

FGFR3 sprzyja zamykaniu się chrząstkozrostów i łączeniu się ośrodków kostnienia poprzez szlak MAPK

Takehiko Matsushita¹, William R. Wilcox^{3,4}, Yuk Yu Chan¹, Aya Kawanami¹, Hülya Bükülmez^{2,5}, Gener Balmes⁶, Pavel Krejci^{3,7,8}, Pertchoui B. Mekikian³, Kazuyuki Otani⁹, Isakichi Yamaura⁹, Matthew L. Warman¹⁰, David Givol¹¹ i Shunichi Murakami^{1,2,*}

¹Klinika Ortopedii i ²Klinika Genetyki, Uniwersytet Case Western Reserve, 10900 Euclid Avenue, Cleveland, OH 44106, USA, ³Instytut Genetyki Medycznej, Centrum Medyczne Cedars-Sinai, 8700 Beverly Blvd, Los Angeles, CA 90048, USA, ⁴Klinika Pediatrii, Szkoła Medyczna Uniwersytetu Kalifornijskiego, kampus Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA, ⁵Klinika Pediatrii i Reumatologii Dziecięcej, Centrum Medyczne Metro Health, 2500 MetroHealth Drive, Cleveland, OH 44109, USA, ⁶Wydział Genetyki Molekularnej, Uniwersytet w Teksasie, M.D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Blvd, Houston, TX 77030, USA, ⁷Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Masaryka, 61137, Brno, Republika Czeska, ⁸Wydział Cytokinetyki, Instytut Biofizyki ASCR 61265, Brno, Republika Czeska, ⁹Klinika Chirurgii Ortopedycznej, Szpital Kudanzaka, 2-1-39 Kudanzakaminami, Chiyoda-ku, Tokio 102-0071, Japonia, ¹⁰Klinika Chirurgii Ortopedycznej i Instytut Medyczny im. Howarda Hughesa w Szpitalu Dziecięcym w Bostonie, 300 Longwood Avenue, Boston, Maryland 02115, USA i ¹¹Instytut Naukowy Weizmanna, Rehovot, Izrael 76100

Otrzymane 9 lipca 2008 r.; Sprawdzone 6 października 2008 r.; Zaakceptowane 13 października 2008 r.

Mutacje aktywujące FGFR3 (receptora typu III dla czynnika wzrostu fibroblastów) powodują achondroplazję i dysplazję śmiertelną, dwa najczęstsze rodzaje dysplazji kostnych wśród ludzi. W tej grupie chorób zwężenie kanału kręgowego i otworu wielkiego są przyczyną poważnych komplikacji neurologicznych. W niniejszym artykule przedstawiamy dowody na to, że sygnalizacja za pomocą FGFR3 oraz MAPK (grupa kinaz aktywowanych mitogenami) w chondrocytach sprzyja zamykaniu się chrząstkozrostu i łączeniu się ośrodków kostnienia. Obserwowaliśmy przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów w kręgosłupie i w podstawie czaszki wśród ludzkich homozygot cierpiących na achondroplazję i dysplazję śmiertelną, jak również wśród mysich modeli achondroplazji. U obu gatunków przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów powiązane było ze wzmożonym procesem formowania się kości. Specyficzna dla chondrocytów aktywacja FGFR3 u myszy wywoływała przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów i wspomagała różnicowanie się osteoblastów wokół chrząstkozrostów. Sygnalizacja FGF w chondrocytach powoduje wzrost ekspresji mRNA dla ligandów białek BMP (białka morfogenetyczne kości), a spadek ekspresji mRNA dla antagonistów białek BMP w sposób zależny od MAPK, co sugeruje rolę sygnalizacji za pomocą BMP we wzmożonym procesie formowania kości. Wzmożone tworzenie się kości przyspieszałoby łączenie się ośrodków kostnienia i ograniczałoby śródchrzęstny wzrost kości. Stąd, zwężenie kanału kręgowego i otworu wielkiego wśród heterozygotycznych pacjentów z achondroplazją może pojawić się w wyniku przedwczesnego zamykania się chrząstkozrostów. Jeśli faktycznie tak jest, to każde leczenie powikłań achondroplazji nakierowane na stymulację wzrostu musi poprzedzać moment zamknięcia się chrząstkozrostu.

WPROWADZENIE

Wzrost kości na długość jest rezultatem kostnienia śródchrzęstnego, w którym chondrocyty rozwijają się dzięki serii procesów proliferacyjnych i różnicujących. Chondrocyty w strefie chrząstki spoczynkowej płytki wzrostu mnożą się, by następnie przerwać cykl komórkowy i zróżnicować się w chondrocyty hipertroficzne. Wzrost liczby chondrocytów w wyniku proliferacji, zwiększenie ich rozmiarów w wyniku

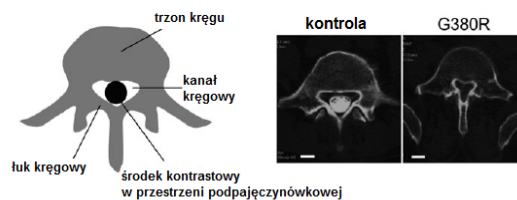
hipertrofii oraz synteza macierzy zewnątrzkomórkowej – wszystkie te czynniki przyczyniają się do wzrostu kości na długość. Chondrocyty znajdujące się w płytkach wzrostu są stale wspomagane przez różnicowanie się i proliferację chondrocytów w strefach spoczynkowej i proliferacji, podczas gdy końcowo zróżnicowane hipertroficzne chondrocyty są usuwane w miejscu połączenia chrzęstno-kostnego poprzez apoptozę (zaprogramowaną śmierć komórki). Równowaga pomiędzy tworzeniem nowych a usuwaniem starych chondrocytów, jak również produkcja macierzy zewnątrzkomórkowej i jej

degradacja determinują wysokość płytek wzrostu. U człowieka zakończenie wzrostu kości na długość zwykle zbiega się w czasie z zakończeniem okresu dojrzewania, kiedy to płytki wzrostu zostają całkowicie zastąpione przez kość.

Podobnie jak w szkielecie kończyn, w kręgach, mostku i podstawie czaszki wzrost kości ujawnia się w chrząstkozrostach – chrzęstnych strukturach składających się z dwóch przeciwległych płytek wzrostu ze wspólną strefą chondrocytów spoczynkowych. Tak samo jak w przypadku śródchrzęstnych płytek wzrostu, chrząstkozrosty również zastępowane są przez kość. Regulacja płytki wzrostu i zamykania się chrząstkozrostów nadal pozostaje do końca niewyjaśniona.

Kostnienie śródchrzęstne kontrolowane jest przez wiele czynników regulujących (1,2). Kluczowym regulatorem śródchrzęstnego wzrostu kości jest receptor typu III dla czynnika wzrostu fibroblastów (Fgfr3). *Fgfr3* ulega wybiórczej ekspresji w proliferujących chondrocytach przed hipertrofią, w płytkach wzrostu chrząstki nasadowej (3,4). Mutacje aktywujące FGFR3 powodują u ludzi dziedziczne autosomalnie dominująco choroby szkieletu, achondroplazję, dysplazję śmiertelną i hipochondroplazję (5-9). Dysplazja śmiertelna jest najczęstszą letalną dysplazją kostną, a achondroplazja jest najczęstszą nieletalną formą karłowatości. Pomimo tego, że nie jest wadą letalną, powszechnym i poważnym powikłaniem w achondroplazji jest mały otwór wielki i zwężenie kręgosłupa (10,11) (Rys. 1). Zwężenie otworu wielkiego – otworu w kości potylicznej, przez który przechodzi rdzeń kręgowy jako kontynuacja rdzenia przedłużonego – powiązane zostało z wodogłowieciem i nagłą śmiercią w okresie niemowlęcym (12-14), jak również z bólami głowy u dzieci starszych (15). Obecnie chirurgiczne powiększenie bardzo małego otworu wielkiego jest zalecane dla <10% dzieci z achondroplazją (11,16). Zwężenie kanału kręgowego, w którym biegnie rdzeń kręgowy oraz ogon koński, jest częstym powikłaniem wśród osób dorosłych cierpiących na achondroplazję i może powodować deficyty neurologiczne takie jak: mielopatie, radikulopatie i chromanie neurogenne. Ponadto, niewystarczający wzrost podstawy czaszki powoduje hipoplazję środkowej części twarzoczaszki, co prowadzi do rozwoju bezdechu sennego, zapalenia ucha środkowego i wad zgrzyzu.

Nieprawidłowy wzrost kanału kręgowego, otworu wielkiego i podstawy czaszki wśród pacjentów z mutacjami FGFR3 może być spowodowany niewystarczającą proliferacją komórek, niewystarczającą hipertrofią i/lub produkcją macierzy i/lub przedwczesnym zamykaniem się chrząstkozrostów. Za ostatnim mechanizmem przemawiają badania tomografii komputerowej (CT) wśród pacjentów z achondroplazją, u których zaobserwowano przedwczesne zamknięcie się chrząstkozrostów kości potylicznej (17). By zbadać



Rys.1. Zwężenie kanału kręgowego w achondroplazji. Mielogram CT w przekroju osiowym piątego kręgu lędźwiowego uwidacznia zwężenie kanału kręgowego u 46-letniej kobiety z achondroplazją i mutacją FGFR3 G380R, u której występuje parapareza (po prawej). Środek kontrastowy wstrzykiwany do przestrzeni podpajęczynkowej został wykluczony u pacjentki z achondroplazją z powodu drastycznego zwężenia kanału kręgowego. (Po lewej) 41-letnia kobieta z nieistotną chorobą kręgosłupa. Białe paski określają długość 1 cm.

