

REGULACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR PER PROTEÏNES MORFOGENÈTIQUES ÒSSIES (BMP)

FRANCESC VENTURA, SANTIAGO AMBROSIO, MÓNICA ESPEJO, TERESA LÓPEZ-ROVIRA I ELISABET CHALAUX

Departament de Ciències Fisiològiques II. Universitat de Barcelona

Adreça per a la correspondència: Unitat de Bioquímica. Departament de Ciències Fisiològiques II. Campus de Bellvitge. Universitat de Barcelona. C/ Feixa Llarga, s/n. 08907 L'Hospitalet de Llobregat. Telèfon 93 402 42 81. Adreça electrònica: *fventura@bellvitge.bvg.ub.es*.

Keywords: Differentiation, bone morphogenetic proteins, bone development, bone regeneration, growth factors

INTRODUCCIÓ

L'organisme humà adult està compost aproximadament d'uns dos-cents tipus de cèl·lules especialitzades. Aquest fet introdueix la necessitat que a partir d'una sola cèl·lula, el zigot, es generin tots aquests diferents tipus cel·lulars durant el desenvolupament de l'embrió i requereix un complex patró d'aparició i progressió de diferents llinatges cel·lulars que té lloc tant en el temps com en l'espai. Aquest procés d'especialització cel·lular, o diferenciació, té lloc en almenys dos estadis. En el primer estadi, o determinació, cèl·lules pluripotencials reben estímuls que les comprometen a una sèrie de llinatges particulars. Després, durant la diferenciació terminal, les cèl·lules inicien una successió temporal de transicions que fan que es produeixi l'expressió de gens que

els conferiran un fenotip específic. Aquest fenomen no només ha de permetre que certes cèl·lules expressin uns determinats gens sinó que, a més, ha de garantir que aquest fenotip es mantingui en el futur i sigui traspassat als descendents.

Les instruccions corresponents a aquests processos han d'activar-se mitjançant el control diferencial de l'expressió gènica per combinacions de factors de transcripció específics de cada tipus cel·lular. L'exemple més ben documentat de gens directores de la diferenciació està constituït pels factors de transcripció miogènics de la família hèlix-llaç-hèlix bàsic (*basic helix-loop-helix*, bHLH). En múscul esquelètic, els factors de la família bHLH MyoD i Myf-5 determinen el llinatge miogènic, mentre MRF4 i miogenina

apareixen posteriorment per completar el programa de diferenciació terminal (Rawls i Olson, 1997). Altres exemples ben documentats d'aquests tipus de control transcripcional estan constituïts pel receptor activat del proliferador peroxisomal γ (PPAR- γ) i els membres de la família de proteïnes que uneixen CCAAT (C/EBP- α) que controlen l'adipogènesi, i el recentment clonat factor CBFA1 com un activador de la diferenciació osteoblàstica (Rodan i Harada, 1997).

L'expressió d'aquests factors de transcripció específics de tipus cel·lular, amb l'activació dels corresponents programes de determinació i diferenciació, està controlada en últim terme per les interaccions de la cèl·lula amb altres cèl·lules, amb la matriu extracel·lular i, molt especialment, amb l'exposició a factors extracel·lulars solubles. Aquests factors solubles determinaran l'expressió gènica adient a les cèl·lules diana i tenen la particularitat que poden crear gradients de concentració a partir del seu punt de secreció. Aquesta forma de comunicació permet a les diferents cèl·lules obtenir informació posicional, «adonar-se» de la seva posició en relació a les altres cèl·lules de l'embrió. Si la concentració supera un cert valor llindar, les cèl·lules diferenciarien en una direcció; si no s'arriba a aquest valor llindar, entraran en un altre programa (Wolpert, 1989). Les cèl·lules, en respondre a diversos senyals d'aquest tipus, integren informacions posicionals en diverses direccions. Cada programa de determinació i diferenciació resultarà de la combinació precisa d'estímuls procedents de diversos gradients de morfogen.

PROTEÏNES MORFÒGENES ÒSSIES (BMP). ESTRUCTURA MOLECULAR I CLASSIFICACIÓ

Entre aquests factors solubles amb propietats d'actuar com a morfogens durant el

desenvolupament embrionari es troben el membres de la família de les proteïnes morfogenètiques òssies (BMP). S'ha demostrat que les BMP controlen diversos processos durant el desenvolupament, com ara proliferació, diferenciació, supervivència, morfogènesi, determinació del llinatge o apoptosi. Malgrat aquesta àmplia varietat d'efectes durant el desenvolupament, les BMP no sols es troben en teixits embrionaris sinó que la seva expressió es manté a molt diversos teixits adults. De fet, el seu aïllament va basar-se, no en els seus efectes com a morfogen, sinó en la propietat que aquesta família de factors presenta, d'induir la regeneració i formació ectòpica d'ossos en diferents models animals (Wozney, 1988). Basant-se en aquesta propietat d'osteoinducció, Wozney *et al.* van purificar factors aïllats de matrius òssies desmineralitzades i varen clonar els primers membres d'aquesta família. Des d'aleshores diversos grups han clonat nous membres de manera que en l'actualitat arriben a ser ja més de 40 isoformes diferents (Hollinger, 1997).

Les BMP pròpiament dites (designades des de BMP-2 fins a BMP-13) i molècules relacionades (com les *growth and differentiation factors*, GDF) pertanyen a la superfamília del factor de creixement transformant beta (TGF β). Aquesta superfamília inclou tant les BMP, les activines i inhibines, la substància inhibidora Mulleriana (MIS) i el factor neurotròfic derivat de glia (GDNF) com els propis TGF β . Les BMP, a l'igual dels altres membres de la superfamília del TGF β , deriven de polipèptids precursors d'entre 396 i 513 aminoàcids. Cada precursor conté un pèptid senyal de secreció a l'extrem amino i una regió a l'extrem carboxi que es troba altament conservada entre tots ells i que representa la forma madura del factor (Ripamonti i Reddi, 1994). Així, aquests factors són processats intracel·lularment, proteolitzats i secretats ja en forma dímera. La forma

madura secretada presenta una sèrie de set cisteïnes, completament conservades entre tots el membres de la superfamília del TGF β , que es creuen importants per al manteniment de l'estructura tridimensional i la configuració dímera del factor (Griffith *et al.*, 1996). En aquest sentit, existeix la possibilitat de trobar tant homo com heterodímers d'aquests factors, la qual cosa permet combinacions múltiples dels monòmers i per tant múltiples activitats biològiques (Aono *et al.*, 1995). Per exemple, s'ha observat que alguns heterodímers poden presentar una activitat biològica més alta mentre, en altres casos, poden actuar com a inhibidors competitius dels homodímers.

