

Aus dem CharitéCentrum
für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Gaedicke

Habilitationsschrift

Molekulare Grundlagen von Organmalformationen am Beispiel kongenitaler Extremitätenfehlbildungen und eines Lateralisierungsdefekts

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Georg C. Schwabe
geboren am 13.06.1967 in Göttingen

Eingereicht: Oktober 2007
Dekan: Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. A. Winterpacht
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Gärtner

“Nature is nowhere accustomed more openly to display her secret mysteries than in cases where she shows traces of her workings apart from the beaten path; nor is there any better way to advance the proper practice of medicine than to give our minds to the discovery of the usual law of nature by the careful investigation of cases of rarer forms of disease. For it has been found in almost all things, that what they contain of useful or of applicable nature, is hardly perceived unless we are deprived of them, or they become deranged in some way.”

William Harvey (1578 – 1657)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	05
1.1	Einteilung kongenitaler Entwicklungsstörungen	05
1.2	Bedeutung der Molekulargenetik für das Verständnis kongenitaler Entwicklungsstörungen	06
1.3	Molekulare Grundlagen der Embryonalentwicklung	08
1.4	Bedeutung der Zilien während der Embryonalentwicklung und bei kongenitalen Malformationen	11
1.5	Molekulare Mechanismen der Extremitätenentwicklung	13
1.6	Molekulare Genetik von Extremitätenfehlbildungen	17
1.7	Funktionelle Untersuchung humaner Skelettmalformationen im Mausmodell	19
2.	Originalarbeiten	21
2.1	<i>Primäre Ziliäre Dyskinesie mit regelrechter Axonem-Ultrastruktur wird durch DNAH11 Mutationen verursacht.</i> Schwabe GC, Hoffmann K, Loges TN, Birker D, Rossier C, de Santi MM, Olbrich H, Fliegau M, Faily M, Liebers U, Collura M, Gaedicke G, Mundlos S, Wahn U, Blouin JL, Niggemann B, Omran H, Antonarakis SE, Bartoloni L. Hum Mutat 2008, 29:289-98	21
2.2	<i>Unterschiedliche Mutationen des Rezeptortyrosinkinase-Gens ROR2 verursachen Brachydaktylie Typ B.</i> Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, Gillessen-Kaesbach G, Oldridge M, Wilkie AO, Komec R, Mundlos S. Am J Hum Genet 2000, 67:822-31	23
2.3	<i>Brachydaktylie Typ C verursacht durch eine homozygote Missense-Mutation in der CDMP1-Prodomäne.</i> Schwabe GC, Türkmen S, Leschik G, Palanduz S, Stöver B, Goecke TOG, Majewski F, Mundlos S. Am J Med Genet 2004, 124A:356-63	25
2.4	<i>Die Ror2 Knock-out-Maus als Modell für die Entwicklungspathogenese des autosomal rezessiven Robinow Syndroms.</i> Schwabe GC, Trepiczik B, Süring K, Brieske N, Tucker AS, Sharpe PT, Minami Y, Mundlos S. Dev Dyn 2004, 229:400-10	27
2.5	<i>Eine Inversion des Shh-Genlocus der Maus führt zu Brachydaktylie durch Dysregulation der Shh-Expression.</i> Niedermaier M*, Schwabe GC*, Fees S, Helmrich A, Brieske N, Seemann P, Hecht J, Seitz V, Stricker S, Leschik G, Schröck E, Selby PB, Mundlos S. J Clin Invest 2005, 115:900-9 (*geteilte Erstautorschaft)	29
3.	Diskussion	31
3.1	DNAH11 Mutationen als Ursache für die Primäre Ziliäre Dyskinesie und das Kartagener Syndrom mit normalem Axonem	31
3.2	Molekulargenetik von Extremitätenfehlbildungen beim Menschen und im Mausmodell	33

3.2.1	<i>ROR2</i> ist bei der Extremitätenformation und der Chondrozytendifferenzierung bedeutsam	33
3.2.2	<i>GDF5</i> Mutationen führen zu Brachydaktylie und Chondrodysplasien	35
3.2.3	Bedeutung der Regulation von <i>Sonic hedgehog</i> bei der Entwicklung und Malformationen der Extremität	37
4.	Literaturverzeichnis	42
5.	Zusammenfassung	49
6.	Danksagung	51
	Erklärung gemäß Habilitationsordnung der Charité	52

1. Einleitung

1.1 Einteilung kongenitaler Entwicklungsstörungen

Kongenitale Entwicklungsstörungen treten beim Menschen mit einer Häufigkeit von drei Prozent bei Geburt auf und nehmen bis zum Alter von fünf Lebensjahren bis auf acht Prozent zu (Connor und Ferguson-Smith, 1987). Mehr als 20 Prozent aller Todesfälle im Säuglings- und Kindesalter in Nordamerika sind auf kongenitale Entwicklungsstörungen zurückzuführen. Kongenitale Entwicklungsstörungen werden in Malformationen, Deformationen, Disruptionen und Dysplasien unterteilt (Spranger et al., 1982). Unter **Malformation** versteht man die Veränderung eines Organs oder Teils eines Organs oder einer größeren Körperregion, die durch eine intrinsische Störung der Embryonalentwicklung entstanden ist (z. B. angeborene Herzfehler, Spalthand). Malformationen treten in verschiedenen Schweregraden auf. Ihr Wiederholungsrisiko ist abhängig von der zugrunde liegenden Störung und beträgt kumulativ zwischen ein und fünf Prozent. Mit **Disruption** bezeichnet man einen morphologischen Defekt eines Organs, Teils eines Organs oder einer größeren Körperregion, der durch eine extrinsische Störung oder Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung entstanden ist. Ein typisches Beispiel für die Ursache einer Disruption ist die Exposition gegenüber Teratogenen in der Schwangerschaft. Von **Deformation** spricht man, wenn eine veränderte Form, Gestalt oder Position eines Körperteils durch die Einwirkung mechanischer Kräfte während der Schwangerschaft hervorgerufen wird. Das Wiederholungsrisiko für Deformationen ist gering, außer wenn die zugrunde liegende Ursache persistiert (z. B. Uterus bicornis). Eine **Dysplasie** ist durch eine veränderte Organisation des Gewebes und seiner Morphologie gekennzeichnet. Einer Dysplasie liegt ein lokalisierter, gewebespezifischer Defekt mit veränderter Histogenese zugrunde (z. B. Diastrophe Dysplasie).

Folgende weitere Begriffe werden verwendet, um kongenitale Veränderungen zu charakterisieren: Der Begriff **Syndrom** beschreibt das gleichzeitige Vorliegen verschiedener verwandter Merkmale, die pathogenetisch auf eine Ursache zurückzuführen sind, z. B. Down Syndrom. Von **Sequenz** spricht man, wenn ein Muster multipler Anomalien vorliegt, das durch eine einzelne strukturelle oder mechanische Ursache pathogenetisch hervorgerufen wird, z. B. Potter Sequenz bei Oligohydramnion. Unter **Assoziation** versteht man ein statistisch erhöhtes gemeinsames Auftreten multipler Anomalien, die nicht pathogenetisch oder kausal zusammenhängen.

Unter allen angeborenen Entwicklungsstörungen stellen die Malformationen des Zentralnervensystems die größte Gruppe mit einer Inzidenz von 1% dar. Angeborene Herzfehler weisen eine Inzidenz von 0,8%, Fehlbildungen der Nieren von 0,4% und Malformationen der Extremitäten von 0,1% auf. Alle anderen Anomalien haben eine kumulative Inzidenz von 0,6% (Connor und Ferguson-Smith, 1987). Ursächlich liegen kongenitalen Entwicklungsstörungen chromosomale Veränderungen (6-7%), Mutationen in einzelnen Genen (7-8%), umweltbedingte Faktoren (7-10%) und multifaktorielle Ursachen (20 bis 25%) zugrunde. Bei 50 bis 60 % der kongenitalen Entwicklungsstörungen wird keine Ursache gefunden (Persaud et al., 1990, Thompson et al., 1991).

1.2 Bedeutung der Molekulargenetik für das Verständnis kongenitaler Entwicklungsstörungen

Die Identifizierung der zugrunde liegenden genetischen Veränderungen stellt einen wichtigen Schritt für das Verständnis der Pathogenese kongenitaler Entwicklungsstörungen dar. Vor 1980 waren nur sehr wenige krankheitsrelevante Gene beim Menschen bekannt, die meist auf einer biochemischen Grundlage identifiziert worden waren. Die Fortschritte der Molekulargenetik, insbesondere die Sequenzierung des humanen Genoms, stellten die Basis für die Identifizierung zahlreicher humaner krankheitsrelevanter Gene dar (McPherson et al., 2001). Der Mensch besitzt circa 25.000 Gene (Internat. Human Genome Consortium, 2004) von denen derzeit mehr als 2100 in der *Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*-Datenbank verzeichnet sind und **monogenen Erkrankungen** zugrunde liegen.

