

L'analyse fonctionnelle des mutations présumées du G92E NOGGIN réfute sa pertinence pathogène

Julia Zimmer^{1,2}, Sandra C. Doelken³, Denise Horn³, Jay C. Groppe⁴, Eileen M. Shore^{5,6}, Frederick S. Kaplan^{5,6}, Petra Seemann^{1,2*}

1 Berlin Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, 2 Berlin Brandenburg School for Regenerative Therapies, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, 3 Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, 4 Department of Biomedical Sciences, Baylor College of Dentistry, Texas A & M Health Science Center, Dallas, Texas, United States of America, 5 Department of Orthopaedic Surgery, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America, 6 Center for Research in FOP and Related Disorders, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania, United States of America

Résumé

*Nous avons identifié un changement d'acide aminé (p.G92E) dans la protéine morphogénétique osseuse (BMP) antagoniste NOGGIN chez un garçon de 22 mois qui a présenté une brachydactylie unilatérale de type B. La brachydactylie de type B est une malformation du squelette qui a été associée à une activation accrue des protéines morphogénétiques osseuses par d'autres patients. Auparavant, le changement de l'acide aminé p.G92E dans le NOGGIN était décrit comme provoquant la fibrodysplasie ossifiante progressive, une maladie génétique rare caractérisée par des malformations des membres et des formations osseuses hétérotopiques progressives dans les tissus mous qui, comme la brachydactylie type B, sont provoquées par l'activation accrue de protéines morphogénétiques osseuses. Pour déterminer si le G92E-NOGGIN montre un antagonisme affaibli qui pourrait conduire à une signalisation des protéines osseuses morphogénétiques augmentée, nous avons effectué des tests fonctionnels afin d'évaluer l'inhibition du signal BMP. Fait intéressant, wt- NOGGIN montre une efficacité d'inhibition différente à l'égard de diverses protéines morphogénétiques osseuses qui sont connues pour être essentielles dans le développement des membres. Cependant, en comparant l'activité biologique du G92E-NOGGIN avec celle du wt-NOGGIN, nous avons observé que le G92E-NOGGIN inhibe l'activation du signal de la protéine morphogénétique osseuse avec la même efficacité que wt-NOGGIN, en soutenant le fait que le G92E-NOGGIN ne provoque pas d'effets pathologiques. Les tests génétiques des parents de l'enfant ont révélé le changement du même acide aminé chez le père sain, démontrant en outre que le p.G92E est une substitution d'acide aminé neutre dans le NOGGIN. **Nous concluons donc que le p.G92E représente un polymorphisme rare du gène NOGGIN – ne causant ni brachydactylie ni fibrodysplasie ossifiante progressive.** Cette étude met en évidence qu'une variation génétique donnée ne doit pas être considérée comme pathogène à moins d'être étayée par des analyses fonctionnelles.*

Introduction

NOGGIN (NOG) est une protéine homodimère sécrétée. Le nom provient de l'observation que de fortes doses de NOG injectées dans des embryons de *Xenopus laevis* (crapaud) ont causé un développement excessif de la tête [1]. Plus tard, il a été montré que le NOG inhibe spécifiquement l'activité des protéines morphogénétiques osseuses (BMP en anglais) et des facteurs de croissance et de différenciation (GDF en anglais) avec des efficacités différentes [2-5]. Les BMP ont été initialement identifiés comme des inducteurs puissants de l'os par *Urist Marshall* [6]. Aujourd'hui, on sait que la fonction des BMP ne se limite pas au développement du squelette et à la régénération, mais ils remplissent des fonctions essentielles dans plusieurs organes non squelettiques y compris le cerveau, le cœur, le foie, les

poumons, les reins et la peau [7]. Les BMP appartiennent à la superfamille TGF β et se lient à un complexe de récepteurs extracellulaires hétérotétramériques de type I et de type II. Le signal est transmis dans le noyau par l'intermédiaire de la phosphorylation de molécules de signalisation comme les protéines SMAD, où la transcription du gène est activée. Un des mécanismes principaux contrôlant la cascade des signaux, à la fois spatiale et temporelle, sont des antagonistes extracellulaires comme le NOG. L'analyse de la structure cristalline du complexe BMP7/NOG a indiqué que le NOG inhibe la transmission du signal par l'occlusion du site de liaison du récepteur [8].

Le déséquilibre entre les agonistes, les antagonistes et les récepteurs peut entraîner des troubles liés aux BMP. Comme le NOG est particulièrement important dans le développement des os et de la fonction, les mutations NOG sont liées à plusieurs maladies osseuses caractérisées soit par des fusions articulaires et/ou des malformations des phalanges [9]. Plus précisément, les mutations du NOG sont décrites comme pouvant causer la symphalangie proximale (SYM1; OMIM # 185800), le syndrome de synostose multiples (SYNS, OMIM: # 186500), le syndrome de coalition tarso-carpienne (STC; OMIM # 186570), l'ankylose stapédienne avec les pouces et les orteils larges (OMIM # 184460), et une brachydactylie de type B2 (BDB2; OMIM # 611377) comme l'a récemment examinée *Mr. Potti et al.* [10]. Tous ces phénotypes sont le résultat d'un dérèglement du signal BMP au cours du développement du squelette humain. Le signal BMP est également modifié dans la Fibrodysplasie Ossifiante Progressive (FOP; OMIM # 135100), une maladie rare et invalidante, autosomique dominante, caractérisée par des malformations des membres et des formations osseuses hétérotopiques progressives qui conduisent à compléter l'ankylose de presque toutes les articulations du squelette appendiculaire et axial [11 -14]. En 2006, le *Dr. Shore* et ses collègues relient la FOP au chromosome 2q23-q24 et identifient la cause génétique sous-jacente de la FOP: une mutation hétérozygote en un point du gène de l'activine A récepteur de type 1 (ACVR1), un récepteur BMP de type I, chez tous les individus affectés dans le monde [15]. Il a ensuite été montré que *la mutation faux-sens* identifiée dans l'ACVR1 au point c.G617A menant au changement de l'acide aminé p.R206H est une mutation activatrice [16].