Sobre la base de similituds de seqüència, les BMP es poden dividir en tres subfamílies: la primera, formada per BMP-2 i BMP-4 amb un 92 % d'identitat entre ells; el BMP-3, que forma un subgrup per ell mateix, amb un 45 % d'homologia amb els altres, i per últim, del BMP-5 fins al BMP-8, amb un 82 % d'identitat entre ells i un 59 % d'homologia amb els altres grups. Altres membres relacionats amb les BMP inclouen el Vgr1

(homòleg al BMP-6), els GDF 1-10 que es troben implicats en desenvolupament d'os i cartílag i amb la inhibició de la diferenciació muscular (McPherron i Lee, 1997). És important també destacar certs homòlegs de *Drosophila* que han estat importants en la caracterització de les funcions d'aquests factors durant el desenvolupament: *Dpp* (homòleg a BMP-2/4) i 60A (homòleg a la família BMP-5/8) (Gelbart, 1989). La seqüència aminoacídica del BMP-1 indica que no és un membre de la superfamília del TGF β sinó que és una proteasa de la família de tholloid, que pot tenir efectes sinèrgics en osteoinducció per mecanismes d'activació proteolítica dels altres BMP (Wozney, 1988).

TRANSDUCCIÓ DE SENYALS BMP

Tots els membres de la superfamília del TGF β (amb l'excepció del GDNF) inicien les seves accions cel·lulars per unió a receptors amb activitat serina/treonina quinasa. Aquests receptors constitueixen dues subfamílies: receptors tipus I i receptors tipus II. Aquests dos tipus són estructuralment molt similars: contenen un domini extracel·lular amb repeticions de cisteïnes molt conservades, un únic domini transmembrana i un domini citoplasmàtic constituït, quasi exclusivament, pel domini catalític quinasa. La diferència més important entre ells radica en el fet que els receptors tipus I presenten una regió rica en glicines i serines (regió GS) a la regió juxtamembrana (Attisano *et al.*, 1993; Ebner *et al.* 1993; revisat a Ten Dijke *et al.*, 1996). El mecanisme d'activació d'aquests receptors va ser definit en primer lloc pel sistema del TGF β . Aquest mecanisme inclou la capacitat del factor d'unir-se al receptor tipus II específic, que presenta una activitat quinasa constitutiva. El receptor tipus I, incapaç per si sol d'unir el factor, és captat en la formació d'un complex hetero-

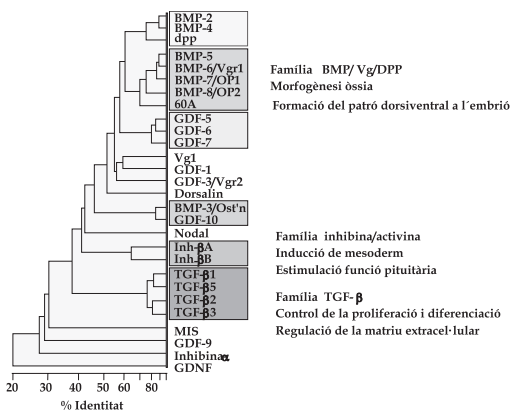


FIGURA 1. Homologia entre els diferents membres de la superfamília del TGF- β . Dendrograma que mostra l'homologia, referida com a percentatge d'identitat d'aminoàcids, entre els membres de la superfamília del TGF- β . A la dreta s'indiquen les activitats biològiques de cada subfamília.

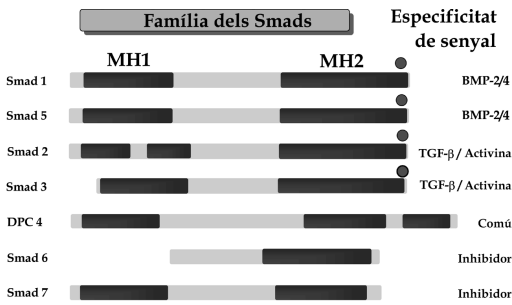


FIGURA 2. Representació dels diferents membres de la família dels *Smad*. Es mostra l'esquema de la seqüència aminoacídica de les diferents isoformes i se n'indiquen les característiques estructurals més importants. Les regions d'homologia MH1 i MH2 es mostren de color més intens. Els llocs de fosforilació a l'extrem carboxiterminal s'indiquen amb un punt. A la dreta s'indiquen les especificitats en la transducció de senyals de cada isoforma.

trimèric. La formació d'aquest complex és suficient per tal que el receptor tipus II activi el receptor tipus I per fosforilació a la seva regió GS (Wrana *et al.*, 1994; Ventura *et al.*, 1994). Aquest model, més l'observació que es poden generar receptors tipus I constitutivament actius per mutacions que imiten la fosforilació de la regió GS, suggereix que les dues subfamílies de receptors actuen en una seqüència ordenada, sent la quinasa del receptor tipus I l'encarregada de transmetre el senyal als transductors intracel·lulars.

La senyalització per BMP difereix en certs aspectes dins d'aquest model. La unió dels BMP amb els seus receptors és cooperativa; ambdós receptors per si sols tenen capacitat d'unir el factor amb baixa afinitat, i junts formen complexos d'alta afinitat. A més, existeixen diversos receptors tipus I (a mamífers BMPR-IA, BMPR-IB i ActR-I) i diversos receptors tipus II (BMPR-II i ActR-II). Cada un dels membres de la superfamília s'uneix amb alta afinitat a una combinació característica de receptors tipus I i II. A més, diferents tipus cel·lulars mostren patrons d'expressió alternatius d'aquests receptors, de manera que es poden generar diferents

respostes cel·lulars per un mecanisme combinatori (ten Dijke *et al.*, 1996).