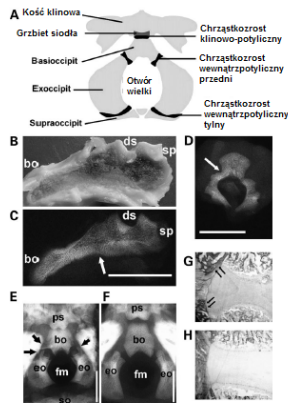
obserwowaliśmy przedwczesne zamykanie się wielu chrząstkozrostów. Nasze wyniki wskazują na to, że sygnalizacja za pośrednictwem Fgfr3 i MAPK w chondrocytach reguluje zamykanie się chrząstkozrostów, różnicowanie się osteoblastów i tworzenie kości, rzucając nowe światło na mechanizmy rozwojowe zwężenia kanału kręgowego, zwężenia otworu wielkiego i hipoplazji środkowej części twarzy w achondroplazji. Jeśli przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu odpowiada za zwężenie kanału kręgowego, zwężenie otworu wielkiego i hipoplazję środkowej części twarzy, przyszłe leczenie tych powikłań nakierowane na stymulację wzrostu musi rozpocząć się przed zamknięciem się chrząstkozrostów.

WYNIKI

Materiał badawczy pochodzący od ludzi cierpiących na homozygotyczną achondroplazję lub dysplazję śmiertelną poddany został badaniom w Międzynarodowym Rejestrze Dysplazji Kostnych Centrum Medycznego Cedars-Sinai. Chrząstkozrosty w podstawie czaszki i kręgach lędźwiowych zbadane zostały w jednym przypadku homozygotycznej achondroplazji, czterech przypadkach dysplazji śmiertelnej (trzy okołoporodowe, jedna płodowa) oraz w płodzie kontrolnym (Tabela 1).

Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu w homozygotycznej achondroplazji

Dokładna analiza i badania radiograficzne w płaszczyźnie pośrodkowej podstawy czaszki u noworodka, który zmarł z powodu achondroplazji homozygotycznej (Przypadek 1) ujawniły brak przedwczesnego zamykania się chrząstkozrostu klinowo-potylicznego (Rys. 2B i C), który normalnie zamyka się pomiędzy 11 a 25 rokiem życia (18-22). Badaliśmy również chrząstkozrosty kręgow lędźwiowych, które prawidłowo zamykają się pomiędzy 3 a 14 rokiem życia (23-26). Badanie rentgenowskie trzeciego kręgu lędźwiowego pokazało całkowite połączenie się chrząstkozrostu po jednej stronie i częściowe połączenie po drugiej stronie (Rys. 2D), zgodnie z przedwczesnym zamykaniem się. Połączenie zostało potwierdzone histologicznie (dane nie są tutaj przedstawione).



Rys. 2. Kręgosłup i podstawa czaszki w homozygotycznej achondroplazji i dysplazji śmiertelnej. (A) Ilustracja przedstawiająca anatomię podstawy czaszki. (B-D) Podstawa czaszki i kręgosłup lędźwiowy w homozygotycznej achondroplazji (Przypadek 1). Ocena makroskopowa (B) i zdjęcie rentgenowskie (C) w płaszczyźnie środkowej podstawy czaszki w homozygotycznej achondroplazji. Strzałka wskazuje połączony chrząstkozrost klinowo-potyliczny. (D) Trzeci kręgi lędźwiowy ujawnił całkowitą fuzję chrząstkozrostu po jednej stronie i częściową po drugiej. (E i F) Widok podstawy czaszki u płodu z dysplazją śmiertelną (E) (Przypadek 2) w 27 tygodniu ciąży i płód kontrolny (F) (Przypadek 3) w 26 tygodniu ciąży bez żadnych zmian dysplazji kostnej. Chrząstkozrosty wewnątrzpotyliczne przednie płodu z dysplazją śmiertelną zostały otoczone kością (strzałki). (G i H) Barwienie wg Goldnera chrząstkozrostu klinowo-potylicznego w Przypadku 2 (G) i Przypadku 3 (H) ukazujące zwiększone kościotworzenie w dysplazji śmiertelnej (strzałki). Paski skali oznaczają 10 mm. Skróty: bo, część kości znajdująca się do przodu od otworu wielkiego; eo, część kości znajdująca się bocznie od otworu wielkiego; fm, otwór wielki; so, część kości znajdująca się powyżej otworu wielkiego; sp, kość klinowa; ds, grzbiet siodła tureckiego; ps, tylna część kości klinowej.

Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów w dysplazji śmiertelnej

Zbadaliśmy również jeden 27-tygodniowy płód z dysplazją śmiertelną i mutacją R248C (Przypadek 2) oraz jeden płód kontrolny w 26 tygodniu ciąży niewykazujący żadnych objawów dysplazji kostnej (Przypadek 3). Badanie radiograficzne ujawniło zwężenie otworu wielkiego u płodu z dysplazją śmiertelną (Rys. 2E i F). Chociaż chrząstkozrosty wewnątrzpotyliczne nadal na tym etapie pozostawały otwarte, płód posiadał mostek kostny powstający wokół chrząstkozrostu wewnątrzpotylicznego przedniego (Rys. 2E), co zostało potwierdzone histologicznie (Rys. 2G). Z drugiej strony, w kontrolnym płodzie nie zaobserwowano żadnych kości pełniących funkcję mostków (Rys. 2F i H).

Badaliśmy również materiał okołoporodowy pochodzący od trzech noworodków z dysplazją śmiertelną (Przypadki 4-6). Przypadek 4. posiadał wcześniej niewykrytą mutację G→C w kodonie stop, która powoduje zmianę kodonu stop na resztę serynową. Przypadki 5. i 6. miały mutację R248C. We wszystkich przypadkach obserwowaliśmy przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów podstawy czaszki i kręgosłupa w połączeniu z nadmiernym tworzeniem się kości (Suplement, Rys. S1). Podsumowując, poczynione obserwacje wskazują, że mutacje aktywujące FGFR3 powodują przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów i przyspieszenie procesu formowania się kości.

Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu u myszy wykazujących mutację achondroplazji

By zbadać, jaką rolę odgrywa *Fgfr3* w zamykaniu się chrząstkozrostu, analizowaliśmy myszy będące

modelem achondroplazji (27). Mutacja *Fgfr3* G374R odpowiada najczęstszej mutacji u ludzi cierpiących na achondroplazję – *FGFR3* G380R. Docelowy allel jest hipomorficzny (nie spełnia swojej funkcji) dopóki rekombinaza Cre nie wytnie kasyety selekcyjnej dla tzw. floxed-neomycyny, w którym to momencie ekspresja ulega normalizacji. Wykorzystanie transgenicznego myszy *Zp3-Cre*, które wykazują ekspresję Cre w oocytach, dostarcza allelu *Fgfr3* G374R ulegającego prawidłowej ekspresji i powodującego karłowatość.

Stwierdziliśmy, że wiele chrząstkozrostów zamyka się przedwcześnie u myszy heterozygotycznych pod względem zmutowanego allelu *Fgfr3* G374R (*Fgfr3*^{G374R/+}). Wypreparowany szkielet 10-dniowej myszy ujawnił przedwczesne zamykanie się wewnątrzklinowych, klinowo-potylicznych i wewnątrzpotylicznych przednich chrząstkozrostów w podstawie czaszki, podczas gdy odpowiednie chrząstkozrosty pozostawały chrzęstne u myszy pochodzących z dzikiego miotu (Rys. 3A). Konsekwentnie, chrząstkozrosty w odcinkach szyjnym, piersiowym i lędźwiowym kręgosłupa zamknęły się przedwcześnie u myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+} (Rys. 3B). Przedwczesne zamknięcie się chrząstkozrostów było obserwowane także w chrząstce ipsilonowej (ang. triradiate cartilage) miednicy, mostku i kości gnykowej (Suplement, Rys. S2).

