

3.4 Treball 4:

“Expressió de XLalpha i G_sα en LCLs humanes i reducció a la meitat dels nivells basals de les formes expressades de GNAS1 en individus POH”

Resum

Els estudis en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3E-1 de ratolí varen demostrar que Nesp55, Nesp-as i tres isoformes de G_sα es troben presents en aquestes cèl·lules. Sota condicions osteogèniques, Nesp55 i la nova forma de G_sα redueixen progressivament els seus nivells d'expressió fins a valors no detectables en resposta a un fenotip més osteogènic, mentre que l'antisentit, la isoforma de G_sα amb l'exó 3 exclòs i XLalpha augmenten progressivament l'expressió en resposta a la inducció osteogènica.

Aquestes observacions plantegen l'existència d'un mecanisme coordinat que involucra la unitat transcripcional de gnas en el procés de diferenciació osteogènica de cèl·lules pluripotents, suggerint que la predisposició de hMCS a dirigir-se a llinatges osteogènics o adipogènics està governat per múltiples interaccions entre els diferents transcrits de gnas. Per a poder obtenir un coneixement més ampli del funcionament d'aquest mecanisme, varem analitzar els transcrits de GNAS1 en LCLs humanes d'individus POH portadors de mutacions inactivadores del gen GNAS1. Es van dissenyar “primers” específics per totes les formes de GNAS1 i posteriorment es van analitzar en LCLs, trobant que Nesp55 i Gnas-as humana no s'expressen en aquestes cèl·lules. L'estudi es va estendre al comparar els nivells dels mRNAs i proteïna entre les LCLs d'individus afectats amb POH respecte les LCLs d'individus no afectats, trobant que en individus POH tant els nivells dels mRNAs com els proteïcs estan reduïts a la meitat comparat amb els valors de les LCLs d'individus sans. Aquests resultats són molt importants ja que les reduccions d'expressió a la meitat de les formes de GNAS1, heretades per part de pare o mare, podrien resultar en una manca (“*imprinting*” del gen no mutat) o en valors reduïts a la meitat d'algunes de les isoformes que són essencials per mantenir cèl·lules pluripotents en el seu estat cel·lular.

Materials i mètodes

Individus humans

Els pacients amb POH, les cèl·lules dels quals es van utilitzar en aquests estudi, han estat descrits prèviament (EDDY. M., et al. 2000). Els participants es van avaluar clínicament per a confirmar el seu estat POH abans de començar els estudis moleculars. Després d'un consentiment oficial es van obtenir mostres de sang de cada un dels pacient seguint els protocols estàndard de les revisions del protocols institucionals del "Children Hospital of Philadelphia", Universitat de Pennsylvania. Es van transformar limfòcits perifèrics amb el virus Epstein-Barr (EBV) (Shafritz et al., 1996).

Línies cel·lulars

Les cèl·lules (LCLs) transformades amb el virus Epstein-Barr es varen fer créixer amb medi de cultiu "Roswell Park Memorial Institute 1640" (RPMI-1640; Life Technologies Inc, Gaithersburg, MD) suplementat amb "fetal bovine serum" (15%), penicilina G (100 u/ml), streptomicina (100 µg/ml) i amphotericina B (250 ng/ml) i mantingudes a 37°C amb 5% de CO₂. Les línies cel·lulars derivaven de dos nens afectats no emparentats entre ells. Les cèl·lules utilitzades per a l'anàlisi d'expressió gènica es varen recollir 24h després d'una divisió 1:2.

Disseny de "primers" humans (Homo sapiens sapiens), específics per Nesp 55, Xl α , G α i Nesp-antisentit:

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

Transcript	Forward	Reverse
Nesp55	5'- aag cca aag aag ccc accc -3'	5'-aaa gat tcc aga agt cag gac acg-3'
XLalpha	5'-cgc aga gaa gaa acg cag taa gc -3'	5'-atc ctc cca cag agc ctt gg-3'
G α	5'- gca gaa gga caa gca ggct tacc -3'	5'-agg gaa gtc aaa gtc agg cac g -3'
Nesp-as	5'-gat cag tcg tcg aaa agg agg -3'	5'-gaa gag gtg ctg ctg ggg tg -3'

Taula .1. Seqüències 5' a 3', específiques de Nesp 55, Xl α , G α i Nesp-as de Homo sapiens sapiens

<u>Homo sapiens sapiens</u>	Producte de PCR esperat	Número GI		Tm obtinguda per Mac vector 7.0		% G+C	
		Forward	Reverse	Forward	Reverse	Forward	Reverse
Nesp55	611 bp	7706588	7706588	66°C	68°C	50	55
XLalpha	418 bp	7362976	7362976	68°C	66°C	56.9	55.2
Gs α	340 bp	8659565	8659565	68°C	70°C	56.5	56.5
Neps-as	295 bp	8346832	8346832	66°C	68°C	56.5	56.5

Taula. 2 Producte de PCR esperat, número Gi (NCBI), temperatura d'hibridació i % G+C per Nesp 55, XLalpha, Gnas i Nesp-as de Homo sapiens sapiens

Aïllament d'RNA total

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

RT-PCR

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

Optimització per RT-PCR en LCLs humanes (Homo sapiens sapiens) dels "primers" dissenyats per els transcrits XL α s i Gnas

A continuació es presenten las condicions d'optimització per RT-PCR en LCLs humanes (Homo sapiens sapiens) dels "primers" dissenyats pels transcrits XL α s i G α .

Abans d'obtenir d'aquest resultats, les variables temperatura d'hibridació i concentració de Mg^{2+} , per cada parell de "primers" varen ser optimitzades. Els nivells d'expressió basal d'aquestes formes de GNAS1 es varen obtenir mitjançant corbes de saturació que consistien en un mostratge seqüencial de reaccions de PCR cada 5 cicles, amb un rang de 10 a 40 cicles dependent del tipus de gen analitzat. D'aquesta forma s'obté el nombre de cicles òptim per romandre en els valors lineals d'amplificació necessaris per a una vàlida quantificació. Per a l'anàlisi d'expressió gènica, el nombre de cicles usats pels diferents gens va ser la següent: GAPDH (gliceraldeid-6-fosfat deshidrogenasa, 18 cicles), XLalpha (40 cicles), $G_s\alpha$ (30cicles).

La desnaturalització del motlle es va realitzar a 94°C durant 30s seguit d'hibridació a 65°C durant 30s i finalment extensió dels "primers" a 72°C durant 30s.

XLalpha: "Primers" ES 692/693; Producte de PCR: ~ 418bp; Condicions de PCR: 95°C 5'+ (94°C 30''+ 65°C 30''+ 72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40cycles; Amplificació òptima esperada a: ~ 40 cicles.

$G_s\alpha$: "Primers" ES 694/695; Producte de PCR: ~ <340bp; Condicions de PCR: 95°C 5'+ (94°C 30''+ 65°C 30''+72°C 45'') + 72°C 5'; Corba de PCR: 25-30-35-40-45 cicles; Amplificació òptima esperada a: ~ 30 cicles.

Anàlisi dels nivells dels mRNAs d'expressió basal dels transcrits humans $Xl\alpha$ s i $G_s\alpha$ en LCLs de 2 POH i 3 control

Es van utilitzar dos LCLs d'individus afectats amb POH i tres LCLs d'individus sans per analitzar els nivells d'expressió basals dels transcrits humans $Xl\alpha$ s i $G_s\alpha$

Anàlisi d'expressió de la proteïna $G_s\alpha$ en LCLs humanes de 2 POH i 3 control usant un anticòs policlonal contra $G_s\alpha$

Els lisats de les LCLs humanes i dels fibroblasts (MC3T3-E1) de ratolí es van preparar utilitzant el mètode "modified RIPA extraction buffer".

“Modified RIPA buffer” es va preparar amb quantitats finals de:

- NP-40: 1%
- Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4
- Na-deoxycholate: 0.25%
- NaCl: 150 mM
- EDTA: 1 mM
- PMSF: 1 mM
- Aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1 microgram/ml de cada
- Na₃VO₄: 1 mM
- NaF: 1 mM

Preparació del lisat usant tampó RIPA, SDS-PAGE i western blot anàlisi.

Les cèl·lules adherents es van rentar dues vegades en el disc amb PBS fred. Per a obtenir el sediment cel·lular en cèl·lules no adherents, vam rentar amb PBS i es va centrifugar a 1000 rpm durant cinc minuts. Tot seguit, es va afegir “modified RIPA buffer” a les cèl·lules (0.5 ml per 5×10^6 cells/60 mm disc/75cm² “flasks”). Les cèl·lules adherents es van treure del disc amb un raspall (rubber policeman) remullat amb aigua destil·lada freda i la suspensió cel·lular es va transferir a un tub de centrifuga. Suaument es va equilibrar la suspensió en una habitació freda durant quinze minuts per així lisar les cèl·lules. Un altre cop es va centrifugar a 1000rpm durant cinc minuts, tot seguit el sobrenedant es va transferir a un nou tub de centrifuga i el sediment restant es va descartar. El lisat cel·lular es va diluir 1:10 abans de determinar la concentració de proteïnes amb el mètode de Bradford. Una quantitat de 20 µg proteïna dels lisats de les LCLs i de les MC3T3-E1 es van sotmetre a sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) i electroforesi amb gel de polyacrilamida al 10%. Les electroforesis es varen fer córrer amb un sistema Bio-rad connectat a un voltatge de 0.02V (10mA)/ gel. Un cop portat a terme l'electroforesi, les proteïnes es van transferir a una membrana de PVDF (polivinyl difluoride) mitjançant un aparell d'electrotransferència. Prèviament, la membrana es va remullar amb metanol -al ser la membrana molt hidrofòbica- i tot seguit amb tampó de transferència (Transfer buffer: 12 mM Tris-HCl, pH 8.3, 96 mM glicina, 20% (v/v). Un cop acabada l'electroforesi, el gel també es remullà durant cinc minuts amb el tampó de transferència. La transferència es va dur a terme durant 40 minuts a corrent constant (90

miliAmpers/gel). Un cop finalitzada la transferència la membrana s'incubà durant ½ hora a T^a ambient amb una solució d'un 5% de llet en pols amb tampó TN (0.1M tris, 0.5M NaCl, pH 7.4). Després la membrana s'incubà amb TN que contenia l'anticòs que reconeix G_sα a una dilució 1:100. Després d'una hora d'incubació en les mateixes condicions la membrana fou rentada amb TNT (TN + 0.1% de tween-20). Tot seguit s'incubà la membrana amb el segon anticòs que reconeix l'IgG de conill (en una dilució 1:1500 en TN) que té conjugat l'enzim peroxidasa. Després de 40 minuts d'incubació es rentà amb la mateixa solució rentadora i la membrana es revelà per Quimioiluminiscència utilitzant el kit d'ECL (Amershan Pharmacia biotech).

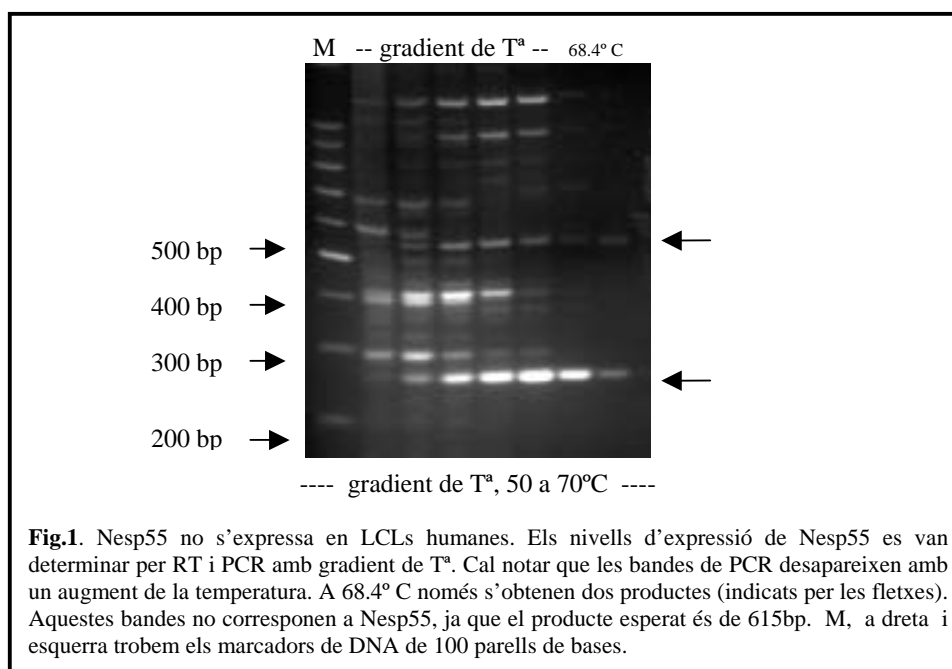
Resultats

Anàlisi de l'expressió dels transcrits Nesp55, XL α s, Nesp-as i G α en LCLs humanes i anàlisi dels nivells d'expressió basal de XL α s i G α en LCLs humanes de 2 POH i 3 control

Recentment, les mutacions inactivadores del gen GNAS1 han estat associades a la POH, una malaltia humana amb formació ectòpica d'os d'origen intramenbranós. En aquest estudi hem fet servir limfòcits humans transformats per a conèixer quines formes de GNAS1 es troben expressades en aquest tipus cel·lular, com també poder conèixer les diferències d'expressió (mRNA i proteïna) de les formes de GNAS1 entre les LCLs d'individus POH respecte les LCLs d'individus control. Tot i que el tipus cel·lular no és el més adequat per l'estudi de POH (no es disposa d'altres tipus cel·lulars), la recerca en LCLs ens ajudarà a entendre quines possibles diferències d'expressió de les formes de GNAS1 existeixen en individus afectats respecte individus no afectats.

Nesp55 no s'expressa en LCLs humanes

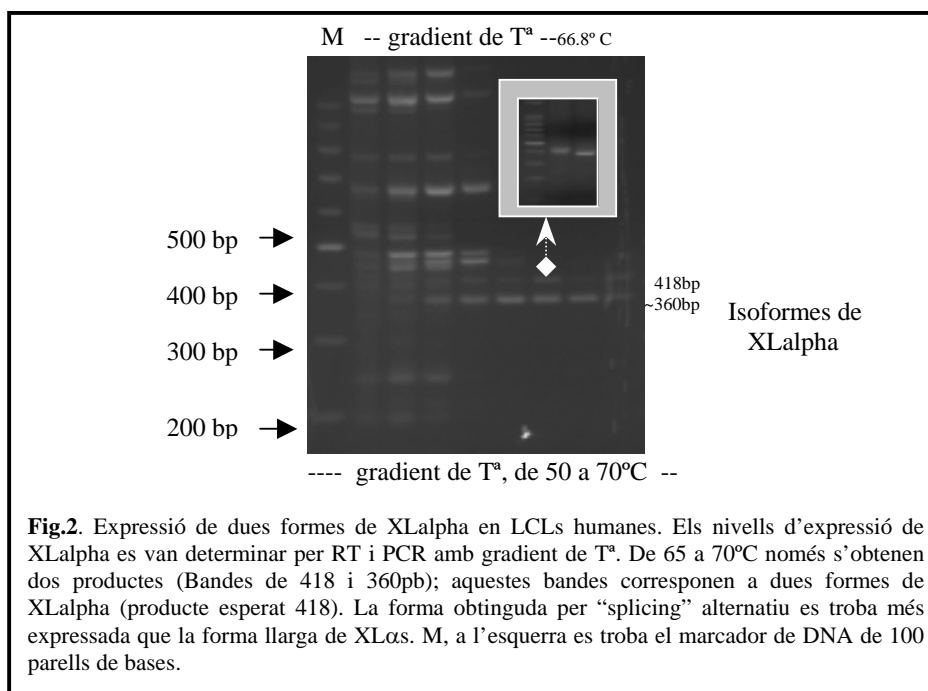
Els productes de les reaccions, utilitzant "primers" específics per Nesp55, es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 1.5% i es van tenyir amb bromur d'etidi.



A la fig.1 podem observar que el transcrit Nesp55 no es troba present en cèl·lules humanes ja que el producte esperat (615bp), corresponent a Nesp55, no apareix tot i l'ampli rang de condicions de magnesi i temperatura usat. No es va aplicar cap més PCR ("nested PCR") ja que el dos productes de PCR amplificats a 66.4° C no eren del tamany esperat.

Hi ha dues formes de Xlalpha en LCLs humanes

Els productes de les reaccions, utilitzant "primers" específics per XL α s, es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 2.5% i es van tenyir amb bromur d'etidi.



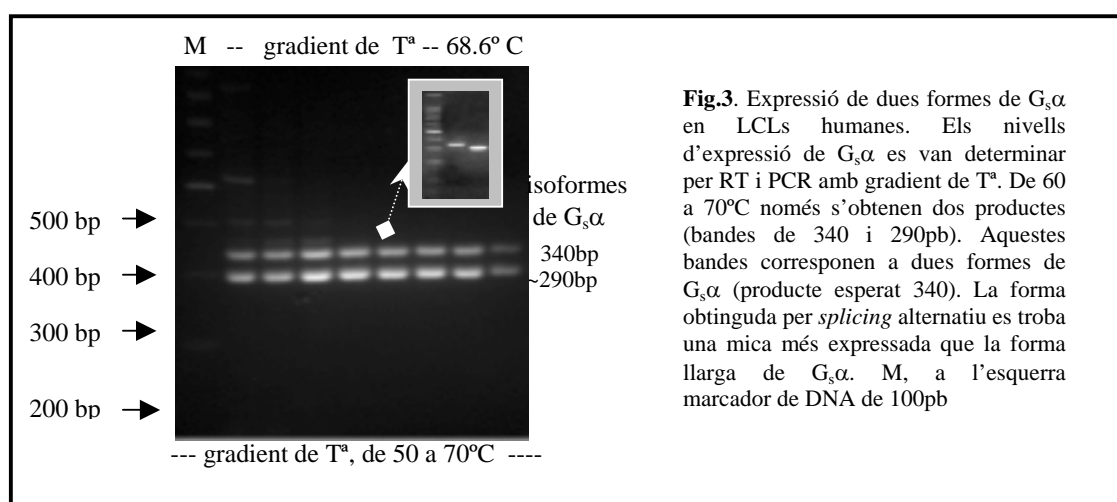
A la fig.2 s'observa que dues formes específiques de XLalpha s'expressen en LCLs humanes. Els "primers" per XLalpha són bastant específics a temperatures de 65 a 70°C. Es va dur a terme una "nested PCR" a 66.8°C (part superior dreta de la figura) per les dues formes de XLalpha i els productes reamplificats es van seqüenciar per confirmar la seva identitat. La forma obtinguda per "splicing" alternatiu amb més mobilitat electroforètica (~360) es troba més expressada que la forma major de XLalpha.

Les seqüències corresponien a dues formes humanes de XLalpha

Les seqüències es van analitzar en la base de dades: BLAST- PAIRWISE BLAST- BLAST 2 SEQUENCES, confirmant que les dues seqüències pertanyien a dues formes diferents de XLalpha.

En LCLs humanes s'expressen dues formes de G_sα

Els productes de les reaccions, utilitzant "primers" específics per G_sα, es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 2.5% i es van tenyir amb bromur d'etidi.



