

**Einfluss verschiedener GDF5- und BMP2-Mutationen auf  
ausgewählte molekulare Mechanismen der Chondrogenese  
und Osteogenese**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Gerburg Schwärzer**

aus Berlin

2011



Die vorliegende Arbeit wurde vom Juli 2007 bis Dezember 2011 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petra Knaus am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Munz

Disputation am 19.03.2012



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	11
1.1. BMP-Liganden .....	11
1.2. BMP-Rezeptoren .....	14
1.3. Einfluss der Ligand-Rezeptor-Komplexe auf die Signaltransduktion .....	17
1.3.1. Ligand-Rezeptor-Interaktion .....	17
1.3.2. Smad-abhängiger Signalweg .....	20
1.3.3. „Non-Smad“-Signalwege .....	23
1.4. Feinregulierung der BMP/GDF-Signaltransduktion .....	25
1.4.1. Gegenseitige Regulierung von Smad-abhängigen und „Non-Smad“-Signalwegen .....	25
1.4.2. Co-Rezeptoren .....	26
1.4.3. BMP/GDF-Antagonisten .....	27
1.5. Chondro- und Osteogenese .....	30
1.5.1. Entwicklung der Knochen und Extremitäten .....	31
1.5.2. Frakturheilung .....	34
1.5.3. An Skelettbildung und Frakturheilung beteiligte Signalwege .....	35
1.5.3.1. Hedgehog-Signalweg .....	35
1.5.3.2. Wnt-Signalwege .....	36
1.5.3.3. FGF-Signalweg .....	38
2. Zielsetzung der Arbeit .....	40
3. Material und Methoden .....	41
3.1. Material .....	41
3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	41
3.1.2. Chemikalien, Enzyme, Kits, Antikörper und Marker .....	43
3.1.3. Enzyme .....	45
3.1.4. Primer .....	45
3.1.5. Standards .....	46
3.1.6. Bakterienstämme .....	47
3.1.7. Expressionsvektoren .....	47
3.1.8. Eukaryotische Expressions-Konstrukte .....	47
3.1.9. Zelllinien .....	48
3.1.10. Medien und Reagenzien für die Zellkultur .....	49

3.1.11. Rekombinante Proteine .....	49
3.1.12. Antikörper .....	50
3.2. Molekularbiologische Methoden.....	52
3.2.1. Isolierung von Plasmid DNA .....	52
3.2.2. Isolierung von RNA und Herstellung von cDNA .....	52
3.2.3. Quantitative Real time-PCR.....	53
3.3. Zellbiologische Methoden.....	53
3.3.1. Kultivierung und Konservierung von Zellen .....	53
3.3.2. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	54
3.3.3. Dualer Luziferase-Reportergen-Test.....	55
3.3.4. Herstellung von Zelllysaten zum Nachweis von Phospho-Proteinen .....	56
3.3.5. Subzelluläre Fraktionierung .....	56
3.3.6. Immunfluoreszenz .....	56
3.3.7. Aktivität der alkalischen Phosphatase .....	57
3.3.8. Maus-Micromass .....	57
3.3.9. Alcian Blue-Färbung .....	57
3.3.10. Alizarin Red-Färbung.....	58
3.4. Proteinanalytische Methoden .....	58
3.4.1. Bestimmung des Protein-Gehaltes .....	58
3.4.2. Co-Immunpräzipitation .....	58
3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
3.4.4. Western Blot.....	59
3.3.5. Iodierung und chemische Quervernetzung von rekombinanten Proteinen .....	60
4. Ergebnisse: Mutationen des <i>GDF5</i> .....	61
4.1. Mutationen im GDF5-Protein beeinträchtigen dessen Bindung an die BMP-Rezeptoren .....	62
4.2. Die GDF5-S94N-Mutante verzögert die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges.....	64
4.2.1. Phosphorylierung von R-Smad 1/5/8 und dessen Translokation in den Nukleus ..	64
4.2.2. Smad-abhängige Transkription .....	67
4.3. Die GDF5-S94N-Mutante verzögert die Aktivierung der p38 MAP-Kinase .....	72
4.4. Mutationen im GDF5-Protein beeinflussen die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten.....	74

4.4.1. GDF5-Mutanten verhindern die osteoblastäre Differenzierung von C2C12-Zellen .....	75
4.4.2. GDF5-Mutanten verhindern die chondrogene Reifung von ATDC5-Zellen .....	78
4.4.3. Die GDF5-S94N-Mutante fördert die chondrogene Differenzierung von Micromass-Zellen.....	81
4.4.4. GDF5-S94N reguliert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nicht .....	84
4.4.5. GDF5-S94N ist resistent gegen die Inhibierung durch den BMP/GDF-Antagonisten Noggin.....	86
5. Diskussion: Mutationen des <i>GDF5</i> .....	91
5.1. Einfluss der GDF5-Mutationen auf die einzelnen Ebenen der GDF5-abhängigen Signaltransduktion.....	92
5.1.1. Interaktion der GDF5-Mutanten mit den BMP-Rezeptoren .....	92
5.1.2. Einfluss der GDF5-Mutanten auf die Signalkaskaden.....	94
5.1.3. Resistenz der GDF5-S94N-Mutante gegen die Inhibierung durch Noggin .....	96
5.2. Auswirkungen der GDF5-Mutationen auf die Chondrogenese und Osteogenese .....	98
5.2.1. Einfluss der GDF5-Mutanten auf die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen.....	98
5.2.2. Einfluss der GDF5-Mutanten auf die endochondrale Ossifikation .....	100
5.3. Schlussfolgerungen .....	105
6. Ergebnisse: Mutationen im <i>BMP2</i> .....	106
6.1. Die BMP2-L51P-Mutante verhindert die Induktion BMP2-abhängiger Signalwege. 107	
6.1.1. Die Mutation BMP2-L51P verhindert die Bindung an BMPRI.....	107
6.1.2. Die BMP2-L51P-Mutante verhindert die Aktivierung der Smads.....	108
6.1.3. Die Mutation BMP2-L51P verhindert die BMP-abhängige Aktivierung des p38 MAPK Weges .....	113
6.1.4. Die Mutation BMP2-L51P verhindert die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen .....	114
6.2. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Differenzierung zu Osteoblasten .....	116
6.2.1. Die Mutationen BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D verbessern die Interaktion zu den BMP Typ II-Rezeptoren.....	116
6.2.2. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Smad-abhängige Transkription .....	118

6.2.3. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D beschleunigen die Aktivierung der p38 MAPK .....	124
6.2.4. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen .....	126
6.2.5. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen .....	129
7. Diskussion: Mutationen des <i>BMP2</i> .....	132
7.1. Einfluss der Rezeptor-Bindungsaffinitäten auf die BMP2-abhängige Signaltransduktion .....	133
7.1.1. Der Bindungsverlust zu BMPRI durch die Mutation BMP2-L51P verhindert die Aktivierung der BMP2-abhängigen Signalwege.....	133
7.1.2. Die verstärkte Interaktion von BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D mit den Typ II-Rezeptoren fördert die BMP2-abhängige Signaltransduktion .....	134
7.2. Die verstärkte Interaktion der BMP2-Mutanten mit den Typ II-Rezeptoren fördert die Differenzierung .....	135
7.3 Schlussfolgerungen .....	140
8. Summary-Zusammenfassung .....	142
8.1. Summary .....	142
8.2. Zusammenfassung .....	143
9. Andere Projekte.....	144
9.1. Feinregulierung des Smad-abhängigen Signalweges durch die „Non-Smad“-Signalwege .....	144
9.2. Sclerostin.....	149
9.3. „The pro-form of BMP2 interferes with BMP2 signaling by competing with BMP2 for IA receptor binding“.....	153
9.4. „Surface immobilization of bone morphogenetic protein 2 via a self-assembled monolayer formation induces cell differentiation“ .....	154
10. Referenzen.....	155
11. Anhang .....	172
Abbildungsverzeichnis .....	172
Abkürzungsverzeichnis .....	174
Tabellenverzeichnis.....	175
Danksagung .....	176
Publikationen.....	177



Lebenslauf .....	178
Erklärung .....	179



# 1. Einleitung

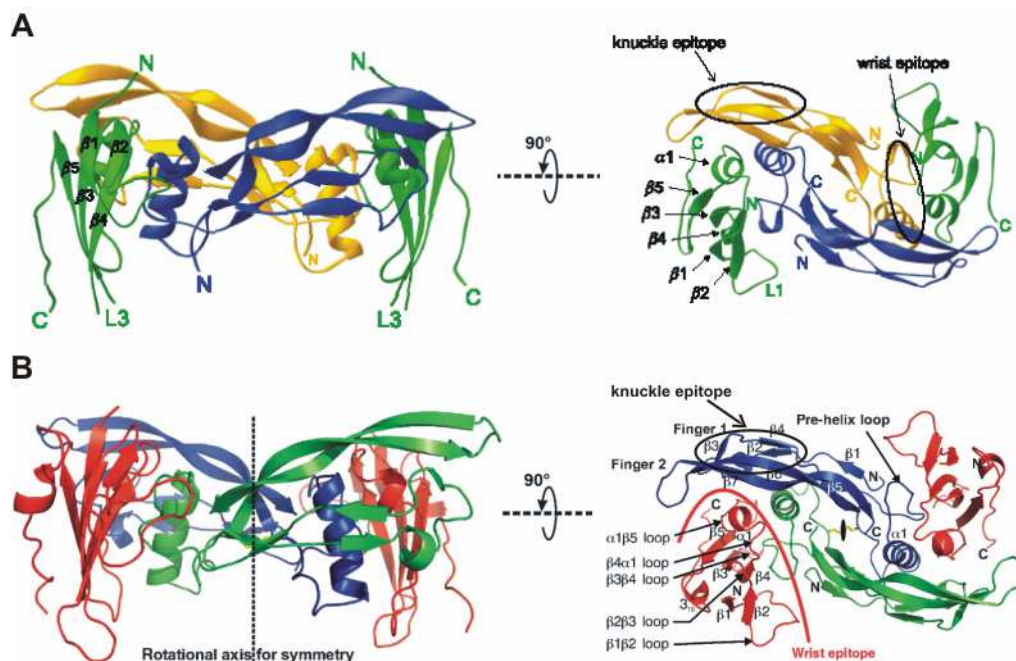
„Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) einschließlich der „Growth and Differentiation Factors“ (GDFs) bilden die BMP-Familie, die Teil der TGF $\beta$ -Superfamilie ist. Sie wurden von Urist als Induktoren der ektopischen Knochenbildung entdeckt (1). Darüber hinaus sind BMPs an der Musterbildung, an der Organogenese von beispielsweise Herz, Lunge und Niere, an der Skelettbildung und Homöostase von Knorpel und Knochen beteiligt (2-4). Sie regulieren dabei die Proliferation, Differenzierung und Migration verschiedener Zelltypen.

Das breite Wirkungsspektrum der BMPs/GDFs basiert auf den über 20 verschiedenen Liganden, die zur BMP-Familie gehören. Sie formen Homo- und Heterodimere, binden mit unterschiedlicher Affinität an die BMP- und Co-Rezeptoren sowie BMP-Antagonisten und aktivieren dadurch unterschiedliche Signalwege. Mutationen und Fehlregulationen der daran beteiligten Komponenten verursachen u. a. Krebs, vaskuläre Erkrankungen, Skelettfehlbildungen und Osteoporose (zusammengefasst in (5-8)).

## 1.1. BMP-Liganden

Die BMP-Monomere enthalten sechs konservierte Cysteine, durch die sie drei intramolekulare Disulfidbrücken, den Cystin-Knoten bilden. Diese sind für die Stabilität des Monomers verantwortlich. Ein weiteres Cystein ist an der Bildung einer intermolekularen Disulfidbrücke beteiligt, so dass die BMPs, mit Ausnahme von GDF3, GDF9 oder GDF9B (9,10). Homo- oder Heterodimere bilden. Die Heterodimere BMP2/BMP6, BMP2/BMP7 sowie BMP4/BMP7 zeigen eine höhere Signalaktivität als die jeweiligen Homodimere und fördern verstärkt die Differenzierung der Osteoblasten sowie die Knorpel- und Knochenbildung (11-14).

Die Kristallstrukturen zeigen, dass sich die Dimere von BMP2, BMP6, BMP7, BMP9 und GDF5 (15-17) ähneln. Sie formen eine schmetterlingsähnliche Struktur, die nach Rotation um die X-Achse zwei linken Händen ähnelt (Abb. 1.1). Zwei „Finger“ werden von den  $\beta$ -Faltblättern zweier antiparalleler  $\beta$ -Faltblatt-Stränge gebildet. Die konvexe Oberfläche der  $\beta$ -Faltblatt-Stränge eines BMP-Monomers ist mit den Knöcheln vergleichbar und wird als „knuckle“-Epitop bezeichnet. Das „Handgelenk“, das „wrist“-Epitop, liegt zwischen der  $\alpha$ -Helix des einen und der konkaven Seite der  $\beta$ -Faltblätter des anderen BMP-Monomers. (Abb. 1.1). Der „Daumen“ entspricht dem N-Terminus des BMP-Monomers.



**Abb. 1.1 Struktur des BMP2- und des GDF5-Dimers gebunden an BMPRI**

A) Abgebildet ist der tetramere Komplex aus BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer (gelb und blau) und zwei extrazellulären Domänen des BMPRIA (grün). Das Modell wurde entlang der X-Achse um 90° gedreht, so dass „wrist“- und „knuckle“-Epitop gut sichtbar sind. B) Dargestellt ist der tetramere Komplex des GDF5<sub>A/B</sub>-Dimer (blau und grün) mit zwei extrazellulären Domänen des BMPRIB (rot) in zwei unterschiedlichen Ansichten. Zusätzlich wurde in der rechten Abbildung das „knuckle“-Epitops hervorgehoben. Abbildungen modifiziert nach (15,16)

BMPs/GDFs werden als Vorläufer-Protein bzw. Prä-Proprotein exprimiert. Es besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid, einem Propeptid und dem reifen C-terminalen Peptid. Das Prä-Proprotein gelangt durch das Signalpeptid zum Endoplasmatischen Reticulum (ER). Beim Transport durch das ER oder den Golgi-Apparat wird das Propeptid durch Convertasen wie z.B. Furin oder SPC (Subtilisin-like-Protein-Convertase) am Erkennungsmotiv „RXXR“ abgespalten (18-20). Die meisten BMPs werden als reife, aktive Homo- oder Heterodimere sekretiert. BMP7, BMP9/GDF2 und GDF8/Myostatin bleiben mit ihren Proproteinen assoziiert und sind trotzdem biologisch aktiv (21-24). Extrazellulär kann die Aktivierung der Signalwege durch die Propeptide oder durch Interaktion mit diesen inhibiert werden (25,26). Einige BMPs sind glycosyliert und werden deshalb bevorzugt von einem bestimmten Rezeptor gebunden. So ist die Glycosylierung des BMP6 am Asparagin 73 beispielsweise für die Interaktion mit dem Activin-Rezeptor Typ I (ActRI) notwendig (27).

Die biologische Funktion einzelner BMPs konnte durch zahlreichen Studien mit „knock out“-Mäusen und die Charakterisierung humaner Phänotypen aufgeklärt werden. Sie sind für die

im Rahmen dieser Arbeit untersuchten BMPs, BMP2, BMP6, GDF5, und die stark homologen Subgruppenmitglieder BMP4 und BMP7 in der Tabelle 1.1 aufgeführt.

**Tab. 1.1 Funktionen ausgewählter BMPs sowie Phänotypen der „knock out“-Mäuse und humane Phänotypen**

Außerdem werden die Kennnummern der BMPs in den Datenbanken „Mouse genome Informatics“ (MGI) und „Online Mendelian Inheritance in Man“ (OMIM) genannt.

<b>BMPs</b>	<b>Funktion</b>	<b>„knock out“-Maus</b>	<b>humane Phänotypen</b>
<b>BMP2</b>	beteiligt an der Entwicklung von Herz und Extremitäten (Regulation der Fingeranzahl, Apoptose in den Fingerzwischenräumen, Osteogenese, Gelenkentwicklung), Frakturheilung	<i>BMP2</i> <sup>-/-</sup> : Tod zwischen E7.5-9 durch Fehlbildung des Amnions und des Herzens (MGI: 88177)	geringe Knochendichte, osteoporotische Frakturen, Spalten in Mund-/Kieferbereich (OMIM 112261)
<b>BMP4</b>	beteiligt an Neurogenese, Entwicklung der Extremitäten und des Skeletts, der Augen, Nieren, Frakturheilung	<i>BMP4</i> <sup>-/-</sup> : früher Tod während der Embryogenese, Fehler bei der Differenzierung des Mesoderms; <i>BMP4</i> <sup>+/-</sup> : Fehlentwicklungen des Nervensystems, der Extremitäten, des Skeletts, der Augen und der Nieren (MGI: 88180)	Fehlbildungen und Entwicklungsstörungen der Augen, Spalten in Mund-/Kieferbereich (OMIM 112262)
<b>BMP6</b>	beteiligt an Osteogenese, Frakturheilung und Eisenhomöostase	<i>BMP6</i> <sup>-/-</sup> : verzögerte Ossifikation des Sternums, Hämochromatose (MGI: 88182)	bisher keine bekannt (OMIM 112266)

<b>BMP7</b>	beteiligt an Osteogenese, Entwicklung der Augen und der Nieren, Frakturheilung	<i>BMP7</i> <sup>-/-</sup> : Tod kurz nach der Geburt; zahlreiche Fehlbildungen von Knorpel und Knochen, renale Dysplasien, Defekte der Augen (MGI: 103302)	bisher keine bekannt (OMIM 112267)
<b>GDF5/ BMP14</b>	beteiligt an Chondrogenese, Bildung und Homöostase der Gelenke	<i>GDF5</i> <sup>-/-</sup> : Brachypodismus (Verkürzung der langen Knochen, Fusionen der Gelenke), Osteoarthritis (MGI: 95688)	Acromesomale Dysplasie (Hunter-Thompson-Typ), Chondrodysplasie (Grebe- Typ), Brachydactyly Typ A2 und C, Fibuläre Hypoplasie und komplexe Brachydactyly, Multiple Synostoses Syndrom, Symphalangismus, Osteoarthritis (OMIM 601146)

## 1.2. BMP-Rezeptoren

Die Mitglieder der BMP-Familie binden an die BMP Typ I und Typ II-Rezeptoren. Dabei kann ein Ligand der BMP/GDF-Subfamilie mit verschiedenen Typ I und Typ II-Rezeptoren interagieren. Andererseits bindet ein BMP-Rezeptor nicht nur einen bestimmten BMP/GDF-Liganden, sondern verschiedenen Mitglieder der BMP/GDF-Subfamilie. Die BMP Typ I und Typ II-Rezeptoren zählen zu den Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren und können wie ihre Liganden Homo- und Heterodimere bilden (12,28,29). Zu den Typ I-Rezeptoren gehören ActRI/ALK2, BMPRIA/ALK3 und BMPRII/ALK6. Zu den Typ-II-Rezeptoren zählen BMPRII, ActRII und ActRIIB. Einige BMPs/GDFs binden auch an Typ I-Rezeptoren, die als Rezeptoren der Activin-/TGF $\beta$ -Subfamilie eingeordnet werden. So interagieren BMP9, BMP10 sowie GDF8 mit ALK1 und GDF8 und GDF9 mit TGF $\beta$ RI/ALK5. Andererseits bindet TGF $\beta$  an die heteromeren Rezeptorkomplexe ALK2/ALK5/TGF $\beta$ RII und ALK3/ALK5/TGF $\beta$ RII und somit an die Rezeptoren ActRI/ALK2 und BMPRIA/ALK3, die der BMP/GDF-Subfamilie zugeordnet werden (30). Durch diese verschiedenen Ligand-Rezeptor-Kombinationen entsteht eine große Vielfalt heterooligomerer Komplexe, die

unterschiedliche Signalwege aktivieren oder im Fall von BMP3 auch zur Inhibierung der BMP-abhängigen Signaltransduktion beitragen (31).

Beide BMP-Rezeptor-Typen bestehen aus einer extrazellulären Ligand-Bindungsdomäne, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Zusätzlich enthalten die Typ I-Rezeptoren N-terminal zur Serin/Threonin-Kinase eine Serin/Glycin (SGSGSG)-reiche Region, die GS-Domäne, in der die Typ I-Rezeptoren von der konstitutiv aktiven Serin/Threonin-Kinase der Typ II-Rezeptoren phosphoryliert werden. Die Typ I-Rezeptoren können dann die dort assoziierten R-Smads phosphorylieren (32,33).

Der Typ II-Rezeptor BMPRII phosphoryliert sich selbst (Autophosphorylierung) und die Typ I-Rezeptoren (34). Er existiert im Gegensatz zum ActRII und ActRIIB in den zwei Spleiß-Varianten BMPRII-LF („BMPRII long form“) und BMPRII-SF („BMPRII short form“). BMPRII-LF enthält im Vergleich zu den anderen Typ II-Rezeptoren einen C-terminalen „tail“, der mit zahlreichen Proteinen wie cGKI, Dullard, Lim-Kinase 1, C-Src, Tctex-1, Trb3 interagiert. Die mit dem BMPRII-„tail“ assoziierten Proteine können die BMP-abhängige Signaltransduktion z.B. durch Phosphorylierung der Rezeptoren, Assoziation und Aktivierung der an den „Non-Smad“-Signalwegen beteiligten Kinasen und Unterstützung der Smad-abhängigen Signaltransduktion beeinflussen (35-40).

Die biologischen Funktionen ausgewählter BMP-Rezeptoren sind in der Tabelle 1.2 dargestellt.

**Tab. 1.2 Funktionen der BMP-Rezeptoren sowie Phänotypen der „knock out“-Mäuse und humane Phänotypen**

<b>BMPs</b>	<b>Funktion</b>	<b>„knock out“ Maus</b>	<b>humane Phänotypen</b>
<b>BMPRIA</b>	beteiligt an der dorsaloventralen Musterbildung, an der Entwicklung der Extremitäten, Chondrogenese, Osteogenese, Frakturheilung	<i>BMPRIA</i> <sup>-/-</sup> : Tod um E9.5 durch fehlendes Mesoderm (MGI 1338938)	Juveniles Polyposis Syndrom, Polyposis Syndrom (OMIM 601299)

<b>BMPs</b>	<b>Funktion</b>	<b>„knock out“ Maus</b>	<b>humane Phänotypen</b>
<b>BMPRII</b>	beteiligt an Entwicklung der Extremitäten (Chondro- und Osteogenese), der Reproduktion	<i>BMPRII</i> <sup>-/-</sup> : Brachydactyly, fehlende Knorpelbildung bei der Fingerentwicklung, Infertilität (MGI: 107191)	Brachydactyly Typ A2, Acromesomale Chondrodysplasie (OMIM 603248)
<b>ActRII</b>	beteiligt an embryonaler Musterbildung	<i>ActRII</i> <sup>-/-</sup> : Anomalien des Skeletts und des Gesichts, eingeschränkte Reproduktionsfähigkeit der adulten Tiere (MGI: 102806)	bisher keine bekannt (OMIM 102581)
<b>ActRIIB</b>	beteiligt an embryonaler Musterbildung	<i>ActRIIB</i> <sup>-/-</sup> : Tod kurz nach Geburt durch Defekte des Herzens, Anomalien der links/rechts-Asymmetrie und des axialen Skeletts (MGI: 87912)	Heterotaxie (OMIM 602730)
<b>BMPRII</b>	beteiligt an Gastrulation, Regulation des vaskulären Tonus	<i>BMPRII</i> <sup>-/-</sup> : Tod vor E9, da weder organisierte Strukturen noch Mesoderm gebildet werden können (MGI: 1095407)	Pulmonäre Hypertension, (OMIM 600799)

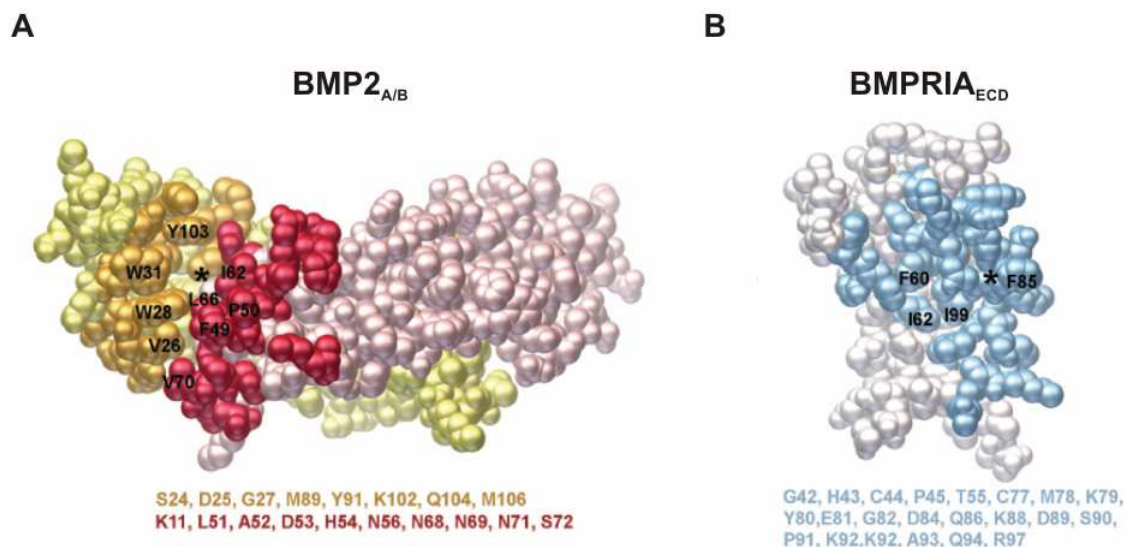


## 1.3. Einfluss der Ligand-Rezeptor-Komplexe auf die Signaltransduktion

### 1.3.1. Ligand-Rezeptor-Interaktion

Die BMP/GDF-Dimere bilden mit den Typ I- und Typ II-Rezeptoren einen heterooligomeren Komplex (41,42). Während in der Regel zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren für die Signaltransduktion erforderlich sind, reicht im Fall von BMP2 die Interaktion mit einem Typ I-Rezeptor und einem Typ II-Dimer aus (43).

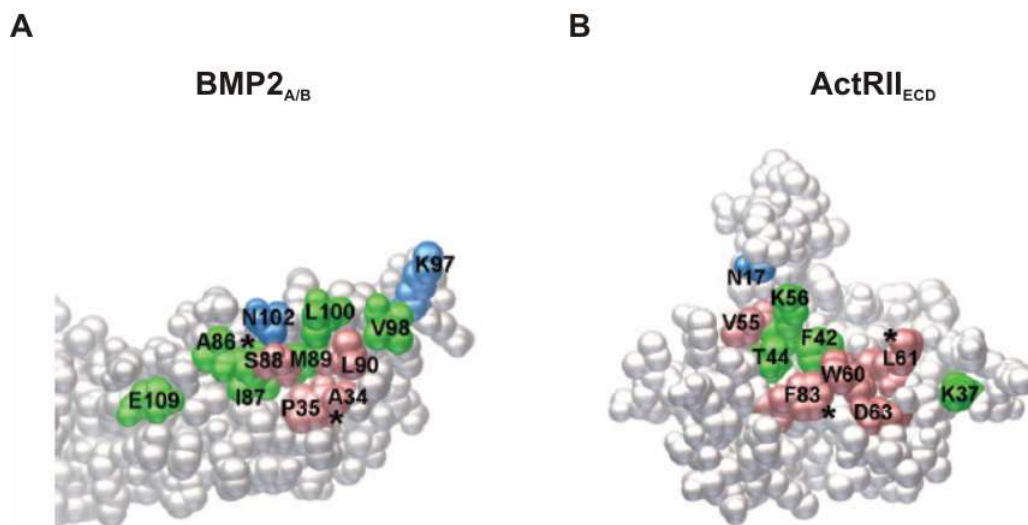
Die Kristallstrukturen des ternären BMP2:BMPRIA:ActRII-Komplexes zeigen, dass die Ligand-Rezeptor-Interaktionen überwiegend auf hydrophoben Kontakten basieren (41,42). In der BMP2-BMPRIA-Interaktionsstelle formen die Aminosäuren Phenylalanin 49 und Prolin 50 im „pre-helix loop“ des BMP2 eine hydrophobe Tasche, die mit Isoleucin 62, Phenylalanin 60 und Isoleucin 99 des BMPRIA interagiert (Abb. 1.2). Eine weitere Interaktion entsteht durch Phenylalanin 85 in der  $\alpha$ -Helix 1 des BMPRIA, das sich in einem „knob-into-hole“ Mechanismus zwischen Isoleucin 62, Leucin 66 und Valin 70 der  $\alpha$ -Helix 3 eines BMP2-Monomers und der konvexen Oberfläche mit Valin 26, Tryptophan 28, Tryptophan 31 und Tyrosin 103 des anderen BMP2-Monomers einlagert (15,41,44).



**Abb. 1.2 BMP2-BMPRIA-Interaktionsflächen**

Die Kugelmodelle der A) BMP2- und B) BMPRIA-Interaktionsflächen zeigen die Aminosäurereste des BMP2-Dimers (rot und orange) (A) sowie der extrazellulären Domäne (ECD) des BMPRIA (blau) (B). Die an den hydrophoben Taschen beteiligten Aminosäuren sind in den Modellen beschriftet. Die übrigen Aminosäurereste der Interaktionsflächen werden unter den Modellen genannt. Abbildungen modifiziert nach (41).

Die hydrophobe BMP2-ActRII-Interaktionsstelle entsteht bei der Interaktion der konvexen Oberfläche der  $\beta$ -Faltblatt-Stränge des BMP2 mit der konkaven Oberfläche der drei  $\beta$ -Faltblatt-Stränge des ActRII/B. Dabei füllt das Tryptophan 60 des ActRII die aus Alanin 34, Prolin 35, Serin 88, Leucin 90 und Leucin 100 vorgeformte Vertiefung des BMP2 aus (Abb. 1.3). Zusätzlich werden im „wrist“-Epitop zwischen dem Leucin 51 des BMP2 und dem Glutamin 86 des BMPRIA sowie im „knuckle“-Epitop zwischen dem Serin 88 des BMP2 und Leucin 61 des ActRII/B sowie der Glutaminsäure 109 des BMP2 und Lysin 37 des ActRII/B Wasserstoffbrückenbindungen gebildet (41,42).



**Abb. 1.3 BMP2-ActRII-Interaktionsflächen**

Die Kugelmodelle der A) BMP2- und B) ActRII-Interaktionsflächen zeigen die Aminosäurereste des BMP2-Dimers (A) sowie der ActRII<sub>ECD</sub> (B). Die in BMP2, BMP7 und Activin bzw. ActRII und ActRIIB identischen (pink), hoch-konservierten (grün) und nicht-konservierten Aminosäuren (blau) sind in den Modellen beschriftet. Abbildungen modifiziert nach (41).

In beiden Ligand-Rezeptor-Interaktionsstellen sind die zentralen Aminosäuren hochkonserviert. Die unterschiedlichen Affinitäten der BMPs/GDFs zu den Rezeptoren entstehen durch die peripher gelegenen, wenig konservierten Aminosäuren (41,42). Entsprechend den Affinitäten zu den BMP-Rezeptoren lassen sich die Mitglieder der BMP/GDF-Subfamilie in weitere Subgruppen unterteilen. So können BMP2, BMP4 und GDF5 sowie BMP6 und BMP7 zu je einer Subgruppe zusammengefasst werden. BMP2, BMP4 und GDF5 binden die Typ I-Rezeptoren BMPRIA und BMPRIB mit hoher und die Typ II-Rezeptoren mit geringer Affinität (vgl. Dissoziationskonstanten  $K_D$  in der Tab. 1.3) (44,45). Die Affinität des GDF5 zum BMPRIB ist höher als die zum BMPRIA, während BMP2 BMPRIA und BMPRIB mit vergleichbarer Affinität bindet (Tab. 1.3) (45).

**Tab. 1.3 Affinitäten von BMP2 und GDF5 zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren**

Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Surface Plasmon Resonance (SPR)-Messungen ermittelten Bindungsaffinitäten von BMP2 oder GDF5 zu den immobilisierten extrazellulären Domänen (ECD) der BMP-Rezeptoren. k. A. = keine Angaben

Ligand	$K_D$ [nM]					Referenz
	BMPRIA	BMPRIB	BMPRII	ActRII	ActRIIB	
<b>BMP2</b>	0,8	2,4	45	14	6,3	(44,45)
<b>GDF5</b>	16,2	1,3	65,8	k. A.	k. A.	(16)

BMP6 und BMP7 binden mit hoher Affinität den BMPRIB, aber auch die Typ II-Rezeptoren ActRII und ActRIIB (Tab. 1.4) (17,27). Diskutiert wird die Affinität von BMP6 und BMP7 zum BMPRIA (Tab. 1.4). Allendorph et al. detektierten durch SPR-Messungen mit immobilisiertem BMPRIA eine 10fach geringere Affinität von BMP6 und BMP7 zum BMPRIA als zum ActRII (Tab. 1.4 oben) (17). Im Gegensatz dazu ermittelten Saremba et al. durch SPR-Messungen mit immobilisierten Liganden ähnliche Affinitäten von BMP6 und BMP7 zum BMPRIA wie zum ActRII (Tab. 1.4 unten) (27). Im Kontrast zu BMP2 und BMP4 können BMP6 und BMP7 auch den ActRI binden (27).

**Tab. 1.4 Affinitäten von BMP2, BMP6, BMP7 zu den BMP-Rezeptoren**

Dargestellt sind die von Allendorph et al. (17) (obere Tabelle) und Saremba et al. (27) (untere Tabelle) publizierten Mittelwerte der mittels SPR-Messungen ermittelten Bindungsaffinitäten. Allendorph et al. (17) (obere Tabelle) bestimmten die Affinitäten der BMPs zu den BMP-Rezeptoren, indem sie die ECDs der Rezeptoren immobilisierten. Im Gegensatz dazu immobilisierten Saremba et al. (27) (untere Tabelle) die BMPs. k. A. = keine Angaben

Ligand	$K_D$ [nM]					Referenz
	BMPRIA	BMPRIB	BMPRII	ActRII	ActRIIB	
<b>BMP2</b>	2,61	k. A.	k. A.	47,5	36,1	(17)
<b>BMP6</b>	67,2	k. A.	k. A.	7,39	6,87	(17)
<b>BMP7</b>	1680	k. A.	k. A.	3,49	7,72	(17)

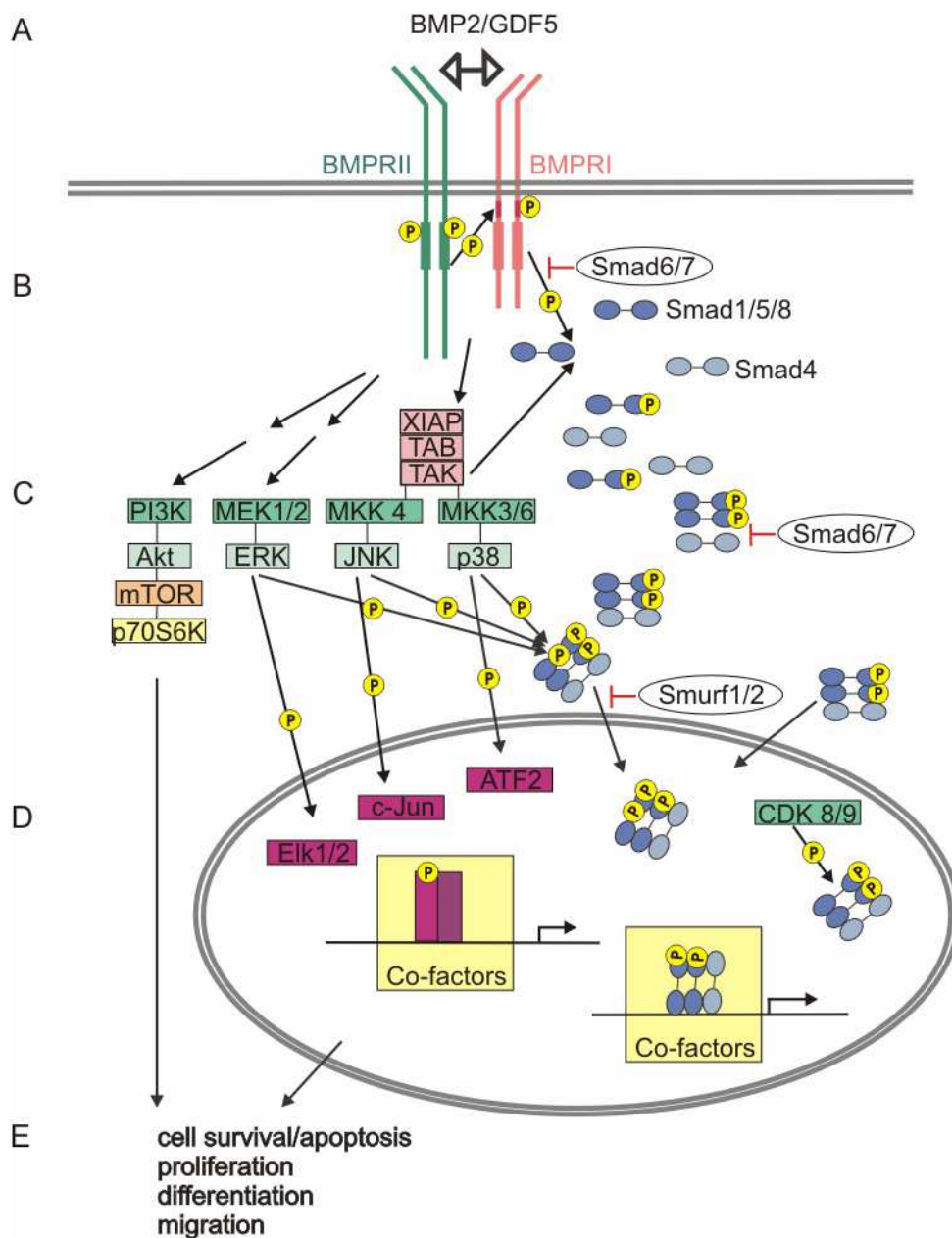
Ligand	$K_D$ [μM]					Referenz
	BMPRIA	BMPRIB	BMPRII	ActRII	ActRIIB	
<b>BMP2</b>	0,015	0,095	k. A.	3,8	k. A.	(27)
<b>BMP6</b>	1,6	0,39	k. A.	0,9	k. A.	(27)
<b>BMP7</b>	10	1,1	k. A.	4,5	k. A.	(27)

Die Bindung der BMPs/GDFs an die BMP-Rezeptoren und die Aktivierung der BMP-abhängigen Signalwege ist für die Stimulation mit BMP2 besonders gut charakterisiert. BMP2 interagiert mit den Rezeptoren über einen präformierten Komplex („preformed complex“, PFC) aus je zwei Typ I- und Typ II-Rezeptoren oder sequentiell, indem BMP2 erst hochaffin an den BMPRI bindet und dann den niedrigaffin gebundenen Rezeptortyp II in den „BMP induced signalling complex“ (BISC) rekrutiert. Diese zwei unterschiedlichen Arten der Ligand-Rezeptor-Aktivierung regulieren die Aktivierung des Smad-abhängigen oder der „Non-Smad“-Signalwege (Abb. 1.4) (46-48).

### **1.3.2. Smad-abhängiger Signalweg**

Smads werden in rezeptor-aktivierte Smads (R-Smads), „common-mediator“ Smads (Co-Smad) und in inhibierende Smads (I-Smads) unterteilt. R- und Co-Smads bestehen aus der N-terminalen Mad homology 1 (MH1)-Domäne, dem Smad-Linker sowie der MH2-Domäne. I-Smads enthalten keine MH1-, sondern nur die MH2-Domäne. Die MH1-Domäne inhibiert die Aktivität der MH2-Domäne im Zytoplasma und interagiert mit der DNA. Die MH2-Domäne hingegen bindet die Typ I-Rezeptoren und ist an der Bildung von homo- und heterodimeren Smad-Komplexen beteiligt (32).

Nach Bindung der BMPs an die PFCs phosphoryliert die konstitutiv aktive Kinase der Typ II-Rezeptoren die GS-Box der Typ I-Rezeptoren. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung der Typ I-Rezeptoren und zur C-terminalen Phosphorylierung im „SSXS“-Motiv der mit den Typ I-Rezeptoren assoziierten R-Smads (Abb. 1.4). Die Spezifität der Smad-Rezeptor-Interaktion wird vom „L45-loop“, einer acht Aminosäure umfassende Region in der Kinase-Domäne der aktivierten Typ I-Rezeptoren, sowie dem „L3-loop“ in der MH2-Domäne der R-Smads reguliert (32,49,50). Die aktivierten BMP Typ I-Rezeptoren phosphorylieren überwiegend die R-Smads 1/5/8, während die aktivierten Activin/ TGFβ-Rezeptoren ActR-IB/ALK4, TGFβRI/ALK5 und ALK7 die R-Smads 2/3 phosphorylieren. Durch den Rezeptorkomplex ALK5/TGFβRII können auch die R-Smads 1/5/8 phosphoryliert werden (51,52). Die Inkubation mit BMP2 oder BMP9 kann ebenfalls zur Aktivierung der Smads 2/3 führen (53,54).



**Abb. 1.4 Schema der BMP2-abhängigen Signaltransduktion**

A) Nachdem BMP2 an den heterotetrameren Komplex der BMP-Rezeptoren gebunden haben, B) wird einerseits BMPRI durch den BMPRII phosphoryliert und aktiviert. Daraufhin kann BMPRI Smad 1/5/8 phosphorylieren, die mit Smad 4 im Komplex in den Nucleus translozieren. C) Andererseits werden nach Ligand-Rezeptor-Interaktion der Rezeptor-assoziierte XIAP/TAB/TAK1-Komplex und andere Rezeptor-assoziierte Proteine aktiviert, die an der Aktivierung der „Non-Smad“-Signalkaskaden beteiligt sind. TAK1 kann wie BMPRI Smad 1/5/8 am C-Terminus phosphorylieren. Anschließend können die MAP-Kinasen die aktivierten Smads im Smad-Linker phosphorylieren und so für den proteosomalen Abbau markieren. D) Die Aktivierung der Smad-abhängigen und „Non-Smad“-Signalwege führt in Gegenwart von Co-Faktoren zur Transkription der Zielgene. E) Diese können Apoptose, Wachstum, Differenzierung und Migration der Zellen regulieren.

Die BMP-Rezeptoren und die assoziierten Smads 1/5/8 werden durch clathrin-abhängige Endocytose internalisiert (47). R-Smads dissoziieren von den Rezeptoren und bilden mit dem Co-Smad 4 einen heteromeren Komplex, der in den Nukleus transloziert (Abb. 1.4) (47). Endofin, ein endosom-assoziiertes FYVE-Domäne-Protein, kann die Smad-Phosphorylierung und Smad-Translokation in den Nukleus unterstützen (55). Im Nukleus binden Smads in Gegenwart von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren an die „Smad binding elements“ (SBE) und induzieren die Transkription der Zielgene (Abb. 1.4) (56-60). Zu den Zielgenen zählen auch die I-Smads Smad 6 und Smad 7, die Teil der negativen „feedback“-Hemmung sind. Smad 6 und Smad 7 befinden sich im Nukleus und gelangen nach BMP-Stimulation in das Zytoplasma. Dort verhindern Smad 6 und Smad 7 die Bindung der R-Smads an den aktivierten Typ I-Rezeptor oder die Komplexbildung der R-Smads mit Smad 4 (61). Smad7 kann außerdem durch die Interaktion mit Protein-Phosphatase 1 (PP1) die Dephosphorylierung und Deaktivierung von BMPRI auslösen und zur Aktivierung der HECT Typ E3 Ligasen Smurf1 und Smurf2 (Smad ubiquitination regulation factors) beitragen, die die Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation der im Smad-Linker phosphorylierten R-Smads, der BMP-Rezeptoren und von Runx2, einem BMP „target gene“, induzieren (62-66). Weiterhin kann Smad 6 im Nukleus durch die Interaktion mit der Histon-Deacetylase und Hoxc8 die Smad-abhängige Transkription verhindern (63).

Die Aktivität der Smads wird außerdem durch Rezeptor-assoziierte Proteine, Kinasen und Phosphatasen reguliert. cGKI beispielsweise interagiert mit BMPRII und phosphoryliert diesen. Nach Bindung des BMP2 an BMPRI und BMPRII dissoziiert die cGKI vom BMPRII und bindet die phosphorylierten R-Smads und Smad 4. Mit dem Smad-Komplex transloziert sie in den Nukleus und fördert mit TF II-I die Smad-abhängige Transkription der Zielgene (36). Trb3 bindet an den BMPRII und dissoziiert wie cGKI nach BMP2-Stimulation vom Rezeptor. Es induziert die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau der HECT E3-ligase Smurf1, so dass die Ubiquitinierung von R-Smads verhindert und die Smad-abhängige Signaltransduktion erleichtert wird (35). Die Serin/Threonin-Phosphatase PP2A verhindert ebenfalls den Abbau der R-Smads. Sie ist mit BMPRI und BMPRII assoziiert und dephosphoryliert Smad 1/5/8 am C-Terminus, aber hauptsächlich in der Smad-Linker-Region. Die Dephosphorylierung des Smad-Linkers verhindert den Abbau der Smads und ermöglicht die nukleäre Translokation sowie die Transkription Smad-abhängiger Zielgene (67). Im Nukleus werden die R-Smads durch die Phosphatasen PDP (Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase) und PPM1A am C-Terminus und durch SCP („small c-terminal domain phosphatase“) am C-Terminus sowie in der Linker-Region dephosphoryliert (68-71). Nach

dem Export können die R-Smads aus dem Nukleus erneut von den Typ I-Rezeptoren durch die C-terminale Phosphorylierung aktiviert werden.

Smads spielen bei der Embryogenese eine wichtige Rolle, so dass der „knock out“ der R-Smads zum Tod während der Embryonalentwicklung führt (Tab. 1.5).

**Tab. 1.5 Phänotypen der „knock out“-Mäuse von R-Smads 1/5/8 und Smad 4**

Smads	„knock out“ Maus
<b>R-Smad 1</b>	<i>Smad 1</i> <sup>-/-</sup> : Tod um E9-10; eingeschränkte Bildung der Allantois und Fehlen der Plazenta (MGI: 109452)
<b>R-Smad 5</b>	<i>Smad 5</i> <sup>-/-</sup> : Tod um E10.5-11.5; vaskuläre und craniofaciale Defekte, Defekte des Neuralrohres, der Urkeimzelle (MGI: 1328787)
<b>Co-Smad 4</b>	<i>Smad 4</i> <sup>-/-</sup> : Tod vor der Gastrulation; eingeschränkte Bildung der extraembryonalen Membran und des Endoderms (MGI: 894293)
<b>I-Smad 6</b>	<i>Smad 6</i> <sup>-/-</sup> : gewöhnlich postnatale Sterblichkeit; Hyperplasie der Herzklappen, Ossifikation der Aorta, Bluthochdruck (MGI: 1336883)
<b>I-Smad 7</b>	<i>Smad 7</i> <sup>-/-</sup> : Anomalien der B-Zellen, reduzierte Körpergröße (MGI: 1100518)

### 1.3.3. „Non-Smad“-Signalwege

„Non-Smad“-Signalwege werden durch die liganden-induzierte Oligomerisierung der Rezeptoren aktiviert. Ihre Aktivierung wurde vor allem nach Stimulation mit TGFβ oder BMP2 detektiert. BMP2 bindet zuerst an den hochaffinen BMPRI und rekrutiert dann den mit geringer Affinität gebundenen BMPRII in den ternären Komplex, den „BMP-induced signaling complex“ (BISC). Die Rezeptoren werden durch „Caveolae“ internalisiert, und die „Non-Smad“-Signalwege werden aktiviert (47,72).

Mit BMPRI ist XIAP („X-chromosome linked Inhibitor of Apoptosis“) assoziiert, der die BMP-Rezeptoren mit dem TAB/TAK1-Komplex (TAB: „TAK Binding Protein“; TAK: „TGF $\beta$ -Activated Kinase“) verbindet (Abb. 1.4). TAK1 aktiviert die Kinasen MKK3/6 und MKK4, durch die p38 und JNK (c-Jun-N-terminal-Kinase) phosphoryliert werden (72-76). Nach BMP2-Stimulation kann ERK1/2 über den Ras/MEK1-Weg aktiviert werden (77-81). Nach Translokation in den Nukleus können p38, JNK und ERK die Transkriptionsfaktoren ATF-2, c-Jun und c-Fos, aber auch Runx2, Osterix, Dlx5 aktivieren (73,78,82-84). Sie induzieren die Transkription der Zielgene, zu denen u. a. *Id1*, *Xvent-1*, *Smad 6* und *Msx-1/-2* gehören (59,61,85-88).

Außerdem kann BMP2 die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalkaskade induzieren (89-91). Der Mechanismus für die BMP2-abhängige Aktivierung von PI3K ist noch nicht genau bekannt. PI3K phosphoryliert das Phosphatidylinositol an der dritten Position. Phosphatidylinositol-(3,4)-diphosphat und Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat werden von den „Pleckstrin Homology“-Domänen von Akt und der konstitutiv aktiven PDK gebunden. Akt und PDK werden so zur Plasmamembran rekrutiert und in die räumliche Nähe zueinander gebracht. Dadurch kann PDK1 Akt in der Kinase-Domäne am Threonin 308 und PDK2 Akt C-terminal am Serin 473 phosphorylieren. Erst nach Phosphorylierung des S473 erhält Akt seine vollständige Aktivität und kann als Serin/Threonin-Kinase andere Proteine wie z.B. GSK3 phosphorylieren (92).

Die Aktivierung dieser „Non-Smad“-Signalkaskaden hat unterschiedliche Auswirkungen, die u. a. abhängig vom Zelltyp sind. So können p38 und Akt einerseits die Apoptose regulieren (93-97). Andererseits können p38 und PI3K durch Interaktion und Aktivierung aktinbindender Proteine, wie z. B. Hsp25 oder der BMPRII-assoziierten LIM-Kinase, sowie durch Aktivierung der „small RhoGTPases“ die Reorganisation des Zytoskeletts und die Migration steuern (40,98,99). Zudem fördern die MAPK wie auch die PI3K/Akt-Signalkaskade die Transkription chondrogener und osteogener Marker, wie *Kollagen Typ I (Colla1)*, *Osteopontin (Opn)*, *Osterix (Sp7)*, *Osteocalcin (Ocn)* und die *Alkalische Phosphatase (ALP)*, und beeinflussen somit die Differenzierung der Zellen (75,78,82,100-103).



## 1.4. Feinregulierung der BMP/GDF-Signaltransduktion

### 1.4.1. Gegenseitige Regulierung von Smad-abhängigen und „Non-Smad“-Signalwegen

Smad-abhängige und „Non-Smad“-Signalwege werden durch die Bildung unterschiedlicher Ligand-Rezeptor-Komplexe aktiviert (vgl. 1.3.2 und 1.3.3). Trotzdem können sie sich gegenseitig auf den verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion beeinflussen.

Mit den BMP-Rezeptoren interagiert beispielsweise der XIAP/TAB/TAK1-Komplex, der nach Bindung der BMPs an die Rezeptoren aktiviert wird. Tak1 aktiviert einerseits die MKK/MAPK-Signalkaskade (vgl. 1.3.3) und andererseits durch die Phosphorylierung der R-Smads am C-Terminus den Smad-abhängigen Signalweg (104). Dadurch kann vermutlich die C-terminale Phosphorylierung der Smads auch nach Überexpression des kinase-defizienten BMPRII beobachtet werden (46,104). Die Phosphorylierung der Smads erfolgt sequentiell (80,105). BMPRI oder TAK1 phosphorylieren R-Smads C-terminal im „SSXS“-Motiv. Dadurch werden die R-Smads aktiviert. Dann können R-Smads mit Co-Smad 4 einen Komplex bilden und nach Interaktion mit Nukleopodin Nup124 in den Nukleus translozieren (Abb. 1.4) (106). Im Nukleus können R-Smads von den „cyclin-dependent kinases“ CDK 8/9 in der Smad-Linker Region phosphoryliert werden, wodurch die Bindung an Co-Faktoren wie YAP (Yes-associated protein) und die Smad-abhängige Transkription gefördert wird (107).

Andererseits können C-terminal phosphorylierte Smads im Zytoplasma durch „Epidermal Growth Factor“ (EGF), „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF), „Fibroblast Growth factor“ (FGF) oder „Insulin-like Growth Factor“ (IGF) induzierte MAP-Kinasen an den Serin-Resten S187, S196, S206 und S214 der vier „PX(S/T)P“-Motive phosphoryliert werden (108,109). Die so markierten Smads werden von der GSK3 erkannt und an den Serin/Threonin-Resten S192, T202 und S210 phosphoryliert (110). Dadurch kann die HECT E3 Ubiquitin-Ligase Smurf 1 mit ihrer WW-Domäne an das „PPAY“-Motiv im Smad-Linker binden und R-Smads für den proteasomalen Abbau markieren. Die Aktivität der GSK3, durch die Smads für den Abbau im Proteasom markiert werden, wird durch den kanonischen Wnt-Signalweg (vgl. 1.5.3.2) und durch die Kinasen Akt und ERK, die auch durch BMP-Stimulation aktiviert werden können, inhibiert (77,105,111). Demnach induzieren BMPs den Smad-abhängigen Signalweg. Durch die gleichzeitige Aktivierung der Smad-unabhängigen Signalwege können BMPs die Aktivität der Smads feiner regulieren. Außerdem induzieren BMPs die Expression der Transkriptionsfaktoren *Runx2*, *Dlx* und *Osx*. Ihre Aktivität wird durch die Interaktion mit

den R-Smads oder durch die p38 MAPK abhängige Phosphorylierung erhöht (73,82,84,103,112).

### 1.4.2. Co-Rezeptoren

Neben den BMP-Rezeptoren wird die BMP-abhängige Signaltransduktion auch durch Co-Rezeptoren beeinflusst. Von ihnen wirken Betaglycan (auch TGF $\beta$ -Rezeptor Typ III genannt), Endoglin, die „Repulsive Guidance Molecule“ (RGM)-Familie sowie c-Kit aktivierend auf die BMP-induzierte Signaltransduktion, während BAMBI („BMP and activin membrane-bound inhibitor“) und Ror2 inhibierend sind.

Betaglycan und Endoglin haben eine lange extrazelluläre und eine kurze zytoplasmatische Domäne ohne Kinase-Aktivität. Betaglycan bindet die BMPs BMP2, BMP4, BMP7 und GDF5, fördert die Interaktion zwischen BMP2 und den Rezeptoren BMPRIA und BMPRIB und unterstützt die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges. Es wird ubiquitär exprimiert und ist an der vaskulären Entwicklung beteiligt (113). Wie Betaglycan ist auch Endoglin an der vaskulären Entwicklung beteiligt. Es interagiert in Gegenwart der jeweiligen BMP-Rezeptoren direkt oder indirekt mit BMP7 oder BMP9 und verstärkt die Smad-abhängige Signaltransduktion. (114-116). RGMa und RGMb/Dragon werden im Nervensystem exprimiert, während RGM3c/Hemjuvelin in Leber, Herz und Skelettmuskel exprimiert werden. RGMa-c binden BMP2, BMP4 und BMPRI und unterstützen so die Smad-abhängige Signaltransduktion (117-119). Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor c-Kit hingegen bindet in Gegenwart von BMP2 oder BMP2 und SCF, dem Liganden von c-Kit, den BMPRII-„tail“ (34). Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit BMP2 und SCF führt im Vergleich zur BMP2-Stimulation zu einem früheren Anstieg der p-Smad 1/5/8-Konzentration und beeinflusst die Kinetik ERK-Aktivierung (34).

BAMBI ist ein Pseudorezeptor, der während der Embryogenese mit BMP4 co-exprimiert wird und wie die BMP/TGF $\beta$ -Typ I-Rezeptoren eine Transmembran-Region und eine extrazelluläre Domäne (ECD) hat. Im Vergleich zu den Typ I-Rezeptoren fehlt BAMBI die intrazelluläre Kinase-Domäne. Inhibiert wird die BMP-, Activin- und TGF $\beta$ -abhängige Signaltransduktion, indem BAMBI intrazellulär mit den Typ I-Rezeptoren wie BMPRIA und BMPRIB interagiert und die Rezeptorkomplexbindung verhindert (120).

Neben BAMBI kann BMPRIB auch vom Tyrosin-Kinase-Rezeptor Ror2 gebunden werden. Dadurch wird die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges und somit die

Chondrogenese gehemmt. Nach Überexpression von BMPRII oder Ror2 allein sind keine Veränderungen der GDF5 induzierten Chondrogenese zu beobachten (121).

### 1.4.3. BMP/GDF-Antagonisten

BMP/GDF-Antagonisten werden wie BMPs räumlich und zeitlich begrenzt exprimiert. Sie tragen zur Feinregulation der BMP-Signaltransduktion bei. Wie BMPs besitzen die BMP-Antagonisten eine Cystein-reiche Domäne, durch die sie einen Cystin-Knoten bilden und andere Proteine binden können. Entsprechend der am Cystin-Knoten beteiligten Cysteine werden sie in die Dan-Familie („eight-member ring“), die Twisted-Gastrulation-Familie („nine-member ring“) und die Noggin-Chordin-Familie („ten-member ring“) unterschieden. Zu den einzelnen Familien gehören die in der Tab.1.6 genannten Mitglieder (122).

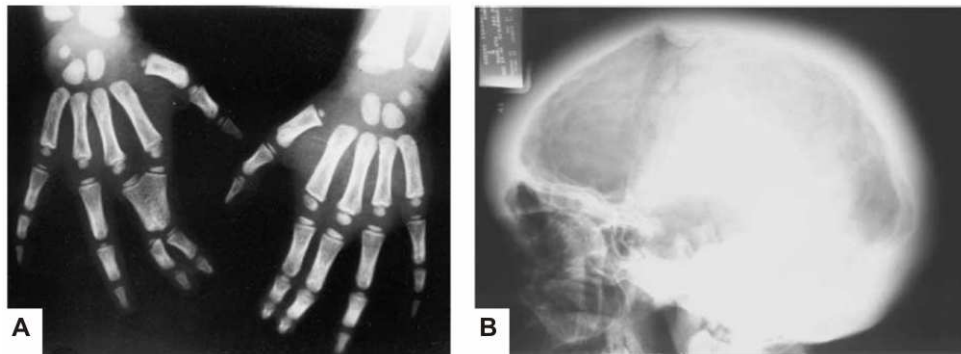
**Tab. 1.6 Die Familien der BMP-Antagonisten**

<b>Familie</b>	<b>BMP-Antagonisten</b>
<b>Dan-Familie</b>	Dan, Cerberus, Coco, PRDC, Gremlin, Dante, Caronte, USAG-1, (Sclerostin)
<b>Twisted-Gastrulation-Familie</b>	Twisted-Gastrulation
<b>Noggin-Chordin-Familie</b>	Noggin, Chordin, Chordin-like/Neuralin, BMPER/Crossveinless, Kielin, Amnioless, CRIM1, Nel

Die Bedeutung der BMP-Antagonisten wurde und wird v. a. bei der Embryogenese untersucht. Die Rolle von Sclerostin und Noggin während der Skelettogenese ist dabei besonders gut charakterisiert.

Sclerostin ist ein glykosyliertes Monomer und wurde zur Dan-Familie der BMP-Antagonisten gezählt. Von den acht am Cystin-Knoten beteiligten Cysteinen bilden sechs Cysteine (C55-C109, C-80-C140, C84-C142) den zentralen Cystin-Knoten (123,124). Von diesem gehen drei „loops“ aus. Der N- und der C-terminale „loop“ enthalten  $\beta$ -Faltblätter, die die „Finger“ 1 und 2 bilden. Sie sind durch eine Disulfidbrücke (C69-C123) miteinander verbunden. Der dritte „loop“ ist wenig geordnet (123,124). Sclerostin wird in Osteozyten nach Stimulation mit BMP2, BMP4 und BMP6 in Gegenwart von Runx2 und Osterix exprimiert und sekretiert (125-127). Extrazellulär bindet es BMP6 und den Wnt-Rezeptor LRP5 (128,129). Mutationen

im Gen *SOST* verursachen Sklerosteose oder das Van Buchem-Syndrom (130,131). Beide Erkrankungen sind durch eine erhöhte Knochenmasse gekennzeichnet (Abb. 1.5).

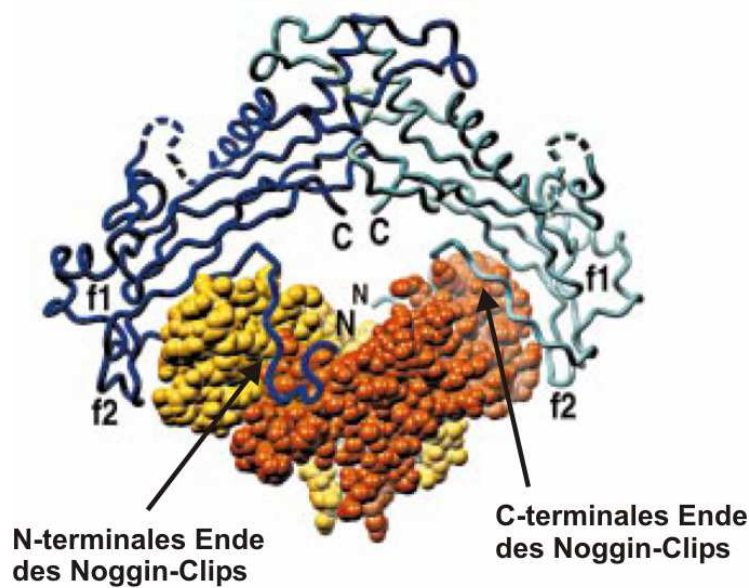


**Abb. 1.5 Phänotypen von Patienten mit Sklerosteose oder dem Van Buchem-Syndrom**

A) Die Röntgenaufnahme zeigt die Syndaktyly von Zeige- und Mittelfinger eines Kindes mit Sklerosteose. B) Die Röntgenaufnahme vom Schädel eines Patienten, der unter dem Van Buchem-Syndrom leidet, zeigt Verdickungen der Calvaria sowie der Schädelbasis. Die Abbildungen wurden entnommen aus (132).

