

Aus dem CharitéCentrum  
für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik  
Institut für Medizinische Genetik  
Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Mundlos

## **Habilitationsschrift**

# **Molekulare Ursachen isolierter Handfehlbildungen am Beispiel des BMP-Signalwegs und von SHH**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Humangenetik

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Katarina Dathe

Eingereicht: November 2009  
Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach  
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Meitinger

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Einteilung isolierter Handfehlbildungen	5
1.2	Klassifikation der Brachydaktylien	7
1.3	Identifikation von Mutationen	11
1.4	Charakterisierung identifizierter Mutationen an ausgewählten Modellen	13
1.5	Der BMP-Signalweg und dessen Bedeutung in der Handentwicklung	15
1.6	Mechanismen der Genregulation durch <i>cis</i> -aktivierte Steuerungselemente	18
<b>2.</b>	<b>Originalarbeiten</b>	<b>21</b>
2.1	Heterozygote Mutationen in <i>BMPR1B</i> führen zur Brachydaktylie Typ A2	21
2.2	Die Mutation p.R486Q in <i>BMPR1B</i> resultiert in zwei verschiedenen Phänotypen, der Brachydaktylie Typ C mit proximalem Symphalangismus und der Brachydaktylie Typ A2	29
2.3	Mutationen in dem BMP Antagonisten <i>NOGGIN</i> verursachen Brachydaktylie Typ B2	38
2.4	Die Duplikation eines extremitätenspezifischen <i>cis</i> -regulatorischen Elementes für <i>BMP2</i> führt zu Brachydaktylie Typ A2	49
2.5	Eine die ZRS umfassende Mikroduplikation bedingt eine Form der Polysyndaktylie mit triphalangealem Daumen	61
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
3.1	Mutationen in Molekülen des BMP-Signalwegs als Ursache von Brachydaktylien	69
3.1.1	<i>GDF5</i>	70
3.1.2	<i>BMPR1B</i>	71
3.1.3	<i>NOG</i>	71
3.1.4	<i>ROR2</i>	73
3.2	Homozygote Mutationen in <i>GDF5</i> und <i>BMPR1B</i> sind mit Skelettdysplasien assoziiert	74

3.3	Dysregulation von <i>SHH</i> und <i>BMP2</i> als Ursache isolierter Handfehlbildungen	76
3.3.1	<i>SHH</i>	77
3.3.2	<i>BMP2</i>	78
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis aus dem freien Text</b>	<b>84</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>89</b>
	<b>Erklärung gemäß der Habilitationsordnung der Charité</b>	<b>90</b>

## Abkürzungen

Array-CGH	Array-comparative genomic hybridization
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor 1A
BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor 1B
cM	Centimorgan
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GDF	Growth differentiation factor
GDF5	Growth differentiation factor 5
kb	Kilobasen
MAP	Mitogen-activated protein
Mb	Megabasen
MIM	Mendelian Inheritance in Man, als Online-Datenbank: OMIM
NOG	Noggin
qPCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RCAS	Replication competent avian sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
ROR2	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
SHH	Sonic hedgehog
SMAD	Kombination aus: mothers against decapentaplegic (mad), Drosophila und sma-Protein, Caenorhabditis elegans
SYM1	Proximaler Symphalangismus
SYNS1	Multiples Synostosensyndrom
TCC	Tarsales-Carpales Fusions- („coalition“) Syndrom
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZPA	Zone polarisierender Aktivität
ZRS	ZPA regulierende Sequenz

# 1. Einleitung

## 1.1 Einteilung isolierter Handfehlbildungen

Angeborene Extremitäten- und Handfehlbildungen sind in der humangenetischen Praxis häufig anzutreffen. Sie sind Folge einer Störung in der frühen Embryogenese. Die Entwicklung der Extremitäten beim Embryo beginnt, nachdem die Primärachse angelegt ist. Die Extremitätenknospen der oberen und unteren Extremitäten, die aus einem mesenchymalen Kern und aus einer äußeren Schicht ektodermaler Zellen bestehen, bilden sich symmetrisch an beiden Seiten aus. In der humanen Embryogenese findet dies zu Beginn der 5. Woche nach der Befruchtung statt. Das Wachstum der Extremitäten wird durch die am distalen Ende der Extremitätenknospe lokalisierte Randleiste induziert.

Die Entwicklung der Extremitäten verläuft entlang dreier definierter Achsen. Die proximo-distale Achse definiert das Längenwachstum von körpernah nach distal. Die Asymmetrie in der Musterbildung von Daumen und Finger erfolgt entlang der antero-posterioren Achse und die Ausbildung von Handrücken- und Handinnenfläche über die dorso-ventrale Achse. Die einzelnen Finger- und Zehenstrahlen entstehen durch programmierte Apoptose von Zellen der Randleiste und im Bereich der zukünftigen Interdigitalregionen; zeitgleich wachsen die fünf definierten Strahlen aus. Am 56. Embryonaltag sind die Finger bereits vollständig getrennt. Dieser komplexe Entwicklungsprozess reagiert äußerst sensibel auf einwirkende Störungen, die je nach dem Zeitpunkt der Einwirkung zu unterschiedlichen klinischen Auswirkungen führen.

Handfehlbildungen können genetisch oder durch den Einfluss exogener Faktoren nicht genetisch bedingt sein. Während sich genetisch bedingte Malformationen der Extremitäten, in variabler Ausprägung, in der Regel symmetrisch manifestieren, liegen nicht genetische Fehlbildungen meist einseitig vor.

Bestehende Handfehlbildungen werden zunächst klinisch charakterisiert. Hierbei werden die Fingerglieder (Phalangen), die Mittelhandknochen (Ossa metacarpalia) und die Handwurzelknochen (Ossa carpalia) hinsichtlich ihrer Anzahl, Größe, Form, Position und Struktur sowie auf knöchernen Fusionen hin beurteilt. Zudem wird die Funktionalität der Fingergelenke und Handgelenke überprüft und auf häutige Verwachsungen (Syndaktylien) sowie Auffälligkeiten an den Fingernägeln geachtet. Neben der klinischen Untersuchung ist die Durchführung einer Röntgendiagnostik in vielen Fällen hilfreich, um die

Beteiligung einzelner knöcherner Strukturen zu bewerten. Da die Hände und Füße in ähnlicher Weise genetisch programmiert werden, sind phänotypische Veränderungen oftmals gleichermaßen an den oberen und unteren Extremitäten zu finden.

Eine umfassende körperliche Untersuchung der Patienten mit Handfehlbildungen ist darüber hinaus wichtig, da weitere klinische Auffälligkeiten bestehen können, deren Vorliegen im Sinne einer komplexen Entwicklungsstörung das Vorliegen eines Syndroms wahrscheinlich erscheinen lässt. Eine Vielzahl von Syndromen wird durch assoziierte Handfehlbildungen erkannt, welche für die Diagnosestellung ein Leitsymptom darstellen.

Anhand der erhobenen klinischen und evtl. radiologischen Befunde erfolgt die Zuordnung der Handfehlbildungen in die folgenden aufgeführten Gruppen. Bei komplexen pathologischen Veränderungen an der Hand sind überlappende Merkmale möglich, die unter Umständen die Einteilung des Phänotyps erschweren.

**Polydaktylie:** Hier finden sich eine überzählige Anzahl von Fingern oder Fingeranlagen. Unterteilt werden die Polydaktylien danach, ob die zusätzlichen Fingeranlagen im Bereich des Daumens (präaxial), zentral (mesoaxial) oder am Kleinfinger (postaxial) lokalisiert sind. Verdopplungen von Unterarmknochen oder Formen der Spiegelbild-Duplikationen von Fingern („mirror hand“) können als komplexe Varianten einer Polydaktylie angesehen werden.

**Syndaktylie:** Die Syndaktylie ist durch ein Zusammenwachsen von Fingern gekennzeichnet. Diese kann entweder als häutige oder knöcherne Syndaktylie vorliegen. Die Variabilität der Merkmalsausbildung ist hoch und reicht von partiellen proximalen häutigen Syndaktylien in den Interdigitalregionen bis hin zu multiplen knöchernen Fusionen verschiedener Fingerstrahlen. Eine Syndaktylie kann zusammen mit einer Polydaktylie auftreten (Polysyndaktylie).

**Triphalangealer Daumen:** Der normalerweise zweigliedrig angelegte Daumen besteht aus drei Gliedern. Oftmals findet man eine präaxiale Polydaktylie assoziiert.

**Oligodaktylie:** Einzelne Finger sind nicht angelegt. Es wird bei der Oligodaktylie unterschieden, ob der präaxiale, mesoaxiale oder postaxiale Anteil betroffen ist. Spalthände (Ektrodaktylien) sind als Resultat einer mesoaxialen Reduktionsfehlbildung zu begreifen. Eine Monodaktylie, die Anlage von nur einem Finger bzw. Fingerrudiment, stellt die Maximalvariante dar.

**Brachydaktylie:** Einzelne Finger sind auf Grund von fehlenden oder hypoplastischen Phalangen verkürzt. Nach dem Muster der betroffenen Phalangen wird unterschieden zwischen den Typen A bis E. Bei dem Typ E findet man zudem einige der Ossa metacarpalia verkürzt.

**Symphalangismus:** Es bestehen Fusionen in den proximalen oder distalen Interdigitalgelenken. Die Finger können in den betroffenen Gelenken nicht gebeugt werden.

Für betroffene Personen mit Handfehlbildungen oder deren Familienangehörige sind meist die Zuordnung der bestehenden Störung zu einer Diagnose und eine Aussage zur Wiederholungswahrscheinlichkeit bei Nachkommen wichtig. Für nicht genetische Fehlbildungen besteht ein Wiederholungsrisiko von 1-5%, welches abhängig von der zugrunde liegenden Störung ist und ggf. im Einzelfall näher bestimmt werden kann. Durch die Erhebung eines Familienstammbaumes bei einem familiären Auftreten der Fehlbildung können Hinweise auf die Vererbung des Merkmals gewonnen werden. Bei den genetisch bedingten Handfehlbildungen müssen alle Mendel'schen Erbgänge in Betracht gezogen werden; hinzu kommen desweiteren chromosomale Aberrationen als mögliche Ursache für Handfehlbildungen. Auf diese Grundlage stützen sich die Aussagen zur Wiederholungswahrscheinlichkeit von Handfehlbildungen bei weiteren Nachkommen in der Familie. Unter Annahme eines autosomal dominanten Erbganges kann eine Wiederholung des Merkmals bis zu 50% betragen.

In den letzten Jahren ist es für eine Vielzahl der hereditären Handfehlbildungen gelungen, die molekulare Ursache zu finden und grundlegende Erkenntnisse über die Steuerung des Systems zu gewinnen, welches die embryonale Musterbildung der Handentwicklung koordiniert. Wenn das mit der bestehenden Fehlbildung assoziierte Gen bekannt ist, so kann mit Hilfe einer molekulargenetischen Analyse nach der zugrunde liegenden Mutation gesucht werden.

## 1.2 Klassifikation der Brachydaktylien

Ein komplexes Regelnetzwerk verschiedener Liganden, Inhibitoren, Rezeptoren sowie intrazellulärer Signalkaskaden, die eng miteinander in Verbindung stehen, ist für die Koordination der frühembryonalen Handentwicklung notwendig. Der Fokus der

vorliegenden Arbeit liegt auf den verschiedenen Formen der Brachydaktylien und einer Form der Polysyndaktylie mit triphalangealem Daumen, deren klinischer und molekularer Einordnung sowie der Aufarbeitung der zu Grunde liegenden Mutationen bzw. chromosomaler Imbalancen.

Die Brachydaktylien (abgeleitet griech.: βραχύς, kurz; δάκτυλος, Finger) sind charakterisiert durch die Verkürzung von Fingern und/oder Zehen, die durch Veränderungen an den Phalangeal- oder Metacarpalknochen verursacht werden. Nach der klinischen Klassifizierung von Julia Bell werden sie in 5 Gruppen eingeteilt, der Brachydaktylien vom Typ A, B, C, D und E (Bell, 1951). Bei dem Typ A werden zudem 3 Subgruppen (A1, A2, A3) unterschieden und bei Typ B bestehen die Subgruppen B1 und B2.

Die **Brachydaktylie Typ A1** (MIM #112500) ist gekennzeichnet durch die Hypoplasie bzw. Aplasie der Mittelphalangen an allen Fingern. Missense-Mutationen in *Indian Hedgehog (IHH)* sind als Ursache bekannt (Gao et al., 2001).

Die **Brachydaktylie Typ A2** (MIM #112600) ist charakterisiert durch hypoplastische Mittelphalangen am Zeigefinger und variabel auch am Kleinfinger. Bei den betroffenen Fingern imponiert neben einer Verkürzung oftmals eine Lateraldeviation. Missense-Mutationen in *Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B (BMPRI1B)*, eine spezifische Missense-Mutation in *Growth Differentiation Factor 5 (GDF5)* sowie eine Duplikation eines cis-regulatorischen Elementes für *Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)* sind bisher auf molekularer Ebene nachgewiesen worden (Dathe et al., 2009; Lehmann et al., 2003; Ploger et al., 2008).

Bei der **Brachydaktylie Typ A3** (MIM #112700), einzig durch eine Klinodaktylie des Kleinfingers auf Grund eines hypoplastischen Mittelphalanx auffallend, ist die molekulare Grundlage noch unklar.

Für die **Brachydaktylie Typ B1** (MIM #113000), deren Hauptmerkmal die Aplasie bzw. Hypoplasie von terminalen Phalangen der Finger II - V ist, sind trunkierende Mutationen in dem Gen *Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 2 (ROR2)* ursächlich (Oldridge et al., 2000; Schwabe et al., 2000).



Bei der **Brachydaktylie Typ B2** (MIM #611377) bestehen neben der terminalen Aplasie oder Hypoplasie der Phalangen zudem ein proximaler Symphalangismus und Fusionen von Handwurzelknochen. Diese Form wird durch spezifische Missense-Mutationen in *NOGGIN* (*NOG*) verursacht (Lehmann et al., 2007).