La recerca dels substrats intracel·lulars d'aquests receptors va conduir a identificar la família dels *Smad* com els transductors que connecten senyals iniciades a la membrana plasmàtica amb els efectes transcripcionals específics per a cada membre de la superfamília del TGFβ. Aquesta identificació es va poder realitzar en aprofitar la versatilitat experimental dels models genètics de *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans*. A *Drosophila*, *Dpp* és l'homòleg de BMP2/4. En un *screening* per trobar potenciadors d'un al·lel feble de *Dpp*, es van aïllar els gens *Mad* i *Medea* i es va comprovar que eren components de la via de transducció que actuaven a un nivell per sota dels receptors de *Dpp* (Raftery *et al.*, 1995). De la mateixa manera es van aïllar els gens *sma-2*, *sma-3* i *sma-4* a *C. elegans*. Per simplificar la nomenclatura en aquesta família es va imposar la denominació híbrida *Smad* per als membres homòlegs d'aquesta família aïllats a mamífers. En l'actualitat s'han aïllat almenys nou gens homòlegs a *Mad* i *Sma* i s'ha comprovat la seva implicació en les vies de transducció dels receptors amb activitat serina/treonina quinasa.

Els *Smad* estan compostos per dues regions amb alta homologia (situades als extrems amino i carboxiterminals i denominades MH1 i MH2 respectivament) que es troben connectades per una regió rica en prolina que és més divergent entre les diferents isoformes (figura 3). Diferents estudis han començat a aclarir les especificitats de senyalització dels diferents *Smad*. Els *Smad* 1, 2, 3 i 5 interaccionen i es fosforilen específicament per diferents receptors tipus I. Els *Smad* 1 i 5 són fosforilats per receptors tipus I activats per BMP2/4 (Hoodless *et al.*, 1996) mentre els *Smad* 2 i 3 són fosforilats pels receptors d'activina i TGFβ tipus I. La fosforilació d'aquests *Smad* té lloc en dues serines

situades a l'extrem carboxiterminal amb la seqüència *consensus* SSXS (revisat a Heldin *et al.*, 1997). Un cop fosforilats, aquests *Smad* s'alliberen del receptor i formen heteroligòmers amb un altre membre de la família *Smad4*. L'*Smad4* presenta unes característiques que el fan especial en el seu mecanisme funcional: no presenta residus fosforilables pels receptors i les seves mutacions, tant en humans com en *Drosophila* (de fet va ser aïllat en primer lloc com un gen supressor tumoral a carcinomes pancreàtics humans), bloquegen la senyalització de tots els membres de la superfamília del TGF β . Això va suggerir que l'*Smad4* era un mitjancer comú de l'acció dels altres *Smad* específics de cada factor i regulats per fosforilació (revisat a Heldin *et al.*, 1997; Kretschmar *et al.*, 1998).

En l'actualitat es treballa amb la hipòtesi que, en l'estat inactiu, el domini MH1 interacciona amb el domini MH2 i impedeix la formació d'heteroligòmers amb l'*Smad4*; la fosforilació de l'extrem carboxi desactivaria aquest mecanisme inhibitori. Estudis cristal·logràfics apunten la possibilitat que els homoligòmers siguin de fet homotrímers i que l'heteroligomerització es produeixi per unió d'aquests homotrímers i doni lloc a heterohexàmers. Aquesta heteroligomerització

induïda per fosforilació produeix la translocació dels complexos cap al nucli cel·lular on s'ha demostrat que els complexos actuen com a activadors transcripcionals.

El panorama d'acció dels *Smad* es completa amb el fet que se n'han clonat tres membres (*Smad 6, 7 i 8; Dad a Drosophila*) que no presenten capacitat transductora sinó que actuen com a inhibidors dels receptors tipus I. Aquests *Smad* mostren una interacció estable amb aquests receptors i no són fosforilables, de manera que actuarien com a dominants negatius impeding la fosforilació dels *Smad* transductors. A més s'ha observat que poden formar heteroligòmers inactius amb l'*Smad4*, de manera que la seva funció inhibidora podria tenir lloc a dos nivells dins la cascada de transducció del senyal (revisat a Kretschmar *et al.*, 1998).

Existeixen nombroses proves que una bona part dels efectes dels membres de la superfamília del TGF β tenen lloc en l'àmbit transcripcional. En alguns casos, s'han identificat els elements de resposta en alguns gens diana d'aquests factors, però en la majoria dels casos encara no hi ha prou dades per saber si els complexos dels *Smad4* amb els *Smad* específics són els efectors directes d'aquests elements. Els estudis realitzats en el gen *Mix.2* de *Xenopus* han demostrat la implicació dels *Smad* com a factors de transcripció. En el cas de *Mix.2*, l'activació transcripcional observada en resposta a activina és mitjançada per l'acció de complexos *Smad2/Smad4* que requereixen la proteïna Fast-1 per tal d'unir-se a la seqüència promotora. Així Fast-1 és el principal component amb capacitat d'unió al DNA. El domini carboxi terminal s'uneix a l'*Smad2* i el domini amino terminal s'uneix a l'*Smad4*, però només en presència de l'*Smad2*. Dins d'aquest complex, serien els dominis MH2 dels *Smad* els que mitjançarien l'activació transcripcional (Chen *et al.*, 1996). Les regions de resposta a activina d'altres gens,

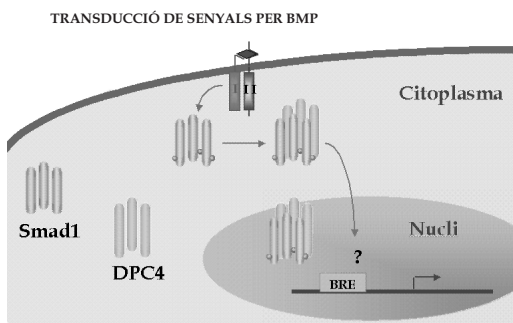


FIGURA 3. Representació dels punts clau en el mecanisme de transducció de senyals mitjançada pels *Smad*. La seqüència inclou la fosforilació pels receptors de membrana, heteromerització amb l'*Smad4* (Dpc4), translocació al nucli i activació transcripcional dels promotors diana.