Aufgrund dieser Phänotypen sowie der Interaktion mit BMP6 und LRP5/6 wurde Sclerostin lange als BMP- und/oder Wnt-Antagonist diskutiert. Durch Untersuchung von Mäusen mit konditionellen „knock out“ (cKO) des BMPRIA konnte gezeigt werden, dass Sclerostin kein BMP-Antagonist ist (133). Stattdessen induzieren BMPs die Expression von Sclerostin, das durch Bindung an LRP5 oder LRP6 deren Interaktion mit Wnt verhindert und dadurch den kanonischen Wnt- Signalweg bzw. Wnt/  $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibiert (128,129). Der Wnt- $\beta$ -Catenin-Weg (Abb. 1.10) ist ebenfalls an zahlreichen Prozessen der Chondro- und Osteogenese beteiligt. Durch die Mutationen im *SOST* ist die Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signaltransduktion permanent aktiv, was eine erhöhte Chondro- und Osteogenese und damit eine höhere Knochenmasse zur Folge hat. Ähnliche Phänotypen wurden auch bei Mutationen im Rezeptor LRP5 beobachtet (134,135).

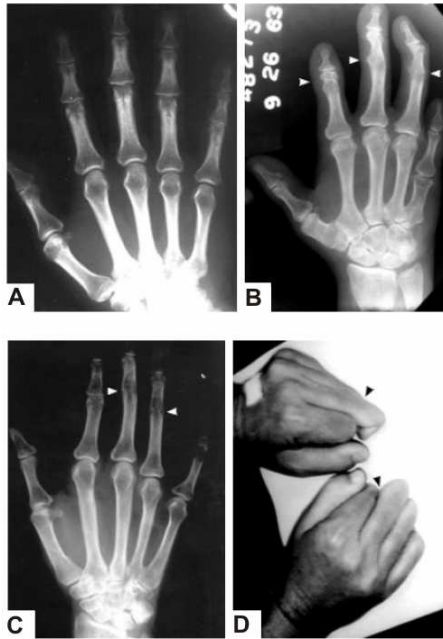
Noggin besteht aus einem N-terminalen „clip“-Segment (Glutamin 28-Glutamat 48) und einer cystein-reichen Region, die den Cystin-Knoten am C-Terminus bildet. Durch die Interaktion der Noggin-Monomere nahe den C-Termini sieht das Noggin-Dimer, gebunden an BMP7, wie eine Klammer aus (Abb. 1.6) (136).



#### Abb. 1.6 BMP7-Noggin-Komplex

Das BMP7-Dimer (orange und rot) ist im Komplex mit Noggin (hell- und dunkelblau) dargestellt. Die aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern geformten „Finger“ f1 und f2 des Noggin sowie der Noggin-Clip sind gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach (136).

Dabei interagiert das N-terminale Ende des Noggin-Clips (Glutamin 28 - Aspartat 39) über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Resten des „wrist“-Epitops, der BMP Typ I-Rezeptorbindungsstelle. Das „knuckle“-Epitop, die Typ II-Rezeptorbindungsstelle der BMPs wird hauptsächlich vom C-terminalen Teil des Noggin-Clips (Asparagin 40 - Glutamat 48) bedeckt und interagiert am Rande mit den distalen Enden der antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstränge („Finger“ 1 und 2) des Noggins (Abb. 1.6). Von Noggin umklammert können BMP2, BMP4, BMP7, GDF5 und GDF6 weder die BMP Typ I- noch Typ II-Rezeptoren binden (136-138). Die Expression von Noggin wird durch BMP2, BMP4, BMP7 und GDF5 induziert. Dadurch überlappt die Expression von BMP und Noggin sowohl räumlich als auch zeitlich, und es kommt zu einer negativen „feedback“-Hemmung. Noggin ist wie die BMPs nicht nur an der Skelettogenese, sondern auch an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt (139,140). Patienten mit heterozygoten Noggin-Mutationen leiden an Symphalangismus (SYM) oder dem Multiple Synostose Syndrom (SYNS), die u. a. durch die Fusion der Gelenke gekennzeichnet sind (Abb. 1.7) (141-143), oder an Brachydactyly Typ B (144).



**Abb. 1.7 Symphalangismus und SYNS als Folge von Mutationen im humanen *Noggin***

Die Röntgenaufnahmen zeigen A) eine normale Hand und B) die Hand eines an Symphalangismus leidenden Patienten, der Synostosen in den mit Pfeilen markierten Gelenken des Zeige-, Mittel- und Ring-Fingers aufweist. C) Röntgenaufnahme und D) Foto eines am Multiplen Synostose Syndrom leidenden Menschen: C) Die Synostose der betroffenen Gelenke ist mit Pfeilen markiert. D) Die fehlende Flexibilität des Mittel- und Ring-Fingers sowie das Fehlen der Gelenke im Mittelfinger (markiert durch Pfeile) sollen hier verdeutlicht werden. Abbildungen modifiziert nach (141).

Homozygote *Noggin*-Mutation hatten bei Mäusen verschiedene Entwicklungsstörungen, Gelenk- und Knochenfehlbildungen und den Tod im frühen Embryogenesestadium zur Folge (145). Die Überexpression von *Noggin* verhindert die Differenzierung der Stammzellen des Knochenmarks zu Osteoblasten, während der „knock down“ von *Noggin* die Osteogenese fördert (145-148).

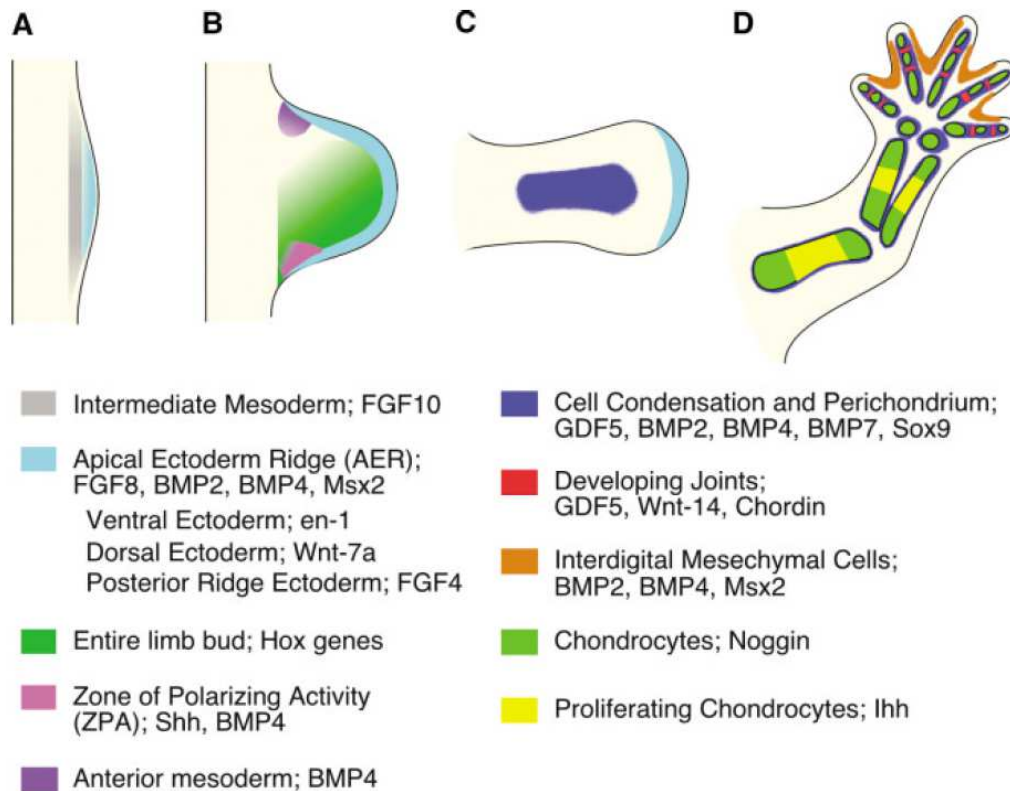
## 1.5. Chondro- und Osteogenese

GDF5 und BMP2 regulieren Chondrogenese und Osteogenese sowie die Homöostase von Knorpel und Knochen. Sie werden auch während der Frakturheilung exprimiert. Die Frakturheilung verläuft meist indirekt durch endochondrale und desmale Ossifikation, da eine genaue Reduktion der Frakturrenden ohne Entstehung einer Lücke und eine stabile Fixierung in der Natur nicht vorkommen. Endochondrale und desmale Ossifikation sind mit den Ossifikationsprozessen während der Skelettbildung vergleichbar, so dass sie als Modell genutzt werden können.

### **1.5.1. Entwicklung der Knochen und Extremitäten**

Die Knochenentwicklung unterteilt sich in Musterbildung, Organogenese und Wachstum der Skelettelemente. Sind räumliche Gestalt und Anordnung festgelegt, beginnt beim Fötus die Ossifikation. Dabei wird in desmale und endochondrale Ossifikation unterschieden. Der desmalen Ossifikation unterliegen Schlüsselbein und die Belegknochen des Schädels. Dabei differenzieren die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) direkt zu Osteoblasten. Das axiale (Wirbelsäule, Rippen, Sternum) und das appendiculäre (Extremitäten, Schultergürtel, Hüfte) Skelett werden durch endochondrale Ossifikation gebildet.

Die Extremitäten entwickeln sich nach Festlegung der drei Hauptachsen (anterior-posterior, proximal-distal und dorsal-ventral) sowie der Somiten aus den Extremitätenknospen des Embryos. Diese bestehen aus mesenchymalen Zellen, die außen von einer Schicht epithelialer Ektodermzellen umgeben sind. Aus dem mesenchymalen Kern entwickelt sich der größte Teil der Extremitäten. Muskelzellen, Nervenzellen und Zellen für die Blutversorgung wandern später aus den Somiten ein. An der Spitze der Extremitätenknospen, unmittelbar unter der apikalen Ektodermleiste (AER), befindet sich eine Schicht schnell-teilender, undifferenzierter Zellen (Abb. 1.8). Sie bilden die Wachstumszone und differenzieren, sobald sie die Wachstumszone verlassen haben. Mit dem Auswachsen der Extremitätenknospen kondensieren die mesenchymalen Zellen und differenzieren zu den verschiedenen Zelltypen (149-151). Die Differenzierung in den Extremitätenknospen schreitet proximal-distal voran, so dass sich beim Menschen zuerst die Oberarmknochen (Humerus) oder die Oberschenkelknochen (Femur) bilden. Anschließend entstehen die Unterarmknochen (Radius und Ulna), die Handwurzelknochen (Karpale, Metakarpale) und die Finger bzw. die Unterschenkelknochen (Tibia und Fibula), die Fußwurzelknochen (Tarsale, Metatarsale) und die Zehen (151). Die Entwicklung der Extremitäten von kondensierendem Mesenchym zu den Knochen und Gelenken wird durch Konzentrationsgradienten von BMPs/GDFs, Hedgehog-Proteinen, Wnt und FGF gesteuert (151,152) (Abb. 1.8).



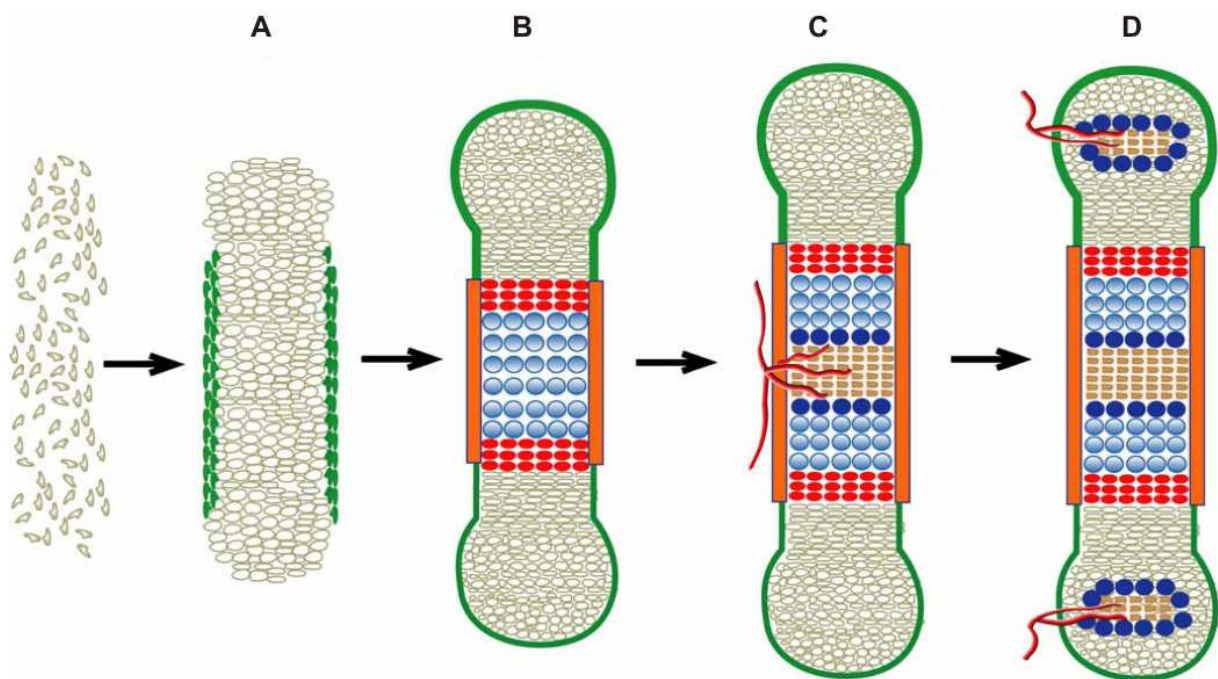
**Abb. 1.8 Entwicklung der Extremitäten vom undifferenziertem Mesenchym zu den knorpeligen Vorläufern der Extremitäten**

Die Entwicklung der Extremitäten sowie der daran beteiligten Faktoren werden hier dargestellt. A) Undifferenziertes Mesenchym (grau) wird vom apikalen Ektoderm (AER; hellblau) bedeckt, die FGFs, BMPs sowie Msx2 sekretieren. B) Es bildet sich die Extremitätenknospe, die entsprechend der räumlichen Einteilung in AER und „Zone of polarizing activity“ (ZPA; violett) „Hox genes“, BMP4, Sonic hedgehog, FGFs und Wnts exprimiert. C) Das Mesenchym kondensiert und sekretiert BMP2, BMP4, BMP7 und GDF5 (dunkelblau). Die Chondrozyten proliferieren und differenzieren. Humerus, Radius, Ulna und die Finger entstehen. Die proliferierenden Chondrozyten exprimieren Indian Hedgehog (Ihh). In bzw. nahe den Gelenkspalten wird GDF5, Wnt14, Chordin (rot) und Noggin (grün) exprimiert. Die Apoptose in den Fingerzwischenräumen wird durch BMP2, BMP4, Msx2 gesteuert (braun). Abbildungen modifiziert nach (149).

Die kondensierten mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen differenzieren zu Chondrozyten und bilden eine knorpelige Anlage (Abb. 1.9). Sie dient als Ausgangspunkt des Knochenwachstums und wird durch die distale Anlagerung von Chondrozyten verlängert. Dabei entstehen unterschiedliche Subpopulationen der Chondrozyten. Die distalen Chondrozyten sind rund und proliferieren langsam. Entlang der Längsachse ordnen sich schnell proliferierende Chondrozyten säulenartig an. Chondrozyten, die nicht mehr proliferieren, differenzieren zu prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten. Sie sind deutlich größer als die proliferierenden Chondrozyten und an der Produktion der ECM und der Mineralisierung beteiligt. Umgeben werden die unterschiedlichen Chondrozyten vom Perichondrium (Abb. 1.9 A, B). An die hypertrophen Chondrozyten angrenzend differenzieren Zellen des Perichondriums direkt zu Osteoblasten und bilden das Periost. Dort



beginnt die vaskuläre Invasion der hypertrophen Zone, die die Einwanderung der Osteoklasten und Osteoblasten ermöglicht. Die hypertrophen Zellen werden apoptotisch. Sie werden von den Osteoklasten resorbiert und durch Osteoblasten ersetzt. Auf diese Weise wird das Knorpelgewebe in Knochen umgewandelt (150-152). Im Bereich der distalen Chondrozyten entstehen sekundäre Ossifikationszentren (Abb. 1.9 D). Zwischen ihnen und dem primären Ossifikationszentrum bilden sich Wachstumszonen, die das Längenwachstum regulieren. Sobald die Knochen ihre spezifische Größe erreicht haben, mineralisieren sie vollständig (153).



**Abb. 1.9 Endochondrale Ossifikation**

Bei der endochondralen Ossifikation A) kondensieren die mesenchymalen Zellen und B) differenzieren zu Chondrozyten (grau), prä-hypertrophen (rot) und hypertrophen Chondrozyten (blau). Sie werden vom Perichondrium (grün) oder dem Periost (orange) umgeben. C) Nach Vaskularisierung können die einwandernden Osteoblasten und Osteoklasten den Knorpel in Knochen umwandeln. D) In dem Bereich der distalen Chondrozyten entstehen sekundäre Ossifikationszentren. Abbildungen modifiziert nach (153).

Während der endochondralen Ossifikation (Abb. 1.9) werden BMP2, BMP3, BMP4, BMP5 und BMP7 im Perichondrium exprimiert. Die hypertrophen Chondrozyten exprimieren BMP2, BMP6 und BMP7, die proliferierenden Chondrozyten BMP7. GDF5, GDF6 und GDF7 werden in den frühen Knorpel-Kondensationszentren und im Perichondrium exprimiert. Dabei treibt v. a. GDF5 die Chondrogenese voran (150,152).

Die Gelenkbildung erfolgt parallel zur endochondralen Ossifikation. Hierbei kondensieren die MSCs im Bereich des zukünftigen Gelenkes und formen die „Interzone“. Es kommt zur

Einstülpung und Trennung in zwei Skelettelemente. Der entstandene Spalt wird mit Flüssigkeit gefüllt. Reguliert wird die Gelenkentwicklung durch die Expression von GDF5, das als „Schlüsselregulator“ der Gelenkentwicklung gilt, sowie durch die Expression von GDF6, BMP2, BMP4, Wnt4, Wnt14, Wnt16, FGFs und den BMP-Antagonisten Noggin und Chordin (154).

### **1.5.2. Frakturheilung**

Nach Entstehen der Fraktur kommt es zur Entzündung und zur Bildung eines Hämatoms, das aus Blut und Zellen des Knochenmarks um die Fraktur herum gebildet wird. Interleukine und TNF- $\alpha$ , das an der Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten beteiligt ist, werden exprimiert. MSCs werden aus dem umgebenden Gewebe, den „soft tissues“, dem Periosteum, dem Knochenmark und dem Blut, rekrutiert. Sie wachsen und differenzieren zu osteogenen Zellen. Zwischen den Frakturrenden und an den periostealen Stellen wird durch endochondrale Ossifikation ein knorpeliger „soft callus“ gebildet, der später mineralisiert. Direkt an den distalen und proximalen Enden findet die desmale Ossifikation statt (155).

Mutationen im *BMP2* der Maus zeigten, dass ohne BMP2 der „Callus“ nicht gebildet werden kann, und die Frakturheilung nicht erfolgreich ist (156). Wie bei der Skelettogenese reguliert GDF5 die endochondrale Ossifikation, während BMP5 und BMP6 an der desmalen Ossifikation beteiligt sind (155,157).

Die Chondrozyten des „soft callus“ proliferieren und differenzieren zu hypertrophen Chondrozyten. Sind die Grundstrukturen festgelegt, beginnt die Vaskularisierung. Hypertrophe Chondrozyten und Osteoblasten exprimieren Faktoren wie z. B. VEGF, den „Schlüsselregulator“ der Vaskularisierung, und induzieren die Blutgefäßbildung. Dadurch können MSCs, Osteoblasten und Osteoklasten in den „soft callus“ einwandern und diesen in einen knöchernen Callus umwandeln. Durch die Expression von M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“), RANKL („receptor activator of nuclear factor kappa B“), Osteoprotegerin und TNF- $\alpha$  werden weitere Zellen rekrutiert und die Resorption der mineralisierten, knorpeligen Matrix sowie die Bildung des „hard callus“ reguliert. Der „hard callus“ wird durch Osteoklasten erneut resorbiert und durch Osteoblasten ersetzt, die eine lamelläre Knochenstruktur bilden. Gesteuert wird dieser Prozess von IL-1, TNF- $\alpha$  und BMP2 (158-160). Durch den wiederholten Prozess der Resorption durch Osteoklasten und die Neubildung durch Osteoblasten kann der Knochen regeneriert werden.

### **1.5.3. An Skelettbildung und Frakturheilung beteiligte Signalwege**

Extremitätenentwicklung und Frakturheilung werden neben BMPs/GDFs durch zahlreiche Wachstumsfaktoren reguliert. Die Expression der einzelnen Wachstumsfaktoren führt zur Bildung von Konzentrationsgradienten, die zeitlich und räumlich überlappen können. Die dabei induzierten Signalkaskaden bilden ein Netzwerk mit gemeinsamen Komponenten, die sich gegenseitig beeinflussen und zur Feinregulation der Entwicklung und Neubildung von Geweben beitragen. So können z. B. BMPs, Hedgehog-Proteine und Wnts die Expression von *Runx2*, dem Schlüsselregulator der Osteogenese induzieren. Andererseits kann die GSK3 durch die Phosphorylierung von R-Smads 1/5/8, Ci und  $\beta$ -Catenin den BMP/Smad-abhängigen-, den Hedgehog- und den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg inhibieren. Das ebenfalls am Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg beteiligte Dishevelled interagiert nach seiner Phosphorylierung mit dem Tyrosin-Kinase-Rezeptor Ror2, der den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg und nach Interaktion mit dem BMP-Rezeptor BMPRII auch den BMP/Smad-Signalweg beeinträchtigen kann (121,161).

#### **1.5.3.1. Hedgehog-Signalweg**

Sonic hedgehog (Shh) und Indian hedgehog (Ihh) gehören zu den Hedgehog-Proteinen. Sie binden an den Rezeptor Patched. Dadurch wird das Transmembranprotein Smoothed (Smo) nicht mehr inhibiert und aktiviert Gli1/GliA sowie Gli2. Gli3/GliR wird inhibiert. Nach Translokation von GliA in den Nukleus bindet es an die DNA und induziert die Transkription der Zielgene.

Die Expression von Shh markiert die „zone of polar activity“ (ZPA) und steuert die Ausbildung der anterioposterior Achse (162,163). Mutationen im *Shh* führen zu neurologischen Syndromen sowie zu Poly- und Syndaktylien (164-166) .

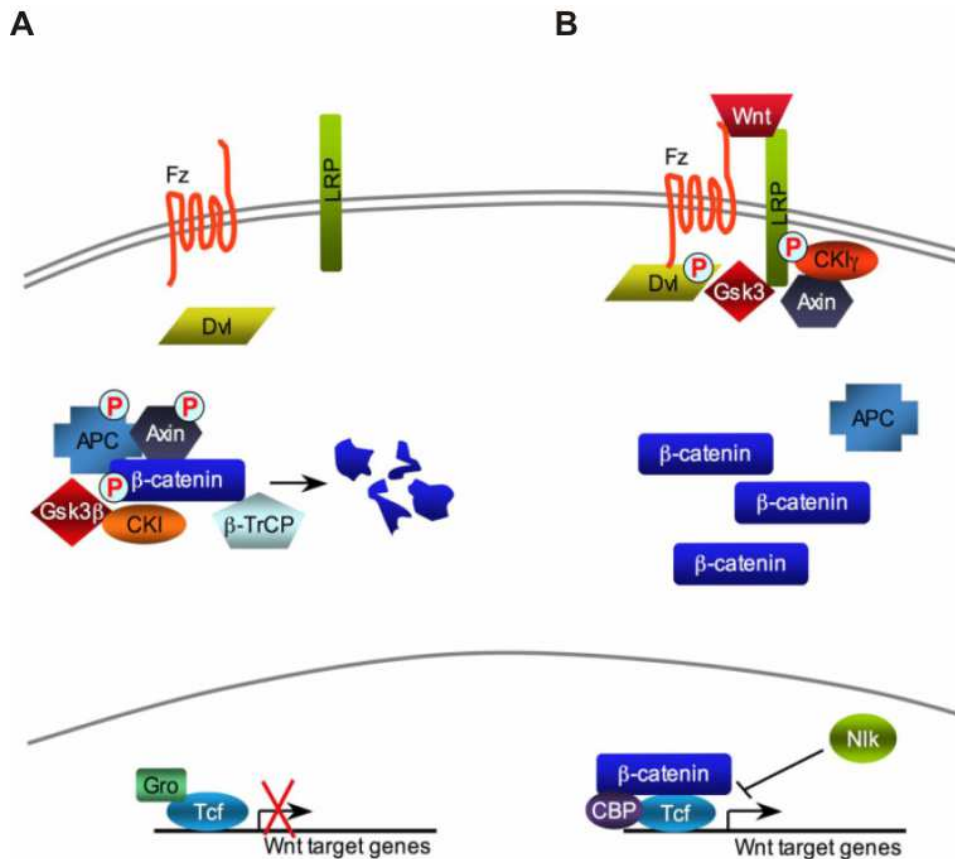
Ihh gilt als „Schlüsselregulator“ für die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten während der endochondralen Ossifikation. Es wird in prä-hypertrophen Chondrozyten und in dem die Fraktur umgebenden Callus exprimiert, wo es die Proliferation der Chondrozyten aktiviert. Außerdem induziert es die Expression von PTHrP („Parathyroid hormone related protein“) in distalen Chondrozyten und inhibiert so ihre Differenzierung zu hypertrophen

Chondrozyten (167,168). Im Perichondrium steuern *Ihh* und PTHrP die Osteoblastogenese durch die Expression von *Runx2* (168).

Die Bedeutung dieses Signalweges wird durch die Mutationen der Hedgehog-Proteine, ihrer Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren deutlich. Mutationen im humanen *Ihh* führen zu Brachydaktyly Typ A1 oder zu Acrocapitofemorale Dysplasie (169-171). Der „knock out“ von *Ihh* beeinflusst nicht die Kondensation der MSCs, beeinträchtigt aber die Proliferation der Chondrozyten und führt zu Abnormalitäten der Knochen. Mutationen im Shh/Ihh-Rezeptor *Patched* (*Ptch*) fördern die Differenzierung zu Osteoblasten und rufen eine höhere Knochenmasse hervor (172,173). Der „knock out“ von *Smoothed* verlangsamt die Proliferation der Chondrozyten und verhindert die Differenzierung der periostealen Zellen zu Osteoblasten (174). Mutationen des Transkriptionsfaktors *Gli3/GliR* führen v. a. zu Polydaktylien (175,176).

### **1.5.3.2. Wnt-Signalwege**

Die Wnt-Familie wurde nach den ersten Mitgliedern *wingless* (*Drosophila*) und *int-1* (Maus) benannt. Sie besteht aus 19 hochkonservierten, cyteinreichen, sekretierten Molekülen. Wnts sind an zahlreichen Prozessen der Skelettogenese beteiligt. In mesenchymalen Zellen hemmen sie die Expression von *Sox9* und fördern die von *Runx2* und *Osterix* (177-179). Dadurch wird die Differenzierung zu Osteoblasten unterstützt, während die Differenzierung zu Chondrozyten inhibiert wird. Andererseits treiben Wnts die Differenzierung der Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten voran und unterstützen die Gelenkbildung (177,180). Wnts werden auch in Osteoblasten exprimiert. Während der Frakturheilung konnte die Expression von *Wnt4*, *Wnt5a*, *Fzd2*, *LRP5*, *Dishevelled* und  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden (181). Bei der Skelettbildung und Frakturheilung ist, wie die Beeinträchtigung der Osteoblastogenese durch den konditionellen „knock out“ und die Überexpression von  $\beta$ -Catenin zeigt, die richtige Konzentration der an der Wnt-Signaltransduktion beteiligten Komponenten von großer Bedeutung (177,182).



**Abb. 1.10 Der kanonische Weg bzw. Wnt/β-Catenin-Signalweg**

A) In der Abwesenheit von Wnt wird β-Catenin in einen Degradations-Komplex aus APC, CKI, GSK3β und Axin rekrutiert, durch βTrCP ubiquitiniert und proteasomal abgebaut. B) Bindet Wnt an die Rezeptoren LRP und Frizzled, werden GSK3β und Axin zum Rezeptorkomplex rekrutiert. Die Bildung des Degradations-Komplex ist nicht möglich. β-Catenin akkumuliert im Zytoplasma und transloziert in den Nucleus, wo es mit TCF und CBP die Transkription der Zielgene induziert. Abbildungen modifiziert nach (183).

Wnts können in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration, von Typ und vom Differenzierungsstadium der Zellen einschließlich der Expression von Rezeptoren, Co-Rezeptoren und Wnt-Antagonisten den kanonischen und den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren. Diese können sich gegenseitig inhibieren (184,185). Der kanonische Weg wird auch als Wnt/β-Catenin-Weg bezeichnet (Abb. 1.10). In Abwesenheit von Wnt (Abb. 1.10 A) wird β-Catenin zu einem Komplex aus Axin, APC (Adenomatous Polyposis Coli), CKIα (Casein-Kinase I) und GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) rekrutiert. Dort wird es von CKIα und GSK3 in der Nähe des N-Terminus phosphoryliert und dann von der Ubiquitin E3-Ligase β-Trcp (β-Transducin repeat containing protein) ubiquitiniert. Der Abbau erfolgt im Proteasom. Im Nucleus binden in Abwesenheit von Wnt TCF, Groucho und Histon-Deacetylasen an die DNA und verhindern die Transkription der Zielgene. Bindet Wnt an einen von zehn Frizzled (Fz)-Rezeptoren und an LRP5/6 werden intrazellulär Dishevelled,

Axin und GSK3 zur Plasmamembran rekrutiert (Abb. 1.10 B). Dabei interagiert Dishevelled mit Fz und LRP6 und fördert die Anreicherung von LRP6 in LRP6-Signalosomen sowie die Phosphorylierung von LRP6 und die Rekrutierung des Axin-GSK3-Komplexes an den LRP6 (186,187). Die Bildung des Axin/APC/CKI $\alpha$ /GSK3/ $\beta$ -Catenin-Komplexes und die Phosphorylierung des  $\beta$ -Catenin sind in Gegenwart von Wnt somit nicht mehr möglich (Abb. 1.10). Dadurch reichert sich  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma an und kann in den Nukleus translozieren, wo es den Co-Repressor Groucho und die interagierenden Histon-Deacetylasen von der DNA verdrängt und mit TCF/LEF („T cell specific transcription factor“/ „Lymphoid enhancer binding factor 1“), p300/CBP und CREB die Transkription der Zielgene wie z. B. *Runx2* (179) induziert. Inhibiert wird der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg, indem Sfrp (secreted frizzled-related protein) und WIF-1 (Wnt inhibitory factor) die Interaktion zwischen Wnt und Fzd verhindern oder die Wnt-Antagonisten Dickkopf (Dkk) und Sclerostin die Co-Rezeptoren LRP5/6 binden (185,188). Nach Bindung von Dkk1 an LRP5/6 und das Transmembranprotein Kremen wird LRP5/6 zusammen mit Kremen internalisiert und steht dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weg nicht mehr zur Verfügung (189). Die Interaktion von Sclerostin mit LRP5/6 verhindert die Bindung von Wnt an den LRP5/6 und so die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (129,188).

Zu den nicht-kanonischen Wnt-Signalwegen zählen z. B. die Bindung von Wnt an Fzd und damit verbundene Aktivierung des PLC/PKC/CamKII-Signalweges sowie die Interaktion von Fzd mit Wnt und dem Proteoglycan Knypek. Letztere führt in Gegenwart des Co-Rezeptors Prickle zur Aktivierung von JNK sowie den GTPasen RhoA und Rac, die das Zytoskelett und die planare Zellpolarität regulieren (190,191).

Mutationen oder „knock outs“ von Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt10b beeinträchtigen die Chondrogenese und führten zu Fehlbildungen der Extremitäten (192,193). Mutationen in den Wnt-Corezeptoren *LRP5/6*, die die Bindung der Wnts beeinträchtigen, reduzieren die Knochenmasse oder verursachen Osteoporose (194,195). Mutationen des *LRP5/6*, die die Bindung an Dkk1 oder Sclerostin behindern, zeigen einen ähnlichen Phäotyp wie Mutationen in *Dkk1* oder *Sclerostin* und verursachen eine höhere Knochenmasse (130,131,134,196,197).

### 1.5.3.3. FGF-Signalweg

Die Proteine der „Fibroblast growth family“ (FGF) werden u. a. im AER der Extremitätenknospen (FGF4, FGF8, FGF9, FGF17) exprimiert, wo sie die Ausbildung der proximodistalen Achse regulieren (198). Außerdem hemmen FGFs die Proliferation von

Chondrozyten und fördern ihre Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten. Sie wirken dadurch der Ihh- und BMP-abhängigen Signaltransduktion entgegen (199,200). FGFs aktivieren eine Vielzahl von Proteinen wie „Mitogen Activated Protein Kinases“ (MAPKs) und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) und induzieren die Phosphorylierung von Stat1. Dadurch können sie auch die Apoptose regulieren (201,202). Mutationen der FGFs wie auch der FGF-Rezeptoren führen zu zahlreichen Skelettfehlbildungen wie z.B. Achondrodysplasie und das Pfeiffer-Syndrom (203).

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, durch welche molekularen Mechanismen die heterozygote Mutation GDF5-S94N das Multiple Synostose Syndrom (SYNS) auslöst. SYNS ist durch proximalen Symphalangismus, karpale und tarsale Fusionen, Gehörlosigkeit und leichte Fehlbildungen des Gesichts gekennzeichnet.

GDF5 induziert die Chondrogenese und ist maßgeblich an der Entwicklung und dem Erhalt der Gelenke beteiligt. Die bisher publizierten Mutationen des *GDF5* sind „frameshift“-Mutationen oder liegen nahe oder im „wrist“-Epitop des GDF5, der Bindungsstelle des hochaffin gebundenen BMPRI. Sie verursachen Chondrodysplasien, Brachydaktyly, Symphalangismus und SYNS (204-211). GDF5-S94N ist bisher die einzige GDF5-Mutante, deren Mutation im hochkonservierten „knuckle“-Epitop, der Bindungsstelle der Typ II-Rezeptoren liegt. Wie die Mutation GDF5-S94N die Bindung an die BMP-Rezeptoren und die molekularen Mechanismen der Chondrogenese beeinflusst, wurde durch die Inkubation von C2C12-Zellen, den Prä-Chondroblasten ATDC5 und mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen der Maus mit rekombinantem GDF5-S94N im Vergleich zu GDF5 Wildtyp, der BDA2-auslösenden Mutante GDF5-L60P sowie der artifiziellen Mutante GDF5-L56P/Y106K/Q108D untersucht.

BMP2 und BMP6 sind an der Skelettbildung und der Frakturheilung beteiligt. Der Vergleich von BMP2 und BMP6 mit BMP2/BMP6- und BMP2/BMP7-Heterodimeren zeigte, dass BMP6 und die BMP-Heterodimere die Differenzierung zu Osteoblasten stärker fördern als BMP2 (11-14,212). Trotzdem ist BMP2 für die Induktion der Frakturheilung unbedingt erforderlich (156). Welchen Einfluss die Rezeptoraffinitäten der BMPs auf die Signaltransduktion, die Differenzierung zu Osteoblasten und ihre Mineralisierung haben, sollte mit Hilfe von BMP2-Mutanten im Vergleich zu BMP2 und BMP6 analysiert werden. Die BMP2-Mutanten haben entweder eine im Vergleich zu BMP2 reduzierte Affinität zum BMPRI oder wie BMP6 eine höhere Affinität zu den Typ II-Rezeptoren.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Folgen der GDF5- und BMP2-Mutationen auf die molekularen Mechanismen der Chondrogenese und Osteogenese zu charakterisieren, um langfristig Wirkstoffe entwickeln zu können, die die Knorpel- und Knochenentwicklung (beispielsweise nach Frakturen) optimal und mit möglichst wenigen Nebenwirkungen fördern.



## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bezeichnung
Agarose-Gel-Dokumentation	Herolab	
	Sony	Video Graphic Printer
Agarose-Gelelektrophorese-System	Bio-Rad	Mini Sub Cell GT
Autoklav	Systec	5075 ELV
Binokular	Leica	MZ 16A
ChemiSmart	Peqlab	ChemiSmart 5000
Combitips	Eppendorf	Combitips plus 5 ml Combitips plus 5 ml Biopur
Deckgläschen	AL	24x60x15mm
Digitalkamera	Carl Zeiss	AxioCam HRC und MRC5
	Sony	DSC-W1
Eismaschine	Scotsman	AF30
FACS	Beckman Coulter	EPICS XL-MCL
Feinwaage	Scaltec	SBA 33
Gefrierschrank	Siemens, Bosch	-20°C
	Forma Scientific	-80°C
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad	Mini-Protean 3 System
Greiner Röhrchen	Greiner	15 ml 50 ml
Heizblock	Heltinse & Ziller	
Inkubator	Infors	Schüttel-Inkubator Ecotron
	Heraeus	HeraCell 240
Kühlschrank	Beko	4°C
	Bosch	4°C
Kryo-Einfrierröhrchen	Nunc	
Magnetrührer	IKA	Combimag RCT
Microplate Reader	Tecan	sunrise ELISA-Plate-Reader
Mikroskop	Carl Zeiss	Axiovert 200 M
	Carl Zeiss	Axiovert 40CFL
	Olympus	IMT-2
Mikrowelle	Severin	Microwave & Grill
Multipette	Eppendorf	Multipette plus

<b>Gerät/ Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
<b>Netzgerät</b>	Biotec Fischer Heraeus Bio-Rad	Pherastab 500 Consort E 831 PowerPac HC
<b>Nitrozellulose-Membran</b>	Schleicher & Schuell	Optitran BA-S85 Reinforced NC
<b>Objektträger</b>	Menzel Gläser	76x26x1 mm
<b>Parafilm</b>	Pechiney	Parafilm
<b>Pasteurpipette</b>	Brand Plastibrand	3 ml
<b>PCR-Cycler</b>	MJ Research	PTC-200
<b>PCR-Reaktionsgefäße</b>	Applied Biosystems	MicroAMP reaction tubes
<b>pH-Meter</b>	Knick Elektronische Messgeräte	761 Calimatic
<b>Phosphor-Imager</b>	Fujifilm	FLA 5000
<b>Photometer</b>	Tecan	sunrise ELISA-Plate-Reader
<b>Pipet boy</b>	Drummond	Pipetaid
<b>Pipetten</b>	Eppendorf	Research 00,1-2,5µl; 2-20 µl; 20-200µl; 100-1000 µl
	Hamilton	20 µl
	Finnigan	1-5 ml; 2-10 ml
<b>Pipettenspitzen</b>	Biozym	Safe Seal Tips 20-1000 µl
	Gilson	D10, D20 Filtertips
<b>Platten-Luminometer</b>	Berthold	Mithras LB 940
<b>qRT-PCR</b>	Applied Biosystems	Step One Plus
<b>Reaktionsgefäße</b>	Eppendorf	1,5 ml und 2 ml
<b>Reinstwasseranlage</b>	Millipore	Milli-Q-Synthesis
<b>Röntgenfilm</b>	Konica / Minolta Kodak	medical films 13X18cm Biomax (für <sup>125</sup> Iod)
<b>Röntgenfilm- Entwicklermaschine</b>	MS Laborgeräte	Optimax Typ TR
<b>Rotations-Schüttler</b>	Heidolph Instruments	Rotamax 120
<b>Scanner</b>	Epson	Perfection 2480 Photo
<b>Schnellkochtopf</b>	Silit	Sicomatic
<b>Schüttler</b>	Heidolph Instruments	Polymax 1040 Vibramax 100
<b>Spektrophotometer</b>	Peqlab	Nanodrop ND-1000
<b>Sterilbank</b>	Heraeus	HeraSafe
<b>Sterilfilter</b>	Millipore Schleicher & Schuell	Millex-GS 0,22 µm FP 30/0,45 CA-S
<b>Stickstofftank</b>	Messmer	Adur β
<b>Thermocycler</b>	Eppendorf	Mastercycler gradient
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf	Thermomixer compact
<b>Überkopf-Schüttler</b>	neolab	Rotator 211175
<b>UV-Transilluminator</b>	Herolab	RH-5.1
<b>Vortexer</b>	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
<b>Waagen</b>	PESA Waagen	XB 4200 C Precisa
<b>Wasserbad</b>	Memmert	

Gerät/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Bezeichnung
<b>Western Blot Kammer</b>	Bio-Rad	Mini Trans-Blot Cell
<b>Whatman Papier</b>	Schleicher & Schuell	Gel Blotting Paper 460x570 mm
<b>Zellkultur</b>	Greiner	Zellkultur-Flaschen
	Greiner	Testplatte 24 Loch
	Greiner	Testplatte 6/24/96 Loch
	Greiner	6 cm / 10 cm Zellkulturschalen
	Hartenstein	Zellschaber
<b>Zellzählkammer</b>	Neubauer	Tiefe 0,100 mm; 0,0025 mm
<b>Zentrifugen</b>	Eppendorf	Tischzentrifuge 5415 D
	Eppendorf	Tischzentrifuge 5417 C
	Eppendorf	5804
	Hettich	Micro 22 R Kühlzentrifuge
	Sorvall	RC 6 Kühlzentrifuge

### 3.1.2. Chemikalien, Enzyme, Kits, Antikörper und Marker

In den folgenden Tabellen sind die Chemikalien, Liganden, Enzyme, Kits, Antikörper und Marker zusammengefasst aufgeführt. Die Chemikalien wurden - soweit nicht anders angegeben - in Analysenqualität verwendet. Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser aus der Millipore-Anlage angesetzt.

Tab. 3.2 Chemikalien

Kurzbezeichnung	Bezeichnung	Hersteller
<b>Acrylamid</b>	Acrylamid Mix 40% Rotiphorese Gel	Roth
<b>Agar</b>	Agar	Roth
<b>Agarose</b>	Agarose ultrapure	Roth
<b>Alcian Blue</b>	Alcian Blue 8GX	Sigma
<b>Alizarin Red</b>	Alizarin Red	Sigma
<b>Ampicillin</b>	Ampicillin-Natriumsalz	Sigma
<b>APS</b>	Ammonium Persulfat	Bio-Rad
<b>APH</b>	3-Aminophthalhydrazid	Roth
<b>β-Mercaptoethanol</b>	β-Mercaptoethanol	Sigma
<b>Betain</b>	Trimethylglycin	Sigma
<b>Bis-Acrylamid</b>	Bis-Acrylamid	Roth
<b>BPB</b>	Bromphenolblau	Merck
<b>BSA</b>	Rinder-Serum-Albumin (Bovine Serum Albumin) 98%	Roth
<b>Butanol</b>	1-Butanol	Sigma
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid	Merck
<b>p-Cumarsäure</b>	p-Cumarsäure	Sigma
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Dilactat	Sigma

<b>Kurzbezeichnung</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>dNTP's 12,5</b>	Desoxyribonukleotidtriphosphate 12,5 mM	Fermentas
<b>DMEM</b>	Dulbeccos Modified Eagles's Medium	Gibco
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	Merck
<b>DPBS</b>	DPBS, Zellkultur	Gibco
<b>HOAc</b>	Essigsäure	AppliChem
<b>EtOH</b>	Ethanol, vergällt	Roth
<b>EtOH abs</b>	Ethanol 100% analysis	Merck
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid-Lösung 10 mg/ml	Roth
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	Applichem
<b>FCS</b>	Fetales Kälber Serum	Invitrogen
<b>Fluoromount G</b>	Mounting-Medium	Science Services
<b>Formaldehyd</b>	Formaldehyd	Roth
<b>G418</b>	Geneticin	Gibco
<b>Glc</b>	Glucose	Sigma
<b>Glycin</b>	Glyzin	Merck
<b>Glycerin</b>	Glyzerin, 86%	Roth
<b>GMEM</b>	Glasgow's MEM	Sigma
<b>HANKs</b>	HBSS Hanks Balanced Salt Solution	Cambrex
<b>Hepes</b>	Hepes buffer 1 M	Roth
<b>Isopropanol</b>	2-Propanol	Roth
<b>[<sup>125</sup>I]</b>	Na[ <sup>125</sup> Iod]	Hartmann Analytik
<b>Kanamycin</b>	Kanamycin-Sulfat	Sigma
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
<b>L-Glutamin</b>	L-Glutamin	Biochrom
<b>LB-Pulver</b>	Luria-Bertuni-Medium	Roth
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Magnesiumsulfat	Merck
<b>1 kb Leiter</b>	1kb DNA Ladder	NEB
<b>100 bp Leiter</b>	GeneRuler 100b DNA Ladder	NEB
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid	Merck
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Magnesiumsulfat	Merck
<b>MeOH</b>	Methanol	Merck
<b>β-Mercaptoethenol</b>	β-Mercaptoethenol	Merck
<b>Milchpulver</b>	Skim Milk Powder	Fluka
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	Merck
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O	Merck
<b>NaF</b>	Natriumfluorid	Fluka
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Natriumvanadat	Sigma
<b>NP-40</b>	Nonidet 40	Fluka
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin	Biochrom
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd	Merck
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma
<b>Ponceau S</b>	Ponceau S	Sigma
<b>pNPP</b>	para-Nitrophenylphosphat	Sigma
<b>Proteaseinhibitor</b>	Protease-Inhibitoren-Cocktail "Complete"; EDTA free	Boehringer

Kurzbezeichnung	Bezeichnung	Hersteller
SDS	Natriumdodecylsulfat	Roth
TCA	Trichloressigsäure	Roth
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin	Roth
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid	Roth
Triton X-100	Octylphenol-polyethylenglycol	Sigma
Trypsin	Trypsin EDTA	Biochrom
Trypanblau	Trypan Blue Stain 0,4%	Biochrom
Tween 20	Polyoxyethylen(20)sorbitan	Roth

Tab. 3.3 Kits

Bezeichnung des Kits	Hersteller
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega
ProteoJet cytoplasmic and nuclear protein extraction kit	Fermentas
NucleoSpin RNA extraction kit	Machery & Nagel
QIAprep Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAprep Plasmid Midi Kit	Qiagen
Vectastain Kit (Myosin-Assay)	Vectastain

### 3.1.3. Enzyme

Tab. 3.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega
Taq polymerase	qbiogene
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs

### 3.1.4. Primer

Tab. 3.5 Primer für die qPCR

Gen	Primer	
ALP	fw	AACCCAGACACAAGCATTCC
	rev	GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG
Col2a1	fw	GGCAACAGCAGGTTACATA
	rev	GCCCTATGTCCACACCAAAT
Col10a1	fw	CATAAAGGGCCCACTTGCTA
	rev	TGGCTGATATTCCTGGTGGT
Dkk1	fw	TCCAGAAGAACCACACTGA
	rev	GGTGACACCTGACCTTCTT

Gen	Primer	
<b>HPRT</b>	fw	TGTTGTTGGATATGCCCTTG
	rev	ACTGGCAACATCAACAGGACT
<b>Id1</b>	fw	CTTCAGGAGGCAAGAGGAAA
	rev	CAAACCCTCTACCCACTGGA
<b>LRP5</b>	fw	GCCACAGACCCCTCTCTCTA
	rev	GGTGCCATACCTCGAATGAC
<b>Myog</b>	fw	CCAAGGTCTCCTGTGCTGATG
	rev	TTGGCAAACACACACAATGC
<b>noggin</b>	fw	ATGCCCCATCCCTTAAAATC
	rev	CGCAGAAGTAGGCTTGTTC
<b>Ocn</b>	fw	GCAGGAGGGCAATAAGGTAG
	rev	CTTTAGGGCAGCACAGGTC
<b>Opg</b>	fw	ACCAAAGTGAATGCCGAGAG
	rev	AAGCTGCTCTGTGGTGAGGT
<b>Opn</b>	fw	GCTTGGCTTATGGACTGAGG
	rev	GGGATGACATCGAGGGACT
<b>Sp7</b>	fw	CCCTTCTCAAGCACCAATGG
	rev	AGGGTGGGTAGTCATTTGCATAG
<b>RANKL</b>	fw	ATTTGCACACCTCACCATCA
	rev	TAGGTACGCTTCCCGATGTT
<b>Runx2</b>	fw	TAAGAAGAGCCAGGCAGGTG
	rev	TAGTGCATTCGTGGGTTGG
<b>SOST</b>	fw	CCTCCTCCTGAGAACAACCA
	rev	GTCAGGAAGCGGGTGTAGTG
<b>Sox9</b>	fw	GAGGAAGTCGGTGAAGAACG
	rev	CCCTCTCGCTTCAGATCAAC

### 3.1.5. Standards

Tab. 3.6 DNA- und Protein-Größenstandards

Größenstandard für	Bezeichnung	Hersteller
<b>DNA</b>	1 kb DNA Leiter	New England Biolabs
	100 bp DNA Leiter	New England Biolabs
<b>Proteine</b>	PAGERuler Prestained Protein Ladder Plus (15, 27, 35, 55, 72, 100, 130 und 250 kDa)	Fermentas

### 3.1.6. Bakterienstämme

#### Escherichia coli C 600-Genotyp:

*lacY1, leuB6, mcrB+, supE44, thi-1, thr-1, tonA21, F*

#### Escherichia coli DH5 $\alpha$ -Genotyp:

*$\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, recA1, endA1, gyrA1, thi-1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, relA1, deoR,  $\Delta$ (lacZYA-argFV169), F*

#### Escherichia coli JM 109-Genotyp:

*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, supE44,  $\Delta$ (lac-proAB), [F', tra D36, pro AB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15]*

### 3.1.7. Expressionsvektoren

Tab. 3.7 Vektoren

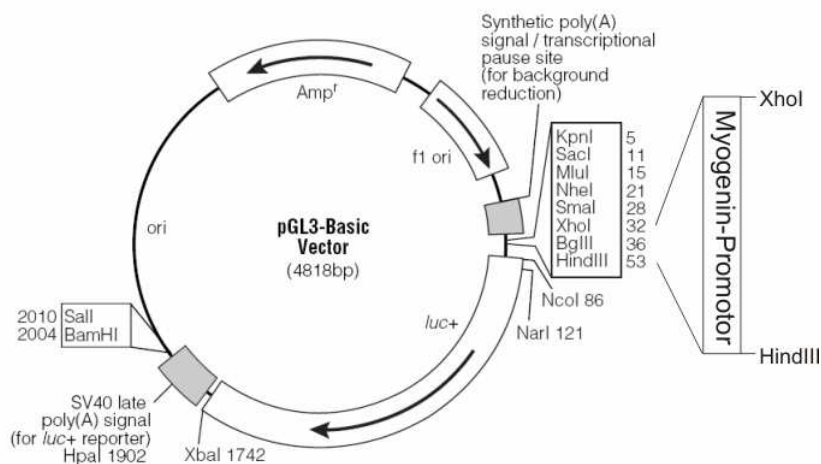
Vektor	Hersteller
pcDNA1	Invitrogen
pcDNA3	Invitrogen
peGFP	Clontech Laboratories
pGL3	Promega
pRL-TK	Promega

### 3.1.8. Eukaryotische Expressions-Konstrukte

Tab. 3.8 Eukaryotische Expressions-Konstrukte

Konstrukt	Insert	Vektor	Tag
peGFP	eGFP	peGFP	
p-HA-BRIa	human BRIa	pcDNA3	HA; N-terminal
p-HA-BRIb	human BRIb	pcDNA3	HA; N-terminal
p-HA-BRII-LF	human BRII-LF	pcDNA1	HA; N-terminal
p-BRE-Luc	Firefly-Luciferase (59); kontrolliert von BRE und dem Id1-Promotor	pGL3	

Konstrukt	Insert	Vektor	Tag
p-Myg-Luc	Firefly-Luciferase (Abb. 3.1); kontrolliert von Myogenin-Promotor	pGL3	
pRL-TK	Renilla-Luciferase	pRL-TK	
pβ-Gal	β-Galactosidase	pcDNA1	
SuperTOPFLASH	Firefly-Luciferase (213); kontrolliert vom TA-Promotor und TCF/LEF-Bindungsstellen	pTA-Luc	



**Abb. 3.1 p-Myg-Luc**

Das Konstrukt p-Myg-Luc wurde von Dr. R. Zavala in der AG Prof. Dr. Knaus hergestellt. Seine Angaben zum Konstrukt sind hier zusammengefasst. Die Sequenz des murinen Myogenin-Promotors wurde (214) bzw. (215) entnommen.

### 3.1.9. Zelllinien

**Tab. 3.9** Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellbank/ Nr.	Herkunft
ATDC5	Riken Cell Bank RCB 0565	murine Prä-Chondrocyten von <i>Mus Musculus</i>
C2C12	LGC Promochem CRL-1772	Myoblasten von <i>Mus Musculus</i>
Cos-7	LGC Promochem CRL-1651	Nierenzellen von <i>Cercopithecus aethiops</i>
HEK293T	LGC Promochem CRL-1268	Nierenzellen von <i>Homo sapiens</i>
Maus-Micromass	-	mesenchymale Zellen aus den Extremitätenknospen von <i>Mus Musculus</i>
MC3T3-E1	Riken Cell Bank RCB 1126	Prä-Osteoblasten der Calvaria von <i>Mus Musculus</i>



### 3.1.10. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Tab. 3.10 Verwendete Reagenzien für die Zellkultur

Medien/ Reagenzien	Hersteller
<b>α-MEM</b>	Gibco/ Invitrogen
<b>Collagenase Typ Ia</b>	Sigma
<b>Collagenase/Dispase-Lösung</b>	Roche
<b>DMEM</b>	Biochrom
<b>DMEM/ Ham´s F12 1:1</b>	Invitrogen
<b>FCS</b>	Biochrom
<b>G418</b>	Biochrom
<b>HBSS</b>	Hyclone
<b>L-Glutamin</b>	Biochrom
<b>Lipofectamine</b>	Invitrogen
<b>Lipofectamine 2000</b>	Invitrogen
<b>Passiven Lysispuffer</b>	Promega
<b>PBS</b>	PAA
<b>PEI</b>	Sigma-Aldrich
<b>Penicillin G</b>	Biochrom
<b>PlusReagent</b>	Invitrogen
<b>Streptomycin-Sulfat</b>	Biochrom
<b>Trypsin</b>	PAA

### 3.1.11. Rekombinante Proteine

Tab. 3.11 Rekombinante Proteine

Kurzbezeichnung	Ligand	Hersteller
<b>BMP2</b>	Bone Morphogenetic Protein 2 (rekombinant)	AG Prof. Dr. Sebald; Würzburg
<b>BMP2-P</b>	Bone Morphogenetic Protein 2-L51P (rekombinant)	AG Prof. Dr. Sebald; Würzburg
<b>BMP2-PRP</b>	Bone Morphogenetic Protein 2-L51P/S85R/A86P (rekombinant)	AG Prof. Dr. Sebald; Würzburg
<b>BMP2-RP</b>	Bone Morphogenetic Protein 2-S85R/A86P (rekombinant)	AG Prof. Dr. Sebald; Würzburg
<b>BMP2-KD</b>	Bone Morphogenetic Protein 2-L100K/N102D (rekombinant)	AG Prof. Dr. Sebald; Würzburg
<b>BMP6</b>	Bone Morphogenetic Protein 6 (rekombinant)	AG Prof. Dr. Vukicevic; Zagreb
<b>GDF5</b>	Growth and Differentiation Factor 5 (rekombinant)	Biopharm; Heidelberg
<b>GDF5-L60P</b>	Growth and Differentiation Factor 5-L60P (rekombinant)	Biopharm; Heidelberg
<b>GDF5-S94N</b>	Growth and Differentiation Factor 5-S94N (rekombinant)	Biopharm; Heidelberg
<b>GDF5-PKD</b>	Growth and Differentiation Factor 5-L56P/Y106K/Q108D (rekombinant)	AG Prof. Dr. Sebald; Würzburg

Kurzbezeichnung	Ligand	Hersteller
Noggin	Recombinant Mouse Noggin / Fc Chimera	R&D Systems
Sclerostin	Recombinant Human Sclerostin	R&D Systems Pfizer
Wnt 3a	Recombinant Mouse Wnt3a / Fc Chimera	R&D Systems

### 3.1.12. Antikörper

Tab. 3.12 primäre Antikörper

primärer Antikörper	Typ/ Herkunft	Hersteller	Blocking- Bedingung	Anwendung	Verdünnung
anti- $\beta$ -Actin	monoklonal Maus	Sigma	3% Milch in 0,1% TBS-T	WB	1:10000 in 0,1% TBS-T
anti-BMPRII (G-17)	polyklonal Ziege	Santa Cruz		IP	1 $\mu$ g
anti-cGKI	polyklonal Kaninchen	Stressgene	3% Milch in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-p-ERK bzw. anti-p-p42/44	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-GAPDH	monoklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-p-GSK3 $\beta$ (S9)	monoklonal Kaninchen	Cell Signaling		WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-HA	monoklonal Maus	Roche	3% Milch in 0,1% TBS-T	FACS WB	1:100 in 1xPBS 1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-Histon H3	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-p-JNK	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-Lamin A/C	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-LRP5 (C- 20)	polyklonal Ziege	Santa Cruz		IP	1 $\mu$ g
anti-LRP6 (C- 10)	monoklonal Maus	Santa Cruz		IP	1 $\mu$ g
anti-p-PDK1 (S241)			5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-p-Akt (S473)	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
anti-p-Akt (T308)	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:2000 in 0,1% TBS-T
anti-P-p38 (T180/ Y182)	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	1% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T

<b>primärer Antikörper</b>	<b>Typ/ Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Blocking-Bedingung</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>anti-Myosin heavy chain</b>	monoklonal Maus	Sigma		IF	1:400 in MST
<b>anti-Sclerostin</b>	monoklonal Maus	Pfizer	3% Milch in 0,1% TBS-T	WB	1:300 in 0,1% TBS-T
<b>anti-Sclerostin</b>	polyklonal Kaninchen	Santa Cruz		IP	1 µg
<b>anti-p-Smad 1/5/8</b>	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
<b>anti-p-Smad (S206)</b>	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
<b>anti-p-Smad (S210)</b>	polyklonal Kaninchen	E. deRobertis	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:50000 in 0,1% TBS-T
<b>anti-p-Smad (S214)</b>	polyklonal Kaninchen	E. deRobertis	5% BSA in 0,1% TBS-T	WB	1:50000 in 0,1% TBS-T
<b>anti-Smad 1</b>	polyklonal Kaninchen	Cell Signaling		WB	1:1000 in 0,1% TBS-T
<b>anti-Smad 1</b>	polyklonal Kaninchen	Santa Cruz	3% BSA in PBS	IF	1:250

Tab. 3.13 sekundäre Antikörper

<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Typ/ Herkunft</b>	<b>Epitop</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>donkey-anti-goat-HRP</b>	Esel	leichte und schwere Ketten der IgGs der Ziege	Santa Cruz	WB	1:5000 in 0,1% TBS-T
<b>goat-anti-mouse-HRP</b>	Ziege	leichte und schwere Ketten der IgGs der Maus	Dianova	WB	1:10000 in 0,1% TBS-T
<b>goat-anti-rabbit-HRP</b>	Ziege	leichte und schwere Ketten der IgGs des Kaninchens	Dianova	WB	1:10000 in 0,1% TBS-T
<b>goat-anti-mouse-Alexa Fluor 488</b>	Ziege	leichte und schwere Ketten der IgGs der Maus	Invitrogen	IF	1:300
<b>goat-anti-mouse-Alexa Fluor 594</b>	Ziege	leichte und schwere Ketten der IgGs der Maus	Invitrogen	IF	1:300

sekundärer Antikörper	Typ/ Herkunft	Epitop	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
goat-anti-rabbit- Alexa Fluor 594	Ziege	leichte und schwere Ketten der IgGs des Kaninchens	Invitrogen	IF	1:300

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken, wie z.B. die Kultivierung und Konservierung von Bakterien, Herstellung von Bakterienmedien, Transformation, Plasmid-DNA Amplifikation, Agarose-Gelelektrophorese, wurden entsprechend den Anweisungen in Sambrook, J. „Molecular Cloning – A Laboratory Manual“ (Third Edition; Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt.

### 3.2.1. Isolierung von Plasmid DNA

Plasmid-DNA wurde - angepasst an die Menge - mit dem „QIAprep Plasmid Mini/Midi Kit“ entsprechend den Herstellerangaben (Qiagene) isoliert. Die Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer „Nanodrop ND-1000“ bestimmt.