A la fig.3 s'observa que s'expressen dues formes de G_sα en LCLs humanes. Els "primers" per G_sα són bastant específics a temperatures de 60 a 70°C. Es va dur a terme "nested PCR" a 66.8°C (a dreta, part superior de la figura) per cada una de les formes de G_sα i els productes reamplificats es van seqüenciar per a confirmar la seva identitat. La forma obtinguda per "splicing" alternatiu de més mobilitat electroforètica (~290) es troba lleugerament més expressada que la forma llarga de G_sα.

Les seqüències corresponien a dues formes humanes de $G_s\alpha$

Per obtenir les corresponents seqüències, el productes reamplificats es van seqüènciar.

$G_s\alpha$

**ttcatcacactcagaatgtagtccactctgaactggttctcgggggttgccagctccacggggggcaccaggtgctcatg
gcgccacaatggttcaatcgctctttcaggttgttttgatgtctgcactttggtgccttctcagagggcggaaga
ggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggcntgctnctnctnaaacccattaacatgcaggatcct
cctctgctnaacaatggtgctttnacnanattctccaccnccagcagcagcngggcngngcgnnnccngannacct
nnttntctntgnannnnnnnn**

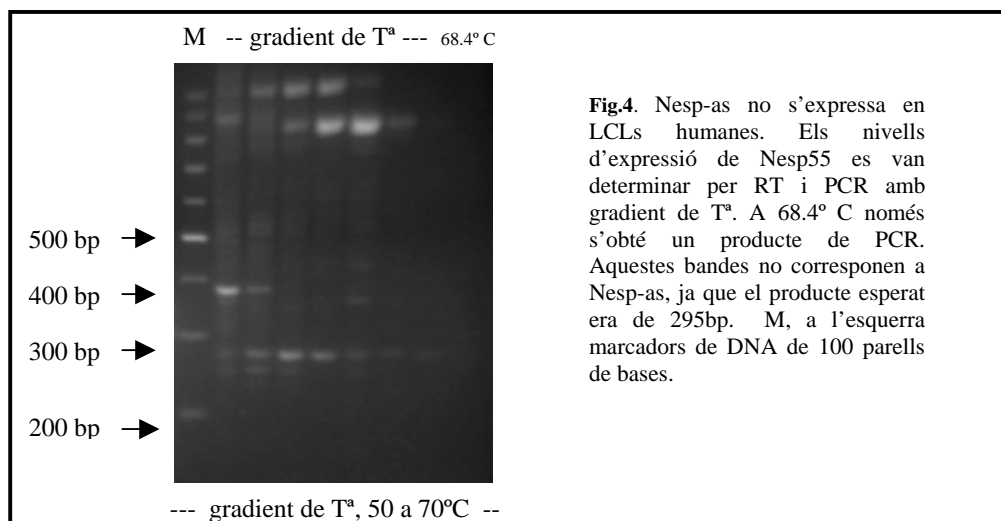
Forma de $G_s\alpha$ generada per “splicing” alternatiu

**ttcatcacactcagaatgtagtccactctgaactggttctcgggggttgccagctccacggggggcaccaggtgctcatg
gcgccacaatggttcaatcgctctttcaggttgttttgatgtctgcactttggtgccttctcantgctnctnaaaa
cccattaacatgcaggatcctctctgctnaacaatggtgctttnacnanattctccaccnccagcagcagcngggcgn
ngcgnnnccngannacctnnttntctntgnannnnnnnn**

Les seqüències es van analitzar a la base de dades, confirmant que les dues seqüències pertanyien a dues formes diferents de $G_s\alpha$. (ANNEX 5).

El transcrit Nesp-as no s'expressa en LCLs humanes

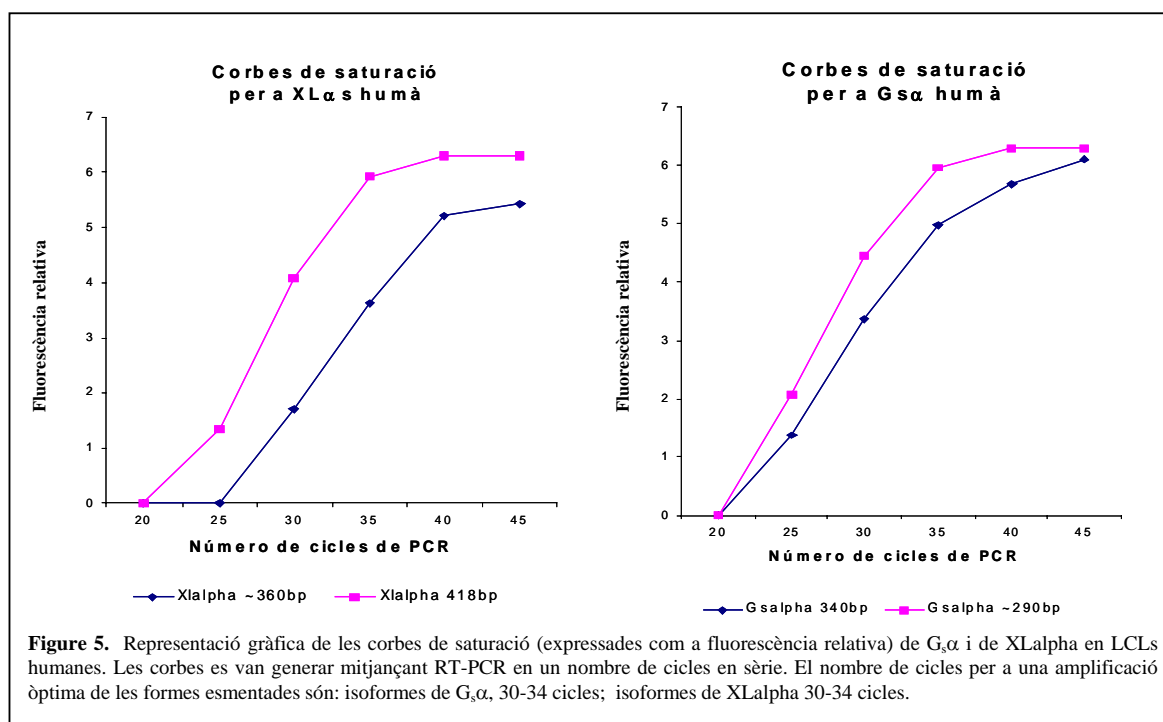
Els productes de les reaccions, utilitzant “primers” específics per Nesp-as, es van analitzar mitjançant electroforesi amb gel d'agarosa al 1.5% i es van tenyir amb bromur d'etidi.



A la fig.4 podem observar que el transcrit Nesp-as no es troba present en cèl·lules humanes ja que el producte esperat (295bp), corresponent a Nesp-as, no apareix tot i l'ampli rang de condicions de magnesi i temperatura usat. No es va aplicar "nested PCR" ja que el dos productes de PCR amplificats a 66.4° C no eren del tamany esperat.

Representació gràfica de les condicions cícliques per als transcrits XLalpha i G α en LCLs humanes.

Per a realitzar els experiments d'expressió gènica de les formes XLalpha i G α de GNAS1 en LCL humanes, es van haver de trobar les condicions d'amplificació òptimes per a cada un dels transcrits expressats en aquestes cèl·lules. Les corbes de saturació s'expressen com a fluorescència relativa.



A la fig.5 es troben representades les condicions òptimes per a una amplificació lineal òptima dels transcrits de XLalpha i G α . Totes les formes de G α s'amplifiquen linealment a 34 cicles. Cal notar que (a la dreta de la figura) G α (385bp), la forma més ubiqüament expressada, es troba lleugerament menys expressada que la forma G α generada per *splicing* alternatiu.

Com s'il·lustra a la fig.5, les formes de Xlalpha (a l'esquerra de la figura) tenen unes condicions d'amplificació diferents, la forma major de Xl α s està de 5 a 10 vegades més expressada que la forma reduïda de Xl α s. Ambdues s'amplifiquen linealment a 35 cicles.

Anàlisi dels nivells d'expressió basal dels transcrits humans Xl α s i G $_s$ α en dos POHs i tres controls

Cada mostra es va obtenir com s'ha descrit en materials i mètodes. Les mostres de PCR obtingudes amb "primers" específics per G $_s$ α i Xl α s es varen analitzar mitjançant electrofores i amb gel d'agarosa al 2.5% i tenyides amb bromur d'etidi.

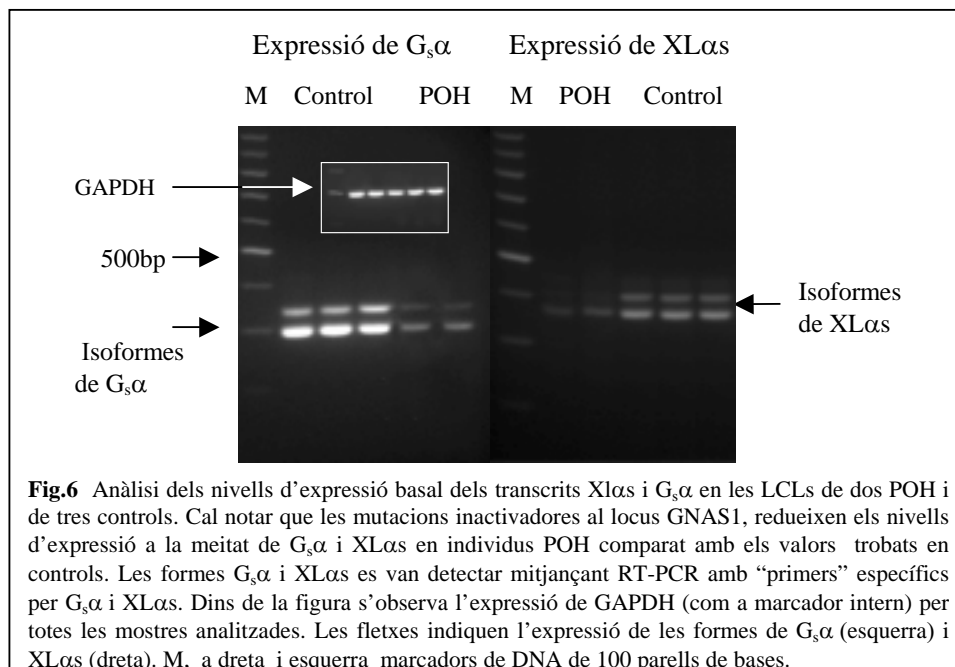
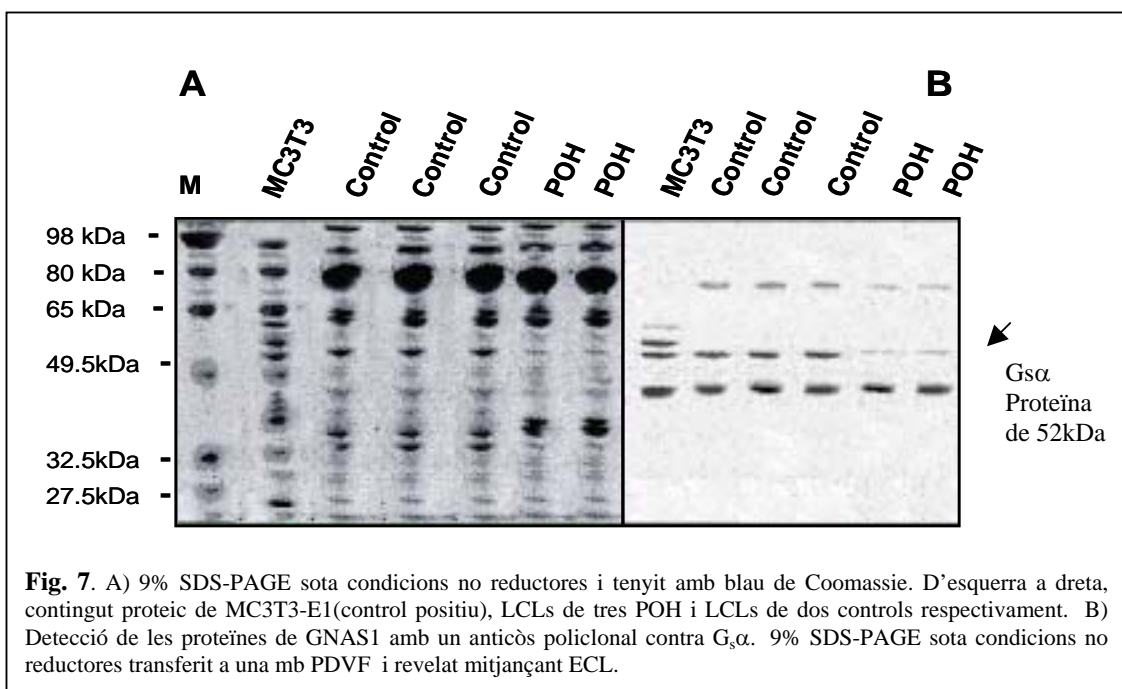


Fig.6 Anàlisi dels nivells d'expressió basal dels transcrits Xl α s i G $_s$ α en les LCLs de dos POH i de tres controls. Cal notar que les mutacions inactivadores al locus GNAS1, redueixen els nivells d'expressió a la meitat de G $_s$ α i Xl α s en individus POH comparat amb els valors trobats en controls. Les formes G $_s$ α i Xl α s es van detectar mitjançant RT-PCR amb "primers" específics per G $_s$ α i Xl α s. Dins de la figura s'observa l'expressió de GAPDH (com a marcador intern) per totes les mostres analitzades. Les fletxes indiquen l'expressió de les formes de G $_s$ α (esquerra) i Xl α s (dreta). M, a dreta i esquerra marcadors de DNA de 100 parells de bases.

L'expressió de Xl α s (dreta fig.6) i G $_s$ α (esquerra fig.6) es troba afectada per mutacions inactivadores en el locus GNAS1. Com es mostra a la figura 6, en individus afectats amb la POH, l'expressió de totes les formes presents en LCLs humanes, es troba reduïda a la meitat respecte a als valors trobats en LCLs controls. Aquests resultats són importants ja que la reducció de transcrits de GNAS1 suggereix que la no expressió de l'al·lel mutat pot tenir profundes implicacions en el manteniment de cèl·lules pluripotents en el seu estat cel·lular.

Anàlisi de l'expressió de la proteïna $G_s\alpha$ humana en dos individus amb POH i tres controls usant un anticòs policlonal contra $G_s\alpha$

L'expressió de $G_s\alpha$ es va analitzar en LCLs humanes de tres POH i dos controls. Les bandes de proteïnes, varen ser analitzades mitjançant 9 % SDS-PAGE i western blot amb l'ús d'un anticòs específic contra $G_s\alpha$.



La fig.7 mostra l'anàlisi de l'expressió de la proteïna de $G_s\alpha$, en tres LCLs controls i dos LCLs POH. Els nivells d'expressió de la forma més abundant de $G_s\alpha$ (fletxa) es troben reduïts a la meitat en individus POH respecte als valors de les LCLs d'individus control. A nivell proteic només observem la forma llarga (~52kda) de $G_s\alpha$; l'altra isoforma de $G_s\alpha$, observada mitjançant expressió gènica, podria ser que no fos reconeguda per l'anticòs utilitzat. La informació codificada per l'exó 3 podria ser essencial en la conformació estructural que reconeix l'anticòs policlonal contra $G_s\alpha$. Aquests resultats juntament amb els resultats obtinguts amb l'anàlisi d'expressió gènica dels diferents transcrits de GNAS1, suggereixen que les mutacions inactivadores de

GNAS1 afecten de forma similar tant els nivells dels mRNAs com els nivells de proteïnes funcionals dels diferents transcrits de $G_s\alpha$, les quals poden tenir les mateixes conseqüències per a totes les formes del gen GNAS1.

També cal comentar que l'anticòs policlonal contra $G_s\alpha$ té reacció creuada amb múltiples proteïnes presents en el contingut proteic de les MC3T3-E1 de ratolí. Com s'ha demostrat amb l'anàlisi d'expressió gènica, hi ha múltiples formes del gen gnas presents en aquestes cèl·lules. Les bandes no específiques que s'observen podrien ser degudes al reconeixement de l'anticòs d'algunes de les possibles formes de GNAS1/gnas o senzillament qualsevol proteïna amb un domini estructural similar al reconegut per l'anticòs anti- $G_s\alpha$. A la part superior de la membrana s'observa una banda que és present en totes les LCLs analitzades però que no s'observa en les cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí.

Aquesta banda, en individus POH, té valors reduïts comparats amb els dels LCLs control. Tot i no saber l'origen concret d'aquesta banda, pensem que es podria tractar de la forma llarga de XLalpha (78kDa). En LCLs humanes s'expressen dues formes d'XL α s, en canvi, en cèl·lules MC3T3-E1 no se n'expressa cap. De nou, la isoforma generada per "splicing" no seria detectada per l'anticòs policlonal. Encara que les isoformes de GNAS/gnas comparteixen molts exons "downstream", no podem concloure que el senyal observat a la part superior del gel, correspongui a alguna de les formes de XLalpha ja que l'anticòs usat era específic per $G_s\alpha$.

Discussió

Durant la passada dècada, les proteïnes G van ser l'objectiu d'una intensa investigació com a base d'estudi d'algunes malalties humanes (*Farfel et al., 1996; Juppner et al., 1999; Liu et al., 2000; Stewler et al., 1999, Shore et al., 2002*). Quatre malalties, com a mínim, amb característiques de desregulació osteogènica estan associades a mutacions de línia germinal o somàtiques del gen GNAS1. Aquestes són: la síndrome de McCune-Albright (MAS), mutació somàtica activadora; l'osteodistròfia hereditària d'Albright (AHO), el plate-like osteoma cutis (POC), i l'heteroplàsia òssia progressiva (POH), mutacions inactivadores de la línia germinal (*Shore et al., 1999-2002; Farfel et al., 1996; Juppner et al., 1999*).

Cal d'estacar que s'han observat diversos "Hot spots" (àrees mutacionals d'elevada freqüència) en aquestes patologies (*Weinstein et al., 1992, Micheala et al., 2000*). Aquestes observacions suggereixen que AHO, POC, MAS i POH són part de l'espectre fenotípic de les malalties clíniques que estan causades per mutacions en el gen GNAS1. Les proteïnes G intervenen en moltes rutes de transducció del senyal (*Ringel et al., 1996, Weinstein et al., 1992, Farfel et al., 1999*). Malgrat que les rutes de transducció específiques per a la formació d'os, regulades per proteïnes G, estan per descobrir, s'han identificat diversos agonistes de receptors acoblats a proteïnes G incloent PTH, "PTH-related protein" (PTHrP), prostaglandines i fluorur de sodi (*Ringel et al., 1996; Quarless et al., 1996*). Com a exemple d'això, l'estimulació de PTHrP mitjançant "indian hedgehog (Ihh)" a la placa de creixement d'ossos llargs en el desenvolupament regula la maduració dels condrocits i l'ossificació (*Vortkamp et al., 1996*).

A la síndrome de McCune-Albright, les mutacions somàtiques activadores del gen GNAS1, les quals resulten en una sobreestimulació de l'activitat de $G_s\alpha$, condueixen a una aturada en la maduració dels osteoblasts, desencadenant una displàsia fibrosa d'os en l'esquelet normotòpic. (*Bianco et al., 1998*). Per contra, les mutacions inactivadores del gen GNAS1 en pacients amb AHO o POC porten a una reduïda estimulació de les rutes activades per $G_s\alpha$, conduint a una ossificació heterotòpica dels teixits conjuntius tous

(Shore *et al* 2001). Aquests resultats, en general, suggereixen que el gen GNAS1 normalment pot funcionar com a regulador negatiu de l'especificitat osteoblàstica.