com *goosecoid*, *Xlim-1* o *XFKHI/XFD-1*, s'han caracteritzat però mostren poca homologia amb la de *Mix.2*. Això suggereix un mecanisme on es pot augmentar la diversitat de senyals per formació de complexos dels *Smad* amb diferents proteïnes amb capacitat d'unió a diferents elements de resposta (Howell *et al.*, 1997). Ben diferent és el cas descrit pel gen *vg* de *Drosophila*, on s'ha observat que el domini amino terminal de l'homòleg *Mad* de *Drosophila* és capaç d'unir-se a l'element de resposta de *Dpp* i és suficient per activar-lo. A més, recentment s'han descrit, per mitjà d'un *screening* d'unió a oligonucleòtids degenerats, seqüències de DNA amb capacitat d'unió directa als *Smad* 3 i 4 (Zawel *et al.*, 1998). En conjunt, aquestes dades indiquen que la regulació transcripcional dels *Smad* comportarà la utilització de diversos components nuclears i que, probablement, diferents gens, amb diferents elements de resposta, respondran a diferents nivells d'expressió dels factors, seguint el model d'activació cel·lular en resposta a un gradient de morfogen postulat per aquesta família de factors.

PAPER DE LES BMP DURANT EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

La formació dels grups cel·lulars que generaran els futurs teixits a l'embrió s'inicia per l'establiment d'un programa regulat de compartimentació molecular i cel·lular. En models de *Xenopus* i *Drosophila*, les molècules que especifiquen la determinació dels eixos a l'embrió són aportades maternalment i es mantenen segregades en el citoplasma de l'ou (Gurdon, 1987). Posteriorment, l'embrió es divideix en diferents regions que interactuen per a la formació de l'eix antero-posterior i l'eix dorsiventral. A vertebrats, tant l'ectoderm com el mesoderm i l'endoderm resulten afectats i adopten destins

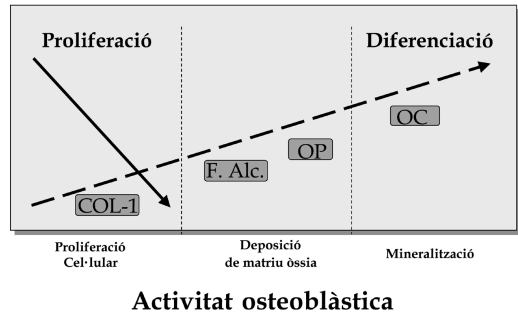


FIGURA 4. Representació del curs temporal en el mecanisme de diferenciació terminal dels osteoblasts. L'expressió progressiva de col·lagen 1 (COL-1), fosfatasa alcalina (F. Alc.), osteopontina (OP) i osteocalcina (OC) indiquen els diferents estadis de progressió de la diferenciació osteoblàstica.

ventrals i dorsals. L'ectoderm dona lloc a l'epidermis com a destí ventral i al sistema nerviós com a dorsal. En canvi el mesoderm forma el mesènquima i el sistema hematopoètic en la zona ventral i el notocordi i el múscul a la zona dorsal.

Experiments d'embriologia clàssica suggerien que el teixit ventral és produït per defecte i que són necessaris senyals addicionals per formar el teixit dorsal. Malgrat aquestes dades, estudis recents en l'àmbit molecular semblen contradir aquests experiments clàssics. La zona ventral seria l'estat actiu i el teixit dorsal resultaria de la inhibició del senyal ventral actiu. Aquests estudis s'han centrat en bona part en el descobriment de la importància de les BMP en els primers estadis del desenvolupament embrionari en vertebrats i del seu paper com a morfogen. S'han implicat les BMP en l'establiment del patró dorsiventral i antero-posterior, en la formació i diferenciació del teixit nerviós i de les somites i en la morfogènesi del ronyó, el budell, els pulmons i de tots els elements del sistema esquelètic (revisat a Graff, 1997).

Després del descobriment de les BMP2/4 com a potents osteoinductors en l'orga-

nisme adult, es va poder comprovar com aquestes BMP2/4 podien complementar funcionalment mutacions del seu homòleg a *Drosophila*, el *Dpp*, que era responsable de la especificació dorsiventral. De la mateixa manera el *Dpp* presentava propietats osteoinductives, fet que suggeria que, salvant les diferències acusades d'espècie, aquests factors podien estar implicats en funcions similars, la importància de les quals quedaria palesa per la seva conservació evolutiva. A partir d'aquests resultats, es va iniciar l'estudi de la funció dels BMP2/4 a diferents models de desenvolupament, en especial oòcits de *Xenopus*. L'addició de BMP-4 exogen o del seu mRNA ventralitzava els embrions i eliminava l'expressió de teixits dorsals; a més, és expressat endògenament per l'embrió a la zona ventral en el temps apropiat per realitzar aquesta tasca. Això suggereix que actuaria com un senyal actiu ventralment i abolint el senyal dorsalitzador. Aquests assajos s'han completat utilitzant formes dominants negatives dels receptors de BMP o del propi BMP (Suzuki *et al.*, 1994). L'absència de senyalització per BMP-4 indueix la dorsalització dels embrions, de manera que es pot suggerir que el BMP-4 indueix estímuls ventrals, i a més, bloqueja altres estímuls dorsalitzadors. Resultats recents indiquen que la capacitat d'induir el fenotip dorsal es produeix per la inhibició de l'efecte del BMP-4 per gens com *noggin* i *chordin*, que poden unir-se amb alta afinitat al BMP-4 i n'inhibeixen la senyalització (Graff *et al.*, 1997).

A més dels seus efectes com a morfogen, les BMP han estat involucrades en la inducció d'apoptosi en estadis més avançats del desenvolupament. Concretament, durant el desenvolupament de les extremitats de pollastre, s'ha comprovat que les BMP induïxen l'apoptosi dels teixits de les regions interdigitals, tant en assajos amb la introducció de matrius que difonen BMP (Macias

et al., 1997) com per sobreexpressió de receptors de BMP dominants negatius (Zou *et al.*, 1996). També el BMP-4 s'expressa i indueix l'apoptosi de certes regions (rombòmers 3 i 5) de la cresta neural (Mehler *et al.*, 1997).

