

## 6) Zusammenfassung/Summary

### 6.1) Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die rezessive Mausmutante „synpolydactyly homolog“ (*spdh*) als Modell für menschliche Synpolydaktylie (SPD) untersucht. Bei der Mutation handelt es sich um die Expansion eines Polyalanin-kodierenden Repeats in der 5'-Region von *Hoxd13*, einem Transkriptionsfaktor, der zu der hoch-konservierten Gruppe der *Hox*-Gene gehört. Man findet bei Menschen mit SPD Expansionen von +7 bis +14 Alaninen und es besteht ein Zusammenhang zwischen der Zunahme der Länge der Expansion und einer Zunahme von Penetranz und Schwere des Phänotyps. In der *spdh*-Maus ist der Alanin-kodierende Repeat um +7 auf insgesamt 22 Alanine verlängert und der Phänotyp besteht aus Syndaktylie, Polydaktylie und Brachydaktylie.

Der Phänotyp der homozygoten *spdh*-Maus wurde in dieser Studie im Detail untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass 3 Entwicklungsprozesse gestört sind. Erstens ist die frühe Musterbildung in den Pfoten verändert, was man deutlich in der Syn- und Polydaktylie erkennt. Whole-Mount in situ Hybridisierungen (WM-ISH) zeigten eine veränderte Expression der *Bmps* (*Bone Morphogenetic Proteins*) 2, 4 und 7, die bei der Musterbildung wichtige Rollen spielen.

Zweitens ist auch die Ausbildung der Gelenke in den Metakarpalen und Phalangen gestört, es entwickeln sich nur die distalen Gelenke. WM-ISH und radioaktive ISH zeigten reduzierte und veränderte Expressionsmuster bei einigen Genen, die bei der Gelenkentwicklung beteiligt sind. So ist in der *spdh*-Mutante die Expression von *Gdf5* (*Growth/Differentiation Factor 5*), *Noggin*, *Ihh* (*Indian Hedgehog*) und dem Hedgehog-Zielgenen *Gli1* und *Ptc1* (*Patched*) deutlich im Vergleich zum Wt verändert, wodurch Signalwege, die bei der Entstehung der Gelenke wichtig sind, gestört werden.

Drittens ist die Differenzierung des Knorpels stark verzögert und die Bildung von Knochen vermindert. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Proliferation der Chondrozyten in der *spdh*-Mutante während der Entwicklung und auch noch nach der Geburt deutlich reduziert ist und sie auch nicht zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren. Die Proliferation und Differenzierung des Knorpels wird durch einen negativen Feedback-Loop zwischen *Ihh* und *Pthlh* (Parathyroid Hormone-like Hormone) gesteuert. ISHs zeigten, dass die Expression von *Ihh* und dem *Pthlh*-Rezeptor in der *spdh*-Mutante stark verändert ist. Somit ist in der *spdh*-Maus ein zentraler Signalweg zur Steuerung der Chondrozytendifferenzierung gestört,

wodurch die Knorpelzellen in einem nicht-proliferierenden und undifferenzierten Zustand stehen bleiben und so auch die Bildung von Knochen verhindert wird.

Um die Auswirkungen der Expansion des Polyalanin-Repeats in *Hoxd13* auf die Lokalisation und Funktionalität des Proteins zu untersuchen, wurden Zelltransfektionen mit *Hoxd13*-Konstrukten mit verschiedenen langen Repeats durchgeführt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Expansionen zu einer Verlagerung des Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma führen, wo das mutierte Protein amorphe Aggregate bildet. Die Frequenz der Aggregatbildung steigt dabei mit zunehmender Länge der Expansion an. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich das wt-Protein auch in diesen Aggregaten befindet und nicht mehr in den Zellkern wandern kann, womit der dominante Charakter der SPD beim Menschen erklärt werden kann.

Zusätzlich wurden auch die Hitze Schock Proteine (HSPs) 40 und 70, die bei der Erkennung und Neu-Faltung fehlgefalteter Proteine eine Rolle spielen, in die Aggregate rekrutiert. Eine verstärkte Aktivierung dieser HSPs durch Geldanamycin führte zu einer reduzierten Bildung von Proteinaggregaten. Dies sind deutliche Hinweise darauf, dass diese Mutation in *Hoxd13* zu einer Fehlfaltung des Proteins führt. Unterstützt wird diese Theorie auch durch Untersuchungen der Proteinverteilung in der *spdh*-Mutante. Durch Immunocytochemie auf Schnitten und Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass *in vivo* das mutierte Protein zum Großteil abgebaut wird, und dass das vorhandene mutierte Protein im Gegensatz zum Wt hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist.

Anhand eines Luciferase-Assays mit einem *Bmp4*-Promoter-Konstrukt, dessen Transkription durch *Hoxd13* aktiviert wird, konnte außerdem gezeigt werden, dass die Aktivität des Proteins deutlich durch die Expansion des Alanin-Repeats reduziert wird, und zwar umso stärker, je länger die Expansion ist. Durch die Mutation wird also nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Funktion des Proteins beeinträchtigt.