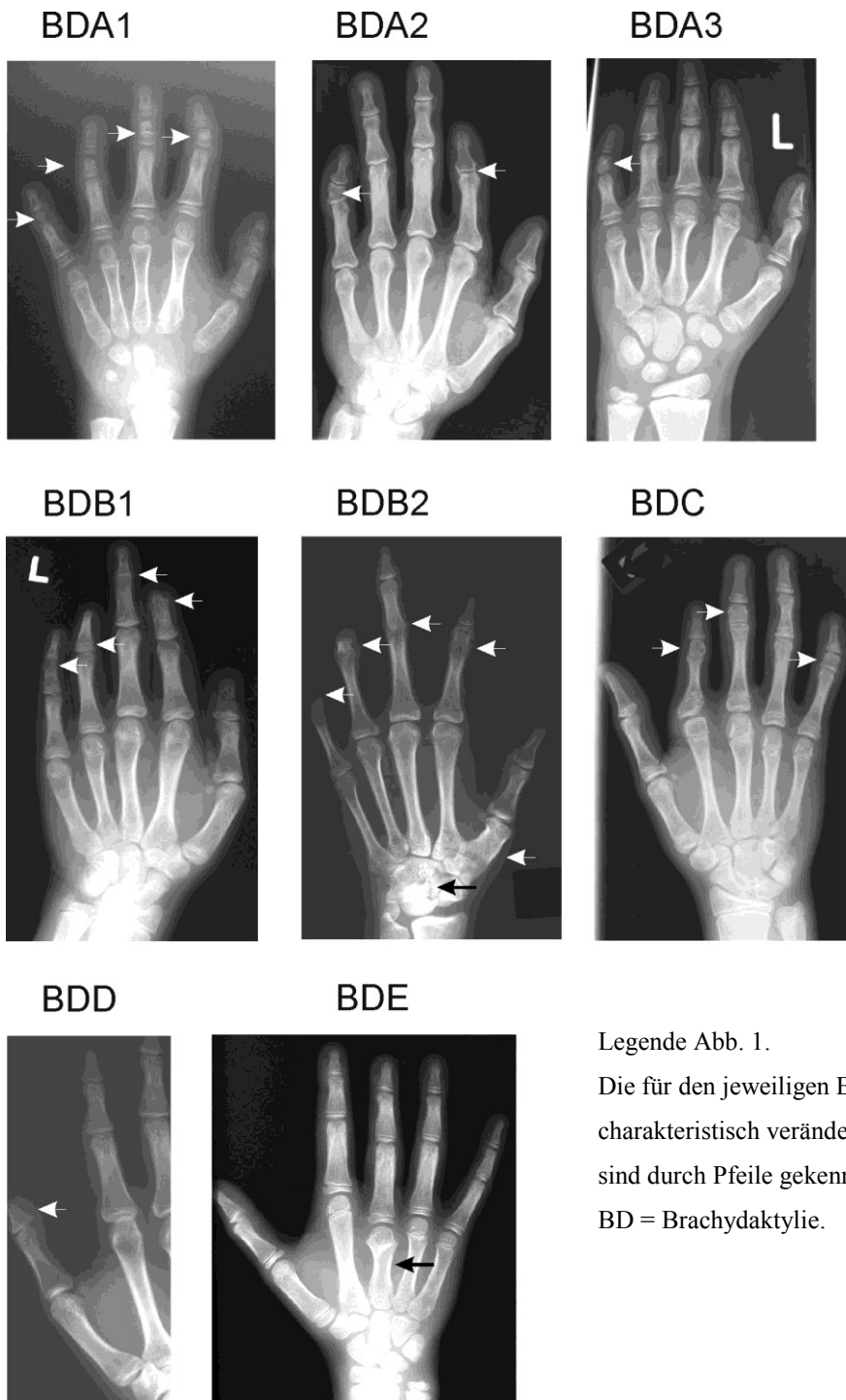
Bei der **Brachydaktylie Typ C** (MIM #113100) sind verkürzte Index-, Mittel-, und Kleinfinger durch hypoplastische Mittelphalangen charakteristisch. Die Ringfinger sind typischerweise normal entwickelt. An Index- und Mittelfinger können zusätzliche Anlagen von Phalangen vorliegen (Hyperphalangie). Das molekulare Korrelat sind Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5* (Polinkovsky et al., 1997). Brachydaktylien vom Typ A1, A2, A3 und Typ C zeigen überlappende Merkmale.

Die **Brachydaktylie vom Typ D** (MIM #113200) ist durch ein breites und verkürztes Endglied des Daumens charakterisiert.

Die **Brachydaktylie Typ E** (MIM #113300) weist verkürzte Ossa metacarpalia auf. Für den Typ D und den Typ E, deren Phänotypen sich z. T. überlappen, sind in Einzelfällen Missense-Mutationen im Gen *Homeobox D13* (*HOXD13*) identifiziert worden (Johnson et al., 2003).

Über die klinische Charakterisierung der Brachydaktylien und die ursächlichen Mutationen konnten bereits wesentliche Einblicke in die genetische Variabilität dieser Fehlbildungsgruppe gewonnen werden. Neben einer variablen phänotypischen Ausprägung ist zudem eine verminderte Penetranz bei den Brachydaktylien bekannt, wie die Auswertung von Stammbäumen zeigt (Polinkovsky et al., 1997). Die funktionelle Analyse von mit Brachydaktylie assoziierten Mutationen und die Korrelation zu den phänotypischen Auswirkungen sind für das Verständnis der Pathogenese essentiell. Über die Lokalisation der Mutationen im Gen bzw. Protein und die daraus resultierende klinische Symptomatik können Hinweise auf die Strukturbereiche der betroffenen Moleküle und auf relevante Protein-Protein Interaktionen gewonnen werden.

Abb. 1: Röntgenbefunde bei den verschiedenen Formen der Brachydaktylien.



Legende Abb. 1.

Die für den jeweiligen Brachydaktylietyp charakteristisch veränderten Knochenstrukturen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

BD = Brachydaktylie.

### 1.3 Identifikation von Mutationen

Ein gut charakterisierter Phänotyp einer genetischen Störung ist wesentliche Grundlage dafür, dass die Diagnose gefunden und die ursächliche Mutation identifiziert werden kann. Verschiedene molekulare Methoden werden angewandt, um krankheitsassoziierte Veränderungen auf molekularer Ebene nachzuweisen.

Sind Veränderungen in einem Gen als Auslöser für eine Erkrankung bzw. eine Störung bekannt, so kann mittels einer direkten DNA-Sequenzierung des betreffenden Genabschnittes nach einer merkmalsverursachenden Mutation bei Patienten gesucht werden. Die DNA-Sequenzierung erfolgt automatisiert an DNA-Sequenziergeräten mit einer basenspezifischen Fluoreszenzmarkierung (Sanger et al., 1992). Durch die Sequenzdaten, mittels deren die Abfolge der vier Basen des untersuchten DNA-Abschnittes angezeigt werden, sind Abweichungen in der Wt-Sequenz nachweisbar. Polymorphismen werden hierbei von krankheitsbedingenden Mutationen unterschieden.

Ist die molekulare Ursache einer monogenen Störung nicht bekannt, muss zunächst das krankheitsassoziierte Gen identifiziert werden. Die Suche nach dem Krankheitsgen über eine genomweite Kopplungsanalyse ist ein klassisches Vorgehen, wobei eine Positionsklonierung des gesuchten Gens auf einen chromosomalen Abschnitt erfolgt (Royer-Pokora et al., 1986). Über die Bestimmung der Haplotypen, z.B. über Mikrosatelliten-Marker oder Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), und anschließendem softwaregestütztem Vergleich der Allele von betroffenen und nicht betroffenen Personen innerhalb einer Familie kann eine kritische Region bestimmt werden, in der das Krankheitsgen liegt. Das Kopplungsintervall wird durch die auftretenden Rekombinationsereignisse definiert. Der Erfolg dieser Methode hängt unter anderem davon ab, inwieweit die Rekombinationsereignisse innerhalb des Stammbaumes den kritischen Bereich in seiner Größe einschränken können und wie hoch die Anzahl der Gene in diesem Intervall ist. Ein limitierender Faktor für diese Methode ist der Umstand, dass DNA-Proben von mehreren Personen in einer Familie benötigt werden und in der Regel größere Stammbäume nötig sind.

Des Weiteren ist es möglich, über die Kenntnis von bekannten funktionellen Interaktionen zwischen Proteinen weitere Kandidatengene zu identifizieren. Mutationen in den verschiedenen Molekülen, die direkt oder indirekt auf molekularer Ebene in Verbindung stehen, können phänotypisch zu identischen oder ähnlichen Erkrankungen führen.

Auch chromosomale Auffälligkeiten, die durch eine konventionelle Chromosomenanalyse detektiert werden, können mit der Ausbildung von Extremitätenfehlbildungen einhergehen. Ob mit weiteren körperlichen Anomalien und geistigen Defiziten zu rechnen ist, hängt von der Art und der Größe der chromosomalen Veränderung ab. Meist ist dies bei lichtmikroskopisch sichtbaren Deletionen und Duplikationen, die Euchromatin beinhalten, zu erwarten. Die Auflösungsgrenze der konventionellen Chromosomenanalyse liegt bei etwa 5 - 10 Mb. Durch die nähere Charakterisierung der Bruchpunkte, insbesondere bei balancierten Translokationen und Inversionen, können Krankheitsgene identifiziert werden. Zur weiteren Abklärung von auffälligen chromosomalen Befunden in der Routinediagnostik kommen weiterführende molekular(zyto)genetische Methoden zum Einsatz, wie z. B. die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).

Genomische Deletionen oder Duplikationen, die bis vor wenigen Jahren aufgrund ihrer Größe mit konventionellen zytogenetischen Verfahren nicht detektierbar waren, sind mit einer neueren Methode, der Mikroarray-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (Array-CGH) festzustellen (Solinas-Toldo et al., 1997). Derzeit kommt der Methode der Array-CGH bei der Identifikation von krankheitsassoziierten Ursachen ein besonderes Interesse zu, da es Schätzungen gibt, dass etwa 15% aller bisher angenommenen „monogenen“ Erkrankungen durch submikroskopische Aberrationen bedingt sein dürften (Vissers et al., 2005). Patienten-DNA und Kontroll-DNA werden bei dieser Methode mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und gemeinsam auf eine Matrix aus BAC-Klonen bzw. Oligonukleotiden hybridisiert. Durch den anschließenden Vergleich der Profile ist es möglich, sehr kleine deletierte oder duplizierte Regionen im Genom des Patienten nachzuweisen. Gesamtgenomische BAC-Arrays erreichen eine Auflösung von etwa 150 kb, mit üblichen gesamtgenomischen Oligonukleotid-Arrays können Aberrationen von etwa 70 kb identifiziert werden. Zum Nachweis von Mikroduplikationen und Mikrodeletionen an definierten Loci sind maximal hochauflösende Oligonukleotid-Arrays, die Aberrationen im Basenpaarbereich detektierten können, einsetzbar (Custom Arrays).

Für die Interpretation der Ergebnisse werden die als aberrant detektierten Regionen mit der Datenlage aus öffentlichen Datenbanken abgeglichen, um copy number variations (CNVs), also Polymorphismen, zu identifizieren. Allerdings ist derzeit die Listung der Polymorphismen, gerade bei in den Oligonukleotid-Arrays, nicht vollständig. Neben der Analyse der Patienten-DNA werden deshalb auch die DNA der Eltern bzw. weiterer

Familienmitglieder untersucht. Dadurch kann bestimmt werden, ob die chromosomale Veränderung *de novo* entstanden oder von einem Elternteil vererbt worden ist. Besteht bei einem klinisch gesunden Elternteil die identische Veränderung, so ist die Wahrscheinlichkeit für einen Polymorphismus hoch. Bei Nachweis der gleichen Aberration bei einem ebenfalls betroffenen Elternteil ist eine Pathogenität der Veränderung zu diskutieren und eine Beweisführung anzustreben. Auffällige Ergebnisse aus der Array-CGH-Analyse werden üblicherweise mit weiteren Methoden, wie FISH oder quantitativer real-time PCR (qPCR), bestätigt.

Die in einer nachgewiesenen Aberration lokalisierten annotierten Gene können in Datenbanken gesucht werden. Hierüber lassen sich Informationen hinsichtlich der Genfunktionen und bereits bekannter Assoziationen von Genen zu humanen Störungen gewinnen. Die Identifikation von mit der Störung assoziierten Kandidatengenen bietet so die Chance, die Pathogenität einer Erkrankung auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Weiterführende funktionelle Experimente an *in vitro* und *in vivo* Modellen sind bei einem Nachweis von neuartigen Mutationen notwendig, um Einblicke in die Pathogenese einer Störung zu erhalten.

#### **1.4 Charakterisierung identifizierter Mutationen an ausgewählten Modellen**

Um die Auswirkungen von Mutationen auf die Knochenentwicklung zu untersuchen, sind eine Reihe von geeigneten Modellen bekannt. Zur weiterführenden funktionellen Charakterisierung von mit Brachydaktylie assoziierten Mutationen wurden ausgewählte Verfahren auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

In Abhängigkeit von den identifizierten Mutationen sind Analysen am Tiermodell aufschlussreich, um die Funktion von spezifischen Genen *in vivo* zu untersuchen. Durch RNA *in situ* Hybridisierungen an histologischen Gewebeschnitten oder am gesamten Embryo bzw. ganzen Körperteilen („whole mount“) ist es möglich, einen Überblick über das Expressionsmuster eines Kandidatengens zu erhalten. Die gewebespezifische und zeitliche Expression der an der Extremitätenentwicklung beteiligten Gene können so am Tiermodell, z.B. beim Huhn oder der Maus, analysiert werden. Hierzu werden genspezifische Sonden verwendet, die in den Zellen bzw. definierten Gewebebereichen Signale erzeugen, in denen das zu untersuchende Gen exprimiert wird.

Ein *in vitro* Modell für die Knorpeldifferenzierung ist das Mikromasskultursystem. Es kann bei der Analyse von Mutationen, die die Ursache von Skeletterkrankungen sind, angewandt werden. Grundlage dieses Modells sind mesenchymale Stammzellen der Extremitätenknospen von Hühnerembryonen, welche sich zu Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren. Die verschiedenen Stadien der Knorpeldifferenzierung (früh, spät, terminal) werden im Weiteren über Färbeverfahren analysiert. Über die Alcian Blau Färbung kann die Bildung von extrazellulärer Knorpelmatrix quantifiziert werden. Mit zunehmender Differenzierung der Chondrozyten wird eine verstärkte Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Die Alizarin Rot Färbung wird zum Nachweis mineralisierter Matrix von terminal differenzierten Chondrozyten eingesetzt. Der Einfluss eines Gens auf die Knorpeldifferenzierung kann durch Überexpression mit einem vogelspezifischen Retrovirus (RCAS, replication competent avian sarcoma) untersucht werden. Dazu werden Viruspartikel hergestellt, die das zu untersuchende Wt-Gen oder Gene mit krankheitsassoziierten Mutationen tragen. Mit diesen werden anschließend die Mikromasskulturen infiziert und damit das Gen in den Kulturen überexprimiert. Fördert oder hemmt das Kandidatengen die Knorpeldifferenzierung, so ist dies über eine erhöhte bzw. verringerte Produktion der Knorpelmatrix messbar.

Mit Hilfe der RCAS Viren ist auch eine *in vivo* Untersuchung der Genfunktion möglich. Dazu werden Viren, die das zu untersuchende Gen enthalten, in Hühnerembryonen injiziert. Zum gewünschten Entwicklungszeitpunkt wird dann der Einfluss der Überexpression des Kandidatengens in verschiedenen Körperabschnitten bzw. Geweben auf die Entwicklung des Embryos analysiert.

Mausmutanten sind eine weitere häufig genutzte Möglichkeit, die Ursachen humaner Erkrankungen bzw. Fehlbildungen zu untersuchen und die Entstehung des pathologischen Phänotyps verstehen zu lernen. Mausmodelle, die einer humanen Störung homolog sind, sind entweder durch Spontanmutationen zufällig entstanden oder können durch gezieltes Ausschalten oder Einführen von Genen bzw. genomischer Bereiche erzeugt werden. Es ist u.a. im Weiteren möglich, an Mausmutanten die Aktivität von Kandidatengenen durch die Analyse der Genexpression am gesamten Embryo oder an Gewebeschnitten zu verschiedenen Entwicklungsstadien zu bestimmen. Auch regulatorische Bereiche können durch die Verwendung von Reporterkonstrukten (z.B. *LacZ*) in ähnlicher Weise *in vivo* untersucht werden. Nach der Integration eines Reporterkonstruktes in das Genom eines

Modellorganismus wird die zeitliche und ortsabhängige Wirkung des entsprechenden Bereiches wiederum an histologischen Schnitten oder am gesamten Embryo untersucht.