Tot i que el tipus cel·lular no és el més adequat per estudiar la POH, l'oportunitat d'usar LCLs humanes per a l'anàlisi dels nivells basals dels mRNAs i/o proteïna dels diferents transcrits del gen GNAS1 representa una ocasió única per entendre en més detall la patogènesi de POH i de malalties congènites relacionades. Tenint en compte aquest fet, es van provar en LCLs humanes "primers" específics per a totes les formes de GNAS1, dissenyats usant la mateixa estratègia que la utilitzada en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí. Es trobà que Nesp55 i Nesp-as humà no s'expressen en aquestes cèl·lules.

Aquests resultats juntament amb els observats en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí concorda amb allò publicat per *Tao li et al., 2000*, on s'observa que la regió de Nesp55 es manté estrictament imprintada en teixits que no presenten Nesp-as. En canvi, les dues isoformes de $G_s\alpha$ i de XLalpha s'expressen en LCLs humanes. L'expressió de $G_s\alpha$ i XLalpha en cèl·lules LCLs humanes no és estranya ja que P2 i P3 tenen una expressió més ubiqüa que les altres formes de GNAS1 (*Tao li et al., 2000*). Cal comentar que l'expressió de XLalpha en aquestes cèl·lules va ser totalment inesperada ja que tal forma no s'expressa en cèl·lules MC3T3-E1. Les funcions que aquestes formes de GNAS1 fan en aquests tipus cel·lular no es coneixen. El que sembla clar és que pel bon funcionament de les LCLs humanes ni Nesp55 ni Nesp-as són necessàries. La regulació del gen GNAS1/gnas a nivell cel·lular pot diferir depenent del grau de potencialitat (*Nuttall et al., 2000*).

En LCLs humanes les diferents formes de $G_s\alpha$ i XLalpha possiblement contribueixen a mantenir els "downstream signals" de forma distinta ja que algunes de les formes estan més expressades que d'altres. Aquesta abundància relativa podria tenir implicacions fenotípiques cel·lulars tant en LCLs humanes com també en altres tipus cel·lulars (*Tao li et al., 2000; Hayward et al., 2001*).

L'estudi es va estendre al comparar els nivells dels mRNAs i proteïna entre les LCLs d'individus afectats amb POH i les LCLs d'individus no afectats, trobant que en individus POH tant els nivells dels mRNAs com els proteïcs es troben reduïts a la meitat respecte als controls. Només es van detectar els mRNAs de les isoformes que s'expressen a partir de l'al·lel normal. Tot i així, a nivell proteic, tant sols es va detectar $G_s\alpha$ expressada a partir de l'al·lel normal. La lesió genètica en els individus analitzats té un efecte similar en totes les formes expressades.

En realitat, els nivells de proteïna corresponents a XLalpha no varen poder ser confirmats amb exactitud. L'anticòs policlonal contra $G_s\alpha$ va reaccionar creuadament amb una banda d'aproximadament 75 kda de pes molecular que podria correspondre a alguna de les formes de XLalpha (*Kehlenbach et al., 1994*). Així doncs, la manca d'especificitat de l'anticòs utilitzat podria haver proporcionat resultats ambigus. Una explicació possible pels resultats obtinguts seria que els mRNAs mutants de GNAS1 probablement no són sintetitzats o són degradats ràpidament (*Culbertson et al., 1999*); a més, cal dir que els passos de processament involucrats en la generació de les diferents isoformes del gen GNAS1 semblen no estar afectats per les mutacions en aquest locus (*Robishaw et al., 1986*).

Aquests resultats són molt importants pel fet que reduccions a la meitat de les formes de GNAS1 en individus POH, podrien afectar, d'alguna manera, a la predisposició de les cèl·lules mesenquimàtiques mare o adipòcits a començar el programa osteogènic en llocs heterotòpics (*Hayward et al., 2000; Lalande, 2001*).

En resum, aquests resultats ens permeten postular que la reducció en l'expressió d'algunes de les formes de GNAS1, en individus afectats amb la POH, podrien estar afectant directament els senyals "downstream" que activen el programa osteogènic. Les mutacions inactivadores, com les trobades en AHO, POC i POH s'espera que produeixin, en tipus cel·lulars específics, valors reduïts de les diferents proteïnes del gen GNAS1, essent aquests insuficients per a mantenir un fre a la inducció osteoblàstica en llocs ectòpics.

3.5 Part II: Discussió final

Les proteïnes heterotrimèriques transductores de senyal que s'uneixen als nucleòtids de guanina (proteïnes G), participen en l'acoplament dels receptors extracel·lulars als enzims efectors intracel·lulars i als canals iònics, servint com a mediadors de les respostes cel·lulars als estímuls externs. Les proteïnes G regulen molts sistemes de segons missatgers, incloent enzims com l'adenilat ciclase (AC), la fosfolipasa C (PLC) i la fosfolipasa A2 i també canals iònics (*Farfel et al., 1996; Birnbaumer et al., 1990; Quarless et al., 1996; Uingset et al., 2000*).

El GNAS1 és un dels pocs gens en el quals s'hi ha caracteritzat mutacions activadores i inactivadores (*Micheala et al., 2000*). Ubicat en el cromosoma 20q13, el GNAS1 va ser originalment descrit com un gen compost de 13 exons, el qual codifica per $G_s\alpha$, la subunitat- α de les proteïnes G estimuladores heterotrimèriques Gs (*Kozasa et al., 1988*). Recentment s'han identificat exons addicionals i ha quedat palès que GNAS1 és un locus complex que codifica múltiples transcrits sobreposats (*Hayward et al., 1998a, b; Hayward et al., 2000; Hayward et al., 2001*). D'aquests, $G_s\alpha$ és el més ben caracteritzat i el de més rellevància clínica (*Farfel et al., 1996; Juppner et al., 1999; Liu et al., 2000; Stewler et al., 1999; Shore et al., 2002*). Existeixen quatre transcrits primaris de $G_s\alpha$ que resulten de l'efecte combinatori de dos processos d'*splicing* alternatiu (*Bray et al., 1986; Kozasa et al., 1988*). El mecanisme d'*splicing* pot també estar afectant, de la mateixa manera, els nous exons identificats en el locus de GNAS1/gnas, convertint aquest locus en una àrea genòmica on es generen gran nombre de processos transcripcionals, sempre sota les necessitats cel·lulars específiques.

En els últims anys, les proteïnes G han estat l'objectiu d'una intensa investigació com a base d'estudi d'algunes malalties humanes (*Farfel et al., 1996; Juppner et al., 1999; Liu et al., 2000; Stewler et al. 1999; Shore et al., 2002*). Com a mínim, quatre condicions amb característiques de desregulació osteogènica estan associades a mutacions de la línia germinal o somàtiques de GNAS1. Aquestes són: AHO, POC, MAS i POH (mutacions inactivadores de la línia germinal) (*Shore et al., 1999-2002; Farfel et al., 1996; Juppner*

et al., 1999). Cal destacar que s'han observat diversos "Hot spots" (àrees mutacionals d'elevada freqüència) en aquestes patologies (*Weinstein et al.*, 1992, *Micheala et al.*, 2000). Aquestes observacions suggereixen que aquestes condicions patològiques són part de l'espectre fenotípic de les malalties clíniques que estan causades per mutacions en el gen GNAS1. Les proteïnes G intervenen en moltes rutes de transducció del senyal (*Ringel et al.*, 1996; *Weinstein et al.*, 1992; *Farfel et al.*, 1999). Malgrat que les rutes de transducció específiques per a la formació d'os, regulades per proteïnes G, han de ser encara classificades, s'han identificat diversos agonistes de receptors acoblats a proteïnes G incloent PTH, "PTH-related protein" (PTHrP), prostaglandines i fluorur de sodi (*Ringel et al.*, 1996; *Quarless et al.*, 1996). Com a exemple d'això, l'estimulació de PTHrP mitjançant indian hedgehog (Ihh) en la placa de creixement d'ossos llargs en el desenvolupament regula la maduració dels condrocits i l'ossificació (*Vortkamp et al.*, 1996).

En la síndrome de McCune-Albright, les mutacions somàtiques activadores del gen GNAS1, les quals resulten en una sobreestimulació de l'activitat de $G_s\alpha$, condueixen a una aturada en la maduració dels osteoblasts, desencadenant una displàsia fibrosa d'os en l'esquelet normotòpic. (*Bianco et al.*, 1998). Per contra, les mutacions inactivadores del gen GNAS1 en pacients amb AHO o POC porten a una estimulació menys intensa de les rutes activades per $G_s\alpha$, conduint a una ossificació heterotòpica dels teixits conjuntius tous (*Shore et al.*, 2001). Aquests resultats, en general, suggereixen que el gen GNAS1 normalment pot funcionar com a regulador negatiu de l'especificitat osteoblàstica.

En aquest estudi s'han tractat les conseqüències que les mutacions en els exons 1–13 del gen GNAS1 poden provocar en el procés d'osteogènesi. S'ha plantejat la hipòtesi que les mutacions heterozigòtiques inactivadores del gen GNAS1, mitjançant una reducció funcional dels mRNAs i/o proteïnes $G_s\alpha$, alterin rutes de transducció cel·lular de senyal implicades en la diferenciació osteoblàstica i/o adipocítica. El treball experimental s'ha desenvolupat en dos models cel·lulars ben establerts: una línia cel·lular preosteoblàstica de ratolí (MC3T3-E1) i una línia cel·lular limfoblastoid humana (LCL).

La línia MC3T3-E1 s'ha utilitzat com a possible model cel·lular per estudiar la funció dels diferents transcrits del gen "gnas" en el procés de diferenciació a osteoblast (*Tori et al., 1991*); la línia limfoblastoid humana es va utilitzar per a estudiar l'expressió dels transcrits de GNAS1 en aquestes cèl·lules i analitzar l'efecte que mutacions inactivadores de GNAS1 poden tenir en l'expressió dels múltiples transcrits de GNAS1 en LCLs d'individus afectats amb POH (*Shore et al., 2001*). Tot i que el tipus cel·lular no és el més adequat per a estudiar la POH, l'oportunitat d'usar LCLs humanes per analitzar els nivells basals dels mRNAs i proteïna dels diferents transcrits del gen GNAS1, representà una ocasió única per entendre més bé la patogènesi de la POH i de les malalties congènites relacionades. Es comprovà que les cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1, després d'induir-les amb àcid ascòrbic, β -glycerol fosfat i BMP-2 exògena (*Torii et al., 1991*) durant un període de 28 dies, es diferencien selectivament cap a osteoblasts. Tots els transcrits del gen "gnas" coneguts fins al moment es van analitzar en cèl·lules MC3T3-E1 induïdes amb suplementos osteogènics, trobant que l'antisentit, Nesp55, ambdues isoformes de $G_s\alpha$ i una nova isoforma de $G_s\alpha$ s'expressen en les cèl·lules preosteoblàstiques, mentre que les isoformes de XLalpha no presenten expressió.

En aquest treball, es demostra per primera vegada l'expressió específica de teixit de Nesp55, Nesp-as i tres isoformes de $G_s\alpha$ en cèl·lules MC3T3-E1 preosteoblàstiques. En altres teixits, *Tao li et al., 2001* ja han demostrat que els transcrits que provenen de P1(Nesp55) són més abundants en el CNS, específicament en medul·la. En canvi, els transcrits de P2 (XLalpha) i P3 ($G_s\alpha$) es troben ubiquament expressats. Nesp-as es troba present en la melsa, la glàndula suprarenal i el còrtex cerebral (*Tao li et al., 2000*). El més sorprenent ha estat la detecció en cèl·lules MC3T3-E1 d'una forma major de $G_s\alpha$, mai detectada en un altre tipus cel·lular o teixit amb una expressió basal semblant a la isoforma de $G_s\alpha$ generada per *splicing* alternatiu. Aquesta observació suggereix que la unitat transcripcional de gnas/GNAS1 és més complexa del que es creia (*Hayward et al., 1998a and b; Hayward et al., 2000; Hayward et al., 2001*) i que la l'existència de més processos d'*splicing* alternatiu per poder generar més formes de GNAS1/gnas és molt probable. Així les cèl·lules disposarien d'una fina maquinària de regulació dels "downstream signals" que dirigeixen cèl·lules pluripotents a llinatges cel·lulars

específics. L'obtenció de resultats positius en alguns dels transcrits de Gnas en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 ens han encoratjat a intentar comprendre amb més detall la regulació del seu mecanisme. S'han utilitzat tècniques d'anàlisis d'expressió gènica per a analitzar la contribució que les diferents isoformes de "gnas" poden tenir quan les cèl·lules MC3T3-E1 s'han orientat cap a un fenotip osteogènic.

Transcrits GNAS1/gnas	MC3T3-E1 de ratolí			LCLs humanes	
	Isoforma	Expressió basal	Estimulació amb SO	Expressió en LCLs control	Expressió en LCLs FOP
G_sα	1	+	▼ fins a valors no detectables	-	-
	2	+	+	+	1/2
	3	+	▲ progressivament	+	1/2
XLalpha	1	-	-	+	1/2
	2	-	▲ progressivament	+	1/2
Nesp55	1	+	▼ fins a valors no detectables	-	-
Nesp-as	1	+	▲ progressivament	-	-

Taula.1. Resum de l'expressió de les formes de Gnas/GNAS1 tant en cèl·lules preosteoblàstiques de ratolí com en limfoblastoids humans. Els números indiquen les diferents isoformes existents per cada un dels promotors de GNAS1, 1-3: de formes majors a formes reduïdes respectivament, SO (suplements osteogènics).

Els resultats obtinguts en experiments preliminars demostren l'existència de variacions en l'expressió d'algunes de les formes de gnas de ratolí generades per *splicing* alternatiu. Aquestes observacions indiquen que Nesp55 i la nova isoforma de G_sα redueixen els nivells d'expressió fins a valors marginals no detectables coincidint amb una diferenciació més osteogènica, mentre que l'antisentit, la isoforma de G_sα amb l'exó 3 exclòs i XLalpha (no detectada en cèl·lules MC3T3-E1 control) augmenten l'expressió progressivament en resposta a un fenotip més osteogènic. Per contra, la forma de G_sα, més expressada i estudiada (*Farfel et al.1996; Birnbaumer et al 1990*) no experimenta cap canvi significatiu respecte de les cèl·lules no estimulades (taula.1).

La reducció de Nesp55, paral·lela a un increment de Nesp-as, coincideix amb l'observat per *Tao li et al., 2000*, en el sentit que els teixits on Nesp-as és molt abundant la transcripció de la regió de Nesp55 és negligible. L'activació i inactivació d'algunes de

les formes de gnas en el procés de mineralització observat en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí aporta evidència de com el procés d'osteogènesi pot ésser regulat.

Paral·lelament dins el mateix estudi, s'ha analitzat l'expressió de les isoformes conegudes de GNAS1 en cèl·lules limfoblastoids, trobant que Nesp55 i Nesp-as humà no s'expressen en aquestes cèl·lules. Aquests resultats juntament amb el que s'ha observat en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí justifica el publicat per *Tao li et al., 2000*, on s'observa que la regió de Nesp55 es manté estrictament imprintada en teixits que no presenten Nesp-as. En canvi, dues isoformes de G_sα i d'XLalpha s'expressen en LCLs humanes. L'expressió de G_sα i XLalpha en cèl·lules LCLs humanes no és estranya ja que P2 i P3 tenen una expressió més ubiqüa que les altres formes del gen GNAS1 (*Tao li et al., 2000*). La regulació del gen GNAS1/gnas a nivell cel·lular pot diferir depenent del grau de potencialitat. Com més gran sigui la plasticitat de la cèl·lula en diferenciar-se cap a altres tipus cel·lulars més estrictament regulada pot estar la unitat de transcripcional de GNAS1 per així evitar llinatges no desitjats (*Nuttall et al., 2000*).

Tal com s'ha demostrat, en cèl·lules menys diferenciades hi ha més activitat transcripcional del locus GNAS1 i la reducció d'aquesta activitat sembla estar directament correlacionada amb un estat més diferenciat de les cèl·lules. En LCLs humanes les diferents formes de G_sα i XLalpha podrien contribuir a mantenir els "downstream signals" de forma diferent ja que, com s'ha observat, algunes de les isoformes es troben més expressades que d'altres. Aquesta abundància relativa podria tenir implicacions fenotípiques cel·lulars tant en LCLs humanes com en altres tipus cel·lulars (*Tao li et al., 2000; Hayward et al., 2001*). L'estudi es va estendre per a comparar els nivells dels mRNAs i proteïna entre LCLs d'individus afectats amb la POH i LCLs d'individus sans, trobant que en individus POH tant els nivells dels mRNAs com els de proteïna estan reduïts a la meitat comparat amb els valors trobats en les LCLs controls.

Només s'han pogut detectar els mRNAs de les formes de GNAS1 i la proteïna funcional de G_sα expressades a partir de l'al·lel normal. La lesió genètica en els individus

analitzats té un efecte similar en totes les formes expressades. Una explicació dels resultats obtinguts seria que els mRNAs mutants de GNAS1 probablement no són sintetitzats o són degradats ràpidament (*Culbertson et al., 1999*). A més, cal dir, que els passos de processament involucrats en la generació de les diferents isoformes del gen GNAS1 semblen no estar afectats per les mutacions en aquest locus (*Robishaw et al., 1986*). Aquests resultats són molt importants ja que les reduccions a la meitat de les formes de GNAS1, en individus amb la POH, podrien afectar d'alguna manera a la predisposició de les cèl·lules a començar el programa osteogènic.

La no expressió d'algunes de les formes de GNAS1 heretades per part de pare o mare mitjançant "imprinting" podria també resultar en manca o reducció fins a la meitat d'algunes de les isoformes que són essencials per a mantenir cèl·lules pluripotents en el seu estat cel·lular (*Lalande, 2001*). En alguns teixits s'ha observat que XLalpha i l'antisentit es transcriuen de l'al·lel patern (*Hayward et al., 2000*). En canvi Nesp55 es transcriu només de l'al·lel matern (*Hayward., 2000; Hayward et al., 1998a; Hayward et al., 1998b, Peters et al., 1999; Wroe et al., 2000; Yu et al., 1998*). Malgrat que se sap que $G_s\alpha$ deriva d'ambdós al·lells (*Hayward et al., 1998a*), sembla que $G_s\alpha$ estaria imprintat (de forma teixit-específic) en algunes cèl·lules. Per exemple, s'ha demostrat els túbuls proximals de la glàndula suprarenal l'existència de la transcripció específica de $G_s\alpha$ provinent de l'al·lel matern (*Yu et al., 1998*).

Els efectes combinatoris d'una variabilitat d'expressió dels transcrits de GNAS1, sumats a una reducció provocada per mutacions inactivadores heretades per part de pare o mare, podrien estar directament relacionats en l'activació de les rutes de transducció de senyal que desencadenen la formació ectòpica d'os en individus amb POH (*Bartolomei and Tilghman, 1997*). La resolució dels efectes d'imprinting en cèl·lules mare mesenquimàtiques o altres cèl·lules pluripotents pot ajudar-nos a entendre la gènesi de desordres genètics de formació ectòpica d'os afectats per mutacions inactivadores de GNAS1.