### 3.2.2. Isolierung von RNA und Herstellung von cDNA

RNA wurde mit dem „RNA Extraction Kit“ entsprechend den Herstellerangaben (Machery & Nagel) isoliert. Die Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer „Nanodrop ND-1000“ gemessen. Anschließend wurden 0,5-1 µg aufgereinigte RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit 0,5 µl Oligo-dT-Primern (100 pmol/µl) und RNase freiem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O: bidestilliertes Wasser mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat ) versehen und 5 min bei 70 °C inkubiert. Zu den auf Eis gestellten Proben wurden 13 µl der Reverse-Transkriptase-Lösung gegeben, bevor sie 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C inkubiert wurden. Durch den letzten Schritt wurde die Reverse-Transkriptase inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Reverse-Transkriptase-Lösung:

- 1,25 µl dNTPs (10mM; qbiogene)
- 5µl MMLV-RT-Puffer (Promega)
- 1 µl RNAsin RNase Inhibitor (Promega)
- 1 µl Reverse Transkriptase (Promega)
- 4,75 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

### 3.2.3. Quantitative Real time-PCR

Die cDNA wurde mit bidestilliertem Wasser 1:4 oder 1:8 verdünnt und mit SYBR-Green-Mix (Applied Biosystem) versetzt. 6 µl der Proben sowie 4 µl der Primer (6pmol; siehe Tab. 3.5) wurden in die Wells einer 96-Well-qPCR-Platte pipettiert und folgendem Temperatur-Programm unterzogen:

- Denaturierung: 10 min bei 95°C
- Amplifikation (40 Zyklen): 30 s bei 95°C und 60 s bei 60°C (Fluoreszenz-Messung)
- Schmelzkurve: 15 s bei 95 °C, von 60-95°C in 0,5°C-Schritten erwärmen

Bei der quantitativen Real-time-PCR interkaliert das Fluorophor SYBR Green mit den amplifizierten DNA-Fragmenten. Die Zunahme der Fluoreszenz während dieses Prozesses wurde gemessen. Die C<sub>T</sub>-Werte wurden mit Hilfe der StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) bestimmt. Unter Berücksichtigung der C<sub>T</sub>-Werte für das untersuchte Zielgen sowie das Haushaltsgen (hier: HPRT) und der Primer-Effizienzen wurde die „mean normalized expression“ (MNE) nach folgender Gleichung errechnet:  $MNE = (\text{Effizienz der Primer für das Referenzgen})^{(\text{mittlerer } C_T\text{-Wert des Referenzgens})} / (\text{Effizienz der Primer für das Zielgen})^{(\text{mittlerer } C_T\text{-Wert des Zielgens})}$ .

## 3.3. Zellbiologische Methoden

### 3.3.1. Kultivierung und Konservierung von Zellen

ATDC5, C2C12, MC3T3-E1, HEK293T sowie die aus den Extremitätenknospen der Maus isolierten Zellen für den Mikromass-Versuch wurden bei 37°C, wie in der folgenden Tabelle beschrieben, kultiviert. Zum Splitten wurden die Zellen 2-5 min mit Trypsin bei 37°C inkubiert.

**Tab. 3.14 Bedingungen für die Kultivierung verschiedener Zelllinien**

<b>Zellen</b>	<b>Medium, CO<sub>2</sub>-Gehalt im Inkubator</b>	<b>Splitten der Zellen</b>
<b>ATDC5</b>	DMEM/ Ham's F12 1:1 mit 5% FCS v/v, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin//Streptomycin bei 5% CO <sub>2</sub>	jeden 2.-3. Tag 1:6 oder 1:8
<b>C2C12</b> <b>C2C12-BRIB</b> <b>C2C12-BRII</b>	DMEM mit 10% FCS v/v, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin//Streptomycin bei 10% CO <sub>2</sub> ; für die stabil transfizierten Zellen: 500µg/ml G418	jeden 2. Tag 1:8 oder 1:10
<b>COS-7</b>	DMEM mit 10% FCS v/v, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin//Streptomycin bei 5% CO <sub>2</sub>	jeden 3. Tag 1:8 - 1:15
<b>HEK293T</b>	DMEM mit 10% FCS v/v, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin//Streptomycin bei 5% CO <sub>2</sub>	jeden 2-3. Tag 1:10 oder 1:15
<b>Maus-Mikromass</b>	DMEM/ Ham's F12 1:1, 10% FCS v/v, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin//Streptomycin bei 5% CO <sub>2</sub>	
<b>MC3T3-E1</b>	α-MEM mit 10% FCS v/v, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin//Streptomycin bei 5% CO <sub>2</sub>	jeden 3.Tag 1:6 oder 1: 8

Für die Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurden die Neubauer-Zählkammer sowie der Farbstoff Trypan-Blau benutzt. Eingefroren wurden die Zellen in Medium mit 10% DMSO v/v bei -80°C über Nacht (ü.N.) und anschließend in flüssigem Stickstoff.

### **3.3.2. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen**

ATDC5- und MC3T3-E1-Zellen wurden mit Hilfe von Lipofectamine entsprechend den Hersteller-Angaben transfiziert. Die Transfektionseffizienz von MC3T3-E1-Zellen wurde durch die Zugabe von Plus Reagent (Invitrogen; 1 µl für 500 ng DNA und 0,8 µl Lipofectamine) erhöht. Lipofectamine ist eine Mischung aus polykationischen und neutralen Lipiden, die Liposomen bilden können. Nukleinsäuren formen mit diesen Lipid-Strukturen Komplexe, die ihre Aufnahme durch die Plasmamembran erleichtern. Das lipofectamine-haltige Medium wurde nach 5 h entfernt und durch Medium mit FCS ersetzt.

C2C12-Zellen wurden entsprechend den Hersteller-Angaben mit Lipofectamine2000 (0,6 µl für 50 ng DNA) und FCS-haltigem Medium über Nacht (ü. N.) transfiziert.

HEK293T-Zellen und COS-7-Zellen wurden mit Polyethylenimin (PEI) in FCS-haltigem Medium ü. N. transfiziert. Plasmid-DNA und PEI wurden im Verhältnis 1:2 (bezogen auf

µg DNA;µg PEI) in Medium ohne FCS gemischt und 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde Medium mit FCS dazugegeben. Die Zellen wurden mit diesem Transfektionsansatz versehen und ü. N. inkubiert.

Die Transfektionseffizienz wurde entweder durch die parallele Transfektion von eGFP („Green Fluorescent Protein“) oder in den Reporter-gen-Versuchen durch die gleichzeitige Transfektion der Renilla-Luciferase (aus *Renilla renifermis*), die aufgrund eines konstitutiv aktiven Promotors unabhängig exprimiert wurde, bestimmt.

### 3.3.3. Dualer Luziferase-Reporter-gen-Test

Mit Hilfe von Reporter-gen-Konstrukten kann die Expression von Proteinen untersucht werden. Dazu wurde der Promotor des zu untersuchenden Proteins vor die Sequenz eines leicht nachweisbaren Proteins, wie z.B. der *Firefly*-Luziferase aus *Photinus pyralis*, kloniert. Nach der Transfektion des Reporter-gen-Konstruktes wurde die Aktivität des Reporter-gens gemessen und gegen die Aktivität der *Renilla*-Luziferase (aus *Renilla renifermis*), die aufgrund eines konstitutiv aktiven Promotors unabhängig exprimiert wurde, als Referenz quantifiziert.

ATDC5-, C2C12- und MC3T3-E1-Zellen wurden in 48-Well-Platten ausgesät und mit folgenden Konstrukten entsprechend Abschnitt 3.3.2. transfiziert (Tab. 3.8).

**Tab. 3.15 Transfektion der Zellen**

Zelllinie	Zellen/Well	Konstrukte/Well
ATDC5	1,5*10 <sup>4</sup>	35 ng BRE-Luc 15 ng pRL-TK
C2C12	1*10 <sup>4</sup>	35 ng BRE-Luc oder Myg-Luc 15 ng pRL-TK
MC3T3-E1	1,5*10 <sup>4</sup>	300 ng BRE-Luc 150 ng pRL-TK

Am nächsten Tag wurden die Zellen für 5 h mit Medium + 0,5% FCS gehungert und anschließend mit Ligand (gelöst in Medium + 0,5% FCS) für 16 Stunden (BRE-Luc) oder 5 Tage (Myg-Luc) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 50 µl Passiven Lysispuffer (Promega) lysiert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. 10 µl der Lysate wurden mit dem Platten-Luminometer vermessen.

### **3.3.4. Herstellung von Zellysaten zum Nachweis von Phospho-Proteinen**

1,2-2\*10<sup>5</sup> Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät und ü. N. bei optimalen Bedingungen kultiviert. Nach 3 h Hungern in serumfreien Medium wurden die Zellen mit den in Tab. 3.11 aufgeführten, in serumfreien Medium gelösten rekombinanten Proteinen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1x Laemmli-Puffer (6x Laemmli-Puffer: 350mM Tris pH 6,8; 40% v/v Glycerol, 10% w/v Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% v/v  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,0012% w/v Bromphenolblau in ddH<sub>2</sub>O gelöst) lysiert und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 min auf 95°C erwärmt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt oder bei -20°C gelagert.

### **3.3.5. Subzelluläre Fraktionierung**

3\*10<sup>5</sup> Zellen wurden in einer Ø6 cm -Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 3 h in serumfreien Medium gehungert und mit den in Tabelle 3.12. aufgeführten Liganden stimuliert. Die Auftrennung in den cytoplasmatischen und nukleären Teil der Zelle erfolgte mit dem „ProteoJet cytoplasmic and nuclear protein extraction kit“ (Fermentas) entsprechend den Herstellerangaben.

### **3.3.6. Immunfluoreszenz**

3\*10<sup>4</sup> Zellen wurden auf Glasplättchen (Fa. Roth) in einer 24-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 h in Medium mit 0,5% FCS gehungert und anschließend mit den 10 nM Ligand gelöst in Hungermedium inkubiert. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert und mit 3% BSA blockiert. Die endogenen Proteine wurden durch die Inkubation mit primären Antikörpern, wie  $\alpha$ -Smad 1 oder  $\alpha$ -Myosin heavy chain, und den sekundären Antikörpern goat  $\alpha$  rabbit IgG Alexa Fluor 594 oder 488 nachgewiesen. Die Kerne wurden mit DAPI (1:1000, 1 min, RT) gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Fluoromount G eingedeckelt. Für die Anfertigung der Immunfluoreszenz-Bilder wurde das Mikroskop Axiovert 200 M sowie die Axiovision-Software (Zeiss) benutzt.



### **3.3.7. Aktivität der alkalischen Phosphatase**

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) ist ein Marker für die chondrogene und osteoblastische Differenzierung. Sie wurde durch den Umsatz des para-Nitrophenolphosphats zum photometrisch detektierbaren para-Nitrophenol (Gelbfärbung) bestimmt.

$1 \cdot 10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden ausgesät. 24 h später wurden die Zellen mit rekombinanten Proteinen (Tab. 3.11) gelöst in Medium mit 2% FCS inkubiert. Nach 72 h Stimulation wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 1 h mit ALP-Lysispuffer 1 (0,1M Glycin, 1% NP-40, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $ZnCl_2$  werden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, pH 9,6) bei RT lysiert. Dazu wurden der pNPP-haltige ALP-Lysispuffer 2 (0,1M Glycin, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $ZnCl_2$  werden in ddH<sub>2</sub>O gelöst, pH 9,6) gegeben. Sobald eine Gelbfärbung auftrat, wurde die 96-Well-Platte in einem ELISA-Platten-Reader bei 405 nm vermessen.

### **3.3.8. Maus-Micromass**

Die Präparation und Kultivierung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben (216). Die E11.5 Embryonen wurden aus den Mäusen präpariert und in eiskaltes PBS überführt. Die Extremitätenknospen wurden abgetrennt und in 37°C warmes HBSS gegeben. Das Ektoderm wurde bei 37°C durch eine Collagenase/Dispase-Lösung (3 mg/ml in HBSS) von den mesenchymalen Zellen abgelöst. Danach wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit der Collagenase Typ Ia/Trypsin-Lösung (0,1 % Collagenase Typ Ia, 0,1% Trypsin, 5% FCS) bei 37°C für 45 min verdaut. Die Zellen wurden vereinzelt und durch ein Zellsieb gegeben. Tropfen mit  $2 \cdot 10^5$  Zellen/10  $\mu$ l wurden in eine 12-Well-Platte gegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Medium und den darin gelösten rekombinanten Proteinen versetzt und für insgesamt 6 d inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach 6 d wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit Alcian Blue gefärbt.

### **3.3.9. Alcian Blue-Färbung**

Die Zellen wurden 15 min mit Kahle's Fixativ (144,5 ml Ethanol, 5 ml Formaldehyd, 19,5 ml Essigsäure add 500ml ddH<sub>2</sub>O) fixiert und nach erneutem Waschen mit 1x PBS ü. N. mit Alcian Blue (1% in 90 ml ddH<sub>2</sub>O und 10 ml HCl, pH 1,0) gefärbt. Nach wiederholtem Waschen mit 1x PBS wurde die Färbung mit Hilfe des Binokulars dokumentiert.

### **3.3.10. Alizarin Red-Färbung**

Die Zellen wurden nach Entfernen des Mediums 3 min mit der Alizarin Red-Lösung (3,33 % in 100 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 5,5 mit 0,5% NH<sub>4</sub>OH eingestellt) inkubiert, mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dokumentiert.

## **3.4. Proteinanalytische Methoden**

### **3.4.1. Bestimmung des Protein-Gehaltes**

Die Protein-Konzentration wurde entweder mit dem Spektrophotometer „Nanodrop ND-1000“ oder in den Zelllysaten mit dem BCA (Bichinonsäure)-Test bestimmt.

Für den BCA-Test wurden die Zelllysate mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und mit 200 µl einer 49:1-Mischung der Lösungen A (1,35 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,58 % NaOH, 1,00 % BCA, 0,57 % KNa-Tartrat werden in in ddH<sub>2</sub>O gelöst) und B (2,3 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O in ddH<sub>2</sub>O gelöst) in einer 96Well-Platte versetzt. Anschließend wurden die Proben für 20 bis 45 min bei 56°C inkubiert, bis ein deutlich violetter Farbumschlag sichtbar war. Quantifiziert wurde die Intensität der Färbung durch die Messung der optischen Dichte am ELISA-Reader bei 550 nm. Mittels einer Proteineichkurve konnte der Proteingehalt in den einzelnen Lysaten berechnet werden.

### **3.4.2. Co-Immunpräzipitation**

10<sup>6</sup> Zellen wurden pro Ø10 cm -Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen behandelt und mit 1% Triton-Lysepuffer (20mM Tris/HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X werden in ddH<sub>2</sub>O gelöst) versetzt mit Protease-Inhibitoren (1x Complete von Fa. Roche, 1 µM PMSF, 20 mM NaF, 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) lysiert. Anschließend werden 0,5-1 µg spezifischer Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein gegeben und ü.N. bei 4°C mit dem Überkopfschüttler rotiert. Nach Zugabe von mit BSA geblockter Protein A-Sepharose (Sigma) wurden die Proben erneut 1h bei 4°C rotiert. Die Pellets wurden dreimal mit dem 1% Triton-Lysepuffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, auf 95°C erhitzt und nach kurzer Zentrifugation der SDS-PAGE unterzogen.

### 3.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellysate wurden mit 6x Laemmli-Puffer (350mM Tris pH 6,8; 40% v/v Glycerol, 10% w/v SDS, 30% v/v  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,0012% w/v Bromphenolblau in ddH<sub>2</sub>O gelöst) versehen, für 5 min auf 95°C erhitzt und nach kurzer Zentrifugation auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Für die SDS-PAGE und den Proteintransfer wurde das Mini-Protean-System der Firma Biorad genutzt.

Die Gele wurden entsprechend Tab. 3.16 angefertigt und ü. N. bei 4°C gelagert.

Tab. 3.16 Bestandteile des Polyacrylamid-Gels

Chemikalien	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Sammelgel
AA/BAA (40%, 29:1)	2 ml	2,5 ml	0,35 ml
ddH <sub>2</sub> O	4 ml	2,6 ml	2,6 ml
4x Lower Tris	2 ml	2 ml	-
4x Upper Tris	-	-	1 ml
Temed	7 $\mu$ l	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l
40%APS	20 $\mu$ l	8 $\mu$ l	8 $\mu$ l

Die Taschen wurden mit den Proben und einem Protein-Größenstandard (PAGERuler Prestained Protein Ladder Plus; Fa. Fermentas) beladen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese in der BioRad-Apparatur mit SDS-Laufpuffer (Laufpuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% SDS) für 10 min bei 100V und 1 h bei 180 V durchgeführt. Nach erfolgreicher Auftrennung konnten die Proteine entweder mit Coomassie gefärbt (Färbelösung: 1g Coomassie Blue G 250, 10% v/v Methanol, 10% v/v Essigsäure; Entfärbelösung: 10% v/v Essigsäure, 20% Ethanol) oder im Western Blot-Verfahren analysiert werden.

### 3.4.4. Western Blot

Der Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine erfolgte auf eine Nitrozellulose- (Protran, Whatman) oder eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran (Westran, Whatman) nach dem wet-Prinzip bei 100 V und 4°C für 2 h im Transfer-Puffer (25 mM Tris, 190mM Glycin, 20% v/v Methanol). Danach wurde die Membran mit 0,1% TBS-T (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween-20) gewaschen und dann mit 5% BSA gelöst in 0,1% TBS-T für 1 h bei RT geblockt. Die Membran wurde mit dem Primärantikörper entsprechend Tab. 3.12 ü. N. bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen des Primärantikörpers wurde die Membran dreimal 10 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem Pox-gekoppelten Sekundärantikörper

(vgl. Tab. 3.13) für 1 h bei RT inkubiert wurde. Dann wurde erneut dreimal 10 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ChemiSmarts und den Femto-Glo ECL-Reagenzien (P.J.K). Für die Quantifizierung wurde die Bio1D-Software der Fa. Vilber-Lourmat genutzt.

### **3.3.5. Iodierung und chemische Quervernetzung von rekombinanten Proteinen**

Die Iodierung erfolgte nach der Chloramin T-Methode (217). 2 µg rekombinantes Protein („carrierfree“) wurden in 10 µl 1M Natriumphosphat (pH 7,2) gelöst. 2 µl Natriumiodid (Na<sup>[125]I</sup>) (0.2 mCi; Hartmann Analytic) wurden dazugegeben. Anschließend wurde die Iodierung durch die Zugabe von 2 µl Chloramine T (50 µg/ml; Sigma) gestartet. Nach zwei Minuten wurden weitere 2 µl Chloramin T dazugegeben. Nach weiteren 1,5 Minuten wurden die letzten 2 µl Chloramin T dazugegeben. Eine Minute später wurde die Reaktion zwischen [<sup>125</sup>I] und den Tyrosin-Resten des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 10 µl N-Acetyltirosine (100 mM; Sigma), 100 µl Kaliumiodid (100 mM) und 100 µl Harnstoffessigsäure (1.2 g Harnstoff gelöst in 1 ml Essigsäure) gestoppt. Radioaktiv markiertes Protein wurde vom ungebundenen Na<sup>[125]I</sup> mit Hilfe einer Sephadex-G-25-Säule (Fa. Pharmacia), gespült mit Elutionspuffer (4 mM HCl, 75 mM NaCl, 0.1% BSA; Sigma), abgetrennt. Das Eluat wurde in mehreren Fraktionen gesammelt, die mit dem γ-Spektrometer vermessen wurden. Die Fraktionen mit dem gebundenen [<sup>125</sup>I]-Protein wurden bei -20°C in Elutionspuffer gelagert.

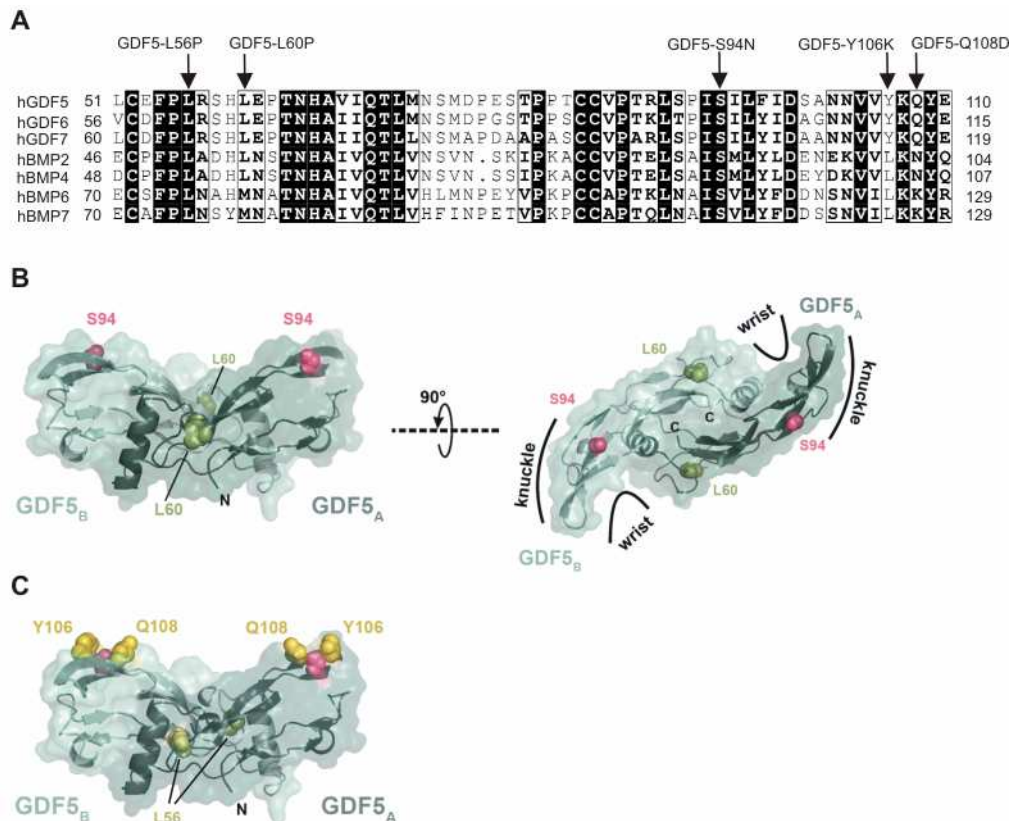
Für die chemische Quervernetzung („Crosslink“) wurden die Zellen dreimal mit erwärmter KRH-Lösung (50 mM HEPES (pH 7,5), 128 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, gelöst in dH<sub>2</sub>O) mit 0,5 % fettsäurefreiem BSA („bovine serum albumin“) gewaschen und für 30 min in KRH-Lösung mit 0,5 % fettsäurefreiem BSA bei 37°C inkubiert. Danach wurde die KRH-Lösung mit 0,5 % fettsäurefreiem BSA mit 350- 500 pM [<sup>125</sup>I]-Protein versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen inkubierten für 3-4 h unter leichtem Schütteln bei 4°C. Nicht gebundenes [<sup>125</sup>I]-Protein wurde daraufhin durch viermaliges Waschen mit KRH-Lösung entfernt. Für die eigentliche Vernetzungsreaktion wurde 10 mg/ml DSS (Disuccinimidyl Suberat) in DMSO gelöst und 1:100 in KRH-Lösung verdünnt. Die Zellen wurden mit dieser Lösung für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit KRH-Lösung bei 4°C gewaschen und lysiert.

## 4. Ergebnisse: Mutationen des *GDF5*

GDF5 ist ein Wachstumsfaktor der BMP/GDF-Familie. Er ist pränatal an der Bildung des Skeletts und der Gelenke und postnatal an deren Homöostase beteiligt. Während der Embryonalentwicklung wird GDF5 im Mesenchym der Extremitätenknospen und später in den zukünftigen Gelenkspalten exprimiert (154). Dabei induziert es zuerst die Kondensation der mesenchymalen Zellen und ihre Differenzierung zu Chondrozyten. Diese bilden die knorpelige Anlage der späteren Knochen. Im Bereich der zukünftigen Gelenkzonen induziert GDF5 ebenfalls die Kondensation der mesenchymalen Zellen und reguliert das Wachstum und die Differenzierung der an den Gelenkspalt angrenzenden Zellen und somit die Entwicklung des Gelenkspaltes (zusammengefasst in(154)).

Die Mutation GDF5-S94N wurde von Akarsu et al. als Ursache für das Multiple Synostoses Syndrom (SYNS) beschrieben, das durch karpale und tarsale Fusionen, Symphalangismus, die humeroradiale Synostosis, Gehörlosigkeit sowie leichte Gesichtsfehlbildungen gekennzeichnet ist (218). Der molekulare Mechanismus, durch den GDF5-S94N SYNS auslöst, wurde im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert. Dabei wurde die durch GDF5-S94N ausgelöste Signaltransduktion und Zelldifferenzierung mit der von GDF5 Wildtyp sowie der von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sebald hergestellten Mutante GDF5-L56P/Y106K/Q108D und der als „loss of function“ publizierten Mutante GDF5-L60P (208) verglichen. GDF5-L60P ruft im Menschen Brachydaktyly Typ A2 (BDA2) hervor, die durch verkürzte Zeigefinger und eine Verkrümmung des kleinen Fingers aufgrund von fehlenden Phalangen oder Hypoplasie gekennzeichnet ist (208).

In Abbildung 4.1 A wird die Aminosäuresequenz von GDF5 mit den Sequenzen anderer Mitglieder der BMP/GDF-Familie verglichen. Die Lage der von den Mutationen betroffenen Aminosäuren ist im GDF5-Dimer hervorgehoben (Abb. 4.1 B, C).



#### Abb. 4.1 Mutationen im GDF5

A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen Mitgliedern der GDF/BMP-Familie; die GDF5-Mutationen L56P, L60P, S94N, Y106K und Q108D sind durch Pfeile markiert. B) Das GDF5<sub>A/B</sub>-Dimer ist in hellem und dunklem blaugrün dargestellt. Die von den Punktmutationen betroffenen Aminosäuren S94 (pink) und L60 (grün) sind gekennzeichnet. Das Modell wird 90° um die X-Achse gedreht, so dass „wrist“-Epitop (BMPRI-Bindungsstelle) und „knuckle“-Epitop (Typ II-Rezeptor-Bindungsstelle) sichtbar sind (rechts). C) Die vom Austausch betroffenen Aminosäuren in der GDF5-Mutante GDF5-L56P/Y106K/Q108D (GDF5-PKD) sind im GDF5<sub>A/B</sub>-Dimer in gelb hervorgehoben. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011 in Kooperation mit Prof. Dr. Mueller)

### 4.1. Mutationen im GDF5-Protein beeinträchtigen dessen Bindung an die BMP-Rezeptoren

GDF5 kann an BMPRIA/B, BMPRII und ActRII/B binden. Bisher ist nur seine Struktur gebunden an den BMPRI gelöst (16,45), während die Struktur von GDF5 im Komplex mit BMPRIA oder BMPRII und einem Typ II Rezeptor (BMPRII, ActRII oder ActRIIB) noch nicht aufgeklärt ist.

Serin 94 (S94) ist im GDF5-Protein eine innerhalb der BMP/GDF-Liganden-Familie hochkonservierte Aminosäure (Abb. 4.1 A). Sie befindet sich im  $\beta$ 6-Faltblatt des „knuckle“-Epitopes (Abb. 4.1 B). Mit Hilfe von „Surface Plasmon Resonance“ (SPR)-Messungen konnte gezeigt werden, dass durch den Aminosäuren-Austausch Serin 94 zu Asparagin die

GDF5-S94N-Mutante mit reduzierter Affinität an die BMP Typ II Rezeptoren bindet: BMPRII (fünffach), ActRII (vierfach) und ActRIIB (vierfach) (Tab. 4.1). Eine vergleichbare Verringerung der Affinität konnte für die Bindung der Mutante BMP2-S88A zum BMPRII und ActRII gezeigt werden (219). Folglich ist Serin 94 in GDF5 ebenso wie das homologe Serin 88 in BMP2 wichtig für die Interaktion mit den BMP Typ II-Rezeptoren.

**Tab. 4.1 Affinitäten der GDF5-Mutanten zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren**

Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen SPR-Messungen mit mindestens sechs unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen, die in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Sebald entstanden sind. n. d. = nicht detektierbar, k. A. keine Angabe (Schwaerzer et al. - JBMR 2011)

Ligand	K <sub>D</sub> [nM]					Referenz
	BMPRIA	BMPRIIB	BMPRII	ActRII	ActRIIB	
<b>BMP2</b>	0,8	2,4	45	14	6,3	(44,45)
<b>GDF5</b>	19	1,3	36	20	4	
<b>GDF5-L60P</b>	n. d.	42,3	31,9	k. A.	k. A.	(16)
<b>GDF5-S94N</b>	19,5	1,2	183,7	84	31,4	
<b>GDF5-L56P/Y106K/Q108D</b>	n. d.	n. d.	11,3	4,3	1,1	

In der Mutante GDF5-L56P/Y106K/Q108D wurde Tyrosin 106 gegen Lysin (Y106K) und Glutamin 108 gegen Asparaginsäure (Q108D) im  $\beta$ 7-Faltblatt des „knuckle“-Epitopes ausgetauscht (Abb. 4.1 A, C). Dadurch bindet GDF5-L56P/Y106K/Q108D mit dreifach erhöhter Affinität an die BMP Typ II Rezeptoren (Tab. 4.1). Zusätzlich zu diesen Mutationen wurde im „wrist“-Epitop von GDF5-L56P/Y106K/Q108D Leucin 56 gegen Prolin (GDF-L56P) ersetzt (Abb. 4.1 A, C), so dass BMPRIA oder BMPRIIB nicht mehr gebunden wurden (Tab. 4.1). Ob dieser Bindungsverlust zum Typ I-Rezeptor durch die stärkere Affinität von GDF5-L56P/Y106K/Q108D zu den Typ II-Rezeptoren kompensiert werden kann, wurde hier untersucht.

Wie GDF5-L56P/Y106K/Q108D kann auch GDF5-L60P den BMPRIA nicht mehr und den BMPRIIB nur mit einer 33fach reduzierten Affinität binden (Tab. 4.1). Im Vergleich zur L56P-Mutation im GDF5-L56P/Y106K/Q108D-Protein liegt die Mutation GDF5-L60P nicht im, sondern in seitlicher Nähe zum „wrist“-Epitop und hat keinen direkten Kontakt mit BMPRI (Abb. 4.1 B). Die Affinität zum Typ II-Rezeptor wurde durch den Austausch L60P im GDF5 nicht verändert (Tab. 4.1). Insgesamt zeigten GDF5-L60P und GDF5-S94N bei den SPR-Messungen konträre Bindungsaffinitäten: Die GDF5-S94N-Mutante bindet unverändert an die BMP Typ I-Rezeptoren und die Typ II-Rezeptoren mit vier- bis fünffach reduzierter

Affinität. Im Gegensatz dazu bindet die GDF5-L60P-Mutante die Typ I-Rezeptoren mit deutlich reduzierter Affinität und die Typ II-Rezeptoren mit unveränderter Affinität (Tab.4.1). Es stellte sich die Frage, welche Folgen die veränderten Bindungsaffinitäten der GDF5-Mutanten zu den BMP-Rezeptoren auf die biologische Aktivität der Wachstumsfaktoren haben. Deshalb wurden Signaltransduktion und Differenzierung nach Stimulation mit GDF5 Wildtyp und Mutanten in C2C12-Zellen, die in Gegenwart von BMP2/GDF5 direkt zu Osteoblasten differenzieren können, in den Prä-Chondroblasten ATDC5 und in mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen von Mausembryonen (E11.5) untersucht.

## **4.2. Die GDF5-S94N-Mutante verzögert die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges**

### **4.2.1. Phosphorylierung von R-Smad 1/5/8 und dessen Translokation in den Nukleus**

Nach Stimulation mit BMP2 oder GDF5 werden Smad 1/5/8 vom aktivierten BMPRI am C-terminalen „SSXS“-Motiv phosphoryliert. Sie translozieren im Komplex mit Co-Smad 4 in den Nukleus und regulieren dort die Transkription von Zielgenen. Wie sich die veränderten Ligand-Rezeptor-Affinitäten der Mutanten GDF5-S94N, GDF5-L56P/Y106K/Q108D und GDF5-L60P auf den Smad-abhängigen Signalweg auswirken, wurde sowohl durch Analyse der Smad 1/5/8-Phosphorylierung am C-Terminus als auch durch Translokationsstudien von Smad 1 mit Hilfe von Western Blot und Immunfluoreszenz in C2C12- und ATDC5-Zellen untersucht (Abb. 4.2).

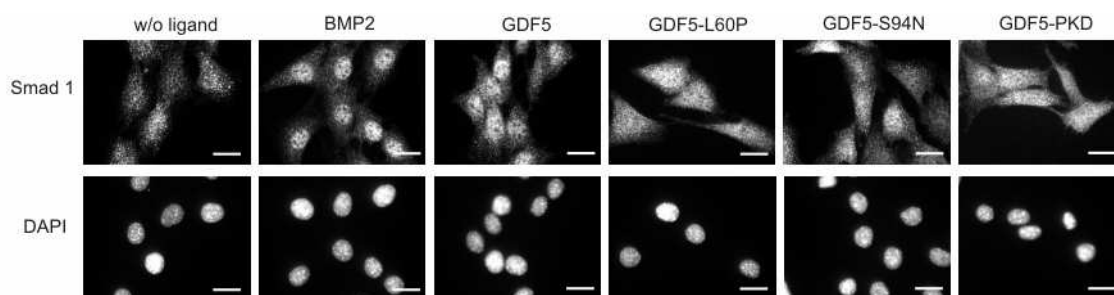




**Abb. 4.2 GDF5-S94N induziert eine verringerte Smad-Phosphorylierung**

A) C2C12- und B) ATDC5-Zellen wurden drei Stunden gehungert und mit BMP2, GDF5, GDF5-L60P (G-L60P), GDF5-S94N (G-S94N) oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die C-terminale Phosphorylierung der R-Smads 1/5/8 mittels Western Blot analysiert.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. (Abb. 4.2 A auch in Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Das Muster der Smad 1/5/8-Phosphorylierung war in beiden Zelllinien vergleichbar (Abb. 4.2 A, B). Nach 30-minütiger Inkubation mit BMP2, dessen Signaltransduktion in C2C12-Zellen gut charakterisiert ist, wurden Smad 1/5/8 stark am C-terminalen „SSXS“-Motiv phosphoryliert (p-Smads). Geringer war die Menge an p-Smads in C2C12- und ATDC5-Zellen nach Inkubation mit GDF5. GDF5-S94N induzierte eine noch geringere p-Smad-Konzentration als GDF5 Wildtyp. Nach Stimulation mit GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D waren in den C2C12- und ATDC5-Zellen kaum phosphorylierte Smad 1/5/8-Proteine nachweisbar (Abb. 4.2 A, B).



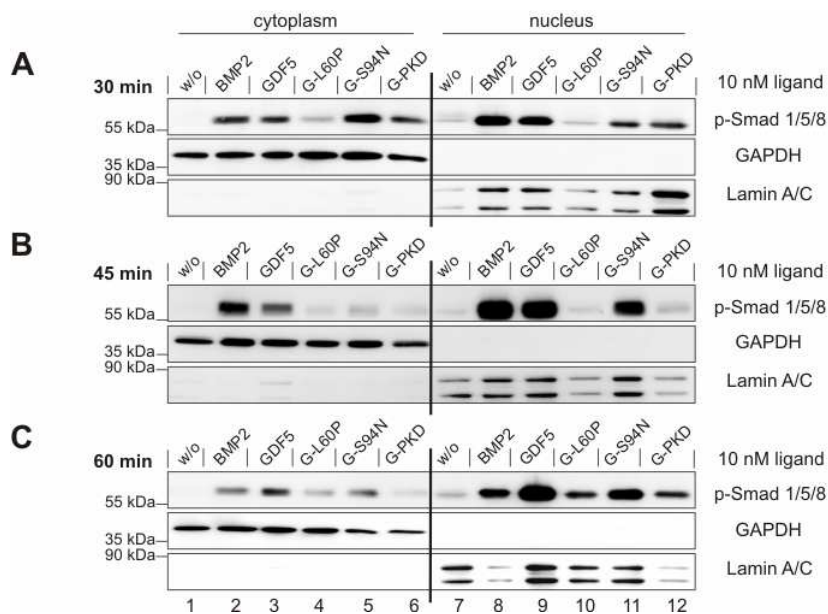
**Abb. 4.3 GDF5-S94N vermindert die nukleäre Akkumulation von Smad 1**

Die liganden-induzierte Translokation von Smad 1 nach 30minütiger Stimulation von C2C12-Zellen wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung von Smad 1 sichtbar (oben). Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (unten). Die Referenzmarkierung entspricht 20  $\mu$ m. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigte nach 30-minütiger BMP2- oder GDF5-Inkubation eine Akkumulation von Smad 1 im Nukleus (Abb. 4.3). Im Vergleich dazu induzierte GDF5-S94N eine geringere nukleäre Smad-Konzentration. Die Smad-Translokation in GDF5-L60P- und

GDF5-L56P/Y106K/Q108D-behandelten Zellen unterschied sich nicht von den unstimulierten Zellen (Abb. 4. 3).

Um einen genaueren Einblick über die räumliche und zeitliche Verteilung von p-Smads innerhalb der Zelle zu erhalten, wurden C2C12-Zellen 30-60 Minuten mit den Liganden inkubiert und dann in die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion aufgetrennt (Abb. 4.4). Da C2C12- und ATDC5-Zellen eine vergleichbare Smad-Phosphorylierung nach Liganden-Stimulation zeigen (vgl. Abb. 4.2 A, B), wird hier die Fraktionierung nur für die C2C12-Zellen gezeigt (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4 GDF5-Mutanten induzieren eine verzögerte Smad-Translokation in den Nucleus**

C2C12-Zellen wurden für 30(A), 45(B) oder 60(C) Minuten mit BMP2, GDF5, GDF5-L60P (G-L60P), GDF5-S94N (G-S94N) oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) stimuliert. Nach Fraktionierung der Zellen in den zytoplasmatischen und den nukleären Teil wurde die C-terminale Smad 1/5/8 Phosphorylierung mit einem spezifischen Antikörper detektiert. GAPDH und Lamin A/C dienten sowohl als Lade- als auch als Kontrolle für die Trennung von Zytoplasma und Nucleus. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Es bestätigt sich, dass nach 30-minütiger Stimulation mit BMP2, GDF5 oder GDF5-S94N eine Translokation der Smad-Proteine in den Nucleus induziert wurde (Abb. 4.4 A, Spur 8, 9, 11). Zusätzlich konnte durch die Aufkonzentrierung bei der Fraktionierung eine Smad-Aktivierung und nukleäre Translokation nach GDF5-L56P/Y106K/Q108D-Inkubation nachgewiesen werden (Abb. 4.4 A, Spur 12). Im Vergleich zu GDF5 Wildtyp wurde durch GDF5-S94N und GDF5-L56P/Y106K/Q108D eine schwächere nukleäre Akkumulation an p-Smads 1/5/8 stimuliert; die Konzentration an p-Smad 1/5/8 im Zytoplasma hingegen war relativ hoch (Abb. 4.4 A, Spur 11, 12). Mit zunehmender Stimulationszeit erhöhte sich der

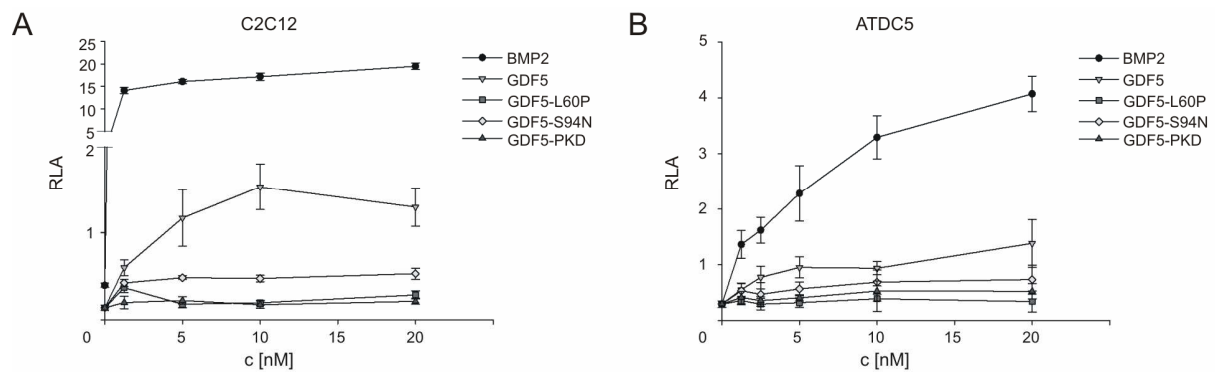
Anteil der nukleären Smads: Nach 45-minütiger Stimulation mit BMP2, GDF5 und GDF5-S94N konnte ein höherer Anteil an nukleären p-Smads detektiert werden als nach 30-minütiger Stimulation (Abb. 4.4 B, Spur 8, 9, 11). Nach 60 Minuten war die nukleäre p-Smad-Konzentration der mit GDF5-S94N- oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D-behandelten Zellen weiter angestiegen, so dass sie mit der nukleären p-Smad-Konzentration in den mit GDF5-stimulierten Zellen vergleichbar war (Abb. 4.4 C, Spur 9, 11, 12). Im Gegensatz dazu induzierte GDF5-L60P auch nach 60-minütiger Stimulation eine nur geringe nukleäre Akkumulation an p-Smads (Abb. 4.4 C, Spur 10).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die reduzierte Bindungsaffinität von GDF5-S94N zu den BMP Typ II-Rezeptoren wie auch die reduzierte Affinität von GDF5-L56P/Y106K/Q108D zum BMPRI die Aktivierung und Translokation von Smad 1/5/8 in den Nukleus verzögern. GDF5-L60P hingegen hemmt die Smad-Aktivierung durch den Verlust der BMPRI-Bindung.

#### **4.2.2. Smad-abhängige Transkription**

Im Nukleus bindet Smad 1/5/8 im Komplex mit Co-Smad 4 an so genannte Smad-binding elements (SBEs). Die Promotorregion des *Id1*-Gens ist detailliert untersucht worden und weist zwei BMP-responsive Regionen auf. Die eine Region umfasst zwei SBEs, die andere eine palindrome Sequenz (GGCGCC), flankiert von dem „CAGC“- und „CGCC“-Motiv (59). Zusammen bilden diese das sogenannte BMP response element (BRE). Das BRE aus dem *Id1*-Promotor wurde vor die Sequenz der Firefly-Luciferase kloniert (BRE-Luc). In den mit BRE-Luc transfizierten Zellen können die aktivierten Smads im Nukleus an BRE binden und die Transkription der Firefly-Luciferase induzieren.

Um den Einfluss der reduzierten Rezeptor-Affinitäten der GDF5-Mutanten auf deren Transkriptionsaktivität zu untersuchen, wurden C2C12- und ATDC5-Zellen mit der Plasmid-DNA von BRE-Luc und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase (RL-TK) transfiziert. Nach Inkubation mit GDF5 Wildtyp oder den Mutanten wurden beide Luciferase-Aktivitäten gemessen. Zur Berücksichtigung von Unterschieden in Transfektionseffizienz und Proliferation wurde die BRE-Luc-Aktivität gegen die der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase normiert (Abb. 4.5).



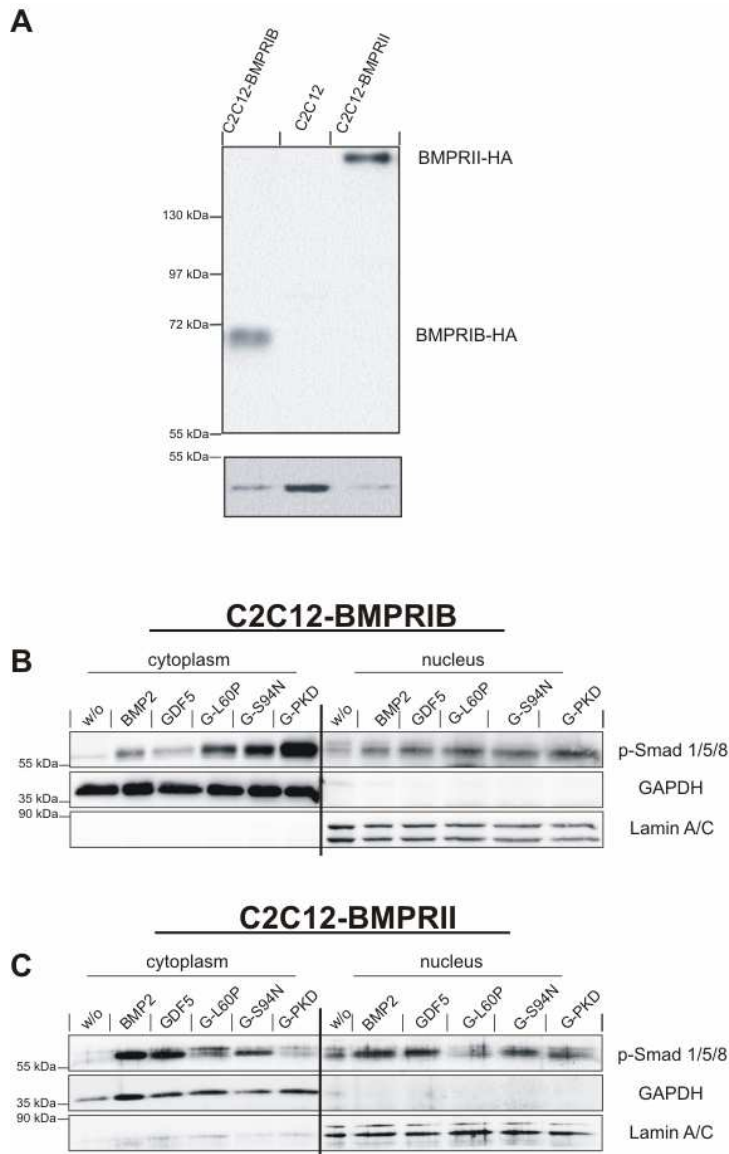
**Abb. 4.5 Die Smad-abhängige Transkription ist nach Stimulation mit GDF5-S94N stark reduziert**

Die BRE-abhängige Reporter-gen-Aktivität wurde nach Transfektion mit den Reporter-gen-Konstrukten und Stimulation mit den genannten Liganden mit zunehmender Konzentration in A) C2C12- und B) ATDC5-Zellen analysiert. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate wurden als „relative light activity“ (RLA) dargestellt und repräsentieren eines von drei Experimenten. GDF5-L56P/Y106K/Q108D = GDF5-PKD. (Abb. 4.5 A auch in Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Die Stimulation mit GDF5-S94N zeigte sowohl in C2C12- als auch in ATDC5-Zellen eine deutlich geringere Luciferase-Aktivität als GDF5 Wildtyp (Abb. 4.5 A, B). Dieses Ergebnis wurde aufgrund der verzögerten Smad-Phosphorylierung und Smad-Translokation in den Nukleus (Abb. 4.4) erwartet. Die Smad-Aktivierung nach Inkubation mit GDF5-L56P/Y106K/Q108D oder GDF5-L60P reichte hingegen für die Induktion der Luciferase-Aktivität nicht aus (Abb. 4.5).

Ob die reduzierten Bindungsaffinitäten der GDF5-Mutanten zu den Rezeptoren durch eine höhere Rezeptorkonzentration an der Zelloberfläche kompensiert werden können, wurde mit Hilfe von stabil transfizierten C2C12-Zelllinien untersucht.

Die C2C12-BMPRII- und C2C12-BMPRII-Zellen waren mit den HA-markierten Rezeptoren BMPRII oder BMPRII stabil transfiziert worden (48). Deren Expression wurde mittels Western Blot kontrolliert (Abb. 4.6 A).



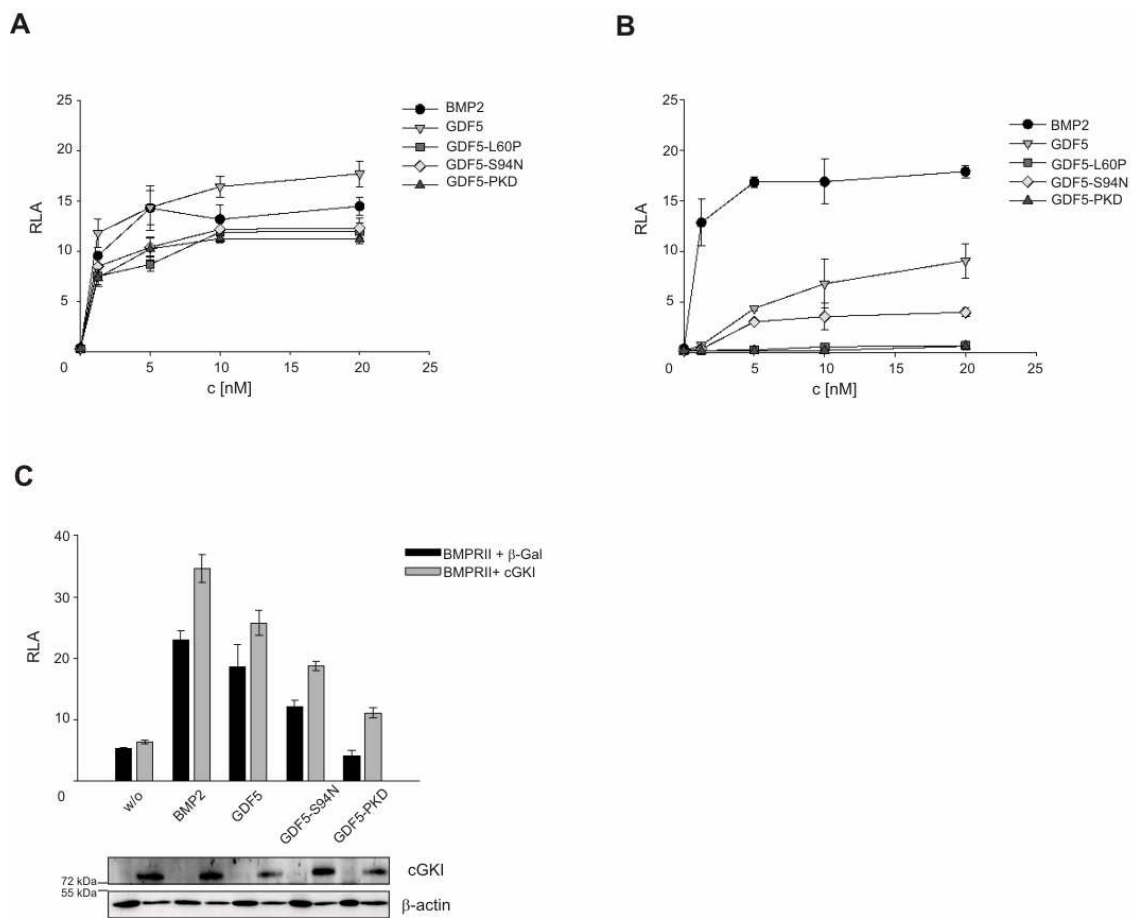
**Abb. 4.6 Die Überexpression von BMPRIIB oder BMPRII kompensiert den Bindungsverlust der GDF5-Mutanten zum jeweiligen Rezeptor**

A) C2C12-Zellen wurden stabil mit BMPRIIB-HA (C2C12-BMPRIIB) oder BMPRII-LF-HA (LF=long form: (C2C12-BMPRII)) transfiziert. Die Expression der HA-markierten Rezeptoren wurde mittels Western Blot und HA-spezifischem Antikörper nachgewiesen.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. B) C2C12-BMPRIIB- und C) C2C12-BMPRII-Zellen wurden mit BMP2, GDF5, GDF5-L60P (G-L60P), GDF5-S94N (G-S94N) oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) inkubiert. Nach 30minütiger Stimulation wurden die Menge an p-Smads im Zytoplasma und im Nukleus nach Zellfraktionierung analysiert. Als Ladekontrolle sowie Kontrolle der Fraktionierung dienten Lamin A/C und GAPDH.

Anschließend wurden die Zellen mit GDF5 Wildtyp oder den GDF5-Mutanten inkubiert. Die Aktivierung und nukleäre Translokation von Smad 1/5/8 wurde nach Zellfraktionierung durch die Western-Blot-Analyse untersucht. Durch die Überexpression von BMPRIIB konnten die reduzierten Bindungsaffinitäten der Mutanten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D zu BMPRIIB kompensiert werden, so dass schon nach 30-minütiger Stimulation keine Unterschiede im Translokationsverhalten der phosphorylierten Smads zu erkennen waren (Abb. 4.6 B im Vergleich zu Abb. 4.4 A). Die Überexpression des BMPRII förderte die

Smad-Translokation der mit GDF5, GDF5-S94N oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D stimulierten Zellen, so dass auch hier nach 30 Minuten keine Unterschiede in der nukleären p-Smad-Konzentration feststellbar waren. In den mit GDF5-L60P stimulierten C2C12-BMPRII-Zellen war die nukleäre p-Smad-Konzentration jedoch unverändert gering (Abb. 4.6 C im Vergleich zu Abb. 4.4 A).

Ob sich durch die Rezeptor-Überexpression auch die transkriptionelle Aktivität der Mutanten verbessern würde, wurde nach Transfektion der C2C12-BMPRII- oder C2C12-BMPRII-Zellen mit der Plasmid-DNA BRE-Luc und RL-TK untersucht (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7 Die Überexpression von BMPRII oder BMPRII verbessert die Smad-abhängige transkriptionelle Aktivität der Mutanten**

A), B) Die BRE-abhängige Reporter-Gen-Aktivität wurde nach Transfektion der A) C2C12-BMPRII- und B) C2C12-BMPRII-Zellen mit den Reporter-Gen-Konstrukten und Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an BMP2, GDF5, GDF5-L60P, GDF5-S94N oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (GDF5-PKD) gemessen. Die Luciferase-Aktivitäten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen einer Triplikat-Messung und werden als „relative light activity“ (RLA) im Säulen-Diagramm dargestellt. Die Ergebnisse konnten in zwei weiteren Versuchen reproduziert werden. C) C2C12-BMPRII wurden mit  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) oder cGKI und den Reporter-Gen-Konstrukten transfiziert und 16 h mit den Liganden stimuliert. Die Luciferase-Aktivitäten sind als RLA graphisch dargestellt und zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Triplikaten aus einem von zwei vergleichbaren Versuchen. Die Expression von cGKI wurde durch Western Blotting mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

Durch die Überexpression von BMPRII konnte auch die verringerte Luciferase-Aktivität von GDF5-L60P, GDF5-S94N und GDF5-L56P/Y106K/Q108D um ein Vielfaches verbessert werden: Die durch GDF5-S94N sowie GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D induzierte Reporter-Gen-Aktivität erreichte 80% der Aktivität, die durch GDF5 Wildtyp hervorgerufen wurde (Abb. 4.7 A). Die Luciferase-Aktivität der C2C12-BMPRII-Zellen war im Vergleich zu den wildtypischen C2C12-Zellen (Abb. 4.5) nach GDF5-Stimulation um den Faktor 4 und nach GDF5-S94N-Stimulation um den Faktor 8 erhöht (Abb. 4.7 B). GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D lösten wie in den parentalen C2C12-Zellen keine Expression des Reportergens aus (Abb. 4.7 B).

Des Weiteren stellte sich die Frage, welchen Einfluss die verminderte Affinität von GDF5-S94N zu BMPRII auf BMPRII-assoziierte Proteine hat, die die Smad-abhängige Signaltransduktion unterstützen. Um dies näher zu untersuchen, wurden C2C12-BMPRII-Zellen mit Plasmid-DNA der cGMP-dependent protein kinase I (cGKI), von BRE-Luc und der konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase transfiziert und im Reporter-Gen-Versuch analysiert (Abb. 4.7 C). cGKI bindet an den BMPRII und phosphoryliert diesen. Nach BMP2-Stimulation dissoziiert cGKI vom BMPRII und bindet die aktivierten Smads, mit denen sie in den Nukleus transloziert. Dort rekrutiert sie den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFII-I in den Smad-Transkriptionskomplex am Id1-Promotor und fördert so die Transkription von Id1 (36). Die SBEs und BMP-responsiven Regionen des Id1-Promotors wurden vor die Sequenz der Firefly-Luciferase kloniert (BRE-Luc), mit der die C2C12-BMPRII-Zellen transfiziert wurde.

Ohne cGKI nahm die Luciferase-Aktivität von GDF5 über GDF5-S94N zu GDF5-L56P/Y106K/Q108D ab. Durch die Überexpression von cGKI zeigten die mit GDF5 und den GDF5-Mutanten stimulierten Zellen eine ca. 30% (GDF5, GDF5-S94N) oder 50% (GDF5-L56P/Y106K/Q108D) höhere Luciferase-Aktivität als die mit  $\beta$ -Galactosidase-transfizierten Zellen. Demzufolge hatte die reduzierte Affinität des GDF5-S94N zum BMPRII keinen Einfluss auf die Aktivität von cGKI, während die stärkere Bindung des GDF5-L56P/Y106K/Q108D an den BMPRII die Aktivierung der cGKI zu erleichtern scheint (Abb. 4.7 C). Die Luciferase-Aktivität der unstimulierten Zellen wurde durch die Überexpression der cGKI nicht beeinflusst, so dass ein ligandenunabhängiger Effekt ausgeschlossen werden konnte.

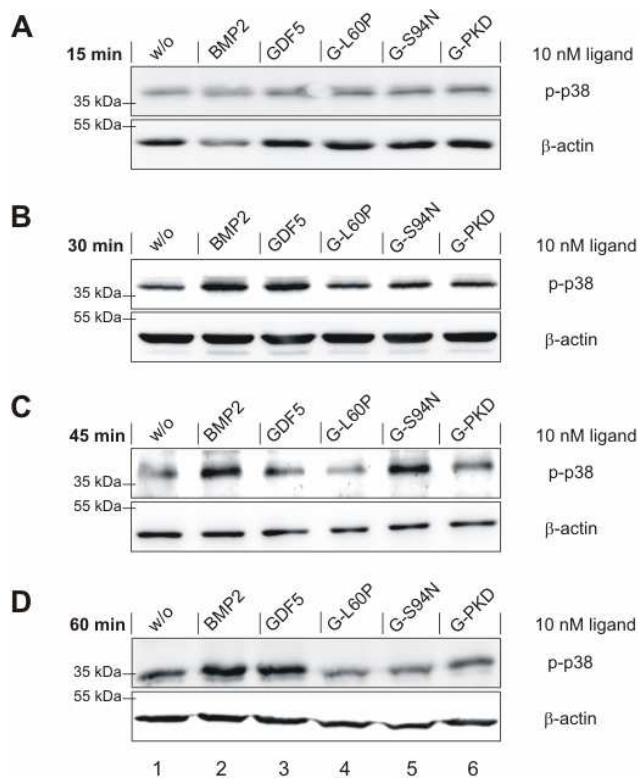
Mit Hilfe der Reporter-Gen-Versuche konnte gezeigt werden, dass durch die reduzierte Affinität von GDF5-S94N zu den Typ II-Rezeptoren die Smad-abhängige Transkription verringert wird. Die BMPRII-assoziierte cGKI konnte jedoch weiterhin die Smad-abhängige

Transkription unterstützen. Durch die Überexpression von BMPRII oder BMPRI wurde die durch GDF5-S94N ausgelöste Transkription gesteigert. Eine vollständige Kompensation der verringerten GDF5-S94N-Aktivität, die aus der reduzierten Affinität zu den Typ II-Rezeptoren hervorgeht, wurde jedoch nicht erreicht. Eine größere Bedeutung für die transkriptionelle Aktivität scheint die Bindung von GDF5 an den Typ I-Rezeptor zu haben, da GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D nur nach Überexpression von BMPRII die Smad-abhängige Transkription induzieren konnten.

### **4.3. Die GDF5-S94N-Mutante verzögert die Aktivierung der p38 MAP-Kinase**

GDF5 und BMP2 binden hochaffin an die BMP Typ I-Rezeptoren und rekrutieren dann die Typ II-Rezeptoren in den BISC. Sie induzieren den p38 MAPK-Signalweg (46). Ob die Mutanten ebenfalls diesen „Non-Smad“-Weg aktivieren können, wurde durch die Analyse der Phosphorylierung von p38 MAPK (p-p38) nach Stimulation für 15, 30, 45 oder 60 Minuten in C2C12-Zellen untersucht (Abb. 4.8).





**Abb. 4.8 GDF5-S94N induziert eine verzögerte p38 MAPK-Phosphorylierung**

A)- D) C2C12-Zellen wurden für 15-60 Minuten mit BMP2, GDF5, GDF5-L60P (G-L60P), GDF5-S94N (G-S94N) oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) stimuliert. Die Phosphorylierung von p38 wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Die Phosphorylierung der p38 MAPK war nach 30-, 45- bzw. 60-minütiger Stimulation mit BMP2 und GDF5 nachweisbar (Abb. 4.8 B-D). Im Gegensatz dazu blieb die Phosphorylierung von p38 nach Inkubation mit den GDF5-Mutanten für 30 Minuten aus. p38 Phosphorylierung konnte erst nach 45-minütiger Inkubation mit GDF5-S49N detektiert werden (Abb. 4.8 C, Spur 5). Stimulationen mit GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D für 45 oder 60 Minuten hingegen konnten keine Aktivierung von p38 induzieren (Abb. 4.8 A-D, Spuren 4, 6).