Tots aquests estudis han centrat l'expectació sobre quins seran els papers dels diferents BMP durant el desenvolupament en mamífers. La majoria d'abordatges per resoldre aquestes qüestions se centren en l'estudi d'animals *knock out*. Malgrat això, aquests estudis tenen l'inconvenient que molts d'aquests factors poden tenir efectes equivalents donada la seva similitud estructural i, a més, com que tenen efectes en etapes tan inicials del desenvolupament, si els animals presenten mort embrionària, aquests assajos no permetran indicar quins efectes poden tenir en etapes més avançades. Tot i així tenim dades sobre alguns d'ells. Per exemple, el *knock out* de BMP-2 presenta aberracions en el desenvolupament del cor, mentre el de BMP-7 presenta una incompleta diferenciació dels glomèruls renals i la lent de l'ull (Luo *et al.*, 1995). Mutacions espontànies del GDF-5 (BMP-14) són responsables del fenotip braquipodisme (bp), caracteritzat per disminució de la mida dels ossos, mentre el fenotip orelleta curta (se) produït per mutacions al BMP-5 produeix orelles curtes i canvis a la morfologia de l'estern (revisat a Vortkamp, 1997). La inactivació dels GDF-6 i 7 els implica en la morfogènesi de les articulacions mentre la disrupció del GDF-8, sigui en ratolins o a l'atzar en races de vaques seleccionades durant segles, produeixen un augment de dues a tres vegades de la massa muscular (per aquest motiu aquest gen s'ha anomenat miostatina) (McPherron *et al.*, 1997). Els transductors del senyal dels membres d'aquesta família donen fenotips molt més severos (la inactivació de l'*Smad-2* i l'*Smad-4* impedeix la formació dels teixits embriona-

ris, i la inactivació heterozigota de l'*Smad-4* incrementa la progressió tumoral del càncer colorectal) (Waldrip *et al.*, 1998; Takaku *et al.*, 1998). Tots aquests resultats són una mostra prou àmplia i indicativa de la importància i de les múltiples funcions, durant el desenvolupament de diferents teixits, dels membres d'aquesta família.

BMP I DESENVOLUPAMENT DEL TEIXIT NERVIÓS

En el desenvolupament del teixit nerviós, els BMP 2 i 4 actuen en la creació del llinatge neuronal a partir de les cèl·lules de la cresta neural mitjançant la inducció, entre d'altres, del factor de transcripció específic de neurones Mash-1. L'expressió de Mash-1 es produeix de manera contigua als llocs d'expressió de BMP-2. Aquesta expressió es produeix en els moments adients durant la diferenciació de les neurones. S'ha comprovat que diferents BMP presenten diferents efectes: els BMP 2 i 4 actuen durant el desenvolupament inicial a concentracions moderades mentre els efectes observats pel BMP-7 només es produeixen a altes concentracions. Posteriorment, el BMP-2 i el BMP-6 indueixen un patró diferent d'expressió de diferents neurotransmissors i neuropèptids (revisat a Mehler *et al.*, 1997).

A més d'aquests efectes durant les primeres etapes del desenvolupament nerviós les BMP exerceixen en etapes posteriors altres efectes per a la supervivència i diferenciació terminal dels diferents tipus neuronals. Aquestes observacions es basen en dades que indiquen que l'expressió dels diferents BMP i dels seus receptors es mantenen fins a estadis adults seguint un complex patró regional d'expressió. L'addició de diferents BMP a cèl·lules neuronals poc diferenciades promou la supervivència i la diferenciació en diferents subtipus neuronals

segons el factor, la dosi i les subpoblacions assajades, la qual cosa suggereix que existeix especificitat i una jerarquia d'efectes entre els diferents factors de la família (Paralkar *et al.*, 1992). L'addició de BMP, en molts casos, aconsegueix augmentar la supervivència de les neurones en cultiu i incrementa la longitud i complexitat de les dendrites de, per exemple, subpoblacions de neurones mesencefàliques dopaminèrgiques (Reiriz *et al.*, manuscrit en preparació).

De manera complementària als seus efectes en l'especificació neuronal, els BMP tenen amplis efectes durant el desenvolupament del llinatge astrogliar. Els BMP indueixen l'expressió transitòria de la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP) en astròcits embrionaris amb la consegüent inhibició de la seva proliferació (Jordan *et al.*, 1997). A més s'ha observat que aquests factors indueixen la formació d'astròcits per mitjà de la inducció de la diferenciació astrocitària. Un cop diferenciats, aquests astròcits no requereixen l'exposició continuada a aquest factor per tal de mantenir el seu fenotip, de manera que se suposa que s'activa un sistema autònom intracel·lular que manté aquest fenotip. Aquests efectes sobre glia també es confirmen en experiments amb cèl·lules bipotents (astroglials i oligodendroglials). Aquestes cèl·lules quan són cultivades en medi sense sèrum deriven cap a oligodendròcits, mentre que si es cultiven amb 10 % de sèrum donen lloc a astròcits tipus II. En aquest model s'observa que quan es cultiven en medi sense sèrum però se'ls addicionen BMP, aquestes cèl·lules diferencien, de manera dosiddependent, cap a astròcits tipus II, i s'inhibeix l'expressió de marcadors neuronals i d'oligodendròcits (Mehler *et al.*, 1997). En conjunt aquestes dades indiquen que les BMP i els seus receptors s'expressen i estan implicats en les primeres etapes de la neuralització. Posteriorment, aquests factors tenen papers en la diferen-

ciació terminal de precursors neuronals i astroglials i en l'apoptosi de certes subpoblacions específiques.