Précédemment à l'identification des mutations de l'ACVR1 dans la FOP, les défauts du signal BMP avait conduit à l'hypothèse qu'ils étaient responsables de la FOP puisque que les BMP régulent plusieurs étapes dans le développement et peuvent induire l'ostéogenèse hétérotopique [17,18]. Initialement, le BMP4 avait été considéré comme le candidat principal du gène responsable car il est surexprimé dans les lésions des patients atteints de la FOP, dans les cellules lymphoblastoïdes et dans les cellules très vasculaires pré-osseuses fibroprolifératives [19-21]. Toutefois, l'analyse des liaisons a exclu le chromosome 14, lieu du BMP4, et aucune mutation du BMP4 n'a pu être trouvée chez les patients atteints de la FOP [15,22,23]. Le NOG, un puissant antagoniste extracellulaire BMP, a également été considéré comme un gène candidat pour la FOP [24,25] puisque le BMP4 est un antagoniste du NOG. Ainsi le NOG se surexprimerait dans une boucle de rétroaction négative [2,26].

De nouvelles mutations du gène NOG ont été signalées chez les patients atteints de la FOP, y compris la même guanine de l'adénine de substitution au nucléotide 275 conduisant au changement d'acide aminé p.G92E que nous avons identifié chez notre patient [27,28]. En réponse à ces rapports sur l'implication des mutations du NOG dans la FOP [29-31], plusieurs études prouvant que la FOP n'est pas liée à des

mutations du NOG ont également été rapportées [32-37], posant une question non résolue quant à savoir si les mutations du NOG pouvaient provoquer la FOP. Des tests d'activité du NOG ont été mis en place avec succès pour étudier l'activité fonctionnelle des mutations du NOG dans des patients atteints de BDB2 [38] et sont utilisés dans cette étude pour évaluer la substitution du p.G92E. Ici, nous fournissons des preuves sur des critères cliniques, ainsi que des données expérimentales que le changement de l'acide aminé G92E du NOG n'a pas altéré sa fonction, mais représente un polymorphisme du NOG.

Résultats

Patient

Le patient, d'origine européenne, a été renvoyé au département de génétique clinique à l'âge de 22 mois. Il a présenté une brachydactylie unilatérale atypique de type B (BDB-like) de la main droite et des antécédents familiaux négatifs (Fig. 1). Cliniquement, sa main droite a montré un raccourcissement du 3^{ème} au 5^{ème} doigt avec un ongle rudimentaire sur le 4^{ème} doigt. Il manque les phalanges moyennes et distales et une hypoplasie de la phalange proximale du 4^{ème} doigt ainsi que l'hypoplasie des phalanges moyennes et distales des doigts III et V qui ont été démontrées par une radiographie de la main (Fig. 1A). A la fois cliniquement et radiologiquement, la main gauche ne présente aucune anomalie. Ses orteils étaient normaux et il n'avait aucune ossification hétérotopique ou d'autres caractéristiques du squelette de la FOP comme les vertèbres cervicales fondues et mal formées, ostéochondroses ou raccourcissement des tibias proximaux médiaux, larges cols fémoraux [39].

Le patient a été testé pour des mutations dans deux gènes candidats pour la BDB, le ROR2 et le NOG. Le séquençage n'a révélé aucune mutation dans le gène ROR2, mais une substitution hétérozygote c.G275A, p.G92E dans le gène NOG. L'analyse des parents sains a montré que le père a également été affecté par cette substitution. Le suivi du patient depuis l'âge de 4 ans a révélé qu'en dehors de la brachydactylie unilatérale le garçon était en bonne santé et n'a par la suite montré aucun signe de la FOP.

L'analyse structurelle du p.G92E

La substitution du seul résidu dans le p.G92E se trouve dans un segment apparemment très souple de la protéine humaine NOG, appelé boucle de polyglycine comprise entre les résidus d'acides aminés 89 et 95 [8]. En raison de l'absence apparente de structure uniforme et donc du manque de densité en électrons dans les zones calculées pour guider le processus, la boucle de polyglycine n'a pu être modélisée et intégrée dans la structure cristalline (1M4U) déposé dans le PDB (Fig. 2). Le NOG est un dimère de protéines extracellulaires qui se lie et séquestre le signal des ligands dimères, bloquant les récepteurs de surface dans un complexe hétéromère de signalisation et de transduction du signal à travers la membrane. Comme la boucle de polyglycine fait saillie dans le solvant loin de l'interface de liaison avec le ligand situé sur la surface opposée, les interactions directes entre la boucle de substitution et le signal BMP sont exclus.

L'analyse *in vitro* du G92E-NOG

Nous avons étudié l'évolution de l'acide aminé G92E-NOG dans des cultures *in vitro* de micromasse du poulet pour vérifier si ce changement d'acide aminé pouvait