Monogene Erkrankungen entstehen aus der Veränderung eines einzelnen Gens. Ein Großteil der monogenen Erkrankungen ist genetisch heterogen, d. h. der gleiche Phänotyp kann durch Mutationen in verschiedenen Genen, die häufig auch funktionell miteinander interagieren, verursacht werden. Demgegenüber besteht bei vielen monogenen Erkrankungen auch eine phänotypische Variabilität, d. h. Mutationen im gleichen Gen führen zu verschiedenen Phänotypen. Dies wird durch sog. Modifier-Gene oder Regulatoren erklärt, die funktionell mit dem betroffenen Genprodukt interagieren. Bei **multifaktoriellen Erbgängen** führen Mutationen bestimmter Gene zusammen mit anderen prädisponierenden genetischen und/oder Umweltfaktoren zur Krankheitsmanifestation.

Den am weitesten verbreiteten Ansatz zur Identifizierung von Genen, die monogene Erkrankungen verursachen, stellt die **positionelle Klonierung** dar, die sich im Wesentlichen auf die Untersuchung von Stammbäumen mit mehreren Betroffenen stützt. Mittels

positioneller Klonierung wird untersucht, ob die Erkrankung mit einem bestimmten Genlokus segregiert („koppelt“). Der Genort, an dem das Krankheitsgen mit hoher Wahrscheinlichkeit lokalisiert ist, wird durch das Vorliegen identischer elterlicher Allele, sog. Haplotypen, bei allen Betroffenen mit sog. Mikrosatelliten-Markern identifiziert, bzw. genomweit kartiert. Mikrosatelliten-Marker sind kurze, polymorphe, nicht kodierende (CA)_n DNA-Repeats (engl.), die über das gesamte Genom verteilt sind. Die Grenzen des Kopplungsintervalls werden durch Rekombinationsereignisse („Crossing over“) bei der Reduktionsteilung (Meiose) der elterlichen Gameten festgelegt.

Außerdem können **chromosomale Veränderungen** zur Identifizierung von Krankheitsgenen dienen. Diese Veränderungen umfassen chromosomale Translokationen, Inversionen, Duplikationen und Deletionen, bei denen die betroffenen Gene über eine Identifizierung der chromosomalen Bruchpunkte detektiert werden können. Zur Detektion chromosomaler Veränderungen werden konventionelle zytogenetische Verfahren (Karyogramm, Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)) und molekulargenetische Methoden (Southern Blot, PCR) verwendet. Ein moderneres Verfahren stellt die „molekulare Karyotypisierung“ dar, bei der mit Array-Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) genomweit Mikrodeletionen oder -duplikationen hochauflösend identifiziert werden können. Dies hat zur Detektion zahlreicher neuer Mikrodeletionssyndrome geführt. Interessanterweise findet man auch bei gesunden Personen submikroskopische Veränderungen der Kopienzahlen von DNA-Segmenten, sog. low copy number variations (CNV). Man vermutet deshalb einen Zusammenhang zwischen CNVs und der phänotypischen Variabilität monogener Erkrankungen bzw. der Suszeptibilität und/oder Progression multifaktorieller Erkrankungen (McCarroll und Altshuler, 2007).

Die Verfahren des **positionsunabhängigen Klonierens** sind in der Genom- und Postgenom-Ära von geringerer Bedeutung. So wurden früher beispielsweise Gene, bei denen lediglich die Proteinsequenz bekannt war, mit degenerierten Oligonukleotiden amplifiziert (reverser Ansatz) oder in einer cDNA-Expressionsbibliothek über Koloniefilter mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Ein weiteres Beispiel für positionsunabhängiges Klonieren stellt die Identifizierung und Klonierung expandierter Repeats bei sog. Repeatexpansionserkrankungen wie dem Fragilen-X-Syndrom dar. Darüber hinaus führte in vielen Fällen die Untersuchung von Genen, die in funktionellem Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, zur Identifizierung neuer Mutationen (sog. Kandidatengenansatz).

Nach der Identifizierung der krankheitsverursachenden Mutationen kann die Relevanz des Gens für die Erkrankung durch eine funktionelle Wiederherstellung des Phänotyps, sog.

„rescue“ (engl.) bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen zur Genfunktion und zur Pathogenese können an Hand von Tiermodellen durchgeführt werden. Bei der Auswahl des Modellorganismus sollte dabei die zu untersuchende Genfunktion berücksichtigt werden.

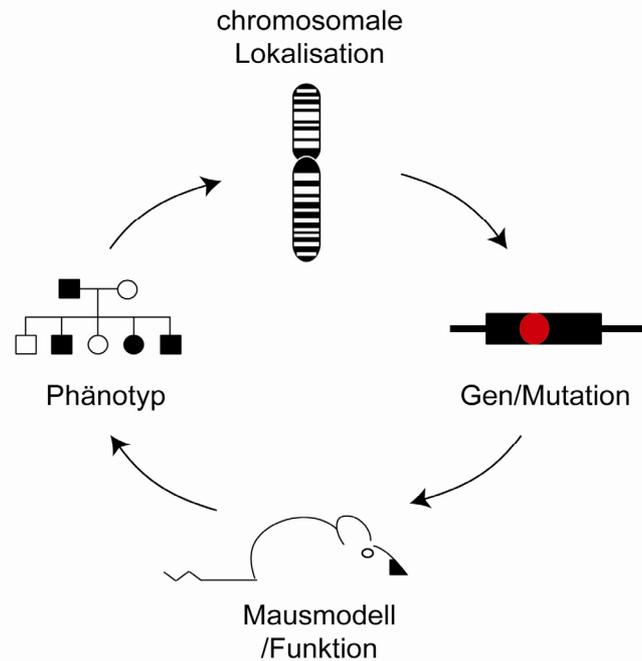


Abb. 1 Vom Phänotyp zur Funktion. Schematische Darstellung der Untersuchung genetisch bedingter Malformationen von der phänotypischen Beschreibung über die Kopplungsanalyse und Mutationsanalyse bis zur Generierung eines Mausmodells.

1.3 Molekulare Grundlagen der Embryonalentwicklung

Die Kenntnis der Embryonalentwicklung stellt die Grundlage für das Verständnis der Entstehung kongenitaler Malformationen dar. Bei Säugetieren unterteilt man die Embryonalentwicklung in **Blastogenese**, **Organogenese** und **Phänogenese**. Die **Blastogenese** umfasst die erste Phase, die beim Menschen von Tag 1 bis Tag 28 dauert. Sie beginnt mit dem Verschmelzen der Ei- und Samenzelle zur totipotenten **Zygote** und endet mit dem Verschwinden des Primitivstreifens am Ende der Gastrulation. Die Blastogenese umfasst die **Furchungsteilungen** der Zygote und Implantation als Blastula, die Entstehung der drei **Keimblätter** und des **Primitivstreifens** sowie die Anlage und den Verschluss des Neuralrohrs (**Neurulation**). Während der Neurulation bilden sich zwischen dem Oberflächenektoderm und dem Neuralrohr die **Neuralleistenzellen**, die die Vorläuferzellen kranialer Nerven, Melanozyten und zahlreicher Schädelknochen darstellen. Aus dem paraxialen Mesoderm entstehen die **Somiten** mit den Vorläuferzellen für die quergestreifte Muskulatur (Myotom), das subkutane Bindegewebe (Dermatom) und die Wirbelkörper.

Während der **Organogenese** (Tag 29 bis 56) entwickelt sich der Embryo zum Fetus, die äußeren und inneren Strukturen formieren sich aus den drei Keimblättern (Morphogenese) und werden ausgebildet (Histogenese). Am Ende dieses Zeitraums sind alle wichtigen **Organe** angelegt, allerdings noch nicht oder kaum funktionstüchtig. Zu Beginn der fünften Woche ändert sich auch die **Form** des noch flachen Embryos, der sich nun in der medianen und horizontalen Ebene in eine zylindrische C-Form faltet. Dabei werden die Primordia der **Körperwände**, der **Darm** und die **Nabelschnur** gebildet. Während der Organogenese kann die Exposition des Embryos gegenüber **Teratogenen** schwere kongenitale Malformationen verursachen.

Der Zeitraum ab der 9. Woche bis zum Ende der Schwangerschaft bzw. bis zum Ende der Wachstumsperiode der Pubertät wird **Phänogenese** genannt. Diese Phase ist durch schnelles Körperwachstum und Differenzierung der Gewebe und Organe gekennzeichnet. Der Kopf zeigt im Vergleich zum Körper nunmehr ein langsames Wachstum. Während der Phänogenese ist der Fetus gegenüber teratogenen Effekten nicht mehr so vulnerabel wie während der Organogenese. Teratogene können hier jedoch zu gestörter Entwicklung des Gehirns und der Augen führen.

Eine wichtige Voraussetzung bei der Entwicklung des Embryos ist, daß sich aus wenigen nicht determinierten Zellen eine große Anzahl von determinierten und spezialisierten Zellen bildet. Bei der frühen Embryonalentwicklung werden undeterminierte Zellen zunächst räumlich voneinander abgegrenzt und dann entsprechend ihrer späteren Funktion determiniert. Dieser Vorgang, bei dem geordnete räumliche Strukturen entstehen, wird als **Musterbildung** bezeichnet. Die in allen Zellen bis auf wenige Ausnahmen identische genomische Information wird nun differentiell abgelesen. Dies ermöglicht im weiteren Verlauf die Entstehung spezifischer Expressionsmuster.