### **1.5 Der BMP-Signalweg und dessen Bedeutung in der Handentwicklung**

Die Bildung des Skelettsystems wird durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert. Unter vielen anderen Einflüssen spielen dabei die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)<sup>1</sup> und Growth Differentiation Factors (GDFs), die zu der TGF- $\beta$ -Superfamilie gehören, eine entscheidende Rolle. Die unterschiedlichen BMPs und GDFs sind an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen in der Embryonalentwicklung beteiligt und sie sind von großer Bedeutung bei der Knocheninduktion und der Ausbildung von Knochenstrukturen. Urist gelang es bereits Anfang der 1960er Jahre nachzuweisen, dass BMPs in der Lage sind, ektop eine Knochenbildung zu bewirken (Urist, 1965). BMPs und GDFs steuern die Proliferation und die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen in Chondrozyten und Osteoblasten. Zudem regulieren sie die Bildung von Fingern und Gelenken in festgelegten Zonen sowie die Apoptose in den interdigitalen Regionen. Insbesondere GDF5 steuert die Differenzierung der Chondrozyten und beeinflusst die Musterbildung der einzelnen Phalangen und die Ausbildung der interphalangealen Gelenke (Francis-West et al., 1999; Storm und Kingsley, 1999). BMP2 spielt eine bedeutsame Rolle in der späten Osteogenese. Eine deutliche Expression von *BMP2* in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge, im Perichondrium und in den Osteoblasten ist nachweisbar (Kulesa et al., 2000; Lyons et al., 1990; Pathi et al., 1999). Eine *BMP2*-Expression in den distalen Extremitätenabschnitten ist zudem in der longitudinalen Achse der sich entwickelnden Phalangen und in einem kleinen Bereich von Zellen der sich bildenden Interphalangealgelenke, die apoptotisch werden, zu finden (Seemann et al., 2005).

Die Aktivität der BMPs und GDFs wird neben anderen Mechanismen auch durch antagonistisch wirkende Proteine reguliert. NOG ist ein solcher extrazellulärer Antagonist, der die Signalwirkung von BMPs und GDFs aufheben kann (Nifuji und Noda, 1999). NOG besetzt die BMP-Rezeptor-Bindungsstellen von GDF5 und weiterer BMPs, sodass diese nicht an der Zelloberfläche an ihre korrespondierenden Rezeptoren binden können und die Signalwirkung folglich unterbrochen ist.

---

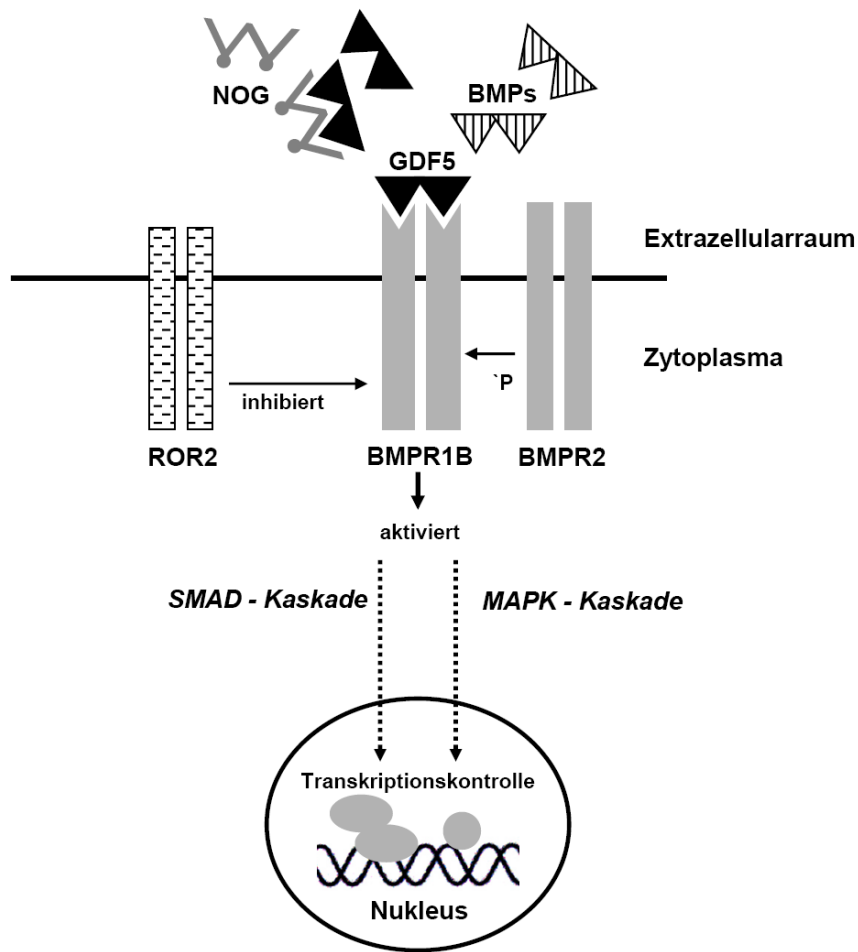
<sup>1</sup> Zur besseren Lesbarkeit werden alle Proteinamen in diesem Abschnitt mit Großbuchstaben abgekürzt.

GDF5 und BMP2 sind Liganden der BMP-Rezeptoren, die als transmembranöse Serin-Threoninkinasen eine Signalweiterleitung in das Zellinnere ermöglichen. Es sind drei BMP-Rezeptoren vom Typ 1 (BMPR1A, BMPR1B, ACVR1) sowie ein BMP-Rezeptor vom Typ 2 (BMPR2) bekannt, die ihrerseits an der Zelloberfläche Komplexbildungen zu aktiven Hetero- bzw. Homodimeren eingehen (Gilboa et al., 2000; Nohe et al., 2004). GDF5 bindet mit einer sehr hohen Affinität an BMPR1B, BMP2 hingegen bindet sowohl an BMPR1A und BMPR1B (Kirsch et al., 2000; Nishitoh et al., 1996). Besetzt ein Ligand den BMP-Rezeptorkomplex, so resultiert typischerweise eine Transphosphorylierung von BMPR1B durch BMPR2 und somit eine Aktivierung von BMPR1B. Es wird daraufhin intrazellulär eine Signalweiterleitung über die MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Kaskade und/oder über den SMAD (homolog: mothers against decapentaplegic, Drosophila; sma-Protein, Caenorhabditis elegans)-abhängigen Signalweg in Gang gesetzt. Die SMAD-Proteine 1, 5 und 8 werden aktiviert und in Folge wird die Transkription von Zielgenen im Nukleus reguliert (Nohe et al., 2002; Nohe et al., 2004). Durch die inhibitorisch wirkenden SMADs 6 und 7 besteht ein negativer Rückkopplungsmechanismus der Signaltransduktion.

Ein mit den BMP-Rezeptoren interagierender Zellmembranrezeptor ist ROR2. Mutationen in ROR2 sind Ursache für die Brachydaktylie Typ B1. Es wurde nachgewiesen, dass ROR2 die intrazelluläre SMAD-Kaskade, welche durch einen aktivierten BMPR1B initiiert wird, inhibieren kann. Dieser modulierende Effekt von ROR2 auf den BMP-Signalweg erfolgt durch die aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinase des Rezeptors (Sammar et al., 2004).



Abb. 2: Schematische Darstellung des BMP-Signalwegs



Legende Abb. 2.

BMPs und GDFs sind Liganden der BMP-Rezeptoren. Eine Aktivierung von BMPR1B über eine Transphosphorylierung von BMPR2 führt zum Anstoß der intrazellulären SMAD- oder MAPK- abhängigen Signalkaskade. ROR2 übt einen modulierenden Effekt auf die BMPR1B-induzierte Signalweiterleitung aus. Im Nucleus werden durch Transkriptionsfaktoren spezifische DNA-Sequenzen besetzt, über deren Bindung die Aktivität von Zielgenen reguliert werden kann.

Die Moleküle des BMP-Signalwegs spielen eine entscheidende Rolle bei der regelrechten Entwicklung der Hand, insbesondere bei der Musterbildung und Morphogenese der einzelnen Phalangen und der Gelenke. Ein verändertes Zusammenspiel von Liganden (GDF5, BMP2), Antagonisten (NOG), Rezeptoren (BMPR1B, BMPR1A) und Co-Rezeptoren (ROR2) führt dazu, dass der Prozess der Handentwicklung gestört ist. Dies äußert sich klinisch in verschiedenen Typen von Brachydaktylien. Während man vor einigen Jahren davon ausging, dass die verschiedenen Typen der Brachydaktylien jeweils durch Mutationen in konkreten Molekülen des BMP-Signalwegs bedingt seien, ist es nach

den aktuellen klinischen und funktionellen Ergebnissen gesichert, dass Mutationen in unterschiedlichen Interaktionspartnern zu überlappenden und einander imitierenden Phänotypen führen können.

### **1.6 Mechanismen der Genregulation durch *cis*-aktivierte Steuerungselemente**

Damit in der Embryogenese eine exakte und fein abgestimmte zeitliche sowie örtliche Expression von Entwicklungsgenen, zu denen auch *BMP2* und *Sonic Hedgehog (SHH)* gehören, erfolgen kann, sind multiple Steuerungsprozesse nötig. Die Genaktivität wird bei vielen Genen nicht nur durch Promotoren reguliert, die unmittelbar am Transkriptionsstart liegen, sondern auch durch weitere regulative Elemente wie Enhancer oder Silencer, die ggf. sehr weit vom regulierten Gen lokalisiert sind. Solche komplexen Regulationsmechanismen sind häufig bei Entwicklungsgenen anzutreffen.

Entwicklungsgene sind oftmals in genomischen Regionen zu finden, in denen über mehrere hundert Kilobasen (kb) keine weiteren Gene liegen (sog. Genwüsten). Das Vorhandensein von evolutionär konservierten, nicht-kodierenden Sequenzabschnitten deutet in diesen Bereichen auf die Existenz von regulatorischen Elementen hin. Es sind Beispiele dafür bekannt, dass *cis*-aktivierte Elemente als Enhancer oder Repressoren die Genexpression von Entwicklungsgenen kontrollieren (Bagheri-Fam et al., 2006; Kleinjan et al., 2006; Sabherwal et al., 2007). Solche *cis*-agierende regulatorische Elemente können als „long-range“ Regulatoren mehrere hundert kb vom eigentlichen Zielgen entfernt sein (Kleinjan und van Heyningen, 2005). Besteht eine Mutation oder Aberrationen in der genomischen Sequenz des regulatorischen Elements, so kann dies Auswirkungen auf die Transkription des Zielgens haben und die Ursache von klinischer Pathologie darstellen. Es ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus für einen nicht unbeträchtlichen Anteil an Erkrankungen oder Fehlbildungen verantwortlich sein dürfte.

Die Sequenzabschnitte, die die regulatorischen Elemente definieren, weisen Erkennungsmotive für DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren auf. Diese interagieren ihrerseits mit den Promotoren des Zielgens, z.B. über eine Schleifenbildung des Chromatins (de Laat und Grosveld, 2003; Tolhuis et al., 2002). Betrifft eine Mutation die Erkennungssequenz für einen Transkriptionsfaktor, ist es möglich, dass dessen Bindungsverhalten gestört ist. Eine veränderte Aktivität des zu regulierenden Gens wäre

die Folge und die Ausbildung von klinischen Auswirkungen könnte hierüber erklärbar sein.

Im Rahmen der Genregulation kommt der Konformation des Chromatins eine wesentliche Bedeutung zu. Eine offene Chromatinstruktur ist nötig, damit Transkriptionsfaktoren an die DNA-Erkennungssequenzen binden und ihrerseits durch Interaktion mit dem Promotor die Transkription steuern. Durch chromosomale Aberrationen kann es zu Änderungen in der lokalen Chromatinstruktur kommen, die eine Bindung von Transkriptionsfaktoren unmöglich machen. Chromosomenveränderungen, wie Deletionen, Duplikationen oder Inversionen, können dazu führen, dass der Abstand zwischen dem *cis*-regulatorischen Element und dem Zielgen je nach ursächlicher Aberration entweder verkleinert bzw. vergrößert ist. Da die Interaktion zwischen *cis*-lokalisiertem Regulator und seinem zu kontrollierenden Gen einen dynamischen Mechanismus erfordert, ist anzunehmen, dass in vielen Fällen der exakte Abstand für diesen Kontakt entscheidend ist und folglich Abweichungen in der Position des *cis*-Regulators (Positionseffekt) zu einer fehlerhaften Genexpression führt (Kleinjan und van Heyningen, 2005).

Wie die Feinabstimmung der Genaktivität durch weit entfernt liegende Regulatoren im Detail funktioniert, ist derzeit weitgehend unklar. Über die Analyse an ausgewählten Genen ist es möglich, zusätzliche Informationen über die Mechanismen der Genregulation zu gewinnen und somit auch die zu einer Störung führende Wirkungsweise von Mutationen und Aberrationen zu verstehen.

Auch die Regulation der Entwicklungsgene *BMP2* und *SHH* wird durch *cis*-lokalisierte Elemente kontrolliert. *BMP2* und *SHH* stellen sezernierte Signalmoleküle dar, die in der Embryonalentwicklung in verschiedenen zeitlichen Phasen und Geweben von essentieller Bedeutung sind. Es ist davon auszugehen, dass für deren regelrechte Expression in den jeweiligen embryonalen Entwicklungsphasen eine hoch komplexe Steuerung notwendig ist.

Sowohl *BMP2* als auch *SHH* sind in sog. Genwüsten lokalisiert. Die Abwesenheit von Genen und das Vorhandensein von hoch konservierten Sequenzabschnitten in den angrenzenden Regionen sprechen für das Vorliegen von multiplen *cis*-agierenden Regulatorelementen. Für beide Gene ist bekannt, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der distalen Extremitätenabschnitte haben. Mutationen in den

kodierenden Sequenzen von *SHH* oder *BMP2*, die zu Extremitätenfehlbildungen führen, sind jedoch nicht nachgewiesen worden.

Für die Steuerung von *SHH* in den sich entwickelnden Extremitäten konnte vor einiger Zeit ein 5' lokalisierter *cis*-Regulator (ZRS) identifiziert werden (Lettice et al., 2002). Nukleotidveränderungen in dieser Regulatorsequenz resultieren klinisch in einer präaxialen Polydaktylie. Wie eigene Ergebnisse zeigen konnten, führt eine Mikroduplikation, die den *cis*-Regulator umfasst, ebenfalls zu diesem Phänotyp (Klopocki et al., 2008).

Auch für die Regulation von *BMP2* wurden 3' von *BMP2* *cis*-lokalisierte Enhancerelemente nachgewiesen (Chandler et al., 2007). Wir konnten ein weiteres *cis*-regulatorisches Element identifizieren, welches gezielt die *BMP2*-Expression in den distalen Phalangen steuert. Die Duplikation des Regulatorelementes korreliert mit der Manifestation einer Brachydaktylie Typ A2 (Dathe et al., 2009).

## 2. Originalarbeiten

### 2.1 Heterozygote Mutationen in *BMPRI1B* führen zur Brachydaktylie Typ A2

Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Süring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Müller D, Knaus P, Nürnberg P, Mundlos S.

Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. Proceedings of the National Academy of Science USA, 100, 2003, 12277-12282.

Bei der autosomal dominant vererbten Brachydaktylie vom Typ A2 handelt es sich um eine Störung, die vorwiegend die Mittelphalangen der Zeigefinger betrifft. In variabler Ausprägung sind die Mittelphalangen hypoplastisch, deltaförmig oder völlig fehlend. Zudem findet sich in einem Teil der Fälle eine Klinodaktylie der Kleinfinger, ebenfalls durch eine deltaförmige Mittelphalanx bedingt. Am Fuß kann eine laterale Deviation der Großzehen bestehen.

