

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mutationsanalyse des *PDE4D*-Gens bei Individuen mit  
Akrodysostose und mit Brachydaktylie Typ E

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jasmin Alicia Torfadóttir Ásgeirsson

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 09.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung (deutsch).....	V
Abstract (english).....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Skelettentwicklung des Menschen.....	1
1.1.1 Entwicklung des Achsenskeletts.....	3
1.1.2 Extremitätenentwicklung des Menschen.....	3
1.2 Skelettale Fehlbildungen.....	6
1.2.1 Brachydaktylie.....	6
1.2.2 Akrodysostose.....	12
1.2.3 Radiologischer Vergleich von Akrodysostose und BDE.....	13
1.3 Die cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4D (PDE4D).....	13
1.3.1 Aufbau.....	13
1.3.2 Funktionsmechanismus.....	15
1.3.3 Der Einfluss der cAMP Signalkaskade auf die Knochenentwicklung.....	16
1.3.4 Mutationen im <i>PDE4D</i> -Gen bei Akrodysostose Patienten.....	17
2 Zielsetzung.....	19
3 Materialien und Methoden.....	20
3.1 Patienten.....	20
3.2 Kontrollgruppe.....	20
3.3 Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut.....	20
3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
3.6 Enzymatische Reinigung (ER).....	26

3.7	Sequenzierungs-PCR (SPCR).....	27
3.8	Aufreinigung des SPCR-Produktes.....	29
3.9	Primerdesign.....	29
3.10	Geräte.....	31
3.11	Datenbanken und Computer-Software .....	32
3.12	Next-Generation-Sequencing (NGS) .....	33
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Etablierung der PCR-Bedingungen.....	35
4.2	Ergebnisse der Sequenzanalyse .....	39
4.3	<i>In silico</i> Analyse hinsichtlich der Pathogenität der Variante c.2030A>G .....	41
4.4	Konservierungsgrad der Aminosäure der Variante p.Tyr677Cys.....	44
4.5	Untersuchung der gesunden Kontrollgruppe .....	44
4.6	Klinische und laborchemische Patientendaten .....	44
5	Diskussion .....	52
5.1	Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse .....	53
5.2	Stellenwert einer Sequenzanalyse des <i>PDE4D</i> -Gens bei Patienten mit Akrodysostose und Brachydaktylie Typ E.....	60
5.3	Mutationen im <i>PDE4D</i> -Gen und <i>PRKAR1A</i> -Gen auch bei phänotypisch ähnlichen Erkrankungen detektiert .....	61
6	Ausblick .....	62
7	Literaturverzeichnis.....	64
8	Eidesstattliche Versicherung .....	69
9	Lebenslauf .....	70
10	Danksagung .....	72

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 .....	2
Abbildung 1-2 .....	4
Abbildung 1-3 .....	6
Abbildung 1-4 .....	7
Abbildung 1-5 .....	11
Abbildung 1-6 .....	14
Abbildung 1-7 .....	16
Abbildung 3-1 .....	34
Abbildung 4-1 .....	36
Abbildung 4-2 .....	37
Abbildung 4-3 .....	37
Abbildung 4-4 .....	38
Abbildung 4-5 .....	40
Abbildung 4-6 .....	41
Abbildung 4-7 .....	42
Abbildung 4-8 .....	43
Abbildung 4-9 .....	44
Abbildung 4-10 .....	45
Abbildung 4-11 .....	46
Abbildung 4-12 .....	48
Abbildung 4-13 .....	49
Abbildung 4-14 .....	49
Abbildung 4-15 .....	50
Abbildung 4-16 .....	51
Abbildung 4-17 .....	51

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1.....	18
Tabelle 3-1.....	21
Tabelle 3-2.....	22
Tabelle 3-3.....	23
Tabelle 3-4.....	24
Tabelle 3-5.....	25
Tabelle 3-6.....	25
Tabelle 3-7.....	26
Tabelle 3-8.....	27
Tabelle 3-9.....	28
Tabelle 3-10.....	28
Tabelle 3-11.....	28
Tabelle 3-12.....	29
Tabelle 3-13.....	30
Tabelle 3-14.....	31
Tabelle 3-15.....	32
Tabelle 3-16.....	32
Tabelle 4-1.....	38
Tabelle 4-2.....	39
Tabelle 4-3.....	39
Tabelle 5-1.....	58

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
AER	apikale ektodermale Randleiste
AHO	Albright Osteodystrophie (engl.: <i>Albright hereditary osteodystrophy</i> )
AP	anterior-posterior
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Brachydaktylie
BDA	Brachydaktylie Typ A
BDB	Brachydaktylie Typ B
BDC	Brachydaktylie Typ C
BDD	Brachydaktylie Typ D
BDE	Brachydaktylie Typ E
BMP	engl.: <i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR1B	BMP Rezeptor Typ 1B
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	engl.: <i>cAMP response element binding</i>
Cys	Cystein
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DV	dorsal-ventral
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK2	engl.: <i>Extracellular-signal Regulated Kinase 2</i>
Exo	Exonuklease
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, engl.: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
G	Guanin
GDF5	engl.: <i>growth differentiation factor 5</i>

IHH	engl.: <i>Indian Hedgehog</i>
kb	Kilo-Basenpaare
KO	Knock-out
M	Größenmarker-Referenz-DNA
n. a.	nicht angegeben
NGS	Next-Generation Sequencing
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl.: <i>polymerase chain reaction</i>
PD	proximal-distal
PDE4D	cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4D
PHP	Pseudohypoparathyreoidismus
PRKAR1A	Regulatorische Untereinheit Typ I Alpha der cAMP-abhängigen Protein Kinase
PSM	presomitic mesoderm
PTH	Parathormon
PTHrP	engl.: <i>parathyroid hormone-related peptide</i>
PZ	Progresszone
SAP	engl.: <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SHH	engl.: <i>Sonic Hedgehog</i>
SPCR	Sequenzierungs-PCR
T	Thymin
TAE	Tris-Acetic-Acid-EDTA
TGF	engl.: <i>transforming growth factor</i>
TK	Tyrosin-Kinase
TSH	Thyreoid-stimulierendes Hormon
Tyr	Tyrosin
UCR	engl.: <i>upstream conserved regions</i>
ZPA	Zone der polarisierenden Aktivität

## Zusammenfassung (deutsch)

Akrodysostose ist eine seltene, genetisch bedingte Dysostose, bei der eine ausgeprägte Brachydaktylie, Kleinwuchs, kraniofaziale Anomalien mit nasaler Hypoplasie sowie eine Entwicklungsverzögerung und hormonelle Veränderungen vorliegen können. Inzwischen konnten zwei in der cAMP-Signalwegkaskade beteiligte Gene, *PRKAR1A* und *PDE4D*, als krankheitsverursachend identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden vier Patienten mit Akrodysostose hinsichtlich Veränderungen in der kodierenden Sequenz im *PDE4D*-Gen untersucht. Bei einem der Patienten konnte durch Sequenzierung eine in der Literatur noch nicht beschriebene Missense-Variante nachgewiesen werden. Diese befand sich im Exon 15 an Position c.2030 A>G. Hierdurch wird in der katalytischen Domäne des Proteins ein Aminosäureaustausch an Position 677 (p.Tyr677Cys) hervorgerufen. Die *in silico* Analyse und das Untersuchungsergebnis des Konservierungsgrads unterstützen die Annahme, dass die Variante krankheitsverursachend ist. Auch der *de novo*-Nachweis durch Untersuchung der elterlichen DNA untermauert diese Schlussfolgerung.

Außerdem wurde das *PDE4D*-Gen bei 26 Patienten mit Brachydaktylie Typ E (BDE) sequenziert, wobei bei keinem der Patienten eine Mutation nachgewiesen werden konnte.

Um das klinische Spektrum von *PDE4D*-Mutationsträgern diskutieren zu können, wurden die klinischen Daten zweier weiterer Akrodysostose Patienten mit nachgewiesener Mutation im *PDE4D*-Gen in diese Arbeit aufgenommen, welche im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik an der Charité Universitätsmedizin Berlin untersucht wurden.

In den Akrodysostose-Fällen, welche in der Literatur beschrieben sind, zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp ab.

Neben Brachydaktylie und fazialen Auffälligkeiten bestehen bei Patienten mit *PDE4D*-Mutationen in den meisten Fällen ein normales Längenwachstum sowie normwertige PTH- und TSH-Spiegel. Allerdings sind bei diesen Patienten in der Mehrheit der Fälle eine reduzierte Intelligenz oder eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung beschrieben. Patienten mit *PRKAR1A*-Mutationen weisen hingegen meistens einen Kleinwuchs sowie eine Hormonresistenz vor allem gegen PTH und TSH auf.



Auffälligkeiten in der psychomotorischen Entwicklung sind nur selten und in leichter Ausprägung beschrieben.

Diese Genotyp-Phänotyp-Korrelationen konnten in dieser Arbeit bei den drei Patienten mit *PDE4D*-Mutation bestätigt werden. Bei allen Patienten lagen ein normales Längenwachstum, normwertige PTH- und TSH-Spiegel sowie unterschiedlich starke Auffälligkeiten im Bereich der psychomotorischen Entwicklung vor.

Zusammenfassend ist die Sequenzierung des *PDE4D*-Gens zur molekulardiagnostischen Sicherung der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose sinnvoll. Vor einer molekulargenetischen Untersuchung sollte aufgrund der klinischen Befunde eine Einschätzung über das in diesem Fall am ehesten krankheitsverursachende Gen, *PDE4D* oder *PRKAR1A*, getroffen werden. Hiermit könnte eine zielführende genetische Diagnostik unterstützt werden.

Weiterhin scheint das *PDE4D*-Gen für die Pathogenese der BDE eine untergeordnete Bedeutung zu haben. Nach weiteren ursächlichen Genen für die BDE sollte daher gesucht werden.

## Abstract (english)

Acrodysostosis is a rare genetic dysostosis, which involves a pronounced brachydactyly, short stature, craniofacial anomalies with nasal hypoplasia as well as mental retardation and hormonal alterations. Meanwhile, two genes participating in the cAMP-dependent pathway, *PRKAR1A* and *PDE4D*, were identified to be associated with this disorder.

In the present study four patients with acrodysostosis were screened for mutations in the coding sequence of *PDE4D*. With this analysis a novel, not yet reported missense variant was detected in one patient, which was located in exon 15 at the position c.2030 A>G. This nucleotide change leads to an amino acid substitution in the catalytic domain of the protein at position 677 (p.Tyr677Cys). The results of the *in silico* analysis as well the investigation of the degree of conservation support the hypothesis that the detected variant should be classified as pathogenic. Moreover, this alteration was verified as *de novo* by analysis of the parental DNA confirming the aforementioned conclusion.

Apart from that, sequencing of *PDE4D* in 26 patients with brachydactyly type E (BDE) detected no mutations.

In order to discuss the clinical spectrum of *PDE4D* mutation carriers, the clinical data of two further acrodysostosis patients with confirmed *PDE4D* mutations, diagnosed at the Institute of Medical Genetics and Human Genetics Charité Universitätsmedizin Berlin, were included in this study.

Furthermore, literature regarding cases of acrodysostosis indicates a correlation between genotype and phenotype. Apart from brachydactyly and facial anomalies patients with a *PDE4D* mutation usually show normal growth and PTH as well as TSH levels. However, in the majority of these patients mental and psychomotor retardation are observed. In contrast, patients with *PRKAR1A* mutations are often characterized by short stature and hormonal resistance especially to PTH and TSH while abnormalities in psychomotor development are rare or exist only to a milder degree.

This genotype-phenotype correlation could be confirmed in this study of the three patients with *PDE4D* mutations. All of these patients showed normal growth, normal PTH and TSH levels as well as abnormalities of the psychomotor development.

In summary, sequencing *PDE4D* is indicated in order to confirm the clinically suspected diagnosis of acrodysostosis on the molecular level. Before initiating molecular diagnostic

testing a preliminary estimate on the likely underlying gene, *PDE4D* or *PRKAR1A*, respectively, should be made based on the clinical features of the patient. This could support future promising genetic diagnostics.

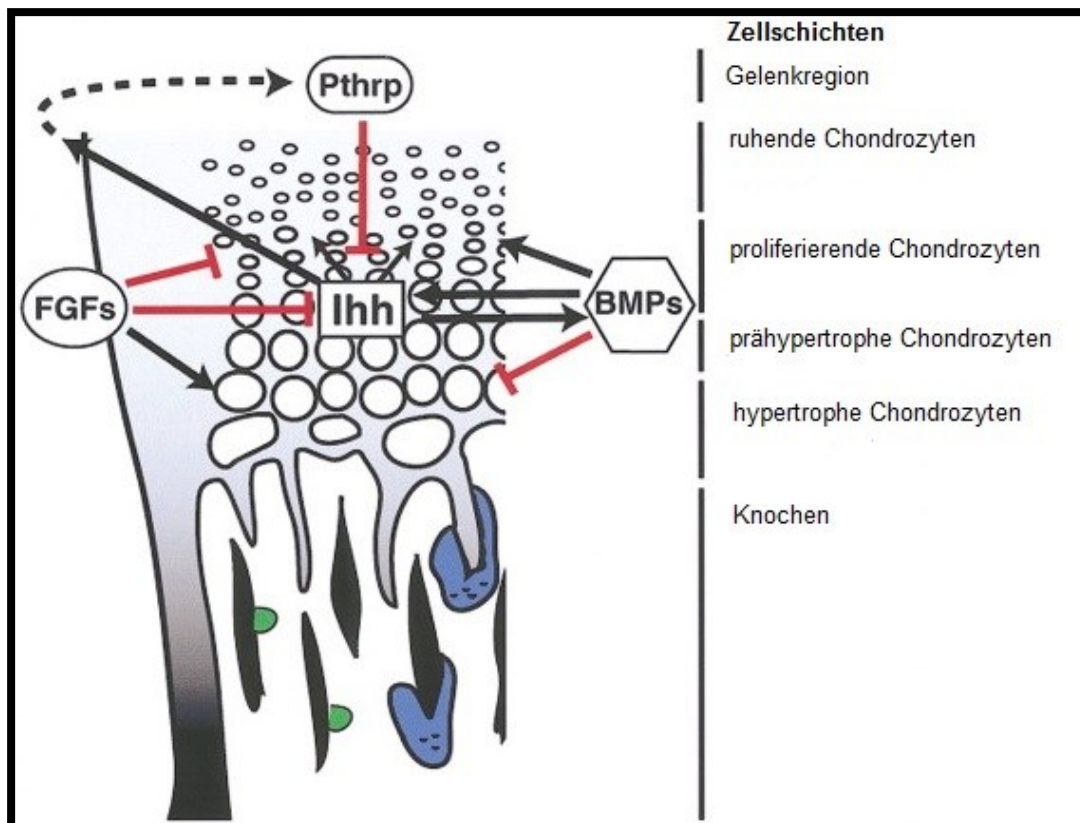
Meanwhile, *PDE4D* seems to have minor relevance in the pathogenesis of BDE. For this reason further investigations on etiological genes are needed.

# 1 Einleitung

## 1.1 Skelettentwicklung des Menschen

Das menschliche Skelettsystem geht aus drei verschiedenen embryonalen Keimblättern hervor (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm). Das Achsen- und das Extremitätenskelett sind mesodermalen Ursprungs, wobei sich erst genanntes aus dem paraxialen Mesoderm entwickelt und letzteres sich aus dem Seitenplattenmesoderm bildet. Das kraniofaziale Skelett ist hingegen ektodermalen Ursprungs und wird aus der Neuralleiste gebildet (1). Bei der Knochenentwicklung unterscheidet man zwischen direkter (desmaler) und indirekter (enchondraler) Osteogenese. Schädeldach, Gesichtsknochen und Teile des Unterkiefers und Schlüsselbeins verknöchern desmal, dabei differenzieren sich mesenchymale Zellen direkt zu Osteoblasten. Dahingegen entstehen die meisten Knochen mesodermalen Ursprungs durch indirekte Osteogenese (2, 3). Während der embryonalen Entwicklung beginnt die enchondrale Ossifikation mit der Verdichtung mesenchymaler Zellen. Auf diese Weise entsteht ein Modell des zukünftigen Skeletts, das sogenannte Primordialskelett (2, 4, 5). Die kondensierten Mesenchymzellen differenzieren schließlich zu Chondrozyten. Dem Transkriptionsfaktor SOX9 wird an diesem Prozess eine entscheidende Funktion zugeschrieben. SOX9 zählt zur Familie von Transkriptionsfaktoren, welche durch eine DNA-Bindungsdomäne mit *High-Mobility-Group* (HMG) Box charakterisiert sind (6). Die Chondrozyten durchlaufen einen mehrphasigen Differenzierungsprozess, der Proliferation, Hypertrophie und Zelltod beinhaltet. Die proliferierenden Zellen sind in parallelen Säulen angeordnet und wandeln sich anschließend in hypertrophe Chondrozyten um (7). Dieser letzte Schritt der Zellreifung gipfelt in der Apoptose und dem Austausch hypertropher Knorpelzellen durch Knochengewebe (8). Durch Gefäßinvasion können Osteoblasten über die Blutbahn in das Knorpelgerüst transportiert werden. Diese produzieren Knochenmatrix und verwenden dabei die verbleibende Knorpelsubstanz als Baugerüst (7). Erste Zeichen der Verknöcherung lassen sich ab der 7. Embryonalwoche beobachten und dauern teilweise bis zum 20. Lebensjahr an (5).

Die Proliferations- und Differenzierungsphasen der Chondrozyten werden von einem komplexen Netzwerk an Signalmolekülen reguliert (**Abbildung 1-1**).



**Abbildung 1-1**

Schematische Darstellung der Chondrozytenproliferation und –differenzierung in der Wachstumsfuge. Chondrozyten sind in vier Ebenen angeordnet, welche ihre Differenzierungsstadien widerspiegeln: (1) ruhende, (2) proliferierende, (3) prähypertrophe und (4) hypertrophe Chondrozyten. Letztere werden infolge des Zusammenwirkens von Osteoblasten (grün) und mehrkernigen Osteoklasten (blau) durch Knochen ersetzt. Komplexe Signalwege regulieren Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten. Die Pfeile veranschaulichen die stimulierende (schwarze Pfeile) beziehungsweise inhibierende (rote Pfeile) Interaktion zwischen den Signalmolekülen.

BMPs: *Bone Morphogenetic Proteins*; FGFs: *Fibroblast Growth Factors*; IHH: *Indian Hedgehog*; PTHrP: *Parathyroid hormone related peptide* (verändert nach Kornak und Mundlos, 2003) (6).

Die Chondrozytenproliferation wird durch BMPs (engl.: *bone morphogenetic proteins*) stimuliert und in ihrer Differenzierung inhibiert (9). BMPs sind multifunktionale Wachstumsfaktoren, welche der TGF- $\beta$ -Superfamilie (engl.: *transforming growth factor*) angehören und in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen (10). Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF, engl.: *fibroblast growth factor*), die zu einer großen Familie an Polypeptid-Wachstumsfaktoren zählen, wirken antagonistisch zu den

BMPs, indem sie die Chondrozytenproliferation inhibieren und ihre Differenzierung stimulieren (9, 11, 12).

Ferner konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass zwei weitere Signalmoleküle, PTHrP (*Parathyroid hormone related peptide*) und IHH (Indian Hedgehog), eine negative Feedbackschleife bilden und auf diese Weise den Differenzierungsbeginn der hypertrophen Chondrozyten regulieren (13).

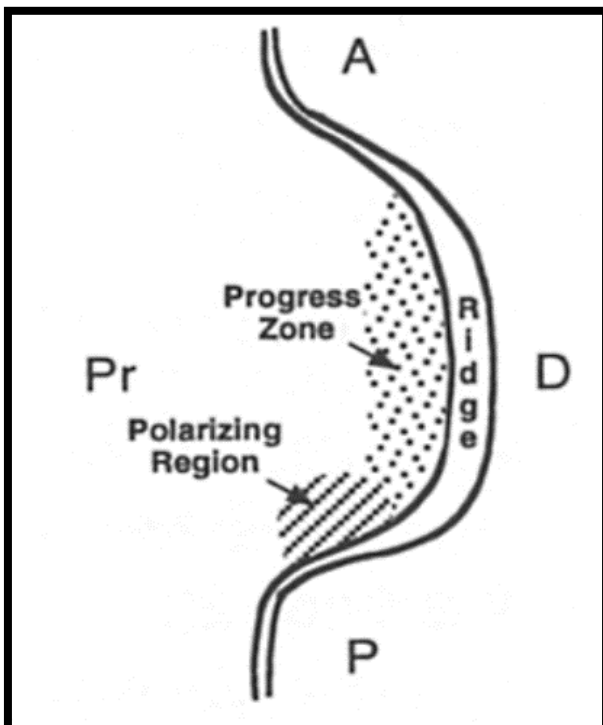
### **1.1.1 Entwicklung des Achsenskeletts**

Das Achsenskelett, die Skelettmuskulatur und Teile der Dermis entstehen aus sogenannten Somiten. Diese segmentartig organisierten Strukturen entstehen durch Abknospung des axialen Mesoderms (PSM, engl.: *presomitic mesoderm*) und liegen zu beiden Seiten der Neuralleiste (14). Durch Signale aus dem umgebendem Gewebe kommt es zur epithelial-mesenchymalen Transition und Teilung der Somiten: aus den vorderen Abschnitten gehen die mesenchymalen Sklerotome hervor, aus den hinteren Abschnitten die epithelialen Dermomyotome (15).