Um zu untersuchen, ob Polyalanin-Expansionen in Transkriptionsfaktoren generell zu Fehlfaltung und Aggregatbildung führen, wurden noch 3 andere Proteine, die Alanin-Repeats besitzen, in der Zellkultur untersucht. Für *Hoxa13*, *Runx2* und *Sox3* konnte *in vitro* ebenfalls gezeigt werden, dass die Expansionen des Repeats zu einer Verschiebung der Lokalisation ins Zytoplasma mit Aggregatbildung führen. Bioinformatische Untersuchungen ergaben außerdem, dass Polyalanin-Repeats mit Transkriptionsfaktoren und anderen nukleären Proteinen korreliert sind und ihre Gesamtlänge 20 nicht überschreitet. Diese Daten zusammen mit den Ergebnissen dieser Studie deuten darauf hin, dass die Verlängerung eines

Polyalanin-Repeats über 18-22 in einer Fehlfaltung des Proteins und, abhängig von der Effizienz des Abbaus, in Aggregatbildung resultiert.

## 6.2) Summary

In this study the recessive mouse mutant “synpolydactyly homolog” (*spdh*) was investigated as a model for human Synpolydactyly (SPD). The mutation consists of an expansion of the polyalanine-coding repeat in the 5'-region of *Hoxd13*, a transcription factor, that belongs to the highly conserved *Hox*-gene family. In humans showing SPD, expansions from +7 to +14 additional alanines are found and there exists a correlation between the increase in the length of expansion and an increase in penetrance and severity of the phenotype. In the *spdh*-mouse, the alanine-coding repeat is expanded by +7 to a total of 22 alanines. The phenotype consists of syndactyly, polydactyly and brachydactyly.

The phenotype of the homozygous *spdh*-mouse was investigated in detail in this study. It could be shown, that 3 developmental processes are disrupted. First, the early patterning of the limb is altered, which leads to the syn- and polydactyly. Whole mount in situ hybridisations (WM-ISH) showed an altered expression of *Bmps* (*Bone morphogenetic proteins*) 2, 4 and 7, which play an important role during patterning.

Second, the development of joints in the metacarpals and phalanges is inhibited, only the distal joints develop. WM-ISH and radioactive ISH showed a reduced and altered expression pattern of genes, that are involved during the formation of joints. In the *spdh*-mutant the expression of *Gdf5* (*Growth/differentiation factor 5*), *Noggin*, *Ihh* (*Indian hedgehog*) and the hedgehog target genes *Gli1* and *Ptc1* (*Patched 1*) are clearly different compared to the wt, which leads to the disruption of signaling pathways, that play crucial roles during joint formation.

Third, the differentiation of the cartilage is strongly delayed and the formation of bone inhibited. It is shown in this study, that the proliferation of chondrocytes in the *spdh*-mutant is clearly reduced during development and after birth. Additionally, they do not undergo hypertrophic differentiation. The proliferation and differentiation of chondrocytes is controlled by a negative feedback-loop between *Ihh* and *Pthlh* (Parathyroid hormone-like hormone). WM-ISH and radioactive ISH revealed that the expression of *Ihh* and the *Pthlh*-receptor is strongly altered in the *spdh*-mutant. Consequently, a central signaling pathway controlling the proliferation and differentiation of chondrocytes is disrupted in the *spdh*-

mouse, whereby the chondrocytes are kept in a non-proliferating and undifferentiated state and thus formation of bone is inhibited.

To investigate the influence of the expansion in the polyalanine-coding repeat in *Hoxd13* on the localisation and function of the protein, cell-transfections were performed using *Hoxd13* constructs with different lengths of the repeat. It was shown in this study, that the expansions lead to a change in the localisation of the protein from nucleus to cytoplasm, where the mutated protein forms amorphous aggregates. The frequency of aggregate-formation increased with an increasing length of the expansion. It could be shown, that the wt protein is sequestered to the aggregates and is hindered to enter the nucleus, which could be an explanation for the dominant character of SPD in humans.

Additionally the heat-shock-proteins (HSP) 40 and 70, which are involved in the recognition and re-folding of misfolded proteins, were recruited into the aggregates. The increased activation of these HSPs using Geldanamycin resulted in a reduction of protein aggregate formation. These are clear hints, that the mutation in *Hoxd13* leads to the misfolding of the protein. This theory is also supported by the investigation of the protein distribution in the *spdh/spdh* mouse. Immunocytochemistry on sections and western blot analysis revealed, that the majority of the mutated protein *in vivo* becomes degraded, but the remaining protein is localized predominantly in the cytoplasm in contrast to the wt.

In a luciferase assay using a *Bmp4*-promoter-construct, whose transcription can be activated by *Hoxd13*, it could also be shown, that the activity of the protein is markedly reduced by the expansion of the alanine-repeat. This reduction is the more severe the longer the expansion becomes. Thus, the expansion not only affects the localisation but also the function of the protein.

To investigate if polyalanine-expansions in transcription factors in general might result in misfolding and aggregate formation, 3 other proteins harbouring alanine-repeats were tested in the cell-culture system. It could also be shown *in vitro* for *Hoxa13*, *Runx2* and *Sox3* that the expansion of the repeat resulted in a displacement of the protein-localisation into the cytoplasm with aggregate formation. In a bioinformatic approach a correlation of polalanine repeats to transcription factors and other nuclear proteins was shown and their maximal length does not exceed a total of 20. These data together with the results of this study indicate, that the expansion of a polyalanine repeat over 18-22 results in misfolding of the protein and, dependent on the efficiency of degradation, in aggregate formation.