Analiza histologiczna przedwczesnego zamykania się chrząstkozrostu

Na początku zbadaliśmy ekspresję *Fgfr3* w chrząstkozrostach poprzez hybrydyzację *in situ*. Stosunkowo silna ekspresja *Fgfr3* była obserwowana w chondrocytach strefy proliferacyjnej i przedhipertroficznej chrząstkozrostów podstawy czaszki, kręgosłupa i mostka (Rys. 4C oraz dane tutaj nieprzedstawione). *Fgfr3* ulegało także słabej ekspresji w chondrocytach strefy spoczynkowej chrząstkozrostów i niektórych komórkach okostnej i kości gąbczastej. By zbadać mechanizm przedwczesnego zamykania się chrząstkozrostów u myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+}, zanalizowaliśmy wiele chrząstkozrostów kręgowych zebranych na różnych etapach rozwoju. W 16.5 dniu życia płodowego (E16.5) nie zaobserwowano żadnych różnic pomiędzy embrionami myszy dzikich i z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+} (Rys. 4A). Jednakże, od pierwszego dnia po porodzie (P1), chrząstkozrosty kręgosłupa zwężały się stopniowo u myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+}. Podczas gdy te same chrząstkozrosty u myszy dzikich nie ulegały zamknięciu do około 14 dnia po urodzeniu (P14; dane nieprzedstawione tutaj), u myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+} wykazywały częściowe zamknięcie w 4 dniu po urodzeniu (P4) i całkowite zamknięcie do ósmego dnia (P8). Interesujące jest, że struktury przypominające płytki wzrostu w chrząstkozrostach kręgosłupa składające się ze stref: spoczynkowej, proliferującej i hipertroficznej chondrocytów były dobrze utrzymane w ósmym dniu po urodzeniu (P8,

Rys. 4B). Przeciwnie – myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ wykazywały przedwczesną utratę stref spoczynkowej i proliferacyjnej chondrocytów, poczynając od drugiego dnia po porodzie (P2). Do czwartego dnia większość chondrocytów stawała się hipertroficzna, jak dowiodły badania immunohistochemiczne w kierunku kolagenu typu X (Rys. 4D).

Ponieważ zmniejszona proliferacja komórek, wczesna apoptoza lub przedwczesna terminacja różnicowania – każdy z tych czynników – mogą być odpowiedzialne za przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów, badaliśmy proliferację chondrocytów w chrząstkozrostach za pomocą przyłączenia bromodeoksyurydyny (BrdU), różnicowanie chondrocytów za pomocą immunohistochemii w kierunku kolagenu typu X oraz apoptozę metodą TUNEL. Szukaliśmy także dowodu inwazji naczyniowej lub inwazji osteoklastów/chondroblastów za pomocą metod immunohistochemicznych w kierunku czynnika von Willebranda, MMP9, MMP13, fosfatazy kwaśnej odpornej na winian (TRAP) oraz za pomocą hybrydyzacji *in situ* w kierunku VEGF. W dniu E16.5 nie było różnicy w liczbie komórek znakowanych BrdU w chrząstkozrostach pomiędzy myszami dzikimi i z mutacją (Rys. 4E). Jednakże w dniu P2 myszy z mutacją miały mniej komórek znakowanych BrdU. W chrząstkozrostach myszy dzikich duże ilości komórek znakowanych BrdU znaleziono w strefach, które odpowiadały strefie proliferacyjnej płytki wzrostu, podczas gdy tylko niewiele chondrocytów znakowanych BrdU u myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$. Immunohistochemia w kierunku markera śródbłonkowego, czynnika von Willebranda pokazała zwiększoną liczbę komórek śródbłonka naczyniowego w połączeniach chrzęstno-kostnych chrząstkozrostów myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$, sugerując zwiększoną waskularyzację (Rys. 4F). Hybrydyzacja *in situ* ujawniła zwiększoną ekspresję VEGF w chondrocytach hipertroficznych myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ w porównaniu do myszy dzikich, sugerując rolę VEGF w zwiększonej waskularyzacji (Rys. 4G). Nie zaobserwowano znaczących różnic w liczbie osteoklastów/chondroblastów, apoptozie chrząstkozrostów w badaniach metodą TUNEL oraz ekspresji MMP9 i MMP13 pomiędzy myszami z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ a szczepem dzikim (dane nie są tutaj przedstawione).

Zwiększone kościotworzenie w ochrzestnej u myszy wykazujących mutację $Fgfr3$ G374R

Podobnie do chrząstkozrostów u ludzi z dysplazją śmiertelną i homozygotyczną achondroplazją, u myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ tworzenie kości miało miejsce wokół zamykających się chrząstkozrostów. W celu obserwacji różnicowania się osteoblastów wokół

zamykających się chrząstkozrostów, dokonaliśmy ekspresji transgenu *Coll1-LacZ* u myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$. Transgen *Coll1-LacZ* powoduje ekspresję *LacZ* pod kontrolą składającego się z 2300 par zasad promotora specyficznego dla osteoblastów *Coll1*, genu odpowiadającego za kolagen typu I (28). Kasetę neomycyny została usunięta przy użyciu transgenu *Zp3-Cr* tak, że allel *Fgfr3* został zrekombinowany w sposób całościowy. Barwienie X-gal u myszy $Fgfr3^{G374R/+};Coll1-LacZ$ pokazało wyraźny wzrost liczby osteoblastów wokół chrząstkozrostów w dniu P3 (Rys. 5A). Badaliśmy także ekspresję *Runx2*, czynnika transkrypcji niezbędnego dla różnicowania się osteoblastów (29,30). Wzrost liczby komórek *Runx2* pozytywnych wykazano w ochrzestnej myszy z mutacją w porównaniu z myszami szczepu dzikiego w dniu P4 (Rys. 5B). Obserwacje te silnie sugerują, że wzmożona sygnalizacja *Fgfr3* sprzyja różnicowaniu się osteoblastów wokół zamykających się chrząstkozrostów.

Ekspresja $Fgfr3$ G374R w chondrocytach powoduje wzrost procesu różnicowania się osteoblastów w sposób parakryny

Fgfr3 ulega silnej ekspresji w chondrocytach, a także osteoblastach (31). Aby zbadać, czy wzmożone różnicowanie się osteoblastów spowodowane było przez zwiększenie sygnalizacji *Fgfr3* w osteoblastach lub chondrocytach, wywołaliśmy ekspresję *Fgfr3* G374R w osteoblastach i chondrocytach u myszy transgenicznym pod względem genu *Coll1-LacZ* przy wykorzystaniu transgenów *Coll1-Cre* i *Col2a1-Cre*, a osteoblasty były identyfikowane za pomocą barwienia X-gal (Rys. 5C i D oraz dane tutaj nieprzedstawione). Specyficzność tkankowa aktywności *Cre* potwierdzona została przy użyciu myszy z genem reporterowym *ROSA26* (Fig. 5E). Myszy z mutacją *Fgfr3* będące nosicielkami transgenu *Col2a1-Cre* wykazały zwiększoną liczbę osteoblastów wybarwionych metodą X-gal w ochrzestnej i w miejscu połączenia chrzęstno-kostnego chrząstkozrostów kręgosłupa, mostka i podstawy czaszki (Rys. 5C i D oraz dane nieprzedstawione) w dniu P3. Te same myszy wykazywały również fenotyp karłowaty i przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów (Rys. 5G i dane nieprzedstawione). W przeciwieństwie do tego, użycie transgenu *Coll1-Cre* nie spowodowało zwiększenia liczby osteoblastów wykrytych barwieniem X-gal (dane nieprzedstawione). Myszy te nie wykazywały przedwczesnego zamykania się chrząstkozrostów i rosły normalnie bez wyraźnych anomalii kostnych (Rys. 5F i dane nieprzedstawione). Obserwacje wskazują, że sygnalizacja za pomocą *Fgfr3* w chondrocytach sprzyja różnicowaniu się osteoblastów i kościotworzeniu wokół chrząstkozrostów w sposób parakryny. Podobny wzrost liczby osteoblastów był również obserwowany w ochrzestnej kości długich, gdy wywoływana jest

w chondrocytach ekspresja Fgfr3 G374R przy użyciu transgenu *Col2a1-Cre* (dane nieprzedstawione).

Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów u myszy wykazujących konstytutywnie aktywną mutację MEK1 (S218/222E, Δ32-51) w chondrocytach

W celu zbadania sygnalizacji downstream, która pośredniczy w przedwczesnym zamykaniu się chrząstkozrostów, sprawdzaliśmy chrząstkozrosty myszy z transgenem *Col2a1-MEK1*, które wykazywały ekspresję konstytutywnie aktywnej mutacji MEK1 w chondrocytach i karłowatość typu achondroplastycznego (32). Preparaty szkieletu 11-dniowej myszy z transgenem *Col2a1-MEK1* wykazały przedwczesne zamykanie się wielu chrząstkozrostów, w tym podstawy czaszki, kręgow, miednicy i kości gnykowej (Rys. 6A i B oraz dane nieprzedstawione). Obserwacje te są zbieżne ze wzmożoną sygnalizacją MAPK pośredniczącą w przedwczesnym zamykaniu się chrząstkozrostów zauważoną wśród mutantów Fgfr3.

Skrzyżowaliśmy także mysz z mutacją *Fgfr3 G374R* z myszą transgeniczną wykazującą nadekspresję peptydu natriuretycznego typu C (CNP) w chondrocytach, ponieważ CNP może hamować szlak ERK MAPK w chondrocytach (33, 34). Transgeniczna nadekspresja CNP częściowo uchroniła przed przedwczesnym zamykaniem się chrząstkozrostu w mostku (Suplement, Rys. S3). W przeciwieństwie do tego, utrata Stat1, innej cząsteczki sygnalizacji downstream Fgfr3, nie uchroniła przed przedwczesnym zamykaniem się chrząstkozrostów (Suplement, Rys. S4)(35, 36). Obserwacje te dalej potwierdzają, że wzmożona sygnalizacja Fgfr3 przyspiesza zamykanie się chrząstkozrostu poprzez szlak MAPK.