Die ersten Untersuchungen über differentiell exprimierte Entwicklungskontrollgene, die für den Bauplan des Körpers bedeutsam sind, stammen aus molekulargenetischen und entwicklungsbiologischen Untersuchungen einer großen Anzahl von Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Lawrence und Morata, 1992). Diese Untersuchungen zeigten, daß Gene, die bei der Entwicklungskontrolle bedeutsam sind, in drei Klassen unterteilt werden können, die in einem **hierarchischen Netzwerk** miteinander interagieren (Abb. 2): **maternal exprimierte Gene**, **Segmentierungsgene** (Gap-Gene, Pair-Rule-Gene,

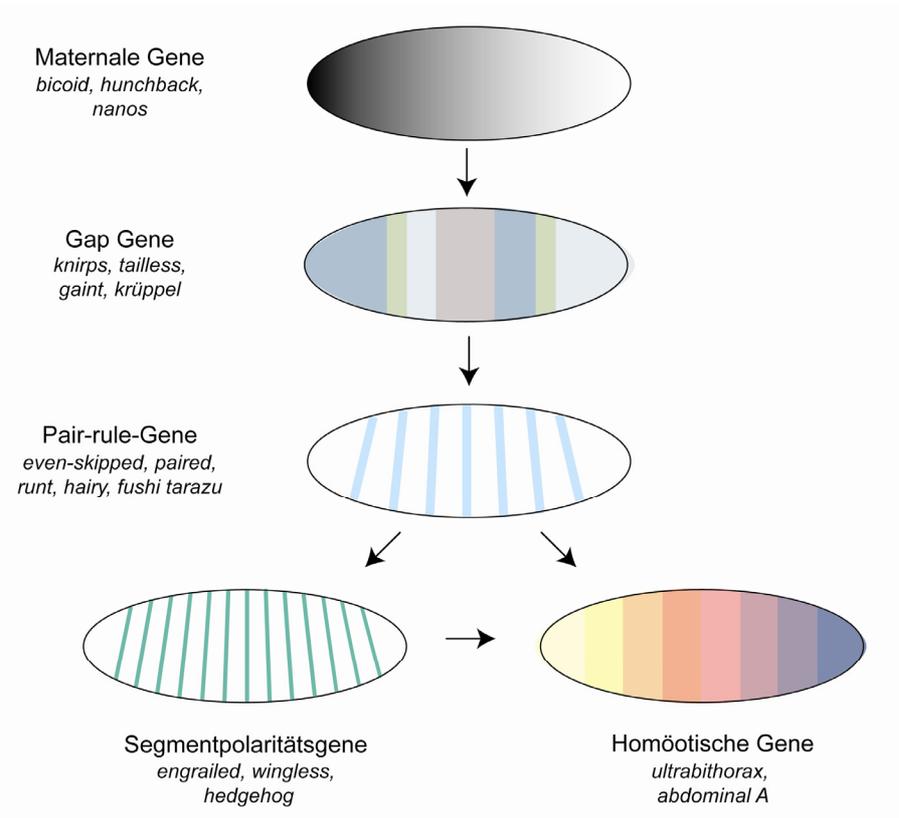


Abb. 2 Musterbildung in der *Drosophila*-Larve. Maternal exprimierte Gene, Gap-, Pair-Rule-, Segmentpolaritätsgene und homöotische Gene interagieren in einem hierarchischem Netzwerk bei der Spezifizierung der Untereinheiten der *Drosophila*-Larve.

Segmentpolaritätsgene) und **homöotische Gene** (Nusslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Gehring und Hiromi, 1986; Scott und Carroll, 1987; Ingham, 1988). Maternale Gene legen bereits während der Oogenese die dorso-ventrale und antero-posteriore Achse des Embryos fest. Die maternalen Genprodukte *bicoid*, *nanos* und *hunchback* führen zur Bildung von Proteingradienten, die die zygotischen Gap-Gene *knirps*, *krüppel*, *tailless* und *giant* aktivieren oder reprimieren (Driever und Nusslein-Volhard, 1989). Die *Drosophila*-Larve wird so zunächst in drei Segmente (Gap-Gene), im weiteren Verlauf in sieben (Pair-rule-Gene) bzw. 14 Segmente und Parasegmente (Segmentpolaritätsgene) unterteilt. Diese Unterteilung ist für die metamere Körpergestalt der Fruchtfliege verantwortlich. Am Ende der Genkaskade stehen homöotische Gene (Akam, 1989), die die Spezifizierung einzelner Segmente bestimmen. Viele der beteiligten Entwicklungskontrollgene kodieren für **Transkriptionsfaktoren**, die konservierte Sequenzmotive mit DNA-Bindungsdomänen beinhalten. Bekannte DNA-Bindungsmotive stellen die **Homöobox** (McGinnis et al., 1984), die **POU-Box** (Herr et al., 1988), die **Paired-Box** (Bopp et al., 1986), das **Zinkfinger-Motiv** (Culp et al., 1988), das **Helix-Loop-Helix-Motiv** (Murre et al., 1989) und das **Forkhead-Motiv** (Weigel et al., 1989) dar.

Die Grundprinzipien der Musterbildung sind stark zwischen den Spezies konserviert. So sind viele Entwicklungskontrollgene von *Drosophila* auch bei der embryonalen Musterbildung höherer Organismen bedeutsam. Diese konservierten Gene steuern nicht nur die Entwicklung der primären Körperachse, sondern sind auch bei der Lateralisierung sowie bei der Entwicklung sekundärer Körperachsen, wie der Anlage und Determinierung der Extremitäten wichtig.

1.4 Bedeutung der Zilien während der Embryonalentwicklung und bei kongenitalen Malformationen

Während der Embryonalentwicklung wird der Bauplan des Körpers in drei Dimensionen entlang der antero-posterioren, dorso-ventralen und rechts-links Achse vorgegeben. Obwohl der Körper äußerlich symmetrisch ist, ist die Mehrheit der inneren Organe asymmetrisch angelegt. Für die **Lateralisierung** der inneren Organe während der Embryonalentwicklung ist die **Aktivität von Zilien** verantwortlich, die am **embryonalen Knoten** am kaudalen Pol des Embryos lokalisiert sind und einen nach links gerichteten **periembrionalen Fluß** erzeugen (Nonaka et al., 1998; Nonaka et al., 2002). Zwei Modelle existieren, um die Induktion der Lateralisierung durch den periembrionalen Fluß am embryonalen Knoten zu erklären. Das „**Zwei-Zilien-Modell**“ geht davon aus, daß der embryonale Fluß durch motile Zilien generiert und von nicht-motilen mechanosensorischen Zilien als Signal empfangen wird. Das zweite Modell postuliert, daß ein Morphogen durch die motilen Zilien transportiert wird und dadurch ein **Morphogengradient** entsteht. Nach der Signalrezeption folgt in beiden Modellen eine asymmetrische Expression der Gene *Nodal* und *Pitx2* im Lateralplattenmesoderm, die wiederum zu einer asymmetrischen Ausrichtung des Herzschauchs und der Organe Leber, Milz und Darm führen (Abb. 3; McGrath und Brueckner, 2003).

Zilien sind aus Mikrotubulusdoubletten und assoziierten Motorproteinen bestehende Zellorganellen, die von der Zelloberfläche ausgehen. Entsprechend ihres strukturellen Aufbaus unterscheidet man **verschieden Zilientypen**: motile „9+2“ (respiratorische, ependymale Zilien), motile „9+0“ (nodale Zilien), immotile „9+2“ (Kinocilien des Innenohrs) und immotile „9+0“ Zilien (renale Monocilien, Photorezeptor-Zilium) (Fliegauß et al., 2007). Die Bewegung der motilen Zilien wird durch die Aktivität eines Dyneinkomplexes generiert, der ATP-abhängig Energie in mechanische Kraft metabolisiert und auf den Mikrotubulus überträgt (Asai und Koonce, 2001).

