **13**, 2001-2021.
- Denissova, N.G., Pouponnot, C., Long, J., He, D. and Liu, F. (2000) Transforming growth factor beta -inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6397-6402.
- Denker, A.E., Haas, A.R., Nicoll, S.B. and Tuan, R.S. (1999) Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation*, **64**, 67-76.
- Denkler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J.M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *Embo J*, **17**, 3091-3100.
- Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL. (1999) Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development*, **126**, 3831-3846.
- Depew MJ, Lufkin T, Rubenstein JL. (2002) Specification of jaw subdivisions by Dlx genes. *Science*, **298**, 381-385.
- Depew, M.J., Simpson, C.A., Morasso, M. and Rubenstein, J.L. (2005) Reassessing the Dlx code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development. *J Anat*, **207**, 501-561.
- Derynck, R. and Akhurst, R.J. (2007) Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol*, **9**, 1000-1004.
- Derynck, R. and Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, **425**, 577-584.
- Di Gregorio, A., Spagnuolo, A., Ristatore, F., Pischetola, M., Aniello, F., Branno, M., Cariello, L. and Di Lauro, R. (1995) Cloning of ascidian homeobox genes provides evidence for a primordial chordate cluster. *Gene*, **156**, 253-257.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. and Wrana, J.L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*, **5**, 410-421.
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6025-6030.
- Dickson, M.C., Martin, J.S., Cousins, F.M., Kulkarni, A.B., Karlsson, S. and Akhurst, R.J. (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, **121**, 1845-1854.
- Dobrev, G., Chahrouh, M., Dautzenberg, M., Chirivella, L., Kanzler, B., Farinas, I., Karsenty, G. and Grosschedl, R. (2006) SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell*, **125**, 971-986.
- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Jr., Feng, X.H. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000) Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Mol Cell*, **5**, 27-34.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M. and Karsenty, G. (2000a) Leptin inhibits bone

BIBLIOGRAFIA

- formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, **100**, 197-207.
- Ducy, P. and Karsenty, G. (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, **57**, 2207-2214.
- Ducy, P., Schinke, T. and Karsenty, G. (2000b) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*, **289**, 1501-1504.
- Duff, E.K. and Clarke, A.R. (1998) Smad4 (DPC4)--a potent tumour suppressor? *Br J Cancer*, **78**, 1615-1619.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. and Miyazono, K. (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, **276**, 12477-12480.
- Edlund, S., Bu, S., Schuster, N., Aspenstrom, P., Heuchel, R., Heldin, N.E., ten Dijke, P., Heldin, C.H. and Landstrom, M. (2003) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase 3. *Mol Biol Cell*, **14**, 529-544.
- Edwards, D.C. and Gill, G.N. (1999) Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **274**, 11352-11361.
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M. and Gill, G.N. (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*, **1**, 253-259.
- Eimon, P.M. and Harland, R.M. (1999) In *Xenopus* embryos, BMP heterodimers are not required for mesoderm induction, but BMP activity is necessary for dorsal/ventral patterning. *Dev Biol*, **216**, 29-40.
- Elefteriou, F., Takeda, S., Ebihara, K., Magre, J., Patano, N., Kim, C.A., Ogawa, Y., Liu, X., Ware, S.M., Craigen, W.J., Robert, J.J., Vinson, C., Nakao, K., Capeau, J. and Karsenty, G. (2004) Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 3258-3263.
- Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K. and Moses, H.L. (1999) Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem*, **274**, 37413-37420.
- Engelman, J.A., Berg, A.H., Lewis, R.Y., Lin, A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1999) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **274**, 35630-35638.
- Engelman, J.A., Lisanti, M.P. and Scherer, P.E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, **273**, 32111-32120.
- Erlebacher, A. and Derynck, R. (1996) Increased expression of TGF-beta 2 in osteoblasts results in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol*, **132**, 195-210.
- Erlebacher, A., Filvaroff, E.H., Gitelman, S.E. and Derynck, R. (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, **80**, 371-378.
- Fang, J. and Hall, B.K. (1997) Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteal. *Anat Embryol (Berl)*, **196**, 349-362.
- Fanger, G.R., Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 67-74.
- Feledy JA, Morasso MI, Jang SI, Sargent TD. (1999) Transcriptional activation by the homeodomain protein distal-less 3. *Nucleic Acids Res*, **27**, 764-770.

BIBLIOGRAFIA

- Feng, X.H. and Derynck, R. (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 659-693.
- Feng, X.H., Lin, X. and Derynck, R. (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J*, **19**, 5178-5193.
- Feng, X.H., Zhang, Y., Wu, R.Y. and Derynck, R. (1998) The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev*, **12**, 2153-2163.
- Fernandez-Lloris, R., Vinals, F., Lopez-Rovira, T., Harley, V., Bartrons, R., Rosa, J.L. and Ventura, F. (2003) Induction of the Sry-related factor SOX6 contributes to bone morphogenetic protein-2-induced chondroblastic differentiation of C3H10T1/2 cells. *Mol Endocrinol*, **17**, 1332-1343.
- Foletta, V.C., Lim, M.A., Soosairajah, J., Kelly, A.P., Stanley, E.G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J. and Bernard, O. (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol*, **162**, 1089-1098.
- Franceschi, R.T., Ge, C., Xiao, G., Roca, H. and Jiang, D. (2007) Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, **1116**, 196-207.
- Franceschi, R.T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S. and Reith, E. (2003) Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res*, **44 Suppl 1**, 109-116.
- Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F. and Auwerx, J. (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*, **65**, 261-311.
- Franz-Odendaal, T.A., Hall, B.K. and Witten, P.E. (2006) Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, **235**, 176-190.
- Frendo, J.L., Xiao, G., Fuchs, S., Franceschi, R.T., Karsenty, G. and Ducy, P. (1998) Functional hierarchy between two OSE2 elements in the control of osteocalcin gene expression in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 30509-30516.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II and Petrakova, K.V. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, **16**, 381-390.
- Fuentealba, L.C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E.M. and De Robertis, E.M. (2007) Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*, **131**, 980-993.
- Furuhashi, M., Yagi, K., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Shimada, S., Nakamura, Y., Kikuchi, A., Miyazono, K. and Kato, M. (2001) Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **21**, 5132-5141.
- Gallea, S., Lallemand, F., Atfi, A., Rawadi, G., Ramez, V., Spinella-Jaegle, S., Kawai, S., Faucheu, C., Huet, L., Baron, R. and Roman-Roman, S. (2001) Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*, **28**, 491-498.
- Gamell, C., Osses, N., Bartrons, R., Ruckle, T., Camps, M., Rosa, J.L. and Ventura, F. (2008) BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J Cell Sci*, **121**, 3960-3970.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M.A. and Hurler, J.M. (1996) Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*, **122**, 2349-2357.