### **1.1.2 Extremitätenentwicklung des Menschen**

Die ersten sichtbaren Zeichen der Extremitätenentwicklung sind die Extremitätenknospen (engl.: *limb buds*), welche an den Seiten des Embryos hervorragen. Sie bestehen aus homogenen undifferenzierten Zellen, welche von einer Ektodermschicht überzogen sind (16). Das Wachstum der Extremitätenknospen verläuft in drei Achsen: Der proximal nach distal (PD)-Achse (Schulter bis Fingerspitze), der anterior nach posterior (AP)-Achse (Daumen bis kleiner Finger) und der dorsal nach ventral (DV)-Achse (Handrücken bis Handfläche) (16). Ein Streifen von spezialisiertem Epithel am distalen Ende der Extremitätenknospe, die sogenannte apikale ektodermale Randleiste (AER, engl.: *apical ectodermal ridge*), steuert das Extremitätenwachstum in der PD-Achse. Entfernt man in einem mikrochirurgischen Eingriff die AER bei Hühnerembryonen, kann man beobachten, dass der Verlust der Extremität umso größer ist, je früher die AER in der Entwicklungsphase entfernt wird. Bei einem Verlust der AER zu späteren Zeitpunkten der Gliedmaßenentwicklung fehlen distal gelegene Extremitätenstrukturen, wohingegen sich die proximalen Strukturen nahezu unauffällig entwickeln (17). Neben der AER gibt es

noch zwei weitere funktionale Regionen, welche beim Extremitätenwachstum eine Rolle spielen. Unterhalb der AER befindet sich die sogenannte Progresszone (PZ, engl.: *progress zone*), in welcher sich die undifferenzierten Vorläuferzellen des Extremitätenskeletts befinden (18). Weiter proximal und posterior der PZ liegt die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA, engl.: *zone of polarizing activity; polarizing region*) (**Abbildung 1-2**). Durch den Versuch von Saunders et al. (1968) im Hühnerembryo, bei dem durch Transplantation der ZPA auf den vorderen (anterioren) Rand einer Extremitätenknospe spiegelbildliche Duplikationen der Finger entstanden (19, 20), erlangte man erste Erkenntnisse über die Vermittlung des AP-Achsen Wachstums (21, 22). Zudem wurden auch auf molekulargenetischer Ebene neue Einsichten gewonnen. So wurde die Rolle des *Sonic Hedgehog* (*SHH*)-Gens, welches in der ZPA exprimiert wird, als entscheidend für die Steuerung der strukturellen Ausbildung der Finger und Festlegung ihrer Anzahl identifiziert (23, 24), vor allem durch die Signalwirkung auf die *HoxA* und *HoxD* Cluster (siehe unten) (25).



**Abbildung 1-2**

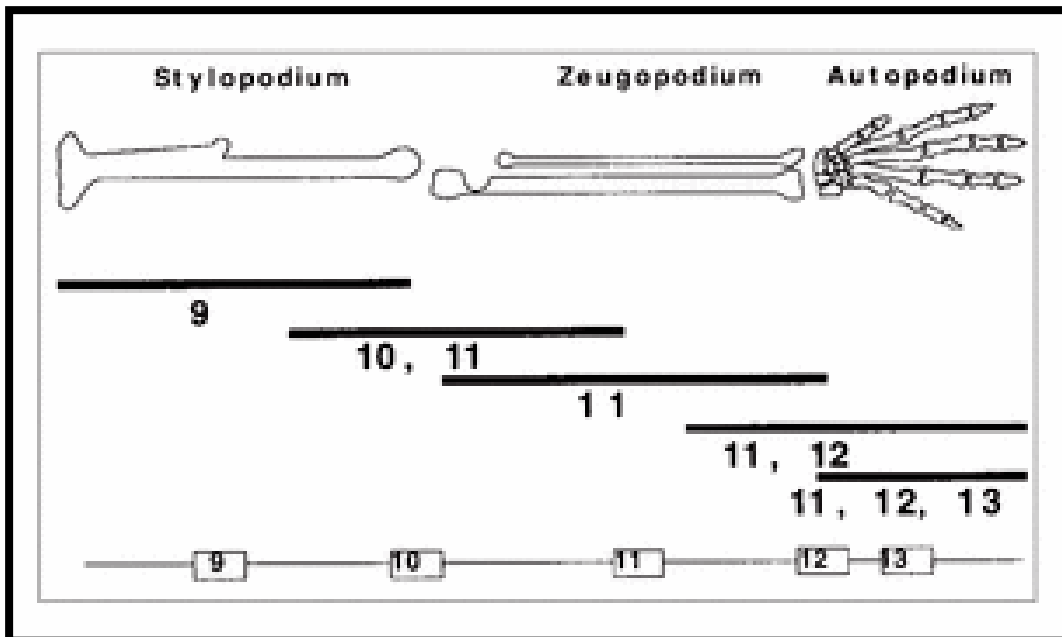
Schematische Darstellung der Extremitätenknospe in einem frühen Entwicklungsstadium. Diese zeigt die apikale ektodermale Randleiste (*Ridge*) und zwei unterschiedliche funktionelle Regionen: die Progresszone und die Zone der polarisierenden Aktivität (*Polarizing Region*). A: anterior, D: distal, P: posterior, Pr: proximal (aus Niswander et al., 1993) (22).

Des Weiteren scheinen FGFs eine wichtige Bedeutung während der Extremitätenentwicklung zu haben. Niswander et al. (1993) konnten zeigen, dass die Signalwirkung der AER durch FGF vermittelt wird. In einem Experiment entfernte die Arbeitsgruppe die AER und setzte eine in FGF4 getränkte Perle in das Extremitäten-Mesenchym ein. Daraufhin beobachteten sie eine nahezu vollständige Extremitätenentwicklung (22).

Es ist zudem bekannt, dass die Signalwirkung von FGF, im Besonderen FGF4, in der posterioren AER die *SHH* Expression in der ZPA transkriptionell reguliert, und dass die Signalwirkung von SHH die *FGF4* Expression in der AER aufrechterhält. Hierdurch wird eine positive Feedback-Schleife gebildet (23, 26).

Die Aktivität der AER und der ZPA wird durch sogenannte *HOX*-Gene bestimmt und reguliert (27). *HOX*-Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, welche in der frühen Entwicklungsphase morphogenetische Prozesse steuern. Der Mensch besitzt insgesamt 39 *HOX*-Gene. Diese sind in 4 Clustern (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* und *HOXD*) organisiert, welche auf vier verschiedenen Chromosomen liegen und jeweils zwischen neun und 11 Gene umfassen. Die Expression der *HOX*-Gene folgt einer zeitlichen und räumlichen Reihenfolge entlang der AP-Achse, welche ihrer Anordnung auf dem Chromosom entspricht. Gene am 3' Ende eines Clusters werden zeitlich früher und weiter anterior exprimiert, wohingegen Gene am 5' Ende später und weiter posterior exprimiert werden. (28). Für die Extremitätenentwicklung sind die *Homeobox*-Gene am 5' Ende der *HOXA*- und *HOXD*-Cluster verantwortlich (**Abbildung 1-3**) (29). Wie bereits beschrieben führt die Signalwirkung von SHH auf die *HOXA*- und *HOXD*-Cluster zu einem distalen Extremitätenwachstum in der AP-Achse. Bereits vor dem Ansprechen der Signalwirkung von SHH liegen bis zu sieben *HOX*-Gene exprimiert vor, welche die *SHH*-Transkription fördern (25).





**Abbildung 1-3**

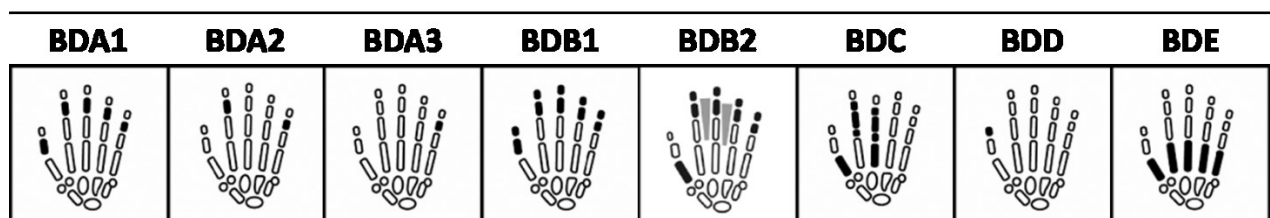
Schematische Darstellung einer Extremität. Die dicken Linien kennzeichnen die Ausdehnung der anatomischen Bereiche der Extremität, welche durch Genmutationen der paralogen Gengruppe 9-13 betroffen sind. Die darunter liegende dünnere Linie mit den nummerierten Boxen (9-13) repräsentiert die Anteile der *HOXA*- und *HOXD*-Cluster, welche an der Extremitätenentwicklung beteiligt sind. Die Gene sind in beiden Clustern repräsentiert, mit Ausnahme von Nummer 12, welches nur im *HOXD*-Cluster vorkommt (aus Zákány und Duboule, 1999) (29).

## 1.2 Skelettale Fehlbildungen

### 1.2.1 Brachydaktylie

Der Wortursprung Brachydaktylie (BD) kommt aus dem Altgriechischen und setzt sich aus den Vokabeln *brachy* für „kurz“ und *dactylos* für „Finger“ zusammen. Der Terminus beschreibt das Vorliegen verkürzter Finger aufgrund einer abnormalen Entwicklung der Phalangen oder der Metakarpalia (30). Brachydaktylie kann entweder isoliert oder in Kombination mit anderen Fehlbildungen auftreten. Entsprechend verschiedener Merkmale wurden die isoliert vorkommenden Brachydaktylien klassifiziert. Basierend auf anatomischen und genetischen Merkmalen erfolgte eine Einteilung in fünf Hauptgruppen (A, B, C, D und E) und drei Subgruppen (A1, A2 und A3) (31), die im Verlauf überarbeitet und erweitert wurde (**Abbildung 1-4**) (32, 33). Isolierte BD sind selten, mit Ausnahme der häufig zu findenden Formen BDA3 und BDD, hier liegt die Prävalenz um 2% (30).

Obwohl die Brachydaktylien spezifische Merkmale aufweisen, gibt es eine beträchtliche Überschneidungen in den Verteilungsmustern der betroffenen Knochen (34). Diese phänotypische Überlappung deutet auf einen gemeinsamen genetischen Signalweg in der Entwicklung der Phalangen und Metakarpalia hin (34). Genetische Studien an Menschen und Mäusen haben gezeigt, dass die meisten Brachydaktylien auf Störungen im BMP-Signalweg zurückzuführen sind (34). BMPs besitzen unter anderem eine entscheidende Funktion in der postnatalen Knochenbildung (s. Kapitel 1.1.) (10). Nichtsdestotrotz zeigen verschiedene Studien, dass weitere Signalmoleküle und Signalwege an der Entstehung von BDs beteiligt sind, sodass unter anderen von Mundlos (2009) vorgeschlagen wird, dass zukünftige Definitionen dieses Krankheitsbildes auf dem spezifischen Phänotyp im Kontext der daran beteiligten molekularen Netzwerke basieren sollten (35).



**Abbildung 1-4**

Schematische Darstellung der verschiedenen Brachydaktylieformen. Die betroffenen Knochen sind schwarz eingefärbt, Symphalangen sind durch graue Schattierungen dargestellt (verändert nach Mundlos, 2009) (35).

## Brachydaktylie Typ A

Nach der Bell-Klassifikation ist die Brachydaktylie Typ A (BDA) durch eine Hypo- oder Aplasie der Mittelphalangen gekennzeichnet. Die Subtypen unterscheiden sich im Verteilungsmuster der betroffenen Mittelphalangen (30).

### Brachydaktylie Typ A1

Der Subtyp BDA1 ist durch eine Hypo- oder Aplasie aller Mittelphalangen charakterisiert, mitunter kann auch ein distaler Symphalangismus vorliegen (30).

*Indian Hedgehog (IHH)* war das erste Gen, bei dem eine Assoziation mit BDA1 gezeigt werden konnte. Hierbei identifizierten Gao et al. (2001) verschiedene Missense-Mutationen in der aminoterminalen Signaldomäne von *IHH* (36). Ein zweiter Genlokus für

BDA1 wurde auf Chromosom 5p13.3-p13.2 identifiziert (37). Im weiteren Verlauf wurden bei BDA1-Patienten Mutationen im *GDF5*-Gen (engl.: *growth differentiation factor 5*) nachgewiesen (38). *GDF5*, welches der BMP Familie (s. oben) angehört, interagiert als der bevorzugte Ligand direkt am BMP Rezeptor Typ 1B (*BMPR1B*, engl.: *bone morphogenetic protein receptor 1B*) und ist sowohl für die Chondrogenese, als auch für die Ausbildung der Finger entscheidend (34, 38). Darüber hinaus zeigten jüngste Forschungsergebnisse, dass Mutationen im *BMPR1B* selbst, welche zuvor im Zusammenhang mit der BDA2 beschrieben worden sind, an der Entstehung der BDA1 beteiligt sind (34).

### **Brachydaktylie Typ A2**

Typisches Merkmal für den BDA2-Phänotyp ist eine Hypo- oder Aplasie der Mittelphalanx des II. Fingers, welche bei betroffenen Patienten dreiecksförmig ist (30). Auch die Mittelphalanx des V. Fingers kann auf diese Weise verändert sein, was in manchen Fällen zu einer Klinodaktylie führt (35). In der Literatur wurden bisher drei Gene beschrieben, die für die Entstehung der BDA2 verantwortlich gemacht werden: *BMPR1B*, *BMP2* und *GDF5*. Lehmann et al. (2003) identifizierten auf Chromosom 4q heterozygote Missense-Mutationen im Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor *BMPR1B* (39, 40). Auch Mutationen im *GDF5*-Gen, welche eine Hemmung der Ligand-Rezeptor-Interaktion zur Folge haben, können zu BDA2 führen (41, 42).

Zuletzt wurden bei mehreren Patienten mit BDA2 auf Chromosom 20p12.3 Duplikationen eines evolutionär hoch konservierten regulatorischen Elements entdeckt. Diese in Bezug auf *BMP2*-Gens downstream liegenden Duplikationen bedingen möglicherweise eine fehlerhafte Regulierung der *BMP2*-Expression (43, 44).

### **Brachydaktylie Typ A3**

Der Phänotyp von BDA3 ist durch Verkürzung der Mittelphalanx des V. Fingers charakterisiert. Bislang konnten für BDA3 keine ursächlichen Gene identifiziert werden (45).

## **Brachydaktylie Typ B**

Der Typ B der Brachydaktylien (BDB) ist durch Hypoplasie der distalen und mittleren Phalangen, Nageldysplasie und einen unterschiedlichen Grad von distalem und proximalem Symphalangismus charakterisiert. Zusätzlich können auch breite Daumen mit oder ohne distale Duplikation, Spaltbildung oder Syndaktylie vorliegen (45). BDB verursachende Mutationen konnten in zwei unterschiedlichen Regionen innerhalb der Rezeptor-Tyrosin-Kinase *ROR2* identifiziert werden (46, 47). Aus diesen Mutationen resultieren eine Verkürzung des Rezeptors vor oder hinter der Tyrosin-Kinase (TK) Domäne. Zwischen distalen und proximalen Mutationen im *ROR2*-Gen konnte eine genotypische-phänotypische Korrelation festgestellt werden: Distale Mutationen waren phänotypisch schwerer ausgeprägt und präsentierten sich in einem amputationsähnlichen Erscheinungsbild (47).

## **Brachydaktylie Typ B2**

Eine weitere BDB Form ist die Brachydaktylie Typ B2 (BDB2), welche durch das zusätzliche Vorkommen von proximalen Symphalangien der Finger gekennzeichnet ist. Diese Form wird durch Mutationen im *NOG*-Gen bedingt, welches für das Protein *NOGGIN* codiert und als BMP Antagonist wirkt. Obwohl Mutationen in diesem Gen nicht zu einem kompletten Funktionsverlust führen, kommt es jedoch zu einer Störung in der BMP-Signalkaskade, indem die Fähigkeit BMP zu binden beeinträchtigt wird (48).

## **Brachydaktylie Typ C**

Brachydaktylie Typ C (BDC) ist durch eine Brachymesophalangie der II., III. und V. Finger charakterisiert, sowie durch einen verkürzten I. Metakarpalknochen und eine Hyperphalangie der Grundphalanx des zweiten und gegebenenfalls auch des dritten Fingers (45). In der Regel ist der IV. Finger nicht betroffen und daher der längste Finger (49). Es sind verschiedene mit BDC assoziierte Mutationen im Gen *GDF5* beschrieben. Diese waren entweder innerhalb der Prodomäne oder im Bereich der aktiven Domäne lokalisiert (49-58). In der Literatur lassen sich weitere Mutationsbeschreibungen im *GDF5*-Gen finden, welche mit dem Phänotyp BDA1 und BDA2 assoziiert sind (siehe oben).

## Brachydaktylie Typ D

Charakteristisch für die Brachydaktylie Typ D (BDD) ist eine isolierte Verkürzung des distalen Phalangenknochens des Daumens, welche entweder unilateral oder bilateral vorliegen kann (30). Johnson et al. (2003) konnten Mutationen im *HOXD13*-Gen bei BDD-Patienten nachweisen, deren Phänotyp Überschneidungen mit dem Erscheinungsbild der BDE zeigte (59). Des Weiteren deuten die Ergebnisse von Williams et al. (2013) darauf hin, dass BDD und BDE einen gemeinsamen genetischen Pathomechanismus aufweisen (60).

## Brachydaktylie Typ E

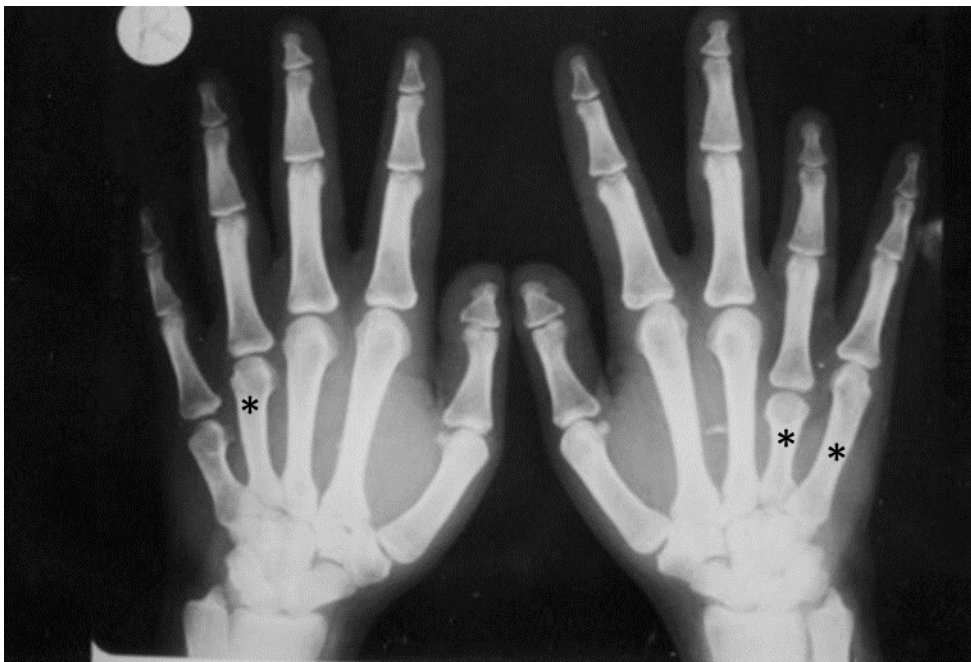
Kennzeichnend für die Brachydaktylie Typ E (BDE) ist das Vorliegen von verkürzten Mittelhandknochen bei normaler Länge der Phalangen (**Abbildung 1-5**) (30). Der Typ E der Brachydaktylien kann isoliert vorkommen, tritt jedoch mehrheitlich in Verbindungen mit Syndromen auf, wie beispielsweise dem Turner-Syndrom, der Albright-Osteodystrophie (AHO, engl.: *Albright hereditary osteodystrophy*) [MIM103580] oder dem „*Hypertension-Brachydactyly Syndrome*“ [MIM112410] (45). Hertzog (1968) klassifizierte BDE in drei verschiedene Unterformen (E1-E3): Typ E1 mit isolierter Verkürzung des IV. Metakarpalknochens, welcher gelegentlich auch mit einer Verkürzung des IV. Metatarsalknochens assoziiert ist; Typ E2, bei dem verschiedene Metakarpalia verkürzt sind und außerdem noch Verkürzungen der I. und III. distalen Phalangen und II. und V. Mittelphalangen vorliegen und Typ E3 mit einem variablen Verteilungsmuster von verkürzten Metakarpalia, allerdings ohne Beteiligung der Phalangen (30, 61). Es ist nicht klar, ob die vorgeschlagenen Subgruppen jeweils verschiedene Mechanismen der Entwicklungsstörung repräsentieren. Zudem liegt keine ausreichende Evidenz für die Einteilung in diese Unterkategorien vor, was sich in den fehlenden separaten Bezeichnungen für diese phänotypischen Subtypen in der Gendatenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) widerspiegelt (60).