altérer la fonction NOG et potentiellement causer des brachydactylies ou la FOP. En utilisant un test précédemment établi pour les BMP induisant la chondrogenèse dans les cultures de micromasse [5], nous avons comparé la capacité du wt-NOG et du G92E-NOG pour bloquer la chondrogenèse naturelle des cultures (figure 3A). Par rapport au témoin non infecté, à la fois le wt-NOG et le NOG-G92E inhibèrent la chondrogenèse même en utilisant des doses de virus très faibles. Afin de nous assurer que l'activité comparable du wt-NOG et du G92E-NOG n'était pas due à des différences dans les niveaux d'expression des protéines dans les cellules micromasses, nous avons confirmé par transfert de protéines (Western Blotting en anglais) que la quantité de wt-NOG et de G92E-NOG était similaire dans les cellules. Le témoin non infecté ne contient aucune protéine NOG détectable (Fig. 3B). Nous avons également étudié la capacité du wt-NOG et du G92E-NOG à inhiber l'activité d'un ensemble de BMP qui sont co-exprimés au cours du développement des membres [40]. G92E-NOG a réussi à bloquer tous les BMP testés de façon comparable et dans doses comparables au wt-NOG (Fig. 4). La comparaison des niveaux d'inhibition des BMP par NOG a montré que le BMP7 avait la plus grande sensibilité. Avec une concentration NOG de seulement 1/10 de la concentration en BMP, la chondrogenèse induite par le BMP7 est presque complètement bloquée alors que tous les autres BMP restent capables d'induire la chondrogenèse à ce niveau de concentration. Les BMP2 et le BMP4 sont contrariés efficacement par les deux, le wt-NOG et le G92E-NOG, bien que moins puissamment que pour le BMP7. De cette série de tests sur les BMP, GDF5 a été bloqué moins efficacement par le NOG, mais était encore capable d'induire des nodules cartilagineux lorsque les concentrations en NOG et en GDF5 étaient égales.

Discussion

La pertinence clinique des *mutations faux-sens* NOG dans la FOP, un trouble génétique rare mais mortelle, a fait l'objet d'intenses discussions depuis près d'une décennie [32-37]. Ici, nous fournissons des preuves fondées sur des données fonctionnelles que la substitution G92E dans la protéine NOG ne cause pas la FOP, mais représente plutôt une rare polymorphisme génétique neutre.

Nous avons identifié G92E-NOG chez un patient de 22 mois avec un phénotype de brachydactylie unilatérale atypique et avec un père en bonne santé. Les brachydactylies représentent un groupe de maladies du squelette caractérisé en général par des doigts raccourcis à la main et des orteils raccourcis aux pieds dus à des anomalies dans le processus de développement des phalanges ou des métacarpes / métatarses [41]. La brachydactylie type B1 (BDB1; omin # 113000) est provoquée par des mutations altérantes du ROR2, tandis que BDB2 est le résultat de mutations dans le NOG.



Figure 1. Phénotype du patient. Radiographies des mains des patients (A) ont été prises avant l'opération, à l'âge de 4 mois, montrant phénotype ressemblant de BDB atypique unilatérale. Les photographies des mains (B) et des pieds (C) ont été prises après la correction chirurgicale, à l'âge de 22 mois. Notez que la deuxième phalange du 3^{ème} orteil gauche a été enlevée et implantée comme la deuxième phalange du 3^{ème} doigt de la main droite afin de stabiliser le chiffre et d'améliorer la fonctionnalité. Le pedigree (D) indique le patient porteur du changement p.G92E hétérozygote dans le gène NOG dont il a hérité de son père en bonne santé.

doi: 10.1371/journal.pone.0035062.g001

Avec le patient décrit ici et présenté avec phénotype ressemblant de BDB unilatérale atypique, le séquençage du ROR2 et du NOG a été réalisé, révélant la substitution nucléotidique c.G275A dans le gène NOG entraînant le changement d'acide aminé p.G92E. Une recherche dans la base de données des mutations géniques humaines a indiqué que G92E-NOG n'est actuellement associé à aucun type de brachydactylie mais à la FOP.

En 2000, *Mr. Lucotte* et ses collègues ont fait état d'une liaison génétique entre le NOG et la FOP, alors que *Mr. Xu et al.* ont exclu un tel lien entre FOP et le NOG et n'ont pu identifier des mutations du gène NOG dans une large cohorte de patients atteints de la FOP [35,42]. En outre, trois nouvelles mutations du gène NOG publiées par *Mr. Semonin et al.* ont été par la suite contestées et suspectées d'être des erreurs techniques en raison de l'utilisation d'une approche PCR erronée [28,36]. Par conséquent, la nécessité de présenter des photographies et des radiographies des patients étudiés atteints de la FOP a été soulignée afin d'assurer le bon diagnostic clinique et pour que les mêmes phénotypes soient comparés [34]. Lors de l'identification des mutations activatrices hétérozygotes faux-sens dans ACRV1 comme cause génétique de la FOP en 2006, d'autres questions concernant la validité des mutations du gène NOG dans la FOP ont été soulevées [15,27,30,33,37].

La substitution nucléotidique c.G275A dans le gène NOG menant à l'acide aminé p.G92E a été décrit chez deux patients atteints de la FOP d'origine espagnole. Fait à noter, l'un des patients a également été positif pour la mutation p.R206H dans le gène ACVR1, ce qui soulève la question de la probabilité que deux mutations pathogènes causant une maladie génétique aussi rare que la FOP puissent être trouvées chez un seul patient [27, 28].

Notre patient avec un phénotype ressemblant de BDB atypique unilatérale et son père en bonne santé étaient positifs pour le changement d'acide aminé c.G275A, p.G92E dans le gène NOG décrit précédemment comme pouvant être une cause de la FOP [27,28]. Aucun de ces deux individus, le garçon, âgé maintenant de 4 ans, ou son père, âgé de 42 ans, n'ont montré aucun des signes cliniques de la FOP.

D'un point de vue structurel, la substitution dans le p.G92E est située dans la partie la plus flexible de la protéine NOG, un segment non interprétable à partir des cartes de densité électronique lors de la détermination structure 3D [8] (Fig. 2). Contrairement à la plupart des polypeptides des protéines NOG qui sont nécessaires pour le pliage, la stabilité et la formation de complexes, le segment de polyglycine n'est pas conservé parmi différentes espèces. Par exemple chez les chiens la boucle est élargie alors que chez les non mammifères elle est totalement absente [43]. De plus, le résidu en position 92 est orienté et distale à l'écart de l'interface de liaison avec le ligand, conforme à la neutralité de la substitution sur la fonction d'antagoniste.

