Roberto Dalto Fanganiello

**Estudo de expressão gênica e de
comportamento celular em células de
indivíduos portadores de craniossinostoses
sindrômicas**

Instituto de Biociências

Universidade de São Paulo

São Paulo

2009

Roberto Dalto Fanganiello

**Estudo de expressão gênica e de comportamento
celular em células de indivíduos portadores de
craniossinostoses sindrômicas**

Tese apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade
de São Paulo, para obtenção de
Título de Doutor em Ciências,
na Área de Biologia/Genética

Orientadora: Maria Rita dos
Santos e Passos-Bueno

São Paulo

2009

Ficha Catalográfica

Fanganiello, Roberto Dalto

Estudo de expressão gênica e de comportamento celular em células de indivíduos portadores de craniossinostoses síndrômicas

Número de páginas

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

1.Craniossinostoses síndrômicas 2.Sinalização por receptores de fatores de crescimento de fibroblastos

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientadora: Profa Dra Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

Epígrafe

Amicus Plato amicus Aristoteles magis amica veritas.

Sir Isaac Newton

Il piacere più nobile è la gioia di capire.

Leonardo da Vinci

In every piece there is a number – maybe several numbers, but if so there is also a base-number, and that is the true one. That is something that affects us all, and links us all together.

Arvo Pärt

You can know the name of a bird in all the languages of the world, but when you're finished, you'll know absolutely nothing whatever about the bird... So let's look at the bird and see what it's doing - that's what counts. I learned very early the difference between knowing the name of something and knowing something.

Richard Feynman

Agradecimentos

Agradeço à Rita, por ter me dado a chance de fazer parte de seu grupo, por me dar a oportunidade de adquirir a experiência e o conhecimento que eu adquiri e por ter me guiado tão bem por toda essa trajetória. Quero agradecê-la pelo exemplo de pessoa, de pesquisadora e de orientadora que você sempre foi e, principalmente, por ter acreditado desde o início no meu potencial. Quero também agradecê-la por ter feito que eu entendesse o lema *Scientia Vincet*.

Agradeço à minha família, por sempre me incentivar e nunca deixar de acreditar em mim. Vocês sempre se interessaram pelo que eu faço e me apoiaram nas minhas escolhas.

Agradeço à Giselle, minha namorada, por seus sentimentos tão puros e por gostar tanto de mim. Você está sempre atenta, principalmente quando eu mais preciso e você sempre se importa e se preocupa muito comigo, muito mais do que eu mesmo.

Agradeço aos pacientes e às suas famílias, que confiaram neste estudo, mesmo que os benefícios mais diretos dele possam vir apenas a longo prazo.

Também em especial quero agradecer à Deinha, por ter sido minha co-orientadora e por ter me ensinado tanto e de forma tão paciente, principalmente no início do projeto, quando eu precisava de mais atenção. Agradeço ao Oscar, por conversas e discussões inteligentes, frutíferas e engraçadas, das quais sempre vou me lembrar e à Erika Yeh, por sua ajuda em quase todos os experimentos e por dar continuidade ao meu projeto principal. Além disso, sem a ajuda dela esta tese teria pouquíssimas figuras e não teria tabelas. Agradeço também à Constância: sem ela os nossos laboratórios não funcionariam e todas as notas fiscais de produtos que eu comprei estariam hoje perdidas.

Agradeço ao Eswar, meu orientador durante o período de estágio no exterior, por ter me dado a chance de trabalhar em seu laboratório como *visiting student*, pelo período de um ano, por confiar no meu trabalho, por ter me dado a

chance de conhecer e de fazer parte do corpo docente da *Yale University* e da equipe do *Department of Orthopaedics and Rehabilitation* dessa universidade durante o meu doutorado e por ter me convidado a voltar quando quiser. Essa experiência foi extremamente edificante, ajudou a moldar quem eu sou hoje e serei sempre grato por isso. Agradeço também às professoras Agnès Vignery e Karen Gundberg e aos professores Mark Horowitz, Thomas Carpenter, Tae Kim e Joseph Schlessinger, pelo apoio durante minha passagem pela Yale. Agradeço ao Badal, meu housemate durante o primeiro semestre de 2008 e ao Choz e Iain, housemates no segundo semestre por terem morado comigo e por serem ótimos amigos. *It was a pleasure to live with you guys!*

De modo geral, quero agradecer a todos os alunos, funcionários e professores do Centro de Estudos do Genoma Humano e, em especial, à equipe do laboratório da Rita. Listo aqui, da forma que recuperei de minha memória, e aqueles que tiveram contribuição mais direta na realização desta tese: Cibele, Lúcia, Dani Bueno, Nélio, Carlos, Guilherme, Todd, Fabiana, Camila, Gerson, Meire, Bruno, Rodrigo Atique, Fernanda, Karina, Erika Kague, Kelly, Lilian, Luciano, Vanessa, Felipe, May, Cíntia, Lígia, Gustavo, Juliana, Dani Yumi, Kátia, Roseli, Daniel, Elô, Dinamar, Flávia Errera, Flávia de Paula, Alex, Vanessa Sato, Vanessa Naomi, Márcia, Roberto, Lilian, Mari, Eder, Nati, Marcos, Tati, Denise, Miguel, Agnes, Manuela, Monize, Toninha, Fernando, Patrícia, David e C.E.O. Walter. Obrigado pelo apoio, pelas conversas, pelas risadas, pelas opiniões. Eu vivo dos meus sonhos, das relações humanas, dos meus estudos e do meu trabalho, e vocês contribuíram muito com tudo isso. Obrigado por tudo mesmo.

Índice

Introdução	8
As Suturas Cranianas	8
As Craniossinostoses	9
Os Receptores de Fatores de Crescimento de Fibroblastos e seus Ligantes	13
Vias de sinalização desencadeadas por FGFRs	17
A Síndrome de Apert	20
Modelos animais para a investigação bioquímica e transcricional das craniossinostoses síndrômicas	26
Justificativa e Objetivos	29
Material e Métodos	32
Comitê de Ética	32
Obtenção de periósteo craniano humano e estabelecimento de culturas celulares primárias	33
Isolamento de RNA de células fibroblastóides humanas	35
Verificação da expressão gênica e proteica de FGFR2 em células humanas	36
Caracterização do imunofenótipo celular	38
Diferenciação osteogênica e adipogênica in vitro	39
PCR em tempo real para validação das diferenciações celulares in vitro	40
Experimentos de microarrays de expressão gênica em células fibroblastóides humanas (sistema Codelink – GE HealthCare)	41
Tratamento de células selvagens com FGF2 exógeno	44
PCR em tempo real para validação de dados dos microarrays e para medição de expressão gênica em células tratadas com FGF2	45
Experimento para teste de potencial de ossificação in vivo	46
Procedimentos para cruzamento e contagem do tempo gestacional dos camundongos	50
Condições de extração de DNA e genotipagem dos camundongos	50
Caracterização dos camundongos Fgfr2C342Y / + adultos marcação dos centros de ossificação por vermelho de alizarina	52
Isolamento e cultivo de células das suturas cranianas murinas	52
Isolamento de RNA de suturas cranianas murinas	53
Diferenciação osteogênica in vitro	54
Confirmação da expressão gênica e proteica de Fgfr2	54
Experimentos de microarrays de expressão com tecido murino (sistema Illumina Single Color Mouse Whole Genome 6)	56
Resultados	59
Morfologia celular, expressão de FGFR2 e imunofenótipo das linhagens de células fibroblastóides	59
Potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica in vitro	61

Análise do perfil de expressão de células fibroblastóides de periósteo coronal de portadores de S. de Apert	65
Validação dos dados de microarrays por PCR em tempo real	69
Tratamento de células controles com FGF2 exógeno	70
Potencial de ossificação de defeitos críticos calvariais em ratos Wistar	72
Caracterização dos camundongos Fgfr2C342Y / + adultos marcação dos centros de ossificação por vermelho de alizarina	76
Diferenciação osteogênica in vitro	77
Confirmação da expressão gênica e protéica de Fgfr2 em sutura coronal de animais Fgfr2C342Y / +	79
Perfil de expressão gênica de tecido das suturas coronais de animais Fgfr2C342Y / +	81
Discussão e conclusão	88
Referências Bibliográficas	104
Resumo	112
Abstract	114
Apêndices	116

Introdução

→ As Suturas Cranianas

Suturas cranianas são junções constituídas de tecido fibroso, diferenciado a partir do mesênquima embrionário, localizadas na região de interface de margens ósseas cranianas contínuas (**figuras 1 e 2**). Estas estruturas funcionam como sítios primários de osteogênese, abrigando frentes de células osteoprogenitoras que proliferam e que diferenciam junto às margens ósseas, mediando boa parte do crescimento facial e craniano. Somado a isso, no momento do nascimento as suturas permitem um movimento sutil dos ossos do crânio, conferindo relativa flexibilidade ao estojo craniano e auxiliando no ajuste a pressões mecânicas temporárias. Durante a infância as suturas devem permanecer abertas, permitindo o crescimento encefálico, extremamente acelerado neste período e ajudando na absorção de choques e estresses mecânicos (M. Michael Cohen, 2000a). É necessário que o desenvolvimento das suturas esteja cuidadosamente sincronizado com o crescimento dos órgãos vizinhos, em especial encéfalo, olhos, nariz, ouvidos e boca, por processos dependentes de recrutamento, proliferação, diferenciação e apoptose de células osteoprogenitoras. Com exceção da sutura sagital, que é fechada logo após o nascimento, o processo normal de ossificação definitiva das suturas cranianas em humanos é efetivamente iniciado após os 20 anos de idade.

Perturbações neste processo podem levar a fusão atrasada ou a fusão prematura destas suturas (Jiang, Iseki *et al.*, 2002; Rice, 2008).

→ As Craniossinostoses

Um dos grupos de doenças mais importante que acomete o desenvolvimento da caixa craniana humana é o das craniossinostoses. Este grupo, também conhecido por “cranioestenoses”, é caracterizado pelo fechamento prematuro (**sinostose**) de uma ou mais suturas cranianas, com incidência de 1 a cada 2000 - 3000 nascimentos, constituindo uma importante causa de morbidade infantil (M. Michael Cohen, 2000b; Wilkie e Morriss-Kay, 2001). As craniossinostoses são, em seguida às fendas palatinas, o grupo de defeitos mais comuns que acometem o complexo

Os domínios quinases intracelulares são evolutivamente os mais conservados de todos. Na porção extracelular, a alça Ig-like III é a mais conservada das três alças (Givol e Yayon, 1992; Spivak-Kroizman, Lemmon *et al.*, 1994). A transcrição de genes que codificam os FGFRs resulta na expressão de várias isoformas do receptor devido à ocorrência de processamentos (*splicings*) alternativos do RNA mensageiro. Isso determina, por exemplo, o número de domínios Ig-like (dois ou três) e as características do Ig-like III, o que pode alterar as propriedades de ligação do receptor a diferentes fatores de crescimento de fibroblastos (**FGFs**). Com exceção do FGFR1, que ainda não está bem caracterizado, o processamento alternativo dos exons que codificam a porção C-terminal do domínio IgIII é tecido-específico e cria duas isoformas do receptor, denominadas FGFR1b e FGFR1c. A isoforma “c”, codificada por todos os exons com exceção do exon 8, é a mais abundante e se expressa em tecidos de origem mesenquimal, enquanto a isoforma “b”, codificada por todos os exons com exceção do exon 9, é menos frequente e se expressa em tecidos de origem epitelial (**figura 4**).

craniofacial. As craniossinostoses podem afetar principalmente as suturas coronal, sagital, metópica e lambdóide, tanto isoladamente quanto em conjunto (Warren e Longaker, 2001).

O fechamento prematuro da sutura sagital é o mais comum (40 – 50% dos casos), seguido por fechamento prematuro das coronais (20 – 25%), da metópica (5 – 15%), de múltiplas suturas simultaneamente (5 – 15%) e das lambdoides (0 – 5%) (Passos-Bueno, 2008). A sinostose destas suturas pode ocorrer tanto antes quanto após o nascimento do indivíduo, sendo que o primeiro caso é mais comum. Quanto mais cedo ocorrer, maiores são os efeitos no formato craniano e as alterações neste formato variam de acordo com a(s) sutura(s) acometida(s) e com a extensão do fechamento ao longo da sutura (fechamento parcial ou total). Normalmente o crescimento craniano se dá em planos perpendiculares ao das suturas, mas, nos casos de fusão prematura, esta alteração força os ossos cranianos adjacentes a crescer de forma paralela à sutura fechada (Kimonis, Gold *et al.*, 2007).

O crescimento e o formato anormal da caixa craniana (**cranioestenose**) podem vir associados a outras complicações, tais como alta pressão intracraniana, comprometimento de perfusões encefálicas, obstrução de vias aéreas, comprometimento de visão e de audição e dificuldades de aprendizagem. Além disso, esse crescimento alterado do crânio pode acarretar em deformidades significativamente graves, como deformidades calvariais, nas órbitas oculares, na face e mal oclusão dentária (Wilkie e Morriss-Kay, 2001). O único tratamento disponível atualmente para indivíduos portadores de craniossinostoses é o tratamento cirúrgico, bastante invasivo, que pode requerer mais de uma intervenção e implica no uso de múltiplos procedimentos (Johnson, 2003). Devemos ressaltar que o tratamento cirúrgico não visa somente a correção estética e que, quando

realizado em idade apropriada, pode atenuar ou até mesmo evitar o surgimento de vários desses problemas relacionados acima.

De modo simplificado, as craniossinostoses são divididas em não-sindrômicas e sindrômicas. As não-sindrômicas são tipicamente constituídas por casos isolados, envolvendo uma ou mais suturas cranianas, sem outras anomalias primárias. No caso das sindrômicas, além do comprometimento de suturas e da caixa craniana, estão também associadas a distúrbios e a malformações primárias que envolvem a face, o esqueleto, os órgãos viscerais e o sistema nervoso (Kimonis, Gold *et al.*, 2007). Acredita-se que cerca de 70 - 85% das craniossinostoses são não-sindrômicas e as causas genéticas que possivelmente estejam associadas a elas são muito pouco conhecidas. (Lajeunie, Le Merrer *et al.*, 1995; 1996). Até o momento somente o gene *EFNA4* está associado, quando mutado, a formas exclusivamente não-sindrômicas de craniossinostoses (Passos-Bueno, 2008). Como causas ambientais importantes envolvidas no fechamento prematuro de suturas cranianas temos a compressão intra-uterina, a exposição do feto a substâncias de efeito teratogênico (como ácido retinóico, ácido valproico e hidantoína) e o hipertireoidismo materno ou neonatal (M. Michael Cohen, 2000b).

As craniossinostoses sindrômicas englobam mais de 180 síndromes, são doenças na maior parte das vezes com padrão de herança autossômico dominante e aproximadamente 40% resultam de alterações genéticas já conhecidas. Destas, 1/4 tem como causa alterações cromossômicas e os 3/4 restantes são causadas por mutações gênicas. Estudos de ligação em casos familiares e análise molecular de alterações cromossômicas permitiram a identificação de 8 genes que, quando mutados, estão associados às craniossinostoses sindrômicas: ***FGFRs* 1, 2, 3 e 5**,

receptores de fatores de crescimento de fibroblastos, explorados em detalhes no próximo tópico, *TWIST1* e *MSX2*, fatores de transcrição, *EFNB1*, gene codificador da eferina-B1 e *RAB23*, membro da família de proteínas de transporte vesicular RAB guanosino-trifosfato (GTPases). (Muenke, Schell *et al.*, 1994; Reardon, Winter *et al.*, 1994; Wilkie, Slaney *et al.*, 1995; Bellus, Gaudenz *et al.*, 1996; El Ghouzzi, Le Merrer *et al.*, 1997; Wilkie, Tang *et al.*, 2000; Twigg, Kan *et al.*, 2004; Jenkins, Seelow *et al.*, 2007). Mutações nos genes *FBN1*, *POR*, *TGFBR1* e *TGFBR2* também estão associadas a síndromes com craniossinostoses, mas aparentemente a craniossinostose não é a característica fenotípica principal (Sood, Eldadah *et al.*, 1996; Fluck, Tajima *et al.*, 2004; Loeys, Chen *et al.*, 2005).

Entre as formas mendelianas das craniossinostoses síndrômicas, mutações dominantes em *FGFRs* são as causas mais frequentes, incluindo as síndromes de Apert, Crouzon, Crouzon associada a acanthosis nigricans, Pfeiffer, Munke, Jackson-Weiss e Beare-Stevenson (Lajeunie, Ma *et al.*, 1995; Burke, Wilkes *et al.*, 1998; Wilkie e Morriss-Kay, 2001; Ornitz e Marie, 2002). As mutações em *FGFRs* conhecidas até o momento e associadas às craniossinostoses permitem o desenvolvimento embrionário inicial, mas interferem em estágios posteriores, prejudicando-os. Mutações em genes da família dos *FGFRs* não estão somente associadas às craniossinostoses: mutações de ganho de função em *FGFR3* já foram relacionadas a displasias ósseas (Shiang, Thompson *et al.*, 1994; Tavormina, Shiang *et al.*, 1995), mutações que levam à haploinsuficiência de *FGFR1* estão relacionadas à Síndrome de Kallmann (Dode, Levilliers *et al.*, 2003), mutações com efeito dominante negativo em *FGFRs* 2 e 3 (e possivelmente mutações que causam haploinsuficiência de *FGF10*) podem causar a síndrome LADD (lacrimo-auriculo-dento-digital) (Shams, Rohmann *et al.*, 2007) e mutações com efeito dominante

negativo em *FGFR3* estão associadas à síndrome CATSHL (camptodactilia, estatura elevada e perda auditiva) (Toydemir, Brassington *et al.*, 2006).

→ Os Receptores de Fatores de Crescimento de Fibroblastos e seus Ligantes

Os receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (**FGFRs**) são um grupo de cinco proteínas da família de receptores do tipo tirosino-quinases, inseridos na membrana plasmática das células, cada qual constituído de modo geral por uma porção de ligação extracelular, um domínio transmembrânico, composto por cerca de 20 aminoácidos e uma porção intracelular com atividade tirosino-quinase (**figura 3**). O FGFR5, ou FGFR1 como é mais referido na literatura, não possui domínios tirosino-quinases intracelulares (Sleeman, Fraser *et al.*, 2001). É importante ressaltarmos que a porção de ligação extracelular apresenta dois ou três domínios em formato de alça, semelhantes à imunoglobulina (*loops immunoglobulin-like*, denominados Ig-like I, II e III) e que cada alça tem sua estrutura tridimensional estabilizada por ligação do tipo ponte de dissulfeto (Givol e Yayon, 1992; Johnson e Williams, 1993; Mason, 1994).

No caso do FGFR2, as propriedades de ligação são bastante específicas: FGFs 7 e 10 ligam-se apenas à isoforma "b", enquanto FGFs 2, 4, 6, 8 e 9 ligam-se à isoforma "c". FGFs 1 e 2 são ligantes universais. As diferentes isoformas de FGFRs estão presentes originalmente em monômeros, transpassando a bicamada lipídica da membrana celular. A ligação de fatores de crescimento de fibroblastos aos FGFRs, associados a cadeias de heparan sulfato da matriz extracelular, causam dimerização e ativação destes receptores (Burke, Wilkes *et al.*, 1998; David Givol, 2004). Existem ainda outras isoformas provenientes de diferentes processamentos alternativos. Dentre as mais relevantes, a alça Ig-like I pode, por exemplo, ser excluída, resultando numa forma mais curta dos receptores, contendo apenas as alças Ig-like II e Ig-like III (Johnson, Lee *et al.*, 1990; Dell e Williams, 1992). Existe também uma isoforma de FGFR1 que termina na alça Ig-like III, constituindo uma isoforma secretada (Givol e Yayon, 1992).

Os FGFs formam uma família com mais de vinte e três polipeptídeos que codificam proteínas com pesos moleculares que variam entre 17 e 34 KDa. Seus aminoácidos apresentam de 13 a 71% de identidade e compartilham uma região central de 120 aminoácidos, com 40 a 60% de identidade. Destes aminoácidos, 28 são altamente conservados e 6 são idênticos em todos os FGFs (Johnson e Williams, 1993; Ornitz e Itoh, 2001). Os FGFs estão envolvidos em diversos processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário até a manutenção da homeostase no organismo adulto. Dentre eles destacam-se a indução de diferenciação celular, crescimento e migração celular, crescimento e desenvolvimento ósseo, diferenciação neuronal, angiogênese e tumorigênese, dentre outros. Além disso, possuem efeito mitogênico para células derivadas da ectoderme, neuroectoderme, mesoderme e endoderme.

Alguns FGFs são expressos apenas no período de desenvolvimento embrionário (são eles FGFs 3,4,8,15,17 e 19) enquanto outros são expressos tanto em fases embrionárias quanto em indivíduos adultos. Os FGFs 1 (também conhecido como FGF ácido) e 2 (FGF básico) são os mais abundantes. Todos os FGFs podem ser encontrados na matriz extracelular e os FGFs 3-8, 10, 15, 17-19 e 20-23 apresentam peptídeos sinais e são proteínas secretadas. Devemos ressaltar também que o FGF1 apresenta comportamento de ligante universal, sendo capaz de ligar-se a todos os FGFRs (Givol D., 2004).

Os FGFs ligam-se, na matriz extracelular, ao glicosaminoglicano heparan sulfato (HSPGs), em geral à heparina – e a dinâmica bioquímica dos FGFs e dos FGFRs é bastante complexa devido à variabilidade dos sítios de ligação dos receptores, uma vez que os RNAs mensageiros que os codificam podem sofrer diversos tipos de splicings alternativos, à existência de vários ligantes (alguns dos

quais com diferentes isoformas) e à possibilidade de ligação a diferentes HSPGs. Além disso, durante a embriogênese e subsequente desenvolvimento do organismo, suas expressões diferem quanto à localização e ao período.

→ **Vias de sinalização desencadeadas por FGFRs**

A ligação de FGFs associados a proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) leva a alterações conformacionais no domínio extracelular do FGFR, o que acarreta em dimerização e subsequente auto-transfosforilação de resíduos de tirosina, por ativação dos domínios quinases intracelulares, gerando fosfotirosinas (**pTyr**). Isto desencadeia cascatas de sinalização intracelulares, uma vez que as fosfotirosinas passam a funcionar como sítios de ancoragem para uma grande variedade de proteínas sinalizadoras.

Essas proteínas são estruturalmente modulares, sendo que um de seus módulos (SH2 ou domínio PTB) liga-se a pTyr. Esses módulos transmitem o sinal ao formar uma ponte entre os resíduos de pTyr do receptor e outras proteínas intracelulares. Além disso, muitas dessas proteínas apresentam também atividade enzimática, como atividades de fosforilação, desfosforilação, atividade de fosfolipase C ou de Ras-GAP (Klint e Claesson-Welsh, 1999; Klint, Kanda *et al.*, 1999). Algumas proteínas que se ligam a pTyr (como Grb2, Nck, Crk e Shc) apresentam apenas os domínios SH2 e SH3 e servem de elo entre as pTyr do receptor e outras proteínas pertencentes à cascata de sinalização.

A sinalização intracelular subsequente à ativação de FGFR é bastante intrincada e pode sofrer inúmeras bifurcações. Atualmente é sabido que os FGFRs estão envolvidos no desencadeamento de pelo menos três vias principais de sinalização, cujos detalhes e implicações serão resumidamente descritos abaixo:

- **Via Ras-MAPK**

Sua importância está fundamentalmente associada ao desencadeamento e à determinação de processos de proliferação e de diferenciação celular. Neste processo o Grb2, proteína sem atividade sinalizadora por si própria, liga-se a um resíduo pTyr do receptor por meio de seu domínio SH2 e a uma proteína Sos por seu domínio SH3, recrutando Sos para a membrana plasmática, onde estimula Ras pela troca de GDP por GTP. A Ras ativada (Ras-GTP) interage com a proteína Raf, uma quinase com base em serina e treonina. A porção C-terminal de Raf estimula a proteína MAPKK por fosforilação de um resíduo de serina. MAPKK, por sua vez, fosforila e ativa MAPK (ERK), que cruza a carioteca e fosforila e ativa uma série de fatores de transcrição (Marshall, 1995; Park, Bellus *et al.*, 1995; Kouchera, Hadari *et al.*, 1997).

- **Via STAT**

Está envolvida em regulação de ciclo celular e de apoptose (morte celular programada) e tem como principal componente as proteínas STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Atualmente são conhecidas sete proteínas STATs (1-4, 5a, 5b e 6) e estão normalmente em estado latente no citoplasma. Quando se ligam

aos resíduos de pTyr por seus domínios SH2 e formam homo ou hetero-dímeros STAT – STAT, estes são translocados para o núcleo e controlam diretamente a ativação de genes e de proteínas que se comportam como fatores de transcrição (Darnell, 1997; Legeai-Mallet, Benoist-Lasselin *et al.*, 1998; Li, Chen *et al.*, 1999).

- **Via do fosfoinositol**

Esta via é importante para a manutenção do metabolismo e do crescimento celular, e desta via participam proteínas como fosfolipase C γ - pLC γ , fosfatidilinositol-(4,5)-bisfosfato – PIP2, diacilglicerol – DAG e inositol trifosfato – IP3. Pode levar a fosforilação de vários fatores de transcrição gênica e induzir ou reprimir a síntese de alguns RNAs mensageiros. Após ligar-se por seu domínio SH2 a resíduos de pTyr do receptor e ser ativada, a pLC γ hidrolisa o PIP2 em DAG e IP3, dois potentes mensageiros intracelulares. O diacilglicerol ativa proteínas da família das proteínas quinases C (proteínas solúveis e citossólicas quando inativas), que regulam a atividade gênica. O IP3 estimula a liberação de íons Ca⁺⁺, que se ligam à calmodulina e ativam proteínas quinases dependentes de calmodulina (26,38). A PI-3 quinase (PI-3K) também é ativada pelo FGFR quando a PI-3K liga-se a um resíduo de pTyr pelo domínio SH2 de sua subunidade p85. O PI-3K ativado fosforila PIP2 e gera a forma trifosfato desta molécula, que serve de segundo mensageiro para o recrutamento de moléculas sinalizadoras para a membrana plasmática (Nishizuka, 1995; Givol D., 2004).

Como podemos perceber, parte destas vias, principalmente as porções iniciais, imediatamente subsequentes à ativação do receptor, foram bem estudadas,

estão descritas na literatura científica e são relativamente bem compreendidas. Grande parte, porém, do funcionamento e do controle dessas vias, principalmente no que tange a regulação transcricional, não é entendido. Em quais situações, por exemplo, ativamos preferencialmente uma ou outra via? Quais os fatores de transcrição relacionados a cada uma dessas vias? Quais os genes que têm suas expressões alteradas com a ativação dessas vias? Essas perguntas e muitas outras permanecem ainda sem resposta ou são apenas parcialmente respondidas. Respostas a essas perguntas levarão a um melhor entendimento das vias bioquímicas acima descritas e, por extensão, a melhor compreensão dos mecanismos moleculares que, quando alterados, acarretam nas craniossinostoses.

→ **A Síndrome de Apert**

A síndrome de Apert (MIM #101200) é considerada uma das craniossinostoses sindrômicas mais graves e mais comuns, com incidência de 1:64000 nascimentos e com herança autossômica dominante, representando cerca de 4,5% de todas as craniossinostoses sindrômicas (Cohen e Kreiborg, 1992). A incidência em homens e mulheres é a mesma (1:1) e a raridade de casos familiares pode ser explicada pela diminuição do valor adaptativo genético (*fitness*) de indivíduos afetados, uma vez que possuem graves malformações craniofaciais e, em cerca de 70 % dos casos, disfunções de ordem neurológica (Renier, Arnaud *et al.*, 1996).

É caracterizada clinicamente por craniossinostose, particularmente fechamento prematuro das suturas coronais, acrocefalia braquiesfenocefálica, hipoplasia do terço médio da face, proptose ocular devido a órbitas rasas, sindactilia simétrica óssea e cutânea das mãos e dos pés e malformações no sistema nervoso central, notadamente a megalencefalia (**figura 5**).

Figura 5: Desenho nº 506 de Max Brödel, do acervo da biblioteca da *Johns Hopkins Medical School*, mostrando sinais fenotípicos craniofaciais característicos de uma criança portadora da S. de Apert.

As anomalias viscerais presentes em indivíduos portadores de S. de Apert são menos caracterizadas e estudadas, mas podem ser: malformações cardiovasculares (presentes em 10% dos casos) e genitourinárias (9,6%), anomalias no sistema respiratório (1,5%) e gastrointestinal (1,5%). Além disso, cerca de 2/3 de pacientes

com S. de Apert apresentam fusões de vértebras cervicais da coluna vertebral (Cohen, 1975; Cohen e Kreiborg, 1992; Kreiborg, Barr *et al.*, 1992; Yu, Herr *et al.*, 2000). Embora as suturas coronais estejam fechadas ao nascimento, as outras suturas e fontanelas ficam tipicamente abertas e comumente expandidas, sendo característico um amplo defeito calvarial que se estende desde a glabella anterior, junto ao osso frontal, até a fontanela posterior, junto ao osso occipital (**figura 6**). Sendo assim, as suturas metópica e sagital são tipicamente alargadas nesta síndrome (Cohen e Kreiborg, 1996). Foi sugerido também que anomalias cartilaginosas na base do crânio são uma causa primária das malformações ao longo do desenvolvimento craniano dos indivíduos com S. de Apert, o que afeta posteriormente o crescimento encefálico e o crescimento ósseo de toda a calvária. Na síndrome de Apert, os centros ósseos parietais e frontais tornam-se deslocados, o que pode resultar em fusão óssea no local da sutura coronal (Kreiborg e Cohen, 1998).

Figura 6: Tomografia computadorizada do crânio de uma criança portadora de S. de Apert, mostrando amplo defeito calvarial de linha média. Figura modificada de Albuquerque et al, 2004 (Albuquerque e Cavalcanti, 2004).

As duas mutações mais comuns associadas a esta síndrome são encontradas em FGFR2, na região de ligação entre as alças Ig-like II e Ig-like III, comum às isoformas “b” e “c” do receptor. São elas as transversões 755C→G, resultando na substituição p.Ser252Trp, na proteína, e 758C→G, resultando em p.Pro253Arg (Wilkie, Slaney *et al.*, 1995). A primeira é mais comum e está presente em cerca de 2/3 dos pacientes, sendo mais frequentemente associada à fenda palatina. A mutação p.Pro253Arg está presente em 1/3 dos pacientes, sendo frequentemente associada a sindactilia grave. A origem de mutações novas é exclusivamente paterna. Devemos ressaltar ainda que estudos envolvendo osteoblastos demonstraram que a mutação p.Ser252Trp acarreta em diferenciação prematura de osteoblastos, aumento de formação de matriz óssea e aumento de níveis de colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina em pré-osteoblastos. Em fibroblastos em cultura

há um aumento da secreção de proteínas de matriz extracelular (Bodo, M., Carinci, F. *et al.*, 1997). Mais raramente, quatro outras mutações foram reportadas: p.Pro252Phe, que requer a substituição de 2 nucleotídeos (Oldridge, Lunt *et al.*, 1997; Lajeunie, Cameron *et al.*, 1999), uma mutação em sítio acceptor de splicing (Passos-Bueno, Sertie *et al.*, 1997) e 2 tipos de inserções de elementos Alu, que perturbam o processamento que dá origem à isoforma FGFR2IIIc, além de gerar expressão ectópica da isoforma FGFR2IIIb (Oldridge, Zackai *et al.*, 1999).

Mutações em *FGFR2* localizadas em outras regiões do gene podem levar a outros tipos de craniossinostoses além da síndrome de Apert, como por exemplo, as síndromes de Crouzon, Pfeiffer e Beare-Stevenson (Neilson e Friesel, 1995; Robertson, Meyer *et al.*, 1998). Essas quatro craniossinostoses são bastante semelhantes clinicamente, diferindo principalmente quanto ao comprometimento de membros e da pele (Jones, 1996; Gorlin R.J., 2001).

As mutações em *FGFR2* associadas a S. de Apert causam um aumento da sua ativação por diferentes mecanismos moleculares. Demonstrou-se que a mutação p.Ser252Trp aumenta a afinidade de ligação da isoforma “c” do receptor FGFR2 por FGF2 em aproximadamente seis vezes por diminuir a constante de dissociação ligante-receptor (Anderson, Burns *et al.*, 1998), além de criar a possibilidade de ativação do receptor por ligação de FGF7 e FGF10 (Yu, Herr *et al.*, 2000; Ibrahimi, Eliseenkova *et al.*, 2001) que, em situação normal, não ocorreria. Já a troca p.Pro253Arg aumenta em cerca de duas vezes a afinidade da isoforma “c” de FGFR2 por FGF2. Além disso, estudos cristalográficos dos receptores mutados e das seqüências dos diferentes FGFs sugerem que essa mutação torna possível que o FGFR2 ligue-se indiscriminadamente a qualquer FGF (Park, Theda *et al.*, 1995;

Wilkie, Slaney *et al.*, 1995; Tsai, Hwu *et al.*, 1998). Por outro lado, a maioria das mutações associadas à síndrome de Crouzon, que estão localizadas na porção extracelular de FGFR2, levam a dimerização constitutiva de FGFR2 independente da presença do ligante. Apesar de as mutações estarem associadas a um ganho de função, ainda não está claro como se explicam as diferenças clínicas observadas entre pacientes com S. de Apert e S. de Crouzon. Uma hipótese é de que dependem parcialmente do envolvimento das duas ou de apenas uma das isoformas ou de que dependem da força de ativação (diferentes graus de fosforilação) do receptor.

Como já mencionado, a estimulação de FGFRs ativa várias cascatas de sinalização envolvendo fatores de transcrição. No caso de FGFR2, está bem estabelecida a relação FGF2-FGFR2 e RUNX2 (AML3 ou CBFA1) Kim *et al.*, 2003, verificaram que em osteoblastos, a via de sinalização mediada por FGF2/FGFR2 para ativação de RUNX2, é a PKC, sendo que a isoforma envolvida é PKC δ (Kim, Kim *et al.*, 2003). Contudo, é desconhecido se esta mesma via está ativa em fibroblastos de pacientes com S. de Apert e mutação p.Ser252Trp, onde há ativação de FGFR2 na presença de FGF2, FGF7 ou FGF10.

No caso dos osteoblastos, alguns mecanismos transcricionais que levam à regulação de programa gênico necessário para a sua diferenciação já são bem conhecidos, como por exemplo aqueles que envolvem os fatores de transcrição RUNX2, Msx2, Dlx5 e ERK2. RUNX2 é um fator de transcrição com domínio RUNT e seu funcionamento adequado é fundamental para a diferenciação de osteoblastos e maturação de condrócitos. Dentre várias outras funções, liga-se à região cis-reguladora, OSE2, do promotor do gene da osteocalcina, regulando a atividade deste gene em osteoblastos (Ducy, Zhang *et al.*, 1997; Lian, Stein *et al.*,

2003; Otto, Lubbert *et al.*, 2003). As proteínas homeobox Msx2 e Dlx5 e a proteína ERK2 também participam dessa via, regulando a atividade de Runx2 por interação proteína-proteína. ERK2 interage fisicamente com RUNX2, sendo capaz de fosforilá-lo e de potencializar sua atividade transcricional. Msx2, por outro lado, reprime sua atividade. O Dlx5 aumenta a atividade de Runx2 por aliviar a atividade repressora de Msx2 (Shirakabe, Terasawa *et al.*, 2001; Robledo, Rajan *et al.*, 2002). Recentemente foi mostrado que também as proteínas Twist (Twist 1 e 2) inibem o funcionamento de Runx2 durante o desenvolvimento esquelético de camundongos pela interação de seu domínio Twist box com o domínio de ligação ao DNA de Runx2 (Bialek, Kern *et al.*, 2004).

→ Modelos animais para a investigação bioquímica e transcricional das craniossinostoses síndrômicas

Na **tabela 1** estão mostrados os modelos animais produzidos até o momento para as Síndromes de Apert, Crouzon e Pfeiffer. A seguir, discutiremos dois modelos importantes para a investigação bioquímica e transcricional das craniossinostoses síndrômicas, sendo que um deles foi usado neste trabalho.

Tabela 1: Modelos animais para as síndromes de Apert, Crouzon e Pfeiffer

Síndrome	Mutação humana	Modelo animal	Referência
Apert	FGFR2 – p.Ser252Trp p.Pro253Arg	Fgfr2 ^{+/S252W} Fgfr2 ^{+/p.P253R}	(Chen, Li <i>et al.</i> , 2003) (Wang, Xiao <i>et al.</i> , 2005) (Yin, Du <i>et al.</i> , 2008)
	FGFR2 – inserções raras em heterozigose em torno e na alça IIIc	Fgfr2IIIc ^{+/del}	(Hajihosseini, Wilson <i>et al.</i> , 2001)
Crouzon	FGFR2 – mutações em heterozigose na porção extracelular. As mais comuns são: p.Cys278Phe, p.Cys342Tyr e p.Ser347Cys	Fgfr2 ^{+/C342Y}	(Eswarakumar, Horowitz <i>et al.</i> , 2004)
Pfeiffer	FGFR2 – mutações em heterozigose nos domínios extracelular e citoplasmático FGFR1	Fgfr1 ^{+/p.P250R} Fgfr1 ^{+/+} com 2 ou 4 cópias de Fgfr1 ^{p.P250R} em BAC integradas ao cromossomo 4	(Hajihosseini, Lalioti <i>et al.</i> , 2004) (Zhou, Xu <i>et al.</i> , 2000)

Em Eswarakumar V.P. et al, 2002 (Eswarakumar, Monsonneg-Oornan *et al.*, 2002) foi descrito um modelo animal murino para investigação da função da isoforma *Fgfr2IIIc*. Este modelo foi obtido por mutagênese sítio dirigida gerando um códon de parada da tradução no exon 9 deste gene, exon que codifica especificamente a isoforma “c”, sem influência na transcrição da isoforma “b” do receptor (vide **figura 4**). A perda de função de Fgfr2c resultou em indivíduos heterozigotos viáveis, férteis e sem nenhuma malformação aparente. O endocruzamento destes indivíduos deu origem a um fenótipo recessivo viável (Fgfr2c - / -), caracterizado principalmente por craniossinostose e atraso no desenvolvimento do esqueleto axial e apendicular. Este trabalho é fundamental para investigarmos a importância da sinalização da isoforma IIIc de Fgfr2 ao longo do

desenvolvimento. Pacientes com S. de Apert portadores de inserções Alu em FGFR2 podem ter perda de função desta isoforma IIIc.

Em Eswarakumar V.P. et al 2004 (Eswarakumar, Horowitz *et al.*, 2004) foi reportado um modelo murino para as síndromes de Crouzon e de Pfeiffer por introdução de uma mutação que troca uma cisteína na posição 342 de *Fgfr2IIIc* por uma tirosina, causando ganho de função do receptor, o mesmo fenômeno bioquímico causado pela mutação p.Ser252Trp em FGFR2 nos pacientes com S. de Apert. Os animais heterozigotos ($Fgfr2^{C342Y / +}$) são viáveis e férteis, caracterizados por portarem craniossinostoses, crânio em formato de dômus, terço médio da face reduzido, distância ocular intercantal aumentada e protrusão ocular. Alguns dos animais $Fgfr2^{C342Y / +}$ apresentaram um desvio lateral da área nasal, levando a mal oclusão e dificuldades na alimentação após o período de amamentação. A existência de pacientes homozigotos para esta mutação é extremamente inverossímil, mas foi possível gerar animais homozigotos $Fgfr2^{C342Y / C342Y}$ por cruzamento dos animais heterozigotos. Estes apresentaram variantes muito mais graves das malformações vistas nos heterozigotos, tais como área nasomaxilar extremamente diminuída e fechamento prematuro de múltiplas suturas cranianas, além de defeitos adicionais, como fenda no palato secundário, defeitos traqueais e pulmonares e fusão múltipla de juntas dos ossos longos do corpo. Esta constelação de malformações foi incompatível com a vida e acarretou na morte destes animais em momento imediatamente subsequente ao nascimento.

Justificativa e Objetivos

A maior parte dos estudos envolvendo as consequências celulares e moleculares de mutações em *FGFR2* associadas às craniossinostoses, incluindo uma parte deste trabalho, foi conduzida em osteoblastos ou em outras células isoladas a partir de tecido calvarial de camundongos (Mansukhani, Bellosta *et al.*, 2000; Chen, Li *et al.*, 2003; Mansukhani, Ambrosetti *et al.*, 2005; Wang, Xiao *et al.*, 2005) devido à relativa facilidade do trabalho e da obtenção destas células a partir do modelo murino, em qualquer estágio do desenvolvimento e em grande quantidade, quando comparada à dificuldade de acesso aos pacientes. Entretanto, a utilização de células fibroblastóides oriundas de tecido craniano de pacientes com Síndrome de Apert é um modelo atrativo para estudo da sinalização de FGFR2 uma vez que esses fibroblastos, provenientes de periósteo, representam células ainda não totalmente diferenciadas e com capacidade de dar origem a osteoblastos (Carinci, Bodo *et al.*, 2002). Devemos enfatizar que o periósteo pode ser facilmente acessado durante a cirurgia corretiva destes pacientes e partes dele são normalmente descartadas durante este procedimento. É sabido também que o periósteo tem um papel fundamental na dinâmica de regeneração de tecido ósseo craniano, uma vez que a remoção deste tecido em defeitos calvariais de animais diminui a vascularização e a calcificações destas regiões (Hopper, Zhang *et al.*, 2001; Ozerdem, Anlatıcı *et al.*, 2003) e que o transcriptoma de fibroblastos em cultura é quase indistinguível do transcriptoma de osteoblastos sob as mesmas condições (Ducy, Schinke *et al.*, 2000). Além disso, a única característica morfológica específica de osteoblastos está situada fora da célula, sob a forma de uma matriz extracelular mineralizada. De fato,

osteoblastos podem ser geneticamente vistos como fibroblastos sofisticados (Ducy, Schinke *et al.*, 2000; Bochukova, Soneji *et al.*, 2009). Assim sendo, a compreensão da regulação gênica nestas células certamente traz esclarecimentos sobre cascatas de sinalização intracelulares importantes para um melhor entendimento desta patologia em humanos e para possível aplicação na área de terapia celular.

No primeiro momento, foi de nosso interesse estudar o potencial de diferenciação e o perfil diferencial de transcrição gênica de culturas primárias de células fibroblastóides do periósteo das suturas coronais de pacientes acometidos por síndrome de Apert, tendo como principais escopos:

1) Verificar se linhagens primárias de células fibroblastóides de periósteo com mutação patogênica p.Ser252Trp em FGFR2 apresentam maior potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* e *in vivo* e adipogênica *in vitro*;

2) Verificar se estas células constituem um modelo adequado para o estudo das vias de sinalização ativadas por este receptor;

3) Elucidar e caracterizar melhor as vias transcricionais desencadeadas pela ativação de FGFR2 portador da mutação p.Ser252Trp.

Para isto, desenvolvemos os seguintes objetivos específicos:

a) Verificar se as células destas linhagens, portadoras de mutação p.Ser252Trp em FGFR2, apresentam potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica e compará-lo com o potencial de células da mesma origem mas livres desta mutação;

b) Verificar se o padrão de expressão gênica de culturas primárias de células fibroblastóides contendo FGFR2 com a mutação p.Ser252Trp difere daqueles com FGFR2 selvagem;

c) Verificar se há uma via de sinalização principal ativada em culturas primárias de células fibroblastóides com esta mutação.

Após apurarmos os resultados dos experimentos desenhados para cumprirmos estes objetivos, tivemos como objetivos subsequentes:

4) Verificar se este comportamento celular anormal identificado em experimentos com células fibroblastóides humanas de suturas coronais portadoras da mutação p.Ser252Trp em FGFR2, que resulta em ganho de função deste receptor, está também presente em células mesenquimais de suturas coronais murinas portadoras da mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2, também resultando em ganho de função, o que nos permitiria caracterizar este mecanismo celular como um dos fenômenos definitivos para o fechamento prematuro destas suturas.

5) Identificar o perfil diferencial de expressão gênica regendo este possível comportamento celular anormal do tecido das suturas coronais do modelo murino portador da mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2.

Material e Métodos

→ Comitê de Ética

No que concerne a obtenção e uso de células de pacientes e de indivíduos não afetados para esta pesquisa, o projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo n° 024/2004).

O projeto para o uso de animais (modelo animal de defeitos críticos em calotas cranianas de ratos Wistar) para os testes de potencial osteogênico *in vivo* de células fibroblastóides de periósteo craniano humano foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisas com Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (protocolo 037/2006).

O protocolo para uso de camundongos selvagens e geneticamente modificados foi aprovado pela IACUC (*Institutional Animal Care & Use Committee*) e pela *YARC Facility* da Universidade de Yale. Antes da etapa experimental envolvendo o uso destes animais, o aluno recebeu treinamento especializado, freqüentando os cursos *Basic Principles in Rodent Handling, Collection and Injection Techniques, Rodent Inhalation Anesthesia, Rodent Aseptic Survival Surgery* e *YARC Facility Training* e assinou o termo *Annual Conflict of Interest/Commitment Disclosure Form*.

→ Obtenção de periósteo craniano humano e estabelecimento de culturas celulares primárias

Isolamos, estabelecemos e expandimos culturas primárias de células fibroblastóides de sete indivíduos normais para craniossinostoses e de sete pacientes portadores de Síndrome de Apert. O grupo de pacientes não só apresentava características clínicas homogêneas, que caracterizaram o diagnóstico de S. de Apert, como também homogeneidade molecular, sendo que todos eram portadores da mutação p.Ser252Trp em FGFR2. Para a obtenção de tais culturas celulares, estabelecemos parcerias com o Prof. Dr. Sérgio Cavalheiro, do Departamento de Neurologia da Escola Paulista de Medicina (EPM), Prof. Dr. Fernando Kok, do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade de São Paulo (FM-USP), Prof. Dr. Nivaldo Alonso, do Departamento de Cirurgia Plástica da FM-USP, Dr. Hamilton Matsushita, do Departamento de Neurologia da FM-USP e Prof. Dr. Renato da Silva Freitas, do Centro de Atendimento Integral ao Fissurado Lábio Palatal, Paraná. As células fibroblastóides dos pacientes com S. de Apert são provenientes de periósteo craniano localizado sobre as suturas coronais, material que é normalmente descartado durante cirurgia de correção. Este material foi obtido de 3 meninos e de 4 meninas, com idades variando de 3 meses a 14 anos. No momento da cirurgia coletamos também amostra de sangue destes pacientes para extração de DNA e a presença da mutação p.Ser252Trp em FGFR2 foi confirmada por sequenciamento direto. Os fibroblastos usados como controle também foram obtidos a partir de tecido ósseo craniano, sendo normalmente retirado durante procedimento cirúrgico em pacientes com câncer encefálico, neste caso craniofaringiomas, para que o cirurgião tenha acesso ao encéfalo do indivíduo

e descartado em seguida. Estes pacientes doadores de periósteo controle, não acometidos por nenhuma doença envolvendo os ossos da caixa craniana, foram 3 meninos e 4 meninas, com idades variando de 11 meses a 13 anos. As idades foram, na medida do possível, pareadas às dos indivíduos com S. de Apert. O sexo também foi um parâmetro pareado na tentativa de minimizar a variabilidade experimental.

As culturas celulares foram conduzidas de acordo com o protocolo 22.14 descrito no livro “Culture of Animal Cells” (Freshney, R. I. Protocolo 22.14 In: Culture of Animal Cells: a manual of Basic Technique, 4ª edição), adaptado para cultura de fibroblastos. De forma geral, um fragmento de periósteo, tanto no caso dos pacientes com S. de Apert quanto no caso dos controles, é coletado no momento inicial da cirurgia, meticulosamente dissecado para ficar livre de tecidos contaminantes e imediatamente armazenado em tubos estéreis contendo meio de cultura de células (80% DMEM High Glicose, implementado com 20% Soro Fetal Bovino e 2mmol/L 1-glutamina, penicilina e estreptomicina). Os tubos são então colocados em caixa de isopor com gelo e conduzidos à sala de cultura de células. No fluxo laminar o tecido é lavado 3 vezes em PBS-A contendo 2mmol/L 1-glutamina, penicilina e estreptomicina, colocado em placa de petri e cortado em finas frações com uso de bisturi. Estas frações são colocadas, com o auxílio de uma agulha (0.5 x 16 mm), na base de garrafas de cultura de células de 25 cm² de área de superfície. Adicionamos 1mL de Soro Fetal Bovino e armazenamos as garrafas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ e alta umidade. Após 4 dias adicionamos meio de cultura de células e aguardamos que as células fibroblastóides irradiem dos fragmentos de tecido. A **figura 7** é uma imagem que mostra o início deste processo.

Figura7: Células fibroblastóides humanas aderidas à placa de cultura, no início do processo de irradiação de um fragmento de periósteo craniano.

As passagens foram feitas com o uso de solução de tripsina-EDTA. Todos os testes foram realizados entre as passagens 6 e 8. Armazenamos também amostras destas células em meio de congelamento (60% DMEM High Glucose, implementado com 30% Soro Fetal Bovino e 2mmol/L 1-glutamina, penicilina e estreptomicina e 10% de DMSO) e as estocamos em galões de nitrogênio líquido com o intuito de usarmos em experimentos e em projetos futuros.

→ Isolamento de RNA de células fibroblastóides humanas

Para todos os experimentos que envolveram uso de RNA mensageiro de células, o RNA total foi extraído de células com 80 - 90% de confluência aderidas à

superfície de garrafas pequenas, de 25 cm² de superfície, ou médias, de 75 cm² de superfície, de acordo com a técnica de extração de RNA com o uso de reagente de TRIzol (Gibco BRL), adaptado para a extração de RNA de células em cultura, tratados com DNase e purificado com o uso do kit “RNAeasy” (Quiagen).

O RNA total foi diluído em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e a qualidade do RNA foi averiguada por meio de eletroforese (100 volts por 60 minutos) em gel de agarose (0,6% de agarose, 2% de brometo de etídio diluídos em tampão 1 X TBE). Usamos apenas amostras sem evidências de degradação de RNA e com razão adequada de bandas 28S/18S de RNA ribossômico. O RNA foi quantificado com o uso de Nanodrop ND 1000.

→ Verificação da expressão gênica e proteica de *FGFR2* em células humanas

Para nos assegurarmos da expressão gênica e proteica de *FGFR2* nas células fibroblastóides humanas, conduzimos experimentos de RT-PCR, imunohistoquímica e *western blotting*. Desenhamos primers específicos para reação de transcrição reversa seguida por amplificação do produto por reação em cadeia da polimerase. Isso foi feito com o uso do kit “SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq” (Invitrogen). Os primers para amplificação do cDNA foram desenhados em diferentes exons, garantindo que o que foi amplificado é referente ao RNA mensageiro e não a nenhum possível DNA genômico contaminante. As sequências específicas dos *primers* usados foram: *primer* F para FGFR2IIIb e FGFR2IIIc – 5' agtgtgtgccatctgacaag 3', *primer* R para FGFR2IIIb - 5'

ggcctgccctatataattgga 3' e *primer R* para FGFR2IIIc - *5' atagaattacccgccaagcac 3'*. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese (130 volts durante 40 minutos) em gel de agarose (2% de agarose diluída em tampão 1 X TBE), junto com um marcador molecular, x174 RFDNA / Hae III fragments (Invitrogen), e corados com solução de brometo de etídio. Em seguida foram visualizados e fotografados com o auxílio de luz ultravioleta. Para esta verificação usamos RNAs de culturas primárias fibroblastóides de 5 pacientes portadores de S. de Apert e de 4 indivíduos controles.

Para checarmos a presença de FGFR2 na membrana celular fizemos experimento de *western blotting* e de imunohistoquímica. Para o *western blotting*, lisados protéicos celulares de 3 pacientes com S. de Apert e de 3 controles foram preparados com Rippa Buffer (50mM Tris-HCL pH7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5 % deoxicolato de sódio, 1% nonidet 40) e 500 µg destes lisados foram submetidos a *western blotting* usando diluição de 1:250 de anticorpo primário BEH (H-80 : sc-20734, Santa Cruz Biotechnology, Inc) e 1:1000 de anticorpo secundário conjugado *anti-rabbit alkalike-phosphatase*.

Para os experimentos de imunohistoquímica as células de 3 pacientes com S. de Apert e de 3 controles foram tratadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos e marcadas com diluição de 1:100 de anticorpo primário BEH e 1:100 de anticorpo secundário *anti-rabbit-Cy3*. Como controle negativo, usamos células fibroblastóides embrionárias murinas NIH 3T3, que não expressam *Fgfr2*, cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Hugo Armelin, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química / USP. Marcação controle apenas com o anticorpo secundário foi usada também como controle negativo.

→ Caracterização do imunofenótipo celular

Com o intuito de caracterizarmos o imunofenótipo (proteínas específicas de superfície celular) e, por extensão, a homogeneidade das linhagens por citometria de fluxo, escolhemos 3 amostras de culturas primárias de células de pacientes e 3 amostras de culturas celulares primárias de controles. Escolhemos anticorpos primários específicos de linhagens mesenquimais, hematopoiéticas e endoteliais, sumarizados a seguir:

1) Anticorpos mesenquimais: anti-CD29, anti-CD90 (Becton Dickinson, NJ, USA), anti-SH2 e anti-SH3 (Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA).

2) Anticorpos hematopoiéticos: anti-CD45, anti-CD117 (Becton Dickinson, NJ, USA).