Eine Einteilung in BDE1 und BDE2 erfolgt in OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)) anhand der genetischen Ursachen.

Als erste genetische Ursache für die isolierte BDE konnten Mutationen im *HOXD13*-Gen identifiziert werden (BDE1 [MIM113300]). Die von Johnson et. al. (2003) auf *HOXD13*-Mutationen untersuchte Familie zeigte eine große phänotypische Variation der

Handanomalien, welche Überlappungen in der phänotypischen Beschreibung von BDD und BDE aufwiesen (siehe auch Abschnitt BDD) (59).

Des Weiteren identifizierten Klopocki et al. (2010) heterozygote Missense- und Nonsense-Mutationen, sowie Mikrodeletionen von 900 kb im *PTH1H*-Gen (engl.: *parathyroid hormone-like hormone*), welches für PTHrP (engl.: *parathyroid hormone-related protein*) kodiert. Diese Patienten wurden dann der Gruppe BDE2 [MIM168470] zugeordnet. Zusätzlich zeigte sich als Besonderheit in der betroffenen Familie mit Mikrodeletion eine Lernproblematik. PTHrP spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenentwicklung, indem es das Gleichgewicht zwischen der Chondrozytenproliferation und dem Beginn der hypertrophen Differenzierung während der enchondralen Knochenentwicklung reguliert (siehe Kapitel 1.1.) (62).



**Abbildung 1-5**

Röntgenaufnahmen der Hände eines ägyptischen Patienten mit BDE. Das Röntgenbild zeigt eine Verkürzung einzelner Metakarpalia (mit \* gekennzeichnet) (verändert nach Temtamy und Aglan, 2008) (30).

### 1.2.2 Akrodysostose

Akrodysostose bezeichnet eine seltene genetisch bedingte Dysostose, welche im Jahre 1968 zum ersten Mal durch Maroteaux et al. beschrieben wurde (63). Die meisten beschriebenen Akrodysostose-Fälle weisen ein sporadisches Vorkommen auf, doch existieren in der Literatur auch Berichte, welche einen autosomal-dominanten Erbgang wahrscheinlich machen (64-67).

Klinisch charakteristisch sind eine ausgeprägte Brachydaktylie, Kleinwuchs, kraniofaziale Anomalien mit nasaler Hypoplasie und eine Entwicklungsverzögerung. Patienten mit Akrodysostose weisen oft ein akzeleriertes Knochenalter auf (67). Radiologisch können sich bei Säuglingen kalkspritzerähnliche Veränderungen in den Epiphysen zeigen (68). Weitere radiologische Veränderungen stellen Verkürzungen der Metakarpalia und Phalangen, kegelförmige Epiphysen und Spinalkanalstenosen dar (63, 68, 69).

In metabolischen Studien wurden bei einigen Akrodysostose-Patienten Auffälligkeiten im Mineralstoffwechsel beobachtet, welche mit einer Parathormon (PTH)-Resistenz assoziiert waren (70). Diese Veränderungen wurden in weiteren Studien betrachtet, sodass inzwischen eine differenziertere Einteilung des Krankheitsbildes in eine Akrodysostose mit oder ohne Hormon Resistenz vorgenommen wird.

Die Akrodysostose unterliegt einer Heterogenie. So konnten bisher in zwei verschiedenen Genen Mutationen identifiziert werden, welche mit Akrodysostose assoziiert sind: zum einen *PRKAR1A*, welches für die regulatorische Untereinheit Typ I Alpha der cAMP-abhängigen Protein Kinase kodiert (71), und zum anderen *PDE4D*, welche die cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4D kodiert (72, 73). Basierend auf diesen Kenntnissen unterscheidet man Akrodysostose 1 (ACRDYS1 [MIM 101800]) und 2 (ACRDYS2 [MIM 600129]). Frühere Genotyp-Phänotyp-Korrelations-Studien ließen vermuten, dass Patienten mit *PRKAR1A*-Mutationen eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen für Kleinwuchs und Hormonresistenz besitzen, während Patienten mit *PDE4D*-Mutationen charakteristische faziale Merkmale und Entwicklungsverzögerung aufweisen, wohingegen Kleinwuchs und Hormonresistenz seltener gefunden werden. Im Gegensatz dazu postuliert die Arbeitsgruppe um Lindstrand et al. (2014), dass, entgegen früherer Berichte, bei Patienten mit *PDE4D*-Gen Mutationen signifikante Hormonresistenzen vorliegen können (74).

### 1.2.3 Radiologischer Vergleich von Akrodysostose und BDE

Die wesentliche radiologische Gemeinsamkeit von Akrodysostose und BDE ist eine Verkürzung der Metakarpalia und Metatarsalia. Bei der Akrodysostose liegt im Gegensatz zu der BDE jedoch zusätzlich eine Verkürzung der Phalangen vor und es zeigen sich Zapfenepiphysen.

## 1.3 Die cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4D (PDE4D)

Das durch *PDE4D* kodierte Enzym cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4D moduliert die intrazelluläre cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)-Konzentration und ist somit in seiner Funktion ein wichtiger Signalgeber in verschiedenen zellulären Signalwegen (74).

### 1.3.1 Aufbau

Im menschlichen Genom konnten 21 Gene identifiziert werden, welche für Phosphodiesterasen (PDEs) kodieren. Basierend auf ihrer Sequenzverwandtschaft, Kinetik, Regulierungsformen und pharmakologischen Eigenschaften kann die Klasse I der PDEs weiter in PDE1 bis PDE11 unterteilt werden. Bei Säugetieren hydrolysieren drei der 11 PDEs selektiv cAMP: PDE4, PDE7 und PDE8 (75). PDE4 wird wiederum durch vier Gene (*4A*, *4B*, *4C* und *4D*) kodiert, welche auf drei verschiedenen Chromosomen des Menschen verteilt liegen (76). Das in dieser Arbeit untersuchte *PDE4D* ist auf dem langen Arm von Chromosom 5 (5q12.1) lokalisiert (74, 77). *PDE4D* kodiert mindestens neun funktionelle Transkriptionsvarianten durch alternatives Splicing und multiple Promotoren. Das längste Transkript besteht aus 15 Exons, welche in drei Transkriptionseinheiten unterteilt werden können (74).

Die PDE4-Isoformen sind in drei Unterkategorien eingeteilt: die lange, die kurze und die sehr kurze Form (78). Die langen PDE4-Isoformen enthalten hoch konservierte Domänen, die sogenannten UCR1 und UCR2 (engl.: *upstream conserved regions*), welche sich zwischen der N-terminalen Region und der katalytischen Domäne befinden. Im Gegensatz zu den langen Isoformen fehlen den kurzen Isoformen die UCR1, während

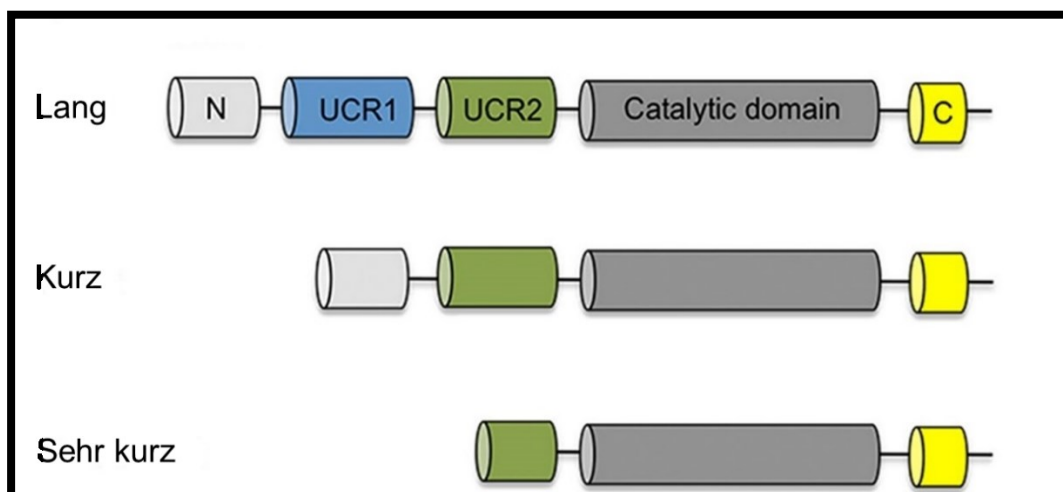


den sehr kurzen Isoformen zum einen die UCR1 fehlen und sie zum anderen nur eine verkürzte UCR2 besitzen (**Abbildung 1-6**).

Das Vorhandensein oder das Fehlen der UCR-Domänen bestimmt wichtige funktionelle Unterschiede zwischen langen und kurzen Isoformen. So besitzt die UCR1 eine Akzeptorstelle für eine Protein Kinase A (PKA)-vermittelte Phosphorylierung, welche einen schnellen Wechsel der PDE4-Aktivität ermöglicht. Diese durch PKA-vermittelte Phosphorylierung führt zur Aktivierung der langen PDE4-Form und hat eine Desensibilisierung der cAMP-Signalwirkung zur Folge (79, 80).

UCR1 verfügt außerdem über eine Bindungsstelle für Phosphatidsäure (phosphatidic acid), die als allosterischer Aktivator für die lange PDE4-Formen wirkt. Darüber hinaus reagieren lange und kurze Isoformen unterschiedlich auf posttranslationale Modifizierungen. PDE4D-Varianten besitzen eine Konsensusstelle für die Phosphorylierung durch die Kinase ERK2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase 2*) am C-Terminus. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle induziert die Hemmung der langen Isoformen, wohingegen die kurzen Isoformen aktiviert werden und die sehr kurzen Isoformen keine Änderung der Aktivität zeigen (78, 79).

Eine längerfristige Regulierung von PDE4 wird durch eine anhaltende Akkumulation von cAMP induziert (80). Es konnte gezeigt werden, dass anhaltende Veränderungen der cAMP-Spiegel die Expressionsrate von einzelnen PDE4 Isoformen modifizieren können (81).



**Abbildung 1-6**

Schematische Darstellung der Hauptfunktionseinheiten des PDE4D-Proteins: UCR1: *upstream conserved region 1*, UCR2: *upstream conserved region 2* und katalytische Domäne (verändert nach Lindstrand et al., 2014) (74).

### 1.3.2 Funktionsmechanismus

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein wichtiger intrazellulärer Mediator, welcher als „*Second Messenger*“ dient, indem er das Signal diverser Moleküle übermittelt (82). Die intrazelluläre Konzentration von cAMP wird durch die Synthese- und Abbaurate des Moleküls bestimmt (83).

Die cAMP Signalkaskade kann durch verschiedene Signalmoleküle, wie Hormone (z. B. PTH) oder Neurotransmitter aktiviert werden. Nach der Bindung des entsprechenden Liganden erfolgt die Signaltransduktion über die Zellmembran mit Hilfe der Vermittlung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Die Adenylatzyklase wird durch die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins ( $G_s\text{-}\alpha$ ) reguliert und katalysiert den „*Second Messenger*“ cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP). Anschließend bindet cAMP an die regulatorische Untereinheit Typ I Alpha der cAMP-abhängigen Protein-Kinase A (PRKAR1A) (73). Vor der Bindung von cAMP liegt die PKA als inaktives Holoenzym vor, bestehend aus einem Dimer aus zwei regulatorischen Untereinheiten und zwei katalysierenden Untereinheiten (84).

Die Bindung bewirkt eine Konformationsänderung, in deren Folge es zur Dissoziation und Aktivierung der katalytischen Untereinheiten kommt, welche den Transkriptionsfaktor CREB (engl.: *cAMP response element binding*) phosphoryliert. Dieser Prozess führt zur Expression von Zielgenen (73). Die dynamische Regulierung der cAMP Spiegel erfolgt jedoch nicht nur über die Aktivierung der Adenylatzyklase, sondern auch durch die Hemmung der cAMP-Phosphodiesterasen (PDEs), welches der einzige Weg ist den „*Second Messenger*“ intrazellulär zu inaktivieren (81).

Eine schematische Darstellung der cAMP Signalkaskade zeigt **Abbildung 1-7**.

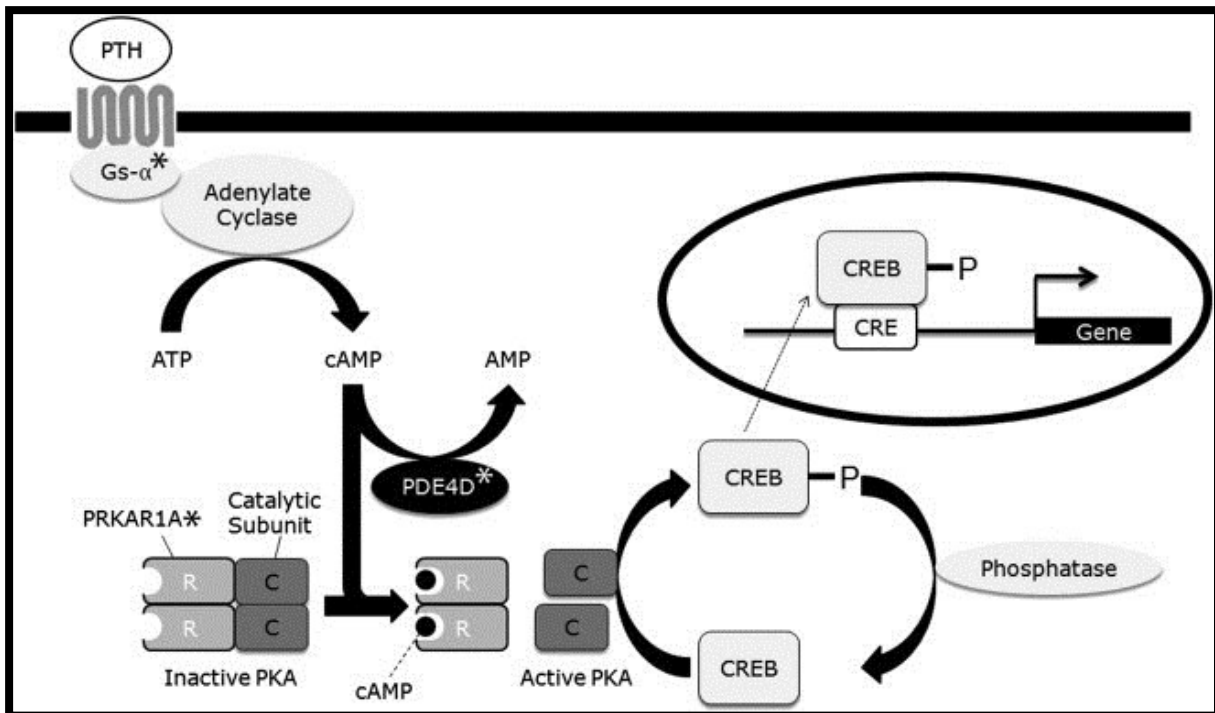


Abbildung 1-7

Die cAMP Signalkaskade (aus Lee et al., 2012) (73).

### 1.3.3 Der Einfluss der cAMP Signalkaskade auf die Knochenentwicklung

Die Identifikation von Mutationen in *PRKAR1A* und *PDE4D* bei Patienten mit Akrodysostose und im *GNAS*-Gen bei dem klinisch verwandten McCune-Albright Syndrom [MIM 174800] weisen auf die entscheidende Rolle der cAMP-Signalkaskade und der daran beteiligten Komponenten an der Knochenentwicklung hin. Wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 1.3.2) führt eine Aktivierung dieses Signalwegs zu einer Erhöhung der cAMP-Spiegel, die wiederum direkt oder über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB verschiedene Zielgene steuern, die den Zellzyklus und Wachstumsvorgänge regulieren. Mutationen in *GNAS* und *PRKAR1A* gehen mit einer Erniedrigung der cAMP-Spiegel einher und führen somit zu einer Beeinträchtigung der anschließenden Entwicklungskontrollsignalwege. Obwohl eine verminderte Aktivität von PDE4D in Folge einer Mutation eine Erhöhung der cAMP-Werte vermuten lässt, wurde in der Studie von Kaname et al. (2014) eine gegensätzliche Reaktion beobachtet (81). Es konnte gezeigt werden, dass diese Diskrepanz durch eine Hochregulierung weiterer PDE4-Isoformen anderer Unterfamilien des Gens im Rahmen eines PDE4D-

Funktionsausfalls verursacht wird, sodass Mutationen im *PDE4D* letztlich wie Veränderungen in *GNAS* und *PRKAR1A* in einer Erniedrigung der cAMP Spiegel münden (81).

Die Rolle der einzelnen aufgeführten Gene in der Knochenentwicklung ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch konnten die Folgen eines cAMP-Aktivitätsverlustes durch einen spezifischen Knockout des *GNAS*-Gens in Chondrozyten untersucht werden. In dieser Analyse zeigte sich eine schwere Beeinträchtigung der Wachstumsfuge, eine beschleunigte hypertrophe Chondrozyten-Differenzierung und erhöhte Expression des PTHrP in periartikulären Chondrozyten (85). Hierin spiegelt sich somit eine fehlende Wirkung des PTHrP wider. Im physiologischem Zustand unterbindet PTHrP die unreife Differenzierung von proliferierenden Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten über eine Aktivierung des cAMP Signalweges (siehe Kapitel 1.1) (86).

#### **1.3.4 Mutationen im *PDE4D*-Gen bei Akrodysostose Patienten**

Neben Veränderungen im *PRKAR1A*-Gen wurden auch Mutationen im *PDE4D*-Gen als ursächlich für die Entstehung von Akrodysostose identifiziert (72, 73). Daraufhin wurden diese Mutationen in einer Reihe von Studien weiter charakterisiert (**Tabelle 1-1**) und auch funktionell untersucht.

Hierbei konnte die Gruppe um Kaname et al. (2014) mit Hilfe von *PDE4D* Knock-out (KO) Ratten sowohl bei männlichen, als auch bei weiblichen Tieren im Alter von 3 und 5 Wochen signifikante Wachstumsstörungen feststellen. Dies spiegelte sich auch sehr eindrücklich in Röntgenbildern der 10 Wochen alten KO Ratten wider, die eine deutlichere Verkürzung der distalen Abschnitte der vorderen Extremität im Vergleich zum Wildtyp zeigten (81). Die Frage, ob ein *PDE4D* spezifischer Phänotyp mit einer geringeren Neigung zu hormoneller Resistenz gegenüber *PRKAR1A* Mutationsträgern bei Patienten mit Akrodysostose besteht, scheint noch nicht abschließend geklärt zu sein (74, 87).

Des Weiteren konnte anhand von Mausmodellen der Einfluss von *PDE4D* auf Wachstumsprozesse, Fertilität und Entwicklung des zentralen Nervensystems beobachtet werden (88, 89).

**Tabelle 1-1**

Zusammenfassung bisher identifizierter Punktmutationen im *PDE4D*-Gen bei Akrodysostose Patienten  
n. a. – nicht angegeben.

	<b>PDE4D Mutation</b>	<b>cDNA Position</b>	<b>Vererbung</b>	<b>Arbeit von</b>
1	p.Pro164Leu	c.491C>T	de novo	Lynch et al Human Mut 2013
2	p.Ser190Ala	c.568T>G	de novo	Michot et al AJHG 2012
3	p.Pro225Thr	c.673C>A	de novo	Michot et al AJHG 2012
4	p.Phe226Val	c.676T>G	de novo	Lindstrand et al J Med Genet 2014
5	p.Phe226Cys	c.677T>G	de novo	Lindstrand et al J Med Genet 2014
6	p.Phe226Ser	c.677T>C	de novo	Michot et al AJHG 2012
7	p.Ala227Ser	c.679G>T	de novo	Linglart et al JCEM 2012
8	p.Gln228Glu	c.682C>G	de novo	Lee et al AJHG 2012
9	p.Gln228Pro	c.683A>C	n.a.	Kaname et al Cell Signal 2014
10	p.Leu230Ser	c.689T>C	n.a.	Kaname et al Cell Signal 2014
11	p.Ser240Thr	c.719G>C	de novo	Lynch et al Human Mut 2013
12	p.Ala243Val	c.728C>T	paternal	Lynch et al Human Mut 2013
13	p.Val268Ala	c.803T>C	de novo	Lynch et al Human Mut 2013
14	p.Met303Val	c.907A>G	de novo	Lindstrand et al J Med Genet 2014
15	p.Val329Ala	c.986T>C	nicht maternal	Lindstrand et al J Med Genet 2014
16	p.Thr587Pro	c.1759A>C	de novo	Michot et al AJHG 2012
17	p.Thr587Ala	c.1759A>G	n.a.	Kaname et al Cell Signal 2014
18	p.Glu590Ala	c.1769A>C	de novo	Linglart et al JCEM 2012
	p.Glu590Ala	c.1769A>C	de novo	Lee et al AJHG 2012
19	p.Ile617Thr	c.1850T>C	de novo	Lynch et al Human Mut 2013
20	p.Gly673Asp	c.2018G>A	nicht maternal	Lee et al AJHG 2012
	p.Gly673Asp	c.2018G>A	n.a.	Kaname et al Cell Signal 2014
21	p.Ile678Thr	c.2033T>C	de novo	Lindstrand et al J Med Genet 2014
	p.Ile678Thr	c.2033T>C	n.a.	Kaname et al Cell Signal 2014

## 2 Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von vier Patienten mit Akrodysostose und 26 Patienten mit Brachydaktylie Typ E auf Mutationen in der kodierenden Sequenz im *PDE4D*-Gen.