Com a resum, en aquests estudi s'ha demostrat que existeixen múltiples formes del gen *GNAS1*/*gnas* que s'expressen en cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí i també en LCLs humanes. Quan les cèl·lules s'orienten cap a un llinatge osteogènic, s'observen notables diferències en l'expressió dels transcrits de *gnas*. La inhibició de les isoformes *Nesp55* i de la nova forma de $G_s\alpha$ i una activació progressiva de les isoformes *XLalpha*, *antisentit* i $G_s\alpha$ amb l'exó 3 exclòs, en conjunt, pot proporcionar un mecanisme coordinat que involucri la unitat transcripcional de *gnas* en el procés de diferenciació osteogènica de les cèl·lules pluripotents, suggerint que la predisposició de hMCS a dirigir-se a llinatges osteogènics o adipogènics està governada per múltiples interaccions entre els diferents transcrits de *gnas*. A més, els nostres resultats indiquen que els nivells reduïts fins a la meitat en individus POH podrien influir en processos "downstream" que condueixen a un fenotip osteogènic competent.

Les funcions que exerceixen les isoformes de *gnas* en aquestes cèl·lules està per elucidar però és força probable que estiguin implicades en els processos moleculars que regulen la predisposició de les cèl·lules pluripotents a diferenciar-se cap a un fenotip osteogènic. Les mutacions inactivadores, com les trobades en AHO, POC i POH, s'espera que produeixin valors reduïts de les diferents proteïnes de *GNAS1* en tipus cel·lulars específics que podrien ser insuficients per a mantenir un fre a la inducció cel·lular cap a una diferenciació osteoblàstica en lloc ectòpics.

Perspectives futures

Els resultats descrits anteriorment aporten informació valuosa en la recerca de POH com també dels processos moleculars implicats en la regulació de la osteogènesi. Futurs experiments, en aquesta àrea de recerca, es centraran en l'ús d'un ratolí transgènic "knockout" per GNAS1, que ja ha estat establert i desenvolupat per el Dr. Michael Levine (Johns Hopkins University School of Medicine, U.S.A). En els heterozigots "knockout", un del dos al·lels de GNAS1 conté una delecció en l'exó 2 de GNAS1. Aquesta mutació afecta l'expressió dels transcrits de $G_s\alpha$, XL α s i Nesp55. Aquest model proporciona un sistema experimental adequat per a examinar els mecanismes moleculars alterats per l'efecte d'una disminució en l'expressió de les formes de GNAS1 que es dona en condicions patològiques com POH, AHO o altres relacionades. En concret es podrien estudiar:

- 1. Els efectes de mutacions heterozigòtiques de GNAS1 en la diferenciació osteoblàstica o adipogènica.*
- 2. L'expressió diferencial dels mRNAs de GNAS1 durant la diferenciació osteoblàstica i adipocítica.*
- 3. Els efectes que l'herència materna/paterna de mutacions inactivadores heterozigòtiques de GNAS1 pot tenir en la diferenciació osteoblàstica i adipocítica: Si l'imprinting genòmic de GNAS1 no influeix en l'expressió dels transcrits en la diferenciació osteoblàstica i adipogènica, no s'esperen tampoc diferències en l'expressió d'aquests transcrits en mutacions inactivadores de GNAS1 que hagin estat heretades únicament de forma paterna o materna.*

L'èxit en futurs treballs dependrà del model cel·lular escollit. Si hi ha absència de diferències entre les cèl·lules control i cèl·lules "knockout" pot ser degut a que els efectes de GNAS1 en la diferenciació cel·lular només s'aprecien en cèl·lules molt específiques. En els POH, la formació ectòpica d'os sorgeix de greix subcutani, suggerint que les

cèl·lules mare mesenquimàtiques o els adipòcits són possiblement els tipus cel·lulars implicats en desencadenar la formació d'os ectòpica en llocs heterotòpics. La resolució d'aquests experiments oferiran una base sòlida per a l'anàlisi dels camins moleculars a través dels quals GNAS1 regula l'osteogènesi.

La importància i implicacions que té entendre la causa de POH i l'ús d'aquest coneixement per a crear tractaments efectius és evident per als individus afectats de POH. Addicionalment, la importància que POH té per la medicina i la ciència és molt més gran que la raresa de la condició pot indicar. El desxiframent de la complexa patogènesi de POH i la elucidació de les rutes cel·lulars i bases moleculars d'expressió gènica implicades en dirigir la transformació de cèl·lules precursoras en os, permetrà que condicions més comunes d'osteogènesi siguin compreses i tractades.

4. DISCUSSIÓ FINAL I CONCLUSIONS

L'esquelet està format per dos teixits, el cartílag i l'os, presentant tres tipus cel·lulars, els condrocits al cartílag, els osteoblasts i els osteoclasts a l'os. Durant els últims 10 anys la biologia del desenvolupament de l'esquelet s'ha centrat en el control genètic de la formació estructural de l'esquelet, que és el resultat de la presència de tots els elements esquelètics i alhora, d'una adequada distribució de cartílag i os en aquests elements. Mitjançant mètodes genètics s'han identificat molts gens que codifiquen per factors de creixement i per factors de transcripció els quals controlen la formació de l'esquelet (*Cohn et al., 1996; Hogan et al., 1996, Tabin et al., 1991*).

Fa poc temps s'han començat a comprendre les bases genètiques i moleculars de la diferenciació als llinatges dels condrocits, osteoblasts i osteoclasts. La primera etapa en el procés d'esqueletogènesi és la migració de les cèl·lules mesenquimàtiques a àrees destinades a esdevenir os. Aquestes cèl·lules formen condensacions que adopten ja la forma dels elements esquelètics futurs. Les condensacions cel·lulars poden evolucionar cap a dues vies diferents de formació en el procés d'esqueletogènesi: a) ossificació endocondral, que presenta els següents passos: condrogènesi, hipertròfia del cartílag, degradació i substitució final per os; b) ossificació intramembranosa, que té lloc en alguns ossos cranials i clavícula, i on cèl·lules mesenquimàtiques es concentren, el teixit es vascularitza i les cèl·lules es diferencien directament a osteoblasts (*Thorogood et al., 1993*). (Fig.1 de la introducció general).

Resultats recents d'altres autors semblen indicar la presència de com a mínim tres categories de cèl·lules mare en animals postnatsals, entre ells, els humans (*Young et al 2001, Zuk et al., 2001*). Aquestes tres categories són: cèl·lules mare progenitores de reserva, cèl·lules mare mesenquimàtiques pluripotents de reserva (PPMSCs) i cèl·lules mare "epiblastic-like" pluripotents de reserva (PELSCs). Totes elles es troben ubicades a les diferents localitzacions del teixit conjuntiu del cos, com per exemple a la musculatura esquelètica, a la dermis, als tendons, als lligaments, als ossos, als vasos sanguinis, a la medul·la òssia, al cervell, a la melsa, al fetge, als ronyons, etc..

Les cèl·lules mare progenitores de reserva estan destinades a un llinatge específic de teixit. Les cèl·lules mare mesenquimàtiques pluripotents de reserva (PPMSCs) estan destinades a diferenciar-se cap a totes les línies cel·lulars de la línia germinal mesodèrmica (*Young et al., 2001*). Per exemple, s'ha demostrat que una població monoclonal de PPMSCs de reserva, derivada d'una única cèl·lula, pot generar musculatura esquelètica, musculatura cardíaca, greix, cartílag hialí, cartílag elàstic, fibrocartílag, cartílag de la placa de creixement, cartílag articulat, os endocondral, os intramenbranós, etc..

Les PPMSCs de reserva són insensibles als agents de progressió, però sí que responen als factors que indueixen la diferenciació cap a un llinatge particular de teixit mesodèrmic, com pugui ser la inducció mitjançant les BMPs. Un cop les PPMSCs de reserva estan destinades cap a un determinat llinatge, assumeixen les característiques de les cèl·lules mare progenitores de reserva. Les cèl·lules mare “epiblastic-like” pluripotents de reserva (PPELSCs) estan destinades a generar tots els tipus cel·lulars dins de les línies germinals ectodèrmiques, mesodèrmiques i endodèrmiques (*Young et al., 2001*). Per al llinatge mesodèrmic, aquestes cèl·lules poden formar musculatura esquelètica, musculatura cardíaca, greix, cartílag hialí, cartílag elàstic, fibrocartílag, cartílag de la placa de creixement, cartílag articulat, os endocondral, os intramenbranós, etc.. Les PPELSCs de reserva són insensibles als agents progressius però responen als factors que indueixen la diferenciació a llinatges cel·lulars o teixits específics de les capes germinals ectodèrmiques, mesodèrmiques i endodèrmiques.

Quan les PPELCS de reserva es van diferenciant cap a un teixit o llinatge particular, assumeixen totes les característiques de les cèl·lules mare progenitores de reserva (*Young et al., 2001; Zuk et al., 2001*). Com s'ha esmentat anteriorment, els diferents tipus de cèl·lules mare pluripotents donen lloc als osteoblasts, als condrocits i als adipòcits. La diferenciació cap a un d'aquests llinatges es troba determinada, en part, per les propietats de l'entorn local cel·lular (*Nuttall and Gimble, 2000*).

És molt possible que aquestes tres categories de cèl·lules mare de reserva es trobin afectades en la fibrodisplàsia ossificadora progressiva i en l'heteroplàsia òssia progressiva així com també en d'altres malalties relacionades amb la formació ectòpica d'os.

Les proteïnes morfogenètiques d'os (BMPs) i altres membres de la superfamília TGF- β sembla que podrien tenir un paper rellevant en la formació de l'os i en el desenvolupament de les extremitats com a molècules senyalitzadores d'acció paracrina/autocrina (*Massague et al., 2000*). Les BMPs, quan s'injecten en rates subcutàniament o intramuscular, poden induir la formació ectòpica d'os (*Urist et al., 1965*), seguint els passos normals dels processos de formació normotòpica d'os endocondral i/o intramembranós. Les BMPs indueixen l'expressió de marcadors de la diferenciació osteoblàstica, com són la hormona PTH i el receptor PTHrP (*Rosen et al., 1994; Yamaguchi et al., 1991*). Un gran nombre d'hormones, neurotransmissors, mediadors locals, citoquines i estímuls sensorials afecten a cèl·lules i organismes. Aquest efecte té lloc mitjançant la unió a receptors acoblats a proteïnes G (*Quarless et al., 1996; Uings et al., 2000*). Donat que el receptor de la hormona PTH es troba acoblat a proteïnes G, les mutacions en aquestes proteïnes, poden causar pèrdua o guany de funció mitjançant activació o inactivació dels camins de senyalització, donant lloc a fenotips clínics de defecte o excés hormonal, respectivament. La identificació del receptor de PTH i el seu camí de senyalització (*Aurbach et al., 1992*) ha permès conèixer millor la fisiopatologia de l'hormona PHP.

En els últims anys, estudis biològics de caràcter molecular, han obtingut resultats rellevants sobre la funció patogènica de les mutacions espontànies en els gens de les proteïnes G, amb la conseqüent alteració del camí de transducció (*Michaela et al., 2000; Hayward et al., 2001*). L'expressió fenotípica d'aquestes mutacions depèn de si les mutacions afecten la línia germinal o somàtica. Les mutacions en la línia germinal es manifesten en totes les cèl·lules on el gen s'expressa. En canvi, les mutacions somàtiques condueixen a una manifestació més focalitzada de la malaltia (*Michaela et al., 2000*).

Moltes malalties de formació ectòpica d'os, com són POH i POC, presenten mutacions en el locus *GNAS1*, gen que codifica per la subunitat alfa de la proteïnes G estimuladores (*Michaela et al., 2000; Hayward et al., 2001*).

La senyalització dels camins de transducció mitjançant factors TGF- β o altres factors com són hormones, neurotransmissors, citokines i mediadors locals associats a proteïnes G es troba sota rigorosos controls finament regulats per processos de retroalimentació negativa/positiva, els quals, alhora, són modulats en l'espai i el temps, actuant aquests mitjançant múltiples mecanismes a nivell extracel·lular, citoplasmàtic i nuclear (*de Caestecker et al., 1998; Adachi-Yamada et al., 1999*). La regulació positiva és essencial per a l'amplificació del senyal emès per aquests factors. La regulació negativa té un paper essencial en la restricció i l'acabament del senyal i sovint actua mitjançant loops de retroalimentació negativa. La regulació negativa també és crítica durant l'inici del desenvolupament embrionari i dels processos morfogenètics, limitant el grau de senyalització dels factors "TGF- β -like", els quals actuen amb gradients d'activitat.

La senyalització a través de factors TGF- β -like també es troba regulada a través de "cross-talking" amb altres camins de senyalització com són el camins de les MAP quinases, JAK/STAT i les proteïnes G, com ja s'ha comentat per PTH/PTHrp. Les perturbacions en la regulació negativa de les vies de transducció de TGF- β / proteïnes G poden estar associades a la patogènesi de molts desordres clínics. (*Hartsough and Mulder, 1995; Atfi et al., 1997; Adachi-Yamada et al., 1999; Hocevar et al., 1999; Zhou et al., 1999*).

Mitjançant un procés meticulosament regulat, l'esqueletogènesi embrionària humana transforma les cèl·lules mesenquimàtiques en sistemes orgànics articulats ben definits espacialment com són el cartílag, l'os i els teixits hematopoiètics (*Karsenty et al., 1999, Ducky et al., 1998*). Un dels enigmes a resoldre encara en l'estudi de la biologia de l'esquelet està en la recerca dels senyals moleculars que són necessaris i suficients per a induir una adequada formació de l'esquelet (*Karsenty et al., 1999*).

L'estudi dels processos moleculars implicats en la regulació de l'osteogènesi s'ha realitzat en base a dues malalties humanes diferents, caracteritzades per la formació ectòpica d'os d'origen divers: la FOP (la fibrodisplàsia ossificadora progressiva), on cèl·lules mare mesenquimàtiques presents als teixits conjuntius evolucionen fins a os laminar madur amb elements de medul·la òssia a través del procés endocondral (*Kaplan et al., 1993b; Gannon et al., 1998*), i la POH (l'heteroplàsia òssia progressiva) un altre desordre de diferenciació mesenquimàtica caracteritzada per una ossificació heterotòpica cutània, subcutània, de la dermis i de teixits conjuntius profunds. En individus afectats per POH, la formació d'os mitjançant el procés intramenbranós predomina respecte al procés endocondral (*Frederick Kaplan and Eileen Shore, 2000*).

Aquest treball de recerca ha permès situar en un mateix pla d'estudi processos d'osteogènesi de naturalesa diversa, els quals es desencadenen per camins de transducció alternatius. Com abans s'ha comentat, les rutes de transducció del senyal de factors TGF- β i proteïnes G s'entrecreuen les unes amb les altres (Cross-talking). Les mutacions en els gens codificadors de proteïnes mediadores o reguladores del camí de senyalització de BMP-4 i els defectes en els camins de senyalització de receptors acoblats a les proteïnes G poden contribuir directament o indirecta a la patogènesi de moltes malalties amb formació heterotòpica d'os.

Els resultats presentats en aquest estudi realitzat en dues malalties rares de formació heterotòpica d'os com són la FOP i la POH ens proporcionen informació original sobre com es regulen els processos d'osteogènesi i esqueletogènesi. Això ens permet plantejar projectes de recerca més temptadors i fructífers en la lluita contra els elements que desencadenen aquestes catastròfiques respostes. El treball intens en ambdues àrees de recerca potenciarà en gran mesura l'esforç combinat de molts científics, realitzat durant les dues últimes dècades, en la lluita contra aquestes devastadores malalties humanes. Les troballes científiques en les dues àrees són igualment de gran importància per a entendre els processos que controlen l'osteogènesi ja que el que s'aprèn a FOP pot ser aplicat, en certa mesura, a POH i viceversa.

La comprensió detallada de la biologia de les cèl·lules mare pluripotents i de les funcions biològiques exercides pels mecanismes de retroalimentació negativa serà un requeriment “*sinequanon*” per a aclarir la patogènesi de la FOP i la POH, i també per a moltes altres malalties relacionades amb la formació ectòpica d’os.

Les implicacions que té entendre la causa de POH i FOP, i l’ús que es faci d’aquests coneixement per a cercar tractaments efectius és vital per als individus afectats per aquestes malalties. No obstant, la importància que la POH i la FOP tenen per la medicina i la ciència és molt més gran que la raresa d’aquestes condicions pot indicar. El desxiframent de la complexa patogènesi de la POH i de la FOP i l’elucidació de les rutes cel·lulars i bases moleculars implicades en dirigir la transformació de cèl·lules precursors en os, permetrà que condicions més comunes d’osteogènesi heterotòpica siguin compreses i tractades. Aquests estudis ajudaran a dissenyar un diagnòstic molecular adequat i estratègies de tractament per un ampli ventall de desordres de desenvolupament de l’esquelet.

Les conclusions obtingudes en ambdós treballs, són les següents:

La fidrodissplàsia ossificadora progressiva

1. S'ha identificat una possible alteració en l'equilibri entre un morfogen de l'esquelet i els seus antagonistes en una malaltia humana d'esqueletogènesi heterotòpica. Els resultats revelen una possible pèrdua del mecanisme de retroalimentació negativa pel qual l'activitat de BMP-4 es troba alterada i, conseqüentment, prolongada en individus FOP. El desequilibri entre el morfogen BMP-4 i els seus antagonistes pot ser l'efecte directe o indirecte de mutacions en el gen responsable de FOP.
2. La proteïna BMP-4 no es troba sobreexpressada en línies FOP sinó desregulada, a través d'una alteració del mecanisme de retroalimentació negativa entre BMP-4 i els seus antagonistes. Així, s'ha detectat, en línies cel·lulars FOP, un patró d'expressió de BMP-4 característic i diferent al de les línies control. També s'ha detectat pels antagonistes *gremlin* i *noggin* un perfil d'expressió similar al que s'observa per BMP-4 però amb menys intensitat.
3. La forta resposta de *gremlin* i *noggin* a la inducció amb hrBMP-4 en LCLs control, independentment del creixement i de la densitat cel·lular, comparada amb resposta feble en línies FOP, consolida la hipòtesi que la mutació causant de la malaltia podria afectar algun factor que interacciona amb la senyalització de les BMPs. Aquest factor podria ser un gen codificador d'una molècula essencial en l'activació de *gremlin* i *noggin*, limitant la seva interacció sobre BMP-4.
4. Els diferents tipus de mutacions en el gen FOP poden tenir efectes diferents en l'expressió de la malaltia en termes de formació de gradients de BMP-4, segons cada localització als diferents teixits. Aquests gradients de BMP-4 vindrien regulats, al seu torn, per una acció inhibidora dels gradients de *noggin* i *gremlin*, els quals també estan alterats.

5. La variabilitat d'expressió de *gremlin* i *noggin* observada en línies FOP, en resposta a rhBMP-4, explicaria les diferències d'expressió de BMP-4 i per tant l'existència de variants de la malaltia, des de les més severes a les més suaus.

L'heteroplàsia òssia progressiva

1. En cèl·lules preosteoblàstiques MC3T3-E1 de ratolí s'expressen els transcrits Nesp-as, Nesp55 i totes les isoformes de $G_s\alpha$, mentre que les isoformes de XLalpha no s'hi expressen. Aquests resultats suggereixen que la unitat transcripcional GNAS1/gnas és més complexa del que es creia i podria ser que existissin més processos d'*splicing* alternatiu per a cobrir totes les necessitats cel·lulars de formes de GNAS1/gnas .

2. L'activació o inactivació, segons el cas, d'algunes de les formes de gnas en el procés de mineralització observat en cèl·lules MC3T3-E1 de ratolí, suggereix que la unitat transcripcional de GNAS1 pot tenir una funció cardinal en el procés d'osteogènesi.