Wzmożone kościotworzenie u myszy wykazujących ekspresję konstytutywnej mutacji aktywnej MEK1 (S218/222E, Δ32-51) w chondrocytach

Zgodnie z poglądem, że wzmożona sygnalizacja Fgfr3 w chondrocytach prowadzi do wzmożonego różnicowania się osteoblastów oraz, że szlak MAPK-zależny pośredniczy w tej sygnalizacji, stwierdziliśmy wzmożenie procesu formowania kości u myszy *Col2a1-MEK1*. W tym modelu mysim transgen zawiera kasetę *IRE5-LacZ* tak, że nie wykrywa się ekspresji transgenu w osteoblastach w barwieniu metodą X-gal. Podczas gdy nie zaobserwowano istoty zbitej wokół chrząstkozrostu klinowo-potylicznego u dzikiej myszy w dniu P1, istota zbita nad chrząstkozrostem klinowo-potylicznym zdążyła już połączyć kory kości klinowej i potylicznej u myszy *Col2a1-MEK1*, wskazując na przyspieszone formowanie się istoty zbitej kości (Rys. 6C górna część). To przyspieszone kościotworzenie było później potwierdzone przy użyciu hybrydyzacji *in situ* dla sialoproteiny kostnej (*BSP*) – markera osteoblastów

(Rys. 6C, dolna część). Obserwacje te wskazują, że wzmożona sygnalizacja MEK1 w chondrocytach stymuluje kościotworzenie wokół chrząstkozrostów i sugerują, że wzmożone kościotworzenie u myszy Fgfr3 G374R jest mediowane przez wzmożoną sygnalizację MAPK w chondrocytach.

Regulacja Bmp-2, Bmp-7, białka noggin, chordyny i białka gremlin przez FGF18 i szlak MAPK w pierwotnych chondrocytach

Ponieważ zebrane przez nas dane wskazują, że sygnalizacja Fgfr3 reguluje różnicowanie się osteoblastów, a w regulacji tej prawdopodobnie pośredniczy szlak MAPK, szukaliśmy docelowych elementów regulacji downstream, które są regulowane przez FGF18 w sposób zależny od MAPK przy użyciu analizy mikromacierzy (Suplement, Tabela S1). FGF18 jest domniemanym fizjologicznym ligandem dla Fgfr3 (37, 38). Wśród genów, które są różnie regulowane przez FGF18 w pierwotnych chondrocytach, niezmiennie znajdowaliśmy szereg ligandów Bmp i antagonistów Bmp. Regulacja genu ligandów Bmp i antagonistów Bmp została następnie potwierdzona metodą PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w pierwotnych chondrocytach. Pierwotne chondrocyty zostały poddane działaniu FGF18 w obecności lub braku obecności U0126, następnie wyekstrahowano RNA w 3, 8 i 24 godzinie po rozpoczęciu działania. Stwierdziliśmy, że FGF18 zwiększają ekspresję (ang. upregulation) zarówno Bmp-2 jak i Bmp-7 około 4-krotnie w sposób zależny od czasu (Rys. 7A i B, po lewej). Regulacja w górę Bmp-2 i Bmp-7 przez FGF18 była przynajmniej częściowo zahamowana przez U0126 (Rys. 7A i B, po prawej). Następnie badaliśmy ekspresję antagonistów Bmp, białka noggin, chordyny i białka gremlin. FGF18 hamowało, podczas gdy U0126 wzmagalo ekspresję wszystkich trzech antagonistów Bmp, chociaż pojawiły się różnice w kinetyce i skali (Rys. 7C-E). Inhibicja ekspresji białka noggin, chordyny i białka gremlin przez FGF18 była przynajmniej częściowo hamowana przez U0126, sugerując, że w regulacji pośredniczył szlak ERK MAPK. Regulacja MAPK cząsteczek Bmp2, Bmp7, białka noggin i białka gremlin była następnie potwierdzona poprzez zainfekowanie pierwotnych chondrocytów adenowirusami wykazującymi ekspresję konstytutywnie aktywnej mutacji MEK1 S217/221E (Suplement, Rys. S5). Podsumowując, obserwacje te wskazują, że FGF18 powoduje zwiększoną ekspresję Bmp-2, -7 oraz zmniejszoną ekspresję białek noggin, gremlin i chordyny w chondrocytach pierwotnych, a szlak MAPK odgrywa zasadniczą rolę w tej regulacji.

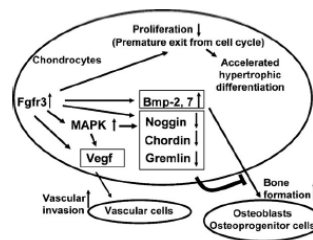
Zmniejszona ekspresja białek noggin i gremlin oraz zwiększona ekspresja Bmp-7 w chondrocytach myszy Fgfr3 G374R

Dalej badaliśmy ekspresję ligandów Bmp oraz antagonistów Bmp w chrząstkozrostach myszy

z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ i u myszy $Col2a1-MEK1$ przy użyciu hybrydyzacji *in situ*.

Analiza hybrydyzacji *in situ* została przeprowadzona w dniu P1, gdy architektonika podobna do tej w płycie wzrostu jest nadal utrzymana w chrząstkozrostach. Stwierdziliśmy, że białko noggin ulega ekspresji w strefie przedhipertroficznej chrząstkozrostu, podczas gdy białko gremlin ulega ekspresji w strefie spoczynkowej (Rys. 8A-C i 9). Poziom i zakres ekspresji białka noggin były zmniejszone w chrząstkozrostach myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ oraz myszy $Col2a1-MEK1$ w porównaniu z myszami typu dzikiego (Rys. 8A i B). Podobnie, ekspresja białka gremlin była zmniejszona u myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ w porównaniu z myszami dzikimi (Rys. 8C). W odróżnieniu do pierwotnych chondrocytów poddanych działaniu FGF18 nie zaobserwowaliśmy oczywistych różnic w ekspresji Bmp-2 i Bmp-7 u tych myszy w hybrydyzacji *in situ* (dane nieprzedstawione). Ta różnica może wynikać z długotrwałej stymulacji $Fgfr3$ *in vivo* i krótkotrwałej *in vitro*.

Następnie badaliśmy ekspresję białek noggin, gremlin, chondryny, Bmp-2 i Bmp-7 w chrząstce nasadowej kości długich metodą PCR w czasie rzeczywistym. RNA zostało wyekstrahowane bezpośrednio z chrząstki nasadowej myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ i myszy pochodzących ze szczepu dzikiego. Zgodnie z wynikami analizy chrząstkozrostów metodą hybrydyzacji *in situ*, zostało stwierdzone statystycznie znaczące zmniejszenie ekspresji białka gremlin w chrząstce nasadowej myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ w porównaniu do myszy dzikich (Rys. 8D). Badanie PCR w czasie rzeczywistym również wykazało niewielkie zmniejszenie ekspresji białka noggin, jednakże nie miało to znaczenia statystycznego (Rys. 8E). W przeciwieństwie do tego, ekspresja Bmp-7 była stale zwiększana w chrząstce nasadowej myszy z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ (Rys. 8F). Chordyna i Bmp-2 nie wykazywały różnic pomiędzy myszami z mutacją $Fgfr3^{G374R/+}$ a myszami ze szczepu dzikiego (dane nieprzedstawione). Podsumowując, obserwacje powyższe sugerują, że zwiększona sygnalizacja $Fgfr3$ i ERK MAPK w chondrocytach powoduje zmniejszenie ekspresji antagonistów BMP, co z kolei może wpływać na fenotyp chondrocytów zamykających się chrząstkozrostów i różnicowanie się osteoblastów w przylegającej chrząstce.



Rys. 9. Model, w którym wzmocniona sygnalizacja $Fgfr3$ w chondrocytach powoduje przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu i połączenie się ośrodków kostnienia. Wzmocniona sygnalizacja $Fgfr3$ powoduje przedwczesne wyjście z cyklu komórkowego i przyspiesza przejście w chondrocyty hipertroficzne. Wzmocniona sygnalizacja $Fgfr3$ powoduje także up-regulację VEGF w chondrocytach, sprzyjając waskularyzacji. Zwiększone wydzielanie ligandów Bmp i zmniejszone wydzielanie antagonistów Bmp skutkuje wzmocnieniem różnicowania się osteoblastów kostnych komórek progenitorowych w okostnej, sprzyjając formowaniu się kości i fuzji ośrodków kostnienia. Up-regulacja VEGF i Bmp oraz down-regulacja antagonistów Bmp są przynajmniej częściowo mediowane przez szlak MAPK.