Ziel dieser Arbeit ist es einerseits, die Ergebnisse der Arbeiten von Lee H. et al. (73) und Michot C. et al. (72) bei Patienten mit Akrodysostose zu bestätigen und womöglich weitere, noch nicht beschriebene *PDE4D*-Mutationen bei den Betroffenen nachzuweisen.

Des Weiteren sollte ein größeres Patientenkollektiv mit Brachydaktylie Typ E, ein der Akrodysostose phänotypisch verwandtes Krankheitsbild, ebenfalls hinsichtlich Veränderungen im *PDE4D*-Gen untersucht werden. Trotz bekannter Mutationen bei BDE-Patienten in *HOXD13* und *PTHLH*, welches über sein kodiertes Protein (PTHrP) ebenfalls am cAMP Signalweg beteiligt ist, bleibt die molekulare Ursache der Erkrankung häufig unklar.

Im Anschluss sollten die molekulargenetischen Ergebnisse unter Einbeziehen der klinischen, radiologischen und laborchemischen Parameter bei den betroffenen Patienten analysiert werden. Insbesondere die These eines *PDE4D*-spezifischen phänotypischen Bildes sollte im vorliegenden Patientenkollektiv untersucht werden.

Darüber hinaus sollte eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation von Mutationsträgern in *PDE4D* und *PRKAR1A* anhand der aktuellen Literatur und der vorliegenden Studie untersucht und diskutiert werden.

Zuletzt dient diese Arbeit dazu den Stellenwert einer Sequenzanalyse des *PDE4D*-Gens bei Patienten mit Akrodysostose und Brachydaktylie Typ E zu beurteilen.

### **3 Materialien und Methoden**

#### **3.1 Patienten**

In dieser Arbeit wurden DNA-Proben von vier Patienten mit Akrodysostose und 26 Patienten mit Brachydaktylie Typ E analysiert, welche im Vorfeld negativ auf Mutationen im *PRKAR1A*-Gen untersucht worden sind. Das aus EDTA-Blut gewonnene DNA-Material stammt zum einen von Patienten der Charité Universitätsmedizin Berlin, weitestgehend jedoch von Patienten, welche in anderen deutschen oder ausländischen Kliniken vorstellig waren. Blutproben dieser auswärtigen Patienten waren zur Ursachenforschung der bei ihnen bestehenden Extremitätenanomalien im Institut für Humangenetik analysiert worden. Für einige Patienten konnten weiterführende Labor-Untersuchungen nicht durchgeführt werden und umfassende medizinische Daten nicht zusammengetragen werden.

#### **3.2 Kontrollgruppe**

Als Kontrollgruppe dienten 148 gesunde Probanden, bei denen keine Akrodysostose beschrieben war.

#### **3.3 Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut**

Die Extraktion genomischer DNA aus EDTA-Blut beruht zunächst auf der Entfernung DNA-freier Erythrozyten aus dem Vollblut, dem anschließenden proteolytischen Abbau von Zellproteinen und der Fällung der DNA aus den Leukozyten (90).

Hierzu wurde 1 ml EDTA-Blut in einem 15 ml Röhrchen mit 6 ml Lösung A versetzt, und anschließend gemischt. Daraufhin konnten die lysierten Erythrozyten durch eine fünf Minuten lange Zentrifugation bei 1300 rpm zusammen mit dem Überstand entfernt werden und die Leukozyten pelletiert werden. Die anschließende Kernlyse der Leukozyten erfolgte durch Resuspension des Pellets in 600 µl der Lösung B.

Zur Deproteinisierung wurde die Probe mit 125 µl der Lösung C versetzt. Nach Zugabe von 700 µl Chloroform wurde die Lösung sechs Minuten lang bei 1300 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die oberste entstandene Schicht (wässrige Phase) mit der gelösten DNA entnommen und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Die DNA wurde dann durch

Zugabe von 510 µl Isopropanol und Invertieren gefällt. Eine anschließende fünfminütige Zentrifugation bei 13000 rpm entfernte wiederum das Isopropanol. Das entstandene Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, daraufhin an der Luft getrocknet und über Nacht in TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in **Tabelle 3-1** angegeben.

Zur Kontrolle einer möglichen DNA-Degradierung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4) und eine photometrische Konzentrationsbestimmung (NanoPhotometer™) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt.

**Tabelle 3-1**

Lösungen für DNA-Extraktion

<b>Lösung A</b>			<b>Lösung B</b>		
Saccharose	109.5	g	0,5 M Na-EDTA	12	ml
1 M MgCl	2-5	ml	1 M NaCl	15	ml
1 M Tris HCl (pH 8,0)	10	ml	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	40	ml
Triton X 100	10	ml	destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 95	ml
destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 1000	ml	→ autoklavieren		
→ autoklavieren			20 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)	5	ml
<b>Lösung C</b>			<b>1x TE Puffer (pH 8,0)</b>		
Natriumperchlorat	100	g	1 M Tris HCl (pH 7,5)	5	ml
destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 142	ml	0,5 M EDTA	1	ml
			destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 500	ml
			→ autoklavieren		



### 3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) wurde von Mullis et al. 1987 (91) entwickelt. Sie ermöglicht die gezielte *in-vitro* Vervielfältigung von bestimmten Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl.: *deoxyribonucleic acid*)-Abschnitten. Durch zwei künstlich hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer, wird die zu replizierende DNA-Sequenz eingerahmt. Am Beginn eines PCR-Zyklus steht die thermische Aufspaltung (Denaturierung) der doppelsträngigen DNA zu jeweils zwei einzelsträngigen DNA-Strängen. Die Primer lagern sich im nächsten Schritt komplementär an den Beginn der DNA-Zielsequenz an (Annealing) und es kommt im dritten Schritt in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase zur Verlängerung (Elongation) der Primer entlang der einzelsträngigen DNA-Matrize. Durch die zyklische Wiederholung der drei Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz. Eine abschließende Extension vervollständigt die einzelsträngige DNA und beendet die Reaktion. Die verwendeten Reagenzien, Reaktionsansätze und das PCR-Protokoll sind in den folgenden Tabellen angegeben (**Tabelle 3-2, 3-3 und 3-4**).

**Tabelle 3-2**

Reagenzien für die PCR

Reagenz	Hersteller
10x PCR Buffer	Applied Biosystems, Warrington, GB
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTP Set (100mM)	GE Healthcare, Freiburg
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Q-Solution	Qiagen, Hilden
„Destilled water“ (DNAse/RNAse free)	Invitrogen, Karlsruhe

**Tabelle 3-3**

## PCR- Ansätze

PCR Ansatz 1			PCR Ansatz 2		
10x PCR- Puffer	2	µl	10x PCR- Puffer	2	µl
Primer F	0,5	µl	Primer F	0,5	µl
Primer R	0,5	µl	Primer R	0,5	µl
dNTPs (20 mM)	0,2	µl	dNTPs (20 mM)	0,2	µl
dH <sub>2</sub> O	15,6	µl	dH <sub>2</sub> O	11,6	µl
Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,2	µl	Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,2	µl
			Q- Sol	4	µl
DNA (30- 60ng)	1	µl	DNA (30- 60ng)	1	µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>	<b>µl</b>	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>	<b>µl</b>

PCR Ansatz 3		
10x PCR- Puffer	2	µl
Primer F	0,5	µl
Primer R	0,5	µl
dNTPs (20 mM)	0,2	µl
dH <sub>2</sub> O	13,6	µl
Taq- Polymerase (5 U/µl)	0,2	µl
DMSO	2	µl
DNA (30- 60ng)	1	µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>	<b>µl</b>

**Tabelle 3-4**

PCR Cycling Protokoll

<b>94</b>	<b>°C</b>	<b>4</b>	<b>min</b>	
94	°C	30	sec	
61	°C	45	sec	3 Zyklen
72	°C	1	min	
94	°C	30	sec	
59	°C	45	sec	3 Zyklen
72	°C	1	min	
94	°C	30	sec	
57	°C	45	sec	3 Zyklen
72	°C	1	min	
94	°C	30	sec	
55	°C	45	sec	32 Zyklen
72	°C	1	min	
72	°C	10	min	
16	°C	∞		

### 3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Sowohl die aus EDTA-Blut extrahierte DNA, als auch die PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und können auf diese Weise nachgewiesen werden. Zur Herstellung der Gele wird Agarose in 1x TAE (Tris Acetic Acid-EDTA)-Puffer gelöst, erwärmt und anschließend mit Ethidiumbromid (10mg/ml) versetzt (verwendete Reagenzien und Zusammensetzung siehe **Tabelle 3-5** und **3-6**). Die durch einen Kunststoffkamm geformten Geltaschen werden mit DNA befüllt und je Kamm eine Tasche mit 3 µl 1-kb-DNA-Größenstandard pipettiert. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung kommt es aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste zu einer Wanderung der DNA-Fragmente in Richtung der Anode und einer Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Der DNA bindende Farbstoff Ethidiumbromid ermöglicht es die entstandenen DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar zu machen, die daraufhin fotografisch dokumentiert werden. Mit Hilfe eines Größenstandards (Marker) lassen sich die einzelnen DNA-Banden einer bestimmten Größe zuordnen.

**Tabelle 3-5**

Reagenzien für Agarosegele

Reagenz	Hersteller
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Roth, Karlsruhe
1 kb plus Marker	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Marker	Invitrogen, Karlsruhe
„Distilled water“ (DNase/RNase free)	Invitrogen, Karlsruhe

**Tabelle 3-6**

Lösungen für Agarosegele

50x TAE-Puffer			DNA-Gelladepuffer		
Tris HCl	242	g	Bromphenolblau	25	mg
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	57,1	ml	Xylencyanol	25	mg
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100	ml	destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 95	ml
destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 1000	ml			

DNA-Marker		
100 bp Marker/ 1 kb plus Marker	10	µl
5x Galladepuffer	20	µl
destilliertes H <sub>2</sub> O	ad 142	ml

### Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese mit aus EDTA Blut extrahierter DNA:

Die DNA-Produkte wurden auf ein 0,8%iges Agarosegel geladen und nach Anlegen einer Spannung von 80 V für 20 min gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese mit PCR-Produkten:

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel geladen und nach Anlegen einer Spannung von 100 V für 25 min (kleine Gelplatte) oder 60 min (große Gelplatte) gelelektrophoretisch aufgetrennt.

## **3.6 Enzymatische Reinigung (ER)**

Vor der Sequenzierung wird das PCR-Produkt enzymatisch gereinigt. Die Exonuklease 1 (Exo1) dient dazu überschüssige Primer und einzelsträngige DNA-Fragmente zu entfernen, während die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) überzählige dNTPs abbaut. Die verwendeten Reagenzien, der Reaktionsansatz und das Protokoll sind in den folgenden Tabellen angegeben (**Tabelle 3-7** und **3-8**).

**Tabelle 3-7**

Reagenzien für ER

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
Exonuklease I (20000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
„Shrimp alkaline phosphatase“ (SAP, 1 U/μl)	Roche, Mannheim
„Distilled water“ (DNAse/RNAse free)	Invitrogen, Karlsruhe

**Tabelle 3-8**

ER Ansatz und Cycling Protokoll

ER Ansatz					
H <sub>2</sub> O	1,62 μL				
SAP	0,3 μL				
Exo1	0,08 μL	37	°C	15	min
PCR- Produkt	8 μL	72	°C	15	min
		4	°C	7	min
Gesamtvolumen	10 μL	4	°C	∞	

### 3.7 Sequenzierungs-PCR (SPCR)

Die Sequenzierungsmethode, welche auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidmethode bezeichnet wird, geht auf F. Sanger (92, 93) zurück. Sie ermöglicht es Nukleotid-Abfolgen eines DNA-Produktes zu bestimmen.

Basierend auf der Bandenintensität des PCR-Produktes aus der vorangegangenen Agarose-Gelelektrophorese wurden verschiedene SPCR-Ansätze gewählt. Diese unterschieden sich in der Menge des eingesetzten PCR-Produktes. Bei starker Bandenintensität wurde die Sequenzierungsreaktion mit SPCR-Ansatz 1 durchgeführt, welche 1,0 μl PCR-Produkt enthielt, bei schwächerer Bandenintensität wurde Ansatz 2 gewählt, welchem 2,5 μl PCR-Produkt hinzugefügt wurde (siehe **Tabelle 3-10**).

Die SPCRs wurden für jedes PCR-Produkt jeweils in 2 Ansätzen mit 0,5 μl des entsprechenden forward- und reverse-Primers durchgeführt. Die verwendeten Reagenzien, der Reaktionsansatz und das Protokoll sind in den folgenden Tabellen angegeben (**Tabelle 3-9, 3-10 und 3-11**).

**Tabelle 3-9**

Reagenzien für SPCR

Reagenz	Hersteller
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Warrington, GB
Sequenzierpuffer (5-fach)	Applied Biosystems, Warrington, GB
„Distilled water“ (DNase/RNase free)	Invitrogen, Karlsruhe

**Tabelle 3-10**

SPCR-Ansätze

SPCR Ansatz 1		SPCR Ansatz 2	
dH <sub>2</sub> O	2,25 µl	dH <sub>2</sub> O	0,75 µl
5x Puffer	0,75 µl	5x Puffer	0,75 µl
v3.1	0,5 µl	V3.1	0,5 µl
Primer	0,5 µl	Primer	0,5 µl
PCR Produkt	1 µl	PCR Produkt	2,5 µl
Gesamtvolumen	5 µl	Gesamtvolumen	5 µl

**Tabelle 3-11**

SPCR Cycling Programm

96 °C	1 min	
96 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	25 Zyklen
60 °C	4 min	
8 °C	∞	

### 3.8 Aufreinigung des SPCR-Produktes

Als nächstes wurden die SPCR-Produkte aufgereinigt. Dieser Arbeitsvorgang wurde in der Biomek<sup>®</sup> Laboratory Automation Workstation mit 7 µL Agencourt<sup>®</sup> CleanSEQ<sup>®</sup> und 85%igem Ethanol durchgeführt und anschließend mit 25 µL H<sub>2</sub>O eluiert (Reagenzien siehe **Tabelle 3-12**).

Die Sequenzanalyse wurden mit Hilfe des 3730 DNA-Analyzers (Applied Biosystems) durchgeführt, die anschließende Auswertung erfolgte mit der SeqMan TM II Software.

**Tabelle 3-12**

Reagenzien für die Aufreinigung des SPCR-Produktes

Reagenz	Hersteller
Agencourt <sup>®</sup> Clean Seq <sup>®</sup> Kit BigDye Terminator v1.1/v3.1	Beckman Coulter, Krefeld
Ethanol 85%	J. T. Baker, Griesheim
„Water“	J. T. Baker, Griesheim

### 3.9 Primerdesign

Als Primer bezeichnet man einzelsträngige Nukleotidsequenzen, welche bei der PCR (siehe Kapitel 3.3.) und der Sequenz-PCR (siehe Kapitel 3.6.) zur Amplifikation von DNA genutzt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer3 (v. 0.4.0)“ entworfen. Hierzu wurde im Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) ein Transkript des *PDE4D*-Gens mit der Ensembl ID ENST00000340635 für das anschließende PCR-Produkt ausgesucht. Nach Einlesen der mit Ensembl ermittelten DNA-Sequenz des *PDE4D*-Gens wurden durch die Software „Primer3 (v. 0.4.0)“ Primersequenzen nach definierten Kriterien erstellt. Die Einstellungen wurden so ausgewählt, dass die Primer möglichst eine Länge von 18-24 Nukleotiden umfassen, eine Primer-Bindetemperatur (Annealing-Temperatur) von 52°C bis 62°C



vorliegt, das Aufeinanderfolgen von gleichartigen Basen auf max. 4 beschränkt ist und der Basengehalt von Guanin und Cytosin möglichst bei 50% liegt. Anschließend wurde die Spezifität der Primersequenzen am gewünschten Locus mithilfe der NCBI Blast Datenbank (Nucleotide-Nucleotide Blast (blastn), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) überprüft. Die entworfenen Primer wurden bei der Firma MWG Biotech GmbH (München) bestellt. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Primer und der PCR-Produktgrößen ist in **Tabelle 3-13** zusammengestellt.

**Tabelle 3-13**

Primer-Sequenzen zur Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden Exons des Gens *PDE4D*

F - forward, R - reverse

<b>PDE4D Exon</b>	<b>Primer Name</b>	<b>Primer Sequenz</b>	<b>PCR Produktgröße [bp]</b>
Exon 2	PDE4D x 2F	TCCTCAGCTGACGCTAAATG	675
	PDE4D x 2R	CAGGACTTTTCAATGGAGTTG	
Exon 3	PDE4D x 3F	CTCATGAAAGTGGAAGTTGCC	204
	PDE4D x 3R	aataaCCCGAACTAATTCCCC	
Exon 4	PDE4D x 4F	TTGCAAGCAATATCAAGTTTTTC	252
	PDE4D x 4R	ATATTGCCTTGGGCTCAATC	
Exon 5	PDE4D x 5F	GATCAAATCAATAAGCCCCAC	171
	PDE4D x 5R	ATTGACTCTTGGCAGAAATGG	
Exon 6	PDE4D x 6F	CTAGCGGACCCGTGAAGC	243
	PDE4D x 6R	ATGGGTACCAGTGGCTCG	
Exon 7	PDE4D x 7F	TTCTTTGGGCATATCTTCCTG	283
	PDE4D x 7R	GTTTCCAAAATGAGTTGGCAC	
Exon 8	PDE4D x 8F	TGTCATGCTAAGTCTTGCAGC	666
	PDE4D x 8R	CCCAAACCCCTAAAACATACC	
Exon 9	PDE4D x 9F	ccggccACCTAAGGTCTG	312
	PDE4D x 9R	AAAATAAGCAAAGGTGGGG	
Exon 10	PDE4D x 10F	GCCATTTCCAGGTTATCCAC	371
	PDE4D x 10R	CTTCTCCATTGAAAACCCTTC	
Exon 11	PDE4D x 11F	CTCCCTTGACACATTGTAACAC	337
	PDE4D x 11R	GAACATTATGGCTCTGGAAGAC	
Exon 12	PDE4D x 12F	GCAGCAGAGAAGTTTtagggg	407
	PDE4D x 12R	TCACGGGCAGCTTCTATAAC	
Exon 13	PDE4D x 13F	CAAAGGGGAAAAGACTCTGC	482
	PDE4D x 13R	AGATGCAAACAGAAAGACCAG	
Exon 14	PDE4D x 14F	TGTTGCAGTCATCCAATGTG	340
	PDE4D x 14R	GTAACCAAATGCTAAAGCGG	
Exon 15	PDE4D x 15F1	TGTTcagtgTTTTATTTGTGGG	354
	PDE4D x 15R1	CCACTTGACTGCCACTGTCC	
Exon 15	PDE4D x 15F2	AGCACAATCCCTCAGAGCC	399
	PDE4D x 15R2	GACAGTGAGGTGTGACCGTG	

### 3.10 Geräte

**Tabelle 3-14**

Auflistung der verwendeten Geräte

Gerätename	Hersteller
Biomek Laboratory Automatisation Workstation	Beckmann Coulter, Krefeld
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Multipette® Stream	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Nanophotometer™	Implen GmbH, München
Owl B1 EasyCast Mini Gel System	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipetman (2µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1ml)	Gilson, Middleton, USA
PTC 100	MJ Research, Quebec, CA
Safe Seal tube 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Thermo fast 96 Detection Plate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Transferpette®	Brand, Wertheim
Transferpipette 3,5 µl	Sarstedt, Nümbrecht
96 Multiply® PCR Plate natural	Sarstedt, Nümbrecht
3730 DNA Analyzer	Beckmann Coulter, Krefeld

### 3.11 Datenbanken und Computer-Software

**Tabelle 3-15**

Auflistung der verwendeten Datenbanken

Datenbank	URL
ECR Browser, Evolutionary Conservation of Genomes	<a href="http://ecrbrowser.dcode.org/">http://ecrbrowser.dcode.org/</a>
Ensembl Genome Browser	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man <sup>®</sup>	<a href="http://www.omim.org/">http://www.omim.org/</a>
UCSC Genome Browser	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

**Tabelle 3-16**

Auflistung der verwendeten Softwares

Software	URL
Mutation Taster	<a href="http://www.mutationtaster.org/">http://www.mutationtaster.org/</a>
PolyPhen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
Primer3 Input (v. 0.4.0)	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a>
SeqMan TM II	DNASTAR, Madison, USA

### 3.12 Next-Generation-Sequencing (NGS)

Zwischenzeitlich wurde im Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik die Methode der Next-Generation-Sequencing (NGS) Methode eingeführt. In dieser Arbeit wurde diese Methode nicht angewendet. Allerdings werden in dieser Arbeit Daten mit einbezogen, die mit dieser Methode gewonnen wurden, um das klinische Spektrum der Akrodysostose besser diskutieren zu können (siehe Kapitel 4.5.).