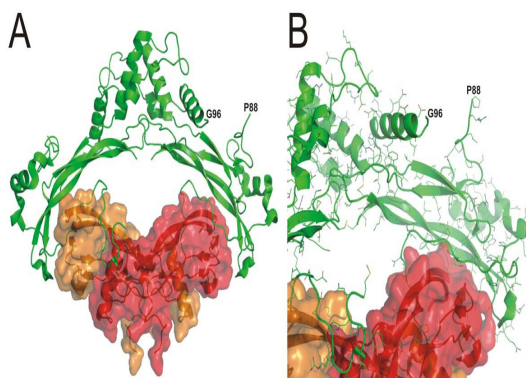


Figure 2. Modèle tridimensionnel du complexe NOG-BMP7 soulignant la boucle structurée de polyglycine qui abrite la substitution dans le p.G92E.

Le complexe NOG-BMP7 (APB: 1M4U) est représenté comme une structure simplifiée, avec des monomères de l'homodimère NOG en foncé dans la lumière verte et des monomères de l'homodimère BMP7 en rouge et orange avec des surfaces représentées (A). Étiquetés résidus adjacents de la boucle de polyglycine, qui est en suspens en raison d'une apparente souplesse élevée associée à la chaîne en grande partie libre de résidus. Les monomères NOG sur la gauche sont légèrement inclinés vers l'intérieur, et les monomères BMP7 légèrement vers l'extérieur, dans l'image plan. Le complexe dans la vue agrandie (B) est incliné de plus dans la même direction, ainsi que légèrement dans le sens inverse des aiguilles d'une montre autour de l'axe perpendiculaire.

doi: 10.1371/journal.pone.0035062.g002

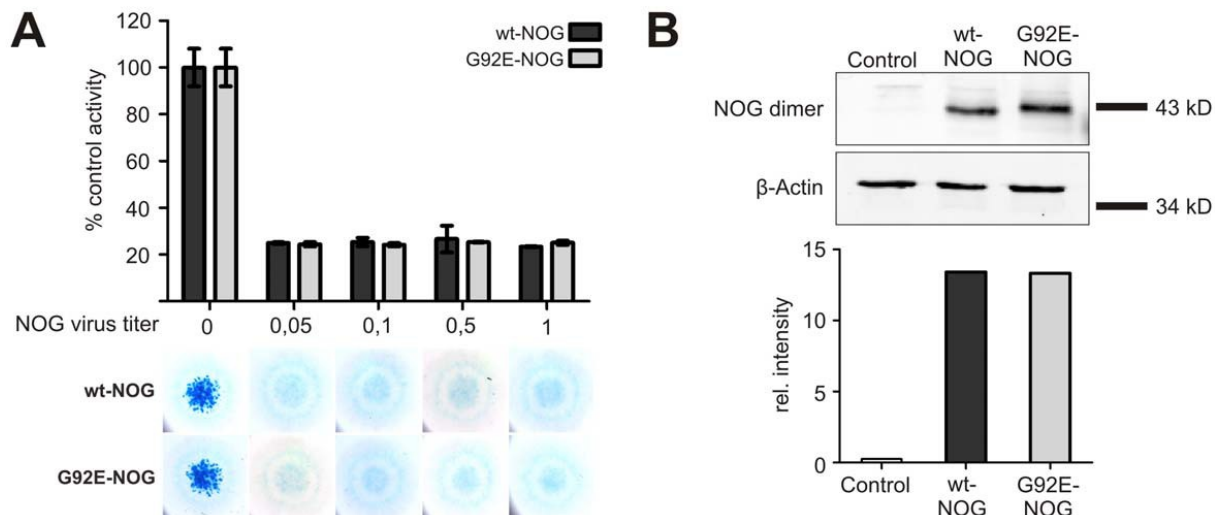


Figure 3. L'activité biologique des wt-NOG et G92E-NOG et la production de protéines dans des cellules micromasses de poulet sont comparables. Les cellules micromasses de poulet ont été infectées avec le wt-NOG et le NOG-G92E de 1×10^7 particules virales/ml jusqu'à $0,05 \times 10^7$ particules virales/ml (A). Au 5^{ème} jour, les cellules ont été colorées avec du bleu Alcian et la concentration du colorant a été quantifiée par spectrophotométrie à 595 nm. Les cellules témoins non infectées ont été normalisées en activité à 100%. Les données présentées sont tirées d'une expérience représentative réalisée avec 3 répétitions chacune. Les barres d'erreur indiquent l'écart type. Les boulettes de cellules infectées avec 1×10^7 particules virales/ml ont été recueillies au 3^{ème} jour de l'expérience à partir des mêmes cellules micromasses de poulet pour effectuer une analyse de Western Blot (transfert de protéines) (B). Les cellules non infectées ont été utilisées comme témoin. Après SDS-PAGE dans des conditions non réductrices et postérieures Western blot, NOG et β -actine sont détectés avec des anticorps spécifiques. Pour la quantification, NOG a été normalisé par rapport à la β -actine. Wt-NOG et G92E-NOG sont exprimés en quantités égales dans les cultures micromasses.
doi: 10.1371/journal.pone.0035062.g003