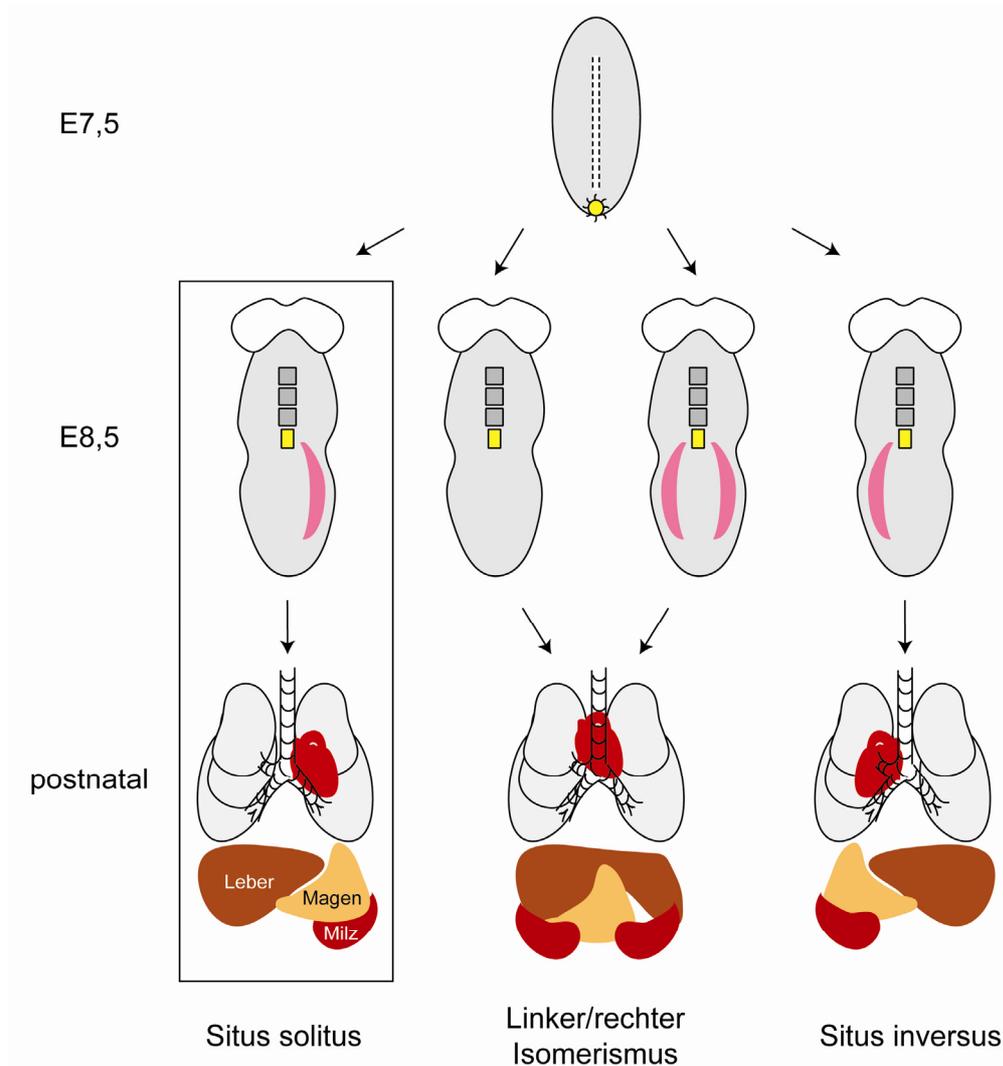


Abb. 3 Übersicht über die Links-Rechts-Asymmetrie. Zum Zeitpunkt E7,75 ist der Embryo symmetrisch. Der embryonale Knoten (gelb) ist an der Spitze des Embryos lokalisiert und mit Zilien besetzt. Er generiert einen nach links gerichteten Fluß. Zum Zeitpunkt E8,25 bis E8,5 wird der Wachstumsfaktor *Nodal* asymmetrisch exprimiert (violett). Zum Zeitpunkt E8,5 dreht sich der Herzschlauch nach rechts, und der molekularen Asymmetrie folgt die asymmetrische Organogenese. Eine normale Lateralisierung führt zum Situs solitus (links eingerahmt). Einen kompletten Verlust der Lateralisierung findet man beim linken oder rechten Isomerismus, der mit komplexen Herzfehlern einhergeht. Beim Situs inversus tritt eine spiegelverkehrte Organanlage auf, die in der Regel keine klinische Relevanz hat.

Eine bedeutsame Verbindung zwischen der Funktion motiler Zilien und der Etablierung der Links-Rechts-Körperasymmetrie stellen Patienten mit **Primärer Ziliärer Dyskinesie (PCD)** dar. PCD ist eine angeborene Erkrankung, bei der die motilen Zilien fehlende oder veränderte Motilität aufweisen. PCD tritt mit einer Prävalenz von 1:20.000 bis 1:60.000 auf (Zariwala et al., 2007). Aufgrund des fehlenden oder verminderten Zilienschlags von Zilien des Respirationstrakts und der Spermien bzw. des Eileiters weisen Patienten mit PCD chronische respiratorische Infektionen und eine eingeschränkte Fertilität auf. Die Diagnose wird klinisch bzw. durch ein verändertes Schlagmuster/-frequenz respiratorischer Zilien gestellt. Darüber hinaus sind ultrastrukturelle Defekte der Dyneinarme, Mikrotubuli und radialen Speichen bei 72 bis 97 % der PCD-Patienten nachweisbar (Zariwala et al., 2007).

Bei der Hälfte der Patienten mit PCD besteht eine spiegelverkehrte Anlage aller oder einiger innerer Organe (Situs inversus totalis oder partialis), die zusammen mit dem Vorliegen einer PCD als **Kartagener Syndrom (KS)** bezeichnet wird. Der Lateralisierungsdefekt (LD) resultiert aus der eingeschränkten Zilienfunktion am embryonalen Knoten und dem konsekutiv gestörten periembryonalen Fluß. Wie das Beispiel monozygoter Zwillinge mit PCD mit und ohne LD zeigt, treten LDe bei PCD-Patienten nach dem Zufallsprinzip auf (Noone et al., 1999).

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise vermehrt, daß **nicht-motile Zilien** für die Zelle bei der Rezeption von Signalen bedeutsam sind, indem sie die Signale gewissermaßen wie eine Antenne empfangen und an die Zelle in Form einer Signaltransduktionskaskade weiterleiten. Man geht heute davon aus, daß fast jede Körperzelle ein sensorisches Zilium trägt, über das Rezeptoren auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese Präsentation wird durch den sog. **intraflagellären Transport (IFT)** ermöglicht, einen Mechanismus, bei dem Proteine durch Dynein- und Kinesinmoleküle anterograd und retrograd entlang des Ziliums transportiert werden. Durch den IFT werden sowohl axonemale als auch intrazelluläre Proteine und zahlreiche Rezeptoren an der Oberfläche der Zelle präsentiert. Die Bedeutung der nicht-motilen Zilien bei der Morphogenese und Signaltransduktion konnte durch Mutationen von IFT-Proteinen gezeigt werden, die zu einer Veränderung der Zilienstruktur, der Expression von Entwicklungskontrollgenen und **morphogenetischen Defekten** führen (Huangfu et al., 2003). Erkrankungen, die mit gestörter Signaltransduktion sensorischer Zilien assoziiert sind, betreffen die Niere (autosomal rezessive polyzystische Nieren, Nephronophtise), die Retina (Retinitis pigmentosa), das Neuralrohr (Joubert Syndrom, Meckel-Gruber-Syndrom), das Skelett (Jeune Syndrom) und das Fettgewebe (Bardet-Biedl-Syndrom) (Fliegau et al., 2007).

1.5 Molekulare Mechanismen der Extremitätenentwicklung

Die Entwicklung der Extremität stellt ein ideales Modell zur Untersuchung der Skelettformation und genetisch bedingter Veränderungen der Musterbildung und Morphogenese des Skeletts dar. Viele grundlegende Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Skelettentwicklung stammen aus Untersuchungen embryonaler Extremitäten der Maus und des Huhns. Die skelettale Morphogenese wird in die Prozesse **Musterbildung, Organogenese, Wachstum** und **Homöostase** unterteilt (Mundlos, 2000).

Bei der **Musterbildung** wird die Position, Anzahl, Größe und Form der einzelnen Skelettelemente festgelegt. Die Extremitäten entstehen an der seitlichen Flanke des Embryos aus dem Lateralplattenmesoderm (Johnson und Tabin, 1997). Bei der Anlage der Extremität in drei Dimensionen sind verschiedene Signalzentren bedeutsam, in denen Schlüsselgene die Entwicklungsprozesse steuern (Johnson und Tabin, 1997). Die **apikale ektodermale Randleiste (AER)** am distalen Ende der Extremitätenanlage steuert das Auswachsen der Extremitätenknospe. Für die Aktivität der AER sind **Fibroblastenwachstumsfaktoren (Fgf)** bedeutsam. Die **Zone polarisierender Aktivität (ZPA)** stellt ein weiteres Signalzentrum am posterioren Rand der Extremitätenanlage dar, das die **antero-posteriore Musterbildung** der Extremität bestimmt. Die morphogenen Eigenschaften der ZPA werden durch das Signalmolekül **Sonic hedgehog (Shh)** bedingt (Abb. 4). Die **dorso-ventrale Musterbildung** determiniert die regelrechte Anordnung von Muskeln, Sehnen und Nägeln an der dorsalen und der palmaren Seite der Extremität. Die Gene *Wnt7a* und *Lmx1* kontrollieren die dorsale und *En2* die palmare Identität der Extremität (Parr und McMahon, 1995).