Die aktuelle Entwicklung der Next-Generation-Sequencing (NGS) Methode, welche in den Grundzügen auf die Sequenzierungs-Methode nach Sanger zurückgeht, erlaubt es ein ganzes Genom in weniger als einem Tag zu sequenzieren. Die NGS-Methode liefert eine höhere Durchlaufleistung durch eine parallele, klonale Amplifikation. Diese hohe Durchsatzleistung erleichtert auch die Entdeckung von krankheitsverursachend Genen und regulatorischen Elementen. Das Analyseverfahren findet auch einen effektiven Einsatz bei der diagnostischen Aufklärung beim Vorliegen bekannter klinischer Krankheitsbilder, welche durch Mutationen verschiedener Gene hervorgerufen werden können.

Die Datenanalysen können allerdings sehr zeitaufwendig sein und erfordern spezielle Kenntnisse im Bereich der Bioinformatik (94).

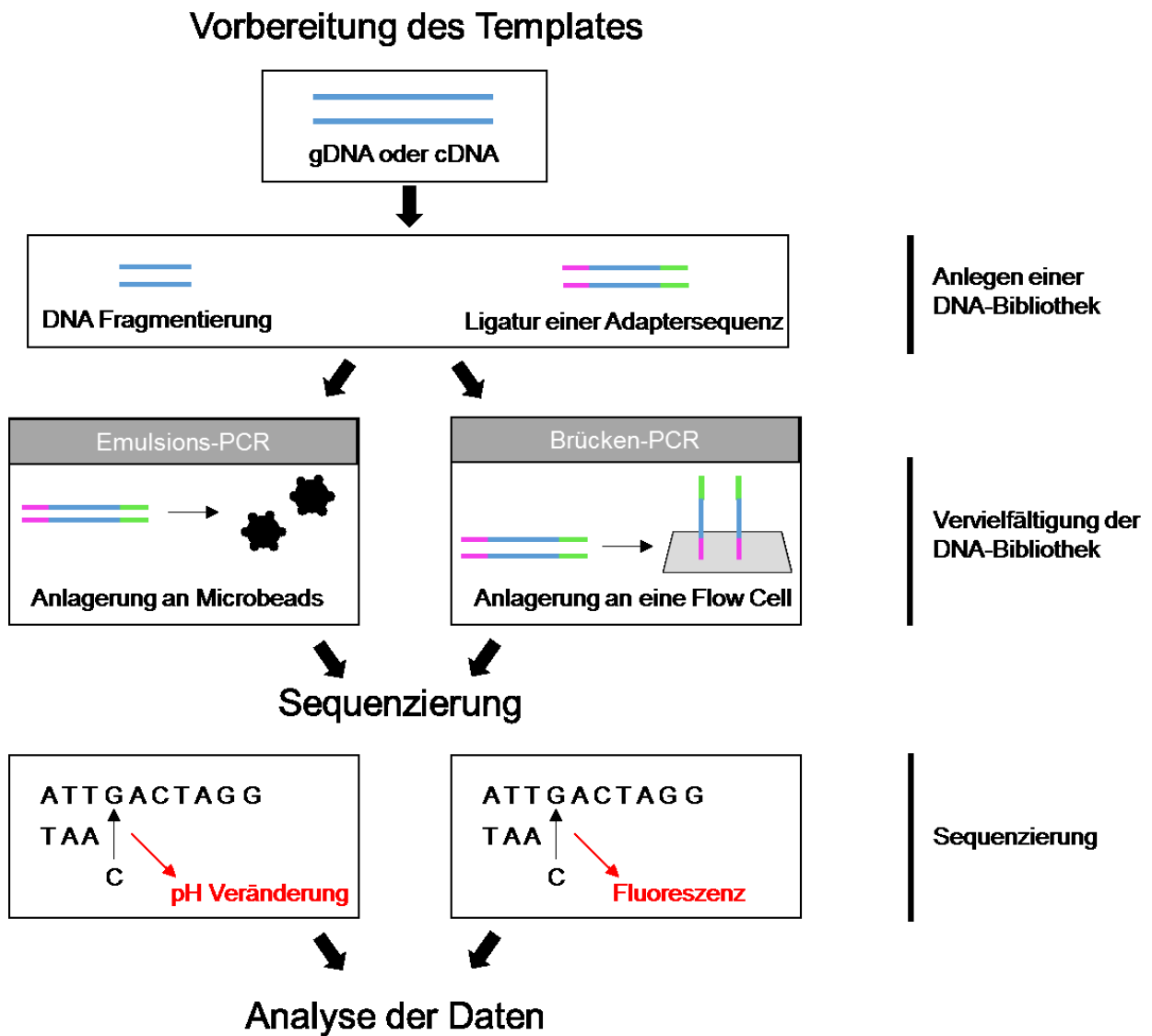
Die Methode der NGS besteht im Wesentlichen aus drei Schritten, die in **Abbildung 3-1** dargestellt sind: 1.) Vorbereitung des Templates, 2.) Sequenzierung und optische Abbildung der Sequenzierungsergebnisse, 3.) Analyse der Daten.

Im ersten Schritt wird das Template vorbereitet. Hierzu wird die gewünschte DNA physikalisch oder enzymatisch fragmentiert und anschließend an beiden Enden der DNA-Fragmente mit Adaptoren ligiert. Zur Amplifikation der angelegten DNA-Bibliothek gibt es zwei grundlegende Methoden: zum einen die Emulsions-PCR (95) und zum anderen die Brücken-PCR (96).

Bei der Emulsions-PCR lagern sich die DNA-Fragmente an Microbeads an. Die anschließende Sequenzierung erfolgt über den Nachweis von pH-Änderungen, die durch die Freisetzung von Wasserstoffionen beim Anbau von Nukleotiden an den wachsenden DNA-Strang entstehen.

Bei der Brücken-PCR binden die DNA-Fragmente hingegen an ein Glass-Slide (Flow-Cell). Die Sequenzierung erfolgt durch die Detektion der Fluoreszenz, welche durch den

Einbau von fluoreszenzmarkierten Nucleotiden erzeugt wird, wobei jedes der vier Nucleotide einen eigenen Farbstoff besitzt.



**Abbildung 3-1**

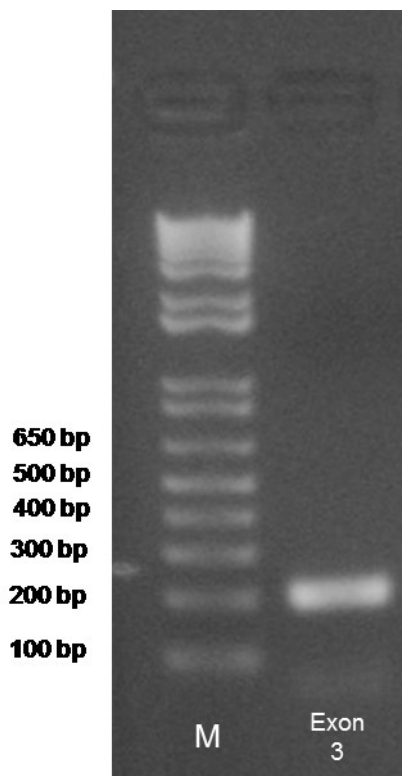
Übersicht des Arbeitsablaufs der Next-Generation-Sequencing-Methode (verändert nach Grada und Weinbrecht, 2013) (94).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der PCR-Bedingungen

Das *PDE4D*-Gen besteht aus 15 Exons und insgesamt 2,4 kb kodierender Sequenz. Aufgrund seiner Größe ist es daher notwendig, das Gen zur Sequenzierung in mehrere Fragmente zu unterteilen. Die Exons 2 bis 14 wurden jeweils in einem Fragment, das Exon 15 dagegen in zwei überlappenden Fragmenten amplifiziert. Auf Grund des hohen GC-Gehalts von Exon 1 war die Etablierung von diesem mit Standard PCR Konditionen nicht möglich. Die Amplifikation von Exon 1 wurde sowohl mit zwei als auch mit drei überlappenden Fragmenten durchgeführt. Trotz mehrfacher Optimierungsversuche gelang die Vervielfältigung von Exon 1 jedoch nicht (siehe unten).

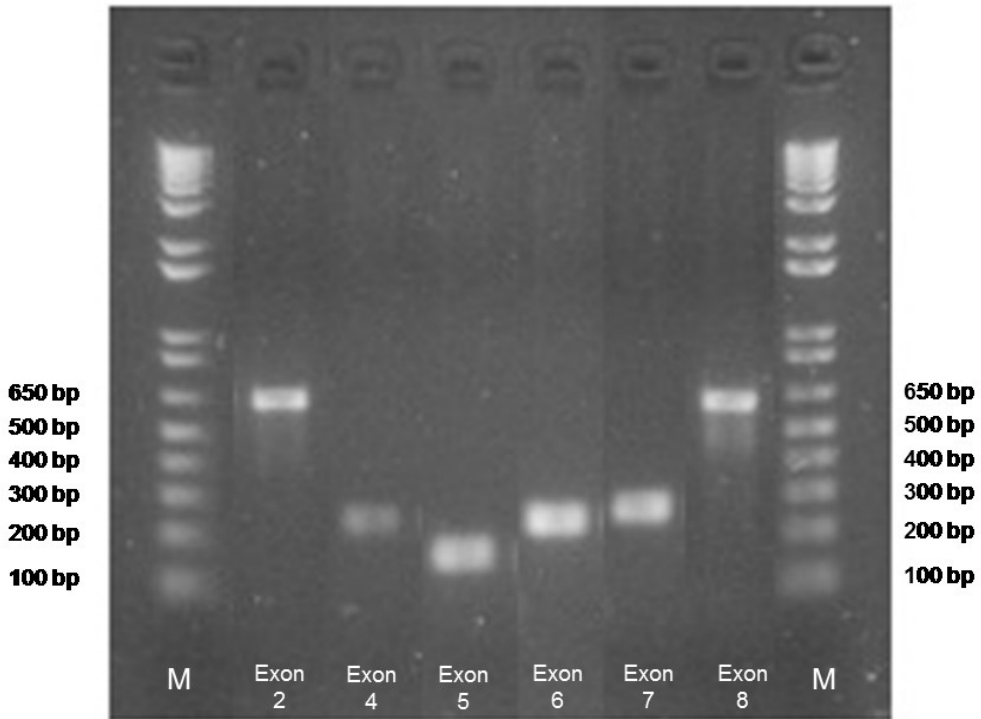
Zur Etablierung der PCR-Bedingungen zur Vervielfältigung der Exons wurden zunächst PCRs mit Ansatz 1 (siehe Kapitel 3.3.) gefahren. Die Ergebnisse der PCRs wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dieser Etablierungsversuch erzielte lediglich für Exon 3 das gewünschte PCR-Produkt (Bande in der Höhe von 200 bp) (**Abbildung 4-1**), sodass dieser PCR-Ansatz nur für Exon 3 festgelegt wurde.



**Abbildung 4-1**

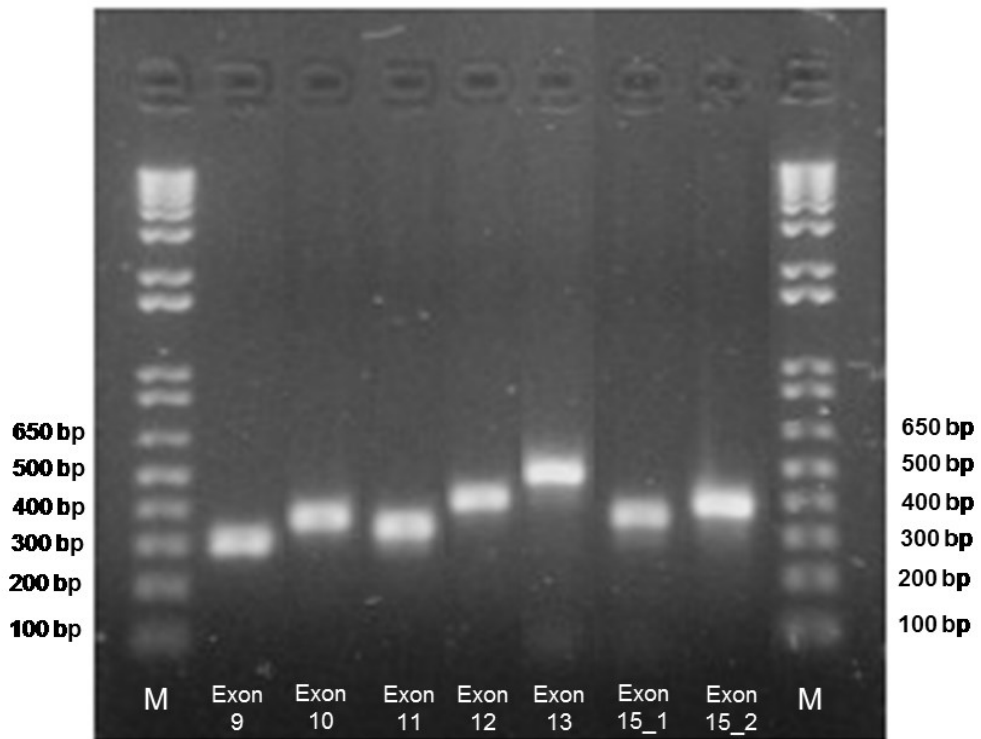
Bande von Exon 3 nach Agarose-Gelelektrophorese. M – Größenmarker

Für die Exons 1, 2 und 4-15 erfolgten weitere Amplifikationen mit Ansatz 2 und Ansatz 3 (siehe Kapitel 3.3). Aufgrund der unterschiedlich kräftigen Banden nach anschließender Gelelektrophorese wurden für Exon 2-13 und die beiden Fragmente von Exon 15 jeweils Ansatz 2 festgesetzt (**Abbildung 4-2** und **4-3**). Die Ergebnisse von Exon 14 fielen unter Verwendung von Ansatz 3 besser aus, sodass dieser dritte Ansatz für die Vervielfältigung dieses Exons gewählt wurde (**Abbildung 4-4**). Alle PCRs wurden mit dem PCR Cycling Protokoll, welches in Kapitel 3.3 beschrieben ist, durchgeführt.



**Abbildung 4-2**

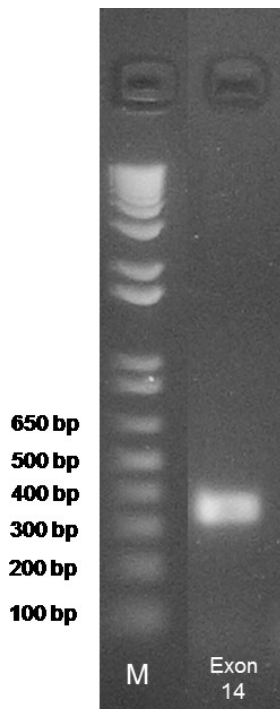
Banden von den Exons 2 und 4-8 nach Agarose-Gelelektrophorese



**Abbildung 4-3**

Banden der Exons 9-13, 15\_1 und 15\_2 nach Agarose-Gelelektrophorese





**Abbildung 4-4**

Bande von Exon 14 nach Agarose-Gelelektrophorese

**Tabelle 4-1**

Übersicht der PCR-Standardbedingungen zur Amplifikation der Exons von *PDE4D*

PCR Ansätze	Exons
Ansatz 1	3
Ansatz 2	2, 4-13, 15
Ansatz 3	14

Da bei den PCRs mit den Ansätzen 1 bis 3 kein Amplifikat des Exons 1 erzielt werden konnte, wurden weitere Optimierungsversuche unternommen. Dabei kamen verschiedene Primer zum Einsatz. Zunächst wurde die Amplifikation angestrebt, indem das Exon in zwei überlappende Fragmente unterteilt wurde (**Tabelle 4-2**). Anschließend wurden drei Primerpaare verwendet, welche das Exon in drei Abschnitte fragmentierten (**Tabelle 4-3**). Des Weiteren kamen verschiedene Kombinationen an Zusätzen (DMSO und Q-

Solution) zum Einsatz und es wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen und Cycling Programme erprobt. Dennoch konnte eine Vervielfältigung von Exon 1 nicht erreicht werden.

**Tabelle 4-2**

Primer-Sequenzen zur Amplifikation und Sequenzierung von Exon 1 in zwei Fragmenten des Gens *PDE4D*

PDE4D Exon	Primer Name	Primer Sequenz
Exon 1	PDE4D x 1F1	cagcagcatcagGAAGGC
	PDE4D x 1R1	GCTCGGTGTCCGAGTAGC
Exon 1	PDE4D x 1F2	agttccgcctcctgcatc
	PDE4D x 1R2	ATTGGTGGTGATAAGCCGAC

**Tabelle 4-3**

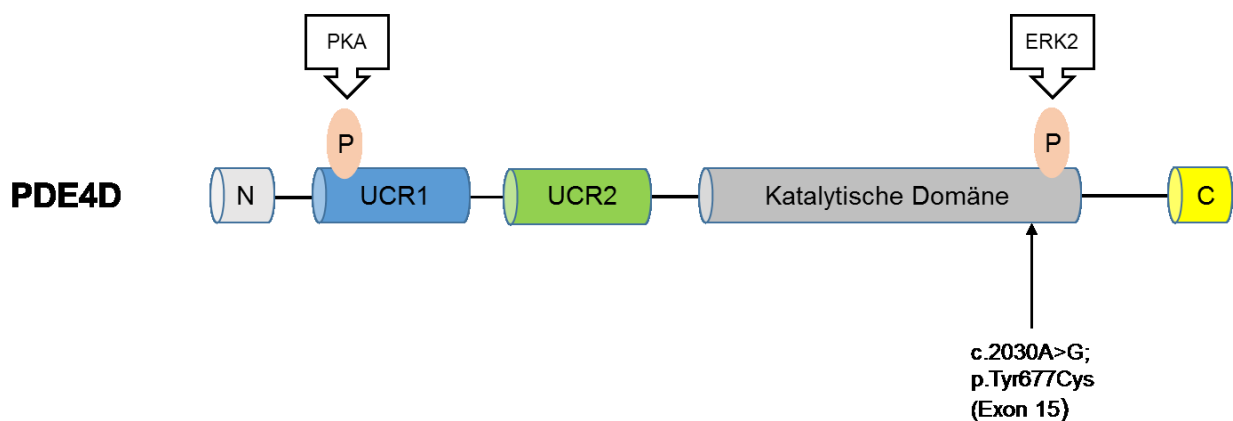
Primer-Sequenzen zur Amplifikation und Sequenzierung von Exon 1 in drei Fragmenten des Gens *PDE4D*

PDE4D Exon	Primer Name	Primer Sequenz
Exon 1	PDE4D x 1F1	aagggaggaagaaggaccaa
	PDE4D x 1R1	GTGATGGGGATGCAGGAG
Exon 1	PDE4D x 1F2	CCAGGATGGAGGCAGAGG
	PDE4D x 1R2	GGCGCGACAGTACAGGTAG
Exon 1	PDE4D x 1F3	CCCCAGTGTCCGCTACAG
	PDE4D x 1R3	ccccaatttcagactagca

## 4.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse

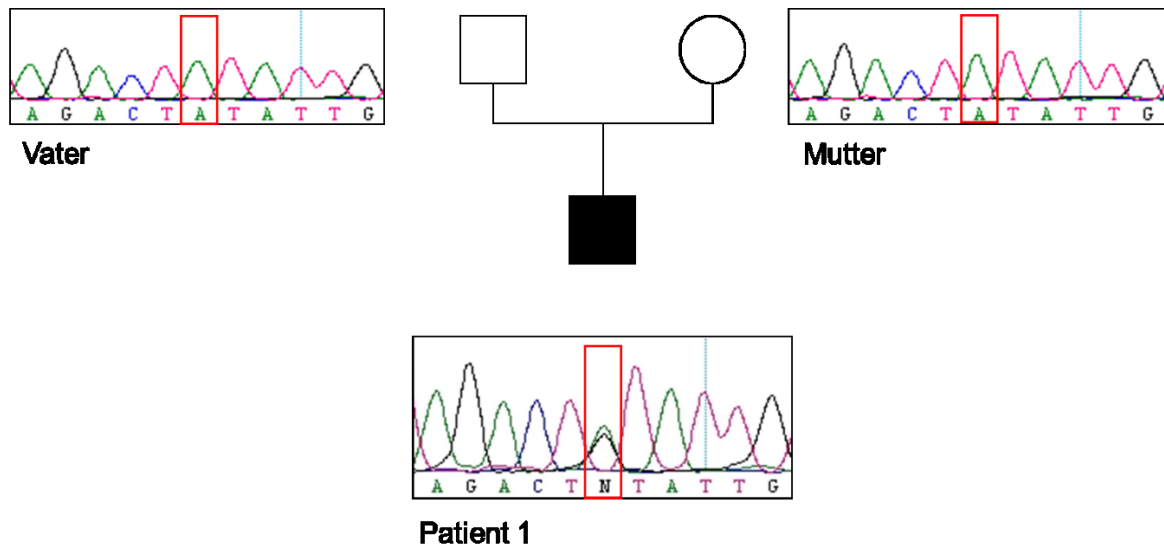
In dieser Arbeit wurde die kodierende Sequenz des Gens *PDE4D* bei vier Patienten mit Akrodysostose und 26 Patienten mit Brachydaktylie Typ E hinsichtlich vorliegender Sequenzveränderungen untersucht. Die Amplifikation von Exon 1 gelang trotz mehrfacher Optimierungsversuche nicht, sodass keine Aussage zur kodierenden Sequenz von Exon 1 getroffen werden kann. Die Exons 2 bis 15 wurden mit Hilfe der Sanger Sequenzierungsmethode zunächst sequenziert und anschließend mit der Computersoftware SeqMan TM II ausgewertet. Veränderungen in der Nukleotidsequenz können Veränderungen der Aminosäuresequenz hervorrufen (Missense-Mutation), welche Funktionsstörungen des Proteins zur Folge haben können.