Ob sich die Aktivierung der p38 MAPK ebenso wie die Aktivierung der Smads durch die Überexpression von BMPRII oder BMPRII verbessern lässt, wurde in den stabil transfizierten C2C12-BMPRII- und C2C12-BMPRII-Zellen nach 30-minütiger Stimulation mit GDF5 Wildtyp oder den Mutanten untersucht. Die p-p38-Konzentration war jedoch schon in den unstimulierten C2C12-BMPRII und BMPRII-Zellen relativ hoch, so dass keine eindeutigen Aussagen über die liganden-abhängige Aktivierung getroffen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Durch die Stimulation der ATDC5-Zellen mit GDF5 Wildtyp oder den GDF5-Mutanten wurde der Einfluss der GDF5-Mutationen auf die Aktivierung der p38 MAPK während der

Chondrogenese untersucht. Wie in den C2C12-Zellen konnte nach 30- und 60-minütiger Stimulation mit GDF5-S94N eine geringere p-p38-Konzentration als in den GDF5-stimulierten Zellen detektiert werden. GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D konnten in den ATDC5-Zellen die Phosphorylierung von p38 nicht induzieren (Daten nicht gezeigt). Ohne die Bindung der Mutanten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D an den BMPRI wurde die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges in C2C12- und ATDC5-Zellen verhindert. Das konnte, wie die Inkubation mit GDF5-L56P/Y106K/Q108D zeigte, durch eine stärkere Bindung an den BMPRII nicht ausgeglichen werden. Die reduzierte Affinität von GDF5-S94N zu den BMP Typ II-Rezeptoren verzögerte und reduzierte die Aktivierung von p38 MAPK.

#### **4.4. Mutationen im GDF5-Protein beeinflussen die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Chondrozyten und Osteoblasten**

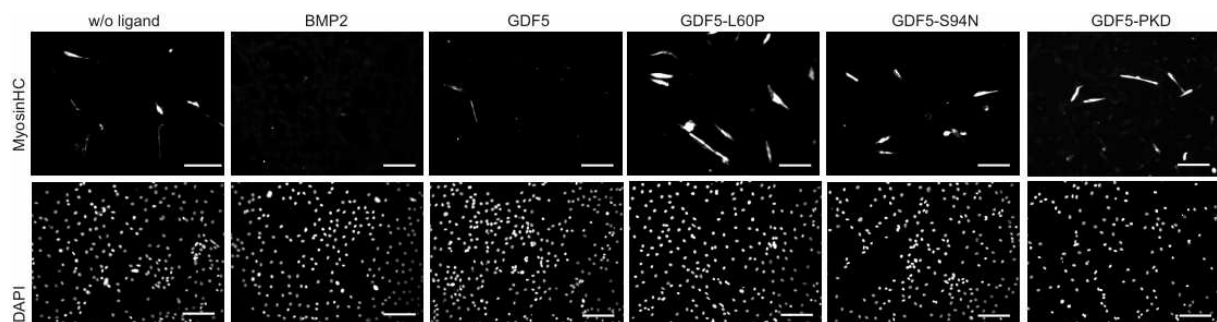
Die Bindung von BMP2/GDF5 aktiviert den Smad-abhängigen Signalweg. Die aktivierten R-Smads translozieren mit Smad 4 in den Nukleus und induzieren die Transkription der Zielgene. Zu diesen zählen u.a. *Id1* sowie die osteogenen Marker *Runx2*, *Sp7*, *Ocn*, *Col1a*, *ALP* und *BSP*, aber auch Smad 6 und Noggin (59,61,73,87,112,146,220). *Id1* bindet an den Transkriptionsfaktor MyoD und verhindert so die Interaktion von MyoD mit der DNA und die Myogenese (221,222). Der Transkriptionsfaktor *Runx2* hingegen gilt als „Schlüsselregulator“ der Osteogenese. Er wird in MSCs, prä-chondrogenen Zellen und im Perichondrium exprimiert und fördert die Reifung zu hypertrophen Chondrozyten sowie die Differenzierung zu Osteoblasten (223,224). *Runx2* induziert die Expression vieler osteoblast-spezifischer Gene, zu denen auch *Sp7* und *Ocn* gehören (224). Die Aktivität von *Runx2* kann durch Interaktion mit den R-Smads im Transkriptionskomplex und nach Phosphorylierung durch Kinasen wie p38 MAPK, JNK und PKC noch verbessert werden (73,103,112). Der „knock out“ von *Runx2* verhindert die endochondrale und desmale Ossifikation, so dass die *Runx2*-defizienten Mäuse ein nicht-mineralisiertes Skelett besaßen (220,225,226). Der konditionelle „knock out“ von Smad 1/5 inhibierte hingegen die Chondrogenese (227).

Andererseits konnten p38 und ERK in mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen sowie in ATDC5-Zellen die Expression der chondrogenen und osteogenen Markergene *ALP*, *Col2a*, *Col10a*, *BSP* oder *MMP13* induzieren (101,228). Das zeigt, dass sowohl die Smad-

abhängigen als auch die „Non-Smad“-Signalwege die Differenzierung zu Chondrozyten und Osteoblasten regulieren. Wie die durch die GDF5-Mutanten induzierten Signalkaskaden die Differenzierung beeinflussen, wurde hier in C2C12, ATDC5- und Micromass-Zellen mittels Immunfluoreszenz, qPCR und Analyse der ECM-Produktion untersucht.

#### 4.4.1. GDF5-Mutanten verhindern die osteoblastäre Differenzierung von C2C12-Zellen

C2C12-Zellen differenzieren *in vitro* bei Zell-Zell-Kontakt oder in Serum-reduziertem Medium zu Myotuben, die Myosin und Myogenin exprimieren. In Gegenwart von BMP2 jedoch wird die Myogenese der C2C12-Zellen inhibiert und die Transdifferenzierung zu Osteoblasten induziert (87,221). Fraglich war, wie sich die Mutationen im „knuckle“-Epitop und/oder „wrist“-Epitop des GDF5-Proteins auf beide Differenzierungswege auswirken könnten. Die C2C12-Zellen wurden deshalb mit GDF5 Wildtyp oder den Mutanten stimuliert. Zuerst wurde die Bildung von Myotuben mit der Immunfluoreszenz analysiert (Abb. 4.9). Außerdem wurde die Expression von myogenen und osteogenen Markern mittels quantitativer Realtime-PCR (qPCR) und auf Proteinebene durch die Messung der Reportergen- sowie der ALP- (alkalische Phosphatase) Aktivität untersucht (Abb. 4.10, 4.11).



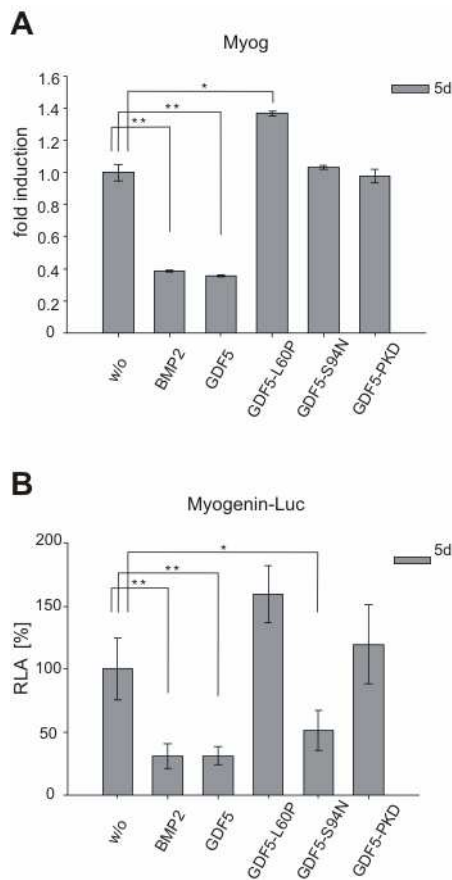
**Abb. 4.9 Die GDF5-Mutanten können die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben nicht inhibieren**

A) C2C12-Zellen wurden für fünf Tage mit Serum-reduzierten Medium, BMP2, GDF5, GDF5-L60P, GDF5-S94N oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) inkubiert. Die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben wurde mit einem Antikörper gegen die schweren Ketten des Skelettmuskel-spezifischen Myosins („Myosin heavy chains“ / Myosin HC) detektiert (oben). Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (unten). Die Referenzmarkierung entspricht 150 µm. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigte, dass BMP2 und GDF5 die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben wie erwartet verhinderten (Abb. 4.9). Im Gegensatz hierzu

konnten sich trotz Stimulation mit GDF5-S94N und GDF5-L56P/Y106K/Q108D Myotuben bilden ähnlich den Zellen, die in Serum-reduziertem Medium kultiviert wurden. GDF5-L60P induzierte, wie bereits publiziert (208), eine verstärkte Myotuben-Bildung (Abb. 4.9).

Um nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen treffen zu können, wurde der Fortschritt der Myogenese durch die Myogenin (*Myog*)-Expression mittels qPCR sowie im Reporter-gen-Versuch mit Hilfe einer vom Myogenin-Promotor abhängigen Firefly-Luciferase (*Myg-Luc*) gemessen (Abb. 4.10 A, B).

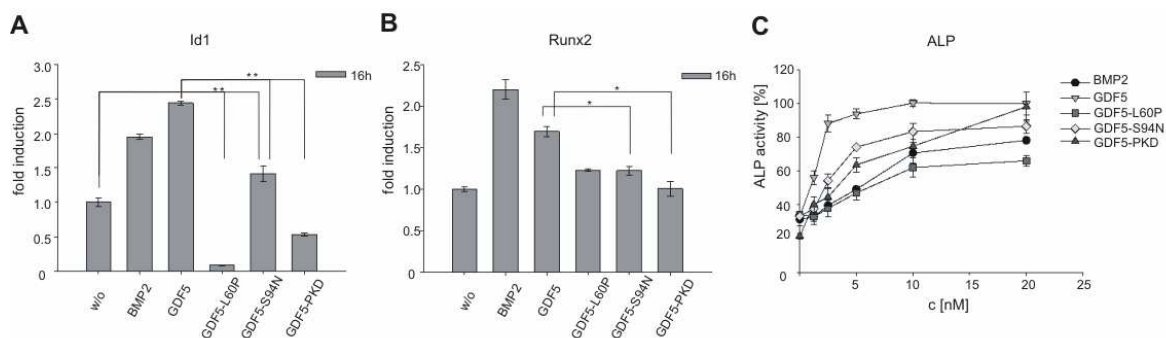


**Abb. 4.10 Die GDF5-Mutanten haben unterschiedliche Einflüsse auf die myogene Differenzierung von C2C12-Zellen**

A) C2C12-Zellen wurden mit 10 nM BMP2, GDF5, GDF5-L60P, GDF5-S94N oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mittels qPCR analysiert. Aus den  $C_T$ -Werten für *Myog* und dem Referenzgen *HPRT* sowie den Primereffizienzen wurden die MNE-Werte (vgl.3.2.3.) errechnet. Die *Myog*-Expression wurde relativ zur *Myog*-Expression in unstimulierten Zellen dargestellt. Der Graph gibt die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines von zwei vergleichbaren Versuchen wieder (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ ). B) C2C12-Zellen wurden mit einer vom Myogenin-Promotor abhängigen Firefly-Luciferase sowie RL-TK transfiziert. Nach fünftägiger Inkubation mit 10 nM Ligand wurden die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die RLA  $\pm$  Standardabweichung wurde auf die der unstimulierten Zellen normiert und spiegelt einen von vier Versuchen wider (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 4$ ). (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Erwartungsgemäß waren sowohl die *Myog*-mRNA-Konzentrationen als auch die vom Myogenin-Promotor-abhängigen Luciferase-Aktivitäten der Zellen nach Stimulation mit BMP2 und GDF5 um 60-70% geringer als in den Kontroll-Zellen (Abb. 4.10 A, B). GDF5-S94N und GDF5-L56P/Y106K/Q108D induzierten im Vergleich zu GDF5 eine 2,5fach höhere *Myog*-mRNA-Konzentration, die der in unstimulierten C2C12-Zellen ähnlich war (Abb. 4.10 A). Noch höher war die *Myog*-mRNA-Konzentration nach Stimulation mit GDF5-L60P (Abb. 4.10 A). Im Gegensatz zur *Myog*-mRNA-Konzentration rief GDF5-S94N im Vergleich zu den unstimulierten Zellen eine um 51% reduzierte, vom Myogenin-Promotor abhängige Luciferase-Aktivität hervor. Die Luciferase-Aktivitäten nach Stimulation mit GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D ähnelten den Myogenin-mRNA-Konzentrationen: GDF5-L60P induzierte eine Luciferase-Aktivität von 160% und GDF5-L56P/Y106K/Q108D eine Luciferase-Aktivität von 120%.

*Id1* und *Runx2* sind BMP-abhängige Zielgene, die an der Regulation der Osteogenese beteiligt sind (59,87,221,229). *Id1* verhindert durch die Bindung des Transkriptionsfaktor MyoD die DNA-MyoD-Interaktion und die Myogenese. *Runx2* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription weiterer osteoblast-spezifischer Gene induziert. Er wird wie ALP sowohl in den prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten und den Osteoblasten exprimiert (230-232) Ihr Transkriptionsmuster sowie die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) wurden bestimmt, um den Einfluss der GDF5-Mutanten auf die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten zu untersuchen (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11 Die GDF5-Mutanten beeinträchtigen die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten**

A), B) C2C12-Zellen wurden mit 10 nM BMP2, GDF5, GDF5-L60P, GDF5-S94N oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D (G-PKD) inkubiert, bevor die Expression von A) *Id1*-mRNA und B) *Runx2*-mRNA mittels qPCR untersucht wurde. Die MNE-Werte wurden errechnet (vgl.3.2.3.) und relativ zu dem MNE-Wert der unstimulierten Zellen dargestellt. Die Resultate geben die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines von zwei vergleichbaren Versuchen wieder (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ ). C) C2C12-BMPRII wurden mit BMP2, GDF5 und den GDF5-Mutanten inkubiert. Nach drei Tagen wurde die ALP-Aktivität gemessen. Die hier dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung wurden auf die durch 20 nM GDF5 induzierte Aktivität (100%) normiert und repräsentieren einen von drei Versuchen. GDF5-L56P/Y106K/Q108D = G-PKD (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

In Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen induzierten die Myogenese-Inhibitoren BMP2 und GDF5 (vgl. Abb. 4.9; 4.10) im Vergleich zu den Kontrollzellen eine 2-2,5fach erhöhte *Id1*-Transkription (Abb. 4.11 A). GDF5-S94N aktivierte eine mäßig gesteigerte (1,5fach) *Id1*-Transkription, während GDF5-L56P/Y106K/Q108D die *Id1*-Expression verglichen mit den unstimulierten Zellen 2fach reduzierte. GDF5-L60P hingegen konnte die Transkription von *Id1* nicht induzieren (Abb. 4.11 A).

Die Analyse des Osteogenese-Regulators *Runx2* ergab folgendes Bild: GDF5 stimulierte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine 1,6fach höhere *Runx2*-mRNA-Expression; GDF5-L60P und GDF5-S94N hingegen zeigten kaum transkriptionelle Aktivität. Die *Runx2*-mRNA-Konzentration war im Vergleich zu den unstimulierten Zellen nur um Faktor 1,2 erhöht (Abb. 4.11 B). Die Stimulation der C2C12-Zellen mit GDF5-L56P/Y106K/Q108D hatte keinen Einfluss auf die Expression von *Runx2* (Abb. 4.11 B).

Als ein weiterer osteogener Marker wurde die Expression von ALP indirekt durch Messung der ALP-Aktivität analysiert. Die ALP-Aktivität wurde durch die enzymatische Umsetzung von para-Nitrophenolphosphat zum photometrisch detektierbaren para-Nitrophenol bestimmt (Abb. 4.11 C). In den GDF5-responsiven C2C12-BMPRII-Zellen löste GDF5 höhere ALP-Aktivitäten als BMP2 aus. Die ALP-Aktivität nahm nach Inkubation mit Ligand von GDF5 über GDF5-S94N zu GDF5-L56P/Y106K/Q108D und GDF5-L60P ab.

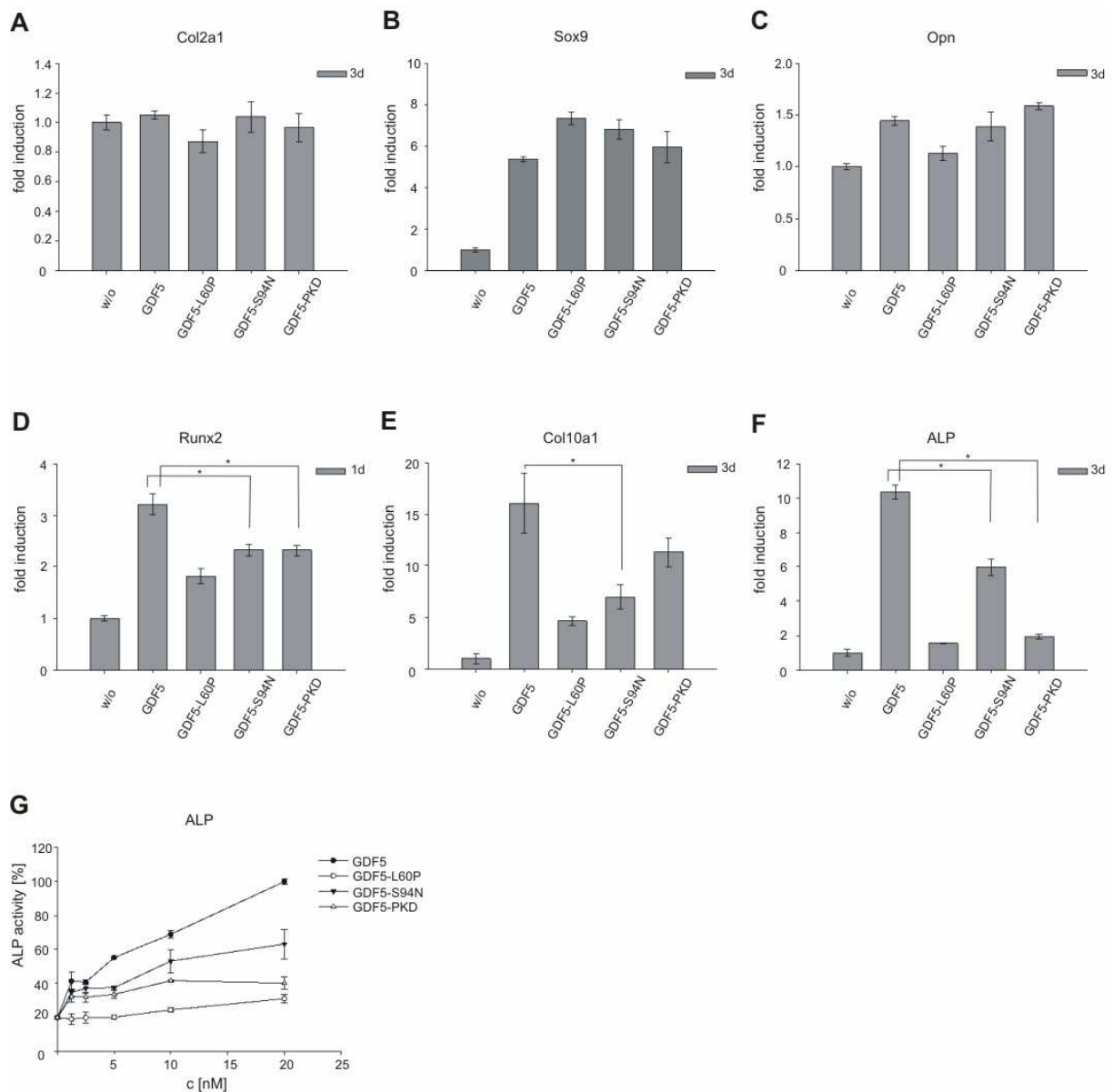
Insgesamt nimmt die Fähigkeit, die Transdifferenzierung der C2C12-Zellen von Myoblasten zu Osteoblasten zu fördern, von GDF5 über GDF5-S94N und GDF5-L56P/Y106K/Q108D zu GDF5-L60P ab. In der gleichen Weise nahm die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben zu. Die Bindung an den BMPRII und insbesondere an den BMPRI ist daher für die Transdifferenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten unerlässlich.

#### **4.4.2. GDF5-Mutanten verhindern die chondrogene Reifung von ATDC5-Zellen**

GDF5 fördert während der Embryogenese die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten (154). Im Vergleich zu GDF5 zeigten die Mutanten in der Prä-Chondroblasten-Zelllinie ATDC5 eine verzögerte und reduzierte Aktivierung der Smad-abhängigen und Smad-unabhängigen Signalwege.

Es stellte sich die Frage, wie sich die Mutationen im GDF5-Protein auf die chondrogene Reifung auswirken würden. Deshalb wurden die ATDC5-Zellen mit GDF5 Wildtyp und den

Mutanten inkubiert. Anschließend wurde die Differenzierung zu reifen Chondrozyten anhand der Expression der chondrogenen Marker *Sox9*, *Collagen Typ 2 (Col2a1)* und *Osteopontin (Opn)* sowie *Runx2*, *ALP* und *Collagen Typ 10 (Col10a1)*, die in prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert werden, verfolgt (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12 Die GDF5-Mutanten GDF5-S94N und GDF5-PKD beeinträchtigen die Reifung der ATDC5-Zellen**

ATDC5-Zellen wurden mit GDF5 GDF5-L60P, GDF5-S94N oder GDF5-PKD (GDF5-L56P/Y106K/Q108D) inkubiert. A)-F) Die Expression von A) *Col2a1*, B) *Sox9*, C) *Opn*, D) *Runx2*, E) *ALP* und F) *Col10a1* wurde nach Umschreiben der mRNA in cDNA mittels qPCR untersucht. Die MNE-Werte wurden errechnet (vgl.3.2.3.) und auf den MNE-Wert der unstimulierten Zellen normiert. Die dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung spiegeln die Ergebnisse von zwei Versuchen wider (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ ). G) Die liganden-abhängige Induktion der ALP-Aktivität wurde in ATDC5-Zellen nach dreitägiger Stimulation gemessen und als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Triplikaten dargestellt. Der Graph repräsentiert das Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Die Expression von *Col2α1* war von der Behandlung mit GDF5 oder den GDF5-Mutanten unabhängig (Abb. 4.12 A). Die anderen Markergene wurden nach GDF5-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Zellen verstärkt exprimiert: *Sox9* (5,5fach), *Opn* (1,4fach), *Runx2* (3,2fach), *ALP* (10fach) und *Col10α1* (15fach) (Abb. 4.12 B-F).

Die Inkubation der ATDC5-Zellen mit GDF5-L60P und GDF5-S94N löste, verglichen mit den Wildtyp-stimulierten Zellen, eine geringfügig höhere (1,3fach) Transkription von *Sox9* aus (Abb. 4.12 B). Die Expression der anderen chondrogenen Marker war nach Inkubation mit der als „loss of function“ publizierten Mutante GDF5-L60P (208) immer geringer als die in den mit GDF5 behandelten Zellen: Die Expression von *Opn* war um 20%, *Runx2* um 44%, *Col10α1* um 71% und *ALP* um 85% reduziert (Abb. 4.12 C-F). Nach Inkubation mit GDF5-S94N- oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D ähnelte die Expression von *Opn* der von GDF5-stimulierten Zellen (Abb. 4.12 C). Die Expression von *Runx2*, *Col10α1* oder *ALP* war jedoch ebenfalls geringer als in den Wildtyp-behandelten Zellen. Durch GDF5-S94N- oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D-Stimulation wurde die Transkription von *Runx2* um jeweils 28% reduziert (Abb. 4.12 D). Ein noch deutlicherer Effekt der Mutanten im Vergleich zu GDF5 war bei der Expression der Marker *Col10α1* und *ALP* nachzuweisen: Die Stimulation mit GDF5-S94N verringerte die Transkription von *Col10α1* um etwa 60 %, während sie durch GDF5-L56P/Y106K/Q108D nur um 30% verringert wurde (Abb. 4.12 E). Die *ALP*-mRNA-Konzentration wurde durch die Stimulation mit GDF5-S94N um etwa 40% und durch GDF5-L56P/Y106K/Q108D um 80% reduziert (Abb. 4.12 F).

Ähnliche Effekte konnten durch die Messung der ALP-Aktivität in ATDC5-Zellen nachgewiesen werden. Wie in den C2C12-BMTRIB-Zellen nahm die liganden-induzierte ALP-Aktivität von GDF5 über GDF5-S94N zu GDF5-L56P/Y106K/Q108D hin ab. GDF5-L60P zeigte nur eine geringe Induktion, die kaum über der ALP-Aktivität der unstimulierten Zellen lag (Abb. 4.12 G im Vergleich zu Abb. 4.11 C)

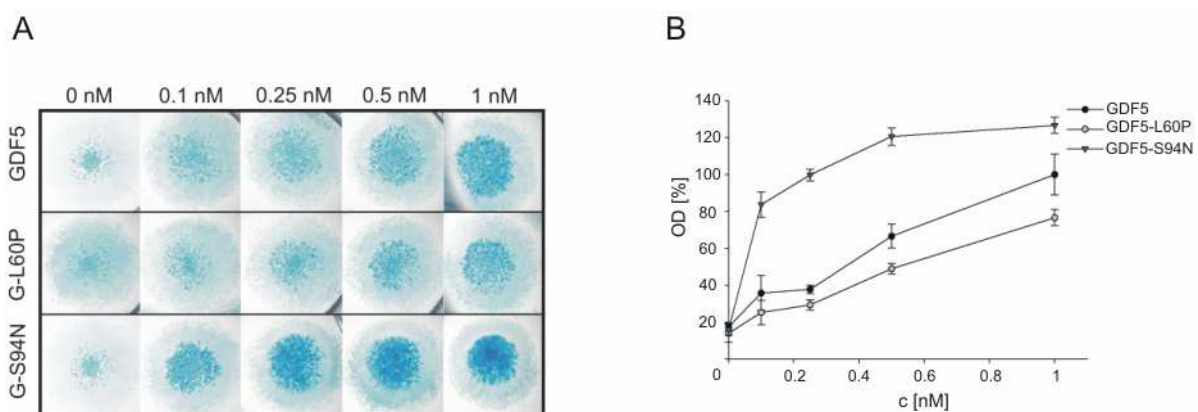
Diese Ergebnisse zeigen, dass GDF5 die Differenzierung der ATDC5-Zellen zu Chondrozyten fördert. Im Gegensatz dazu verringerte die Stimulation mit den GDF5-Mutanten die Expression von *Runx2*, *ALP* und *Col10α1*, die Marker reifer Chondrozyten sind. Dieses Resultat weist auf eine stark verzögerte und/oder inhibierte Differenzierung der Prä-Chondroblasten zu prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten hin. Zugleich wird durch die GDF5-Mutanten deutlich, dass für die chondrogene Reifung der ATDC5-Zellen sowohl die Bindung des GDF5-Proteins an die BMP Typ I-Rezeptoren als auch an die Typ II-



Rezeptoren nötig ist. Eine stärkere Bindung der Typ II-Rezeptoren kann die Differenzierung trotz Bindungsverlust zum Typ I-Rezeptor geringfügig verbessern.

#### 4.4.3. Die GDF5-S94N-Mutante fördert die chondrogene Differenzierung von Micromass-Zellen

Die Mutante GDF5-S94N verursacht das humane SYNS, das aufgrund der ausgelösten Fusion von Hand- und Fußwurzelknochen sowie Symphalangismus eine verstärkte Chondro- und Osteogenese vermuten lässt. Um zu verstehen, wie GDF5-S94N trotz reduzierter Aktivität in Signaltransduktion und Differenzierung von C2C12- und ATDC5-Zellen SYNS auslösen kann, wurden die mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen von Mausembryonen (E11.5) isoliert. Sie differenzieren in Gegenwart von GDF5 zu Chondrozyten und sind ein anerkanntes Modell, um die einzelnen Schritte der Extremitäten-Entwicklung und den Prozess der endochondralen Ossifikation zu verfolgen (233). Die mesenchymalen Zellen wurden in hoher Dichte ausgesät und für sechs Tage mit GDF5 oder den Mutanten GDF5-L60P und GDF5-S94N inkubiert. Danach wurde die Produktion der extrazellulären Matrix (ECM) mit Alcian Blue (Abb. 4.13 A, B) sowie die Expression chondrogener und osteogener Marker mittels qPCR (Abb. 4.14 A-H) untersucht. Auf eine Inkubation der Micromass-Kulturen mit der Mutante GDF5-L56P/Y106K/Q108D, die in C2C12- und ATDC5-Zellen nur geringfügig von der Aktivität der GDF5-L60P abwich und keinen humanen Phänotyp hat, wurde hier verzichtet.

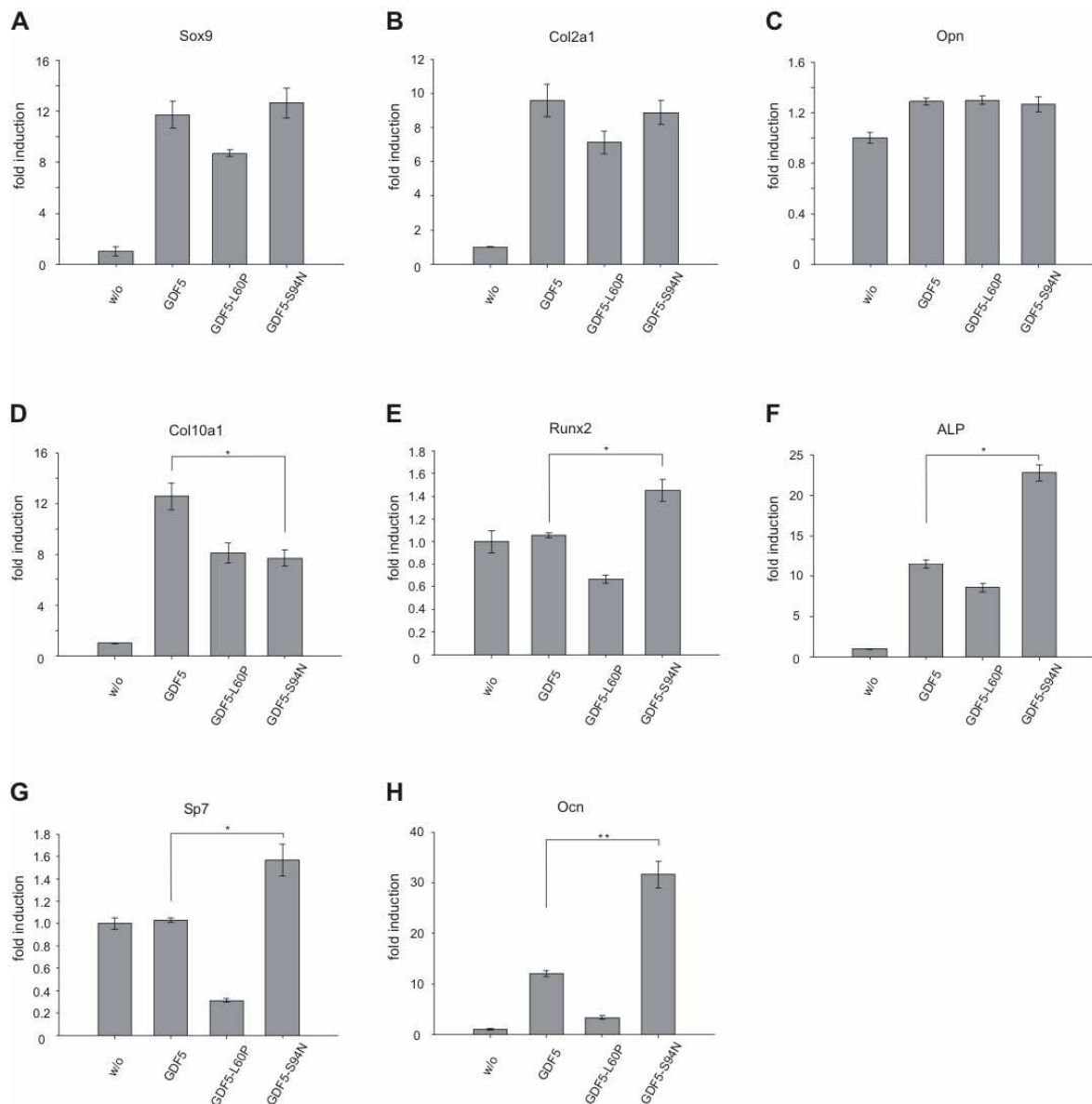


**Abb. 4.13 GDF5-S94N fördert die Produktion von extrazellulärer Matrix**

A) Murine Micromass-Kulturen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von GDF5, GDF5-L60P oder GDF5-S94N inkubiert. Die Menge an sekretierter extrazellulärer Matrix (ECM) wurde nach sechstägiger Stimulation mit Alcian Blue bestimmt. B) Die optische Dichte (OD) der gefärbten Micromass-Kulturen wurde mit der Bio1D-Software bestimmt und auf die OD der mit 1 nM GDF5 stimulierten Zellen (100%), normalisiert. Die ODs  $\pm$  Standardabweichung waren das Ergebnis von Triplikaten aus einer biologischen Probe von 20 Embryonen. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Bereits zwei Tage nach Stimulation mit GDF5 Wildtyp oder den Mutanten waren erste Zell-Kondensationen („nodules“) zu sehen. Unabhängig vom Liganden war die Anzahl der Kondensationszentren nahezu gleich. Nach sechs Tagen wurde die extrazelluläre Matrix (ECM) mit Alcian Blue gefärbt, so dass Unterschiede in der ECM-Produktion sichtbar wurden (Abb. 4.13). Interessanterweise zeigten die mit GDF5-S94N stimulierten Micromass-Kulturen bereits in einer Konzentration von 0,1 nM eine viermal so intensive Blaufärbung und ECM-Produktion wie die GDF5-stimulierten Micromass-Kulturen (Abb. 4.13 A, B). Demzufolge förderte GDF5-S94N die Chondrogenese der Micromass-Kulturen stärker als GDF5. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Ergebnissen der mit GDF5-S94N stimulierten C2C12- und ATDC5-Zellen: Die GDF5-S94N-Stimulation beeinträchtigte die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen (Abb. 4.11) sowie Reifung der ATDC5-Zellen (Abb. 4.12). GDF5-L60P induzierte, wie bereits veröffentlicht (208), erst in Konzentration über 0,5 nM eine geringe ECM-Produktion (Abb. 4.13 A, B).

Um einen genaueren Einblick in die Differenzierung der mit GDF5 oder den GDF5-Mutanten stimulierten Micromass-Kulturen zu erhalten, wurde die Expression der chondrogenen und osteoblast-spezifischen Marker mittels qPCR untersucht (Abb. 4.14).



**Abb. 4.14 GDF5-S94N treibt die chondrogene Differenzierung der Micromass-Zellen voran**

A)- H) Die Expression chondrogener und osteogener Marker wurde nach sechstägiger Stimulation der Maus-Micromass-Kulturen mit GDF5, GDF5-L60P oder GDF5-S94N und Umschreiben der extrahierten mRNA in cDNA mittels qPCR untersucht. Die MNE-Werte wurden errechnet (vgl.3.2.3.) und relativ zu dem MNE-Wert der unstimulierten Zellen dargestellt. Die dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung waren das Ergebnis von Triplikaten einer biologischen Probe von 20 Embryonen (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ,  $n = 3$ ).

Nach Inkubation der Micromass-Kulturen waren auf mRNA-Ebene nur geringe Unterschiede bei der Transkription der chondrogenen Marker *Sox9*, *Col2a1* und *Opn* in den mit GDF5 und GDF5-S94N inkubierten Zellen zu sehen (Abb. 4.14 A-C). *Col10a1*, der Marker der prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, war im Vergleich zu GDF5 nach GDF5-S94N-Inkubation um 40% reduziert (Abb. 4.14 D). Diese Ergebnisse stimmten mit den mRNA-Analysen der ATDC5-Zellen (Abb. 4.12) überein. Im Kontrast dazu wurden die Marker der späten Chondrogenese und Osteogenese nach GDF5-S94N-Inkubation verstärkt

transkribiert: *Runx2* (1,5fach), *ALP* (2,3fach), *Osterix (Sp7)*; 1,6fach) und *Ocn* (4fach) (Abb. 4.14 E-H).

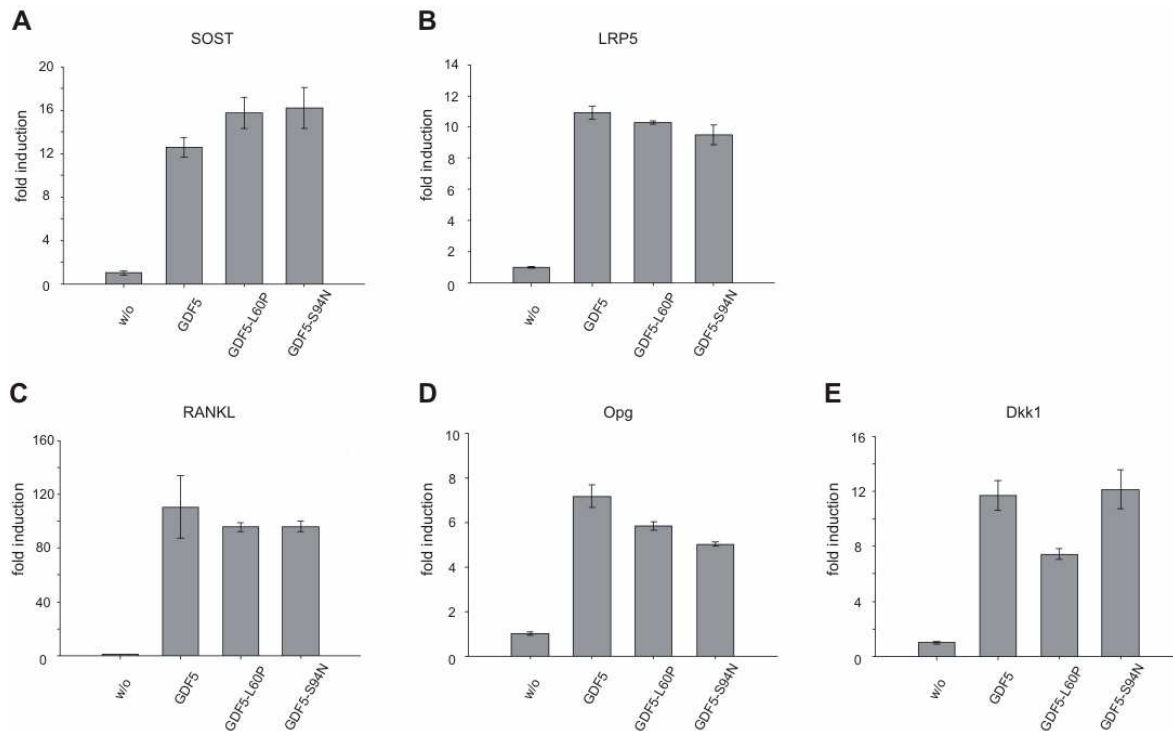
Nach GDF5-L60P-Inkubation war die Expression der chondrogenen (*Sox9*, *Col2a1*, *Col10a1*, *Runx2*, *ALP*) und osteoblast-spezifischen (*Osterix/Sp7*, *Ocn*) Marker im Vergleich zu GDF5 Wildtyp reduziert (Abb. 4.14 A-H). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen in den ATDC5-Zellen (Abb. 4.12) und einer früheren Publikation (208) überein.

Insgesamt ermöglichten sowohl GDF5 als auch die GDF5-Mutanten GDF5-L60P und GDF5-S94N die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten. Dabei trieb GDF5-S94N die Differenzierung der Micromass-Kulturen zu Chondrozyten stärker voran als GDF5 Wildtyp. Unklar war, welche Faktoren für die beschleunigte Differenzierung der Micromass-Kulturen nach Stimulation mit GDF5-S94N verantwortlich sind.

#### **4.4.4. GDF5-S94N reguliert den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nicht**

Kamiya et al. beobachteten, dass in Mäusen mit konditionellem BMPRIA-„knock out“ die Masse der Knochen zunahm (133). Sie zeigten, dass durch die fehlende Signaltransduktion durch den BMPRIA das Verhältnis von RANKL/Osteoprotegerin (*Opg*) reduziert und die Osteoklastogenese gehemmt wurde. Außerdem wurde in BMPRIA-defizienten Zellen die Expression von Sclerostin (*SOST*), einem natürlichen Antagonisten des kanonischen Wnt-Signalweges, so stark reduziert, dass der kanonische Wnt-Signalweg permanent aktiviert wurde. RANKL und Osteoprotegerin werden in Osteoblasten, Sclerostin wird in Osteozyten exprimiert.

Ob die reduzierten Affinitäten von GDF5-L60P und GDF5-S94N zum BMPRIA/B oder den Typ II-Rezeptoren ebenfalls die Expression von *RANKL*, *Opg* oder *SOST* verändern, wurde mittels qPCR analysiert. Da ATDC5-Zellen weder Sclerostin (*SOST*) noch *RANKL* oder *Opg* exprimierten (Daten wurden nicht gezeigt) und die Differenzierung der mesenchymalen Zellen in den Extremitätenknospen von BMPs und Wnts reguliert wird (234), wurden für die Expressionsanalyse die Micromass-Kulturen verwendet (Abb. 4.15).



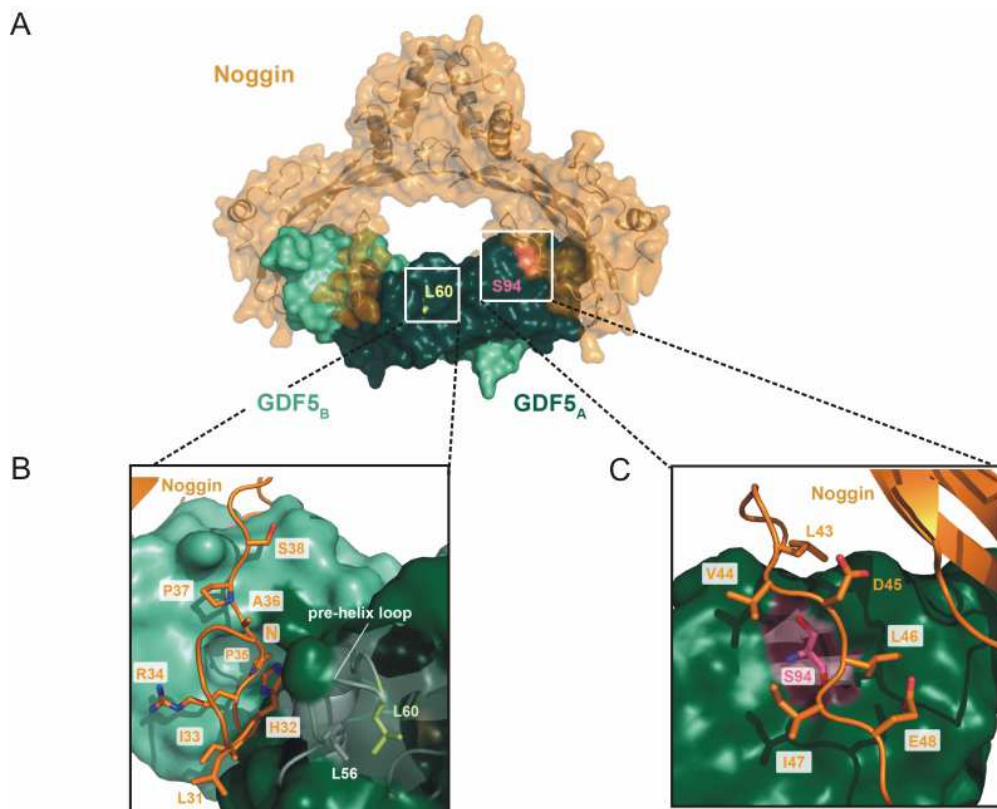
**Abb. 4.15 GDF5-S94N reduzierte die Expression von Sclerostin und das RANKL/Opg-Verhältnis nicht**  
 Maus-Micromass-Kulturen wurden mit 1 nM GDF5, GDF5-L60P oder GDF5-S94N für sechs Tage inkubiert. Die Expression von A) *SOST*, B) *LRP5*, C) *RANKL*, D) *Opg* und E) *Dkk1* wurde mittels qPCR analysiert. Die MNE-Werte wurden errechnet (vgl.3.2.3.) und relativ zu dem MNE-Wert der unstimulierten Zellen dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von Triplikaten dargestellt und waren das Ergebnis einer biologischen Probe mit 20 Embryonen (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ ). (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Im Vergleich zu GDF5 induzierten GDF5-L60P und GDF5-S94N eine 25-30% höhere Expression von *SOST* (Abb. 4.15 A). Die Expressionen von *LRP5* und *RANKL* waren nach Inkubation mit GDF5 und den Mutanten ähnlich hoch (Abb. 4.15 B, C), während die Expression von *Opg* von GDF5 über GDF5-L60P zu GDF5-S94N abnahm (Abb. 4.15 D). *Dkk1* war nach Inkubation von GDF5-L60P, verglichen mit GDF5 Wildtyp, um 30% reduziert (Abb. 4.15 E).

Folglich konnten die reduzierten Affinitäten von GDF5-S94N zu den BMP Typ II- Rezeptoren weder den kanonischen Wnt-Signalweg noch die Osteoklastogenese signifikant beeinflussen. Der Widerspruch zwischen der reduzierten Signaltransduktion in den C2C12- und den ATDC5-Zellen und der beschleunigten Chondrogenese der Maus-Micromass-Kulturen konnte damit nicht geklärt werden.

#### 4.4.5. GDF5-S94N ist resistent gegen die Inhibierung durch den BMP/GDF-Antagonisten Noggin

SYNS war von Gong et al. 1999 als Folge von heterozygoten *Noggin*-Mutationen beschrieben worden (141). Noggin ist ein natürlicher Antagonist der BMP-Familie. Seine Expression und Sekretion wird von BMP2, BMP4, BMP7 und GDF5 induziert (146). Noggin bindet an die BMPs und blockiert die Bindungsstellen der Typ I und Typ II-Rezeptoren. Es vermeidet so eine übermäßige BMP-Stimulation der Zelle (negative „feedback“-Hemmung) (146). Die Mutationen GDF5-S94N und GDF5-L60P liegen im „knuckle“- bzw. nahe dem „wrist“-Epitop und somit in der Bindungsregion von Noggin. Ob diese Mutationen auch die Affinität zu Noggin und dadurch die negative „feedback“-Hemmung verändern können, wurde anhand von SPR-Messungen sowie der Analyse von ALP-, Reporter-Gen-Aktivität und ECM-Produktion in mit GDF5 oder den Mutanten und Noggin stimulierten Zellen untersucht.



**Abb. 4.16 GDF5-S94N interagiert mit dem C-terminalen Bereich des Noggin-Clips**

A) GDF5-Noggin-Komplex. Das GDF5-Dimer (hell-, dunkelgrün) wird von Noggin (ocker) wie von einer Klammer gebunden. Die von den Punktmutationen betroffenen Aminosäuren L60 (gelb) und S94 (pink) sind markiert. B) Interaktion des „wrist“-Epitops mit dem N-terminalen Noggin-Clip. Die Aminosäuren innerhalb von Noggin, die mit dem GDF5 interagieren, sind in orange hervorgehoben. Die von der Punktmutation betroffene Aminosäure L60 (gelb) und die benachbarte Aminosäure L56 (grau) sind im GDF5-Protein markiert. C) Interaktion des „knuckle“-Epitops mit der C-terminalen Hälfte des N-terminalen Noggin-Clips (orange), S94 (pink) ist in GDF5 gekennzeichnet. (Schwaerzer et al.- JBMR 2011 in Kooperation mit Prof. Dr. Mueller)

Das Homodimer Noggin bindet BMPs wie eine Klammer (Abb. 4.16 A) (136). Dabei wird das „wrist“-Epitop durch den N-terminalen Teil des Noggin-Clips (L31-S38) (Abb. 4.16 B) bedeckt. Das Prolin 35 vom Noggin lagert sich mit seinem hydrophoben Ring ähnlich dem Phenylalanin 85 des BMPRIA wie ein „knob-into-hole“ in das „wrist“-Epitop des GDF5 (Abb. 4.16 B). Das „knuckle“-Epitop interagiert mit dem mehr C-terminal gelegenen Teil des Noggin-Clips (L43-E48) sowie von mit den aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern geformten Fingern 1 und 2 des Noggins (Abb. 4.16 C), (136). Auf diese Weise verhindert Noggin die Bindung der BMP/GDF-Liganden an die BMP-Rezeptoren. Der Aminosäureaustausch L60P erfolgte in direkter Nähe zum „wrist“-Epitop, liegt jedoch außerhalb des Bereiches, der mit Noggin interagiert (Abb. 4.16 B). Im Gegensatz dazu liegt GDF5-S94N im „knuckle“-Epitop, das direkt mit dem C-terminalen Clip des Noggins interagiert (Abb. 4.16 C). Anhand der modellierten GDF5-S94N: Noggin-Struktur konnte keine sterische Beeinträchtigung der Interaktion mit Noggin durch den Austausch von Serin gegen Asparagin im GDF5 festgestellt werden.

Welche Auswirkung die S94N-Mutation innerhalb des GDF5-Proteins auf die Bindungsaffinität zu Noggin hat, wurde durch Bestimmung der Dissoziationskonstanten von GDF5 Wildtyp:Noggin bzw. GDF5-S94N:Noggin mittels SRP-Messung untersucht (Tab. 4.2).

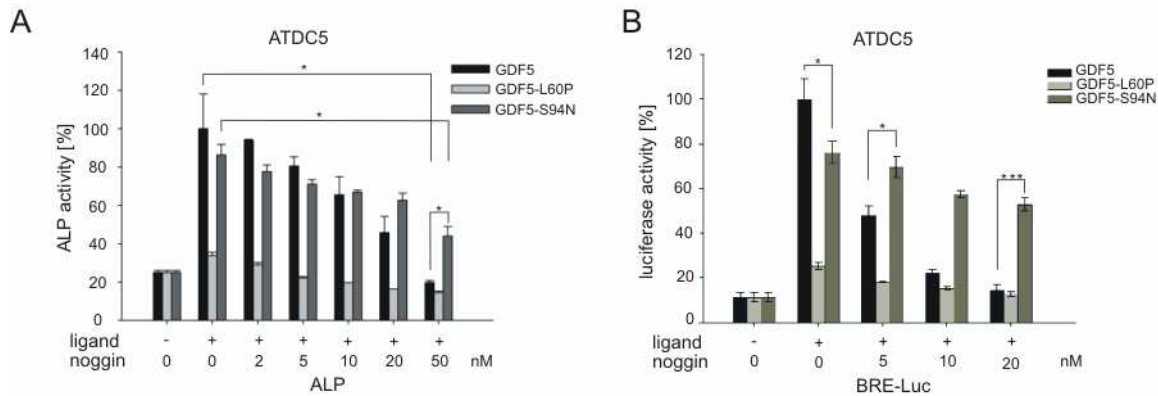
**Tab. 4.2 Affinitäten der GDF5-Mutanten zum immobilisierten BMP-Antagonisten Noggin**

Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen SPR (surface plasmon resonance)-Messungen mit mindestens sechs unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen, die in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Sebald entstanden sind. (Schwaerzer et al. - JBMR 2011)

Ligand	Noggin K <sub>D</sub> [nM]	Referenz
<b>BMP2</b>	1,9	
<b>GDF5</b>	0,97	
<b>GDF5-L60P</b>	1,5	(208)
<b>GDF5-S94N</b>	3,6	

Die mittels SPR-Messungen ermittelten Bindungsdaten ergaben, dass die Affinität zwischen GDF5-S94N und Noggin verglichen mit GDF5 Wildtyp um den Faktor vier reduziert ist (Tab. 4.2). GDF5-L60P bindet trotz Mutation unverändert an Noggin (208). Welche biologischen Folgen die reduzierte Bindungsaffinität von GDF5-S94N zu Noggin hat, wurde in den ATDC5-Zellen (Abb. 4.17) und den Maus-Micromass-Kulturen (Abb. 4.18) durch die

Inkubation mit GDF5 Wildtyp oder den Mutanten und ansteigenden Noggin-Konzentrationen untersucht.



**Abb. 4.17 GDF5-S94N ist resistent gegen die Inhibierung durch Noggin.**

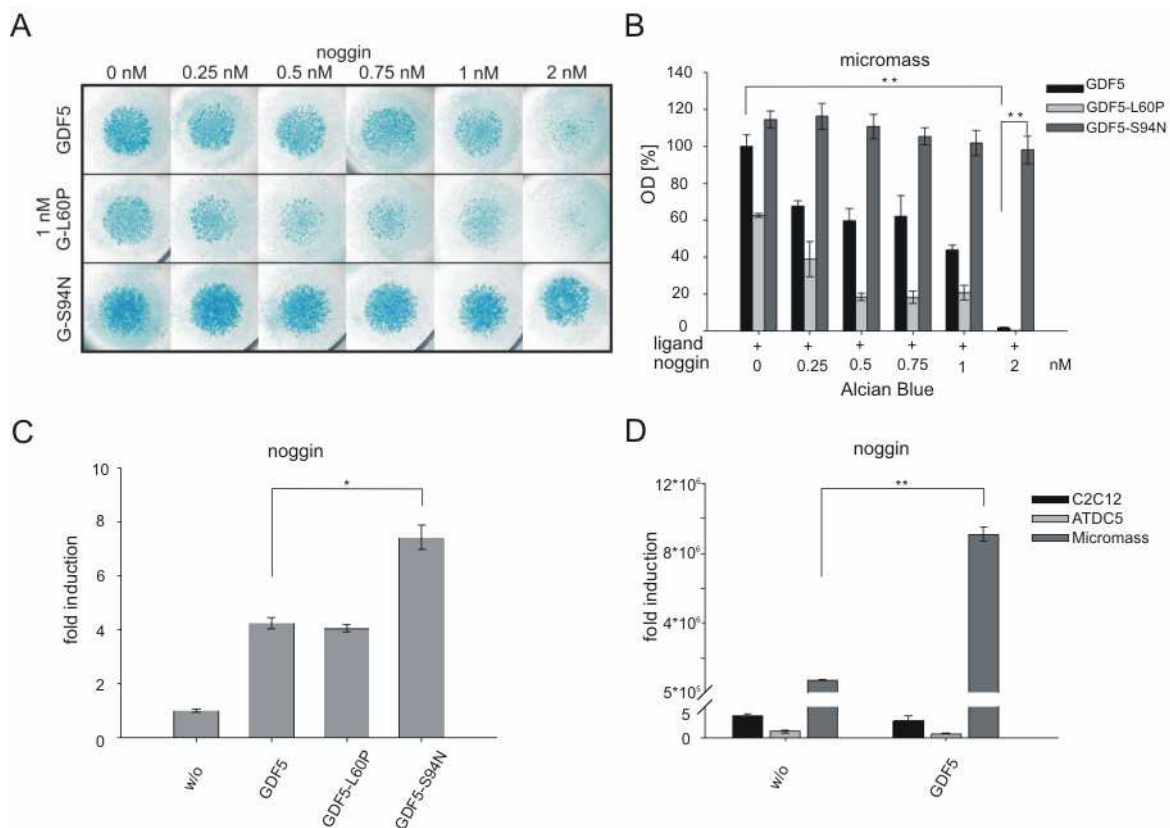
A) ATDC5-Zellen wurden mit 5 nM GDF5, GDF5-L60P oder GDF5-S94N und zunehmenden Mengen Noggin inkubiert. Nach drei Tagen wurde die ALP-Aktivität gemessen. Die jeweilig gemessene Aktivität wurde auf die ALP-Aktivität nach Stimulation mit 5 nM GDF5 (100%) normiert. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate repräsentieren eines von drei vergleichbaren Experimenten. B) Die Luciferase-Aktivität der mit BRE-Luc und RL-TK transfizierten ATDC5-Zellen wurde nach Stimulation mit GDF5, GDF5-L60P oder GDF5-S94N und zunehmenden Mengen Noggin bestimmt. Aus den gemessenen Aktivitäten der Firefly- und Renilla-Luciferase wurden die relativen Luciferase-Aktivitäten (RLA) errechnet. Diese wurden auf die RLA, die durch 5 nM GDF5 (100%) induziert wird, normiert, und als „luciferase activity [%]“ graphisch dargestellt. Aus den untersuchten Triplikaten wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung errechnet. Sie spiegeln das Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen wider. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ;  $n = 3$ ) (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

ALP wird in prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten sowie Osteoblasten exprimiert. Wie bereits gezeigt (Abb. 4.12 F, G) induzierte GDF5-S94N in ATDC5-Zellen eine geringere ALP-Aktivität als GDF5 Wildtyp (Abb. 4.17 A). Mit steigender Noggin-Konzentration nahm jedoch die ALP-Aktivität der mit GDF5 stimulierten Zellen ab: 50 nM Noggin reduzierten die von GDF5 induzierte ALP-Aktivität um 80%. Die ALP-Aktivität der mit GDF5-S94N inkubierten Zellen blieb hingegen trotz hoher Noggin-Konzentration (10facher molarer Überschuss) nahezu konstant (Abb. 4.17 A). Dass GDF5-S94N in Gegenwart von Noggin kaum an Aktivität einbüßt, wurde durch Analyse der Smad-abhängigen Transkription (BRE-Luc-Reporter) bestätigt (Abb. 4.17 B). In Abwesenheit von Noggin löste GDF5-S94N eine etwas (25%) geringere Reporter-Gen-Antwort als GDF5 Wildtyp aus. Die zusätzliche Gabe von 5 nM, 10 nM bzw. 20 nM Noggin führte zu einer schrittweise abnehmenden Inhibierung der GDF5-Aktivität. 20 nM Noggin, d.h., ein vierfacher molarer Überschuss konnten die Aktivität von 5 nM GDF5 Wildtyp komplett unterdrücken. Die durch GDF5-S94N ausgelöste Reporter-Gen-Aktivität blieb hingegen auch



bei gleichzeitiger Inkubation mit 20 nM Noggin nahezu konstant (Abb. 4.17 B). GDF5-L60P konnte, wie bereits publiziert, durch Noggin inhibiert werden (208).

Um in einem *in vivo* ähnlicherem System zu überprüfen, ob GDF5-S94N durch Noggin inhibiert werden kann, wurden die Micromass-Kulturen sechs Tage mit GDF5 oder den GDF5-Mutanten und ansteigenden Noggin-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die ECM-Produktion mittels Alcian Blue-Färbung analysiert.



**Abb. 4.18 GDF5-S94N induziert chondrogene Differenzierung von Micromass-Zellen in Gegenwart von Noggin**

A) Maus-Micromass-Kulturen wurden für sechs Tage mit 1 nM Ligand und zunehmenden Mengen Noggin inkubiert. Mit Alcian Blue konnte die Produktion der ECM nachgewiesen werden. B) Die mit der Bio-1D-Software bestimmten ODs wurden auf die mittlere OD nach Behandlung mit 1 nM GDF5 (100%) normiert. Die ODs  $\pm$  Standardabweichung waren das Ergebnis von Triplikaten aus einer biologischen Probe von 20 Embryonen. C) Die Expression von *Noggin* wurde in stimulierten Micromass-Zellen mittels qPCR detektiert. Die errechneten MNE-Werte wurden auf den der unstimulierten Zellen normiert. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate einer biologischen Probe sind dargestellt. D) Die *Noggin*-Expression in ATDC5-, C2C12- und Micromass-Zellen wurde mit qPCR gemessen und auf die der unstimulierten ATDC5-Zellen (1) normiert. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ;  $n = 3$ ) (Schwaerzer et al.- JBMR 2011)

Die Inkubationen der murinen Micromass-Kulturen mit 1 nM GDF5 oder GDF5-S94N und ansteigenden Noggin-Konzentrationen zeigten, dass GDF5-S94N unverändert die ECM-Produktion und somit die Chondrogenese induzieren kann (Abb. 4.18 A, B). Hingegen wurde

die durch GDF5 Wildtyp induzierte Chondrogenese in Anwesenheit von 2 nM Noggin (zweifacher molarer Überschuss) vollständig inhibiert (Abb. 4.18 A, B). Die ECM-Produktion nach Stimulation mit der Mutante GDF5-L60P, die als Kontrolle diente, wurde schon durch 0,5 nM Noggin um mehr 50% inhibiert.

Noggin wird wie GDF5 in den zukünftigen Gelenkzonen exprimiert (145). Um auszuschließen, dass GDF5 durch den bereits beschriebenen Feedback-Mechanismus eine höhere Noggin-Expression als GDF5-S94N induziert, wurde die Expression von Noggin in Maus-Micromass-Kulturen untersucht (Abb. 4.18 C). Sowohl GDF5 als auch die Mutanten induzierten in Micromass-Zellen die Expression von Noggin. Jedoch war die Noggin-Expression nach GDF5-S94N-Behandlung fast doppelt so hoch wie in den mit GDF5 stimulierten Zellen (Abb. 4.18 C). Daher kann ausgeschlossen werden, dass GDF5 Wildtyp durch einen additiven Effekt von endogenem, durch den Liganden induziertem Noggin und rekombinantem Noggin stärker inhibiert wurde. Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass GDF5-S94N resistent gegen die Inhibierung durch Noggin ist.

Im Vergleich zu den Micromass-Zellen exprimieren C2C12- und ATDC5-Zellen nach GDF5-Stimulation kein Noggin (Abb. 4.18 D). Auch die basale Expression von Noggin war in beiden Zelllinien verglichen mit den primären Zellen sehr gering (Abb. 4.18 D). Demzufolge wird die Signaltransduktion in den C2C12- und ATDC5-Zellen nicht durch endogenes Noggin beeinflusst. Die verzögerte und reduzierte Aktivierung der Smads und der p38 MAPK in den mit GDF5-S94N stimulierten C2C12- und ATDC5-Zellen sowie die verringerte chondrogene Differenzierung der ATDC5-Zellen wird somit nur durch die reduzierte Bindungsaffinität von GDF5-S94N zu den Typ II-Rezeptoren verursacht.