BMP I LA MORFOGÈNESI ÒSSIA

Es poden definir dos tipus d'os segons el seu tipus de desenvolupament: l'os intramembranós que es forma directament per cèl·lules òssies a partir de teixit connectiu i forma els ossos del crani i la cara; l'altre tipus d'os, que constitueix la majoria de l'esquelet, es forma a partir de l'agregació i diferenciació de precursors condrogènics fins a formar un cartílag i, posteriorment, aquest model de cartílag és vascularitzat i substituït per cèl·lules òssies en un procés anomenat ossificació endocondral. Aquest os és derivat de les somites que contenen cèl·lules pluripotents mesenquimàtiques que tenen capacitat miogènica, adipogènica, condrogènica i osteogènica. Diferents tipus de senyals i interaccions extracel·lulars determinaran la diferenciació a cada un d'aquests llinatges cel·lulars (revisat a Reddi 1997a). D'entre aquests tipus de senyals, diferents abordatges i dades experimentals indiquen que la senyalització per BMP ocupa un lloc clau en el procés de l'osteogènesi. Les primeres dades provenen del seu descobriment com a inductors de formació de cartílag i os quan s'injectaven subcutàniament en múscul de rates i altres espècies (Wozney *et al.*, 1988). Els BMP a més s'expressen als llocs de formació de cartílag i os durant el desenvolupament embrionari (Hogan, 1996).

En el model de desenvolupament d'extremitats en pollastre, el BMP-4 és induït per *sonic hedgehog*, i és absolutament necessari per a la seva morfogènesi. Els BMP-3 i 4 estimulen la condrogènesi en aquest model, mesurada per marcadors com el col·lagen tipus II i caracterització dels tipus de proteo-

glicans (revisat a Reddi, 1994). Els BMP, i l'expressió dels seus receptors, són també necessaris per al manteniment del fenotip diferenciat i per induir la hipertròfia d'aquest condrocits, punt clau per a la seva substitució per osteoblasts (Enomoto-Iwamoto *et al.*, 1998). Altres evidències són que receptors dominants negatius de BMP bloquegen l'apoptosi interdigital (Zou *et al.*, 1996) o bé que l'addició de matrius contenen BMP recombinats és capaç de produir duplicacions dels dits de l'extremitat en pollastre (Macias *et al.*, 1997).

Aquests factors també actuen induint i potenciant el fenotip de diferenciació terminal dels osteoblasts i són capaços, fins i tot, d'inhibir i transdiferenciar cèl·lules prèviament compromeses a altres llinatges com el miogènica (Chaloux *et al.*, 1998). Les BMP-2,

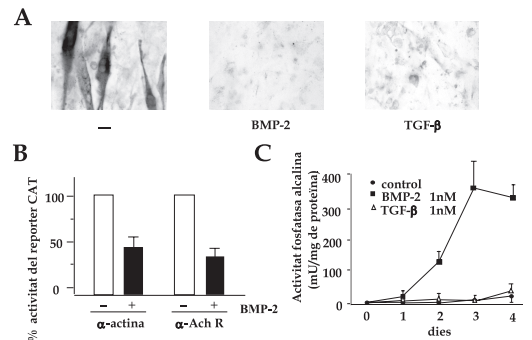


FIGURA 5. Efecte de la BMP-2 sobre la diferenciació de cèl·lules C2C12.

L'addició de BMP-2 o TGF-β bloqueja la diferenciació mioblàstica de les cèl·lules C2C12. A la il·lustració A es mostra una immunofluorescència realitzada amb anticossos contra el marcador muscular miosina de cèl·lules tractades durant 48 hores amb medi de diferenciació (DMEM + 2 % sèrum), o bé aquest medi amb addició de BMP-2 o TGF-β. En la il·lustració B es mostra l'anàlisi de l'activitat CAT de cèl·lules transfectades amb plàsmids reporter sota el control de promotors específics de múscul (α-actina i el receptor d'acetilcolina). Les cèl·lules van ésser tractades com en la il·lustració anterior i l'activitat es representa com a percentatge de l'activitat en absència del factor.

En la il·lustració C es mostren els efectes de BMP-2 o TGF-β sobre la diferenciació osteoblàstica de les cèl·lules C2C12 utilitzant l'activitat fosfatasa alcalina com a marcador.

3, 4, 6 i 7 indueixen l'expressió de marcadors de diferenciació osteoblàstica com fosfatasa alcalina, osteocalcina o col·lagen tipus I en cèl·lules precursors (Reddi, 1994; Asahina *et al.*, 1993). Els BMP poden també transdiferenciar altres tipus cel·lulars d'origen mesenquimàtic, com els mioblasts, en osteoblasts. En aquests processos es produeix la regulació negativa dels factors de transcripció miogènics, com MyoD, miogenina, inducció d'Id, així com la inducció de factors de transcripció com JunB (Katagiri *et al.*, 1994; Chalaux *et al.*, 1998). Recentment, s'ha caracteritzat el factor de transcripció Cbfa1 com l'activador essencial de la diferenciació osteoblàstica. Els animals *knock out* per Cbfa1 moren al poc de néixer a causa de la impossibilitat de respirar deguda a la completa manca d'ossos i a la retenció d'un esquelet cartilaginós. L'anàlisi cel·lular i molecular indicava l'absència completa d'osteoblasts i dels seus marcadors (revisat a Rodan *et al.*, 1997). Mutacions en aquest gen s'han associat amb la displàsia cleidocranial on s'observa ossificació retardada. A cèl·lules precursors, els BMP els indueixen l'expressió d'aquest factor de forma anterior a l'aparició del fenotip diferenciat; estableixen una connexió entre activació de BMP i desenvolupament de la diferenciació osteoblàstica (Ducy *et al.*, 1997).

La morfogènesi de les dents es produeix d'una manera similar a l'osteogènesi. És una combinació d'interaccions inductives entre epiteli i mesènquima dental i factors solubles (revisat a Thesleff *et al.*, 1996). Entre aquests factors implicats també es troben les BMP. L'implant de BMP-2 o 4 en matrius d'agarosa simula moltes d'aquestes interaccions inductives, i produeix sobreexpressió de factors de transcripció com Msx-1, Msx-2 o Egr-1 que són necessaris per al desenvolupament dental (Vainio *et al.*, 1993). BMP-2, 4 i 7 són fortament expressats en els punts de desenvolupament dentari. Recents estudis

indiquen que l'addició de BMP-7 a babuïns indueix lligaments periodontals correctament alineats.