Bei einem von vier Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose konnte eine Missense-Mutation nachgewiesen werden (c.2030 A>G). Diese befand sich im Exon 15 an der cDNA Position 2030 und damit in der katalytischen Domäne des Proteins (**Abbildung 4-5**). Durch diese Mutation kommt es zu einem Aminosäure-Austausch an Position 677, wodurch Cystein anstelle von Tyrosin in das Protein eingebaut wird (p.Tyr677Cys). Um festzustellen, ob es sich bei dieser Veränderung um eine neu aufgetretene Mutation handelt, wurde die elterliche DNA an der entsprechenden Position im Exon 15 des *PDE4D*-Gens analysiert. Weder paternal noch maternal konnte die beim Sohn vorhandene Mutation nachgewiesen werden, sodass die vorliegende Veränderung bei Patient 1 als *de novo*-Mutation gewertet werden kann (**Abbildung 4-6**). Im Patientenkollektiv mit Brachydaktylie Typ E konnten hingegen keine Veränderungen im *PDE4D*-Gen nachgewiesen werden.



**Abbildung 4-5**

Schematische Darstellung der Position der gefundenen Mutation im PDE4D Protein. Dargestellt sind die Proteindomänen und die Bindungsstellen für die Kinasen PKA und ERK2. N: N-Terminus, P: Phosphorylierungsstelle. UCR: *upstream conserved region*, C: C-Terminus. (verändert nach Lindstrand et al., 2014) (74).



**Abbildung 4-6**

Familienstammbaum von Patient 1 mit Sequenzausschnitten aus dem *PDE4D*-Gen. Die detektierte heterozygote Missense-Mutation des Patienten (c.2030A>G) wurde rot umrahmt, an derselben Position zeigt sich bei den Eltern die Wildtyp-Sequenz mit dem Nukelotid Adenin jeweils homozygot.

### 4.3 *In silico* Analyse hinsichtlich der Pathogenität der Variante c.2030A>G

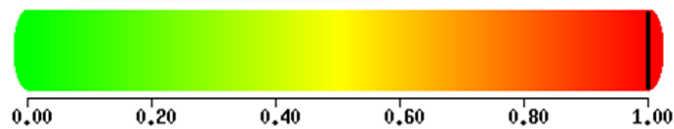
Die bei Patient 1 detektierte Missense-Veränderung wurde durch *in silico* Analysen weiter untersucht, um die Pathogenität zu bewerten. Hierzu wurde mit zwei verschiedenen Programmen gearbeitet, zum einen mit Mutation Taster und zum anderen mit PolyPhen-2.

Diese Programme treffen eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Mutation krankheitsverursachend sein kann. In die Beurteilung fließen verschiedene Aspekte ein, wie die Position und Art der Mutation, die Art der Aminosäuresequenz-Veränderung sowie der Konservierungsgrad.

Die Untersuchung mit Mutation Taster ergab für die Sequenzveränderung bei Patient 1 eine 99,99%ige Wahrscheinlichkeit, dass diese krankheitsverursachend ist.

Die Analyse mit PolyPhen-2 kam zu derselben Bewertung und errechnete einen Score von 0,999 und die Prognose „*probably damaging*“ (**Abbildung 4-7**).

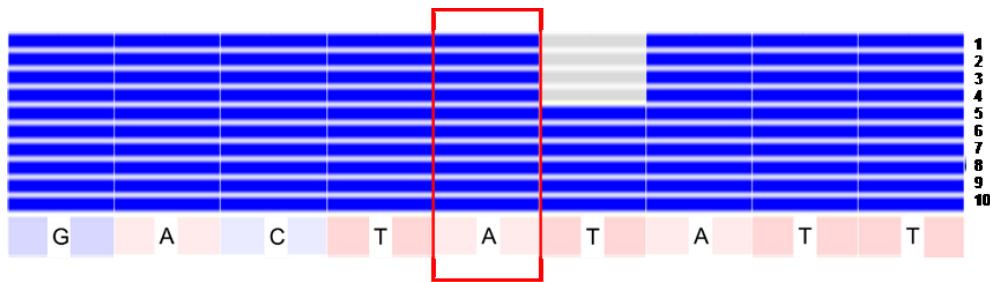
This mutation is predicted to be **PROBABLY DAMAGING** with a score of **0.999** (sensitivity: **0.14**; specificity: **0.99**)



#### **Abbildung 4-7**

Evaluierung der Pathogenität der Mutation c.2030 A>G im Exon 15 des *PDE4D*-Gens durch das Programm PolyPhen-2.

Mit Hilfe der Datenbank „*ECR Browser: Evolutionary Conservation of Genomes*“ wurde der Konservierungsgrad des von der Veränderung betroffenen Nukleotids bei Patient 1 untersucht. Dabei wurde der Konservierungsgrad über 10 Spezies bestimmt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in **Abbildung 4-8** dargestellt.



- 1  Kugelfisch (*Takifugu rubripes*)
- 2  Huhn (*Gallus gallus*)
- 3  Opossum (*Monodelphis domestica*)
- 4  Frosch (*Xenopus laevis*)
- 5  Kuh (*Bos Taurus*)
- 6  Hund (*Canis familiaris*)
- 7  Maus (*Mus musculus*)
- 8  Schimpanse (*Pan troglodytes*)
- 9  Rhesusaffe (*Macaca mulatta*)
- 10  Ratte (*Rattus norvegicus*)

**Abbildung 4-8**

Graphische Darstellung des Konservierungsgrades des bei Patienten 1 veränderten Nukleotids an der Position c.2030A>G. Das entsprechende Nukleotid ist durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Jeder der blauen Balken oberhalb einer Base stellt die Konservierung in einer der 10 Spezies da. Die Balken wurden am rechten Bildrand von 1 bis 10 nummeriert, die dazugehörige Legende befindet sich unterhalb der Abbildung. Das Nukleotid ist in allen 10 Spezies konserviert.

#### 4.4 Konservierungsgrad der Aminosäure der Variante p.Tyr677Cys

Der Konservierungsgrad der Aminosäure wurde mit Hilfe der Software Mutation Taster untersucht. Dabei zeigte sich, dass die betreffende Aminosäure an Position 677 in allen 5 untersuchten Spezies konserviert ist (**Abbildung 4-9**).

Spezies	p.Tyr677Cys
H. sapiens	GFIDYIVHPLW
M. mulatta	GFIDYIVHPLW
F. catus	GFIDYIVHPLW
M. musculus	GFIDYIVHPLW
D. rerio	GFIDYIVHPLW
X. tropicalis	GFIDYIVHPLW

**Abbildung 4-9**

Darstellung des Konservierungsgrades der Aminosäure an Position 677, in rot hervorgehoben. Der Aminosäurecode Y steht für Tyrosin (Tyr).

#### 4.5 Untersuchung der gesunden Kontrollgruppe

Die gesunde Kontrollgruppe wurde ebenfalls mittels SPCR gezielt an Position c.2030A>G im *PDE4D*-Gen analysiert. Bei keinem der 148 Probanden konnte an der beschriebenen Stelle eine Veränderung nachgewiesen werden.

#### 4.6 Klinische und laborchemische Patientendaten

##### Patient 1

Patient 1 ist ein Junge, der zum Zeitpunkt der Untersuchung 6 3/4 Jahre alt war. Er ist das einzige Kind seiner Eltern. Die Körpergröße der Mutter betrug 186 cm, die des Vaters 184 cm. Die elterliche Zielgröße des Jungen liegt somit bei 191,5 cm (> +2,0 SD). Zum Zeitpunkt der Vorstellung maß die Körpergröße 131 cm und lag damit auf der 95. Perzentile (+2,0 SD). Das Längenwachstum des Patienten lag somit in dem für sein Alter zu erwartenden Bereich. Der Kopfumfang betrug 55 cm (P 90-97).

Phänotypisch fielen beim Patienten für Akrodysostose typische faziale Dysmorphien auf: eine Hypoplasie des Mittelgesichts und eine nasale Hypoplasie mit flacher Nasenwurzel (**Abbildung 4-10**).



**Abbildung 4-10**

Gesichtsaufnahme von Patient 1. Es zeigen sich für Akrodysostose typische faziale Dysmorphien, wie nasale Hypoplasie mit flacher Nasenwurzel

An den Händen des Patienten konnte die für Akrodysostose typische Brachydaktylie festgestellt werden. Radiologisch zeigten sich sowohl charakteristische Verkürzungen aller Mittelhandknochen, als auch Zapfenepiphysen an den Mittelphalangen (**Abbildung 4-11**).

Es konnten keine hormonellen Auffälligkeiten gefunden werden, insbesondere waren der TSH-Wert und der PTH-Wert normal.



Im Bereich der Psychomotorik wurde insgesamt eine verzögerte psychomotorische Entwicklung festgestellt. So war das freie Laufen erst im Alter von zwei Jahren möglich und die Sprachentwicklung setzte verspätet um das dritte Lebensjahr ein.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung des Gens *PDE4D* ergab eine Missense-Mutation an der kodierenden Position c.2030A>G im Exon 15, welche einen Aminosäure Austausch von Tyrosin zu Cystein (p.Tyr677Cys) zur Folge hat. Nach der genetischen Untersuchung des elterlichen Sequenzabschnitts, konnte die Mutation als *de novo* identifiziert werden.



**Abbildung 4-11**

Die Finger sind auffällig kurz mit Deviation der Strahlen II und III nach radial. Das linke Röntgenbild zeigt deutliche Verkürzungen der Metakarpalia II bis V und Rudimente der bereits fusionierten, kegelförmigen Epiphysen der Mittelphalangen (auch der Grundphalanx II), die Mittel- und Endphalangen sind ebenfalls verkürzt. Die Karpalknochen sind in Ihrer Reifung akzeleriert. Das rechte Röntgenbild zeigt im Vergleich dazu einen Normalbefund einer linken Hand eines Jungen im Alter von 6 Jahren.

### **Patienten 2, 3 und 4**

Zu den anderen drei Patienten mit der klinischen, beziehungsweise radiologischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose lagen Informationen vor, dass die typischen Hand- und Fußanomalien vorhanden seien. Die untersuchten Sequenzbereiche des *PDE4D*-Gens zeigten die Wildtyp-Sequenz, also ein unauffälliges Ergebnis.

## Patienten 5 und 6

Nach Abschluss der in dieser Arbeit beschriebenen Sequenzanalysen stellte sich eine weitere Familie zur genetischen Beratung am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik an der Charité Universitätsmedizin Berlin vor. Sowohl bei der Mutter (Patient 5), als auch bei ihrem jüngsten Sohn (Patient 6) bestand die klinische und radiologische Verdachtsdiagnose einer Akrodysostose. Die DNA des Sohnes wurde daraufhin von Mitarbeitern des Instituts mit Hilfe der Next-Generation-Sequencing-Methode auf genetische Veränderungen hin untersucht, wobei das Augenmerk auf die Gene *PRKAR1A* und *PDE4D* gerichtet wurde, welche mit Akrodysostose assoziiert sind. Dabei konnte eine in der Literatur noch nicht beschriebene Veränderung an Position c.997A>G im Exon 7 nachgewiesen werden. Durch diese kommt es zu einem Aminosäure-Austausch an Position 333, wodurch Valin anstelle von Isoleucin in das Protein eingebaut wird (p.Ile333Val). Die mütterliche DNA wurde an der entsprechenden Position im Exon 7 des *PDE4D*-Gens mittels SPCR analysiert. Das Untersuchungsergebnis konnte die identische Veränderung c.997A>G im Exon 7 nachweisen.

Zur Diskussion des klinischen Spektrums bei *PDE4D*-Mutationen werden die klinischen Daten dieser Familie hier mit aufgenommen.

Patientin 5 war zum Zeitpunkt der Vorstellung 38 Jahre alt. Die Körpergröße lag bei 160 cm (-0,8 SD) und das Körpergewicht betrug 90 kg. Die Patientin zeigte für das Krankheitsbild der Akrodysostose typische morphologische Veränderungen: an den Händen und an den Füßen bestand eine ausgeprägte Brachydaktylie, außerdem wies sie charakteristische faziale Auffälligkeiten wie eine Mittelgesichtshypoplasie und eine flache Nasenwurzel auf (**Abbildung 4-12, 4-13 und 4-14**). Die Laborchemischen Parameter zeigten normwertige TSH- und PTH-Werte. Bei ihr konnte eine Lernbehinderung festgestellt werden.



**Abbildung 4-12**

Gesichtsaufnahme von Patientin 5 im Alter von 38 Jahren. Das Bild zeigt eine für das Krankheitsbild der Akrodysostose typische Mittelgesichtshypoplasie und eine flache Nasenwurzel.



**Abbildung 4-13**

Röntgenaufnahme des linken Fußes von Patientin 5. Das Bild zeigt eine Verkürzung sowohl der Phalangen als auch der Metatarsalia, welche eine kolbenartige Auftreibung am distalen und proximalen Ende aufweisen. Außerdem zeigen sich Rudimente von Zapfenepiphysen an den Phalangen. Die Großzehe tritt prominent hervor.



**Abbildung 4-14**

Fotografische Darstellung der rechten Hand und Röntgenbild der linken Hand von Patientin 5. Radiologisch fällt eine Verkürzung aller Metakarpalia mit aufgetriebenen distalen und proximalen Enden auf. Außerdem sind zapfenartige Einziehungen der Grundphalangen II bis V zu erkennen. Die phalangealen Knochen sind alle insgesamt verkürzt und plump.

Patient 6 ist der zweite Sohn von Patientin 5 und war beim Untersuchungstermin 9 Jahre alt. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Körperlänge des Patienten 141 cm, und lag damit zwischen der 75. und 90. Perzentile (+1,0 SD). Der Kopfumfang lag mit 53 cm auf der 50. Perzentile.

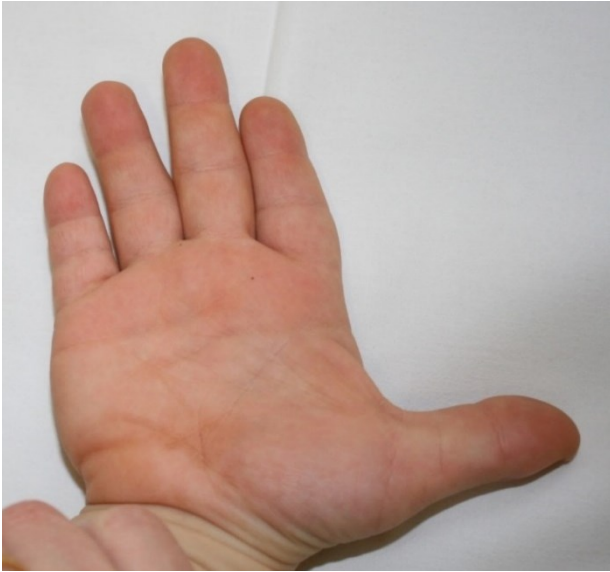
Phänotypisch zeigte der Patient zum einen eine typische Mittelgesichtshypoplasie, zum anderen wies er an Händen und Füßen eine für Akrodysostose charakteristische Brachydaktylie auf (**Abbildung 4-15, 4-16 und 4-17**). Die endokrinologischen Parameter waren, wie auch bei seiner Mutter, unauffällig. Auffälligkeiten konnten im Bereich der psychomotorischen Entwicklung festgestellt werden. Bei dem Patienten bestand sowohl eine Sprachentwicklungsverzögerung, als auch eine Lernproblematik. Außerdem lag bei ihm eine Verhaltensauffälligkeit im Sinne einer Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung (ADHS) vor, welche medikamentös behandelt wurde.



**Abbildung 4-15**

Aufnahme des Gesichts von Patient 6. Es zeigen sich faziale Dysmorphiezeichen wie eine Mittelgesichtshypoplasie, eine flache Nase mit einer hypoplastischen Nasenwurzel und ein schmales Lippenrot.





**Abbildung 4-16**

Klinische Aufnahme der rechten Hand von Patient 6. Es zeigt sich eine deutliche Brachydaktylie sowie eine Klinodaktylie des IV. Fingers.



**Abbildung 4-17**

Klinische Aufnahme der Füße von Patient 6. Die Zehen II-V sind deutlich verkürzt, wohingegen die Großenzehen markant hervortreten und verbreitert und plump wirken.

## 5 Diskussion

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse von vier Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose erbrachte bei einem Patienten eine Missense-Mutation im *PDE4D*-Gen an Position c.2030A>G, welche *de novo* entstanden ist.

Nach Abschluss der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen stellte sich eine Familie mit zwei Betroffenen Akrodysostose-Patienten (Mutter und Sohn) am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik an der Charité Universitätsmedizin Berlin vor. Sowohl bei der Mutter, als auch bei ihrem Sohn konnte eine weitere Missense-Mutation im *PDE4D*-Gen nachgewiesen werden.

Im Patientenkollektiv mit BDE konnte bei keinem der 26 untersuchten Patienten eine Mutation nachgewiesen werden.

Nachfolgend soll die bei Patient 1 detektierte Mutation mit Blick auf ihre Pathogenität und die Proteinfunktion diskutiert und beurteilt werden.

### Patient 1

In der Sequenzanalyse des *PDE4D*-Gens konnte bei dem Patienten 1 eine Transition von Adenin zu Guanin (c.2030A>G) im Exon 15 nachgewiesen werden, welche zu einem Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Cystein (p.Tyr677Cys) führt. Durch die molekulargenetische Untersuchung der elterlichen DNA konnte die *de novo*-Entstehung nachgewiesen werden. Diese Sequenzveränderung liegt in der katalytischen Domäne des Proteins und ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden.

Sowohl in der Arbeit von Kaname et al. (2014) als auch in der Arbeit von Lindstrand et al. (2014) wurde eine Missense-Mutation im angrenzenden Codon (c.2033T>C) beschrieben, welche an Position 678 zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Threonin führt (p.Ile678Thr). Kaname et al. (2014) untersuchten in ihrer Arbeit die Auswirkung dieser Mutation (c.2033T>C) auf die dreidimensionale Struktur der neuen *PDE4D*-Proteinvariante und die daraus resultierende Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität. Basierend auf den Ergebnissen ihrer Analyse wird eine Veränderung in der Bindungsaffinität von cAMP an die katalytischen Domäne angenommen, welche zu einer verminderten enzymatischen Aktivität führt (81).

Die in dieser Arbeit detektierte Sequenzveränderung führt zu einem Aminosäureaustausch an Position 677 (p.Tyr677Cys), welche direkt an den von Kaname et al. und Lindstrand et al. beschriebenen Aminosäureaustausch an Position 678 angrenzt, wodurch angenommen werden kann, dass diese Mutation einen vergleichbaren Effekt auf die enzymatische Aktivität der Phosphodiesterase hat.

Die *in silico* Analyse, welche mit den Programmen Mutation Taster und PolyPhen-2 durchgeführt wurde, erbrachte in beiden Fällen, dass die Mutation mit 99,99%iger Wahrscheinlichkeit als krankheitsverursachend einzuschätzen ist. Auch die Untersuchung mit Hilfe der Datenbank „*ECR Browser: Evolutionary Conservation of Genomes*“ zur Beurteilung des Konservierungsgrads des mutierten Nukleotids zeigte, dass das Nukleotid über alle 10 analysierten Spezies hinweg konserviert ist.

Mit Hilfe der Software Mutation Taster wurde der Konservierungsgrad der Aminosäure an Position 677 untersucht. Der hohe Konservierungsgrad spricht für die phylogenetische Relevanz dieser Aminosäure.

Auch bei der gezielten Sequenzierung an Position c.2030A>G bei 148 gesunden Kontrollprobanden, konnte keine Veränderung gezeigt werden.

Die Zusammenschau dieser Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Veränderung mit hoher Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachend ist.

## **5.1 Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse**

Die Akrodysostose wurde erstmals 1968 durch Maroteaux et al. als klinische Diagnose beschrieben, welche aufgrund von phänotypischen und radiologischen Merkmalen gestellt wurde. Mittlerweile wurden zwei in der cAMP-Signalwegkaskade beteiligte Gene, *PRKAR1A* und *PDE4D*, als Ursache für dieses Krankheitsbild identifiziert.

Das Aufdecken möglicher Zusammenhänge von Genotyp und Phänotyp könnte zu einer verbesserten Vorhersage in Bezug auf das krankheitsverursachende Gen bei Individuen mit dem typischen Krankheitsbild einer Akrodysostose beitragen. Das Wissen um eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation könnte somit die zielführende genetische Diagnostik unterstützen.