3) Anticorpo endotelial: anti-CD31 (Becton Dickinson, NJ, USA).

Todos os anticorpos primários foram titulados antes de conduzirmos os experimentos, para padronização das concentrações ideais de cada um e das condições experimentais da citometria de fluxo. Os anticorpos primários estavam conjugados com PE, FITC ou Cy3. As células foram misturadas a TrypLe (Invitrogen), lavadas com PBS e incubadas a 4°C por 30 minutos com os anticorpos primários. Para cada amostra usamos 10^5 células ressuspendidas em 200 uL de PBS e anticorpo primário. Foram usados 2 controles negativos para cada uma das linhagens: células incubadas com PBS em vez de anticorpo primário e células incubadas apenas com o anticorpo secundário anti-mouse PE. A fluorescência das células foi adquirida com o uso do equipamento “EasyCyte flow cytometer” (Guava

Technologies). Os dados foram analisados com o uso do programa “Guava ExpressPlus”.

→ **Diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro***

Para todos os experimentos de diferenciação celular *in vitro* usamos amostras de 3 pacientes com S. de Apert e de 3 indivíduos controles, constituindo triplicatas biológicas, estabelecidas em cultura primária até atingirem confluência de 80 – 90%. Os protocolos de diferenciação foram também conduzidos em triplicata para cada uma das amostras (triplicatas técnicas) e estão detalhados a seguir.

- Diferenciação osteogênica:

Após padronização do protocolo de diferenciação osteogênica, as triplicatas biológicas e técnicas das culturas celulares referidas acima foram tratadas com meio de proliferação suplementado com 50 μ M de ascorbato-2-fosfato (Sigma), 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma), e 0,1 μ M de dexametasona (Sigma) por 21 dias. A diferenciação osteogênica foi demonstrada por acúmulo de matriz extracelular de cálcio por coloração de von Kossa.

Para esta coloração as células foram tratadas com 1% de nitrato de prata (Sigma) por 45 minutos sob luz ultravioleta, seguido de tratamento com 3% de tiosulfato de sódio por 5 minutos e posterior marcação com solução de van Gieson. As imagens foram fotografadas em microscópio invertido, em aumentos de 5X, 10X e 20X.

- Diferenciação adipogênica:

Após padronização deste protocolo, as células foram cultivadas em meio de proliferação suplementado com 1 μ M de dexametasona (Sigma), 500 μ M de 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX - Sigma), 60 μ M de indometacina (Sigma) e 5 μ g/mL de insulina (Sigma). A diferenciação adipogênica foi confirmada após 21 dias de tratamento, por marcação de vacúolos intracelulares ricos em lipídeos por coloração de Oil Red-O (Sigma).

Para esta marcação, as células foram fixadas em solução contendo 4% de paraformaldeído por 30 minutos, lavadas com água destilada e, em seguida, marcadas com uma solução de 0,16% de Oil Red-O por 20 minutos. As imagens de todas as triplicatas técnicas e biológicas foram fotografadas em microscópio invertido, em aumentos de 5X, 10X e 20X.

→ **PCR em tempo real para validação das diferenciações celulares *in vitro***

Para a validação das diferenciações celulares *in vitro*, constatando a expressão de genes marcadores destas diferenciações, extraímos RNA, com uso de reagente de TriZol, das linhagens usadas para as diferenciações em dois momentos distintos: antes de iniciarmos os protocolos de diferenciação (0 dias – t.0) e após o término dos protocolos (21 dias – 21d.). Como marcadores da diferenciação osteogênica, medimos a expressão dos genes que codificam osteopontina e colágeno tipo 1A1. Como marcador de diferenciação adipogênica, medimos a expressão do gene que codifica a lipase lipoproteica (LPL). Usamos a expressão do gene *HPRT1*

(hipoxantina fosforibosiltransferase 1) para controle endógeno e o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001) para cálculo das razões de expressão.

Na construção dos gráficos, para os dois tempos foi calculada a média aritmética dos valores de expressão das 3 amostras de células de pacientes com S. de Apert e das 3 amostras controles e, com base nestes dados, foram construídas as barras “Apert t.0”, “Apert t.21” e “Controle t.0”, “Controle t.21” respectivamente. A construção das barras de erro foi feita de modo análogo, com o valor da média aritmética dos erros mínimo e máximo para cada amostra. Estes experimentos foram realizados em triplicatas técnicas, com o uso do equipamento Applied Biosystems 7500 e do sistema SYBR-Green.

→ **Experimentos de microarrays de expressão gênica em células fibroblastóides humanas (sistema Codelink – GE HealthCare)**

Os experimentos de microarrays de expressão foram conduzidos com o uso do sistema “CodeLink™ Expression Bioarray”, da Amersham Biosciences, atual G.E. Healthcare. Em linhas gerais, o procedimento é o seguinte: após a preparação do RNA total fazemos a síntese das primeiras fitas de cDNA a partir de 2 µg de RNA com o uso da transcriptase reversa SuperScript II e de primers t7-poli-dT, das segundas fitas de cDNA, com o uso de DNA polimerase I de *E.coli* e RNase H e purificaremos este cDNA por meio de colunas QIAquick (Qiagen). A seguir, fazemos uma transcrição *in vitro* acoplada à marcação com biotina, gerando, a partir do cDNA dupla fita, cRNA marcado com biotina. De acordo com o protocolo, este método faz uma amplificação de aproximadamente 1000 a 5000 vezes do mRNA

inicial. Este cRNA é então purificado, fragmentado e hibridizado *overnight* (por 18 a 24 horas) aos oligonucleotídeos contidos nas lâminas. Este cRNA fragmentado foi hibridizado a 5 lâminas CodeLink contendo aproximadamente 20.000 sondas (lâminas de 20K) e a 9 lâminas CodeLink contendo aproximadamente 55.000 sondas (lâminas de 55K). Isto é feito com o uso de um agitador com temperatura e agitação controladas. O processamento que se segue à hibridização inclui uma lavagem para a remoção de moléculas de RNAm que não se ligaram ou que se ligaram às sondas de forma não específica, uma etapa de marcação com Cy 5 – estreptavidina e uma série de lavagens para remover a estreptavidina em excesso. As lâminas são então secadas por uma centrifugação rápida. Os sinais do Cy5 são detectados por um Scanner GenePix 4000B (Axon Instruments).

As matrizes de dados obtidas a partir das hibridizações dos RNAs mensageiros dos pacientes e controles foram inicialmente geradas com o uso do programas *CodeLink Expression Analysis software* (Amersham Biosciences) Para a etapa de normalização e de mineração destes dados, contamos com a colaboração da equipe do Dr. Sergio Verjovski-Almeida e do Prof. Dr. Eduardo Reis, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química – USP.

Um conjunto de 19.683 sondas de cDNA (com 30 bases cada), presentes tanto nas lâminas de 20K quanto nas de 55K, foram analisadas neste experimento. Destes apenas 9.543 (48,5%) tiveram medidas de expressão aceitáveis (a expressão foi detectada e o valor de expressão estava acima do valor médio de ruído de fundo, determinado pela expressão de controles negativos organizados aleatoriamente pela lâmina) em pelo menos 6 de 7 amostras de pacientes com S. de Apert ou controles. Para tornar os experimentos comparáveis, dados de intensidade de sinal de diferentes hibridizações foram normalizados por 2 métodos: a) média trimada com

exclusão dos 20% dos dados de intensidades maiores ou menores e b) *Lowess (local weighted scatter plot smoothing* (Quackenbush, 2002). Os dados ajustados por *lowess* usando um arquivo de referência tiveram valores mais baixos de coeficientes de variação entre as amostras e foram usados no restante das análises.

Com o objetivo de identificarmos uma assinatura de expressão gênica característica de amostras de pacientes com S. de Apert usamos uma métrica de *Signal-to-Noise* (SNR (Golub, Slonim *et al.*, 1999) para compararmos dados de expressão das células mutadas com os dados das células controles. O parâmetro SNR é essencialmente um parâmetro métrico de força de sinal relativo ao ruído de fundo. A comparação SNR nos dá uma indicação da dimensão da separação das médias das duas distribuições, definindo as intensidades gênicas dos 2 grupos, e é calculada como: $SNR = \sqrt{(\mu_1 - \mu_2)^2 / (SD_1 + SD_2)}$, onde μ_1 e μ_2 são as intensidades médias de sinais dos grupos Apert e Controle, respectivamente e SD1 e SD2 os desvios padrões correspondentes. Para cada gene, um SNR absoluto maior indica uma maior diferença de expressão entre amostras Apert e Controles, com uma dispersão menor entre cada grupo. Um limiar de $SNR \geq |0.4|$ foi usado para a seleção de genes diferencialmente expressos. A significância estatística das diferenças de expressão (valores de P) foi calculada por *bootstrap resampling*, ou seja, por re-calcularmos os valores SNRs após 10.000 permutações aleatórias das amostras, seguido do registro da frequência com que cada valor de SNR medido no arranjo inicial foi observada nos dados permutados aleatoriamente (Reis, Nakaya *et al.*, 2004). A robustez da assinatura de expressão gênica identificada nas amostras mutadas foi validada pela estratégia *leave-one-out* (Van 'T Veer, Dai *et al.*, 2002). De forma geral, uma das amostras é removida e um novo painel de genes diferencialmente expressos é identificado usando as amostras remanescentes. Este

procedimento foi aplicado para cada uma das 14 amostras e a frequência com que cada gene aparece nas várias planilhas *leave-one-out* com uma significância de $P \leq 0.05$ foi registrada.

A reprodutibilidade das medidas de expressão gênica foi verificada ao gerarmos duas réplicas independentes de RNA mensageiro de 2 linhagens celulares de pacientes com S. de Apert e de 1 controle e ao hibridizarmos estas replicatas tanto a lâminas de 20K quanto a lâminas de 55K e compararmos pareadamente, pelo índice de correlação de Pearson, os valores de intensidades de sinais das 19.683 sondas compartilhadas pelas duas plataformas.

→ Tratamento de células selvagens com FGF2 exógeno

Três amostras de células controles foram cultivadas como 2 grupos distintos (duplicatas técnicas) em garrafas de 25 cm² de superfície até atingirem confluência de 80%. Foram então lavadas com PBS e tratadas com meio de careciamento (meio de proliferação livre de soro fetal bovino), por 24 hs. Após este período a um grupo foi adicionado meio de proliferação com 0,5% de soro fetal bovino (**grupo controle**) e ao outro (**grupo experimental**) foi adicionado meio de proliferação com 0,5% de soro fetal bovino e FGF2 bovino recombinante (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Hugo Armelin, professor titular do Depto de Bioquímica do Instituto de Química da USP) em concentração final de 36 ng/mL. As células dos dois grupos foram lisadas 3, 6 e 24 horas após a adição de FGF2 e o RNA total foi isolado para medirmos a expressão gênica de *STMM1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN* e *EEF1B2* por PCR em tempo real.

→ **PCR em tempo real para validação de dados dos microarrays e para medição de expressão gênica em células tratadas com FGF2**

O cDNA foi produzido a partir de 4 µg de RNA total usando o kit de transcrição reversa “SuperScript II” (Invitrogen). PCR em tempo real foi conduzido usando aproximadamente 200 ng de cDNA e SYBR-Green. As condições da reação foram: 94°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, por 40 ciclos. Como controles endógenos usamos os genes *HPRT1* (hipoxantina fosforibosiltransferase 1) para normalização dos genes com alta expressão e *SDHA* (subunidade A do complexo succinato desidrogenase) para genes com baixa expressão e como genes alvos usamos *STMM1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN* e *EEF1B2*. As sequências dos *primers* usados nesta etapa experimental estão sumarizadas na **tabela 2**. Para validação dos experimentos de microarrays, quatro amostras provenientes de portadores de S. de Apert e 4 amostras controles foram corridas em triplicatas. Para a medição da expressão destes genes em células controles submetidas a tratamento com FGF2 exógeno usamos todas as amostras de RNA obtidas a partir dos diferentes grupos deste experimento. O limiar (*threshold*) sugerido pelo programa foi adotado para o cálculo do Ct e as razões de expressão foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 2: Sequência dos *primers* usados nos experimentos de PCR em tempo real para validação de dados dos microarrays de expressão (sistema CodeLink).

Gene	Sequência F	Sequência R
<i>CENPN</i>	TCAGTGATGCTGCCCTGTTAGA	AGTGATGCTGCCCTGTTAGACA
<i>STMN1</i>	GGCAGGACTTTCCTTATCCCA	GGCAGGACTTTCCTTATCCCA
<i>SPAG5</i>	GAGTTCAAGGAGGTGCTGAAGA	TGTCTGGAGGTCCTGCTATTTC
<i>RMM2</i>	CTTTGTCATCTTCCCCATCGAG	TGCTGAATGTCCTTGGAGAGGT
<i>HIP2</i>	GAGTTCAAGGAGGTGCTGAAGA	TGTCTGGAGGTCCTGCTATTTC
<i>EEF1B2</i>	TTCGGAGACCTGAAAAGCCCT	CGGCTTCAAATACTGCCACATC
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>SDHA</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG

→ Experimento para teste de potencial de ossificação *in vivo*

Após nos assegurarmos do potencial de diferenciação celular *in vitro* de células fibroblastóides provenientes de suturas coronais de pacientes com S. de Apert, desenhamos e conduzimos experimentos de diferenciação celular *in vivo*.

Padronizamos as condições deste experimento com o uso de um total de 4 ratos Wistar machos divididos em 2 grupos. Cada grupo foi composto igualmente por 1 rato de 60 dias de idade (massa corpórea de cerca de 250g) e por 1 rato de 8 meses de idade (massa corpórea de cerca de 500g) não imunossuprimidos. Os animais mais jovens foram adquiridos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo enquanto os animais com 8 meses foram adquiridos no biotério da Escola Paulista de Medicina. Para o experimento propriamente dito usamos no total 6 ratos machos de 8 meses de idade (massa corpórea de 320 a 420 g) não imunossuprimidos, adquiridos no biotério da Escola Paulista de Medicina. Até o momento da cirurgia e no período pós-cirúrgico todos os animais foram mantidos em estantes ventiladas (Alesco), com condições

padronizadas de temperatura, arejamento e iluminação (22°C, ciclagem de 12 horas de claridade por dia), com acesso livre a água e ração.

Antes das cirurgias, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (0,3mL/100g de massa corpórea) com uma combinação de hidrocloreto de ketamina (5%) e xilasina (2%). No momento da cirurgia, a cabeça dos animais foi imobilizada com o uso de um aparato estereotáxico.

Durante o procedimento cirúrgico foi feita, com bisturi, uma incisão de linha média desde a região frontonasal até a protuberância occipital externa. A pele, o periósteo craniano e a musculatura temporal foram rebatidos lateralmente, de forma a deixarmos exposta a região calvarial (**figura 8**).

Dois defeitos cranianos simétricos medindo 8 x 5mm (defeito crítico neste modelo) foram feitos na região parietal, flanqueando a sutura sagital, entre as suturas occipitais e as coronais, com o uso de uma broca e constante irrigação com solução fisiológica. A dura mater foi mantida intacta, evitando hemorragia e preservando o funcionamento encefálico.

Figura 8: Imagem de um rato no momento do procedimento cirúrgico. O animal foi imobilizado com o uso de um aparato estereotáxico. Após a incisão na região da linha média, pele e periósteo foram rebatidos lateralmente. Parte da musculatura temporal foi rebatida num momento imediatamente subsequente.

No experimento de padronização cada animal foi transplantado com membrana de colágeno (CM - Oral Medica) infundidas com meio de proliferação. As membranas foram cortadas em tamanho ligeiramente (1 mm em cada extremidade) maior que os defeitos para podermos prendê-las sob o defeito, de forma a mantê-las imóveis, principalmente após o fechamento da incisão. A incisão foi fechada com fios nº 4 de nylon (Ethicon). Os animais do primeiro grupo foram mortos 30 dias após a data da cirurgia e os animais do segundo grupo foram mortos 90 dias após a cirurgia.

As amostras de tecidos foram fixadas em formalina 10% por 24 horas, descalcificadas em ácido fórmico 5% por 48 horas e emblocadas em parafina. Para o

estudo morfológico foram obtidas secções de 5 µm, marcadas com hematoxilina e eosina (coloração HE) e examinadas com o uso do microscópio Axiovert 2 (Carl Zeiss). Para a análise histológica estabelecemos colaboração com o grupo da Profª Drª Marília Trierveiler Martins, do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Para o experimento propriamente dito usamos 3 amostras de células de pacientes com S. de Apert e 3 amostras de células de indivíduos normais. Um total de 10⁶ células por amostra, contadas em câmara de Neubauer, foi diluído em 200 µL de meio de proliferação, infundido em membranas de colágeno, em placas de 35 mm (6-well plate, Corning) e incubado a 37°C, 5% CO₂ por 1 hora. Após este período as placas foram suplementadas com 2,5 mL de meio de proliferação e as membranas foram incubadas nas mesmas condições por 24 horas. No momento do transplante, as membranas infundidas de células foram lavadas duas vezes com solução de PBS. As membranas contendo células das amostras controles foram transferidas para o defeito ósseo do lado esquerdo do crânio do animal e as membranas contendo células das amostras de pacientes com S. de Apert foram transferidas para o defeito do lado direito do crânio. É importante ressaltarmos que cada amostra de paciente foi pareada com uma amostra controle no mesmo animal. A incisão foi fechada com fios nº 4 de nylon (Ethicon). Os animais foram mortos 15 dias (três deles) e 30 dias (os outros três) após o transplante. As análises histológicas foram conduzidas da mesma forma que as do experimento de padronização, em colaboração com o grupo da Profª Drª Marília Trierveiler Martins.

→ Procedimentos para cruzamento e contagem do tempo gestacional dos camundongos

Para padronização e condução dos experimentos com modelo murino, cruzamos camundongos machos selvagens isogênicos da linhagem CD1 com mais de 3 meses de idade com fêmeas CD1 com 2 meses de idade. Os animais foram colocados na mesma gaiola durante o período noturno e pela manhã as fêmeas foram inspecionadas para verificarmos a presença do *plug* vaginal, o que indica que o coito ocorreu nas últimas dez horas. Às 12:00 horas do dia da detecção do *plug* vaginal consideramos E 0.5. Nestes experimentos trabalhamos com animais em E 18.5 (dezoito dias e meio após a detecção do *plug* vaginal nas fêmeas). Assim que os fetos provenientes dos cruzamentos dos animais selvagens atingiram E 18.5, as fêmeas grávidas foram mortas com o uso de câmara de CO₂ e os fetos foram removidos para serem usados para isolamento de células das suturas coronais e de RNA destas suturas.

Para expansão da colônia de animais $Fgfr2^{C342Y/+}$, cruzamos camundongos machos $Fgfr2^{C342Y/+}$ de 8 meses de idade com fêmeas selvagens CD1 de 2 meses de idade e obtivemos a geração F1. Os machos $Fgfr2^{C342Y/+}$ desta primeira geração (F1) foram usados, após 3 meses de idade, para cruzamentos com fêmeas selvagens CD1 e para darem origem a todos os fetos usados nos experimentos com o modelo murino. As genotipagens em todos os momentos foram feitas por amplificação dos alelos mutantes e selvagens por PCR, como detalhado a seguir.

→ Condições de extração de DNA e genotipagem dos camundongos

Para a genotipagem dos animais, o DNA foi extraído a partir de 5 a 10mg de tecido da orelha externa ou da porção terminal da cauda. Os tecidos em questão foram lisados por 12 horas a 55°C com “Cell Lysis Solution” (Quiagen), implementada com 0,1% de proteinase K. As proteínas do lisado celular foram precipitadas com o auxílio da solução *Protein Precipitation Solution* (Puregene, Gentra Systems) e o DNA foi precipitado por tratamento com solução de 100% isopropanol e, subsequentemente, 70% etanol. A re-hidratação do DNA foi feita com *DNA Hydration Solution* (Puregene, Gentra Systems), a 65°C por 1 hora. As amostras originais de DNA foram estocadas a 4°C. As condições da reação de PCR e das termociclagens para a genotipagem são mostradas na **tabela 3** (**3a**, **3b** e **3c**). Os produtos desta reação foram aplicados em gel de agarose 1,5% e submetidos a eletroforese por 30 minutos a 120 volts. Os géis foram então marcados com brometo de etídio e os fragmentos amplificados foram visualizados com o auxílio de luz ultravioleta.

Tabela 3: **3a** - Composição da reação de PCR; **3b** Condições de termociclagem; **3c** e sequência dos *primers* empregados.

Tampão (10X)	2 µL
DNTPs (2.5 mM)	3 µL
Primer F (20µM)	1,5 µL
Primer R (20µM)	1,5 µL
ddH2O	15,8 µL
DNA (50 µg/mL)	1 µL
Ex Taq Polymerase (5U/µL)	0,2 µL

2a

95°C	3 minutos	40x
95°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	

2b

Primer F	GAGTACCATGCTGACTGCATGC
Primer R	GGAGAGGATCTCTGTTTCAAGACC

2c

→ **Caracterização dos camundongos *Fgfr2*^{C342Y / +} adultos - marcação dos centros de ossificação por vermelho de alizarina**

Para a marcação dos centros de ossificação do crânio e dos membros posteriores por vermelho de alizarina, 8 camundongos *Fgfr2*^{C342Y / +} e 3 animais selvagens (linhagem isogênica CD1), todos machos e com 7 meses de idade, foram mortos com o uso de uma câmara de CO₂. A cabeça e os membros posteriores foram isolados do restante do corpo e diligentemente dissecados para remoção dos tecidos moles, tais como pele, músculos, tecido adiposo e tendões. Estas peças foram então fixadas em acetona por 3 dias e transferidas para solução de KOH 2%, em que permaneceram por 24 horas, para digestão do tecido muscular remanescente. As peças foram marcadas por 12 hs em solução de vermelho de alizarina (150 µg/mL diluídos em 1% KOH), tratadas por 3 dias em solução de 20% glicerol / 1% KOH, 2 dias em 20% glicerol diluído em etanol, 2 dias em 50% glicerol diluído em etanol e finalmente colocadas em solução de 100% glicerol para conservação.

→ **Isolamento e cultivo de células das suturas cranianas murinas**

As calvárias dos fetos de 30 camundongos selvagens e de 30 mutantes em E18.5 foram cuidadosamente isoladas e colocadas em de α -MEM (Gibco) implementado com 5% de soro fetal bovino (HyClone). As suturas coronais foram dissecadas sob lupa (Zeiss Stemi 2000-c), colocadas três a três (totalizando 10 grupos de suturas de animais selvagens e 10 grupos de suturas de animais mutados) em tubos falcon com 10 mL de EDTA 4mM e colocadas em banho-maria a 37°C

por 10 minutos. Esta etapa de tratamento com EDTA 4mM foi repetida uma vez, após lavagem com PBS. Em seguida, os grupos de suturas foram digeridos com 5 mL de solução de collagenase (200 unidades / mL de Collagenase CLS2, Worthington, diluída em PBS) por 10 minutos. Esta etapa foi repetida cinco vezes. Nas duas primeiras vezes a solução de collagenase foi descartada e nas 3 últimas vezes esta solução foi coletada, com um volume final de 15 mL. Estes 15 mL de solução foram então centrifugados por 6 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em 3 mL de α -MEM (Gibco) implementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone) e estabelecidas em cultura de células. Estas células foram usadas nos experimentos de comparação do potencial de ossificação *in vitro* e no experimento de western blotting em que verificamos a presença e o status de fosforilação de Fgfr2.

→ **Isolamento de RNA de suturas cranianas murinas**

Para os experimentos em que usamos RNA mensageiro de suturas coronais de camundongos, as calvárias de 15 fetos selvagens e de 15 fetos mutantes, em E18.5, foram isoladas sob condição estéril. Com o uso de lupa, a pele foi removida do crânio e uma incisão circular foi cuidadosamente feita para remoção da calota craniana intacta. Em seguida, remanescentes do encéfalo e da dura-máter foram diligentemente removidos. As suturas coronais foram dissecadas, isoladas e colocadas em conjuntos de 5, para cada grupo de animais (selvagens ou mutantes), em solução “RNAlater – RNA Stabilization Reagent” (Quiagen). A fragmentação e homogeneização deste tecido foi feita com uso do equipamento *Bullet Blender* (Next Advance, Inc), com microesferas metálicas de 1.6 mm de diâmetro. O RNA foi

então extraído dos 6 grupos, cada qual com 5 suturas, com o uso de reagente de TriZol, tratados com DNase e purificado em colunas do kit RNAeasy (Quiagen).

O RNA total foi diluído em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e a qualidade do RNA foi averiguada por meio do equipamento Bioanalyzer. O RNA foi quantificado com o uso de Nanodrop ND 1000. Com estes RNAs conduzimos experimentos de PCR em tempo real para medirmos a expressão das isoformas mais freqüentes dos *Fgfrs* e para os experimentos de microarrays de expressão.

→ Diferenciação osteogênica *in vitro*

Três grupos de células extraídas a partir de suturas de animais mutantes (**grupo experimental**) foram colocadas nos compartimentos superiores de 3 placas de 6 compartimentos (6-well plate, Corning) e 3 grupos de células isoladas de suturas de animais selvagens (**grupo controle**) foram plaqueadas nos compartimentos inferiores destas placas. Dessa forma, tivemos triplicatas biológicas dos grupos experimental e controle na mesma placa. Após adquirirem confluência de 80 – 90%, foi adicionado meio de diferenciação suplementado com 50 µM de ascorbato-2-fosfato (Sigma), 10 mM de β-glicerofosfato (Sigma), e 0,1 µM de dexametasona (Sigma) por 14 dias. Cada placa foi submetida a uma destas marcações: marcação de fosfatase alcalina (Sigma), coloração de vermelho de alizarina e coloração com reagente de Von Kossa.

→ Confirmação da expressão gênica e proteica de *Fgfr2*

Para a confirmação de expressão gênica de *Fgfr2* e caracterização do perfil de expressão das isoformas mais frequentes de *Fgfrs* conduzimos experimentos de PCR em tempo real usando o sistema *StepOne™ Real-Time PCR System*, 48 well (Applied Biosystems) e o reagente SYBR-Green. Reação de transcrição reversa foi feita com 1 µg de RNA total de cada um dos 6 grupos (3 grupos de RNAs de animais selvagens e 3 grupos de mutantes), usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Os primers foram desenhados usando o programa *Primer Express 3.1* (Applied Biosystems) e a especificidade dos *primers* foi testada com o uso do *NIH Basic Local Alignment Search Tool*. Os primers e as condições de reação foram testados e padronizados com o uso de amostra de RNA total de embrião murino. Os parâmetros das reações de PCR em tempo real foram: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Cada ensaio foi conduzido em triplicata técnica e a expressão do gene da β -actina foi usada como controle endógeno para a normalização dos sinais dos genes alvos de uma mesma amostra. O teste t de Student foi usado, com $P \geq 0,05$, na comparação entre as triplicatas. Para compararmos as variações gênicas entre diferentes amostras usamos como fator de normalização a expressão de *Frs2- β* , que mostrou não variar entre as amostras quando submetido ao programa geNorm. As diferenças de expressão foram calculadas com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Para a confirmação da expressão protéica de *Fgfr2* e de sua fosforilação conduzimos experimentos de *western blotting*. Usamos amostras celulares de 1 grupo de células isoladas a partir de suturas cranianas de indivíduos selvagens e de 1 grupo de células isoladas de suturas de animais mutantes. Estas células foram estimuladas ou não com *Fgfl*. Para a estimulação de *Fgfr2*, tanto mutado quanto selvagem, por

Fgfl, células dos dois grupos em meio de careciamento (livre de soro fetal bovino) por 24 horas foram estimuladas por 10 minutos, a 37°C, com 10 ng de Fgfl (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Joseph Schlessinger, do Departamento de Farmacologia da Universidade de Yale). Foram então preparados lisados protéicos com solução de lise (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton-X100, 25 nM NaF, 10 µg/mL aprotinina, 5µg/mL leupeptina, 1mM Na₃VO₄ e 1mM PMSF). Os lisados foram imunoprecipitados com anticorpo anti-Fgfr2 (cedido pelo Prof. Dr. Joseph Schlessinger) e com anticorpo anti-Fgfr2 seguido de *immunoblotting* com anticorpo anti-pTyr (Sigma).

→ **Experimentos de microarrays de expressão com tecido murino**

(sistema *Illumina Single Color Mouse Whole Genome 6*)

Para estes experimentos usamos 3 amostras de RNA de animais selvagens e 3 amostras de RNA de animais *Fgfr2*^{C342Y / +}, extraídos cada um diretamente de 5 suturas coronais, como descrito no tópico “Isolamento de RNA” desta seção. Estes experimentos de microarrays de expressão foram feitos usando o serviço de microarrays da *W.M.Keck Facility*, afiliada à Universidade de Yale. Usamos o sistema *Whole Genome Expression* (Illumina) e lâmina *Illumina Single Color Mouse WG 6 v.2.0*. Nestas lâminas podemos usar 6 amostras independentes de RNA e elas contém sondas de 50mers imobilizadas em alta densidade em microesferas (*beads*) de 3 µm de diâmetro. Com estas sondas podemos interrogar 45.200 transcritos, que abrangem 19.730 genes curados com base no banco de dados *NCBI ref.sec database, Build 36, Release 22*.

Em linhas gerais, com o uso do kit *Illumina RNA amplification* (Ambion), 200 ng de RNA total de cada amostra foram usados para síntese de cDNA de fita simples a partir de cauda poli (A) do RNA mensageiro. Em seguida, foi sintetizada segunda fita para o cDNA e foi feita transcrição reversa *in vitro* durante a noite na presença de UTP e de CTP marcados com biotina, produzindo cRNA. 1,5 µg deste cRNA foi misturado a controles e hibridizado por 16 horas a 58°C sob agitação constante. A seguir a lâmina passou por uma sequência de lavagens e foi marcada com estreptavidina associada a Cy3. A lâmina foi lavada novamente e escaneada pelo equipamento *Illumina BeadArray Reader*. As imagens foram analisadas pelo programa *BeadStudio v.3.2.7*, onde a qualidade dos controles *housekeepings*, dos controles de hibridização e dos controles negativos foi verificada. A partir do programa *BeadStudio* geramos um arquivo de extensão “.bgx.xml” que foi exportado para o programa *GeneSpring GX 10.0 Expression Analysis* (Agilent Technologies Inc), onde foi feita a anotação, normalização, filtragem dos dados de sinais significativos, análise de componente principal, análise estatística e de Fold Change e agrupamentos.

Os dados das hibridizações de RNA de animais *Fgfr2^{C342Y / +}* e de animais selvagens foram agrupados em dois conjuntos independentemente e normalizados por deslocamento de percentil (*percentile shift - shift to the 75th percentile*) e foi feito o ajuste de normalização pela média (*baseline to the median of all samples*). De 45.281 transcritos, 39.009 tiveram valor de expressão aceitáveis para as análises. A partir desta lista inicial geramos 3 sublistas de genes diferencialmente expressos: uma com base no teste t de Student, $p \leq 0.05$ e Fold Change ≥ 1.5 e outras duas filtrada para transcritos com coeficiente de variação < 50% em pelo menos 1 das 2 condições e teste t de Student com $p \leq 0.05$ com correção de Benjamini-Hochberg aplicada e

Fold Change ≥ 1.2 e ≥ 1.5 Estas listas foram submetidas aos programas *Ingenuity Pathway Analysis* e *DAVID* para serem melhor explorados do ponto de vista funcional e de vias transcrpcionais.

Resultados

→ Morfologia celular, expressão de *FGFR2* e imunofenótipo das linhagens de células fibroblastóides

As células fibroblastóides de periósteo craniano de suturas coronais de pacientes acometidos por S. de Apert, portadores da mutação p.Ser252Trp em *FGFR2* e de indivíduos normais, mostraram-se como populações de células aderentes e com morfologia relativamente homogênea, sem apresentarem alterações morfológicas ou aumento notável em morte celular após sucessivas passagens. Como esperado para células mesenquimais, observamos apenas a expressão de *FGFR2IIIc* (isoforma mesenquimal) tanto nas células de indivíduos com S. de Apert quanto nas células controles. Na **figura 9** podemos ver as bandas de cDNA de *FGFR2IIIc* de 2 destas amostras. A presença da proteína *FGFR2* foi verificada, tanto por *western blotting* quanto por imunohistoquímica, nos dois grupos e em quantidades similares (**figuras 10 e 11**). No caso dos experimentos de imunohistoquímica, os controles negativos de células NIH 3T3 e de células de pacientes e controles incubadas apenas com o anticorpo secundário ficaram livres de marcação. A caracterização imunofenotípica mostrou uma quantidade predominante de células marcadas com anticorpos primários mesenquimais, tanto naquelas provenientes de pacientes com S. de Apert quanto nas controles. A porcentagem de células, dos dois grupos, marcadas com anticorpos hematopoiéticos e endoteliais foi extremamente baixa, o que mostra nitidamente a origem

mesenquimal destas células e a atesta a homogeneidade destas linhagens primárias (figura 12).

Figura 12: Porcentagem de células marcadas com anticorpos mesenquimais (anti - SH2, SH3, CD90, CD29), hematopoiéticos (anti - CD45, CD117) e endotelial (anti - CD31). As barras de erro foram calculadas com base no desvio padrão das triplicatas técnicas.

→ Potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*

Para verificarmos se a expressão de FGFR2 mutado (p.Ser252Trp) confere às linhagens primárias de células fibroblastóides de periósteo dos pacientes com S. de Apert maior potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica, tratamos as triplicatas biológicas e técnicas com meio de indução para estas diferenciações e fizemos coloração por reagente de Von Kossa e por Oil Red-O, respectivamente. observamos forte marcação de depósitos de cálcio e de vacúolos lipídicos intracelulares em células de pacientes com S. de Apert, o que não ocorreu nas células controles. Além disso, no caso do experimento de osteogênese, quatro dias após o início do tratamento com meio de indução já era possível notar diferença no formato das células provenientes dos pacientes quando comparadas às células controles.

Os resultados das marcações específicas para as diferenciações osteogênicas (coloração de von Kossa) e adipogênicas (coloração Oil Red-O) estão apresentados nas **figuras 13 e 14**.

Figura 13 : Diferenciação osteogênica das células de periósteo craniano. Após 21 dias de cultura em meio osteogênico as células foram marcadas com a coloração de Von Kossa. A secreção de matriz extracelular calcificada pode ser nitidamente observada nas amostras “Apert 1”, “Apert 2” e “Apert 3”. As células das linhagens “Controle 1, 2 e 3”, em contrapartida, não mostram sinal de secreção de matriz extracelular de cálcio (diferenciação osteogênica completa).

Figura 14: Diferenciação adipogênica das células de perióstio craniano. Após 21 dias de cultura em meio adipogênico as células foram marcadas com a coloração de Oil Red-O. A presença de vacúolos intracelulares ricos em lipídeos pode ser claramente observada nas amostras “Apert 1”, “Apert 2” e “Apert 3”. As linhagens “Controle 1, 2 e 3”, por outro lado, não mostram qualquer sinal de diferenciação adipogênica.

As imagens acima apresentadas estão em aumentos diferentes (10X para as diferenciações osteogênicas e 20X para as adipogênicas) e incluem apenas uma das replicatas técnicas, mas conseguimos detectar marcação nítida para as células dos pacientes com S. de Apert em todas as replicatas e em todos os aumentos.

Conduzimos também experimentos de PCR em tempo real para verificarmos a expressão de genes relacionados à diferenciação óssea (osteopontina e colágeno 1A1 – Col 1A1) e adipogênica (lípase lipoproteica - LPL). Os resultados dos PCRs em tempo real das diferenciações osteogênicas estão apresentados na **figura 15**.

Figura 15: Gráficos dos PCRs em tempo real mostrando os níveis de expressão dos genes osteopontina e colágeno 1A1 em linhagens celulares de pacientes com S. de Apert e de controles antes e após a diferenciação osteogênica *in vitro*. As barras “Cont t.0” e “Apert t.0” refletem o nível de expressão destes genes nas células de controles e de pacientes com S. de Apert antes da indução osteogênica. As barras “Cont 21d.” e “Apert 21d.” mostram a expressão destes genes após 21 dias de diferenciação osteogênica.

Como podemos verificar nos gráficos, os genes medidos neste experimento mostraram aumento significativo de sua expressão tanto nas células de pacientes quando de controles, após serem submetidas à diferenciação osteogênica. Ao compararmos estes gráficos aos dados da **figura 13** percebemos que, no caso das células controles, o tratamento com meio de indução osteogênica foi suficiente para ativar estes genes, mas não para levar a secreção de matriz de cálcio, diferentemente do comportamento das células dos pacientes. Outros genes associados ao processo de diferenciação osteogênica e o restante do transcriptoma destas células sob estas condições não foram analisados.

Com relação aos PCRs em tempo real das diferenciações adipogênicas, não podemos apresentar gráficos com intensidades relativas de expressão, uma vez que a expressão de LPL no momento inicial (células não tratadas) é zero. Ressaltado isto,

os experimentos de PCR em tempo real confirmaram a expressão deste gene nas células Apert 1, 2 e 3 após 21 dias de tratamento com meio adipogênico, o que não aconteceu com os controles. As curvas de amplificação de triplicatas técnicas para uma destas amostras de paciente com S. de Apert comparadas às células controles são mostradas na **figura 16**.

Figura 16: As setas pretas apontam as curvas sigmoidais de amplificação e as curvas de dissociação de triplicatas técnicas de uma amostra de RNA de paciente com S. de Apert. As setas vermelhas apontam o perfil equivalente a estas curvas nas amostras de RNA de triplicatas técnicas de um controle.

→ Análise do perfil de expressão de células fibroblastóides de periósteo coronal de portadores de S. de Apert

Para testarmos a hipótese de que há um perfil diferencial de expressão gênica associado à presença da mutação p.Ser252Trp em FGFR2, o que delinearía a base molecular e transcricional para o comportamento alterado das células mutantes, realizamos experimentos de microarrays de expressão usando amostras de RNA de 7 pacientes acometidos pela S. de Apert e de 7 controles, pareados com relação ao sexo e à idade, e lâminas CodeLink de 20K e de 55K.

Uma vez que usamos dois tipos de lâminas diferentes, com diâmetros e densidade de “spots” diferentes, testamos a reprodutibilidade dos experimentos ao compararmos pareadamente, pelo índice de correlação de Pearson, hibridizações em lâminas de 20K e de 55K de RNA mensageiro de 2 linhagens celulares de pacientes com S. de Apert e de 1 controle. Os valores de intensidade das sondas das duas lâminas foram altamente correlacionados entre as replicatas (correlação média de Pearson = 0.95 ± 0.01) entre os três conjuntos de hibridizações. Isto mostra que as intensidades de sinais medidas nas duas lâminas podem ser comparáveis sem perda significativa de acuidade. Este valor é superior ao valor médio de correlação nas análises pareadas para as 14 diferentes amostras, de 0.83 ± 0.07 .

De 19.683 transcritos interrogados nas lâminas, encontramos 9.543 expressos em ao menos 6 das 7 amostras de pacientes com S. de Apert ou 6 das 7 amostras de indivíduos controles. Encontramos 263 transcritos com expressão média significativamente alterada em amostras mutadas, quando comparadas às amostras controles (118 transcritos superexpressos e 145 transcritos subexpressos), com $SNR \geq |0.4|$ e $P \leq 0.05$ (**figura 17, tabela 4**).

Ao submetermos estes transcritos ao *KEGG Pathways Database*, ao *the Gene Ontology database (AmiGO)* e ao banco de dados *Gene*, do NCBI, encontramos 186 com funções conhecidas ou inferidas.

Dentre eles, 98 transcritos puderam ser agrupados nas seguintes categorias: regulação positiva de proliferação celular (28), regulação negativa de proliferação celular (8), metabolismo de nucleotídeos (10), regulação de expressão gênica (32), apoptose (17), adesão celular (13), componente ou biogênese de matriz extracelular

(7), via MAPK (16) – **figura 18**. Alguns genes pertencem a mais de uma categoria funcional e selecionamos estas categorias uma vez que contem as maiores quantidades de genes e já haviam sido associadas à sinalização por FGFR2.

Figura 18: Gráfico da distribuição percentual dos 98 genes em categorias funcionais, classificados a partir dos bancos de dados *KEGG Pathways Database*, *the Gene Ontology database (AmiGO)* e *Gene*, do NCBI.

A partir destas análises percebemos que as classes mais abundantes de transcritos são associadas à regulação de proliferação celular e à regulação de expressão gênica. Além disso, dentre os 98 genes classificados funcionalmente, 45 mostraram-se superexpressos e 53 subexpressos. Entre os genes superexpressos, a maior parte pertence à categoria “regulação positiva de proliferação celular” e “metabolismo de nucleotídeos” (64,4 %). Com o intuito de aumentarmos a significância estatística das análises e de identificarmos os marcadores mais robustos associados a esta assinatura de expressão, fizemos uma análise estatística com o uso do método *leave-one-out*. Dos 263 genes encontrados na análise anterior, 120 genes

foram identificados em pelo menos 50% das planilhas de dados *leave-one-out* e 25 genes estiveram presentes em todas as planilhas. Deste último grupo de genes, mais significativo, 2 deles estão associados a sinalização mediada por fosfoinositol (*P2RY6* e *PIK3C3B*) e 2 a síntese protéica (*EEF1B2* e *ChGn*).

→ **Validação dos dados de microarrays por PCR em tempo real**

Para a validação dos dados dos experimentos de microarrays selecionamos 6 transcritos superexpressos em células de pacientes com S. de Apert, sendo *STMN1* e *SPAG5* associados a proliferação celular, *RRM2* associado à proliferação celular e metabolismo de nucleotídeos, *HIP2* relacionado a supressão de apoptose e regulação de expressão gênica, *CENPN* associado à constituição centromérica e *EEF1B2* relacionado à tradução. Esta seleção foi feita ao acaso, para evitarmos qualquer viés. Todos esses genes mostraram-se superexpressos nas células provenientes de pacientes com S. de Apert, corroborando os dados dos microarrays (**figura 19**).

Figura 19: Resultado de PCR em tempo real mostrando a expressão relativa de 6 genes identificados como superexpressos em células de pacientes com S. de Apert pela análise de microarrays: *STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN* e *EEF1B2*. O valor de expressão destes genes está aumentado nas amostras de pacientes com S. de Apert quando comparados às amostras controles.

→ Tratamento de células controles com FGF2 exógeno

Conduzimos experimentos de estimulação de células controles com FGF2 exógeno com o intuito de confirmarmos os dados dos microarrays de expressão por meio de uma estratégia independente, mimetizando o aumento da sinalização de FGFR2 causada tipicamente pela mutação p.Ser252Trp. Culturas de células controles foram tratadas com concentração alta de FGF2 (36 ng/mL ou 2000 pM) com o intuito de simularmos o status de fosforilação de FGFR2IIIc portador da mutação. Já está estabelecido na literatura que 2000 pM de FGF2 é uma concentração suficientemente alta para tornar similar as fosforilações de FGFR2IIIc

mutantes e controles (Yu, Herr *et al.*, 2000). Por PCR em tempo real, medimos a expressão dos seis genes usados previamente para a validação dos dados de microarrays e observamos que a super-ativação de FGFR2 de células controles pelo tratamento com FGF2 superexpressou estes genes. Somente após 24 horas de tratamento pudermos verificar este efeito (**figura 20**).

Figura 20: Resultado de PCR em tempo real mostrando os níveis de expressão para os 6 genes testados (*STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN* e *EEF1B2*) em resposta ao tratamento com FGF2 exógeno. As barras refletem os níveis de expressão de cada gene antes da administração de 0,5% SFB ou de 0,5% de SFB + FGF2 (0hs), após 24 horas da administração de 0,5% SFB ou de 0,5% de SFB + FGF2.

→ **Potencial de ossificação de defeitos críticos calvariais em ratos**

Wistar

Desenhamos o experimento de padronização de forma a verificarmos se existe capacidade de ossificação e diferença na formação de osso novo em defeitos cranianos críticos contendo apenas membrana de colágeno, a depender da idade do animal utilizado (60 dias e 8 meses) e do tempo decorrido após a cirurgia (1 mês e 3 meses). Fizemos a avaliação do processo de regeneração óssea dos defeitos cranianos críticos dos dois grupos de animais que constituíram o experimento de padronização por análise histológica.

Como mostrado na **figura 21**, não obtivemos formação completa de osso e fechamento do defeito crítico em nenhum dos grupos experimentais para o ensaio de padronização. A **figura 22** mostra em detalhes, em aumento maior, a região do defeito cirúrgico em um dos animais.

Grupo 1 - Animal de 2 meses

Grupo 1 - Animal de 8 meses

Grupo 2 - Animal de 2 meses

Grupo 2 - Animal de 8 meses

Figura 21: Cortes histológicos (marcação com HE) de cotos laterais do osso dos animais. As setas indicam a região entre o osso do animal (região rósea) e a membrana de colágeno (região roxa). Os animais do grupo 1 foram mortos depois de 1 mês da data da cirurgia e os animais do grupo 2 foram mortos após 3 meses.

Figura 22: Pudemos ver em todos os animais a região do defeito cirúrgico preenchida por tecido conjuntivo denso com moderado a escasso infiltrado inflamatório mononuclear, vasos neoformados e fibroblastos jovens. Nesta aproximação podemos ainda notar os remanescentes da membrana de colágeno utilizada, além de macrófagos e eventuais células gigantes multinucleadas do tipo corpo-estranho.

No experimento em que testamos o potencial *in vivo* das células, avaliamos o processo de regeneração óssea dos defeitos cranianos dos dois grupos de animais (mortos com 15 e 30 dias pós-cirúrgicos) por análise histológica. Os resultados dos cortes histológicos podem ser visualizados nas **figuras 23 e 24**. Como pode ser visto obtivemos início de ossificação ossificação no lado em que implantamos membrana contendo células de pacientes com S. de Apert. Isto não ocorreu no lado em que implantamos membrana infundida com células controles.

Coto lateral esquerdo (40X) - 15 dias

Coto lateral direito (40 X) - 15 dias

Figura 23: Cortes histológicos (marcação com HE) dos cotos lateral esquerdo (com células controles) e lateral direito (com células de pacientes portadores de S. de Apert) do osso de um animal sacrificado após 15 dias do momento da cirurgia. A seta amarela indica a região de interface do osso do animal (região rósea) com a membrana de colágeno (região roxa) no defeito do lado esquerdo. As setas verdes mostram uma porção de osso neoformado no lado direito.

Coto lateral esquerdo (40X) - 30 dias

Coto lateral direito (40X) - 30 dias

Figura 24: Cortes histológicos (marcação com HE) dos cotos lateral esquerdo e lateral direito do osso de um animal sacrificado após 30 dias do momento da cirurgia. A seta amarela indica a região de interface do osso do animal (região rósea) com a membrana de

colágeno (região roxa) no lado esquerdo. As setas verdes mostram uma porção de osso neoformado no lado direito do animal. A seta azul mostra uma região evoluindo para a formação óssea, mas ainda com organização difusa.

→ **Caracterização dos camundongos $Fgfr2^{C342Y/+}$ adultos - marcação dos centros de ossificação por vermelho de alizarina**

Para verificarmos se os animais adultos, cruzados novamente a partir de camundongos machos heterozigotos, apresentavam as mesmas características fenotípicas dos animais descritos em (Eswarakumar, Horowitz *et al.*, 2004; Eswarakumar, Ozcan *et al.*, 2006), fizemos caracterização dos centros de ossificação por vermelho de alizarina. Uma amostra dos resultados das marcações dos crânios e dos membros posteriores dos animais $Fgfr2^{C342Y/+}$ em comparação com os controles estão na **figura 25**. Os animais $Fgfr2^{C342Y/+}$ apresentam características craniofaciais semelhantes às daquelas de humanos afetados pelas síndromes de Crouzon ou de Pfeiffer, com fusão completa de suturas coronais, crânio em formato de dômus, hipoplasia acentuada do terço médio da face, proptose ocular, órbitas rasas e maloclusão de classe III. O tamanho craniano significativamente diminuído quando comparado ao animal selvagem é devido ao comprometimento do terço médio facial. Podemos também observar que os ossos do esqueleto apendicular são iguais aos do indivíduo selvagem e livres de malformações aparentes.

Figura 25: Crânios de indivíduos selvagens e $Fgfr2^{C342Y/+}$ vistos de diferentes ângulos. As cabeças de setas brancas apontam no crânio selvagem para a sutura coronal esquerda e no crânio do animal $Fgfr2^{C342Y/+}$ para a região em que esta sutura sofreu fechamento prematuro. A figura ilustra que os indivíduos $Fgfr2^{C342Y/+}$ não apresentam alterações aparentes nos ossos longos dos membros.

→ Diferenciação osteogênica *in vitro*

Assim como nos experimentos acima descritos conduzidos com células humanas, analisamos se células mesenquimais isoladas a partir de suturas coronais de camundongos $Fgfr2^{C342Y/+}$ apresentam maior potencialidade de diferenciação óssea quando comparadas com células mesenquimais sem essa mutação. Em testes iniciais após induções osteogênica por 21 dias, tanto o grupo de células de animais $Fgfr2^{C342Y/+}$ quanto o grupo de células de animais selvagens diferenciaram plenamente para osteoblastos e osteócitos e a diferença entre estes grupos foi indistinguível. Conduzimos então estas diferenciações por um período menor, de 14 dias. Neste período podemos ver grande diferença entre os grupos, sendo que o grupo de células de animais $Fgfr2^{C342Y/+}$ teve marcações muito mais evidentes de expressão de fosfatase alcalina (**figura 26**) e de formação de matriz de cálcio,

constatada por marcações de vermelho de alizarina (**figura 26**) e de Von Kossa (**figura 27**).

Figura 26: Marcação de fosfatase alcalina, evidenciando maior presença desta proteína em culturas de células provenientes de animais $Fgfr2^{C342Y} / +$ induzidas a diferenciação osteogênica, quando comparadas a células de animais selvagens sob as mesmas condições.

Figura 27: Coloração de vermelho de alizarina mostrando maior presença de depósito de cálcio na matriz extracelular de culturas de células provenientes de animais $Fgfr2^{C342Y} / +$ induzidas a diferenciação osteogênica, quando comparadas a células de animais selvagens sob as mesmas condições.

Figura 28: Coloração de Von Kossa, constatando maior presença de depósito de cálcio na matriz extracelular de culturas de células provenientes de animais $Fgfr2^{C342Y} / +$ induzidas a diferenciação osteogênica, em comparação a células de animais selvagens sob as mesmas condições.

→ Confirmação da expressão gênica e protéica de *Fgfr2* em sutura coronal de animais $Fgfr2^{C342Y} / +$

Neste experimento acessamos a expressão das principais isoformas de genes da família dos FGFRs em RNA isolado diretamente de tecido das suturas coronais de animais mutantes e selvagens e a expressão protéica e nível de fosforilação de FGFR2 em células mesenquimais isoladas a partir de suturas coronais de camundongos $Fgfr2^{C342Y} / +$ e de camundongos selvagens. Estas células, após

estabelecidas em cultura, também mostraram-se aderentes e com morfologia homogênea. Como esperado para tecido de origem mesenquimal, observamos expressões altas de *Fgfrs 1c* e *2c* (isoformas mesenquimais) tanto nas células de camundongos *Fgfr2^{C342Y} / +* quanto nas células controles (**figura 29**). As expressões das isoformas epiteliais *Fgfr1b*, *2b* e *3b*, e de *Fgfr4* são limitrofes. A expressão de *FgfrL1* é baixa neste tecido e a expressão de *Fgfr3c* também é baixa, mas maior do que a da isoforma epitelial *Fgfr3b*. Verificamos a presença e o nível de fosforilação da proteína *Fgfr2* por western blotting (**figura 30**). Podemos visualizar a presença de *Fgfr2* em concentrações similares tanto nos controles (não-tratados e tratados com *Fgf1* exógeno) quanto nas células de animais *Fgfr2^{C342Y} / +*. Notamos fosforilação (ativação) de *Fgfr2* nas células selvagens apenas quando estimuladas por *Fgf1* exógeno, enquanto nas células dos animais *Fgfr2^{C342Y} / +* a fosforilação é constitutiva.

Figura 29: Resultado do experimento de PCR em tempo real mostrando, em tecido de suturas coronais de animais selvagens e de animais *Fgfr2^{C342Y} / +*, alta expressão de *Fgfrs1c* e *2c*, baixa expressão de *Fgfrs3c* e de *FgfrL1* e expressões limitrofes de *Fgfrs1b*, *2b*, *3b* e *4*.

→ **Perfil de expressão gênica de tecido das suturas coronais de animais Fgfr2^{C342Y} / +**

Com o objetivo de verificar se existe um perfil diferencial de expressão gênica em células mesenquimais do tecido das suturas coronais de camundongos portadores da mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2, conduzimos experimentos de microarrays de expressão usando amostras de RNA de 3 animais selvagens e de 3 animais Fgfr2^{C342Y} / +.

Dos 45.281 transcritos presentes na lâmina “Illumina Single Color Mouse WG”, 39.009 tiveram sinais acima ou marginais ao ruído de fundo e foram usados nas comparações. Para acessarmos a homogeneidade destes experimentos, rodamos análise de componente principal (PCA) comparando os dados destas hibridizações com dados externos a este estudo e previamente gerados de hibridizações de RNAs provenientes de células de mesênquima e de epitélio de glândulas salivares submandibulares de camundongos CD1 controles. O gráfico está mostrado na **figura 31**. Esta análise mostrou relativa homogeneidade na expressão gênica global dos dois grupos de amostras de tecido de suturas coronais quando comparadas às expressões dos outros grupos. Isto provavelmente ocorreu uma vez que trabalhamos com precisamente o mesmo tecido de diferentes indivíduos e o único fator distintivo destes dois grupos é a mutação p.Cys342Tyr em *Fgfr2* em um dos grupos de animais.