En outre, en utilisant des tests expérimentaux pour la signalisation BMP, nous n'avons pas relevé les différences entre la forme wt et la forme mutante de la protéine NOG pour inhiber le contrôle des cellules micromasses de poulet (Fig. 3). Cette observation est en contraste avec la maladie provoquant des mutations NOG comme P35R ou R167G, où les contrôles des cellules micromasses de poulet sont avérés être au moins bloqués efficacement par rapport au wt-NOG [38]. Cependant, dans la même publication de *Lehmann et al.* certains BDB provoquant des mutations NOG ne montrent pas non plus une perte d'activité inhibitrice sur le contrôle des cellules micromasses de poulet, comme A36P et P187S. C'est pourquoi nous avons élargi notre approche afin de comparer la capacité de G92E-NOG et de wt-NOG pour bloquer la chondrogenèse dans des cellules micromasses de poulet exprimant les complexes BMPs/GDFs connus pour être essentiels dans le développement des membres. Nous avons montré que BMP2, BMP4, BMP7 et GDF5 sont bloqués par le wt-NOG et le G92E de façon similaire dans des doses comparables (Fig. 4). Comme les BMP testés sont tous connus pour être des acteurs essentiels pendant la structuration des membres, des changements dans l'affinité du NOG pour ces BMP auraient pu fournir une explication pour le phénotype main du patient [5,40]. Il convient de noter que, contrairement aux données précédentes, le BMP7 a été antagonisé de manière très efficace par le NOG comparativement au BMP2, BMP4 et GDF5 [2]. En outre, le NOG avait été suspecté comme pouvant causer la FOP par diminution des antagonistes au BMP4 depuis que ce BMP avait été trouvé pour être surexprimé dans les lésions de patients FOP [20]. Toutefois, si une mutation dans le NOG aboutissait à la FOP à cause d'une diminution des antagonistes au BMP4, cela aurait été manifeste dans le système micromasse de poulet (Fig. 4). Comme il n'y a pas de différence dans l'antagonisme Bmp4 en comparant le wt-NOG et le G92E-NOG, nous pouvons exclure cette voie de la pathogénicité. L'application générale des cultures micromasses de poulet pour l'évaluation des mutations causant la FOP a été démontrée comme pour les mutations dans l'ACVR1 dont

résultent des changements dans le signal BMP et qui peuvent être surveillés dans ce système [16].

L'absence de différences entre le G92E-NOG et wt-NOG lors de nos tests fonctionnels soutient que l'observation d'un phénotype ressemblant à une BDB unilatérale atypique comme chez notre patient n'est pas due au polymorphisme dans le NOG. Sa malformation est plus probablement causée par une perturbation locale et isolée des vaisseaux embryonnaires au début du développement. De nombreuses anomalies des membres unilatérales sont supposés être causés par des troubles de développement polygéniques ou multifactorielles plutôt que par de simples mutations germinales du gène, plus spécifiquement les types de brachydactylies monogéniques héréditaires se manifestent quant à eux généralement de façon bilatérale [44]. En outre, les données empiriques étayent notre interprétation. Dans la base de données de séquençage d'exome de l'Université de *Seattle* (<http://evs.gs.washington.edu/EVS>) 25 des 10129 allèles (23 d'origine américaine ou européenne; 2 d'origine afro-américaine) sont répertoriées comme contenant l'échange G92E [45]. Cela implique une fréquence allélique de la population de 1/400. Comme la FOP et la BDB sont des maladies génétiques rares, il est très peu probable que le G92E-NOG provoque l'une de ces maladies. Nous concluons que le changement G92E dans le NOG est un polymorphisme ne causant ni la BDB ni la FOP.

Notre analyse soulève des questions importantes en matière de conseil génétique. Depuis que le changement d'acide aminé G92E dans le NOG est signalé comme étant pathogène pour la FOP dans plusieurs bases de données, tels que *the Human Gene Mutation Database*, des parents pourraient être mal informés que leur enfant a une mutation causant la FOP quand, en fait, un polymorphisme neutre a été identifié. À notre avis, il est impératif que ce fait devienne de notoriété publique et soit noté dans la base de donnée correspondante, et en outre que tout autre mutation NOG décrite pour provoquer la FOP soit évaluée par des tests expérimentaux. La nécessité de ces tests fonctionnels pour l'évaluation des mutations pathologiques causales a été récemment soulignée par plusieurs études. Par exemple, l'information sur le génome du *Dr. James Watson* par la technologie de séquençage de nouvelle génération a identifié 20 mutations associées à une augmentation des risques de maladie sans qu'elles ne deviennent apparemment manifestes chez les porteurs [46,47]. Cette notion a également été prise en charge dans une plus grande échelle par *MacArthur et al.* qui ont montré que l'homme sain porte en lui un grand nombre de mutations lui faisant perdre des fonctions putatives dans les gènes codant pour des protéines sans conséquences phénotypiques, ce qui suggère un degré inattendu et élevé de redondance dans le génome humain [48]. Il est prévu que pour la majorité des gènes humains un seul allèle fonctionnel soit suffisant pour exercer la fonction normale [49]. Compte tenu de ces résultats, des essais fonctionnels sont indispensables pour analyser la pathogénicité d'une mutation.