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Micromass-Zellen nach Stimulation mit GDF5 Wildtyp oder der GDF5-S94N-Mutante den natürlichen Antagonisten Noggin sekretieren. Noggin konnte die GDF5-abhängige Signaltransduktion hemmen. Da GDF5-S94N eine geringere Affinität zu Noggin aufweist und somit nicht inhibiert wird, scheint die SYNS-Mutante im Vergleich zu GDF5 permanent die Expression von Zielgenen induzieren zu können. Dies hatte zur Folge, dass die Differenzierung der mesenchymalen Micromass-Zellen zu Chondrozyten durch GDF5-S94N beschleunigt wird. GDF5-S94N kann daher trotz der reduzierten Affinität zu den Typ II-Rezeptoren als „gain of function“-Mutation betrachtet werden.

## 5. Diskussion: Mutationen des *GDF5*

*GDF5* induziert die Chondrogenese durch verstärkte Adhäsion und Kondensation der mesenchymalen Zellen. Der Wachstumsfaktor wird außerdem in den zukünftigen Gelenkzonen exprimiert, wo er die Entwicklung der Gelenke fördert und auch postnatal an ihrem Erhalt beteiligt ist (154). Mutationen des humanen *GDF5* verursachen Chondrodysplasien, Brachydaktyly, Symphalangismus und das Multiple Synostose Syndrom (SYNS) (205,206,208,209,235). Die Betroffenen leiden an fusionierten Gelenken, verformten oder fehlenden Knochen und an einer dadurch eingeschränkten Flexibilität der Gliedmaßen. In den letzten Jahren wurde verstärkt nach Wachstumsfaktoren gesucht, die die Regeneration von Knochen und Gelenken fördern. Für die meisten *GDF5*-Mutationen wie *GDF5*-E491K (210) ist nur der Phänotyp beschrieben. Die molekularen Mechanismen, die zu den Phänotypen führen, sind oft unbekannt. Detailliertes Wissen der Wirkmechanismen ist jedoch unerlässlich, um einerseits den Folgen der Mutationen entgegenwirken zu können oder um andererseits Wirkstoffe zu entwickeln, die die Knorpel- und Knochenentwicklung z. B. nach Frakturen optimal und mit möglichst wenigen Nebenwirkungen fördern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig der molekulare Mechanismus, durch den *GDF5*-S94N das Multiple Synostoses Syndrom (SYNS) verursacht, aufgeklärt werden.

Bisher publizierte *GDF5*-Mutationen liegen nahe oder im „wrist“-Epitop des *GDF5* (208,210,236), der Interaktionsstelle des hochaffinen BMPRI. Sie verursachen einen ähnlichen Phänotyp wie die Mutationen des BMPRIIB (237). Das ließ vermuten, dass *GDF5* und BMPRIIB entscheidende Komponenten in der Regulierung der Chondrogenese sind, während die *GDF5*-abhängige Signaltransduktion durch die niederaffin gebundenen BMP Typ II-Rezeptoren wenig charakterisiert ist.

*GDF5*-S94N ist bisher die einzig identifizierte *GDF5*-Mutante, deren Mutation im „knuckle“-Epitop liegt. Obwohl dieses Epitop nur mit geringer Affinität mit den BMP Typ II-Rezeptoren (ActRII, ActRIIB, BMPRII) interagiert (Tab. 4.1), verursacht die Mutante mit SYNS (218) einen Phänotyp, dessen Symptome (Symphalangismus, Fusion der Hand- und Fußwurzelknochen, Gehörlosigkeit) teilweise auch bei den bisher publizierten Mutationen des *GDF5*-Liganden oder seinem hochaffinen Rezeptor BMPRIIB beobachtet wurden. Demzufolge ist für die Chondrogenese auch die Interaktion mit dem *GDF5*-„knuckle“-Epitop notwendig.

## 5.1. Einfluss der GDF5-Mutationen auf die einzelnen Ebenen der GDF5-abhängigen Signaltransduktion

### 5.1.1. Interaktion der GDF5-Mutanten mit den BMP-Rezeptoren

GDF5 bindet mit hoher Affinität an BMPRII und mit geringerer Affinität an BMPRIA und die Typ II Rezeptoren BMPRII, ActRII und ActRIIB. Die Struktur dieses ternären Ligand-Rezeptor-Komplexes ist noch nicht gelöst. GDF5 und BMP2 zeigen eine große Homologie (Abb. 5. 1), die einen Vergleich mit dem hochkonservierten „knuckle“-Epitop des BMP2 und dem ternären Komplex BMP2:BMPRIA:ActRII/B erlauben (41,42).

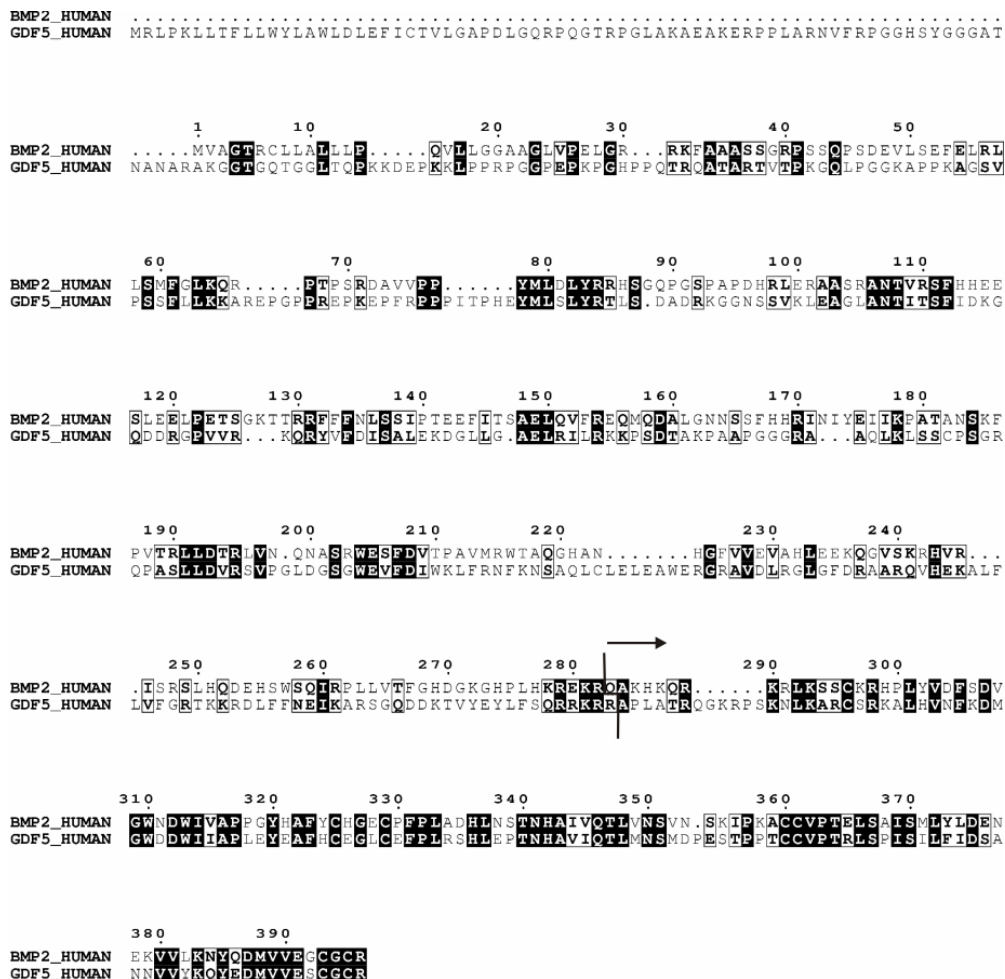


Abb. 5.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem BMP2 und GDF5

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt die Homologie der reifen BMP2- und GDF5-Proteine, deren Beginn mit einem Pfeil gekennzeichnet ist.

Das „knuckle“-Epitop des BMP2 besteht aus hydrophoben Aminosäure-Resten, die die Form eines Hufeisens bilden (42). Im Zentrum dieses Hufeisens liegt das zum GDF5-S94 homologe BMP2-S88, das mit Leucin 61 des ActRII/B (ActRII/B-L61) eine zentrale Wasserstoffbrücken-Bindung eingeht (42). Modifikationen dieser Aminosäuren (BMP2-S88A, ActRIIB-L61A oder ActRIIB-L61P) verhindern die Bildung dieser zentralen Wasserstoffbrücken-Bindung und führen zu einer 3-8fach reduzierten Affinität des BMP2 zu den Typ II-Rezeptoren (219). Durch die Mutation S94N wurde im Vergleich zum GDF5 die Affinität des GDF5-S94N zum BMPRII um den Faktor 5 und zum ActRII sowie ActRIIB um den Faktor 4 reduziert (Tab. 4.1). Der Austausch S94N beeinträchtigt demnach die Bildung der Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem in ActRII und ActRIIB konservierten L61 sowie mit einem noch nicht identifizierten Rest (vielleicht I61) des BMPRII. Folglich ist S94 für die Bindung des GDF5 an die Typ II-Rezeptoren notwendig.

Wie wichtig die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Serin 94 in GDF5 und Leucin 61 in ActRII/B ist, zeigen auch die GDF5-Mutationen Y106K und Q108D im  $\beta$ 7-Faltblatt des GDF5-L56P/Y106K/Q108D. Die Typ II Rezeptoren wurden von GDF5-L56P/Y106K/Q108D mit höherer Affinität als vom GDF5 Wildtyp gebunden. Dies steht im Gegensatz zur Mutante GDF5-S94N, die den BMPRII fünffach und den ActRII sowie ActRIIB mit vierfach reduzierter Affinität bindet. Die Ursache dafür scheint die Bildung einer intramolekularen Salzbrücke analog zu den Komplexen ActA:ActRIIB und BMP2-L100K/N102D:BMPRI:ActRIIB zu sein. Diese stabilisiert die zentrale intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen GDF5-S94 und ActRII/B-L61 (42). Diese Vermutung kann jedoch nur durch das Lösen der Struktur GDF5:ActRII/B bestätigt werden. Durch den Austausch der hochkonservierten Aminosäure Leucin 56 gegen Prolin (L56P) im „pre-helix-loop“ des GDF5-L56P/Y106K/Q108D wird die Wasserstoffbrücken-Bindung mit BMPRII-Q67 oder BMPRIA-Q86 und somit die Interaktion zwischen dem „wrist“-Epitop des GDF5 und BMPRI verhindert.

GDF5-L60P wurde bereits als „loss of function“-Mutante identifiziert (208), die BMPRI nicht mehr binden kann. Da die Mutation auf der Rückseite des „pre-helix loops“ (Abb. 4.1 B, (45)) liegt, hat sie keinen direkten Kontakt mit dem BMPRI. Sie interagiert aber über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem L56 im „pre-helix loop“. Daher ist zu vermuten, dass es durch die Mutation L60P zu einer Konformationsänderung kommt, durch die BMPRI aus dem „wrist“-Epitop herausgedrängt wird (16).

### 5.1.2. Einfluss der GDF5-Mutanten auf die Signalkaskaden

Die Affinität des GDF5 Wildtyp und der Mutanten zu den Rezeptoren ist für die Bindung an den PFC oder den BISC und die daraus resultierende Aktivierung des Smad-abhängigen und der „Non-Smad“-Signalwege von besonderer Bedeutung.

Smad 1/5/8 werden nach Interaktion der Liganden mit den PFCs, die sich aus zwei Typ I und zwei Typ II-Rezeptoren zusammensetzen, durch den aktivierten BMPRI am C-terminalen „SSXS“-Motiv phosphoryliert. Sie bilden mit Co-Smad 4 einen Komplex, der in den Nukleus transloziert und dort die Transkription von Zielgenen reguliert. Die reduzierte Affinität von GDF5-S94N zum Typ II-Rezeptor (Tab. 4.1) resultierte in einer geringeren p-Smad-Konzentration sowie der verzögerten Smad-Translokation in den Nukleus und einer geringeren Smad-abhängigen Reporter-gen-Aktivität. Die reduzierte Bindung des GDF5-L60P an den BMPRI führte zu einer noch geringeren Menge phosphorylierter Smads (Abb. 4.2, 4.4), die, wie die Inkubation mit GDF5-L56P/Y106K/Q108D zeigte, durch die stärkere Bindung der Typ II-Rezeptoren erhöht werden konnte. Trotzdem konnten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D keine Smad-abhängige Reporter-gen-Aktivität induzieren (Abb. 4.5). Das zeigt, dass für die Induktion der Smad-abhängigen Transkription die Bindung an den BMPRI unbedingt erforderlich und durch die Bindung an die Typ II-Rezeptoren verstärkt wird. Bestätigt wird das durch die Überexpression von BMPRI und BMPRII, die die Konzentration der jeweiligen Rezeptoren in den PFCs erhöht. Die Überexpression des BMPRI kompensiert die reduzierten Rezeptor-Bindungsaffinitäten der Mutanten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D und verbesserte die nukleäre Translokation der aktivierten Smads sowie die transkriptionelle Aktivität in den mit GDF5-Mutanten behandelten Zellen (Abb. 4.6B, 4.7). Durch die Überexpression des BMPRII konnte die Smad-abhängige Transkription nur in mit GDF5 oder GDF5-S94N stimulierten Zellen verbessert werden. GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D induzierten aufgrund des Bindungsverlustes zum BMPRI in den C2C12-BMPRII-Zellen keine Reporter-gen-Aktivität (Abb. 4.7).

Trotz der Überexpression von BMPRI oder BMPRII konnten die GDF5-Mutanten jedoch keine mit dem GDF5 Wildtyp vergleichbare Aktivität stimulieren. Dies lässt vermuten, dass zusätzliche Signal-Faktoren erforderlich sind. Ähnlich dem BMP2 kann GDF5 wahrscheinlich durch die Bindung an die BMP-Rezeptoren Co-Faktoren oder Rezeptor-assoziierte Proteine aktivieren, die im Komplex mit den phosphorylierten R-Smads in den Nukleus wandern und dort den Abbau der Smads oder ihre Bindung an die DNA beeinflussen.

Der Einfluss von Rezeptor-assoziierten Proteinen wurde durch die Überexpression von BMPRII und cGKI untersucht (Abb. 4.7 C). cGKI interagiert mit der C-terminalen tail-Region des BMPRII und phosphoryliert diesen. Nach BMP-Stimulation löst sich die cGKI vom Rezeptor, bindet an die aktivierten Smads und transloziert mit dem Smad-Komplex in den Nukleus. Dort wird der allgemeine Transkriptionsfaktor TFII-I durch cGKI in den Smad-Transkriptionskomplex am *Id1*-Promotor rekrutiert und die *Id1*-Transkription durch TFII-I und cGKI zusätzlich gefördert (36). In den cGKI-überexprimierenden Zellen löste sowohl die Inkubation mit GDF5 als auch GDF5-S94N oder GDF5-L56P/Y106K/Q108D eine höhere Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den mit  $\beta$ -Galactosidase transfizierten Zellen aus (Abb. 4.7 C). Demnach reicht die geringe Affinität von GDF5-S94N zum BMPRII aus, damit die Rezeptor-assoziierte cGKI die Smad-abhängige Transkription unterstützen kann. Die unstimulierten Zellen zeigten trotz Überexpression von cGKI keine Veränderung der Luciferase-Aktivität, so dass ein ligandenunabhängiger Effekt ausgeschlossen ist. Neben der cGKI können weitere Proteine sowohl mit den BMP-Rezeptoren als auch den Smads interagieren und zur Regulation der Signalkaskaden beitragen (35,37,76). Ihr Einfluss konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Rezeptor-assoziierte Proteine tragen auch zur „Non-Smad“-Signaltransduktion bei, zu der die Aktivierung von TAK1 und den MAPKs p38, ERK und JNK sowie von PI3K/Akt gehören. Die Aktivierung von p38 MAPK ist besonders gut charakterisiert. Dabei binden BMP2/GDF5 zuerst an ihren hochaffinen Rezeptor BMPRI und rekrutieren anschließend den niederaffin gebundenen BMPRII in den BMP induced signaling complex (BISC). Der XIAP/TAB/TAK1-Komplex bindet an die BMP-Rezeptoren (76). Die aktivierte TAK1 phosphoryliert MKK3/6, die p38 MAPK phosphoryliert und aktiviert (73). In C2C12-Zellen induzierten BMP2 und GDF5 die Phosphorylierung von p38 im Stimulationszeitraum von 30-60 Minuten (Abb. 4.8). GDF5-S94N hingegen induzierte in C2C12-Zellen nur nach 45minütiger Stimulation eine geringe Menge an p-p38 (Abb. 4.8). Demzufolge reicht die geringe Affinität der GDF5-S94N-Mutante zu den Typ-II-Rezeptoren aus, um die Typ-II-Rezeptoren in den BISC zu rekrutieren. Die mittels SPR-Messungen bestimmten Affinitäten zu den BMP-Rezeptoren (vgl. Tab. 4.1) wurden aus Assoziation und Dissoziation der Liganden errechnet. Die hohe Affinität des GDF5 zum BMPRI ergibt sich aus der langsamen Assoziation und Dissoziation des Liganden und des BMPRI. Im Gegensatz dazu erfolgt die Assoziation und Dissoziation des Liganden und der Typ II-Rezeptoren deutlich schneller und beeinflusst so entscheidend die Halbwertszeit des BISC (43). Die geringere Affinität des GDF5-S94N zu den Typ II-Rezeptoren scheint die Halbwertszeit des BISC noch weiter zu

verkürzen, so dass p38 nicht nur verzögert, sondern auch über einen kürzeren Zeitraum aktiviert wird.

Die Mutanten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D, die BMPRI nicht mehr binden können, konnten p38 nicht aktivieren (Abb. 4.8). Dies bestätigt, dass die Interaktion mit BMPRI für die Rekrutierung des BMPRII und die Bildung des BISC unerlässlich ist. Demzufolge kann die fehlende Bindung an den BMPRI auch nicht durch eine höhere Affinität zum Typ II-Rezeptor ausgeglichen werden.

### **5.1.3. Resistenz der GDF5-S94N-Mutante gegen die Inhibierung durch Noggin**

BMPs/GDFs induzieren auch die Transkription des BMP-Antagonisten Noggin (146). Es wird sekretiert und bindet als Noggin-Dimer extrazellulär an die dimeren BMPs/GDF-Liganden. Dabei interagiert die N-terminale Clip-Region des Noggins mit dem „wrist“-Epitop des Liganden, während der C-terminale Bereich des Noggin-Clips das „knuckle“-Epitop besetzt. Auf diese Weise wird die Bindung der BMPs/GDFs an die Rezeptoren unterbunden und eine permanente Aktivierung der BMP/GDF-abhängigen Signalkaskaden verhindert (Abb. 4.16) (136).

GDF5-S94N liegt im „knuckle“-Epitop und kommt mit dem C-terminalen Ende des Noggin-Clips direkt in Kontakt (Abb. 4.16 C). Die SPR-Messungen zeigen, dass durch den Aminosäureaustausch des Serin gegen Asparagin an Position 94 die Bindung von GDF5-S94N zu Noggin um den Faktor vier geschwächt wird (Tab. 4.2). Konsistent mit dieser Beobachtung waren die Resultate in ATDC5- und Micromass-Zellen, die zeigten, dass die biologische Aktivität von GDF5-S94N durch Noggin nicht inhibiert werden konnten. Durch ansteigende Noggin-Konzentrationen (10facher molarer Überschuss) wurde die GDF5-induzierte ALP-Aktivität komplett gehemmt, während die GDF5-S94N-induzierte ALP-Aktivität aufgrund der reduzierten Affinität zu Noggin kaum beeinträchtigt wird (Abb. 4.17 A). Noch deutlicher war der Unterschied im Reporter-gen-Versuch: Ein vierfacher molarer Überschuss an Noggin konnte die vom Wildtyp ausgelöste Reporter-genaktivität komplett inhibieren, wohingegen die durch die Mutante S94N ausgelöste Reporter-genantwort nahezu konstant blieb (Abb. 4.17 B). In den Micromass-Kulturen induzierte GDF5-S94N in Gegenwart von 2 nM Noggin unverändert die Produktion der ECM, während nach Inkubation mit GDF5 und 2 nM Noggin keine ECM-Produktion nachweisbar war (Abb. 4.18 A, B). Die



mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen der Maus differenzieren während der Extremitätenentwicklung zu den verschiedensten Zelltypen u.a. zu reifen Chondrozyten. Sie sind daher als ein *in vivo*-ähnliches System anzusehen. GDF5 und die GDF5-Mutanten lösten in den Micromass-Zellen die endogene Noggin-Expression aus. Dieses wird sekretiert und beeinflusst die biologische Aktivität des GDF5. Infolgedessen konnte die GDF5-Aktivität in Micomass-Zellen schon mit einem zweifach molaren Überschuss komplett inhibiert werden, während für die Aktivität in ATDC5-Zellen, die kein Noggin exprimieren, ein vier- bzw. zwanzigfacher molarer Überschuss notwendig war. Hinzu kommt, dass die ECM-Produktion durch die Färbung mit Alcian Blue direkt nachgewiesen wird. Im Gegensatz dazu wird die Expression des ALP und des Reportergens indirekt durch die enzymatische Umsetzung eines Substrats gemessen.

Die SPR-Messungen (Tab. 4.2) sowie die Versuchsergebnisse der mit GDF5-S94N und Noggin stimulierten ATDC5- und Micromass-Zellen zeigen, dass S94 nicht nur für die Bindung des GDF5 an die Typ II-Rezeptoren, sondern auch für die Bindung an den C-terminalen Noggin-Clip notwendig ist. Die Punktmutation S94N im „knuckle“-Epitop des GDF5 reicht aus, um die Resistenz gegen die Inhibierung durch Noggin auszulösen.

Die Mutante GDF5-N64K/T (bzw. N445K/T einschließlich Signalpeptid und Proprotein) ist bereits als noggin-resistente GDF5-Mutante, die SYNS auslöst, beschrieben (235). Im Gegensatz zu GDF5-S94N liegt die Mutation N64K/T nicht in einem mit den BMPRI oder Noggin interagierenden Bereich, sondern nur in der Nähe zum „wrist“-Epitop und somit außerhalb der Rezeptor-Interaktionsseiten. Folglich bindet GDF5-N64K/T mit unveränderter Affinität an die BMP-Rezeptoren. In C2C12-Zellen induziert diese Mutante eine höhere ALP-Aktivität als GDF5 und in den Micromass-Zellen des Hühnchens eine verstärkte ECM-Produktion und somit Chondrogenese (Dissertation Petra Seemann 2005, (235)). Dies lässt eine höhere biologische Aktivität von GDF5-N64K/T im Vergleich zu GDF5 Wildtyp ähnlich einem „Superagonisten“ vermuten. Die biologische Aktivität von GDF5-N64K/T ließ sich auch durch ansteigende Noggin-Konzentrationen (achtfacher molarer Überschuss) nicht inhibieren. Eine veränderte Affinität von GDF5-N64K/T zu Noggin, die die Noggin-Resistenz verursachen könnte, wurde nicht nachgewiesen (235). Stattdessen ist zu vermuten, dass die durch GDF5-N64K/T ausgelöste Signalaktivität in Gegenwart von Noggin allein auf die deutlich höhere biologische Aktivität des Superagonisten GDF5-N64K/T (Dissertation Petra Seemann 2005, (235)) zurückzuführen ist, die einer höheren Noggin-Konzentration als GDF5 für die Inhibierung bedarf.

Lysin 60 (K60) wurde in BMP6 als entscheidende Aminosäure für Noggin-Resistenz identifiziert, die auch in BMP9, nicht aber im relativ homologen BMP7 vorkommt (238). Obwohl BMP6-K60 nicht direkt mit Noggin interagiert und BMP6 eine höhere Affinität zu Noggin als BMP7 zeigt, wird es nicht wie BMP7 inhibiert (238). Unklar ist noch, welche molekularen Begebenheiten der Noggin-Resistenz von BMP6 zugrunde liegen. Bisher wurde eine geringere Flexibilität des BMP6 im Vergleich zum sehr homologen BMP7 aufgrund einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Lysin 60 und Asparagin 65 des BMP6 und eine daraus resultierende geringere Stabilität des BMP6-Noggin-Komplexes in Gegenwart von den BMP-Rezeptoren vermutet (238), die von SPR-Messungen nicht bestätigt werden konnten. Die Beteiligung weiteren Co-Faktoren wurde bisher nicht ausgeschlossen.

## **5.2. Auswirkungen der GDF5-Mutationen auf die Chondrogenese und Osteogenese**

Während der Embryonalentwicklung regulieren GDF5 und BMP2 die Chondrogenese und Osteogenese und somit die Bildung von Knorpel, Knochen und Gelenken. Bei diesen Prozessen differenzieren die mesenchymalen Zellen entweder direkt zu Osteoblasten (desmale Ossifikation) oder zu Chondrozyten, die dann durch Osteoblasten ersetzt werden (endochondrale Ossifikation) (153). Dabei werden in Abhängigkeit von Zelltyp und Differenzierungsstadium spezifisch BMP-Liganden, -Rezeptoren, -Cofaktoren und -Antagonisten exprimiert (154). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der GDF5-Mutanten auf die Osteoblasten-Differenzierung (C2C12-Zellen) und auf die Chondrogenese (ATDC5-Zellen und Mircomass-Zellen) untersucht.

### **5.2.1. Einfluss der GDF5-Mutanten auf die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen**

C2C12-Zellen sind Vorläuferzellen, die in Serum-reduziertem Medium zu Myotuben und in Gegenwart von BMP2 direkt zu Osteoblasten differenzieren. Dabei aktiviert BMP2 die Smads, p38 MAPK und Transkriptionsfaktoren wie z. B. Runx2. Infolgedessen exprimieren C2C12-Zellen *Id1* sowie die osteoblastären Differenzierungsmarker *ALP*, *Runx2*, *Osx* und *Ocn* (46,75,100,221). *Id1* interagiert mit MyoD und inhibiert die MyoD-DNA-Interaktion, wodurch die Myogenese der C2C12-Zellen gehemmt wird (222,239). Im Vergleich zu den

mit GDF5 stimulierten Zellen zeigten die GDF5-S94N inkubierten Zellen eine verzögerte/gehemmte Smad-Phosphorylierung sowie eine reduzierte Transkription (Abb. 4.2, 4.4, 4.5). Das spiegelt sich auch in der geringeren Expression der *Id1*-mRNA nach GDF5-S94N-Stimulation im Vergleich zu GDF5 wilder (Abb. 4.11 A). Die Mutanten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D konnten die Transkription von *Id1* nicht induzieren. Folglich nahm die *Id1*-Expression in den stimulierten C2C12-Zellen von GDF5 über GDF5-S94N zu GDF5-L56P/Y106K/Q108D und GDF5-L60P ab (Abb. 4.11 A), während die Differenzierung zu Myotuben in gleicher Weise anstieg (Abb. 4.9, 4.10). Die verstärkte Myotubenbildung nach Inkubation mit GDF5-L60P wurde bereits publiziert (208). Durch die stärkere Bindung des GDF5-L56P/Y106K/Q108D an die Typ II-Rezeptoren konnte der Bindungsverlust zum BMPRI kompensiert und die Differenzierung zu Myotuben verlangsamt werden (Abb. 4.9, 4.10). Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der BMP-BMPRI-Interaktion für die osteoblastäre Differenzierung. Auch die Überexpression des kinase-defizienten BMPRIA oder BMPRIIB in C2C12-Zellen begünstigt die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben (240). Die reduzierte Bindung der GDF5-S94N-Mutante an die Typ II-Rezeptoren hatte keinen großen Einfluss auf die Myogenese: Sie förderte die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben nicht, aber verhinderte sie auch nicht.

Die ALP-Aktivität, ein Marker der osteoblastären Differenzierung, nahm in gleicher Weise wie die *Id1*-mRNA-Konzentration und in Übereinstimmung mit der Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben von GDF5 über GDF5-S94N zu GDF5-L56P/Y106K/Q108D und GDF5-L60P ab. Auch die Expression von *Runx2*, einem weiteren osteoblastären Marker, war nach Stimulation mit GDF5-L60P, GDF5-S94N und GDF5-L56P/Y106K/Q108D geringer als in den GDF5 Wildtyp-behandelten Zellen.

Die Differenzierung der C2C12-Zellen nach Stimulation mit den GDF5-Mutanten spiegelt somit eine gehemmte Aktivierung des Smad-abhängigen und p38 MAPK Signalweges wider. Ebenso wie für die Transkription der Zielgene ist für die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten die unveränderte Bindung des GDF5 an die Typ I und Typ II-Rezeptoren erforderlich. Die hier untersuchten GDF5-Mutanten erfüllen dieses Kriterium nicht. Deshalb konnten die C2C12-Zellen in Gegenwart der GDF5-Mutanten nicht zu Osteoblasten differenzieren.

### 5.2.2. Einfluss der GDF5-Mutanten auf die endochondrale Ossifikation

ATDC5-Zellen sind Prä-Chondroblasten, die in Gegenwart von GDF5 zu Chondrozyten differenzieren. Dabei werden R-Smads und p38 aktiviert, die die Expression von Kollagen Typ II und ALP fördern (101,241). Die Bedeutung von Smads und p38 für die Chondrogenese wurde auch in Mäusen mit konditionellem „knock out“ untersucht. Retting et al zeigten in verschiedenen Smad 1/5/8 konditionellen „knock out“-Mäusen, dass der „knock out“ von Smad 1, Smad 5 oder Smad 8 keine Abnormalitäten auslöst, aber das kombinierte Ausschalten mehrerer R-Smads zu Disorganisation der Wachstumszone und dem Verlust hypertropher Chondrozyten führt und die Invasion der Osteoblasten in den Knorpel verhindert (227). Beeinträchtigungen der Chondrogenese und Skelettfehlbildungen wie z. B. Gelenkfehlbildungen, Dislokation der Ellenbogen und Fusion der Tarsalen sowie die reduzierte Mineralisierung der Calvaria wurden auch in Mäusen mit konditionellem „knock out“ der TAK1 und der daraus resultierenden Inhibierung des TAK1/MKK3/6/p38-Weges beobachtet (73,104).

In den ATDC5-Zellen verzögerte und reduzierte die GDF5-S94N-Mutante die Aktivierung von Smads und p38 MAPK (Abb. 4.2, 4.5, 4.8). Infolgedessen wurde durch die Inkubation mit GDF5-S94N im Vergleich zu GDF5 Wildtyp auch die Expression von *Runx2*, *Col10a1* und *ALP*, die Marker der prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten sind, verringert. Die Stimulation der ATDC5- und C2C12-Zellen mit GDF5-L60P, die den BMPRI nicht mehr binden kann, löste keine Aktivierung der Smads und der p38 MAPK aus (Abb. 4.2, 4.5, 4.8). Dementsprechend wurde in den ATDC5-Zellen eine im Vergleich zu GDF5 reduzierte Expression von *Runx2*, *ALP* und *Col10a1* detektiert (Abb. 4.12 D-F). Die Induktion der ALP-Aktivität war auch nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen GDF5-L60P nicht möglich (Abb. 4.12G). GDF5-L56P/Y106K/Q108D bindet hingegen mit höherer Affinität an die Typ II-Rezeptoren als GDF5-L60P. Dadurch konnte GDF5-L56P/Y106K/Q108D im Vergleich zu GDF5-L60P die Aktivierung der Smads geringfügig verbessern und die Expression von *Runx2* und *Col10a1* sowie die ALP-Aktivität erhöhen (Abb. 4.12). Trotzdem blieb die Intensität der chondrogenen Differenzierung nach GDF5-L56P/Y106K/Q108D-Stimulation hinter der von GDF5-behandelten Zellen zurück. In ATDC5-Zellen beeinträchtigt demnach GDF5-S94N aufgrund seiner reduzierten Affinität zu den Typ II-Rezeptoren die Reifung der Prä-Chondroblasten ATDC5 zu Chondrozyten, während ohne die Bindung der

Mutanten GDF5-L60P und GDF5-L56P/Y106K/Q108D an den BMPRI die chondrogene Differenzierung kaum möglich ist.

Um den Einfluss der GDF5-Mutanten in einer *in vivo*-ähnlichen Situation auf die unterschiedlichen Stadien der Extremitätenentwicklung untersuchen zu können, wurden mesenchymale Zellen aus den Extremitätenknospen der Maus isoliert und mit den GDF5-Mutanten für sechs Tage stimuliert. Wie bereits veröffentlicht, konnte GDF5-L60P in den Micromass-Zellen nur eine geringe ECM-Produktion induzieren (Abb. 4.13) (208). Außerdem verringerte die Behandlung der Micromass-Zellen mit der „loss-of-function“ Mutante GDF5-L60P im Vergleich zu GDF5 die Expression der chondrogenen und osteoblast-spezifischen Marker (Abb. 4.14) und bestätigt die mittels der C2C12- und ATDC5-Zellen erhaltenen Ergebnisse. Durch die Inkubation der C2C12-, ATDC5- und Micromass-Zellen konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass der Bindungsverlust von GDF5-L60P zum BMPRI die Aktivierung von R-Smads und p38 verhindert, die für die Chondrogenese unbedingt notwendig sind. Infolgedessen leiden die Betroffenen an BDA2. Bisherige Publikationen beschreiben das Fehlen der Phalangen in BMPRI<sup>B</sup> „knock out“ Mäusen (242) sowie den Phänotyp BDA2 als Folge von Mutationen des BMPRI<sup>B</sup> (243) oder des GDF5 (208,236) ohne die molekularen Mechanismen hinsichtlich ihres Verhaltens innerhalb der BMP/GDF-Signaltransduktion zu untersuchen.

GDF5-S94N löste in ATDC5-Zellen ebenfalls eine reduzierte Expression von *Runx2*, *ALP* und *Col10a1* (Abb. 4.12) aus. Diese Ergebnisse stimmten mit der verzögerten und reduzierten Aktivierung von Smads und p38 in C2C12- und ATDC5-Zellen überein. Im Gegensatz dazu förderte GDF5-S94N in Micromass-Kulturen schon in geringen Konzentrationen die ECM-Bildung der Micromass-Kulturen (Abb. 4.13). Dass GDF5-S94N die Chondrogenese der Micromass-Zellen vorantreibt, wurde durch die verstärkte Expression von *Runx2*, *ALP*, *Osx* und *Ocn*, Marker der prä-hypertrophen und hypertrophen Chondrozyten sowie der Osteoblasten, bestätigt (Abb. 4.14). Eine höhere biologische Aktivität des rekombinanten GDF5-S94N im Vergleich zu GDF5 Wildtyp, ähnlich einem „Superagonisten“, kann aufgrund der reduzierten Signaltransduktion von GDF5-S94N in C2C12- und ATDC5-Zellen ausgeschlossen werden.

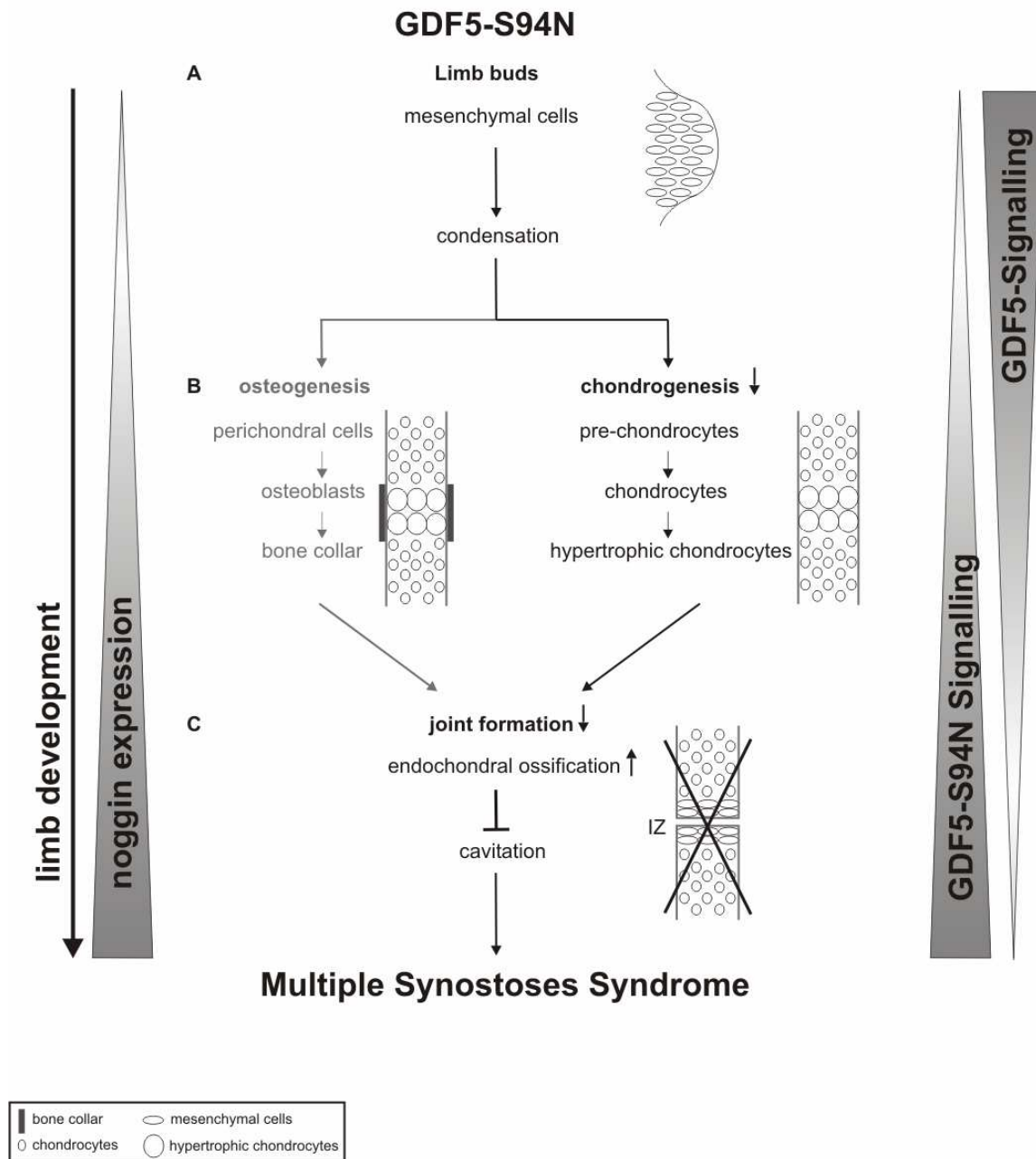
Die durch GDF5-S94N induzierte verstärkte Chondrogenese der Micromass-Zellen stimmt mit dem GDF5-S94N verursachten Phänotyp SYNS, der eine verstärkte Chondrogenese und Osteogenese vermuten lässt, überein. Um auszuschließen, dass GDF5-S94N die Expression von SOST oder LRP5 sowie das *RANKL/Opg*-Verhältnis beeinflusst, wurde deren

Expression mittels qPCR in Micromass-Zellen untersucht. Mutationen im humanen *SOST* sowie im *LRP5*, die eine reduzierte Expression von *SOST* oder die dauerhafte Aktivierung von *LRP5/6* und damit eine dauerhafte Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges bedingen, führen ebenfalls zu einer verstärkten Chondrogenese und Osteogenese sowie einer erhöhten Knochenmasse (130,131,134,135). Auch der konditionelle „knock out“ von *BMPRIA* zeigte eine verstärkte Knochenbildung, die durch die reduzierte Expression von Sclerostin und das verminderte *RANKL/Opg*-Verhältnis verursacht wird (133). *GDF5-S94N* induzierte im Vergleich zu *GDF5* stimulierten Zellen eine geringfügig (1,3fach) höhere *SOST*- Expression (Abb. 4.15). Die Expression des Wnt-Antagonisten *Dkk1* und des *LRP5* wurde durch *GDF5-S94N* nicht beeinflusst (Abb. 4.15). Eine permanente Aktivierung durch die fehlende *SOST*-Expression oder erhöhte *LRP5*-Expression konnten somit als Verstärker der *GDF5-S94N*-induzierten Chondrogenese ausgeschlossen werden. *RANKL* wird von Osteoblasten exprimiert und ist auf der Zelloberfläche lokalisiert. Es wird von *RANK*, einem Rezeptor der Osteoklasten gebunden. Durch die *RANKL-RANK*-Interaktion differenzieren die Osteoklasten und initiieren die Knochen-Resorption. Dieser Prozess kann durch Osteoprotegerin inhibiert werden. Dabei bindet Osteoprotegerin an *RANKL* und verhindert die *RANKL-RANK*-Interaktion und damit die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten. Die Expression von *RANKL* wurde im Vergleich zu den *GDF5*-stimulierten Zellen durch *GDF5-S94N* nicht verändert. Stattdessen reduzierte *GDF5-S94N* geringfügig (1,4fach) die *Opg*-Expression (Abb. 4.15), die eine Erhöhung des *RANKL/Opg*-Verhältnis und eine Hemmung der Osteogenese bedingen könnte. Im Hinblick auf das durch *GDF5-S94N* ausgelöste SYNS kann die Inhibierung der Osteogenese nicht bestätigt werden. Demzufolge ist die höhere Aktivität der *GDF5-S94N* auf die fehlende Inhibierung durch das endogene *Noggin* zurückzuführen.

Eine verstärkte Chondro- und Osteogenese war auch in Menschen mit Mutationen im *Noggin* beobachtet worden. Sie litten unter SYNS, Symphalangismus oder karpale/tarsale Fusionen (141,142,244). Die Suppression von *Noggin* in der Maus förderte durch die fehlende Inhibierung der BMP-abhängigen Signaltransduktion die endochondrale und desmale Ossifikation (145,148). Durch die Stimulation der Micromass-Zellen mit *GDF5-S94N* wurde keine *Noggin*-Suppression, sondern eine zweifach höhere *Noggin*-Expression ausgelöst (Abb. 4.18).

Die durch *GDF5-S94N* induzierte *Noggin*-Expression zeigt, dass das durch *GDF5-S94N* hervorgerufene SYNS nicht nur die Folge einer fehlenden negativen „feedback“-Hemmung, sondern einer „feedforward“-Situation ist: Während in den Extremitätenknospen die

mesenchymalen Zellen differenzieren, induzieren GDF5 oder GDF5-S94N die Expression von Noggin (Abb. 5.2). Die endogene Noggin-Konzentration nimmt zu, so dass eine überlappende Expression von GDF5 oder GDF5-S94N und Noggin in den zukünftigen Gelenkzonen beobachtet werden kann (145,208,245,246). GDF5 wird von Noggin gebunden und dadurch inhibiert. Im Gegensatz dazu ist GDF5-S94N resistent gegen die Inhibierung durch Noggin. Deshalb kann GDF5-S94N ungehemmt die Transkription von Zielgenen wie *Runx2*, *ALP*, *Sp7*, *Ocn* und *Noggin* induzieren und so die Chondrogenese vorantreiben. Dieser folgen Osteogenese und Mineralisierung und somit die Verknöcherung der Gelenke. D.h., die ursprünglich reduzierte Signaltransduktion von GDF5-S94N in den mesenchymalen Zellen nimmt mit steigender Noggin-Expression zu und fördert die Differenzierung der Zellen. Die negative „feedback“-Hemmung wird so in einen „feed-forward“-Mechanismus umgewandelt, der die Chondrogenese beschleunigt und als humaner Phänotyp SYNS sichtbar wird (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2 Die Noggin-Resistenz des GDF5-S94N während der Extremitäten-Entwicklung verursacht das Multiple Synostoses Syndrom (SYNS).**

A) In den Extremitätenknospen induziert GDF5-S94N die Kondensation der mesenchymalen Zellen. B) Ihre Differenzierung zu Chondrozyten wird durch die Mutation S94N und die daraus resultierende verminderte Signalaktivität beeinträchtigt. C) In zukünftigen Gelenkspalten sekretieren die Chondrozyten GDF5-S94N und Noggin um die Interzone (IZ) zu bilden (links). GDF5-S94N ist resistent gegen die Inhibierung durch Noggin und kann ungehindert die Transkription der für die Chondrogenese und Osteogenese benötigten Faktoren induzieren. Schließlich übersteigt die Aktivität von GDF5-S94N die von GDF5 (rechts) und resultiert in einer verstärkten endochondralen Ossifikation sowie der fehlenden Gelenkbildung, die als SYNS diagnostiziert wird.



### 5.3. Schlussfolgerungen

Diese Arbeit zeigt, dass Serin 94 im „knuckle“-Epitop des GDF5 für die Signaltransduktion, die Zelldifferenzierung und die Interaktion mit dem C-terminalen Bereich des Noggin-Clips entscheidend ist.

Durch die Mutation GDF5-S94N wird die Affinität zu den BMP-Typ II-Rezeptoren geschwächt. Trotzdem kann GDF5-S94N den Smad-abhängigen und den p38 MAPK-Signalweg, wenn auch abgeschwächt und/oder verzögert, induzieren. Dies hat zur Folge, dass die SYNS-Mutante im Vergleich zum GDF5 Wildtyp eine geringere transkriptionelle Aktivität aufweist. Daher sind durch die S94N-Punktmutation in GDF5 auch Prozesse der Zelldifferenzierung beeinträchtigt (Abb. 5.2). Viel schwerer hingegen scheint die durch die Mutation GDF5-S94N ausgelöste Noggin-Resistenz zu wiegen. Während der Extremitäten-Entwicklung reicht die geringe transkriptionelle Aktivität von GDF5-S94N aus, um die Chondrogenese und die Expression von *Noggin* zu induzieren (Abb. 5.2). Da GDF5-S94N nicht wie GDF5 durch Noggin im Rahmen der negativen „feedback“-Hemmung inhibiert wird, treibt es die Chondrogenese immer weiter voran und zeigt schließlich ein höheres chondrogenes Potential als GDF5 (Abb. 5.2). Der beschleunigten Chondrogenese folgen Osteogenese und Mineralisierung, die im Menschen zur Verknöcherung der knorpeligen Elemente und der Gelenke führen und als SYNS sichtbar werden.

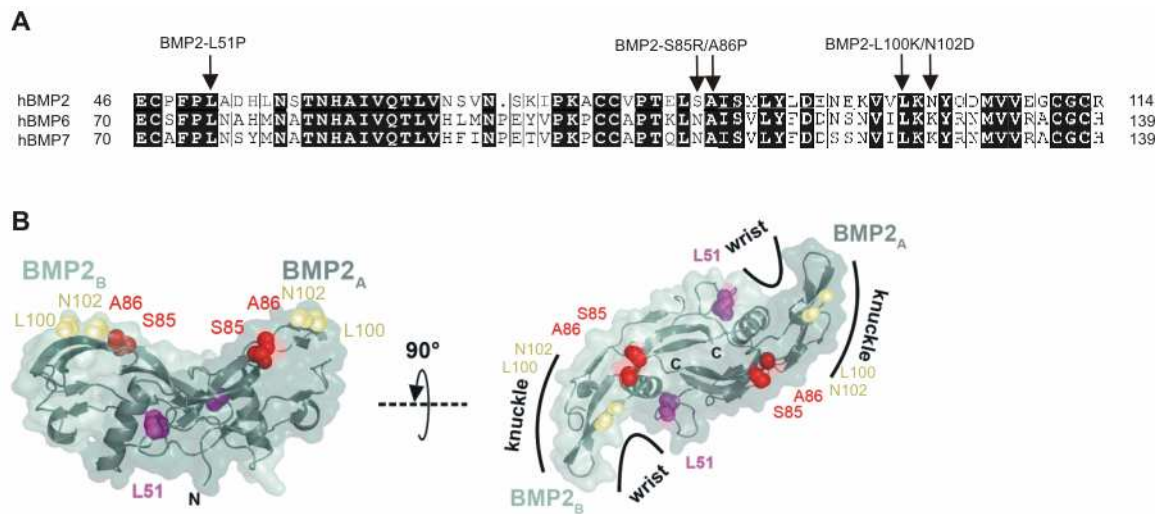
Außerdem konnte gezeigt werden, dass die reduzierte Chondrogenese in BDA2-Patienten, die die GDF5-L60P-Mutation tragen (208), wahrscheinlich auf die fehlende Aktivierung von Smads und p38-MAPK zurückgeführt werden kann. Abhängig von der zeitlichen und räumlichen Expression von *GDF5-L60P*, *BMPRII* und *Noggin* werden Chondrogenese und osteoblastäre Differenzierung durch die Mutation GDF5-L60P negativ beeinträchtigt und rufen den Phänotyp der Brachydaktyly Typ A2 hervor.

Inwieweit diese Mutanten sich für die Applikation im Menschen zur Förderung der Knorpel- und Knochenbildung eignen, wird in weiteren Studien untersucht.

## 6. Ergebnisse: Mutationen im *BMP2*

BMP2 und BMP6 sind an der Skelettbildung und der Frakturheilung beteiligt. Sie werden von hypertrophen Chondrozyten exprimiert (150,247). Zusätzlich wird BMP2 auch im Perichondrium synthetisiert und ist an der Entwicklung des Herzens beteiligt (4,248), BMP2 „knock-out“-Mäuse (*BMP2*<sup>-/-</sup>) sind daher nicht lebensfähig (249). Im Gegensatz dazu führte der „knock-out“ von BMP6 nur zu einer verzögerten Skelett-Entwicklung (250). Der Vergleich zwischen BMP2 und BMP6 zeigte außerdem, dass BMP6 resistent gegen die Inhibierung durch Noggin ist und die Differenzierung zu Osteoblasten stärker fördert als BMP2 (238,251,252). BMP2 und BMP6 induzieren durch die C-terminale Aktivierung von Smad 1/5/8 den gleichen Signalweg. BMP2 bindet mit hoher Affinität an BMPRI und mit geringer Affinität an die Typ II-Rezeptoren (BMPRII, ActRII, ActRIIB) (44,45). BMP6 hingegen bindet mit hoher Affinität an die Typ II-Rezeptoren ActRII und ActRIIB (17,27). Strittig ist noch, ob BMP6 an den BMPRIA mit höherer Affinität (17) oder mit geringerer Affinität (27) als an den ActRII bindet.

Wie die Rezeptoraffinitäten die Signaltransduktion, Differenzierung und Mineralisierung beeinflussen, wurde nach Stimulation von C2C12- und MC3T3-E1-Zellen mit verschiedenen BMP2-Mutanten analysiert. Die Rezeptoraffinitäten der BMP2-Mutanten wurden durch gezielte Mutationen im „wrist“- oder im „knuckle“-Epitop verändert. Die von diesen Mutationen betroffenen Aminosäuren wurden in Abb. 6.1 sowohl in der Aminosäuresequenz (Abb. 6.1A) als auch im BMP2-Dimer (Abb. 6.1 B) gekennzeichnet.



**Abb. 6.1 Die Mutationen BMP2-L51P und BMP2-S85R/A86P im BMP2**

A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von BMP2, BMP6 und BMP7. Die BMP2-Mutationen L51P, S85R/A86P und L100K/N102D sind gekennzeichnet. B) In dem blaugrün dargestellten BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer sind die von Mutationen betroffenen Aminosäuren L51 (violett) im „wrist“-Epitop sowie S85 (rot), A86 (rot), L100 (gelb) und N102 (gelb) im „knuckle“-Epitop farbig hervorgehoben. Die Rezeptor-Interaktionsseiten, „wrist“-Epitop und „knuckle“-Epitop sind in dem um 90° um die X-Achse gedrehten BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer markiert (rechts). (Die Abbildungen des BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer sind in Kooperation mit Prof. Dr. Mueller entstanden.)

## 6.1. Die BMP2-L51P-Mutante verhindert die Induktion BMP2-abhängiger Signalwege

### 6.1.1. Die Mutation BMP2-L51P verhindert die Bindung an BMPRI

Die hier untersuchten BMP2-Mutanten können mit Ausnahme von BMP2-L51P/S85R/A86P in die BMP2-Mutante (BMP2-L51P) mit Mutation im „wrist“-Epitop und die BMP2-Mutanten mit modifiziertem „knuckle“-Epitop eingeteilt werden. BMP2-L51P/S85R/A86P trägt eine Mutation im „wrist“- Epitop (L51P) und zwei Mutationen im „knuckle“-Epitop (S85R/A86P) (Abb. 6.1).

Leucin 51 (L51) ist eine hochkonservierte Aminosäure im „wrist“-Epitop des BMP2, BMP6 und BMP7 (Abb. 6.1 A). Es bildet mit BMPRIA-Q86 bzw. BMPRIIB-Q67 eine Wasserstoffbrücken-Bindung, die durch den Aminosäureaustausch von Leucin 51 gegen Prolin (L51P) zerstört wird. Infolgedessen war die Affinität der BMP2-L51P-Mutante zu BMPRIA und BMPRIIB mittels SPR-Messungen kaum zu detektieren (Tab. 6.1). Die Affinität zu den BMP Typ II-Rezeptoren wurde durch die Mutation L51P nicht beeinträchtigt (43,44).

L51 wurde auch in der Mutante BMP2-L51P/S85R/A86P durch Prolin ersetzt, so dass diese wie BMP2-L51P BMPRI nicht mehr binden kann (Tab. 6.1). Durch die zusätzlichen Mutationen S85R und A86P im „knuckle“-Epitop des BMP2 (Abb. 6.1 B) wird die Affinität des BMP2-L51P/S85R/A86P zu BMPRII um den Faktor 5 erhöht, während die Affinität zu ActRII und ActRIIB nahezu unverändert blieb (Tab. 6.1).

Ligand	K <sub>D</sub> [nM]					Referenz
	BMPRIA	BMPRIIB	BMPRII	ActRII	ActRIIB	
<b>BMP2</b>	0,8	2,4	45	14	6,3	(44,45)
<b>BMP2-L51P</b>	>7,000	>4,000	45	35	k.A.	(43,44)
<b>BMP2-L51P/S85R/A86P</b>	n.d.	n.d.	9,6	11	7,4	(16)
<b>BMP2-S85R/A86P</b>	1,3	k. A.	9,2	8,5	6,8	
<b>BMP2-L100K/N102D</b>	0,84	k. A.	42	2,9	2,7	

**Tab. 6.1 Affinitäten von BMP2 und den BMP2-Mutanten zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren**

Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen SPR (surface plasmon resonance)-Messungen mit mindestens sechs unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen, die von der AG Prof. Dr. Sebald durchgeführt wurden. n. d. = nicht detektierbar; k. A. = keine Angaben

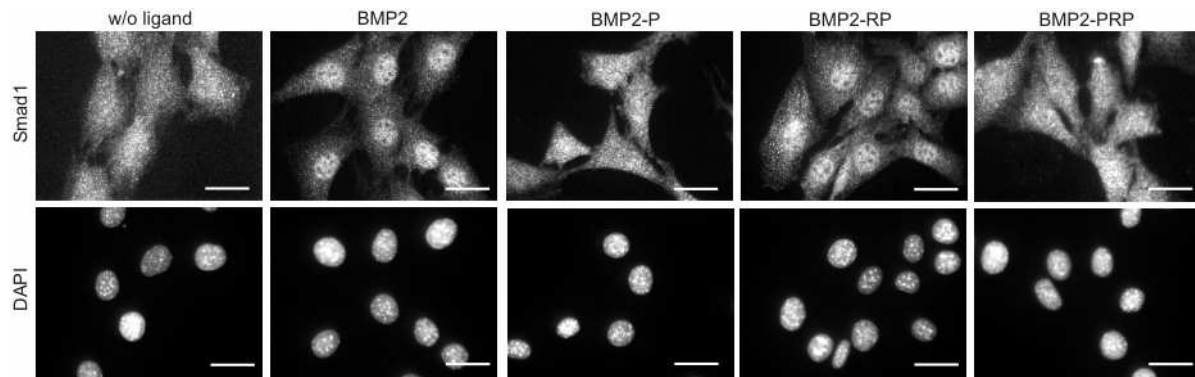
Im Kapitel 6.1. werden BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P mit der Mutation L51P im „wrist“-Epitop charakterisiert und mit BMP2 Wildtyp sowie BMP2-S85R/A86P verglichen. Durch den Vergleich mit BMP2-S85R/A86P wird ausgeschlossen, dass die durch BMP2-L51P/S85R/A86P induzierten Effekte ausschließlich auf die Mutationen S85R/A86P im „knuckle“-Epitop zurückzuführen sind. Im Kapitel 6.2. wird BMP2-S85R/A86P mit der Mutante BMP2-L100K/N102D verglichen, dessen „knuckle“-Epitope ebenfalls modifiziert wurde und die keine Veränderungen des „wrist“-Epitopes aufweist.

### 6.1.2. Die BMP2-L51P-Mutante verhindert die Aktivierung der Smads

BMP2 bindet an den präformierten Komplex (PFC), der aus BMPRI und den Typ II-Rezeptoren gebildet wird (46). Die Kinase-Domäne der Typ II-Rezeptoren phosphoryliert BMPRI, der daraufhin Smads 1/5/8 C-terminal phosphoryliert und aktiviert. Die phosphorylierten Smads translozieren im Komplex mit Co-Smad 4 in den Nukleus und induzieren die Transkription von Zielgenen wie *Id1* (80).

Wie sich der Bindungsverlust der BMP2-L51P-Mutante zu BMPRI auf die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges auswirkt und ob der Bindungsverlust zu BMPRI durch die stärkere Bindung von BMP2-L51P/S85R/A86P an BMPRII kompensiert werden kann, wurde

durch Translokationsstudien mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Western-Blot sowie durch Messung der Reporter-gen-Aktivitäten untersucht (Abb. 6.2, Abb. 6.3).

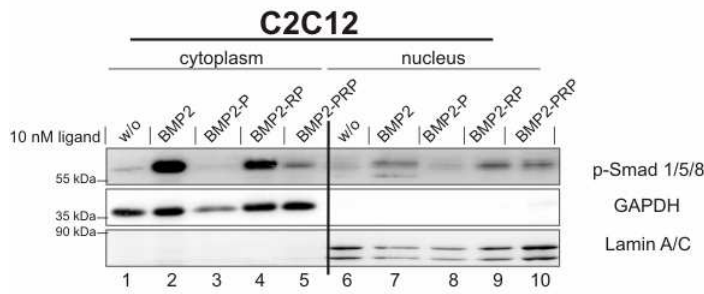
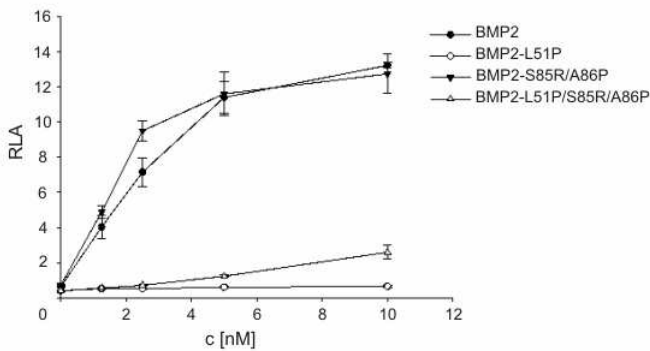


**Abb. 6.2 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P verhindern die Smad 1-Translokation**

C2C12-Zellen wurden drei Stunden gehungert und 30 Minuten mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten inkubiert. Die nukleäre Translokation von Smad 1 (oben) wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse verfolgt. Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (unten). Die Referenzmarkierung entspricht 20  $\mu\text{m}$ . BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L51P/S85R/A86P (BMP2-PRP)

Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigte, dass Smad 1 nach 30minütiger Stimulation mit BMP2 oder BMP2-S85R/A86P im Nukleus akkumuliert. Im Gegensatz dazu konnte in den unstimulierten Zellen wie auch in den mit BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P behandelten Zellen keine Translokation von Smad 1 in den Nukleus beobachtet werden (Abb. 6.2).

Durch die Fraktionierung der C2C12-Zellen in Zytoplasma und Nukleus konnte die räumliche Verteilung der phosphorylierten Smads 1/5/8 noch genauer detektiert werden (Abb. 6.3 A).