A partir da lista de 39.009 transcritos, geramos três sublistas: uma sublista de genes diferencialmente expressos com base no teste t de Student ($P \leq 0.05$) e Fold Change ≥ 1.5 , contendo 188 genes (91 superexpressos e 97 subexpressos – **figura 32, tabela 5**), e outras duas após filtrarmos para transcritos com coeficiente de variação $< 50\%$ em pelo menos uma das condições. Aplicamos então teste t de Student com $P \leq 0.05$ e correção de Benjamini-Hochberg e derivamos uma lista de 488 genes com Fold Change ≥ 1.2 e outra mais restrita, de 31 genes com Fold Change ≥ 1.5 (**figuras 33 e 34, tabela 6**).

Figura 31: Gráfico tridimensional da análise de componente principal (PCA) com o uso dos 3 primeiros componentes (PCA1 no eixo das ordenadas, PCA2 no eixo das abcissas e PCA3 no eixo das cotas). O gráfico mostra relativa homogeneidade na expressão gênica global dos grupos de amostras provenientes de tecidos de suturas coronais, circutados em roxo, quando comparadas aos outros grupos.

Figura 32: Agrupamento hierárquico construído para as entidades (transcritos) e para as condições (mutante X selvagem), mostrando 188 genes diferencialmente expressos. Aplicamos regra de ligação centróide e distância métrica euclidiana. Os genes estão representados nas linhas e as amostras, agrupadas, nas colunas. O nível de expressão de cada gene está representado pelo número de desvios padrões acima (vermelho) ou abaixo (azul) do valor da média de expressão do gene em questão para todas as amostras. A intensidade das cores é proporcional ao número de desvios padrões no intervalo -0,5 a 0,5.

Figura 33: Agrupamento hierárquico construído para as entidades (transcritos) e para as condições (mutante X selvagem), mostrando 488 genes diferencialmente expressos. Aplicamos também regra de ligação centróide e distância métrica euclidiana. O nível de expressão de cada gene está representado pelo número de desvios padrões acima (vermelho) ou abaixo (azul) do valor da média de expressão do gene em questão para todas as amostras. A intensidade das cores é proporcional ao número de desvios padrões no intervalo -0,7 a 0,7.

Figura 34: Agrupamento hierárquico construído para entidades (transcritos) e para condições (mutante X selvagem), contendo 31 genes diferencialmente expressos. Regra de ligação centróide e distância métrica euclidiana foram aplicadas. Os genes estão representados nas linhas e as amostras nas colunas. O nível de expressão de cada gene está representado pelo número de desvios padrões acima (vermelho) ou abaixo (azul) do valor da média de expressão do gene em questão para todas as amostras. A intensidade das cores é proporcional ao número de desvios padrões no intervalo -0,7 a 0,7.

Para testarmos a robustez destas listas aplicamos modelo lógico de predição com base em algoritmo de árvore de decisão (com validações do tipo N-fold e leave-one-out) e algoritmo Nãive Bayes (com validação do tipo N-fold). As amostras puderam ser previstas pertencentes às suas categorias reais em 100% das vezes em todos os testes envolvendo as listas de 31 genes e de 488 genes, enquanto que para a de 188 genes as amostras são previstas corretamente em 100% dos casos apenas pelo

algoritmo Nive Bayes. Alm disso, ao cruzarmos estas trs listas em diagrama de Venn, a lista de 31 genes est precisamente na interseco das outras duas (figura 35).

Ao usarmos o programa DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) para lista de 188 genes (91 superexpressos e 97 subexpressos), pudemos associar 144 deles a categorias do Gene Ontology. As categorias “componente celular, biognese e organizao” (39 transcritos), “ligao protica” (67 transcritos) e “diferenciao celular” (21 transcritos) foram as mais significativas. Pela classificao do banco de dados Swiss Prot, 44 transcritos podem ser associados ao grupo “fosfoprotenas”. Ao interpretarmos esta lista de transcritos com o uso do programa “Ingenuity Pathway Analysis” (IPA) as categorias mais relevantes foram “funo e manuteno celular” (24 transcritos) e

“desenvolvimento, crescimento e proliferação celular” (15 transcritos). Dentro desta última categoria apenas 2 genes (*ElavlL2* e *Gria2*) estão subexpressos. Outra categoria que se destacou como enriquecida foi “sinalização célula-célula” (16 transcritos). 17 transcritos desta lista foram associados a doenças genéticas.

Os programas DAVID e Ingenuity Pathway Analysis puderam classificar 381 dos 488 genes (183 superexpressos e 305 subexpressos) da segunda lista em categorias conhecidas do Gene Ontology. Pelo Swiss Prot 106 transcritos foram associados à categoria “fosfoproteínas”. As categorias mais enriquecidas foram “proliferação, crescimento e ciclo celular” (69 transcritos) e “resposta imune mediada por células” (50 transcritos). Outras funções celulares e moleculares enriquecidas foram “ciclo celular” (37 transcritos), “sinalização célula-célula” (28 transcritos). 12 transcritos foram associados a desenvolvimento de sistemas esquelético e muscular.

Dos 31 transcritos (11 superexpressos e 20 subexpressos) diferencialmente expressos da terceira lista, pudemos classificar 28 em categorias conhecidas do Gene Ontology pelos programas DAVID e IPA. Processos e vias de maior destaque foram ligação protéica (17 transcritos), “homodimerização e dimerização proteica” (6 transcritos) e “sinalização por receptor Wnt” (3 transcritos). Vias associadas a desenvolvimento celular (14 transcritos), função e manutenção celular (9 transcritos), ciclo celular (4 transcritos), morfologia celular (9 transcritos) e sinalização célula-célula (3 transcritos) se destacaram na análise com o programa IPA. Os genes *Pitx2*, já mencionado, e *Sox6*, ambos subexpressos nas amostras mutantes, estão associados a doenças esqueléticas.

Discussão e conclusões

Mesmo com estudos publicados mostrando a importância do periósteo no processo normal de ossificação das suturas cranianas, a possível contribuição de células com mutação em *FGFR2* de periósteo craniano de pacientes com S. de Apert ainda era desconhecida. Mostramos pela primeira vez com este trabalho um potencial de diferenciação osteogênica bastante aumentado de células fibroblastóides de periósteo craniano heterozigotas para a mutação p.Ser252Trp em *FGFR2* quando comparadas ao mesmo tipo de células mas de indivíduos livres desta mutação e com o programa de fusão das suturas cranianas preservado. Estas células dos pacientes também apresentam potencial adipogênico aumentado, quando comparadas a células de indivíduos controles, o que aponta para uma plasticidade celular aumentada, em virtude da mutação.

Procuramos atestar este maior potencial de ossificação de células fibroblastóides portadoras desta mutação em um modelo *in vivo*. Para isso, utilizamos um modelo de defeitos críticos calvariais em ratos que fora usado por nosso grupo em um estudo paralelo, que teve o intuito de testar o potencial osteogênico *in vivo* de células-tronco mesenquimais proveniente de polpa dentária humana (De Mendonca Costa, Bueno *et al.*, 2008). Este ensaio preliminar sugeriu que as células expressando *FGFR2* mutado apresentam potencial osteogênico *in vivo* aumentado, confirmando os resultados *in vitro*. Para comprovarmos estes resultados, iremos verificar a reproducibilidade destes experimentos bem como acompanhar os animais por um tempo maior após o transplante celular.

Com a intenção de delinear os mecanismos moleculares por detrás deste comportamento celular anormal, conduzimos experimentos de microarrays de expressão gênica e demonstramos a existência de um perfil de expressão diferencial estatisticamente significativo associado às células que carregam esta mutação. Apesar do tamanho de nossa amostra contrastar com o tamanho de amostras usadas em estudos de doenças complexas e poligênicas, tais como câncer, doenças cardíacas ou doenças psiquiátricas e de desenvolvimento cognitivo, que no geral são etiologicamente bastante heterogêneas e que implicam no uso de um número amostral muitíssimo elevado.

No momento da publicação de Fanganiello *et al*, 2007, este estudo teve o maior número amostral até então usado para a investigação de assinatura de expressão de uma doença mendeliana rara com mecanismo de ganho de função e, em específico, para investigação de alterações transcricionais em tecido/células de pacientes portadores de craniossinostoses. Este estudo também é pioneiro quanto ao delineamento do perfil global de expressão gênica de tecido de suturas coronais do modelo animal murino para Síndromes de Crouzon / Pfeiffer, com mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2.

Atribuímos o sucesso da detecção de assinaturas de expressão associada aos nossos experimentos com células de pacientes e com tecidos murinos à homogeneidade molecular e fenotípica dos indivíduos. Todos os indivíduos, em cada experimento, são portadores de uma mesma mutação em um receptor do tipo tirosino-quinase com funções fundamentais em vias de sinalização associadas a processos críticos de desenvolvimento, além da enorme homogeneidade fenotípica, tanto dos pacientes portadores de S. de Apert quanto dos animais portadores de características fenotípicas semelhantes àsquelas presentes nos pacientes com S. de

Crouzon / Pfeiffer, principalmente quando comparados a outras craniossinostoses. É provável que estudos análogos a este, com doenças monogênicas e padrões mendelianos de herança, porém envolvendo mutações que comprometam proteínas menos dinâmicas (como proteínas de citoesqueleto) não tenham o mesmo sucesso.

Em Lemonnier *et al*, 2000, foi reportada a indução de uma grande repressão nos valores de expressão proteica de FGFR2 associada à mutação p.Ser252Trp em osteoblastos, o que foi atribuído a uma internalização aumentada destes receptores (Lemonnier, Delannoy *et al.*, 2000). Em contra-partida, aparentemente estas células periosteais têm um perfil diferente de expressão de FGFR2, uma vez que quantidades similares de transcritos foram verificados pelos experimentos de microarrays.

No estudo de perfil de expressão envolvendo células humanas usamos 2 sistemas de lâminas diferentes e, embora tenhamos conduzido experimentos para testarmos a reprodutibilidade dos 2 sistemas por hibridizações controles avaliadas pelo índice de correlação de Pearson, achamos necessário confirmar extensivamente a validade deste perfil. Confirmações independentes das alterações no perfil de expressão gênica das células de pacientes com S. de Apert em comparação com as células de indivíduos normais identificadas pelo nosso estudo de microarrays vieram de três estratégias distintas. Inicialmente usamos PCR em tempo real visando confirmar a superexpressão de seis dos genes identificados a partir dos dados de microarrays (*STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN* e *EEF1B2*) em células de pacientes com S. de Apert. Como segunda abordagem, usamos células fibroblastóides derivadas de periósteo controle tratadas com altas concentrações de FGF2 exógeno (um ligante específico de FGFR2IIIc) almejando mimetizar os elevados níveis de ativação do FGFR2 portador da mutação. Neste experimento

observamos, por PCR em tempo real, superexpressão destes mesmos seis genes associados ao perfil de expressão diferencial das células de pacientes com S. de Apert. Curiosamente, somente fomos capazes de observar alterações significativas nos níveis de expressão destes genes após 24 horas de tratamento com FGF2, o que sugere que esta superexpressão é um evento tardio decorrente da ativação excessiva de FGFR2. Outra inferência importante que podemos fazer é que os genes diferencialmente expressos nas células de pacientes com S. de Apert estão envolvidos direta ou indiretamente com a sinalização por FGFR2IIIc, uma vez que pudemos mimetizar os efeitos celulares da mutação superativando o receptor selvagem. É importante também ressaltarmos que esta estratégia nos permitiu replicar parte dos dados dos microarrays num sistema diferente, biologicamente análogo. De fato, Mansukhani *et al*, 2005 reportou que expressão de genes associados a osteoblastos murinos portadores da mutação p.Ser252Trp em *Fgfr2* podem ser reproduzidos por tratamento com Fgfs exógeno (Mansukhani, Ambrosetti *et al.*, 2005). Estes resultados também sugerem que FGFR2 mutado pode superativar as vias moleculares normais desencadeadas pelos receptores selvagens em vez de induzirem novas vias moleculares.

Como terceira abordagem independente usada para validarmos nossos resultados de microarrays, procuramos transcritos diferencialmente expressos de genes sabidamente envolvidos nas vias canônicas de sinalização de FGFRs. Como discutido adiante, o gene *PIK3C2B*, que codifica uma proteína da família das PI3K (fosfoinositol-3-quinase), teve expressão diferencial, além de vários membros da cascata de MAPK. Uma das vias de sinalização mais importantes que levam à ativação da via das MAPK é a cascata hierárquica FGFR – PI3K. Também observamos perfis diferenciais de expressão associados a outros genes vinculados à

ativação de FGFR2, tais como *FLRT2*, um regulador positivo da cascata de FGFR, e *MITF*, um fator de transcrição agindo subsequentemente à via FGFR / MEK / ERK. Dessa forma estes resultados vão de acordo com a hipótese de que as alterações de expressão associadas às células de pacientes com S. de Apert representam um estado biológico causado pela mutação p.Ser252Trp em FGFR2. De fato, quando esta lista foi submetida à classificação pelo banco de dados de funções protéicas do *Swiss Prot*, 25% dos transcritos diferencialmente expressos são incluídos na categoria “fosfoproteínas”.

A maior parte dos genes diferencialmente expressos nas células de pacientes com S. de Apert estão associados a regulação de proliferação celular e a metabolismo de nucleotídeos, o que sugere que a ativação de FGFR2 pela mutação p.Ser252Trp induz aumento do potencial de proliferação de células periosteais. Além disso, uma proliferação aumentada de células de pacientes com S. de Apert quando comparadas a células controles é claramente evidente durante os procedimentos de expansão destas células *in vitro*. Efetivamente, em Yeh et al, 2009 (manuscrito em preparação), constatamos que células fibroblastóides portadoras da mutação p.Ser252Trp em FGFR2 apresentam potencial de proliferação significativamente aumentado quando comparadas a células fibroblastóides controles sob as mesmas condições.

É conhecido por dados da literatura que a sinalização por FGFR – MAPK deflagra proliferação de células fibroblastóides. Entretanto, observamos subexpressão de vários membros da cascata de sinalização por MAPK (13 de 16 transcritos), assim como de *PIK3C2B* nas células de portadores de S. de Apert. Devemos destacar que entre estes 3 genes superexpressos encontramos o *DUSP2*,

associado a inibição da cascata de MAPK por desfosforilação de MAPKs ativadas. Interessantemente, a subexpressão de *PI3K* e da cascata de MAPK estão sendo recentemente associadas à ativação de diferenciação de células-tronco (Takahashi, Murakami *et al.*, 2005; Armstrong, Hughes *et al.*, 2006). Sendo assim, é possível que estas células mutantes expressando *FGFR2* sejam mais facilmente diferenciadas para linhagens osteoblásticas quando estimuladas, devido à menor expressão de transcritos associados à via de sinalização por PI3K – MAPK. Entretanto, temos que ressaltar que mais experimentos envolvendo a medição dos níveis de transcritos e de proteínas associados à via PI3K – MAPK em células mutantes expressando *FGFR2* são muito importantes para que se confirme esta subexpressão e a associação desta via de sinalização com a patofisiologia da S. de Apert. De fato, atestamos potencial de diferenciação extremamente aumentado destas células fibroblastóides heterozigotas para a mutação p.Ser252Trp em *FGFR2*, quando induzidas a diferenciação celular *in vitro*.

Encontramos também subexpressão em células de portadores de S. de Apert de transcritos de genes que codificam proteínas de adesão celular (11 de 13 transcritos) e composição de matriz extracelular (5 de 7 transcritos), o que contrasta com dados de um estudo prévio que mostrou que células de periósteo de pacientes com S. de Apert sintetiza maior quantidade de componentes de matriz extracelular (incluindo glicosaminoglicanos, colágenos tipos I e III e fibronectina) (Bodo, M., Carinci, P. *et al.*, 1997). Dessa forma, seria importante testar se a redução na expressão destes transcritos associados a adesão celular e a composição de matriz extracelular estão associados ao maior potencial osteogênico ou a um possível potencial migratório aumentado nestas células portadoras da mutação p.Ser252Trp em *FGFR2*.

Como sabemos, o número de transcritos com expressão significativamente diferente (263, com $P \leq 0.05$) não excede o número esperado ao acaso de genes diferencialmente expressos nestas interpretações para este intervalo de confiança. Entretanto, se levarmos em conta a lista de 120 transcritos identificados como diferencialmente expressos em pelo menos 50% das análises *leave-one-out* não observamos grande diferença entre a distribuição de genes super e subexpressos entre as categorias funcionais previamente descritas e discutidas para os 263 transcritos. A única exceção ocorre para os genes associados a apoptose, com uma tendência para o aumento da proporção de genes subexpressos nas células de portadores de S. de Apert quando comparados às células de indivíduos normais. Sendo assim estes resultados confirmam que as classes mais abundantes de genes superexpressos em células com a mutação p.Ser252Trp são aqueles associados a regulação positiva de proliferação celular e metabolismo de nucleotídeos, enquanto os genes pertencentes a todas as outras categorias estão principalmente subexpressos nestas células.

Foi reportado que sob condições de diferenciação osteogênica, osteoblastos calvariais de camundongos heterozigotos para a mutação p.Ser252Trp em *Fgfr2* mostraram aumento de apoptose (Mansukhani, Bellosta *et al.*, 2000; Chen, Li *et al.*, 2003; Mansukhani, Ambrosetti *et al.*, 2005). Entretanto, encontramos uma inclinação à subexpressão de genes associados à apoptose entre células de pacientes com S. de Apert e células controles na lista de 120 genes referida acima. Além disso, não observamos morte celular significativa nestes dois grupos de culturas celulares primárias.

Um estudo prévio reportou experimento de delineamento de perfil de expressão empregando células periosteais de um paciente portador de S. de Apert

(mutação p.Pro253Arg em FGFR2), de dois pacientes portadores de S. de Crouzon (mutação p.Gly338Arg em FGFR2 e mutação desconhecida) e de dois controles normais, com o uso de uma plataforma de cDNAs de 19.000 transcritos (Carinci, Bodo *et al.*, 2002). Não observamos correlação entre a lista de genes identificados naquele estudo e o grupo de 263 genes identificados neste. Acreditamos que o número muito reduzido de amostras analisadas naquele estudo (apenas 1 amostra de paciente com S. de Apert, 2 amostras de pacientes com S. de Crouzon e 2 controles) introduziu um considerável viés em virtude de variações individuais na expressão dos genes.

Em momentos posteriores foram publicados mais 2 artigos (Coussens, Wilkinson *et al.*, 2007; Bochukova, Soneji *et al.*, 2009) investigando perfil de expressão gênica em craniossinostoses síndrômicas. Coussens *et al.*, 2007, investigou este perfil em amostras de tecidos provenientes de suturas cranianas fusionadas, não fusionadas e durante o processo de fusão de cinco pacientes (S. de Apert com mutação p.Ser252Trp em FGFR2, 3 sinostoses sagitais e 1 sinostose unicoronal sem causas moleculares determinadas), com o uso de lâminas da plataforma Affymetrix. Bochukova *et al.*, 2009, estudou o padrão de expressão gênico em fibroblastos isolados a partir de epiderme de 10 indivíduos com S. de Apert (mutação p.Ser252Trp em FGFR2), 10 portadores de S. de Muenke (mutação p.Pro250Arg em FGFR3), 10 portadores de S. de Saethre-Chotzen (diferentes mutações em *TWIST1*) e o grupo controle foi constituído por 10 indivíduos com craniossinostose sagital não-sindrômica (sem causa molecular determinada).

Como ressaltado em Bochukova et al, 2009, quando cruzamos as listas de genes diferencialmente expressos destes três estudos com o nosso não há nenhum gene em comum. Estas divergências, assim como discrepâncias que surgem quando

comparamos os transcritos de diversos estudos de expressão são provavelmente atribuídas a diferenças nos organismos utilizados, nos modelos experimentais empregados, nas fontes e nos tipos de células / tecidos usados, nas plataformas de expressão adotadas e nos tipos de comparação realizados. Em (Bochukova, Soneji *et al.*, 2009) foi reportada inconsistência nos transcritos do perfil de expressão encontrado quando apenas alteraram as condições do lote do soro fetal bovino empregado para o crescimento das células em cultura. Assim sendo, algo importante é que o perfil de expressão descrito em estudos análogos aponte alterações de comportamento celular / molecular concordantes e que possam ser testadas experimentalmente.

Para a mineração de dados dos experimentos envolvendo delineamento e estudo de perfil de expressão em tecido de suturas coronais de camundongos portadores da mutação p.Cys342Tyr em *Fgfr2*, geramos três listas de genes diferencialmente expressos variando parâmetros de rigor de correção estatística, de filtro baseado em coeficiente de variação e de limiares de Fold Change, para extrairmos o máximo possível deste experimento. Coincidentemente à análise do experimento com células humanas, 44 (23,4%) dos 188 genes da primeira lista e 106 (21,7%) dos 488 genes da segunda lista foram classificados como fosfoproteínas quando submetidos ao banco de dados do *Swiss Prot*.

Além disso, uma dos processos celulares apontados pelo programa DAVID como enriquecido a partir da lista de 188 genes diferencialmente expressos no experimento com tecidos animais é a de diferenciação celular. Dentre os mais importantes temos superexpressão de *Bglap1*, *Bglap2*, *Bglaprs*, *Csflr*, *Junb* e *Picalm* e subexpressão de *Dusp16* e de *Bmpr*. Em consonância com isto, células mesenquimais isoladas a partir de suturas coronais dos camundongos portadores da

mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2 apresentaram maior potencial de diferenciação osteogênica quando comparadas com células de animais selvagens sob as mesmas condições. Processos biológicos ou funções moleculares identificadas pelo programa DAVID como enriquecidos a partir dos genes das três diferentes listas que podem estar associados a este maior potencial foram: “componente, biogênese e organização celular” (lista de 188 transcritos), “função e manutenção celular” (lista de 188 transcritos), “proliferação, crescimento e ciclo celular” (lista de 488 transcritos), ligação protéica (listas de 188 e de 31 transcritos), “ciclo celular” (listas de 488 e de 31 transcritos), “homodimerização e dimerização protéica” (lista de 31 transcritos), sinalização célula-célula (três listas - 188, 488 e 31 transcritos) e sinalização por receptor Wnt (lista de 31 transcritos).

“Comunicação célula-célula e transdução de sinal” foi a categoria mais significativamente enriquecida quando os genes diferencialmente expressos de Bochukova *et al*, 2009 foram submetidos à mesma análise pelo programa DAVID. Não há nenhum transcrito idêntico entre nossas listas e o subgrupo de transcritos apresentados em Bochukova *et al*, 2009 associados a esta categoria, mas existe sobreposição substancial de genes de mesmas famílias: Bochukova *et al*, 2009 reportou superexpressão de *IL15* e subexpressão de *DDX17*, *HMGA2*, *ITGA2* e *ITGA6* enquanto encontramos superexpressão de *Il12a*, *Il15* e *Il18bp* e subexpressão de *Ddx6*, *Ddx20* e *Ddx26*, *Hmgn1* e *Itgae*. Bochukova *et al*, 2009 também reportou superexpressão de *STMN2* e subexpressão de *MT1E* e encontramos comportamento oposto e significativamente diferentes para *Stmn2* e *Stmn3* (subexpressos) e *MT1* (superexpresso).

Com relação à categoria “sinalização por receptor Wnt”, encontramos os genes *Wnt10a*, *Tgf β 1i1* e *Pitx2*, sendo apenas *Tgf β 1i1* superexpresso. Isto está consistente com dados recentes que indicam que a ativação de via canônica de Wnt é importante para expansão e diferenciação osteoblástica, mas esta sinalização precisa ser interrompida para a diferenciação osteoblástica completa (Vaes, Dechering *et al.*, 2005; Krishnan, Bryant *et al.*, 2006). Uma quantidade grande de transcritos associados à via Wnt foi encontrada em Coussens *et al.*, 2007 quando foi comparado perfil de expressão de suturas fusionadas com suturas abertas.

Uma outra das categorias funcionais identificadas como mais enriquecida na lista de 488 genes é a de “resposta imune mediada por células”. Isto pode refletir formação de medula óssea na matriz do osso fundido ou então a fusão prematura da sutura coronal pode estar funcionalmente associada a resposta imune a infecção, direta ou indiretamente, uma vez que já foi mostrado que várias citocinas imunoregulatórias influenciam na homeostase óssea e que pode haver uma facilitação de resposta imune mediada por osteoblastos por produção de moléculas imunoregulatórias (Marriott, 2004; Marriott, Gray *et al.*, 2004; Walsh, Kim *et al.*, 2006). Coussens *et al.*, 2007 também encontrou superexpressão de genes associados a resposta imune e o mesmo grupo reportou em estudo posterior superexpressão de transcritos de resposta imune quando compararam tecido de suturas fundidas e explantes celulares desdiferenciados (Coussens, Hughes *et al.*, 2008).

Dentre os transcritos diferencialmente expressos associados a doenças genéticas da lista de 188 transcritos damos destaque a *Gabrb3* e *Gad1* (ambos subexpressos). *Gabrb3* (Receptor GABA tipo A β 3) tem função fundamental em desenvolvimento embrionário facial e palatal, sendo que sua expressão muda

dramaticamente durante a palatogênese (Brown, Knott *et al.*, 2003) e *Gad1* é uma enzima chave na síntese de *Gabrb3*. Animais *knockout* para *Gabrb3* apresentam fenda palatina (Culiat, Stubbs *et al.*, 1995; Hagiwara, Katarova *et al.*, 2003) e polimorfismos neste gene já foram associados a fissuras e fendas palatinas em humanos (Scapoli, Martinelli *et al.*, 2002; Inoue, Kayano *et al.*, 2008). Associados a processos esqueléticos e musculares de camundongos temos os genes *Csf1r*, *Fos*, *Gabrb3*, *Mapt* e *Syt4*. Associados a osteoclastogênese e a quantidade de osteoclastos estão os genes *Csf1r*, *Fos*, *Tm7sf4* e *Junb*, todos superexpressos nas amostras mutadas. Além disso, destacamos os genes *Csf1r*, *Hmgn1* e *Tgfb1L1* (sendo o primeiro e o último superexpressos) vinculados a crescimento de fibroblastos.

Dos transcritos associados a desenvolvimento de sistemas esquelético e muscular na lista de 488 genes, destacamos *Nos3* e *Nog* (*Noggin*), associados a quimiotaxia de osteoblastos, quantidade de unidades formadoras de colônias de osteoblastos e a estrutura de ossos trabeculares e corticais, ambos superexpressos em amostras mutadas. Animais *knockout* para *eNos*, uma sintase epitelial de óxido nítrico, apresentaram retardo na formação óssea pós-natal, volume ósseo reduzido e problemas na maturação e na atividade de osteoblastos (Aguirre, Buttery *et al.*, 2001). Além disso, polimorfismos em *Nos3* foram associados a aumento de suscetibilidade a osteomielite em humanos (Asensi, Montes *et al.*, 2007). *Noggin*, uma glicoproteína secretada e antagonista de BMPs, é superexpressa em osteoblastos quando são tratados com BMPs (Gazzerro, Gangji *et al.*, 1998). Os animais *knockouts* homozigotos para *noggin* apresentam problemas no desenvolvimento esquelético e lesões em juntas (Brunet, McMahon *et al.*, 1998; Abe, Yamamoto *et al.*, 2000) e animais superexpressando este gene apresentam volume ósseo trabecular reduzido e função osteoblástica deficiente, o que leva a osteopenia

e fraturas (Devlin, Du *et al.*, 2003). Além disso, mutações em heterozigose em NOGGIN levam a lesões múltiplas de juntas em humanos (Gong, Krakow *et al.*, 1999).

O conjunto dos nossos achados têm implicações importantes para o entendimento da função do periósteo craniano na patogênese da Síndrome de Apert e para o entendimento celular e molecular do processo de fechamento prematuro de suturas coronais do modelo animal portador da mutação p. p.Cys342Tyr em Fgfr2. Os potenciais osteogênicos e proliferativos aumentados observados neste estudo associados às células de pacientes com S. de Apert podem levar a uma expansão de células periosteais com maior potencial de diferenciação, o que poderia contribuir com a ossificação prematura das suturas coronais. O potencial osteogênico aumentado das células mesenquimais dos animais heterozigotos para a mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2 pode também contribuir para a ossificação prematura destas suturas no modelo murino. É importante ressaltarmos que mecanismos similares também já foram discutidos para células osteoblásticas sob super-ativação de FGFR (Mansukhani, Ambrosetti *et al.*, 2005). Injúrias no sítio das suturas, tais como aquelas que induzem os processos de cicatrização e de reparo após a intervenção cirúrgica, poderiam deflagrar este comportamento anormal de células periosteais e levar a aceleração da fusão das suturas após a cirurgia, fenômeno que observamos após a maioria das cirurgias. Além disso, os nossos resultados sugerem pela primeira vez que as células mutantes de periósteo craniano de pacientes com S. de Apert podem desempenhar um papel importante tanto na patogênese desta doença quanto na fusão recorrente de suturas no período pós-cirúrgico.

Recentemente a identificação de mutações no gene *ephrin-B1* associadas a craniossinostoses levou à hipótese de que alterações nas vias celulares ativadas por

estas moléculas podem levar a uma compartimentalização anormal destas células durante a embriogênese, o que acarretaria na formação anormal de junções entre tecidos (Twigg, Kan *et al.*, 2004). Considerando o potencial osteogênico aumentado de células de periósteo de pacientes com S. de Apert e também o fato de que as eferinas foram recentemente associadas a um aumento da ativação de FGFRs (Yokote, Fujita *et al.*, 2005), sugerimos que um mecanismo similar pode contribuir para as craniosinostoses em pacientes com mutações em *FGFRs*, uma vez que os sinais que determinam as identidades dos tecidos das suturas foram perturbados.

Enquanto o painel completo de fatores moleculares que modulam os comportamentos celulares aberrantes ainda precisa ser determinado, este estudo de perfis de expressão contribui para a identificação de novos genes com funções importantes em processos de ossificação de suturas cranianas ou para a identificação de genes candidatos possivelmente associados a craniossinostoses síndrômicas com causas ainda desconhecidas. Particularmente interessante é o achado de que a inativação de *Dusp6*, membro da família de proteínas DUSP (*dual-specificity phosphatases*), sendo normalmente ativado por FGFRs e inibidor de MAPKs, aumentou níveis de fosforilação de ERK e de ERM e levou a nanismo esquelético e a craniossinostose de suturas coronais em camundongos (Li, Scott *et al.*, 2007). Dessa forma, genes da família DUSP devem ser considerados bons candidatos para craniossinostoses associadas a alterações em FGFRs. Como mostramos, encontramos *DUSP2* como um dos genes com maior significância de expressão diferencial em células de pacientes com S. de Apert. Além disso, *Dusp16* está subexpresso na lista de 188 transcritos do estudo de expressão com animais *Fgfr2*^{C342Y / +}.

Dessa forma, os resultados obtidos e mostrados neste estudo nos permitiram:

1) Identificar um comportamento celular alterado e consistente (potencial de diferenciação celular *in vitro* e *in vivo* aumentado) em células fibroblastóides de periósteo craniano coronal de pacientes portadores de S. de Apert (mutação p.Ser252Trp em FGFR2, levando a maior ativação deste receptor) e em células mesenquimais de suturas coronais do modelo animal para S. de Crouzon e Pfeiffer (mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2, também acarretando em ativação aumentada deste receptor);

2) Revelar assinaturas de expressões gênicas típicas das células fibroblastóides de periósteo de pacientes portadores de S. de Apert e de tecido de suturas coronais do modelo animal para S. de Crouzon e Pfeiffer;

3) Isolar um grupos de genes envolvidos na patofisiologia da S. de Apert e na determinação das características craniofaciais do modelo animal em questão, além de importantes para a biologia normal do processo de fechamento da sutura coronal;

4) Sugerir pela primeira vez a função do periósteo craniano na patofisiologia da S. de Apert, uma vez que esta estrutura pode prover células para a ossificação das suturas cranianas, pelo aumento da capacidade proliferativa de suas células e aumento da capacidade osteogênica;

5) Agregar mais evidências de que a caracterização do perfil global de expressão gênica pode servir como ferramenta para a identificação de genes candidatos envolvidos na etiologia molecular de doenças monogênicas.

Referências Bibliográficas

Abe, E., M. Yamamoto, *et al.* Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. J Bone Miner Res, v.15, n.4, Apr, p.663-73. 2000.

Aguirre, J., L. Buttery, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. Am J Pathol, v.158, n.1, Jan, p.247-57. 2001.

Albuquerque, M. A. e M. G. Cavalcanti. Computed tomography assessment of Apert syndrome. Braz Oral Res, v.18, n.1, Jan-Mar, p.35-9. 2004.

Anderson, J., H. D. Burns, *et al.* Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. Hum Mol Genet, v.7, n.9, Sep, p.1475-83. 1998.

Armstrong, L., O. Hughes, *et al.* The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. Hum Mol Genet, v.15, n.11, Jun 1, p.1894-913. 2006.

Asensi, V., A. H. Montes, *et al.* The NOS3 (27-bp repeat, intron 4) polymorphism is associated with susceptibility to osteomyelitis. Nitric Oxide, v.16, n.1, Feb, p.44-53. 2007.

Bellus, G. A., K. Gaudenz, *et al.* Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes. Nat Genet, v.14, n.2, Oct, p.174-6. 1996.

Bialek, P., B. Kern, *et al.* A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. Dev Cell, v.6, n.3, Mar, p.423-35. 2004.

Bochukova, E., S. Soneji, *et al.* Scalp fibroblasts have a shared expression profile in monogenic craniosynostosis. J Med Genet, Sep 15. 2009.

Bodo, M., F. Carinci, *et al.* Apert's syndrome: differential in vitro production of matrix macromolecules and its regulation by interleukins. Eur J Clin Invest, v.27, n.1, Jan, p.36-42. 1997.

Bodo, M., P. Carinci, *et al.* Glycosaminoglycan metabolism and cytokine release in normal and otosclerotic human bone cells interleukin-1 treated. Connect Tissue Res, v.36, n.3, p.231-40. 1997.

Brown, N. L., L. Knott, *et al.* Microarray analysis of murine palatogenesis: temporal expression of genes during normal palate development. Dev Growth Differ, v.45, n.2, Apr, p.153-65. 2003.

Brunet, L. J., J. A. McMahon, *et al.* Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. Science, v.280, n.5368, May 29, p.1455-7. 1998.

- Burke, D., D. Wilkes, *et al.* Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. Trends Biochem Sci, v.23, n.2, Feb, p.59-62. 1998.
- Carinci, F., M. Bodo, *et al.* Expression profiles of craniosynostosis-derived fibroblasts. Mol Med, v.8, n.10, Oct, p.638-44. 2002.
- Chen, L., D. Li, *et al.* A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. Bone, v.33, n.2, Aug, p.169-78. 2003.
- Cohen, M. M., Jr. An etiologic and nosologic overview of craniosynostosis syndromes. Birth Defects Orig Artic Ser, v.11, n.2, p.137-89. 1975.
- Cohen, M. M., Jr. e S. Kreiborg. New indirect method for estimating the birth prevalence of the Apert syndrome. Int J Oral Maxillofac Surg, v.21, n.2, Apr, p.107-9. 1992.
- Cohen, M.M., Jr. e S. Kreiborg. Suture formation, premature sutural fusion, and suture default zones in Apert syndrome. Am J Med Genet, v.62, n.4, Apr 24, p.339-44. 1996.
- Coussens, A. K., I. P. Hughes, *et al.* Identification of genes differentially expressed by prematurely fused human sutures using a novel in vivo - in vitro approach. Differentiation, v.76, n.5, May, p.531-45. 2008.
- Coussens, A. K., C. R. Wilkinson, *et al.* Unravelling the molecular control of calvarial suture fusion in children with craniosynostosis. BMC Genomics, v.8, p.458. 2007.
- Culiat, C. T., L. J. Stubbs, *et al.* Deficiency of the beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor causes cleft palate in mice. Nat Genet, v.11, n.3, Nov, p.344-6. 1995.
- Darnell, J. E., Jr. STATs and gene regulation. Science, v.277, n.5332, Sep 12, p.1630-5. 1997.
- David Givol, V. P. E., Peter Lonai. Molecular and Cellular Biology of FGF Signaling. In: R. P. E. Charles J. Epstein, Anthony Wynshaw-Boris (Ed.). Inborn Errors of Development. New York: Oxford University Press, 2004. Molecular and Cellular Biology of FGF Signaling, p.367 - 379. (Oxford Monographs on Medical Genetics)
- De Mendonca Costa, A., D. F. Bueno, *et al.* Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. J Craniofac Surg, v.19, n.1, Jan, p.204-10. 2008.
- Dell, K. R. e L. T. Williams. A novel form of fibroblast growth factor receptor 2. Alternative splicing of the third immunoglobulin-like domain confers ligand binding specificity. J Biol Chem, v.267, n.29, Oct 15, p.21225-9. 1992.
- Devlin, R. D., Z. Du, *et al.* Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. Endocrinology, v.144, n.5, May, p.1972-8. 2003.
- Dode, C., J. Levilliers, *et al.* Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nat Genet, v.33, n.4, Apr, p.463-5. 2003.
- Ducy, P., T. Schinke, *et al.* The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science, v.289, n.5484, Sep 1, p.1501-4. 2000.

Ducy, P., R. Zhang, *et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, v.89, n.5, May 30, p.747-54. 1997.

El Ghouzzi, V., M. Le Merrer, *et al.* Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. Nat Genet, v.15, n.1, Jan, p.42-6. 1997.

Eswarakumar, V. P., M. C. Horowitz, *et al.* A gain-of-function mutation of Fgfr2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.34, Aug 24, p.12555-60. 2004.

Eswarakumar, V. P., E. Monson-Orran, *et al.* The IIIc alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. Development, v.129, n.16, Aug, p.3783-93. 2002.

Eswarakumar, V. P., F. Ozcan, *et al.* Attenuation of signaling pathways stimulated by pathologically activated FGF-receptor 2 mutants prevents craniosynostosis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.49, Dec 5, p.18603-8. 2006.

Fluck, C. E., T. Tajima, *et al.* Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. Nat Genet, v.36, n.3, Mar, p.228-30. 2004.

Gazzerro, E., V. Gangji, *et al.* Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. J Clin Invest, v.102, n.12, Dec 15, p.2106-14. 1998.

Givol, D. e A. Yayon. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. Faseb J, v.6, n.15, Dec, p.3362-9. 1992.

Givol D., E. V. P., Lonai P. Molecular and Cellular Biology of FGF Signaling. In: R. P. E. Charles J. Epstein, Anthony Wynshaw-Boris (Ed.). Inborn Errors of Development. New York: Oxford University Press, 2004. Molecular and Cellular Biology of FGF Signaling, p.367 - 379. (Oxford Monographs on Medical Genetics)

Golub, T. R., D. K. Slonim, *et al.* Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science, v.286, n.5439, Oct 15, p.531-7. 1999.

Gong, Y., D. Krakow, *et al.* Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. Nat Genet, v.21, n.3, Mar, p.302-4. 1999.

Gorlin R.J., C. M. M. J., Hennekam, R.C.M. Syndromes of the Head and Neck: Oxford University Press, v.42. 2001 (Oxford Monographs on Medical Genetics)

Hagiwara, N., Z. Katarova, *et al.* Nonneuronal expression of the GABA(A) beta3 subunit gene is required for normal palate development in mice. Dev Biol, v.254, n.1, Feb 1, p.93-101. 2003.

Hopper, R. A., J. R. Zhang, *et al.* Effect of isolation of periosteum and dura on the healing of rabbit calvarial inlay bone grafts. Plast Reconstr Surg, v.107, n.2, Feb, p.454-62. 2001.

Ibrahimi, O. A., A. V. Eliseenkova, *et al.* Structural basis for fibroblast growth factor receptor 2 activation in Apert syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.13, Jun 19, p.7182-7. 2001.

Inoue, H., S. Kayano, *et al.* Association of the GABRB3 gene with nonsyndromic oral clefts. Cleft Palate Craniofac J, v.45, n.3, May, p.261-6. 2008.

Jenkins, D., D. Seelow, *et al.* RAB23 mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. Am J Hum Genet, v.80, n.6, Jun, p.1162-70. 2007.

Jiang, X., S. Iseki, *et al.* Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. Dev Biol, v.241, n.1, Jan 1, p.106-16. 2002.

Johnson, D. A comprehensive screen of genes implicated in craniosynostosis. Ann R Coll Surg Engl, v.85, n.6, Nov, p.371-7. 2003.

Johnson, D. E., P. L. Lee, *et al.* Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. Mol Cell Biol, v.10, n.9, Sep, p.4728-36. 1990.

Johnson, D. E. e L. T. Williams. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. Adv Cancer Res, v.60, p.1-41. 1993.

Jones, K. L. D. W. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation: W. B. Saunders Company. 1996

Kim, H. J., J. H. Kim, *et al.* The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. J Biol Chem, v.278, n.1, Jan 3, p.319-26. 2003.

Kimonis, V., J. A. Gold, *et al.* Genetics of craniosynostosis. Semin Pediatr Neurol, v.14, n.3, Sep, p.150-61. 2007.

Klint, P. e L. Claesson-Welsh. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. Front Biosci, v.4, Feb 15, p.D165-77. 1999.

Klint, P., S. Kanda, *et al.* Contribution of Src and Ras pathways in FGF-2 induced endothelial cell differentiation. Oncogene, v.18, n.22, Jun 3, p.3354-64. 1999.

Kouhara, H., Y. R. Hadari, *et al.* A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. Cell, v.89, n.5, May 30, p.693-702. 1997.

Kreiborg, S., M. Barr, Jr., *et al.* Cervical spine in the Apert syndrome. Am J Med Genet, v.43, n.4, Jul 1, p.704-8. 1992.

Kreiborg, S. e M. M. Cohen, Jr. Is craniofacial morphology in Apert and Crouzon syndromes the same? Acta Odontol Scand, v.56, n.6, Dec, p.339-41. 1998.

Krishnan, V., H. U. Bryant, *et al.* Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest, v.116, n.5, May, p.1202-9. 2006.

Lajeunie, E., R. Cameron, *et al.* Clinical variability in patients with Apert's syndrome. J Neurosurg, v.90, n.3, Mar, p.443-7. 1999.

Lajeunie, E., M. Le Merrer, *et al.* Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. Am J Med Genet, v.55, n.4, Feb 13, p.500-4. 1995.

Lajeunie, E., M.L. Merrer, *et al.* Genetic study of scaphocephaly. Am J Med Genet, v.62, n.3, Mar 29, p.282-5. 1996.

Lajeunie, E., H. W. Ma, *et al.* FGFR2 mutations in Pfeiffer syndrome. Nat Genet, v.9, n.2, Feb, p.108. 1995.

Legeai-Mallet, L., C. Benoist-Lasselin, *et al.* Fibroblast growth factor receptor 3 mutations promote apoptosis but do not alter chondrocyte proliferation in thanatophoric dysplasia. J Biol Chem, v.273, n.21, May 22, p.13007-14. 1998.

Lemonnier, J., P. Delannoy, *et al.* The Ser252Trp fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2) mutation induces PKC-independent downregulation of FGFR-2 associated with premature calvaria osteoblast differentiation. Exp Cell Res, v.256, n.1, Apr 10, p.158-67. 2000.

Li, C., L. Chen, *et al.* 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, v.8, n.1, Jan, p.35-44. 1999.

Li, C., D. A. Scott, *et al.* Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. Development, v.134, n.1, Jan, p.167-76. 2007.

Lian, J. B., J. L. Stein, *et al.* Runx2/Cbfa1 functions: diverse regulation of gene transcription by chromatin remodeling and co-regulatory protein interactions. Connect Tissue Res, v.44 Suppl 1, p.141-8. 2003.

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.

Loeys, B. L., J. Chen, *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. Nat Genet, v.37, n.3, Mar, p.275-81. 2005.

M. Michael Cohen, Jr. Chapter 2: Sutural Biology. In: J. R. E. M. M. Michael Cohen (Ed.). Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, and Management: Oxford University Press, 2000a. Chapter 2: Sutural Biology, p.11 - 23

M. Michael Cohen, Jr. Part VIII: Syndromes with Craniosynostosis. In: J. M. Michael Cohen (Ed.). Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, and Management. New York: Oxford University Press, 2000b. Part VIII: Syndromes with Craniosynostosis, p.309 - 441

Mansukhani, A., D. Ambrosetti, *et al.* Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. J Cell Biol, v.168, n.7, Mar 28, p.1065-76. 2005.

Mansukhani, A., P. Bellosta, *et al.* Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. J Cell Biol, v.149, n.6, Jun 12, p.1297-308. 2000.

Marriott, I. Osteoblast responses to bacterial pathogens: a previously unappreciated role for bone-forming cells in host defense and disease progression. Immunol Res, v.30, n.3, p.291-308. 2004.

- Marriott, I., D. L. Gray, *et al.* Osteoblasts express the inflammatory cytokine interleukin-6 in a murine model of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and infected human bone tissue. Am J Pathol, v.164, n.4, Apr, p.1399-406. 2004.
- Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell, v.80, n.2, Jan 27, p.179-85. 1995.
- Mason, I. J. The ins and outs of fibroblast growth factors. Cell, v.78, n.4, Aug 26, p.547-52. 1994.
- Muenke, M., U. Schell, *et al.* A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. Nat Genet, v.8, n.3, Nov, p.269-74. 1994.
- Neilson, K. M. e R. E. Friesel. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-2 by a point mutation associated with Crouzon syndrome. J Biol Chem, v.270, n.44, Nov 3, p.26037-40. 1995.
- Nishizuka, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. Faseb J, v.9, n.7, Apr, p.484-96. 1995.
- Oldridge, M., P. W. Lunt, *et al.* Genotype-phenotype correlation for nucleotide substitutions in the IgII-IgIII linker of FGFR2. Hum Mol Genet, v.6, n.1, Jan, p.137-43. 1997.
- Oldridge, M., E. H. Zackai, *et al.* De novo alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. Am J Hum Genet, v.64, n.2, Feb, p.446-61. 1999.
- Ornitz, D. M. e N. Itoh. Fibroblast growth factors. Genome Biol, v.2, n.3, p.REVIEWS3005. 2001.
- Ornitz, D. M. e P. J. Marie. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. Genes Dev, v.16, n.12, Jun 15, p.1446-65. 2002.
- Otto, F., M. Lubbert, *et al.* Upstream and downstream targets of RUNX proteins. J Cell Biochem, v.89, n.1, May 1, p.9-18. 2003.
- Ozerdem, O. R., R. Anlati, *et al.* Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. J Craniofac Surg, v.14, n.3, May, p.371-9; discussion 380-2. 2003.
- Park, W. J., G. A. Bellus, *et al.* Mutations in fibroblast growth factor receptors: phenotypic consequences during eukaryotic development. Am J Hum Genet, v.57, n.4, Oct, p.748-54. 1995.
- Park, W. J., C. Theda, *et al.* Analysis of phenotypic features and FGFR2 mutations in Apert syndrome. Am J Hum Genet, v.57, n.2, Aug, p.321-8. 1995.
- Passos-Bueno, M. R., A. L. Sertie, *et al.* Pfeiffer mutation in an Apert patient: how wide is the spectrum of variability due to mutations in the FGFR2 gene? Am J Med Genet, v.71, n.2, Aug 8, p.243-5. 1997.
- Passos-Bueno, M. R. S., A.L.; Jehee, F.S.; Fanganiello R.D.; Yeh, E. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations. In: D. P. Rice (Ed.). Craniofacial Sutures: Development, Disease and Treatment. London: Karger, v.12, 2008. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations, p.107 - 143. (Frontiers of Oral Biology)

Quackenbush, J. Microarray data normalization and transformation. Nat Genet, v.32 Suppl, Dec, p.496-501. 2002.

Reardon, W., R. M. Winter, *et al.* Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. Nat Genet, v.8, n.1, Sep, p.98-103. 1994.

Reis, E. M., H. I. Nakaya, *et al.* Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. Oncogene, v.23, n.39, Aug 26, p.6684-92. 2004.

Renier, D., E. Arnaud, *et al.* [Mental prognosis of Apert syndrome]. Arch Pediatr, v.3, n.8, Aug, p.752-60. 1996.

Rice, D. P. Developmental Anatomy of Craniofacial Sutures. In: D. P. Rice (Ed.). Craniofacial Sutures: Development, Disease and Treatment
London: Karger, v.Vol.12, 2008. Developmental Anatomy of Craniofacial Sutures, p.1 - 21. (Frontiers of Oral Biology)

Robertson, S. C., A. N. Meyer, *et al.* Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.8, Apr 14, p.4567-72. 1998.

Robledo, R. F., L. Rajan, *et al.* The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. Genes Dev, v.16, n.9, May 1, p.1089-101. 2002.

Scapoli, L., M. Martinelli, *et al.* Linkage disequilibrium between GABRB3 gene and nonsyndromic familial cleft lip with or without cleft palate. Hum Genet, v.110, n.1, Jan, p.15-20. 2002.

Shams, I., E. Rohmann, *et al.* Lacrimo-auriculo-dento-digital syndrome is caused by reduced activity of the fibroblast growth factor 10 (FGF10)-FGF receptor 2 signaling pathway. Mol Cell Biol, v.27, n.19, Oct, p.6903-12. 2007.

Shiang, R., L. M. Thompson, *et al.* Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. Cell, v.78, n.2, Jul 29, p.335-42. 1994.

Shirakabe, K., K. Terasawa, *et al.* Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. Genes Cells, v.6, n.10, Oct, p.851-6. 2001.

Sleeman, M., J. Fraser, *et al.* Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. Gene, v.271, n.2, Jun 27, p.171-82. 2001.

Sood, S., Z. A. Eldadah, *et al.* Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. Nat Genet, v.12, n.2, Feb, p.209-11. 1996.

Spivak-Kroizman, T., M. A. Lemmon, *et al.* Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. Cell, v.79, n.6, Dec 16, p.1015-24. 1994.

Takahashi, K., M. Murakami, *et al.* Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. Biochem Soc Trans, v.33, n.Pt 6, Dec, p.1522-5. 2005.

- Tavormina, P. L., R. Shiang, *et al.* Thanatophoric dysplasia (types I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. Nat Genet, v.9, n.3, Mar, p.321-8. 1995.
- Toydemir, R. M., A. E. Brassington, *et al.* A novel mutation in FGFR3 causes camptodactyly, tall stature, and hearing loss (CATSHL) syndrome. Am J Hum Genet, v.79, n.5, Nov, p.935-41. 2006.
- Tsai, F. J., W. L. Hwu, *et al.* Two common mutations 934C to G and 937C to G of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) gene in Chinese patients with Apert syndrome. Hum Mutat, v.Suppl 1, p.S18-9. 1998.
- Twigg, S. R., R. Kan, *et al.* Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.23, Jun 8, p.8652-7. 2004.
- Vaes, B. L., K. J. Dechering, *et al.* Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts. Bone, v.36, n.5, May, p.803-11. 2005.
- Van 't Veer, L. J., H. Dai, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature, v.415, n.6871, Jan 31, p.530-6. 2002.
- Walsh, M. C., N. Kim, *et al.* Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. Annu Rev Immunol, v.24, p.33-63. 2006.
- Wang, Y., R. Xiao, *et al.* Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+/-S252W) mouse. Development, v.132, n.15, Aug, p.3537-48. 2005.
- Warren, S. M. e M. T. Longaker. The pathogenesis of craniosynostosis in the fetus. Yonsei Med J, v.42, n.6, Dec, p.646-59. 2001.
- Wilkie, A. O. e G. M. Morriss-Kay. Genetics of craniofacial development and malformation. Nat Rev Genet, v.2, n.6, Jun, p.458-68. 2001.
- Wilkie, A. O., S. F. Slaney, *et al.* Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. Nat Genet, v.9, n.2, Feb, p.165-72. 1995.
- Wilkie, A. O., Z. Tang, *et al.* Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene MSX2 causes defects in skull ossification. Nat Genet, v.24, n.4, Apr, p.387-90. 2000.
- Yokote, H., K. Fujita, *et al.* Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.52, Dec 27, p.18866-71. 2005.
- Yu, K., A. B. Herr, *et al.* Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.26, Dec 19, p.14536-41. 2000.

Resumo

Um dos grupos de doenças mais importante que acomete o desenvolvimento da caixa craniana humana é o das craniossinostoses, caracterizado pelo fechamento prematuro de uma ou mais suturas cranianas. Entre as formas mendelianas das craniossinostoses síndrômicas, mutações dominantes em FGFR2 são uma das causas mais frequentes e estão associadas às síndromes de Apert, de Crouzon e de Pfeiffer. A sinalização intracelular subsequente à ativação de FGFR2, tanto selvagem quanto mutante, é bastante intrincada e pode sofrer inúmeras bifurcações. As porções iniciais destas vias, imediatamente subsequentes à ativação do receptor, são relativamente bem compreendidas. Grande parte, porém, do controle dessas vias, principalmente no que tange a regulação transcricional e sua associação com alterações em comportamentos celulares, não é entendido.

Assim sendo, os objetivos gerais deste trabalho foram: 1) estudar o potencial de diferenciação e o perfil diferencial de transcrição gênica de culturas primárias de células fibroblastóides isoladas a partir do periósteo das suturas coronais de pacientes acometidos por síndrome de Apert (heterozigotos para a mutação de ganho de função p.Ser252Trp em FGFR2, a mutação mais comum em pacientes com esta síndrome) e 2) estudar o potencial de diferenciação osteogênico e o perfil transcricional respectivamente de células mesenquimais e de tecido provenientes de sutura coronal de um modelo murino para Síndromes de Crouzon/Pfeiffer (heterozigotos para a mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2, a mutação mais comum associada a estas síndromes).