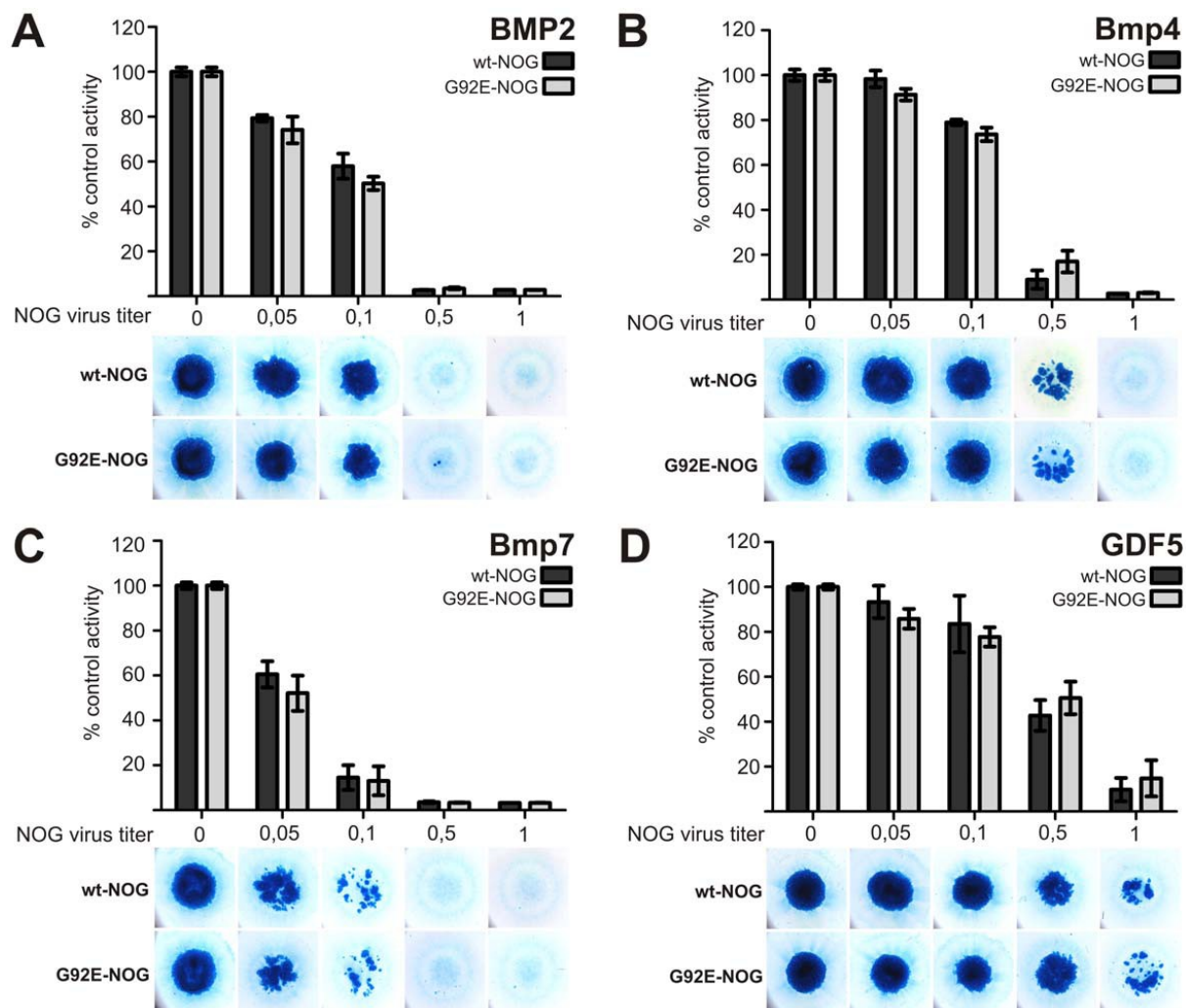


Figure 4. wt-NOG et G92E-NOG montrent la capacité de bloquer des cibles BMP comparables dans le système Micromasse du poulet. Les cellules micromasses du poulet ont été infectées avec 1×10^7 particules virales/ml contenant le gène de la BMP2 (A), BMP4 (B), BMP-7 (C) ou GDF5 (D). La co-infection a été réalisée avec des concentrations virales croissantes soit en wt-NOG ou en NOG-G92E comme indiqué. Au 5^{ème} jour, les cellules ont été colorées avec du bleu Alcian et quantifié par spectrophotométrie la concentration du colorant à 595 nm. Les cellules témoins non infectées ont été normalisées en activité à 100%. Les données présentées sont tirées d'une expérience représentative réalisée avec 3 répétitions chacune. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.
doi: 10.1371/journal.pone.0035062.g004

Matériels et Méthodes

Déclaration éthique

Les investigations cliniques ont été menées conformément aux principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki. L'approbation éthique de l'étude a été donnée par *the ethical board Charité*. Un consentement écrit pour les tests génétiques a été reçu de tous les individus analysés ou des parents au nom de leur enfant.

Analyse moléculaire du patient et de ses parents

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons de sang périphérique par des méthodes classiques. Les régions codantes du gène tyrosine kinase de récepteur orphelin de type 2 (ROR2) et du gène NOG ainsi que les séquences introniques adjacentes ont été amplifiées par des protocoles PCR standards. Les séquences d'amorce et les conditions du PCR pour les tests moléculaires ont déjà été publiées (pour NOG: [38], car ROR2: [50]). Les produits du PCR ont été analysés sur des gels d'agarose à 2%. Le séquençage a été effectué en utilisant le kit de séquençage *ABI*

Prism BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) avec des amorces PCR utilisées comme amorces de séquençage. Les produits ont été évalués sur un séquenceur automatique capillaire (*Applied Biosystems 3730, Foster City, CA, USA*). Des changements de séquences identifiées ont été évalués en utilisant la base de données *dbSNP135* et *the Human Gene Mutation Database (HGMD)* et (<https://portal.biobase-international.com/hgmd>) comme référence.

Complexe NOG-BMP7

L'image de la structure tridimensionnelle de NOG-BMP7 complexe a été produite à partir du fichier PDB 1M4U [8] et rendu par *PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC*.

Préparation virale

Le BMP4 de la souris dans RCAS-A a été fourni par *Pip Francis-West* [51], le GDF5 d'origine humaine a été décrit précédemment [52]. Les séquences codantes du BMP2 de l'homme, du NOG de la souris et du BMP-7 humain ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur navette *pSLAX-13*. La mutagenèse *in vitro* pour le NOG humain a été réalisée avec le *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Biotechnologies Agilent, Santa Clara, CA, USA). BMP2, GDF5 et BMP-7 ont été clonés dans *RCAS(BP)A*. Wt-NOG et G92E-NOG ont été clonés dans *RCAS(BP)B* afin de permettre la co-expression de NOG avec des BMP différents. Le clonage dans des vecteurs rétroviraux, la production de surnageant viral dans les cellules *DF1* et la concentration des particules virales ont été réalisés comme décrit précédemment [53]. En bref, des cellules *DF1* ont été transfectées avec des vecteurs rétroviraux RCAS et le surnageant récolté sur 3 jours consécutifs. Les particules virales sont concentrées par ultra-centrifugation, suivi par la détermination de la concentration virale par infection de cellules *DF1* (ATCC: CRL-UMNSAH/DF-1 # 12203) et le comptage des cellules positives pour un anticorps spécifique RCAS.