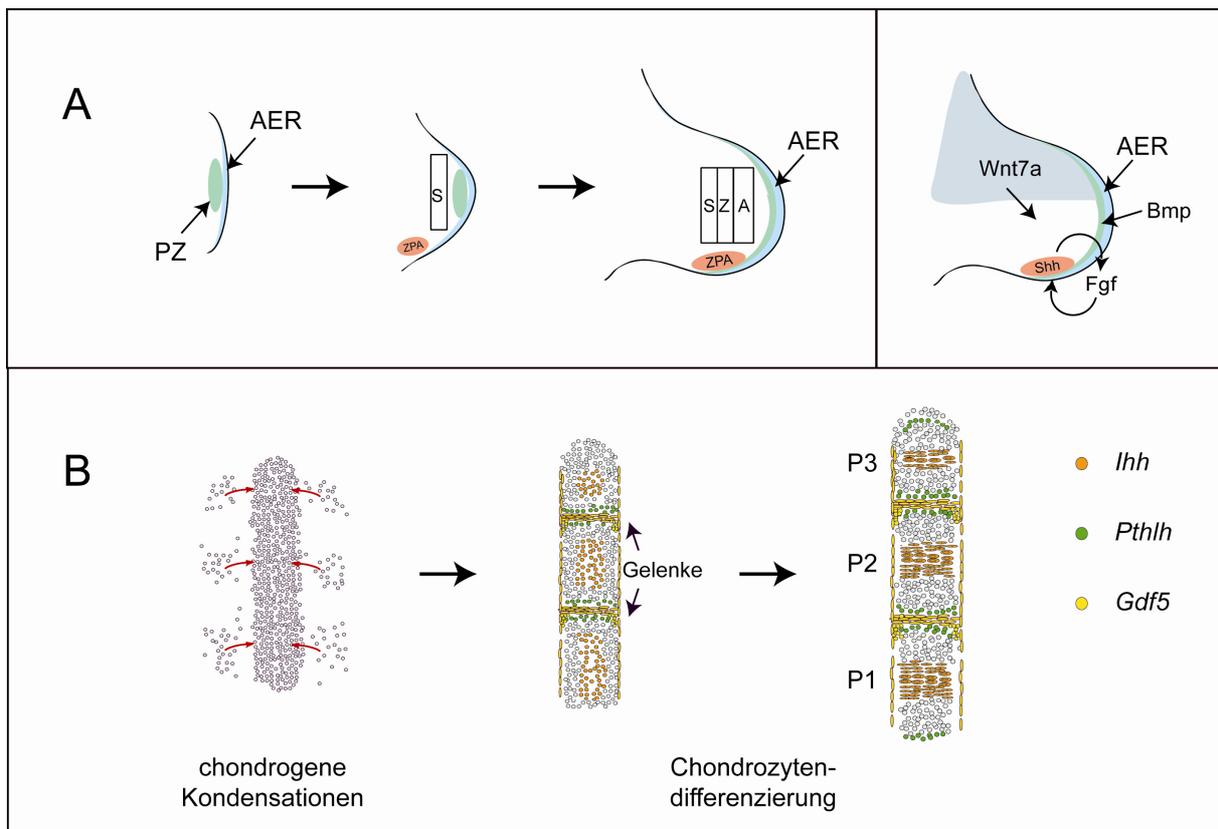


Abb. 4 Embryonale Entwicklung der Extremität. **A.** Bedeutung der Signalzentren apikale ektodermale Randleiste (AER), Zone polarisierender Aktivität (ZPA) und des Ektoderms bei der Musterbildung der Extremität (Progresszonen (PZ)-modell). In der AER werden *Fgf* exprimiert, die das proximo-distale Auswachsen steuern. *Shh* ist in der ZPA lokalisiert und ist für die antero-posteriore Musterbildung verantwortlich. *Wnt7a* ist im Ektoderm exprimiert und kontrolliert die dorso-ventrale Musterbildung. S-Stylopod, Z-Zeugopod und A-Autopod. **B.** Entwicklung der phalangealen Skelettelemente und Gelenke. Mesenchymale Zellen kondensieren zu einer knorpeligen Anlage (Organogenese). Im Bereich der zukünftigen Gelenke bildet sich die Interzone, in der *Gdf5* exprimiert wird. Zeitgleich differenzieren Knorpelzellen in der fetalen Wachstumsfuge unter Einfluß von *Ihh* und *Pthlh*. **P1**-Grundphalanx, **P2**-Mittelphalanx, **P3**-Endphalanx.

Die Spezifizierung der Skelettelemente in der frühen Extremitätenknospe werden mit zwei Konzepten erklärt (Dudley et al., 2002). Nach dem **Progresszonen(PZ)-modell** befinden sich die Zellen in der PZ unterhalb der AER in einem undifferenzierten Zustand und werden beim Verlassen der PZ spezifiziert. Das **frühe Spezifizierungsmodell** postuliert, daß undifferenzierte Zellpopulationen expandieren und in proximo-distaler Richtung abhängig von Zell-Zell-Interaktionen determiniert werden.

Bei der Entstehung der Knorpel- und Knochenmatrix kondensieren mesenchymale Vorläuferzellen zu einer knorpeligen Anlage (**Organogenese**). Die Position der zu bildenden Knochen wird durch die Anordnung von Vorläuferzellen vermittelt. Während die Extremitätenknospe auswächst, werden die Skelettelemente von proximal nach distal angelegt (Shubin und Alberch, 1986). So verzweigt sich bei der Extremitätenentwicklung die Humerusanlage in die Radius- und Ulnaanlagen, die Ulna verzweigt sich wiederum in die proximalen und distalen Karpalknochen und die Digiti I bis V. Humerus und Femur werden als Stylopod, Radius und Ulna, Tibia und Fibula als Zeugopod und Hand und Fuß als Autopod bezeichnet (Abb. 4).

Zum Zeitpunkt der frühen Chondrozytendifferenzierung beginnt die Entwicklung der **Gelenke** mit der Formation von Regionen höherer Zelldichte in den Bereichen der Extremität, an denen sich später die Gelenke bilden. Die Zellen dieser sog. Interzonen verlieren einige der Merkmale früher prächondrogener Zellen und differenzieren in eine dreischichtige Struktur, die aus einer zentralen intermediären Lamina mit geringer Zelldichte und zwei Schichten mit höherer Zelldichte besteht (Craig et al., 1987). Im weiteren Verlauf gehen die Zellen der intermediären Lamina durch Apoptose verloren und bilden den **Gelenkspalt**, während die äußeren Schichten sich zu **Gelenkknorpel** entwickeln (Kimura und Shiota, 1996). Trotz der wachsenden Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen der Skelettentwicklung, ist bisher kein Gen bekannt, das sowohl notwendig als auch hinreichend für die Gelenkentwicklung ist. Zwar weisen Mäuse, denen **Gdf5** fehlt, weniger Gelenke im Bereich der Extremität auf (Storm et al., 1994), **Gdf5**-Überexpression in Extremitäten von Hühnerembryonen ist aber nicht in der Lage Gelenke zu induzieren (Francis-West et al., 1998; Merino et al., 1999). In ähnlicher Weise ist Überexpression von **Wnt9a** (früher als **Wnt14** bezeichnet) zwar in der Lage Strukturen zu induzieren, die eine Gelenkmorphologie aufweisen, **Wnt9a**^{-/-} Mäuse zeigen jedoch keine Gelenkveränderungen (Spatar et al., 2006).

Die Verknöcherung und das **Wachstum** des appendikulären Skeletts erfolgt durch **enchondrale Ossifikation**, einen Prozess, bei dem sich der Knochen aus einer präformierten knorpeligen Matrix bildet. Als frühester Marker exprimieren die Skelettkondensationen den

Transkriptionsfaktor *Sox9* und das *Collagen2*-Gen. Nach der Kondensation expandieren proliferierende Chondrozyten, ihre Größe nimmt zu, sie ordnen sich in Säulen an, **hypertrophieren** und kalzifizieren. Die Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten wird durch die Gene *Ihh* und *Pthlh* reguliert, die in den prähypertrophen bzw. proliferierenden Chondrozyten exprimiert werden (Abb. 4 und 5). Zum gleichen Zeitpunkt differenzieren Osteoblasten im Perichondrium und bilden den sog. „Knochenkragen“. Über den periostalen Knochen wandern Blutgefäße und mit ihnen Zellen in den kalzifizierten Knorpel ein und differenzieren in **hämatopoetische Stammzellen, Osteoklasten** und **Osteoblasten**. Schließlich wird die Matrix, die die hypertrophen Chondrozyten umgibt, von Osteoklasten abgebaut und durch Knochen ersetzt (McLean und Olsen, 2001). Hypertrophe Chondrozyten exprimieren *CollagenX*, der neu entstandene Knochen ist durch *CollagenI*-Expression gekennzeichnet. Während sich das zentrale primäre Ossifikationszentrum vergrößert, bilden sich im Bereich beider Epiphysen **sekundäre Ossifikationszentren**. Das weitere Längenwachstum des Knochens findet von der Fetalzeit bis zur Pubertät zwischen den verschiedenen Ossifikationszentren in der knorpeligen Wachstumsfuge statt.

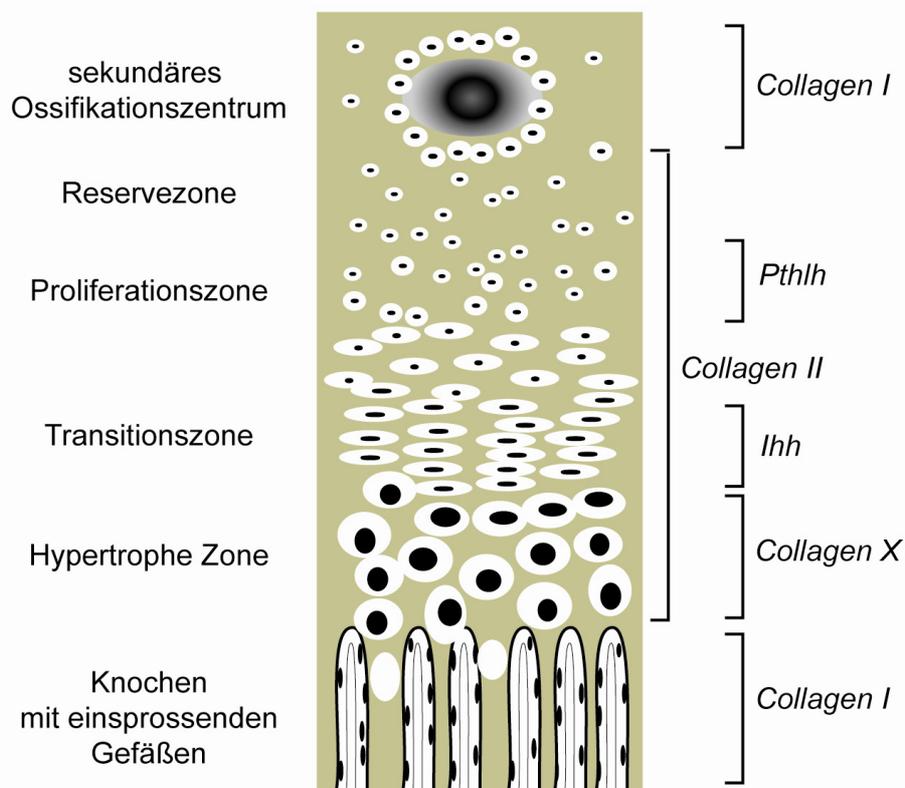


Abb. 5 Wachstumsfuge mit Chondrozyten und molekularen Markern. Die sich in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung befindlichen Chondrozyten der fetalen Wachstumszone exprimieren charakteristische Markergene.