Certificamo-nos da expressão gênica e proteica de FGFR2 nas células fibroblastóides humanas e de Fgfr2 nas células mesenquimais murinas. Em seguida, testamos o potencial osteogênico (*in vitro* e *in vivo*) e adipogênico (*in vitro*) das células de pacientes com Síndrome de Apert, comparadas a células do mesmo tecido mas de indivíduos sem esta mutação e o potencial osteogênico (*in vitro*) das células mesenquimais de camundongos portadores da mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2, comparadas a células também das suturas coronais mas de animais selvagens. O potencial de diferenciação das células mutantes, nos dois grupos de experimentos, foi muito aumentado em relação ao potencial das células livres destas mutações.

Conduzimos experimentos de microarrays de expressão gênica (sistema CodeLink) com 7 amostras de culturas primárias de células de pacientes com S. de Apert e as comparamos com 7 amostras de culturas primárias controles. Identificamos 263 genes com valores de expressão estatisticamente diferentes ($SNR \geq |0.4|$, $P \leq 0,05$) nas amostras de pacientes com S. de Apert quando comparadas às controles (118 superexpressos, 145 subexpressos). Categorias funcionais enriquecidas foram regulação de proliferação celular, metabolismo de nucleotídeos, regulação de expressão gênica, adesão celular, organização de matriz extracelular e cascata PI3K – MAPK. Para a validação deste experimento constatamos superexpressão, por PCR em tempo real, de genes identificados como superexpressos na assinatura de expressão associada às células mutadas, além de verificarmos o mesmo comportamento destes genes em células controles tratadas com FGF2 exógeno para superativação do receptor.

Os experimentos de expressão gênica com os tecidos de suturas coronais do modelo murino foram feitos com 15 amostras de tecidos de animais mutantes em 3 grupos de 5 e comparadas a amostras de mesmo tecido de animais selvagens agrupadas da mesma forma. Identificamos três listas de genes diferencialmente expressos: a primeira contendo 188 transcritos ($P \leq 0,05$, $FC \geq 1,5$, sendo 91 superexpressos e 97 subexpressos), e as outras duas filtradas previamente para coeficiente de variação $< 50\%$ dentro de cada grupo, contendo 488 transcritos ($P \leq 0,05$, $FC \geq 1,2$, sendo 183 superexpressos e 305 subexpressos) e 31 transcritos ($P \leq 0,05$, $FC \geq 1,5$, sendo 11 superexpressos e 20 subexpressos). Categorias funcionais mais enriquecidas foram crescimento, proliferação e ciclo celular, diferenciação celular, sinalização célula-célula, resposta imune mediada por células e sinalização por receptor Wnt.

Estes resultados nos permitiram: a) demonstrar que células fibroblastóides de periósteo craniano de paciente portadores de S. de Apert (mutação p.Ser252Trp em FGFR2) e células

mesenquimais do modelo murino para S. de Crouzon e Pfeiffer, portador da mutação p.Cys342Tyr em Fgfr2, apresentam potencial osteogênico aumentado, agregando evidências que sugerem que esta alteração de comportamento celular tem função fundamental no desencadeamento das craniossinostoses nestas síndromes; b) revelar assinaturas de expressão gênica associadas a estas mutações nas condições estudadas, que podem reger este comportamento celular anormal; c) identificar um novo grupo de genes associados à patofisiologia da Síndrome de Apert ou às características fenotípicas do modelo murino investigado, podendo também ser genes candidatos a outras craniossinostoses de causa desconhecida.

Abstract

Craniosynostosis is one of the most important group of diseases linked to the development of the human skull and is characterized by the premature fusion of one or more cranial sutures. Dominant mutations in FGFR2 are frequent molecular causes amongst the mendelian inherited forms of the syndromic craniosynostosis and are associated to Apert, Crouzon and Pfeiffer syndromes. The intracellular signaling pathways following the activation of wild type or mutant FGFR2 are very complex due to several possible bifurcations. The initial portions of these pathways, immediately following the receptor activation, are relatively well delineated. However the great majority of the events related to the control of these pathways is still not well understood, mainly concerning its transcriptional regulation and its association to other cell behavior anomalies.

Therefore the key scopes of this work were: 1) to study the differentiation potential and the differential gene expression profile of primary fibroblastoid cell cultures isolated from the periosteum of the coronal sutures of Apert Syndrome patients (heterozygous for the mutation p.Ser252Trp in FGFR2, the most common cause of the Apert Syndrome condition) and 2) to study the osteogenic differentiation potential and the transcriptional profile of mesenchymal cells and tissue isolated from the coronal sutures of a mouse model for the Crouzon and Pfeiffer Syndromes (heterozygous for the p.Cys342Tyr mutation in Fgfr2, the mutation most commonly associated to these syndromes).

We assured the *FGFR2*/FGFR2 gene and the protein expression in human fibroblastoid cells and *Fgfr2*/Fgfr2 expression in the mesenchymal murine cells. We tested the (*in vitro* and *in vivo*) osteogenic and the (*in vitro*) adipogenic potentials of the Apert Syndrome patients cells compared to cells from the same tissue but from subjects without this mutation and the (*in vitro*) osteogenic potential of mesenchymal cells from mice bearing the p.Cys342Tyr mutation in Fgfr2 compared to coronal suture cells but from wild type mice. On both experiments the differentiation potential of the mutant cells were very increased when compared to the potential of the wild type cells.

We conducted gene expression microarray experiments (CodeLink system) using 7 samples from primary cultures of cells from Apert Syndrome patients compared to 7 samples from primary control cultures. We identified 263 genes with significantly different expression ($\text{SNR} \geq |0.4|$, $P \leq 0,05$) associated to the Apert Syndrome profile (118 upregulated, 145 downregulated). Enriched functional categories were regulation of cell proliferation, nucleotide metabolism, gene expression regulation, cell adhesion, extracellular matrix organization and PI3K – MAPK cascades. In order to validate this gene expression signature we confirmed through Real-Time PCR the upregulation of genes identified as upregulated in the Apert cell profile in samples from the microarray experiment and in control cells treated with exogenous overactivate the receptor.

The gene expression experiments with the coronal suture tissues from the mouse model were performed with 15 samples of mutant animal tissue in 3 groups of 5 and compared to samples from the same tissue of wild type animals, with identical grouping. We identified three sets of differentially expressed genes: the first set containing 188 transcripts ($P \leq 0,05$, $\text{FC} \geq 1,5$, 91 upregulated e 97 downregulated), and the other two filtered for coefficient of variation $< 50\%$ in each group, containing 488 transcripts ($P \leq 0,05$, $\text{FC} \geq 1,2$, sendo 183 upregulated and 305downregulated) e 31 transcripts ($P \leq 0,05$, $\text{FC} \geq 1,5$, 11 upregulated and 20 downregulated). The most enriched functional categories were growth, proliferation and cell cycle, cell differentiation, cell-to-cell signaling, cell mediated immune response and Wnt receptor signaling.

These results allowed us: a) to demonstrate that fibroblastoid cells from coronal periosteum PF Apert Syndrome patients (p.Ser252Trp mutation in FGFR2) and mesenchymal cells from the

coronal tissue of the mouse model for Crouzon and Pfeiffer syndromes (bearing the p.Cys342Tyr in Fgfr2) have enhanced osteogenic potential, summoning evidences suggesting that this cell behavior alteration have a fundamental role to the craniosynostotic process in these syndromes; b) to unravel gene expression signatures linked to these mutations in the studied conditions, that could orchestrate this abnormal cell behavior; c) to identify a ser of genes associated to the pathophysiology of Apert Syndrome and to the phenotypic characteristics of the animal model investigated, which might be candidate genes to other craniosynostosis of unknown cause.

Apêndices

Apêndice 1 - Tabelas 4, 5 e 6

Tabela 4: Lista de 263 transcritos diferencialmente expressos nas células de pacientes portadores de S. de Apert quando comparadas a células de indivíduos controles. Os transcritos foram ordenados pela razão Apert / Controle (Log 2).

Gene (símbolo oficial)	Nome do gene	Número de acesso	SNR	p- valor	Razão Apert / Controle (Log2)	x-vezes subexpresso em Apert
DKFZp434B1231 *	eEF1A2 binding protein	NM_178275.3	-0.86	0.010	-2.66	6.31
TNNT1 **	troponin T type 1 (skeletal, slow)	F36108.1	-0.662	0.017	-2.45	5.46
TNXB *	tenascin XB	NM_032470.2	-0.769	0.015	-2.32	4.98
CYHR1 *	cysteine/histidine-rich 1	AB007965.1	-1.013	0.010	-2.21	4.62
RTN4RL1 *	reticulon 4 receptor-like 1	AL834409.1	-0.812	0.023	-1.83	3.57
CCRL1	chemokine (C-C motif) receptor- like 1	NM_016557.2	-0.65	0.035	-1.77	3.42
NISC_np07a06y1 NICHDS_HS_Ut1	NISC_np07a06y1 NICHDS_HS_Ut1 cDNA clone IMAGE:5936938 5'	CB215524.1	-0.422	0.047	-1.76	3.39
PCNXL2 *	pecanex-like 2 (Drosophila)	NM_014801.2	-0.773	0.023	-1.75	3.36
CFB	complement factor B	NM_001710.3	-0.678	0.027	-1.74	3.34
DDIT4 *	DNA-damage-inducible transcript 4	NM_019058.1	-0.564	0.022	-1.71	3.28
RARRES3 *	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	NM_004585.2	-0.773	0.022	-1.64	3.12
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	NM_025079.1	-0.499	0.047	-1.62	3.08
PIK3C2B **	phosphoinositide-3-kinase, class 2, beta polypeptide	NM_002646.2	-0.903	0.004	-1.54	2.91
TP53I11	tumor protein p53 inducible protein 11	BC045666.1	-0.702	0.026	-1.48	2.79
GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	NM_004120.3	-0.689	0.031	-1.43	2.69
ChGn **	chondroitin beta1,4 N- acetylgalactosaminyltransferase	NM_018371.3	-0.819	0.015	-1.42	2.68
ZNF385 *	zinc finger protein 385	NM_015481.1	-0.955	0.011	-1.38	2.61
UI-E-CQ1-aew-i-06-0- UIr1 UI-E-CQ1	UI-E-CQ1-aew-i-06-0-UIr1 UI-E- CQ1 cDNA clone UI-E-CQ1-aew- i-06-0-UI 5'	BM695626.1	-0.661	0.042	-1.37	2.59
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	NM_006206.2	-0.653	0.045	-1.34	2.53
LRRC17 *	leucine rich repeat containing 17	NM_005824.1	-0.643	0.039	-1.25	2.38
yr27d04r1	yr27d04r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone	H59349.1	-0.708	0.039	-1.25	2.38

	IMAGE:206503 5'					
MGC:71335 *	cDNA clone MGC:71335 IMAGE:6088873	BC067086.1	-0.825	0.009	-1.25	2.37
FLJ43880 **	cDNA FLJ43880 fis, clone TESTI4009022	AK125868.1	-0.796	0.017	-1.24	2.36
ADAM33	ADAM metalloproteinase domain 33	NM_153202.1	-0.709	0.027	-1.22	2.33
RC6-HT0840-150800-022-D11 HT0840	RC6-HT0840-150800-022-D11 HT0840 Homo sapiens cDNA	BE719128.1	-0.678	0.031	-1.22	2.33
FXD1	FXD domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)	NM_021902.2	-0.578	0.044	-1.20	2.29
MAF	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	NM_005360.2	-0.568	0.044	-1.19	2.29
ABI3BP **	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein	NM_015429.2	-0.705	0.012	-1.17	2.26
UI-E-DW1-ahc-b-11-0-UIr1 UI-E-DW1 **	UI-E-DW1-ahc-b-11-0-UIr1 UI-E- DW1 cDNA clone UI-E-DW1-ahc- b-11-0-UI 5'	BM712072.1	-0.854	0.008	-1.14	2.21
MTSS1 *	metastasis suppressor 1	NM_014751.2	-0.731	0.009	-1.14	2.20
CLDN15 *	claudin 15	NM_014343.1	-0.714	0.022	-1.13	2.19
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	NM_198334.1	-0.719	0.020	-1.13	2.19
C1QTNF1 **	C1q and tumor necrosis factor related protein 1	NM_030968.2	-0.672	0.017	-1.13	2.18
ATF3	activating transcription factor 3	NM_004024.2	-0.619	0.049	-1.10	2.14
C17orf58 **	chromosome 17 open reading frame 58	NM_181655.1	-0.813	0.007	-1.10	2.14
P2RY6 **	pyrimidinergic receptor P2Y, G- protein coupled, 6	NM_004154.3	-0.814	0.021	-1.08	2.12
ADAM8 **	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109.1	-0.628	0.044	-1.06	2.08
PNRC1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	NM_006813.1	-0.902	0.008	-1.05	2.07
FLJ23438 *	cDNA: FLJ23438 fis, clone HRC13275	AK027091.1	-0.738	0.016	-1.04	2.06
BTN3A3 **	butyrophilin, subfamily 3, member A3	NM_197974.1	-0.833	0.009	-1.03	2.05
UI-H-EU0-azp-a-24-0-UIs1 NCI_CGAP_Car1 *	UI-H-EU0-azp-a-24-0-UIs1 NCI_CGAP_Car1 cDNA clone IMAGE: 5851679 3'	BQ181011.1	-0.716	0.009	-1.01	2.01
CREB5 *	cAMP responsive element binding protein 5	NM_004904.1	-0.9	0.010	-1.00	2.00
HLA-G	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	NM_002127.3	-0.721	0.028	-0.99	1.99
MATN2	matrilin 2	NM_030583.1	-0.743	0.027	-0.96	1.95
HHLA2	HERV-H LTR-associating 2	NM_007072.2	-0.488	0.024	-0.95	1.93
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	NM_018950.1	-0.619	0.039	-0.95	1.93
TXNIP	thioredoxin interacting protein	NM_006472.1	-0.604	0.034	-0.94	1.92
KLF11	Kruppel-like factor 11	NM_003597.4	-0.493	0.039	-0.92	1.89
ARID5A	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	NM_006673.2	-0.526	0.042	-0.92	1.89
PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	NM_022121.2	-0.602	0.042	-0.92	1.89
HHLA1	HERV-H LTR-associating 1	NM_005712.1	-0.661	0.031	-0.92	1.89
GYPC *	glycophorin C (Gerbich blood group)	NM_002101.3	-0.578	0.046	-0.91	1.88
NUCB1	nucleobindin 1	NM_006184.3	-0.618	0.026	-0.89	1.86

LGALS3BP *	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_005567.2	-0.784	0.014	-0.89	1.85
FLJ20099 *	cDNA FLJ20099 fis, clone COL04544	AK000106.1	-0.711	0.023	-0.89	1.85
TMEM142C *	transmembrane protein 142C	NM_152288.1	-0.803	0.011	-0.87	1.83
ATXN2L	ataxin 2-like	NM_007245.2	-0.596	0.046	-0.87	1.83
PAQR6 *	progesterone and adipoQ receptor family member VI	NM_024897.2	-0.63	0.040	-0.87	1.83
SPTBN1	spectrin, beta, non-erythrocytic 1 (SPTBN1)	NM_003128.1	-0.62	0.049	-0.87	1.83
MGC15875 *	hypothetical protein MGC15875 (MGC15875)	NM_032921.1	-0.894	0.013	-0.86	1.81
MAPK8IP1	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	NM_005456.2	-0.642	0.037	-0.86	1.81
ANKZF1	ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1	NM_018089.1	-0.673	0.036	-0.85	1.81
CCBE1	collagen and calcium binding EGF domains 1	NM_133459.1	-0.602	0.034	-0.85	1.81
DKFZp779O1626	mRNA; cDNA DKFZp779O1626 (from clone DKFZp779O1626)	BX648538.1	-0.676	0.027	-0.83	1.78
CA12	carbonic anhydrase XII	AK000158.1	-0.612	0.040	-0.83	1.78
NFIL3 *	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NM_005384.1	-0.803	0.012	-0.83	1.77
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	NM_021034.1	-0.604	0.033	-0.83	1.77
SLC27A1	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	NM_198580.1	-0.621	0.047	-0.81	1.75
LAMP1	lysosomal-associated membrane protein 1	NM_005561.2	-0.648	0.037	-0.80	1.74
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	NM_005178.2	-0.671	0.039	-0.79	1.73
R15896 ya47b07.r1	R15896 ya47b07.r1 Soares infant brain 1N1B cDNA clone IMAGE:53125 5' similar to SP:S37009 S37009 TRANSPOSASE - ALMOND ;	R15896.1	-0.645	0.037	-0.79	1.73
ZFP64 *	zinc finger protein 64 homolog (mouse)	NM_018197.2	-0.795	0.017	-0.78	1.72
SWAP-70 *	SWAP-70 protein	AB014540.1	-0.708	0.028	-0.77	1.71
P2RX4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	NM_002560.2	-0.69	0.032	-0.77	1.71
BMP1	bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	NM_006129.2	-0.598	0.048	-0.76	1.69
SLC25A37	solute carrier family 25, member 37	NM_016612.1	-0.607	0.039	-0.75	1.68
NUB1 *	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	NM_016118.3	-0.68	0.011	-0.75	1.68
ACADS	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	NM_000017.1	-0.669	0.046	-0.74	1.67
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	NM_006509.2	-0.682	0.033	-0.74	1.67
PPARA *	peroxisome proliferative activated receptor, alpha	NM_032644.1	-0.753	0.009	-0.74	1.67
ELL3 *	elongation factor RNA polymerase II-like 3	NM_025165.1	-0.791	0.006	-0.74	1.67
BCL6 **	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	NM_001706.2	-0.819	0.013	-0.74	1.67
PYGL **	phosphorylase, glycogen; liver	NM_002863.2	-0.804	0.016	-0.74	1.67

	(Hers disease, glycogen storage disease type VI)					
cDNA clone fs01a03 5'	fs01a03y1 Human Lens cDNA (Normalized): fs cDNA clone fs01a03 5'	CD673362.1	-0.615	0.030	-0.73	1.66
602156641F1 NIH_MGC_83	602156641F1 NIH_MGC_83 cDNA clone IMAGE:4297258 5'	BF681513.1	-0.597	0.037	-0.73	1.66
CSNK2A1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	NM_177560.2	-0.693	0.030	-0.73	1.66
KIAA0082	KIAA0082	NM_015050.1	-0.945	0.010	-0.72	1.65
UI-E-DW0-agh-c-03-0-UIr1 UI-E-DW0 **	UI-E-DW0-agh-c-03-0-UIr1 UI-E-DW0 cDNA clone UI-E-DW0-agh-c-03-0-UI 5'	BM706230.1	-0.714	0.024	-0.72	1.65
CNTNAP1	contactin associated protein 1	NM_003632.1	-0.628	0.041	-0.72	1.64
SYNGR1 *	synaptogyrin 1	NM_004711.3	-0.635	0.043	-0.71	1.64
ING4	inhibitor of growth family, member 4	NM_198287.1	-0.586	0.044	-0.69	1.62
RBM5 *	RNA binding motif protein 5	NM_005778.1	-0.71	0.024	-0.69	1.61
FLJ34274	cDNA FLJ34274 fis, clone FEBRA2003327	AK091593.1	-0.618	0.044	-0.68	1.60
FAM113A *	family with sequence similarity 113, member A	NM_022760.3	-0.796	0.015	-0.68	1.60
MAP3K6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	NM_004672.3	-0.584	0.041	-0.67	1.59
FLJ14360	hypothetical protein FLJ14360	NM_032775.2	-0.638	0.030	-0.67	1.59
B4GALT7 *	xylosylprotein beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)	NM_007255.1	-0.76	0.026	-0.66	1.57
CASP7 *	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_001227.2	-0.637	0.023	-0.65	1.57
IXL *	intersex-like (Drosophila)	AL137304.1	-0.662	0.031	-0.65	1.57
RHBDF2	rhomboid-like protein 6	NM_024599.2	-0.636	0.030	-0.65	1.57
UCN	urocortin	NM_003353.2	-0.625	0.044	-0.65	1.57
FLRT2	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	NM_013231.3	-0.595	0.042	-0.64	1.56
FLJ45129	cDNA FLJ45129 fis, clone BRAWH3037394	AK127072.1	-0.582	0.048	-0.63	1.55
LKAP **	limkain b1	NM_014647.1	-0.693	0.012	-0.63	1.55
yj34b04r1 *	yj34b04r1 Soares placenta Nb2HP cDNA clone IMAGE:150607 5'	H02050.1	-0.722	0.017	-0.62	1.54
HECA *	headcase homolog (Drosophila)	NM_016217.1	-0.629	0.047	-0.62	1.54
BMP1 *	bone morphogenetic protein 1	NM_006129.2	-0.763	0.024	-0.62	1.54
601194047F1 NIH_MGC_7	601194047F1 NIH_MGC_7 cDNA clone IMAGE:3537995 5'	BE264943.1	-0.699	0.048	-0.62	1.54
TNIP2 *	TNFAIP3 interacting protein 2	NM_024309.2	-0.95	0.008	-0.62	1.54
ZNF688	zinc finger protein 688	NM_145271.2	-0.669	0.026	-0.61	1.53
MITF	microphthalmia-associated transcription factor	NM_006722.1	-0.62	0.042	-0.60	1.51
FLJ45204 *	cDNA FLJ45204 fis, clone BRCAN2009168	AK127147.1	-0.807	0.010	-0.60	1.51
UBXD7 **	UBX domain containing 7	AB018337.1	-0.811	0.007	-0.58	1.50
C16orf48 *	hypothetical protein DKFZp434A1319 (DKFZP434A1319)	NM_032140.1	-0.714	0.015	-0.58	1.50
ZFHx4	zinc finger homeodomain 4	NM_024721.2	-0.643	0.030	-0.58	1.49

yo60a08r1	yo60a08r1 Soares breast 3NbHBst cDNA clone IMAGE:182294 5' similar to contains Alu repetitive element;contains LTR9 repetitive element ;	H41942.1	-0.692	0.031	-0.58	1.49
ZNF44	zinc finger protein 44	BC032246.1	-0.614	0.032	-0.57	1.49
SETD5	SET domain containing 5	AB051544.1	-0.6	0.031	-0.57	1.48
RNF103	ring finger protein 103	NM_005667.2	-0.648	0.031	-0.57	1.48
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	NM_033285.2	-0.642	0.028	-0.55	1.47
yr35b01r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS *	yr35b01r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:207241 5'	H59642.1	-0.631	0.038	-0.55	1.46
BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1	NM_024649.4	-0.616	0.047	-0.54	1.46
FLJ43900	cDNA FLJ43900 fis, clone TESTI4009973	AK125888.1	-0.669	0.043	-0.54	1.45
ITM2B *	integral membrane protein 2B	NM_021999.2	-0.681	0.028	-0.54	1.45
PDE6G *	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	NM_002602.1	-0.87	0.003	-0.53	1.44
FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa	NM_002014.2	-0.697	0.023	-0.53	1.44
CHKB	choline kinase beta (CHKB)	NM_005198.3	-0.593	0.039	-0.52	1.43
FLJ11946 *	cDNA FLJ11946 fis, clone HEMBB1000709	AK022008.1	-0.922	0.005	-0.50	1.42
wi65f08x1 NCI_CGAP_Kid12	wi65f08x1 NCI_CGAP_Kid12 cDNA clone IMAGE:2398215 3'	AI763182.1	-0.621	0.044	-0.50	1.42
NSMAF **	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	NM_003580.2	-0.789	0.015	-0.50	1.41
SIX5 *	sine oculis homeobox homolog 5 (Drosophila)	NM_175875.3	-0.75	0.017	-0.49	1.40
64B2 Human retina cDNA Tsp509I-cleaved sublibrary *	64B2 Human retina cDNA Tsp509I-cleaved sublibrary Homo sapiens cDNA not directional	W22248.1	-0.684	0.022	-0.48	1.39
XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C	NM_004628.2	-0.644	0.041	-0.48	1.39
603040523F1 NIH_MGC_115	603040523F1 NIH_MGC_115 cDNA clone IMAGE:5181509 5'	BI824163.1	-0.708	0.030	-0.48	1.39
DKFZp686K2137	mRNA; cDNA DKFZp686K2137 (from clone DKFZp686K2137)	AL833529.1	-0.626	0.037	-0.47	1.38
SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2	NM_016333.2	-0.632	0.042	-0.45	1.36
SH3GLB2	SH3-domain GRB2-like endophilin B2	NM_020145.2	-0.662	0.037	-0.45	1.36
yd89d12r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS	yd89d12r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:115415 5'	T87528.1	-0.592	0.050	-0.43	1.35
cDNA clone IMAGE:3636922	cDNA clone IMAGE:3636922	BC062348.1	-0.598	0.035	-0.43	1.34
PTPRA	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	NM_002836.2	-0.624	0.042	-0.41	1.33
C20orf111	chromosome 20 open reading frame 111	NM_016470.6	-0.632	0.043	-0.41	1.33
MGAT1 *	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	NM_002406.2	-0.799	0.019	-0.40	1.32
ZDHC3 *	zinc finger, DHHC domain containing 3	NM_016598.1	-0.634	0.040	-0.32	1.25
cDNA DKFZp313K127	mRNA; cDNA DKFZp313K127	AL833316.1	-0.74	0.024	-0.31	1.24

* (from clone DKFZp313K127)						
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	NM_198334.1	-0.676	0.034	-0.31	1.24
						x-vezes superexpresso em Apert
NUBP2	nucleotide binding protein 2 (MinD homolog, E coli)	NM_012225.1	0.66	0.030	0.23	1.17
AGENCOURT_8454944 NIH_MGC_113	AGENCOURT_8454944 NIH_MGC_113 cDNA clone IMAGE:6278846 5'	BU899205.1	0.587	0.046	0.28	1.22
ATP5G1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)	NM_005175.1	0.618	0.042	0.28	1.22
AGENCOURT_8073800 NIH_MGC_110 *	AGENCOURT_8073800 NIH_MGC_110 cDNA clone IMAGE:6083397 5'	BU147450.1	0.678	0.020	0.32	1.25
CIB1 *	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	NM_006384.2	0.665	0.035	0.32	1.25
ARL3	ADP-ribosylation factor-like 3	NM_004311.2	0.633	0.033	0.34	1.27
PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	NM_002787.3	0.648	0.039	0.36	1.28
MAGED2 *	melanoma antigen, family D, 2	NM_014599.4	0.599	0.030	0.36	1.28
CUTA	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)	NM_015921.1	0.603	0.044	0.37	1.29
CSNK1D	casein kinase 1, delta	NM_001893.3	0.614	0.042	0.37	1.29
MTCH2	mitochondrial carrier homolog 2 (C elegans) (MTCH2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_014342.2	0.576	0.045	0.38	1.30
yp83b01s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS	yp83b01s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:193993 3'	H51256.1	0.597	0.049	0.38	1.30
MAPRE1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	NM_012325.1	0.613	0.045	0.38	1.30
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	NM_003072.2	0.658	0.034	0.39	1.31
PLA2G12A	phospholipase A2, group XIIA	NM_030821.3	0.668	0.044	0.39	1.31
METTL2B *	methyltransferase like 2	NM_018396.1	0.753	0.019	0.40	1.32
EEF1B2 **	eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	NM_001959.2	0.879	0.011	0.40	1.32
GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2	NM_002041.2	0.664	0.027	0.40	1.32
ZNF414 *	zinc finger protein 414	NM_032370.1	0.742	0.029	0.41	1.32
ADCY2 *	adenylate cyclase 2 (brain)	NM_020546.1	0.665	0.028	0.41	1.33
CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	NM_012115.2	0.621	0.049	0.41	1.33
TIMP3 **	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	BG104808.1	0.966	0.006	0.42	1.34
EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A	NM_001416.1	0.585	0.038	0.44	1.35
MUS81 *	MUS81 endonuclease homolog (S. cerevisiae)	NM_025128.3	0.662	0.024	0.44	1.35
CCDC72	coiled-coil domain containing 72	NM_015933.1	0.694	0.030	0.44	1.36
SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	NM_006938.2	0.619	0.044	0.44	1.36

DTYMK	deoxythymidylate kinase	NM_012145.2	0.64	0.037	0.44	1.36
STX2 *	syntaxin 2	NM_194356.1	0.745	0.019	0.44	1.36
AARSD1 *	alanyl-tRNA synthetase domain containing 1	NM_025267.2	0.786	0.019	0.45	1.37
CREB3 *	cAMP responsive element binding protein 3	NM_006368.4	0.743	0.023	0.46	1.38
COX4NB	neighbor of COX4 (NOC4)	NM_006067.3	0.593	0.030	0.47	1.38
PDZK6	PDZ domain containing 6	NM_015693.2	0.63	0.038	0.47	1.39
UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	NM_003348.3	0.584	0.037	0.48	1.39
PPIH	peptidyl prolyl isomerase H	NM_006347.3	0.676	0.025	0.48	1.40
SIKE	suppressor of IKK epsilon	NM_025073.1	0.584	0.048	0.50	1.41
TK1	thymidine kinase 1, soluble	NM_003258.1	0.685	0.028	0.50	1.41
PAFAH1B3	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, gamma subunit 29kDa	NM_002573.2	0.651	0.037	0.51	1.42
SFRS7 *	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	NM_006276.36	0.705	0.028	0.52	1.44
PSMC5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	NM_002805.4	0.624	0.043	0.53	1.44
yr11c06r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS *	yr11c06r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:204970 5'	H57392.1	0.742	0.015	0.53	1.44
C15orf29 *	chromosome 15 open reading frame 29	NM_024713.1	0.793	0.011	0.53	1.44
GFOD2 **	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 2	NM_030819.2	0.745	0.019	0.53	1.45
HN1	hematological and neurological expressed 1	NM_001002032.1	0.683	0.045	0.54	1.46
DKFZp451H129	mRNA; cDNA DKFZp451H129 (from clone DKFZp451H129)	AL833295.1	0.649	0.035	0.54	1.46
CKLF *	chemokine-like factor	NM_016951.2	0.726	0.021	0.55	1.46
OBFC1	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1	NM_024928.3	0.688	0.027	0.55	1.46
VAMP4 *	vesicle-associated membrane protein 4, transcript variant 1	NM_201994.1	0.744	0.010	0.55	1.46
RRM1	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	NM_001033.2	0.612	0.045	0.55	1.46
PSME4 *	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	NM_014614.1	0.736	0.022	0.56	1.47
PLK3	polo-like kinase 3 (Drosophila)	NM_004073.2	0.642	0.036	0.57	1.48
MRPL35 *	mitochondrial ribosomal protein L35	NM_016622.2	0.706	0.014	0.57	1.49
DLAT *	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	NM_001931.2	0.707	0.019	0.58	1.49
HIP2 *	huntingtin interacting protein 2	NM_005339.3	0.723	0.017	0.58	1.49
C20orf7	chromosome 20 open reading frame 7	NM_199052.1	0.615	0.041	0.59	1.50
UFD1L *	ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	NM_005659.3	0.616	0.023	0.59	1.51
POP5	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit (S cerevisiae) (POP5)	NM_015918.3	0.623	0.041	0.59	1.51
SLC35B3	solute carrier family 35, member B3	NM_015948.2	0.628	0.037	0.60	1.51
CDKN3	cyclin-dependent kinase	NM_005192.2	0.613	0.044	0.60	1.52

	inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)					
LZIC *	leucine zipper and CTNNBIP1 domain containing	NM_032368.3	0.766	0.019	0.60	1.52
LETM1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	NM_012318.1	0.589	0.049	0.60	1.52
RNASEH2A *	ribonuclease H2, subunit A	NM_006397.2	0.869	0.011	0.60	1.52
NEDD1	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	NM_152905.2	0.643	0.041	0.62	1.53
CEP78	centrosomal protein 78kDa	AW962072.1	0.672	0.028	0.63	1.54
UI-H-BIO-aah-e-06-0-UIs1 NCI_CGAP_Sub1	UI-H-BIO-aah-e-06-0-UIs1 NCI_CGAP_Sub1 cDNA clone IMAGE:2709227 3'	AW014009.1	0.597	0.037	0.63	1.55
CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	NM_018204.2	0.644	0.037	0.66	1.58
ACTR3B *	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)	NM_020445.1	0.765	0.016	0.67	1.59
ELAVL1	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	NM_001419.2	0.635	0.041	0.67	1.59
POLR3K *	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K	NM_016310.2	0.802	0.013	0.69	1.61
PI4KII *	phosphatidylinositol 4-kinase type II	NM_018425.2	0.77	0.014	0.69	1.62
TMEM107 *	transmembrane protein 107	NM_183065.1	0.739	0.022	0.70	1.62
BCAP29	B-cell receptor-associated protein 29	NM_018844.1	0.644	0.040	0.70	1.63
PRPS1L1 *	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1-like 1	NM_175886.2	0.728	0.022	0.71	1.63
MTFMT *	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	NM_139242.2	0.866	0.008	0.72	1.64
DDX49	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49	NM_019070.3	0.61	0.046	0.73	1.66
RAD1 *	RAD1 homolog (S. pombe)	NM_002853.2	0.71	0.018	0.73	1.66
CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	NM_138460.2	0.721	0.019	0.74	1.67
NEK6 *	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	NM_014397.3	0.715	0.017	0.74	1.67
K-EST0149992 L3SNU475 *	K-EST0149992 L3SNU475 cDNA clone L3SNU475-29-H12 5'	CB108944.1	0.657	0.015	0.75	1.68
yx15f01s1 Soares melanocyte 2NbHM *	yx15f01s1 Soares melanocyte 2NbHM cDNA clone IMAGE:261817 3'	H99198.1	0.766	0.015	0.76	1.70
EXOSC9 *	exosome component 9	NM_005033.1	0.721	0.021	0.76	1.70
UI-E-CIO-aah-e-03-0-UIr1 UI-E-CIO	UI-E-CIO-aah-e-03-0-UIr1 UI-E-CIO cDNA clone UI-E-CIO-aah-e-03-0-UI 5'	BM690376.1	0.659	0.031	0.79	1.73
PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	NM_000317.1	0.597	0.047	0.79	1.73
C14orf143	chromosome 14 open reading frame 143	NM_145231.1	0.629	0.047	0.79	1.73
UBE2T	HSPC150 protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme	NM_014176.1	0.664	0.029	0.83	1.77
SAE1	SUMO-1 activating enzyme subunit 1	NM_005500.1	0.62	0.049	0.83	1.78
AURKB	aurora kinase B	NM_004217.1	0.692	0.031	0.84	1.79
ARSL	arylsulfatase family, member J	AK027201.1	0.708	0.028	0.85	1.80

RRM2 *	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	NM_001034.1	0.781	0.019	0.86	1.81
BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A	NM_020993.2	0.652	0.034	0.86	1.82
IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein	NM_006469.2	0.66	0.035	0.87	1.82
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	NM_022346.2	0.689	0.028	0.87	1.83
CENPM **	centromere protein M	NM_024053.2	0.693	0.006	0.87	1.83
C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13	NM_004772.1	0.626	0.042	0.89	1.85
MCM4	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)	NM_182746.1	0.65	0.030	0.90	1.87
FLJ43294	cDNA FLJ43294 fis, clone MESTC1000042	AK125284.1	0.527	0.049	0.93	1.90
PTPDC1 *	protein tyrosine phosphatase domain containing 1	NM_152422.3	0.725	0.027	0.95	1.93
LOC90624	hypothetical protein LOC90624	NM_181705.1	0.642	0.026	0.95	1.94
SPAG5 *	sperm associated antigen 5	NM_006461.2	0.876	0.007	0.98	1.97
CTPS	CTP synthase	NM_001905.1	0.496	0.046	0.98	1.98
zu70f09r1 Soares_testis_NHT	zu70f09r1 Soares_testis_NHT cDNA clone IMAGE:743369 5'	AA400694.1	0.578	0.039	0.99	1.98
MND1	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)	NM_032117.2	0.674	0.034	1.00	2.00
KIAA0101	KIAA0101 gene product	NM_014736.3	0.58	0.050	1.02	2.03
ZNF738 **	zinc finger protein 738	BC034499.1	1.07	0.003	1.03	2.04
EHD4 **	EH-domain containing 4	NM_139265.2	0.725	0.001	1.04	2.06
MNS1 *	meiosis-specific nuclear structural 1	NM_018365.1	0.832	0.013	1.06	2.08
ARHGAP11A	similar to human GTPase-activating protein	NM_014783.2	0.7	0.027	1.08	2.12
CENPN **	centromere protein N	NM_018455.3	1.142	0.001	1.10	2.14
STMN1 *	stathmin 1/oncoprotein 18	NM_203401.1	0.969	0.006	1.11	2.16
DUSP2 *	dual specificity phosphatase 2	NM_004418.2	0.953	0.004	1.17	2.25
SPBC25 *	spindle pole body component 25 homolog (S. cerevisiae)	NM_020675.3	0.892	0.010	1.18	2.27
HIST1H4C	histone 1, H4c	NM_003542.3	0.682	0.033	1.22	2.32
TCF19	transcription factor 19 (SC1)	BC033086.1	0.631	0.041	1.23	2.34
CIP29	cytokine induced protein 29 kDa	NM_033082.1	0.65	0.040	1.24	2.36
FLJ39342 *	cDNA FLJ39342 fis, clone OCBBF2018873	AK096661.1	0.776	0.017	1.32	2.50
FLJ23131	cDNA: FLJ23131 fis, clone LNG08502	AK026784.1	0.645	0.039	1.61	3.05
zv03f03r1 Soares_NhHMPu_S1	zv03f03r1 Soares_NhHMPu_S1 cDNA clone IMAGE:752573 5'	AA419568.1	0.718	0.041	1.74	3.34
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299.3	0.808	0.022	2.09	4.24
HAPLN1 **	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	NM_001884.2	1.003	0.005	3.00	7.99

*Os 120 transcritos identificados como diferencialmente expressos em pelo menos 50% das análises *leave-one-out*.

** Os 25 genes identificados como diferencialmente expressos em 100% das análises *leave-one-out*.

Tabela 5: Lista de 188 transcritos diferencialmente expressos nos tecidos de suturas coronais de animais $Fgfr2^{C342Y} / +$ em comparação com este mesmo tecido em animais selvagens. Os transcritos foram ordenados por *Fold Change*.

Gene (Símbolo oficial)	Nome do gene	Número de acesso	Fold Change
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A) (S100a8), mRNA.	NM_013650.2	2,7359893
Stfa1	stefin A1 (Stfa1), mRNA.	NM_001082543.1	2,6568878
S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9), mRNA.	NM_009114.1	2,5899076
Stfa1	stefin A1 (Stfa1), mRNA.	NM_001082543.1	2,3045743
Picalm*	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	NM_146194	2,223338
Myh8	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal (Myh8), mRNA.	NM_177369.3	2,1631758
Stfa2	stefin A2 (Stfa2), mRNA. XM_148531 XM_915403	NM_001082545.1	2,1515937
Ltf	lactotransferrin (Ltf), mRNA.	NM_008522.3	2,0959704
Bglap1	bone gamma carboxyglutamate protein 1 (Bglap1), transcript variant 1, mRNA.	NM_007541.2	2,0724595
EG433016	predicted gene, EG433016 (EG433016), mRNA.	NM_001082547.1	2,0668252
Prpc *	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) (Prpc), mRNA.	NM_028243.2	2,0494504
Stfa2	stefin A2 (Stfa2), mRNA. XM_148531 XM_915403	NM_001082545.1	2,0041835
Uap1l1 *	UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1 (Uap1l1), mRNA. XM_918982	NM_001033293.2	1,9919231
Bglap1	bone gamma carboxyglutamate protein 1 (Bglap1), transcript variant 2, mRNA.	NM_001037939.1	1,9584957
BC100530	cDNA sequence BC100530 (BC100530), mRNA.	NM_001082546.1	1,9503134
Lcn2	lipocalin 2 (Lcn2), mRNA.	NM_008491.1	1,8926641
Ndufb10 *	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	XM_128594.4	1,886061
Ndg2	Nur77 downstream gene 2 (Ndg2), mRNA.	NM_175329.3	1,8630484
Mt1	metallothionein 1 (Mt1), mRNA.	NM_013602.2	1,8605396
Retnlg	resistin like gamma (Retnlg), mRNA.	NM_181596.3	1,8494369
Bglap-rs1	bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1 (Bglap-rs1), mRNA.	NM_031368.3	1,8316761
Ctsc	cathepsin C (Ctsc), mRNA.	NM_009982.3	1,8104335
Traf1		AK089281	1,8027176
Myl1	myosin, light polypeptide 1 (Myl1), mRNA.	NM_021285.1	1,7821151
LOC100047583	PREDICTED: similar to apolipoprotein D (LOC100047583), mRNA.	XM_001479138.1	1,7607542
Ctsc	cathepsin C (Ctsc), mRNA.	NM_009982.2	1,7558347
Cd52	CD52 antigen (Cd52), mRNA.	NM_013706.1	1,7311577
Bglap-rs1	bone gamma-carboxyglutamate protein, related sequence 1 (Bglap-rs1), mRNA.	NM_031368.3	1,7289149
Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle (Mylpf), mRNA.	NM_016754.3	1,7198484

Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor (Csf1r), mRNA.	NM_001037859.2	1,7094725
Tens1		XM_109868	1,7016845
Zic4 *	zinc finger protein of the cerebellum 4 (Zic4), mRNA.	NM_009576.2	1,7009163
Bglap2	bone gamma-carboxyglutamate protein 2 (Bglap2), mRNA.	NM_001032298.2	1,694859
Myh8	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal (Myh8), mRNA.	NM_177369.3	1,694602
Mylpf	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle (Mylpf), mRNA.	NM_016754.3	1,6689656
Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor (Csf1r), mRNA.	NM_001037859.2	1,6674254
Lyzs	lysozyme (Lyzs), mRNA.	NM_017372.2	1,6558753
Adssl1	adenylosuccinate synthetase like 1 (Adssl1), mRNA.	NM_007421.1	1,6550156
LOC244710	PREDICTED: similar to eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (LOC244710), misc RNA.	XR_031556.1	1,6507219
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene (Fos), mRNA.	NM_010234.2	1,6492558
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle (Acta1), mRNA.	NM_009606.2	1,6421822
Dok3	docking protein 3 (Dok3), mRNA.	NM_013739.2	1,6402601
Tpm2	tropomyosin 2, beta (Tpm2), mRNA.	NM_009416.3	1,624677
Lat	linker for activation of T cells (Lat), mRNA.	NM_010689.2	1,6192
Atp2a1	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1 (Atp2a1), mRNA.	NM_007504.2	1,6138823
mt-Nd5			1,6129987
Lcp1	lymphocyte cytosolic protein 1 (Lcp1), mRNA.	NM_008879.3	1,6094463
EG382843	PREDICTED: predicted gene, EG382843 (EG382843), mRNA.	XM_905000.3	1,6083072
1500010G04Rik		NM_173366.1	1,6014322
Des	desmin (Des), mRNA.	NM_010043.1	1,5993297
Lrrc59	leucine rich repeat containing 59 (Lrrc59), mRNA.	NM_133807.1	1,5937958
Rnd3	Rho family GTPase 3 (Rnd3), mRNA.	NM_028810.2	1,581476
Myl1	myosin, light polypeptide 1 (Myl1), mRNA.	NM_021285.2	1,5791196
Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein (Sparc), mRNA.	NM_009242.3	1,5767773
Wdr89	PREDICTED: WD repeat domain 89, transcript variant 2 (Wdr89), mRNA.	XM_001479426.1	1,5732923
Mpo	myeloperoxidase (Mpo), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	NM_010824.1	1,5732381
Rusc2	RUN and SH3 domain containing 2 (Rusc2), transcript variant 1, mRNA.	NM_199057.2	1,5721644
Sln	sarcolipin (Sln), mRNA.	NM_025540.2	1,5711842
Igsf10	PREDICTED: immunoglobulin superfamily, member 10, transcript variant 4 (Igsf10), mRNA.	XM_913941.2	1,5698342
Rbm13	RNA binding motif protein 13 (Rbm13), mRNA.	NM_026453.1	1,5680599
Actn2		NM_033268.2	1,56766
Tens1		XM_109868	1,5648888
Aoc3 *	amine oxidase, copper containing 3 (Aoc3), mRNA.	NM_009675.1	1,561671
Lyz	lysozyme (Lyz), mRNA.	NM_013590.2	1,5609878
Cdkn2b *	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) (Cdkn2b), mRNA.	NM_007670.3	1,5577897

Fxyd5	FXYD domain-containing ion transport regulator 5 (Fxyd5), mRNA.	NM_008761.2	1,555957
EG384525	PREDICTED: predicted gene, EG384525 (EG384525), mRNA.	XM_912340.3	1,555867
Myh8	myosin, heavy polypeptide 8, skeletal muscle, perinatal (Myh8), mRNA.	NM_177369.3	1,5495965
H1f0	H1 histone family, member 0 (H1f0), mRNA.	NM_008197.3	1,5484447
Myh3	PREDICTED: myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic (Myh3), mRNA.	XM_908146.3	1,5479172
Dm15		NM_032418	1,5463932
Tm7sf4	transmembrane 7 superfamily member 4 (Tm7sf4), mRNA.	NM_029422.3	1,5447718
Junb	Jun-B oncogene (Junb), mRNA.	NM_008416.1	1,5411572
Hexb *	hexosaminidase B (Hexb), mRNA.	NM_010422.1	1,5409776
Cox7a2l		XM_123188.1	1,5408226
Tgfb1i1 *	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (Tgfb1i1), mRNA.	NM_009365.2	1,5394957
Ush2a	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild) homolog (human) (Ush2a), mRNA.	NM_021408.2	1,5372852
2010005H15Rik	RIKEN cDNA 2010005H15 gene (2010005H15Rik), mRNA.	NM_029733.2	1,5308805
Ctsc	cathepsin C (Ctsc), mRNA.	NM_009982.2	1,5295594
Tspan4 *	tetraspanin 4 (Tspan4), mRNA.	NM_053082.2	1,5267582
Rbp7	retinol binding protein 7, cellular (Rbp7), mRNA.	NM_022020.2	1,5258255
LOC384538		XM_357700.1	1,524247
LOC383706		XM_357197.1	1,520012
Cpxm1	carboxypeptidase X 1 (M14 family) (Cpxm1), mRNA.	NM_019696.1	1,518263
Tnnc2	troponin C2, fast (Tnnc2), mRNA.	NM_009394.2	1,5181416
Gpr137b-ps	G protein-coupled receptor 137B, pseudogene (Gpr137b-ps) on chromosome 13.	NR_003568.1	1,5130135
Actb	actin, beta, cytoplasmic (Actb), mRNA.	NM_007393.3	1,5130005
Whrn	whirlin (Whrn), transcript variant 3, mRNA.	NM_001008792.1	1,5113591
scl000959.1_2		BC059087.1	1,5104125
Plvap	plasmalemma vesicle associated protein (Plvap), mRNA.	NM_032398.1	1,5011681
Pfn2	profilin 2 (Pfn2), mRNA.	NM_019410.2	-1,5000615
Camk2b	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta (Camk2b), mRNA.	NM_007595.3	-1,5014741
Dhcr24		XM_131538.1	-1,5028405
Hmgn1	high mobility group nucleosomal binding domain 1 (Hmgn1), mRNA.	NM_008251.3	-1,5037048
Ppp2r4 *	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	NM_138748	-1,5047972
Ddx26		AK051573	-1,5053339
Gabrb3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 3 (Gabrb3), transcript variant 2, mRNA.	NM_001038701.1	-1,5087581
Elavl2	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B) (Elavl2), transcript variant 3, mRNA.	NM_207686.1	-1,5104529
Stmn3	stathmin-like 3 (Stmn3), mRNA.	NM_009133.3	-1,5109985
Homer1 *	homer homolog 1 (Drosophila) (Homer1), transcript variant d, mRNA.	NM_152134.1	-1,5116445

Tubb2b	tubulin, beta 2b (Tubb2b), mRNA.	NM_023716.1	-1,5146371
Dlgap1 *	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 (Dlgap1), mRNA.	NM_177639.5	-1,5168939
Ctnna2	catenin (cadherin associated protein), alpha 2 (Ctnna2), transcript variant 2, mRNA.	NM_009819.1	-1,5177268
Gad1	glutamic acid decarboxylase 1 (Gad1), mRNA.	NM_008077.4	-1,5181367
Kif5a *	kinesin family member 5A (Kif5a), transcript variant 2, mRNA.	NM_001039000.1	-1,5189589
LOC633016	PREDICTED: similar to Chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila), transcript variant 2 (LOC633016), mRNA.	XM_921371.2	-1,5194273
Cbx3		NM_007624	-1,520013
Csmd2			-1,5206273
Pcdha7	protocadherin alpha 7 (Pcdha7), mRNA.	NM_009957.1	-1,5207427
Dusp16	dual specificity phosphatase 16 (Dusp16), transcript variant B1, mRNA.	NM_001048054.1	-1,5240363
C030014C12Rik			-1,5286092
Tubb2b	tubulin, beta 2b (Tubb2b), mRNA.	NM_023716.2	-1,5325266
4921533L14Rik	RIKEN cDNA 4921533L14 gene (4921533L14Rik), mRNA.	NM_026604.3	-1,5332997
Sox6 *		AK084290	-1,5356771
Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit (p35) 1 (Cdk5r1), mRNA.	NM_009871.2	-1,5368524
E030026I10Rik		NM_175553	-1,5407374
6330403K07Rik	RIKEN cDNA 6330403K07 gene (6330403K07Rik), mRNA.	NM_134022.2	-1,5424149
Bmper	BMP-binding endothelial regulator (Bmper), mRNA.	NM_028472.1	-1,5430752
Ddx6 *	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6 (Ddx6), mRNA.	NM_007841.3	-1,5476592
Syt16	synaptotagmin XVI (Syt16), mRNA.	NM_172804.2	-1,5489913
Diras1	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1 (Diras1), mRNA.	NM_145217.2	-1,5514741
Sfrs2 *	splicing factor, arginine/serine-rich 2 (SC-35) (Sfrs2), mRNA.	NM_011358.1	-1,5522097
Nsg2	neuron specific gene family member 2 (Nsg2), mRNA.	NM_008741.1	-1,5573281
Rab6	RAB6, member RAS oncogene family (Rab6), mRNA.	NM_024287.3	-1,5641236
Fmo1		AK042457	-1,5643525
B3gat1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P) (B3gat1), mRNA.	NM_029792.1	-1,5672266
Kif23 *	kinesin family member 23 (Kif23), mRNA.	NM_024245.3	-1,568789
Svop	SV2 related protein (Svop), mRNA.	NM_026805.1	-1,5711812
2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene (2810417H13Rik), mRNA.	NM_026515.2	-1,5714577
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3 (Rufy3), mRNA.	NM_027530.2	-1,5775238
Sqle *	squalene epoxidase (Sqle), mRNA.	NM_009270.3	-1,5860791
scl000710.1_2295 *		AF343877.1	-1,5937237
2900072M03Rik			-1,5940399
Sox11	SRY-box containing gene 11 (Sox11), mRNA.	NM_009234.5	-1,6005961
Uap1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 (Uap1), mRNA.	NM_133806.4	-1,6012818
Col12a1	collagen, type XII, alpha 1 (Col12a1), mRNA.	NM_007730.2	-1,6050428
Tmem130	transmembrane protein 130 (Tmem130), mRNA.	NM_177735.4	-1,6072737

Foxg1	forkhead box G1 (Foxg1), mRNA.	NM_008241.1	-1,6113981
Gh	growth hormone (Gh), mRNA.	NM_008117.2	-1,6124655
Reln	reelin (Reln), mRNA.	NM_011261.2	-1,6237556
Npm3	nucleoplasmin 3 (Npm3), mRNA.	NM_008723.1	-1,6245972
Fdps	farnesyl diphosphate synthetase (Fdps), mRNA.	NM_134469.3	-1,6336005
Kif5c	kinesin family member 5C (Kif5c), mRNA.	NM_008449.2	-1,637546
Nfib		AK089127	-1,6397959
6330503K22Rik *	RIKEN cDNA 6330503K22 gene (6330503K22Rik), mRNA.	NM_182995.1	-1,6493754
2600009P04Rik			-1,654099
Dpysl5	dihydropyrimidinase-like 5 (Dpysl5), mRNA.	NM_023047.2	-1,6629112
A2bp1		NM_021477.2	-1,6645904
Gabrb3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit beta 3 (Gabrb3), transcript variant 2, mRNA.	NM_001038701.1	-1,6700448
Gpm6a	glycoprotein m6a (Gpm6a), mRNA.	NM_153581.2	-1,6754043
Tsg101 *	tumor susceptibility gene 101 (Tsg101), mRNA.	NM_021884.3	-1,6830608
Pitx2 *	paired-like homeodomain transcription factor 2 (Pitx2), transcript variant 2, mRNA.	NM_011098.3	-1,6930987
Dusp16	dual specificity phosphatase 16 (Dusp16), transcript variant B1, mRNA.	NM_001048054.1	-1,6941146
Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (Acat2), mRNA.	NM_009338.3	-1,6950779
Srp9	signal recognition particle 9 (Srp9), mRNA.	NM_012058.2	-1,6950821
Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3 (Rufy3), mRNA.	NM_027530.2	-1,6961386
LOC381283		XM_358544.1	-1,7047585
Bex2	PREDICTED: brain expressed X-linked 2 (Bex2), mRNA.	XM_977338.1	-1,7063789
Cplx1	complexin 1 (Cplx1), mRNA.	NM_007756.2	-1,710309
Ppp2r2b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform (Ppp2r2b), transcript variant 2, mRNA.	NM_028392.2	-1,7295539
Elovl6 *	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast) (Elovl6), mRNA.	NM_130450.2	-1,7367722
LOC100041516	PREDICTED: similar to 4933409K07Rik protein (LOC100041516), misc RNA.	XR_031127.1	-1,7397221
Sec23ip	Sec23 interacting protein (Sec23ip), mRNA.	NM_001029982.1	-1,7535136
Rtn1 *	reticulon 1 (Rtn1), transcript variant 2, mRNA.	NM_001007596.1	-1,7570714
Rps13 *	ribosomal protein S13	NM_026533	-1,7581595
Wnt10a *	wingless related MMTV integration site 10a (Wnt10a), mRNA.	NM_009518.1	-1,7681103
Myt1l	myelin transcription factor 1-like (Myt1l), transcript variant 2, mRNA.	NM_008666.3	-1,7781323
Dcx	doublecortin (Dcx), transcript variant 4, mRNA.	NM_010025.2	-1,8118438
Gria2		NM_013540	-1,8715764
Zcchc18	zinc finger, CCHC domain containing 18 (Zcchc18), transcript variant 3, mRNA.	NM_025893.2	-1,8855425
Sc4mol *	sterol-C4-methyl oxidase-like (Sc4mol), mRNA.	NM_025436.1	-1,8903701
Dcx	doublecortin (Dcx), transcript variant 4, mRNA.	NM_010025.2	-1,9049705
Syt1		NM_009306	-1,9513296
Crmp1	collapsin response mediator protein 1 (Crmp1), mRNA.	NM_007765.3	-1,9860394

Mpped1	metallophosphoesterase domain containing 1 (Mpped1), mRNA.	NM_172610.1	-2,013788
6330407J23Rik	RIKEN cDNA 6330407J23 gene (6330407J23Rik), mRNA.	NM_026138.2	-2,020212
Rtn1	reticulon 1 (Rtn1), transcript variant 1, mRNA.	NM_153457.6	-2,037926
Syt4	synaptotagmin IV (Syt4), mRNA.	NM_009308.3	-2,0563104
scl0002540.1_6		AK019418.1	-2,0577478
Nsg2 *	neuron specific gene family member 2 (Nsg2), mRNA.	NM_008741.1	-2,058064
3110018K01Rik			-2,0996466
Rtn1	reticulon 1 (Rtn1), transcript variant 2, mRNA.	NM_001007596.1	-2,1067226
Fgfr1op2	FGFR1 oncogene partner 2 (Fgfr1op2), mRNA.	NM_026218.2	-2,1184523
Mtap2	microtubule-associated protein 2 (Mtap2), transcript variant 2, mRNA. XM_901527 XM_901529 XM_901531 XM_901532 XM_901536 XM_901538 XM_901540	NM_008632.2	-2,1351492
Tubb2b	tubulin, beta 2b (Tubb2b), mRNA.	NM_023716.2	-2,2117038
Stmn2 *	stathmin-like 2 (Stmn2), mRNA.	NM_025285.2	-2,2322474
Rtn1	reticulon 1 (Rtn1), transcript variant 1, mRNA.	NM_153457.6	-2,549329
Mapt		NM_010838.2	-2,636008

*Genes presentes na lista de 31 transcritos.