Über eine Positionsklonierung in einer klinisch gut charakterisierten Familie mit Brachydaktylie Typ A2 konnten wir das Merkmal auf einen 21.2 cM großen Bereich auf Chromosom 4q21-q25 kartieren. In der kritischen Region wurde *BMPRI1B* als Kandidatengen identifiziert. Die direkte Sequenzierung von *BMPRI1B* ergab die merkmalsassoziierte heterozygote Missense-Mutation c.C1456T, die zu einem Aminosäureaustausch p.R486W führt. Dieser Aminosäureaustausch liegt innerhalb einer hoch konservierten, C-terminalen Region der Serin-Threonin-Kinase des Rezeptors. In einer zweiten unabhängigen Familie mit Brachydaktylie Typ A2 besteht eine heterozygote Missense-Mutation c.T599A (p.I200K). Diese Veränderung ist ebenfalls in einem konservierten Bereich, der glycin- und serinreichen GS-Domäne, lokalisiert.

Für die funktionelle Beweisführung der Kausalität von Mutation und Phänotyp sind *in vitro* und *in vivo* Testsysteme etabliert worden. Die beiden o.g. *Bmpr1b*-Mutationen wurden hinsichtlich ihrer Effekte auf die Chondrogenese mit dem Mikromasskultursystem analysiert und die Auswirkungen mit *Wt-Bmpr1b* verglichen. Die Experimente zeigen, dass beide Mutationen, p.I200K stärker als p.R486W, einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Knorpelproduktion aufweisen. Untersuchungen zur Aktivität der Serin-Threoninkinase des Rezeptors haben ergeben, dass die Mutation p.I200K zu einem Funktionsverlust der *Bmpr1b*-Kinase führt, wohingegen bei der Mutation p.R486W keine

Veränderung der Kinaseaktivität messbar ist. Demnach ist für die Mutation p.R486W ein anderer Pathomechanismus zu postulieren.

An der Oberfläche von COS7-Zellen wurde im Weiteren mittels Immunodetektion von HA-markierten BmpR1bs analysiert, ob sich die Lokalisation von mutierten Rezeptoren und Wt-BmpR1b an der Zelloberfläche unterscheidet. Sowohl die Mutanten als auch Wt-BmpR1b lassen sich an der Zelloberfläche nachweisen, was dafür spricht, dass auch die mutierten Rezeptoren unverändert prozessiert werden.

Aus den durchgeführten Experimenten lässt sich folgern, dass die zur Brachydaktylie Typ A2 führenden *BMPRI*B-Mutationen über einen dominant negativen Effekt pathogen wirken.

Beide Mutationen wurden desweiteren an einem *in vivo* Modell an Hühnerembryonen ausgetestet, um deren Auswirkung auf die Extremitätenentwicklung analysieren zu können. Es erfolgte eine Infektion von Hühnerembryonen mit einem die mutierten Genkonstrukte tragenden Retrovirus, worüber eine Überexpression der Genkonstrukte stattfindet. Am Tiermodell wird deutlich, dass die resultierenden Veränderungen im Hühnchen, die durch verkürzte oder fehlende Phalangen gekennzeichnet ist, den menschlichen Phänotyp einer Brachydaktylie imitieren. Analog zu den Mikromasskultur-Experimenten ist auch hier ein stärkerer Effekt für die Mutation p.I200K nachzuweisen.

Bei den infizierten Hühnerembryonen sind auch wesentlich stärker betroffene Phänotypen am Skelett mit einer komplexen Verkürzung der Extremitäten zu beobachten. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf eine höhere Viruslast der betroffenen Hühnerembryonen. Wir postulieren, dass ein solcher Phänotyp möglicherweise den Effekt einer homozygoten Missense-Mutation beim Menschen widerspiegeln könnte. In der klinischen Erstbeschreibung der Brachydaktylie Typ A2 durch Mohr und Wried im Jahr 1919 wird von einem Kind zweier von Brachydaktylie Typ A2 betroffener Elternteile berichtet, welches eine schwere Skelettfehlbildung und ein komplettes Fehlen von Fingern und Zehen aufwies und demnach homozygot für die Mutation gewesen sein könnte (Mohr und Wried, 1919). Bisher sind keine Patienten in der Literatur publiziert, die Träger einer homozygoten Missense-Mutation in *BMPRI*B sind.

Seite 23 – 28 Originalarbeit

Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Süring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Müller D, Knaus P, Nürnberg P, Mundlos S.

Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. Proceedings of the National Academy of Science USA, 100, 2003, 12277-12282.

## 2.2 Die Mutation p.R486Q in BMPR1B resultiert in zwei verschiedenen Phänotypen, der Brachydaktylie Typ C mit proximalem Symphalangismus und der Brachydaktylie Typ A2

Lehmann K, Seemann P, Börgermann J, Morin G, Reif S, Knaus P, Mundlos S.  
A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *European Journal of Human Genetics*, 14, 2006, 1248-1254.

Die Brachydaktylie vom Typ C ist charakterisiert durch eine Brachymesophalangie der Zeigefinger, der Mittelfinger und der Kleinfinger. Der Ringfinger ist nicht betroffen und imponiert als der längste Finger. Nicht selten findet man zudem eine Hyperphalangie an den Zeige- und Mittelfingern. Ursächlich für die Brachydaktylie vom Typ C sind in der Mehrzahl der Fälle heterozygote Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5*. Ein proximaler Symphalangismus (SYM1, MIM #185800) ist typischerweise nicht mit Brachydaktylie Typ C assoziiert. SYM1 wird durch heterozygote Funktionsverlust-Mutationen in *NOG* verursacht; selten können auch Funktionsgewinn-Mutationen in *GDF5* zu SYM1 führen.

Wir berichten von einer Mutation c.1457G>A (p.R486Q) in *BMPR1B*, dem Rezeptor für GDF5, welche phänotypisch sowohl eine Brachydaktylie Typ A2 verursachen, als auch zu einer Kombination von Brachydaktylie Typ C und SYM1 führen kann. Bislang waren heterozygote *BMPR1B*-Mutationen als Ursache für die Brachydaktylie vom Typ A2 bekannt. Das Auftreten eines kombinierten Phänotyps von Brachydaktylie Typ C und SYM1 bei einer Mutation in *BMPR1B* ist vor dem Hintergrund eines besseren Verständnisses der Interaktionen von Molekülen des BMP-Signalweges äußerst interessant.

Der Effekt der Mutation p.R486Q wurde im Mikromasskultursystem analysiert und mit einer weiteren Brachydaktylie Typ A2 assoziierten Mutation (p.R486W) sowie mit Wt-*BmpR1b* verglichen. Die Überexpression der beiden mutierten Konstrukte resultiert in einer signifikanten Inhibierung der Knorpeldifferenzierung. Die Mutation p.R486Q, die auch zur Brachydaktylie Typ C/SYM1 führt, weist hierbei einen stärkeren Effekt als die mit der Brachydaktylie Typ A2 assoziierte Mutation p.R486W auf.

Die beiden *BmpR1b*-Mutationen sind zudem hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalkaskade untersucht worden. Die Analysen wurden an stabil transfizierten C2C12-Zellen durchgeführt, welche mesenchymale Vorläuferzellen



darstellen und sich u.a. auch in Osteoblasten differenzieren können. Die intrazelluläre SMAD-Aktivität wurde mittels eines Luciferase-Reporterkonstruktes nach Stimulation mit GDF5 gemessen. Bei beiden Mutationen ist das SMAD-Signalling stark eingeschränkt, wobei sich die Mutation p.R486Q stärker als die Mutation p.R486W auswirkt. Die Aktivität des SMAD-unabhängigen Signalweges wurde über die Messung der Alkalischen Phosphatase als Marker für die Osteoblastendifferenzierung bestimmt. Auch das SMAD-unabhängige Signalling ist für beide Mutationen kaum nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Mutationen die regelrechte Knorpelproduktion und -differenzierung beeinträchtigen und negative Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalweiterleitung haben. Die Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Mutation p.R486Q einen stärkeren Effekt als die Mutation p.R486W aufweist. Die funktionellen Resultate stimmen mit der phänotypischen Variabilität, die bei den Patienten besteht, überein. Es kann festgestellt werden, dass die Mutation p.R486Q tendenziell zu einem schwereren Handphänotyp führt. Stochastische Effekte und modifizierende Faktoren sind jedoch ebenfalls als weitere Modulatoren zu diskutieren.

Der zusätzlich bestehende SYM1 ist bei der Brachydaktylie Typ C sehr ungewöhnlich. Während die Entstehung der Brachydaktylie durch eine partielle Inaktivierung der Wirkung von GDF5 über den mutierten *BMPR1B* zu erklären ist, wäre als ein möglicher Pathomechanismus, der zur Entstehung von SYM1 führt, ein relativ verstärktes Signalling von GDF5 über *BMPR1A* anstatt über *BMPR1B* denkbar. Eine Steigerung der *BMPR1A*-Aktivität wurde als ursächlich für SYM1 nachgewiesen (Seemann et al., 2005).

Durch die klinische Charakterisierung der Brachydaktylien und der Klärung der zugrunde liegenden Mutationen konnte das phänotypische Spektrum von Mutationen in *BMPR1B* erweitert werden. Die Beobachtungen lassen den Rückschluss zu, dass Mutationen in verschiedenen Molekülen des BMP-Signalweges das ausgewogene Zusammenspiel der Liganden (GDF5), der Rezeptoren (*BMPR1A*, *BMPR1B*) und Antagonisten (*NOG*) stören und diese Dysregulation zu einander sehr ähnlichen bzw. identischen Handfehlbildungen führt.

Seite 31 – 37 Originalarbeit

Lehmann K, Seemann P, Börgermann J, Morin G, Reif S, Knaus P, Mundlos S.  
A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-  
like phenotype or brachydactyly type A2. *European Journal of Human Genetics*, 14, 2006, 1248-  
1254.

### 2.3 Mutationen in dem BMP Antagonisten NOGGIN verursachen Brachydaktylie Typ B2

Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, Reissner C, Kerr B, Wilkie AOM, Mundlos S.

A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the Bone Morphogenetic Protein antagonist NOGGIN. *American Journal of Human Genetics*, 81, 2007, 388-396.

Bei Patienten, die von einer schweren Form der Brachydaktylie vom Typ B betroffen sind, findet man ein Fehlen oder eine Hypoplasie der End- und Mittelphalangen der Finger II, III, IV und V. Die betroffenen Finger ähneln in diesen Fällen oftmals einem Zustand, der nach Fingergliedamputationen zu beobachten ist. Hypoplastische distale Phalangen mit kleinen Fingernägeln und Fusionen des distalen Interphalangealgelenke finden sich bei einer milden Ausprägung der Brachydaktylie Typ B. Heterozygote Mutationen in *ROR2* sind als Ursache für die Mehrzahl der Fälle identifiziert worden.

Der Phänotyp, der in dem folgenden Artikel beschrieben wird, unterscheidet sich klinisch von der *ROR2*-assoziierten Brachydaktylie Typ B1 und stellt einen eigenen Subtyp (B2) dar. Die Finger IV und V sind meist stärker von der Brachydaktylie betroffen und es bestehen bei allen Patienten, in variabler Ausprägung, zusätzlich Fusionen im proximalen Interphalangealgelenk, Fusionen im Bereich der Handwurzelknochen, verkürzte Ossa metacarpalia des Daumens und milde häutige Syndaktylien. Bei zwei betroffenen Kindern ist das Knochenalter deutlich akzeleriert.

Wir haben sechs familiäre Fälle und ein Patient, bei dem die Brachydaktylie erstmals in der Familie aufgetreten ist, klinisch charakterisiert und molekulargenetisch untersucht. Aufgrund der klinischen Überlappung der Phänotypen zu Störungen, die durch Mutationen in *NOG* verursacht werden, erfolgte eine Sequenzierung dieses Gens. Sechs unterschiedliche Missense-Mutationen wurden in *NOG* identifiziert.

Die genannten Mutationen sind an drei strukturell wichtigen Regionen im NOG-Protein lokalisiert. Sie betreffen die Interaktionsbereiche von NOG und den GDFs/BMPs, die für die Bindung der GDFs/BMPs an die BMP Typ I Rezeptoren (p.P35S, p.P35A, p.A36P) und Typ II Rezeptoren (p.E48K, p.R167G) verantwortlich ist. Eine weitere Mutation (p.P187S) ist in einem Bereich lokalisiert, der an der Homodimerisierung von NOG beteiligt ist. Mögliche Auswirkungen der identifizierten Mutationen wurden an einem NOG/GDF5-Strukturmodell mathematisch berechnet. Diese Daten deuten darauf hin, dass

durch die Mutationen kein wesentlicher Funktionsverlust von NOG zu erwarten ist. Die nachfolgenden Experimente mit den Mutanten im Mikromasskultursystem bestätigen dies. Die mit Brachydaktylie Typ B2 assoziierten NOG-Mutanten schränken die Aktivität von NOG kaum oder nur partiell ein. Sie weisen also nach wie vor inhibitorische Eigenschaften auf und hemmen die Chondrogenese. Dem gegenüber stehen Mutationen, die mit einem Funktionsverlust von NOG einhergehen und zu Phänotypen mit Gelenksfusionen führen (SYM1; Multiples Synostosen Syndrom, SYNS1, MIM #186500; Tarsales-Carpales Fusions-(„coalition“) Syndrom, TCC, MIM #186570), jedoch keine Brachydaktylie Typ B verursachen; zum Vergleich wurde eine solche Funktionsverlust-Mutation (p.P35R) ebenfalls exemplarisch getestet.

Die genaue Wirkungsweise der identifizierten Mutationen ist nicht geklärt, jedoch kann gefolgert werden, dass offensichtlich nur der Austausch von spezifischen Aminosäuren in NOG zu einer Brachydaktylie Typ B2 führt. Auf Grund der Lokalisation der nachgewiesenen Mutationen im Protein ist es wahrscheinlich, dass die Mutationen zu einer veränderten Interaktion zwischen NOG und den BMP-Rezeptoren führen und in Folge das feinregulierte Gleichgewicht innerhalb des BMP-Signalweges gestört wird. Die klinische Manifestation einer Kombination von Brachydaktylie Typ B und Gelenksfusionen sowie die erhobenen funktionellen Ergebnisse machen deutlich, dass es sich nicht um einen ausschließlichen Funktionsverlust von NOG handeln kann. Es wäre jedoch denkbar, dass die bestehenden Gelenksfusionen durch einen partiellen Verlust der antagonistischen Wirkung von NOG auf GDF5 verursacht werden, was zu einer gesteigerten Bindung von GDF5 an BMP-Rezeptoren und somit zu einem erhöhten Signalling führen würde. Der Phänotyp einer Brachydaktylie Typ B muss über einen anderen Mechanismus bedingt sein. Die Beobachtung, dass eine Brachydaktylie Typ B sowohl durch Mutationen in *ROR2* als auch in *NOG* entstehen kann, spricht für eine funktionelle, zumindest indirekte Verknüpfung dieser beide Moleküle. Untermauert wird diese Feststellung durch die Tatsache, dass eine Interaktion zwischen BMPRI1B und ROR2 nachgewiesen ist, wonach die aktivierte Tyrosinkinase von ROR2 einen inhibierenden Effekt auf das intrazelluläre BMPRI1B-Signalling hat.