3. La regió de Nesp55 es manté estrictament 'imprintada' (bloquejada per metilació) en les LCLs humanes ja que Nesp55 i Nesp-as no s'expressen en aquestes cèl·lules. Aquest mecanisme s'ha observat també en altres teixits que manquen de GNAS1/gnas.

4. En les LCLs humanes s'expressen dues isoformes de $G_s\alpha$ i de XLalpha. L'expressió de $G_s\alpha$ i XLalpha en cèl·lules LCLs humanes és, en certa manera, esperable ja que P2 i P3 tenen una expressió més ubiqua que les altres formes de GNAS1. Com més diferenciades siguin les cèl·lules, més estrictament regulada sembla estar la unitat de transcripcional de GNAS1.

5. En individus POH tant els nivells dels mRNAs com els proteics del gen GNAS1 estan reduïts a la meitat comparat amb els valors de LCLs controls. L'abundància relativa de les formes de GNAS1 pot tenir implicacions fenotípiques cel·lulars i, per tant, petits canvis en els nivells de les isoformes de GNAS1 podrien afectar a la predisposició de les cèl·lules pluripotents a començar tot el programa d'osteogènesi.

6. L'efecte de les mutacions inactivadores sobre la variabilitat d'expressió i al mateix temps reducció dels transcrits de GNAS1 podria estar directament relacionat amb l'activació de les rutes de transducció de senyal que desencadenen la formació ectòpica d'os en individus POH.

7. Les funcions que exerceixen les isoformes de gnas en cèl·lules mare està per elucidar però és força probable que estiguin implicades en els processos moleculars que regulen l'osteogènesi. Les mutacions inactivadores provocarien reduccions de les diferents proteïnes de GNAS1 i per tant aquestes proteïnes serien insuficients per a mantenir un fre a la inducció cel·lular cap a una diferenciació osteoblàstica en llocs ectòpics.


ANNEX 1

Seqüència corresponent al gen Nesp55

**Tcagcactgctagtgnagatggngcgcactactgntaccctcantttacctncgccgtggacactnagaacatccncc
gtgtcttcaacgactgccgtgacatcatccagencatgcatctccncaatanganctgctctaagaagggaacaccca
aatttaattcagcctaagcacaattanntaagagtganacgtaatngtacaancagttggtcaccnaccatagggca
tgatcaacacngcaanctttcctntntcnnccagtgattntgaana**

*Gnas de Mus musculus (la proteïna d'unió a nucleòtids de guanina, alpha estimuladora,
locus complex (Gnas), mRNA).*

Score = 437 bits (227), Expect = e-120
Identities = 254/280 (90%)
Strand = Plus / Plus



```

1   atcagcactgctagtgnagatggngcgcactactgntaccctcantttacctncgccgtg 60
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
1965 atcagcactgctagtggagatggngcgcactactgctaccctcactttacctgcgcctg 2024
   guanine nucleotide binding prot> 316   I S T A S G D G R H
   Y C Y P H F T C A V

61   gacactnagaacatccnccggtgtcttcaacgactgccgtgacatcatccagencatgcat 120
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2025 gacactgagaacatccgccggtgtcttcaacgactgccgtgacatcatccagcgcatgcat 2084
   guanine nucleotide binding prot> 336   D T E N I R R V F N
   D C R D I I Q R M H

121  ctccncaatanganctgctctaagaagggaacaccccaaatttaattcagcctaagcac 180
   ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2085 ctccgcaatacagagctgctctaagaagggaacaccccaaatttaattcagcctaagcac 2144
   guanine nucleotide binding prot> 356   L R Q Y E L L ^^

181  aattanntaagagtganacgtaatngtacaancagttggtcaccnaccatagggcatgat 240
   ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
2145 aattaattaagagtgaaacgtaattgtacaagcagttggtcaccaccatagggcatgat 2204

241  caacacngcaanctttcctntntcnnccagtgattntgaa 280
   ||||| ||||| ||||| || || || ||||| |||||
2205 caacaccgcaacctttcctttttccccagtgattctgaa 2244

```

LOCUS Gnas 2463 bp mRNA linear ROD 07-JAN-2002
DEFINITION Mus musculus GNAS (guanine nucleotide binding protein,
alphastimulating) complex locus (Gnas), mRNA.
ACCESSION NM_010310
VERSION NM_010310.1 GI:6754015
KEYWORDS .
SOURCE Mus musculus.

ORGANISM [Mus musculus](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae;
 Murinae; Mus.

REFERENCE 9 (bases 1 to 2463)
 AUTHORS Wroe,S.F., Kelsey,G., Skinner,J.A., Bodle,D., Ball,S.T.,
 Beechey,C.V., Peters,J. and Williamson,C.M.
 TITLE An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity
 to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (7), 3342-3346 (2000)
 MEDLINE [20202637](#)
 PUBMED [10716699](#)

COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to
 final
 NCBI review. The reference sequence was derived from
[AF107848.1](#).

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..2463
 /organism="Mus musculus"
 /strain="C57BL/6J"
 /db_xref="taxon:10090"
 /chromosome="2"
 /map="2 104.0 cM"
[gene](#) 1..2463
 /gene="Gnas"
 /note="P3; Gnas1; NESP55; Gs-alpha; Nesp; P1; P2; Gnasx1"
 /db_xref="LocusID:[14683](#)"
 /db_xref="MGD:[95777](#)"
[misc_feature](#) 1..2463
 /gene="Gnas"
 /note="this alternatively spliced mRNA, XL2alphas,
 contains exons XL2 and 2-13"
[CDS](#) 1020..2108
 /gene="Gnas"
 /note="translated from exons XL2 and 2-13; guanine
 nucleotide binding protein, alpha stimulating; Galpha;
 G alpha s; XL alpha s; neuroendocrine secretory protein"
 /codon_start=1
 /product="guanine nucleotide binding protein, alpha
 stimulating, extra large"
 /protein_id="[NP_034440.1](#)"
 /db_xref="GI:6754016"
 /db_xref="LocusID:[14683](#)"
 /db_xref="MGD:[95777](#)"

BASE COUNT 626 a 720 c 644 g 473 t

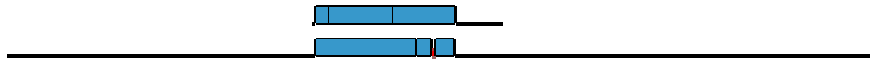
ORIGIN
 1 cgaccccgcg tccgctccca gacgagagga tcagtgagg cacctctcgg agtcttagac
 61 ttcagagtct gagacttagc gagaggagcc tcgaggagac tccttctctc ttctttacc
 121 atccctttct tttacttaca gccacaagct gaggcgcgga gctttagaaa gttcgcagtg
 181 gtttgaagtc cttgcgagc gggggccactc tctgcagagc cagaggggtga gtcggcttct
 241 cggtgagcac ctaagagaat ggatcgcagg tcccgggctc agcagtgggc ccgagctcgc
 301 cataattaca acgacctgtg cccgcccata ggccgcccgg ctgccaccgc tctcctctgg
 361 ctctcctgct ccattgctct cctcgcgcc ctagcctctt ccaacgccg cgcaccagcag
 421 cgtgctgccc agcgccggag cttccttaac gccaccacc ggtccgctgc cgctgcagct

481 gccgcacagg tactccctga gtcctctgaa tctgagtctg atcacgagca cgaggaggtt
 541 gagcctgagc tggccccgcc cgagtgccta gagtacgatc aggacgacta cgagaccgag
 601 accgattctg agaccgagcc tgagtccgat atcgaatccg agaccgaaat cgagaccgag
 661 ccagagaccg agccagaaac cgagccagag accgagccag aggacgagcg cggcccccg
 721 ggtgccacct tcaaccagtc actcactcag cgtctgcacg ctctgaagtt gcagagcgcc
 781 gacgcctccc cgagacgtgc gcagcccacc actcaggagc ctgagagcgc aagcgagggg
 841 gaggagcccc agcgagggcc cttagatcag gatcctcggg accccgagga ggagccagag
 901 gagcgcaagg aggaaaacag gcagccccgc cgctgcaaga ccaggaggcc agcccgcgct
 961 cgcgaccagt ccccgagtc cctcccaga aaggggcca tccccatccg gcgtcactaa
 1021 tgggtgactc cgtccagatt ctcttggtt tcatggataa aggtgctgga gagtctggca
 1081 aaagcaccat tgtgaagcag atgaggatcc tgcattgtaa tgggtttaa ggagagggcg
 1141 gcgaagagga cccgcaggct gcaaggagca acagcgatgg tgagaaggcc actaaagtgc
 1201 aggacatcaa aaacaacctg aaggaggcca ttgaaacat tgtggccgcc atgagcaacc
 1261 tggtgcccc tgtggagctg gccaacctg agaaccagtt cagagtggac tacattctga
 1321 gcgtgatgaa cctgccgaac tttgacttcc cacctgaatt ctatgagcat gccaaaggctc
 1381 tgtgggagga tgagggagtg cgtgcctgct acgagcgctc caatgagtac cagctgattg
 1441 actgtgccca gtacttctg gacaagattg atgtgatcaa gcaggccgac tacgtgcca
 1501 gtgaccagga cctgcttcgc tgcctgtcc tgacctctgg aatctttgag accaagttcc
 1561 aggtggacaa agtcaacttc cacatgttcg atgtggcgcg ccagcgcgat gaacgcccga
 1621 agtggatcca gtgcttcaat gatgtgactg ccatcatctt cgtggtggcc agcagcagct
 1681 acaacatggc cattcgggag gacaaccaga ctaaccgcct gcaggaggct ctgaacctct
 1741 tcaagagcat ctggaacaac agatggctgc gcaccatctc tgtgattctc ttcctcaaca
 1801 agcaagacct gcttgctgag aaagtcctcg ctggcaaatc gaagattgag gactactttc
 1861 cagagtctgc tcgctacacc actcctgagg atgcgactcc cgagcccgga gaggaccac
 1921 gcgtgaccgc ggccaagtac ttcattcggg atgagtttct gagaatcagc actgctagtg
 1981 gagatgggcg ccactactgc taccctcact ttacctgcgc cgtggacact gagaacatcc
 2041 gccgtgtctt caacgactgc cgtgacatca tccagcgcac gcactctccg caatacgagc
 2101 tgctctaaga agggaacacc caaatttaat tcagccttaa gcacaattaa ttaagagtga
 2161 aacgtaattg tacaagcagt tggtcaccca ccatagggca tgatcaacac cgcaaccttt
 2221 ctttttccc ccagtgatc tgaaaaaccc ctcttccctt cagcttgctt agatttcaa
 2281 atttagtaag ctttaagggc ctgcagaaga aaaagaaaaa aaaggccaca aaagttccct
 2341 ctactttca gtaaataaaa taaaagcagc aacagaaata aagaaataaa tgaaattcaa
 2401 aatgaaataa atattgtgtt gtgcagcatt aaaaaatcaa taaaaattaa aaatgagcaa
 2461 aaa

Seqüència corresponent al transcrit XLas

Cagctccacagggggcaccaggttgcctcatggcgccacaatggttcaaggcctcctcaggtggtttgatgctcgcacttagtggcctctc
 accatcgtgttgcctcctgcagcctcgggtcctctcgcgcctcctcgtaaaccattaacatgcaggatcctcatctgcttcacaatggtgctt
 ttgctttgccagactcctcagcacctagaagcagcagggcgggtgtacacatgtagtccatctctcctcctcagttgcttgcgatgagcttget
 gcgtttctatctgcgccttctgctcgcacctaataaggcttcttgcgcacatggttgcgcctcctcctccataggatccttggccttcccgggctgag
 ggatcgtgatcgggtacactcggatagaccgaagcagcttccgaaggctcgggtgaagaagtgcggactgggttgcctccgacctgtggctcc
 ggggcaggccagggcgggttgcgcgcanaaccactggaagcagccgnggcccctcttncgactcatnactgannnnnnnnnnnc

*Seqüència Completa codificadora de la forma reduïda de la Proteïna G Xlalpha mRNA
 de Mus musculus, obtinguda per "splicing" alternatiu.*



Score = 715 bits (372), Expect = 0.0
 Identities = 414/427 (96%), Gaps = 9/427 (2%)
 Strand = Plus / Minus

Large sequence

145 tctccgttaaaccattaacatgcaggatcctcatctgcttcacaatggtgcttttgctt

|||||
 1361 tctccgttaaaccattaacatgcaggatcctcatctgcttcacaatggtgcttttgctt--
 G-protein XLalphas 428 D G N F G N V H L I R M Q K
 V I T S K G

205 ttgccagactctccagcacctagaagcagcagggcgggtgtgtacacatgtagtcccatctt
 |||||
 cagactctccagcacctagaagcagcagggcgggtgtgtacacatgtagtcc-atctt----
 G-protein XLalphas 412 S E G A G L L L L R H T
 C M Y D M K

265 ctctcctccagttgcttgcgatgagcttgcgcttcttctatctgcgcgcttctgctc
 |||||
 ctctcctccagttgcttgcgatgagcttgcgcttcttctatctgcgcgcttctgctc
 G-protein XLalphas 390 E E E L Q K D I L K S R K K
 D A R K Q E

325 tcgcatctaataaggcttcttgcgcacatctggttgcgcctcctcctccataggatccttggc
 |||||
 1188 tcgcatctaataaggcttcttgcgcacatctggttgcgcctcctcctccataggatccttggc
 G-protein XLalphas 387 R M E I A E K R M Q K R R E
 E M P D K A

384 cttcccggggctgagggatcgtgatcgggtacactcggatagaccgaagcagcttccgaa
 |||||
 1128 cttcccggggctgagggatcgtgatcgggtacactcggatagaccgaagcagcttccgaa
 G-protein XLalphas 350 K G P S L S R S R T C E S L
 G F C S G F

444 ggctcgggtgaagaagttgCGGactgggttgctcccgaccgtgtggctccggggcaggcc
 |||
 1068 ggctcgggtgaagaagttgCGGactgggttgctcccgaccgtgtggctccggggcaggcc
 G-protein XLalphas 330 A R T F F N R V P N S G V T
 H S R P L G

504 agggcggcggtttcgccgcanaa-ccactggaagcagccggngggcccttcttncgactc
 |||
 1008 agggcggcggtttcgccgagaagccactggaagcagccggngggcccttcttccgactc
 G-protein XLalphas 322 P R R N R R L L W Q F C G T
 A G E E S E

Query: 563 atnactg 569
 || |||
 Sbjct: 948 atcactg 942

Small sequence

G-protein XLalphas 308 D S
 Score = 181 bits (94), Expect = 9e-43
 Identities = 103/105 (98%), Gaps = 1/105 (0%)
 Strand = Plus / Minus

1 cagctccacagggggcaccaggttgctcatggcggccacaatggtttcaa-ggcctcctt
 |||
 1464 cagctccacagggggcaccaggttgctcatggcggccacaatggtttcaatggcctcctt
 G-protein XLalphas 465 L E V P P V L N S M A A V I
 T E I A E K

60 caggttgttttgatgtcctgcacttttagtggccttctcaccatc 104
 |||
 1404 caggttgttttgatgtcctgcacttttagtggccttctcactatc 1360
 G-protein XLalphas 447 L N N K I D Q V K T
 A K E S D

LOCUS AF116268 2655 bp mRNA linear ROD 24-OCT-2000
 DEFINITION Mus musculus G-protein XLalphas mRNA, alternatively,
 spliced,
 complete cds.
 ACCESSION AF116268
 VERSION AF116268.1 GI:4262550
 KEYWORDS .
 SOURCE Mus musculus.
 ORGANISM [Mus musculus](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae;
 Murinae; Mus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 2655)
 AUTHORS Klemke,M., Pasolli,H.A., Kehlenbach,R.H., Offermanns,S.,
 Schultz,G.
 and Huttner,W.B.

TITLE Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. II. Signal transduction properties

JOURNAL J. Biol. Chem. 275 (43), 33633-33640 (2000)

MEDLINE [20517925](#)

PUBMED [10931851](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 2655)

AUTHORS Klemke, M. and Huttner, W.B.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (22-DEC-1998) Neurobiology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, Heidelberg 69120, Germany

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..2655

/organism="Mus musculus"

/strain="C57BL"

/db_xref="taxon:10090"

/clone="IMAGE: 1499201"

[CDS](#) 22..2292

/note="alternatively spliced; exon 2 spliced to exon 4 using an alternative TG splice site; Kozasa, T. et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2081-2085"

/codon_start=1

/product="G-protein XLalphas"

/protein_id="[AAD14686.1](#)"

/db_xref="GI:4262551"

ORIGIN

```

1 gttgagcgcg aagcagccga gatggaagga agccctacca ccgccactgc ggtggaagga
61 aaagtcccct ctccggagag aggggacgga tcttccaccc agcctgaagc aatggatgcc
121 aagccagccc ctgctgcccc agccgtctct accggatctg atgctggagc tcctacggat
181 tccgcgatgc tcacagatag ccagagcgat gccggagaag acgggacagc cccaggaacg
241 cctcagatc tccagtcgga tctgaagaa ctggaagaag cccagctgt ccgcgccgat
301 cctgacggag gggcagcccc agtcgcccc gccactcctg ccgagtccga gtctgaaggc
361 agcagagatc cagccgccc gccagcctcc gaggcagtc ctgccaccac ggccgagtct
421 gcctccgggg cagcccctgt caccaggtg gagcccgcag ccgcggcagt ctctgccacc
481 ctggcggagc ctgccgccc ggcagcccct atcaccacca aggagcccac taccgggca
541 gtcccctctg ctagagcccc tccggccgct ggagcagtc ctggcgcccc agcaatgtca
601 gcctctgcta gggcagctgc cgctagggca gcctatgcag gtccactggt ctggggagcc
661 aggtcactct cagctactcc cgccgctcgg gcatcccttc ctgcccgcgc agcagctgcc
721 gcccgggcag cctctgctgc ccgcgcagtc gctgctggcc ggtcagctc tgccgcgccc
781 agcagggccc atcttagacc ccccagccc gagatccagg ttgctgacc gcctactccg
841 cggcctcctc cgcggccgac tgcctggcct gacaagtac agcggggccc aagctgctgc
901 aggtacgag catcgtctgg catctgagc atcgagtcct ccagtgatga gtcggaagaa
961 ggggccaccg gctgcttcca gtggcttctg cggcgaaacc gccgccctgg cctgccccgg
1021 agccacacgg tcgggagcaa cccagtcgca aacttcttca cccgagcctt cggaagctgc
1081 ttcggtctat ccgagtgtac ccgatcacga tccctcagcc ccgggaaggc caaggatcct
1141 atggaggaga ggcgcaaaca gatgcgcaaa gaagccattg agatgcgaga gcagaagcgc
1201 gcagataaga aacgcagcaa gctcatcgac aagcaactgg aggaggagaa gatggactac
1261 atgtgtacac accgcctgct gcttctaggt gctggagagt ctggcaaaag caccattgtg
1321 aagcagatga ggatcctgca tgtaaatggg ttaacggag atagtgagaa ggccactaaa
1381 gtgcaggaca tcaaaaacaa cctgaaggag gccattgaaa ccattgtggc cgccatgagc
1441 aacctggtgc cccctgtgga gctggccaac cctgagaacc agttcagagt ggactacatt
1501 ctgagcgtga tgaacgtgcc gaactttgac ttcccacctg aattctatga gcatgccaa
1561 gctctgtggy aggatgaggg agtgcgtgcc tgctacgagc gctccaatga gtaccagctg
1621 attgactgtg cccagtaact cctggacaag attgatgtga tcaagcagcc gcactacgtg
1681 ccaagtgacc aggacctgct tcgctgccgt gtctgacct ctggaatctt tgagaccaag
1741 ttccaggtgg acaaagtcaa cttccacatg ttcgatgtgg gcggccagcg cgatgagcgc