Tabela 6: Lista de 488 transcritos diferencialmente expressos nos tecidos de suturas coronais de animais $Fgfr2^{C342Y} / +$ em comparação com este mesmo tecido em animais selvagens. Os transcritos foram ordenados por *Fold Change*.

Gene (Símbolo oficial)	Nome do gene	Número de acesso	Fold Change
Picalm *	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	NM_146194	2,223338
Prp *	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) (Prp), mRNA.	NM_028243.2	2,0494504
Uap1l1 *	UDP-N-acteylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1 (Uap1l1), mRNA. XM_918982	NM_001033293.2	1,9919231
Ndufb10 *	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	XM_128594.4	1,886061
LOC100047583 *	PREDICTED: similar to apolipoprotein D (LOC100047583), mRNA.	XM_001479138.1	1,7607542
Zic4 *	zinc finger protein of the cerebellum 4 (Zic4), mRNA.	NM_009576.2	1,7009163
Aoc3 *	amine oxidase, copper containing 3 (Aoc3), mRNA.	NM_009675.1	1,561671
Cdkn2b *	amine oxidase, copper containing 3 (Aoc3), mRNA.	NM_007670.3	1,5577897
Hexb *	hexosaminidase B (Hexb), mRNA.	NM_010422.1	1,5409776
Tgfb1i1 *	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 (Tgfb1i1), mRNA.	NM_009365.2	1,5394957
Tspan4 *	tetraspanin 4 (Tspan4), mRNA.	NM_053082.2	1,5267582
Rtkn2	rhotekin 2 (Rtkn2), mRNA.	NM_001081346.1	1,4742491
Tmem134	transmembrane protein 134 (Tmem134), transcript variant 1, mRNA.	NM_001078649.1	1,4550773
Slc29a1		BC004828	1,4422225

Wtip	WT1-interacting protein (Wtip), mRNA.	NM_207212.2	1,437013
Nog	noggin (Nog), mRNA.	NM_008711.1	1,4361483
Il12a	interleukin 12a (Il12a), mRNA.	NM_008351.1	1,4293501
Anxa8	annexin A8 (Anxa8), mRNA.	NM_013473.3	1,4288445
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1 (Aldh3a1), mRNA.	NM_007436.1	1,422506
Pik3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta) (Pik3r2), mRNA.	NM_008841.1	1,4189326
St6galnac4	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4 (St6galnac4), mRNA.	NM_011373.2	1,4122725
Calcoco1	calcium binding and coiled coil domain 1 (Calcoco1), mRNA.	NM_026192.2	1,4114555
3300001P08Rik	RIKEN cDNA 3300001P08 gene (3300001P08Rik), mRNA.	NM_026313.1	1,4004817
Cc2d1a	coiled-coil and C2 domain containing 1A (Cc2d1a), mRNA.	NM_145970.1	1,3985149
Tspan17	tetraspanin 17 (Tspan17), mRNA.	NM_028841.2	1,3983786
Ccbl1	cysteine conjugate-beta lyase 1 (Ccbl1), mRNA.	NM_172404.2	1,3971198
Abi3		NM_025659	1,3930756
Aqp1	aquaporin 1 (Aqp1), mRNA.	NM_007472.1	1,3868462
Prg4		XM_355243.1	1,3863827
Svil	supervillin (Svil), transcript variant 1, mRNA.	NM_153153.1	1,3829421
Decr1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial (Decr1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	NM_026172.3	1,3697637
Plekhf1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1 (Plekhf1), mRNA.	NM_024413.1	1,3647289
Tmem53	transmembrane protein 53 (Tmem53), mRNA.	NM_026837.1	1,3627632
Fbxo9	f-box protein 9 (Fbxo9), transcript variant 1, mRNA.	NM_023605.2	1,3610166
Hvcn1	hydrogen voltage-gated channel 1 (Hvcn1), transcript variant 1, mRNA.	NM_001042489.1	1,3581285
E030024L06Rik		AK053170	1,3559331
Ppp2r2c	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), gamma isoform (Ppp2r2c), mRNA.	NM_172994.2	1,3545517
Pofut1	protein O-fucosyltransferase 1 (Pofut1), transcript variant 2, mRNA.	NM_001039055.1	1,3543934
Hdac5	histone deacetylase 5 (Hdac5), transcript variant 1, mRNA.	NM_001077696.1	1,3511165
Cfp	complement factor properdin (Cfp), mRNA.	NM_008823.3	1,350541
2900097C17Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2900097C17 gene (2900097C17Rik), mRNA.	XM_001480665.1	1,3375919
C230030N03Rik		NM_172847.1	1,3258563
Dgka	diacylglycerol kinase, alpha (Dgka), mRNA.	NM_016811.2	1,3257688
4933404K08Rik			1,320614
Stap2	signal transducing adaptor family member 2 (Stap2), mRNA.	NM_145934.1	1,3150765
Gps2	G protein pathway suppressor 2 (Gps2), mRNA.	NM_019726.3	1,3149091
Trpc4ap	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein (Trpc4ap), mRNA.	NM_019828.1	1,3142622
St6galnac2	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2 (St6galnac2), mRNA.	NM_009180.3	1,3123012

Lepre1	leprecan 1 (Lepre1), transcript variant 1, mRNA.	NM_019782.2	1,3121643
Msrb2	methionine sulfoxide reductase B2 (Msrb2), mRNA.	NM_029619.2	1,3118199
Ppfia1	PREDICTED: protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein, alpha 1, transcript variant 1 (Ppfia1), mRNA.	XM_133979.7	1,3034719
Gatad1	GATA zinc finger domain containing 1 (Gatad1), mRNA.	NM_026033.1	1,3028874
LOC677551	PREDICTED: similar to Ribosomal protein L19 (LOC677551), misc RNA.	XR_005084.2	1,3007795
A530026G17		XM_488731	1,298917
Klc4	kinesin light chain 4 (Klc4), mRNA.	NM_029091.2	1,2973238
Galm	galactose mutarotase (Galm), mRNA.	NM_176963.4	1,2959372
mt-Atp6			1,2957616
Elf3	E74-like factor 3 (Elf3), mRNA.	NM_007921.2	1,2949146
Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell (Nos3), mRNA.	NM_008713.2	1,2932043
Apba3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3 (Apba3), mRNA.	NM_018758.1	1,2928853
Csnk1d	casein kinase 1, delta (Csnk1d), transcript variant 2, mRNA.	NM_027874.2	1,2924778
Eps15l1	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1 (Eps15l1), mRNA.	NM_007944.2	1,2918955
Snx25	sorting nexin 25 (Snx25), mRNA.	NM_207213.1	1,2917069
Lgr6	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6 (Lgr6), mRNA.	NM_001033409.3	1,2914808
scl0001379.1_70		AK049469.1	1,2897419
Paox	polyamine oxidase (exo-N4-amino) (Paox), mRNA.	NM_153783.4	1,2874262
Ppp1cc	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform (Ppp1cc), mRNA.	NM_013636.3	1,2866694
BC039210	PREDICTED: cDNA sequence BC039210 (BC039210), mRNA.	XM_001481316.1	1,2861687
Tapbp	TAP binding protein (Tapbp), transcript variant 1, mRNA.	NM_001025313.1	1,2850729
Larp6	La ribonucleoprotein domain family, member 6 (Larp6), mRNA.	NM_026235.4	1,2831049
Ccdc114	coiled-coil domain containing 114 (Ccdc114), mRNA. XM_925312	NM_001033243.2	1,2810726
scl0003155.1_68			1,279672
Pdlim2	PDZ and LIM domain 2 (Pdlim2), mRNA.	NM_145978.1	1,276022
4930429B21Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930429B21 gene (4930429B21Rik), misc RNA.	XR_035269.1	1,2746679
Ccdc84	coiled-coil domain containing 84 (Ccdc84), mRNA.	NM_201372.3	1,2743111
H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1 (H2-Ab1), mRNA.	NM_207105.2	1,2733732
Tsc2	tuberous sclerosis 2 (Tsc2), transcript variant 2, mRNA.	NM_001039363.1	1,2717394
Pon3	paraoxonase 3 (Pon3), mRNA.	NM_173006.1	1,2689741
Rin3	Ras and Rab interactor 3 (Rin3), mRNA.	NM_177620.3	1,2674665
Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase (Wars), mRNA.	NM_011710.2	1,2671001
EG384814	predicted gene, EG384814 (EG384814), mRNA.	NM_001079931.1	1,2668616
H6pd	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase) (H6pd), mRNA.	NM_173371.3	1,2638859
Defb25	defensin beta 25 (Defb25), mRNA.	NM_001039122.1	1,2632887
Trim21		NM_009277.2	1,2631785

Eif3h	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H (Eif3h), mRNA.	NM_080635.1	1,2622949
Spna1	spectrin alpha 1 (Spna1), mRNA.	NM_011465.3	1,2607632
Zfp553	zinc finger protein 553 (Zfp553), mRNA.	NM_146201.1	1,2599943
Dnd1	dead end homolog 1 (zebrafish) (Dnd1), mRNA.	NM_173383.1	1,2571205
Relt	RELt tumor necrosis factor receptor (Relt), mRNA.	NM_177073.5	1,25612
4833413E03Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4833413E03 gene (4833413E03Rik), mRNA.	XM_001472513.1	1,2544428
Ptprs	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S (Ptprs), mRNA.	NM_011218.1	1,2538191
Sybl1	synaptobrevin like 1 (Sybl1), mRNA.	NM_011515.3	1,2528647
D630023B12Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA D630023B12 gene (D630023B12Rik), mRNA.	XM_907047.3	1,2513151
Olfr707	olfactory receptor 707 (Olfr707), mRNA.	NM_001005570.2	1,251046
LOC386094		XM_359067.1	1,2508487
Zfp622	zinc finger protein 622 (Zfp622), mRNA.	NM_144523.2	1,2502192
LOC100047273	PREDICTED: hypothetical protein LOC100047273 (LOC100047273), mRNA.	XM_001478032.1	1,2486035
BC063749	cDNA sequence BC063749 (BC063749), mRNA.	NM_001001738.2	1,24844
AW554918	expressed sequence AW554918 (AW554918), mRNA.	NM_001033532.2	1,2477849
Naaladl1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1 (Naaladl1), mRNA.	NM_001009546.1	1,2444669
Tmem88	transmembrane protein 88 (Tmem88), mRNA.	NM_025915.2	1,2433445
8430403M15Rik		NM_175314.2	1,2428112
B4galt3	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 3 (B4galt3), mRNA.	NM_020579.1	1,2427005
LOC675572	PREDICTED: hypothetical LOC675572 (LOC675572), mRNA.	XM_001481199.1	1,2425826
D630023F18Rik	RIKEN cDNA D630023F18 gene (D630023F18Rik), mRNA.	NM_175293.3	1,241791
0610037B23Rik		AK002767	1,2415961
2900060N12Rik		NM_183095.1	1,2411603
Ptpla	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member a (Ptpla), transcript variant 2, mRNA.	NM_001012396.2	1,24113
Tm4sf1		NM_008536.2	1,2407584
Fbxw4	F-box and WD-40 domain protein 4 (Fbxw4), mRNA.	NM_013907.2	1,2402925
Sh3tc1	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1 (Sh3tc1), mRNA.	NM_194344.1	1,238936
Reg3b	regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b), mRNA.	NM_011036.1	1,2387159
Specc1	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1 (Specc1), mRNA.	NM_001029936.2	1,2364674
9530066K23Rik	RIKEN cDNA 9530066K23 gene (9530066K23Rik), mRNA.	NM_172524.1	1,2363143
Ube3a	ubiquitin protein ligase E3A (Ube3a), transcript variant 3, mRNA.	NM_001033962.1	1,236117
Il18bp		NM_010531	1,2358333
Kcns3	potassium voltage-gated channel, delayed-rectifier, subfamily S, member 3 (Kcns3), mRNA.	NM_173417.2	1,2337435
Asb7	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 7 (Asb7), transcript variant 2, mRNA.	NM_178236.3	1,2336019
Olfr374	olfactory receptor 374 (Olfr374), mRNA.	NM_146338.1	1,2333992

Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N (Serpina3n), mRNA.	NM_009252.2	1,2329819
Rap1gap	Rap1 GTPase-activating protein (Rap1gap), mRNA.	NM_001081155.1	1,232661
Syf2	SYF2 homolog, RNA splicing factor (<i>S. cerevisiae</i>) (Syf2), mRNA.	NM_026780.1	1,2315882
Myh11	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle (Myh11), mRNA.	NM_013607.1	1,2311822
Olfr313		NM_146536	1,2289764
Sharpin	SHANK-associated RH domain interacting protein (Sharpin), mRNA.	NM_025340.1	1,2260629
Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3 (Bcl3), mRNA.	NM_033601.1	1,2252684
Tbc1d22a	TBC1 domain family, member 22a (Tbc1d22a), mRNA.	NM_145476.2	1,2246231
Ankrd50	ankrin repeat domain 50 (Ankrd50), mRNA.	NM_001033198.2	1,2246084
Vps37b	vacuolar protein sorting 37B (yeast) (Vps37b), mRNA.	NM_177876.4	1,2235514
2510039O18Rik	RIKEN cDNA 2510039O18 gene (2510039O18Rik), mRNA.	NM_029841.2	1,2226957
Irf1	interferon regulatory factor 1 (Irf1), mRNA.	NM_008390.1	1,2226007
2310047D07Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2310047D07 gene (2310047D07Rik), mRNA.	XM_975744.1	1,2225243
2700007P21Rik	RIKEN cDNA 2700007P21 gene (2700007P21Rik), transcript variant 2, mRNA.	NM_173750.2	1,2221825
H2-DMb1	histocompatibility 2, class II, locus Mb1 (H2-DMb1), mRNA.	NM_010387.2	1,2217925
Twf2	twinfilin, actin-binding protein, homolog 2 (<i>Drosophila</i>) (Twf2), mRNA.	NM_011876.3	1,2212552
Tspyl4	TSPY-like 4 (Tspyl4), mRNA.	NM_030203.2	1,2210222
LOC386277		XM_359154.1	1,2207358
Il15	interleukin 15 (Il15), mRNA.	NM_008357.1	1,2205514
Usp12	ubiquitin specific peptidase 12 (Usp12), mRNA.	NM_011669.3	1,2202884
D130027A21Rik		AK051268	1,2201034
Rpl23	ribosomal protein L23 (Rpl23), mRNA.	NM_022891.2	1,2197794
Xtrp3s1	X transporter protein 3 similar 1 gene (Xtrp3s1), mRNA.	NM_139142.1	1,2191675
Serpina5	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 5 (Serpina5), mRNA.	NM_172953.1	1,2187095
A730049K22Rik		AK043033	1,217455
Serpinc1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1 (Serpinc1), mRNA.	NM_080844.2	1,2167927
Zfp385c	zinc finger protein 385C (Zfp385c), mRNA.	NM_177790.3	1,2165352
LOC100039590	PREDICTED: similar to transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa) (LOC100039590), mRNA.	XM_001473149.1	1,2161263
4930579M01Rik		XM_150070.1	1,2159387
C230012D11Rik		AK048705	1,2158006
Edg3	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3 (Edg3), mRNA.	NM_010101.2	1,2146428
4930414F18Rik		XM_488766	1,214348
4632427K15Rik		AK076297	1,2138722
Gjc2	gap junction protein, gamma 2 (Gjc2), transcript variant 2, mRNA.	NM_175452.3	1,213613
Olfr1198	olfactory receptor 1198 (Olfr1198), mRNA.	NM_207567.1	1,2130648
Dhfr	dihydrofolate reductase (Dhfr), mRNA.	NM_010049.3	1,2130306

H2-T18			1,2129061
Capn8	calpain 8 (Capn8), mRNA.	NM_130890.1	1,2122498
Tmem176b	transmembrane protein 176B (Tmem176b), mRNA.	NM_023056.3	1,2107283
Afmid	arylformamidase (Afmid), mRNA.	NM_027827.2	1,2091774
Cnot10	CCR4-NOT transcription complex, subunit 10 (Cnot10), mRNA.	NM_153585.4	1,2087562
E130308A19Rik	RIKEN cDNA E130308A19 gene (E130308A19Rik), transcript variant 2, mRNA.	NM_001015681.1	1,2083141
Chek1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe) (Chek1), mRNA.	NM_007691.4	1,2079127
Art2b	ADP-ribosyltransferase 2b (Art2b), mRNA.	NM_019915.2	1,2076079
Dkc1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin homolog (human) (Dkc1), mRNA.	NM_001030307.1	1,2072487
Spic	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1 related) (Spic), mRNA.	NM_011461.2	1,2071877
Gng5		NM_010318.1	1,2071773
5830411E10Rik		NM_028696	1,2071657
EG666387	PREDICTED: predicted gene, EG666387 (EG666387), mRNA.	XM_983525.1	1,2066793
Foxo3a	forkhead box O3a (Foxo3a), mRNA.	NM_019740.2	1,2064652
Ccdc142	coiled-coil domain containing 142 (Ccdc142), mRNA.	NM_001081266.1	1,2064455
Cbx4	chromobox homolog 4 (Drosophila Pc class) (Cbx4), mRNA.	NM_007625.1	1,2058291
4933414I19Rik		AK077156	1,2056884
Daam1	dishevelled associated activator of morphogenesis 1 (Daam1), transcript variant 1, mRNA.	NM_026102.2	1,2052375
Rtn3	reticulon 3 (Rtn3), transcript variant 1, mRNA.	NM_001003934.1	1,204932
Olfr435	olfactory receptor 435 (Olfr435), mRNA.	NM_146653.1	1,2048104
LOC100046998	PREDICTED: similar to optic atrophy 1 (autosomal dominant) (LOC100046998), mRNA.	XM_001477204.1	1,2046264
9630009L01Rik		AK035840	1,2043107
Zfp142	zinc finger protein 142 (Zfp142), mRNA.	NM_029888.2	1,2042909
D930005D10Rik	RIKEN cDNA D930005D10 gene (D930005D10Rik), mRNA.	NM_178702.3	1,2034297
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb), mRNA.	NM_053110.3	1,2031322
Icosl		NM_015790.2	1,2026213
Mark3		NM_021516	1,2016821
LOC100048049	PREDICTED: similar to Regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression), transcript variant 1 (LOC100048049), mRNA.	XM_001479718.1	1,2004623
6530421E24Rik		NM_207280.1	-1,2005234
Dnajc5		NM_016775	-1,2012379
D730003L24Rik		AK085665	-1,201431
D930025M23Rik		AK053033	-1,2015066
Imp4	IMP4, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (yeast) (Imp4), mRNA.	NM_178601.2	-1,2015483
Siah1a	seven in absentia 1A (Siah1a), mRNA.	NM_009172.1	-1,2021405
Tnrc6a	trinucleotide repeat containing 6a (Tnrc6a), mRNA.	NM_144925.3	-1,2022047
LOC331295		XM_285610.1	-1,2032481
Mark3		NM_021516	-1,2032747
BC003993	cDNA sequence BC003993 (BC003993), mRNA.	NM_030560.3	-1,2033222

4933429H19Rik		AK016981	-1,2051783
9030225E01Rik		AK033491	-1,2052273
Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4 (Chrna4), mRNA.	NM_015730.4	-1,2052355
lhh	Indian hedgehog	AK090147	-1,2054204
C130020C13Rik			-1,2062362
BC065120		NM_183208	-1,2063123
Irf2bp2	PREDICTED: interferon regulatory factor 2 binding protein 2 (Irf2bp2), mRNA.	XM_001002526.2	-1,2069548
Galnt12	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2 (Galnt12), mRNA.	NM_030166.1	-1,2078426
4931403I22Rik		AK016428	-1,2080456
Rasa2	RAS p21 protein activator 2 (Rasa2), mRNA.	NM_053268.2	-1,2087023
2410078J06Rik		XM_356960	-1,2087959
Og9x		NM_008759.1	-1,2088479
Trrp5		AK038531	-1,2090583
Atp11c		XM_135900.3	-1,2093717
C230004F18Rik		NM_177916	-1,2098064
Gm684	PREDICTED: gene model 684, (NCBI) (Gm684), mRNA.	XM_924862.2	-1,2098253
Bfar	bifunctional apoptosis regulator (Bfar), mRNA.	NM_025976.1	-1,2111853
Rnf166		XM_134599.3	-1,2118895
C030026E19Rik			-1,2120148
Tmpo	thymopoietin (Tmpo), transcript variant 6, mRNA.	NM_001080134.1	-1,2121238
4930443G12Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930443G12 gene (4930443G12Rik), mRNA.	XM_910494.2	-1,2123334
2310007A19Rik	RIKEN cDNA 2310007A19 gene (2310007A19Rik), mRNA.	NM_025506.2	-1,2126232
Gsg2	germ cell-specific gene 2 (Gsg2), mRNA.	NM_010353.1	-1,2126681
Cyb561d1		XM_485295	-1,2128702
Rab1b	RAB1B, member RAS oncogene family (Rab1b), mRNA.	NM_029576.1	-1,2129407
Slc9a6	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 6 (Slc9a6), mRNA.	NM_172780.1	-1,2140492
EG330503	predicted gene, EG330503 (EG330503), mRNA.	NM_001033540.1	-1,2148315
4732460I02Rik			-1,2163019
Crem		NM_013498	-1,2164004
Wdr75	WD repeat domain 75 (Wdr75), mRNA. XM_899942 XM_899949 XM_905443 XM_919350 XM_919365 XM_919374 XM_919385 XM_919393 XM_919402	NM_028599.1	-1,2164637
Vti1a	vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A (yeast) (Vti1a), mRNA.	NM_016862.3	-1,2168379
A030011A13Rik			-1,2174236
Pnkd	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia (Pnkd), transcript variant 3, mRNA.	NM_001039509.1	-1,2174429
Klrb1b	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1B (Klrb1b), mRNA.	NM_008526.1	-1,2175695
Cxxc6		XM_125673.2	-1,2175967
9530002O20Rik			-1,2179807
LOC383303		XM_356974.1	-1,2184162
Slc27a1		NM_011977.2	-1,218438

Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2 (Kcnq2), transcript variant 12, mRNA.	NM_001006680.1	-1,2197422
A630076G18Rik		AK042261	-1,2198404
Setd2	SET domain containing 2 (Setd2), mRNA.	NM_001081340.1	-1,2213979
B930007L02Rik		XM_356186.1	-1,2217317
scl0078462.1_70		AK018879.1	-1,2224163
A630054L15Rik		NM_145969	-1,2226291
Hrh2	histamine receptor H2 (Hrh2), transcript variant 2, mRNA.	NM_008286.2	-1,2227265
Ulk4	PREDICTED: unc-51-like kinase 4 (C. elegans) (Ulk4), mRNA.	XM_001481114.1	-1,2232294
Wins2		NM_152815	-1,2245761
Gm1066	PREDICTED: gene model 1066, (NCBI) (Gm1066), mRNA.	XM_355758.5	-1,2266978
2310003P10Rik		NM_175145.2	-1,2275628
Nol10	nucleolar protein 10 (Nol10), mRNA.	NM_001008421.1	-1,227622
A930004J17Rik			-1,2283138
Pkd1l2	polycystic kidney disease 1 like 2 (Pkd1l2), mRNA.	NM_029686.1	-1,2283679
lfrd2	interferon-related developmental regulator 2 (lfrd2), mRNA.	NM_025903.1	-1,2287791
6720467C03Rik	RIKEN cDNA 6720467C03 gene (6720467C03Rik), mRNA.	NM_026558.2	-1,228793
Ccar1		NM_026201	-1,2293116
Tusc1	tumor suppressor candidate 1 (Tusc1), mRNA.	NM_026954.1	-1,2308441
Nhlrc1	NHL repeat containing 1 (Nhlrc1), mRNA.	NM_175340.3	-1,2309983
2810405F04Rik		AK012991	-1,2313244
Zfp184	zinc finger protein 184 (Kruppel-like) (Zfp184), mRNA.	NM_183014.1	-1,2314208
Agtpbp1		NM_023328	-1,2319525
Gal3st1	galactose-3-O-sulfotransferase 1 (Gal3st1), mRNA.	NM_016922.2	-1,2320111
Fem1c		NM_175117.2	-1,2328141
Prdx6-rs1	peroxiredoxin 6, related sequence 1 (Prdx6-rs1), mRNA.	NM_177256.3	-1,2330008
Ubiad1	UbiA prenyltransferase domain containing 1 (Ubiad1), mRNA.	NM_027873.2	-1,2335454
A730036D20Rik		AK042894	-1,2338748
Pnpla5		XM_128189.1	-1,2340175
Trim33	tripartite motif-containing 33 (Trim33), transcript variant 1, mRNA.	NM_053170.2	-1,2344458
Pcgf6	polycomb group ring finger 6 (Pcgf6), mRNA.	NM_027654.1	-1,2345308
1110037P13Rik		AK075652	-1,2353718
Olfr973	olfactory receptor 973 (Olfr973), mRNA.	NM_146613.1	-1,2359961
Syt6		NM_018800.1	-1,2369565
LOC100046035	PREDICTED: similar to ADAM23 (LOC100046035), mRNA.	XM_001475441.1	-1,2369951
Enc1	ectodermal-neural cortex 1 (Enc1), mRNA.	NM_007930.3	-1,238223
Adar	adenosine deaminase, RNA-specific (Adar), transcript variant 1, mRNA.	NM_001038587.2	-1,2384397
Denr	density-regulated protein (Denr), mRNA.	NM_026603.3	-1,239114
BC027231	cDNA sequence BC027231 (BC027231), mRNA.	NM_145972.3	-1,2394755
Tmem102	transmembrane protein 102 (Tmem102), mRNA.	NM_001033433.1	-1,2398851

Neto2	PREDICTED: neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2, transcript variant 8 (Neto2), mRNA.	XM_922064.2	-1,240753
Acly	ATP citrate lyase (Acly), mRNA.	NM_134037.2	-1,2410891
Gorasp2	golgi reassembly stacking protein 2 (Gorasp2), mRNA.	NM_027352.2	-1,2416245
Frmd4a		NM_172475	-1,2424572
EG434078	PREDICTED: predicted gene, EG434078 (EG434078), mRNA.	XM_924614.1	-1,2424709
Dnm1	dynamin 1 (Dnm1), mRNA.	NM_010065.2	-1,2441219
LOC381607		XM_355563.1	-1,245032
Man1a2	mannosidase, alpha, class 1A, member 2 (Man1a2), mRNA.	NM_010763.1	-1,2453917
1700109F18Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 1700109F18 gene (1700109F18Rik), mRNA.	XM_984549.1	-1,2458562
Tspan6	tetraspanin 6 (Tspan6), mRNA.	NM_019656.3	-1,2462721
ENSMUSG00000053178	predicted gene, ENSMUSG00000053178 (ENSMUSG00000053178), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	NM_001042670.1	-1,2474787
5330414O08Rik		NM_183270.1	-1,247603
8030481K01Rik		AK078781	-1,2486019
Rai1		NM_009021.1	-1,24934
Gpr17	G protein-coupled receptor 17 (Gpr17), mRNA.	NM_001025381.1	-1,2508359
Ncapd2	non-SMC condensin I complex, subunit D2 (Ncapd2), mRNA.	NM_146171.1	-1,2509636
Atxn2	ataxin 2 (Atxn2), mRNA.	NM_009125.2	-1,2520627
Ncapd2	non-SMC condensin I complex, subunit D2 (Ncapd2), mRNA.	NM_146171.1	-1,2524107
BC024659		XM_488673	-1,2537493
E230008O15Rik		AK053983	-1,2538785
Trim27	tripartite motif-containing 27 (Trim27), mRNA.	NM_009054.2	-1,254279
4733401H18Rik		NM_023247	-1,2550603
E330027G05Rik		AK054453	-1,256028
Setd7	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7 (Setd7), mRNA.	NM_080793.5	-1,2567651
Rdh1	retinol dehydrogenase 1 (all trans) (Rdh1), mRNA.	NM_080436.1	-1,258311
1190012C08Rik		AK028016	-1,2591213
A830015G10Rik		AK043648	-1,2597554
2310007F21Rik	RIKEN cDNA 2310007F21 gene (2310007F21Rik), mRNA.	NM_025857.1	-1,260145
9430034D17Rik		NM_029891.1	-1,2613883
Klf6	Kruppel-like factor 6 (Klf6), mRNA.	NM_011803.2	-1,2622018
2900097C17Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 2900097C17 gene (2900097C17Rik), mRNA.	XM_001480665.1	-1,2625055
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (Tiam1), mRNA.	NM_009384.2	-1,2628355
Athl1	ATH1, acid trehalase-like 1 (yeast) (Athl1), mRNA.	NM_145387.2	-1,2636573
Gsg1l	PREDICTED: GSG1-like (Gsg1l), mRNA.	XM_914623.2	-1,2641666
Golga4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4 (Golga4), mRNA.	NM_018748.3	-1,2643657
1700012K20Rik		AK005920	-1,2649791
Cul1		AK040053	-1,2651808
Fbp1	fructose biphosphatase 1 (Fbp1), mRNA.	NM_019395.2	-1,2664871
Arfrp1	ADP-ribosylation factor related protein 1 (Arfrp1), mRNA.	NM_029702.3	-1,267248

Tlcd1	TLC domain containing 1 (Tlcd1), mRNA.	NM_026708.1	-1,2676418
A430090G16Rik		AK040384	-1,2687395
LOC384663		XM_357775.1	-1,2691505
2700050C19Rik			-1,2693276
Pgls		AK054257	-1,2697207
Wdr77	WD repeat domain 77 (Wdr77), mRNA.	NM_027432.3	-1,269906
Nup133	nucleoporin 133 (Nup133), mRNA.	NM_172288.1	-1,2707499
C230096N03Rik		AK049071	-1,2721161
Fbxo17	F-box protein 17 (Fbxo17), mRNA.	NM_015796.1	-1,2739655
B230208H17Rik	RIKEN cDNA B230208H17 gene (B230208H17Rik), mRNA. XM_897418 XM_897429 XM_897439 XM_897452 XM_897459 XM_914394 XM_923230 XM_923233 XM_923237 XM_923239 XM_923241 XM_923243 XM_923244 XM_923249 XM_923252	NM_001024616.1	-1,2742085
Ddx20	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20 (Ddx20), mRNA.	NM_017397.2	-1,2756906
Zfp26		XM_134736	-1,2761265
Ube3c	ubiquitin protein ligase E3C (Ube3c), mRNA.	NM_133907.3	-1,2770953
Rpa1	replication protein A1 (Rpa1), mRNA.	NM_026653.1	-1,2775366
Polr1e	polymerase (RNA) I polypeptide E (Polr1e), mRNA.	NM_022811.2	-1,2775774
LOC100045708	PREDICTED: similar to hCG19301 (LOC100045708), mRNA.	XM_001474781.1	-1,2776512
Tnfaip8l1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1 (Tnfaip8l1), mRNA.	NM_025566.2	-1,2803063
C130002N06			-1,2808694
Tmem108	transmembrane protein 108 (Tmem108), mRNA.	NM_178638.2	-1,281262
Mfap4	microfibrillar-associated protein 4 (Mfap4), mRNA.	NM_029568.2	-1,281314
Nup50	nucleoporin 50 (Nup50), mRNA.	NM_016714.2	-1,282747
Rmnd5b	required for meiotic nuclear division 5 homolog B (S. cerevisiae) (Rmnd5b), mRNA.	NM_025346.1	-1,2827889
Fktn	fukutin (Fktn), mRNA.	NM_139309.4	-1,2832388
LOC332788		XM_285750.2	-1,2834264
Lrrfip2		XM_284541.1	-1,2835534
G430079N04Rik		AK090050	-1,2866721
Adamts4		NM_172845.1	-1,2871416
LOC100045228	PREDICTED: similar to neuroligin 3 (LOC100045228), mRNA.	XM_001473899.1	-1,2905298
Plekha5	pleckstrin homology domain containing, family A member 5 (Plekha5), mRNA.	NM_144920.3	-1,2924665
Akap8		AK030964	-1,2926193
Slc31a2		NM_025286.1	-1,2932208
Ppa2	pyrophosphatase (inorganic) 2 (Ppa2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	NM_146141.1	-1,2954161
Zmynd11	zinc finger, MYND domain containing 11 (Zmynd11), mRNA.	NM_144516.2	-1,2955109
N4bp2	NEDD4 binding protein 2 (N4bp2), mRNA.	NM_001024917.1	-1,2956071
B130017I01Rik		NM_172525	-1,2963493
Arglu1	arginine and glutamate rich 1 (Arglu1), mRNA.	NM_176849.3	-1,2976433
AU016693		NM_178686	-1,2982279
A330057G13Rik		AK039536	-1,2982287

Ippk	inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase (Ippk), mRNA.	NM_199056.2	-1,2986608
4930422G04Rik	PREDICTED: RIKEN cDNA 4930422G04 gene, transcript variant 2 (4930422G04Rik), mRNA.	XM_485308.4	-1,2990277
Akap9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9 (Akap9), mRNA.	NM_194462.2	-1,2994227
Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B (Bcl11b), transcript variant 2, mRNA.	NM_021399.2	-1,2994238
Fgf13	fibroblast growth factor 13 (Fgf13), mRNA. XM_919159	NM_010200.2	-1,2995307
Adora1	adenosine A1 receptor (Adora1), transcript variant 1, mRNA.	NM_001008533.2	-1,2997907
Srisnf2l		NM_030730	-1,3004929
9030013K10Rik		AK078840	-1,300721
Rab8b	RAB8B, member RAS oncogene family (Rab8b), mRNA.	NM_173413.2	-1,3026143
Eps15-rs		AK036728	-1,3043454
Txndc13	thioredoxin domain containing 13 (Txndc13), mRNA. XM_902134 XM_902137 XM_925631 XM_925632 XM_925633	NM_029148.1	-1,3046457
Rab3a		NM_009001.2	-1,3051778
Gprc5b	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B (Gprc5b), mRNA.	NM_022420.1	-1,3053826
Gys3		NM_008195	-1,3056678
Rbm12	RNA binding motif protein 12 (Rbm12), transcript variant 1, mRNA.	NM_029397.3	-1,306377
Wdr68	WD repeat domain 68 (Wdr68), mRNA.	NM_027946.3	-1,3066002
D930001I22Rik		NM_173397	-1,3084104
4631410M14Rik		AK028460	-1,3096703
Bbs5	Bardet-Biedl syndrome 5 (human) (Bbs5), mRNA.	NM_028284.2	-1,3107183
Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase (Aacs), mRNA.	NM_030210.1	-1,3110288
Lmo3	LIM domain only 3 (Lmo3), mRNA.	NM_207222.1	-1,311956
Inadl	InaD-like (Drosophila) (Inadl), transcript variant 1, mRNA.	NM_172696.2	-1,3123665
E130202F10Rik		AK053683	-1,3136421
Kif23		NM_024245	-1,3139284
Pi4ka	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide (Pi4ka), mRNA.	NM_001001983.1	-1,3166703
Ttc5	tetratricopeptide repeat domain 5 (Ttc5), transcript variant 1, mRNA.	NM_001080949.1	-1,3179358
2610021K21Rik		XM_354690.1	-1,319339
BC066140		XM_485999	-1,3229038
Pif1	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae) (Pif1), mRNA.	NM_172453.1	-1,3229097
Hnrpc		NM_016884	-1,3245021
Trim37	tripartite motif-containing 37 (Trim37), mRNA.	NM_197987.1	-1,3261319
Nosip	nitric oxide synthase interacting protein (Nosip), mRNA.	NM_025533.2	-1,3264756
Bmp2k	BMP2 inducible kinase (Bmp2k), mRNA.	NM_080708.1	-1,3280575
Chfr	checkpoint with forkhead and ring finger domains (Chfr), mRNA.	NM_172717.1	-1,3281937
Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2 (Pitx2), transcript variant 3, mRNA.	NM_001042502.1	-1,3287419

Shmt2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial) (Shmt2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	NM_028230.3	-1,3288242
Pcyox1		NM_025823	-1,3318913
Pcbp2	poly(rC) binding protein 2 (Pcbp2), mRNA.	NM_011042.1	-1,3321487
Dcps	decapping enzyme, scavenger (Dcps), mRNA.	NM_027030.1	-1,332869
Fbxo45	F-box protein 45 (Fbxo45), mRNA.	NM_173439.2	-1,3351843
Trrp4		AK049788	-1,33618
Rnmt		NM_026440	-1,3380871
Sv2a	synaptic vesicle glycoprotein 2 a (Sv2a), mRNA.	NM_022030.3	-1,3394431
Ndn	necdin (Ndn), mRNA.	NM_010882.3	-1,3401325
Wdr53	WD repeat domain 53 (Wdr53), mRNA.	NM_026898.1	-1,3416998
Itgae	integrin, alpha E, epithelial-associated (Itgae), transcript variant 2, mRNA.	NM_172944.2	-1,3420537
Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (Ifit2), mRNA.	NM_008332.2	-1,3421633
Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2 (Mmd2), mRNA.	NM_175217.6	-1,3452703
Ctps	cytidine 5'-triphosphate synthase (Ctps), mRNA.	NM_016748.1	-1,3462312
Brrn1		NM_144818	-1,3490864
Diap3	diaphanous homolog 3 (Drosophila) (Diap3), mRNA.	NM_019670.1	-1,3503047
2310036D22Rik		NM_027992	-1,3537736
Pols	polymerase (DNA directed) sigma (Pols), mRNA.	NM_198600.1	-1,3540976
LOC100047888	PREDICTED: similar to Neurocan (LOC100047888), mRNA.	XM_001479068.1	-1,3561635
A430103B12Rik		AK040489	-1,3563031
Polq	polymerase (DNA directed), theta (Polq), mRNA.	NM_029977.1	-1,3598033
scl000911.1_939		BC069970.1	-1,3624761
Clspn	claspin homolog (Xenopus laevis) (Clspn), mRNA.	NM_175554.3	-1,3631146
4732462B05Rik		AK028848	-1,3637757
Polr2e	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E (Polr2e), mRNA. XM_994017	NM_025554.2	-1,3656404
Hapln3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3 (Hapln3), mRNA.	NM_178255.3	-1,3668072
Slc4a7		XM_147798.4	-1,36781
Dck	deoxycytidine kinase (Dck), mRNA.	NM_007832.4	-1,3700716
Zfml	zinc finger, matrin-like (Zfml), mRNA.	NM_008717.1	-1,3711579
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45) (Skp2), transcript variant 2, mRNA.	NM_145468.1	-1,3713259
AI847670		NM_177869	-1,3719827
0910001A06Rik	RIKEN cDNA 0910001A06 gene (0910001A06Rik), mRNA.	NM_144846.4	-1,3721582
Cacng4		NM_019431.1	-1,3745673
Dlx1	distal-less homeobox 1 (Dlx1), mRNA.	NM_010053.1	-1,3762286
E430012K20Rik		XM_130845	-1,3772088
Ttll5	tubulin tyrosine ligase-like family, member 5 (Ttll5), mRNA.	NM_001081423.1	-1,3776925
Golga1	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1 (Golga1), mRNA.	NM_029793.1	-1,3810297

Ric8b	resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog B (C. elegans) (Ric8b), transcript variant 2, mRNA.	NM_183172.1	-1,3823249
Pafah1b1	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit (Pafah1b1), mRNA.	NM_013625.1	-1,3841335
Ap4e1	adaptor-related protein complex AP-4, epsilon 1 (Ap4e1), mRNA. XM_925455 XM_925461 XM_991402 XM_991421 XM_991442 XM_991461	NM_175550.3	-1,3859321
3010015K02Rik			-1,3862128
Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila) (Dlg2), mRNA.	NM_011807.2	-1,3876003
LOC100040592	PREDICTED: similar to Hmgcs1 protein, transcript variant 1 (LOC100040592), mRNA.	XM_001475189.1	-1,3904587
Lcmt1	leucine carboxyl methyltransferase 1 (Lcmt1), mRNA.	NM_025304.3	-1,3913319
D10Ertd516e		XM_125901	-1,3913987
Neurod2	neurogenic differentiation 2	NM_010895	-1,39352
Kpna1	karyopherin (importin) alpha 1 (Kpna1), mRNA.	NM_008465.4	-1,3943073
LOC235857		XM_135371.3	-1,3966906
A630072M18Rik			-1,3985647
Narg1	NMDA receptor regulated 1	NM_053089	-1,399314
LOC98434			-1,4009129
Rrm2	ribonucleotide reductase M2 (Rrm2), mRNA.	NM_009104.1	-1,4037418
Stk38l	serine/threonine kinase 38 like (Stk38l), mRNA.	NM_172734.2	-1,4048475
Polr3k	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K (Polr3k), mRNA.	NM_025901.2	-1,4058087
Smg7	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans) (Smg7), mRNA.	NM_001005507.1	-1,4061903
D230046F09Rik		AK052106	-1,4098955
LOC100044862	PREDICTED: similar to Fbxl3 protein (LOC100044862), mRNA.	XM_001473206.1	-1,4126688
H2afy	H2A histone family, member Y (H2afy), mRNA.	NM_012015.1	-1,4141687
D230020C06Rik		AK051933	-1,4152592
Osbpl3	oxysterol binding protein-like 3 (Osbpl3), mRNA.	NM_027881.1	-1,4171789
2310051F07Rik			-1,4179226
Pa2g4	proliferation-associated 2G4 (Pa2g4), mRNA.	NM_011119.3	-1,4198598
Fcmd		NM_139309	-1,4229304
Mtap6	microtubule-associated protein 6 (Mtap6), transcript variant 2, mRNA.	NM_001048167.1	-1,4235255
LOC639396	similar to neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4 isoform 2 (LOC639396), mRNA.	NM_001039251.1	-1,4249947
Sbk		NM_145587.1	-1,4273694
A730042J05Rik		NM_178708	-1,430812
Tada2l	transcriptional adaptor 2 (ADA2 homolog, yeast)-like (Tada2l), mRNA.	NM_172562.3	-1,4420066
Xylt2	xylosyltransferase II (Xylt2), mRNA.	NM_145828.2	-1,4430615
Adamts18		NM_172466	-1,444204
Kif15	kinesin family member 15 (Kif15), mRNA.	NM_010620.1	-1,4465536
Iars	isoleucine-tRNA synthetase (Iars), mRNA.	NM_172015.1	-1,4552257
Ralgps1		NM_175211	-1,4573557
Clip4	CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4 (Clip4), mRNA.	NM_030179.2	-1,4625306

Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 (Mfhas1), mRNA.	NM_001081279.1	-1,465381
4833424O15Rik	RIKEN cDNA 4833424O15 gene (4833424O15Rik), mRNA.	NM_029425.1	-1,4686108
Tmem23		NM_144792.2	-1,4718506
Als2cr4	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 4 (Als2cr4), transcript variant 2, mRNA. XM_909142 XM_921139 XM_921149 XM_921172 XM_921181	NM_001037812.2	-1,4719774
Cog3		NM_177381	-1,479099
Mpv17	Mpv17 transgene, kidney disease mutant (Mpv17), mRNA.	NM_008622.3	-1,4809762
D12Ert553e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 553, expressed (D12Ert553e), mRNA.	NM_029758.3	-1,4811658
Trim2	tripartite motif protein 2 (Trim2), mRNA. XM_984114 XM_984144 XM_984172 XM_984200 XM_984238 XM_984275 XM_984313	NM_030706.1	-1,4834416
Psip1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1 (Psip1), mRNA.	NM_133948.2	-1,4860399
Bnc2	basonuclin 2 (Bnc2), mRNA.	NM_172870.3	-1,486311
Zfp238	zinc finger protein 238 (Zfp238), transcript variant 1, mRNA.	NM_001012330.1	-1,4918226
B230219D22Rik	RIKEN cDNA B230219D22 gene (B230219D22Rik), mRNA.	NM_181278.2	-1,492736
Ppp2r4 *	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	NM_138748	-1,5047972
Homer1 *	homer homolog 1 (Drosophila) (Homer1), transcript variant d, mRNA.	NM_152134.1	-1,5116445
Dlgap1 *	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 (Dlgap1), mRNA.	NM_177639.5	-1,5168939
Kif5a *	kinesin family member 5A (Kif5a), transcript variant 2, mRNA.	NM_001039000.1	-1,5189589
Sox6 *		AK084290	-1,5356771
Ddx6 *	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6 (Ddx6), mRNA.	NM_007841.3	-1,5476592
Sfrs2 *	splicing factor, arginine/serine-rich 2 (SC-35) (Sfrs2), mRNA.	NM_011358.1	-1,5522097
Kif23 *	kinesin family member 23 (Kif23), mRNA.	NM_024245.3	-1,568789
Sqle *	squalene epoxidase (Sqle), mRNA.	NM_009270.3	-1,5860791
scl000710.1_2295 *		AF343877.1	-1,5937237
6330503K22Rik *	RIKEN cDNA 6330503K22 gene (6330503K22Rik), mRNA.	NM_182995.1	-1,6493754
Tsg101 *	tumor susceptibility gene 101 (Tsg101), mRNA.	NM_021884.3	-1,6830608
Pitx2 *	paired-like homeodomain transcription factor 2 (Pitx2), transcript variant 2, mRNA.	NM_011098.3	-1,6930987
Elovl6 *	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast) (Elovl6), mRNA.	NM_130450.2	-1,7367722
Rtn1 *	reticulum 1 (Rtn1), transcript variant 2, mRNA.	NM_001007596.1	-1,7570714
Rps13 *	ribosomal protein S13	NM_026533	-1,7581595
Wnt10a *	wingless related MMTV integration site 10a (Wnt10a), mRNA.	NM_009518.1	-1,7681103
Sc4mol *	sterol-C4-methyl oxidase-like (Sc4mol), mRNA.	NM_025436.1	-1,8903701
Nsg2 *	neuron specific gene family member 2 (Nsg2), mRNA.	NM_008741.1	-2,058064
Stmn2 *	stathmin-like 2 (Stmn2), mRNA.	NM_025285.2	-2,2322474

*Genes presentes na lista de 31 transcritos.

Apêndice 2 – Lista de publicações durante o período do doutorado

- Splendore, A., R. D. Fanganiello, *et al.* TCOF1 mutation database: novel mutation in the alternatively spliced exon 6A and update in mutation nomenclature. Hum Mutat, v.25, n.5, May, p.429-34. 2005.
- Oliveira, N. A., L. G. Alonso, *et al.* Further evidence of association between mutations in FGFR2 and syndromic craniosynostosis with sacroccygeal eversion. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, v.76, n.8, Aug, p.629-33. 2006.
- Fanganiello, R. D., A. L. Sertie, *et al.* Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. Mol Med, v.13, n.7-8, Jul-Aug, p.422-42. 2007.
- De Mendonca Costa, A., D. F. Bueno, *et al.* Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. J Craniofac Surg, v.19, n.1, Jan, p.204-10. 2008.
- Passos-Bueno, M. R. Sertié, A.L.; Jehee, F.S.; Fanganiello R.D.; Yeh, E. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations. In: D. P. Rice (Ed.). Craniofacial Sutures: Development, Disease and Treatment. London: Karger, v.12, 2008. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations, p.107 - 143. (Frontiers of Oral Biology)
- Bueno, D. F., I. Kerkis, *et al.* New Source of Muscle-Derived Stem Cells with Potential for Alveolar Bone Reconstruction in Cleft Lip and/or Palate Patients. Tissue Eng Part A, v.15, n.2, Feb, p.427-35. 2009.
- Passos-Bueno, M. R., C. C. Ornelas, *et al.* Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review. Am J Med Genet A, v.149A, n.8, Aug, p.1853-9. 2009.
- Yeh, E., Sunaga, D.Y., Fanganiello, R.D., Passos-Bueno, M.R. Different functional roles of FGF2 and FGF10 signaling in S252W FGFR2 cells: impact in the Apert phenotype? Mechanisms of Development, v.126, p.S122. 2009.

Apêndice 3 - Fanganiello, R. D., A. L. Sertie, *et al.* Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. Mol Med, v.13, n.7-8, Jul-Aug, p.422-42. 2007.

Apêndice 4 - Passos-Bueno, M. R. S., A.L.; Jehee, F.S.; Fanganiello R.D.; Yeh, E. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations. In: D. P. Rice (Ed.). Craniofacial Sutures: Development, Disease and Treatment. London: Karger, v.12, 2008. Genetics of Craniosynostosis: Genes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations, p.107 - 143. (Frontiers of Oral Biology).

Apert p.Ser252Trp Mutation in FGFR2 Alters Osteogenic Potential and Gene Expression of Cranial Periosteal Cells

Roberto D Fanganiello,¹ Andréa L Sertié,¹ Eduardo M Reis,² Erika Yeh,¹ Nélío AJ Oliveira,¹ Daniela F Bueno,¹ Irina Kerkis,³ Nivaldo Alonso,⁴ Sérgio Cavalleiro,⁵ Hamilton Matsushita,⁵ Renato Freitas,⁶ Sergio Verjovski-Almeida,² and Maria Rita Passos-Bueno¹

¹Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil; ²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil; ³Laboratório de Genética, Instituto Butantã, Brazil; ⁴Departamento de Cirurgia Plástica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil; ⁵Departamento de Neurologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil; ⁶Centro de Atendimento ao Fissurado, Curitiba, Brazil

Apert syndrome (AS), a severe form of craniosynostosis, is caused by dominant gain-of-function mutations in FGFR2. Because the periosteum contribution to AS cranial pathophysiology is unknown, we tested the osteogenic potential of AS periosteal cells (p.Ser252Trp mutation) and observed that these cells are more committed toward the osteoblast lineage. To delineate the gene expression profile involved in this abnormal behavior, we performed a global gene expression analysis of coronal suture periosteal cells from seven AS patients (p.Ser252Trp), and matched controls. We identified 263 genes with significantly altered expression in AS samples (118 upregulated, 145 downregulated; SNR ≥ 1.041 , $P \leq 0.05$). Several upregulated genes are involved in positive regulation of cell proliferation and nucleotide metabolism, whereas several downregulated genes are involved in inhibition of cell proliferation, gene expression regulation, cell adhesion, and extracellular matrix organization, and in PIK3-MAPK cascades. AS expression profile was confirmed through real-time PCR of a selected set of genes using RNAs from AS and control cells as well as from control cells treated with high FGF2 concentration, and through the analysis of genes involved in FGF-FGFR signaling. Our results allowed us to: (a) suggest that AS periosteal cells present enhanced osteogenic potential, (b) unravel a specific gene expression signature characteristic of AS periosteal cells which may be associated with their osteogenic commitment, (c) identify a set of novel genes involved in the pathophysiology of AS or other craniosynostotic conditions, and (d) suggest for the first time that the periosteum might be involved in the pathophysiology of AS.