DYSKUSJA

W naszych badaniach przedstawiliśmy przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów i łączenie się ośrodków kostnienia w kręgosłupie i podstawie czaszki w jednym przypadku homozygotycznej achondroplazji z mutacją G380R i czterech przypadkach dysplazji śmiertelnej z mutacjami R248C i kodonu stop. Stwierdziliśmy również, że wiele chrząstkozrostów zamyka się przedwcześnie u myszy wykazujących ekspresję $Fgfr3$ G374R, co odpowiada ludzkiej mutacji G380R w achondroplazji. Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów może odpowiadać za zwężenie otworu wielkiego i kanału kręgowego u pacjentów z achondroplazją. Jeśli tak jest, wtedy każde leczenie powikłań achondroplazji skierowane na stymulację wzrostu musi poprzedzać okres zamknięcia się chrząstkozrostów. Ponadto, by dowiedzieć się, jak mutacje $FGFR3$ przyczyniają się do przedwczesnego zamykania się chrząstkozrostów, niezbędne jest zrozumienie mechanizmów, w których się to pojawia.

Aktywacja sygnalizacji $Fgfr3$ w chondrocytach powoduje przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów

Chociaż przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu podstawy czaszki zostało stwierdzone u myszy będących nosicielkami mutacji $Fgfr3$ G369C i G365C (39, 40), dokładne mechanizmy przyspieszonego zamykania się pozostają nieznane. W tych badaniach zauważona została także zaawansowana osteogeneza, jednakże to, czy przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu jest pierwotnie spowodowane przez nieprawidłową chondrogenezę czy też zaawansowaną osteogenezę, pozostaje nierozstrzygnięte. W tych badaniach jasno przedstawiliśmy, że przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu jest spowodowane wzmocnioną sygnalizacją $Fgfr3$ w chondrocytach. Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu u myszy $Fgfr3$ G374R było powiązane z przedwczesną utratą proliferujących chondrocytów, wzmocnioną waskularyzacją i zwiększonym kościotworzeniem. Proliferacja chondrocytów w chrząstkozroście jest kluczowa dla utrzymania chrząstkozrostu, ponieważ hipertroficzne chondrocyty chrząstkozrostu są stale

usuwane w miejscu połączenia chrzęstno-kostnego po obu stronach. Zwiększona waskularyzacja również przyspieszałaby zamykanie się chrząstkozrostu, podczas gdy wzmożone kościotworzenie powodowało łączenie się ośrodków kostnienia.

Sygnalizacja Fgfr3 w chondrocytach reguluje różnicowanie się osteoblastów w sposób parakryny

Nasze eksperymenty genetyczne wykazały następnie, że sygnalizacja Fgfr3 w chondrocytach, nie w osteoblastach, reguluje różnicowanie się osteoblastów w sposób parakryny. Stwierdzono, że sekwencje regulacyjne *Col2a1* napędzają ekspresję transgenu w niektórych komórkach okostnej i osteoblastach, wzmacniając prawdopodobieństwo, że Fgfr3 G374R, które ulega ekspresji w osteoblastach, sprzyja różnicowaniu się osteoblastów (41). Jednakże istnieje szereg dowodów będących przeciwko takiemu prawdopodobieństwu. Po pierwsze, jak pokazano na Rys. 5E, nie wykryto rekombinacji w osteoblastach przy użyciu myszy z linii *Col2a1-Cre*. Po drugie, rekombinacja allele *Fgfr3* w osteoblastach przy użyciu transgenu *Colla1-Cre* nie sprzyjała różnicowaniu się osteoblastów otaczających chrząstkozrost. Po trzecie, myszy transgeniczne *Col2a1-MEK1*, które wykazywały ekspresję tego genu w chondrocytach, ale nie w osteoblastach, wykazywały przyspieszone różnicowanie się osteoblastów otaczających chrząstkozrost. Podsumowując, obserwacje te wskazują, że sygnalizacja Fgfr3 w chondrocytach w sposób skoordynowany reguluje zamykanie się chrząstkozrostu poprzez regulację różnicowania się osteoblastów oraz kościotworzenia w sposób parakryny.

W materiale zebranym od ludzi z dysplazją śmiertelną obserwowaliśmy przerost kości po obu stronach chrząstkozrostu. Przerośnięta tkanka kostna spotykała się po obu stronach i łączyła ze sobą, prowadząc do utraty chrząstkozrostu. Ten przerost kości podobny jest do bocznego przerostu kości przynasady wokół nasady w kościach długich u ludzi cierpiących na dysplazję śmiertelną i achondroplazję (42). Identyfikacja wydzielanych przez chondrocyty cząsteczek, które pośredniczą we wzmożonym kościotworzeniu, dostarczyłaby dodatkowych punktów uchwytu dla kontrolowania zamykania się chrząstkozrostów w dysplazji śmiertelnej i achondroplazji.

Wśród cytokin i czynników wzrostu, które ulegają ekspresji w chondrocytach, białko IHH (indian hedgehog homolog) zostało powiązane z kościotworzeniem w okostnej (43). Jednakże, jest mało prawdopodobne, że białko IHH jest mediatorem sygnalizacji Fgfr3 dla kościotworzenia, ponieważ nasza analiza metodą hybrydyzacji *in situ* wykazała, że ekspresja IHH w chrząstkozrostach myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+} oraz transgenicznych myszy *Col2a1-MEK1* była nierozróżnialna od tej u myszy należących do szczepu dzikiego (dane nieprzedstawione).

W dodatku zostało wykazane, że białko IHH ulega regulacji w dół (ang. downregulation) w innych modelach mysich, wykazujących ekspresję mutacji Fgfr3 odpowiedzialnych za dysplazję śmiertelną i achondroplazję (44,45).

Wzmożona sygnalizacja Fgfr3 hamuje ekspresję antagonistów Bmp

Nasze doświadczenia prowadzone w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* określiły ligandy Bmp oraz antagonistów Bmp jako punkty uchwytu regulacji downstream sygnalizacji FGF w chondrocytach: Bmp takie jak Bmp-2 i Bmp-7 są silnie osteogenne, podczas gdy ich dostępność dla receptorów Bmp jest równoważona przez antagonistów Bmp, takich jak białko noggin, białko gremlin i chordyna (46). Ponieważ BMP wzmacnia hipertrofię chondrocytów (47), możliwe jest, że wzmożona sygnalizacja BMP wraz ze wzmożoną sygnalizacją FGF w chondrocytach przyspieszała zamykanie się chrząstkozrostów u myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+}. Ponadto, zwiększona dostępność różnych BMP mogła przyspieszać różnicowanie się osteoblastów w przyległej chrzęstnej. Taka parakrynyna regulacja została stwierdzona w szwie czaszkowym, gdzie wzmożona sygnalizacja Fgfr2 hamuje ekspresję białka noggin w oponie twardej, która z kolei sprzyja zamykaniu się szwu czaszkowego (48). Zgodnie z tą koncepcją nasza analiza immunohistochemiczna wykazała fosforylację Smad1, 5 i 8 w chrzęstnej otaczającej chrząstkozrosty, wskazując na obecność sygnalizacji BMP (dane nieprzedstawione). Jednakże, nie zaobserwowaliśmy wyraźnej różnicy w barwieniu dla ufosforylowanych Smad1, 5 i 8 pomiędzy myszami dzikimi i tymi z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+}, chociaż badanie immunohistochemiczne może nie być wystarczające do wykrycia delikatnej różnicy. Niemniej, nasze dane z badań *in vivo* i *in vitro* są zbieżne z koncepcją, że ligandy Bmp i antagoniści Bmp znajdują się wśród wydzielanych mediatorów sygnalizacji Fgfr3 w chondrocytach, które regulują różnicowanie się osteoblastów.

Przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostu jest mediowane przez szlak MAPK

Identyfikacja szlaków regulacji downstream, które pośredniczą w przedwczesnym zamykaniu się chrząstkozrostów, dostarczyłaby celów terapeutycznych do zapobiegania temu przedwczesnemu zamykaniu się. Sygnalizacja Fgfr3 jest transdukowana do wielu szlaków sygnalizacji, włączając w to Stat1, Stat3, Stat5, ERK1, ERK2, p38, fosfolipazę C gamma, kinazę proteinową C, Src, kinazę-3 fosfatydyloinozytolu, Akt i Pyk2 (35, 36, 45, 49-51). Spośród nich co najmniej Stat1 i szlak ERK MAPK zostały zaangażowane w regulację rozwoju szkieletu poprzez Fgfr3 (32, 35, 36). W tych badaniach udowodniliśmy, że szlak MAPK w chondrocytach

odgrywa główną rolę w przedwczesnym zamykaniu się chondrocytów i wzmożonym kościotworzeniu. Myszy transgeniczne *Col2a1-MEK1* wykazywały przyspieszone zamykanie się chrząstkozrostu podobne do myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+}, podczas gdy utrata *Stat1* nie chroniła myszy z mutacją *Fgfr3*^{G374R/+} przed przedwczesnym zamykaniem się chrząstkozrostu. Co więcej, nadekspresja *CNP* w chondrocytach, które zdolne jest do hamowania szlaku MAPK, częściowo chroniła przed przedwczesnym zamykaniem się chrząstkozrostu. Farmakologiczne hamowanie szlaku MPAK lub aktywacja sygnalizacji *CNP* może zapobiegać przedwczesnemu zamykaniu się chrząstkozrostów.