Durch eine gute klinische Charakterisierung von Patienten mit einer Brachydaktylie Typ B ist es möglich, zwischen den Subtypen B1 und B2 zu unterscheiden. Mutationen in *NOG* sind als ursächlich anzunehmen, wenn an der Hand zusätzlich Knochenfusionen bestehen.

Seite 40 – 48 Originalarbeit

Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, Reissner C, Kerr B, Wilkie AOM, Mundlos S.

A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the Bone Morphogenetic Protein antagonist NOGGIN. *American Journal of Human Genetics*, 81, 2007, 388-396.

## 2.4 Die Duplikation eines extremitätenspezifischen *cis*-regulatorischen Elementes für *BMP2* führt zu Brachydaktylie Typ A2

Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nürnberg P, Neto CG, Brunoni D, Tommerup N, Ott CE, Klopocki E, Seemann P, Mundlos S.

Duplications involving a conserved regulatory element downstream of *BMP2* are associated with brachydactyly type A2. *American Journal of Human Genetics*, 84, 2009, 483-492.

Die molekulare Genese der Brachydaktylie Typ A2 ist heterogen. Nachdem in einem großen Stammbaum einer Familie mit autosomal dominant vererbter Brachydaktylie Typ A2 Mutationen in *BMPR1B* und *GDF5* als Ursache ausgeschlossen waren, konnten wir über eine genomweite Kopplungsanalyse einen weiteren Locus dieser Form der Brachydaktylie auf Chromosom 20p12.3 kartieren. Im kritischen Kopplungsintervall ist *BMP2* lokalisiert.

*BMP2* ist ein Ligand der BMP-Rezeptoren und bindet mit gleicher Affinität an *BMPR1A* und *BMPR1B*. Da ein verringertes Signalling über *BMPR1B* klinisch mit einer Brachydaktylie Typ A2 oder Typ C einhergeht, war die Hypothese, dass eine veränderte Aktivität von *BMP2* zu einer Dysregulation im BMP-Signalweg führt und daraus ebenfalls ein reduziertes *BMPR1B*-Signalling resultiert.

Nachdem die direkte Sequenzierung der Exons und Introns von *BMP2* sowie der angrenzenden hochkonservierten Abschnitte keine Mutation erbrachte, ist eine Custom-Array-CGH Analyse mit einer im Basenpaarbereich liegenden Auflösung durchgeführt worden, um kleinste Aberrationen im Kopplungsintervall identifizieren zu können. Mit dieser Methode wurde eine etwa 5.5 kb umfassende Mikroduplikation auf einem Allel identifiziert. Der duplizierte Bereich liegt etwa 110 kb in 3'-Richtung von *BMP2* entfernt und enthält hochkonservierte Sequenzabschnitte. Die Mikroduplikation segregiert in der Familie, wie über qPCR-Analysen gezeigt werden konnte. In einer zweiten Familie mit Brachydaktylie Typ A2 wurde mittels qPCR eine ähnliche Duplikation nachgewiesen. Die Sequenzierung der Bruchpunkte ergab, dass die duplizierten Abschnitte in beiden Familien in einer Tandem-Orientierung vorliegen.

*BMP2* liegt inmitten eines genfreien genomischen Abschnittes, der sich über einen Bereich von etwa 1.7 Mb erstreckt. In solchen Regionen, welche in unmittelbarer Nachbarschaft von Entwicklungsgenen liegen, können sich relativ weit entfernte, nicht-codierende Elemente zur Regulation von Zielgenen befinden. Unsere Hypothese war, dass innerhalb

der identifizierten Duplikation ein Steuerungselement für die *BMP2*-Expression in den Extremitäten lokalisiert ist.

Zur Beweisführung wurde ein transgenes Mausmodell generiert, das die homologen hochkonservierten Abschnitte der nachgewiesenen Duplikation und ein *LacZ*-Reporterkonstrukt trägt. Über einen Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität durch X-Gal Färbung kann die Induktion des Reportergens an den transgenen Mäuseembryonen untersucht werden. Die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen am Gesamtembryo und an den Gewebeschnitten der Extremitäten dieses Mausmodells verdeutlichen, dass durch die duplizierte Sequenz eine spezifische Expression von *LacZ* ausschließlich in den distalen Extremitäten gesteuert wird. Vergleicht man dieses Expressionsmuster mit Resultaten von *in situ* Hybridisierungen, die die endogene Expression von *Bmp2* in den Extremitäten darstellen, so zeigt sich eine deutliche mit der X-Gal Färbung überlappende Expression an den Phalangen. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass ein für die Extremitätenentwicklung spezifischer *Bmp2*-Enhancer innerhalb der Mikroduplikation liegt und eine Verdopplung dieses regulatorischen Elements zu einer gestörten *Bmp2*-Expression in den sich entwickelnden Phalangen führt. Die Brachydaktylie ist der klinische Ausdruck dieser Fehlregulation.

Klinisch unterscheidet sich die Brachydaktylie Typ A2, die durch einen duplizierten *BMP2*-Regulator verursacht ist, nicht von dem Phänotyp, der durch Funktionsverlust-Mutationen in *BMPR1B* oder *GDF5* bedingt ist. Da der pathogene Effekt dieser Mutationen durch eine reduzierte Signalweiterleitung über *BMPR1B* begründet ist, kann vermutet werden, dass sich die Duplikation des extremitätenspezifischen *BMP2*-Regulators ebenfalls störend auf das Gleichgewicht des BMP-Signalweges auswirkt und mit einem verringerten Signalling über *BMPR1B* einhergeht.

Seite 51 – 60 Originalarbeit

Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nürnberg P, Neto CG, Brunoni D, Tommerup N, Ott CE, Klopocki E, Seemann P, Mundlos S.

Duplications involving a conserved regulatory element downstream of *BMP2* are associated with brachydactyly type A2. *American Journal of Human Genetics*, 84, 2009, 483-492.



## 2.5 Eine die ZRS umfassende Mikroduplikation bedingt eine Form der Polysyndaktylie mit triphalangealem Daumen

Klopocki E, Ott CE, Benatar N, Ullmann R, Mundlos S, Lehmann K.

A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 45, 2008, 370-375.

In einem großen Stammbaum weisen mehrere Familienmitglieder in variabler Ausprägung einen triphalangealen Daumen, eine präaxiale oder postaxiale Polydaktylie, eine Syndaktylie bzw. eine Kombination dieser Merkmale auf. Insgesamt sind die Hände stärker als die Füße betroffen. Das Merkmal folgt einem autosomal dominanten Erbgang.

Auf Grund des Ausprägungsmusters lag die Vermutung nahe, dass eine gestörte Aktivität von SHH die Ursache für diese Störung sein könnte. Es wurde jedoch keine Mutation in dem bekannten regulatorischen Element (ZRS) nachgewiesen, das die *SHH*-Expression in den Extremitäten kontrolliert und in *cis*-Lokalisation im Intron 5 des *LMBRI*-Gens liegt. Die Auswertung der Haplotypen einer lokusspezifischen Kopplungsanalyse mit Mikrosatelliten-Markern in der Familie machte eine Kopplung zu *SHH* allerdings sehr wahrscheinlich.

Da kleinste Chromosomenveränderungen bereits als Ursache für isolierte Handfehlbildungen identifiziert wurden, ist anschließend eine Array-CGH Analyse durchgeführt worden, über die eine Mikroduplikation von etwa 590 kb auf Chromosom 7q36.3 identifiziert werden konnte. Die duplizierte Region liegt in einem Abstand von etwa 540 kb in 5'-Richtung des *SHH*-Gens und beinhaltet die ZRS. Bruchpunktanalysen ergaben, dass die Duplikation in einer Tandem-Orientierung vorliegt.

Nukleotidveränderungen innerhalb der ZRS führen neben einer regelrechten *Shh*-Expression in der posterioren Region der Extremitätenknospe zu einer zusätzlichen Expressionszone von *Shh* am anterioren Rand der Extremitätenknospe (Blanc et al., 2002; Maas und Fallon, 2004; Sharpe et al., 1999). Eine Missexpression von *Shh* ist auch zu beobachten, wenn die ZRS verdoppelt ist, wie Untersuchungen an der *Sasquatch* (*Ssq*)-Maus, die an dem homologen Locus eine 20 kb umfassende Duplikation trägt, zeigen (Lettice et al., 2002). Ein ähnlicher Effekt ist für die hier identifizierte Mikroduplikation anzunehmen. Der bestehende Phänotyp von triphalangealem Daumen und präaxialer Polysyndaktylie in der in dieser Arbeit beschriebenen Familie lässt sich durch eine ektopische

*SHH*-Expression im anterioren Bereich der Extremitätenknospe erklären; die Manifestation einer postaxialen Polydaktylie spricht zudem für eine veränderte *SHH*-Expression in der posterioren Region der Extremitätenknospe. Über welchen Mechanismus die ZRS als *cis*-Regulator *SHH* steuert, ist nicht geklärt.

Wird bei bestehender Polysyndaktylie und triphalangealem Daumen eine molekulargenetische Diagnostik durchgeführt, so ist zu bedenken, dass sowohl Mutationen innerhalb der ZRS als auch eine Duplikation der ZRS ursächlich sein können. Demnach sollte die Durchführung einer lokusspezifischen qPCR-Analyse erfolgen, wenn die Sequenzierung der ZRS kein Mutationsnachweis ergeben hat.

Seite 63 – 68 Originalarbeit

Klopocki E, Ott CE, Benatar N, Ullmann R, Mundlos S, Lehmann K.

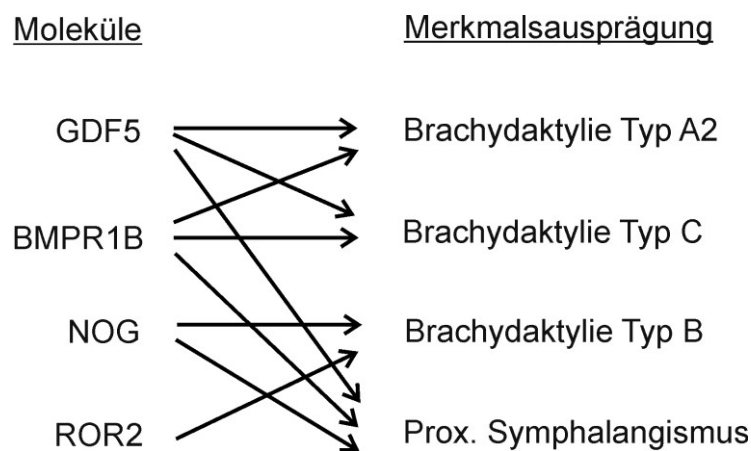
A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 45, 2008, 370-375.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Mutationen in Molekülen des BMP-Signalwegs als Ursache von Brachydaktylien

Die ungestörte Funktion des BMP-Signalwegs trägt ganz wesentlich zu der regelrechten Entwicklung des Skeletts bei. Störungen innerhalb dieses Signalwegs, die durch Mutationen in den beteiligten Proteinen entstehen, führen zu einem Ungleichgewicht der interagierenden Moleküle, welches klinische Manifestationen zur Folge hat. Wie die vorliegende Arbeit deutlich macht, hat die funktionelle Charakterisierung von einzelnen Mutationen wichtige Erkenntnisse zur Regulation des BMP-Signalwegs erbracht. Die klinischen Untersuchungen und die molekularen Analysen bei Brachydaktylien haben ergeben, dass Mutationen in verschiedenen Molekülen des BMP-Signalweges zu identischen Phänotypen führen können.

**Abb. 3: Proteine des BMP-Signalweges und assoziierte isolierte Handfehlbildungen.**



Legende Abb. 3.

Mutationen in verschiedenen Proteinen des BMP-Signalweges und des Co-Rezeptors ROR2 führen zu einander imitierenden Typen der Brachydaktylien und/oder einem proximalem Symphalangismus.

Mutationen in *GDF5* und *BMPRI1B* sowie eine Dysregulation von *BMP2* sind mit Brachydaktylie Typ A2 und C assoziiert; Mutationen in *NOG* und *ROR2* bewirken die Manifestation einer Brachydaktylie Typ B. Das klinische Bild der Brachydaktylien zeigt

eine intra- und interfamiliäre Variabilität, weshalb davon auszugehen ist, dass weitere modifizierende Faktoren Einfluss auf die Merkmalsausprägung nehmen.

### 3.1.1 *GDF5*

In *GDF5* sind eine Vielzahl von heterozygoten Missense-, Nonsense- oder Frameshift-Mutationen beschrieben, die einen Funktionsverlust des Proteins bewirken und klinisch mit einer autosomal dominanten Brachydaktylie Typ C einhergehen (Everman et al., 2002; Polinkovsky et al., 1997). *GDF5* weist gemeinsam mit weiteren Mitgliedern der BMP- und GDF-Familie eine charakteristische Grundstruktur auf. So ist *GDF5* durch ein Signalpeptid, eine Prodomäne und eine mature Domäne charakterisiert. Über Disulfidbrücken verbunden, liegt *GDF5* wie die anderen BMPs als Homo- oder Heterodimer vor. Durch die Abspaltung der Prodomäne von der maturaen Domäne mit Hilfe der Proproteinkonvertasen entsteht biologisch aktives *GDF5*, das mit den BMP-Rezeptoren interagieren kann. Während lange Zeit angenommen wurde, dass die Entfernung der Prodomäne bereits intrazellulär vor der Sezernierung des Proteins erfolgt und hierüber die Aktivität von *GDF5* reguliert wird, so deuten einige Beobachtungen darauf hin, dass auch pro*GDF5* in den Extrazellularraum sezerniert wird und der Prodomäne vermutlich weitere regulative Funktionen zukommen. Missense-Mutationen in der Prodomäne von *GDF5* führen in heterozygotem oder homozygotem Zustand in diesem Zusammenhang beispielsweise zu einer Brachydaktylie Typ C (Everman et al., 2002; Schwabe et al., 2004). Der zugrunde liegende Pathomechanismus dieser Prodomänen-Mutationen ist derzeit nicht hinreichend verstanden.

Desweiteren sind heterozygote Punktmutationen in *GDF5* bekannt, die, anstatt mit einer Brachydaktylie Typ C, mit anderen Phänotypen assoziiert sind. Distinkte Missense-Mutationen verändern spezifische Teilfunktionen von *GDF5* und bewirken unterschiedliche klinische Auswirkungen. Die Mutation p.R380Q, die das Schnittstellenmotif zwischen Prodomäne und maturaer Domäne von *GDF5* verändert, führt beispielsweise zur gestörten Prozessierung von pro*GDF5* und zu einer gesteigerten Sekretion von pro*GDF5*. Dies resultiert in einer verringerten biologischen Aktivität von *GDF5* und verursacht bei Patienten eine Brachydaktylie Typ A2 (Ploger et al., 2008). Eine andere Mutation p.L441P stört spezifisch die Interaktion zwischen *GDF5* und BMPRI1B und resultiert ebenfalls in einer Brachydaktylie Typ A2 (Seemann et al., 2005).