Online address: <http://www.molmed.org>

doi: 10.2119/2007-00027.Fanganiello

INTRODUCTION

Craniosynostosis, the premature fusion of one or more cranial sutures, is a relatively common malformation with an incidence of 1:2,500 births. Apert syndrome (AS [MIM 101200]) is one of the most severe forms of craniosynostosis, accounting for 4.5% of all cases in different populations (1). AS also is characterized by mid-facial hypoplasia and severe symmetric bony and cutaneous syndactyly of the hands and feet. Although the coronal suture is closed at birth, the squamosal and the lambdoid suture are opened and the anterolateral fontanelles are much enlarged because of a wide midline calvarial

defect. Many other anomalies are associated with AS, such as central nervous system, cardiovascular, urogenital, and dermatologic abnormalities (2–5). Inheritance is autosomal dominant and most cases represent new mutations which are exclusively of paternal origin (6). Early corrective cranial surgical intervention is needed to allow proper brain and skull growth. As a result of continuous bone healing defect, several surgeries are usually necessary during childhood and puberty.

Two activating missense mutations on the fibroblast growth factor 2 receptor (FGFR2) cause the great majority of AS cases: p.Ser252Trp (c.755C > G) and

p.Pro253Arg (c.758C > G) (7). They are located in the linker region between immunoglobulin-like loops II and III of the FGFR2: the former is present in about two thirds of the patients and is associated with a more severe craniofacial phenotype and the latter is found in the remaining one third of the patients and is associated with a more severe syndactyly (4). These mutations are present in mesenchymal “FGFR2c” and epithelial “FGFR2b” splice isoforms and they both involve substitutions of bulky side-chain amino acids, which can alter the relative orientation of the ligand-binding sites of this receptor. Either of these changes lead to enhanced FGFR2 ligand binding affinity and decreased specificity (8–10).

FGFR activation by FGFs (fibroblast growth factors) can induce several different cell processes, such as differentiation, proliferation, migration, and apoptosis by

Address correspondence and reprint requests to Maria Rita Passos-Bueno, Rua do Matão 277, Departamento, Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP, 05508-900. Phone: 55-11-30919910; Fax: 55-11-30917419; E-mail: [passos\(at\)ib.usp.br](mailto:passos(at)ib.usp.br)

The first two authors contributed equally to this work.

Submitted April 05, 2007; Accepted for publication June 12, 2007.

activating a variety of intracellular pathways, including MAPK (mitogen-activating protein kinase), PI3K (Phosphoinositide-3 kinase), PKC (protein kinase C), and STAT (signal transducers and activator of transcription) pathways (5). Cellular context and cell nature are important factors that determine the cellular consequences of receptor stimulation. Normal FGFR1-3 signaling also is crucial in the processes of cell growth and differentiation at the cranial sutural margins and alterations in the molecular pathways or in the timing of the activation events can lead to the premature fusion of these margins.

Most of the studies on the cellular consequences of AS mutant FGFR2 activation have been focused on calvarial osteoblasts, both in vitro and in vivo (11–17). Several lines of evidence indicate that the periosteum plays an important role in cranial bone regeneration because removal of this tissue decreases vascularization and calcification of cranial defects in animal models (18,19). However, little or no information about the periosteal cells' role in the pathophysiology of AS is available. We have postulated that the AS cranial periosteal cells may behave abnormally and contribute to enhanced suture ossification, and therefore we decided in the present work to test this hypothesis.

A transcriptional gene expression signature in periosteal AS cells has been previously reported based on the analysis of only one patient harboring the p.Pro253Arg mutation and two controls (20). Therefore, the confirmation of these results with a larger number of patients and controls is clearly warranted. Nonetheless, given that one of the most considerable challenges in the field of molecular medicine is to dissect the mechanisms of isolated cases of genetic diseases, including syndromic craniosynostosis, the identification of gene expression profiles associated with specific Mendelian disorders could become a powerful tool to unravel the underlying causes of this group of diseases.

Thus, the present study aimed to evaluate if p.Ser252Trp FGFR2 mutant periosteal cells present a greater commitment toward osteogenic differentiation,

which could contribute to the pathophysiology of AS, and to address if these cells present a transcriptional signature that would be involved in the molecular mechanisms of this syndrome.

SUBJECTS, MATERIAL, AND METHODS

Subjects

During corrective surgery, overlying periosteum from the coronal suture region of seven AS patients (three males and four females aged from three months to 14 years) was meticulously dissected away from surrounding tissues to isolate intact periosteal flaps. Control periosteum was obtained using the same procedure from the coronal suture region of seven subjects (three males and four females aged from 11 months to 13 years) with no evidence of bone disease during craniotomy for removal of brain tumors. The project was approved by the local ethical committee and appropriate informed consent was obtained from each subject or their legal guardians.

The presence of the p.Ser252Trp mutation was confirmed by direct DNA sequencing.

Cell Culture and RNA Isolation

Primary periosteal fibroblast cells derived from the periosteal flaps were grown in fibroblast growth medium (80 percent DMEM, 20 percent fetal bovine serum [FSB] and 2 mmol/L L-glutamine, penicillin, and streptomycin), in a humidified incubator at 37°C and five percent CO₂. Cells were passaged at near confluence with trypsin-EDTA. All tests were performed between the sixth and the eighth subculture.

Although the primary periosteal fibroblast cells appeared as a homogeneous population of fibroblastoid cells, to further attest that the surgical isolation of periosteum as well as the cell culture expansion procedure were leading to a homogeneous cell sample, immunocytochemistry experiments were performed in two control cell lineages using antibodies specific for mesenchymal cells (SH2 and SH3) and epithelial cells (Cytokeratin 18

and Integrin B1). It was observed that these cells stained homogeneously for the mesenchymal cells markers but not for the epithelial ones. As a positive control, cultured skin fibroblasts from an unaffected subject were used, which stained homogeneously for the epithelial cells markers but not for the mesenchymal cells markers.

Total RNA was isolated from confluent control and AS cells using TRIZOL reagent (Gibco BRL Gaithersburg, MD, USA) and purified with RNeasy minicolumns (Qiagen Valencia, CA, USA). RNA quality and concentration were accessed respectively by 1.5 percent agarose gel electrophoresis and spectrophotometry.

FGFR2 Expression Analysis

To verify the presence of the FGFR2 in AS and control periosteal cells we performed RT-PCR, Western blot, and immunocytochemical experiments.

Expression Analysis of *FGFR2* by RT-PCR

One step RT-PCR (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) was performed with 2 µg of total RNA samples from five AS patients and four control subjects and specific primer pairs for each of the two major isoforms of *FGFR2* (*FGFR2b* and *FGFR2c*). The same forward primer (*FGFR2-6F*: 5'-agtgtggtcccatctgacaag-3') was combined with a reverse primer specific for either the *FGFR2b* (*FGFR2b-9R*: 5'-ggcctgcctatataattgga-3') or *FGFR2c* (*FGFR2c-10R*: 5'-atagaattaccgcgaagcac-3') isoform. A total of 35 cycles of amplification were performed. Reaction products were resolved alongside a 100-bp ladder on 1.5 percent agarose gel.

Western Blot and Immunocytochemical Experiments

Cell lysates from three AS patients and from three control subjects were prepared in RIPA Buffer (5 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 percent SDS, 0.5 percent sodium deoxycholate, one percent Nonidet 40) and 500 µg of protein were subject to Western blot analysis using a dilution of 1:250 of primary antibody BEH (H-80: sc-20734,

Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, CA, USA), and 1:1000 of anti-rabbit alkaline-phosphatase conjugated secondary antibody. For the immunocytochemical experiments, cells were treated with paraformaldehyde (four percent during 30 min) and labeled with 1:100 of the first antibody BEH and 1:100 of the second anti-rabbit-Cy3 antibody. As positive control we used the murine adeno-cortical Y1 cells (kindly provided by Dr. Hugo Armelin). Control staining without primary antibody was used as negative control.

In Vitro Osteogenic Differentiation

To induce osteogenic differentiation, periosteal fibroblasts from two AS patients and two controls were cultured for three weeks in DMEM ten percent FBS, 0.1 mM dexamethasone, 50 mM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 percent antibiotic, with media changes every three to four days. After 21 days, calcified matrix production was analyzed by von Kossa staining as previously described (21).

Microarray Assays, Normalization, and Statistical Analyses

Gene expression experiments were performed using CodeLink bioarray systems (GE Healthcare Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's protocols. In brief, first-strand cDNA was produced using 2 μ g of total RNA from each sample, Superscript II reverse transcriptase and a T7-poly-dT primer. Second-strand cDNA was produced using RNase H and *E. coli* DNA polymerase I. Double-stranded cDNA was purified on a QIAquick column (Qiagen) and biotin-labeled cRNA targets were generated by an in vitro transcription reaction using T7 RNA polymerase and biotin-11-UTP (Perkin Elmer-Foster City, CA, USA). Fragmented cRNA from each sample was hybridized to CodeLink microarrays containing approximately 20,000 (20K, five samples) or 55,000 (55K, nine samples) 30-mer probes overnight at 37°C in a shaking incubator at 300 rpm. After post-hybridization washes, hybridized targets were revealed

by incubating the arrays with a Cy5-Streptavidin conjugate. The reagents used in the synthesis and fragmentation of cRNA were provided in the CodeLink expression assay kit (GE Healthcare). Signal of the Cy5-dye from hybridized targets were detected with a GenePix 4000B scanner (Axon Instruments Foster City, CA, USA). CodeLink Expression Analysis software (GE Healthcare) was used to obtain background-subtracted spot intensities from microarray images. A set of 19,683 cDNA probes present in both the 20K and 55K arrays were analyzed. From these, only 9,543 probes that had valid measurements (i.e. were detected above the average array background as determined by a set of negative controls represented in the CodeLink arrays) in at least six out of seven samples from AS or control samples were further analyzed. To make experiments comparable, intensity data from different hybridizations were normalized by two different methods: (i) trimmed mean excluding the 20 percent of spots with higher and lower intensities, or (ii) Lowess, local weighted scatter-plot smoothing (22). Data adjusted by Lowess to a reference file resulted in lower coefficient of variation values across all samples and were used in further analyses. To identify gene expression signatures of AS, a Signal-to-Noise Ratio (SNR) metric (23) was used to compare the expression intensity data from AS samples to control samples. The SNR parameter essentially is a measure of signal strength relative to background noise. The distance between the two groups was measured by a signal (expression intensity) to-noise (variation) ratio. The signal-to-noise comparison gives an indication of the level of separation for the means of the two distributions defining the gene intensities of the two groups, and it was calculated as $SNR = \sqrt{(\mu_1 - \mu_2)^2 / (SD_1 + SD_2)}$, where μ_1 and μ_2 are the mean intensities of AS and control groups, respectively, and SD_1 and SD_2 the corresponding standard deviations. For each gene, higher absolute SNR values indicate a higher difference of expression between AS and control samples with a lower dispersion within each group. A

cutoff $SNR \geq |0.4|$ was used to select differentially expressed genes. Statistical significance of the differential expression (P values) was ascertained by bootstrap resampling, i.e. by re-calculating SNR values following 10,000 random permutations of sample labels and computing the frequency at which each SNR value measured in the original set was observed in the randomly permuted data (24). The robustness of identified AS gene expression signature was evaluated by sample leave-one-out cross-validation (25). Essentially, one sample is removed and a new set of significantly altered genes is determined using the remainder samples. This procedure was repeated for each one of the 14 AS/control samples and the frequency at which each gene appears in the various "leave-one-out" datasets at a given significance ($P \leq 0.05$) was annotated.

The reproducibility of the gene expression measurements was assessed by generating two independent replicate target preparations for each of two AS patients and one control and hybridization of the replicates to separate 55K or 20K microarrays, the two types of microarray platforms used in our gene expression experiments. Pair-wise comparison using the Pearson correlation was applied to compare the intensity values from the 19,683 probes common to both CodeLink platforms. Intensity values from the probes common to both microarray platforms were highly correlated between sample replicates (average Pearson correlation = 0.95 ± 0.01) among the three sets of hybridizations. This result confirms that intensity measurements obtained in the different platforms can be compared without any significant loss in accuracy. In addition, the average correlation measured in pairwise analyses with data from all 14 different samples was 0.83 ± 0.07 .

Reverse Transcription Reactions and Quantitative Real-time PCR

Complementary DNA (cDNA) was produced from four μ g of total RNA using Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using approximately 200 ng

Table 1. Sequence of the primers used in the quantitative Real Time PCR experiments.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
<i>CENPN</i>	TCAGTGATGCTGCCCTGTTAGA	AGTGATGCTGCCCTGTTAGACA
<i>STMN1</i>	GGCAGGACTTTCCTTATCCCA	GGCAGGACTTTCCTTATCCCA
<i>SPAG5</i>	GAGTCAAGGAGGTGCTGAAGA	TGCTGGAGGTCCTGCTATTC
<i>RRM2</i>	CTTTGTCATCTTCCCCATCGAG	TGCTGAATGTCCTTGGAGAGGT
<i>HIP2</i>	GAGTCAAGGAGGTGCTGAAGA	TGCTGGAGGTCCTGCTATTC
<i>EEF1B2</i>	TTCGGAGACCTGAAAAGCCCT	CGGCTTCAAATACTGCCACATC
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCCTTTCACCAAGCAAGCT
<i>SDHA</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCATG

of cDNA and SYBR Green PCR master mix in an ABI Prism 7100 system (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). The PCR conditions were: 94°C for 15 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s for 40 cycles.

Samples from four AS and four controls were run in triplicates, and the threshold suggested by the instrument software was used to calculate Ct. To normalize the readings we used Ct values from *HPRT1* (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) and *SDHA* (*succinate dehydrogenase complex, subunit A*) as internal controls in each run, obtaining a delta Ct value for each tested gene (*STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN*, *EEF1B2*). Primers used in this study are summarized in Table 1 as supplementary information.

Exogenous FGF2 Treatment

Control periosteal fibroblasts were grown to about 80 percent confluence in six 25 cm² cell culture bottles as described. Cells were washed with PBS and then were serum starved for 24 h in DMEM not supplemented with FBS. After this period, control cells (three bottles) were treated with DMEM containing 0.5 percent FBS and experimental cells (three bottles) were treated with DMEM 0.5 percent FBS and recombinant bovine FGF2 (provided by Dr. Hugo Armelin) to a final concentration of 36 ng/mL (or 2000 pM – at this high concentration phosphorylation of both wild type and mutant FGFR2c was similar, as observed by 9). Control and experimental cells were harvested at three, six, and 24 h after addition of FGF2, and had its total RNA isolated and purified as described. cDNA was obtained by reverse

transcription of two µg of total RNA using Superscript II (Invitrogen). qRT-PCR was used to measure expression levels of *STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN*, *EEF1B2* after FGF2 stimulation.

RESULTS

Morphology and FGFR2 Expression Analysis in Periosteal Cells

Cultured coronal suture periosteal cells from wild type controls and AS pa-

tients appeared microscopically to be a homogeneous population of adherent fibroblast-like cells, which exhibited neither morphology alteration nor significant cell death after several passages.

As expected for a homogeneous cellular population of periosteal cells with mesenchymal origin, we observed only the expression of the *FGFR2c* isoform in control and AS periosteal cells, with no apparent difference between these two, as determined by RT-PCR. FGFR2 protein also was detected in similar amounts both in control and AS cells (data not shown).

Differentiation of Periosteal Fibroblasts to the Osteoblast Cell Lineage

To address if AS periosteal cells present a greater osteogenic potential, control and AS cells (Figure 1A) were treated with osteogenic induction medium. We found that the potentiality to differentiate to osteogenic lineage varied significantly between control and AS cellular

Figure 1. (A) Morphology of undifferentiated AS periosteal cells. (B and C) Osteogenic differentiation of periosteal cells after 21 days of culture in osteogenic medium. Secretion of a calcified extracellular matrix was clearly observed. (D) Control cells after 21 days of osteogenic induction without signals of osteogenic differentiation (mineralized matrix are absent). Differentiation was accessed by von Kossa staining.

Figure 2. Hierarchical clustering of a 263 gene expression signature of AS samples relative to normal control samples. Individual genes are represented in lines and different samples are represented in rows. Expression level of each gene is represented by the number of standard deviations above (red) or below (blue) the average value for that gene across all samples. Color intensity is proportional to the number of standard deviations in the range -1.5 to 1.5 , as indicated by the color-coded bar at the bottom of the figure.

populations. Four days after the beginning of treatment, an osteoblast-like phenotype was observed in AS cells, while control cells maintained the fibroblast-like morphology. After 21 days of treatment, we observed several areas positive for calcium staining by the von Kossa reaction in AS cells (Figure 1 B and C), but not in control cells (Figure 1 D).

Differential Gene Expression

To verify whether there is an expression signature associated with the presence of the p.Ser252Trp mutation, which could explain the altered mutant cell behavior, we performed genome-wide expression analysis with RNA samples from seven AS patients and seven gender- and age-matched controls using either 55K or 20K microarray platforms. We found 9,543 transcripts (out of 19,683 transcripts under analysis) that were expressed in at least six out of seven sam-

ples from AS or control subjects. The average expression levels of 263 genes were found to be significantly altered in AS samples when compared with normal subjects (118 genes upregulated and 145 downregulated) (Figure 2, Table 2 – supplementary information), using as thresholds an absolute SNR $\geq |0.4|$ and $P \leq 0.05$ (see Methods section for details).

Submitting the 263 differentially expressed genes to the KEGG Pathway Database, the Gene Ontology Database (AmiGO), and the NCBI (Gene) database, we found that 186 of them have a known or inferred function. Among them, we found 98 genes that could be grouped in the following functional categories: regulation of cell proliferation (36 genes; among them, 28 and eight genes are involved in positive and negative regulation of cell proliferation, respectively), nucleotide metabolism (ten genes), regulation of gene expression (32 genes),

apoptosis (17 genes), cell adhesion (13), extracellular matrix component or biogenesis (seven genes), and MAPK pathways (16 genes) (Table 3). Some genes belong to more than one functional category. These categories were selected because they contain the largest numbers of genes, and because genes with related biological functions already were associated to FGFR2 signaling.

From this analysis, we observed that the most abundant classes of transcripts were those associated with regulation of cell proliferation and regulation of gene expression. In addition, among the 98 genes functionally classified, 45 were upregulated while 53 were downregulated in AS cells. Among the upregulated genes, the majority belong to positive regulation of cell proliferation and nucleotide metabolism categories (29/45 genes or $\sim 64.4\%$) (Table 3).

Table 2. 263 transcripts differentially expressed in AS cells as compared with control samples. Transcripts are ordered by their Apert-to-control ratios (Log 2).

Gene (Official Symbol)	Gene name	Accession number	SNR ^a	P value	Apert-to- control Ratio (Log2)	x-fold down- regulated in Apert
<i>DKFZp434B1231^b</i>	eEF1A2 binding protein	NM_178275.3	-0.86	0.010	-2.66	6.31
<i>TNNT1^c</i>	troponin T type 1 (skeletal, slow)	F36108.1	-0.662	0.017	-2.45	5.46
<i>TNXB^b</i>	tenascin XB	NM_032470.2	-0.769	0.015	-2.32	4.98
<i>CYHR1^b</i>	cysteine/histidine-rich 1	AB007965.1	-1.013	0.010	-2.21	4.62
<i>RTN4RL1^b</i>	reticulon 4 receptor-like 1	AL834409.1	-0.812	0.023	-1.83	3.57
<i>CCRL1</i>	chemokine (C-C motif) receptor-like 1	NM_016557.2	-0.65	0.035	-1.77	3.42
<i>NISC_np07a06y1 NICHD_ HS_Ut1</i>	NISC_np07a06y1 NICHD_ HS_Ut1 cDNA clone IMAGE:5936938 5'	CB215524.1	-0.422	0.047	-1.76	3.39
<i>PCNXL2^b</i>	pecanex-like 2 (Drosophila)	NM_014801.2	-0.773	0.023	-1.75	3.36
<i>CFB</i>	complement factor B	NM_001710.3	-0.678	0.027	-1.74	3.34
<i>DDIT4^b</i>	DNA-damage-inducible transcript 4	NM_019058.1	-0.564	0.022	-1.71	3.28
<i>RARRES3^b</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	NM_004585.2	-0.773	0.022	-1.64	3.12
<i>ZC3H12A</i>	zinc finger CCCH-type containing 12A	NM_025079.1	-0.499	0.047	-1.62	3.08
<i>PIK3C2B^c</i>	phosphoinositide-3-kinase, class 2, β polypeptide	NM_002646.2	-0.903	0.004	-1.54	2.91
<i>TP53I11</i>	tumor protein p53 inducible protein 11	BC045666.1	-0.702	0.026	-1.48	2.79
<i>GBP2</i>	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	NM_004120.3	-0.689	0.031	-1.43	2.69
<i>ChGn^c</i>	chondroitin beta1,4 N-acetylgalactos- aminyltransferase	NM_018371.3	-0.819	0.015	-1.42	2.68
<i>ZNF385^b</i>	zinc finger protein 385	NM_015481.1	-0.955	0.011	-1.38	2.61
<i>UI-E-CQ1- aew-i-06- 0-Ulr1 UI- E-CQ1</i>	UI-E-CQ1-aew-i-06-0-Ulr1 UI-E-CQ1 cDNA clone UI-E-CQ1-aew-i-06-0-UI 5'	BM695626.1	-0.661	0.042	-1.37	2.59
<i>PDGFRA</i>	platelet-derived growth factor receptor, α polypeptide	NM_006206.2	-0.653	0.045	-1.34	2.53
<i>LRRC17^b</i>	leucine rich repeat containing 17	NM_005824.1	-0.643	0.039	-1.25	2.38
<i>yr27d04r1</i>	yr27d04r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:206503 5'	H59349.1	-0.708	0.039	-1.25	2.38
<i>MGC:71335^b</i>	cDNA clone MGC:71335 IMAGE:6088873	BC067086.1	-0.825	0.009	-1.25	2.37
<i>FLJ43880^c</i>	cDNA FLJ43880 fis, clone TESTI4009022	AK125868.1	-0.796	0.017	-1.24	2.36
<i>ADAM33</i>	ADAM metalloproteinase domain 33	NM_153202.1	-0.709	0.027	-1.22	2.33
<i>RC6-HT0840- 150800- 022-D11 HT0840</i>	RC6-HT0840-150800-022-D11 HT0840 Homo sapiens cDNA	BE719128.1	-0.678	0.031	-1.22	2.33
<i>FXD1</i>	FXD domain containing ion transport regulator 1 (phospholemman)	NM_021902.2	-0.578	0.044	-1.20	2.29
<i>MAF</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	NM_005360.2	-0.568	0.044	-1.19	2.29

Continued

TABLE 2—Continued

<i>ABI3BP^c</i>	ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein	NM_015429.2	−0.705	0.012	−1.17	2.26
<i>UI-E-DW1-ahc-b-11-0-Ulr1 UI-E-DW1-ahc-b-11-0-Ulr1 UI-E-DW1^c</i>	UI-E-DW1-ahc-b-11-0-Ulr1 cDNA clone UI-E-DW1-ahc-b-11-0-Ulr1 5'	BM712072.1	−0.854	0.008	−1.14	2.21
<i>MTSS1^b</i>	metastasis suppressor 1	NM_014751.2	−0.731	0.009	−1.14	2.20
<i>CLDN15^b</i>	claudin 15	NM_014343.1	−0.714	0.022	−1.13	2.19
<i>GANAB</i>	glucosidase, alpha; neutral AB	NM_198334.1	−0.719	0.020	−1.13	2.19
<i>C1QTNF1^c</i>	C1q and tumor necrosis factor related protein 1	NM_030968.2	−0.672	0.017	−1.13	2.18
<i>ATF3</i>	activating transcription factor 3	NM_004024.2	−0.619	0.049	−1.10	2.14
<i>C17orf58^c</i>	chromosome 17 open reading frame 58	NM_181655.1	−0.813	0.007	−1.10	2.14
<i>P2RY6^c</i>	pyrimidinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 6	NM_004154.3	−0.814	0.021	−1.08	2.12
<i>ADAM8^c</i>	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109.1	−0.628	0.044	−1.06	2.08
<i>PNRC1</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	NM_006813.1	−0.902	0.008	−1.05	2.07
<i>FLJ23438^b</i>	cDNA: FLJ23438 fis, clone HRC13275	AK027091.1	−0.738	0.016	−1.04	2.06
<i>BTN3A3^c</i>	butyrophilin, subfamily 3, member A3	NM_197974.1	−0.833	0.009	−1.03	2.05
<i>UIH-EU0-azp-α-24-0-Uls1 NCI_CGAP_Car1^b</i>	UI-H-EU0-azp-α-24-0-Uls1 NCI_CGAP_Car1 cDNA clone IMAGE: 5851679 3'	BQ181011.1	−0.716	0.009	−1.01	2.01
<i>CREB5^b</i>	cAMP responsive element binding protein 5	NM_004904.1	−0.9	0.010	−1.00	2.00
<i>HLA-G</i>	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	NM_002127.3	−0.721	0.028	−0.99	1.99
<i>MATN2</i>	matrilin 2	NM_030583.1	−0.743	0.027	−0.96	1.95
<i>HHLA2</i>	HERV-H LTR-associating 2	NM_007072.2	−0.488	0.024	−0.95	1.93
<i>HLA-F</i>	major histocompatibility complex, class I, F	NM_018950.1	−0.619	0.039	−0.95	1.93
<i>TXNIP</i>	thioredoxin interacting protein	NM_006472.1	−0.604	0.034	−0.94	1.92
<i>KLF11</i>	Kruppel-like factor 11	NM_003597.4	−0.493	0.039	−0.92	1.89
<i>ARID5A</i>	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	NM_006673.2	−0.526	0.042	−0.92	1.89
<i>PERP</i>	PERP, TP53 apoptosis effector	NM_022121.2	−0.602	0.042	−0.92	1.89
<i>HHLA1</i>	HERV-H LTR-associating 1	NM_005712.1	−0.661	0.031	−0.92	1.89
<i>GYPC^b</i>	glycophorin C (Gerbich blood group)	NM_002101.3	−0.578	0.046	−0.91	1.88
<i>NUCB1</i>	nucleobindin 1	NM_006184.3	−0.618	0.026	−0.89	1.86
<i>LGALS3BP^b</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_005567.2	−0.784	0.014	−0.89	1.85
<i>FLJ20099^b</i>	cDNA FLJ20099 fis, clone COL04544	AK000106.1	−0.711	0.023	−0.89	1.85
<i>TMEM142C^b</i>	transmembrane protein 142C	NM_152288.1	−0.803	0.011	−0.87	1.83
<i>ATXN2L</i>	ataxin 2-like	NM_007245.2	−0.596	0.046	−0.87	1.83
<i>PAQR6^b</i>	progesterone and adipoQ receptor family member VI	NM_024897.2	−0.63	0.040	−0.87	1.83
<i>SPTBN1</i>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1 (SPTBN1)	NM_003128.1	−0.62	0.049	−0.87	1.83
<i>MGC15875^b</i>	hypothetical protein MGC15875 (MGC15875)	NM_032921.1	−0.894	0.013	−0.86	1.81
<i>MAPK8IP1</i>	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	NM_005456.2	−0.642	0.037	−0.86	1.81

Continued

TABLE 2—Continued

<i>ANKZF1</i>	ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1	NM_018089.1	−0.673	0.036	−0.85	1.81
<i>CCBE1</i>	collagen and calcium binding EGF domains 1	NM_133459.1	−0.602	0.034	−0.85	1.81
<i>DKFZp779O1626</i>	mRNA; cDNA DKFZp779O1626 (from clone DKFZp779O1626)	BX648538.1	−0.676	0.027	−0.83	1.78
<i>CA12</i>	carbonic anhydrase XII	AK000158.1	−0.612	0.040	−0.83	1.78
<i>NFIL3^p</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NM_005384.1	−0.803	0.012	−0.83	1.77
<i>IFITM3</i>	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	NM_021034.1	−0.604	0.033	−0.83	1.77
<i>SLC27A1</i>	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	NM_198580.1	−0.621	0.047	−0.81	1.75
<i>LAMP1</i>	lysosomal-associated membrane protein 1	NM_005561.2	−0.648	0.037	−0.80	1.74
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3	NM_005178.2	−0.671	0.039	−0.79	1.73
<i>R15896 ya47b07.r1</i>	R15896 ya47b07.r1 Soares infant brain 1NIB cDNA clone IMAGE:53125 5' similar to SP:S37009 S37009 TRANSPOSASE - ALMOND ;	R15896.1	−0.645	0.037	−0.79	1.73
<i>ZFP64^b</i>	zinc finger protein 64 homolog (mouse)	NM_018197.2	−0.795	0.017	−0.78	1.72
<i>SWAP-70^b</i>	SWAP-70 protein	AB014540.1	−0.708	0.028	−0.77	1.71
<i>P2RX4</i>	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4	NM_002560.2	−0.69	0.032	−0.77	1.71
<i>BMP1</i>	bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	NM_006129.2	−0.598	0.048	−0.76	1.69
<i>SLC25A37</i>	solute carrier family 25, member 37	NM_016612.1	−0.607	0.039	−0.75	1.68
<i>NUB1^b</i>	negative regulator of ubiquitin-like proteins 1	NM_016118.3	−0.68	0.011	−0.75	1.68
<i>ACADS</i>	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	NM_000017.1	−0.669	0.046	−0.74	1.67
<i>RELB</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	NM_006509.2	−0.682	0.033	−0.74	1.67
<i>PPARA^b</i>	peroxisome proliferative activated receptor, α	NM_032644.1	−0.753	0.009	−0.74	1.67
<i>ELL3^b</i>	elongation factor RNA polymerase II-like 3	NM_025165.1	−0.791	0.006	−0.74	1.67
<i>BCL6^c</i>	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	NM_001706.2	−0.819	0.013	−0.74	1.67
<i>PYGL^c</i>	phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)	NM_002863.2	−0.804	0.016	−0.74	1.67
<i>cDNA clone fs01a03 5'</i>	fs01a03y1 Human Lens cDNA (Normalized): fs cDNA clone fs01a03 5'	CD673362.1	−0.615	0.030	−0.73	1.66
<i>602156641F1 NIH_MGC_83</i>	602156641F1 NIH_MGC_83 cDNA clone IMAGE:4297258 5'	BF681513.1	−0.597	0.037	−0.73	1.66
<i>CSNK2A1</i>	casein kinase 2, α 1 polypeptide	NM_177560.2	−0.693	0.030	−0.73	1.66
<i>KIAA0082</i>	KIAA0082	NM_015050.1	−0.945	0.010	−0.72	1.65
<i>UI-E-DW0-agh-c-03-0-Ulr1 UI-E-DW0^c</i>	UI-E-DW0-agh-c-03-0-Ulr1 UI-E-DW0 cDNA clone UI-E-DW0-agh-c-03-0-Ul 5'	BM706230.1	−0.714	0.024	−0.72	1.65
<i>CNTNAP1</i>	contactin associated protein 1	NM_003632.1	−0.628	0.041	−0.72	1.64

Continued

TABLE 2—Continued

<i>SYNGR1^b</i>	synaptogyrin 1	NM_004711.3	−0.635	0.043	−0.71	1.64
<i>ING4</i>	inhibitor of growth family, member 4	NM_198287.1	−0.586	0.044	−0.69	1.62
<i>RBM5^b</i>	RNA binding motif protein 5	NM_005778.1	−0.71	0.024	−0.69	1.61
<i>FLJ34274</i>	cDNA FLJ34274 fis, clone FEBRA2003327	AK091593.1	−0.618	0.044	−0.68	1.60
<i>FAM113A^b</i>	family with sequence similarity 113, member A	NM_022760.3	−0.796	0.015	−0.68	1.60
<i>MAP3K6</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	NM_004672.3	−0.584	0.041	−0.67	1.59
<i>FLJ14360</i>	hypothetical protein FLJ14360	NM_032775.2	−0.638	0.030	−0.67	1.59
<i>B4GALT7^b</i>	xylosylprotein β 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)	NM_007255.1	−0.76	0.026	−0.66	1.57
<i>CASP7^b</i>	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_001227.2	−0.637	0.023	−0.65	1.57
<i>IXL^b</i>	intersex-like (Drosophila)	AL137304.1	−0.662	0.031	−0.65	1.57
<i>RHBDF2</i>	rhomboid-like protein 6	NM_024599.2	−0.636	0.030	−0.65	1.57
<i>UCN</i>	urocortin	NM_003353.2	−0.625	0.044	−0.65	1.57
<i>FLRT2</i>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	NM_013231.3	−0.595	0.042	−0.64	1.56
<i>FLJ45129</i>	cDNA FLJ45129 fis, clone BRAWH3037394	AK127072.1	−0.582	0.048	−0.63	1.55
<i>LKAP^c</i>	limkain b1	NM_014647.1	−0.693	0.012	−0.63	1.55
<i>yj34b04r1^b</i>	yj34b04r1 Soares placenta Nb2HP cDNA clone IMAGE:150607 5'	H02050.1	−0.722	0.017	−0.62	1.54
<i>HECA^b</i>	headcase homolog (Drosophila)	NM_016217.1	−0.629	0.047	−0.62	1.54
<i>BMP1^b</i>	bone morphogenetic protein 1	NM_006129.2	−0.763	0.024	−0.62	1.54
<i>601194047F1 NIH_MGC_7</i>	601194047F1 NIH_MGC_7 cDNA clone IMAGE:3537995 5'	BE264943.1	−0.699	0.048	−0.62	1.54
<i>TNIP2^b</i>	TNFAIP3 interacting protein 2	NM_024309.2	−0.95	0.008	−0.62	1.54
<i>ZNF688</i>	zinc finger protein 688	NM_145271.2	−0.669	0.026	−0.61	1.53
<i>MITF</i>	microphthalmia-associated transcription factor	NM_006722.1	−0.62	0.042	−0.60	1.51
<i>FLJ45204^b</i>	cDNA FLJ45204 fis, clone BRCAN2009168	AK127147.1	−0.807	0.010	−0.60	1.51
<i>UBXD7^c</i>	UBX domain containing 7	AB018337.1	−0.811	0.007	−0.58	1.50
<i>C16orf48^b</i>	hypothetical protein DKFZp434A1319 (DKFZP434A1319)	NM_032140.1	−0.714	0.015	−0.58	1.50
<i>ZFX4</i>	zinc finger homeodomain 4	NM_024721.2	−0.643	0.030	−0.58	1.49
<i>yo60a08r1</i>	yo60a08r1 Soares breast 3NbHBst cDNA clone IMAGE:182294 5' similar to contains Alu repetitive element; contains LTR9 repetitive element	H41942.1	−0.692	0.031	−0.58	1.49
<i>ZNF44</i>	zinc finger protein 44	BC032246.1	−0.614	0.032	−0.57	1.49
<i>SETD5</i>	SET domain containing 5	AB051544.1	−0.6	0.031	−0.57	1.48
<i>RNF103</i>	ring finger protein 103	NM_005667.2	−0.648	0.031	−0.57	1.48
<i>TP53INP1</i>	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	NM_033285.2	−0.642	0.028	−0.55	1.47
<i>yr35b01r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS^b</i>	yr35b01r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:207241 5'	H59642.1	−0.631	0.038	−0.55	1.46
<i>BBS1</i>	Bardet-Biedl syndrome 1	NM_024649.4	−0.616	0.047	−0.54	1.46
<i>FLJ43900</i>	cDNA FLJ43900 fis, clone TEST14009973	AK125888.1	−0.669	0.043	−0.54	1.45
<i>ITM2B^b</i>	integral membrane protein 2B	NM_021999.2	−0.681	0.028	−0.54	1.45
<i>PDE6G^b</i>	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	NM_002602.1	−0.87	0.003	−0.53	1.44

Continued

TABLE 2—Continued

<i>FKBP4</i>	FK506 binding protein 4, 59kDa	NM_002014.2	−0.697	0.023	−0.53	1.44
<i>CHKB</i>	choline kinase β (CHKB)	NM_005198.3	−0.593	0.039	−0.52	1.43
<i>FLJ11946^b</i>	cDNA FLJ11946 fis, clone HEMBB1000709	AK022008.1	−0.922	0.005	−0.50	1.42
<i>wi65f08x1</i>	wi65f08x1 NCI_CGAP_Kid12 cDNA	AI763182.1	−0.621	0.044	−0.50	1.42
NCI_CGAP_Kid12	clone IMAGE:2398215 3'					
<i>NSMAF^c</i>	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	NM_003580.2	−0.789	0.015	−0.50	1.41
<i>SIX^b</i>	sine oculis homeobox homolog 5 (Drosophila)	NM_175875.3	−0.75	0.017	−0.49	1.40
<i>64B2 Human retina cDNA Tsp509I-cleaved sublibrary^b</i>	64B2 Human retina cDNA Tsp509I-cleaved sublibrary Homo sapiens cDNA not directional	W22248.1	−0.684	0.022	−0.48	1.39
<i>XPC</i>	xeroderma pigmentosum, complementation group C	NM_004628.2	−0.644	0.041	−0.48	1.39
<i>603040523F1 NIH_MGC_115</i>	603040523F1 NIH_MGC_115 cDNA clone IMAGE:5181509 5'	BI824163.1	−0.708	0.030	−0.48	1.39
<i>DKFZp686K2137</i>	mRNA; cDNA DKFZp686K2137 (from clone DKFZp686K2137)	AL833529.1	−0.626	0.037	−0.47	1.38
<i>SRRM2</i>	serine/arginine repetitive matrix 2	NM_016333.2	−0.632	0.042	−0.45	1.36
<i>SH3GLB2</i>	SH3-domain GRB2-like endophilin B2	NM_020145.2	−0.662	0.037	−0.45	1.36
<i>yd89d12r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS</i>	yd89d12r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:115415 5'	T87528.1	−0.592	0.050	−0.43	1.35
<i>cDNA clone IMAGE:3636922</i>	cDNA clone IMAGE:3636922	BC062348.1	−0.598	0.035	−0.43	1.34
<i>PTPRA</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, A	NM_002836.2	−0.624	0.042	−0.41	1.33
<i>C20orf111</i>	chromosome 20 open reading frame 111	NM_016470.6	−0.632	0.043	−0.41	1.33
<i>MGAT1^b</i>	mannosyl (α-1,3-)-glycoprotein β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	NM_002406.2	−0.799	0.019	−0.40	1.32
<i>ZDHHC3^b</i>	zinc finger, DHHC domain containing 3	NM_016598.1	−0.634	0.040	−0.32	1.25
<i>cDNA DKFZp313K127^b</i>	mRNA; cDNA DKFZp313K127 (from clone DKFZp313K127)	AL833316.1	−0.74	0.024	−0.31	1.24
<i>GANAB</i>	glucosidase, alpha; neutral AB	NM_198334.1	−0.676	0.034	−0.31 x-fold up-regulated in Apert	1.24
<i>NUBP2</i>	nucleotide binding protein 2 (MinD homolog, E coli)	NM_012225.1	0.66	0.030	0.23	1.17
<i>AGENCOURT_8454944 NIH_MGC_113</i>	AGENCOURT_8454944 NIH_MGC_113 cDNA clone IMAGE:6278846 5'	BU899205.1	0.587	0.046	0.28	1.22
<i>ATP5G1</i>	ATP synthase, H + transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)	NM_005175.1	0.618	0.042	0.28	1.22

Continued

TABLE 2—Continued

AGENCOURT_8073800 NIH_MGC_110 ^b	AGENCOURT_8073800 NIH_MGC_110 cDNA clone IMAGE:6083397 5'	BU147450.1	0.678	0.020	0.32	1.25
CIB1 ^b	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	NM_006384.2	0.665	0.035	0.32	1.25
ARL3	ADP-ribosylation factor-like 3	NM_004311.2	0.633	0.033	0.34	1.27
PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, α type, 2	NM_002787.3	0.648	0.039	0.36	1.28
MAGED2 ^b	melanoma antigen, family D, 2	NM_014599.4	0.599	0.030	0.36	1.28
CUTA	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)	NM_015921.1	0.603	0.044	0.37	1.29
CSNK1D	casein kinase 1, delta	NM_001893.3	0.614	0.042	0.37	1.29
MTCH2	mitochondrial carrier homolog 2 (C elegans) (MTCH2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	NM_014342.2	0.576	0.045	0.38	1.30
yp83b01s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS	yp83b01s1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:193993 3'	H51256.1	0.597	0.049	0.38	1.30
MAPRE1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	NM_012325.1	0.613	0.045	0.38	1.30
SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	NM_003072.2	0.658	0.034	0.39	1.31
PLA2G12A	phospholipase A2, group XIA	NM_030821.3	0.668	0.044	0.39	1.31
METTL2B ^b	methyltransferase like 2	NM_018396.1	0.753	0.019	0.40	1.32
EEF1B2 ^c	eukaryotic translation elongation factor 1 β 2	NM_001959.2	0.879	0.011	0.40	1.32
GABPB2	GA binding protein transcription factor, β subunit 2	NM_002041.2	0.664	0.027	0.40	1.32
ZNF414 ^b	zinc finger protein 414	NM_032370.1	0.742	0.029	0.41	1.32
ADCY2 ^b	adenylate cyclase 2 (brain)	NM_020546.1	0.665	0.028	0.41	1.33
CASP8AP2	CASP8 associated protein 2	NM_012115.2	0.621	0.049	0.41	1.33
TIMP3 ^c	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	BG104808.1	0.966	0.006	0.42	1.34
EIF4A1	eukaryotic translation initiation factor 4A	NM_001416.1	0.585	0.038	0.44	1.35
MUS81 ^b	MUS81 endonuclease homolog (S. cerevisiae)	NM_025128.3	0.662	0.024	0.44	1.35
CCDC72	coiled-coil domain containing 72	NM_015933.1	0.694	0.030	0.44	1.36
SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	NM_006938.2	0.619	0.044	0.44	1.36
DTYMK	deoxythymidylate kinase	NM_012145.2	0.64	0.037	0.44	1.36
STX2 ^b	syntaxin 2	NM_194356.1	0.745	0.019	0.44	1.36
AARSD1 ^b	alanyl-tRNA synthetase domain containing 1	NM_025267.2	0.786	0.019	0.45	1.37
CREB3 ^b	cAMP responsive element binding protein 3	NM_006368.4	0.743	0.023	0.46	1.38
COX4NB	neighbor of COX4 (NOC4)	NM_006067.3	0.593	0.030	0.47	1.38
PDZK6	PDZ domain containing 6	NM_015693.2	0.63	0.038	0.47	1.39
UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	NM_003348.3	0.584	0.037	0.48	1.39
PPIH	peptidyl prolyl isomerase H	NM_006347.3	0.676	0.025	0.48	1.40
SIKE	suppressor of IKK epsilon	NM_025073.1	0.584	0.048	0.50	1.41
TK1	thymidine kinase 1, soluble	NM_003258.1	0.685	0.028	0.50	1.41

Continued

TABLE 2—Continued

<i>PAFAH1B3</i>	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, γ subunit 29kDa	NM_002573.2	0.651	0.037	0.51	1.42
<i>SFRS7^b</i>	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa	NM_006276.36	0.705	0.028	0.52	1.44
<i>PSMC5</i>	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	NM_002805.4	0.624	0.043	0.53	1.44
<i>yr11c06r1</i> Soares fetal liver spleen 1NFLS ^b	yr11c06r1 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGE:204970 5'	H57392.1	0.742	0.015	0.53	1.44
<i>C15orf29^b</i>	chromosome 15 open reading frame 29	NM_024713.1	0.793	0.011	0.53	1.44
<i>GFOD2^c</i>	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 2	NM_030819.2	0.745	0.019	0.53	1.45
<i>HN1</i>	hematological and neurological expressed 1	NM_001002032.1	0.683	0.045	0.54	1.46
<i>DKFZp451H129</i>	mRNA; cDNA DKFZp451H129 (from clone DKFZp451H129)	AL833295.1	0.649	0.035	0.54	1.46
<i>CKLF^b</i>	chemokine-like factor	NM_016951.2	0.726	0.021	0.55	1.46
<i>OBFC1</i>	oligonucleotide/oligosaccharide- binding fold containing 1	NM_024928.3	0.688	0.027	0.55	1.46
<i>VAMP4^b</i>	vesicle-associated membrane protein 4, transcript variant 1	NM_201994.1	0.744	0.010	0.55	1.46
<i>RRM1</i>	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	NM_001033.2	0.612	0.045	0.55	1.46
<i>PSME4^b</i>	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	NM_014614.1	0.736	0.022	0.56	1.47
<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3 (Drosophila)	NM_004073.2	0.642	0.036	0.57	1.48
<i>MRPL35^b</i>	mitochondrial ribosomal protein L35	NM_016622.2	0.706	0.014	0.57	1.49
<i>DLAT^b</i>	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	NM_001931.2	0.707	0.019	0.58	1.49
<i>HIP2^b</i>	huntingtin interacting protein 2	NM_005339.3	0.723	0.017	0.58	1.49
<i>C20orf7</i>	chromosome 20 open reading frame 7	NM_199052.1	0.615	0.041	0.59	1.50
<i>UFD1L^b</i>	ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	NM_005659.3	0.616	0.023	0.59	1.51
<i>POP5</i>	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit (S cerevisiae) (POP5)	NM_015918.3	0.623	0.041	0.59	1.51
<i>SLC35B3</i>	solute carrier family 35, member B3	NM_015948.2	0.628	0.037	0.60	1.51
<i>CDKN3</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	NM_005192.2	0.613	0.044	0.60	1.52
<i>LZIC^b</i>	leucine zipper and CTNNBIP1 domain containing	NM_032368.3	0.766	0.019	0.60	1.52
<i>LETM1</i>	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	NM_012318.1	0.589	0.049	0.60	1.52
<i>RNASEH2A^b</i>	ribonuclease H2, subunit A	NM_006397.2	0.869	0.011	0.60	1.52
<i>NEDD1</i>	neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 1	NM_152905.2	0.643	0.041	0.62	1.53
<i>CEP78</i>	centrosomal protein 78kDa	AW962072.1	0.672	0.028	0.63	1.54
<i>UI-H-BI0-aah- e-06-0-Uls1</i> NCL_ CGAP_ Sub1	UI-H-BI0-aah-e-06-0-Uls1 Sub1 cDNA clone IMAGE:2709227 3'	AW014009.1	0.597	0.037	0.63	1.55
<i>CKAP2</i>	cytoskeleton associated protein 2	NM_018204.2	0.644	0.037	0.66	1.58

Continued

TABLE 2—Continued

<i>ACTR3B^b</i>	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast)	NM_020445.1	0.765	0.016	0.67	1.59
<i>ELAVL1</i>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, <i>Drosophila</i>)-like 1 (Hu antigen R)	NM_001419.2	0.635	0.041	0.67	1.59
<i>POLR3K^b</i>	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K	NM_016310.2	0.802	0.013	0.69	1.61
<i>PI4K1P</i>	phosphatidylinositol 4-kinase type II	NM_018425.2	0.77	0.014	0.69	1.62
<i>TMEM107^b</i>	transmembrane protein 107	NM_183065.1	0.739	0.022	0.70	1.62
<i>BCAP29</i>	B-cell receptor-associated protein 29	NM_018844.1	0.644	0.040	0.70	1.63
<i>PRPS1L1^b</i>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1-like 1	NM_175886.2	0.728	0.022	0.71	1.63
<i>MTFMT^b</i>	mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	NM_139242.2	0.866	0.008	0.72	1.64
<i>DDX49</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49	NM_019070.3	0.61	0.046	0.73	1.66
<i>RAD1^b</i>	RAD1 homolog (<i>S. pombe</i>)	NM_002853.2	0.71	0.018	0.73	1.66
<i>CMTM5</i>	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	NM_138460.2	0.721	0.019	0.74	1.67
<i>NEK6^b</i>	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	NM_014397.3	0.715	0.017	0.74	1.67
<i>K-EST0149992</i>	K-EST0149992 L3SNU475 cDNA clone	CB108944.1	0.657	0.015	0.75	1.68
<i>L3SNU475^b</i>	L3SNU475-29-H12 5'					
<i>yx15f01s1</i>	yx15f01s1 Soares melanocyte 2NbHM cDNA clone IMAGE:261817 3'	H99198.1	0.766	0.015	0.76	1.70
<i>Soares melanocyte 2NbHM^b</i>						
<i>EXOSC9^b</i>	exosome component 9	NM_005033.1	0.721	0.021	0.76	1.70
<i>UI-E-C10-aah-e-03-0-Ulr1</i>	UI-E-C10-aah-e-03-0-Ulr1 UI-E-C10 cDNA clone UI-E-C10-aah-e-03-0-UI 5'	BM690376.1	0.659	0.031	0.79	1.73
<i>UI-E-C10</i>						
<i>PTS</i>	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	NM_000317.1	0.597	0.047	0.79	1.73
<i>C14orf143</i>	chromosome 14 open reading frame 143	NM_145231.1	0.629	0.047	0.79	1.73
<i>UBE2T</i>	HSPC150 protein similar to ubiquitin-conjugating enzyme	NM_014176.1	0.664	0.029	0.83	1.77
<i>SAE1</i>	SUMO-1 activating enzyme subunit 1	NM_005500.1	0.62	0.049	0.83	1.78
<i>AURKB</i>	aurora kinase B	NM_004217.1	0.692	0.031	0.84	1.79
<i>ARSJ</i>	arylsulfatase family, member J	AK027201.1	0.708	0.028	0.85	1.80
<i>RRM2^b</i>	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	NM_001034.1	0.781	0.019	0.86	1.81
<i>BCL7A</i>	B-cell CLL/lymphoma 7A	NM_020993.2	0.652	0.034	0.86	1.82
<i>IVNS1ABP</i>	influenza virus NS1A binding protein	NM_006469.2	0.66	0.035	0.87	1.82
<i>NCAPG</i>	non-SMC condensin I complex, subunit G	NM_022346.2	0.689	0.028	0.87	1.83
<i>CENPM^c</i>	centromere protein M	NM_024053.2	0.693	0.006	0.87	1.83
<i>C5orf13</i>	chromosome 5 open reading frame 13	NM_004772.1	0.626	0.042	0.89	1.85
<i>MCM4</i>	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)	NM_182746.1	0.65	0.030	0.90	1.87
<i>FLJ43294</i>	cDNA FLJ43294 fis, clone MESTC1000042	AK125284.1	0.527	0.049	0.93	1.90
<i>PTPDC1^b</i>	protein tyrosine phosphatase domain containing 1	NM_152422.3	0.725	0.027	0.95	1.93
<i>LOC90624</i>	hypothetical protein LOC90624	NM_181705.1	0.642	0.026	0.95	1.94
<i>SPAG5^b</i>	sperm associated antigen 5	NM_006461.2	0.876	0.007	0.98	1.97
<i>CTPS</i>	CTP synthase	NM_001905.1	0.496	0.046	0.98	1.98
<i>zu70f09r1</i>	zu70f09r1 Soares_testis_NHT cDNA clone IMAGE:743369 5'	AA400694.1	0.578	0.039	0.99	1.98
<i>Soares_testis_NHT</i>						

Continued

TABLE 2—Continued

<i>MND1</i>	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)	NM_032117.2	0.674	0.034	1.00	2.00
<i>KIAA0101</i>	KIAA0101 gene product	NM_014736.3	0.58	0.050	1.02	2.03
<i>ZNF738^c</i>	zinc finger protein 738	BC034499.1	1.07	0.003	1.03	2.04
<i>EHD4^c</i>	EH-domain containing 4	NM_139265.2	0.725	0.001	1.04	2.06
<i>MNS1^b</i>	meiosis-specific nuclear structural 1	NM_018365.1	0.832	0.013	1.06	2.08
<i>ARHGAP11A</i>	similar to human GTPase-activating protein	NM_014783.2	0.7	0.027	1.08	2.12
<i>CENPN^c</i>	centromere protein N	NM_018455.3	1.142	0.001	1.10	2.14
<i>STMN1^b</i>	stathmin 1/oncoprotein 18	NM_203401.1	0.969	0.006	1.11	2.16
<i>DUSP2^b</i>	dual specificity phosphatase 2	NM_004418.2	0.953	0.004	1.17	2.25
<i>SPBC25^b</i>	spindle pole body component 25 homolog (S. cerevisiae)	NM_020675.3	0.892	0.010	1.18	2.27
<i>HIST1H4C</i>	histone 1, H4c	NM_003542.3	0.682	0.033	1.22	2.32
<i>TCF19</i>	transcription factor 19 (SC1)	BC033086.1	0.631	0.041	1.23	2.34
<i>CIP29</i>	cytokine induced protein 29 kDa	NM_033082.1	0.65	0.040	1.24	2.36
<i>FLJ39342^b</i>	cDNA FLJ39342 fis, clone OCBBF2018873	AK096661.1	0.776	0.017	1.32	2.50
<i>FLJ23131</i>	cDNA: FLJ23131 fis, clone LNG08502	AK026784.1	0.645	0.039	1.61	3.05
<i>zv03f03r1</i>	zv03f03r1 Soares_NhHMPu_S1 cDNA	AA419568.1	0.718	0.041	1.74	3.34
Soares_NhHMPu_S1	clone IMAGE:752573 5'					
<i>CNN1</i>	calponin 1, basic, smooth muscle	NM_001299.3	0.808	0.022	2.09	4.24
<i>HAPLN1^c</i>	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	NM_001884.2	1.003	0.005	3.00	7.99

^aSNR stands for "signal to noise ratio".