L'os és un dels pocs teixits que es troba en un procés constant de remodelació i que té la capacitat de regeneració. Aquesta regeneració, a l'igual de la formació ectòpica d'os induïda de forma experimental per BMP, és un procés molt similar al desenvolupament endocondral embrionari. Cèl·lules indiferenciades migren al lloc de fractura, diferencien i creen un callus de cartílag que és substituït per osteoblasts que mineralitzen la matriu secretada i regeneren l'estructura fracturada amb teixit idèntic a l'original. Aquesta capacitat de les BMP d'induir regeneració òssia ha posat una gran èmfasi en estudiar les possibles aplicacions terapèutiques d'aquests factors en camps com la traumatologia, la periodontologia o la cirurgia reconstructiva. BMP expressats de forma recombinant i aplicats localment s'han utilitzat de manera experimental en la regeneració de fractures greus i altres defectes a mandíbula, radi, tíbies i altres ossos de tipus llarg i regeneració de dentina i esmalt dental, a molt diverses espècies (revisat a Holliger, 1997; Reddi, 1997b; Lee, 1997). Altres experiments han utilitzat matrius amb vectors d'expressió per aquests factors amb resultats similars (Fang *et al.*, 1996). En l'actualitat s'estan realitzant els primers assajos clínics en humans sobre la capacitat del BMP-2 i 7 d'accelerar la regeneració de fractures greus amb resultats inicials prometedors (Reddi, 1997b). Encara que les BMP es consideren factors de tipus local, és molt probable que també actuïn a nivell sistèmic, la qual cosa podria iniciar l'estudi en la terapèutica de l'osteoporosi, encara que *a priori* la seva utilització a nivell sistèmic pot presentar efectes indesitjables deguts a la multifuncionalitat d'aquesta família de factors. L'increment en la recerca dels mecanismes d'acció i l'aplicació clínica d'aquests factors durant els

darrers anys probablement n' ampliarà les aplicacions en terapèutica regenerativa.

AGRAÏMENTS

Els autors agraeixen al Dr. Ramon Bartrons i al Dr. José Luis Rosa el seu ajut inestimable. Els estudis del grup estan finançats per la DGICYT (PM-0171). L' Elisabet Chalaux i la Mónica Espejo són becàries de la Fundació August Pi i Sunyer (CSIU Bellvitge). La Teresa López-Rovira és becària FPI (Ministeri d' Educació i Cultura).

BIBLIOGRAFIA

- ASAHINA, I.; K. SAMPATH; P. V. HAUSCHKA (1996). «Human OP-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells». *Exp. Cell Res.*, núm. 222, pàg. 38-47.
- ATTISANO, L.; J. CÁRCAMO; F. VENTURA; F. M. B. WEIS; J. MASSAGUÉ; J. L. WRANA (1993). «Identification of human activin anfang TGF- β type I receptors that form heteromeric complexes with type II receptors». *Cell*, núm. 75, pàg. 671-680.
- AONO, A.; M. HAZAMA; K. NOTOYA; S. TAKETOMI; H. YAMASAKI; R. TSUKUDA; S. SASAKI; Y. FUJISAWA (1995). «Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 dimer». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, núm. 210, pàg. 670-677.
- CHALAUX, E.; T. LÓPEZ-ROVIRA; J. L. ROSA; R. BARTRONS; F. VENTURA (1998). «JunB is involved in the inhibition of myogenic differentiation by bone morphogenetic protein 2». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 537-543.
- CHEN, X.; M. RUBOCK; M. WHITMAN (1996). «A transcriptional partner for Mad proteins in TGF- β signalling». *Nature*, núm. 383, pàg. 691-696.
- DUCY, P.; R. ZHANG; V. GEOFFROY; A. RIDALL; G. KARSENTY (1997). «Osif2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation». *Cell*, núm. 89, pàg. 747-754.
- EBNER, R.; R. CHEN; L. SHUM; S. LAWLER; T. ZIONCHECK; A. LEE; A. LÓPEZ; R. DERYNCK (1993). «Cloning of a type I receptor and its effects on TGF- β binding to the type II receptor». *Science*, núm. 260, pàg. 1344-1348.
- ENOMOTO-IWAMOTO, M.; M. IWAMOTO; Y. MUKUDAI; Y. KAWAKAMI; T. NOHNO; Y. HIGUCHI [et al.] (1998). «BMP signalling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes». *J. Cell. Biol.*, núm. 140, pàg. 409-418.
- FANG, J.; Y. Y. ZHU; E. SMILEY; J. BONADIO; J. ROULEAU; S. GOLDSTEIN; L. MCCAULEY; B. DAVIDSON; B. ROESSLER (1996). «Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 5753-5758.
- GELBART, W. M. (1989). «The *dpp* gene: a TGF- β homologue controlling pattern formation in *Drosophila*». *Development suppl.*, pàg. 65-74.
- GRAFF, J. M. (1997). «Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question». *Cell*, núm. 89, pàg. 171-174.
- GRIFFITH, D. L.; P. C. KECK; K. SAMPATH; D. C. RUEGER; W. D. CARLSON (1996). «Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 878-883.
- GURDON, J. B. (1987). «Embryonic induction-molecular prospects». *Development*, núm. 99, pàg. 285-306.
- HELDIN C. H.; K. MIYAZONO; P. TEN DIJKE (1997). «TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins». *Nature*, núm. 390, pàg. 465-471.
- HOLLINGER, J. O. (1997). «What's new in bone biology». *J. of Histotech.*, núm. 20, pàg. 235-240.
- HOGAN, B. L. M. (1996). «BMP: multifunctional regulators of vertebrate development». *Genes Dev.*, núm. 10, pàg. 1580-1594.
- HOODLESS, P.; T. HAERRY; S. ABDOLLAH; M. STAPLETON; M. O'CONNOR; L. ATTISANO; J. L. WRANA (1996). «Madr1, a Mad-related protein that functions in BMP-2 signalling pathways». *Cell*, núm. 85, pàg. 489-500.
- HOWELL, M.; C. HILL (1997). «Xmad2 directly activates the activin-inducible, dorsal mesoderm gene XFKH1 in *Xenopus* embryos». *EMBO J.*, núm. 16, pàg. 7411-7421.
- JORDAN, J.; M. BÖTTNER; H. SCHLUESENER; K. UNSICKER; K. KRIEGLSTEIN (1997). «BMP: neurotrophic roles for midbrain dopaminergic neurons and implications of astroglial cells». *European J. of Neuroscience*, núm. 9, pàg. 1699-1710.
- KATAGIRI, T.; A. YAMAGUCHI; M. KOMAKI; E. ABE; N. TAKAHASHI; T. IKEDA; V. ROSEN; J. WOZNEY; A. FUJISAWA; T. SUDA (1994). «BMP-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage». *J. Cell. Biol.*, núm. 127, pàg. 1755-1766.
- KRETSCHMAR, M.; J. MASAGUÉ (1998). «Smad: mediators and regulators of TGF- β signalling». *Curr. Op. Genet. and Develop.*, núm. 8, pàg. 103-111.
- LEE, M. B. (1997). «BMP: background and implications in oral reconstruction». *J. Clin. Periodontol*, núm. 24, pàg. 355-365.
- LUO, G.; C. HOFMANN; A. BRONCKERS; M. SOHOCKI; A. BRADLEY; G. KARSENTY (1995). «BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning». *Genes and Development*, núm. 9, pàg. 2808-2820.