Podsumowując, stwierdziliśmy przedwczesne zamykanie się chrząstkozrostów i wzmożenie procesu formowania się kości w materiale pobranym od osób z homozygotyczną achondroplazją i dysplazją śmiertelną oraz u mysich modeli achondroplazji. Nasze eksperymenty medyczne przeprowadzone na myszach wskazują, że sygnalizacja *Fgfr3* w chondrocytach reguluje różnicowanie się osteoblastów i formowanie się kości w sposób parakryny. Dodatkowo, analizy *in vivo* i *in vitro* sugerują rolę sygnalizacji *Bmp* we wzmożonym kościotworzeniu otaczającym chrząstkozrosty. Na podstawie tych obserwacji przypuszczamy, że *Fgfr3* w chondrocytach reguluje zamykanie się chrząstkozrostów, tworzenie kości i łączenie się ośrodków kostnienia w sposób skoordynowany. Zwężenie kanału kręgowego, zwężenie otworu wielkiego i hipoplazja podstawy czaszki u pacjentów z heterozygotyczną achondroplazją mogą być spowodowane przedwczesnym zamykaniem się chrząstkozrostów. Moment zamknięcia się każdego chrząstkozrostu powinien być u tych pacjentów badany, a przyszłe leczenie nakierowane na wzrost kręgosłupa i podstawy czaszki musi rozpocząć się przed zamknięciem się chrząstkozrostów. Dalsza analiza roli *Fgfr3* w chondrocytach może prowadzić do powstania nowego podejścia terapeutycznego dla zapobiegania przedwczesnemu zamykaniu się chrząstkozrostów i płytek wzrostu w achondroplazji i innych chorobach układu kostnego.

MATERIAŁY I METODY

Material badawczy pochodzący od ludzi

Próbki pozyskane od ludzi z dysplazją śmiertelną i homozygotyczną achondroplazją badane były w Międzynarodowym Rejestrze Dysplazji Kostnych Centrum Medycznego Cedar Sinai. Chrząstkozrosty podstawy czaszki i kręgów lędźwiowych badane były początkowo za pomocą badania radiograficznego, a następnie poddane zostały obróbce celem przeprowadzenia analizy histologicznej. Utrwalona w formalinie, nieodwapniona tkanka zatopiona została w metakrylanie metylu, pocięta nożem wolframowym i zabarwiona metodą Goldnera.

Myszy

Wydziałowy Komitet ds. opieki nad zwierzętami i wykorzystania zwierząt Uniwersytetu Case Western Reserve zatwierdził wszystkie procedury, które miały być przeprowadzone na zwierzętach. Wszystkie procedury zostały wykonane zgodnie z zasadami i polityką Komitetu. Myszy nosicielki mutacji *Fgfr3*^{G374R}, która odpowiada ludzkiej mutacji *G380R* w achondroplazji oraz myszy transgeniczne, które wykazują w chondrocytach ekspresję aktywnej konstytutywnej mutacji *MEK1* pod kontrolą sekwencji regulujących *Col2a1*, zostały opisane wcześniej (27, 32). Myszy transgeniczne *Zp3-Cre*, które wykazują ekspresję rekombinazy *Cre* w oocytach (52), myszy transgeniczne *Prx1-Cre*, które wykazują ekspresję rekombinazy *Cre* we wszystkich komórkach mezenchymalnych rozwijających się kończyn i mostka (53), myszy transgeniczne *Col2a1-Cre*, które wykazują ekspresję rekombinazy *Cre* w chondrocytach (54) i myszy transgeniczne *Coll1a1-Cre*, które wykazują ekspresję rekombinazy *Cre* w osteoblastach (55) zostały użyte w celu usunięcia kasety neomycynowej w *Fgfr3*. Myszy, które wykazywały ekspresję *LacZ* pod kontrolą promotora specyficznego dla osteoblastów *Coll1a1* o długości 2.3 kb (28) były hojnym darem od dr. Benoit de Crombrugge (U.T.M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Teksas, USA). Myszy transgeniczne wykazujące nadekspresję ludzkiego *CNP* pod kontrolą sekwencji regulatorowej *Col2a1* zostały stworzone w Transgenic Core Facility na Uniwersytecie Case Western Reserve. Transgeniczny wektor ekspresji zawierający sekwencje promotorowe i wzmacniające myszy *Col2a1* były szczerze zapewnione przez dr. Yoshihiko Yamada (Narodowy Instytut Zdrowia, Bethesda, Maryland, USA). Myszy bez *Stat1* zostały zakupione od Taconic (56). Allel *Fgfr3* został zrekombinowany przy pomocy transgeny *Zp3-Cre*, by wywołać ekspresję *Fgfr3*^{G374R} na podłożu braku *Stat1* (32).

Preparaty kostne

Myszy zostały uśmiercone za pomocą inhalacji dwutlenku węgla. Po usunięciu skóry, całe ciało zostało utrwalone w 95% roztworze etanolu i zabarwione błękitem alcjańskim i czerwienią alizarynową S. Tkanki miękkie usunięto za pomocą KOH.

Badanie histologiczne

Tkanki zostały utrwalone w 4% roztworze formaldehydu w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) przez 20-24 godziny w temperaturze 4°C i zanurzone w parafinie. Przed zanurzeniem tkanki poporodowe zostały zdeminalizowane w 0,5 molowym roztworze EDTA. Następnie pocięto materiał na fragmenty o grubości 7 µm i zabarwiono hematoksyliną i eozyną oraz błękitem

alcjańskim. W celu immunowybarwienia aktywność endogennej peroksydazy została stłumiona przy użyciu 3% roztworu nadtlenu wodoru. Przeprowadzono indukowane ciepłem poszukiwanie epitopów – użyto Borgdecloaker (Biocare) i szybkoaru (Biocare). Pierwotne przeciwciała dla czynnika von Willebranda (Chemicon, Kalifornia, USA), Runx2 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) i osteopontyny (R&G) zostały zaaplikowane na każdy skrawek i inkubowane w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę lub nocą w temperaturze 4°C. Po wypłukaniu w zawierającym PBS 0,01% roztworze Tritounu X, skrawki były inkubowane w obecności polimeru przeciwciał kozich lub króliczych sprzężonego z peroksydazą (Super PicTure Polymer Detection kit, Zymed, Kalifornia, USA). Barwienie immunologiczne kolagenu typu X przeprowadzone zostało za pomocą mysiego przeciwciała przeciwko kolagenowi typu X (Clone X53, Cat. No. 2031501005, quartett Immunodiagnostika&Biotechnologie GmbH, Berlin, Niemcy) oraz zestawu biotynylacji MM (Biocare medical, Kalifornia, USA). Kolor uzyskano przy pomocy diaminobenzzydiny lub 3,3',5,5'-tetrametylobenzzydiny (KPL Inc., Maryland, USA). Skrawki poddane zostały barwieniu kontrastowemu orceiną lub zielenią kontrastową (KPL). W analizie proliferacji komórek BrdU (Zymed) zostało wstrzyknięte dootrzewnowo lub podskórnio w dawce 300 mg/kg. Myszy zostały uśmiercone 2 godziny po iniekcji. Komórki wyznakowane BrdU identyfikowane były za pomocą zestawu barwiącego BrdU (Zymed). W celu wybarwienia X-gal tkanki zostały utrwalone w 2% roztworze formaliny w PBS, przemyte buforem do płukania (0,1% dezoksychoalan sodowy, 0,2% NP40, 2 mmol MgCl₂, 0,1 molowy bufor fosforanowy, pH 7.3) i zabarwione w roztworze X-gal (1mg/ml X-gal, 5 mmol żelazicyjnanu, 5 mmol żelazicyjanku w buforze do płukania). Zdjęcia wykonano mikroskopem Leica przy użyciu oprogramowania Leica.

Hybrydyzacja *in situ*

Ze skrawków usunięto parafinę i utrwalono je w 4% roztworze formaldehydu. Następnie poddano je trawieniu proteinazą K (1µg/ml) przez 20 minut w temperaturze 37°C, a także acetylacji w 0,25% roztworze bezwodnika octowego w 0,1 molowym chlorowodoru trietanolaminy. Po ponownym utrwaleniu w 4% roztworze formaldehydu skrawki zostały zhybrydyzowane za pomocą znakowanej siarką ³⁵S antysensownej sondy rybosomalnej w buforze hybrydyzacyjnym (50% zdejonizowany formamid, 300 mmol NaCl, 20 mmol Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mmol EDTA, 0,5mg/ml tRNA drożdży, 10% siarczanu dekstranu i 1 x roztwór Denharda) w nawilżonej komorze w temperaturze 55°C w nocy. Po hybrydyzacji skrawki zostały przepłukane 5 x SSC (roztwór soli buforowany cytrynianem sodu) w temperaturze 50°C, 50% formamidzie, 2 x SSC w temperaturze 65°C i 1 x NTE (0,5 mmol NaCl, 10

mmol tris-HCl, pH 8,0, 5 mmol EDTA) w temperaturze 37°C, następnie poddane działaniu rybonukleazy A (20µg/ml) i rybonukleazy T1 (1U/µl) w 1 x NTE w temperaturze 37°C przez 20 minut. Następnie skrawki zostały płukane w 1 x NTE w 37°C, 50% formamidzie, 2 x SSC w temperaturze 65°C, 2 x SSC, 0,1 x SSC, a potem odwodnione przy użyciu stopniowych stężeń octanu amonu i etanolu. Próbki zostały zanurzone w emulsji NTB (Kodak) i poddane ekspozycji od 5 dni do 2 tygodni. Skrawki były następnie opracowane i zabarwione kontrastowo barwikiem Hoechst 33258 (Sigma).