BIBLIOGRAFIA

- Gao Y, Jheon A, Nourkeyhani H, Kobayashi H, Ganss B. (2004) Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene*, **341**, 101-110.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y. and Han, J. (2002) MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science*, **295**, 1291-1294.
- Ge, C., Xiao, G., Jiang, D. and Franceschi, R.T. (2007) Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol*, **176**, 709-718.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wuthrich, K. (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, **78**, 211-223.
- Ghosh-Choudhury, N., Mandal, C.C. and Choudhury, G.G. (2007) Statin-induced Ras activation integrates the phosphatidylinositol 3-kinase signal to Akt and MAPK for bone morphogenetic protein-2 expression in osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, **282**, 4983-4993.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y.I. and Knaus, P. (2000) Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell*, **11**, 1023-1035.
- Gleizes, P.E., Munger, J.S., Nunes, I., Harpel, J.G., Mazzieri, R., Noguera, I. and Rifkin, D.B. (1997) TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*, **15**, 190-197.
- Gould, A., Morrison, A., Sproat, G., White, R.A. and Krumlauf, R. (1997) Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev*, **11**, 900-913.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., Mummery, C., Karlsson, S. and ten Dijke, P. (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*, **12**, 817-828.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P. and ten Dijke, P. (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J*, **21**, 1743-1753.
- Gray, P.C., Greenwald, J., Blount, A.L., Kunitake, K.S., Donaldson, C.J., Choe, S. and Vale, W. (2000) Identification of a binding site on the type II activin receptor for activin and inhibin. *J Biol Chem*, **275**, 3206-3212.
- Greenwald, J., Groppe, J., Gray, P., Wiater, E., Kwiatkowski, W., Vale, W. and Choe, S. (2003) The BMP7/ActRII extracellular domain complex provides new insights into the cooperative nature of receptor assembly. *Mol Cell*, **11**, 605-617.
- Greenwald, J., Vega, M.E., Allendorph, G.P., Fischer, W.H., Vale, W. and Choe, S. (2004) A flexible activin explains the membrane-dependent cooperative assembly of TGF-beta family receptors. *Mol Cell*, **15**, 485-489.
- Gronroos, E., Hellman, U., Heldin, C.H. and Ericsson, J. (2002) Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell*, **10**, 483-493.
- Grotewold, L., Plum, M., Dildrop, R., Peters, T. and Ruther, U. (2001) Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. *Mech Dev*, **100**, 327-330.
- Grove, J.E., Bruscia, E. and Krause, D.S. (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, **22**, 487-500.

BIBLIOGRAFIA

- Guggino SE. (2007) Mechanisms of disease: what can mouse models tell us about the molecular processes underlying Dent disease? *Nat Clin Pract Nephrol*, **3**, 449-455.
- Guicheux, J., Lemonnier, J., Ghayor, C., Suzuki, A., Palmer, G. and Caverzasio, J. (2003) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*, **18**, 2060-2068.
- Haas, A.R. and Tuan, R.S. (2000) Murine C3H10T1/2 multipotential cells as an in vitro model of mesenchymal chondrogenesis. *Methods Mol Biol*, **137**, 383-389.
- Hall, B.K. and Ekanayake, S. (1991) Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives. *Int J Dev Biol*, **35**, 367-387.
- Hall, B.K. and Miyake, T. (1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*, **39**, 881-893.
- Hall, B.K. and Miyake, T. (2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, **22**, 138-147.
- Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, **371**, 257-261.
- Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T. and Miyazono, K. (2001) The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling. *J Cell Biol*, **155**, 1017-1027.
- Hara F, Samuel S, Liu J, Rosen D, Langley RR, Naora H. (2007) A homeobox gene related to Drosophila distal-less promotes ovarian tumorigenicity by inducing expression of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *Am J Pathol*, **170**, 1594-1606.
- Harris SE, Guo D, Harris MA, Krishnaswamy A, Lichtler A. (2003) Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci*, **8**, 1249-1265.
- Harrison, C.A., Gray, P.C., Vale, W.W. and Robertson, D.M. (2005) Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab*, **16**, 73-78.
- Hartmann, C. and Tabin, C.J. (2001) Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell*, **104**, 341-351.
- Hartsough, M.T., Frey, R.S., Zipfel, P.A., Buard, A., Cook, S.J., McCormick, F. and Mulder, K.M. (1996) Altered transforming growth factor signaling in epithelial cells when ras activation is blocked. *J Biol Chem*, **271**, 22368-22375.
- Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergermann JH, Hassel S, Henis YI, Knaus P. (2006) Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol*, **26**, 7791-7805.
- Hashimoto, K., Yokouchi, Y., Yamamoto, M. and Kuroiwa, A. (1999) Distinct signaling molecules control Hoxa-11 and Hoxa-13 expression in the muscle precursor and mesenchyme of the chick limb bud. *Development*, **126**, 2771-2783.
- Hassan, M.Q., Javed, A., Morasso, M.I., Karlin, J., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Stein, J.L. and Lian, J.B. (2004) Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, **24**, 9248-9261.
- Hassan, M.Q., Tare, R.S., Lee, S.H., Mandeville, M., Morasso, M.I., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. and Lian, J.B. (2006) BMP2 commitment to

BIBLIOGRAFIA

- the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem*, **281**, 40515-40526.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J. and Hemmati-Brivanlou, A. (1998) Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 186-197.
- Hayes, S., Chawla, A. and Corvera, S. (2002) TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol*, **158**, 1239-1249.
- Healy, C., Uwanogho, D. and Sharpe, P.T. (1999) Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn*, **215**, 69-78.
- Herpin, A. and Cunningham, C. (2007) Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *Febs J*, **274**, 2977-2985.
- Hewitt J, Lu X, Gilbert L, Nanes MS. (2008) The muscle transcription factor MyoD promotes osteoblast differentiation by stimulation of the Osterix promoter. *Endocrinology*, **149**, 3698-3707.
- Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J. and Pourquie, O. (1997) Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development*, **124**, 4605-4614.
- Hocevar, B.A., Smine, A., Xu, X.X. and Howe, P.H. (2001) The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *Embo J*, **20**, 2789-2801.
- Hoffmann, A., Preobrazhenska, O., Wodarczyk, C., Medler, Y., Winkel, A., Shahab, S., Huylebroeck, D., Gross, G. and Verschueren, K. (2005) Transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors. *J Biol Chem*, **280**, 27271-27283.
- Holley, S.A., Jackson, P.D., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E.M., Hoffmann, F.M. and Ferguson, E.L. (1995) A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin. *Nature*, **376**, 249-253.
- Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh SP, Zegzula HD, Wozney J. (1998) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res*, **43**, 356-364.
- Houten SM, Volle DH, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Auwerx J. (2007) In vivo imaging of farnesoid X receptor activity reveals the ileum as the primary bile acid signaling tissue. *Mol Endocrinol*, **21**, 1312-23.
- Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW. (1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet*, **15**, 36-41.
- Hryciw DH, Wang Y, Devuyt O, Pollock CA, Poronnik P, Guggino WB. (2003) Cofilin interacts with CIC-5 and regulates albumin uptake in proximal tubule cell lines. *J Biol Chem*, **278**, 40169-40176.
- Hu, M.C. and Rosenblum, N.D. (2005) Smad1, beta-catenin and Tcf4 associate in a molecular complex with the Myc promoter in dysplastic renal tissue and cooperate to control Myc transcription. *Development*, **132**, 215-225.
- Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z. (1999) p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem*, **274**, 12229-12235.

BIBLIOGRAFIA

- Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V. and de Crombrughe, B. (2000) Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol*, **20**, 4149-4158.
- Hussein, S.M., Duff, E.K. and Sirard, C. (2003) Smad4 and beta-catenin co-activators functionally interact with lymphoid-enhancing factor to regulate graded expression of Msx2. *J Biol Chem*, **278**, 48805-48814.
- Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T. (2004) Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 34015-34022.
- Iemura, S., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Ueno, N. (1998) Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9337-9342.
- Imai, Y., Kurokawa, M., Yamaguchi, Y., Izutsu, K., Nitta, E., Mitani, K., Satake, M., Noda, T., Ito, Y. and Hirai, H. (2004) The corepressor mSin3A regulates phosphorylation-induced activation, intranuclear location, and stability of AML1. *Mol Cell Biol*, **24**, 1033-1043.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K. (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, **389**, 622-626.
- Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M. and Miyazono, K. (2000) Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem*, **275**, 6075-6079.
- Ishii M, Merrill AE, Chan YS, Gitelman I, Rice DP, Sucov HM, Maxson RE Jr. (2003) Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development*, **130**, 6131-6142.
- Ito, Y., Yeo, J.Y., Chytil, A., Han, J., Bringas, P., Jr., Nakajima, A., Shuler, C.F., Moses, H.L. and Chai, Y. (2003) Conditional inactivation of *Tgfbr2* in cranial neural crest causes cleft palate and calvaria defects. *Development*, **130**, 5269-5280.
- Itoh, F., Itoh, S., Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Iso, T., Dotto, G.P., Hamamori, Y., Kedes, L., Kato, M. and ten Dijke Pt, P. (2004) Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. *Embo J*, **23**, 541-551.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.J. and Ten Dijke, P. (2000) Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, **267**, 6954-6967.
- Izutsu, K., Kurokawa, M., Imai, Y., Maki, K., Mitani, K. and Hirai, H. (2001) The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood*, **97**, 2815-2822.
- Javed, A., Afzal, F., Bae, J.S., Gutierrez, S., Zaidi, K., Pratap, J., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. and Lian, J.B. (2008) Specific Residues of RUNX2 Are Obligatory for Formation of BMP2-Induced RUNX2-SMAD Complex to Promote Osteoblast Differentiation. *Cells Tissues Organs*.
- Johnson, G. (2002) Signal transduction. Scaffolding proteins--more than meets the eye. *Science*, **295**, 1249-1250.