### 3.1.2 *BMPR1B*

Heterozygote Mutationen, die in *BMPR1B* liegen, äußern sich klinisch entweder in einer Brachydaktylie Typ A2 oder führen zu einer ungewöhnlichen Kombination von Brachydaktylie Typ C mit SYM1, wie durch uns gezeigt werden konnte (Lehmann et al., 2007; Lehmann et al., 2003). *BMPR1B* besteht aus einer extrazellulären Domäne zur Ligandenbindung, einem transmembranösen Bereich, einer glycin- und serinreichen GS-Region, die für den Phosphorylierungsprozess wichtig ist, einer Kinase-Domäne und einem C-terminalen NANDOR (nonactivating, non-down-regulating) Motiv, das vermutlich bei der Phosphorylierung und der Regulation des Rezeptors an der Zelloberfläche beteiligt ist (Garamszegi et al., 2001). Derzeit sind drei heterozygote, mit Brachydaktylie assoziierte Mutationen in *BMPR1B* bekannt: p.I200K, p.R486W und p.R486Q. Die Lage der Mutationen im Bereich der GS-Region und der NANDOR-BOX deuten darauf hin, dass der Transphosphorylierungsvorgang durch *BMPR2* gestört ist und eine normale Aktivierung von *BMPR1B* nicht erfolgen kann. Während p.I200K und p.R486W zur Brachydaktylie Typ A2 führen, resultiert p.R486Q in Brachydaktylie A2 oder in einem Phänotyp mit Brachydaktylie Typ C und zusätzlichem SYM1. Die Aminosäurenveränderung p.R486Q kann demnach Phänotypen imitieren, die durch Funktionsverlustmutationen in *GDF5* oder *NOG* verursacht werden. Der Phänotyp einer Brachydaktylie Typ C ist über eine Funktionseinschränkung von *BMPR1B* durch die Mutation p.R486Q erklärbar. Die Tatsache, dass ebenfalls ein SYM1 mit der Mutation assoziiert ist, könnte dafür sprechen, dass durch die Funktionseinschränkung von *BMPR1B* eine in Relation gesteigerte Wirkung des Liganden *GDF5* über *BMPR1A* stattfindet. Eine gesteigerte Signalweiterleitung über *BMPR1A* wurde bereits ursächlich bei bestehendem SYM1 nachgewiesen (Seemann et al., 2005).

### 3.1.3 *NOG*

Zu den *NOG*-assoziierten, hauptsächlich durch Knochensynostosen auffallenden Störungen gehören SYM1, SYNS1 und TCC (Gong et al., 1999). Diese Störungen sind Folge eines Funktionsverlustes von *NOG*, die dazu führen, dass *NOG* die Aktivität von *GDF5* nicht mehr hemmen kann. Am Mausmodell mit inaktiviertem *Nog* sind schwere letale Auswirkungen zu beobachten, die u. a. zu einer Überproduktion von Knorpel und zum Verlust einer regelrechten Gelenkbildung bzw. zu Gelenkfusionen führen (Brunet et al., 1998).

Spezielle Punktmutationen in *GDF5* können ebenfalls eine SYM1 oder SYNS1 verursachen. Die Mutation p.R438L beispielsweise resultiert in einem Verlust der Ligand-Rezeptor-Spezifität von *GDF5* zu *BMPR1B* und führt zu einer gesteigerten Bindungsaffinität zu *BMPR1A*, den Rezeptor, der typischerweise durch *BMP2* aktiviert wird (Seemann et al., 2005). Zwei weitere *GDF5*-Mutationen an der Aminosäureposition 445 (p.N445K, p.N445T) führen dazu, dass *NOG* nicht mehr an *GDF5* binden kann und somit den gleichen Effekt wie Funktionsverlustmutationen in *NOG* bedingen (Seemann et al. 2009, Manuskript eingereicht). Eine klinisch auffällige Brachydaktylie besteht bei diesen *NOG*- und *GDF5*-assoziierten Störungen mit Gelenksfusionen nicht.

Im Gegensatz dazu stehen heterozygote *NOG*-Mutationen, die mit Brachydaktylie Typ B2 assoziiert sind. Das kombinierte Auftreten einer Brachydaktylie Typ B, eines Symphalangismus und carpaler Fusionen zeichnen diese durch *NOG*-Mutationen verursachte Subform der Brachydaktylie Typ B aus. Im Gegensatz zu den durch *NOG*-Mutationen verursachten Störungen mit Gelenksfusionen macht bereits der unterschiedliche Phänotyp deutlich, dass sich diese Mutationen in ihrem pathogenen Mechanismus unterscheiden müssen. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Untersuchungen können wir schließen, dass die mit Brachydaktylie Typ B assoziierten Mutationen nur zu einem geringen Funktionsverlust führen (Lehmann et al., 2007). Das bedeutet, dass der Phänotyp einer Brachydaktylie Typ B nicht durch eine fehlende Inhibition von *GDF5* durch *NOG* erklärbar ist.

Die zur Brachydaktylie führenden Mutationen sind nicht als Cluster an einem spezifischen Bereich des *NOG*-Proteins lokalisiert. Sie liegen vielmehr an drei funktionell unterschiedlichen Domänen und betreffen erstens die Region, an der *NOG* die BMP Typ 1 Rezeptorbindung von *GDFs/BMPs* blockiert, zweitens die Region, an der *NOG* die BMP Typ 2 Rezeptorbindung von *GDFs/BMPs* blockiert und drittens die Bindungsstelle für die Homodimerisierung der *NOG*-Proteine.

Die Mutation p.P187S, die in der Dimerisierungsstelle liegt, führt über eine Konformationsänderung zu einer Destabilisierung der *NOG*-Dimerisierung und bedingt das Vorliegen von monomeren *NOG*-Proteinen, wie über Western-Blot Analysen gezeigt werden konnte. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass monomere *NOG*-Proteine noch an *BMPs/GDFs* binden und somit partiell antagonistisch wirken könnten.

Die Aminosäureveränderungen in NOG, welche innerhalb der hydrophoben Bindungstaschen für die BMP Typ 1 Rezeptoren und den BMP Typ 2 Rezeptor in den GDFs/BMPs liegen, führen zu der Hypothese, dass im Resultat eine veränderte Aktivierung der BMP-Rezeptoren stattfindet. Über eine veränderte Affinität der mutierten NOG-Proteine zu bestimmten GDFs/BMPs ist eine Verschiebung der Liganden wahrscheinlich, die nachfolgend ein Ungleichgewicht in der Signalweiterleitung über die BMP-Rezeptoren verursacht. Bei der Entstehung des Phänotyps können zudem weitere, derzeit nicht bekannte Proteine von Bedeutung sein, die mit Molekülen des BMP-Signalweges interagieren.

### 3.1.4 *ROR2*

Seit längerem ist bekannt, dass Mutationen in *ROR2* die Ursache für Brachydaktylie Typ B1 sind (Oldridge et al., 2000). Hinsichtlich der Merkmalsausprägung an den terminalen Phalangen unterscheidet sich der Phänotyp nicht von dem Typ B2, weshalb ein funktioneller Zusammenhang von NOG und *ROR2* auf molekularer Ebene anzunehmen ist. An experimentellen Daten ist hierzu bislang wenig publiziert. Einzig in einer Arbeit, in der eine Interaktion zwischen *ROR2* und *BMPRI1B* nachgewiesen wurde, ist gezeigt worden, dass eine aktivierte *ROR2*-Tyrosinkinase inhibitorische Auswirkungen auf die *BMPRI1B*-vermittelte intrazelluläre Signalweiterleitung hat (Sammar et al., 2004). Wie das wechselseitige Zusammenspiel zwischen *ROR2* und den Proteinen des BMP-Signalweges im Detail vonstatten geht, ist unklar. Überlegungen hinsichtlich des zum Brachydaktylie Typ B führenden Mechanismus der *NOG*-Mutationen werden zudem erschwert, da derzeit die Wirkungsweise der in *ROR2* liegenden Mutationen nicht umfassend aufgeklärt ist, wenngleich die phänotypischen Auswirkungen von heterozygoten und homozygoten Mutationen in *ROR2* gut untersucht sind.

Heterozygote Mutationen in *ROR2* führen zur autosomal dominanten Brachydaktylie Typ B1, während homozygote Mutationen typischerweise mit dem klinischen Bild eines autosomal rezessiven Robinow Syndroms, welches durch Kleinwuchs, mesomere Verkürzung der Extremitäten, spondylokostaler Dysostose, Genitaliauffälligkeiten und einen spezifischen fazialen Aspekt charakterisiert ist (Robinow et al., 1969). Heterozygote Anlagenträger von Robinow Syndrom verursachenden Mutationen sind klinisch unauffällig und weisen keine Brachydaktylie auf.



Die Aminosäureveränderungen, die zum Robinow Syndrom führen, sind entweder im extrazellulären Bereich oder intrazellulär in der Tyrosinkinase von ROR2 lokalisiert. Es ist davon auszugehen, dass das Robinow Syndrom durch einen Funktionsverlust des ROR2-Proteins bedingt ist (Chen et al., 2005; Schwarzer et al., 2009). Im Gegensatz dazu liegen die zur Brachydaktylie Typ B führenden Nonsense-Mutationen direkt proximal oder distal der Tyrosinkinasedomäne und führen zu einem trunkierten Protein. Die mutierten ROR2-Proteine sind an der Zellmembran nachweisbar, wobei eine direkte Korrelation zwischen an der Membran lokalisiertem mutiertem ROR2 und der Schwere des Brachydaktylie Typ B-Phänotyps besteht (Schwarzer et al., 2009). Verschiedene Beobachtungen lassen vermuten, dass die Pathogenität der Mutationen über einen dominanten Effekt ausgeübt wird (Afzal und Jeffery, 2003).

### **3.2 Homozygote Mutationen in *GDF5* und *BMPRI1B* sind mit Skelettdysplasien assoziiert**

Werden die Brachydaktylien in der Regel durch heterozygote Mutationen in Molekülen des BMP-Signalwegs hervorgerufen, so führen homozygote Funktionsverlust-Mutationen in der Regel zu schweren Skelettdysplasien, den autosomal rezessiven akromesomelen Chondrodysplasien. Hierzu zählen das Grebe Syndrom (MIM #200700), das Hunter-Thompson Syndrom (MIM #201250) und das DuPan Syndrom (MIM #228900). Als homologes Tiermodell dieser Krankheitsgruppe ist die *GDF5*-knock out *brachypodism* (*bd*) Maus zu nennen, die verkürzte Extremitäten und Skelettveränderungen an den distalen Extremitätenabschnitten aufweist, die ähnlich denen sind, wie sie bei den humanen akromesomelen Chondrodysplasien auftreten (Storm und Kingsley, 1999). Patienten mit Grebe Syndrom zeigen die schwerste Form der Skelettveränderung mit einem hochgradigen Kleinwuchs, einer starken mesomelen Verkürzung der Extremitäten und rudimentären Fingeranlagen, die eine Maximalform der Brachydaktylie darstellen (Thomas et al., 1997). Patienten mit Hunter-Thompson Syndrom weisen einen ähnlichen Phänotyp auf, der jedoch insgesamt weniger schwerwiegend erscheint (Thomas et al., 1996). Das DuPan Syndrom bezeichnet den mildesten Typ dieser Störungen und beinhaltet als klinische Besonderheit eine Fibulaaplasie (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2002). Angemerkt sei, dass zudem in einer Familie über eine autosomal dominante Form des DuPan Syndroms berichtet wird (Szczałuba et al., 2005). Allen Formen der akromesomelen Chondrodysplasie ist eine komplexe Form der Brachydaktylie gemeinsam.

Analog zum Schweregrad der durch heterozygote *GDF5*-Mutationen hervorgerufenen Brachydaktylien, ist eine Korrelation in der Ausprägung der Chondrodysplasien zu beobachten. So führt die Mutation p.L441P in heterozygotem Zustand zur Brachydaktylie Typ A2 und resultiert im homozygoten Zustand in einem DuPan Syndrom. Die Mutation p.C400Y hingegen ist heterozygot mit Brachydaktylie Typ C assoziiert und prägt sich homozygot als Grebe Syndrom aus. Ein compound-heterozygoter Zustand von p.R378Q und p.P436T resultiert in einem DuPan Syndrom, während heterozygot die Mutation p.R378Q zu einer sehr mild ausgeprägten Brachydaktylie und der heterozygote Aminosäureaustausch p.P436T zu keinen klinischen Auswirkungen führt (Douzgou et al., 2008). Diese klinischen Beispiele zeigen, dass für bestimmte *GDF5*-Mutationen eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation beobachtet werden kann.

In dem *GDF5*-Rezeptor *BMPRI1B* konnten wir heterozygote Missense-Mutationen als ursächlich für Brachydaktylie Typ A2 identifizieren. Bisher ist für Missense-Mutationen in *BMPRI1B* kein homozygoter Phänotyp bekannt, möglicherweise weil dieser Zustand mit einer Letalität einhergeht. Eine homozygote 8 Basenpaar umfassende Deletion in der extrazellulären Region von *BMPRI1B*, von der ausgegangen werden kann, dass sie zu einem Funktionsverlust des Rezeptors führt, äußert sich allerdings klinisch ebenfalls in einem Subtyp der akromesomelen Chondrodysplasie. Der bestehende Phänotyp unterscheidet sich von den *GDF5*-assoziierten Chondrodysplasien durch eine zusätzlich auftretende Uterushypoplasie sowie einen hypergonadotrophen Hypogonadismus, aus dem eine Infertilität resultiert. Der Phänotyp an der Hand weist Fusionen an den Ossa carpalia und Ossa tarsalia auf und grenzt sich auch in diesem Punkt von den anderen akromesomelen Chondrodysplasien ab (Demirhan et al., 2005). Ein unauffälliger Phänotyp bei heterozygoten Trägern einer Funktionsverlustmutation in *BMPRI1B* spricht dafür, dass eine Haploinsuffizienz zu keinen pathologischen Auswirkungen führt (Demirhan et al., 2005).

Ein diesem homozygoten Status äquivalentes Tiermodell, die *BmpR1b*-knock out (*BmpR1b*<sup>-/-</sup>) Maus, zeigt Skelettveränderungen, die auf die distalen Extremitätenabschnitte beschränkt sind und als Hypoplasie der Phalangen und Fusionen der Carpal- und Tarsalknochen imponieren. Funktionsverlust-Mutationen in *BmpR1b* resultieren zudem bei weiblichen Mäusen in einer Infertilität (Yi et al., 2001). Eine weitere Assoziation zwischen Mutationen in Molekülen des BMP-Signalwegs und der Auswirkung auf die Fertilität wurde auch bei anderen Tierarten nachgewiesen. Bei den Booroola Merino Schafen

beispielsweise geht eine spezielle *BmpR1b*-Punktmutation mit einer gesteigerten Ovulationsrate einher (Mulsant et al., 2001). In den Inverdale und Hanna Schafrassen führt eine distinkte Mutation in *Bmp15* im heterozygoten Zustand zu einer höheren Ovulationsrate, während diese Mutation homozygot zu einer ovariellen Dysfunktion und zu einer Infertilität führt (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004). Eine pathologische Skelettbeteiligung ist bei diesen genannten Schafrassen nicht zu beobachten. *BMPR1B* weist somit eine regulative Funktion hinsichtlich der Fertilität bei Säugetieren auf. Im Rahmen der Skelettentwicklung ist *BMPR1B* ein Schlüsselrezeptor, der als Hauptrezeptor von *GDF5* eine essentielle Rolle in der Chondrozytendifferenzierung, der Bildung der Phalangen sowie der Gelenkentwicklung spielt.

Die klinischen Manifestationen, die die Charakteristika für die verschiedenen Subtypen der akromesomelen Dysplasien darstellen, verdeutlichen, dass auch homozygote Mutationen in *GDF5* und *BMPR1B* zu überlappenden Phänotypen führen.