Nach Beendigung der Wachstumsphase wird die Masse, Form und Belastbarkeit des Knochens durch ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau aufrechterhalten. Dabei ist die Aktivität von **Osteoblasten** und **Osteoklasten** bedeutsam, die das Skelett in Abhängigkeit von lokalen und systemischen Faktoren modellieren (**Homöostase**) (Erlebacher et al., 1995).

Von der enchondralen Ossifikation abzugrenzen ist die **intramembranöse Ossifikation**, bei der mesenchymale Vorläuferzellen direkt in Osteoid-produzierende Osteoblasten differenzieren. Die Knochenmatrix verkalkt, und das weitere Knochenwachstum wird durch Apposition an den osteogenen Fronten gewährleistet. Im Gegensatz zur enchondralen Ossifikation sind die molekulargenetischen Mechanismen der intramembranösen Ossifikation bisher erst ansatzweise bekannt. Zahlreiche bei der enchondralen Ossifikation bedeutsame Moleküle scheinen jedoch auch hier eine Rolle zu spielen (Abzhanov et al., 2007).

1.6 Molekulare Genetik von Extremitätenfehlbildungen

Kongenitale Extremitätenfehlbildungen stellen eine pathogenetisch und klinisch heterogene Gruppe von Erkrankungen dar. Obwohl einzelne Formen von Extremitätenmalformationen beim Menschen selten sind, besitzen sie in ihrer Gesamtheit durchaus klinische Relevanz. Die Erkenntnisse der Entwicklungsbiologie und die Untersuchung der molekularen Grundlagen humaner **genetisch bedingter Extremitätenfehlbildungen** haben zu einem besseren Verständnis der Embryonalentwicklung und genetisch bedingter Malformationen der Extremität beigetragen. Neben genetischen können kongenitale Extremitätenfehlbildungen auch durch **umweltbedingte Faktoren** ausgelöst werden, zu denen amniotische Bänder, vaskuläre Disruptionen oder Teratogene zählen.

Genetisch bedingte kongenitale Extremitätenmalformationen werden auf einer anatomischen und genetischen Basis unter der Berücksichtigung molekularer und entwicklungsbiologischer Aspekte klassifiziert bzw. diagnostiziert. Im Wesentlichen werden die drei räumlichen Dimensionen zugrunde gelegt. So umfassen kongenitale Extremitätenmalformationen Absence-Deformitäten, Brachydaktylien und Segmentationsstörungen (**proximo-distale Achse**), Polydaktylien und Syndaktylien (**antero-posteriore Achse**) und das Nagel-Patella-Syndrom (**dorso-ventrale Achse**). Viele der

zugrunde liegenden Gene sind mittlerweile identifiziert, und eine entsprechende Verdachtsdiagnose kann molekulargenetisch bestätigt werden.

Brachydaktylien stellen unter den kongenitalen Extremitätenfehlbildungen eine Gruppe von Handfehlbildungen dar, die durch eine Verkürzung der Phalangen mit unterschiedlichen Mustern gekennzeichnet sind (Bell, 1951). In den letzten Jahren konnten mehrere Gene identifiziert werden, die mit Brachydaktylien assoziiert sind (Abb. 6). Die zugrunde liegenden Veränderungen der Musterbildung, Chondrogenese und Gelenkformation können hervorragend im Mausmodell untersucht werden und stellen somit einen Zugang zu den molekularen Mechanismen der Knochen- und Gelenkentwicklung dar.

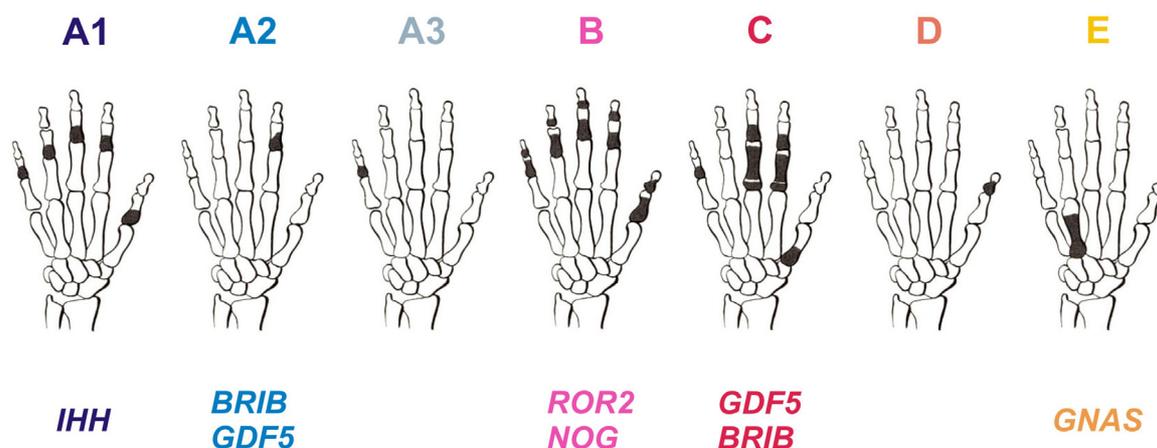


Abb. 6 Klassifikation der Brachydaktylien. Klassifikation nach anatomischen und genetischen Kriterien in Typ A bis E nach Bell (Bell, 1951) und die zugehörigen ursächlichen Krankheitsgene soweit bekannt.

Beim Menschen werden Brachydaktylien nach anatomischen Kriterien in fünf **Gruppen A bis E** eingeteilt, wobei Brachydaktylien vom Typ A (BDA) abhängig vom Muster der betroffenen Mittelphalangen in drei weitere Subgruppen unterteilt werden (Bell, 1951). BDA1 ist durch Verkürzung oder Fehlen aller Mittelphalangen und der Grundphalanx des Daumens gekennzeichnet und wird durch *IHH*-Mutationen verursacht (Gao et al., 2001). Patienten mit BDA2 haben keine oder verkürzte Mittelphalangen am zweiten und gelegentlich am fünften Finger. BDA2 wird durch inaktivierende *BRIB*-Mutationen hervorgerufen (Lehmann et al., 2003). BDC ist durch Verkürzung der Mittelphalangen des Index-, Mittel- und kleinen Fingers und Hyperphalangie des Index- und Mittelfingers charakterisiert und wird durch *GDF5*-Mutationen verursacht (Polinkovsky et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigen, daß Mutationen des *GDF5-BRIB*-Ligand-Rezeptor-Komplexes abhängig von der Art der Mutation zu BDA2 oder BDC führen können. So ist eine inaktivierende *GDF5*-Mutation beschrieben, die zu BDA2 führt (Seemann et al, 2005), und eine spezifische *BRIB*-Mutation

ist mit BDC assoziiert (Lehmann, et al, 2006). Brachydaktylie Typ B (BDB) ist durch Verkürzung oder Fehlen der Mittel- und Endphalangen sowie Nageldysplasien gekennzeichnet. Mutationen der *ROR2*-Rezeptortyrosinkinase und des *BMP*-Antagonisten *Noggin* sind für BDB verantwortlich (Oldridge et al., 2000; Schwabe et al., 2000; Lehmann et al., 2007). BDD und BDE sind durch Verkürzung der Daumenendphalanx bzw. der Metakarpalia (MC) insbesondere des vierten MC charakterisiert. BDE tritt bei zahlreichen Konditionen auf wie beispielsweise beim Turner Syndrom und beim Pseudohypoparathyreoidismus, der durch Mutationen der alpha-Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins der Adenylatzyklase (*GNAS*) hervorgerufen wird (Patten et al., 1990). Ein Fall einer Brachydaktylie mit überlappenden Aspekten von BDD und BDE ist beschrieben, der mit Mutationen des *HOXD13* Gens assoziiert ist (Johnson et al., 2003).