BIBLIOGRAFIA

- Johnson, R.L., Laufer, E., Riddle, R.D. and Tabin, C. (1994) Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell*, **79**, 1165-1173.
- Johnson, R.L. and Tabin, C.J. (1997) Molecular models for vertebrate limb development. *Cell*, **90**, 979-990.
- Ju, W., Hoffmann, A., Verschueren, K., Tylzanowski, P., Kaps, C., Gross, G. and Huylebroeck, D. (2000) The bone morphogenetic protein 2 signaling mediator Smad1 participates predominantly in osteogenic and not in chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors C3H10T1/2. *J Bone Miner Res*, **15**, 1889-1899.
- Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, U., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T. and Miyazono, K. (2004) Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes Cells*, **9**, 143-151.
- Kan, L., Hu, M., Gomes, W.A. and Kessler, J.A. (2004) Transgenic mice overexpressing BMP4 develop a fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)-like phenotype. *Am J Pathol*, **165**, 1107-1115.
- Kang, J.S., Alliston, T., Delston, R. and Derynck, R. (2005) Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *Embo J*, **24**, 2543-2555.
- Kang, P. and Svoboda, K.K. (2005) Epithelial-mesenchymal transformation during craniofacial development. *J Dent Res*, **84**, 678-690.
- Karsenty, G. (2006) Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab*, **4**, 341-348.
- Karsenty, G. and Wagner, E.F. (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell*, **2**, 389-406.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, **127**, 1755-1766.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H. and Wrana, J.L. (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*, **6**, 1365-1375.
- Kawai, S. and Sugiura, T. (2001) Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone*, **29**, 54-61.
- Keller, S., Nickel, J., Zhang, J.L., Sebald, W. and Mueller, T.D. (2004) Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 481-488.
- Kieny, M., Mauger, A. and Sengel, P. (1972) Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of axial skeleton of the chick embryo. *Dev Biol*, **28**, 142-161.
- Kim, H.J., Kim, J.H., Bae, S.C., Choi, J.Y., Kim, H.J. and Ryoo, H.M. (2003) The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *J Biol Chem*, **278**, 319-326.
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H.J., Carroll, S. and Laughon, A. (1997) Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*, **388**, 304-308.
- Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, Cho JY, Ryoo HM. (2004) Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem*, **279**, 50773-50780.

BIBLIOGRAFIA

- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K. and Taga, T. (2000) BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem*, **275**, 17647-17652.
- King, J.A., Marker, P.C., Seung, K.J. and Kingsley, D.M. (1994) BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev Biol*, **166**, 112-122.
- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V. and Blobe, G.C. (2008) Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem*, **283**, 7628-7637.
- Kirsch, T., Sebald, W. and Dreyer, M.K. (2000) Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol*, **7**, 492-496.
- Kishigami, S. and Mishina, Y. (2005) BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 265-278.
- Kishimoto, K., Matsumoto, K. and Ninomiya-Tsuji, J. (2000) TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. *J Biol Chem*, **275**, 7359-7364.
- Kmita, M. and Duboule, D. (2003) Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science*, **301**, 331-333.
- Knudsen, K.A., Myers, L. and McElwee, S.A. (1990) A role for the Ca²⁺-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp Cell Res*, **188**, 175-184.
- Kobayashi, H., Gao, Y., Ueta, C., Yamaguchi, A. and Komori, T. (2000) Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 630-636.
- Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K. and Takayanagi, H. (2005) NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med*, **11**, 880-885.
- Komori, T. (2005) Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem*, **95**, 445-453.
- Komori, T. (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*, **99**, 1233-1239.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T. (1997) Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**, 755-764.
- Korchynskiy, O. and ten Dijke, P. (2002) Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem*, **277**, 4883-4891.
- Kretschmar, M., Doody, J. and Massague, J. (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*, **389**, 618-622.
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massague, J. (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev*, **13**, 804-816.
- Kronenberg, H.M. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature*, **423**, 332-336.
- Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M. and Karlsson, S. (1993) Transforming growth

BIBLIOGRAFIA

- factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 770-774.
- Kurisaki, K., Kurisaki, A., Valcourt, U., Terentiev, A.A., Pardali, K., Ten Dijke, P., Heldin, C.H., Ericsson, J. and Moustakas, A. (2003) Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol*, **23**, 4494-4510.
- Kurokawa, M., Mitani, K., Irie, K., Matsuyama, T., Takahashi, T., Chiba, S., Yazaki, Y., Matsumoto, K. and Hirai, H. (1998) The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature*, **394**, 92-96.
- Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., Mishima, H.K., Kawabata, M. and Miyazono, K. (2000) Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell*, **11**, 555-565.
- Labbe, E., Letamendia, A. and Attisano, L. (2000) Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8358-8363.
- Lai, C.F. and Cheng, S.L. (2002) Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, **277**, 15514-15522.
- Leboy, P.S. (2006) Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **1068**, 14-18.
- Lebrin, F., Goumans, M.J., Jonker, L., Carvalho, R.L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H.M. and ten Dijke, P. (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo J*, **23**, 4018-4028.
- Lee-Hoeflich, S.T., Causing, C.G., Podkowa, M., Zhao, X., Wrana, J.L. and Attisano, L. (2004) Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *Embo J*, **23**, 4792-4801.
- Lee, H.W., Suh, J.H., Kim, A.Y., Lee, Y.S., Park, S.Y. and Kim, J.B. (2006a) Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation. *Mol Endocrinol*, **20**, 2432-2443.
- Lee, J.Y., Lee, Y.M., Kim, M.J., Choi, J.Y., Park, E.K., Kim, S.Y., Lee, S.P., Yang, J.S. and Kim, D.S. (2006b) Methylation of the mouse Dlx5 and Osx gene promoters regulates cell type-specific gene expression. *Mol Cells*, **22**, 182-188.
- Lee, J., Mira-Arbibe, L. and Ulevitch, R.J. (2000a) TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol*, **68**, 909-915.
- Lee, K.H., Evans, S., Ruan, T.Y. and Lassar, A.B. (2004) SMAD-mediated modulation of YY1 activity regulates the BMP response and cardiac-specific expression of a GATA4/5/6-dependent chick Nkx2.5 enhancer. *Development*, **131**, 4709-4723.
- Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M. and Bae, S.C. (2000b) Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol*, **20**, 8783-8792.
- Lee, M.H., Javed, A., Kim, H.J., Shin, H.I., Gutierrez, S., Choi, J.Y., Rosen, V., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Lian, J.B. and Ryoo, H.M. (1999) Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with