### **3.3 Dysregulation von *SHH* und *BMP2* als Ursache isolierter Handfehlbildungen**

Entwicklungsgene, die in ihrer Expression hoch sensibel in engen Zeitabschnitten und in sich bildenden Gewebestrukturen angeschaltet bzw. ausgeschaltet werden müssen, benötigen eine exakt abgestimmte Steuerung, die über die Existenz multipler *cis*-regulatorischer Elemente ermöglicht wird. Da die Genaktivität von Entwicklungsgenen in den einzelnen Phasen in der Embryonalentwicklung exakt koordiniert sein muss, ist davon auszugehen, dass für viele dieser Gene mehrere *cis*-agierende Regulatoren existieren, die gewebespezifisch die Genexpression steuern.

Deletionen von *cis*-regulatorischen Elementen oder das Element einschließende Inversionen und Translokationen sind für die Entstehung von Erkrankungen und Fehlbildungen bekannt (Kleinjan und van Heyningen, 2005; Niedermaier et al., 2005). Im Gegensatz dazu sind Duplikationen, die *cis*-regulatorische Elemente beinhalten, als Ursache von klinischen Störungen bisher nur selten identifiziert worden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine Duplikation von *cis*-Regulatoren, welche die Genaktivität von *SHH* und *BMP2* in den distalen Extremitäten steuern, pathogen ist und klinisch mit isolierten Handfehlbildungen einhergeht.

### 3.3.1 SHH

Sonic Hedgehog (SHH) ist als ein Mitglied der Hedgehog Protein Familie ein evolutionär hoch konserviertes Signalmolekül. Es reguliert als Schlüsselgen bereits in der frühen Embryonalphase eine Vielzahl von grundlegenden Entwicklungsschritten in multiplen Geweben. Die Beteiligung von SHH ist ganz wesentlich bei der Entwicklung der Extremitäten, indem es die antero-posteriore Wachstumsachse definiert. Eine lokalisierte und asymmetrische Expression von SHH am posterioren Rand der Extremitätenknospe, der sog. Zone polarisierender Aktivität (ZPA), bestimmt die regelrechte phänotypische Ausbildung der Phalangen an Händen und Füßen. Veränderungen in der SHH-Konzentration führen zu klinischen Störungen. So bedingt eine zusätzliche, ektopische Expression von Shh am anterioren Rand der Extremitätenknospe im Weiteren eine gestörte Musterbildung und resultiert in der Anlage von überzähligen Phalangen (Polydaktylie), wie Untersuchungen an Mausmutanten (*Sasquatch*, *Hemimelic extra toes*, *M101116*, *M100081*) ergeben haben (Lettice et al., 2003; Lettice et al., 2002; Masuya et al., 2007).

Es ist bekannt, dass die Aktivität von *SHH* durch *cis*-agierende regulatorische Elemente kontrolliert wird. Eines dieser Elemente, die ZPA regulierende Sequenz (ZRS) steuert die umgrenzte, posteriore *Shh*-Expression in der Extremitätenknospe (Blanc et al., 2002; Sharpe et al., 1999). Bei der ZRS handelt es sich um eine nicht-kodierende Sequenz, die etwa 1 Mb entfernt in 5' Richtung von *SHH* liegt und als „long-range“ Regulator gezielt die Expression von *SHH* in den Extremitäten steuert und somit einen extremitätenspezifischen Enhancer darstellt. Typischerweise liegen zwischen *cis*-agierenden Regulatoren und dem zu regulierenden Zielgen nur sehr wenige bzw. keine weiteren Gene. Die ZRS liegt hinter einer 800 kb großen, genarmen Region 5' von *SHH*, in der sich weitere hochkonservierte nicht-kodierende Sequenzen finden, die für das Vorliegen von zusätzlichen *cis*-Regulatoren sprechen. Beispielsweise steuert ein anderer Enhancer in dieser Region die *Shh*-Expression im Gehirn und Neuralrohr (Jeong et al., 2006). Ist dieser durch eine Disruption in seiner Funktion gestört, so ist die *Shh*-Expression im Vorderhirn deutlich verringert. Dieser Effekt führt ebenso wie Funktionsverlustmutationen in der kodierenden Sequenz von *SHH* beim Menschen zu einer Gehirnehlbildung, der Holoprosencephalie (Wallis und Muenke, 1999).

Mutationen in der ZRS äußern sich klinisch in einer Polysyndaktylie mit triphalangealem Daumen. Die Steuerung der *Shh*-Expression durch die ZRS ist in den distalen Extremitäten

am Tiermodell bewiesen. Über welchen Pathomechanismus der extremitätenspezifische Regulator die *Shh*-Expression kontrolliert, ist nicht umfassend verstanden (Blanc et al., 2002; Lettice et al., 2002; Maas und Fallon, 2004; Sharpe et al., 1999). So ist es auch unklar, wie Veränderungen in der ZRS zu einer Missexpression von *Shh* in den Extremitäten führen.

Wir konnten durch klinische Charakterisierung und molekulare Untersuchung mittels Array-CGH in einer großen Familie nachweisen, dass eine die ZRS umfassende Mikroduplikation von etwa 590 kb ebenfalls zum Phänotyp einer Polysyndaktylie mit triphalangealem Daumen führt. Durch eine weitere Arbeitsgruppe wurde die Identifikation dieser pathogenen ZRS-Duplikation bestätigt (Sun et al., 2008). Hinsichtlich des pathogenen Mechanismus der Duplikation sind mehrere Szenarien zu überlegen: Der Position zwischen *cis*-Regulator und *SHH* könnte eine entscheidende Rolle zukommen, um eine lokale Interaktion von Regulator und Zielgen zu ermöglichen. Es ist denkbar, dass es durch den duplizierten Abschnitt zu räumlichen Änderungen in der Chromatinstruktur kommt und dadurch eine Interaktion unmöglich oder gestört wird. Allerdings ist der 590 kb umfassende duplizierte Bereich klein. Ein gestörter Positionseffekt von Regulator und Zielgen wurde bereits am *Shh*-Lokus für eine Mausmutante nachgewiesen. Eine Inversion, die zur Folge hat, dass *Shh* von regulatorischen Sequenzen getrennt wird, führt zur Missexpression des Gens und bedingt eine Brachydaktylie in der *short digits (dsh)* Maus (Niedermaier et al., 2005).

Desweiteren können DNA-bindende Proteine, die als Aktivatoren oder Repressoren die ZRS besetzen, die Genaktivität beeinflussen. Da durch eine duplizierte ZRS die doppelte Anzahl an Bindungsstellen für solche Proteine vorhanden wäre, ist es vorstellbar, dass durch die erhöhte Quantität der bindenden Proteine eine fehlerhafte Expression von *SHH* resultiert.

### 3.3.2 *BMP2*

Die Expression von *BMP2* ist in den embryonalen Entwicklungsphasen in verschiedenen Geweben zu finden. Die Genaktivität scheint demnach komplex gesteuert zu sein. *BMP2* kommt als wichtiges Entwicklungsgen eine essentielle Bedeutung in der frühen Organentwicklung zu. Mausmutanten, die einen Funktionsverlust (knock-out) von *Bmp2* aufweisen, sind letal (Zhang und Bradley, 1996). Bei der Entwicklung der Phalangen und

der Interphalangealgelenke ist die Funktion von BMP2 von entscheidendem Einfluss. Es ist davon auszugehen, dass eine Dysregulation von *BMP2* in der sensiblen Phase, in welcher die Bildung und Ausdifferenzierung von distalen Extremitätenstrukturen stattfindet, zu pathologischen Veränderungen an Hand und Fuß führt.

*BMP2* liegt inmitten einer Genwüste. Etwa 600 kb in 5'-Richtung und 1.1 Mb in 3'-Richtung sind keine weiteren Gene lokalisiert. Die angrenzenden genfreien Sequenzen mit konservierten Regionen lassen vermuten, dass sich in diesen Regionen multiple *cis*-regulatorische Elemente befinden, die die *BMP2*-Expression komplex steuern können. Im Jahr 2007 wurden zwei Enhancer, ECR1 und ECR2, publiziert, die in der Maus +156 kb bzw. +160 kb in der 3' Region von *Bmp2* lokalisiert sind. (Chandler et al., 2007). Für ECR1 wurde eine regulatorische Funktion auf die *Bmp2*-Expression in sich differenzierenden Osteoblasten nachgewiesen.

Über eine genomweite Kopplungsanalyse in einem großen Stammbaum mit autosomal dominanter Brachydaktylie Typ A2 konnte ein neuer Locus für die Störung identifiziert werden (Dathe et al., 2009). Mittels einer hochauflösenden Custom Array-CGH-Analyse wurde eine heterozygote ~5.5 kb umfassende Mikroduplikation 110 kb 3' von *BMP2* als Ursache für die Fehlbildung detektiert. Innerhalb der duplizierten Sequenz liegt ein *cis*-regulatorisches Element, das spezifisch die *Bmp2*-Expression in den distalen Extremitäten steuert, wie wir an einem transgenen Mausmodell zeigen konnten. Es ist daraus abzuleiten, dass eine veränderte *BMP2*-Expression in den Regionen der sich bildenden Phalangen kausal für die vorliegende Brachydaktylie ist und dass ein duplizierter *cis*-Regulator hierfür die molekulare Ursache darstellt.

Ein aufeinander exakt abgestimmtes Zusammenspiel von Liganden, deren Antagonisten und Rezeptoren im BMP-Signalweg ist die Grundlage für eine regelrechte Abfolge der Entwicklungsprozesse, damit die Musterbildung und Morphogenese der knöchernen Strukturen und der Gelenke in der Hand ordnungsgemäß ablaufen kann. Da sich die *BMP2*-assoziierte Brachydaktylie Typ A2 klinisch nicht von der unterscheidet, die durch Funktionsverlustmutationen in *BMPR1B* oder *GDF5* verursacht wird, kann postuliert werden, dass die funktionellen Auswirkungen auf den BMP-Signalweg zu einem gleichen Endeffekt führen, also in einem verringerten Signalling über *BMPR1B* resultieren.

Unbeantwortet ist jedoch die Frage nach dem Mechanismus, über den das duplizierte *cis*-regulatorische Element eine Fehlregulation von *BMP2* bewirkt und die Brachydaktylie

verursacht. Die Fehlsteuerung kann entweder eine verstärkte oder eine verringerte *BMP2*-Expression sowie eine Missexpression von *BMP2* zur Folge haben.

Die Missexpression eines Zielgens durch einen duplizierten *cis*-aktivierten Enhancer als Ursache für eine isolierte Handfehlbildung wurde bereits für die Steuerung der *SHH*-Expression ausgeführt. Eine örtliche bzw. zeitliche Missexpression von *BMP2* ist für die Entstehung der Brachydaktylie nicht auszuschließen.

Es gibt zwei klinische Berichte von größeren Duplikationen auf Chromosom 20p, die mit Brachydaktylie Typ A2 assoziiert sind: Bei einem Jungen mit einer Trisomie 20p11.2-ter und einer Deletion 20q13.3-ter und bei einer weiteren Person mit dem Karyotyp 46,XY,der(15),t(15;20)(q25.2;p12.2) (Lucas et al., 1985; Pfeiffer et al., 1997). In beiden Fällen umfasst die Duplikation nach den zytogenetischen Angaben sowohl *BMP2* als auch seinen extremitätenspezifischen *cis*-Regulator. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass eine Duplikation, die das regulatorische Element und *BMP2* beinhaltet, ebenfalls zur Brachydaktylie A2 führt, wie die in dieser Arbeit beschriebene Duplikation, die nur das regulatorische Element umfasst. Ein Positionseffekt als Pathomechanismus für veränderte *BMP2*-Aktivität erscheint demnach nicht wahrscheinlich.

Eine konditionale Inaktivierung von *Bmp2* in den Extremitäten geht nicht mit pathologischen Effekten einher, wie in einem Mausmodell gezeigt wurde (Bandyopadhyay et al., 2006). Das bedeutet, dass die biologische Funktion von *Bmp2* in der Maus für eine regelrechte Entwicklung der Extremitäten nicht erforderlich ist. Dass die heterozygote Duplikation des extremitätenspezifischen *cis*-Regulators zu einer verringerten Expression von *BMP2* führt und dies die Ursache für die Brachydaktylie beim Menschen darstellen soll, erscheint demnach eher unwahrscheinlich.

*BMP2* ist neben *GDF5* ein Ligand der BMP Typ 1 Rezeptoren, wobei *BMP2* im Gegensatz zu *GDF5* mit gleicher Affinität zu *BMPR1A* und *BMPR1B* bindet, während *GDF5* bevorzugt mit *BMPR1B* interagiert (Kirsch et al., 2000; Kotzsch et al., 2008). Es ist durchaus denkbar, dass eine gesteigerte *BMP2*-Expression zu einer verstärkten Interaktion von *BMP2* mit *BMPR1A* und *BMPR1B* führt. Zudem ist es möglich, dass durch eine verstärkte *BMP2*-Expression ein kompetitiver Effekt zwischen *BMP2* und *GDF5*, dessen Aktivität nicht verändert ist, resultiert. Durch die Verschiebung des Gleichgewichtes der Liganden wäre eine relative Abnahme der Signalweiterleitung via *BMPR1B* zu erwarten.

Diese Überlegung lässt eine durch die Duplikation des *cis*-Regulators gesteigerte *BMP2*-Expression am wahrscheinlichsten erscheinen.



## 4. Zusammenfassung

Die Ausbildung der anatomischen Strukturen der Hand ist ein komplexer Prozess. Die Aktivität einer Vielzahl von Genen ist in der frühen Embryonalphase notwendig, um die regelrechte Handentwicklung zu gewährleisten. Dem BMP-Signalweg und der SHH-Signalwirkung kommt hierbei eine wesentliche Bedeutung zu.

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Mutationen in verschiedenen Molekülen des BMP-Signalwegs die Ursache von isolierten Handfehlbildungen sind und zu einander imitierenden phänotypischen Veränderungen an der Hand führen.

- Mittels einer Positionsklonierung in einem großen Stammbaum konnte *BMPR1B* als das merkmalsassoziierte Gen für die Brachydaktylie Typ A2 identifiziert werden. Es wurden bei den betroffenen Personen in zwei verschiedenen Familien die heterozygoten Punktmutationen p.I200K und p.R486W als ursächlich nachgewiesen. Über weitere funktionelle *in vitro* und *in vivo* Analysen wurde die Pathogenität der beiden Mutationen in *BMPR1B* bewiesen, für die ein dominanter Effekt als wahrscheinlich gilt.
- Der kombinierte Phänotyp von Brachydaktylie Typ C und proximalem Symphalangismus (SYM1) kann durch die in *BMPR1B* liegende Mutation p.R486Q verursacht werden. Dies ist ungewöhnlich, da solche phänotypischen Auswirkungen normalerweise durch Mutationen in dem *BMPR1B*-Liganden GDF5 oder dem GDF5-Antagonisten NOG bedingt sind. Aus den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen kann gefolgert werden, dass die Mutation p.R486Q über einen partiellen Funktionsverlust der GDF5-Wirkung zur Brachydaktylie führt. Als Mechanismus, der die Entstehung eines SYM1 erklären kann, wird eine relativ gesteigerte Aktivität von *BMPR1A* diskutiert.
- Durch den Nachweis von 6 verschiedenen Punktmutationen in *NOG* ist eine weitere molekulare Ursache für eine Subgruppe der heterogen bedingten Brachydaktylie vom Typ B identifiziert worden. Dieser Subtyp B2 unterscheidet sich klinisch von der *ROR2*-assoziierten Brachydaktylie Typ B1 insbesondere durch das Bestehen eines SYM1. Die Lokalisation der pathologischen Aminosäureveränderungen an strukturell wichtigen Regionen im NOG-Protein sowie die Daten der funktionellen Analysen sprechen dafür, dass durch die den Subtyp B2 verursachende Mutationen die Interaktionen von Proteinen im BMP-Signalweg verändert sind und das damit verbundene Signalungleichgewicht zur Pathogenität führt.