**A****B****Abb. 6.3 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P verhindern die nukleäre Translokation von Smad 1**

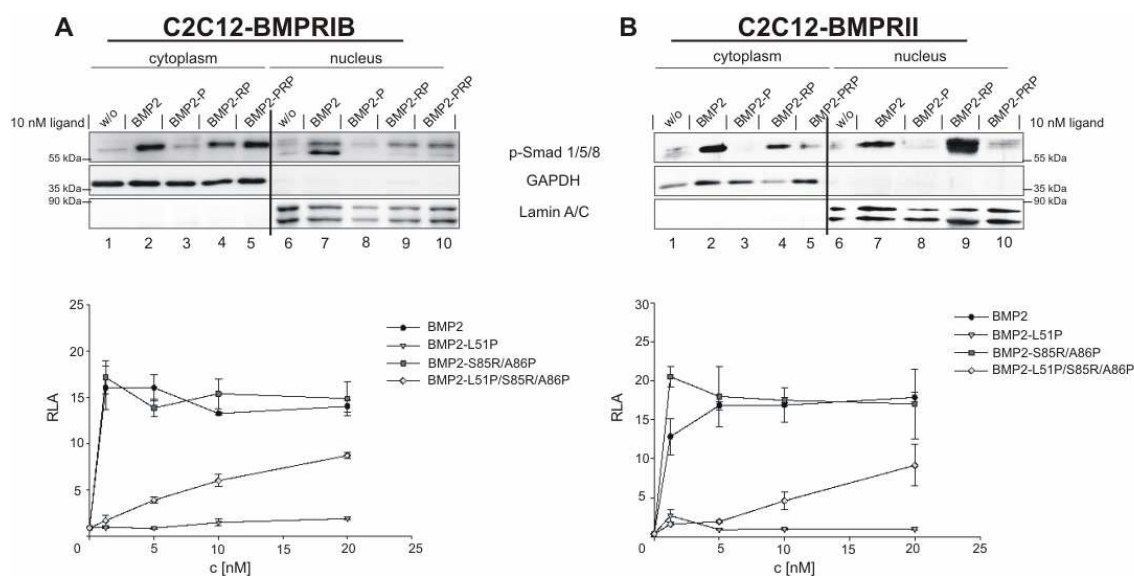
A) Nach dreistündigem Hungern und 30minütiger Stimulation mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten wurden C2C12-Zellen in den zytoplasmatischen und nukleären Anteil aufgetrennt. Durch einen spezifischen Antikörper wurden die C-terminal phosphorylierten Smads 1/5/8 nachgewiesen. Als Ladekontrolle sowie als Kontrolle für die Fraktionierung der Zellen dienten GAPDH (Zytoplasma) und Lamin A/C (Nukleus). B) C2C12-Zellen wurden mit den Reporter-Gen-Konstrukten BRE-Luc sowie RL-TK transfiziert und mit zunehmenden Konzentrationen an BMP2 oder den BMP2-Mutanten über Nacht inkubiert. Die gemessene Firefly-Luciferase-Aktivität wurde gegen die der konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase normiert und als relative Luciferase-Aktivität (RLA) dargestellt. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikat-Messung repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen. BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L51P/S85R/A86P (BMP2-PRP)

Die 30minütige Inkubation der C2C12-Zellen mit BMP2 und BMP2-S85R/A86P induzierte die Phosphorylierung der R-Smads 1/5/8 und dessen Translokation in den Nukleus (Abb. 6.3 A, Spuren 2, 4, 6 und 8). Nach Inkubation mit BMP2-L51P konnten hingegen keine p-Smads im Zytoplasma und im Nukleus nachgewiesen werden (Abb. 6.3 A, Spuren 3, 6). Diese Ergebnisse stimmen mit der Immunfluoreszenz-Analyse (Abb. 6.2) überein. Nach Stimulation mit BMP2-L51P/S85R/A86P war die nukleäre p-Smad-Konzentration so gering, dass sie nicht durch die Immunfluoreszenz-Analyse, sondern nur durch die Aufkonzentrierung während der Zellfraktionierung detektiert werden konnte (Abb. 6.3 A, Spur 10).

Um die Smad-abhängige Transkription zu untersuchen, wurden C2C12-Zellen mit den Reporter-Gen-Konstrukten BRE-Luc und RL-TK transfiziert. Entsprechend den Ergebnissen

aus den Translokationsstudien (Abb. 6.2, 6.3 A) induzierten BMP2 Wildtyp und BMP2-S85R/A86P die höchsten Reporter-gen-Aktivitäten (Abb. 6.3 B). Die BMP2-L51P-Mutante induziert keine Smad-Phosphorylierung (Abb. 6.3 A) und somit auch keine Smad-abhängige Transkription (Abb. 6.3 B). Im Vergleich dazu reichte die reduzierte Menge an nukleären p-Smads nach Inkubation mit mindestens 10 nM BMP2-L51P/S85R/A86P aus, um eine geringe Firefly-Luciferase-Aktivität zu stimulieren (Abb. 6.3 B). In Abhängigkeit von der BMP2-L51P/S85R/A86P-Konzentration wurden 10-20% der von BMP2 ausgelösten Reporter-gen-Aktivität erreicht.

Ob der Bindungsverlust von BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P zu BMPRI wie bei den GDF5-Mutanten (vgl. Kapitel 4) durch die Überexpression von BMPRIIB kompensiert werden kann und welchen Effekt die BMPRII-Überexpression hat, wurde durch die Stimulation der stabil transfizierten Zelllinien C2C12-BMPRIIB und C2C12-BMPRII mit BMP2 Wildtyp und den BMP2-Mutanten untersucht (Abb. 6.4).



**Abb. 6.4 Die Überexpression von BMPRIIB oder BMPRII verbesserte geringfügig die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges in den BMP2-L51P/S85R/A86P-stimulierten Zellen**

Die stabil transfizierten A) C2C12-BMPRIIB- und B) C2C12-BMPRII-Zellen wurden 30 Minuten mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fraktioniert und die C-terminale Phosphorylierung von Smad 1/5/8 nachgewiesen. GAPDH und Lamin A/C dienen als Ladekontrolle sowie als Kontrolle für die Fraktionierung der Zellen (oben). Nach Transfektion der C2C12-BMPRIIB- bzw. C2C12-BMPRII-Zellen mit den Reporter-gen-Konstrukten BRE-Luc und RL-TK wurden die Zellen mit BMP2 oder den BMP2-Mutanten für 16 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Luciferase-Aktivitäten gemessen und als RLA dargestellt. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate spiegeln das Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen wider (unten). BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L51P/S85R/A86P (BMP2-PRP)

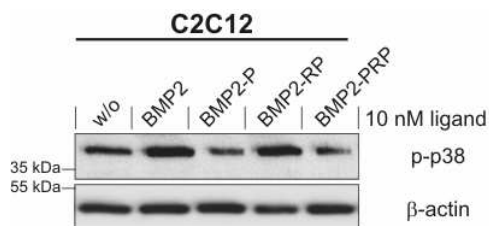
BMP2 bindet sowohl BMPRIA als auch BMPRII mit hoher Affinität (Tab. 6.1). Die Stimulation der C2C12-BMPRII-Zellen mit BMP2 Wildtyp und BMP2-S85R/A86P löste die Aktivierung der R-Smads 1/5/8 sowie ihre Translokation in den Nukleus (Abb. 6.4 A) und eine vergleichbar hohe transkriptionelle Aktivität aus. Die BMPRII-Überexpression hatte keinen Einfluss auf die biologische Aktivität von BMP2-L51P: BMP2-L51P induzierte in den stabilen C2C12-BMPRII-Zellen weder die Phosphorylierung der Smads (Abb. 6.4 A, Spur 3 und 8) noch die Aktivität der BRE-abhängigen Firefly-Luciferase (Abb. 6.4 A unten). Im Vergleich zu den parentalen C2C12-Zellen (Abb. 6.3) erhöhte die Inkubation der C2C12-BMPRII-Zellen mit der BMP2-L51P/S85R/A86P-Mutante die Konzentration der nukleären p-Smads (Abb. 6.4 A, Spur 5 und 10) sowie die Reporter-gen-Aktivität. Die Reporter-gen-Aktivität erreichte in Abhängigkeit von der Liganden-Konzentration 30-50% der Aktivität, die durch BMP2 induziert wurde (Abb. 6.4 A unten). Die Überexpression des BMPRII hatte keinen Einfluss auf die Smad-Phosphorylierung und Transkription der mit BMP2-L51P stimulierten Zellen. Die mit mehr als 10 nM BMP2-L51P/S85R/A86P stimulierten C2C12-BMPRII-Zellen erreichten 30-50% der durch BMP2 Wildtyp induzierten Reporter-gen-Aktivität (Abb. 6.4 B). Diese Reporter-gen-Aktivität war etwas höher als die Reporter-gen-Aktivität der mit BMP2-L51P/S85R/A86P stimulierten C2C12-Zellen (Abb. 6.3).

Die Inkubation der C2C12-Zellen mit der BMP2-L51P-Mutante zeigte, dass für die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges die Bindung an BMPRI erforderlich ist. Durch die höhere Affinität von BMP2-L51P/S85R/A86P zu BMPRII konnte die Mutante trotz des Bindungsverlustes zum BMPRI mit den PFCs interagieren und die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges partiell induzieren. Trotzdem erreichte die transkriptionelle Aktivität in den mit BMP2-L51P/S85R/A86P stimulierten C2C12-Zellen nur 10-20 % der Aktivität, die durch die Stimulation mit BMP2 Wildtyp hervorgerufen wurde. Der Bindungsverlust von BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P zu BMPRI konnte durch die Überexpression von BMPRII nicht kompensiert werden.



### 6.1.3. Die Mutation BMP2-L51P verhindert die BMP-abhängige Aktivierung des p38 MAPK Weges

Neben der Bindung an den „preformed complex“ (PFC) kann BMP2 hochaffin an BMPRI binden und die Rekrutierung der Typ II-Rezeptoren in den BMP-induced signaling complex (BISC) sowie die „Non-Smad“-Signalwege induzieren (46,48). Von diesen Signalwegen ist die Aktivierung der p38 MAPK durch den Rezeptor-assoziierten XIAP/TAB/TAK1-Komplex und MKK 3/6 am besten charakterisiert (73,74,76,104). Es stellte sich jedoch die Frage, ob dieser Signalweg ohne die Bindung der BMP2-Mutanten an den Typ I Rezeptor aktiviert werden kann. Deshalb wurden C2C12, C2C12-BMPRI<sup>B</sup> und C2C12-BMPRII drei Stunden gehungert und mit BMP2 oder den BMP2-Mutanten für 30 Minuten stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von p38 am Threonin 182 und dem Tyrosin 184 untersucht (Abb. 6.5).



**Abb. 6.5 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P können den p38 MAPK Signalweg nicht aktivieren**  
C2C12-Zellen wurden 30 Minuten mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten inkubiert und anschließend lysiert. Die Aktivierung von p38 wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Actin. BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L51P/S85R/A86P (BMP2-PRP)

In C2C12-Zellen konnte die Phosphorylierung von p38 nach Stimulation mit BMP2 Wildtyp oder BMP2-S85R/A86P, nicht jedoch nach Stimulation mit BMP2-L51P oder BMP2-L51P/S85R/A86P beobachtet werden (Abb. 6.5). Durch die Überexpression des BMPRI<sup>B</sup> oder des BMPRII wurde bereits in den unstimulierten Zellen eine hohe p-p38-Konzentration gemessen. Unterschiede zwischen den unstimulierten und den mit Liganden behandelten C2C12-BMPRI<sup>B</sup>- oder den C2C12-BMPRII-Zellen waren deshalb nicht zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

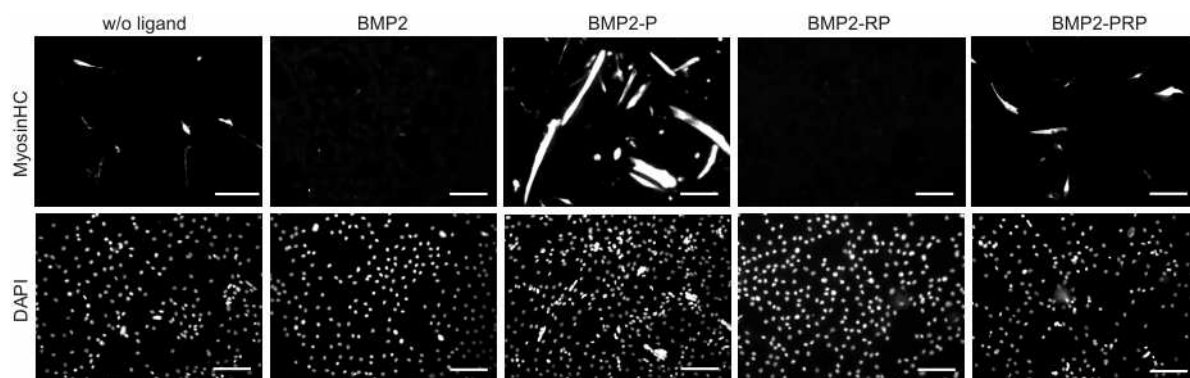
Die Aktivierung des p38 MAPK-Weges wurde somit durch die fehlende Bindung der Mutanten BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86 an BMPRI verhindert. Im Gegensatz zum

Smad-abhängigen Signalweg konnte die stärkere Bindung des BMP2-L51P/S85R/A86P an BMPRII den Bindungsverlust zum BMPRI nicht ausgleichen.

#### 6.1.4. Die Mutation BMP2-L51P verhindert die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen

C2C12-Zellen differenzieren in Serum-reduziertem Medium zu multi-nukleären Myotuben. Dabei exprimieren sie die myogenen Marker Myosin und Myogenin. Durch die Inkubation von C2C12-Zellen mit BMP2 wird jedoch der myogene Differenzierungsweg durch die Bindung von Id1 an MyoD inhibiert und stattdessen die Differenzierung zu Osteoblasten gefördert (87,221).

Ob die Mutanten BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86 trotz des Bindungsverlustes zu BMPRI die Konversion der C2C12-Zellen zu Osteoblasten induzieren, wurde durch den Nachweis des Skelettmuskel-spezifischen Myosins mittels Immunfluoreszenz-Analyse (Abb. 6.6) untersucht. Des Weiteren wurden die vom Myogenin-Promotor abhängigen Reporter-gen-Aktivität und die ALP-Aktivität der C2C12-Zellen nach Inkubation mit BMP2 oder den BMP2-Mutanten analysiert (Abb. 6.7).

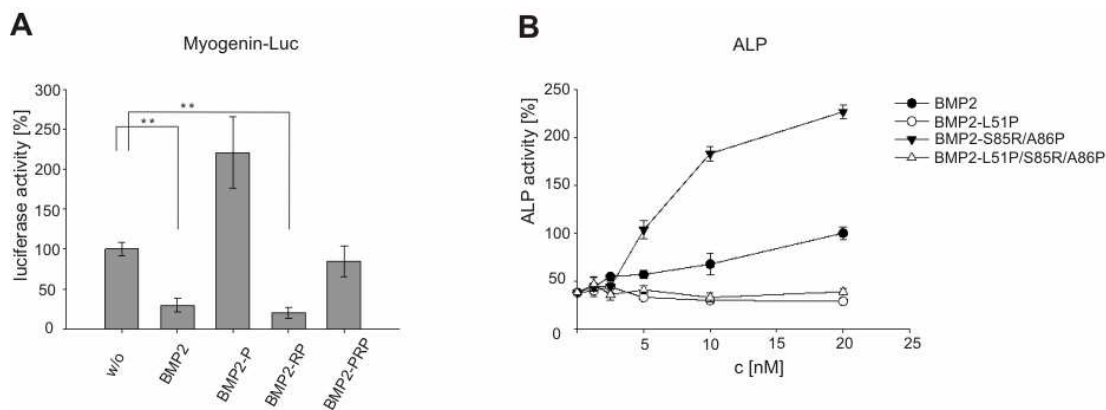


**Abb. 6.6 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P können die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Myotuben nicht inhibieren**

C2C12-Zellen wurden fünf Tage mit BMP2 Wildtyp und den BMP2-Mutanten inkubiert. Die Skelettmuskel-spezifische „Myosin heavy chains“ (MyosinHC) wurde als Marker für Myotuben mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und der Immunfluoreszenz nachgewiesen (oben). Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (unten). Die Referenzmarkierung entspricht 150  $\mu\text{m}$ . BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L51P/S85R/A86P (BMP2-PRP)

Die Immunfluoreszenz-Analyse bestätigte, dass C2C12-Zellen in Serum-reduziertem Medium Myotuben bilden. Nach Stimulation mit BMP2 Wildtyp oder mit der BMP2-S85R/A86-Mutante waren keine Myotuben nachweisbar (Abb. 6.6). Im Gegensatz dazu förderte die BMP2-L51P-Mutante die Myogenese der C2C12-Zellen, so dass deutlich mehr Myotuben im

Vergleich zu den unstimulierten Zellen gebildet wurden. Die Stimulation mit BMP2-L51P/S85R/A86P löste ebenfalls Myotuben-Bildung aus, die mit der in den Kontrollzellen induzierten Myogenese vergleichbar war (Abb. 6.6). Um ein quantitatives Ergebnis zu erhalten, wurden C2C12-Zellen mit einem vom Myogenin-Promotor abhängigen Firefly-Luciferase-Konstrukt (Myogenin-Luc) sowie dem konstitutiv aktiven Renilla-Luciferase-Konstrukt (RL-TK) transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten stimuliert (Abb. 6.7 A).



**Abb. 6.7 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P verhindern die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten**

A) C2C12-Zellen wurden mit den Reporter-Gen-Konstrukten Myogenin-Luc und RL-TK transfiziert und für fünf Tage mit 10 nM BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten inkubiert. Danach wurden die Luciferase-Aktivitäten gemessen und auf die RLA der unstimulierten Zellen (100%) normiert. Die dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate geben das Ergebnis eines von insgesamt vier vergleichbaren Versuchen wieder. (\* $p = 0,05$ ; \*\* $p = 0,005$ ;  $n = 3$ ) B) Nach dreitägiger Inkubation von C2C12-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten wurde die ALP-Aktivität gemessen. Die hier dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung repräsentieren einen von drei Versuchen. BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L51P/S85R/A86P (BMP2-PRP)

Die gemessenen Reporter-Gen-Aktivitäten bestätigen die Beobachtungen der Immunfluoreszenz-Analyse: Die in Serum-reduziertem Medium kultivierten C2C12-Zellen bildeten Myotuben (Abb. 6.6) und exprimierten die vom Myogenin-Promotor abhängige Firefly-Luciferase (Abb. 6.7 A). Im Vergleich dazu verringerten BMP2 Wildtyp und die BMP2-S85R/A86P-Mutante die Luciferase-Aktivität um das 3,4fache (BMP2) bzw. 5fache (BMP2-S85R/A86P) (Abb. 6.7 A). BMP2-L51P induzierte eine doppelt so hohe Reporter-Gen-Aktivität wie die unstimulierten Kontroll-Zellen. Mit BMP2-L51P/S85R/A86P behandelte Zellen differenzierten ebenfalls zu Myotuben (Abb. 6.6) und zeigten eine ähnliche Luciferase-Aktivität wie die unstimulierten C2C12-Zellen (Abb. 6.7 A).

Die Inkubation mit BMP2-L51P zeigte, dass die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben durch die fehlende Bindung an BMPRI gefördert wird. Eine stärkere Bindung der

BMP2-L51P/S85R/A86-Mutante zu BMPRII hingegen verlangsamte die Differenzierung zu Myotuben, verhinderte sie aber nicht.

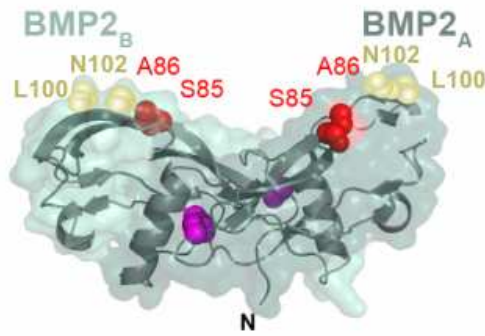
Das Enzym ALP wird in Osteoblasten exprimiert und gilt als ein Marker für die osteoblastäre Differenzierung (232). Deshalb wurde die ALP-Aktivität nach Stimulation mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten als Maß für die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen bestimmt (Abb. 6.7 B). Die Messung der ALP-Aktivität kann indirekt als Bezugswert der Expressionsstärke der ALP genutzt werden. BMP2 Wildtyp induziert die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten: die ALP-Aktivität nahm mit steigender BMP2-Konzentration zu. Eine noch höhere ALP-Aktivität wurde durch die Inkubation mit BMP2-S85R/A86P hervorgerufen. Im Gegensatz dazu konnten die Mutanten BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P die ALP-Aktivität und somit die Expression von ALP nicht induzieren (Abb. 6.7 B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass für die osteoblastäre Differenzierung von C2C12-Zellen die Bindung an BMPRI unbedingt notwendig ist und nicht, wie die Inkubation mit BMP2-L51P/S85R/A86P zeigt, durch die stärkere Bindung an BMPRII kompensiert werden kann.

## **6.2. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Differenzierung zu Osteoblasten**

### **6.2.1. Die Mutationen BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D verbessern die Interaktion zu den BMP Typ II-Rezeptoren**

Die Typ II-Rezeptor-Bindungsstelle innerhalb des BMP2-Proteins, das sog. „knuckle“-Epitop, besteht aus überwiegend hydrophoben Aminosäuren. Sie sind in Form eines Hufeisens um Serin 88 (S88) und Asparagin 102 (N102) angeordnet (42). Serin 88 ist ebenso wie die Aminosäuren Alanin 34, Prolin 35, Methionin 89 und Leucin 90 innerhalb der BMP-Familie hochkonserviert. Sie bilden den Kern des „knuckle“-Epitops. Die peripher gelegenen, nicht-konservierten Aminosäuren bestimmen die Affinität der BMPs zu den einzelnen Typ-II-Rezeptoren (BMPRII, ActRII, ActRIIB) (41,42). Um die Affinitäten von BMP2 zu den Typ II-Rezeptoren zu erhöhen, wurden die im „knuckle“-Epitop gelegenen Aminosäuren Serin 85, Alanin 86, Leucin 100 und Asparagin 102 von Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Sebald mutiert. Die Lage dieser Aminosäuren im BMP2-Dimer ist in Abb. 6.8 gekennzeichnet.



**Abb. 6.8 Darstellung der Mutationen BMP2- S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer**  
 In dem blaugrün dargestellten BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer wurden die durch Mutationen im „knuckle“-Epitop veränderten Aminosäuren S85 und A86 rot sowie L100 und N102 gelb hervorgehoben. (Die Abbildungen des BMP2<sub>A/B</sub>-Dimer sind in Kooperation mit Prof. Dr. Mueller entstanden.)

Durch den Aminosäureaustausch Serin 85 gegen Arginin (BMP2-S85R) konnte ein starkes Netz von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Asparaginsäure 34 und dem Lysin 35 von ActRII sowie der Glutaminsäure 83 vom BMP2 gebildet werden (41). Um den Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren auf die Bindungsaffinitäten der BMP2-Mutanten zu den BMP-Rezeptoren zu analysieren, wurden von der AG Prof. Dr. Sebald SPR-Messungen mit immobilisierten extrazellulären Domänen der BMP-Rezeptoren durchgeführt (Tab. 6.2).

**Tab. 6.2 Bindungsaffinitäten von BMP2 und den BMP2-Mutanten zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren**

Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen SPR-Messungen mit mindestens sechs unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen, die von der AG Prof. Dr. Sebald durchgeführt wurden. n. d. = nicht detektierbar; k. A. = keine Angaben

Ligand	K <sub>D</sub> [nM]					Referenz
	BMPRIA	BMPRIB	BMPRII	ActRII	ActRIIB	
<b>BMP2</b>	0,8	2,4	45	14	6,3	(44,45)
<b>BMP2-S85R/A86P</b>	1,3	k. A.	9,2	8,5	6,8	
<b>BMP2-L100K/N102D</b>	0,84	k. A.	42	2,9	2,7	

Die SPR-Messungen mit den immobilisierten BMP-Rezeptoren zeigten, dass sich die Affinität von BMP2-S85R/A86P zu BMPRII um den Faktor fünf und zu ActRII um den Faktor 1,6 erhöht (9, 10). Die Affinität zu ActRIIB wurde durch die Mutation nicht beeinflusst (Tab.6.2). Die Mutationen L100K und N102D stabilisieren die hochkonservierte Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen BMP2-S88 und ActRII/ActRIIB-L61 durch eine intramolekulare Salzbrücke und verstärken so die Bindung zu ActRII und ActRIIB. Die Bindung zu BMPRII wurde durch diese Mutationen nicht beeinflusst (42) (Tab. 6.2). Die Doppelmutante BMP2-

L100K/N102D bindet daher ActRII mit einer 5fach höheren und ActRIIB mit 2,3fach höheren Affinität als BMP2 Wildtyp. Die Bindung von BMP2-L100K/N102D zu BMPRII wurde nicht verändert (Tab. 6.2). Diese Affinitäten ähneln den Affinitäten des BMP6 zu ActRII und ActRIIB. BMP6 bindet ActRII mit sechsfach und den ActRIIB mit fünffach höherer Affinität als BMP2. Ein direkter Vergleich der SPR-Daten für die BMP2-Mutanten (Tab. 6.2) und BMP6 (Tab.6.3) ist jedoch nicht möglich. Zwar wurden die Affinitäten in beiden Fällen mit immobilisierten Rezeptoren bestimmt, jedoch gab es, wie die unterschiedlichen Messwerte für BMP2 zeigen, Unterschiede in der Versuchsdurchführung (17,42).

**Tab. 6.3 Affinitäten von BMP2 und BMP6 zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren**

Dargestellt sind die von Allendorph et al. (17) mittels SPR-Messung bestimmten Bindungsaffinitäten

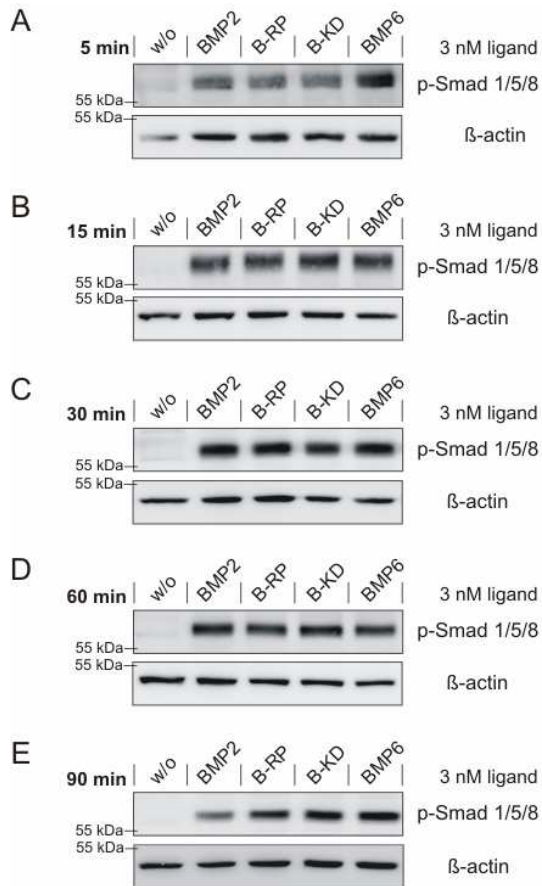
Ligand	K <sub>D</sub> [nM]			Referenz
	BMPRIA	ActRII	ActRIIB	
BMP2	2,61	47,5	36,1	(17)
BMP6	67,2	7,39	6,87	(17)

Auch die Mutanten BMP2-S85R und BMP2-L100K binden BMPRII oder ActRII/B mit höherer Affinität als BMP2 Wildtyp. Ihre biologische Aktivität wurde durch den BRE-abhängigen Reporter-gen-Test und durch Messen der ALP-Aktivität bestimmt (Daten nicht gezeigt). BMP2-S85R und BMP2-L100K induzierten eine mit BMP2 Wildtyp vergleichbare Reporter-gen-Aktivität. Ebenso konnten keine Unterschiede in der ALP-Aktivitätsmessung nach Stimulation von C2C12-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R oder BMP2-L100K beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in dieser Arbeit nur der Einfluss der Doppelmutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D auf die molekularen Mechanismen der Osteogenese im Vergleich zu BMP2 und BMP6 untersucht. Hierfür wurden C2C12-Zellen, die durch BMP2 Wildtyp zu Osteoblasten differenzieren können, und die Prä-Osteoblasten MC3T3-E1 mit den rekombinanten Proteinen BMP2, BMP2-S85R/A86P, BMP2-L100K/N102D oder BMP6 stimuliert. Neben Smad- und p38-MAPK-Phosphorylierung wurden auch die Differenzierung und Mineralisierung der C2C12- und MC3T3-E1-Zellen untersucht.

### **6.2.2. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Smad-abhängige Transkription**

BMP2 und BMP6 können an PFC, die aus Heterotetrameren der Typ I- und Typ II-Rezeptoren bestehen, binden und die Aktivierung von Smad 1/5/8 induzieren. Fraglich war,

wie sich die unterschiedlichen Affinitäten der BMP2-Mutanten zu den Typ II-Rezeptoren auf die Induktion des Smad-abhängigen Signalweges auswirkt. Daher wurde die C-terminale Smad-Phosphorylierung nach Behandlung von C2C12-Zellen mit den BMP2-Mutanten im Vergleich zum wildtypischen BMP2 und BMP6 analysiert (Abb. 6.9).

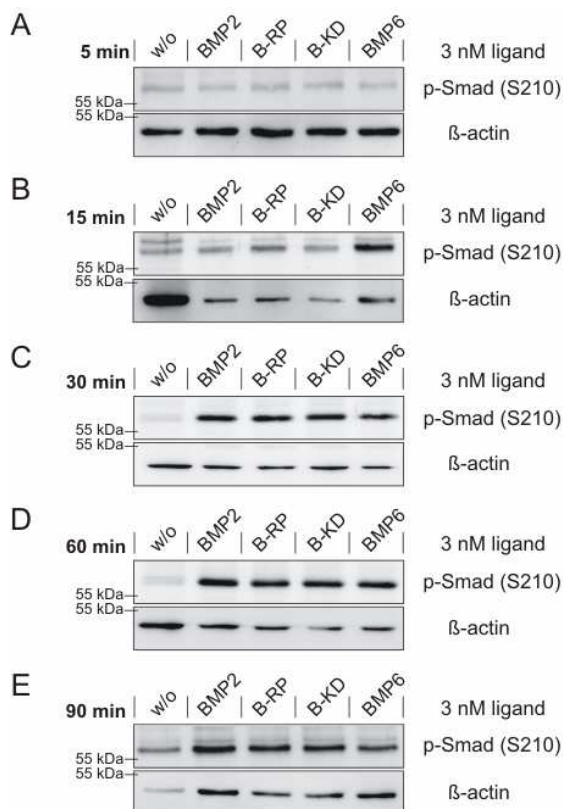


**Abb. 6.9 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzieren die C-terminale Smad-Phosphorylierung über einen längeren Zeitraum**

C2C12-Zellen wurden gehungert und A) 5, B) 15, C) 30, D) 60 oder E) 90 Minuten mit BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 Wildtyp inkubiert. Anschließend wurde die C-terminale Phosphorylierung von Smad 1/5/8 mittels Western Blotting und einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. β-Actin diente dabei als Ladekontrolle. BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD)

Bereits nach fünfminütiger Inkubation mit BMP6 konnte eine deutliche Zunahme der p-Smad-Konzentration detektiert werden. Auch BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzierten die Phosphorylierung der Smads. Der Anteil an phosphorylierten Smads war hier jedoch deutlich geringer als nach BMP6-Stimulation (Abb. 6.9 A). Nach 15 Minuten schien BMP2-L100K/N102D eine mit BMP6 vergleichbare p-Smad-Konzentration und eine geringfügig höhere p-Smad-Konzentration als BMP2 hervorzurufen (Abb. 6.9 B). Nach 30minütiger Inkubation konnten keine liganden-abhängigen Unterschiede der Smad-Phosphorylierung mehr detektiert werden. Erst nach 90minütiger Stimulation war zu

beobachten, dass die Konzentration der p-Smads nach BMP2-Stimulation abnahm, während sie nach Stimulation mit den BMP2-Mutanten und BMP6 unverändert hoch war (Abb. 6.9 E). Smads 1/5/8 werden nach der BMP-Stimulation sequentiell phosphoryliert. Nach BMP2-Stimulation phosphoryliert zuerst der BMP Typ I-Rezeptor Smad 1/5/8 am C-Terminus und aktiviert sie dadurch (80). Anschließend phosphorylieren MAP-Kinasen Smad 1/5/8 an den Serin-Resten S187, S196, S206 und S214 des Smad-Linkers (108,109). Daraufhin kann auch GSK3, die die Phosphorylierung der Smads durch die MAP-Kinasen als „Priming“ benötigt (105), Smad 1/5/8 an den benachbarten Serin-/Threonin-Resten S192, S/T202 und S210 phosphorylieren. Dies führt zur Markierung der Smads für Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau (105). Ob die Inkubation mit BMP2 Wildtyp einen schnelleren Abbau der p-Smads im Vergleich zu den Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D und BMP6 zur Folge hat, wurde mit Hilfe der Smad-Linker-Phosphorylierung am Serin-Rest 210 (p-Smad (S210)) untersucht (Abb. 6.10).



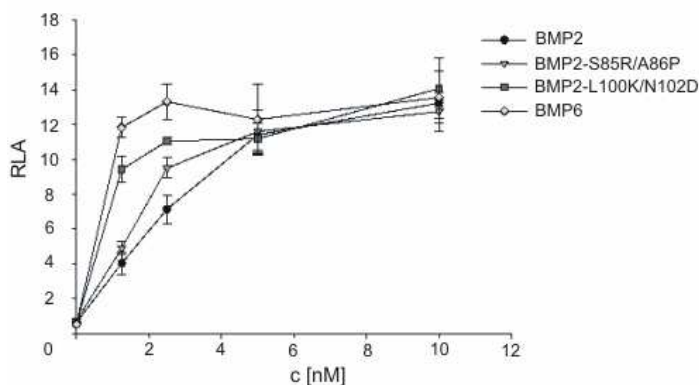
**Abb. 6.10 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzieren eine mit BMP2 Wildtyp vergleichbare Phosphorylierung des Smad-Linkers**

Nach A) 5, B) 15, C) 30, D) 60 oder E) 90 Minuten Stimulation von C2C12-Zellen mit BMP2, den BMP2-Mutanten oder BMP6 wurde die Smad-Linker-Phosphorylierung durch GSK3 am Serin-Rest 210 (p-Smad (S210)) durch einen spezifischen Antikörper (105) nachgewiesen.  $\beta$ -Actin diente dabei als Ladekontrolle. BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD)



Linker-phosphorylierte Smads konnten nach 15minütiger Stimulation mit BMP6 detektiert werden (Abb. 6.10 B). Nach 30minütiger Inkubation von C2C12-Zellen mit BMP2, BMP2-Mutanten oder BMP6 wurden keine liganden-abhängigen Unterschiede in der GSK3-vermittelten Smad-Phosphorylierung am Serin S210 beobachtet (Abb. 6.10 C). Das änderte sich auch nach 60- (Abb. 6.10 D) bzw. 90minütiger (Abb. 6.10 E) Stimulation nicht. BMP2 und die Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzieren im gleichen Zeitraum die Phosphorylierung des Smad-Linkers am S210. Unterschiede, die auf den proteasomalen Abbau der R-Smads nach 90minütiger BMP2-Stimulation hinweisen und damit die Abnahme der p-Smad-Konzentration im Vergleich zu den BMP2-Mutanten bedingen (Abb. 6.9), wurden nicht festgestellt.

Welchen Einfluss die verlängerte Aktivierung von Smad 1/5/8 nach Stimulation mit BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D im Vergleich zu BMP2 Wildtyp (Abb. 6.9) auf die Smad-abhängige Transkription hat, wurde im BRE-Reportergen-Test analysiert. Dazu wurden C2C12-Zellen mit Reportergen-Konstrukten, die die BRE-abhängige Firefly-Luciferase (BRE-Luc) sowie die konstitutiv aktive Renilla-Luciferase (RL-TK) exprimieren, transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit BMP2, BMP2-S85R/A86P, BMP2-L100K/N102D oder BMP6 stimuliert (Abb. 6. 11).



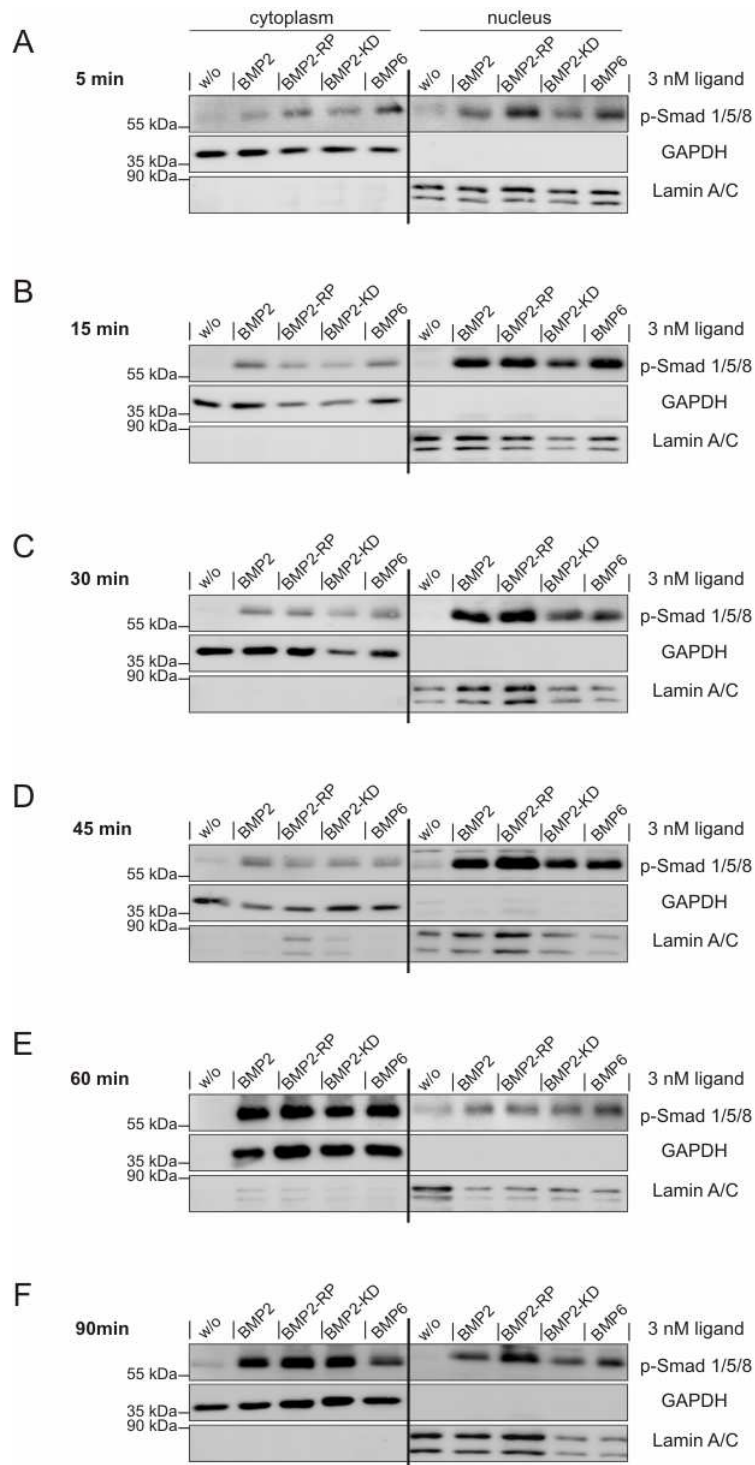
**Abb. 6.11 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Smad-abhängige Transkription**

Die Luciferase-Aktivitäten wurden nach Transfektion von C2C12-Zellen mit den Reportergen-Konstrukten BRE-Luc und RL-TK sowie Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P, BMP2-L100K/N102D oder BMP6 Wildtyp gemessen. Aus den Aktivitäten der Firefly- und Renilla-Luciferase wurden die relativen Luciferase-Aktivitäten (RLA) errechnet. Die Mittelwerte der RLAs  $\pm$  Standardabweichung der untersuchten Triplikate repräsentieren einen von drei vergleichbaren Versuchen.

In C2C12-Zellen nahmen die relativen Luciferase-Aktivitäten (RLA) konzentrationsabhängig bis zur Stimulation mit 5 nM Ligand zu. Dabei induzierte BMP2 die geringste Luciferase-Aktivität. Höhere Luciferase-Aktivitäten wurden durch die Stimulation mit BMP2-

S85R/A86P zu BMP2-L100K/N102D erreicht (Abb. 6.11). BMP6 löste die höchste Luciferase-Aktivität aus. Wurden die Zellen mit mehr als 5 nM Ligand stimuliert, war eine Sättigung erreicht, in der keine liganden-abhängigen Unterschiede mehr detektiert werden konnten (Abb. 6.11).

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die verlängerte Smad-Aktivierung innerhalb der ersten 90 Minuten nach Stimulation mit BMP2-S85R/A86P zu BMP2-L100K/N102D ausreicht, um diesen Expressions-Unterschied hervorzurufen, oder ob auch das Translokationsverhalten der Smads durch die BMP2-Mutanten beeinflusst wird. Deshalb wurden C2C12-Zellen für 5-90 Minuten mit BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in den zytoplasmatischen und den nukleären Anteil fraktioniert und mit Hilfe der Western-Blot-Analyse und spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 6.12).



**Abb. 6.12 BMP2-S85R/A86P fördert die Smad-Translokation in den Nukleus**

C2C12-Zellen wurden gehungert und für A) 5, B) 15, C) 30, D) 45, E) 60 oder F) 90 Minuten mit BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD) oder BMP6 inkubiert. Die C-terminale Phosphorylierung von Smad 1/5/8 wurde nach Auftrennung in Zytoplasma und Nucleus analysiert. GAPDH und Lamin dienten als Kontrolle für die Zellfraktionierung und als Ladekontrolle.

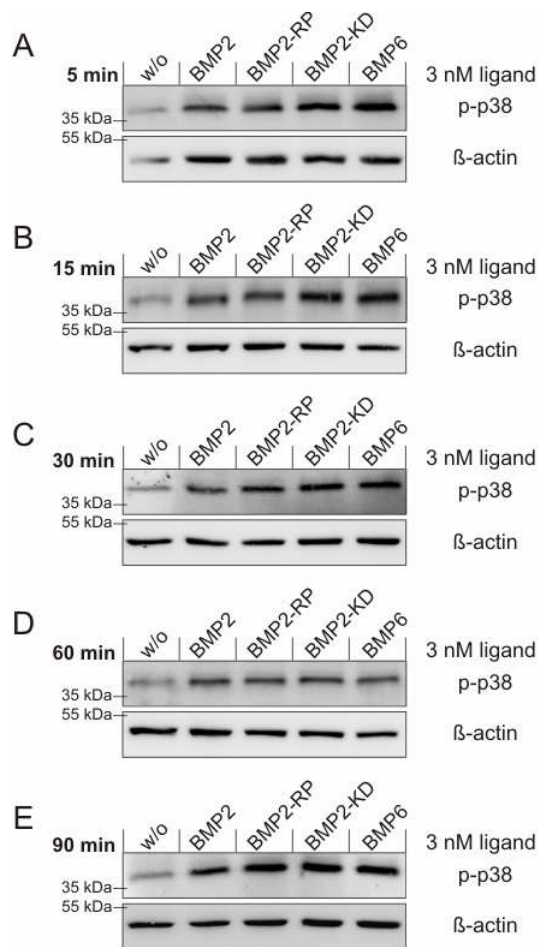
Nach 5 Minuten Stimulation mit 3 nM BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 konnten die C-terminal phosphorylierten Smads im Nukleus detektiert werden. Die Konzentration der nukleären p-Smads war in den mit BMP2-S85R/A86P stimulierten Zellen etwa doppelt so hoch wie in den mit BMP2 inkubierten Zellen und ähnelte dem nukleären Anteil der p-Smads in BMP6-stimulierten Zellen. Die durch BMP2-L100K/N102D induzierte nukleäre p-Smad-Konzentration war mit der nach BMP2-Stimulation vergleichbar (Abb. 6.12 A). Nach 15-90minütiger Stimulation mit BMP2 oder den BMP2-Mutanten waren keine Unterschiede der nukleären p-Smad-Konzentration festzustellen (6.12 B-F).

Der Vergleich mit den BMP2-stimulierten C2C12-Zellen zeigte, dass nach Stimulation mit bis zu 5 nM BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D die R-Smads über einen längeren Zeitraum aktiviert und höhere transkriptionelle Aktivitäten induziert wurden.

### **6.2.3. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D beschleunigen die Aktivierung der p38 MAPK**

Die Aktivierung von p38 MAPK als Teil eines „Non-Smad“-Signalweges erfolgt nach BMP2-Stimulation durch die Bildung des BISCs und den XIAP/TAB/TAK1-Komplex, der MKK-3/6 aktiviert.

BMP2-S85R/A86P, BMP2-L100K/N102D und BMP6 binden die Typ II-Rezeptoren mit höherer Affinität als BMP2 (Tab. 6.3). Ob sie deshalb die Rekrutierung der Typ II-Rezeptoren in den BISC erleichtern und die Phosphorylierung von p38 vorantreiben, wurde nach Stimulation von C2C12-Zellen mit 3 nM Ligand und anschließender Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 6.13).



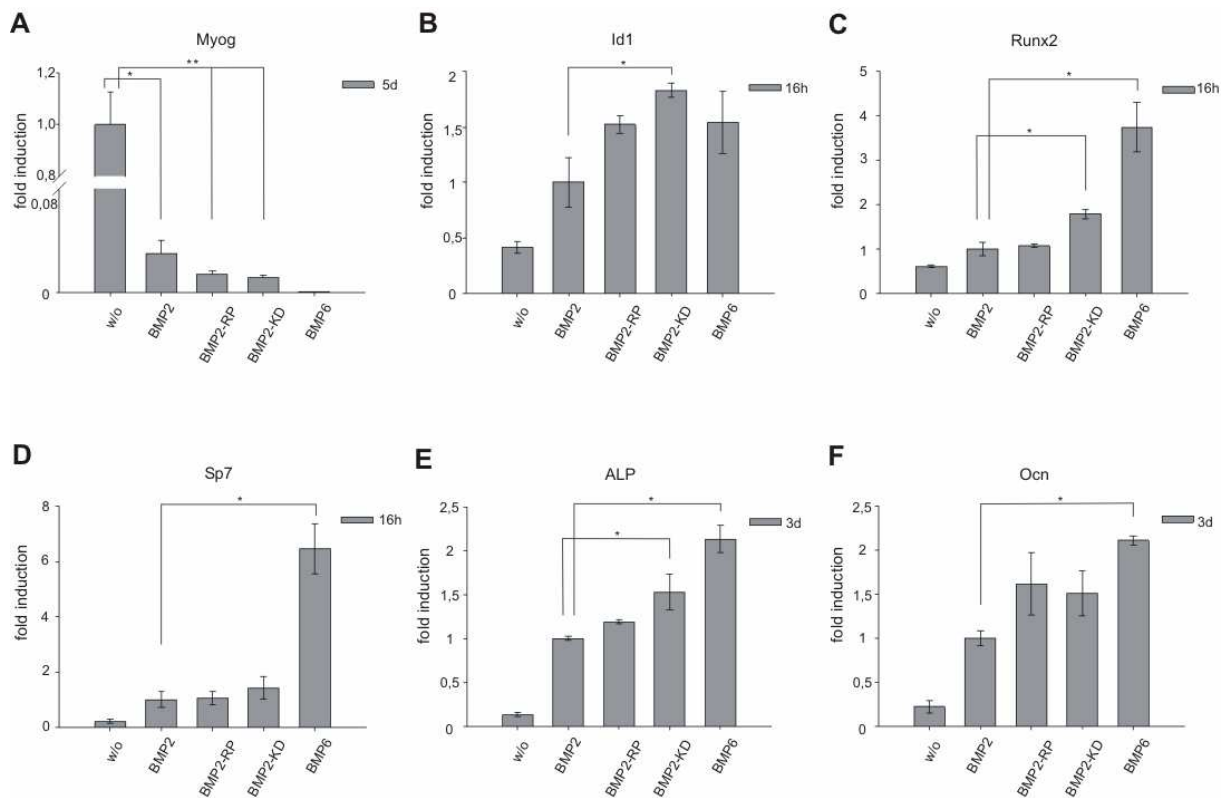
**Abb. 6.13 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Aktivierung von p38**

C2C12-Zellen wurden für A) 5, B) 15, C) 30, D) 60 oder E) 90 Minuten mit BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 inkubiert, bevor die Aktivierung von p38 nach Western Blotting mittels eines spezifischen Antikörper untersucht wurde. β-Actin diente dabei als Ladekontrolle. BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD)

BMP2-L100K/N102D und BMP6 induzierten bereits nach 5minütiger Inkubation eine höhere p-p38-Konzentration als BMP2 Wildtyp (Abb. 6.13 A). Eine vergleichbare p-p38-Konzentration wurde von BMP2-S85R/A86P erst nach 30minütiger Stimulation erreicht (Abb. 6.13 C). Nach 60minütiger Stimulation waren keine Unterschiede feststellbar (Abb. 6.12 D). Nach 90 Minuten nahm die p-p38-Konzentration in den mit BMP2-S85R/A86P, BMP2-L100K/N102D und BMP6 stimulierten Zellen im Vergleich zu BMP2 Wildtyp geringfügig zu (Abb. 6.12 E). Festzuhalten ist, dass BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D die Aktivierung von p38 MAPK über einen längeren Zeitraum stimulierten. Zusätzlich konnte im Vergleich zu BMP2 Wildtyp eine frühere p38-Aktivierung durch BMP2-L100K/N102D beobachtet werden.

## 6.2.4. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen

BMP2 induziert die Transdifferenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten. Durch die Stimulation mit BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D konnte im Vergleich zum BMP2 die BMP2-abhängigen Signalwege über einen längeren Zeitraum aktiviert und eine höhere transkriptionelle Aktivität erzielt werden. Allerdings waren die beobachteten Unterschiede gering. Wie sich die Mutationen des BMP2 auf die liganden-vermittelte Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten auswirken, wurde durch die Expression von verschiedenen Markergenen nach Stimulation mit BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 mittels qPCR untersucht (Abb. 6. 14).

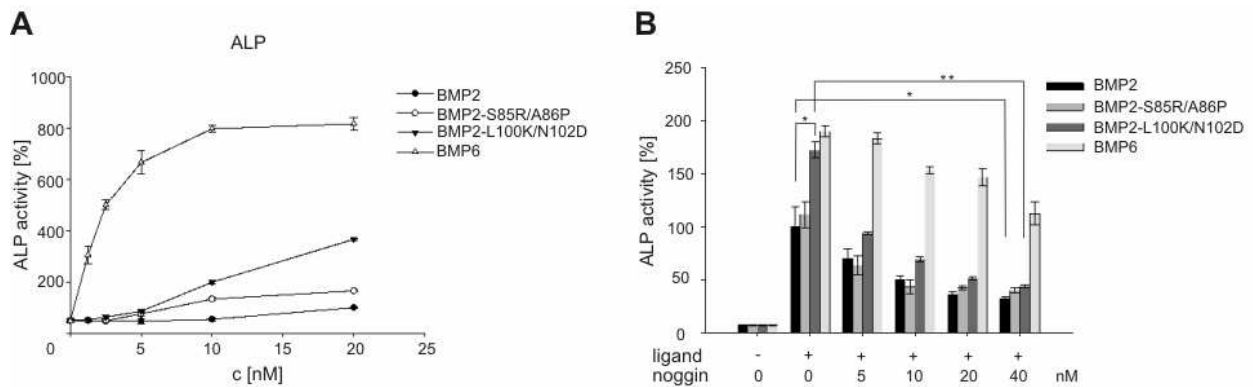


**Abb. 6.14 BMP2-L100K/N102D fördert die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten**

A)-F) C2C12-Zellen wurden mit 1 nM BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD) oder BMP6 inkubiert. Anschließend wurde die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Der jeweilige mRNA-Gehalt an A) *Myog*, B) *Id1*, C) *Runx2*, D) *Sp7*, E) *ALP* und F) *Ocn* wurde mittels qPCR untersucht. Die errechneten MNE-Werte (vgl.3.2.3.) wurden auf A) die unstimulierten oder B)-F) die BMP2-stimulierten Zellen normiert. Die Resultate geben die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate eines von zwei vergleichbaren Versuchen wieder. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ )

Die Expression von Myogenin (*Myog*) als Markergen für die Myogenese war im Vergleich zu den in Serum-reduzierten Medium kultivierten C2C12-Zellen nach Stimulation mit den Mutanten um den Faktor 100 und im Vergleich zu den BMP2-stimulierten Zellen um den Faktor 2 reduziert (Abb. 6.14 A). Hiermit konform ist die Beobachtung, dass die mRNA-Expression von *Id1*, einem Myogenese-Inhibitor, nach BMP2-S85R/A86P-Stimulation um den Faktor 1,5 und nach BMP2-L100K/N102D-Stimulation um den Faktor 1,8 erhöht war (Abb. 6.14 B).

*Runx 2* sowie ALP werden in hypertrophen Chondrozyten und Osteoblasten exprimiert (223,224,232). Im Gegensatz dazu werden *Osterix (Sp7)* sowie Osteocalcin nur in Osteoblasten exprimiert und gelten daher als Osteoblast-spezifische Marker (220,253). BMP2 und BMP2-S85R/A86P induzierten eine vergleichbare *Runx2*-mRNA-Expression, während nach Stimulation mit BMP2-L100K/N102D eine mäßig gesteigerte (1,8fach) *Runx2*-Transkription detektiert wurde (Abb. 6.14 C). Bei der Expression von *Osterix (Sp7)* wurden nach Stimulation mit BMP2 Wildtyp oder den BMP2-Mutanten keine Unterschiede beobachtet (Abb. 6.14 D). BMP2-S85R/A86P, das nur BMPRII stärker als BMP2 Wildtyp bindet, induzierte eine mit BMP2 vergleichbare *ALP*- und eine geringfügig höhere *Ocn*-mRNA-Konzentration (1,6fach) als der Wildtyp (Abb. 6.14 E, F). In den BMP2-L100K/N102D-behandelten Zellen war die mRNA-Konzentrationen von *ALP* und *Ocn* im Vergleich zu BMP2 Wildtyp ebenfalls geringfügig (1,5fach) erhöht (Abb. 6.14 E, F). Am effektivsten trieb BMP6 die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten voran. Im Vergleich zu BMP2 wurden in den mit BMP6 stimulierten Zellen signifikant erhöhte Konzentrationen an *Runx2*-, *Sp7*-, *ALP*- und *Ocn*-mRNA detektiert (Abb. 6.14 C-F). Auch auf Proteinebene induzierte BMP6 im Vergleich zu BMP2 und den BMP2-Mutanten eine vielfach höhere ALP-Expression, die indirekt durch Messung der ALP-Aktivität festgestellt wurde (Abb. 6.15 A).



**Abb. 6.15 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D sind durch Noggin-inhibierbare Super-Agonisten**

A) C2C12-Zellen wurden drei Tage mit ansteigenden Konzentrationen BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 inkubiert, bevor die ALP-Aktivität der Zellen gemessen wurde. Die jeweiligen ALP-Aktivitäten wurden auf die Aktivität, die durch 20 nM BMP2 ausgelöst wurde (100%), normiert. Die hier dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung wurden aus Triplikaten errechnet und repräsentieren einen von zwei vergleichbaren Versuchen. B) C2C12-Zellen wurden drei Tage mit 5 nM mit BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D oder 0,5 nM BMP6 und ansteigenden Noggin-Konzentrationen inkubiert. Die dargestellten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung wurden aus Triplikaten ermittelt und spiegeln einen von zwei vergleichbaren Versuchen wider (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ ).

Nach Stimulation mit 10-20 nM BMP2-S85R/A86P war die ALP-Aktivität fast doppelt so hoch wie die gemessene Aktivität der Wildtyp-stimulierten Zellen (Abb. 6.15 A). Noch effektiver wurde die osteoblastäre Differenzierung von C2C12-Zellen durch BMP2-L100K/N102D gefördert. Im Vergleich zu den BMP2 Wildtyp-behandelten Zellen war die ALP-Aktivität der mit 10-20 nM BMP2-L100K/N102D stimulierten Zellen etwa viermal so hoch (Abb. 6.15 A). Demzufolge fördern BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D die osteoblastäre Differenzierung von C2C12-Zellen signifikant stärker als BMP2 Wildtyp.

Unklar war, wie sich die Mutationen BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D auf die Interaktion mit Noggin auswirken. Um den Einfluss von Noggin auf die biologische Aktivität von BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D zu untersuchen, wurden C2C12-Zellen mit 5 nM BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D sowie 0,5 nM BMP6 und ansteigenden Noggin-Konzentrationen inkubiert (Abb. 6.15 B). Dabei reduzierte ein zweifacher molarer Überschuss an Noggin (10 nM) die von BMP2, BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D ausgelösten ALP-Aktivitäten um 50 %. Die durch 0,5 nM BMP6 ausgelöste ALP-Aktivität hingegen wurde erst in Gegenwart von 40 nM Noggin (einem 80fachen molaren Überschuss), um etwa 40 % inhibiert. Dieses Ergebnis bestätigte die bereits beschriebene Noggin-Resistenz von BMP6 (238).

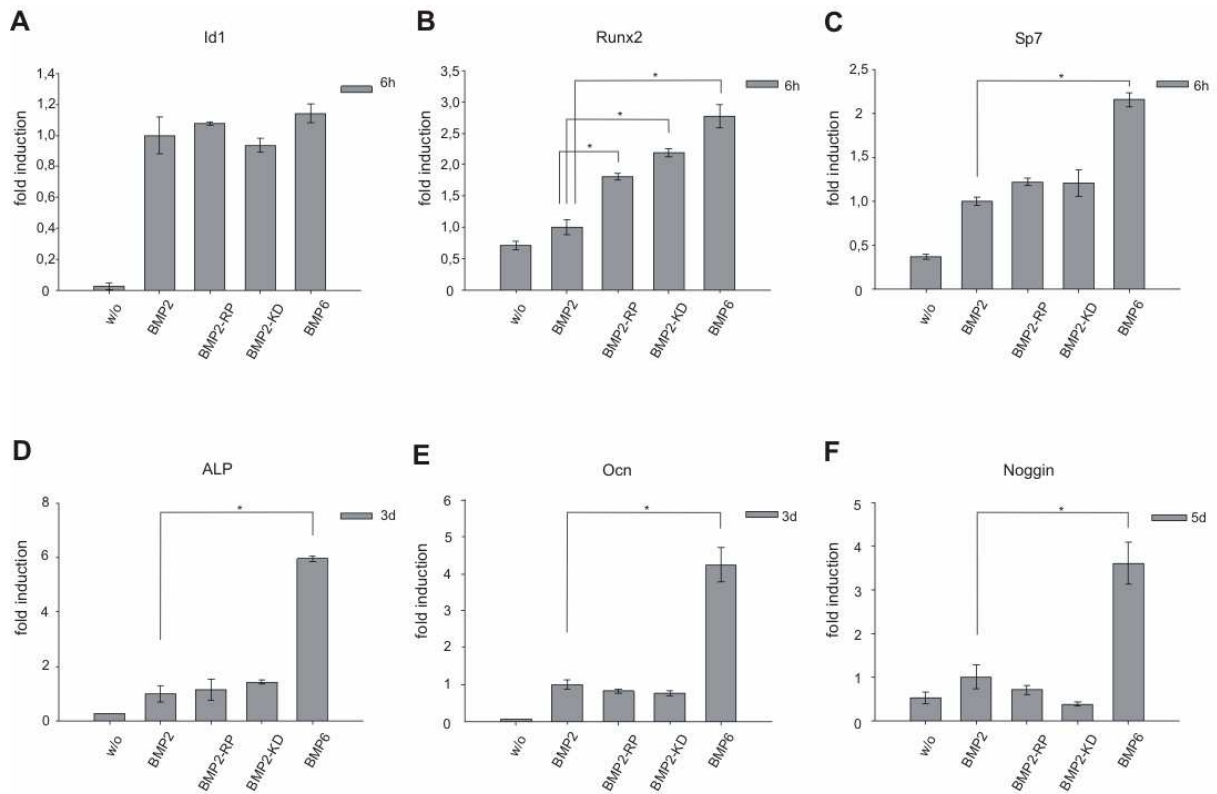
Insgesamt förderten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D die osteoblastäre Differenzierung der C2C12-Zellen stärker als BMP2 Wildtyp. Dabei war BMP2-L100K/N102D durch die verstärkte Bindung an ActRII und ActRIIB effektiver als BMP2-



S85R/A86P, das BMPRII mit höherer Affinität bindet. Die Mutationen BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D hatten keinen Einfluss auf die Inhibierung durch den BMP/GDF-Antagonisten Noggin.

### **6.2.5. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen**

MC3T3-E1-Zellen sind Prä-Osteoblasten aus der Calvaria der Maus, die in Gegenwart von 50µg/ml Ascorbinsäure und 5 mM  $\beta$ -Glycerophosphat zu Osteoblasten differenzieren. Sie erwiesen sich bei der Untersuchung des Smad- und des „Non-Smad“-Signalweges als stark BMP-responsiv, so dass bereits nach Stimulation mit 1 nM BMP2, BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D keine Unterschiede in der Phosphorylierung von Smad 1/5/8 oder p38 MAPK sowie der ALP-Aktivität festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden MC3T3-E1-Zellen mit BMP2 Wildtyp, BMP2-S85R/A86P, BMP2-L100K/N102D oder BMP6 inkubiert, um den Einfluss der Mutanten auf die Differenzierung zu Osteoblasten zu untersuchen. Die Expression von Osteoblast-spezifischen Markergenen wurde mittels qPCR analysiert (Abb. 6.16).



**Abb. 6.16 Analyse der osteoblast-spezifischen Markergene in MC3T3-E1-Zellen**

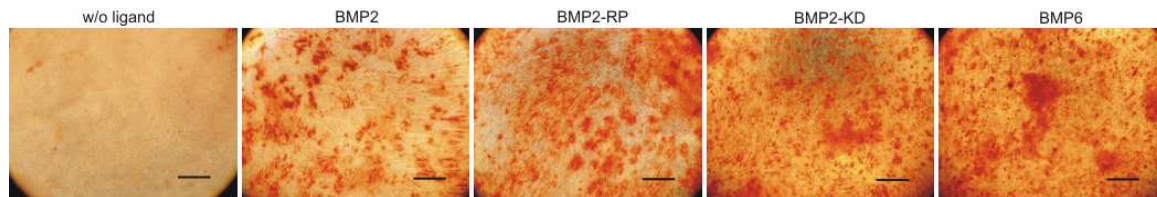
A)-F) MC3T3-E1-Zellen wurden mit 1 nM BMP2, BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD) oder BMP6 inkubiert. Die Expression von A) *Id1*, B) *Runx2*, C) *Sp7*, D) *ALP*-, E) *Ocn*- und F) *Noggin* wurde mittels qPCR untersucht. Die errechneten MNE-Werte (vgl.3.2.3.) wurden auf die der BMP2-stimulierten Zellen normiert. Die Resultate geben die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Triplikate eines von zwei vergleichbaren Versuchen wieder. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ;  $n = 3$ ).