BIBLIOGRAFIA

- suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, **73**, 114-125.
- Lee, M.H., Kim, Y.J., Kim, H.J., Park, H.D., Kang, A.R., Kyung, H.M., Sung, J.H., Wozney, J.M., Kim, H.J. and Ryoo, H.M. (2003a) BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem*, **278**, 34387-34394.
- Lee, M.H., Kim, Y.J., Yoon, W.J., Kim, J.I., Kim, B.G., Hwang, Y.S., Wozney, J.M., Chi, X.Z., Bae, S.C., Choi, K.Y., Cho, J.Y., Choi, J.Y. and Ryoo, H.M. (2005) Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem*, **280**, 35579-35587.
- Lee, M.H., Kwon, T.G., Park, H.S., Wozney, J.M. and Ryoo, H.M. (2003b) BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, **309**, 689-694.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P. and Karsenty, G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, **130**, 456-469.
- Lefebvre, V., Li, P. and de Crombrughe, B. (1998) A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J*, **17**, 5718-5733.
- Lei, S., Dubeykovskiy, A., Chakladar, A., Wojtukiewicz, L. and Wang, T.C. (2004) The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factor-beta/Smad and Wnt signaling pathways. *J Biol Chem*, **279**, 42492-42502.
- Lemonnier, J., Ghayor, C., Guicheux, J. and Caverzasio, J. (2004) Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 259-264.
- Lengner CJ, Steinman HA, Gagnon J, Smith TW, Henderson JE, Kream BE, Stein GS, Lian JB, Jones SN. (2006) *J Cell Biol*, **172**, 909-921.
- Levi G, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Lasagna M, Mantero S, Cancedda R, Charnay P. (1996) Defective bone formation in Krox-20 mutant mice. *Development*, **122**, 113-120.
- Levy, L. and Hill, C.S. (2006) Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, **17**, 41-58.
- Li, X. and Cao, X. (2006) BMP signaling and skeletogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, **1068**, 26-40.
- Li H, Marijanovic I, Kronenberg MS, Erceg I, Stover ML, Velonis D, Mina M, Heinrich JG, Harris SE, Upholt WB, Kalajzic I, Lichtler AC. (2008) Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage. *Dev Biol*, **316**, 458-470.
- Li G, Peng H, Corsi K, Usas A, Olshanski A, Huard J. (2005) Differential effect of BMP4 on NIH/3T3 and C2C12 cells: implications for endochondral bone formation. *J Bone Miner Res*, **20**, 1611-1623
- Lin, X., Liang, Y.Y., Sun, B., Liang, M., Shi, Y., Brunicardi, F.C., Shi, Y. and Feng, X.H. (2003) Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription. *Mol Cell Biol*, **23**, 9081-9093.
- Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M. and Guillemin, R. (1986) Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, **321**, 779-782.

BIBLIOGRAFIA

- Liu, D., Kang, J.S. and Derynck, R. (2004a) TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *Embo J*, **23**, 1557-1566.
- Liu, J.K., Ghattas, I., Liu, S., Chen, S. and Rubenstein, J.L. (1997) Dlx genes encode DNA-binding proteins that are expressed in an overlapping and sequential pattern during basal ganglia differentiation. *Dev Dyn*, **210**, 498-512.
- Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A. and Komori, T. (2001) Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, **155**, 157-166.
- Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, Sangiorgi F, Snead ML, Maxson RE. (1999) Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol*, **205**, 260-274.
- Liu, Z., Shi, W., Ji, X., Sun, C., Jee, W.S., Wu, Y., Mao, Z., Nagy, T.R., Li, Q. and Cao, X. (2004b) Molecules mimicking Smad1 interacting with Hox stimulate bone formation. *J Biol Chem*, **279**, 11313-11319.
- Liu, Z., Tang, Y., Qiu, T., Cao, X. and Clemens, T.L. (2006) A dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, **281**, 17156-17163.
- Lloyd SE, Pearce SH, Fisher SE, Steinmeyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolino A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SP, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker RV. (1996) A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature*, **379**, 445-449.
- Lo, R.S., Chen, Y.G., Shi, Y., Pavletich, N.P. and Massague, J. (1998) The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *Embo J*, **17**, 996-1005.
- Loeys, B.L., Chen, J., Neptune, E.R., Judge, D.P., Podowski, M., Holm, T., Meyers, J., Leitch, C.C., Katsanis, N., Sharifi, N., Xu, F.L., Myers, L.A., Spevak, P.J., Cameron, D.E., De Backer, J., Hellemans, J., Chen, Y., Davis, E.C., Webb, C.L., Kress, W., Coucke, P., Rifkin, D.B., De Paepe, A.M. and Dietz, H.C. (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*, **37**, 275-281.
- Logan, C.Y. and Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 781-810.
- Long, F., Chung, U.I., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M. and McMahon, A.P. (2004) Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*, **131**, 1309-1318.
- Long, J.E., Garel, S., Depew, M.J., Tobet, S. and Rubenstein, J.L. (2003) DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system. *J Neurosci*, **23**, 568-578.
- Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L. and Massague, J. (1994) Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol*, **124**, 557-568.
- Lopez-Casillas, F., Wrana, J.L. and Massague, J. (1993) Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell*, **73**, 1435-1444.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Rosa, J.L., Bartrons, R. and Ventura, F. (2000) Interaction and functional cooperation of NF-kappa B with Smads.

BIBLIOGRAFIA

- Transcriptional regulation of the junB promoter. *J Biol Chem*, **275**, 28937-28946.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J.L. and Ventura, F. (2002) Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem*, **277**, 3176-3185.
- Lou, J., Tu, Y., Li, S. and Manske, P.R. (2000) Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T1/2. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 757-762.
- Lu X, Gilbert L, He X, Rubin J, Nanes MS. (2006) Transcriptional regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by tumor necrosis factor identifies disparate effects of mitogen-activated protein kinase and NF kappa B pathways. *J Biol Chem*, **281**, 6297-6306.
- Lu X, Nannenga B, Donehower LA. (2005) PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev*, **19**, 1162-1174.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. and Zhou, Q. (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev*, **13**, 2196-2206.
- Ma L, Golden S, Wu L, Maxson R. (1996) The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Hum Mol Genet*, **5**, 1915-1920.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P.A., Tang, S.J., Buchwald, M. and Wrana, J.L. (1998) Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem*, **273**, 25628-25636.
- Majumdar, M.K., Wang, E. and Morris, E.A. (2001) BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol*, **189**, 275-284.
- Manolagas, S.C. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, **21**, 115-137.
- Mao, Y., Nickitenko, A., Duan, X., Lloyd, T.E., Wu, M.N., Bellen, H. and Quijcho, F.A. (2000) Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell*, **100**, 447-456.
- Massague, J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 597-641.
- Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**, 753-791.
- Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 169-178.
- Massague, J. (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell*, **134**, 215-230.
- Massague, J. and Gomis, R.R. (2006) The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*, **580**, 2811-2820.
- Masuyama, N., Hanafusa, H., Kusakabe, M., Shibuya, H. and Nishida, E. (1999) Identification of two Smad4 proteins in Xenopus. Their common and distinct properties. *J Biol Chem*, **274**, 12163-12170.
- Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. (2008) BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, **283**, 29119-29125.