Die Akrodysostose ist durch verschiedene Charakteristika gekennzeichnet. Zu diesen zählen eine ausgeprägte Brachydaktylie und faziale Dysostosen, wie eine Hypoplasie der Nase und des Mittelgesichts. Außerdem werden häufig Kleinwuchs, Entwicklungsverzögerungen und Hormonresistenzen, insbesondere gegen PTH und TSH in der Literatur beschrieben (67, 70). Jedoch deuteten die Daten daraufhin, dass mehrere Unterformen der Akrodysostose existieren. Diese Annahme wird durch die neu gewonnenen Erkenntnisse in der molekularen Genetik unterstützt, die zeigen konnten, dass die Erkrankung einer Heterogenie unterliegt.

Im folgenden Abschnitt sollen einzelne Merkmale hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihres Ausprägungsgrades bei Patienten mit einer Mutation im *PDE4D*- beziehungsweise im *PRKAR1A*-Gen betrachtet werden. Hierzu werden zunächst Patientendaten aus der Literatur zusammengefasst, diskutiert und anschließend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt. Die neben der typischen Brachydaktylie und den fazialen Auffälligkeiten bestehenden Symptome werden im Folgenden einzeln besprochen.

### Kleinwuchs

Um die Körpergröße der Akrodysostose-Patienten mit der einer Referenzpopulation vergleichen zu können, wird in der Regel der sogenannte Z-Score (Standard Deviation Score (SDS)) verwendet. Der Z-Score ist unabhängig von Alter und Geschlecht, wodurch die Daten unterschiedlicher Altersgruppen und beider Geschlechter verglichen werden können. Laut Definition entspricht der Bereich von  $\pm 2,0$  SDS dem Normbereich (3.-97. Perzentile). Liegt die Körpergröße des Kindes unter der 3. Perzentile, beziehungsweise ist  $< -2,0$  SDS, wird definitionsgemäß von einem Kleinwuchs gesprochen (<http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/027-023.html>).

In der Literatur sind 29 Akrodysostose-Fälle beschrieben, bei denen eine Mutation im *PDE4D*-Gen nachgewiesen werden konnte (72-74, 81, 87, 97). 25 dieser Patienten sind nicht miteinander verwandt. Bei den übrigen vier Patienten handelt es sich um eine Familie, in der der Vater, die Tochter und zwei Söhne betroffen sind. Für alle 29 beschriebenen Akrodysostose-Fälle wurden Angaben zur Körpergröße gemacht (siehe **Tabelle 5-1**)

Der Z-Score lag lediglich bei sieben der in der Literatur beschriebenen Patienten unter -2,0 SD, wodurch definitionsgemäß ein Kleinwuchs besteht. Bei zwei der Patienten konnte sogar ein Hochwuchs beschrieben werden, der Standard Deviation Score war in diesen Fällen  $>+2,0$  SD.

In der Mehrzahl der Fälle lag die Körpergröße jedoch im Normbereich. Bei 13 Akrodysostose-Patienten wurde ein Z-Score im Bereich zwischen -2,0 SD und +2,0 SD angegeben. In den Arbeiten von Lee et al. (2012) und Michot et al. (2012) werden keine genauen Angaben zum SDS gemacht. So schreibt die Arbeitsgruppe um Lee et al., dass bei zwei Patienten ein milder Kleinwuchs vorliegt und beim dritten Patienten kein Kleinwuchs festgestellt werden konnte. Die Arbeitsgruppe von Michot et al. nennt ebenfalls keinen Z-Score, gibt jedoch an, dass bei keinem der vier Akrodysostose-Patienten mit *PDE4D*-Mutation eine postnatale Wachstumsretardierung ( $< 2,0$  SDS) vorlag.

In der Arbeit von Lynch et al. (2013) wird der Fall von vier verwandten Patienten beschrieben, wobei die Körpergröße des Vaters im Normbereich (Z-Score zwischen 0 und -1,0 SD) liegt. Im Gegensatz dazu weist der ältere Sohn eine Körpergröße im unteren Normbereich auf (SD zwischen -1,0 und -2,0), wohingegen bei dem jüngeren Sohn (im Alter von 5 Jahren) und der Tochter (im Alter von 12 Jahren) ein Z-Score im Bereich zwischen +2,0 und +3,0 SD bestimmt werden konnte, und damit bei beiden definitionsgemäß ein Hochwuchs vorliegt. Dieser beschriebene Fall lässt daher vermuten, dass keine Rückschlüsse auf die zu erwartende Körpergröße aufgrund einer bestimmten Mutation beziehungsweise aufgrund des jeweils betroffenen Gens zulässig sind.

Des Weiteren lassen sich 28 Akrodysostose-Fälle mit nachgewiesener Mutation im *PRKAR1A*-Gen in der Literatur finden (71-73, 81, 97-100). Bei 21 dieser Patienten wurde ein Z-Score von  $<-2,0$  SD bestimmt, wodurch bei diesen definitionsgemäß von einem Kleinwuchs gesprochen werden kann. Die Spanne des Z-Scores lag dabei zwischen -2,5 SD und -4,6 SD. Bei weiteren 7 Patienten war der Z-Score zwar größer oder gleich -2,0 SD, lag aber maximal bei -1,0 SD. Zwar wird die Körpergröße in der Arbeit von Lee et al. (2012) nicht durch den SDS definiert, jedoch wird bei den zwei vorgestellten Patienten ein milder Kleinwuchs beschrieben. Michot et al. (2012) beschreiben das Vorliegen einer postnatalen Wachstumsretardierung ( $<-2,0$  SDS) bei vier von insgesamt fünf Patienten.

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Patienten 1, 5 und 6 konnte ein reguläres Längenwachstum festgestellt werden.

Patient 1 maß im Alter von 6 Jahren und 9 Monaten 131 cm, was einem Z-Score von +2,0 SD entspricht, wobei beachtet werden muss, dass seine elterliche Zielgröße hoch ist. Patientin 5 hatte im Alter von 38 Jahren eine Körpergröße von 160 cm. Der ermittelte Z-Score betrug bei ihr -1,0 SD und auch bei ihrem Sohn (Patient 6) konnte eine Körpergröße im Normbereich ermittelt werden. Im Alter von 9 Jahren konnte eine Körpergröße von 141 cm dokumentiert werden, womit sein Z-Score +1,0 SD betrug.

Bereits in vorangegangenen Genotyp-Phänotyp-Korrelations-Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Kleinwuchs mit einer höheren Wahrscheinlichkeit bei Patienten mit Mutationen im *PRKAR1A*-Gen auftritt, während die Körpergröße bei Patienten mit *PDE4D*-Mutationen meist im Normbereich liegt (72).

Auch in dieser Arbeit konnte bei keinem der Patienten mit *PDE4D*-Mutation ein Kleinwuchs festgestellt werden, was die oben beschriebene Annahme unterstützt.

### Hormonresistenz

Auch im Blick auf die in der Literatur beschriebenen Hormonresistenzen, insbesondere gegen PTH und TSH, zeigen sich deutliche Unterschiede in den beiden genotypischen Gruppen der Akrodysostose-Patienten.

Im Vergleich zu den Trägern einer *PDE4D*-Mutation sind in der Literatur in der genotypischen Gruppe mit *PRKAR1A*-Mutationen viel häufiger endokrinologische Veränderungen in Form erhöhter PTH- und TSH-Serumspiegel beschrieben.

Von den 29 beschriebenen Akrodysostose-Fällen, bei denen eine Mutation im *PDE4D*-Gen nachgewiesen werden konnte, sind bei 23 Patienten die PTH-Spiegel und bei 27 Patienten die TSH-Spiegel bestimmt worden. Hierbei lagen bei 18 Patienten normwertige PTH-Spiegel vor. Auffälligkeiten zeigten sich bei einem Patienten in Form einer transienten PTH Resistenz (74); bei drei Patienten zeigte sich eine leichte PTH-Resistenz (74) und bei einem Patienten konnten erhöhte PTH-Spiegel nachgewiesen werden (72).

Ähnlich verhielt es sich auch bei den TSH-Spiegeln. Bei 25 der 27 untersuchten Patienten bestanden normwertige TSH-Serumspiegel. Lediglich bei zwei Patienten ließen sich Auffälligkeiten in Form einer kongenitalen Hypothyreose feststellen.

Der PTH-Spiegel wurde bei 24 der in der Literatur beschriebenen Akrodysostose Fälle mit einer *PRKAR1A*-Mutation bestimmt. Dabei fielen 23 der Patienten durch stark erhöhte PTH-Werte auf. Nur in einem Fall lagen die Werte im Normbereich (81).

Bei der Betrachtung der TSH-Serumspiegel wiesen in dieser genotypischen Gruppe von 27 untersuchten Patienten nur zwei Patienten normwertige TSH-Spiegel auf.

Bei der Bestimmung der TSH- und PTH-Werte der Patienten 1, 5 und 6 konnten keine hormonellen Auffälligkeiten gefunden werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass hormonelle Veränderungen, insbesondere von TSH und PTH, unter *PDE4D*-Mutationsträgern sehr selten auftreten. Hingegen können Hormonresistenzen fast immer bei *PRKAR1A*-Mutationsträger nachgewiesen werden.

### Entwicklungsverzögerung und Verhaltensauffälligkeiten

Ein weiterer Unterschied in der phänotypischen Ausprägung der beiden Genotyp-Gruppen zeigt sich in der psychomotorischen Entwicklung. Patienten mit einer *PDE4D*-Mutation zeigen fast immer eine mentale Retardierung oder eine Entwicklungsverzögerung. In der Literatur findet sich nur ein Fall eines Patienten mit einer *PDE4D*-Mutation, bei dem keine Auffälligkeiten in der Entwicklung bestehen (**Tabelle 5-1**).

Im Vergleich dazu zeigen Patienten mit einer *PRKAR1A*-Mutation seltener und weniger schwerwiegende Auffälligkeiten in der psychomotorischen Entwicklung. So wird in der Literatur in fünf Fällen mit dieser genetischen Veränderung von einer leichten Entwicklungsverzögerung gesprochen. Außerdem beschreibt die Gruppe um Linglart et al. (2015) bei acht von 14 untersuchten Akrodysostose-Patienten mit *PRKAR1A*-Mutationen Verhaltensauffälligkeiten und Schwierigkeiten in der Schule, jedoch wird bei keinem der Patienten von einer mentalen Retardierung berichtet.

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass psychomotorische Auffälligkeiten vermehrt bei Patienten mit *PDE4D*-Mutationen auftreten. So konnte bei Patient 1 eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung beobachtet werden, wobei einige Meilenstein der Entwicklung verspätet erreicht wurden. Bei Patientin 5 bestand eine Lernbehinderung und bei Patient 6 wurden eine Sprachentwicklungsverzögerung, eine Lernproblematik sowie eine Verhaltensauffälligkeit im Sinne einer Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung (ADHS) beschrieben.

**Tabelle 5-1**

Zusammenfassung der Literaturdaten zu Patienten mit *PDE4D*-Mutation

	Mutation	Alter	Geschlecht	Körpergröße (SD)	PTH	TSH	Faziale Dysostosen	Psychomotorische Entwicklung	Aus der Arbeit von
1	c.491C>T (p.Pro164Leu)	2 4/12	m	0 bis -1,0 SD	Normwertig	Primärer Hypothyreoidismus	Rundes Gesicht, Hypoplasie des Mittelgesichts, prominente Ohren	Generelle Entwicklungsverzögerung	Lynch et al Human Mut 2013
2	c.568T>G (p.Ser190Ala)	4	m	Kein Kleinwuchs	Normwertig	Normwertig	Nasale Hypoplasie, flache Nasenwurzel und prominenter Unterkiefer	Sprachentwicklungsverzögerung, psychomotorische Entwicklungsverzögerung	Michot et al AJHG 2012
3	c.673C>A (p.Pro225Thr)	7	m	Kein Kleinwuchs	Erhöht	Normwertig	Nasale Hypoplasie und flache Nasenwurzel	Sprachentwicklungsverzögerung und Beeinträchtigung der feinmotorischen Fähigkeiten	Michot et al AJHG 2012
4	c.676T>G (p.Phe226Val)	3 6/12	m	-0.7 SD	Transiente PTH Resistenz	Normwertig	Ausgeprägte Hypoplasie von Nase und Oberkiefer	Späte psychomotorische und sprachliche Entwicklung, Hyperaktivität	Lindstrand et al J Med Genet 2014
5	c.677T>G (p.Phe226Cys)	14 7/12	m	-2.1 SD	Leichte PTH Resistenz	Normwertig	Hypoplasie des Oberkiefers, kurze Nase mit knolliger Nasenspitze	Sprachentwicklungsverzögerung, Dysphasie, mentale Retardierung	Lindstrand et al J Med Genet 2014
6	c.677T>C (p.Phe226Ser)	4	m	Kein Kleinwuchs	Normwertig	Normwertig	Nasale Hypoplasie und flache Nasenwurzel	Sprachentwicklungsverzögerung und Beeinträchtigung der feinmotorischen Fähigkeiten	Michot et al AJHG 2012
7	c.679G>T (p.Ala227Ser)	14	w	-3.0 SD	Normwertig	Normwertig	Breites Gesicht, weit auseinander liegende Augen, Hypoplasie der Maxilla und der Nase, abgeflachte Nasenwurzel, antevertierte Nasenlöcher	Psychomotorische Entwicklungsverzögerung	Linglart et al JCEM 2012
8	c.682C>G (p.Gln228Glu)	n.a.	w	Kein Kleinwuchs	n.a.	Normwertig	Hypoplasie des Mittelgesichts	Keine	Lee et al AJHG 2012
9	c.683A>C (p.Gln228Pro)	39	w	-2.1 SD	Normwertig	Normwertig	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase mit flacher Nasenwurzel	Schwere mentale Retardierung	Kaname et al Cell Signal 2014
10	c.683A>C (p.Gln228Pro)	37	m	-5.9 SD	Normwertig	Normwertig	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase mit flacher Nasenwurzel	Schwere mentale Retardierung	Kaname et al Cell Signal 2014
11	c.689T>C (p.Leu230Ser)	10 5/12	m	-0.9 SD	Normwertig	Normwertig	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase mit flacher Nasenwurzel	Leichte bis schwere mentale Retardierung	Kaname et al Cell Signal 2014
12	c.719G>C (p.Ser240Thr)	34	w	-2.0 SD	Normwertig	Normwertig	Mittelgesichtshypoplasie, kurzes Philtrum, antevertierte Nasenlöcher, Prognathie	Moderate mentale Retardierung	Lynch et al Human Mut 2013
13	c.728C>T (p.Ala243Val)	41	m	0 bis -1,0 SD	Normwertig	Normwertig	Unauffällig	Lernschwäche	Lynch et al Human Mut 2013
14	c.728C>T (p.Ala243Val)	12	w	+2,0 bis +3,0 SD	Normwertig	Normwertig	Rundes Gesicht, kurze Nase mit antevertierten Nasenlöchern	Leichte Sprachentwicklungsverzögerung	Lynch et al Human Mut 2013
15	c.728C>T (p.Ala243Val)	8	m	-1,0 bis -2,0 SD	Normwertig	Normwertig	Flache und breite Nasenwurzel und antevertierten Nasenlöchern	Entwicklungsverzögerung im Bereich der Sprache und Grobmotorik	Lynch et al Human Mut 2013
16	c.728C>T (p.Ala243Val)	5	m	+2,0 bis +3,0 SD	Normwertig	Normwertig	Rundes Gesicht, breite und flache Nasenwurzel und antevertierte Nasenlöcher	Signifikante Sprachentwicklungsverzögerung	Lynch et al Human Mut 2013

	Mutation	Alter	Geschlecht	Körpergröße (SD)	PTH	TSH	Faziale Dysostosen	Psychomotorische Entwicklung	Aus der Arbeit von
17	c.803T>C (p.Val268Ala)	12	w	-1,0 bis -2,0 SD	Normwertig	Normwertig	Breite und prominente Stirn, Hypoplasie des Mittelgesichts, kurze nach oben gebogene Nase, leichte Mikrognathie, Überbiss, Hypoplastische Helix des Ohres	Sprachentwicklungsverzögerung	Lynch et al Human Mut 2013
18	c.907A>G (p.Met303Val)	12 6/12	m	-2.9 SD	Leichte PTH Resistenz	Normwertig	Hypoplasie des Oberkiefers, kurze Nase mit knolliger Nasenspitze	Moderate Entwicklungsverzögerung, Lernbehinderung	Lindstrand et al J Med Genet 2014
19	c.986T>C (p.Val329Ala)	7	m	-0.9 SD	Leichte PTH Resistenz	Normwertig	Hypoplasie von Nase und Oberkiefer	Motorische- und Sprachentwicklungsverzögerung, Hyperaktivität, autistische Züge, leichte mentale Retardierung	Lindstrand et al J Med Genet 2014
20	c.997 A>G p.Ile333Val	38	f	-0.8 SD	Normwertig	Normwertig	Mittelgesichtshypoplasie und flache Nasenwurzel	Lernbehinderung	Unsere Studie
21	c.997 A>G p.Ile333Val	9	m	+1.0 SD	Normwertig	Normwertig	Mittelgesichtshypoplasie	Sprachentwicklungsverzögerung, Lernproblematik, Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung (ADHS)	Unsere Studie
22	c.1759A>C (p.Thr587Pro)	3	m	Kein Kleinwuchs	Normwertig	Normwertig	Nasale Hypoplasie und flache Nasenwurzel	Psychomotorische Entwicklungsverzögerung	Michot et al AJHG 2012
23	c.1759A>G (p.Thr587Ala)	8 5/12	w	-0.2 SD	n.a.	n.a.	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase mit flacher Nasenwurzel	Schwere mentale Retardierung, verspätetes Erreichen der Meilensteine der Entwicklung	Kaname et al Cell Signal 2014
24	c.1769A>C (p.Glu590Ala)	n.a.	m	Kleinwuchs	n.a.	Normwertig	Hypoplasie des Mittelgesichts	Signifikante Entwicklungsstörung	Lee et al AJHG 2012
25	c.1769A>C (p.Glu590Ala)	7	w	+0.4 SD	Normwertig	Normwertig	Breites Gesicht, weit auseinander liegende Augen, Hypoplasie der Maxilla und der Nase, abgeflachte Nasenwurzel, antevertierte Nasenlöcher	Psychomotorische Entwicklungsverzögerung	Linglart et al JCEM 2012
26	c.1850T>C (p.Ile617Thr)	6 6/12	m	+2.0 SD	Normwertig	Normwertig	Rundes Gesicht, nasale Hypoplasie	Leichte bis moderate mentale Retardierung	Lynch et al Human Mut 2013
27	c.2018G>A (p.Gly673Asp)	n.a.	m	Kleinwuchs	n.a.	Kongenitale Hypothyreoidose	Hypoplasie des Mittelgesichts	Leichte Entwicklungsverzögerung	Lee et al AJHG 2012
28	c.2018G>A (p.Gly673Asp)	17	m	-2.8 SD	Normwertig	Normwertig	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase mit flacher Nasenwurzel	Schwere mentale Retardierung	Kaname et al Cell Signal 2014
29	c.2030 A>G (p.Tyr677Cys)	6 9/12	m	+2,0 SD	Normwertig	Normwertig	Hypoplasie des Mittelgesichts und eine nasale Hypoplasie mit flacher Nasenwurzel	Verzögerte psychomotorische Entwicklung	Unsere Studie
30	c.2033T>C (p.Ile678Thr)	3 6/12	w	-0.9 SD	n.a.	n.a.	Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, Epikanthus und tief ansetzende Ohren	Psychomotorische Entwicklungsverzögerung	Lindstrand et al J Med Genet 2014
31	c.2033T>C (p.Ile678Thr)	4 11/12	m	-1.6 SD	n.a.	Normwertig	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase	Schwere mentale Retardierung	Kaname et al Cell Signal 2014
32	c.2033T>C (p.Ile678Thr)	17	w	-3.1 SD	Normwertig	Normwertig	Schwere Hypoplasie von Nase und Oberkiefer, prominente Stirn, kurze Nase mit flacher Nasenwurzel	Leichte mentale Retardierung	Kaname et al Cell Signal 2014

## 5.2 Stellenwert einer Sequenzanalyse des *PDE4D*-Gens bei Patienten mit Akrodysostose und Brachydaktylie Typ E

Die Diagnose der Akrodysostose wurde bisher aufgrund phänotypischer Merkmale gestellt. Die Sequenzierung des *PDE4D*-Gens bei Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose ist sinnvoll, um die Diagnose molekulargenetisch zu sichern. In der hier vorliegenden Arbeit gelang bei einem von vier Patienten mit der klinischen Diagnose Akrodysostose der Nachweis einer *PDE4D*-Mutation. Hiermit konnte zusätzlich zu den insgesamt 21 in der Literatur beschriebenen Mutationen, eine noch nicht bekannte Mutation dieses Gens identifiziert werden.

Das *PRKAR1A*-Gen wurde bereits vor dem *PDE4D*-Gen als krankheitsverursachendes Gen bei Akrodysostose detektiert. Daher sind die Patienten 2, 3 und 4 bereits im Vorfeld auf Mutationen im *PRKAR1A*-Gen untersucht worden. Da weder im *PDE4D*-Gen noch im *PRKAR1A*-Gen Mutationen bei diesen Patienten gefunden wurden, kann angenommen werden, dass noch weitere genetische Ursachen zu dem klinischen Krankheitsbild der Akrodysostose führen. Mit Hilfe der NGS Methode können in der Zukunft möglicherweise weitere Gene identifiziert werden. Da die Amplifikation der kodierenden Sequenz von Exon 1 nicht möglich war, ist es außerdem denkbar, dass Mutationen in diesem Bereich nicht erkannt wurden. Bisher wurden allerdings noch keine Mutationen im Exon 1 bei Patienten mit Akrodysostose beschrieben.