Um in der Embryonalentwicklung der Hand eine exakte zeitliche und gewebespezifische Expression der bedeutsamen Gene zu gewährleisten, ist eine abgestimmte Regulation der Genaktivität nötig. Diese Steuerung der Genexpression erfolgt bei Entwicklungsgenen über verschiedene regulative Elemente, die sehr weit vom zu kontrollierenden Zielgen liegen können, den sog. *cis*-Regulatoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Duplikationen von *cis*-agierenden Elementen bei Patienten mit isolierten Handfehlbildungen identifiziert, die über eine Dysregulation der Genaktivität von *BMP2* und *SHH* die Ausbildung von isolierten Handfehlbildungen bedingen.

- Mittels einer genomweiten Kopplungsanalyse in einer Familie mit Brachydaktylie Typ A2 wurde ein weiterer Locus diese Störung auf Chromosom 20p12.3 kartiert. Die Durchführung einer lokusspezifischen hochauflösenden Array-CGH-Analyse ergab eine Mikroduplikation in einem nicht-kodierenden Bereich, der etwa 110 kb 3' von *BMP2* entfernt liegt. Analysen an einem transgenen Mausmodell konnten nachweisen, dass innerhalb des duplizierten Abschnittes ein Element zur extremitätenspezifischen Steuerung der *BMP2*-Expression lokalisiert ist. Eine Verdopplung dieses *cis*-regulierenden Elementes ist pathogen und wirkt sich klinisch beim Menschen als Brachydaktylie aus.

- Über eine Array-CGH-Analyse wurde eine Duplikation identifiziert, die das *cis*-lokalisierte Steuerungselementes (ZRS) für die *SHH*-Expression in den Extremitäten umfasst. Die duplizierte ZRS geht bei betroffenen Personen in variabler Ausprägung mit Polysyndaktylie und triphalangealen Daumen einher. Dieser Phänotyp wird bekanntermaßen durch in der ZRS liegende Mutationen verursacht. Eine Missexpression von *Shh* in der Extremitätenknospe wurde bereits als ursächlich für diese Fehlbildung identifiziert, jedoch ist derzeit unklar, wie der Prozess der durch die ZRS kontrollierten *Shh*-Expression vonstatten geht. Durch die Identifikation der die ZRS umfassende Duplikation ist eine zusätzliche Beobachtung gemacht worden, die weitere Überlegungen zum Mechanismus der Genregulation zulässt.

Die vorliegende Arbeit erweitert das Spektrum der phänotypischen Ausprägung sowie der molekularen Störungen von isolierten Handfehlbildungen und trägt über funktionelle Analysen zu dem Verständnis der zugrunde liegenden Pathogenese bei.

## 5. Literaturverzeichnis

- Afzal AR, Jeffery S (2003) One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. *Hum Mutat* 22:1-11.
- Bagheri-Fam S, Barrionuevo F, Dohrmann U, Gunther T, Schule R, Kemler R, Mallo M, Kanzler B, Scherer G (2006) Long-range upstream and downstream enhancers control distinct subsets of the complex spatiotemporal Sox9 expression pattern. *Dev Biol* 291:382-397.
- 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:e216.
- Bell J (1951) *Treasury of Human Inheritance*. Cambridge University Press, London, pp 1-31.
- Blanc I, Bach A, Robert B (2002) Unusual pattern of Sonic hedgehog expression in the polydactylous mouse mutant Hemimelic extra-toes. *Int J Dev Biol* 46:969-974.
- Brunet LJ, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM (1998) Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* 280:1455-1457.
- Chandler RL, Chandler KJ, McFarland KA, Mortlock DP (2007) Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. *Mol Cell Biol* 27:2934-2951.
- Chen Y, Bellamy WP, Seabra MC, Field MC, Ali BR (2005) ER-associated protein degradation is a common mechanism underpinning numerous monogenic diseases including Robinow syndrome. *Hum Mol Genet* 14:2559-2569.
- Dathe K, Kjaer KW, Brehm A, Meinecke P, Nurnberg P, Neto JC, Brunoni D, Tommerup N, Ott CE, Klopocki E, et al. (2009) Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. *Am J Hum Genet* 84:483-492.
- de Laat W, Grosveld F (2003) Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res* 11:447-459.
- Demirhan O, Turkmen S, Schwabe GC, Soyupak S, Akgul E, Tastemir D, Karahan D, Mundlos S, Lehmann K (2005) A homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *J Med Genet* 42:314-317.
- Douzgou S, Lehmann K, Mingarelli R, Mundlos S, Dallapiccola B (2008) Compound heterozygosity for GDF5 in Du Pan type chondrodysplasia. *Am J Med Genet A* 146A:2116-2121.
- Everman DB, Bartels CF, Yang Y, Yanamandra N, Goodman FR, Mendoza-Londono JR, Savarirayan R, White SM, Graham JM, Jr., Gale RP, et al. (2002) The mutational spectrum of brachydactyly type C. *Am J Med Genet* 112:291-296.
- Faiyaz-Ul-Haque M, Ahmad W, Zaidi SH, Haque S, Teebi AS, Ahmad M, Cohn DH, Tsui LC (2002) Mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP1) gene in a kindred affected with fibular hypoplasia and complex brachydactyly (DuPan syndrome). *Clin Genet* 61:454-458.
- 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* 126:1305-1315.

- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, et al. (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25:279-283.
- 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* 28:386-388.
- Garamszegi N, Dore JJ, Jr., Penheiter SG, Edens M, Yao D, Leof EB (2001) Transforming growth factor beta receptor signaling and endocytosis are linked through a COOH terminal activation motif in the type I receptor. *Mol Biol Cell* 12:2881-2893.
- Gilboa L, Nohe A, Geissendorfer T, Sebald W, Henis YI, Knaus P (2000) Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11:1023-1035.
- Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, et al. (1999) Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* 21:302-304.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70:900-909.
- Jeong Y, El-Jaick K, Roessler E, Muenke M, Epstein DJ (2006) A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development* 133:761-772.
- Johnson D, Kan SH, Oldridge M, Trembath RC, Roche P, Esnouf RM, Giele H, Wilkie AO (2003) Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. *Am J Hum Genet* 72:984-997.
- Kirsch T, Nickel J, Sebald W (2000) BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPRII. *Embo J* 19:3314-3324.
- Kleinjan DA, Seawright A, Mella S, Carr CB, Tyas DA, Simpson TI, Mason JO, Price DJ, van Heyningen V (2006) Long-range downstream enhancers are essential for Pax6 expression. *Dev Biol* 299:563-581.
- Kleinjan DA, van Heyningen V (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* 76:8-32.
- Klopocki E, Ott CE, Benatar N, Ullmann R, Mundlos S, Lehmann K (2008) A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *J Med Genet* 45:370-375.
- Kotzsch A, Nickel J, Seher A, Heinecke K, van Geersdaele L, Herrmann T, Sebald W, Mueller TD (2008) Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome. *J Biol Chem* 283:5876-5887.
- Kulesa H, Turk G, Hogan BL (2000) Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J* 19:6664-6674.
- Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, Reissner C, et al. (2007) A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am J Hum Genet* 81:388-396.
- Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Suring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Muller D, et al. (2003) Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12277-12282.

- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E (2003) A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 12:1725-1735.
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, et al. (2002) Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7548-7553.
- Lucas J, Le Mee F, Le Marec B, Pluquailec K, Journal H, Picard F (1985) [Trisomy 20p derived from a maternal pericentric inversion and brachymesophalangy of the index finger]. *Ann Genet* 28:167-171.
- 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* 109:833-844.
- Maas SA, Fallon JF (2004) Isolation of the chicken *Lmbr1* coding sequence and characterization of its role during chick limb development. *Dev Dyn* 229:520-528.
- Masuya H, Sezutsu H, Sakuraba Y, Sagai T, Hosoya M, Kaneda H, Miura I, Kobayashi K, Sumiyama K, Shimizu A, et al. (2007) A series of ENU-induced single-base substitutions in a long-range cis-element altering Sonic hedgehog expression in the developing mouse limb bud. *Genomics* 89:207-214.
- Mohr, Wried (1919) A new Type of Hereditary Brachyphalangy in Man. Institution of Washington, Washington, DC
- Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, et al. (2001) Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5104-5109.
- Niedermaier M, Schwabe GC, Fees S, Helmrich A, Brieske N, Seemann P, Hecht J, Seitz V, Stricker S, Leschik G, et al. (2005) An inversion involving the mouse *Shh* locus results in brachydactyly through dysregulation of *Shh* expression. *J Clin Invest* 115:900-909.
- Nifuji A, Noda M (1999) Coordinated expression of *noggin* and bone morphogenetic proteins (BMPs) during early skeletogenesis and induction of *noggin* expression by BMP-7. *J Bone Miner Res* 14:2057-2066.
- Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, Matsumoto T, Makishima F, Yamaguchi A, Yamashita H, Enomoto S, Miyazono K (1996) Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem* 271:21345-21352.
- 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* 277:5330-5338.
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO (2004) Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16:291-299.
- Oldridge M, Fortuna AM, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, DeChiara TM, Kimble RB, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, et al. (2000) Dominant mutations in *ROR2*, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet* 24:275-278.
- Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, Vortkamp A (1999) Interaction of *Ihh* and BMP/*Noggin* signaling during cartilage differentiation. *Dev Biol* 209:239-253.
- Pfeiffer RA, Kandler C, Sieber E, Rauch A, Trautmann U (1997) Brachydactyly in a child with duplication-deficiency subsequent to t(15;20)(q25.2;p12.2)mat. Candidate regions on one or both chromosomes? *Clin Genet* 51:357-360.

- 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* 17:1222-1233.
- Polinkovsky A, Robin NH, Thomas JT, Irons M, Lynn A, Goodman FR, Reardon W, Kant SG, Brunner HG, van der Burgt I, et al. (1997) Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat Genet* 17:18-19.
- Robinow M, Silverman FN, Smith HD (1969) A newly recognized dwarfing syndrome. *Am J Dis Child* 117:645-651.
- Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* 322:32-38.
- Sabherwal N, Bangs F, Roth R, Weiss B, Jantz K, Tiecke E, Hinkel GK, Spaich C, Hauffa BP, van der Kamp H, et al. (2007) Long-range conserved non-coding SHOX sequences regulate expression in developing chicken limb and are associated with short stature phenotypes in human patients. *Hum Mol Genet* 16:210-222.
- Sammar M, Stricker S, Schwabe GC, Sieber C, Hartung A, Hanke M, Oishi I, Pohl J, Minami Y, Sebald W, et al. (2004) Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* 9:1227-1238.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24:104-108.
- Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, Gillessen-Kaesbach G, Oldridge M, Wilkie AO, Komec R, Mundlos S (2000) Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet* 67:822-831.
- Schwabe GC, Turkmen S, Leschik G, Palanduz S, Stover B, Goecke TO, Mundlos S (2004) Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of CDMP1. *Am J Med Genet A* 124:356-363.
- Schwarzer W, Witte F, Rajab A, Mundlos S, Stricker S (2009) A gradient of ROR2 protein stability and membrane localization confers brachydactyly type B or Robinow syndrome phenotypes. *Hum Mol Genet*
- Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K, Stricker S, Pohl J, Ploger F, Staub E, et al. (2005) Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 115:2373-2381.
- Sharpe J, Lettice L, Hecksher-Sorensen J, Fox M, Hill R, Krumlauf R (1999) Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for the polydactylous mouse mutant Sasquatch. *Curr Biol* 9:97-100.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.
- Storm EE, Kingsley DM (1999) GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Dev Biol* 209:11-27.
- Sun M, Ma F, Zeng X, Liu Q, Zhao XL, Wu FX, Wu GP, Zhang ZF, Gu B, Zhao YF, et al. (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* 45:589-595.
- Szczaluba K, Hilbert K, Obersztyn E, Zabel B, Mazurczak T, Kozłowski K (2005) Du Pan syndrome phenotype caused by heterozygous pathogenic mutations in CDMP1 gene. *Am J Med Genet A* 138:379-383.

- Thomas JT, Kilpatrick MW, Lin K, Erlacher L, Lembessis P, Costa T, Tsipouras P, Luyten FP (1997) Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat Genet* 17:58-64.
- 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* 12:315-317.
- Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* 10:1453-1465.
- Urist MR (1965) Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150:983-899.
- Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG (2005) Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R215-223.
- Wallis DE, Muenke M (1999) Molecular mechanisms of holoprosencephaly. *Mol Genet Metab* 68:126-138.
- Yi SE, LaPolt PS, Yoon BS, Chen JY, Lu JK, Lyons KM (2001) The type I BMP receptor *Bmpr1B* is essential for female reproductive function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7994-7999.
- Zhang H, Bradley A (1996) Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122:2977-2986.

## **Danksagung**

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Professor Dr. Stefan Mundlos bedanken, der mich bei meinen wissenschaftlichen Interessen stets unterstützte und es mir ermöglichte, meinen Forschungsschwerpunkt auf die angeborenen Handfehlbildungen auszurichten.

Danken möchte ich den Kollegen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Genetik und des Max-Planck-Institutes für molekulare Genetik. Die Zusammenarbeit im Rahmen der durchgeführten Projekte war sehr bereichernd, sowohl in fachlicher als auch in persönlicher Hinsicht.

Einen herzlichen Dank richte ich an Prof. Dr. Petra Seemann für die fruchtbare Kooperation und anregenden Diskussionen in den letzten Jahren. Anja Brehm sowie Randi Koll gebührt ein großes Dankeschön für ihr tatkräftiges Engagement, das zum Gelingen der Projekte beitrug. Dr. Eva Klopocki danke ich für die Gespräche am Nachmittag bei einer Tasse Kaffee. Daraus haben sich Ideen entwickelt, die zu einer erfreulichen Zusammenarbeit geführt haben. Lieben Dank an Dr. Jochen Hecht, der mir oftmals bei den Fragen nach dem Warum prompt fundierte Erklärungen liefern konnte und dessen Hilfsbereitschaft ich darüber hinaus sehr geschätzt habe. Danke auch an Gundula Leschik, Birgit Jonske, Silvia Jähnke und Ingrid Barth, die mir immer freundlich bezüglich meiner endlosen Nachfragen zu Probeneingängen und Mutationslisten zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei den Patienten, ohne deren Kooperationsbereitschaft die Durchführung meiner wissenschaftlichen Projekte nicht möglich gewesen wäre. Ich würde mir wünschen, dass meine klinische Arbeit und die molekularen Ergebnisse einige ihrer Fragen beantworten konnten.

Durch die Forschungsförderung der Charité und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft standen mir finanzielle Mittel zur Verfügung, die zur Verwirklichung der Projekte unerlässlich waren. Hierfür bedanke ich mich ausdrücklich.

Ein von Herzen kommendes Danke an meine Eltern, die mich bei der Verwirklichung meiner Pläne unterstützt haben und immer für mich da waren. Uwe, Dir danke ich im Besonderen dafür, dass Du jeden Tag aufs Neue positive Energie in mir freisetzt.



## **ERKLÄRUNG**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

---

Datum

Dr. med. Katarina Dathe