BIBLIOGRAFIA

- Matsuoka, T., Ahlberg, P.E., Kessarlis, N., Iannarelli, P., Dennehy, U., Richardson, W.D., McMahon, A.P. and Koentges, G. (2005) Neural crest origins of the neck and shoulder. *Nature*, **436**, 347-355.
- McMahon, J.A., Takada, S., Zimmerman, L.B., Fan, C.M., Harland, R.M. and McMahon, A.P. (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev*, **12**, 1438-1452.
- Menko, A.S. and Boettiger, D. (1987) Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell*, **51**, 51-57.
- Merlo, G.R., Paleari, L., Mantero, S., Genova, F., Beverdam, A., Palmisano, G.L., Barbieri, O. and Levi, G. (2002) Mouse model of split hand/foot malformation type I. *Genesis*, **33**, 97-101.
- Merlo, G.R., Zerega, B., Paleari, L., Trombino, S., Mantero, S. and Levi, G. (2000) Multiple functions of Dlx genes. *Int J Dev Biol*, **44**, 619-626.
- Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M. and Vale, W. (1988) Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 247-251.
- Michael D, Oren M. (2002) The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 53-59.
- Milona, M.A., Gough, J.E. and Edgar, A.J. (2003) Expression of alternatively spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells. *BMC Genomics*, **4**, 43.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M. and Vortkamp, A. (2002) Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell*, **3**, 439-449.
- Minina, E., Wenzel, H.M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A.P. and Vortkamp, A. (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*, **128**, 4523-4534.
- Miyama, K., Yamada, G., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Miyado, K., Sakai, M., Ueno, N. and Shibuya, H. (1999) A BMP-inducible gene, dlx5, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction. *Dev Biol*, **208**, 123-133.
- Molkentin, J.D. and Olson, E.N. (1996) Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 445-453.
- Morasso MI, Grinberg A, Robinson G, Sargent TD, Mahon KA. (1999) Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. *Proc Natl Acad Sci*, **96**, 162-167.
- Morasso MI, Mahon KA, Sargent TD. (1995) A Xenopus distal-less gene in transgenic mice: conserved regulation in distal limb epidermis and other sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3968-3972.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E. and Hagiwara, M. (1996) A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem*, **271**, 13675-13679.
- Moustakas, A. and Heldin, C.H. (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, **118**, 3573-3584.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C.H. (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci*, **114**, 4359-4369.
- Mulder, K.M. and Morris, S.L. (1992) Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem*, **267**, 5029-5031.

BIBLIOGRAFIA

- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. and Imamura, T. (2003) Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell*, **14**, 2809-2817.
- Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. and de Crombrughe, B. (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev*, **18**, 290-305.
- Murakami, S., Kan, M., McKeehan, W.L. and de Crombrughe, B. (2000) Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1113-1118.
- Nakamura, K., Shirai, T., Morishita, S., Uchida, S., Saeki-Miura, K. and Makishima, F. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res*, **250**, 351-363.
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, **247**, 836-838.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (1997) Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*, **389**, 631-635.
- Nakashima, K. and de Crombrughe, B. (2003) Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*, **19**, 458-466.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. and de Crombrughe, B. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, **108**, 17-29.
- Nakayama, N., Han, C.E., Scully, S., Nishinakamura, R., He, C., Zeni, L., Yamane, H., Chang, D., Yu, D., Yokota, T. and Wen, D. (2001) A novel chordin-like protein inhibitor for bone morphogenetic proteins expressed preferentially in mesenchymal cell lineages. *Dev Biol*, **232**, 372-387.
- Narayanan K, Srinivas R, Peterson MC, Ramachandran A, Hao J, Thimmapaya B, Scherer PE, George A. (2004) Transcriptional regulation of dentin matrix protein 1 by JunB and p300 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, **279**, 44294-44302.
- Naski, M.C., Colvin, J.S., Coffin, J.D. and Ornitz, D.M. (1998) Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development*, **125**, 4977-4988.
- Nebreda, A.R. and Porras, A. (2000) p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*, **25**, 257-260.
- Nelson, C.E., Morgan, B.A., Burke, A.C., Laufer, E., DiMambro, E., Murtaugh, L.C., Gonzales, E., Tessarollo, L., Parada, L.F. and Tabin, C. (1996) Analysis of Hox gene expression in the chick limb bud. *Development*, **122**, 1449-1466.
- Nerlov, C. (2008) C/EBPs: recipients of extracellular signals through proteome modulation. *Curr Opin Cell Biol*, **20**, 180-185.
- Newberry EP, Latifi T, Towler DA. (1998) Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry*, **37**, 16360-16368.

BIBLIOGRAFIA

- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, **398**, 252-256.
- Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T. and Miyazono, K. (2002) Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell*, **13**, 3055-3063.
- Nishita, M., Hashimoto, M.K., Ogata, S., Laurent, M.N., Ueno, N., Shibuya, H. and Cho, K.W. (2000) Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature*, **403**, 781-785.
- Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. (2006) Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene*, **372**, 62-70.
- Noden, D.M. (1983) The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol*, **96**, 144-165.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I. and Knaus, P. (2002) The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*, **277**, 5330-5338.
- Nordsletten, L. (2006) Recent developments in the use of bone morphogenetic protein in orthopaedic trauma surgery. *Curr Med Res Opin*, **22 Suppl 1**, S13-17; S23.
- Norris RA, Kern MJ. (2001) The identification of Prx1 transcription regulatory domains provides a mechanism for unequal compensation by the Prx1 and Prx2 loci. *J Biol Chem*, **276**, 26829-37.
- Noth, U., Steinert, A.F. and Tuan, R.S. (2008) Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*, **4**, 371-380.
- Nowicki, J.L. and Burke, A.C. (2000) Hox genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development*, **127**, 4265-4275.
- Ohuchi, H., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Araga, A., Ohata, T., Ishimaru, Y., Yoshioka, H., Kuwana, T., Nohno, T., Yamasaki, M., Itoh, N. and Noji, S. (1997) The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor. *Development*, **124**, 2235-2244.
- Ohyama, Y., Nifuji, A., Maeda, Y., Amagasa, T. and Noda, M. (2004) Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology*, **145**, 4685-4692.
- Okreglak V, Drubin DG. (2007) Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J Cell Biol*, **178**, 1251-1264.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. and Niehrs, C. (1999) Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, **401**, 480-485.
- Otto, T.C. and Lane, M.D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **40**, 229-242.
- Padgett, R.W., Wozney, J.M. and Gelbart, W.M. (1993) Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the Drosophila embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2905-2909.
- Palacios, D. and Puri, P.L. (2006) The epigenetic network regulating muscle development and regeneration. *J Cell Physiol*, **207**, 1-11.
- Palumbo, C., Palazzini, S. and Marotti, G. (1990) Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*, **11**, 401-406.

BIBLIOGRAFIA

- Pang J, Zhang Y, Ke J, Yu Q, He W, Wu B. (2007) Upregulation of dentin matrix protein 1 promoter activities by core binding factor alpha1 in human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **357**, 505-510.
- Panopoulou, E., Gillooly, D.J., Wrana, J.L., Zerial, M., Stenmark, H., Murphy, C. and Fotsis, T. (2002) Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**, 18046-18052.
- Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D. and Moustakas, A. (2000) Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, **275**, 29244-29256.
- Patel, S.R. and Dressler, G.R. (2005) BMP7 signaling in renal development and disease. *Trends Mol Med*, **11**, 512-518.
- Patterson, G.I. and Padgett, R.W. (2000) TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends Genet*, **16**, 27-33.
- Penheiter, S.G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Dore, J.J., Jr. and Leof, E.B. (2002) Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol*, **22**, 4750-4759.
- Pera, E.M., Ikeda, A., Eivers, E. and De Robertis, E.M. (2003) Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev*, **17**, 3023-3028.
- Perfettini JL, Castedo M, Nardacci R, Ciccocanti F, Boya P, Roumier T, Larochette N, Piacentini M, Kroemer G. (2005) Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med*, **201**, 279-289.
- Phillips BT, Kwon HJ, Melton C, Houghtaling P, Fritz A, Riley BB. (2006) Zebrafish msxB, msxC and msxE function together to refine the neural-non-neural border and regulate cranial placodes and neural crest development. *Dev Biol*, **294**, 376-390.
- Piek, E., Afrakhte, M., Sampath, K., van Zoelen, E.J., Heldin, C.H. and ten Dijke, P. (1999) Functional antagonism between activin and osteogenic protein-1 in human embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol*, **180**, 141-149.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. and Marshak, D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143-147.
- Piwon N, Günther W, Schwake M, Bösl MR, Jentsch TJ. (2000) ClC-5 Cl⁻ channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature*, **408**, 369-373.
- Polesskaya, A., Seale, P. and Rudnicki, M.A. (2003) Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45⁺ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*, **113**, 841-852.
- Porteus, M.H., Brice, A.E., Bulfone, A., Usdin, T.B., Ciaranello, R.D. and Rubenstein, J.L. (1992) Isolation and characterization of a library of cDNA clones that are preferentially expressed in the embryonic telencephalon. *Brain Res Mol Brain Res*, **12**, 7-22.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J. and Kroll, K.L. (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *Embo J*, **22**, 2453-2462.
- Pourquie, O., Fan, C.M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M. and Le Douarin, N.M. (1996) Lateral