Système de culture micromasse de poulet

Les cultures micromasses de poulet étaient initialement isolées des bourgeons de membres d'embryons de poulet au bout de 4,5 jours et réalisées comme décrit précédemment [38]. Les cellules ont étéensemencées à une densité de cellules de $2610E05/14$ ml déposées. Les infections simples et les co-infections ont été réalisées des surnageants viraux adaptés aux infections avec un titrage de $1610E07$ unités / ml. Pour évaluer la chondrogenèse, les cultures micromasses ont été fixées et colorées avec du bleu Alcian à 0,05%. La coloration en bleu Alcian a été quantifiée après extraction avec 6 M guanidine-HCl et spectrophotométrie mesurée à 595 nm.

Western Blot (transfert de protéines)

L'analyse WesternBlot a été réalisée comme décrit précédemment [38] avec des modifications mineures: les cellules micromasses ont été récoltées au 3^{ème} jour et lysées dans un tampon de lyse (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, du glycérol 10%, du triton 1%, 100 mM PMSF). L'immunodétection a été réalisée en utilisant un anticorps anti-NOG (sc-25656, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), et un anticorps anti-actine (A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) comme anticorps primaires. Les signaux ont été détectés par des anticorps secondaires marqués IRDye (lapin de chèvre IRDye contre 800; souris de chèvre IRDye contre 680, LICOR, Lincoln, NE, USA) et quantifiés à l'aide du système d'imagerie infrarouge Odyssey (LICOR).

Remerciements

Nous remercions *Maria Walther* pour le support technique et *Lutz Schomburg* pour les remarques critiques sur le manuscrit.

Contributions des auteurs

Conception et développement des expériences: JZ SCD DH JCG EMS FSK PS.

Réalisation des expériences: JZ SCD.

Analyse des données: JZ SCD DH JCG EMS FSK PS.

Manipulation des réactifs / matériel / outils d'analyse: JZ SCD JCG PS.

Rédaction du journal: JZ SCD PS.

Références

1. Smith WC, Harland RM (1992) EXPRESSION CLONING OF NOGGIN, A NEW DORSALIZING FACTOR LOCALIZED TO THE SPEMANN ORGANIZER IN XENOPUS EMBRYOS. *Cell* 70: 829–840.
2. Zimmerman LB, DeJesusEscobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599–606.
3. Beck HN, Drahushuk K, Jacoby DB, Higgins D, Lein PJ (2001) Bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) promotes dendritic growth in cultured sympathetic neurons. *Bmc Neuroscience* 2.
4. Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, et al. (2010) Identification of a Key Residue Mediating Bone Morphogenetic Protein (BMP)-6 Resistance to Noggin Inhibition Allows for Engineered BMPs with Superior Agonist Activity. *Journal of Biological Chemistry* 285: 12169–12180.
5. Seemann P, Brehm A, Koenig J, Reissner C, Stricker S, et al. (2009) Mutations in GDF5 Reveal a Key Residue Mediating BMP Inhibition by NOGGIN. *Plos Genetics* 5.
6. Urist MR (1965) BONE - FORMATION BY AUTOINDUCTION. *Science* 150: 893–8.
7. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M (2010) Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry* 147: 35–51.
8. Groppé J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, et al. (2002) Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420: 636–642.
9. Seemann P, Mundlos S, Lehmann K (2008) Alterations of BMP signalling pathway(s) in skeletal diseases Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics. In: Vukicevic S, Sampath KT, eds. *Birkhäuser Basel*. P p141–159.
10. Pottli TA, Petty EM, Lesperance MM (2011) A Comprehensive Review of Reported Heritable Noggin-Associated Syndromes and Proposed Clinical Utility of One Broadly Inclusive Diagnostic Term: NOG-Related-Symphalangism Spectrum Disorder (NOG-SSD). *Human Mutation* 32: 877–886.
11. Cohen RB, Hahn GV, Tabas JA, Peeper J, Levitz CL, et al. (1993) THE NATURAL-HISTORY OF HETEROTOPIC OSSIFICATION IN PATIENTS WHO HAVE FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA - A STUDY OF 44 PATIENTS. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 75A: 215–219.
12. Connor JM, Evans DAP (1982) FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA - THE CLINICAL-FEATURES AND NATURAL-HISTORY OF 34 PATIENTS. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume* 64: 76–83.
13. Connor JM, Skirton H, Lunt PW (1993) A 3 GENERATION FAMILY WITH FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA. *Journal of Medical Genetics* 30: 687–689.
14. Kaplan FS, Tabas JA, Gannon FH, Finkel G, Hahn GV, et al. (1993) THE HISTOPATHOLOGY OF FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA - AN ENDOCHONDRAL PROCESS. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 75A: 220–230.
15. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, et al. (2006) A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 38: 525–527.
16. Shen Q, Little SC, Xu M, Haupt J, Ast C, et al. (2009) The fibrodysplasia ossificans progressiva R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. *Journal of Clinical Investigation* 119: 3462–3472.
17. Kaplan FS, Tabas JA, Zasloff MA (1990) FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA - A CLUE FROM THE FLY. *Calcified Tissue International* 47: 117–125.
18. Rosen V, Thies RS (1992) THE BMP PROTEINS IN BONE-FORMATION AND REPAIR. *Trends in Genetics* 8: 97–102.
19. Shafritz AB, Shore EM, Gannon FH, Zasloff MA, Taub R, et al. (1996) Overexpression of an osteogenic morphogen in fibrodysplasia ossificans progressiva. *New England Journal of Medicine* 335: 555–561.
20. Gannon FH, Kaplan FS, Olmsted E, Finkel GC, Zasloff MA, et al. (1997) Bone morphogenetic protein 2/4 in early fibromatous lesions of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Human Pathology* 28: 339–343.
21. Lanchoney TF, Olmsted EA, Shore EM, Gannon FA, Rosen V, et al. (1998) Characterization of bone morphogenetic protein 4 receptor in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. pp 38–45.
22. Tabas JA, Hahn GV, Cohen RB, Seanez HN, Modi WS, et al. (1993) CHROMOSOMAL ASSIGNMENT OF THE HUMAN GENE FOR BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-4. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. pp 310–316.
23. Xu MQ, Shore EM (1998) Mutational screening of the bone morphogenetic protein 4 gene in a family with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. pp 53–58.
24. Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280: 1455–1457.
25. Gong YQ, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, et al. (1999) Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nature Genetics* 21: 302–304.
26. Gazzero E, Gangji V, Canalis E (1998) Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation* 102: 2106–2114.
27. Lucotte G, Houzet A, Hubans C, Lagarde JP, Lenoir G (2009) MUTATIONS OF THE NOGGIN (NOG) AND OF THE ACTIVIN A TYPE I RECEPTOR (ACVR1) GENES IN A SERIES OF TWENTY-SEVEN FRENCH FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA (FOP) PATIENTS. *Genetic Counseling* 20: 53–62.
28. Semonin O, Fontaine K, Daviaud C, Ayuso C, Lucotte G (2001) Identification of three novel mutations of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *American Journal of Medical Genetics* 102: 314–317.
29. Fontaine K, Semonin O, Lagarde JP, Lenoir G, Lucotte G (2005) A new mutation of the Noggin gene in a French Fibrodysplasia ossificans progressive (FOP) family. *Genetic Counseling* 16: 149–154.
30. Lucotte G, Lagarde JP, European Research G (2007) Mutations of the noggin and of the activin a type I receptor genes in fibrodysplasia ossificans progressive (FOP). *Genetic Counseling* 18: 349–352.
31. Lucotte G, Semonin O, Lutz P (1999) A de novo heterozygous deletion of 42 base-pairs in the noggin gene of a fibrodysplasia ossificans progressiva patient. *Clinical Genetics* 56: 469–470.
32. Cohen MM (2002) Bone morphogenetic proteins with some comments on fibrodysplasia ossificans progressiva and NOGGIN. *American Journal of Medical Genetics* 109: 87–92.