Aufgrund der Ergebnisse in der Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalyse erscheint es aussichtsreich, je nach vorliegender Klinik zuerst das *PDE4D*-Gen beziehungsweise das *PRKAR1A*-Gen zu untersuchen. So sollte bei unauffälligem Längenwachstum und normwertigen PTH- und TSH-Spiegeln, sowie Auffälligkeiten in der psychomotorischen Entwicklung zunächst das *PDE4D*-Gen untersucht werden. Bei Patienten mit Kleinwuchs, PTH- und TSH-Resistenz, sowie einer unauffälligen psychomotorischen Entwicklung ist das *PRKAR1A*-Gen wiederum als krankheitsverursachend zu favorisieren.

Durch die Entwicklung der Next-Generation-Sequencing Methode wird die traditionelle Sanger-Sequenzierung in Zukunft wahrscheinlich an Bedeutung verlieren. Mit der durchlaufstarken Methode wird es möglich sein die beiden krankheitsverursachenden Gene für die Akrodysostose, *PRKAR1A* und *PDE4D*, parallel zu untersuchen.

Da bei keinem der untersuchten Patienten mit Brachydaktylie Typ E eine Mutation im *PDE4D*-Gen nachgewiesen werden konnte, ist von einer anderen genetischen Ursache in dieser Kohorte auszugehen.

### **5.3 Mutationen im *PDE4D*-Gen und *PRKAR1A*-Gen auch bei phänotypisch ähnlichen Erkrankungen detektiert**

In einer aktuellen Arbeit von Elli et al. (2016) wurde ein Patientenkollektiv mit der klinischen Diagnose AHO und/oder Pseudohypoparathyreoidismus (PHP) auf Mutationen im *PDE4D*-Gen und *PRKAR1A*-Gen untersucht. Diese Erkrankungen weisen skeletale und endokrinologische Veränderungen auf, welche phänotypische Überlappungen mit der Akrodysostose darstellen. Aufgrund des zunehmenden Verständnis über die Bedeutung der cAMP-Signalwegkaskade, untersuchte die Arbeitsgruppe von Elli et al. ein Patientenkollektiv (n = 81) mit der klinischen Diagnose PHP beziehungsweise AHO, welche bereits negativ auf Mutationen im *GNAS*-Gen untersucht wurden. Dabei konnte sie acht Missense Veränderungen bei neun Patienten identifizieren, welche bisher mit Akrodysostose assoziiert waren (101). Diese Arbeit unterstreicht noch einmal die Bedeutung der cAMP Signalkaskade und zeigt, dass Erkrankungen, wie die AHO, PHP und Akrodysostose nicht nur phänotypische, sondern auch genetische Überschneidungen besitzen und eine neue Einteilung und Klassifizierung dieser Erkrankungen in Zukunft denkbar sind.



## 6 Ausblick

Akrodysostose ist eine seltene genetisch bedingte Dysostose, bei welcher inzwischen zwei in der cAMP-Signalwegkaskade beteiligte Gene, *PRKAR1A* und *PDE4D*, als krankheitsverursachend identifiziert werden konnten.

In dieser Arbeit wurden vier Patienten mit Akrodysostose hinsichtlich Mutationen in der kodierenden Sequenz im *PDE4D*-Gen untersucht. Bei einem der Patienten konnte durch Sequenzierung eine in der Literatur noch nicht beschriebene Missense-Mutation nachgewiesen werden.

Außerdem wurde das *PDE4D*-Gen bei 26 Patienten mit BDE sequenziert, wobei bei keinem dieser Patienten eine Veränderung nachgewiesen werden konnte.

In den Akrodysostose-Fällen, welche in der Literatur beschrieben sind, zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp ab. Neben Brachydaktylie und fazialen Auffälligkeiten bestehen bei Patienten mit *PDE4D*-Mutationen in den meisten Fällen ein normales Längenwachstum sowie normwertige PTH- und TSH-Spiegel. Allerdings sind bei diesen Patienten in der Mehrheit der Fälle eine reduzierte Intelligenz oder eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung beschrieben. Patienten mit *PRKAR1A*-Mutationen weisen hingegen meistens einen Kleinwuchs, sowie eine Hormonresistenz, vor allem gegen PTH und TSH, auf. Auffälligkeiten in der psychomotorischen Entwicklung sind nur selten und wenn nur in leichter Ausprägung beschrieben.

Diese Genotyp-Phänotyp-Korrelationen konnten in dieser Arbeit auch bei den drei Patienten (zwei Patienten wurden nach Abschluss dieser Arbeit im Institut für Humangenetik untersucht) mit *PDE4D*-Mutation bestätigt werden.

Zur molekulardiagnostischen Sicherung der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose erscheint die Sequenzierung des *PDE4D*-Gens sinnvoll. Vor einer molekulargenetischen Untersuchung sollte aufgrund der klinischen Befunde eine Einschätzung über das in diesem Fall am ehesten krankheitsverursachende Gen (*PDE4D* oder *PRKAR1A*) getroffen werden. Hiermit könnte eine zielführende genetische Diagnostik unterstützt werden. In Zukunft werden NGS-Untersuchungstechniken eingesetzt werden, die die Analyse der gesamten Gruppe der in Frage kommenden Gene einschließen.

Weiterhin scheint das *PDE4D*-Gen für die Pathogenese der BDE eine untergeordnete Bedeutung zu haben. Nach weiteren ursächlichen Genen für die BDE sollte daher gesucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. Annual review of cell and developmental biology. 2000;16:191-220.
2. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association. 2004;9(4):410-4.
3. Karaplis AC. Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. Bilezikian JP RL, Rodan GA, editor. San Diego: Academic Press; 2002.
4. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. Nature. 2003;423(6937):332-6.
5. Drenckhahn D, Kugler P. Knochengewebe. Drenckhahn D, editor. München, Jena: Urban & Fischer; 2008. p.141-5 p.
6. Kornak U, Mundlos S. Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. American journal of human genetics. 2003;73(3):447-74.
7. Shimizu H, Yokoyama S, Asahara H. Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. Development, growth & differentiation. 2007;49(6):449-54.
8. Sun MM, Beier F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. Birth defects research Part C, Embryo today : reviews. 2014;102(1):74-82.
9. Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. Journal of cellular biochemistry. 2004;93(1):93-103.
10. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth factors (Chur, Switzerland). 2004;22(4):233-41.
11. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. Development (Cambridge, England). 2015;142(5):817-31.
12. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. Genome biology. 2001;2(3):Reviews3005.
13. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. Developmental cell. 2002;3(3):439-49.
14. Brent AE, Tabin CJ. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. Current opinion in genetics & development. 2002;12(5):548-57.
15. Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. A somitic compartment of tendon progenitors. Cell. 2003;113(2):235-48.
16. Niswander L. Pattern formation: old models out on a limb. Nature reviews Genetics. 2003;4(2):133-43.
17. Saunders JW, Jr. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. The Journal of experimental zoology. 1948;108(3):363-403.
18. Summerbell D, Lewis JH, Wolpert L. Positional information in chick limb morphogenesis. Nature. 1973;244(5417):492-6.
19. Tickle C, Summerbell D, Wolpert L. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. Nature. 1975;254(5497):199-202.
20. Saunders JW, Jr., & Gasseling, M. T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In R. Fleischmeier & R. E. Billingham (Eds.), Mesenchymal-Epithelial Interactions (pp. pp. 78-97). Baltimore: Williams and Wilkin
21. Bastida MF, Ros MA. How do we get a perfect complement of digits? Current opinion in genetics & development. 2008;18(4):374-80.
22. Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR. FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. Cell. 1993;75(3):579-87.
23. Towers M, Tickle C. Growing models of vertebrate limb development. Development (Cambridge, England). 2009;136(2):179-90.

24. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 1993;75(7):1401-16.
25. Tickle C. Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(1):45-53.
26. Niswander L, Jeffrey S, Martin GR, Tickle C. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*. 1994;371(6498):609-12.
27. Zakany J, Duboule D. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Current opinion in genetics & development*. 2007;17(4):359-66.
28. Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. *Molecular genetics and metabolism*. 2014;111(1):4-15.
29. Zakany J, Duboule D. Hox genes in digit development and evolution. *Cell and tissue research*. 1999;296(1):19-25.
30. Temtamy SA, Aglan MS. Brachydactyly. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008;3:15.
31. Bell J. On brachydactyly and symphalangism. Penrose LS *The Treasury of Human Inheritance*. Vol. 5. Cambridge; Cambridge University Press 1951: 1-31.
32. Temtamy SA, McKusick VA. Brachydactyly as an isolated malformation. In: Bergsma D, Mudge JR, Paul KW, eds. *The genetics of hand malformations*. New York: Alan R Liss, 1978:187-97.
33. Kirkpatrick TJ, Au KS, Mastrobattista JM, McCready ME, Bulman DE, Northrup H. Identification of a mutation in the Indian Hedgehog (IHH) gene causing brachydactyly type A1 and evidence for a third locus. *Journal of medical genetics*. 2003;40(1):42-4.
34. Racacho L, Byrnes AM, MacDonald H, Dranse HJ, Nikkel SM, Allanson J, et al. Two novel disease-causing variants in BMPR1B are associated with brachydactyly type A1. *European journal of human genetics : EJHG*. 2015.
35. Mundlos S. The brachydactylies: a molecular disease family. *Clinical genetics*. 2009;76(2):123-36.
36. Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, et al. Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nature genetics*. 2001;28(4):386-8.
37. Armour CM, McCready ME, Baig A, Hunter AG, Bulman DE. A novel locus for brachydactyly type A1 on chromosome 5p13.3-p13.2. *Journal of medical genetics*. 2002;39(3):186-8.
38. Byrnes AM, Racacho L, Nikkel SM, Xiao F, MacDonald H, Underhill TM, et al. Mutations in GDF5 presenting as semidominant brachydactyly A1. *Human mutation*. 2010;31(10):1155-62.
39. Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Suring K, et al. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12277-82.
40. Lehmann K, Seemann P, Boergemann J, Morin G, Reif S, Knaus P, et al. A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *European journal of human genetics : EJHG*. 2006;14(12):1248-54.
41. Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K, et al. Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(9):2373-81.
42. Kjaer KW, Eiberg H, Hansen L, van der Hagen CB, Rosendahl K, Tommerup N, et al. A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *Journal of medical genetics*. 2006;43(3):225-31.
43. Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nurnberg P, Neto JC, et al. Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *American journal of human genetics*. 2009;84(4):483-92.
44. Su P, Ding H, Huang D, Zhou Y, Huang W, Zhong L, et al. A 4.6 kb genomic duplication on 20p12.2-12.3 is associated with brachydactyly type A2 in a Chinese family. *Journal of medical genetics*. 2011;48(5):312-6.
45. Schwabe GC, Mundlos S. Genetics of congenital hand anomalies. *Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Handchirurgie : Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefässe* 2004;36(2-3):85-97.

46. Oldridge M, Fortuna AM, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, et al. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nature genetics*. 2000;24(3):275-8.
47. Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, Gillessen-Kaesbach G, et al. Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *American journal of human genetics*. 2000;67(4):822-31.
48. Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, et al. A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *American journal of human genetics*. 2007;81(2):388-96.
49. Schwabe GC, Turkmen S, Leschik G, Palanduz S, Stover B, Goecke TO, et al. Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of CDMP1. *American journal of medical genetics Part A*. 2004;124a(4):356-63.
50. Polinkovsky A, Robin NH, Thomas JT, Irons M, Lynn A, Goodman FR, et al. Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nature genetics*. 1997;17(1):18-9.
51. Galjaard RJ, van der Ham LI, Posch NA, Dijkstra PF, Oostra BA, Hovius SE, et al. Differences in complexity of isolated brachydactyly type C cannot be attributed to locus heterogeneity alone. *American journal of medical genetics*. 2001;98(3):256-62.
52. Savarirayan R, White SM, Goodman FR, Graham JM, Jr., Delatycki MB, Lachman RS, et al. Broad phenotypic spectrum caused by an identical heterozygous CDMP-1 mutation in three unrelated families. *American journal of medical genetics Part A*. 2003;117a(2):136-42.
53. Holder-Espinasse M, Escande F, Mayrargue E, Dieux-Coeslier A, Fron D, Doual-Bisser A, et al. Angel shaped phalangeal dysplasia, hip dysplasia, and positional teeth abnormalities are part of the brachydactyly C spectrum associated with CDMP-1 mutations. *Journal of medical genetics*. 2004;41(6):e78.
54. Yang W, Cao L, Liu W, Jiang L, Sun M, Zhang D, et al. Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydactyly type C and proximal symphalangism. *Journal of human genetics*. 2008;53(4):368-74.
55. Gutierrez-Amavizca BE, Brambila-Tapia AJ, Juarez-Vazquez CI, Holder-Espinasse M, Manouvrier-Hanu S, Escande F, et al. A novel mutation in CDMP1 causes brachydactyly type C with "angel-shaped phalanx". A genotype-phenotype correlation in the mutational spectrum. *European journal of medical genetics*. 2012;55(11):611-4.
56. Farooq M, Nakai H, Fujimoto A, Fujikawa H, Kjaer KW, Baig SM, et al. Characterization of a novel missense mutation in the prodomain of GDF5, which underlies brachydactyly type C and mild Grebe type chondrodysplasia in a large Pakistani family. *Human genetics*. 2013;132(11):1253-64.
57. Seo SH, Park MJ, Kim SH, Kim OH, Park S, Cho SI, et al. Identification of a GDF5 mutation in a Korean patient with brachydactyly type C without foot involvement. *Annals of laboratory medicine*. 2013;33(2):150-2.
58. Al-Qattan MM, Al-Motairi MI, Al Balwi MA. Two novel homozygous missense mutations in the GDF5 gene cause brachydactyly type C. *American journal of medical genetics Part A*. 2015.
59. Johnson D, Kan SH, Oldridge M, Trembath RC, Roche P, Esnouf RM, et al. Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. *American journal of human genetics*. 2003;72(4):984-97.
60. Williams KD, Blangero J, Subedi J, Jha B, Dyer T, Vandenberg JL, et al. Nonsyndromic brachydactyly type D and type E mapped to 7p15 in healthy children and adults from the Jirel ethnic group in eastern Nepal. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*. 2013;25(6):743-50.
61. Hertzog KP. Brachydactyly and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Acta geneticae medicae et gemellologiae*. 1968;17(3):428-38.
62. Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, Koll R, de Ravel T, Baten E, et al. Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. *American journal of human genetics*. 2010;86(3):434-9.
63. Maroteaux P, Malamut G. [Acrodysostosis]. *La Presse medicale*. 1968;76(46):2189-92.

64. Jones KL, Smith DW, Harvey MA, Hall BD, Quan L. Older paternal age and fresh gene mutation: data on additional disorders. *The Journal of pediatrics*. 1975;86(1):84-8.
65. Hernandez RM, Miranda A, Kofman-Alfaro S. Acrodysostosis in two generations: an autosomal dominant syndrome. *Clinical genetics*. 1991;39(5):376-82.
66. Steiner RD, Pagon RA. Autosomal dominant transmission of acrodysostosis. *Clinical dysmorphology*. 1992;1(4):201-6.
67. Butler MG, Rames LJ, Wadlington WB. Acrodysostosis: report of a 13-year-old boy with review of literature and metacarpophalangeal pattern profile analysis. *American journal of medical genetics*. 1988;30(4):971-80.
68. Viljoen D, Beighton P. Epiphyseal stippling in acrodysostosis. *American journal of medical genetics*. 1991;38(1):43-5.
69. Graham JM, Jr., Krakow D, Tolo VT, Smith AK, Lachman RS. Radiographic findings and Gs-alpha bioactivity studies and mutation screening in acrodysostosis indicate a different etiology from pseudohypoparathyroidism. *Pediatric radiology*. 2001;31(1):2-9.
70. Silve C, Clauser E, Linglart A. Acrodysostosis. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2012;44(10):749-58.
71. Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M, et al. Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *The New England journal of medicine*. 2011;364(23):2218-26.
72. Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E, et al. Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *American journal of human genetics*. 2012;90(4):740-5.
73. Lee H, Graham JM, Jr., Rimoin DL, Lachman RS, Krejci P, Tompson SW, et al. Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *American journal of human genetics*. 2012;90(4):746-51.
74. Lindstrand A, Grigelioniene G, Nilsson D, Pettersson M, Hofmeister W, Anderlid BM, et al. Different mutations in PDE4D associated with developmental disorders with mirror phenotypes. *Journal of medical genetics*. 2014;51(1):45-54.
75. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual review of biochemistry*. 2007;76:481-511.
76. Houslay MD. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2001;69:249-315.
77. Szpirer C, Szpirer J, Riviere M, Swinnen J, Vicini E, Conti M. Chromosomal localization of the human and rat genes (PDE4D and PDE4B) encoding the cAMP-specific phosphodiesterases 3 and 4. *Cytogenetics and cell genetics*. 1995;69(1-2):11-4.
78. Houslay MD. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(2):91-100.
79. Xie M, Blackman B, Scheitrum C, Mika D, Blanchard E, Lei T, et al. The upstream conserved regions (UCRs) mediate homo- and hetero-oligomerization of type 4 cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE4s). *The Biochemical journal*. 2014;459(3):539-50.
80. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;109(3):366-98.
81. Kaname T, Ki CS, Niikawa N, Baillie GS, Day JP, Yamamura K, et al. Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cellular signalling*. 2014;26(11):2446-59.
82. Richter W. 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism. *Proteins*. 2002;46(3):278-86.
83. Sette C, Conti M. Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(28):16526-34.
84. Hansson V, Skalhegg BS, Tasken K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000;73(1-2):81-92.

85. Sakamoto A, Chen M, Kobayashi T, Kronenberg HM, Weinstein LS. Chondrocyte-specific knockout of the G protein G(s)alpha leads to epiphyseal and growth plate abnormalities and ectopic chondrocyte formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(4):663-71.
86. Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, et al. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science*. 1996;273(5275):663-6.
87. Lynch DC, Dyment DA, Huang L, Nikkel SM, Lacombe D, Campeau PM, et al. Identification of novel mutations confirms PDE4D as a major gene causing acrodysostosis. *Human mutation*. 2013;34(1):97-102.
88. Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ, Conti M. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(21):11998-2003.
89. Li Y-F, Cheng Y-F, Huang Y, Conti M, Wilson SP, O'Donnell JM, et al. Phosphodiesterase-4D knockout and RNAi-mediated knockdown enhance memory and increase hippocampal neurogenesis via increased cAMP signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(1):172-83.
90. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
91. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 1987;155:335-50.
92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
93. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology (Reading, Mass)*. 1992;24:104-8.
94. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(8):e11.
95. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):8817-22.
96. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(3):e22.
97. Linglart A, Fryssira H, Hiort O, Holterhus PM, Perez de Nanclares G, Argente J, et al. PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(12):E2328-38.
98. Muhn F, Klopocki E, Graul-Neumann L, Uhrig S, Colley A, Castori M, et al. Novel mutations of the PRKAR1A gene in patients with acrodysostosis. *Clinical genetics*. 2013;84(6):531-8.
99. Li N, Nie M, Li M, Jiang Y, Xing X, Wang O, et al. The first mutation identified in a Chinese acrodysostosis patient confirms a p.G289E variation of PRKAR1A causes acrodysostosis. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(8):13267-74.
100. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, et al. PRKAR1A mutation affecting cAMP-mediated G protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(9):E1808-13.
101. Elli FM, Bordogna P, de Sanctis L, Giachero F, Verrua E, Segni M, et al. Screening of PRKAR1A and PDE4D in a Large Italian Series of Patients Clinically Diagnosed With Albright Hereditary Osteodystrophy and/or Pseudohypoparathyroidism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2016;31(6):1215-24.

## 8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jasmin Alicia Torfadóttir Ásgeirsson, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Mutationsanalyse des Gens *PDE4D*-Gens bei Individuen mit Akrodysostose und mit Brachydaktylie Typ E“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **10 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Denise Horn für ihre intensive und professionelle Betreuung sowie ihre immerwährende freundliche Unterstützung und guten Anregungen. Aber auch für ihre konstruktive Kritik beim Korrigieren dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Der gleiche Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Eva Klopocki für die hervorragende Betreuung im Labor und ihre Ratschläge und Ideen, sowie das intensive und kritische Lesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Randi Koll für die kompetente Einführung in die Methoden und die Begleitung im Laboralltag.

Mein Dank gilt auch Robert Henze-Kersten für seine herzliche und stets freundliche Unterstützung und seine Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Björn Fischer-Zirnsak danke ich für die konstruktiven Anmerkungen, sowie die Unterstützung und die Hilfestellung im Umgang mit den Sofwares und Datenbanken.

Mein Dank gilt auch meiner Familie für den steten Rückhalt und Zuspruch, sowie die fortwährende Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zu guter Letzt möchte ich noch Alexander danken, der mich beim Schreiben dieser Arbeit stets ermutigt hat.