BIBLIOGRAFIA

- and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell*, **84**, 461-471.
- Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. (1998) Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet*, **7**, 563-569.
- Prockop, D.J. (2003) Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J Cell Biol*, **160**, 807-809.
- Prockop, D.J., Gregory, C.A. and Spees, J.L. (2003) One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 1**, 11917-11923.
- Proetzel, G., Pawlowski, S.A., Wiles, M.V., Yin, M., Boivin, G.P., Howles, P.N., Ding, J., Ferguson, M.W. and Doetschman, T. (1995) Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet*, **11**, 409-414.
- Pugh, B.F. and Tjian, R. (1991) Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev*, **5**, 1935-1945.
- Qi, X., Li, T.G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., Miura, S., Mishina, Y. and Zhao, G.Q. (2004) BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 6027-6032.
- Qiao, B., Padilla, S.R. and Benya, P.D. (2005) Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-beta-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling. *J Biol Chem*, **280**, 17562-17571.
- Qing, J., Zhang, Y. and Derynck, R. (2000) Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta -induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity. *J Biol Chem*, **275**, 38802-38812.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, **265**, 23-32.
- Raman, M., Chen, W. and Cobb, M.H. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, **26**, 3100-3112.
- Rawadi, G., Vayssiere, B., Dunn, F., Baron, R. and Roman-Roman, S. (2003) BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res*, **18**, 1842-1853.
- Razani, B., Zhang, X.L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Bottinger, E.P. and Lisanti, M.P. (2001) Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J Biol Chem*, **276**, 6727-6738.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**, 843-850.
- Rifkin, D.B. (2005) Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem*, **280**, 7409-7412.
- Robledo, R.F., Rajan, L., Li, X. and Lufkin, T. (2002) The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev*, **16**, 1089-1101.
- Roca H, Phimpilai M, Gopalakrishnan R, Xiao G, Franceschi RT. (2005) Cooperative interactions between RUNX2 and homeodomain protein-binding sites are critical for the osteoblast-specific expression of the bone sialoprotein gene. *J Biol Chem*, **280**, 30845-30855.
- Roeder, R.G. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci*, **16**, 402-408.

BIBLIOGRAFIA

- Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L. and MacDougald, O.A. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, **289**, 950-953.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H. and Jaenisch, R. (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, **75**, 1351-1359.
- Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB. (1997) Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol*, **11**, 1681-1694.
- Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. (2006) Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, **366**, 51-57.
- Samad, T.A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S.J., Campagna, J.A., Perusini, S., Fabrizio, D.A., Schneyer, A.L., Lin, H.Y., Brivanlou, A.H., Attisano, L. and Woolf, C.J. (2005) DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem*, **280**, 14122-14129.
- Samad, T.A., Srinivasan, A., Karchewski, L.A., Jeong, S.J., Campagna, J.A., Ji, R.R., Fabrizio, D.A., Zhang, Y., Lin, H.Y., Bell, E. and Woolf, C.J. (2004) DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. *J Neurosci*, **24**, 2027-2036.
- Sampath, T.K., Rashka, K.E., Doctor, J.S., Tucker, R.F. and Hoffmann, F.M. (1993) Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6004-6008.
- Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS. (2000) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, **60**, 2464-2472.
- Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L. and Doetschman, T. (1997) TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, **124**, 2659-2670.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. and Ishii, S. (1999) ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*, **274**, 8949-8957.
- Sasaki Y, Nagai J, Kitahara Y, Takai N, Murakami T, Takano M. (2001) Expression of chloride channel, ClC-5, and its role in receptor-mediated endocytosis of albumin in OK cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 212-218.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R. (2000) Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, **24**, 391-395.
- Schwartz KA, Lanciloti NJ, Moore MK, Campione AL, Chandar N. (1999) p53 transactivity during in vitro osteoblast differentiation in a rat osteosarcoma cell line. *Mol Carcinog*, **25**, 132-138.
- Scheufler, C., Sebald, W. and Hulsmeier, M. (1999) Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, **287**, 103-115.
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. and Auwerx, J. (1996) PPARalpha and PPARgamma activators

BIBLIOGRAFIA

- direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J*, **15**, 5336-5348.
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. and Auwerx, J. (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, **270**, 19269-19276.
- Scott, I.C., Steiglitz, B.M., Clark, T.G., Pappano, W.N. and Greenspan, D.S. (2000) Spatiotemporal expression patterns of mammalian chordin during postgastrulation embryogenesis and in postnatal brain. *Dev Dyn*, **217**, 449-456.
- Scott, R.W. and Olson, M.F. (2007) LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med*, **85**, 555-568.
- Seki, K. and Hata, A. (2004) Indian hedgehog gene is a target of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem*, **279**, 18544-18549.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. and Kato, S. (1999) Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet*, **21**, 138-141.
- Shi, X., Yang, X., Chen, D., Chang, Z. and Cao, X. (1999) Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J Biol Chem*, **274**, 13711-13717.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**, 685-700.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell*, **94**, 585-594.
- Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1996) TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science*, **272**, 1179-1182.
- Shigetani, Y., Sugahara, F., Kawakami, Y., Murakami, Y., Hirano, S. and Kuratani, S. (2002) Heterotopic shift of epithelial-mesenchymal interactions in vertebrate jaw evolution. *Science*, **296**, 1316-1319.
- Shioda, T., Lechleider, R.J., Dunwoodie, S.L., Li, H., Yahata, T., de Caestecker, M.P., Fenner, M.H., Roberts, A.B. and Isselbacher, K.J. (1998) Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9785-9790.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1997) TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **272**, 8141-8144.
- Sierra J, Villagra A, Paredes R, Cruzat F, Gutierrez S, Javed A, Arriagada G, Olate J, Imschenetzky M, Van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M. (2003) Regulation of the bone-specific osteocalcin gene by p300 requires Runx2/Cbfa1 and the vitamin D3 receptor but not p300 intrinsic histone acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, **23**, 3339-3351.
- Simeone, A., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Stornaiuolo, A., Gulisano, M., Mallamaci, A., Kastury, K., Druck, T., Huebner, K. and et al. (1994) Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2250-2254.

BIBLIOGRAFIA

- Smale ST. (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta*, **1351**, 73-88.
- Smale, S.T. and Kadonaga, J.T. (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*, **72**, 449-479.
- Smit, L., Baas, A., Kuipers, J., Korswagen, H., van de Wetering, M. and Clevers, H. (2004) Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem*, **279**, 17232-17240.
- Smith, C.A. and Tuan, R.S. (1995) Functional involvement of Pax-1 in somite development: somite dysmorphogenesis in chick embryos treated with Pax-1 paired-box antisense oligodeoxynucleotide. *Teratology*, **52**, 333-345.
- Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R., Wan, C. and Rubin, C.S. (1988) Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **263**, 9402-9408.
- Smith, W.C. and Harland, R.M. (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*, **70**, 829-840.
- Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B. and Lefebvre, V. (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell*, **1**, 277-290.
- Solloway, M.J., Dudley, A.T., Bikoff, E.K., Lyons, K.M., Hogan, B.L. and Robertson, E.J. (1998) Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet*, **22**, 321-339.
- Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.H. and Landstrom, M. (2008) The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol*, **10**, 1199-1207.
- Spiegelman, B.M. and Green, H. (1980) Control of specific protein biosynthesis during the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem*, **255**, 8811-8818.
- Spinella-Jaegle, S., Rawadi, G., Kawai, S., Gallea, S., Faucheu, C., Mollat, P., Courtois, B., Bergaud, B., Ramez, V., Blanchet, A.M., Adelmant, G., Baron, R. and Roman-Roman, S. (2001) Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J Cell Sci*, **114**, 2085-2094.
- Steinmeyer K, Schwappach B, Bens M, Vandewalle A, Jentsch TJ. (1995) Cloning and functional expression of rat CLC-5, a chloride channel related to kidney disease. *J Biol Chem*, **270**, 31172-31177.
- Student, A.K., Hsu, R.Y. and Lane, M.D. (1980) Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, **255**, 4745-4750.
- Sugimori, K., Matsui, K., Motomura, H., Tokoro, T., Wang, J., Higa, S., Kimura, T. and Kitajima, I. (2005) BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. *J Bone Miner Metab*, **23**, 411-419.
- Sun, P.D. and Davies, D.R. (1995) The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **24**, 269-291.
- Sun Y, Lu X, Yin L, Zhao F, Feng Y. (2006) Inhibition of DLX4 promotes apoptosis in choriocarcinoma cell lines. *Placenta*, **27**, 375-383.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T. and Miyazono, K. (2002) Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem*, **277**, 39919-39925.