33. Kaplan FS, Xu M, Feldman G, Brown M, Cho TJ, et al. (2008) RESPONSE TO "MUTATIONS OF THE NOGGIN AND OF THE ACTIVIN A TYPE I RECEPTOR GENES IN FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA (FOP)" by Lucotte et al. *Genetic Counseling* 19: 357–359.
34. Warman ML (2002) Significant difference of opinion regarding the role of noggin in fibrodysplasia ossificans progressiva. *American Journal of Medical Genetics* 109: 162–162.
35. Xu MQ, Feldman G, Le Merrer M, Shugart YY, Glaser DL, et al. (2000) Linkage exclusion and mutational analysis of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Clinical Genetics* 58: 291–298.
36. Xu MQ, Shore EM, Kaplan FS (2002) Reported noggin mutations are PCR errors. *American Journal of Medical Genetics* 109: 161–161.
37. Seemann P, Mundlos S (2008) THE TALE OF FOP, NOGGIN AND MYRISTOYLATION: NO DATA, NO PROOF! *Genetic Counseling* 19: 353–355.
38. Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, et al. (2007) A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *American Journal of Human Genetics* 81: 388–396.
39. Kaplan FS, Xu M, Seemann P, Connor JM, Glaser DL, et al. (2009) Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. *Human Mutation* 30: 379–390.
40. Albrecht AN, Schwabe GC, Stricker S, Boddlich A, Wanker EE, et al. (2002) The synpolydactyly homolog (spdh) mutation in the mouse - a defect in patterning and growth of limb cartilage elements. *Mechanisms of Development* 112: 53–67.
41. Bell J (1951) *On brachydactyly and symphalangism* University Press.
42. Lucotte G, Bathelier C, Mercier G, Lenoir G, Semonin O, et al. (2000) Localisation of the gene for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) to chromosome 17q21-22 and noggin gene as candidate for FOP. *Developmental Dynamics* 219: 459–459.
43. Ishii Y, Takizawa T, Iwasaki H, Fujita Y, Murakami M, et al. (2011) Nucleotide Polymorphisms in the Canine Noggin Gene and Their Distribution Among Dog (*Canis lupus familiaris*) Breeds. *Biochem Genet.* 44.
44. Schwabe GC, Mundlos S (2004) Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36: 85–97.
45. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) S, WA (05.03.2012) Exome Variant Server.
46. Wadman M (2008) James Watson's genome sequenced at high speed. *Nature* 452: 788–788.
47. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, et al. (2008) The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872–U875.
48. MacArthur DG, Balasubramanian S, Frankish A, Huang N, Morris J, et al. (2012) A systematic survey of loss-of-function variants in human protein-coding genes. *Science* 335: 823–828.
49. Huang N, Lee I, Marcotte EM, Hurles ME (2010) Characterising and Predicting Haploinsufficiency in the Human Genome. *Plos Genetics* 6.
50. Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, et al. (2000) Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *American Journal of Human Genetics* 67: 822–831.
51. Duprez D, Bella EJD, Richardson MK, Archer CW, Wolpert L, et al. (1996) Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mechanisms of Development* 57: 145–157.
52. Ploeger F, Seemann P, Kegler MS-v, Lehmann K, Seidel J, et al. (2008) Brachydactyly type A2 associated with a defect in proGDF5 processing. *Human Molecular Genetics* 17: 1222–1233.
53. Morgan BA, Fekete DM (1996) Manipulating gene expression with replicationcompetent retroviruses. *Methods in Cell Biology*, Vol 51 51: 185–218.