```

1801 cgcaagtgga tccagtgctt caatgatgtg actgccatca tcttcgtggt ggccagcagc
 1861 agctacaaca tggtcattcg ggaggacaac cagactaacc gcctgcagga ggctctgaac
 1921 ctcttcaaga gcatctggaa caacagatgg ctgcgacca tctctgtgat tctcttcctc
 1981 aacaagcaag acctgcttgc tgagaaagtc ctcgctggca aatcgaagat tgaggactac
 2041 tttccagagt tcgctcgcta caccactcct gaggatgcga ctcccagacc gggagaggac
 2101 ccacgcgtga cccgggcaa gtacttcatt cgggatgagt ttctgagaat cagcactgct
 2161 agtggagatg ggcgccacta ctgctaccct cactttacct gcgccgtgga cactgagaac
 2221 atccgccgtg tcttcaacga ctgccgtgac atcatccagc gcatgcatct ccgccaatac
 2281 gagctgctct aagaagggaa cacccaaatt taattcagcc ttaagcacia ttaattaaga
 2341 gtgaaacgta attgtacaag cagttgggtca cccaccatag ggcatgatca acaccgcaac
 2401 ctttcctttt tccccagtg attctgaaaa acccctcttc ccttcagctt gcttagatgt
 2461 tccaaattta gtaagcttaa ggcggcctac agaagaaaaa gaaaaaaaaa gccacaaaag
 2521 ttccctctca ctttcagtaa ataaaataaa agcagcaaca gaaataaaga aataaatgaa
 2581 attcaaaatg aaataaatat tgtgtgtgtgc agcatataaa aatcaataaa aatcaaaaat
 2641 gagcaaaaaa aaaaa

ANNEX 3

Nova isoforma de $G_s\alpha$

**tctcggcaaagcccagctgcagaatgcagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgctgctgctgctgggtgctggag
 agtctggcaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgtaatgggttaacggagagggcggcgaagaggaccgca**

**ggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggccactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaacca
ttgtggcccgcatgagcaacctggtgcccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtga
tgaacg**

Score = 617 bits (321), Expect = e-174
Identities = 321/321 (100%)
Strand = Plus / Plus



```
26  tgcagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggag
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
108 tgcagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggag
GNAS (guanine nucleotide bindin> 30 L Q K D K Q V Y R A
   T H R L L L L G A G

86  agtctggcaaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgtaaatgggtttaacg
   | |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
168 agtctggcaaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgtaaatgggtttaacg 227
GNAS (guanine nucleotide bindin> 50 E S G K S T I V K Q M R
   I L H V N G F N

146 gagagggcggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggcca
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
228 gagagggcggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggcca
GNAS (guanine nucleotide bindin> 70 G E G G E E D P Q A A R
   S N S D G E K A

206 ctaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggccgcca
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
288 ctaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggccgcca 347
GNAS (guanine nucleotide bindin> 90 T K V Q D I K N N L K E
   A I E T I V A A

266 tgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggact
   |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
348 tgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggact
GNAS (guanine nucleotide bindin> 110 M S N L V P P V E L A N
   P E N Q F R V D

Query:   326 acattctgagcgtgatgaacg 346
         |||||||||||||||||||||||
Sbjct:   408 acattctgagcgtgatgaacg 428
GNAS (guanine nucleotide bindin> 130 Y I L S V M N
```

G_sα

**agaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagagtctggcaaaagcaccattg
tgaagcagatgaggatcctgcatgtaatgggtttaacggagagggcggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagc
aacagcgatggtgagaaggccactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggc**

**cgccatgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtg
atgaacgtg**

Score = 615 bits (320), Expect = e-174
Identities = 320/320 (100%)
Strand = Plus / Plus



```

1   agaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagagt
   |||
111 agaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagagt
GNAS (guanine nucleotide bindin> 31 Q K D K Q V Y R A T
   H R L L L L G A G E

61  ctggcaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaacggag
   |||
171 ctggcaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaacggag
GNAS (guanine nucleotide bindin> 51 S G K S T I V K Q M
   R I L H V N G F N G

121 agggcggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggcacta
   |||
231 agggcggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggcacta
GNAS (guanine nucleotide bindin> 71 E G G E E D P Q A A
   R S N S D G E K A T

181 aagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggccgcatga
   |||
291 aagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggccgcatga
GNAS (guanine nucleotide bindin> 91 K V Q D I K N N L K
   E A I E T I V A A M

241 gcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactaca
   |||
351 gcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactaca
GNAS (guanine nucleotide bindin> 111 S N L V P P V E L A
   N P E N Q F R V D Y

Query:      301 ttctgagcgtgatgaacgtg 320
           |||
Sbjct:      411 ttctgagcgtgatgaacgtg 430
GNAS (guanine nucleotide bindin> 131 I L S V M N V

```

Forma de $G_s\alpha$, generada per “splicing” alternatiu

**tgagaaggccactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaaccattgtggccgcatgagca
acctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagttcagagtggactacattctgagcgtgatgaacgtgctg**

**cagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagagtctggcaaaagcaccatt
gtgaagcagatgaggatcctgcatgtaatgggttaacg**

Primera seqüència

Score = 298 bits (155), Expect = 2e-78

Identities = 155/155 (100%)

Strand = Plus / Plus



1 tgagaaggccactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaacat
|||||
277 tgagaaggccactaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaggaggccattgaaacat
GNAS (guanine nucleotide bindin> 87 E K A T K V Q D I K N N
L K E A I E T I

61 tgtggccgcatgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagtt
|||||
337 tgtggccgcatgagcaacctggtgccccctgtggagctggccaacctgagaaccagtt
GNAS (guanine nucleotide bindin> 107 V A A M S N L V P
P V E L A N P E N Q F

121 cagagtggactacattctgagcgtgatgaacgtgc 155
|||||
397 cagagtggactacattctgagcgtgatgaacgtgc 431
GNAS (guanine nucleotide bindin> 127 R V D Y I L S V M N V

Segona seqüència

Score = 235 bits (122), Expect = 2e-59

Identities = 122/122 (100%)

Strand = Plus / Plus



154 gctgcagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctgg
|||||
106 gctgcagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctgg
GNAS (guanine nucleotide bindin> 30 L Q K D K Q V Y R
A T H R L L L L G A G

214 agagtctggcaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgtaatgggtttaa
|||||
166 agagtctggcaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgtaatgggtttaa
GNAS (guanine nucleotide bindin> 50 E S G K S T I V K
Q M R I L H V N G F N

Query: 274 cg 275

||

Sbjct: 226 cg 227

GNAS (guanine nucleotide bindin> 70

“Mus musculus guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating (Gnas), mRNA”

LOCUS NM_010309 1389 bp mRNA ROD 01-NOV-2000
 DEFINITION Mus musculus guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating (Gnas), mRNA.
 ACCESSION NM_010309
 VERSION NM_010309.1 GI:6754013
 KEYWORDS .
 SOURCE house mouse.
 ORGANISM [Mus musculus](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1389)
 AUTHORS Rall,T. and Harris,B.A.
 TITLE Identification of the lesion in the stimulatory GTP-binding protein of the uncoupled S49 lymphoma
 JOURNAL FEBS Lett. 224 (2), 365-371 (1987)
 MEDLINE [88083563](#)
 COMMENT PROVISIONAL [REFSEQ](#): This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference sequence was derived from [Y00703.1](#).
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1389
 /organism="Mus musculus"
 /strain="BALB/cSt"
 /db_xref="taxon:10090"
 /chromosome="2"
 /map="2 104.0 cM"
 /clone="pUNC6"
 /cell_line="S49.1"
 /clone_lib="S49 uncoupled cDNA in pcDV"
[gene](#) 1..1389
 /gene="Gnas"
 /note="Gnas1; NESP55; Gs-alpha"
 /db_xref="LocusID:[14683](#)"
 /db_xref="MGD:[MGI:95777](#)"
[CDS](#) 20..1204
 /gene="Gnas"
 /note="Gs alpha; G alpha s; XL alpha s"
 /codon_start=1
 /db_xref="LocusID:[14683](#)"
 /db_xref="MGD:[MGI:95777](#)"
 /product="guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating"
 /protein_id="[NP_034439.1](#)"
 /db_xref="GI:6754014"
 BASE COUNT 354 a 389 c 368 g 278 t

ORIGIN

```

1  ccccgcgccc  cgccgcccga  tgggctgcct  cggcaacagt  aagaccgagg  accagcgcaa
61  cgaggagaag  ggcgagcgcg  aggccaacaa  aaagatcgag  aagcagctgc  agaaggacaa
121  gcaggtctac  cggggccacgc  accgcctgct  gctgctgggt  gctggagagt  ctggcaaaag
181  caccattgtg  aagcagatga  ggatcctgca  tgtaaatggg  ttaacggag  agggcggcga
241  agaggacccg  caggctgcaa  ggagcaacag  cgatgggtgag  aaggccacta  agtgcaggaa
301  catcaaaaac  aacctgaagg  aggccattga  aaccattgtg  gccgccatga  gcaacctggt
361  gccccctgtg  gagctggcca  accctgagaa  ccagttcaga  gtggactaca  ttctgagcgt
421  gatgaacgtg  cccgactttg  acttcccacc  tgaattctat  gagcatgcca  aggctctgtg
481  ggaggatgag  ggagtgcgtg  cctgctacga  gcgctccaat  gaggaccagc  tgattgactg
541  tgcccagtac  ttctgggaca  agattgatgt  gatcaagcag  gccgactacg  tgccaagtga
601  ccaggacctg  ctctgctgcc  gtgtcctgac  ctctggaatc  tttgagacca  agttccaggt
661  ggacaaaagtc  aacttccaca  tgttcgatgt  gggcggccag  cgcgatgaac  gccgcaagtg
721  gatccagtgc  ttcaatgatg  tgactgccat  catcttcgtg  gtggccagca  gcagctacaa
781  catggtcatt  cgggaggaca  accagactaa  ccgcctgcag  gaggctctga  acctcttcaa
841  gagcatctgg  aacaacagat  ggctgcgcac  catctctgtg  attctcttcc  tcaacaagca
901  agacctgctt  gctgagaaaag  tcctcgctgg  caaatcgaag  attgaggact  actttccaga
961  gttcgctcgc  tacaccactc  ctgaggatgc  gactcccag  ccgggagagg  acccacgcgt
1021  gaccggggcc  aagtacttca  ttcgggatga  gtttctgaga  atcagcactg  ctagtggaga
1081  tgggcgccac  tactgctacc  ctcactttac  ctgcgcccgtg  gacactgaga  acatccgccg
1141  tgtcttcaac  gactgccgtg  acatcatcca  gcgcatgcat  ctcccccaat  acgagctgct
1201  ctaagaaggg  aacacccaaa  ttttaattcag  ctttaagcac  aattaattaa  gagtgaacg
1261  taattgtaca  agcagttggt  caccaccat  agggcatgat  caacaccgca  accttctctt
1321  tttccccag  tgattctgaa  aaaccctct  tcccttcagc  ttgcttagat  gtccaaatt
1381  tagaagctt.

```

ANNEX 4

Seqüència corresponent a Nesp-as

**tcacctctggctctgcagagagtggccccactgcgcaaggactggtggggccgaaaaggattaaccttatgaggagag
aagetggggtctgaagaccccaatctcgctcggggcaaaaagaagggatgtacctacctcaaacctgcaacttt
ctaaagctcgcgctcagcttgaggctgtaagtaaaagaaaggatgggtaaagaagagagaaggagtctcctcga
ggctcctcgcgtaagtctcagactctga**

Score = 508 bits (264), Expect = e-141
Identities = 264/264 (100%)
Strand = Plus / Plus

```

1      tcacctctggctctgcagagagtggccccactgcgcaaggactggtggggccgaaaagg
      |||
791    tcacctctggctctgcagagagtggccccactgcgcaaggactggtggggccgaaaagg

61     attaaccttatgaggagagaagctggggtctgaagaccccaatctcgctcggggcaaaa
      |||
851    attaaccttatgaggagagaagctggggtctgaagaccccaatctcgctcggggcaaaa

121    agaaggggatgtacctaccttcaaaccactgcaactttctaaagctccgcgctcagctt
      |||
911    agaaggggatgtacctaccttcaaaccactgcaactttctaaagctccgcgctcagctt

181    gaggctgtaagtaaaagaaaggatgggtaaagaagagagaaggagtctcctcagaggctc
      |||
971    gaggctgtaagtaaaagaaaggatgggtaaagaagagagaaggagtctcctcagaggctc

```

Query: 241 ctctcgctaagtctcagactctga 264
 |||
Sbjct: 1031 ctctcgctaagtctcagactctga 1054

Mus musculus Nesp-as mRNA, sequence

LOCUS AF173359 1083 bp mRNA linear ROD 30-
MAR-2000
DEFINITION Mus musculus Nesp-as mRNA, sequence.
ACCESSION AF173359
VERSION AF173359.1 GI:7229395
KEYWORDS .
SOURCE Mus musculus.
ORGANISM [Mus musculus](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae;
Murinae; Mus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1083)
AUTHORS Wroe,S.F., Kelsey,G., Skinner,J.A., Bodle,D., Ball,S.T.,
Beechey,C.V., Peters,J. and Williamson,C.M.
TITLE An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity
to the
cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (7), 3342-3346 (2000)
MEDLINE [20202637](#)
PUBMED [10716699](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1083)
 AUTHORS Wroe,S.F., Kelsey,G., Skinner,J.A., Ball,S.T.,
 Beechey,C.V.,
 Peters,J. and Williamson,C.M.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (29-JUL-1999) Mammalian Genetics Unit, Medical
 Research
 Council, Harwell, Didcot, Oxon OX11 0RD, UK
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1083
 /organism="Mus musculus"
 /db_xref="taxon:10090"
 /chromosome="2"
 /map="Gnas locus"
 /dev_stage="15.5 dpc embryo"
 /note="paternally derived transcript"
[misc_RNA](#) 1..1083
 /note="Nesp-as; antisense transcript at Nesp
 locus;
 similar to Mus musculus neuroendocrine secretory
 protein
 NESP55 encoded by GenBank Accession Number
 AF010163"
 BASE COUNT 186 a 305 c 371 g 221 t
 ORIGIN
 1 ttagtgacgc cggatgggga tgggcccctt tctgggaggg gactccgggg actggtcgcg
 61 acggcgggct ggctctctgg tcttgacagc gcggggctgc ctgttttct ccttgcgctc
 121 ctctggctcc tcctcggggt cccgaggatc ctgatctaag ggccctcgct ggggctcctc
 181 ccctcgctt gcgctctcag gctcctgagt ggtgggctgc gcacgtctcg gggaggcgctc
 241 ggcgctctgc aacttcagag cgtgcagacg ctgagtgagt gactggttga aggtggcacc
 301 ccgggggccg cgctcgtcct ctggctcggg ctctggctcg gtttctggct cggctctctgg
 361 ctcggtctcg atttcgggtc cggattcgat atcggactca ggctcgggtc cagaatcggg
 421 ctcggtctcg tagtcgtcct gatcgtactc taggcactcg gggcgggcca gctcaggctc
 481 aacctcctcg tgctcgtgat cagactcaga ttcagaggac tcagggagta cctgtgcggc
 541 agctgcagcg gcagcggagc ggtggtgggc gtttaaggaag ctccggcgat gggcagcacg
 601 ctgctgggcg cgggcggttg aagaggctag ggcgcggagg agagcaatgg agcaggagag
 661 ccagaggaga gcggtggcag cccggcggcc tatgggcggg cacaggtcgt tgtaattatg
 721 gcgagctcgg cgccactgct gagcccggga cctgcgatcc attctcttag gtgctcaccg
 781 agaagccgac tcaccctctg gctctgcaga gagtggcccc actgcgcaag gactgttggg
 841 gccgaaaagg attaacctta tgaggagaga agctggggtc tgaagacccc aatctcgctc
 901 cggggcaaaa agaagggatg tacctacctt caaaccactg cgaactttct aaagctccgc
 961 gcctcagctt gaggctgtaa gtaaaagaaa gggatgggta aagaagagag aaggagtctc
 1021 ctcgaggtc ctctcgctaa gtctcagact ctgaagtcta agactccgag aggtgcctcc
 1081 act

ANNEX 5*Seqüència corresponent a G_sα*

**ttcatcacactcagaatgtagtccactctgaactggttctcgggggtggccagctccacggggggcaccaggtgctcatg
gcgccacaatggtttcaatcgctctttcaggttgttttgatgctctgcactttggttgccttctcagagggcggcgaaga
ggacccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggcntgnetncatnaaacccattaacatgcaggatcct
cntctgctnaacaatggtgctttnacnanattctccaccnccagcagcagcnggcgngcgnnnccngannacct
nntntnctntgnannnnnnnn**

“Human GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating,) complex locus
(Gnas), mRNA”.