BIBLIOGRAFIA

- Suzuki, M., Ueno, N. and Kuroiwa, A. (2003) Hox proteins functionally cooperate with the GC box-binding protein system through distinct domains. *J Biol Chem*, **278**, 30148-30156.
- Takebayashi-Suzuki, K., Funami, J., Tokumori, D., Saito, A., Watabe, T., Miyazono, K., Kanda, A. and Suzuki, A. (2003) Interplay between the tumor suppressor p53 and TGF beta signaling shapes embryonic body axes in *Xenopus*. *Development*, **130**, 3929-3939.
- Takeda, S., Bonnamy, J.P., Owen, M.J., Ducy, P. and Karsenty, G. (2001) Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev*, **15**, 467-481.
- Takeda, S., Elefteriou, F., Lévassieur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P. and Karsenty, G. (2002) Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, **111**, 305-317.
- Tang, Q.Q. and Lane, M.D. (1999) Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev*, **13**, 2231-2241.
- Tang, Q.Q., Otto, T.C. and Lane, M.D. (2003a) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 850-855.
- Tang, Q.Q., Otto, T.C. and Lane, M.D. (2003b) Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 44-49.
- Tang, Q.Q., Otto, T.C. and Lane, M.D. (2004) Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9607-9611.
- Tang, Y., Katuri, V., Dillner, A., Mishra, B., Deng, C.X. and Mishra, L. (2003c) Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science*, **299**, 574-577.
- Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F. and Itoh, S. (2002) Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol*, **191**, 1-16.
- Theodosiou, N.A. and Tabin, C.J. (2005) Sox9 and Nkx2.5 determine the pyloric sphincter epithelium under the control of BMP signaling. *Dev Biol*, **279**, 481-490.
- Thirunavukkarasu, K., Miles, R.R., Halladay, D.L., Yang, X., Galvin, R.J., Chandrasekhar, S., Martin, T.J. and Onyia, J.E. (2001) Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem*, **276**, 36241-36250.
- Thomas, B.L., Tucker, A.S., Qui, M., Ferguson, C.A., Hardcastle, Z., Rubenstein, J.L. and Sharpe, P.T. (1997) Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Development*, **124**, 4811-4818.
- Thomas, D.A. and Massague, J. (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, **8**, 369-380.
- Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.S., Wang, W.F., Forrester, W.C. and Hinds, P.W. (2001) The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell*, **8**, 303-316.
- Thompson JF, Hayes LS, Lloyd DB. (1991) Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene*, **103**, 171-177.
- Tickle, C. (1995) Vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 478-484.

BIBLIOGRAFIA

- Tintut, Y., Parhami, F., Le, V., Karsenty, G. and Demer, L.L. (1999) Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *J Biol Chem*, **274**, 28875-28879.
- Tjian, R. and Maniatis, T. (1994) Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell*, **77**, 5-8.
- Tominaga, H., Maeda, S., Hayashi, M., Takeda, S., Akira, S., Komiya, S., Nakamura, T., Akiyama, H. and Imamura, T. (2008) CCAAT/enhancer-binding protein beta promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4. *Mol Biol Cell*, **19**, 5373-5386.
- Tonegawa, A., Funayama, N., Ueno, N. and Takahashi, Y. (1997) Mesodermal subdivision along the mediolateral axis in chicken controlled by different concentrations of BMP-4. *Development*, **124**, 1975-1984.
- Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 1147-1156.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*, **95**, 779-791.
- Tufan, A.C. and Tuan, R.S. (2001) Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *Faseb J*, **15**, 1436-1438.
- Tylzanowski, P., Verschueren, K., Huylebroeck, D. and Luyten, F.P. (2001) Smad-interacting protein 1 is a repressor of liver/bone/kidney alkaline phosphatase transcription in bone morphogenetic protein-induced osteogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem*, **276**, 40001-40007.
- Urist, M.R. (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science*, **150**, 893-899.
- Vaananen, H.K. (2005) Mesenchymal stem cells. *Ann Med*, **37**, 469-479.
- Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D. and Spiess, J. (1986) Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*, **321**, 776-779.
- van der Hoeven, F., Zakany, J. and Duboule, D. (1996) Gene transpositions in the HoxD complex reveal a hierarchy of regulatory controls. *Cell*, **85**, 1025-1035.
- Verschueren, K., Remacle, J.E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B.S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M.T., Bodmer, R., Smith, J.C. and Huylebroeck, D. (1999) SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem*, **274**, 20489-20498.
- Viñals, F., Lopez-Rovira, T., Rosa, J.L. and Ventura, F. (2002) Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett*, **510**, 99-104.
- Viñals F, Reiriz J, Ambrosio S, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. (2004) BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression. *Embo J*, **23**, 3527-3537.
- Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M. and Werb, Z. (1998) MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, **93**, 411-422.
- Wagers, A.J. and Weissman, I.L. (2004) Plasticity of adult stem cells. *Cell*, **116**, 639-648.

BIBLIOGRAFIA

- Wan, M. and Cao, X. (2005) BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 651-657.
- Wan, M., Shi, X., Feng, X. and Cao, X. (2001) Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem*, **276**, 10119-10125.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G.R., Inoue, J. and Chen, Z.J. (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351.
- Wang, X., Goh, C.H. and Li, B. (2007) p38 mitogen-activated protein kinase regulates osteoblast differentiation through osterix. *Endocrinology*, **148**, 1629-1637.
- Wang X, Kua HY, Hu Y, Guo K, Zeng Q, Wu Q, Ng HH, Karsenty G, de Crombrughe B, Yeh J, Li B. (2006) p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *J Cell Biol*, **172**, 115-125.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. and Nishida, E. (2000) Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep*, **1**, 176-182.
- Wellik, D.M. and Capecchi, M.R. (2003) Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton. *Science*, **301**, 363-367.
- Wieser, R., Attisano, L., Wrana, J.L. and Massague, J. (1993) Signaling activity of transforming growth factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Mol Cell Biol*, **13**, 7239-7247.
- Williams, T.M., Williams, M.E., Heaton, J.H., Gelehrter, T.D. and Innis, J.W. (2005) Group 13 HOX proteins interact with the MH2 domain of R-Smads and modulate Smad transcriptional activation functions independent of HOX DNA-binding capability. *Nucleic Acids Res*, **33**, 4475-4484.
- Woloshin P, Song K, Degnin C, Killary AM, Goldhamer DJ, Sassoon D, Thayer MJ. (1995) MSX1 inhibits myoD expression in fibroblast x 10T1/2 cell hybrids. *Cell*, **82**, 611-620.
- Wozney, J.M. (1989) Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res*, **1**, 267-280.
- Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massague, J. and Shi, Y. (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science*, **287**, 92-97.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., Massague, J. and Shi, Y. (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol Cell*, **8**, 1277-1289.
- Wu, J.W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K. and Shi, Y. (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: insights on Ski-mediated repression of TGF-beta signaling. *Cell*, **111**, 357-367.
- Wu, L., Wu, Y., Gathings, B., Wan, M., Li, X., Grizzle, W., Liu, Z., Lu, C., Mao, Z. and Cao, X. (2003) Smad4 as a transcription corepressor for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*, **278**, 15192-15200.
- Wu, X., Shi, W. and Cao, X. (2007) Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, **1116**, 29-49.
- Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N.L. and Farmer, S.R. (1995) Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev*, **9**, 2350-2363.
- Xia, Y., Yu, P.B., Sidis, Y., Beppu, H., Bloch, K.D., Schneyer, A.L. and Lin, H.Y. (2007) Repulsive guidance molecule RGMA alters utilization of bone