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass nur geringe Unterschiede zwischen den BMP2-, BMP2-S85R/A86P- oder BMP2-L100K/N102D-stimulierten Zellen detektiert wurden. MC3T3-E1-Zellen, die mit BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D stimuliert wurden, zeigten auf mRNA-Ebene eine mit BMP2 vergleichbare Induktion von *Id1* (Abb. 6.16 A). Der Transkriptionsfaktor *Runx2* ist der „Schlüssel-Regulator“ der Osteogenese (254). BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzierten eine doppelt so hohe *Runx2*-mRNA-Konzentration wie BMP2 Wildtyp (Abb. 6.16 B). Die Expression der Osteoblast-spezifischen Marker *Sp7* und *Ocn* wurde durch BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im Vergleich zum wildtypischen BMP2 nicht beeinflusst (Abb. 6.16 C, E). Die *ALP*-Expression war nach Stimulation mit BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im Vergleich zum Wildtyp geringfügig (1,4fach) erhöht (Abb. 6.16 D). Die höchste mRNA-Konzentration an osteoblastären Markern (*Runx2*, *Sp7*, *ALP* und *Ocn*) wurden durch BMP6-Stimulation hervorgerufen (Abb. 6.16 B-E).

Auffällig war, dass die *Noggin*-Expression nach BMP2-S85R/A86P-Stimulation um das 1,4fache und nach BMP2-L100K/N102D-Stimulation um das 2,5fache geringer war als in den

BMP2-behandelten Zellen (Abb. 6.16 F). Im Gegensatz dazu wurde die Noggin-Expression durch die Stimulation mit BMP6 um das 3,6fache erhöht.

Um die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach Stimulation mit BMP2 Wildtyp, den BMP2-Mutanten oder BMP6 mit Alizarin Red gefärbt (Abb. 6.17). Durch den Farbstoff Alizarin Red werden Calcium-Ablagerungen und dadurch indirekt die Mineralisierung der Zellen nachgewiesen.



**Abb. 6.17 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D treiben die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen voran**

MC3T3-E1-Zellen wurden sieben Tage mit 10 nM BMP2, BMP2-S85R/A86P (BMP2-RP), BMP2-L100K/N102D (BMP2-KD) oder BMP6 stimuliert. Anschließend wurde der Mineralisierungsgrad mittels Alizarin Red-Färbung nachgewiesen. Die Bilder repräsentieren ein Ergebnis von zwei vergleichbaren Versuchen. Die Referenzmarkierung entspricht etwa 300 µm.

Die Alizarin Red-Färbung zeigte, dass die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen von BMP2 über BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D zu BMP6 zunahm (Abb. 6.17). Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch für C2C12-Zellen erhalten (Daten nicht gezeigt), die jedoch als Prä-Myoblasten weniger gut mineralisierten. Demzufolge förderten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D nicht nur die Differenzierung zu Osteoblasten, sondern beschleunigten auch ihr Mineralisierungspotential. Dabei waren BMP2-L100K/N102D und BMP6 mit höherer Affinität zu ActRII und ActRIIB am effektivsten.

## 7. Diskussion: Mutationen des *BMP2*

„Bone morphogenetic proteins“ (BMPs) gehören zur TGF $\beta$ -Superfamilie. Sie sind an zahlreichen Prozessen während der Embryogenese, aber auch postnatal an der Entwicklung und dem Erhalt von Geweben und Organen beteiligt (3,5,6). Namensgebend war die Entdeckung von Marshall Urist, dass BMPs die ektopische Knochenbildung induzieren (1). Daraufhin wurde die Bedeutung einzelner BMPs in der Chondrogenese und Osteogenese untersucht. BMP2 und BMP6 werden in mesenchymalen Stammzellen und in hypertrophen Chondrozyten exprimiert, wo sie die Differenzierung zu Osteoblasten fördern (150). Trotzdem verursacht der „knock out“ von *BMP6* sowie der konditionelle „knock out“ von *BMP2*, *BMP4* oder *BMP7* in den Extremitätenknospen nur geringe Verzögerungen bei der Ossifikation und hatte keine dauerhaften Folgen für die Skelettogenese (250,255). Erst durch den konditionellen „knock out“ mehrerer BMPs wie z.B. *BMP2*<sup>-/-</sup>/*BMP7*<sup>-/-</sup> wurde eine Reduktion der Osteoblastogenese erreicht, während die Osteoklastogenese unverändert war (255). Demnach kann das Fehlen von BMP2, BMP4 oder BMP7 durch die anderen BMPs kompensiert werden. Stärker noch als die BMP-Homodimere fördern die Heterodimere BMP2/BMP6 oder BMP2/BMP7 die Differenzierung zu Osteoblasten und somit die Skelettbildung (11-14).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene BMP2-Mutanten charakterisiert. Sie binden entweder nicht mehr an BMPRI oder wie BMP6 die Typ II-Rezeptoren mit höherer Affinität. Wie die veränderten Bindungsaffinitäten zwischen BMP2-Mutanten und BMP-Rezeptoren die Aktivierung der BMP-vermittelten Signalwege und das osteogene Potential der BMP2-Mutanten beeinflussen, wurde hier im Vergleich zu wildtypischem BMP2 und BMP6 untersucht. Das langfristige Ziel dieser Untersuchungen ist die Herstellung von Wachstumsfaktoren, die z.B. auf inerte Oberflächen aufgebracht und gezielt zur Behandlung komplizierter Brüche oder anderer regenerativer Therapien eingesetzt werden können.

## **7.1. Einfluss der Rezeptor-Bindungsaffinitäten auf die BMP2-abhängige Signaltransduktion**

### **7.1.1. Der Bindungsverlust zu BMPRI durch die Mutation BMP2-L51P verhindert die Aktivierung der BMP2-abhängigen Signalwege**

BMP2 kann entweder an den aus BMPRIA/B und BMP-Typ-II-Rezeptoren bestehenden präformierten Komplex (PFC) binden und den Smad-abhängigen Signalweg aktivieren. Oder es bindet mit hoher Affinität an BMPRI und rekrutiert dann die Typ-II-Rezeptoren BMPRII, ActRII oder ActRIIB in den BMP-induzierten Signalkomplex (BISC), um die „Non-Smad“-Signalwege zu stimulieren (46).

Im Vergleich zum BMP2 bindet BMP2-L51P BMPRI nicht mehr, während die Affinität zu den Typ II-Rezeptoren durch die Mutation nicht beeinflusst wurde (Tab. 6.1). Die Behandlung von C2C12-Zellen mit BMP2-L51P zeigte, dass ohne die Bindung an BMPRI weder die Smad- noch „Non-Smad“-Signalwege aktiviert werden können (Abb 6.3, 6.5). Die unveränderte Affinität des BMP2-L51P zu den Typ II-Rezeptoren allein reicht nicht aus, um die Typ-II-Rezeptoren im PFC zu binden und die Phosphorylierung von BMPRI und von Smad 1/5/8 zu induzieren (Abb. 6.3). Im Gegensatz zur GDF5-Mutante GDF5-L60P (vgl. Kapitel 4) konnte der Bindungsverlust von BMP2-L51P zu BMPRI nicht durch die Überexpression des BMPRIIB kompensiert werden. Wie die Dissoziationskonstanten zeigen, ist die Bindung von GDF5-L60P an BMPRIIB ( $K_D = 42,3 \text{ nM}$ ) schwach, aber vorhanden. Die Bindung von BMP2-L51P an den BMPRIIB ( $K_D = 4000 \text{ nM}$ ) konnte kaum detektiert werden. Infolgedessen konnte der Bindungsverlust des GDF5-L60P zu BMPRIIB durch die BMPRIIB-Überexpression kompensiert werden, während nach BMPRIIB-Überexpression und BMP2-L51P-Stimulation keine Induktion des Smad-abhängigen Weges nachgewiesen werden konnte (Abb. 6.4).

Durch zusätzliche Mutationen im „knuckle“-Epitop wurde die Affinität der BMP2-L51P/S85R/A86P-Mutante zu BMPRII um das Fünffache erhöht. Dadurch wurde eine geringe Induktion des Smad-abhängigen Weges trotz fehlendem Kontakt zu BMPRI möglich: Im Reporter-gen-Versuch erzielte die Inkubation mit BMP2-L51P/S85R/A86P in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration 10-20% der Reporter-gen-Aktivität, die durch die gleiche BMP2-Konzentration ausgelöst wurde (Abb. 6.3). Diese Beobachtung verdeutlicht, dass nicht nur BMPRI (43), sondern bei erhöhter Typ II-Rezeptor-Affinität des Liganden auch die Typ II-Rezeptoren als membranständige Anker für die Bindung des Liganden an den BMP-Rezeptor-Komplex dienen können. Trotzdem wurde weder durch die

Überexpression des BMPRII noch durch die stärkere Bindung der BMP2-L51P/S85R/A86P-Mutante an BMPRII eine mit dem BMP2 Wildtyp vergleichbare transkriptionelle Aktivität induziert. Für eine effektive Aktivierung der Smad-abhängigen Transkription ist daher die Bindung des BMP2 an BMPRII nach wie vor unbedingt nötig.

Im Gegensatz zur Smad-abhängigen Signaltransduktion konnte weder BMP2-L51P noch BMP2-L51P/S85R/A86P die p38 MAPK-Signalkaskade aktivieren (Abb. 6.5). Dies bestätigt, dass ohne die Bindung des Liganden an BMPRII die Rekrutierung der Typ II-Rezeptoren in den BISC nicht möglich ist. Folglich bleibt die von Nohe et al. beschriebene Aktivierung von p38 MAPK als Teil des „Non-Smad“-Signalweges aus (46).

### **7.1.2. Die verstärkte Interaktion von BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D mit den Typ II-Rezeptoren fördert die BMP2-abhängige Signaltransduktion**

BMP2 und BMP6 gehören zu unterschiedlichen Subgruppen der BMP-Familie. BMP2 und BMP4 binden die Typ I-Rezeptoren BMPRIA/B hochaffin und die Typ II-Rezeptoren (ActRII, ActRIIB und BMPRII) mit geringerer Affinität. Im Gegensatz dazu binden BMP6 und BMP7 die Typ II-Rezeptoren mit höherer Affinität. Außerdem können BMP6 und BMP7 mit geringer Affinität auch ActRI binden (41,43).

Die Bindungsaffinitäten werden aus dem Assoziations- und Dissoziationsverhalten von Ligand und Rezeptor errechnet. BMP2 bindet hochaffin an BMPRII, indem BMPRII langsam mit BMP2 assoziiert und auch langsam davon dissoziiert (43). Im Gegensatz dazu assoziieren die Typ II-Rezeptoren schnell mit dem Liganden, aber dissoziieren ebenso schnell. Demzufolge ist die Interaktion zwischen BMP2 und den Typ II-Rezeptoren der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes und der BMP2-abhängigen Signaltransduktion (43).

Durch die Mutationen BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im „knuckle“-Epitop des BMP2 wird die Ligand-Rezeptor-Interaktion durch zusätzliche Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert (42). Dadurch erhöhen sich die Bindungsaffinitäten zu den Typ II-Rezeptoren und nähern sich denen von BMP6 an (Tab. 6.2). BMP2-S85R/A86P bindet BMPRII mit 6fach höherer Affinität als BMP2 Wildtyp, während BMP2-L100K/N102D ActRII mit 5fach und ActRIIB mit 2,3fach höherer Affinität als BMP2 bindet (Tab. 6.2).

Durch die Stimulation von Zellen mit BMP2-L51P/S85R/A86P konnte bereits gezeigt werden (vgl. Abschnitte 6.1, 7.1.1), dass die erhöhte Affinität zu den Typ II-Rezeptoren die Bindung an die präformierten Rezeptor-Komplexe (PFCs) erleichtert. Im Gegensatz zu BMP2-L51P/S85R/A86P binden BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D unverändert an BMPRI und an die Typ II-Rezeptoren mit höherer Affinität als BMP2. Dadurch können BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D wahrscheinlich länger als BMP2 mit den PFCs in Kontakt bleiben. Sie können deshalb die Phosphorylierung von Smad 1/5/8 über einen längeren Zeitraum (Abb. 6.9) sowie eine höhere Smad-abhängige Reporter-gen-Aktivität (Abb. 6.11) als nach BMP2-Stimulation induzieren. Ein vergleichbares Verhalten konnte bei BMP6-Stimulation beobachtet werden.

Entsprechend dem publizierten Modell der BMP2-induzierten Signalkomplexbildung sollte die erhöhte Typ II Rezeptor-Affinität von BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D eine größere Bedeutung für die Rekrutierung der Typ II-Rezeptoren in den BISC und die Aktivierung der „Non-Smad“-Signalwege haben (46). In C2C12-Zellen lösten die Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D ebenso wie BMP6 die Phosphorylierung von p38 MAPK über einen längeren Zeitraum als BMP2 aus (Abb. 6.13). Daher wird vermutet, dass durch die höhere Affinität von BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D zu den Typ II-Rezeptoren die Rekrutierung der Typ II-Rezeptoren in den BISC erleichtert wird und der BISC über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden kann. Das könnte die Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Proteine wie den XIAP/TAB/TAK1-Komplex erleichtern. Der XIAP/TAB/TAK1-Komplex bindet nach BMP2-Stimulation an die BMP-Rezeptoren. Daraufhin kann TAK1 die „Non-Smad“-Signalwege aktivieren oder wie BMPRI die Smad-Proteine am C-Terminus phosphorylieren und so gleichfalls zu Erhöhung der p-Smad-Levels (104) beitragen. Inwieweit TAK1 nach Stimulation mit BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D zur Phosphorylierung von Smad 1/5/8 über einen längeren Zeitraum (Abb. 6.9) beiträgt, könnte durch den „knock down“ der TAK1 analysiert werden.

## **7.2. Die verstärkte Interaktion der BMP2-Mutanten mit den Typ II-Rezeptoren fördert die Differenzierung**

Als Folge der BMP2-Rezeptor-Interaktion werden die Smad- sowie die „Non-Smad“-Signalwege aktiviert. Obwohl die Aktivierung dieser Signalwege durch unterschiedliche Rezeptorkomplexe erfolgt, können sich die Signalkaskaden, wie die Aktivierung des

XIAP/TAB/TAK1-Komplexes und die Smad-Linker-Phosphorylierung zeigen, gegenseitig beeinflussen. Nach Bindung des BMP2 an die PFCs wird einerseits Smad 1/5/8 durch den BMPRI am C-Terminus im „SSXS“-Motiv phosphoryliert und der Smad-abhängige Signalweg induziert (80). Andererseits wird nach Bildung des BISC TAK1 im Rezeptor-assoziierten XIAP/TAB/TAK1-Komplex aktiviert (73). TAK1 kann daraufhin wie der BMPRI Smad 1/5/8 am C-Terminus im „SSXS“-Motiv phosphorylieren und somit den Smad-abhängigen Weg aktivieren. Außerdem induziert TAK1 den MKK4-JNK- und den MKK3/6-p38-Signalweg, die zu den „Non-Smad“-Signalwegen gezählt werden. Die MAP-Kinasen ERK, p38 und JNK können die aktivierten Smads 1/5/8 in der Smad-Linker-Region phosphorylieren und so die Smad-Translokation in den Nukleus inhibieren (106). p38 kann außerdem Transkriptionsfaktoren wie Runx2 phosphorylieren und so deren Aktivität erhöhen (102,112). Eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität wurde auch festgestellt, wenn Smad 1/5/8 und Runx2 gemeinsam, in einem Transkriptionskomplex die Transkription der Zielgene induzierten (256). Diese Beispiele zeigen, dass Smad-abhängige und „Non-Smad“-Signalwege einander und auch die Transkription der Zielgene beeinflussen. Demzufolge wird auch die Differenzierung von Zellen durch Smad-abhängige und „Non-Smad“-Wege reguliert.

Die Mutanten BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P binden nicht an BMPRI und konnten deshalb nicht den p38 MAPK-Signalweg induzieren (Abb. 6.5). Durch die stärkere Bindung an BMPRII konnte BMP2-L51P/S85R/A86P in Abhängigkeit von der Liganden-Konzentration eine im Vergleich zum Wildtyp geringe (bis zu 20%) Smad-abhängige Transkription auslösen (Abb. 6.3). Das reichte jedoch nicht aus, um die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben zu inhibieren (Abb. 6.6, 6.7) oder, wie die fehlende Induktion der ALP-Aktivität zeigt, eine Konversion zu Osteoblasten zu induzieren (Abb. 6.6, 6.7). Folglich ist die unveränderte Bindung an BMPRI und die Typ II-Rezeptoren erforderlich, um eine BMP2-abhängige Differenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten auszulösen.

Im Vergleich zum Serum-reduziertem Medium steigerte die BMP2-L51P-Mutante die Myogenese von C2C12-Zellen (Abb. 6.6 und 6.7). Die BMP2-L51P-Mutante bindet dabei vermutlich an die BMP Typ II-Rezeptoren, ohne die BMP-abhängigen Signalwege zu induzieren. Dadurch verhindert BMP2-L51P wahrscheinlich, dass sekretierte BMPs oder BMPs aus dem Serum-reduziertem Medium (mit 0,5% FCS) an die BMP-Rezeptoren binden und so die myogene Differenzierung von C2C12-Zellen inhibieren können. Des Weiteren konnte von Keller et al. gezeigt werden, dass die Inhibierung von BMP2 durch Noggin nach Zugabe von BMP2-L51P konzentrationsabhängig neutralisiert werden konnte (44).



Demzufolge ist die BMP2-L51P-Mutante nicht nur ein „Noggin-Blocker“ (44), sondern ein „Pseudo-BMP2“.

Die Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D binden unverändert an BMPRI und mit erhöhter Affinität an die Typ II-Rezeptoren. Beide Mutanten aktivierten die Smad-Kaskade (Abb. 6.9) und p38-MAPK (Abb. 6.13) über einen längeren Zeitraum hinweg als BMP2 Wildtyp und induzieren in niedrigen Konzentrationen (bis 5 nM) eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität (Abb. 6.11). Dadurch wurde im Vergleich zu BMP2 eine höhere Expression des BMP2-Zielgens *Id1* induziert (Abb. 6.14 B). Durch die Interaktion von *Id1* mit dem bHLH Transkriptionsfaktor MyoD wird die MyoD-DNA-Interaktion und damit die Myogenese inhibiert (222,239). Während der Differenzierung von Myoblasten zu Muskelfasern wird Myogenin exprimiert, das für die Bildung von multinukleären Myotuben und Muskelfasern nötig ist (257). Da die Stimulation mit BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D die Expression von *Id1* erhöht und so die Myogenese inhibiert, war die Expression von *Myog* nach Inkubation mit BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D geringer als in den BMP2-stimulierten Zellen. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D inhibieren demnach die Myogenese noch stärker als der Wildtyp und fördern, wie die Expressionsanalyse von *ALP*- und *Ocn-mRNA* zeigte (Abb. 6.14 E, F), die Transdifferenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten.

Eine höhere Expression der osteogenen Marker *Runx2*, *Sp7*, *ALP* und *Ocn* war nach Stimulation der C2C12-Zellen mit BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D aufgrund der längeren Aktivierung der R-Smads 1/5/8 und der p38 MAPK auch erwartet worden. Die Unterschiede auf mRNA-Ebene waren jedoch gering. BMP2-S85R/A86P induzierte in C2C12-Zellen eine mit den BMP2-stimulierten Zellen vergleichbare mRNA-Konzentration von *Runx2*, *Sp7* und *ALP*, aber eine geringfügig höhere (1,6fach) *Ocn*-mRNA-Konzentration. BMP2-L100K/N102D löste ebenfalls nur eine leicht höhere mRNA-Konzentration von *Runx2* (1,8fach), *ALP* (1,5fach) und *Ocn* (1,5fach) aus. Höhere Expressionslevel wurden nur durch Stimulation mit BMP6 erzielt: *Runx2* (3,8fach), *Sp7* (6,5fach), *ALP* (2fach) und *Ocn* (2fach) (Abb. 6.14). Deutlicher waren die Unterschiede auf Proteinebene, bei der Messung der ALP-Aktivität als indirekter Nachweis für die ALP-Expression und der osteoblastären Differenzierung. In Abhängigkeit von der Konzentration induzierte BMP2-S85R/A86P eine doppelt so hohe und BMP2-L100K/N102D eine viermal so hohe ALP-Aktivität als BMP2 Wildtyp (Abb. 6.15). Eine bis zu achtmal höhere ALP-Aktivität wurde nach BMP6-Stimulation im Vergleich zum BMP2 detektiert. Demzufolge nimmt die Fähigkeit, die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten zu fördern, in Abhängigkeit von der

Ligandenkonzentration von BMP2 über BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D zu BMP6 zu. Diese konzentrationsabhängigen Unterschiede konnten auf mRNA-Ebene nach Stimulation mit mehr als 1 nM Ligand nicht detektiert werden. Auch in den MC3T3-E1-Zellen konnte im Vergleich zu BMP2 nach Stimulation mit BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D eine doppelt so hohe *Runx2*-mRNA-Konzentration detektiert werden (Abb. 6.16). Die Mineralisierung der MC3T3-E1-Zellen nahm durch die Inkubation mit den BMP2-Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im Vergleich zum BMP2 ebenfalls zu (Abb. 6.17). Demzufolge fördern die BMP2-Mutanten aufgrund der höheren Affinität zu den Typ II-Rezeptoren und der daraus resultierenden längeren Aktivierung der Smads sowie von p38 MAPK die Differenzierung zu Osteoblasten sowie deren Mineralisierung. Die ALP-Aktivität der mit BMP2 oder den BMP2-Mutanten inkubierten C2C12-Zellen sowie die Mineralisierung der stimulierten MC3T3-E1-Zellen weisen darauf hin, dass BMP2-L100K/N102D im Vergleich zu BMP2 und BMP2-S85R/A86P ein höheres osteogenes Potential hat. Die Ergebnisse der mit BMP2-L100K/N102D oder BMP6 stimulierten Zellen lassen außerdem vermuten, dass für die Differenzierung zu Osteoblasten die Bindung der BMPs an den ActRII/ActRIIB von größerer Bedeutung als an den BMPRII ist. Konditionelle „knock outs“ von BMPRII, ActRII oder ActRIIB in den Extremitätenknospen hatten jedoch keinen Einfluss auf deren Entwicklung, so dass die Bedeutung eines Typ II-Rezeptors für die Extremitätenentwicklung nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (31,258). Das Fehlen eines Typ II-Rezeptors kann wahrscheinlich analog zu den Liganden BMP2, BMP4 und BMP7 durch die anderen BMP Typ II-Rezeptoren kompensiert werden (255). Die konditionelle „knock out“-Maus von ActRIIB zeigte jedoch eine beeinträchtigte Reifung der Chondrozyten (31). Fraglich ist, ob die erhöhte Affinität des BMP2-L100K/N102D zu ActRII/B oder des BMP2-S85R/A86P zu BMPRII *in vivo* die Chondrogenese und Osteogenese stärker fördern als BMP2. Eine abschließende Aussage über das osteogene Potential der BMP2-Mutanten im Vergleich zu BMP2 und BMP6 ist daher erst nach weiteren Expressionsanalysen auf Proteinebene sowie dem Test der Mutanten in *in vivo*-Systemen möglich.

Ein erhöhtes osteogenes Potential der BMP2-Mutanten BMP2-L100K/N102D und BMP2-S85R/A86P im Vergleich zu BMP6 – ähnlich den publizierten Daten zu den BMP2/BMP6- und BMP2/BMP7-Heterodimeren (11-13,259) - konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der biologischen Aktivitäten von BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D mit den BMP-Heterodimeren BMP2/BMP6 und BMP2/BMP7 steht noch aus. Einige Heterodimere wie BMP2/7 können auch mit ActRI interagieren (12), so

dass die Signaltransduktion sowohl über BMPRI als auch ActRI möglich ist und somit weitere Signalwege aktiviert werden können. Für die hier untersuchten BMP2-Mutanten sind keine veränderten Bindungsaffinitäten zu ActRI bekannt. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit C2C12- und MC3T3-E1-Zellen mit rekombinanten Proteinen behandelt und keine mesenchymalen Stammzellen untersucht, die die entsprechenden BMP-Heterodimere stabil exprimieren. Durch die stabile Überexpression von BMP-Liganden könnte sich auch die Expression von BMP-Rezeptoren, Co-Faktoren oder Antagonisten verändern, die dann gleichfalls die BMP-Signaltransduktion beeinflussen.

Die zelltypspezifische Expression der an den BMP-Signalwegen beteiligten Komponenten wurde in myoblastären C2C12- und den prä-osteoblastären MC3T3-E1-Zellen untersucht. Dabei konnte die Expression von Noggin in BMP2-stimulierten MC3T3-E1-Zellen (Abb. 6.16 F), nicht jedoch in BMP2-stimulierten C2C12-Zellen nachgewiesen werden. Anhand von Stimulationsversuchen in MC3T3-E1-Zellen konnte gezeigt werden, dass BMP2-S85R/A86P eine 1,4fach und BMP2-L100K/N102D eine 2,5fach reduzierte Noggin-Expression im Vergleich zum BMP2 auslöste. Beide BMP2-Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D sind durch Noggin inhibierbar (Abb. 6.15 B). Durch die reduzierte ligandenvermittelte Noggin-Expression ist es möglich, dass BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im Vergleich zu BMP2 Wildtyp weniger stark inhibiert werden und dadurch eine höhere biologische Aktivität als BMP2 Wildtyp zeigen. Um diese Vermutung zu untersuchen, müssten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D auf Micromass-Kulturen oder in einem *in vivo*-System getestet werden. BMP6 rief im Vergleich zu BMP2 eine 3,6fach höhere Noggin-Expression hervor. Dadurch entsteht der Eindruck, dass die MC3T3-E1-Zellen versuchen, die fehlende Inhibierung des BMP6 durch Noggin durch eine verstärkte Noggin-Expression zu kompensieren. BMP6 ist jedoch nur in Gegenwart sehr hoher Noggin-Konzentrationen inhibierbar (Abb. 6.15 B). Ob diese durch die endogene Expression von Noggin erreicht werden, ist fraglich. Stattdessen kann das sekretierte Noggin mit anderen BMPs extrazellulär interagieren und diese inhibieren. Es wurde auch publiziert, dass wenn Noggin BMP2 und BMP4 inhibiert, die Expression von BMP6 erhöht wird (260). *In vivo* würde somit die Konzentration des Noggin-resistenten BMP6 zusätzlich erhöht werden. Somit ist denkbar, dass analog zur GDF5-Mutante GDF5-S94N (vgl. Kapitel 4 und 5) auch hier eine negative „feedback“-Hemmung in eine „feedforward“-Situation umgewandelt wird. Für die initialen Schritte der Frakturheilung ist BMP2 unbedingt erforderlich und kann nicht durch andere BMPs ersetzt werden (156). Es wird bereits einen Tag nach der Fraktur in erhöhtem Maße exprimiert (157). Nach drei weiteren Tagen steigt auch die BMP6-Expression

(157). Die BMP2-Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D binden unverändert die Typ I-Rezeptoren und treiben durch die verstärkte Bindung an die Typ II-Rezeptoren die osteoblastäre Differenzierung und Mineralisierung besser als BMP2 voran. Die Mutanten scheinen daher optimale Wirkstoffe für die Frakturheilung zu sein. Da BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D durch Noggin inhibierbare Superagonisten sind, sollten sie *in vivo* die Expression von Noggin und somit die negative „feedback“-Hemmung induzieren. Eine übermäßige Verknöcherung wie bei der Noggin-resistenten GDF5-Mutante GDF5-S94N könnte so verhindert werden. Eine zu effektive Inhibierung durch endogenes Noggin könnte durch Applikation von BMP2-S85R/A86P oder BMP2-L100K/N102D in Kombination mit dem „Pseudo-BMP2“ und „Noggin-Blocker“ BMP2-L51P (44) vermieden werden. BMP2-L51P kann aufgrund des Bindungsverlustes zum BMPRI keine BMP2-abhängige Signaltransduktion induzieren (Kapitel 6.1). Es interagiert aber mit Noggin und kann dadurch die extrazelluläre Noggin-Konzentration reduzieren (44). Auf diese Weise wäre der Schutz vor einer übermäßigen Verknöcherung und einer geringen Wirksamkeit durch eine zu schnelle Inhibierung durch Noggin gegeben. Jedoch endgültig geklärt werden kann die Wirksamkeit der BMP2-Mutanten, auch in Kombination mit BMP2-L51P, nur im Tiermodell.

### 7.3 Schlussfolgerungen

Die Mutation BMP2-L51P verhindert durch den Bindungsverlust zu BMPRI die Aktivierung der Smad- und „Non-Smad“-Signalwege, die für die Transdifferenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten erforderlich sind. Stattdessen wurde in Gegenwart der BMP2-L51P-Mutante die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Myotuben gefördert. Durch die verstärkte Bindung zu BMPRII konnte BMP2-L51P/S85R/A86P an die PFCs binden, den Smad-abhängigen Signalweg und eine detektierbare, jedoch geringe transkriptionelle Aktivität induzieren. Für die Bildung des BISC und die Aktivierung des p38 MAPK-Weges reicht die verstärkte BMPRII-Bindung nicht aus. Deshalb wurde in Gegenwart von BMP2-L51P/S85R/A86P die Myogenese der C2C12-Zellen zwar nicht gefördert, aber die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten wie nach BMP2-Stimulation war auch nicht möglich.

Die Mutanten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D binden unverändert an BMPRI und verlängerten aufgrund ihrer höheren Affinität zu den Typ II-Rezeptoren die Aktivierung des Smad-abhängigen und des p38 MAPK-Weges. Dadurch fördern sie in geringeren Konzentrationen als BMP2 Wildtyp die Differenzierung zu Osteoblasten und deren

Mineralisierung. Die osteoblastäre Differenzierung und Mineralisierung wurde durch die höhere Affinität des BMP2-L100K/N102D zu ActRII/B stärker induziert als durch die höhere Affinität des BMP2-S85R/A86P zu BMPRII. Im Gegensatz zu BMP6, das resistent gegen die Inhibierung durch Noggin ist, sind BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D durch Noggin inhibierbare Superagonisten. Eine übermäßige Knochenbildung sollte somit verhindert werden. Da BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D auf der Struktur des für die Frakturheilung nötigen BMP2 basieren, sollten sie gut als Wirkstoffe für regenerative Therapien geeignet sein.

## 8. Summary-Zusammenfassung

### 8.1. Summary

Bone morphogenetic proteins (BMPs) and the Growth and differentiation factors (GDFs) form a subfamily within the TGF $\beta$  superfamily. BMPs and GDFs regulate a plethora of different cellular processes such as proliferation, differentiation and migration of several cell types during embryonic development and in the adult organism. This requires fine-tuning of the expression of the ligands, the BMP receptors, the co-receptors and the antagonists. Aberrant BMP signalling results in the development of vascular disorders, cancer or malformation of bone and cartilage. The latter was observed in patients with the mutation GDF5-S94N, a mutant characterised in the presented work.

Both BMP2 and GDF5 interact either with the preformed complex (PFC) of BMP receptors type I and II or bind first to their high affinity receptor BMPRI and then recruit the low affinity receptor type II into the BMP-induced signalling complex (BISC) which causes activation of receptor-associated proteins such as the XIAP/TAB/TAK1-complex inducing the Smad-independent pathway (e.g. p38 MAPK pathway).

This thesis describes the molecular mechanisms of GDF5-S94N mutant causing the Multiple Synostoses Syndrome (SYNS). Patients suffer from symphalangism, carpal/tarsal fusions, deafness and mild facial dysmorphism. GDF5-S94 is located within the BMPRII interaction site, the so-called knuckle epitope. S94 is identified as an amino acid which is crucial for the interaction with the BMP receptor type II and the BMP antagonist noggin. Therefore, GDF5-S94N exhibits impaired binding to the type II receptors causing alleviated Smad- and non-Smad signalling and reduced chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. Furthermore, the mutation GDF5-S94N results in a reduced affinity of the ligand to the BMP/GDF antagonist noggin and the consequential lack of noggin inhibition. Analysing chondrogenesis of mouse micromass cultures revealed that despite reduced signalling capacity GDF5-S94N is still able to induce chondrogenesis and the expression of noggin. In contrast to GDF5 wildtype, GDF5-S94N is not inhibited by increasing concentrations of endogenous noggin in a negative feedback inhibition. It exceeds the GDF5 wildtype action and signals over prolonged time which results in enhanced endochondral ossification and the phenotypic outcome of SYNS. In addition, it was shown that reduced chondrogenic differentiation in patients suffering from brachydactyly A2 due to mutation GDF5-L60P is caused by lack of Smad signalling and p38 MAPK activation.

Furthermore, in this thesis BMP2 mutants were used to analyse the impact of modified receptor binding affinities on BMP signalling and osteogenic differentiation. As it is shown by incubation with BMP2-L51P, failed interaction with BMPRI prevents activation of Smad-dependent and Non-Smad signalling. Stimulation with BMP2-L51P/S85R/A86P, which additionally exhibits an enhanced affinity to BMPRII, phosphorylates Smad 1/5/8 through PFCs and induces a markedly reduced, but detectable transcriptional activity. However, p38 MAPK is not activated. Therefore, the residual Smad-dependent target gene transcription is not sufficient to induce transdifferentiation of C2C12 cells to osteoblasts. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D mutants bind BMPRI with the same affinity, but the type II receptors with an increased affinity compared to BMP2. The mutants improve the activation of Smad-dependent and Smad-independent signalling and enhance osteogenic differentiation and mineralisation. In contrast to BMP6, signalling induced by BMP2-S85R/A86P and BMP2-L100K/N102D mutants is inhibited by noggin. Since BMP2 is indispensable for fracture healing and the superagonists BMP2-S85R/A86P and BMP2-L100K/N102D have a similar structure to BMP2, they are attractive candidates for therapeutic applications in the field of regenerative medicine. Malformations caused by enhanced osteogenesis should be prevented by interaction of BMP2-S85R/A86P and BMP2-L100K/N102D with noggin.

## 8.2. Zusammenfassung

Die Bone morphogenetic proteins (BMPs) und Growth and differentiation factors (GDFs), die eine funktionelle Gruppe innerhalb der TGF $\beta$ -Superfamilie bilden, regulieren während der Embryogenese und im adulten Organismus die Proliferation, Differenzierung und Migration verschiedener Zelltypen. Die Vielfalt der Prozesse, an denen BMPs/GDFs beteiligt sind, kann nur durch eine sehr genaue Regulation der Expression der Liganden, der Rezeptoren, der Co-Rezeptoren sowie der Antagonisten bewältigt werden. Bereits geringe Abweichungen führen zu Störungen des vaskulären Systems, rufen Krebs hervor oder haben, wie der Phänotyp der in dieser Arbeit untersuchten Mutation GDF5-S94N zeigt, Fehlbildungen des Skeletts zur Folge.

BMP2 und GDF5 binden entweder einen aus Typ I und Typ II-Rezeptoren bestehenden präformierten Komplex (PFC) und aktivieren den Smad-abhängigen Signalweg, oder induzieren die Bildung des BISC, durch den Rezeptor-assoziierte Proteine wie z. B. der XIAP/TAB/TAK1-Komplex und die „Non-Smad“-Signalwege (z. B. der p38 MAPK-Weg) aktiviert werden.

Die Mutation GDF5-S94N wurde in Patienten mit dem Multiplen Synostoses Syndrom (SYNS) identifiziert. Die Betroffenen leiden unter Symphalangismus, karpale/tarsale Fusionen, Gehörlosigkeit und Fehlbildungen des Gesichts. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen dieser Erkrankung aufgeklärt und GDF5-S94 als essentielle Aminosäure für die Interaktion mit den BMP Typ II-Rezeptoren und Noggin identifiziert. Die Mutation GDF5-S94N liegt in der Typ II-Bindungsstelle des GDF5 und verringert die Affinität zu den BMP Typ II-Rezeptoren. Dies führt zu einer geringeren Aktivierung des Smad-abhängigen und des p38-MAPK Signalweges und beeinträchtigt die Chondrogenese der ATDC5-Zellen. Zusätzlich schwächt die Mutation GDF5-S94N auch die Bindung zum BMP/GDF-Antagonisten Noggin. GDF5-S94N kann nicht optimal von Noggin gebunden werden und ist somit gegen die Inhibierung durch Noggin resistent. Die Inkubation von murinen Micromass-Kulturen mit GDF5-S94N zeigte, dass die geringe biologische Aktivität des GDF5-S94N trotzdem ausreicht, um die Chondrogenese und Expression von Noggin zu induzieren. In Gegenwart von Noggin hingegen wird die durch GDF5-S94N-induzierte Chondrogenese nicht wie im Fall des GDF5 durch eine negative „feedback“-Hemmung inhibiert, sondern kann ungehindert voranschreiten. Der übermäßigen Chondrogenese folgen Osteogenese und Mineralisierung, die sich in der Verknöcherung knorpeliger Elemente und der Gelenkspalten und somit im Phänotyp SYNS äußert. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die stark reduzierte chondrogene Differenzierung, die durch die BDA2-auslösende Mutante GDF5-L60P induziert wird, durch fehlende Aktivierung des Smad-abhängigen und des p38 MAPK Signalweges verursacht wird.

Mit Hilfe von BMP2-Mutanten wurden außerdem die Einflüsse der Ligand-Rezeptor-Affinität auf die Signaltransduktion und das osteogene Potential von BMP2 untersucht. Die Mutation BMP2-L51P zeigt, dass ohne die Bindung an BMPRI die Aktivierung der Smads sowie die Bildung des BISC und die Aktivierung der „Non-Smad“-Signalwege nicht möglich sind. Die verstärkte Bindung der BMP2-L51P/S85R/A86P-Mutante an BMPRII ermöglicht die Bindung an den PFC und induziert eine stark reduzierte, aber detektierbare transkriptionelle Aktivität. Die verringerte Transkription reichte jedoch für die Transdifferenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten nicht aus. BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D hingegen sind BMP2-Mutanten, die aufgrund der höheren Affinität zu den Typ II-Rezeptoren die Aktivierung des Smad-abhängigen und der „Non-Smad“-Signalwege verbessern und so die Differenzierung zu Osteoblasten und ihre Mineralisierung fördern. Anders als BMP6 können die Superagonisten BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D durch Noggin inhibiert werden. Da die Mutanten auf der Struktur des für die Frakturheilung nötigen BMP2 basieren, scheinen BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D gut als Wirkstoffe für regenerative Therapien geeignet zu sein. Eine übermäßige Knochenbildung sollte durch die Interaktion mit Noggin verhindert werden.

## 9. Andere Projekte

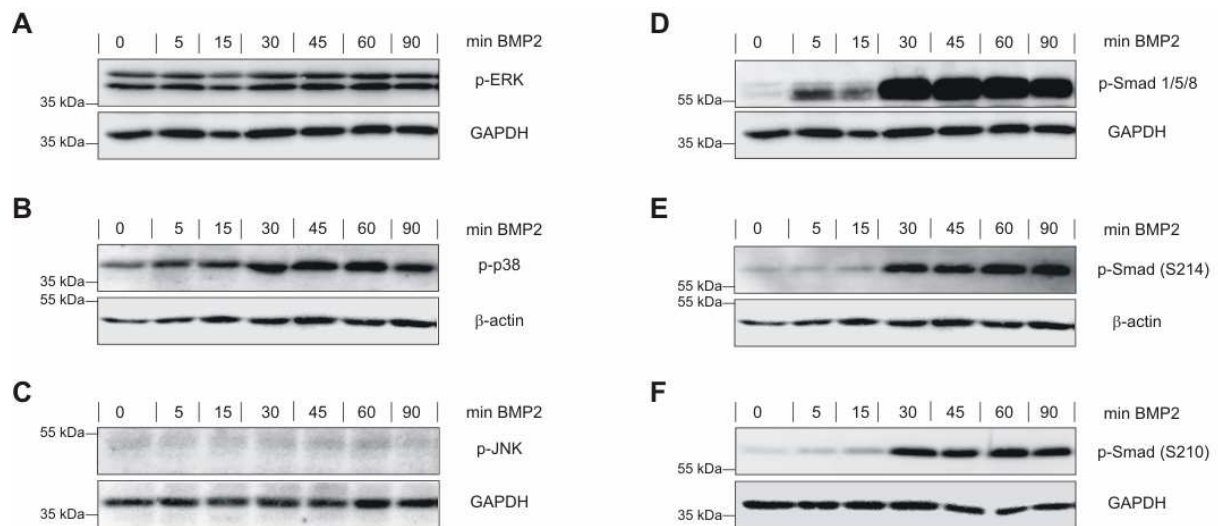
### 9.1. Feinregulierung des Smad-abhängigen Signalweges durch die „Non-Smad“-Signalwege

Kretschmar et al. sowie Pera et al. zeigten, dass in Gegenwart von „Epidermal Growth Factor“ (EGF), „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF), „Fibroblast Growth Factor“ (FGF) oder „Insulin-like-Growth Factor“ (IGF) die Rezeptortyrosinkinasen die MAP-Kinasen aktivieren. Diese phosphorylieren die Serin-Reste S187, S195, S202 und S214 im „Smad-Linker“, der sich zwischen der MH1- und der MH2-Domäne des Smad 1 befindet (106,108,109). Anhand dieses Phosphorylierungs-Musters erkennt GSK3 den „Smad-Linker“ und phosphoryliert ihn an den vier Aminosäuren entfernten Serin/Threonin-Resten S191, S198 und S/T202 und S210 (105). Daraufhin bindet Smurf 1 an das „PPAY“-Motiv im „Smad-Linker“ und verhindert die Interaktion von Smad 1 mit Nup124 und somit die Translokation von Smad 1 in den Nukleus (106). Außerdem induziert Smurf1 die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Smad 1 (66,105).

Zu Beginn dieser Arbeit war wenig über die Regulierung der Smad-Aktivität durch die „Non-Smad“-Signalwege bekannt. Deshalb wurde vermutet, dass BMP2 den Smad-abhängigen Signalweg und die MAP-Kinasen aktiviert. Die aktivierten MAP-Kinasen könnten dann unabhängig von EGF, HGF, FGF oder IGF Smad 1 in der Smad-Linker-Region phosphorylieren. Dadurch wird Smad 1 im Zytoplasma zurückgehalten und proteasomal abgebaut. Auf diese Weise würde BMP2 einerseits den Smad-abhängigen Signalweg und andererseits dessen Feinregulierung durch die Aktivierung der „Non-Smad“-Signalwege induzieren.

Um den Einfluss der durch BMP2-induzierten MAP-Kinasen auf den „Smad-Linker“ aufzuklären, wurde zuerst die zeitabhängige Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinasen sowie die sequentielle Phosphorylierung von Smad 1 nach BMP2-Stimulation untersucht (Abb. 9.1).

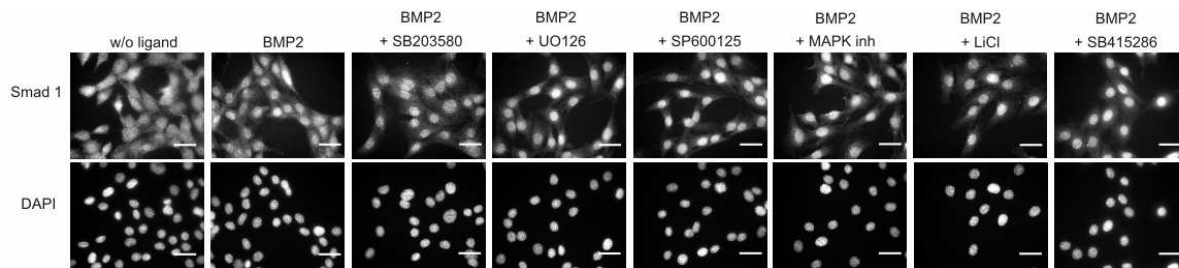




**Abb. 9.1 Zeitabhängige Phosphorylierung der Kinasen und sequentielle Phosphorylierung von Smad 1**

A)-F) Die C2C12-Zellen wurden drei Stunden gehungert und für 0-90 Minuten mit BMP2 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung der MAP-Kinasen A) ERK, B) p38 und C) JNK sowie D) die C-terminale Phosphorylierung von Smad 1/5/8, E) die Phosphorylierung von Smad 1 (S214) durch die MAP-Kinasen und F) die Phosphorylierung von Smad 1 (S210) durch die GSK3 mit spezifischen Antikörpern (105) auf vier verschiedenen Western Blots nachgewiesen. GAPDH und  $\beta$ -Actin dienten als Ladekontrolle.

ERK war schon in Abwesenheit von BMP2 phosphoryliert, so dass eine BMP2-abhängige Aktivierung nicht beobachtet werden konnte (Abb. 9.1 A). Auch p38 war in den unstimulierten C2C12-Zellen schon phosphoryliert. Trotzdem konnte eine Zunahme der p-p38-Konzentration nach 30minütiger BMP2-Stimulation beobachtet werden. Nach 90minütiger Stimulation mit BMP2 nahm der Gehalt an phosphorylierter p38 MAPK wieder ab (Abb. 9.1 B). Die Phosphorylierung von JNK konnte auf dem Western Blot nach BMP2-Stimulation nicht nachgewiesen werden (Abb. 9.1 C). Die ersten C-terminal phosphorylierten Smads waren in geringer Konzentration nach fünfminütiger und in höherer Konzentration nach 30minütiger Stimulation mit BMP2 detektierbar (Abb. 9.1 D). Die im „Smad-Linker“ an S214 und S210 phosphorylierten Smads waren nach 30-90minütiger Stimulation mit BMP2 nachweisbar (Abb. 9.1 E, F). Demzufolge sind nach 30-90minütiger BMP2-Stimulation der C2C12-Zellen die MAP-Kinasen ERK und p38 aktiviert. Sie können im gleichen Zeitraum den Serin-Rest S214 im „Smad-Linker“ phosphorylieren, so dass anschließend GSK3 den Serin-Rest S210 phosphoryliert. Die Inhibierung der MAP-Kinasen und der GSK3 sollte die Phosphorylierung des Smad-Linkers verhindern und die Smad-Translokation in den Nukleus fördern. Bestätigt wurde das mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analyse (Abb. 9.2).

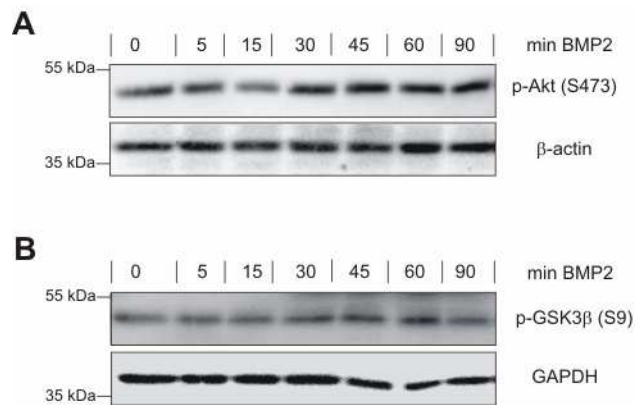


**Abb. 9.2 MAP-Kinase- und GSK3-Inhibitoren fördern die nukleäre Akkumulation von Smad 1**

Die C2C12-Zellen wurden nach dreistündigem Hungern mit BMP2 in Gegenwart verschiedener Kinase-Inhibitoren stimuliert. Die Translokation von Smad 1 war mit Hilfe der Immunfluoreszenz sichtbar (oben). Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt (unten). Die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren waren: 10  $\mu$ M SB203580 (p38 inh), 10  $\mu$ M U0126 (ERK inh), 25  $\mu$ M SP600125 (JNK inh), MAPK inh (10  $\mu$ M SB203580 + 10  $\mu$ M U0126 + 25  $\mu$ M SP600125), 10  $\mu$ M SB415286 (GSK3 inh), 30 mM LiCl (GSK3 inh). Die Referenzmarkierung entspricht 40  $\mu$ m.

Die Immunfluoreszenz-Analyse der mit BMP2 und den Inhibitoren für p38, ERK, JNK und GSK3 inkubierten C2C12-Zellen zeigte, dass durch die MAP-Kinase- oder GSK3-Inhibitoren die Smad 1-Translokation in den Nukleus gefördert wird (Abb. 9.2).

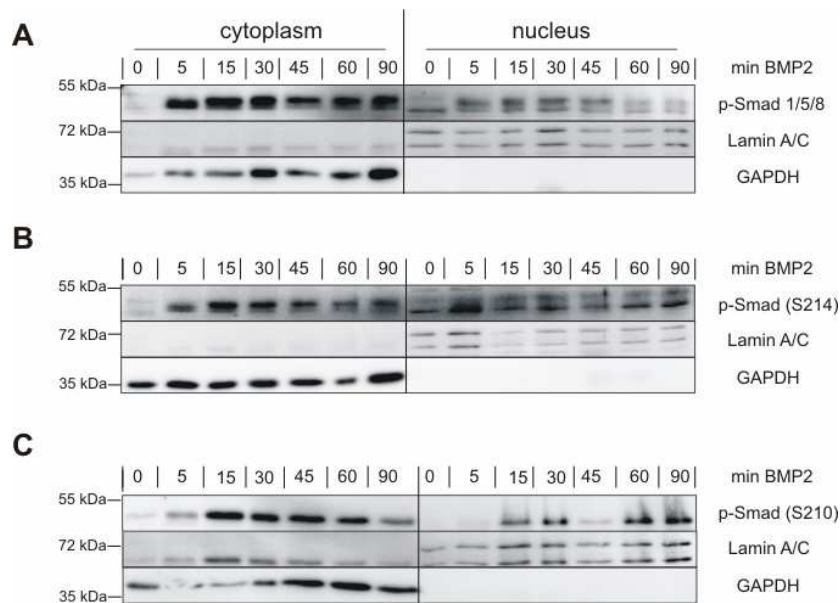
In Gegenwart von Wnt wird GSK3 zu dem Rezeptorkomplex aus LRP5/6 und Frizzled rekrutiert und inhibiert (183). Infolgedessen wird Smad 1 im Smad-Linker nicht mehr von der GSK3 phosphoryliert und für den proteasomalen Abbau markiert (105). GSK3 kann aber auch durch ERK, p38 und Akt phosphoryliert und inaktiviert werden (77,261,262). Sowohl Erk als auch p38 wurden nach 30-90minütiger BMP2-Stimulation aktiviert und können zur Inhibierung der GSK3 beitragen (Abb. 9.1). Außerdem aktiviert BMP2 auch den PI3K/Akt-Signalweg (89-91). Deshalb wurde die zeitabhängige Aktivierung von Akt durch BMP2 untersucht (Abb. 9.3).



### Abb. 9.3 Phosphorylierung von Akt und GSK3β

A)-B) C2C12-Zellen wurden nach dreistündigem Hungern für 0-90 Minuten mit BMP2 stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Phosphorylierung A) von Akt und B) von GSK3β analysiert. β-Actin und GAPDH dienten als Ladekontrolle.

Nach dreistündigem Hungern war die Phosphorylierung von Akt schon in den unstimulierten Zellen nachweisbar. Das war zu erwarten, da Akt auch an der Regulation anderer Signalkaskaden, die u. a. zum Überleben der Zelle beitragen, beteiligt ist (92,96). Trotzdem konnte eine geringe Zunahme der p-Akt (S473)-Konzentration nach 30-90minütiger BMP2-Stimulation beobachtet werden (Abb. 9.3 A). Akt und auch ERK können GSK3β am Serin 9 phosphorylieren und inaktivieren (77,111). In C2C12-Zellen konnte dementsprechend eine geringe Zunahme der p-GSK3β (S9)-Konzentration nach 30-60minütiger BMP2-Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 9.3 B). In den letzten Jahre bestätigen Han et al. und de Jesus et al., dass BMP2 die Aktivierung von Akt und ERK induziert, die daraufhin GSK3β inhibieren (77,111). Durch die Phosphorylierung sollte GSK3β inhibiert und die Phosphorylierung des Smad-Linkers am S210 verhindert werden. Das konnte in C2C12-Zellen nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde die Phosphorylierung des Serin-Restes S210 im Smad-Linker im gleichen Zeitraum wie die GSK3β-Phosphorylierung, nach 30-90minütiger Stimulation beobachtet (Abb. 9.1 F). Aufgrund der durchgeführten Versuche konnte nur die Phosphorylierung der GSK3β am Serin 9, nicht jedoch der Grad der GSK3β-Inhibierung nachgewiesen werden. außerdem war unklar, ob die Kinasen die Smad-Linker-Region im Zytoplasma oder im Nukleus phosphorylieren. Um die zeitliche und räumliche Verteilung der aktivierten Kinasen und der phosphorylierten Smads zu untersuchen, wurden C2C12-Zellen nach Stimulation mit BMP2 in den zytoplasmatischen und den nukleären Anteil fraktioniert und die Phosphorylierung der R-Smads und der Kinasen analysiert (Abb. 9.4).



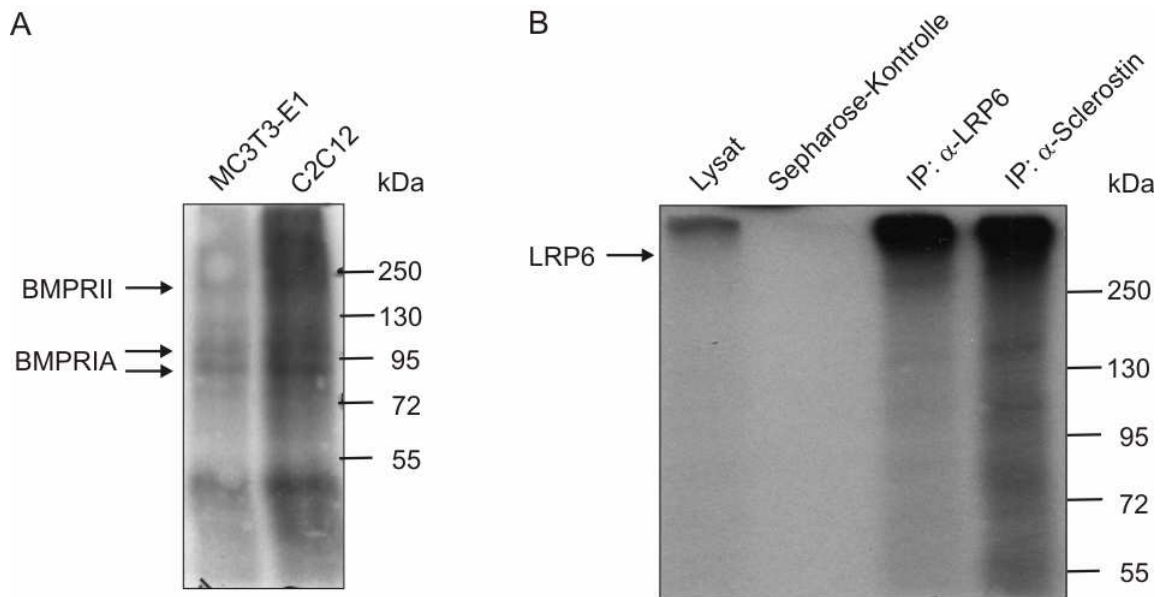
**Abb. 9.4 Smad 1 ist trotz Phosphorylierung des „Smad-Linkers“ im Nukleus nachweisbar**

A)-C) Die C2C12-Zellen wurden nach dreistündigem Hungern für 0-90 Minuten mit BMP2 stimuliert, bevor sie lysiert und fraktioniert wurden. A) Die C-terminale Phosphorylierung von Smad 1/5/8, B) die Phosphorylierung von S214 durch MAP-Kinasen sowie C) die Phosphorylierung von S210 durch GSK3 wurden nach Western Blotting mit Hilfe von Antikörpern untersucht. Lamin A/C und GAPDH dienten als Ladekontrolle und Kontrolle für die Qualität der Zellfraktionierung.

Sapkota et al. zeigten, dass das im Smad-Linker phosphorylierte Smad 1 im Zytoplasma zurückgehalten und abgebaut wird (106). Im Gegensatz dazu wurde hier das im Linker phosphorylierte Smad 1 im Zytoplasma und im Nukleus nachgewiesen (Abb. 9.4; p-Smad (S214) und p-Smad (S210)). Es wurde daher vermutet, dass MAP-Kinasen und GSK3 auch im Nukleus den Linker von Smad 1 phosphorylieren und so den proteasomalen Abbau der Smads regulieren können. Die Phosphorylierung der Kinasen wurde ebenfalls im Nukleus untersucht. Die nukleäre Konzentration der phosphorylierten Kinasen war jedoch so gering, dass anhand der Western Blots keine eindeutigen Aussagen getroffen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Alarcon et al. konnten jedoch nachweisen, dass CDK8 und CDK9 Smad 1 im Linker an den Serin-Resten S206 und S214 phosphorylieren können. Dadurch wird im Nukleus die Interaktion von Smad 1 mit dem Co-Faktor YAP und somit die Smad-abhängige Transkription erleichtert (107). Unabhängig davon, ob MAP-Kinasen oder CDK8/9 Smad 1 an den Serin-Resten S206 und S214 phosphorylieren, könnte GSK3 im Nukleus wie im Zytoplasma die Phosphorylierung in der Smad-Linker-Region erkennen und Smad 1 zusätzlich an den Serin/Threonin-Resten S191, S198 und S/T202 und S210 phosphorylieren. Diese Hypothese wurde in diesem Jahr durch Aragon et al. bestätigt (263). Es wurde gezeigt, dass YAP Smad 1 bindet, solange GSK3 im Nukleus nicht T202 und S210 phosphoryliert und eine Konformationsänderung von Smad 1 induziert (263).

## 9.2. Sclerostin

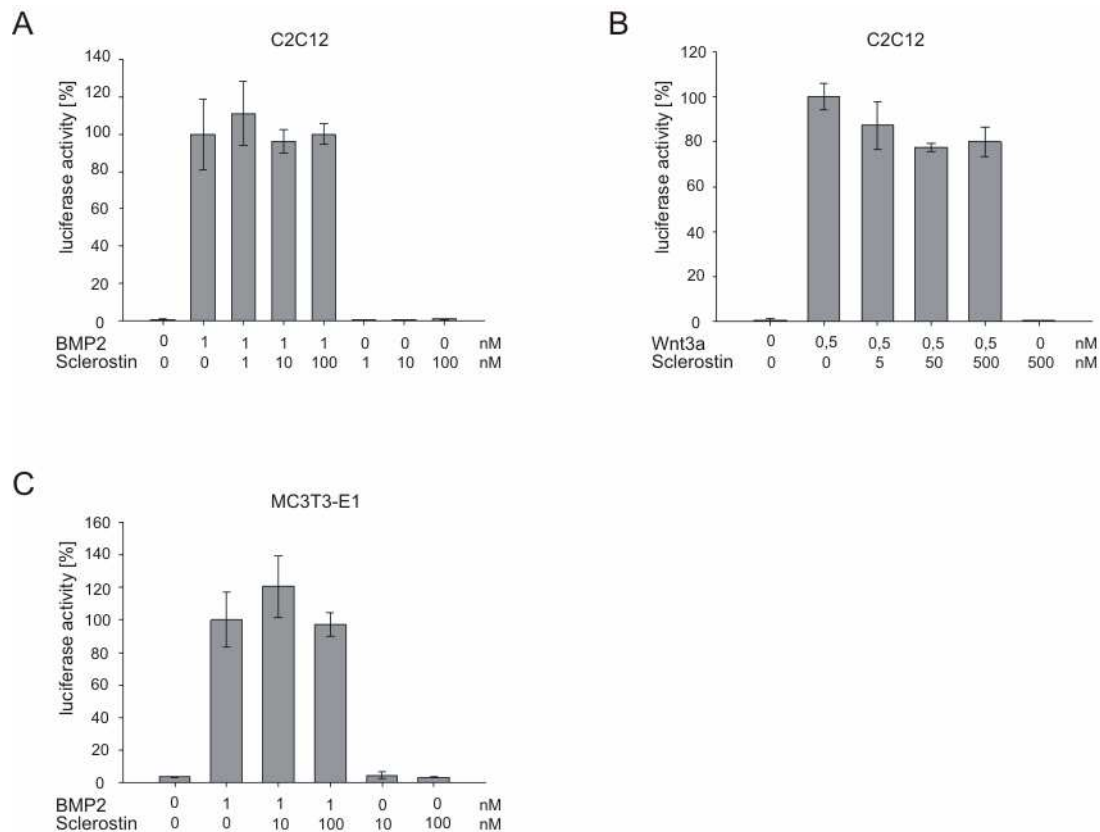
Sclerostin ist ein sekretiertes Glykoprotein, das in Osteozyten exprimiert wird. Mutationen im Gen *SOST* verursachen Sclerostosis oder das van Buchem-Syndrom, die durch eine deutlich höhere Knochenmasse und z. T. durch Knochenfusionen gekennzeichnet sind (130-132). Ähnliche Phänotypen wurden auch durch Mutationen des LRP5 verursacht (134,135). Sclerostin bindet an die LRP-Rezeptoren 5 und 6 und verhindert deren Interaktion mit Wnt und somit die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges (128,129). Infolgedessen werden die Differenzierung der Osteoblasten und die Mineralisierung inhibiert (264,265). Wird die Expression von Sclerostin durch Mutationen beeinträchtigt, so kann Wnt den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg dauerhaft aktivieren und eine höhere Knochenbildung verursachen. Winkler et al. zeigten, dass Sclerostin mit den BMP-Rezeptoren BMPRI und BMPRII um die Bindung an die BMPs konkurriert und die von BMP induzierte Smad-Phosphorylierung und ALP-Aktivität beeinträchtigt (127). Sclerostin wurde daher lange als BMP- und/oder Wnt-Antagonist diskutiert und den BMP-Antagonisten der DAN-Familie zugeordnet (122). Van Bezooijen et al. publizierten hingegen, dass BMP die Expression von Sclerostin induziert, aber Sclerostin keinen Einfluss auf die Aktivierung der Smads sowie die ALP-Aktivität hat (266). Um herauszufinden, welche Rezeptoren und Co-Rezeptoren von Sclerostin gebunden werden, wurde Sclerostin mit [ $^{125}$ Iod] radioaktiv markiert (217). Anschließend wurde [ $^{125}$ Iod]-Sclerostin mit MC3T3-E1- oder 293T-Zellen, die entweder die BMP-Rezeptoren oder LRP5/6 überexprimierten, inkubiert und durch die Zugabe von Disuccinimidylsuberat (DSS) mit den Proteinen der Plasmamembran und wahrscheinlich auch mit sich selbst vernetzt. Die interagierenden Proteine wurden nach Immunpräzipitation (IP) mit spezifischen Antikörpern identifiziert (Abb.9.5).