Score = 131 bits (68), Expect = 3e-27
Identities = 121/121 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 326 tgagaaggcaaccaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaagaggcgattgaaacat
|||||
Sbjct: 150 tgagaaggcaaccaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaagaggcgattgaaacat

Query: 386 tgtggccgcatgagcaacctggtgcccccgctggagctggccaaccccgagaaccagtt
|||||
Sbjct: 90 tgtggccgcatgagcaacctggtgcccccgctggagctggccaaccccgagaaccagtt

Query: 446 cagagtggactacatcctgagtgtgatgaa 475
|||||
Sbjct: 30 cagagtggactacattctgagtgtgatgaa 1

Score = 131 bits (68), Expect = 3e-27
Identities = 96/121 (79%)
Strand = Plus / Minus

Query: 159 cagaaggacaagcaggtctaccgggccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagaa
|| ||| | || |||| | ||| ||| |||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 331 canaagnanaannaggtntcngggnnncgcnncgcngctgctgctggnggtggagaa
272

Query: 219 tctggtaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaatgga
| | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 271 tntngtnaaagcaccattgttnagcagangaggatcctgcatgttaatgggtttnatgna

Query: 279 g 279
|
Sbjct: 211 g 211

Score = 110 bits (57), Expect = 6e-21
Identities = 57/57 (100%)

Query: 278 agagggcggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggc
|||||

Sbjct: 150 agagggcgggcgaagaggaccgcaggctgcaaggagcaacagcgatggtgagaaggc
206

Seqüència corresponent a la forma de G_sα generada per splicing alternatiu

**ttcatcacactcagaatgtagtccactctgaactggttctcgggggttgccagctccacggggggcaccaggttgctcatg
gcgccacaatggttcaatcgctcttcaggttgttttgatgtctgcactttggtgccttctcantgntncatnaaa
cccattaacatgcaggatcctctctgctnaacaatggtgctttnacnanatttccaccnccagcagcagcngggcgn
ngcgnnnccngannacctnttntnctntnagnnnnnnnn**

Score = 283 bits (147), Expect = 5e-73
Identities = 149/150 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 326 tgagaaggcaaccaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaagaggcgattgaaaccat
|||||
Sbjct: 150 tgagaaggcaaccaaagtgcaggacatcaaaaacaacctgaaagaggcgattgaaaccat

Query: 386 tgtggccgcatgagcaacctggtgcccccggtggagctggccaaccccgagaaccagtt
|||||
Sbjct: 90 tgtggccgcatgagcaacctggtgcccccggtggagctggccaaccccgagaaccagtt

Query: 446 cagagtggactacatcctgagtgtgatgaa 475
|||||
Sbjct: 30 cagagtggactacattctgagtgtgatgaa 1

Score = 131 bits (68), Expect = 3e-27
Identities = 96/121 (79%)
Strand = Plus / Minus

Query: 159 cagaaggacaagcaggtctaccgggcccacgcaccgcctgctgctgctgggtgctggagaa
|| ||| | || |||| | ||| ||| |||| |||||
Sbjct: 275 canaagnanaannaggtntcngggnnncgcnncgcnngctgctgctggnggtggagaa

Query: 219 tctggtaaaagcaccattgtgaagcagatgaggatcctgcatgttaatgggtttaatgga
| | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 215 tntngtnaaagcaccattgttnagcagangaggatcctgcatgttaatgggtttnatgna

LOCUS GNAS 1614 bp mRNA linear PRI 20-DEC-2001
DEFINITION Homo sapiens GNAS complex locus (GNAS), mRNA.
ACCESSION NM_000516
VERSION NM_000516.2 GI:8659565
KEYWORDS .
SOURCE human.
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1614)
 AUTHORS Weinstock,R.S., Wright,H.N., Spiegel,A.M., Levine,M.A. and Moses,A.M.
 TITLE Olfactory dysfunction in humans with deficient guanine nucleotide-binding protein
 JOURNAL Nature 322 (6080), 635-636 (1986)
 MEDLINE [86311269](#)
 PUBMED [3018580](#)

[gene](#) 1..1614
 /gene="GNAS"
 /note="GPSA; NESP55; GNAS1"
 /db_xref="LocusID:2778"
 /db_xref="MIM:139320"
[CDS](#) 69..1253
 /gene="GNAS"
 /note="neuroendocrine secretory protein 55;

guanine

nucleotide binding protein (G protein), alpha

ORIGIN

```

1 gcgggctgct tgcgcgcgt ggcgcgcgcg ccgcagcccc gccgcgcccc gccgcgcgcg
61 ccgcccgcct gggctgcctc gggaacagta agaccgagga ccagcgcaac gaggagaagg
121 cgcagcgtga ggccaacaaa aagatcgaga agcagctgca gaaggacaag caggctacc
181 gggccacgca ccgcctgctg ctgctgggtg ctggagaatc tggtaaaagc accattgtga
241 agcagatgag gatcctgcat gttaatgggt ttaatggaga gggcggcgaa gaggaccgac
301 aggtgcaag gagcaacagc gatggtgaga aggcaaccaa agtgcaggac atcaaaaaaca
361 acctgaaaaga ggcgattgaa accattgtgg ccgccatgag caacctgggtg cccccgctgg
421 agctggccaa ccccgagaac cagttcagag tggactacat cctgagtgtg atgaacgtgc
481 ctgactttga cttccctccc gaattctatg agcatgcaa ggctctgtgg gaggatgaag
541 gagtgcgtgc ctgctacgaa cgctccaacg agtaccagct gattgactgt gccagctact
601 tcctggacaa gatcgacgtg atcaagcagg ctgactatgt gccgagcgat caggacctgc
661 ttcgctgccg tgtcctgact tctggaatct ttgagaccaa gttccagggtg gacaaaagtca
721 acttccacat gtttgacgtg ggtggccagc gcgatgaacg ccgcaagtgg atccagtgtc
781 tcaacgatgt gactgccatc atcttcgtgg tggccagcag cagctacaac atggtcatcc
841 gggaggacaa ccagaccaac cgctgcagg aggctctgaa cctcttcaag agcatctgga
901 acaacagatg gctgcgcacc atctctgtga tcctgttcct caacaagcaa gatctgctcg
961 ctgagaaaagt ccttgctggg aaatcgaaga ttgaggacta ctttccagaa tttgctcgct
1021 aactactcc tgaggatgct actcccagc ccggagagga cccacgcgtg acccgggcca
1081 agtacttcat tcgagatgag tttctgagga tcagcactgc cagtggagat gggcgtcact
1141 actgctacc ccatctcacc tgcgctgtgg aactgagaa catccgccgt gtgttcaacg
1201 actgccgtga catcattcag cgcctgcacc ttcgtcagta cgagctgctc taagaagga
1261 acccccaaat ttaattaaag ccttaagcac aattaattaa aagtgaacg taattgtaca
1321 agcagttaat caccacccat agggcatgat taacaaagca acctttccct tccccgagt
1381 gattttgcga aacccccctt tcccttcagc ttgcttagat gttccaaatt tagaaaagctt
1441 aaggcggcct acagaaaaag gaaaaaaggc cacaaaagtt ccctctcact ttcagtaaaa
1501 ataaataaaa cagcagcagc aaacaaataa aatgaaataa aagaaacaaa tgaataaat
1561 attgtgttgt gcagcattaa aaaaaatcaa aataaaaatt aatgtgagc aaag

```

5. REFERÈNCIES

Ahrens, M., Ankenbauer, T., Schroder, D., Hollnagel, A., Mayer, H. and Gross, G. (1993). Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol.* 12, 871-880.

Albright, S. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89: 773–779.

Arun, Seth., Barbara, K. Lee., Shirley, Q.I and Calvin, P.H. (2000). Coordinate expression of novel genes during osteoblast differentiation. *J. Bone and Miner Res.* 15, 9.

Barlow, D. P. (1997). Competition—A common motif for the imprinting mechanism? *EMBO J.* 16: 6899–6905.

Bauer, R., Ischia, R., Marksteiner, J., Kapeller, I., and Fischer-Colbrie, R. (1999). Localization of neuroendocrine secretory protein 55 messenger RNA in the rat brain. *Neuroscience* 91: 685–694.

Bellows, C.G., and Aubin, J.E. (1989). Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.* 133, 8.

Ben-Porath, I., and Cedar, H. (2000). Imprinting: focusing on the center. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:550–554.

Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S. and Owen, M. E. (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* 102, 341-351.

- Beresford, J.N., Graves, J.E and Smoothy, C.A. (1993). Formation of mineralized nodules by bone-derived cells in vitro: a model of bone formation. *Am. J. Med. Genet.* 45, 163.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., De Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–89.
- Bianco, P., Cancedda, R. (1998). Bone formation via cartilage models: the border-line chondrocyte. *Matrix Biol* 17: 185-192).
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Yatani, A., Okabe, K., Mattera, R., Sanford, J., Codina, J., Brown, A.M and J. Brown, A.M. (1990). Roles of G proteins in coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. *Crit Rev Biochem Molec Bio* 24:225-44.
- Boden SC., et al. (1997) Glucocorticoid-induced differentiation of fetal rat calvarial osteoblasts is mediated by bone morphogenetic protein-6. *Endocrinology* 138:2820–2828.
- Bouwmeester, T., Kim, S-H and De Robertis, E.M. (1996). Cerberus is a head-inducing secreted factor expressed in the anterior endoderm of Spemann's organizer. *Nature* 382:595–601.
- 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.
- Burkhardt, R., Kettner, G., Bohm, W., Schmidmeier, M., Schlag, R., Frisch, B., Mallmann, B., Eisenmenger, W. and Gilg, T. (1987). Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis, and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8, 157-164.

Carpenter, D., Stone, D. M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A. and de Sauvage, F. J. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13630-13634.

Celeste AJ., et al. (1990). Identification of transforming growth factor B family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9843–9847.

Chan, G. K., D., G. and Karaplis, A. C. (1999). PTHrP inhibits adipogenesis by downregulating PPAR γ activity via MAP kinase signaling. *J. Bone Miner. Res.* 14, Suppl. 1, S136.

Chan, G. K., Miao, D., Deckelbaum, R., Bolivar, L., Karaplis, A. C. and Goltzman, D. (2000). PTHrP reciprocally inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis in pluripotent mesenchymal cells. *J. Bone Miner. Res.* 15, Suppl 1, S165.

Chang, S., Hoang, B., Thomas, J and Moos, M. (1994). Cartilage-derived morphogenetic proteins: New members of the transforming growth factor-b superfamily expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem* 269: 28227–28234.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.

Cohen, R.B., Hahn, G.V, Tabas, J.A., Peeper, J., Levitz, C.L., Sando, A and Sando, N. (1993). The natural history of heterotopicossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. A study of forty-four patients. *J Bone Joint Surg Am* 75:215–219.

Cohn, M.J and Tickle, C. (1996). Limbs: a model for pattern formation within the vertebrate body plan. *Trends Genet*, 12:253-258.

Connor, J.M and Evans, D.A.P. (1982a). Fibrodysplasia ossificans progressiva: the clinical features and natural history of 34 patients. *J Bone Joint Surg Br* 64:76–83———
(1982b) Genetic aspects of fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Med Genet* 19:35–39.

Connor, J.M, Skirton, H and Lunt, P.W. (1993). A three generation family with fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Med Genet* 30:687–689

Cooke, J. (1995). Morphogens in vertebrate development: how do they work? *Bioassays* 17, 93-96.

Culbertson, M.R. (1999). RNA surveillance: unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genetics* 15:74-80.

Davies, S.J., and Hughes, H.E. (1993). Imprinting in Albright's hereditary osteodystrophy. *J. Med. Genet.*30:101–103.

De Robertis, E.M., Larrain J., M& Wessely, O. (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature Rev. Genet.* 1, 171-181.

De Winter J.P., et al. (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol Cell Endocrinol* 116:105–114.

Delatycki, M and Rogers, J.G. (1998). The genetics of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 346:15–18.

Duax, W.L and Ghosh, D. (1997). Structure and function of steroid dehydrogenases involved in hypertension, fertility, and cancer. *Steroids* 62:95–100.

Derynck, R., Zhang, Y. and Feng, X. H. (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95, 737-740.

D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A. and Howard, G. A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1115-1122.

Dominguez, M., Brunner, M., Hafen, E. and Basler, K. (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein Cubitus interruptus. *Science* 272, 1621-1625.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747–754.

Ducy, P and Karsenty, G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 10:614–619.

Dudley, A., Lyons, K and Robertson, E. (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9:2795–2807.

Emery, AEH (ed). (1999). *Neuromuscular disorders: clinical and molecular genetics*. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp 289–321.

Farfel, Z., Bourne, H.R and Iiri, T. (1999). The expanding spectrum of G proteins diseases. *N Engl J Med.*, 340:1012-20.

Ferguson CA., et al. (1998). Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev* 12:2636–2649.

Fietz, M. J., Concordet, J. P., Barbosa, R., Johnson, R., Krauss, S., McMahon, A. P., Tabin, C. and Ingham, P. W. (1994). The hedgehog gene family in *Drosophila* and vertebrate development. *Development Suppl.*, 43-51.

Funaba, M., Murata, T., Takahashi M and Torii K. (1997). Suppressed bone induction by follistatin in spontaneously hypercholesterolemic rat bone. *Life Sci* 61:653–658.

Funaba, M., et al. (1996). Follistatin and activin in bone: Expression and localization during endochondral bone development. *Endocrinology* 137:4250–4259.

Gannon, F.H., Kaplan, F.S., Olmsted, E., Finkel, G.C., Zasloff, M and Shore, E. (1997). Bone morphogenetic protein (BMP) 2/4 in early fibromatous lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Hum Pathol* 28:339–343.

Gannon, F.H., Valentine, B.A., Shore, E.M., Zasloff, M,A and Kaplan, F.S. (1998). Acute lymphocytic infiltration in extremely early lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 346:19–25.

Gazzerro, E., Gangji, V and Canalis, E. (1998). Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 102:2106–2114.

Gejman, P. V., Weinstein, L. S., Martinez, M., Spiegel, A. M., Cao, Q., Hsieh, W. T., Hoehe, M. R., and Gershon, E. S. (1991). Genetic mapping of the Gs-alpha subunit gene (GNAS1) to the distal long arm of chromosome 20 us polymorphism detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 9: 782–783.

Ghosh-Choudhury, N., et al. (1994). Expression of the BMP 2 gene during bone cell differentiation. *Crit Rev EukaryotGene Expr* 4:345–355.

Glaser, D.L, Rocke, D.M and Kaplan, FS. (1998). Catastrophic falls in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 346:110–116 Hogan BL .(1996a). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10: 1580–1594 ——— (1996b). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* 6:432–438.

Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Belmonte JC and Choe S. (2002). Structural basis of BMP signaling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* Dec 12; 420(6916):613-4.

Gurdon, J.B and Bourillot, P.-Y. (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature*. Vol 413.

Hammerschmidt, M., Brook, A. and McMahon, A. P. (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 13, 14-21.

Hashimoto, M., Shoda, A., Inoue, S., Yamada, R., Kondo, T., Sakurai, T., Ueno, N and Muramatsu, M. (1992). Functional regulation of osteoblastic cells by the interaction of activin-A with follistatin. *J Biol Chem* 267:4999–5004.

Hashimoto, O., Nakamura, T., Shoji, H., Shimasaki, S., Hayashi, Y., and Sugino, H. (1997). A novel role of follistatin, an activinbinding protein, in the inhibition of activin actions in rat pituitary cells. *J Biol Chem* 272:13835–13842.

Hayward, B.E., et al. (1998a). The human GNAS1 gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 95:10038–10043.

Hayward, B.E., Moran, V., Strain, L and Bonthron, D.T. (1998b). Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:15475–15480.

Hayward, B. E., and Bonthron, D. T. (2000). An imprinted antisense transcript at the human GNAS1 locus. *Hum. Mol. Genet.* 9: 835–841.

Hayward, B.E., et al. (2001). Imprinting of the G α gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J.Clin. Invest.* 107:R31–R36.

-
- Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.
- Helder M., et al. (1995). Expression pattern of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in human and mouse development. *J Histochem Cytochem* 43:1035–1044.
- Hoffman, C., Luo, G., Balling, R., Karsenty, G. (1996). Analysis of limb patterning in BMP-7 deficient mice. *Dev Genet* 19:43–50.
- Hogan, B.L. (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580–1594.
- Hoodless, P.A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M.B., Attisano, L and Wrana, J.L. (1996). *Madr1*, a Mad-related protein that functions in *Bmp2* signaling pathways. *Cell* 85: 489–500.
- Hsu, D.R., et al.(1998). The *Xenopus* dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1:673–683.
- Hu, J. F., Balaguru, K. A., Ivaturi, R. D., Oruganti, H., Li, T., Nguyen, B. T., Vu, T. H., and Hoffman, A. R. (1999). Lack of reciprocal genomic imprinting of sense and antisense RNA of mouse insulin-like growth factor II receptor in the central nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 604–608.
- Hu, J. F., Nguyen, P. H., Pham, N. V., Vu, T. H., and Hoffman, A. R. (1997). Modulation of *Igf2* genomic imprinting in mice induced by 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation. *Mol. Endocrinol.* 11: 1891–1898.
- Hu, J. F., Vu, T. H., and Hoffman, A. R. (1996). Promoter-specific modulation of insulin-like growth factor II genomic imprinting by inhibitors of DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 271: 18253–18262.

- Hughes, F. J., Collyer, J., Stanfield, M and Goodman, S.A. (1995). The effects of bone morphogenetic protein-2, -4, and -6 on differentiation of rat osteoblast cells in vitro. *Endocrinology* 136:2671–2677.
- Hurle, J.M and Colombatti, A. (1996). Extracellular matrix modifications in the interdigital spaces of the chick embryo mesenchymal condensations and expression of NCAM. *Dev Biol* 155:545–557.
- Ingham, P. W. (1998). Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* 17,3505-3511.
- Ischia, R., Lovisetti-Scamihorn, P., Hogue-Angeletti, R., Wolkersdorfer, M., Winkler, H., and Fischer-Colbrie, R. (1997). Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromograninlike precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 272: 11657–11662.
- Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M and Kurisu, K. (1999). Actions of hedgehog proteins on skeletal cells. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 10, 477-486.
- Janoff, H.B., Zasloff, M and Kaplan, F.S. (1996). Submandibular swelling in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Otolaryngol Head Neck Surg* 114:599–604.
- Jinno, Y., Sengoku, K., Nakao, M., Tamate, K., Miyamoto, T. T. M., Sutcliffe, J. S., Anan, T., Takuma, N., Nishiwaki, K., Ikeda, Y., Ishimaru, T., Ishikawa, M., and Niikawa, N. (1996). Mouse/human sequence divergence in a region with a paternal-specific methylation imprint at the human H19 locus. *Hum. Mol. Genet.* 5: 1155–11561.
- Jong, M. T., Carey, A. H., Caldwell, K. A., Lau, M. H., Handel, M. A., Driscoll, D. J., Stewart, C. L., Rinchik, E. M., and Nicholls, R. D. (1999a). Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader–Willi syndrome genetic region. *Hum. Mol. Genet.* 8: 795–803.

Jong, M. T., Gray, T. A., Ji, Y., Glenn, C. C., Saitoh, S., Driscoll, D. J., and Nicholls, R. D. (1999b). A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader–Willi syndrome critical region. *Hum. Mol. Genet.* 8: 783–793.

Juppner, H., Brown, E.M and Kronenberg, H.M. (1999). Parathyroid Hormone, In: Favus MJ(ed.) *Primer on the metabolic bone Diseases and Disorders of mineral metabolism*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, U.S.A., pp 80-87.

Kameda, T., Kioke, C., Kuroiwa, A and Iba, H. (1999). Developmental patterning in chondrocytic cultures by morphogenic gradients: BMP induces expression of Indian hedgehog and Noggin. *Genes Cells* 4:175–184.

Kaplan, F.S., Tabas, J.A and Zasloff, M.A. (1990). Fibrodysplasia ossificans progressiva: a clue from the fly? *Calcif Tissue Int* 47:117–125.

Kaplan, F.S., McCluskey, W., Hahn, G., Tabas, J.A., Muenke, M and Zasloff, M.A. (1993a). Genetic transmission of fibrodysplasia ossificans progressiva: report of a family. *J Bone Joint Surg Am* 75:1214–1220.

Kaplan, FS., Tabas, JA., Gannon, FH., Finkel, G., Hahn, GV., and Zasloff, M.A. (1993b). The histopathology of fibrodysplasia ossificans progressiva: an endochondral process. *J Bone Joint Surg Am* 75:220–230.

Kaplan, F.S., Delatycki, M., Gannon, F.H., Rogers, J.G., Smith, R and Shore, E.M. (1998). Fibrodysplasia ossificans progressiva. In Emery, AEH (ed) *Neuromuscular disorders: clinical and molecular genetics*. John Wiley & Sons, Chichester, England, pp 289–321.

Katsuura, M., Hosono-Sakuma, Y., Wagatsuma, M., Yanagisawa, S., Okazaki, M. and Kimura, M. (1999). The NH₂-terminal region of the active domain of sonic hedgehog is necessary for its signal transduction. *FEBS Lett.* 447, 325-328.

Kawabata, M., Imamura, T. and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 49-61.

Kawabata, M. and Miyazono, K. (2000). Bone morphogenetic proteins. In *Skeletal Growth Factors* (ed. E. Canalis). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (in press).

Kehlenbach, R. H., Matthey, J., and Huttner, W. B. (1994). XL alphas is a new type of G protein. *Nature* 372: 804–809.