1.7 Funktionelle Untersuchung humaner Skelettmalformationen im Mausmodell

Zur Untersuchung der molekularen Grundlagen kongenitaler Skelettmalformationen stellt die **Maus** aus mehreren Gründen ein hervorragendes Tiermodell dar. Das Genom der Maus ist nach dem menschlichen das am besten untersuchte Genom. Zwischen Mensch- und Mausgenom besteht ferner ein hoher Grad an **Konservierung**. So sind viele Bereiche des murinen und humanen Genoms in der gleicher Abfolge angeordnet (**Syntänie**). Darüber hinaus weist die Entwicklung muriner und humaner Embryonen zahlreiche Parallelen auf, was auch für die Anordnung und den Aufbau der Skelettelemente zutrifft. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten lassen sich Fragestellungen relativ gut vom Menschen auf die Maus übertragen. Schließlich kann das Mausgenom vergleichsweise einfach experimentell manipuliert werden.

Den ersten Schritt bei der Untersuchung entwicklungsbiologisch bedeutsamer Gene stellt die Untersuchung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung dar. Dafür wird eine markierte antisense-RNA-Probe auf Gewebeschnitte oder komplette Mausembryonen hybridisiert (*in situ* Hybridisierung) und anschließend detektiert. Zur weiteren funktionellen Analyse genetisch bedingter Entwicklungsstörungen können zahlreiche verschiedene Mausmodelle herangezogen werden. Diese umfassen spontan entstandene Mausmutanten und durch genetische Manipulation erzeugte Modelle wie transgene Mäuse, Knock-out (K.o.)-Mäuse, Cre-Lox induzierbare K.o.-Mäuse, mutagenisierte Tiere und sog. „Trap“ (engl.) Mutanten.

Spontan entstandene Mausmutanten sind durch zufällige Mutationen im Mausgenom entstanden. Der Phänotyp der meisten dieser Mäuse wurde bereits vor vielen Jahren beschrieben. Die zugrunde liegenden molekularen Ursachen wurden bei zahlreichen Tieren in den letzten Jahren aufgeklärt. **Transgene Mäuse** werden durch Injektion genomischer oder nur kodierender Sequenzen (cDNA) in den Pronukleus fertilisierter Oozyten generiert (Gordon und Ruddle, 1981) Das Genexpressionsmuster kann durch einen bestimmten Promotor und regulatorische Elemente gezielt beeinflusst werden. Nachteilig bei der transgenen Technologie ist, daß die Anzahl und die Integrationsorte der Transgene nicht kontrolliert und die Expression durch epigenetische Mechanismen supprimiert werden kann. Bei **Knock-out** Mäusen wird ein funktioneller Teil eines Zielgens durch einen selektiven Marker, z. B. das Neomycinresistenzgen (Neo) gezielt inaktiviert (Thomas und Capecchi, 1987). Dieses „Gen-Targeting“ wird durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) erreicht. Die manipulierten ES-Zellen werden anschließend in Blastozysten injiziert und diese in scheinchwangere Mäuse implantiert. Um an nachfolgende Generationen weitergegeben zu werden, muß das Zielgen bei den daraus entstehenden Nachkommen in der Keimbahn vorhanden sein (Keimbahntransmission). Bei **Cre/lox Mutanten** kann die Geninaktivierung räumlich und zeitlich gesteuert (Lakso et al., 1996) und so die frühe Letalität vieler klassischer Knock out-Mäuse umgangen werden. Dafür werden flankierend zum Gen loxP-Sequenzen eingeführt, die unter dem Einfluß der Cre-Rekombinase reziprok rekombinieren können. Die Aktivität der Cre-Rekombinase wird wiederum durch gewebespezifische Promotoren bestimmt. Mittels Cre/lox-Technologie können außerdem spezifische Mutationen (Knock-in), chromosomale Deletionen oder Inversionen gezielt generiert werden.

Neben dieser gezielten Mutagenese können Mutationen ungerichtet durch verschiedene Mutageneseverfahren generiert werden. Bei der **Bestrahlungsmutagenese** werden männliche Tiere bestrahlt bzw. bei der **ENU-Mutagenese** mit Ethylnitrosurea behandelt. Dadurch werden Chromosomenbrüche bzw. Punktmutationen in den Spermatozoen männlicher Tiere induziert (Russell et al., 1979). Beim „**trap**“ (engl. Falle) - Ansatz werden Trap-Vektoren durch Elektroporation oder retrovirale Infektion in ES-Zellen des Mausgenoms unspezifisch inseriert (Stanford et al., 2001). Die Nachkommenschaft mutagenisierter Tiere wird phänotypisch untersucht und der genomische Ort der Mutation ggf. positionell kloniert. Die so generierten Mausphänotypen stellen geeignete Modelle dar, um Veränderungen der Genfunktion im Tiermodell zu untersuchen.

2. Originalarbeiten

2.1 Primäre Ziliäre Dyskinesie mit regelrechter Axonem-Ultrastruktur wird durch *DNAH11* Mutationen verursacht

Georg C. Schwabe, Katrin Hoffmann, Niki Tomas Loges, Daniel Birker, Colette Rossier, Margherita M. de Santi, Heike Olbrich, Manfred Fliegau, Mike Faily, Uta Liebers, Mirella Collura, Gerhard Gaedicke, Stefan Mundlos, Ulrich Wahn, Jean-Louis Blouin, Bodo Niggemann, Heymut Omran, Stylianos E. Antonarakis und Lucia Bartoloni

Hum Mutat 2008, 29:289-98

Die Primäre Ziliäre Dyskinesie (PCD) ist eine angeborene Erkrankung, bei der die Zilien des Respirationstrakts, des embryonalen Knotens, im Eileiter und der Spermien keine oder veränderte Motilität aufweisen. Als Folge der veränderten Zilienfunktion am embryonalen Knoten besteht bei der Hälfte der Patienten mit PCD ein Situs inversus; man spricht dann vom Kartagener Syndrom (KS). Wir beschreiben eine Familie, bei der fünf Patienten eine PCD und ein Patient ein KS aufweisen. Klinisch imponierten die Patienten durch ausgeprägte rezidivierende respiratorische Infektionen. Das Vorliegen einer Mukoviszidose oder eines Immundefekts wurde ausgeschlossen. Einer der Patienten ist der leibliche Vater eines Kindes, und seine Frau berichtet von einer weiteren unauffällig verlaufenden Schwangerschaft. Die Diagnose einer PCD wurde durch Untersuchung nativer und kultivierter respiratorischer Zilien mit Videomikroskopie gestellt. Die respiratorischen Zilien betroffener Individuen zeigten ein verändertes, nicht flexibles Schlagmuster mit einer verminderten Biegsamkeit und einer hyperkinetischen Schlagfrequenz. In der Elektronenmikroskopie zeigte sich jedoch eine unauffällige axonemale Ultrastruktur. Die immunhistochemische Untersuchung der schweren Dyneinketten DNAH5 und DNAH9 zeigte eine regelrechte Lokalisation am ziliären Axonem und somit regelrechte äußere Dyneinarme. Mittels Mikrosatellitenanalyse konnten wir eine Kopplung der Erkrankung zur Dyneinkette *DNAH11* auf Chromosom 7p21 nachweisen. Alle betroffenen Individuen waren compound (engl.) heterozygot für die *DNAH11*-Mutationen c.12384C4G und c.13552_13608del. Beide Mutationen sind in der C-terminalen Domäne lokalisiert und deuten auf das Vorliegen eines verkürzten DNAH11-Proteins hin (p.Y4128X, p.A4518_A4523delinsQ). Die beschriebenen Mutationen konnten nicht in einer Kohorte von 96 weiteren PCD-Patienten nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse legen nahe, daß *DNAH11*-Nonsense-Mutationen zwar das Schlagmuster und die Schlagfrequenz der respiratorischen Zilien stören, aber nicht die normale axonemale Ultrastruktur und die männliche Fertilität beeinträchtigen.

Primary Ciliary Dyskinesia Associated With Normal Axoneme Ultrastructure Is Caused by *DNAH11* Mutations

Georg C. Schwabe, Katrin Hoffmann, Niki Tomas Loges, Daniel Birker, Colette Rossier, Margherita M. de Santi, Heike Olbrich, Manfred Fliegau, Mike Faily, Uta Liebers, Mirella Collura, Gerhard Gaedicke, Stefan Mundlos, Ulrich Wahn, Jean-Louis Blouin, Bodo Niggemann, Heymut Omran, Stylianos E. Antonarakis and Lucia Bartoloni

Hum Mutat 2008, 29:289-98

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/116845187/PDFSTART>

2.2 Unterschiedliche Mutationen des Rezeptortyrosinkinase-Gens *ROR2* verursachen Brachydaktylie Typ B

Georg C. Schwabe, Sigrid Tinschert, Christian Buschow, Peter Meinecke, Gerhard Wolff, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Michael Oldridge, Andrew O. M. Wilkie, Reyhan Kömec und Stefan Mundlos