**Abb. 9.5 Nachweis der mit [<sup>125</sup>Iod]-BMP2 und [<sup>125</sup>Iod]-Sclerostin interagierenden Proteine**

A) C2C12- und MC3T3-E1-Zellen wurden mit [<sup>125</sup>Iod]-markiertem BMP2 inkubiert und mit DSS kovalent vernetzt. Durch die anschließende Immunpräzipitation (IP) mit dem BMPRII-spezifischen Antikörper und der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten BMPRI und BMPRII kovalent gebunden an [<sup>125</sup>Iod]-BMP2 (BMP2-Monomer: 12,5 kDa) nachgewiesen werden. B) MC3T3-E1-Zellen wurden mit [<sup>125</sup>Iod]-Sclerostin (Sclerostin-Monomer: 22,5 kDa) inkubiert und durch DSS kovalent mit den Proteinen der Plasmamembran verbunden. Die Zellysate wurden für die IP mit LRP6- oder Sclerostin-spezifischen Antikörper eingesetzt. Dabei konnte der LRP6 identifiziert werden.

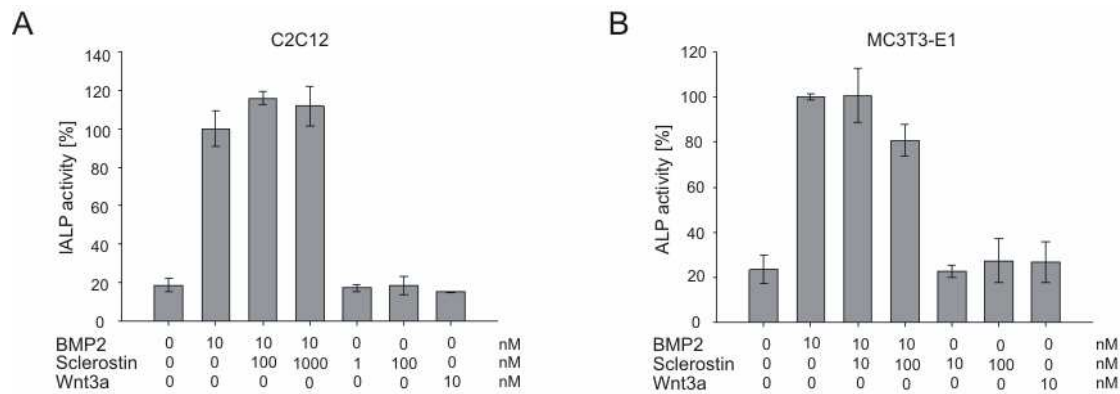
Der Vergleich der verschiedenen Quervernetzungs-Experimente mit anschließender Immunpräzipitation (IP) zeigte, dass Sclerostin nur den LRP6 bindet. Um den Einfluss von Sclerostin auf die Aktivität von BMP2 und Wnt3a zu untersuchen, wurden C2C12- und MC3T3-E1-Zellen mit der Plasmid-DNA BRE-Luc oder SuperTOPFLASH und der konstitutiv aktiven *Renilla*-Luciferase transfiziert und mit BMP2 oder Wnt3a stimuliert (Abb.9.6).



**Abb. 9.6 Sclerostin inhibiert nicht die durch BMP2 oder Wnt3a induzierte Reporter-gen-Aktivität**

A) C2C12-Zellen wurden mit den Reporter-gen-Konstrukten BRE-Luc und RL-TK transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 16 Stunden mit rekombinantem BMP2 und /oder Sclerostin stimuliert. Aus den gemessenen Aktivitäten der Firefly- und Renilla-Luciferase wurden die relativen Luciferase-Aktivitäten errechnet. Sie wurden auf die relative Aktivität der mit 1 nM BMP2 stimulierten Zellen (100%) normiert. B) C2C12-Zellen wurden mit den Reporter-gen-Konstrukten SuperTOPFLASH und RL-TK transfiziert, bevor sie mit rekombinantem Wnt3a und/oder Sclerostin für 16 Stunden stimuliert wurden. Die relativen Luciferase-Aktivitäten wurden auf die Aktivität der mit 0,5 nM Wnt3a stimulierten Zellen normiert. C) MC3T3-E1-Zellen wurden mit den Reporter-gen-Konstrukten BRE-Luc und RLTK transfiziert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden mit rekombinantem BMP2 und /oder Sclerostin stimuliert. Auch hier wurden die relativen Luciferase-Aktivitäten auf die relative Aktivität der mit 1 nM BMP2 stimulierten Zellen normiert. Die in A)-C) dargestellten Luciferase-Aktivitäten zeigen die Mittelwerte ± Standardabweichung von Triplikaten und repräsentieren einen von zwei vergleichbaren Versuchen.

In keiner Zelllinie konnte eine Reduktion der BMP2- oder Wnt3a-induzierten Reporter-gen-Aktivität durch ansteigende Sclerostin-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb.9.6). C2C12- und MC3T3-E1-Zellen wurden zusätzlich mit BMP2 und Wnt3a in Gegenwart von Sclerostin für drei Tage inkubiert. Die darauffolgende Analyse der ALP-Aktivität zeigte, dass nur BMP2, nicht aber Wnt3a die Expression von ALP induzieren kann. Die BMP2-abhängige ALP-Aktivität wurde von ansteigenden Sclerostin-Konzentrationen nicht beeinflusst (Abb. 9.7).



**Abb. 9.7 Sclerostin inhibiert nicht die durch BMP2 oder Wnt3a induzierte ALP-Aktivität**

A) C2C12- und B) MC3T3-E1-Zellen wurden für 72 Stunden mit rekombinantem BMP2 oder Wnt3a und zunehmender Sclerostin-Konzentration stimuliert. Die gemessenen ALP-Aktivitäten wurden auf die ALP-Aktivität der mit 10 nM BMP2 stimulierten Zellen (100%) normiert. Die dargestellten ALP-Aktivitäten zeigen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von Triplikaten und spiegeln einen von zwei vergleichbaren Versuchen wider.

In allen hier vorgestellten Versuchen wurde rekombinantes Sclerostin der Firmen Pfizer und R&D getestet. Da Sclerostin zwar mit LRP6 vernetzt werden konnte (Abb. 9.5), die von rekombinantem Wnt3a induzierte Reporter-gen-Aktivität aber nicht inhibiert wurde (Abb. 9.6), war es fraglich, ob das rekombinante Protein biologisch aktiv ist. Die endogene Expression von Sclerostin konnte nach BMP2-Stimulation weder in C2C12- noch in MC3T3-E1-Zellen nachgewiesen werden.

Durch den konditionellen „knock out“ des BMPRIA konnten die Ergebnisse von van Bezooijen et al. *in vivo* bestätigt werden (133,266): Die Expression von Sclerostin wird nach Interaktion der BMPs mit den BMP-Rezeptoren induziert. Sclerostin verhindert daraufhin die Bindung von Wnt an LRP5/6 und somit die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Infolgedessen wird die Osteoklastogenese durch die Expression von RANKL gefördert und eine zu hohe Knochenmasse verhindert (133).



### **9.3. „The pro-form of BMP2 interferes with BMP2 signaling by competing with BMP2 for IA receptor binding“**

**Hauhuber A, von Einem S, Schwaerzer GK, Buttstedt A, Zebisch M, Schräml M, Hortschansky P, Knaus P, Schwarz E. (25)**

#### **Abstract**

Pro-forms of growth factors have received increasing attention since it was shown that they can affect both the maturation and functions of mature growth factors. Here, we assessed the biological function of the pro-form of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), a member of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ )/BMP superfamily. The role of the 263 amino acids of the pro-peptide is currently unclear. In order to obtain an insight into the function of the pro-form (proBMP-2), the ability of proBMP-2 to induce alkaline phosphatase (AP), a marker enzyme for cells differentiating into osteoblasts, was tested. Interestingly, in contrast to mature BMP-2, proBMP-2 did not lead to induction of AP. Instead, proBMP-2 inhibited the induction of AP by BMP-2. This result raised the question of whether proBMP-2 may compete with mature BMP-2 for receptor binding. ProBMP-2 was found to bind to the purified extracellular ligand binding domain (ECD) of BMPRIA, a high-affinity receptor for mature BMP-2, with a similar affinity as mature BMP-2. Binding of proBMP-2 to BMPR-IA was confirmed in cell culture by cross-linking proBMP-2 to BMPR-IA presented on the cell surface. In contrast to this finding, proBMP-2 did not bind to the ECD of BMPR-II. ProBMP-2 also differed from BMP-2 in its capacity to induce p38 and Smad phosphorylation. The data presented here suggest that the pro-domain of BMP-2 can alter the signalling properties of the growth factor by modulating the ability of the mature part to interact with the receptors.

## **9.4. „Surface immobilization of bone morphogenetic protein 2 via a self-assembled monolayer formation induces cell differentiation“**

**Pohl TLM, Boergermann JH, Schwaerzer GK, Knaus P, Cavalcanti-Adam, EA. (267)**

### **Abstract**

Bone extracellular matrix consists of a network of proteins in which growth factors, like bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), are embedded and released upon matrix turnover and degradation. Recombinant human (rh)BMP-2 shows promise in enhancing bone fracture repair, although issues regarding finding a suitable delivery system still limit its extensive clinical use. The aim of this study is to determine which cell activities are triggered by the presentation of immobilized rhBMP-2. For this purpose gold surfaces were first decorated with a self-assembled monolayer consisting of a hetero-bifunctional linker. rhBMP-2 was covalently bound to the surfaces via this linker and used to investigate the cellular responses of C2C12 myoblasts. We show that covalently immobilized rhBMP-2 (iBMP-2) initiates short-term signaling events. Using a BMP-responsive reporter gene assay and western blotting to monitor phosphorylation of Smad 1/5/8 we prove that iBMP-2 activates BMP-dependent signal transduction. Furthermore, we demonstrate that iBMP-2 suppresses myotube formation and promotes the osteoblast phenotype in C2C12 cells. The bioactivity of surface-bound rhBMP-2 presented in this study is not due to its release into the medium. As such, our simple approach paves the way for the controlled local presentation of immobilized growth factors, limiting degradation while still maintaining biological activity.

## 10. Referenzen

1. Urist MR 1965 Bone: formation by autoinduction. *Science* 150(698):893-9.
2. Zhao GQ 2003 Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35(1):43-56.
3. Kamiya N, Mishina Y 2011 New insights on the roles of BMP signaling in bone-A review of recent mouse genetic studies. *Biofactors* 37(2):75-82.
4. Danesh SM, Villasenor A, Chong D, Soukup C, Cleaver O 2009 BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene Expr Patterns* 9(5):255-65.
5. Li W, Dunmore BJ, Morrell NW Bone morphogenetic protein type II receptor mutations causing protein misfolding in heritable pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 7(6):395-8.
6. Lowery JW, de Caestecker MP 2010 BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(4):287-98.
7. Song B, Estrada KD, Lyons KM 2009 Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6):379-88.
8. Waite KA, Eng C 2003 From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 4(10):763-73.
9. McPherron AC, Lee SJ 1993 GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268(5):3444-9.
10. Liao WX, Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S 2003 Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J Biol Chem* 278(6):3713-9.
11. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM 1996 Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13(3-4):291-300.
12. Little SC, Mullins MC 2009 Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nat Cell Biol* 11(5):637-43.
13. Valera E, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Choe S 2010 BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inducer of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One* 5(6):e11167.
14. Isaacs MJ, Kawakami Y, Allendorph GP, Yoon BH, Izpisua Belmonte JC, Choe S 2010 Bone morphogenetic protein-2 and -6 heterodimer illustrates the nature of ligand-receptor assembly. *Mol Endocrinol* 24(7):1469-77.
15. Kirsch T, Sebald W, Dreyer MK 2000 Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat Struct Biol* 7(6):492-6.
16. Kotzsch A, Nickel J, Seher A, Sebald W, Muller TD 2009 Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5-type I receptor specificity. *Embo J* 28(7):937-47.
17. Allendorph GP, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Choe S 2007 BMP-3 and BMP-6 structures illuminate the nature of binding specificity with receptors. *Biochemistry* 46(43):12238-47.
18. Thomas JT, Prakash D, Weih K, Moos M, Jr. 2006 CDMP1/GDF5 has specific processing requirements that restrict its action to joint surfaces. *J Biol Chem* 281(36):26725-33.

19. Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G 1992 Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 267(23):16396-402.
20. Cui Y, Hackenmiller R, Berg L, Jean F, Nakayama T, Thomas G, Christian JL 2001 The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* 15(21):2797-802.
21. Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC, Tucker RF 1994 Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth Factors* 11(3):215-25.
22. Gregory KE, Ono RN, Charbonneau NL, Kuo CL, Keene DR, Bachinger HP, Sakai LY 2005 The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem* 280(30):27970-80.
23. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, Naik C, Chen C, Pukac L, Singh M, Tsareva T, Parice Y, Mahoney A, Roschke V, Sanyal I, Choe S 2005 Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem* 280(26):25111-8.
24. Sengle G, Ono RN, Lyons KM, Bachinger HP, Sakai LY 2008 A new model for growth factor activation: type II receptors compete with the prodomain for BMP-7. *J Mol Biol* 381(4):1025-39.
25. Hauburger A, von Einem S, Schwaerzer GK, Buttstedt A, Zebisch M, Schraml M, Hortschansky P, Knaus P, Schwarz E 2009 The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *Febs J* 276(21):6386-98.
26. Sengle G, Ono RN, Sasaki T, Sakai LY 2011 Prodomains of transforming growth factor beta (TGFbeta) superfamily members specify different functions: extracellular matrix interactions and growth factor bioavailability. *J Biol Chem* 286(7):5087-99.
27. Saremba S, Nickel J, Seher A, Kotzsch A, Sebald W, Mueller TD 2008 Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *Febs J* 275(1):172-83.
28. Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Mueller TD 2009 Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6):367-77.
29. Lavery K, Swain P, Falb D, Alaoui-Ismaili MH 2008 BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 283(30):20948-58.
30. Daly AC, Randall RA, Hill CS 2008 Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* 28(22):6889-902.
31. Gamer LW, Nove J, Levin M, Rosen V 2005 BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos. *Dev Biol* 285(1):156-68.
32. Shi Y, Massague J 2003 Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113(6):685-700.
33. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J 1994 Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370(6488):341-7.
34. Hassel S, Yakymovych M, Hellman U, Ronnstrand L, Knaus P, Souchelnytskyi S 2006 Interaction and functional cooperation between the serine/threonine kinase bone morphogenetic protein type II receptor with the tyrosine kinase stem cell factor receptor. *J Cell Physiol* 206(2):457-67.

35. Chan MC, Nguyen PH, Davis BN, Ohoka N, Hayashi H, Du K, Lagna G, Hata A 2007 A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* 27(16):5776-89.
36. Schwappacher R, Weiske J, Heining E, Ezerski V, Marom B, Henis YI, Huber O, Knaus P 2009 Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity. *Embo J* 28(11):1537-50.
37. Satow R, Kurisaki A, Chan TC, Hamazaki TS, Asashima M 2006 Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. *Dev Cell* 11(6):763-74.
38. Foletta VC, Moussi N, Sarmiere PD, Bamburg JR, Bernard O 2004 LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp Cell Res* 294(2):392-405.
39. Wong WK, Knowles JA, Morse JH 2005 Bone morphogenetic protein receptor type II C-terminus interacts with c-Src: implication for a role in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33(5):438-46.
40. Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkova M, Zhao X, Wrana JL, Attisano L 2004 Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *Embo J* 23(24):4792-801.
41. Allendorph GP, Vale WW, Choe S 2006 Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20):7643-8.
42. Weber D, Kotzsch A, Nickel J, Harth S, Seher A, Mueller U, Sebald W, Mueller TD 2007 A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol* 7:6.
43. Heinecke K, Seher A, Schmitz W, Mueller TD, Sebald W, Nickel J 2009 Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol* 7:59.
44. Keller S, Nickel J, Zhang JL, Sebald W, Mueller TD 2004 Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol* 11(5):481-8.
45. Nickel J, Kotzsch A, Sebald W, Mueller TD 2005 A single residue of GDF-5 defines binding specificity to BMP receptor IB. *J Mol Biol* 349(5):933-47.
46. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P 2002 The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 277(7):5330-8.
47. Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergermann JH, Hassel S, Henis YI, Knaus P 2006 Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* 26(20):7791-805.
48. Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N, Ehrlich M, Henis YI, Sebald W, Knaus P 2003 Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3:44-51.
49. Feng XH, Derynck R 1997 A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *Embo J* 16(13):3912-23.
50. Lo RS, Chen YG, Shi Y, Pavletich NP, Massague J 1998 The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *Embo J* 17(4):996-1005.
51. Wrighton KH, Lin X, Yu PB, Feng XH 2009 Transforming Growth Factor {beta} Can Stimulate Smad1 Phosphorylation Independently of Bone Morphogenic Protein Receptors. *J Biol Chem* 284(15):9755-63.

52. Lonn P, Moren A, Raja E, Dahl M, Moustakas A 2009 Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res* 19(1):21-35.
53. Ishibashi O, Ikegame M, Takizawa F, Yoshizawa T, Moksed MA, Iizawa F, Mera H, Matsuda A, Kawashima H Endoglin is involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells through a pathway independent of Smad-1/5/8 phosphorylation. *J Cell Physiol* 222(2):465-73.
54. Upton PD, Davies RJ, Trembath RC, Morrell NW 2009 Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 284(23):15794-804.
55. Shi W, Chang C, Nie S, Xie S, Wan M, Cao X 2007 Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* 120(Pt 7):1216-24.
56. Ross S, Hill CS 2008 How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40(3):383-408.
57. de Jong DS, Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, Hendriks JM, Wehrens R, Mummery CL, van Zoelen EJ, Olijve W, Steegenga WT 2004 Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 19(6):947-58.
58. Korchynskiy O, Dechering KJ, Sijbers AM, Olijve W, ten Dijke P 2003 Gene array analysis of bone morphogenetic protein type I receptor-induced osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 18(7):1177-85.
59. Korchynskiy O, ten Dijke P 2002 Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277(7):4883-91.
60. Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, Mishima HK, Kawabata M, Miyazono K 2000 Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Mol Biol Cell* 11(2):555-65.
61. Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A 1998 Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12(2):186-97.
62. Bennett D, Alpey L 2002 PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 31(4):419-23.
63. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T 2003 Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 14(7):2809-17.
64. Shen R, Chen M, Wang YJ, Kaneki H, Xing L, O'Keefe R J, Chen D 2006 Smad6 interacts with Runx2 and mediates Smad ubiquitin regulatory factor 1-induced Runx2 degradation. *J Biol Chem* 281(6):3569-76.
65. Zhang Y, Derynck R 1999 Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends Cell Biol* 9(7):274-9.
66. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH 1999 A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400(6745):687-93.
67. Bengtsson L, Schwappacher R, Roth M, Boergermann JH, Hassel S, Knaus P 2009 PP2A regulates BMP signalling by interacting with BMP receptor complexes and by dephosphorylating both the C-terminus and the linker region of Smad1. *J Cell Sci* 122(Pt 8):1248-57.
68. Chen HB, Shen J, Ip YT, Xu L 2006 Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway. *Genes Dev* 20(6):648-53.
69. Duan X, Liang YY, Feng XH, Lin X 2006 Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J Biol Chem* 281(48):36526-32.

70. Knockaert M, Sapkota G, Alarcon C, Massague J, Brivanlou AH 2006 Unique players in the BMP pathway: small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32):11940-5.
71. Sapkota G, Knockaert M, Alarcon C, Montalvo E, Brivanlou AH, Massague J 2006 Dephosphorylation of the linker regions of Smad1 and Smad2/3 by small C-terminal domain phosphatases has distinct outcomes for bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem* 281(52):40412-9.
72. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO 2004 Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16(3):291-9.
73. Greenblatt MB, Shim JH, Zou W, Sitara D, Schweitzer M, Hu D, Lotinun S, Sano Y, Baron R, Park JM, Arthur S, Xie M, Schneider MD, Zhai B, Gygi S, Davis R, Glimcher LH 2010 The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. *J Clin Invest* 120(7):2457-73.
74. Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E 1997 TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 272(13):8141-4.
75. Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J 2003 Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 18(11):2060-8.
76. Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K 1999 XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J* 18(1):179-87.
77. de Jesus Perez VA, Alastalo TP, Wu JC, Axelrod JD, Cooke JP, Amieva M, Rabinovitch M 2009 Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *J Cell Biol* 184(1):83-99.
78. Lai CF, Cheng SL 2002 Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277(18):15514-22.
79. Lou J, Tu Y, Li S, Manske PR 2000 Involvement of ERK in BMP-2 induced osteoblastic differentiation of mesenchymal progenitor cell line C3H10T1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 268(3):757-62.
80. Massague J 2003 Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev* 17(24):2993-7.
81. Palcy S, Goltzman D 1999 Protein kinase signalling pathways involved in the up-regulation of the rat alpha1(I) collagen gene by transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2 in osteoblastic cells. *Biochem J* 343 Pt 1:21-7.
82. Ortuno MJ, Ruiz-Gaspa S, Rodriguez-Carballo E, Susperregui AR, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F 2010 p38 regulates expression of osteoblast-specific genes by phosphorylation of osterix. *J Biol Chem* 285(42):31985-94.
83. Sano Y, Harada J, Tashiro S, Gotoh-Mandeville R, Maekawa T, Ishii S 1999 ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 274(13):8949-57.
84. Ulsamer A, Ortuno MJ, Ruiz S, Susperregui AR, Osses N, Rosa JL, Ventura F 2008 BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. *J Biol Chem* 283(7):3816-26.
85. Henningfeld KA, Friedle H, Rastegar S, Knochel W 2002 Autoregulation of Xvent-2B; direct interaction and functional cooperation of Xvent-2 and Smad1. *J Biol Chem* 277(3):2097-103.

86. Henningfeld KA, Rastegar S, Adler G, Knochel W 2000 Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter. *J Biol Chem* 275(29):21827-35.
87. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T 1994 Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127(6 Pt 1):1755-66.
88. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I 1993 Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 75(1):45-58.
89. Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG 2002 Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem* 277(36):33361-8.
90. Osyczka AM, Leboy PS 2005 Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology* 146(8):3428-37.
91. Vinals F, Lopez-Rovira T, Rosa JL, Ventura F 2002 Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett* 510(1-2):99-104.
92. Manning BD, Cantley LC 2007 AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7):1261-74.
93. Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K, Taga T 2000 BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem* 275(23):17647-52.
94. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME 1997 Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91(2):231-41.
95. Datta SR, Ranger AM, Lin MZ, Sturgill JF, Ma YC, Cowan CW, Dikkes P, Korsmeyer SJ, Greenberg ME 2002 Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 3(5):631-43.
96. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC 1997 PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88(4):435-7.
97. Zuzarte-Luis V, Montero JA, Rodriguez-Leon J, Merino R, Rodriguez-Rey JC, Hurler JM 2004 A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways. *Dev Biol* 272(1):39-52.
98. Gamell C, Osses N, Bartrons R, Ruckle T, Camps M, Rosa JL, Ventura F 2008 BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J Cell Sci* 121(Pt 23):3960-70.
99. Gamell C, Susperregui AG, Bernard O, Rosa JL, Ventura F 2011 The p38/MK2/Hsp25 pathway is required for BMP-2-induced cell migration. *PLoS One* 6(1):e16477.
100. Gallea S, Lallemand F, Atfi A, Rawadi G, Ramez V, Spinella-Jaegle S, Kawai S, Faucheu C, Huet L, Baron R, Roman-Roman S 2001 Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28(5):491-8.
101. Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Uchida S, Saeki-Miura K, Makishima F 1999 p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res* 250(2):351-63.



102. Payne KA, Meszaros LB, Phillipi JA, Huard J 2010 Effect of phosphatidyl inositol 3-kinase, extracellular signal-regulated kinases 1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on osteogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 16(12):3647-55.
103. Gori F, Thomas T, Hicok KC, Spelsberg TC, Riggs BL 1999 Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *J Bone Miner Res* 14(9):1522-35.
104. Shim JH, Greenblatt MB, Xie M, Schneider MD, Zou W, Zhai B, Gygi S, Glimcher LH 2009 TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *Embo J* 28(14):2028-41.
105. Fuentealba LC, Eivers E, Ikeda A, Hurtado C, Kuroda H, Pera EM, De Robertis EM 2007 Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131(5):980-93.
106. Sapkota G, Alarcon C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massague J 2007 Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* 25(3):441-54.
107. Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, Miller AN, Manova-Todorova K, Macias MJ, Sapkota G, Pan D, Massague J 2009 Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 139(4):757-69.
108. Kretzschmar M, Doody J, Massague J 1997 Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* 389(6651):618-22.
109. Pera EM, Ikeda A, Eivers E, De Robertis EM 2003 Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev* 17(24):3023-8.
110. Fuentealba LC, Eivers E, Geissert D, Taelman V, De Robertis EM 2008 Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(22):7732-7.
111. Lee MY, Lim HW, Lee SH, Han HJ 2009 Smad, PI3K/Akt, and Wnt-dependent signaling pathways are involved in BMP-4-induced ESC self-renewal. *Stem Cells* 27(8):1858-68.
112. Lee KS, Hong SH, Bae SC 2002 Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 21(47):7156-63.
113. Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC 2008 Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J Biol Chem* 283(12):7628-37.
114. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M 1999 Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274(2):584-94.
115. Ray BN, Lee NY, How T, Blobe GC ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis* 31(3):435-41.
116. Scherner O, Meurer SK, Tihaa L, Gressner AM, Weiskirchen R 2007 Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor-beta1 and BMP-7 signaling. *J Biol Chem* 282(19):13934-43.
117. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY 2006 Bone morphogenetic

- protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet* 38(5):531-9.
118. Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, Schneyer AL, Woolf CJ, Lin HY 2005 Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280(33):29820-7.
  119. Samad TA, Srinivasan A, Karchewski LA, Jeong SJ, Campagna JA, Ji RR, Fabrizio DA, Zhang Y, Lin HY, Bell E, Woolf CJ 2004 DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. *J Neurosci* 24(8):2027-36.
  120. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C 1999 Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401(6752):480-5.
  121. Sammar M, Stricker S, Schwabe GC, Sieber C, Hartung A, Hanke M, Oishi I, Pohl J, Minami Y, Sebald W, Mundlos S, Knaus P 2004 Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* 9(12):1227-38.
  122. Avsian-Kretchmer O, Hsueh AJ 2004 Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol Endocrinol* 18(1):1-12.
  123. Veverka V, Henry AJ, Slocombe PM, Ventom A, Mulloy B, Muskett FW, Muzylak M, Greenslade K, Moore A, Zhang L, Gong J, Qian X, Paszty C, Taylor RJ, Robinson MK, Carr MD 2009 Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. *J Biol Chem* 284(16):10890-900.
  124. Weidauer SE, Schmieder P, Beerbaum M, Schmitz W, Oschkinat H, Mueller TD 2009 NMR structure of the Wnt modulator protein Sclerostin. *Biochem Biophys Res Commun* 380(1):160-5.
  125. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA 2004 Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 35(4):828-35.
  126. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Lowik CW 2004 Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 199(6):805-14.
  127. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA 2003 Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo J* 22(23):6267-76.
  128. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D 2005 Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280(20):19883-7.
  129. Semenov M, Tamai K, He X 2005 SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem* 280(29):26770-5.
  130. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D, Van Hul W 2001 Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 10(5):537-43.
  131. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepfer BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D,

- Hamersma H, Beighton P, Mulligan J 2001 Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 68(3):577-89.
132. van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW 2005 SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(3):319-27.
133. Kamiya N, Ye L, Kobayashi T, Mochida Y, Yamauchi M, Kronenberg HM, Feng JQ, Mishina Y 2008 BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. *Development* 135(22):3801-11.
134. Balemans W, Devogelaer JP, Cleiren E, Piters E, Caussin E, Van Hul W 2007 Novel LRP5 missense mutation in a patient with a high bone mass phenotype results in decreased DKK1-mediated inhibition of Wnt signaling. *J Bone Miner Res* 22(5):708-16.
135. Semenov MV, He X 2006 LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* 281(50):38276-84.
136. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S 2002 Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420(6916):636-42.
137. Aspenberg P, Jeppsson C, Economides AN 2001 The bone morphogenetic proteins antagonist Noggin inhibits membranous ossification. *J Bone Miner Res* 16(3):497-500.
138. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM 1996 The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86(4):599-606.
139. Gaggero E, Du Z, Devlin RD, Rydziel S, Priest L, Economides AN, Canalis E 2003 Noggin arrests stromal cell differentiation in vitro. *Bone* 32(2):111-9.
140. McMahan JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahan AP 1998 Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12(10):1438-52.
141. Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, Reinker K, Rimoin DL, Cohn DH, Goodman FR, Reardon W, Patton M, Francomano CA, Warman ML 1999 Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* 21(3):302-4.
142. Takahashi T, Takahashi I, Komatsu M, Sawaishi Y, Higashi K, Nishimura G, Saito H, Takada G 2001 Mutations of the NOG gene in individuals with proximal symphalangism and multiple synostosis syndrome. *Clin Genet* 60(6):447-51.
143. Mangino M, Flex E, Digilio MC, Giannotti A, Dallapiccola B 2002 Identification of a novel NOG gene mutation (P35S) in an Italian family with symphalangism. *Hum Mutat* 19(3):308.
144. Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, Reissner C, Kerr B, Wilkie AO, Mundlos S 2007 A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am J Hum Genet* 81(2):388-96.
145. Brunet LJ, McMahan JA, McMahan AP, Harland RM 1998 Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280(5368):1455-7.
146. Gaggero E, Gangji V, Canalis E 1998 Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J Clin Invest* 102(12):2106-14.

147. Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E 2003 Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 144(5):1972-8.
148. Wan DC, Pomerantz JH, Brunet LJ, Kim JB, Chou YF, Wu BM, Harland R, Blau HM, Longaker MT 2007 Noggin suppression enhances in vitro osteogenesis and accelerates in vivo bone formation. *J Biol Chem* 282(36):26450-9.
149. Shum L, Coleman CM, Hatakeyama Y, Tuan RS 2003 Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2):102-22.
150. Kronenberg HM 2003 Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423(6937):332-6.
151. Reddi AH 1998 Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16(3):247-52.
152. Yoon BS, Lyons KM 2004 Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93(1):93-103.
153. Wuelling M, Vortkamp A 2010 Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* 25(4):625-31.
154. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M 2005 Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75(3):237-48.
155. Marsell R, Einhorn TA 2011 The biology of fracture healing. *Injury* 42(6):551-5.
156. Tsuji K, Cox K, Gamer L, Graf D, Economides A, Rosen V Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair. *J Orthop Res* 28(3):384-9.
157. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA 2002 Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17(3):513-20.
158. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA 2008 Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87(2):107-18.
159. Mountziaris PM, Mikos AG 2008 Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 14(2):179-86.
160. Marsell R, Einhorn TA 2009 The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 40 Suppl 3:S4-7.
161. Witte F, Bernatik O, Kirchner K, Masek J, Mahl A, Krejci P, Mundlos S, Schambony A, Bryja V, Stricker S 2010 Negative regulation of Wnt signaling mediated by CK1-phosphorylated Dishevelled via Ror2. *Faseb J* 24(7):2417-26.
162. Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA, Fallon JF 2001 Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 236(2):421-35.
163. Kraus P, Fraidenraich D, Loomis CA 2001 Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech Dev* 100(1):45-58.
164. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M 1996 Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14(3):357-60.
165. Lettice LA, Hill RE 2005 Preaxial polydactyly: a model for defective long-range regulation in congenital abnormalities. *Curr Opin Genet Dev* 15(3):294-300.
166. Sun M, Ma F, Zeng X, Liu Q, Zhao XL, Wu FX, Wu GP, Zhang ZF, Gu B, Zhao YF, Tian SH, Lin B, Kong XY, Zhang XL, Yang W, Lo WH, Zhang X 2008 Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic

- duplications involving the long range, limb-specific SHH enhancer. *J Med Genet* 45(9):589-95.
167. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ 1996 Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273(5275):613-22.
  168. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP 1999 Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13(16):2072-86.
  169. Gao B, Guo J, She C, Shu A, Yang M, Tan Z, Yang X, Guo S, Feng G, He L 2001 Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* 28(4):386-8.
  170. Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, Mortier GR 2003 Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet* 72(4):1040-6.
  171. Byrnes AM, Racacho L, Grimsey A, Hudgins L, Kwan AC, Sangalli M, Kidd A, Yaron Y, Lau YL, Nikkel SM, Bulman DE 2009 Brachydactyly A-1 mutations restricted to the central region of the N-terminal active fragment of Indian Hedgehog. *Eur J Hum Genet* 17(9):1112-20.
  172. Mak KK, Bi Y, Wan C, Chuang PT, Clemens T, Young M, Yang Y 2008 Hedgehog signaling in mature osteoblasts regulates bone formation and resorption by controlling PTHrP and RANKL expression. *Dev Cell* 14(5):674-88.
  173. Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung UI 2008 Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14(5):689-99.
  174. Long F, Chung UI, Ohba S, McMahon J, Kronenberg HM, McMahon AP 2004 Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131(6):1309-18.
  175. Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH 1991 GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352(6335):539-40.
  176. Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, Patel UC, Rossier C, Engel H, Bottani A, Chandal D, Blouin JL, Solanki JV, Grzeschik KH, Antonarakis SE 1999 The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* 65(3):645-55.
  177. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C 2005 Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8(5):727-38.
  178. ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E, Nusse R 2008 Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell* 3(5):508-18.
  179. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB 2005 Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 280(39):33132-40.
  180. Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B 2004 Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18(9):1072-87.

181. Zhong N, Gersch RP, Hadjiargyrou M 2006 Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone* 39(1):5-16.
182. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y 2005 Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8(5):739-50.
183. Verheyen EM, Gottardi CJ 2010 Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn* 239(1):34-44.
184. Nalesso G, Sherwood J, Bertrand J, Pap T, Ramachandran M, De Bari C, Pitzalis C, Dell'accio F WNT-3A modulates articular chondrocyte phenotype by activating both canonical and noncanonical pathways. *J Cell Biol* 193(3):551-64.
185. Liu F, Kohlmeier S, Wang CY 2008 Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* 20(6):999-1009.
186. Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, Niehrs C 2007 Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316(5831):1619-22.
187. Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh JC, He X 2008 Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135(2):367-75.
188. Balemans W, Piters E, Cleiren E, Ai M, Van Wesenbeeck L, Warman ML, Van Hul W 2008 The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations. *Calcif Tissue Int* 82(6):445-53.
189. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stanek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C 2002 Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417(6889):664-7.
190. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M 1998 Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94(1):109-18.
191. Zhu S, Liu L, Korzh V, Gong Z, Low BC 2006 RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal* 18(3):359-72.
192. Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S 1999 A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126(6):1211-23.
193. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Muller U 2004 Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74(3):558-63.
194. Kato M, Patel MS, Lévassé R, Lobov I, Chang BH, Glass DA, 2nd, Hartmann C, Li L, Hwang TH, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L 2002 Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157(2):303-14.
195. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van

- den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML 2001 LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107(4):513-23.
196. Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J 2003 Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 130(5):1003-15.
  197. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G 2006 Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 21(6):934-45.
  198. Niswander L, Tickle C, Vogel A, Booth I, Martin GR 1993 FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell* 75(3):579-87.
  199. Yoon BS, Pogue R, Ovchinnikov DA, Yoshii I, Mishina Y, Behringer RR, Lyons KM 2006 BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. *Development* 133(23):4667-78.
  200. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A 2002 Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3(3):439-49.
  201. Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, de Crombrughe B 2004 Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev* 18(3):290-305.
  202. Boulet AM, Moon AM, Arenkiel BR, Capecchi MR 2004 The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* 273(2):361-72.
  203. Baldrige D, Shchelochkov O, Kelley B, Lee B Signaling pathways in human skeletal dysplasias. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:189-217.
  204. Dawson K, Seeman P, Sebald E, King L, Edwards M, Williams J, 3rd, Mundlos S, Krakow D 2006 GDF5 is a second locus for multiple-synostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 78(4):708-12.
  205. Everman DB, Bartels CF, Yang Y, Yanamandra N, Goodman FR, Mendoza-Londono JR, Savarirayan R, White SM, Graham JM, Jr., Gale RP, Svarch E, Newman WG, Kleckers AR, Francomano CA, Govindaiah V, Singh L, Morrison S, Thomas JT, Warman ML 2002 The mutational spectrum of brachydactyly type C. *Am J Med Genet* 112(3):291-6.
  206. Faiyaz-Ul-Haque M, Faqeih EA, Al-Zaidan H, Al-Shammary A, Zaidi SH 2008 Grebe-type chondrodysplasia: a novel missense mutation in a conserved cysteine of the growth differentiation factor 5. *J Bone Miner Metab* 26(6):648-52.
  207. Ploger F, Seemann P, Schmidt-von Kegler M, Lehmann K, Seidel J, Kjaer KW, Pohl J, Mundlos S 2008 Brachydactyly type A2 associated with a defect in proGDF5 processing. *Hum Mol Genet* 17(9):1222-33.
  208. Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K, Stricker S, Pohl J, Ploger F, Staub E, Nickel J, Sebald W, Knaus P, Mundlos S 2005 Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 115(9):2373-81.
  209. Thomas JT, Lin K, Nandedkar M, Camargo M, Cervenka J, Luyten FP 1996 A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat Genet* 12(3):315-7.
  210. Wang X, Xiao F, Yang Q, Liang B, Tang Z, Jiang L, Zhu Q, Chang W, Jiang J, Jiang C, Ren X, Liu JY, Wang QK, Liu M 2006 A novel mutation in GDF5 causes autosomal dominant symphalangism in two Chinese families. *Am J Med Genet A* 140A(17):1846-53.

211. Yang W, Cao L, Liu W, Jiang L, Sun M, Zhang D, Wang S, Lo WH, Luo Y, Zhang X 2008 Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydactyly type C and proximal symphalangism. *J Hum Genet* 53(4):368-74.
212. Aono A, Hazama M, Notoya K, Taketomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S, Fujisawa Y 1995 Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3):670-7.
213. Bryja V, Gradl D, Schambony A, Arenas E, Schulte G 2007 Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(16):6690-5.
214. Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T, Olson EN 1992 Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol Cell Biol* 12(9):3665-77.
215. Yee SP, Rigby PW 1993 The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes Dev* 7(7A):1277-89.
216. Karamboulas K, Dranse HJ, Underhill TM 2010 Regulation of BMP-dependent chondrogenesis in early limb mesenchyme by TGFbeta signals. *J Cell Sci* 123(Pt 12):2068-76.
217. Frolik CA, Wakefield LM, Smith DM, Sporn MB 1984 Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor-beta in normal rat kidney fibroblasts. *J Biol Chem* 259(17):10995-1000.
218. Akarsu A, Rezale, T, Demirtas, M, Farhud, D D, Sarfarazi, M 1999 Multiple synostosis type 2 (SYNS2) maps to 20q11.2 and caused by a missense mutation in the growth/ differentiation factor 5 (GDF5). *Am J Hum Genet Suppl* 65 A 281.
219. Kirsch T, Nickel J, Sebald W 2000 BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *Embo J* 19(13):3314-24.
220. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B 2002 The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108(1):17-29.
221. Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T 2010 Dual roles of smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 285(20):15577-86.
222. Sun L, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL 2005 Ubiquitin-proteasome-mediated degradation, intracellular localization, and protein synthesis of MyoD and Id1 during muscle differentiation. *J Biol Chem* 280(28):26448-56.
223. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G 1997 *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89(5):747-54.
224. Karsenty G 2008 Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9:183-96.
225. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T 1997 Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89(5):755-64.
226. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ 1997 *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89(5):765-71.



227. Retting KN, Song B, Yoon BS, Lyons KM 2009 BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. *Development* 136(7):1093-104.
228. Stanton LA, Sabari S, Sampaio AV, Underhill TM, Beier F 2004 p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *Biochem J* 378(Pt 1):53-62.
229. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC 2000 Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20(23):8783-92.
230. Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T 1999 Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn* 214(4):279-90.
231. Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S 1999 Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80(2):159-70.
232. Roach HI 1999 Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem J* 31(1):53-61.
233. Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS 1977 Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol* 60(1):69-82.
234. Yang Y 2009 Growth and patterning in the limb: signaling gradients make the decision. *Sci Signal* 2(53):pe3.
235. Seemann P, Brehm A, Konig J, Reissner C, Stricker S, Kuss P, Haupt J, Renninger S, Nickel J, Sebald W, Groppe JC, Ploger F, Pohl J, Schmidt-von Kegler M, Walther M, Gassner I, Rusu C, Janecke AR, Dathe K, Mundlos S 2009 Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS Genet* 5(11):e1000747.
236. Kjaer KW, Eiberg H, Hansen L, van der Hagen CB, Rosendahl K, Tommerup N, Mundlos S 2006 A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *J Med Genet* 43(3):225-31.
237. Lehmann K, Seemann P, Boergemann J, Morin G, Reif S, Knaus P, Mundlos S 2006 A novel R486Q mutation in BMPRII resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur J Hum Genet* 14(12):1248-54.
238. Song K, Krause C, Shi S, Patterson M, Suto R, Grgurevic L, Vukicevic S, van Dinter M, Falb D, Ten Dijke P, Alaoui-Ismaili MH 2010 Identification of a key residue mediating bone morphogenetic protein (BMP)-6 resistance to noggin inhibition allows for engineered BMPs with superior agonist activity. *J Biol Chem* 285(16):12169-80.
239. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H 1990 The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61(1):49-59.
240. Namiki M, Akiyama S, Katagiri T, Suzuki A, Ueno N, Yamaji N, Rosen V, Wozney JM, Suda T 1997 A kinase domain-truncated type I receptor blocks bone morphogenetic protein-2-induced signal transduction in C2C12 myoblasts. *J Biol Chem* 272(35):22046-52.
241. Erlacher L, McCartney J, Piek E, ten Dijke P, Yanagishita M, Oppermann H, Luyten FP 1998 Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *J Bone Miner Res* 13(3):383-92.
242. Yi SE, Daluiski A, Pederson R, Rosen V, Lyons KM 2000 The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development* 127(3):621-30.

243. Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Suring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Muller D, Knaus P, Nurnberg P, Mundlos S 2003 Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12277-82.
244. Dixon ME, Armstrong P, Stevens DB, Bamshad M 2001 Identical mutations in NOG can cause either tarsal/carpal coalition syndrome or proximal symphalangism. *Genet Med* 3(5):349-53.
245. Francis-West PH, Abdelfattah A, Chen P, Allen C, Parish J, Ladher R, Allen S, MacPherson S, Luyten FP, Archer CW 1999 Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development* 126(6):1305-15.
246. Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ 1994 Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 368(6472):639-43.
247. Lyons KM, Pelton RW, Hogan BL 1990 Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development* 109(4):833-44.
248. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A 1999 Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev Biol* 209(2):239-53.
249. Zhang H, Bradley A 1996 Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122(10):2977-86.
250. Solloway MJ, Dudley AT, Bikoff EK, Lyons KM, Hogan BL, Robertson EJ 1998 Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 22(4):321-39.
251. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC 2003 Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am* 85-A(8):1544-52.
252. Kang Q, Sun MH, Cheng H, Peng Y, Montag AG, Deyrup AT, Jiang W, Luu HH, Luo J, Szatkowski JP, Vanichakarn P, Park JY, Li Y, Haydon RC, He TC 2004 Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther* 11(17):1312-20.
253. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G 2007 Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130(3):456-69.
254. Ducy P 2000 Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219(4):461-71.
255. Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ 2006 Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet* 2(12):e216.
256. Lee HJ, Koh JM, Hwang JY, Choi KY, Lee SH, Park EK, Kim TH, Han BG, Kim GS, Kim SY, Lee JY 2009 Association of a RUNX2 promoter polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Calcif Tissue Int* 84(6):439-45.
257. Knapp JR, Davie JK, Myer A, Meadows E, Olson EN, Klein WH 2006 Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. *Development* 133(4):601-10.
258. Gamer LW, Tsuji K, Cox K, Capelo LP, Lowery J, Beppu H, Rosen V 2011 BMPR-II is dispensable for formation of the limb skeleton. *Genesis* 49(9):719-24.
259. Isaacs MJ, Kawakami Y, Allendorph GP, Yoon BH, Izipisua Belmonte JC, Choe S Bone Morphogenetic Protein-2 and -6 Heterodimer Illustrates the Nature of Ligand-Receptor Assembly. *Mol Endocrinol*.

260. Edgar CM, Chakravarthy V, Barnes G, Kakar S, Gerstenfeld LC, Einhorn TA 2007 Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone* 40(5):1389-98.
261. Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M 2008 Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320(5876):667-70.
262. Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC 2005 Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell* 19(2):159-70.
263. Aragon E, Goerner N, Zaromytidou AI, Xi Q, Escobedo A, Massague J, Macias MJ 2011 A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev* 25(12):1275-88.
264. Ohyama Y, Nifuji A, Maeda Y, Amagasa T, Noda M 2004 Spatiotemporal association and bone morphogenetic protein regulation of sclerostin and osterix expression during embryonic osteogenesis. *Endocrinology* 145(10):4685-92.
265. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Winkler DG, Latham JA 2004 Unique regulation of SOST, the sclerosteosis gene, by BMPs and steroid hormones in human osteoblasts. *Bone* 35(2):448-54.
266. van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Lowik CW 2007 Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res* 22(1):19-28.
267. Pohl TL, Boergemann JH, Schwaerzer GK, Knaus P, Cavalcanti-Adam EA 2011 Surface immobilization of bone morphogenetic protein 2 via a self-assembled monolayer formation induces cell differentiation. *Acta Biomater*.

# 11. Anhang

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Struktur des BMP2- und des GDF5-Dimers gebunden an BMPRI .....	12
Abb. 1.2 BMP2-BMPRIA-Interaktionsflächen.....	17
Abb. 1.3 BMP2-ActRII-Interaktionsflächen.....	18
Abb. 1.4 Schema der BMP2-abhängigen Signaltransduktion.....	21
Abb. 1.5 Phänotypen von Patienten mit Sklerosteose oder dem Van Buchem-Syndrom .....	28
Abb. 1.6 BMP7-Noggin-Komplex.....	29
Abb. 1.7 Symphalangismus und SYNS als Folge von Mutationen im humanen <i>Noggin</i> .....	30
Abb. 1.8 Entwicklung der Extremitäten vom undifferenziertem Mesenchym zu den knorpeligen Vorläufern der Extremitäten .....	32
Abb. 1.9 Endochondrale Ossifikation .....	33
Abb. 1.10 Der kanonische Weg bzw. Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg.....	37
Abb. 3.1 p-Myg-Luc .....	48
Abb. 4.1 Mutationen im <i>GDF5</i> .....	62
Abb. 4.2 GDF5-S94N induziert eine verringerte Smad-Phosphorylierung.....	65
Abb. 4.3 GDF5-S94N vermindert die nukleäre Akkumulation von Smad 1 .....	65
Abb. 4.4 GDF5-Mutanten induzieren eine verzögerte Smad-Translokation in den Nukleus.....	66
Abb. 4.5 Die Smad-abhängige Transkription ist nach Stimulation mit GDF5-S94N stark reduziert .....	68
Abb. 4.6 Die Überexpression von BMPRIIB oder BMPRII kompensiert den Bindungsverlust der GDF5-Mutanten zum jeweiligen Rezeptor.....	69
Abb. 4.7 Die Überexpression von BMPRIIB oder BMPRII verbessert die Smad-abhängige transkriptionelle Aktivität der Mutanten .....	70
Abb. 4.8 GDF5-S94N induziert eine verzögerte p38 MAPK-Phosphorylierung.....	73
Abb. 4.9 Die GDF5-Mutanten können die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben nicht inhibieren... 75	
Abb. 4.10 Die GDF5-Mutanten haben unterschiedliche Einflüsse auf die myogene Differenzierung von C2C12-Zellen.....	76
Abb. 4.11 Die GDF5-Mutanten beeinträchtigen die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten.....	77
Abb. 4.12 Die GDF5-Mutanten GDF5-S94N und GDF5-PKD beeinträchtigen die Reifung der ATDC5-Zellen.....	79
Abb. 4.13 GDF5-S94N fördert die Produktion von extrazellulärer Matrix .....	81
Abb. 4.14 GDF5-S94N treibt die chondrogene Differenzierung der Micromass-Zellen voran.....	83
Abb. 4.15 GDF5-S94N reduzierte die Expression von Sclerostin und das RANKL/Opg-Verhältnis nicht.....	85
Abb. 4.16 GDF5-S94N interagiert mit dem C-terminalen Bereich des Noggin-Clips.....	86
Abb. 4.17 GDF5-S94N ist resistent gegen die Inhibierung durch Noggin.....	88
Abb. 4.18 GDF5-S94N induziert chondrogene Differenzierung von Micromass-Zellen in Gegenwart von Noggin.....	89
Abb. 5.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem BMP2 und GDF5 .....	92
Abb. 5.2 Die Noggin-Resistenz des GDF5-S94N während der Extremitäten-Entwicklung verursacht das Multiple Synostoses Syndrom (SYNS).....	104
Abb. 6.1 Die Mutationen BMP2-L51P und BMP2-S85R/A86P im BMP2 .....	107
Abb. 6.2 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P verhindern die Smad 1-Translokation.....	109
Abb. 6.3 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P verhindern die nukleäre Translokation von Smad 1 .....	110
Abb. 6.4 Die Überexpression von BMPRIIB oder BMPRII verbesserte geringfügig die Aktivierung des Smad-abhängigen Signalweges in den BMP2-L51P/S85R/A86P-stimulierten Zellen.....	111
Abb. 6.5 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P können den p38 MAPK Signalweg nicht aktivieren.....	113
Abb. 6.6 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P können die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Myotuben nicht inhibieren .....	114
Abb. 6.7 BMP2-L51P und BMP2-L51P/S85R/A86P verhindern die Differenzierung von C2C12-Zellen zu Osteoblasten .....	115
Abb. 6.8 Darstellung der Mutationen BMP2- S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D im BMP2 <sub>AB</sub> -Dimer ..	117
Abb. 6.9 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzieren die C-terminale Smad-Phosphorylierung über einen längeren Zeitraum.....	119
Abb. 6.10 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D induzieren eine mit BMP2 Wildtyp vergleichbare Phosphorylierung des Smad-Linkers.....	120
Abb. 6.11 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Smad-abhängige Transkription .....	121
Abb. 6.12 BMP2-S85R/A86P fördert die Smad-Translokation in den Nukleus.....	123

Abb. 6.13 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D fördern die Aktivierung von p38.....	125
Abb. 6.14 BMP2-L100K/N102D fördert die Differenzierung der C2C12-Zellen zu Osteoblasten.....	126
Abb. 6.15 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D sind durch Noggin-inhibierbare Super-Agonisten .	128
Abb. 6.16 Analyse der osteoblast-spezifischen Markergene in MC3T3-E1-Zellen.....	130
Abb. 6.17 BMP2-S85R/A86P und BMP2-L100K/N102D treiben die Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen voran.....	131
Abb. 9.1 Zeitabhängige Phosphorylierung der Kinasen und sequentielle Phosphorylierung von Smad 1 .....	145
Abb. 9.2 MAP-Kinase- und GSK3-Inhibitoren fördern die nukleäre Akkumulation von Smad 1 .....	146
Abb. 9.3 Phosphorylierung von Akt und GSK3 $\beta$ .....	147
Abb. 9.4 Smad 1 ist trotz Phosphorylierung des „Smad-Linkers“ im Nukleus nachweisbar .....	148
Abb. 9.5 Nachweis der mit [ <sup>125</sup> Iod]-BMP2 und [ <sup>125</sup> Iod]-Sclerostin interagierenden Proteine .....	150
Abb. 9.6 Sclerostin inhibiert nicht die durch BMP2 oder Wnt3a induzierte Reporter-gen-Aktivität.....	151
Abb. 9.7 Sclerostin inhibiert nicht die durch BMP2 oder Wnt3a induzierte ALP-Aktivität.....	152

## Abkürzungsverzeichnis

<b>α</b>	anti-	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>AA</b>	Acrylamid	<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>L-Gln</b>	L-Glutamin
<b>ALP</b>	Alkalische Phosphatase	<b>Luc</b>	Luciferase
<b>AK</b>	Antikörper	<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>μ</b>	mikro
<b>BAA</b>	Bis-Acrylamid	<b>m</b>	milli
<b>BCA</b>	Bichinonsäure	<b>M</b>	Mol
<b>BISC</b>	BMP induced signaling complex	<b>MEK/</b>	MAP Kinase Kinase
		<b>MKK</b>	
<b>BMP</b>	Bone Morphogenetic Protein	<b>min</b>	Minute
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>n</b>	nano
<b>BMPRI</b>	BMP-Rezeptor Typ I	<b>Neo</b>	Neomycin
<b>BMPRIA</b>	BMP-Rezeptor Typ IA	<b>n.d.</b>	nicht detektierbar
<b>BMPRIB</b>	BMP-Rezeptor Typ IB	<b>p-</b>	Phospho-
<b>BMPRII</b>	BMP-Rezeptor Typ II	<b>p</b>	piko
<b>BRE</b>	BMP-Response-Element	<b>PAA</b>	Polyacrylamidgel
<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>cDNA</b>	complementary DNA, komplementäre DNA	<b>PBS</b>	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus	<b>PFC</b>	preformed complex
<b>Da</b>	Dalton	<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure	<b>sec</b>	Sekunde
<b>ds</b>	double stranded, doppelsträngig	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>ECL</b>	enhanced chemiluminescence	<b>ssDNA</b>	einzelsträngige DNA
<b>ERK</b>	Extracellular Signal-Regulated Kinase	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>ES-Zellen</b>	embryonale Stammzellen	<b>TAB</b>	TAK Binding Protein
<b>FACS</b>	Fluorescent Activated Cell Sorter	<b>TAK</b>	TGFβ activated kinase
<b>FCS</b>	fetal calf serum, fötales Kälberserum	<b>U</b>	Units
<b>gam</b>	goat anti mouse	<b>ü. N.</b>	über Nacht
<b>garb</b>	goat anti rabbit	<b>ÜNK</b>	Übernachtkultur
<b>GDF</b>	Growth and Differentiation Factor	<b>ÜTK</b>	Übertagkultur
<b>Gent</b>	Gentamycin	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>GFP</b>	green fluorescent protein	<b>V</b>	Volt
<b>h</b>	Stunde	<b>v/v</b>	Volumen /Totalvolumen
<b>HA</b>	Hämagglutinin	<b>WB</b>	Western Blot
<b>JNK</b>	c-Jun-N-terminal Kinase	<b>w/v</b>	Gewicht/Totalvolumen
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	<b>XIAP</b>	X-chromosome linked inhibitor of apoptosis

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Funktionen ausgewählter BMPs sowie Phänotypen der „knock out“-Mäuse und humane Phänotypen .	13
Tab. 1.2 Funktionen der BMP-Rezeptoren sowie Phänotypen der „knock out“-Mäuse und humane Phänotypen	15
Tab. 1.3 Affinitäten von BMP2 und GDF5 zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren .....	19
Tab. 1.4 Affinitäten von BMP2, BMP6, BMP7 zu den BMP-Rezeptoren.....	19
Tab. 1.5 Phänotypen der „knock out“-Mäuse von R-Smads 1/5/8 und Smad 4.....	23
Tab. 1.6 Die Familien der BMP-Antagonisten.....	27
Tab. 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	41
Tab. 3.2 Chemikalien.....	43
Tab. 3.3 Kits.....	45
Tab. 3.4 Enzyme .....	45
Tab. 3.5 Primer für die qPCR.....	45
Tab. 3.6 DNA- und Protein-Größenstandards.....	46
Tab. 3.7 Vektoren.....	47
Tab. 3.8 Eukaryotische Expressions-Konstrukte .....	47
Tab. 3.9 Verwendete Zelllinien.....	48
Tab. 3.10 Verwendete Reagenzien für die Zellkultur .....	49
Tab. 3.11 Rekombinante Proteine.....	49
Tab. 3.12 primäre Antikörper.....	50
Tab. 3.13 sekundäre Antikörper.....	51
Tab. 3.14 Bedingungen für die Kultivierung verschiedener Zelllinien .....	54
Tab. 3.15 Transfektion der Zellen.....	55
Tab. 3.16 Bestandteile des Polyacrylamid-Gels.....	59
Tab. 4.1 Affinitäten der GDF5-Mutanten zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren.....	63
Tab. 4.2 Affinitäten der GDF5-Mutanten zum immobilisierten BMP-Antagonisten Noggin.....	87
Tab. 6.1 Affinitäten von BMP2 und den BMP2-Mutanten zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren.....	108
Tab. 6.2 Bindungsaffinitäten von BMP2 und den BMP2-Mutanten zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren.	117
Tab. 6.3 Affinitäten von BMP2 und BMP6 zu den immobilisierten BMP-Rezeptoren.....	118

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Petra Knaus, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Ihr danke ich außerdem für die Motivation, ihre Zeit und Diskussionsbereitschaft sowie für die Freiheit, die eigenen Ideen ausprobieren zu dürfen.

Prof. Dr. Barbara Munz danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Bei Dr. Heinrich Schrewe bedanke ich mich für die schnelle und unkomplizierte Unterstützung bei den Micromass-Versuchen sowie die wissenschaftlich wertvollen Diskussionen. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Thomas Müller für die Hilfen und Diskussionen über die Strukturdaten von BMP2, GDF5 und Noggin. Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Walter Sebald und Dr. Joachim Nickel für die SPR-Messungen sowie die Bereitstellung von BMP2- und GDF5-Mutanten. Dr. Frank Plöger und der Firma Biopharm danke ich für das Überlassen von GDF5 und der GDF5-S94N-Mutante.

Mein Dank gilt insbesondere auch den ehemaligen Kollegen Dr. Luiza Bengtsson, Dr. Christina Sieber und Dr. Raphaela Schwappacher für die nachhaltige Unterstützung, ihre Motivation und ihren wissenschaftlichen Rat. Darüber hinaus danke ich Dr. Christina Sieber für ihre unermüdliche IT-Unterstützung und die hierfür erforderliche Geduld. Dr. Raphaela Schwappacher möchte ich ganz herzlich für ihre Anleitung beim wissenschaftlichen Arbeiten, ihre unermüdliche Unterstützung und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Knaus danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und Unterstützung unterschiedlichster Art: Sofia Banchenko, Raghu Bhushan, Jessica Kopf und Christian Hiepen, meinen direkten Labornachbarn Asja Guzman und Agniezka Denkis, Katharina Hoffmann, Mohammad Poorgholi Belverdi, Neil Meshraqi, Jessica Becker, Eva Heining, Daniel Horbelt, Jan Börgermann, Gisela Wendel, Sonja Niedrig, Dr. Darja Obradovic Wagner, Isabel Casanova, Sandra Paschkowsky und Felix Wiggers. Bedanken möchte ich mich auch für die großartige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Giampiero Bandini und Hermann Bayer sowie meiner Mitarbeitsstudentin Helena Matschke und Praktikantin Charlotte Jores.

Mein Dank gilt auch meinen Eltern für ihre Unterstützung.



## Publikationen

**Schwaerzer GK**, Hiepen C, Schrewe H, Nickel J, Ploeger F, Sebald W, Mueller T, Knaus P.

*“New Insights into the Molecular Mechanism of Multiple Synostoses Syndrome (SYNS): Mutation within the GDF5 Knuckle Epitope Causes Noggin-Resistance.”*

Journal of Bone and Mineral Research, published online: since 2011 Oct 4<sup>th</sup>; doi: 10.1002/jbmr.532.

Pohl TLM, Boergemann JH, **Schwaerzer GK**, Knaus P, Cavalcanti-Adam, EA.

*“Surface Immobilization of Bone Morphogenetic Protein 2 via Self-assembled Monolayer Induces Cell Differentiation.”*

Acta Biomaterialia, published online: since 2011 Oct 20<sup>th</sup>.

Hauhuber A, von Einem S, **Schwaerzer GK**, Buttstedt A, Zebisch M, Schräml M, Hortschansky P, Knaus P, Schwarz E.

*“The Pro-Form of BMP-2 Interferes with BMP-2 Signalling by Competing with BMP-2 for IA Receptor Binding.”*

The FEBS Journal, 2009, 276 (21), 6386–6398.

**Schwaerzer GK**, Kopf J, Hiepen C, Schwappacher R, Sieber C, Knaus P.

*“Determination of the BMP/GDF Epitopes Essential for Induction of Smad-dependent and Smad-Independent Signalling.”*

Published Poster abstract: European Journal of Cell Biology, 2009, 88S1, Suppl. 59.

Sieber C, **Schwaerzer GK**, Knaus P.

*“BMP Signaling is Fine Tuned on Multiple Levels.”*

Book: Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics.

Progress in Inflammation Research 2008, Birkhäuser.

ISBN 978-3-7643-8551-4.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst und nur unter Nutzung der genannten Literatur sowie der aufgeführten Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Berlin, im Dezember 2011

---

Gerburg Schwärzer