Kingsley, D.M., Bland, A., Grubber, J., Marker, P., Russell, L., Copeland, N and Jenkins, N. (1992). The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF- β superfamily. *Cell* 71:399–410.

Kingsley, D.M. (1994). The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8:133–146.

Kirman, I., Vainer, B and Nielsen, O.H (1998). Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. *Inflamm Res* 47:285–289.

Kinto, N., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Noji, S., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Kataoka, H., Wada, Y., Yuhao, G., Takahashi, H. E. et al. (1997). Fibroblasts expressing Sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Lett.* 404, 319-323.

Kretzschmar, M and Massague, J. (1998). SMADs: mediators and regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8:103–111.

Kruglyak L, Daly M.J, Reeve-Daly M.P, Lander E.S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58:1347–1363.

Kusssmaul W.G., Esmail AN., Sagir, Y., Ross, J., Gregory, S and Kaplan, F.S.(1998). Pulmonary and cardiac function in advanced fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 346:104–109.

Lalande M. Imprints of disease at GNAS1. (2001). *J. Clin. Invest* 107: 7

Lanchoney, T.F., Olmsted, E.A., Shore, E.M., Gannon, F.H., Zasloff, M.A., Rosen, V and Kaplan, F.S.(1998). Characterization of bone morphogenetic protein-4 receptors in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 346:38–45.

Lechleider RJ, de Caestecker MP., et al. (1996). Serine phosphorylation, chromosomal localization, and transforming growth factor-beta signal transduction by human bsp-1. *J Biol Chem* 271:17617–17620

Lee, M. P., DeBaun, M. R., Mitsuya, K., Galonek, H. L., Brandenburg, S., Oshimura, M., and Feinberg, A. P. (1999). Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith–Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5203–5208.

Levine, M., Ahn, T., Klupt, S., Kaufman, K., Smallwood, P., Bourne, H., Sullivan, K., and Van Dop, C. (1988). Genetic deficiency of the alpha subunit of the guanine nucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 617–621.

Levitz, C.L., Cohen, R.B., Zasloff, M.A and Kaplan, F.S. (1992). The role of prostaglandins in the pathogenesis of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Calcif Tissue Int* 50:387.

-
- Liu, J., Yu, S., Litman, D., Chen, W., and Weinstein, L.S. (2000). Identification of a methylation imprint mark within the mouse *Gnas* locus. *Mol. Cell. Biol.* 20:5808–5817.
- Liu, J., et al. (2000). A *GNAS1* imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. *J. Clin. Invest.* 106:1167–1174.
- Luchetti W., et al. (1996). Severe restriction in jaw movement after routine injection of local anesthetic in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 81:21–25
- Luo, G., Hofmann, C., Bronckers, ALJJ., Sohocki, M., Bradley., A and Karsenty, G. (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* 9:2808–2820.
- Luyten, F., Chen, P., Paralkar, V and Reddi, A.(1994). Recombinant bone morphogenetic protein-4, transforming growth factor-b1 and activin A enhance the cartilage phenotype of articular chondrocytes in vitro. *Exp Cell Res* 210:224–229.
- Macias D., et al. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* 124:1109–1117.
- 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.
- Marigo, V., Davey, R. A., Zuo, Y., Cunningham, J. M. and Tabin, C. J. (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384, 176-182.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597–641.

Massague, J. and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGFbeta/Smad signaling system. *EMBO J.* 19, 1745-1754.

Mathews, L.S and Vale, W.W. (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65:973–982.

Matzuk, M., et al. (1995). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374: 354–356.

Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A.N and Wang X. (1999a). Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol* 206:33–45.

Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Gan~ an, Y., Economides, A. N., and Hurle, J. M. (1999b). The BMP antagonist gremlin regulate outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development* 126, 5515–5522.

Miyazono, K. (2000). Positive and negative regulation of TGF-b signaling. *Journal of Cell Science* 113, 1101-1109.

Micheala, A., Aldred and Richard, C. Trembath. (2000). Activating and Inactivating Mutations in the Human GNAS1 Gene. *Human Mutation* 16:183.189.

Minabe-Saegusa, C., Saegusa, H., Tsukahara, M and Noguchi S. (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC (protein related to DAN and cerberus) identified by a gene trap approach. *Dev Growth Differ* 40:343–353.

Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M. P., Katoh, M., Schulz, T. C., Kugoh, H., Yoshida, M. A., Niikawa, N., Feinberg, A. P., and Oshimura, M. (1999). LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.* 8:1209–1217.

- Moore, T., Constanica, M., Zubair, M., Bailleul, B., Feil, R., Sasaki, H., and Reik, W. (1997). Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse *Igf2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12509–12514.
- Murone, M., Rosenthal, A. and de Sauvage, F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr. Biol.* 9, 76-84.
- Murtaugh, L. C., Chyung, J. H. and Lassar, A. B. (1999). Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev.* 13, 225-237.
- Nagamine, T., et al. (1998). Immunohistochemical detection of activin A, follistatin, and activin receptors during fracture healing in the rat. *J Orthop Res* 16:314–321.
- Nakamura, T., Aikawa, T., Iwamoto-Enomoto, M., Iwamoto, M., Higuchi, Y., Pacifici, M., Kinto, N., Yamaguchi, A., Noji, S., Kurisu, K. et al. (1997). Induction of osteogenic differentiation by hedgehog proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 465-469.
- Neumann, C and Cohen, S. (1997). Morphogens and pattern formation. *Biossays* 19, 721-729.
- Nuttall, M. E., Patton, A. J., Olivera, D. L., Nadeau, D. P. and Gowen, M. (1998). Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Miner. Res.* 13, 371-382.
- Olmsted, E.A., Liu, C., Haddad, J.G., Shore, E.M and Kaplan, F.S. (1996). Characterization of mechanisms controlling bone morphogenetic protein-4 message expression in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res* 11:S164.

Otto, F., et al. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765–771.

Patten, J.L., et al. (1990). Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 322:1412–1419.

Pages, F and Kerridge, S. (2000). Morphogen gradients. A question of time or concentration? *Trends Genet.* 16. 40-44.

Pearce, J.J.H., Penny, G and Rossant, J. (1999). A mouse *cerberus/dan*-related gene family. *Dev Biol* 209:98–110.

Pereira, R.C., Rydziel, S and Canalis, E. (2000). Bone morphogenetic protein-4 regulates its own expression in cultured osteoblasts. *J Cell Physiol* 182:239–246.

Perrimon, N. (1995). Hedgehog and beyond. *Cell* 80, 517-520.

Peters, J., Wroe, S. F., Wells, C. A., Miller, H. J., Bodle, D., Beechey, C. V., Williamson, C. M., and Kelsey, G. (1999). A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3830–383.

Pfeifer, K. (2000). Mechanisms of genomic imprinting. *Am. J. Hum. Genet.* 67:777–787.

Piccolo, S., Sasai, Y and Lu, B. (1996). De Robertis EM Dorsoventral patterning in xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86:589–598.

Piccolo, S., Agius, E and Leys, L. (1999). The head inducer *cerberus* is a multifunctional antagonist of nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397:707–710.

Pichaud, F., Delage-Mourroux, R., Frenkian, M., Frenco, J.L., Roux, S., de Vernejoul, M.C and Jullienne, A. (1997a). Type-I 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase: role in macrophage/osteoclast differentiation. *Adv Exp Med Bio* 433:399–402.

Pichaud F., et al. (1997b) Chromosomal localization of the type-I 15-PGDH gene to 4q34-q35. *Hum Genet* 99:279–281.

Pitsillides, A.A, and Edwards, J.C.W. (1995). Alterations in hyaluronan synthesis during developing joint cavitation. *J Histochem Cytochem* 43:263–273.

Podos, S.D and Fergusson, EL. (1999). Morphogen gradients: new insight from DPP. *Trends Genet.* 15, 396-402.

Preece, M.A., and Moore, G.E. (2000). Genomic imprinting, uniparental disomy and foetal growth. *Trends Endocrinol. Metab.* 11:270–275.

Puzas, J and Band, J. (1985). Bone cell phosphotyrosine phosphate: characterization and regulation by calcitropic hormones. *Endocrinology* 116:2463–2468.

Quarless, L.D and Siddhanti, S.R. (1996). Guanine nucleotide binding-protein coupled signaling pathway regulation of osteoblast-mediated bone formation. *J Bone Miner Res* 11: 1375-1383).

Quarles, L.D., yohay, D.A., Lever, L.W and Caton, R. (1992). Distinc proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7:683-92.

Ringel, M.D., Schwindinger, W.F and Levine, M.A (1996). Clinical implications of genetic defects in G proteins. The molecular basis of McCune-Albright syndrome and Albright hereditary osteodystrophy. *Medicine* 75: 171-184.

-
- Roberts V and Barth, S. (1994). Expression of messenger ribonucleic acids encoding the inhibin/activin system during mid- and late-gestation rat embryogenesis. *Endocrinology* 134:914–923.
- Rocke, D.M., Zasloff, M., Peeper, J., Cohen, R.B and Kaplan, F.S. (1994). Age-and joint-specific risk of initial heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 301:243–248.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-1307.
- Rougeulle, C., Cardoso, C., Fontes, M., Colleaux, L., and Lalande, M. (1998). An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat. Genet.* 19: 15–16.
- Ruiz and Altaba, A. (1997). Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* 90, 193-196.
- Schlesinger, S., Zasloff, M.A., et al. (1995). Mild expression of fibrodysplasia ossificans progressiva: a report of 3 cases. *J Rheumatol* 22:976–978.
- Schmitt, J.M., Hwang, K., Winn, S.R and Hollinger, J.O. (1999). Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res*17:269–278.
- Schroeder, H.W and Zasloff, M. (1980). The hand and foot malformations in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Johns Hopkins Med J* 147:73–78.
- Shafritz, AB., et al. (1996). Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *N Engl J Med* 335:555–561.

Shah, P.B., Zasloff, M.A., Drummond, D and Kaplan, F.S (1994). Spinal deformity in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Joint Surg Am* 76:1442–1450.

Shimizu, K Y., et al (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755–764.

E. M. Shore., M.-q. Xu, P. B., Shah, H. B., Janoff, G. V and Hahn, M. A. (2000). The Human Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4) Gene: Molecular Structure and Transcriptional Regulation. *Calcif Tissue Int* (1998) 63:221–229.

Smith, R. (1998). Fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva: clinical lessons from a rare disease. *Clin Orthop* 346:7–14.

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.

Stanley, E. (1998). DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* cerberus. *Mech Dev* 77:173–184.

St-Jacques, B., Hammerschmidt, M and McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13, 2072-2086.

Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H. et al. (1996). The tumour-suppressor gene *patched* encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129-134.

Stott, N. S. and Chuong, C. M. (1997). Dual action of sonic hedgehog on chondrocyte hypertrophy: retrovirus mediated ectopic sonic hedgehog expression in limb bud

micromass culture induces novel cartilage nodules that are positive for alkaline phosphatase and type X collagen. *J. Cell Sci.* 110, 2691-2701.

Stottmann, R., Anderson, R., and Klingensmith, J. (2001). The BMP Antagonist Chordin and Noggin have Essential but Redundant Roles in Mouse Mandibular Outgrowth. *Dev. Biol.* 240, 457-473.

Tabin, C.J. (1991). Retinoids, homeoboxes, and growth factors: toward molecular models for limb development. *Cell*, 66:199-217.

Teillet, M., Watanabe, Y., Jeffs, P., Duprez, D., Lapointe, F. and Le Douarin, N. M. (1998). Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development* 125, 2019-2030.

Tenenbaum, H.C., et al. (1992). Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by beta-glycerolphosphate in chick periosteal cultures.

Thomas, J.T., Boot-Handford, R.P and Grant, M.E. (1990). Modulation of type X collagen gene expression by calcium beta-glycero-phosphate and levamisole: implications for a possible role for type X collagen in endochondral bone formation. *J Cell Sci* 95:639-648.).

Thies, R.S., et al. (1992). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells. *Endocrinology* 130:1318-1324.

Thorogood, P. (1993). Differentiation and morphogenesis of cranial skeletal tissues. In *The Skull*. Edited by J Hanken, BK Hall. Chicago:University of Chicago Press;

Tilghman, S. M., Bartolomei, M. S., Webber, A. L., Brunkow, M. E., Saam, J., Leighton, P. A., Pfeifer, K., and Zemel, S. (1993). Parental imprinting of the H19 and Igf2 genes in the mouse. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58: 287-295.

Timothy S. Gardner and James J. Collins. (2000). Neutralizing noise in gene networks. *Nature*. Vol 405. 1.

Topol, L. Z., Marx, M., Laugier, D., Bogdanova, N. N., Boubnov, N. V., Clausen, P. A., Calothy, G., and Blair, D. G. (1997). Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4801–4810.

Topol, L. Z., Modi, W. S., Koochekpour, S., and Blair, D. G. (2000b). DRM/GREMLIN (CKTSF1B1) maps to human chromosome 15 and is highly expressed in adult and fetal brain. *Cytogenet. Cell Genet.* **89**, 79–84.

Torii, Y., Hitomi, K and Tsukagoshi, N. (1996). Synergistic effect of BMP2 and ascorbate on the phenotypic expression of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol cell Biochem* 165:25-29)

Valenzuela, D.M., Economides, A.N., Rojas, E., Lamb, T.M, Nunez, L., Jones, P., Ip, N.Y., Espinosa, III. R., Brannan, C.I., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., LeBeau, M.M., Harland, R.M and Yancopoulos, G.D. (1995). Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15:6077–6084

Virdi, A.S., et al (1999). Phenotypic and molecular heterogeneity in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Calcif Tissue Int* 65:250–255.

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. and Tabin, C. J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622.

Vu, T. H., and Hoffman, A. (1996). Alterations in the promoterspecific imprinting of the insulin-like growth factor-II gene in Wilms' tumor. *J. Biol. Chem.* 271: 9014–9023.

Vu, T. H., and Hoffman, A. R. (1994). Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature* 371: 714–717.

Vu, T. H., and Hoffman, A. R. (1997). Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat. Genet.* 17:12–13.

Wang, E. A., Israel, D. I., Kelly, S. and Luxenberg, D. P. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 9, 57-71.

Weinstein, L., Gejman, P., Friedman, E., Kadowaki, T., Collins, R., Gershon, E., and Spiegel, A. (1990). Mutations of the Gs alphasubunit gene in Albright hereditary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8287–8290.

Weinstein, L.S., et al. (1990). Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:8287–8290.

Weinstein, L.S., and Yu, S. (1999). The role of genomic imprinting of Galpha in the pathogenesis of Albright hereditary osteodystrophy. *Trends Endocrinol. Metab.* 10:81-85.

Weinstein, LS., et al (1992). A heterozygous 4bp deletion mutation in the Gs alpha gene (GNAS1) in a patient with Albright hereditary osteodystrophy. *Genomics* 13: 1319-1321.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., et al. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242:1528–1534

Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J. and Spiegelman, B. M. (1999). Crossregulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151-158.

Wroe, S. F., Kelsey, G., Skinner, J. A., Bodle, D., Ball, S. T., Beechey, C. V., Peters, J., and Williamson, C. M. (2000). An imprinted transcript, antisense to *Nesp*, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3342–3346.

Xu, M-Q and Shore, E.M. (1998). Mutational screening of the bone morphogenetic protein 4 gene in a family with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Orthop* 346:53–58.

Xu, M-Q., et al. (2000). Linkage exclusion and mutational analysis of the *noggin* gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Clin Genet*: 58: 291–298.

Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., Accili, D., Westphal, H., and Weinstein, L. S. (1998). Variable and tissue specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alphasubunit (*Gsalpha*) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the *gsalpha* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8715–8720.

Young, H.E., Steele, T.A., Bray, R.A., Hudson, J, Floyd, J.A, Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J and Black, A.C. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *AnatRec.* Sep1;264(1):51-62.

Young HE, Ceballos EM, Smith JC, Mancini ML, Wright RP, Ragan BL, Bushell I, Lucas PA. (1993). Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* Sep; 29A(9):723-36.

Young HE, Duplaa C, Young TM, Floyd JA, Reeves ML, Davis KH, Mancini GJ, Eaton ME, Hill JD, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Parikh A, Groom J, Hudson J, Black AC Jr. (2001). Clonogenic analysis reveals reserve stem cells in postnatal mammals: I. Pluripotent mesenchymal stem cells. *Anat Rec.* Aug 1;263(4):350-60.

Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC Jr, Reagan CR, Lucas PA. (1995). Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev.*202(2):137-44.

Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276:1268-1272.

Zimmerman, L.B., DeJesus-Escobar, J.M and Harland R.M (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein-4. *Cell* 86:599–606.

Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P., and Zeller, R. (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401, 598–602.

6. AGRAÏMENTS

En aquestes quatre línies m'agradaria expressar el meu agraïment a la multitud de gent que ha fet possible la realització d'aquest treball. Sóc plenament conscient que sense el seu suport i coneixement aquesta tesi hagués estat un repte insuperable.

Al Dr. Simon Mackenzie, Departament de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, director de la tesi doctoral, pels invaluosos consells que em van permetre estructurar racionalment el contingut d'aquest treball.

Al Dr. Lluís Tort, Departament de Fisiologia Animal, Universitat Autònoma de Barcelona. Per la confiança que va posar en mi des del primer moment; per la seva valuosa ajuda, tan científica com personal.

Al Dr. Lluís Rovira, Secretari de Consell Social, Universitat de Girona, tutor i amic, pels bons consells científics que em van ajudar a tenir una perspectiva global més encertada; per les converses, tant a dins com a fora de l'àmbit de treball.

Al Dr. J. Oriol Sunyer, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, tutor de gran vàlua en la primera etapa que em va ajudar a madurar tan a nivell personal com científic.

Al Dr. Paul Billings, School of Medicine, FOP Lab, University of Pennsylvania, tutor i amic, per la seva inacabable paciència per explicar i ajudar. Per saber transmetre en tot moment la magnitud de l'esperit científic.

A la Dra. Lourdes Serrano, School of Medicine, FOP Lab, University of Pennsylvania, amiga i personatge insòlit, per la seva incessant vitalitat i bons consells en moments de poca llum.

Al Dr. Bruno Gran, School of Medicine, University of Pennsylvania, gran amic. Per la guia, les converses i el suport que he rebut durant tot aquests temps, però sobretot per la seva inesgotable habilitat de fer-me sentir bé en tot moment.

A la Nina Bosch, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, companya de pis i amiga, per instruir-me a “saltar” els obstacles que anem patint al llarg del temps; per ser com és.

Als companys del FOP lab, el Dr. Jorge Feldman, en Yanguí, la M-Q, que em van permetre entendre nombroses tècniques de biologia molecular i desxifrar els meus resultats i amb els quals vaig poder comptar en tot moment.

A tota la gent de la Unitat de Fisiologia Animal, especialment al Pep, per el seu suport i acolliment.

A l'Àngels, que em va fer el disseny de nombroses figures, a la Cristins, a en Pavel, a en Tete, a la Roser, a la Clara, a en Robert i als molts amics que he tingut la sort de conèixer, a la facultat, a Girona, a Barcelona i a Philadelphia.

A la meva germana Montse i la seva família, que em van aguantar, recolzar i creure en mi en tot moment, per la força que m'han donat.

Al meu pare, guru de tot exercici intel·lectual, per haver-me estimulat a superar els obstacles acadèmics.

I finalment a la meva mare i a la resta de la meva família, que han estat la meva font d'inspiració, i que sempre han estat prop meu, fent-me costat.

Moltíssimes gràcies