- MACIAS, D.; Y. GAÑAN; K. SAMPATH; M. E. PIEDRA; M. A. ROS; J. M. HURLE (1997). «Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development». *Development*, núm. 124, pàg. 1109-1117.
- MCPHERRON, A.; S. J. LEE (1997). «Double muscling cattle due to mutations in the myostatin gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 94, pàg. 12457-12461.
- MEHLER, M. F.; P. C. MABIE; D. ZHANG; J. A. KESSLER (1997). «Bone morphogenetic proteins in the nervous system». *Trends Neurosci.*, núm. 20, pàg. 309-317.
- PARALKAR, V. M.; B. S. WEEKS; Y. YU; M. KLEINMAN; A. H. REDDI (1992). «Recombinant human BMP-2B stimulates PC12 cell differentiation». *J. Cell Biol.*, núm. 119, pàg. 1721-1728.
- RAFTERY, L. A.; V. TWOMBLY; K. WHARTON; W. M. GELBART (1995). «Genetic screens to identify elements of the dpp signalling pathway in *Drosophila*». *Genetics*, núm. 139, pàg. 241-254.
- RAWLS, A.; E. N. OLSON (1997). «MyoD meets its maker». *Cell*, núm. 89, pàg. 5-8.
- REDDI, A. H. (1994). «Bone and cartilage differentiation». *Curr. Op. Genet and Develop.*, núm. 4, pàg. 737-744.
- REDDI, A. H. (1997a). «Bone morphogenesis and modeling: soluble signals sculpt osteosomes in the solid state». *Cell*, núm. 89, pàg. 159-161.
- REDDI, A. H. (1997b). «BMP: Actions in flesh and bone». *Nature Medicine*, núm. 3, pàg. 837-839.
- RIPAMONTI, U.; A. H. REDDI (1994). «Periodontal regeneration, potential role of bone morphogenetic proteins». *J. of Periodontal Res.*, núm. 29, pàg. 225-235.
- RODAN, G. A.; S. HARADA (1997). «The missing bone». *Cell*, núm. 89, pàg. 677-680.
- SUZUKI, A.; R. S. THIES; N. YAMAJI; J. SONG; J. M. WOZNEY; K. MURAKAMI; N. UENO (1994). «A truncated BMP receptor affects dorso-ventral patterning in early *Xenopus* embryo». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 10255-10259.
- TAKAKU, K.; M. OSHIMA; H. MIYOSHI; M. MATSUI; M. SELDIN; M. TAKETO (1998). «Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes». *Cell*, núm. 92, pàg. 645-656.
- TEN DIJKE, P.; K. MIYAZONO; C. H. HELDIN (1996). «Signalling via heterooligomeric complexes of type I and II serine/threonine kinase receptors». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 8, pàg. 139-145.
- THESLEFF, I.; P. NIEMINEN (1996). «Tooth morphogenesis and cell differentiation». *Curr. Op. Cell Biol.*, núm. 8, pàg. 844-850.
- VAINIO, S.; I. KARAVANOVA; A. JOWET; I. THESLEFF (1993). «Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development». *Cell*, núm. 75, pàg. 45-58.
- VENTURA, F.; J. DOODY; F. LIU; J. L. WRANA; J. MASSAGUÉ (1994). «Reconstitution and transphosphorylation of TGF- β receptor complexes». *EMBO J.*, núm. 13, pàg. 5581-5589.
- VORTKAMP, A. (1997). «Skeleton morphogenesis: defining skeletal elements». *Curr. Biol.*, núm. 7, pàg. 104-107.
- WALDRIP, W. R.; E. BIKOFF; P. HOODLESS; J. L. WRANA; E. J. ROBERTSON (1998). «Smad2 signalling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo». *Cell*, núm. 92, pàg. 797-808.
- WOLPERT, A. (1989). «Positional information revisited». *Development*, núm. 107, pàg. 3-12.
- WOZNEY, J. (1988). «Novel regulators of bone formation». *Science*, núm. 242, pàg. 1528-34.
- WRANA, J. L.; L. ATTISANO; R. WIESER; F. VENTURA, J. MASSAGUÉ (1994). «Mechanism of activation of the TGF- β receptor». *Nature*, núm. 370, pàg. 341-347.
- ZAWEL, L.; J. L. DAI; P. BUCKHAULTS; S. ZHOU; K. M. KINZLER; B. VOGELSTEIN; S. E. KERN (1998). «Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription factors». *Cell*, núm. 1, pàg. 611-617.
- ZOU, H.; L. NISWANDER (1996). «Requirement for BMP signalling in interdigital apoptosis and scale formation». *Science*, núm. 272, pàg. 738-741.