^bThe 120 genes identified as differentially expressed in at least 50% of the "leave-one-out" datasets.

^cThe 25 genes identified as differentially expressed in 100% of the "leave-one-out" datasets.

To improve the statistical significance and identify the most robust markers in the AS gene expression signature we performed a leave-one-out statistical analysis (detailed in Methods). Out of the 263 genes previously found to be differentially expressed, 120 genes were identified in at least 50 percent of the "leave-one-out" datasets, and 25 genes were present in all "leave-one-out" datasets (Tables 2 and 3).

Quantitative Real Time PCR Validation of Microarray Data

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed to confirm the differential expression of gene sets identified in the microarray analysis. We selected for validation four genes belonging to the previously mentioned functional categories: *STMN1* and *SPAG5* (cell proliferation), *RRM2* (cell proliferation and nucleotide metabolism), and *HIP2* (suppression of apoptosis and regulation

of gene expression). In addition, two other genes were selected with non-related functions: *CENPN* (centromere protein), and *EEF1B2* (translation elongation factor). The above selection was picked at random to avoid a bias toward a specific pathway in the validation of the microarray results. qRT-PCR experiments showed that these six genes were upregulated in AS cells (Figure 3), corroborating the expression results obtained in the microarray experiments.

FGF2 Treatment

To independently confirm the data generated by microarray analysis, and to mimic the increased downstream signaling caused by mutant FGFR2, primary cultured control periosteal cells were treated with a high concentration of FGF2 (the high concentration of FGF2 was used to simulate the phosphorylation status of mutant FGFR2c). Total RNA was isolated three, six, and 24 h

after FGF2 addition. qRT-PCR was used to measure the changes in mRNA levels of the six genes previously used for experimental validation of the microarray data: *STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN* and *EEF1B2*. We observed that FGF2 treatment differentially stimulated the expression of these genes only after 24 h of treatment (Figure 4).

DISCUSSION

Despite the important role played by the periosteum in normal suture biology, the contribution of FGFR2 mutant periosteal cells in AS suture closure is unknown. We report here, for the first time, a strikingly higher osteoblast differentiation of heterozygous p.Ser252Trp FGFR2 mutant cells as compared with the same kind of cells from individuals without this mutation and normal suture fusion. To delineate molecular mechanisms underlying this abnormal cell behavior, we also present here a statistically significant difference in gene

Table 3. 98 genes grouped in functional categories. Transcripts are ordered by their Apert-to-control ratios (Log 2). Upregulated genes in AS cells are shown in orange. Downregulated genes are shown in blue.

Gene (Official Symbol)	Gene name	Accession number	P value	Apert-to- control Ratio (Log2)	x-fold up- or down- regulated in Apert
Positive regulation of cell proliferation					
<i>CIP29</i>	cytokine induced protein 29 kDa	NM_033082.1	0.040	1.24	2.36
<i>TCF19</i>	transcription factor 19 (SC1)	BC033086.1	0.041	1.23	2.34
<i>SPBC25^b</i>	spindle pole body component 25 homolog (S. cerevisiae)	NM_020675.3	0.010	1.18	2.27
<i>STMN1^b</i>	stathmin 1/oncoprotein 18	NM_203401.1	0.006	1.11	2.16
<i>SPAG5^b</i>	sperm associated antigen 5	NM_006461.2	0.007	0.98	1.97
<i>MCM4</i>	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (S. cerevisiae)	NM_182746.1	0.030	0.90	1.87
<i>HCAP-G</i>	chromosome condensation protein G	NM_022346.2	0.028	0.87	1.83
<i>RRM2^b</i>	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	NM_001034.1	0.019	0.86	1.81
<i>AURKB</i>	aurora kinase B	NM_004217.1	0.031	0.84	1.79
<i>NEK6^b</i>	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	NM_014397.3	0.017	0.74	1.67
<i>CKAP2</i>	cytoskeleton associated protein 2	NM_018204.2	0.037	0.66	1.58
<i>NEDD1</i>	neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 1	NM_152905.2	0.041	0.62	1.53
<i>RNASEH2A^b</i>	ribonuclease H2, subunit A	NM_006397.2	0.011	0.60	1.52
<i>UFD1L^b</i>	ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	NM_005659.3	0.023	0.59	1.51
<i>PLK3</i>	polo-like kinase 3 (Drosophila)	NM_004073.2	0.036	0.57	1.48
<i>CKLF^b</i>	chemokine-like factor	NM_016951.2	0.021	0.55	1.46
<i>TK1</i>	thymidine kinase 1, soluble	NM_003258.1	0.028	0.50	1.41
<i>DTYMK</i>	deoxythymidylate kinase	NM_012145.2	0.037	0.44	1.36
<i>MUS81^b</i>	MUS81 endonuclease homolog (S. cerevisiae)	NM_025128.3	0.024	0.44	1.35
<i>MAPRE1</i>	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	NM_012325.1	0.045	0.38	1.30
<i>HECA^b</i>	headcase homolog (Drosophila)	NM_016217.1	0.047	-0.62	1.54
<i>CSNK2A1</i>	casein kinase 2, α 1 polypeptide	NM_177560.2	0.030	-0.73	1.66
<i>BCL6^a</i>	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	NM_001706.2	0.013	-0.74	1.67
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3	NM_005178.2	0.039	-0.79	1.73
<i>ADAM33</i>	ADAM metalloproteinase domain 33	NM_153202.1	0.027	-1.22	2.33
<i>PDGFRA</i>	platelet-derived growth factor receptor, α polypeptide	NM_006206.2	0.045	-1.34	2.53
<i>ChGn^a</i>	chondroitin beta1,4 N- acetylgalactosaminyltransferase	NM_018371.3	0.015	-1.42	2.68
<i>PIK3C2B^a</i>	phosphoinositide-3-kinase, class 2, β polypeptide	NM_002646.2	0.004	-1.54	2.91
Negative regulation of cell proliferation					
<i>RAD1^b</i>	RAD1 homolog (S. pombe)	NM_002853.2	0.018	0.73	1.66
<i>CDKN3</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	NM_005192.2	0.044	0.60	1.52
<i>RBM5^b</i>	RNA binding motif protein 5	NM_005778.1	0.024	-0.69	1.61
<i>ING4</i>	inhibitor of growth family, member 4	NM_198287.1	0.044	-0.69	1.62
<i>IFITM3</i>	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	NM_021034.1	0.033	-0.83	1.77
<i>KLF11</i>	Kruppel-like factor 11	NM_003597.4	0.039	-0.92	1.89
<i>MTSS1^b</i>	metastasis suppressor 1	NM_014751.2	0.009	-1.14	2.20
<i>RARRES3^b</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	NM_004585.2	0.022	-1.64	3.12
Nucleotide metabolism					
<i>CTPS</i>	CTP synthase	NM_001905.1	0.046	0.98	1.98
<i>RRM2^b</i>	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	NM_001034.1	0.019	0.86	1.81
<i>PRPS1L1^b</i>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1-like 1	NM_175886.2	0.022	0.71	1.63
<i>POLR3K^b</i>	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K	NM_016310.2	0.013	0.69	1.61
<i>RRM1</i>	ribonucleotide reductase M1 polypeptide	NM_001033.2	0.045	0.55	1.46
<i>TK1</i>	thymidine kinase 1, soluble	NM_003258.1	0.028	0.50	1.41
<i>DTYMK</i>	deoxythymidylate kinase	NM_012145.2	0.037	0.44	1.36

Continued

TABLE 3—Continued

<i>ADCY2^b</i>	adenylate cyclase 2 (brain)	NM_020546.1	0.028	0.41	1.33
<i>ATP5G1</i>	ATP synthase, H + transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C1 (subunit 9)	NM_005175.1	0.042	0.28	1.22
<i>PDE6G^b</i>	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	NM_002602.1	0.003	-0.53	1.44
Regulation of gene expression					
<i>CIP29</i>	cytokine induced protein 29 kDa	NM_033082.1	0.040	1.24	2.36
<i>ZNF738^a</i>	zinc finger protein 738	BC034499.1	0.003	1.03	2.04
<i>POLR3K^b</i>	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K	NM_016310.2	0.013	0.69	1.61
<i>ELAVL1</i>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 1 (Hu antigen R)	NM_001419.2	0.041	0.67	1.59
<i>HIP2^b</i>	huntingtin interacting protein 2	NM_005339.3	0.017	0.58	1.49
<i>CREB3^b</i>	cAMP responsive element binding protein 3	NM_006368.4	0.023	0.46	1.38
<i>CASP8AP2</i>	CASP8 associated protein 2	NM_012115.2	0.049	0.41	1.33
<i>ZNF414^b</i>	zinc finger protein 414	NM_032370.1	0.029	0.41	1.32
<i>GABPB2</i>	GA binding protein transcription factor, β subunit 2	NM_002041.2	0.027	0.40	1.32
<i>SMARCA4</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	NM_003072.2	0.034	0.39	1.31
<i>SIX5^b</i>	sine oculis homeobox homolog 5 (Drosophila)	NM_175875.3	0.017	-0.49	1.40
<i>ZNF44</i>	zinc finger protein 44	BC032246.1	0.032	-0.57	1.49
<i>ZFX4</i>	zinc finger homeodomain 4	NM_024721.2	0.030	-0.58	1.49
<i>MITF</i>	microphthalmia-associated transcription factor	NM_006722.1	0.042	-0.60	1.51
<i>ZNF688</i>	zinc finger protein 688	NM_145271.2	0.026	-0.61	1.53
<i>TNIP2^b</i>	TNFAIP3 interacting protein 2	NM_024309.2	0.008	-0.62	1.54
<i>ING4</i>	inhibitor of growth family, member 4	NM_198287.1	0.044	-0.69	1.62
<i>BCL6^a</i>	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	NM_001706.2	0.013	-0.74	1.67
<i>ELL3^b</i>	elongation factor RNA polymerase II-like 3	NM_025165.1	0.006	-0.74	1.67
<i>PPARA^b</i>	peroxisome proliferative activated receptor, α	NM_032644.1	0.009	-0.74	1.67
<i>RELB</i>	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	NM_006509.2	0.033	-0.74	1.67
<i>ZFP64^b</i>	zinc finger protein 64 homolog (mouse)	NM_018197.2	0.017	-0.78	1.72
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3	NM_005178.2	0.039	-0.79	1.73
<i>NFIL3^b</i>	nuclear factor, interleukin 3 regulated	NM_005384.1	0.012	-0.83	1.77
<i>ANKZF1</i>	ankyrin repeat and zinc finger domain containing 1	NM_018089.1	0.036	-0.85	1.81
<i>ARID5A</i>	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	NM_006673.2	0.042	-0.92	1.89
<i>KLF11</i>	Kruppel-like factor 11	NM_003597.4	0.039	-0.92	1.89
<i>CREB5^b</i>	cAMP responsive element binding protein 5	NM_004904.1	0.010	-1.00	2.00
<i>PNRC1^a</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	NM_006813.1	0.008	-1.05	2.07
<i>ATF3</i>	activating transcription factor 3	NM_004024.2	0.049	-1.10	2.14
<i>MAF</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	NM_005360.2	0.044	-1.19	2.29
<i>ZNF385^b</i>	zinc finger protein 385	NM_015481.1	0.011	-1.38	2.61
Cell Adhesion					
<i>HAPLN1^a</i>	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	NM_001884.2	0.005	3.00	7.99
<i>CIB1^b</i>	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	NM_006384.2	0.035	0.32	1.25
<i>FLRT2</i>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	NM_013231.3	0.042	-0.64	1.56
<i>CNTNAP1</i>	contactin associated protein 1	NM_003632.1	0.041	-0.72	1.64
<i>CSNK2A1</i>	casein kinase 2, α 1 polypeptide	NM_177560.2	0.030	-0.73	1.66
<i>LGALS3BP^b</i>	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	NM_005567.2	0.014	-0.89	1.85
<i>PERP</i>	PERP, TP53 apoptosis effector	NM_022121.2	0.042	-0.92	1.89
<i>ADAM8^b</i>	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109.1	0.044	-1.06	2.08
<i>CLDN15^b</i>	claudin 15	NM_014343.1	0.022	-1.13	2.19
<i>ADAM33</i>	ADAM metalloproteinase domain 33	NM_153202.1	0.027	-1.22	2.33
<i>PDGFRA</i>	platelet-derived growth factor receptor, α polypeptide	NM_006206.2	0.045	-1.34	2.53

Continued

TABLE 3—Continued

<i>TNXB^b</i>	tenascin XB	NM_032470.2	0.015	-2.32	4.98
<i>DKFZp434B1231^b</i>	eEF1A2 binding protein	NM_178275.3	0.010	-2.66	6.31
Extracellular matrix component, biosynthesis					
<i>HAPLN1^a</i>	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	NM_001884.2	0.005	3.00	7.99
<i>TIMP3^a</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	BG104808.1	0.006	0.42	1.34
<i>BMP1^b</i>	bone morphogenetic protein 1	NM_006129.2	0.024	-0.62	1.54
<i>B4GALT7^b</i>	xylosylprotein β 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I)	NM_007255.1	0.026	-0.66	1.57
<i>MATN2</i>	matrilin 2	NM_030583.1	0.027	-0.96	1.95
<i>ChGn^a</i>	chondroitin beta1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase	NM_018371.3	0.015	-1.42	2.68
<i>TNXB^b</i>	tenascin XB	NM_032470.2	0.015	-2.32	4.98
MAPK signaling pathway					
<i>DUSP2^b</i>	dual specificity phosphatase 2	NM_004418.2	0.004	1.17	2.25
<i>STMN1^b</i>	stathmin 1/oncoprotein 18	NM_203401.1	0.006	1.11	2.16
<i>PLA2G12A</i>	phospholipase A2, group XIIA	NM_030821.3	0.044	0.39	1.31
<i>PDE6G^b</i>	phosphodiesterase 6G, cGMP-specific, rod, gamma	NM_002602.1	0.003	-0.53	1.44
<i>TNIP2^b</i>	TNFAIP3 interacting protein 2	NM_024309.2	0.008	-0.62	1.54
<i>UCN</i>	urocortin	NM_003353.2	0.044	-0.65	1.57
<i>CASP7^b</i>	caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_001227.2	0.023	-0.65	1.57
<i>MAP3K6</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6	NM_004672.3	0.041	-0.67	1.59
<i>BCL3</i>	B-cell CLL/lymphoma 3	NM_005178.2	0.039	-0.79	1.73
<i>MAPK8IP1</i>	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	NM_005456.2	0.037	-0.86	1.81
<i>SPTBN1</i>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1 (SPTBN1)	NM_003128.1	0.049	-0.87	1.83
<i>KLF11</i>	Kruppel-like factor 11	NM_003597.4	0.039	-0.92	1.89
<i>PNRC1^a</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	NM_006813.1	0.008	-1.05	2.07
<i>PDGFRA</i>	platelet-derived growth factor receptor, α polypeptide	NM_006206.2	0.045	-1.34	2.53
<i>PIK3C2B^a</i>	phosphoinositide-3-kinase, class 2, β polypeptide	NM_002646.2	0.004	-1.54	2.91
<i>RARRES3^b</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	NM_004585.2	0.022	-1.64	3.12

^aGenes within the list of 120 genes identified as differentially expressed in at least 50 percent of the "leave-one-out" datasets.

^bThose within the list of 25 genes identified as differentially expressed in 100 percent of the "leave-one-out" datasets (see Methods for details).

expression profile of periosteal cells from a large group of AS patients (p.Ser252Trp mutation) as compared with normal FGFR2 expressing cells.

Our study represents the largest sample where a dominant gain-of-function mutation of a rare Mendelian disorder is analyzed through microarray technology. Successful detection of a gene expression signature was achieved possibly because all the patients harbor a common mutation in a tyrosine kinase receptor involved in critical developmental signaling cell pathways that leads to a very homogeneous phenotype. On the other hand, our sample size contrasts with the expression profile studies of complex disorders, such as cancer, which are etiologically very heterogeneous and require an even larger number of individuals in

the analysis. It will be important to verify whether other craniosynostotic conditions with either known or unknown causative mutations are also correlated with specific gene expression signatures.

Lemonnier et al. (12) reported that AS p.Ser252Trp mutation induces striking downregulation of FGFR2 protein in osteoblasts, which was attributed to an increased internalization of the receptor. In contrast, our results indicate that AS periosteal cells have a different pattern of FGFR2 expression, as similar FGFR2 transcript and protein levels were observed between control and AS periosteal cells. These discrepancies may be due to differences between the two cell types used in the studies.

Independent confirmation of AS expression changes identified by our mi-

croarray studies came from three strategies. First we used qRT-PCR to confirm the upregulation of six genes (*STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN*, *EEF1B2*) in AS cell lines. As a second approach, we used control periosteal cells treated with high concentrations of exogenous FGF2 (a specific wild type FGFR2c ligand) to mimic the activation status of mutant FGFR2. We observed over-expression in FGF2-treated cells of the six genes previously confirmed to be upregulated in AS cells through qRT-PCR. Curiously, we observed a change in gene expression of the selected genes only after 24 h of FGF2 treatment, suggesting that their expression is a late event of FGFR2c activation. In addition, these results imply that the genes differentially expressed in the AS cells are involved either directly or

Figure 3. Real-time PCR showing expression levels for six genes identified as upregulated in AS cells by microarray analysis: *STMN1*, *SPAG5*, *RMM2*, *HIP2*, *CENPN*, and *EEF1B2*. The expression levels for these genes are enhanced in AS samples when compared with controls.

indirectly with FGFR2c signaling. It is important to point out that this strategy replicates the microarray data in a biologically analogous system. Indeed, Mansukhani et al. (15) showed that gene expression profiles of a murine osteoblast cell line harboring the p.Ser252Trp mutation could be reproduced by exogenous FGF treatment. These findings also suggest that the mutated FGFR2 may over-activate the normal molecular pathways elicited by wild type receptor instead of inducing novel molecular pathways.

As a third approach to validate our microarray results, we looked at the differentially expressed transcripts for genes known to be involved in the canonical FGFR transduction signaling

pathways. As will be discussed later, we observed the presence of *PIK3C2B* gene, which encodes a protein of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) family, and of several members of the MAPK cascades. One of the important signaling pathways leading to activation of the MAP kinases is through FGFR-PI3K hierarchical cascade. We also observed different expression profiles concerning other genes associated with FGFR2 activation, such as *FLRT2*, a positive regulator of FGFR cascade, and *MITE*, a transcription factor acting downstream of FGFR/MEK/ERK signaling. Therefore, our results (including both laboratory and the leave-one-out statistical analysis) support that the expression signature observed in AS cells do represent a

biological state caused by p.Ser252Trp mutation in FGFR2.

Analysis of the genes differentially expressed in AS cells revealed novel expression networks and cellular processes possibly involved in AS pathogenesis. A previous study reported a gene expression profiling experiment using fibroblast periosteal cells obtained from one AS patient (p.Pro253Arg), and two controls (20). We did not observe overlap between the list of genes identified in that study and the set of 263 genes reported here. We think that the very small number of samples analyzed in the previous study (one AS patient and two controls) may have introduced a considerable bias due to individual variation in gene expression, which

Figure 4. Real-time PCR showing expression levels for six genes (*STMN1*, *SPAG5*, *RRM2*, *HIP2*, *CENPN*, and *EEF1B2*) in response to FGF2 treatment. The bars are representing the expression levels of each gene before administration of 0.5 percent FBS and FGF2 (0 h), after 24 h of administration of 0.5 percent FBS (0.5 percent FBS) and after addition of 0.5 percent FBS and FGF2 (0.5 percent FBS + FGF2).

would explain the absence of genes in common in the two studies.

The majority of genes upregulated in AS cells are associated with positive regulation of cell proliferation and nucleotide metabolism, suggesting that the activating FGFR2 mutation induces increased periosteal cell proliferation. Indeed, an excessive proliferation in AS cells in comparison to control cells was clearly evident during tissue culture cell expansion although further experiments are needed to confirm this phenotype.

FGFR-MAPK signaling functions as a trigger of fibroblast cell proliferation. However, we observed downregulation of several members of MAPK signaling

cascades (13 out of 16 genes) as well as *PIK3C2B* in AS cells. It is of note that among the three upregulated genes belonging to the MAPK cascades is *DUSP2*, which is associated with inhibition of MAPK signaling by dephosphorylating activated MAPKs. Interestingly, downregulation of PI3K and MAPK signaling pathways have been associated recently with increased stem cell differentiation (26,27). Therefore, it is possible that the AS mutant FGFR2 expressing cells are more committed toward the osteoblast lineage due to downregulation of transcripts associated with PI3K-MAPK signaling networks. However, further experiments to measure transcript/protein levels of components of

the PI3K-MAPK pathway in mutant FGFR2 expressing cells are warranted to confirm the downregulation and the association of this signaling network with the pathophysiology of AS.

We also found downregulation of most of the genes involved in cell adhesion (11 out of 13 genes) and extracellular matrix composition (five out of seven genes) in AS cells, which contrast one previous study that has shown that periosteal AS cells synthesize a greater amount of extracellular matrix components (including glycosaminoglycans, type I and III collagens, and fibronectin) than normal cells (28). In view of this, it would be interesting to test if the suggested reduction in

cell adhesion and extracellular matrix complexity of our AS periosteal cells are associated with the greater osteogenic capacity of these cells.

As we are aware, the number of significantly altered genes (263 with a $P \leq 0.05$) does not exceed the expected number of genes that would be found by chance in the dataset using the same confidence interval (476 genes out of 9,526 by chance alone at $P \leq 0.05$, and a one-tailed distribution). However, if we took into account the 120 more significant genes (identified as differentially expressed in at least 50 percent of the "leave-one-out" datasets), we did not observe great differences in the distribution of the upregulated and downregulated genes among the functional categories previously discussed for the 263 genes. The exception is the group of genes associated with apoptosis, in which a tendency of enhancement of the number of genes downregulated in AS cells as compared with control cells was observed. These results thus confirm that the most abundant classes of upregulated genes are those related to positive regulation of cell proliferation and nucleotide metabolism, whereas the genes associated with all the other functional categories are mostly downregulated in AS cells.

It was reported that under osteogenic differentiation condition, murine calvarial osteoblast cells heterozygous for p.Ser252Trp mutation in FGFR2 showed increased apoptosis (13,15,16). However, we found an inclination toward downregulation of genes associated with apoptosis between control and AS cells among the 120 genes referred above; in fact, we did not observe significant cell death either in control or in the mutant cell lineages. These discrepancies may be due to differences in the experimental models and cell types used in each study.

Taken together, our findings have important implications in understanding the periosteum function in the postnatal pathogenesis of Apert syndrome patients. The increased proliferative and osteogenic potentials here observed in the AS cells may lead to an expansion of

periosteal cells with the potential to differentiate and contribute to premature suture ossification. It is important to note that a similar mechanism already has been discussed for osteoblast cells upon FGFR over-activation (15). Injuries at the suture site, as those induced by surgical repair, could trigger this abnormal periosteal cell behavior and lead to acceleration of the suture fusion after surgery. Thus, our results suggest for the first time that the mutant periosteal cells in AS patients might play an important role in the pathogenesis of this disease as well as in the recurrent suture closure after surgery.

Recently, identification of mutations in *ephrin-B1* gene associated with craniosynostosis have led to the hypothesis that alteration in the cellular pathways activated by these molecules can lead to an abnormal compartmentalization of the cells during embryogenesis leading to disturbed tissue boundary formation (29). Considering the enhanced osteogenic potential of the AS periosteal cells and also that ephrins recently were shown to activate FGFRs (30), we would like to suggest that a similar mechanism may contribute to the craniosynostosis in FGFR-mutated patients, once the signals that determine separate identities of the cranial suture tissues have been disturbed.

While the full spectrum of molecular factors that modulate these aberrant cellular behaviors remains to be determined, our gene expression profiling study shall contribute to the identification of novel genes with important roles in ossification of cranial sutures or as candidates for syndromic craniosynostosis with still unidentified cause. Of particular note is the recent finding showing that loss of *Dusp6*, a member of the DUSP (dual-specificity phosphatases) family which is activated by FGFRs and inhibits MAP Kinases, cause coronal craniosynostosis in mice (31). Therefore DUSP family members may be considered good candidate genes for FGFR-like craniosynostosis. Interestingly, we found that *DUSP2* is one of the most significant differentially expressed genes in AS periosteal cells. Finally, the understanding of the molecular

pathways involved in the abnormal AS periosteum behavior will certainly have important implications in the prognostic of surgical repair in syndromic craniosynostosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all of the patients and their relatives who participated in this work. We would like to thank Dr Hugo Armelin and Jaqueline Salotti for providing the FGFR2 antibodies and Y1 cell lineage; Regina Maki Sasahara for her help in earlier phases of the project; Dr Oswaldo Keith Okamoto for stimulating and useful discussions; Constância G Urbani for secretarial assistance; Eder Zuconni and Natassia Vieira for their contribution to the flow cytometry experiments; Dr Alessandra S Gordonos and Fernanda Jehee for revision of the manuscript. This work is supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. Cohen MM Jr et al. (1992) Birth prevalence study of the Apert syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 42: 655–9.
2. Upton J, Zuker RM (eds) (1991) *Clinics in plastic surgery*. Vol 18: Apert syndrome. WB Saunders, Philadelphia.
3. Park WJ et al. (1995) Analysis of phenotypic features and FGFR2 mutations in Apert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 57:321–8.
4. Slaney SF, et al. (1996) Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 58:923–32.
5. Cohen MM Jr. (2000) Syndromes with craniosynostosis. In: Cohen Jr MM, MacLean RE. (eds) *Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, and Management*. New York: Oxford University Press. 309–441.
6. Moloney DM et al. (1996) Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nat. Genet.* 13:48–53.
7. Wilkie AO et al. (1995) Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nat. Genet.* 9:165–72.
8. Anderson J, Burns HD, Enriquez-Harris P, Wilkie AO, Heath JK. (1998) Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand. *Hum. Mol. Genet.* 7:1475–83.
9. Yu K, Herr AB, Waksman G, Ornitz DM. (2000) Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-

- binding specificity in Apert syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 7:14536–41.
10. Ibrahimi OA, Zhang F, Hrstka SC, Mohammadi M, Linhardt RJ. (2004) Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry*. 43:4724–30.
11. Lomri A, Lemonnier J, Hott M, et al. (1998) Increased calvaria cell differentiation and bone matrix formation induced by fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Apert syndrome. *J. Clin. Invest.* 101:1310–7.
12. Lemonnier J, Delannoy Ph, Hott M, Lomri A, Modrowski D, Marie PJ. (2000) The Ser252Trp fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2) mutation induces PKC-independent downregulation of FGFR-2 associated with premature calvaria osteoblast differentiation. *Exp. Cell Res.* 256:158–67.
13. Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. (2000) Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J. Cell Biol.* 149: 1297–1308.
14. Lomri A, Lemonnier J, Delannoy P, Marie PJ. (2001) Increased expression of protein kinase Calpha, interleukin-1alpha, and RhoA guanosine 5'-triphosphatase in osteoblasts expressing the Ser252Trp fibroblast growth factor 2 receptor Apert mutation: identification by analysis of complementary DNA microarray. *J. Bone Miner. Res.* 16:705–12.
15. Mansukhani A, Ambrosetti D, Holmes G, Cornivelli L, Basilico C. (2005) Sox2 induction by FGF and FGFR2 activating mutations inhibits Wnt signaling and osteoblast differentiation. *J. Cell Biol.* 168:1065–76.
16. Chen L, Li D, Li C, Engel A, Deng CX. (2005) A Ser252Trp [corrected] substitution in mouse fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) results in craniosynostosis. *Bone*. 33:169–78. Erratum in: *Bone*. (2005) 37:876.
17. Wang Y et al. (2005) Abnormalities in cartilage and bone development in the Apert syndrome FGFR2(+ /S252W) mouse. *Development*. 132: 3537–48.
18. Hopper RA et al. (2001) Effect of isolation of periosteum and dura on the healing of rabbit calvarial inlay bone grafts. *Plast. Reconstr. Surg.* 107:454–62.
19. Ozerdem OR et al. (2003) Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. *J. Craniofac. Surg.* 14:371–9.
20. Carinci F et al. (2002) Expression profiles of craniosynostosis-derived fibroblasts. *Mol. Med.* 8: 638–44.
21. Zuk PA et al. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7:211–28.
22. Quackenbush J. (2002) Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 32(Suppl.):496–501.
23. Golub TR et al. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 286:531–7.
24. Reis EM et al. (2004) Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*. 23:6684–92.
25. van't Veer LJ et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 415:530–6.
26. Takahashi K, Murakami M, Yamanaka S. (2005) Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem. Soc. Trans.* 33:522–5.
27. Armstrong L et al. (2006) The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta signaling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum. Mol. Genet.* 15:1894–1913.
28. Bodo M et al. (1997) Glycosaminoglycan metabolism and cytokine release in normal and otosclerotic human bone cells interleukin-1 treated. *Eur. J. Clin. Invest.* 27:36–42.
29. Twigg SR et al. (2004) Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101:8652–7.
30. Yokote H et al. (2005) Trans-activation of EphA4 and FGF receptors mediated by direct interactions between their cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:8866–71.
31. Li C, Scott DA, Hatch E, Tian X, Mansour SL. (2007) Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development*. 134:167–76.

56 Thomas GP, Wilkie AO, Richards PG, Wall SA: FGFR3 P250R mutation increases the risk of reoperation in apparent 'nonsyndromic' coronal craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 2005;16:347–354.

57 Wilcox WR, Tavormina PL, Krakow D, Kitoh H, Lachman RS, Wasmuth JJ, Thompson LM, Rimoin DL: Molecular, radiologic, and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet* 1998;78:274–281.

Dr. David P. Rice
Professor of Orthodontics
Institute of Dentistry and Helsinki University Central Hospital
Box 41, University of Helsinki
FIN-00014 Helsinki (Finland)
E-Mail David.Rice@helsinki.fi

Genetics of Craniosynostosis: Genes, Syndromes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations

Maria Rita Passos-Bueno, Andréa L. Sertié, Fernanda S. Jehee,
Roberto Fanganiello, Erika Yeh

Human Genome Center, Institute of Biosciences, University of São Paulo,
São Paulo, Brazil

Abstract

Craniosynostosis is a very heterogeneous group of disorders, in the etiology of which genetics play an important role. Chromosomal alterations are important causative mechanisms of the syndromic forms of craniosynostosis accounting for at least 10% of the cases. Mutations in 7 genes are unequivocally associated with mendelian forms of syndromic craniosynostosis: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1*, *MSX2* and *RAB23*. Mutations in 4 other genes, *FBN1*, *POR*, *TGFBR1* and *TGFBR2*, are also associated with craniosynostosis, but not causing the major clinical feature of the phenotype or with an apparently low penetrance. The identification of these genes represented a great advance in the dissection of the genetics of craniosynostosis in the last 15 years, and today they explain the etiology of about 30% of the syndromic cases. The paucity in the identification of genes associated with this defect has partly been due to the rarity of familial cases. In contrast, very little is known about the molecular and cellular factors leading to nonsyndromic forms of craniosynostosis. Revealing the molecular pathology of craniosynostosis is also of great value for diagnosis, prognosis and genetic counseling. This chapter will review (1) the chromosomal regions associated with syndromic forms of the malformation, (2) the genes in which a large number of mutations have been reported by independent studies (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* and *EFNB1*) and (3) the molecular mechanisms and genotype-phenotype correlations of such mutations.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

Cranial suture fusion occurs at specific periods during the lifetime of an individual, and therefore, abnormal activation of cell signaling triggered by genetic and/or environmental factors during embryogenesis or early childhood

can alter the patency of the sutures. The two most common processes associated with cranial suture developmental defects are craniosynostosis, premature fusion of cranial sutures, and parietal foramina, delayed differentiation of the bones of the skull. Although common genes seem to be involved with these two cranial suture abnormalities, this chapter will focus on the genetics of craniosynostosis.

The prevalence of craniosynostosis is estimated to be 1 to 2,000–3,000 births [1]. The frequencies of different types of craniosynostosis vary according to ascertainment centers, but on average, of all craniosynostosis, sagittal synostosis is the most common (40–55%), followed by coronal (20–25%), metopic (5–15%), multiple suture synostosis (5–15%) and lambdoid (0–5%) [1].

Craniosynostosis has usually been classified as nonsyndromic (or isolated) and syndromic forms for genetic studies. Nonsyndromic craniosynostosis accounts for 70% of the cases [2–4], and occurs when cranial suture fusion is the only primary defect in the individual. Secondary symptoms, such as neurologic or ophthalmologic manifestations, can be present as a consequence of early sutural obliteration [1]. On the other hand, syndromic craniosynostosis occurs associated with other primary defects of morphogenesis. In practice, it is very hard to make this distinction and it is possible that some nonsyndromic forms actually represent the end of the spectrum of the clinical variability of syndromic forms.

Familial recurrence is reported for 14% in nonsyndromic coronal synostosis, 6% in sagittal synostosis, 3–9% in metopic synostosis and 22% in syndromic metopic synostosis [2–4, Jehee, unpubl. data]. Pedigrees from familial cases are compatible with autosomal dominant, autosomal recessive or X-linked inheritance [1–5]. Multifactorial inheritance also seems to play a role in the etiology of the nonsyndromic forms of craniosynostosis, although additional epidemiological studies should be performed.

The genetic etiology of the nonsyndromic craniosynostosis is still very poorly understood: to date, *EFNA4* is the only gene that when mutated causes only nonsyndromic craniosynostosis [6]. However, the understanding of the effect of mutations in this gene on the human phenotype still depends on the identification of a larger number of patients with *EFNA4* pathogenic changes. Conventional karyotype analysis is not recommended for nonsyndromic craniosynostosis.

Despite the lower proportion of syndromic forms, their genetic analysis has largely contributed to the elucidation of some important pathways for suture development and closure. There are at least 150 syndromes associated with craniosynostosis as a major clinical feature. Mendelian and chromosomal alterations are important causative mechanisms of this group of craniosynostosis. Linkage analysis in familial cases and molecular analysis of chromosomal alterations have led to the identification of six genes that when mutated are unequivocally associated with syndromic craniosynostosis: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1*, *MSX2* (table 1). More recently *RAB23* has been

Table 1. Genes and phenotypes associated with craniosynostosis

Gene	Gene symbol	Chromosome	Phenotypes	MIM	Penetrance
Fibroblast growth factor receptor 1	<i>FGFR1</i>	8p11.2-p11.1	Preiffer osteoglophonic dysplasia Crouzon Crouzon with scaphocephaly Jackson-Weiss Preiffer Apert SCS like cutis gyrate syndrome of Beare-Stevenson Antley-Bixley nonclassifiable syndromes with craniosynostosis	101600 166250 123500 123150 101600 101200 101400 123790	high ^a apparently high high ^b high high high high high
Fibroblast growth factor receptor 2	<i>FGFR2</i>	10q26			
Fibroblast growth factor receptor 3	<i>FGFR3</i>	4p16.3	nonsyndromic coronal synostosis Muenke syndrome Crouzon with acanthosis nigricans SCS like thanatophoric dysplasia type I thanatophoric dysplasia type II SCS nonsyndromic craniosynostosis	602849 123500 101400 187600 187601 101400	high high high low (<30%) high very few cases reported
Twist homolog 1 Drosophila 1	<i>TWIST1</i>	7p21			
Ephrin-B1 Ras-associated protein RAB23 Muscle segment homeobox homolog Drosophila 2	<i>EFNB1</i> <i>RAB23</i> <i>MSX2</i>	Xq12 6p11 5q34-35	craniofrontonasal syndrome Carpenter syndrome craniosynostosis Boston type	304110 201000 604757	high high high

included in this list [7]. Mutations in 4 other genes, *FBN1*, *POR*, *TGFBR1* and *TGFBR2* (table 1), are also associated with craniosynostosis, but not causing the major clinical feature of the phenotype and/or with an apparently low penetrance [8–10]. The identification of these genes represented a great advance in the dissection of the genetics of craniosynostosis in the last 15 years, even though they explain the etiology of about 30% of the syndromic cases. The paucity in the identification of genes associated with this defect has partly been due to the rarity of familial cases.

Revealing the molecular pathology of craniosynostosis has also been of great value for diagnosis, prognosis and genetic counseling. In this chapter we will deal with the genetics of the syndromic forms of craniosynostosis.

Chromosome Alterations in the Etiology of Craniosynostosis

All types of chromosomal abnormalities have already been described in patients with craniosynostosis, including deletions and duplications in almost all human chromosomes (fig. 1). The large number of chromosomal alterations and their ubiquitous location in the human genome indicate the vast genetic heterogeneity of this condition and reinforce the importance of performing karyotype analysis in patients with syndromic craniosynostosis that have been excluded for any of the known monogenic forms. It was estimated that approximately 16% of all cases of syndromic craniosynostosis are related to chromosomal abnormalities [11]. There is a high association of craniosynostosis with duplication 13q21-q34 and deletion 7p15-p21, 9p21-p24 and 11q23-q25 [50, 51]. Furthermore, an increasing number of craniosynostotic patients with deletion 22q11 and deletion and or duplication 1p36 have been reported [12, 33].

The mapping of important genes involved in suture closure based on chromosomal abnormalities has been limited. With the exception of 7p21, 9p21 and 11q23 deletions, the number of cases carrying each chromosomal alteration is not large enough to enable phenotype/genotype correlations. Furthermore, craniosynostosis is not present in all patients bearing the same chromosomal rearrangement; for instance, around 65–100% of patients with 9p21 deletions and only 50–70% of patients with deletions on 11q23 present metopic synostosis [52–55]. This suggests that other factors such as the environmental and genetic background of the individual could be important for the penetrance of craniosynostosis.

Table 1. (continued)

Gene	Gene symbol	Chromosome	Phenotypes	MIM	Penetrance
Transforming growth factor- β receptor type I	<i>TGFBR1</i>	9q33-q34	Loeys-Dietz syndrome	609192	low (<30%)
Transforming growth factor- β receptor type II	<i>TGFBR2</i>	3p22	Loeys-Dietz syndrome		low (<30%)
Cytochrome P450 reductase gene	<i>POR</i>	7q11.2	Antley-Bixley	207410	apparently high
Fibrillin	<i>FBN1</i>	15q21	Shprintzen-Goldberg	182212	very few cases reported
^a High = Penetrance higher than 70%.					
^b Variability of the phenotype possibly related to the type of mutation.					
^c Under discussion.

Fig. 1. Human chromosomal map depicting duplications and deletions associated with craniosynostosis [data based on 1, 12–49].

Mendelian Causes of Craniosynostosis

Herein we include a detailed description of the genes *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1* and *EFNB1*, as several mutations in each of these genes have been associated with autosomal dominant forms of craniosynostosis, mostly syndromic forms as illustrated in figure 2.

Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs)

FGFR Structure and Functions

The FGFR family consists of four closely related members of signal-transduction receptor tyrosine kinases (FGFR1–4). Each receptor is composed of three extracellular immunoglobulin-like domains (IgI, IgII and IgIII), a single-pass

Fig. 2. Facial and limb appearance of patients with craniosynostosis. **a** Pfeiffer syndrome, FGFR1 p.Pro252Arg (courtesy of Dr. N. Alonso). **b–d** Pfeiffer syndrome, FGFR2 c.940-1G>C. **e** Pfeiffer syndrome, FGFR2 p.Trp290Cys. **f, g** Apert syndrome, FGFR2 p.Pro253Arg. **h–j** Apert syndrome, FGFR2 p.Ser252Trp. **k** Crouzon syndrome, FGFR2 p.Cys278Phe. **l–n** Three affected members of the same family, Muenke syndrome, FGFR3 p.Pro205Arg. **o–q** SCS, 46,XX, ins(7;9)(p21.2;p21.2p24.2). **r** SCS, TWIST1 c.385_405InsAALRKII.

transmembrane domain (TM), and a split intracellular tyrosine kinase domain (TK1/TK2). The IgII and IgIII loops are critical for fibroblast growth factors (FGF) binding. The formation of a complex involving two FGFRs, a FGFR dimer and cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for autophosphorylation of various tyrosine residues in the TK domain [56]. Once phosphorylated, these tyrosines initiate signal transduction through a diverse array of signaling pathways, which may control phenomena such as cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis according to the context [57, 58].

Complexity in FGFR signaling is enhanced by a wide array of alternative splicings. Most important is the alternative splicing of the exons encoding the C-terminal half of the third Ig loop of FGFR1–3. For these three receptors, the IgIII loop is encoded by two exons, an invariant exon termed IIIa and one of two exons, termed IIIb and IIIc, respectively, to which the IIIa exon is spliced. This generates two receptor isoforms with different ligand-binding specificities [59]. Best known are the variants of FGFR2: FGFR2b (encoded by the IIIb exon) is expressed mainly on the epithelia and is activated by ligands synthesized predominantly in the tissue mesenchyme; on the other hand, FGFR2c (encoded by the IIIc exon), the most abundant one, is located primarily in the mesenchyme and preferentially recognizes epithelial FGFRs.

FGF-FGFR signaling plays a critical role in early embryonic development and in organogenesis and heterozygous mutations in the FGFR1–3 have been associated with a number of different dominant disorders, including craniosynostosis (gain-of-function mutations in FGFR1–3) [60–81], short-limbed bone

dysplasias (gain-of-function mutations in *FGFR3*) [60, 82–85]. Kallmann syndrome (haploinsufficiency for *FGFR1*) [86], lacrimo-auriculo-dento-digital (LADD) syndrome (dominant-negative *FGFR2* and possibly *FGFR3* mutations and haploinsufficiency for *FGF10*) [87] and camptodactyly, tall stature, scoliosis, and hearing loss (CATSHL) syndrome (dominant-negative *FGFR3* mutation) [88]. In this section *FGFR1–3* mutations associated with craniosynostosis are discussed.

Gain-of-Function *FGFR* Mutations Associated with Craniosynostosis: Overview

Heterozygous mutations in *FGFR1*, *FGFR2* and *FGFR3* genes account for the majority of cases of syndromic craniosynostosis. The *FGFRs* craniosynostotic syndromes share several craniofacial features including premature closure of coronal or other cranial sutures, but have distinct limb and dermatological features. In addition, some patients with nonclassifiable craniosynostotic syndromes or with nonsyndromic craniosynostosis have been shown to bear mutations in *FGFR2* and *FGFR3* genes (tables 1, 2).

The *FGFR1–3* mutations associated with craniosynostosis identified so far are summarized in table 2 and illustrated in figure 3 [60–81]. All pathogenic *FGFR1–3* mutations associated with craniosynostosis act dominantly and confer gain-of-function to the mutated receptor through different mechanisms, including (1) FGF-independent receptor dimerization and activation, (2) enhanced FGF-binding affinity, (3) loss of FGF-binding specificity and (4) ectopic splice form expression.

FGFR-related craniosynostoses are found both in familial and sporadic cases, and some mutations are highly recurrent. An exclusive paternal origin of de novo mutations has been described for several *FGFRs* mutations [89, 90].

Genotype-Phenotype Correlations

Analysis of *FGFR1–3* mutations reveals a complex pattern of phenotype-genotype correlations. This is further complicated by the fact that the distinction between the craniosynostosis syndromes is not absolute and clinical overlapping is a common feature. There are several examples in which clinically different phenotypes can be caused by either the same mutation or by equivalent mutations on each of the *FGFR1–3*, while a given phenotype can be associated with many different mutations in the same or different *FGFRs*. In addition, low penetrance mutations have also been observed (table 2).

Table 2. *FGFR1–3* mutations associated with craniosynostosis

Gene	Nucleotide change ^a	Effects on protein or RNA ^a	Gene or protein region ^b	Phenotype	Reference No. ^c
<i>FGFR1</i>	c.755C>G	p.Pro252Arg	IgII-IgIII linker	Pfeiffer syndrome; Jackson-Weiss syndrome	61
	c.929T>A c.1115G>A c.1135T>C	p.Asn30Ile p.Tyr372Cys p.Cys379Arg	IgIIIc IgIII-TM TM	osteoglophonic syndrome osteoglophonic syndrome osteoglophonic syndrome	62 62 62
<i>FGFR2</i>	c.314A>G c.514+515GC>TT c.755C>G c.755C>T c.755-756 CG>TC c.755-757 CGC>TCT c.758C>G c.758C>T c.760C>T c.788C>T c.799T>C	p.Tyr105Cys p.Ala172Phe p.Ser252Trp p.Ser252Leu ^d p.Ser252Phe p.Ser252Phe/Pro253Ser p.Pro253Arg p.Pro253Leu p.His254Tyr p.Pro263Leu p.Ser267Pro	IgI IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker IgII-IgIII linker	Crouzon syndrome Pfeiffer syndrome Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome Crouzon syndrome Crouzon syndrome Crouzon syndrome Crouzon syndrome Crouzon syndrome Crouzon syndrome Crouzon syndrome	63
<i>FGFR3</i>	c.803insTTGG c.804-809delGTGGTC c.818_820del c.823_824ins12 c.826T>G	p.Thr268ThrGly p.Val269_Val270del p.Asp273del p.Val274_Glu275ins4 p.Phe276Val	IgIIIa IgIIIa IgIIIa IgIIIa IgIIIa	Crouzon syndrome nonclassifiable disorder with Crouzon syndrome Crouzon syndrome Pfeiffer syndrome Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome	64 65

Gene	Nucleotide change ^a	Effects on protein or RNA ^a	Gene or protein region ^b	Phenotype	Reference No. ^c
	c.833G>A	p.Cys278Tyr ^d	IgIIIa	Crouzon syndrome; nonsyndromic sagittal/unilateral synostosis	66
	c.833G>T	p.Cys278Phe	IgIIIa	Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome	67
	c.842A>G	p.Tyr281Cys	IgIIIa	Crouzon syndrome	68
	c.858_866delCCACATCCA	p.His287_Gln288del	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.863T>A	p.Ile288Asn	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.863T>G	p.Ile288Ser	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.864_881del	p.Ile288Met; Gln289_Val294del	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	69, 70
	c.866A>C	p.Gln289Pro	IgIIIa	Crouzon syndrome, Jackson-Weiss syndrome, SCS	
	c.868T>C	p.Trp290Arg	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.870G>C	p.Trp290Gly	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.870G>T	p.Trp290Cys	IgIIIa	Pfeiffer syndrome, nonclassifiable disorders with craniosynostosis	68
	c.874A>G	p.Lys292Gln	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.902A>G	p.Tyr301Cys	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.923A>G	p.Tyr308Cys	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.940G>T	p.Alal34Ser	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	68
	c.940-1G>A	splicing	intron 9 – splice acceptor	Pfeiffer syndrome	
	c.940-1G>C	splicing	intron 9 – splice acceptor	Pfeiffer syndrome	
	c.940-2A>G ^e	splicing	intron 9 – splice acceptor	Pfeiffer syndrome; Apert syndrome	
	c.940-2A>T ^e	splicing	intron 9 – splice acceptor	Pfeiffer syndrome	
	c.940-3-4insAlu ^e	splicing	intron 9	Apert syndrome	68
	c.940-3_946del10msACC	splicing	intron 9	Pfeiffer syndrome	
	c.943G>T	p.Alal31Ser ^d	IgIIIa	nonsyndromic unicoronal synostosis	
	c.958_959delAC ^e	p.Thr320GlyfsX5	IgIIIa	Jackson-Weiss syndrome	
	c.966A>C	p.Asp321Ala	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	68
	c.983A>G	p.Tyr328Cys	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.992A>T	p.Asn331Ile	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.1009G>A	p.Alal337Thr ^d	IgIIIa	nonsyndromic unicoronal synostosis	
	c.1009G>C	p.Alal337Pro	IgIIIa	Crouzon syndrome	71
	c.1011-1012insGACGCT	p.AspAlal377_378ins	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.1012G>C	p.Gly338Arg	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.1013G>A	p.Gly338Gln	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.1018T>C	p.Tyr340His	IgIIIa	Crouzon syndrome	68
	c.1019A>C	p.Tyr340Ser	IgIIIa	Crouzon syndrome	
	c.1019A>G	p.Tyr340Cys	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	
	c.1021A>C	p.Thr341Pro	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	
	c.1024T>A	p.Cys342Ser	IgIIIa	Crouzon syndrome, Jackson-Weiss syndrome	72
	c.1024T>C	p.Cys342Arg	IgIIIa	syndrome, Pfeiffer syndrome	
	c.1024T>G	p.Cys342Gly	IgIIIa	syndrome, Pfeiffer syndrome	
	c.1025G>A	p.Cys342Tyr	IgIIIa	Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome	
	c.1025G>C	p.Cys342Ser	IgIIIa	Crouzon syndrome, Jackson-Weiss syndrome	74
	c.1025G>T	p.Cys342Phe	IgIIIa	Crouzon syndrome, Jackson-Weiss syndrome	
	c.1025G>CT	p.Cys342Ser	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	
	c.1026C>G	p.Cys342Trp	IgIIIa	Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome	
	c.1030G>C	p.Alal344Pro	IgIIIa	Pfeiffer syndrome	c.1031C>G
	c.1031C>G	p.Alal344Gly	IgIIIa	Jackson-Weiss syndrome, Crouzon syndrome	

Table 2. (continued)

Table 2. (continued)

Gene	Nucleotide change ^a	Effects on protein or RNA ^a	Gene or protein region ^b	Phenotype	Reference No. ^c
	c.1032G>A ^f	p.A1a344Ala (Splicing) ^d	IgIIIc	Crouzon syndrome; nonclassifiable disorders with craniosynostosis	
	c.1040C>G	p.Ser347Cys	IgIIIc	Crouzon syndrome	
	c.1041_1042insAlu ^e	splicing	IgIIIc	Apert syndrome	
	c.1052C>G	p.Ser351Cys	IgIIIc	Crouzon syndrome; Pfeiffer	75, 76
	c.1059C>A	p.Ser354Tyr	IgIIIc	Crouzon syndrome	
	c.1061C>A	p.Ser354Tyr	IgIIIc	Crouzon syndrome	
	c.1061C>G	p.Ser354Cys	IgIIIc	Crouzon syndrome	
	c.1061C>T	p.Ser354Phe	IgIIIc	Crouzon syndrome	
	c.1075G>T	p.Val359Phe	IgIIIc	Pfeiffer syndrome; Jackson-Weiss	74
	c.1084G>T	p.A1a362Ser ^d	IgIIIc	Crouzon syndrome	
	c.1084+1G>T	splicing	intron 10 – splice	Pfeiffer syndrome	77
	c.1084+3A>C	splicing	intron 10 – splice	Crouzon syndrome	
	c.1084+3A>G	splicing	intron 10 – splice	Pfeiffer syndrome	66
	c.1084_1085ins_TCAACA	p.Gly345_Pro361del	IgIIIc	Pfeiffer syndrome	
	c.1115C>G	p.Ser372Cys	IgIIIc-TM	Bear-Stevenson cutis gyrate	
	c.1124A>G	p.Tyr375Cys	IgIIIc-TM	Bear-Stevenson cutis gyrate syndrome	
	c.1150G>A	p.Gly384Arg	TM	unclassified craniosynostosis	78, 79
	c.1576A>G	p.Lys526Glu ^d	TK1	mild Crouzon syndrome, scaphocephaly	
	c.1645A>C	p.Asn549Thr	TK1	Crouzon syndrome	
	c.1646A>C	p.Asn549Thr	TK1	Pfeiffer syndrome	63
	c.1694A>C	p.Glu565Ala	TK1	Pfeiffer syndrome	
	c.1694A>G	p.Glu565Gly	TK1	Pfeiffer syndrome	
	c.1922A>G	p.Lys641Arg	TK2	Pfeiffer syndrome	
	c.1977G>T	p.Lys659Asn	TK2	nonclassifiable syndrome with	
	c.1988G>A	p.Gly663Glu	TK2	Crouzon syndrome	
	c.2032A>G	p.Arg678Gly	TK2	Pfeiffer syndrome	
	c.742C>T	p.Arg248Cys ^f	IgII-IgIII linker	thanatophoric dysplasia type I	
	c.749C>G	p.Pro250Arg ^d	IgII-IgIII linker	Muenke syndrome; Bear-Stevenson	
	c.749C>T	p.Pro250Leu ^d	IgII-IgIII linker	cutis gyrate syndrome	
				nonsyndromic unicoronal	
				craniosynostosis in child,	
				macrocephaly in mother	
				thanatophoric dysplasia type I	
				Crouzonodermoskeletal syndrome ^h	
				thanatophoric dysplasia type II	

^aNucleotide and amino acid residue numbers are in accordance with Cohen [1, 60] or the original reports. Mutation nomenclature is in accordance with the recommendations of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>).

^bGene region or protein domain affected by the mutation.

^cAll the original reports of the mutations are cited here except for the ones included in Cohen [1, 60].

^dMutations either associated with reduced penetrance or with uncertain pathogenicity

^eMutations that lead to ectopic expression of the alternative FGFR2b splice form.

^fMutation that produces a cryptic donor splice site that causes a 17-amino acid deletion.

^gThanatophoric dysplasia type I mutations more frequently associated with craniosynostosis.

^hAlso referred to as Crouzon syndrome with acanthosis nigricans.

ⁱCraniosynostosis is present in ~93% of thanatophoric dysplasia type II subjects with this mutation.

FGFR3

81

80

Fig. 3. Structure of FGFR proteins (types 1, 2 and 3) showing the approximate location of the mutations causing craniosynostosis. AB = Acid box; IgI, IgII, IgIII = immunoglobulin-like domains; IgIIIa = N-terminal portion of the IgIII loop (common to both FGFR1-3b and FGFR1-3c splice forms); IgIIIc = alternatively spliced form of the C-terminal portion of IgIII loop; TM = transmembrane domain; TK1 = first kinase domain; TK2 = second kinase domain.