BIBLIOGRAFIA

- morphogenetic protein (BMP) type II receptors by BMP2 and BMP4. *J Biol Chem*, **282**, 18129-18140.
- Xiao, G., Jiang, D., Ge, C., Zhao, Z., Lai, Y., Boules, H., Phimpilai, M., Yang, X., Karsenty, G. and Franceschi, R.T. (2005) Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression. *J Biol Chem*, **280**, 30689-30696.
- Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R. and Franceschi, R.T. (2002) Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*, **277**, 36181-36187.
- Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M.D., Guan, K., Karsenty, G. and Franceschi, R.T. (2000) MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*, **275**, 4453-4459.
- Xu, L., Kang, Y., Col, S. and Massague, J. (2002) Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell*, **10**, 271-282.
- Xu, L., Yao, X., Chen, X., Lu, P., Zhang, B. and Ip, Y.T. (2007) Msk is required for nuclear import of TGF- β /BMP-activated Smads. *J Cell Biol*, **178**, 981-994.
- Xu, M.Q., Feldman, G., Le Merrer, M., Shugart, Y.Y., Glaser, D.L., Urtizbera, J.A., Fardeau, M., Connor, J.M., Triffitt, J., Smith, R., Shore, E.M. and Kaplan, F.S. (2000) Linkage exclusion and mutational analysis of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Clin Genet*, **58**, 291-298.
- Yaffe D, Saxel O. (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, **270**, 725-727
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K. (1999) Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem*, **274**, 703-709.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. and Matsumoto, K. (1999) XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J*, **18**, 179-187.
- Yamakawa, N., Tsuchida, K. and Sugino, H. (2002) The rasGAP-binding protein, Dok-1, mediates activin signaling via serine/threonine kinase receptors. *Embo J*, **21**, 1684-1694.
- Yamamoto, N., Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Kurokawa, T. and Suda, T. (1997) Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 574-580.
- Yamamoto, T., Saatcioglu, F. and Matsuda, T. (2002) Cross-talk between bone morphogenetic proteins and estrogen receptor signaling. *Endocrinology*, **143**, 2635-2642.
- Yanagisawa, M., Nakashima, K., Takeda, K., Ochiai, W., Takizawa, T., Ueno, M., Takizawa, M., Shibuya, H. and Taga, T. (2001) Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7. *Genes Cells*, **6**, 1091-1099.
- Yang, X., Ji, X., Shi, X. and Cao, X. (2000) Smad1 domains interacting with Hoxc-8 induce osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, **275**, 1065-1072.
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H.C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T.M., Hanauer, A. and Karsenty, G.

BIBLIOGRAFIA

- (2004) ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, **117**, 387-398.
- Yao, J., Xiong, S., Klos, K., Nguyen, N., Grijalva, R., Li, P. and Yu, D. (2001) Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin-beta1 in human breast cancer cells. *Oncogene*, **20**, 8066-8074.
- Yao, X., Chen, X., Cottonham, C. and Xu, L. (2008) Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. *J Biol Chem*, **283**, 22867-22874.
- Yin, M. and Pacifici, M. (2001) Vascular regression is required for mesenchymal condensation and chondrogenesis in the developing limb. *Dev Dyn*, **222**, 522-533.
- Yoon, B.S. and Lyons, K.M. (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem*, **93**, 93-103.
- Yoshida, I., Koide, S., Hasegawa, S.I., Nakagawara, A., Tsuji, A. and Matsuda, Y. (2001) Proprotein convertase PACE4 is down-regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor hASH-1 and MASH-1. *Biochem J*, **360**, 683-689.
- Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T. and Yamamoto, T. (2000) Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*, **103**, 1085-1097.
- Yoshida, Y., von Bubnoff, A., Ikematsu, N., Blitz, I.L., Tsuzuku, J.K., Yoshida, E.H., Umemori, H., Miyazono, K., Yamamoto, T. and Cho, K.W. (2003) Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling. *Mech Dev*, **120**, 629-637.
- Yousfi M, Lasmoles F, Lomri A, Delannoy P, Marie PJ. (2001) Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *J Clin Invest*, **107**, 1153-1161.
- Yu, L., Hebert, M.C. and Zhang, Y.E. (2002) TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *Embo J*, **21**, 3749-3759.
- Zambetti GP, Horwitz EM, Schipani E. (2006) Skeletons in the p53 tumor suppressor closet: genetic evidence that p53 blocks bone differentiation and development. *J Cell Biol*, **172**, 795-797.
- Zavadil, J. and Bottinger, E.P. (2005) TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, **24**, 5764-5774.
- Zavadil, J., Cermak, L., Soto-Nieves, N. and Bottinger, E.P. (2004) Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *Embo J*, **23**, 1155-1165.
- Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Kern, S.E. (1998) Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell*, **1**, 611-617.
- Zerucha, T., Stuhmer, T., Hatch, G., Park, B.K., Long, Q., Yu, G., Gambarotta, A., Schultz, J.R., Rubenstein, J.L. and Ekker, M. (2000) A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J Neurosci*, **20**, 709-721.
- Zetser, A., Frank, D. and Bengal, E. (2001) MAP kinase converts MyoD into an instructive muscle differentiation factor in *Xenopus*. *Dev Biol*, **240**, 168-181.
- Zetser, A., Gredinger, E. and Bengal, E. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem*, **274**, 5193-5200.

BIBLIOGRAFIA

- Zhang, C., Cho, K., Huang, Y., Lyons, J.P., Zhou, X., Sinha, K., McCrea, P.D. and de Crombrughe, B. (2008) Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 6936-6941.
- Zhang H, Catron KM, Abate-Shen C. (1996) A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci*, **5**, 1764-1769.
- Zhang H, Hu G, Wang H, Sciavolino P, Iler N, Shen MM, Abate-Shen C. (1997) Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. *Mol Cell Biol*, **17**, 2920-32.
- Zhang, J.W., Tang, Q.Q., Vinson, C. and Lane, M.D. (2004) Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 43-47.
- Zhang, L., Deng, M., Parthasarathy, R., Wang, L., Mongan, M., Molkentin, J.D., Zheng, Y. and Xia, Y. (2005) MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol*, **25**, 60-65.
- Zhang, Y.W., Yasui, N., Ito, K., Huang, G., Fujii, M., Hanai, J., Nogami, H., Ochi, T., Miyazono, K. and Ito, Y. (2000) A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10549-10554.
- Zhao, G.Q., Zhao, S., Zhou, X., Eberspaecher, H., Solursh, M. and de Crombrughe, B. (1994) rDlx, a novel distal-less-like homeoprotein is expressed in developing cartilages and discrete neuronal tissues. *Dev Biol*, **164**, 37-51.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V. and De Crombrughe, B. (1997) Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn*, **209**, 377-386.
- Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D. and Lee, B. (2006) Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19004-19009.
- Zhou, H., Mak, W., Zheng, Y., Dunstan, C.R. and Seibel, M.J. (2008) Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem*, **283**, 1936-1945.
- Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M. and Harland, R.M. (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, **86**, 599-606.

BIBLIOGRAFIA