Hodowle komórkowe

Mysie chondrocyty kostne wyizolowane zostały z myszy 3-4 dniowych szczepu dzikiego B6D2 (C57BL6/DBA2) (57). Klatki piersiowe zostały początkowo poddane trawieniu kolagenazą (3mg/ml) w temperaturze 37°C przez około 1 godzinę celem usunięcia tkanek miękkich. Chondrocyty zostały wyizolowane z żeber przez dalsze trawienie kolagenazą (0,5mg/ml) w ciągu nocy w inkubatorze CO₂ w temperaturze 37°C. W przypadku działania FGF18 i U0126, komórki zostały umieszczone na 60 mm płytkach 12-dołkowych lub 24-dołkowych w gęstości 1x10⁵ komórek/cm² na podłożu wysokoglukozowym Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen) wzbogaconym L-glutaminą 2 mmol (Invitrogen), penicyliną (50 jednostek/ml), streptomycyną (50 µg/ml) i 10% FBS przez 3 dni do osiągnięcia stanu subkonfluencji i poddane działaniu 20 ng/ml FGF18 (R&D) w obecności lub braku 20 µmol U0126 (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Całkowite RNA zostało wyekstrahowane w 3, 8, i 24 godzinie po stymulacji przy użyciu zestawu RNeasy kit (Qiagen, Valencia, Kalifornia, USA). W przypadku infekcji adenowirusem pierwotne chondrocyty zostały umieszczone na płytkach 12-dołkowych w liczbie 2x10⁵ komórek/cm². Komórki zostały zainfekowane adenowirusem kodującym konstytutywnie aktywną MEK1 S217/221E lub adenowirusem kontrolnym bez wspomnianego genu (Cell Biolabs, San Diego, Kalifornia, USA) w liczbie 100 cząsteczek wirusa na jedną komórkę (MOI – multiplicity of infection) w 1 godzinę po przeniesieniu na płytki. RNA pozyskane zostało 48 godzin po infekcji adenowirusem.

Izolacja RNA z chrząstki nasadowej

W celu bezpośredniej ekstrakcji RNA z chrząstki nasadowej zebrano nasady proksymalnej części kości piszczelowej, dystalnej części kości udowej i dystalnej części kości ramiennej od 3-dniowych myszy przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. Uzyskane nasady zostały poddane procesowi homogenizacji w roztworze RLT (Qiagen) przy użyciu Power Gen 500 (Fisher, Pittsburgh, Pensylwania, USA). Całkowite RNA zostało wyekstrahowane przy użyciu zestawu RNeasy kit (Qiagen).

PCR w czasie rzeczywistym

RNA poddane zostało procesowi odwrotnej transkrypcji do cDNA za pomocą zestawu High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzone zostało przy użyciu systemu detekcji Applied Biosystems 7500 real-time PCR. Zaprojektowano zestawy sond TaqMan i zsyntetyzowano za pomocą Applied Biosystems (*Bmp-2*; Mm01962382_s1, *Bmp-7*; Mm00432105_m1, *Noggin*; Mm01297833_s1, *Chordin*; Mm00438203_m1, *Gremlin 1*; Mm00488615_s1, *Gapdh*; 4352932E). By porównać poziomy ekspresji genów wykorzystano metodę porównawczego progu cyklu (Ct). *Gapdh* zostało wykorzystane jako endogenna kontrola do sprawdzenia potencjalnej zmienności zawartości RNA lub wydajności amplifikacji.

Analiza mikromacierzy

Analiza mikromacierzy przeprowadzona została w Zakładzie Ekspresji Genów i Genotypowania w Case Comprehensive Cancer Center na Uniwersytecie Case Western Reserve. W skrócie, RNA zostało oczyszczone przy użyciu Qiagen spin columns i przekształcone w cDNA z podwójną nicią. cDNA znakowane zostało biotyną i pofragmentowane według protokołu producenta. Pofragmentowane cRNA zostało zhybrydyzowane na Affymetrix mouse 4.30 chips. Analiza danych została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania AffymetrixGCOS.

SUPLEMENT

Suplement dostępny jest na Human Molecular Genetics Online.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy Chu-Xia Deng (Narodowy Instytut Zdrowia, Bethesda, Maryland, USA), Tamayuki Shinomura (Uniwersytet Medyczny i Stomatologiczny w Tokio, Tokio, Japonia), Céline Colnot (Uniwersytet Kalifornijski w San Francisco, Kalifornia, USA), Richard Harland (Uniwersytet Kalifornijski w Berkeley, Kalifornia, USA), Yasuhide Furuta (U.T.M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Teksas, USA), Andrew McMahon (Uniwersytet Harvarda, Cambridge, Massachusetts, USA), Jinkun Chen (U.T. Centrum Nauk o Zdrowiu w San Antonio, Teksas, USA) za próbki, Yoshihiko Yamada (Narodowy Instytut Zdrowia, Bethesda, Maryland, USA) za transgeniczny wektor ekspresji, James Martin (Instytut Nauk Biologicznych i Technologii, Houston, Teksas, USA) i Benoit de Crombrughe (U.T.M.D. Anderson Cancer Center) za myszy transegeniczne *Prx1-Cre* i *Coll1a1-LacZ*. Jesteśmy wdzięczni Dr. Masahiro Kurosaka (Uniwersytet w Kobe) za jego stałe

wspieranie tych badań. Dziękujemy także Drs. Guang Zhou i Douglas Armstrong za dyskusję naukową oraz Ms. Valerie Schmedlen za pomoc edytorską.

Oświadczenie konfliktu interesów: nikt nie zadeklarował.

FINANSOWANIE

Praca ta wsparta została nagrodą Arthritis Investigator Award fundacji Arthritis Foundation, March of Dimes Birth Defects Foundation [numer grantu #6-FY06-341], Narodowego Instytutu Zdrowia [numer grantu R21DE017406] dla S.M., Narodowego Instytutu Zdrowia [numer grantu 5P01-HD22657, M01-RR00425] i nagrodą stypendium badawczego rodziny Winnick dla W.R.W, Narodowej Fundacji Badawczej nad Artretyzmem i Narodowego Instytutu Zdrowia [numer grantu 5K08AR53943-2] dla H.B., Instytutu Medycznego Howarda Hughesa dla M.L.W. Wydział Ekspresji Genów i Genotypowania Case Comprehensive Cancer Center wspierany był przez Narodowy Instytut Zdrowia [numer grantu P30 CA43703].

PIŚMIENNICTWO

1. van der Eerden, B.C., Karperien, M. and Wit, J.M. (2003) Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr. Rev.*, 24, 782–801.
2. Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M. and Baron, J. (2005) Endocrine regulation of the growth plate. *Horm. Res.*, 64, 157–165.
3. Peters, K., Ornitz, D., Werner, S. and Williams, L. (1993) Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev. Biol.*, 155, 423–430.
4. Delezoide, A.L., Benoist-Lasselin, C., Legeai Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., Vekemans, M. and Bonaventure, J. (1998) Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech. Dev.*, 77, 19–30.
5. Rousseau, F., Bonaventure, J., Legeai-Mallet, L., Pelet, A., Rozet, J.M., Maroteaux, P., Le Merrer, M. and Munnich, A. (1994) Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature*, 371, 252–254.
6. Rousseau, F., Saugier, P., Le Merrer, M., Munnich, A., Delezoide, A.L., Maroteaux, P., Bonaventure, J., Narcy, F. and Sanak, M. (1995) Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat. Genet.*, 10, 11–12.
7. Rousseau, F., el Ghouzzi, V., Delezoide, A.L., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A. and Bonaventure, J. (1996) Missense FGFR3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum. Mol. Genet.*, 5, 509–512.
8. Shiang, R., Thompson, L.M., Zhu, Y.Z., Church, D.M., Fielder, T.J., Bocian, M., Winokur, S.T. and Wasmuth, J.J. (1994) Mutations in the transmembrane

- domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell*, 78, 335–342.
9. Bellus, G.A., McIntosh, I., Smith, E.A., Aylsworth, A.S., Kaitila, I., Horton, W.A., Greenhaw, G.A., Hecht, J.T. and Francomano, C.A. (1995) A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia. *Nat. Genet.*, 10, 357–359.
 10. Trotter, T.L. and Hall, J.G. the Committee on Genetics (2005) Health supervision for children with achondroplasia. *Pediatrics*, 116, 771–783.
 11. Horton, W.A., Hall, J.G. and Hecht, J.T. (2007) Achondroplasia. *Lancet*, 370, 162–172.
 12. Pauli, R.M., Scott, C.I., Wassman, E.R. Jr, Gilbert, E.F., Leavitt, L.A., Ver Hoeve, J., Hall, J.G., Partington, M.W., Jones, K.L., Sommer, A. et al. (1984) Apnea and sudden unexpected death in infants with achondroplasia. *J. Pediatr.*, 104, 342–348.
 13. Hecht, J.T., Francomano, C.A., Horton, W.A. and Annegers, J.F. (1987) Mortality in achondroplasia. *Am. J. Hum. Genet.*, 41, 454–464.
 14. Hecht, J.T. and Butler, I.J. (1990) Neurologic morbidity associated with achondroplasia. *J. Child Neurol.*, 5, 84–97.
 15. Danielpour, M., Wilcox, W.R., Alanay, Y., Pressman, B.D. and Rimoin, D.L. (2007) Dynamic cervicomedullary cord compression and alterations in cerebrospinal fluid dynamics in children with achondroplasia. Report of four cases. *J. Neurosurg.*, 107, 504–507.
 16. Rimoin, D.L. (1995) Cervicomedullary junction compression in infants with achondroplasia: when to perform neurosurgical decompression. *Am. J. Hum. Genet.*, 56, 824–827.
 17. Hecht, J.T., Horton, W.A., Reid, C.S., Pyeritz, R.E. and Chakraborty, R. (1989) Growth of the foramen magnum in achondroplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 32, 528–535.
 18. Soames, R.W. (1995) *Gray's Anatomy. The Anatomical Basis of Medicine and Surgery*. 38th edn. Churchill Livingstone, New York, pp. 547–613.
 19. Madeline, L.A. and Elster, A.D. (1995) Suture closure in the human chondrocranium: CT assessment. *Radiology*, 196, 747–756.
 20. Okamoto, K., Ito, J., Tokiguchi, S. and Furusawa, T. (1996) High-resolution CT findings in the development of the sphenoccipital synchondrosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 17, 117–120.
 21. Sahni, D., Jit, I., Neelam and Suri, S. (1998) Time of fusion of the basisphenoid with the basilar part of the occipital bone in northwest Indian subjects. *Forensic Sci. Int.*, 98, 41–45.
 22. Kahana, T., Birkby, W.H., Goldin, L. and Hiss, J. (2003) Estimation of age in adolescents –the basilar synchondrosis. *J. Forensic Sci.*, 48, 504–508.
 23. Maat, G.J., Matricali, B. and van Persijn van Meerten, E.L. (1996) Postnatal development and structure of the neurocentral junction. Its relevance for spinal surgery. *Spine.*, 21, 661–666.
 24. Rajwani, T., Rajwani, T., Bhargava, R., Moreau, M., Mahood, J., Raso, V.J., Jiang, H. and Bagnall, K.M. (2002) MRI characteristics of the neurocentral synchondrosis. *Pediatr. Radiol.*, 32, 811–816.
 25. Rajwani, T., Bhargava, R., Lambert, R., Moreau, M., Mahood, J., Raso, V.J., Jiang, H., Huang, E.M., Wang, X., Daniel, A. et al. (2002) Development of the neurocentral junction as seen on magnetic resonance images. *Stud. Health Technol. Inform.*, 91, 229–234.
 26. Hoshino (2004) A study of the postnatal development of vertebrae in medieval human bones. *St. Marianna Med. J.*, 32, 551–559.
 27. Wang, Y., Spatz, M.K., Kannan, K., Hayk, H., Avivi, A., Gorivodsky, M., Pines, M., Yayon, A., Lonai, P. and Givol, D. (1999) A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 4455–4460.
 28. Rossert, J., Eberspaecher, H. and de Crombrughe, B. (1995) Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter *Human Molecular Genetics*, 2009, Vol. 18, No. 2 239
Downloaded from <http://hmg.oxfordjournals.org/> by guest on May 24, 2016 direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J. Cell Biol.*, 129, 1421–1432.
 29. Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M. 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.
 30. Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R. et al. (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89, 765–771.
 31. Xiao, L., Naganawa, T., Obugunde, E., Gronowicz, G., Ornitz, D.M., Coffin, J.D. and Hurley, M.M. (2004) *Stat1* controls postnatal bone formation by regulating fibroblast growth factor signaling in osteoblasts. *J. Biol. Chem.*, 279, 27743–27752.
 32. Murakami, S., Balmes, G., McKinney, S., Zhang, Z., Givol, D. And de Crombrughe, B. (2004) Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes *Stat1*-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the *Fgfr3*-deficient mouse phenotype. *Genes Dev.*, 18, 290–305.
 33. Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., Ozasa, A., Miura, M., Kurihara, T., Rogi, T., Tanaka, S., Suda, M. et al. (2004) Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat. Med.*, 10, 80–86.
 34. Krejci, P., Masri, B., Fontaine, V., Mekikian, P.B., Weis, M., Prats, H. And Wilcox, W.R. (2005) Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis. *J. Cell Sci.*, 118, 5089–5100.

35. Su, W.C., Kitagawa, M., Xue, N., Xie, B., Garofalo, S., Cho, J., Deng, C., Horton, W.A. and Fu, X.Y. (1997) Activation of Stat1 by mutant fibroblast growth-factor receptor in thanatophoric dysplasia type II warfism. *Nature*, 386, 288–292.
36. Sahni, M., Ambrosetti, D.C., Mansukhani, A., Gertner, R., Levy, D. And Basilico, C. (1999) FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway. *Genes Dev.*, 13, 1361–1366.
37. Liu, Z., Xu, J., Colvin, J.S. and Ornitz, D.M. (2002) Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.*, 16, 859–869.
38. Ohbayashi, N., Shibayama, M., Kurotaki, Y., Imanishi, M., Fujimori, T., Itoh, N. and Takada, S. (2002) FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.*, 16, 870–879.
39. Chen, L., Adar, R., Yang, X., Monsonego, E.O., Li, C., Hauschka, P.V., Yayon, A. and Deng, C.X. (1999) Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J. Clin. Invest.*, 104, 1517–1525.
40. Chen, L., Li, C., Qiao, W., Xu, X. and Deng, C. (2001) A Ser(365)–Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals and causes severe achondroplasia. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 457–465.
41. Sakai, K., Hiripi, L., Glumoff, V., Brandau, O., Eerola, R., Vuorio, E., Bo'sze, Z., Fa'ssler, R. and Aszo'di, A. (2001) Stage-and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice. *Matrix Biol.*, 19, 761–767.
42. Wilcox, W.R., Tavormina, P.L., Krakow, D., Kitoh, H., Lachman, R.S., Wasmuth, J.J., Thompson, L.M. and Rimoin, D.L. (1998) Molecular, radiologic, and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia. *Am. J. Med. Genet.*, 78, 274–281.
43. 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.
44. Naski, M.C., Colvin, J.S., Coffin, J.D. and Ornitz, D.M. (1998) Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development*, 125, 4977–4988.
45. Li, C., Chen, L., Iwata, T., Kitagawa, M., Fu, X.Y. and Deng, C.X. (1999) A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 35–44.
46. Balemans, W. and Van Hul, W. (2002) Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.*, 250, 231–250 (review).
47. Kobayashi, T., Soegiarto, D.W., Yang, Y., Lanske, B., Schipani, E., McMahon, A.P. and Kronenberg, H.M. (2005) Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J. Clin. Invest.*, 115, 1734–1742.
48. Warren, S.M., Brunet, L.J., Harland, R.M., Economides, A.N. and Longaker, M.T. (2003) The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature*, 422, 625–629.
49. Hart, K.C., Robertson, S.C. and Donoghue, D.J. (2001) Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol. Biol. Cell*, 12, 931–942.
50. Meyer, A.N., Gastwirt, R.F., Schlaepfer, D.D. and Donoghue, D.J. (2004) The cytoplasmic tyrosine kinase Pyk2 as a novel effector of fibroblast growth factor receptor 3 activation. *J. Biol. Chem.*, 279, 28450–28457.
51. Krejci, P., Masri, B., Salazar, L., Farrington-Rock, C., Prats, H., Thompson, L.M. and Wilcox, W.R. (2007) Bisindolylmaleimide I suppresses fibroblast growth factor-mediated activation of Erk MAP kinase in chondrocytes by preventing Shp2 association with the Frs2 and Gab1 adaptor proteins. *J. Biol. Chem.*, 282, 2929–2936.
52. Lewandoski, M., Wassarman, K.M. and Martin, G.R. (1997) Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr. Biol*, 7, 148–151.
53. Logan, M., Martin, J.F., Nagy, A., Lobe, C., Olson, E.N. and Tabin, C.J. (2002) Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis*, 33, 77–80.
54. Ovchinnikov, D.A., Deng, J.M., Ogunrinu, G. and Behringer, R.R. (2000) Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis*, 26, 145–146.
55. Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T. and Karsenty, G. (2002) Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev. Dyn.*, 224, 245–251.
56. Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., Kaplan, D.H., Riley, J.K., Greenlund, A.C., Campbell, D. et al. (1996) Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84, 431–442.
57. Lefebvre, V., Garofalo, S., Zhou, G., Metsa'ranta, M., Vuorio, E. And de Crombrugge, B. (1994) Characterization of primary cultures of chondrocytes from type II collagen/beta-galactosidase transgenic mice. *Matrix Biol.*, 14, 329–335.

Źródło:

<http://hmg.oxfordjournals.org/content/18/2/227.full.pdf+html?sid=cb1e07e8-278b-4a0b-b976-b1b2a4de03e0>