FGFR1 Mutations

The most common FGFR1-activating mutation is the amino acid substitution p.Pro252Arg in the IgII-IgIII linker region. This heterozygous mutation has been found in a few cases of Pfeiffer syndrome (with a benign course) [60] and in a subject with Jackson-Weiss syndrome [61].

FGFR1 mutations were also found in patients with osteoglophonic dysplasia, a condition characterized by craniosynostosis, a prominent supraorbital ridge, depressed nasal bridge, rhizomelic dwarfism and nonossifying bone lesions [62]. This association reveals the critical role of FGFR1 in the modulation of bone elongation in humans.

Analogous mutations in FGFR2 or FGFR3 have been found for the four gain-of-function mutations in FGFR1 so far identified. Although there is phenotypic overlap among patients, these analogous mutations in different receptors are associated with different clinical entities. For example, FGFR1 p.Pro252Arg substitution is analogous to FGFR2 p.Pro253Arg and FGFR3 p.Pro250Arg that cause Apert and Muenke syndromes, respectively [60]. Another example is FGFR1 p.Asn330Ile mutation in the IgIIIc loop associated with osteoglophonic dysplasia [62], which is equivalent to FGFR2 p.Asn331Ile and FGFR3 p.Asn328Ile that cause Crouzon and hypochondroplasia syndromes, respectively [60].

FGFR2 Mutations

Mutations in FGFR2 account for approximately 90% of the syndromic craniosynostosis Apert, Crouzon, Pfeiffer, and Jackson-Weiss [60, 67, 68, 91] and for ~9% of all craniosynostosis [67, 71, 92]. No FGFR2 mutations have been found in any case of nonsyndromic sagittal or metopic synostosis [71].

In contrast to FGFR1 mutations, a broader spectrum of FGFR2 mutations has been associated with craniosynostosis. The majority of FGFR2 mutations are missense (to date about 65 amino acid substitutions reported) or splice-site type (about a dozen mutations reported) but small in-frame deletions and insertions have been also described. Several of the missense mutations (~20%) either create or destroy cysteine residues, resulting in unpaired cysteines that can produce intermolecular disulfide binding and ligand-independent constitutive receptor activation (table 2, fig. 3).

Mutations in the IgI and IgII Loops of FGFR2

Mutations within IgI and IgII domains have only been found in FGFR2 (table 2, fig. 3). The associated phenotypes resemble those with mutations in the hot spots of the FGFR2 (exons IIIa and IIIc, or exons 8 and 10, respectively, encoding the IgIII domain) but with some unusual clinical features, such as Crouzon syndrome with scaphocephaly [60, 75] in one case and a Pfeiffer phenotype with severe limb abnormalities, including symphalangism [60, 93].

Mutations in the IgII-IgIII Linker Region of FGFR2

The two most frequent mutations in the linker region between IgII and IgIII of FGFR2 are p.Ser252Trp and p.Pro253Arg that cause 66 and 32.2% of

Apert syndrome cases, respectively. The p.Ser252Trp mutation is associated with a more severe craniofacial phenotype with cleft palate in some patients, while p.Pro253Arg mutation is associated with more severe syndactyly [60, 94]. Interestingly, one patient bearing the p.Ser252Trp mutation had such a mild syndactyly that the phenotype suggested Pfeiffer rather than Apert syndrome [60].

Few rare additional mutations in the IgII-IgIII linker region are also associated with Apert and Pfeiffer syndrome. The type of amino acid residue substitution has a specific clinical consequence, as illustrated by the observation of Crouzon-like phenotypes and nonpenetrance of the disease in cases with p.Ser252Leu or p.Pro253Leu substitutions.

Unlike mutations within other regions of FGFRs, the Apert syndrome p.Ser252Trp and p.Pro253Arg mutations are substitutions to bulky side-chain amino acids and are ligand dependent. It has been demonstrated that these substitutions define two gain-of-function mechanisms of FGFR2 mutations: enhanced FGF-binding affinity and loss of FGF-binding specificity [95–97]. Analogous mutations on FGFR1 and FGFR3 seem to behave similarly to the Apert FGFR2 mutations [98].

Mutations in the IgIII loop of FGFR2

The majority of FGFR2 mutations (~77%) are clustered in the IgIII loop of the receptor (table 2, fig. 3). Although several mutations have been associated with more than one syndrome, a genotype-phenotype correlation is observed in many cases. For example, Crouzon syndrome appears to be preferentially accounted for in the case of substitutions at residues p.Phe267, p.Cys278, p.Gln289, p.Gly338, p.Cys342, p.Ala344, p.Ser347 and p.Ser354; severe Pfeiffer syndrome cases, on the other hand, are more frequently associated with mutations at residues p.Trp290, p.Tyr340, p.Cys342 and p.Ser351 when they are substituted by a cysteine or if a cysteine residue is abolished. The residue that is substituted is also important for the phenotype, as exemplified by the conversion of the p.Trp290 and p.Tyr340 into other amino acid residues rather than cysteines (p.Trp290Arg/Gly, p.Tyr340His/Ser) that result in Crouzon syndrome [60, 68, 93].

One interesting category of FGFR2 mutations is the splicing mutations that are mostly associated with Pfeiffer syndrome (accounts for ~10% of mutations associated with this syndrome), and usually with a more severe limb phenotype [60, 93].

Another interesting class of mutations constitutes two de novo *Alu*-element insertions upstream or within exon IIIc (or exon 10) in 2 Apert syndrome patients. This type of mutation and a few other pathogenic changes affecting this domain lead to ectopic expression of the FGFR2b splice form in cells of

mesenchyme origin [68, 99]. Therefore, these mutations define a new pathological class of FGFR2 mutations: ectopic splice form expression.

Mutations Either Near or within the Transmembrane Region of FGFR2

Two closely spaced mutations p.Ser372Cys and p.Tyr375Cys, in the linker region between IgIII and the transmembrane domain of FGFR2, have been associated with Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome [60]. The latter was also recently found in a severe Pfeiffer phenotype, but in which cutis gyrata and acanthosis nigricans, clinical findings associated with Beare-Stevenson syndrome, were not observed [60, 91].

The only mutation within the transmembrane domain of FGFR2, p.Gly384Arg, has been associated with a nonclassifiable disorder with craniosynostosis [60].

Mutations in the Tyrosine Kinase Domain of FGFR2

A total of nine distinct mutations associated with syndromic craniosynostosis have been identified so far in the FGFR2 tyrosine kinase domain (table 2, fig. 3). There does not appear to be a set of clinical features that uniformly distinguishes patients with FGFR2 intracellular tyrosine kinase mutations from those with mutations in the extracellular region, except that patients tend to exhibit mild broadening of the thumbs and great toes [91, 93].

Some of these mutations occur at equivalent positions of FGFR3, but the associated phenotypes are different. For example, several FGFR2 mutations associated with Crouzon or Pfeiffer phenotypes occur at the position equivalent to constitutively activating mutations associated with short limb skeletal dysplasias [60].

FGFR3 Mutations

FGFR3 p.Pro250Arg mutation causes Muenke syndrome, the most common syndromic form of craniosynostosis [60]. Muenke syndrome expressivity is extremely variable and nonpenetrance has been reported in some families. It is estimated that about 30% of children with coronal synostosis and 6–8% of all craniosynostosis patients have this mutation [71, 92].

A recurrent mutation in the transmembrane region of FGFR3, p.Ala391Glu, accounts for a form of Crouzon syndrome that associates craniosynostosis and *acanthosis nigricans* also called crouzonodermoskeletal syndrome [60].

FGFR3 mutations are also associated with four forms of short-limbed bone dysplasias. Of these, only thanatophoric dysplasias (types I and II) and rarely hypochondroplasia are associated with craniosynostosis. It is interesting that the penetrance of craniosynostosis varies from approximately 28% in thanatophoric dysplasia type I cases, with the p.Arg248Cys and p.Tyr373Cys

mutations, to 93% in thanatophoric dysplasias type II patients, carriers of the p.Lys650Glu mutation [60].

Twist Homolog Drosophila 1 (TWIST1)

Gene, Protein Structure and Functions

TWIST1 gene, which encodes a basic helix-loop-helix transcription factor (bHLH), has of a first exon with a translation start site (ATG) followed by an uninterrupted open reading frame of 606 nucleotides that encodes 202 amino acid residues (GenBank Accession No. U80998) and a second untranslated exon with two potential polyadenylation signals that are 65 and 415 bp away from the 5' end of exon 2.

TWIST1 protein is characterized by two highly conserved regions: a DNA-binding domain, which consists mostly of basic amino acid residues and the bHLH motif, which consists of a short alpha helix (helix I) connected by a loop to a second, longer alpha helix (helix II). The loop region is essential for the protein tertiary structure and the correct functionality of the two alpha helices. The HLH region is necessary and sufficient for protein dimerization, and dimerization is needed prior to DNA binding [100]. The second HLH protein can be the same (creating a homodimer) or different (creating a heterodimer). The repertoire of proteins that dimerizes with *TWIST1* is not fully known, but it seems that the type of heterodimer formed is critical for determining the specificity of downstream target genes [101].

TWIST1 protein contains additional functional motifs. One of these (amino acids 30–64 in humans) binds to histone acetyltransferase p300 and can be involved in *TWIST1* gene expression regulation through chromatin condensation [102]. Another motif is the 'Twist box' located at the C-terminal domain (amino acids 183–202 of the human protein), which interacts with the Run-related factor DNA-binding domain, Runx2, and inhibits its function [103]. Nuclear localization sequences, other important functional domains, are located within and outside the HLH domain.

TWIST1 gene became a candidate for Saethre-Chotzen syndrome (SCS) after the gene was localized to chromosome 7p21, the region to which the SCS locus was previously mapped [104–107] and based on the observation that mice heterozygous for a *twist1*-null mutation exhibit subtle cranial and limb defects [108].

SCS, or acrocephalosyndactyly type III, is an autosomal dominantly inherited form of craniosynostosis. The classical clinical features are craniosynostosis, mainly involving the coronal sutures, low-set frontal hairline, facial asymmetry, ptosis of the eyelids, deviated nasal septum, brachydactyly, partial soft tissue syndactyly, especially of the second and third fingers, and various

skeletal anomalies, such as defects of the cervical and lumbar spine or radioulnar synostosis among others. Short stature has been documented in some instances. Patients may have hearing loss, most commonly due to conductive hearing impairment as a consequence of abnormal configuration of the nasopharynx, cleft palate or both. Penetrance is high, but it is not complete. There is a wide spectrum of clinical variability, and mild cases can often be misdiagnosed. A better characterization of the clinical spectrum of variability is being established since the identification of *TWIST1* as the causative gene.

TWIST1 Gene Mutations

Characterization and Distribution along the Gene

Although chromosomal structural alterations are not rare causative mechanisms of SCS, at least 97 different disease-causing mutations in the coding region of the *TWIST1* gene have been described among 153 patients worldwide mostly with SCS phenotype [109–115] (table 3). To date, no splice site and intronic mutations or changes within the promoter or in the second nontranslated exon have been reported. Among the mutations in the coding region of *TWIST1*, about 60% of are nucleotide substitutions leading to either missense (31%) or nonsense mutations (29%). The remaining 40% are deletions, duplications or insertions of less than 30 nucleotides, which will be referred to as small rearrangements (table 3). Two distinct mutations on the same allele have been reported in two unrelated patients.

The majority of the mutations (63/97; 65%) are located within the bHLH motif. The functional importance of the N- and C-terminal domains has also been shown by the identification of a few rare missense and in-frame mutations outside the bHLH motif [115]. Except for a few mutations, most of them are private with no apparent mutational hot spot. It is of note, however, that mutations involving the nucleotide at position c.309 (which encode the amino acid residue Tyr in the 5' DNA-binding domain) account for 8% of all mutations or 13% of the nucleotide substitutions (table 3). There is also an apparent excess of duplications starting at nucleotides 416–420 (encoding for amino acid residues in the loop region) and unequal crossovers due to repeated sequences in this region have been suggested as the causative mechanism [115].

Large deletions including the *TWIST1* gene account for at least 10% of the SCS cases. These deletions were originally identified by fluorescence *in situ* hybridization or Southern blot analysis [115], and their detection has been greatly facilitated with the use of the multiplex ligation-dependent probe amplification method. The extension of the deletion varies from a relatively small size encompassing mainly the *TWIST1* gene up to a few megabases.

Table 3. *TT/ST1* mutations in patients with SCS and related phenotypes

Nucleotide change ^a , the protein level	Consequence at the protein level	Functional domain	n	Reference No. ^c
c.7C>T	Gln3X	5' DNA binding	2	
c.61G>T	Glu21X	5' DNA binding	1	
c.82C>T	Gln28X	5' DNA binding	1	
c.106G>T	Gly36X	5' DNA binding	3	
c.108delA	Gly36GlyfsX88	5' DNA binding	1	
c.115C>G	p.Arg39Gly	NLS	1	
c.127_137del11	Arg43fsX233	5' DNA binding	1	
c.128_138del11	Arg44fsX233	5' DNA binding	1	
c.181G>T	p.Gly61X	5' DNA binding	1	
c.193G>T	p.Glu65X	5' DNA binding	4	
c.211C>T	p.Gln71X	5' DNA binding	2	110
c.230delA;c.232T>C	Lys77fsX124	5' DNA binding	1	
c.263delG	Gly88fsX124	5' DNA binding	1	111
c.272_273ins10	Ser93fsX292	5' DNA binding	1	
c.276_277dup21	Gly92_S93insGAGGGGG	5' DNA binding	2	
c.283delAinsCG	Ser95fsX237	5' DNA binding	2	
c.308_309insA	Tyr103X	5' DNA binding	2	
c.309C>A/G	Tyr103X	5' DNA binding	13	
c.309delC	Tyr103X	5' DNA binding	2	
c.310G>T	Glu104X	5' DNA binding	2	
c.326del17	p.Gln109fs	DNA binding	1	
Not referred	p.Gln109X	DNA binding	1	
c.336delG	p.Met112fsX12 ou	DNA binding	1	
c.340A>G	p.Asn114Asp	DNA binding	1	
Not referred	p.Asn114Ser	DNA binding	1	
c.346C>T	p.Arg116Trp	DNA binding	1	
Not referred	p.Arg116Gly	DNA binding	1	
c.348del17	p.Arg116fsX231	DNA binding	1	
c.352C>T	p.Arg118Cys	DNA binding	1	112
c.352_354del13	p.Arg118del	DNA binding	1	
c.353G>A	p.Arg118His	DNA binding	2	113
c.353G>C	p.Arg118Pro	DNA binding	1	
c.353_360del18	p.Arg118fsX234	DNA binding	1	
c.355C>T	p.Gln199X	DNA binding	2	
c.355delC	p.Gln119fsX124	DNA binding	1	
c.356A>C	p.Gln119Pro	DNA binding	1	
c.359G>C	p.Arg120Pro	DNA binding	1	
Not referred	p.Arg120Cys	DNA binding	1	
c.364C>T	p.Gln122X	helix I	2	
c.368C>A	p.Ser123X	helix I	3	
c.368C>G	p.Ser123Trp	helix I	3	

Table 3. (continued)

Nucleotide change ^a , the protein level	Consequence at the protein level	Functional domain	n	Reference No. ^c
c.376G>T	p.Glu126X	helix I	4	
c.379G>A;c.398A>T	p.Ala127Thr/p.Lys133Ile	helix I	1	
c.379_381dup	p.Ala127_Phe128insA	helix I	1	
c.380C>A	p.Ala127Glu	helix I	1	
c.384_385insC	p.Ala129fsX237	helix I	1	
c.385G>C	p.Ala129Pro	helix I	1	
c.385_405dup	p.Ala129_Ile135insAALRKII	helix I	2	
c.392T>C	Leu131Pro	helix I	1	
c.395G>C	Arg132Pro	helix I	1	
c.397_417dup	p.Lys133_Pro139insKIIPITLP	helix I/loop	2	
c.402C>G	Ile134Met	helix I	1	
c.405_406dup21	Ile135_Pro136insAALRKII	helix I	2	
c.407C>T	Pro136Leu	helix I	2	
Not referred	Pro136Leu	helix I	1	
c.409A>C	Thr137Pro	helix I	1	
c.415C>T	Pro139Ser	loop	1	
c.416C>A	Pro139His	loop	1	
c.416C>T	Pro139Leu	loop	1	
c.416_417dup21	Pro139_Ser140insKIIPITLP	loop	7	
c.417_418dup21	Pro139_Ser140ins KIIPITLP	loop	3	
c.418_419dup21	Ser140X	loop	1	
c.420_421dup21	Ser140_Asp141insIIPITLP	loop	2	
c.421G>T	Asp141Tyr	loop	2	
c.422A>G	Asp141Gly	loop	1	
c.423_424ins25	Asp141_Lys142insDHPHAALGfsX297	loop	1	
c.428delT	p.Leu143ArgfsX76	loop	1	
c.430A>C	Ser144Arg	loop	2	
c.433A>G	Lys145Glu	loop	1	
c.433_455del23	Lys145fsX229	loop	1	
c.435G>C	Lys145Asn	loop	1	
c.442A>G	Thr148Ala	loop	1	
c.443C>A	Thr148Asn	loop	1	
c.443C>G	Thr148Ser	loop	1	
c.443C>T	Thr148Ile	loop	1	
c.445C>T	Leu149Phe	loop	2	
c.454G>C	Ala152Pro	loop	1	
c.455C>T	Ala152Val	loop	1	
c.460A>G	Arg154Gly	helix II	1	
c.460_461insA	Arg154fsX237	helix II	1	
c.464_469del5	Tyr155X	helix II	1	
c.465C>A	Tyr155X	helix II	1	

Table 3. (continued)

Nucleotide change ^a , the protein level	Consequence at the protein level	Functional domain	n	Reference No. ^c
c.466A>G	Ile156Val	helix II	1	
c.470A>T	Asp157Val	helix II	1	
Not referred	Asp157Ala	helix III	1	
c.472T>C	Phe158Leu	helix II	2	
c.474C>G	Phe158Leu	helix II	2	
c.475C>T	Leu159Phe	helix II	1	
c.480C>G	Tyr160X	helix II	1	
c.481C>T	Gln161X	helix II	5	
c.481delC	Gln161fsX230	helix II	1	
c.482_488del7	Gln161fsX228	helix II	1	
c.485_488del4	Val162fsX229	helix II	1	
c.487delC	Leu163fsX230	helix II	1	
c.490C>T	Gln164X	helix II	1	
c.495ins10	p.Ala165fs	helix II	1	
c.541G>T	Glu181X	3' helix II	1	
c.561C>G	Phe187Leu	TWIST box	1	
Deletion	entire gene	entire gene	20	

^aGenomic sequence based on GenBank accession No. U80998; mutations are referred to as originally reported.

^bMutation nomenclature according to Den Dunnen and Antonarakis [114].

^cAll the original reports of the mutations are cited in this table except for the ones included in Jabs (115).

The rearrangement (GGC)₃(CGC)(GGC)₃ at nucleotides 244–276 was initially identified only among affected patients. Family and functional studies have demonstrated that it is not pathogenic. This polyglycine tract variation does not seem to modulate the phenotype when in *cis* with a pathogenic mutation in the *TWIST1* gene, but its effect in *trans* with a pathogenic mutation has not yet been functionally or phenotypically addressed [115].

Polymorphisms within the *TWIST1* gene have also been identified. No functional or systematic studies have yet been performed for this type of mutations, but they do apparently not influence the phenotype.

Effect of the Mutations in the Protein

The phenotypes caused by complete heterozygous deletions of the *TWIST1* gene in some SCS patients and of the *Twist1* null heterozygous (*Twist1*^{+/-}) mouse suggested that haploinsufficiency is the most likely disease-causing mechanism [116–118]. This assumption has been further reinforced by the

observation that all pathogenic mutations so far identified in SCS patients lead to a similar phenotype [115–117].

Different mutational mechanisms in *TWIST1* lead to haploinsufficiency in SCS. Nonsense mutations upstream or within the bHLH motif cause the synthesis of truncated proteins which are rapidly degraded, while missense mutations involving helix I or II regions create proteins that fail to heterodimerize and become abnormally located in the cytoplasm [119]. On the other hand, missense mutations in the loop-helix II junction region of the bHLH motif can lead to deficiency in protein-DNA interactions, while mutations in the middle of the loop seem to reduce heterodimerization with E12 protein and partial mislocalization of the protein [115]. Mutations in the *TWIST1* box lead to abnormal interaction with RUNX2 while a naturally occurring mutation in one of the NLS domain leads to nuclear mislocalization of *TWIST1* protein [110, 111]. Therefore, alterations in protein stability, dimerization deficiency, altered DNA-binding capacity or abnormal nuclear location can lead to *TWIST1* loss of function.

Characterization of the breakpoints of some cytogenetically balanced translocations in SCS patients revealed that the coding region of *TWIST1* gene is preserved. Therefore, it is possible that the translocation breakpoints disrupt an important regulatory sequence of *TWIST1* or a second gene on 7p. Alternatively, the disease in these cases is caused by a positional effect on *TWIST1* expression [115, 120].

Phenotype and Genotype Correlations

Large pedigrees segregating nonsense mutations or a deletion of the *TWIST1* gene and SCS have exemplified the great clinical intrafamilial variability of the syndrome, including low penetrance for craniosynostosis in one of these genealogies [115]. A remarkable interfamilial clinical variability in SCS has also been well documented [60, 115]. The molecular mechanisms that cause the extreme variation in the clinical outcome of the disease are unknown, and there is no evidence of a correlation between the phenotype and the nature or location of a specific point or small rearrangement mutations within the *TWIST1* gene. Physical findings in patients with large gene deletions also do not differ from those with small or point mutations. Although intellectual deficits are rarely seen in patients with point mutations, they are often found in those with deletions encompassing the gene, thus suggesting a correlation between *TWIST1* gene deletions and cognitive function. It is still unclear whether the degree of mental retardation in patients with a complete deletion of the *TWIST1* gene is related to the size and location of the molecular defect [115, 121]. A more systematic study including delineation of the breakpoints and a better definition of the cognitive deficit in a larger number of patients is necessary to draw final conclusions.

The expression level of *TWIST1* protein and of those that dimerize with it is critical for the correct function of *TWIST1*. We could thus speculate that variation on the availability of the counterpart proteins that dimerize with *Twist1*, which can be dependent on genetic or environmental factors, may play a role in the determination of the expressivity of the disease.

Despite the lack of genotype-phenotype correlation for physical alterations, analysis of the *TWIST1* gene in a large set of craniosynostotic patients has contributed to a better delineation of the syndrome. Bifid halluces and unilateral radial aplasia are now part of the clinical spectrum of variability of SCS as it was shown that patients diagnosed with Robinow-Sorauf and Baller-Gerold syndromes carry mutations in *TWIST1* gene [115]. In contrast, very mild patients, nonsyndromic or in whom ptosis was the main clinical feature, have also been found to carry mutations in *TWIST1* [110, 115]. Therefore, the spectrum of clinical variability ranges from nonsyndromic or only ptosis to the full SCS phenotype, associated or not with bifid halluces and unilateral radial aplasia.

Some patients originally classified as SCS were found to have the p.Pro250Arg mutation at FGFR3 [109, 115], which is associated with Muenke syndrome. Therefore, it has been recommended that SCS patients negative for *TWIST1* mutations should be tested for this FGFR3 mutation. However, Kress et al. [110] argue that it is possible to clinically distinguish patients with SCS or Muenke syndrome. Based on the phenotype analysis of a large cohort of patients with *TWIST1* mutations or the p.Pro250Arg mutation in FGFR3, they suggested that low-set frontal hairline, gross ptosis of the eyelids, subnormal ear length, dilated parietal foramina, interdigital webbing, hallux valgus or broad great toe with bifid distal phalanx were significantly more prominent in patients with *TWIST1* mutations. In addition, intercranial hypertension as a consequence of early progressive multisutural fusion was a significant problem in SCS only, while mental delay and sensorineural hearing loss were associated with Muenke syndrome.

Several reports have shown that a few patients clinically classified as SCS do not harbor mutations either in the *TWIST1* gene or in the *FGFR* genes, suggesting genetic heterogeneity for the syndrome or a different mutational mechanism in these genes. No mutations have been found in potential candidate genes that are components of the same developmental pathway, including *SNAIL*, *SLUG* and *DERM1* [109, 115].

Ephrin-B1 (EFNB1)

Gene and Protein Structure and Functions

Ephrins are one of the largest classes of membrane-bound ligands for Eph family receptor tyrosine kinases, which regulate cell adhesion and repulsion

responses that guide the migration of cells and axons along specific pathways during animal development. The ephrins and Eph proteins are also known to have an important function to avoid mixing of cells across boundaries in embryo development. Eph/ephrin interactions lead to the generation of a bidirectional signal, in which both the Eph receptors and the ephrins activate downstream signaling cascades simultaneously. Eight ephrins belonging to two classes have been characterized: class A (EFNA1–A5) which are linked to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor, and class B (EFNB1–B3) which are transmembrane proteins with intracellular region containing multiple tyrosine residues and a PDZ domain. Tyrosine phosphorylation and binding of PDZ-containing proteins are required for the function of transmembrane ephrins. The Eph receptors, 14 in number, are divided into EphA and EphB receptors, depending on their preferential affinity to ephrin-A or ephrin-B proteins [122–124].

Through linkage and positional candidate gene analysis it was demonstrated that mutations in one of the ephrin B genes, *EFNB1*, mapped at Xq13, cause a syndromic form of craniosynostosis, craniofrontonasal dysplasia [125, 126]. *EFNB1* contains 5 exons and encodes a protein of 346 aa.

Craniofrontonasal syndrome is an X-linked developmental disorder that shows greater severity in heterozygous females than in hemizygous males. Females present severe hypertelorism, coronal craniosynostosis either unilaterally or bilaterally, craniofacial asymmetry, frontal bossing, downslanting palpebral fissures, broad bifid nose, low posterior hairline with an anterior widow's peak, frizzy hair, and occasionally cleft lip or palate. Common extracranial features are sloping shoulders with dysplastic clavicles, mild cutaneous syndactyly, and characteristic longitudinal splitting of the nails, diaphragmatic hernia, and agenesis of corpus callosum. Males are rarely reported and paradoxically have a much milder phenotype, which includes hypertelorism and possibly cleft lip and/or palate [1, 125, 126]. Congenital diaphragmatic hernia can also be part of the phenotype in males, but its penetrance is still unknown [127].

EFNB1 Gene Mutations

Characterization and Distribution along the Gene

More than 70 different mutations distributed along the *EFNB1* gene have already been associated with craniofrontonasal syndrome; among these, 71 were intragenic and 3 were partial or complete gene deletions [125–130] (table 4). The intragenic mutations comprised 46 single-nucleotide and 1 double-nucleotide substitutions leading to missense or nonsense codons, splicing mutations or

Table 4. *EFNB1* mutations associated with craniofrontonasal dysplasia

Nucleotide change ^a	Exon (intron)	Consequence at mRNA or protein	Functional domain ^b	Cases n	Reference No.
4_4del	1	—	signal peptide	1	128
c.1A>G	1	p.Met1Val	signal peptide	1	125
c.30C>T ^c	1	p.Lys11SerfsX2	signal peptide	1	128
c.57G>A	1	p.Trp19X	signal peptide	1	125
c.80C>G	1	p.Pro27Arg	signal peptide	1	129
c.88_89delAA	1	p.Ala29fsX73	extracellular	1	129
c.109T>G	1	p.Trp37Gly	extracellular	2	128
c.110G>A	1	p.Trp37Gly	extracellular	1	128
c.123C>G	1	p.Asp41Lys	extracellular	1	128
c.146delG	2	p.Lys48fsX51	extracellular	1	129
c.151_153delGTG	2	p.Val51del	extracellular	1	127, 128
c.161C>T	2	p.Pro54Leu	extracellular	3	126, 128, 129
c.170_171GA>TT	2	p.Gly57Val	extracellular	1	128
c.185T>C	2	p.Ile62Thr	extracellular	1	125
c.191G>A	2	p.Cys64Tyr	extracellular	1	128
c.196delC	2	p.Arg66GlufsX93	extracellular	1	128
c.196C>T	2	p.Arg66X	extracellular	9	125, 128, 129
c.220G>T	2	p.Glu74X	extracellular	2	128, 129
c.229_232delAAGC	2	p.Tyr76fsX157	extracellular	1	129
c.233T>C	2	p.Leu78Pro	extracellular	1	128
c.246delG	2	p.Pro83fsX75	extracellular	1	125
c.258_261dupAGCT	2	p.Ala87fsX91	extracellular	1	129
c.265T>C	2	p.Cys89Arg	extracellular	1	128
c.266G>A	2	p.Cys89Tyr	extracellular	1	128
c.293T>C	2	p.Leu98Ser	extracellular	1	125
c.324_325insA	2	p.Ile108fsX131	extracellular	1	129
c.325delC	2	p.Ile108fsX158	extracellular	1	129
c.332C>T ^d	2	p.Thr111Ile	extracellular	1	126
c.339G>C	2	p.Lys113Asn	extracellular	1	128
c.344A>C	2	p.Gln115Pro	extracellular	1	128
c.346G>T	2	p.Glu116X	extracellular	1	129
c.355C>A	2	p.Pro119Thr	extracellular	1	125
c.355C>T	2	p.Pro119Ser	extracellular	1	129
c.355C>G	2	p.Pro119Ala	extracellular	1	128
c.356C>A	2	p.Pro119His	extracellular	2	125, 129
c.363C>A	2	p.Tyr121X	extracellular	1	128
c.368G>A	2	p.Gly123Asp	extracellular	1	128
c.377_384delTCAAGAAG	2	p.Glu125fsX128	extracellular	1	129
c.398delA	2	p.Tyr133SerfsX26	extracellular	1	128
c.406+1G>A	(2)	splice	extracellular	2	125, 128
c.407-1G>A	(2)	splice	extracellular	1	125
c.407-2A>G	(2)	splice	extracellular	1	129

^aNomenclature according to GenBank accession No. NM_004429.^bDomains according to <http://us.expasy.org>.^cMutation causes altered splicing.^dPublished numbering incompatible with exon 2 sequence. c.332C>T corresponds to 1023C>T [129].^eOriginally referred to as p.Gly230fsX.

Table 4. (continued)

Nucleotide change ^a	Exon (intron)	Consequence at mRNA or protein	Functional domain ^b	Cases n	Reference No.
c.407-2A>T	(2)	splice	extracellular	1	129
c.407C>T	3	p.Ser136Leu	extracellular	1	128
c.409A>G	3	p.Thr137Ala	extracellular	1	129
c.413C>T	3	p.Ser138Phe	extracellular	1	129
c.415delA	3	p.Ser138fsX158	extracellular	1	129
c.432delG	3	p.Leu145TrpfsX14	extracellular	2	127, 128
c.445G>T	3	p.Glu149X	extracellular	1	128
c.451G>A	3	p.Gly151Ser	extracellular	5	125, 128
c.452G>T	3	p.Gly151Val	extracellular	1	125
c.452G>A	3	p.Gly151Asp	extracellular	1	128
c.458G>A	3	p.Cys153Tyr	extracellular	1	129
c.458G>C	3	p.Cys153Ser	extracellular	2	125, 126
c.463A>C	3	p.Thr155Pro	extracellular	1	125
c.472A>G	3	p.Met158Val	extracellular	1	128
c.474G>T	3	p.Met158Ile	extracellular	1	125
c.496C>T	3	p.Gln166X	extracellular	1	128
c.500-2A>G	(3)	splicing	extracellular	1	128
c.546C>A	4	p.Ser182Arg	extracellular	1	129
c.550delG	4	p.Lys183fsX212	extracellular	1	129
c.564_565insT	4	p.Tyr189CysfsX10	extracellular	1	128
c.587delC	4	p.Pro196LeufsX17	extracellular	1	128
c.629-2A>G	(4)	splicing	extracellular	1	125
c.635_636delTG	5	p.Val212GlufsX19	extracellular	1	128
c.678_679insA	5	p.Ser226fsX231	extracellular	1	129
c.685_686insGG	5	p.Gly228fsX259	extracellular	1	129
c.685_686insG	5	p.Asp229GlyfsX31 ^e	extracellular	1	130
c.969delC	5	p.Gly322fsX391	cytoplasmic (potential)	1	129
c.986delA	5	p.Val328fsX391	cytoplasmic (potential)	1	129
c.993_994insCT	5	p.Gln332LeufsX61	cytoplasmic (potential)	1	128
Deletion	1-5	no protein	entire gene	2	128
Deletion	1-3	no protein	entire gene	1	128
Deletion exons	2-5	no protein	entire gene	1	129

^aNomenclature according to GenBank accession No. NM_004429.^bDomains according to <http://us.expasy.org>.^cMutation causes altered splicing.^dPublished numbering incompatible with exon 2 sequence. c.332C>T corresponds to 1023C>T [129].^eOriginally referred to as p.Gly230fsX.

alteration of the initiation codon; the remaining ones were frameshifting deletions, insertions or duplications and one in-frame deletion mutations. Of the 48 single nucleotide substitutions identified among 66 unrelated patients, only 2 mutations were more highly recurrent, respectively, at nucleotides c.196C (9/66) and c.451G (5/66); however, there is no evidence of a mutational hot spot along the gene. Nucleotide substitutions are located in exons 1–4 of the gene (encoding for the signal peptide/extracellular domains) while nearly 50% of the frameshift deletions/insertions occurred within the last two exons of the *EFNB1* gene (which encode part of the transmembrane and cytoplasmic domains).

Effect of the Mutation on the Protein

Missense mutations change highly conserved amino acid residues across species in the extracellular ephrin domain and are expected to disrupt protein folding or interaction sites for ephrin-B1 interacting partners (such as ephrin-B2 and EphB2), and thus correspond to loss-of-function mutations. The frameshift, nonsense and splice site mutations identified in exons 1–4 of the *EFNB1* gene generate premature termination codons that most likely elicit nonsense-mediated mRNA decay and therefore correspond to null mutants. Whether this also applies to the frameshift mutations in exon 5 is not quite clear, because premature termination occurs in the last exon of the gene. This may allow the synthesis of a truncated, soluble ephrin-B1 that could act in a dominant-negative fashion provided that it is properly processed and expressed as a stable polypeptide. Other frameshift mutations at the end of exon 5 change the reading frame and lead to the addition of several amino acids at the carboxyterminal part of ephrin-B1. These mutations are predicted to alter the structure of the cytoplasmic tail and disrupt the intracellular binding sites for Grb4 and PDZ-effector proteins, which are involved in ephrin-B1 reverse signaling. These C-terminal frameshifts may also impair bidirectional endocytosis of ephrin-B1 and EphB complexes, a mechanism that appears to regulate Eph-ephrin contact-mediated repulsion [125–129].

Genotype-Phenotype Correlations

Mutations in *EFNB1* have been found in the great majority of females (~95%) diagnosed with craniofrontonasal syndrome, thus suggesting genetic heterogeneity or a still unknown mutational mechanism in this gene in less than 10% of the cases [129].

There is great intrafamilial and interfamilial clinical variability among craniofrontonasal female subjects, including the extent of craniosynostosis and the occurrence of additional clinical features. No genotype-phenotype correlation is apparent in any of the studies, which implies that missense or frameshift changes cause a comparable disturbance of ephrin-B1 [125–129]. This X-linked disease has been a paradox in human genetics, as heterozygous female carriers

of the mutation always present a more severe phenotype than hemizygous males. In addition, there is a significant excess of females.

It has been proposed that the phenotypic discrepancies between the sexes are due to cellular interference, a process associated with X inactivation. That is, in heterozygous females, there is a mosaic of cells expressing and not expressing ephrin-B1, which might interfere in the establishment of tissue boundaries during embryogenesis. On the other hand, as males will only have cells without ephrin-B1, no disruption in cell boundaries will occur and ligand/receptor promiscuity may explain the mild or absent manifestation of *EFNB1* mutations in hemizygotes [125, 126]. This hypothesis has been supported by the observation that mice harboring *Efnb1* null mutation show a similar paradoxical pattern of phenotypic severity, with heterozygous females consistently more severely affected than hemizygous males. In the heterozygous female mice, abnormal sorting of cells into ephrin-B1-expressing and ephrin-B1-nonexpressing patches was shown to correlate with the X-inactivation status of *Efnb1* [131]. However, this hypothesis does not explain the occurrence of congenital diaphragmatic hernia, as this malformation is present both in males and females with mutations in *EFNB1*. It is possible that ephrin-B1 does not have a nonredundant role in the development of the diaphragm [127].

The low proportion of affected males has been shown to be associated with the origin of the mutation, as 92% of the de novo mutations occur in the paternal germinative cells [128]. It is also of note that somatic mosaicism is quite high, accounting for 18.5% of the cases. These data have important implications for genetic counseling.

Final Considerations

The growth of the skull, which involves ossification and growth of the cranial plates and their fusion along the calvarial sutures, is very well coordinated with the growth of the developing brain and it might reflect an important evolutionary process. Identification of the molecular pathways involved in this developmental process will not only provide insights into the understanding of this process but will also have an important impact on diagnosis and genetic counseling.

Syndromic craniosynostosis is etiologically very heterogeneous and the involvement of several genes in the control of suture development is suggested by the diverse number of chromosomal abnormalities. This group of conditions is possibly caused by haploinsufficiency or gain-of-function mechanisms represented, respectively, by deletions and duplications. The identification of the genes within these chromosomal rearrangements involved with suture development remains a challenge.

The genes so far identified that, when mutated, unequivocally cause craniosynostosis belong to four functional groups: regulatory molecules at the DNA level: *TWIST1* and *MSX2*, tyrosine-kinase receptors: *FGFR1-3*, ligand receptors: *EFNB1* and *EFNA4*, and intracellular trafficking of membrane-associated protein: *RAB23*. *RAB23* is the only one associated with an autosomal recessive condition, while mutations in the others cause autosomal dominant disorders. Five of these genes are involved in the process of cell proliferation and ossification and they seem to belong to a common molecular pathway. Gain-of-function mutations represent the main molecular mechanism causing the disorders, but loss of function can also lead to the phenotype. The association of ephrin genes with craniosynostosis has shed new light on the understanding of suture development, as they provided evidence that craniosynostosis, at least when involving coronal sutures, can be the result of a defect in the boundary formation between cellular compartments during suture formation. *TWIST1*, *MSX2* and possibly *FGFR2* may also be involved in this process, at least in tissues where these genes are coexpressed.

Although the number of patients with mutations in *FBN1*, *TGFBRI* and *2* is still small and the penetrance of craniosynostosis is low, they provide insights into the importance of the extracellular matrix components and their signaling in suture development.

This is a very exciting field in human genetics and the molecular analysis in patients with craniosynostosis has made a major and significant contribution to the understanding of this complex mechanisms.

References

- Cohen MM Jr, MacLean RE: Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation and Management, ed 2. New York, Oxford University Press, 2000.
- Lajeunie E, Le Merrer M, Bonatti-Pellie C, Marchac D, Renier D: Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. *Am J Med Genet* 1995;55:500-504.
- Lajeunie E, Le Merrer M, Bonatti-Pellie C, Marchac D, Renier D: Genetic study of scaphocephaly. *Am J Med Genet* 1996;62:282-285.
- Lajeunie E, Le Merrer M, Marchac D, Renier D: Syndromal and nonsyndromal primary trigonocephaly: analysis of a series of 237 patients. *Am J Med Genet* 1998;2:211-215.
- Hennekam RCM, Van den Boogaard MJ: Autosomal dominant craniosynostosis of the suture metopica. *Clin Genet* 1990;38:374-377.
- Merrill AE, Bochkova EG, Brugger SM, Ishii M, Pilz DT, Wall SA, Lyons KM, Wilkie AO, Maxson RE Jr: Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin-Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. *Hum Mol Genet* 2006;15:1319-1328.
- Jenkins D, Seelow D, Jehes FS, Perlyn CA, Alonso LG, Bueno DF, Donnai D, Josifova D, Mathijssen IMJ, Morton JEV, Ørstavik KH, Sweeney E, Wall SA, Marsh JL, Nürnberg P, Passos-Bueno MR, Wilkie AO: *RAB23* mutations in Carpenter syndrome imply an unexpected role for hedgehog signaling in cranial-suture development and obesity. *Am J Hum Genet* 2007;80:1162-1170.
- Sood S, Eldadah ZA, Krause WL, McIntosh I, Dietz HC: Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nat Genet* 1996;12:209-211.

- Flück CE, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, Jabs EW, Mendonça BB, Fujieda K, Miller WL: Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nat Genet* 2004;36:228-230.
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Heilemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paeppe AM, Dietz HC: A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in *TGFBRI* or *TGFBRI2*. *Nat Genet* 2005;37:275-281.
- Cohen MM Jr: Suture biology and the correlates of craniosynostosis. *Am J Med Genet* 1993;47:581-616.
- Gajicka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen A, Rice R, Rice DP, Shaffer LG: Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *Eur J Hum Genet* 2005;13:139-149.
- Van Buggenhout G, Van Ravenswaay-Arts C, McMaas N, Thoenen R, Vogels A, Smeets D, Salden I, Matthijs G, Fryns JP, Vermeesch JR: The del(2)(q32.2q33) deletion syndrome defined by clinical and molecular characterization of four patients. *Eur J Med Genet* 2005;48:276-289.
- Schwytzer U, Binkert U, Cafilisch U, Baumgartner B, Schinzel A: Terminal deletion of the short arm of chromosome 3, del(3pter-p25): a recognizable syndrome. *Helv Paediatr Acta* 1987;42:309-315.
- Tipton RE, Berns JS, Johnson WE, Wilroy RS Jr, Summitt RL: Duplication 6q syndrome. *Am J Med Genet* 1979;3:325-330.
- Van Buggenhout G, Maas NM, Fryns JP, Vermeesch JR: A dysmorphic boy with 4qter deletion and 4q32.3-34.3 duplication: clinical, cytogenetic, and molecular findings. *Am J Med Genet* 2004;131:186-189.
- Zweimer SM, Cotter PD, Stewart SD: Telomere-telomere (end to end) fusion of chromosomes 7 and 22 with an interstitial deletion of chromosome 7p11.2→p15.1: phenotypic consequences and possible mechanisms. *Clin Genet* 2000;58:129-133.
- Hinkel GK, Tolkenhoff E, Bergan J: 7p-deletion syndrome (in German). *Monatsschr Kinderheilkd* 1988;136:824-827.
- Fryns JP, Haspelagh M, Agnecssens A, van den Berghe H: De novo partial 2q3 trisomy/distal 7p22 monosomy in a malformed newborn with 7p deletion phenotype and craniosynostosis. *Am J Med Genet* 1985;28:45-48.
- Morimoto M, An B, Ogami A, Shin N, Sugino Y, Sawai Y, Usuku T, Tanaka M, Hirai K, Nishimura A, Hasegawa K, Sugimoto T: Infantile spasms in a patient with Williams syndrome and craniosynostosis. *Epilepsia* 2003;44:1459-1462.
- Fryburg JS, Golden WL: Interstitial deletion of 8q13.3→22.1 associated with craniosynostosis. *Am J Med Genet* 1993;45:638-641.
- Eshel G, Lahat E, Reish O, Barr J: Neurodevelopmental and behavioral abnormalities associated with deletion of chromosome 9p. *J Child Neurol* 2002;17:50-51.
- Schimmmenti LA, Higgins RR, Mendelsohn NJ, Casey TM, Steinberger J, Mammel MC, Wiesner GL: Monosomy 9p24→pter and trisomy 5q31→qter: case report and review of two cases. *Am J Med Genet* 1995;57:52-56.
- Redon R, Baujat G, Sanlaville D, Le Merrer M, Vekemans M, Munnich A, Carter NP, Cormier-Daire V, Colleaux L: Interstitial 9q22.3 microdeletion: clinical and molecular characterisation of a newly recognised overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14:759-767.
- Yatsenko SA, Cheung SW, Scott DA, Nowaczyk MJ, Tarnopolsky M, Naidu S, Bibat G, Patel A, Leroy JC, Scaglia F, Stankiewicz P, Lupski JR: Deletion 9q34.3 syndrome: genotype-phenotype correlations and an extended deletion in a patient with features of Optic C trigonocephaly. *J Med Genet* 2005;42:328-335.
- Francie U, Kernahan C, Bradshaw C: Del (10)p autosomal deletion syndrome: clinical, cytogenetic and gene marker studies. *Humangenetik* 1975;26:343-351.
- Lukusa T, Smeets E, Vermeesch JR, Fryns JP: Small terminal 10q26 deletion in a male patient with Noonan-like stigmata: diagnosis by cytogenetic and FISH analysis. *Genet Couns* 2002;13:417-425.

28 Masuno M, Asano J, Yasuda K, Kondo T, Oni T: Balanced complex rearrangement involving chromosomes 8, 9, and 12 in a normal mother, derivative chromosome 9 with recombinant chromosome 12 in her daughter with minor anomalies. *Am J Med Genet* 1993;45:65-67.

29 Lemyre E, Lemieux N, Decarie JC, Lambert M: Del(14)(q22.1q23.2) in a patient with anophthalmia and pituitary hypoplasia. *Am J Med Genet* 1998;77:162-165.

30 Shur N, Cowan J, Wheeler PG: Craniosynostosis and congenital heart anomalies associated with a maternal deletion of 15q15-22.1. *Am J Med Genet A* 2003;120:542-546.

31 Fukushima Y, Wakui K, Nishida T, Nishimoto H: Craniosynostosis in an infant with an interstitial deletion of 15q [46,XX,del(15)(q15q22.1)]. *Am J Med Genet* 1990;36:209-213.

32 Thomas JA, Manchester DK, Prescott KE, Milner R, McGavran L, Cohen MM Jr: Hunter-McAlpine craniosynostosis phenotype associated with skeletal anomalies and interstitial deletion of chromosome 17q. *Am J Med Genet* 1996;62:372-375.

33 McDonald-McGinn DM, Gripp KW, Kirschner RE, Maisenbacher MK, Husted V, Schauer GM, Keppler-Noreuil KM, Cipero KL, Pasquarello P Jr, LaRossa D, Bartlett SP, Whitaker LA, Zackai EH: Craniosynostosis: another feature of the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;136:358-362.

34 Lucas J, Faivre J, Le Mee F, Hubert S, Pluqualec K, Picard F: De novo interstitial deletion of the long arm of chromosome 2: 46,XXX,del(2)(q14q21), associated with premature craniosynostosis (in French). *Ann Genet* 1987;30:33-38.

35 Gagnon JA, Richer CL, Lemieux N, Gauthier-Chouinard M: De novo appearance of a partial trisomy 1q in mosaic due to a 1;9 translocation (in French). *Ann Genet* 1984;27:33-37.

36 de Brasi D, Perone L, di Micco P, Andria G, Sebastio G, Iaccarino E, Pinto L, Aliberti F: Cloverleaf skull anomaly and de novo trisomy 4p. *J Med Genet* 1999;36:422-424.

37 Breslau-Siderius EJ, Wijnen JT, Dauwerse JG, de Pater JM, Beemer FA, Khan PM: Paternal duplication of chromosome 5q11.2-5q14 in a male born with craniosynostosis, ear tags, kidney dysplasia and several other anomalies. *Hum Genet* 1993;92:481-485.

38 Shihara T, Kato M, Kimura T, Hayasaka K, Yamamoto S, Ogata T: Craniosynostosis with extra copy of MSX2 in a patient with partial 5q-trisomy. *Am J Med Genet A* 2004;128:214-216.

39 Odell JM, Siebert JR, Bradley C, Salk D: Duplication 7p in a family with t(7;11): association with anomalies of the anterior cranial base. *Am J Med Genet* 1987;27:687-692.

40 Seghezzi L, Maraschio P, Bozzola M, Maserati E, Tupler R, Marchi A, Tiepolo L: Ring chromosome 9 with a 9p22.3-p24.3 duplication. *Eur J Pediatr* 1999;158:791-793.

41 Yelavarthi KK, Zunich J: Familial interstitial duplication of 11q; partial trisomy (11)(q13.5q21). *Am J Med Genet* 2004;126A:423-426.

42 Babovic-Vuksanovic D, Westman JA, Jalal SM, Lindor NM: Clinical characteristics associated with dup17(q24q25.1) in a mosaic mother and two non-mosaic daughters. *Clin Dysmorphol* 1998;7:171-176.

43 Czakó M, Riegel M, Morava E, Bajnoczky K, Kosztolanyi G, Opitz 'C' trigonocephaly-like syndrome in a patient with terminal deletion of 2p and partial duplication of 17q. *Am J Med Genet A* 2004;131:310-312.

44 Jhehe FS, Rosenberg C, Krepschi-Santos AC, Kok F, Knijnenburg J, Froyen G, Vianna-Morgante AM, Opitz JM, Passos-Bueno MR: An Xq22.3 duplication detected by comparative genomic hybridization microarray (Array-CGH) defines a new locus (FGS5) for FG syndrome. *Am J Med Genet A* 2005;139:221-226.

45 Ward J, Viteo E, Lee D, Arosemena G: Acrocephalopolysyndactyly, pentalogy of Fallot, and hypoaecusis in a patient with a de novo reciprocal translocation involving the short arm of chromosome 1 and the long arm of chromosome 18:46,XX,t(1;18)(p31;q11). *J Med Genet* 1993;30:438-439.

46 Hordnes K, Engebretsen LF, Knudtzon J: De novo balanced 5;21 translocation in a child with acrobachycephaly, ventriculomegaly, pulmonary stenosis, ectopic anus and mental retardation. *Clin Genet* 1995;48:321-323.

47 Kaminker CP, Dain L, Lamas MA, Sanchez JM: Mosaic trisomy 9 syndrome with unusual phenotype. *Am J Med Genet* 1985;22:237-241.

48 Demeyer W, Planer C: Closed metopic suture with trigonocephaly in Down's syndrome. *Neurology* 1965;15:756-760.

49 Jhehe FS, Bertola DR, Yelavarthi KK, Krepschi-Santos ACV, Vermeesch JR, Passos-Bueno MR: An 11q11-q13.3 duplication, including *FGF3* and *FGF4* genes, in a patient with syndromic multiple craniosynostosis. *Am J Med Genet A*, in press.

50 Brewer C, Holloway S, Zawalski P, Schinzel A, FitzPatrick D: A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet* 1998;63:1153-1159.

51 Brewer C, Holloway S, Zawalski P, Schinzel A, FitzPatrick D: A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality - and tolerance of segmental aneuploidy - in humans. *Am J Hum Genet* 1999;64:1702-1708.

52 Huret JL, Leonard C, Forestier B, Rethoré MO, Lejeune J: Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *J Med Genet* 1988;25:741-749.

53 de Pater JM, Ippel PF, Bijlsma JB, Van Nieuwenhuizen O: Interstitial deletion 11q case report and review of the literature. *Genet Couns* 1997;4:335-339.

54 Christ LA, Crowe CA, Micale MA, Conroy J, Schwartz S: Chromosome breakage hotspots and delineation of the critical region for the 9p-deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 1999;65:1387-1395.

55 Leegde B, Kerstjens-Frederix WS, Deelstra K, Begeer JH, Van Essen AJ: 11q-syndrome: three cases and a review of the literature. *Genet Couns* 1999;3:305-313.

56 Ornitz DM: FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 2000;22:108-112.

57 Givol D, Eswarakumar VP, Lonai P: The fibroblast growth factor signaling pathway; in Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A (eds): *Inborn Errors of Development*. Oxford, Oxford University Press, 2004, pp 367-379.

58 Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J: Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:139-149.

59 Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulter F, Gao G, Goldfarb M: Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271:15292-15297.

60 Cohen MM: FGFs/FGFRs and association disorders; in Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A (eds): *Inborn Errors of Development*. Oxford, Oxford University Press, 2004, pp 380-400.

61 Roscoli T, Flanagan S, Kumar P, Masel J, Gattas M, Hyland VJ, Glass IA: Clinical findings in a patient with FGFR1 P252R mutation and comparison with the literature. *Am J Med Genet* 2000;93:228.

62 White KE, Cabral JM, Davis SJ, Fishburn T, Evans WE, Ichikawa S, Fields J, Yu X, Shaw NJ, McLellan NJ, McKeown C, Fitzpatrick D, Yu K, Ornitz DM, Econs MJ: Mutations that cause osteoglyphonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. *Am J Hum Genet* 2005;76:361-367.

63 Wilkie AO: Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:187-203.

64 Priolo M, Lerone M, Baffico M, Baldi M, Ravazzolo R, Cama A, Capra V, Silengo M: Pfeiffer syndrome type 2 associated with a single amino acid deletion in the FGFR2 gene. *Clin Genet* 2000;58:81-83.

65 Lapunzina P, Fernandez A, Sanchez Romero JM, Delicado A, Saenz de Pipaon M, Lopez Pajares I, Molano J: A novel insertion in the FGFR2 gene in a patient with Crouzon phenotype and sacro-coccygeal tail. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73:614.

66 Kress W, Collmann H, Bisse M, Halliger-Keller B, Mueller CR: Clustering of FGFR2 gene mutations in patients with Pfeiffer and Crouzon syndromes (FGFR2 associated craniosynostoses). *Cytogenet Cell Genet* 2000;91:1347.

67 Passos-Bueno MR, Sertie AL, Richieri-Costa A, Alonso LG, Zatz M, Alonso N, Brunoni D, Ribeiro SF: Description of a new mutation and characterization of FGFR1, FGFR2, and FGFR3 mutations among Brazilian patients with syndromic craniosynostoses. *Am J Med Genet* 1998;78:237-241.

68 Lajunie E, Heuertz S, El Chouzi V, Martinovic J, Renier D, Le Merrer M, Bonaventure J: Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14:289-298.