Am J Hum Genet 2000, 67:822-31

Brachydaktylie Typ B (BDB) ist eine autosomal dominante Skelettdysplasie, die durch Hypoplasie und/oder Aplasie der Mittel- und Endphalangen sowie der Nägel gekennzeichnet ist. Heterozygote Mutationen der *ROR2*-Rezeptortyrosinkinase (RTK) in einem bestimmten Bereich distal der Tyrosinkinase (TK)-domäne sind verantwortlich für BDB. Wir berichten über vier neue *ROR2*-Mutationen in fünf Familien mit BDB, die zwei Leserasterverschiebungen, eine Spleißmutation und eine Nonsense-Mutation umfassen. Diese Mutationen befinden sich distal, aber auch proximal der TK-Domäne. Die Transkripte der mutierten Gene werden nicht abgebaut und führen, regelrechte Translation vorausgesetzt, sehr wahrscheinlich zur Verkürzung des intrazellulären Anteils des *ROR2*-Proteins in zwei unterschiedlichen Bereichen proximal bzw. distal der TK-Domäne. Wir konnten zeigen, daß BDB-Patienten mit distalen *ROR2*-Mutationen einen schwereren Phänotyp als Patienten mit Mutationen proximal der TK-Domäne aufweisen. Wir beschreiben ferner erstmalig eine homozygote BDB bei einem Patienten mit einer 5 Basenpaar-Deletion proximal der TK-Domäne. Dieser Patient weist Überlappungen und Unterschiede zum allelischen Robinow Syndrom (RS) auf, das durch homozygote *ROR2*-Mutationen in der extrazellulären Frizzled-ähnlichen und Kringle-Domäne sowie in der TK-Domäne verursacht wird. So besteht bei dem Patient mit homozygoter BDB wie bei Patienten mit RS eine spondylocostale Dysostose, hinsichtlich Extremitätenmalformation, Körpergröße und Fazies unterscheidet er sich jedoch von RS Patienten. Während bei der homozygoten BDB eine extreme Brachydaktylie-Form mit Hypo- bzw. Aplasie der Phalangen, Metakarpalia/-tarsalia und Nägel vorliegt, sind RS-Patienten durch eine mesomale Extremitätenverkürzung, Kleinwuchs und eine charakteristische Fazies gekennzeichnet. Die Art und die Lokalisation der BDB- und RS-Mutationen deuten darauf hin, daß BDB nicht durch Haploinsuffizienz hervorgerufen wird, während homozygote RS-Mutationen sehr wahrscheinlich zum Verlust der *ROR2*-Funktion führen. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, daß Patienten mit einer heterozygoten 9q22 Deletion (Oldridge et al., 2000) und heterozygote Anlageträger von RS-Mutationen unauffällig sind (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000).

Distinct Mutations in the Receptor Tyrosine Kinase Gene *ROR2* Cause Brachydactyly Type B

**Georg C. Schwabe, Sigrid Tinschert, Christian Buschow, Peter Meinecke,
Gerhard Wolff, Gabriele Gillessen-Kaesbach, Michael Oldridge, Andrew O. M.
Wilkie, Reyhan Kömec and Stefan Mundlos**

Am J Hum Genet 2000, 67:822-31

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1287887&blobtype=pdf>

2.3 Brachydaktylie Typ C verursacht durch eine homozygote Missense-Mutation in der *CDMP1*-Prodomäne

Georg C. Schwabe, Seval Türkmen, Gundula Leschik, Sukru Palanduz, Brigitte Stöver, Timm O. Goecke und Stefan Mundlos

Am J Med Genet 2004, 124A:356-63

Brachydaktylie Typ C (BDC) ist durch Verkürzung der Mittelphalangen des Index-, Mittel- und kleinen Fingers mit Hyperphalangie des Index- und Mittelfingers charakterisiert. Heterozygote Mutationen des *CDMP1* (*GDF5*)-Gens, die zum Verlust der Proteinfunktion führen, sind mit BDC assoziiert. *Gdf5* ist ein Signalmolekül, das während der Extremitätenentwicklung in frühen Knorpelkondensationen, in der Interzone des Gelenkspalts und im Perichondrium exprimiert wird. Untersuchungen an embryonalen Extremitäten von Hühnern und Mäusen, die mit *Gdf5* behandelt wurden oder denen *Gdf5* fehlt, zeigen, daß *Gdf5* ein wichtiger Faktor für die Musterbildung des Knochens und der Gelenke ist, selbst aber keine Gelenke induziert. Wir beschreiben hier eine große Familie mit einer rezessiven Form einer BDC und einer betonten ulnaren Deviation des zweiten und dritten Fingers. Die Untersuchung des *GDF5*-Gens zeigte bei den betroffenen Patienten mit BDC das Vorliegen einer neuen homozygoten Missense-Mutation (c.A517G), die in einem Aminosäureaustausch von Methionin gegen Valin an der Position 173 (p.M173V) resultiert. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen heterozygoten *GDF5*-Mutationen, die zu BDC führen, handelt es sich bei der p.M173V Mutation erstmals um eine homozygote Mutation. Die bisher beschriebenen homozygoten *GDF5*-Mutationen führen zu den Chondrodysplasien Grebe, Hunter Thompson und Du Pan, die durch extreme Verkürzung der gesamten Extremität gekennzeichnet sind. Die p.M173V Mutation ist innerhalb einer stark konservierten Region von sieben Aminosäuren der *GDF5*-Prodomäne lokalisiert. Während der *GDF5*-Prozessierung wird die N-terminal lokalisierte Prodomäne proteolytisch gespalten und anschließend nicht kovalent an das reife TGF-beta-Molekül gebunden. Aus Untersuchungen von verschiedenen Molekülen der TGF-beta Signaltransduktionskaskade ist bekannt, daß die Prodomäne für die Faltung, Sekretion und Verfügbarkeit des fertigen, sekretierten Proteins bedeutsam ist. Vor diesem Hintergrund deuten unsere Untersuchungen auf eine wichtige Funktion der Prodomäne bei der Signalreichweite und/oder der Stabilität von biologisch aktivem *GDF5*, sowie bei der Entstehung der BDC hin.

Brachydactyly Type C Caused by a Homozygous Missense Mutation in the Prodomain of *CDMP1*

Georg C. Schwabe, Seval Türkmen, Gundula Leschik, Sukru Palanduz, Brigitte Stöver, Timm O. Goecke and Stefan Mundlos

Am J Med Genet 2004, 124A:356-63

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/104547578/PDFSTART>

2.4 Die *Ror2* Knock-out-Maus als Modell für die Entwicklungspathogenese des autosomal rezessiven Robinow Syndroms

Georg C. Schwabe, Britta Trepczik, Kathrin Süring, Norbert Brieske, Abigail S. Tucker, Paul T. Sharpe, Yasuhiro Minami und Stefan Mundlos

Dev Dyn 2004, 229:400-10

Das Robinow Syndrom (RS) ist eine humane Skelettdysplasie, die durch Kleinwuchs, mesomere Extremitätenverkürzungen, Genitalhypoplasie und eine charakteristische Fazies gekennzeichnet ist. Patienten mit autosomal rezessivem RS (RRS) werden phänotypisch durch das Vorliegen einer spondylocostalen Dysostose vom autosomal dominanten RS abgegrenzt. Während das autosomal rezessive RS durch homozygote Mutationen der *ROR2*-Rezeptortyrosinkinase hervorgerufen wird, die zum Verlust der ROR2-Funktion führen, ist für die autosomal dominante Form des RS bisher kein Gen bekannt. Um die Funktion von *Ror2* besser zu verstehen, führten wir eine detaillierte Untersuchung des *Ror2*-Expressionsmusters zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung zwischen E10,5 und E16,5 der Maus durch. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Organe gelegt, die Malformationen beim RRS zeigen. Wir konnten *Ror2* im sich entwickelnden ZNS, in den Branchialbögen, im Primitivstreifen, in der Extremitätenanlage und im präsomitischen Mesoderm nachweisen. In der späteren Entwicklung wurde *Ror2* im Bereich der Kraniofazies, in den Zahnanlagen und im Urogenitalbereich exprimiert. Um die zugrunde liegenden entwicklungsbiologischen Mechanismen bei der Entstehung des RRS besser zu verstehen, führten wir eine detaillierte entwicklungsbiologische Untersuchung von *Ror2*^{-/-}-Mäusen durch, die zahlreiche phänotypische Merkmale von RRS-Patienten aufweisen. Die Untersuchung verschiedener Schlüsselgene der Somitogenese mit *in situ* Hybridisierung zeigte, daß die spondylocostale Dysostose bei *Ror2*^{-/-}-Mäusen durch ein kleines präsomitisches Mesoderm und Epithelialisierungsdefekte der Somiten verursacht wird. Die mesomeren Extremitätenveränderungen bei *Ror2*^{-/-}-Mäusen sind Folge einer veränderten Chondrozytendifferenzierung, insbesondere im Bereich der prähypertrophen und hypertrophen Zone. Darüber hinaus konnten wir zeigen, daß der kraniofaziale Phänotyp mit Hypertelorismus, Mittelgesichtshypoplasie und oralen Veränderungen Folge eines veränderten Auswachsens kraniofazialer Mittellinienstrukturen ist. Zusammenfassend stellen *Ror2*^{-/-}-Mäuse ein Modell dar, mit dem viele der Veränderungen bei Patienten mit rezessivem RS erklärt werden können.

***Ror2* Knockout Mouse as a Model for the Developmental Pathology of Autosomal Recessive Robinow Syndrome**

Georg C. Schwabe, Britta Trepczik, Kathrin Süring, Norbert Brieske, Abigail S. Tucker, Paul T. Sharpe, Yasuhiro Minami and Stefan Mundlos

***Dev Dyn* 2004, 229:400-10**

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/106600906/PDFSTART>

2.5 Eine Inversion des *Shh*-Genlocus der Maus führt zu Brachydaktylie durch Dysregulation der *Shh*-Expression

Michael Niedermaier*, Georg C Schwabe*, Stephan Fees, Anne Helmrich, Norbert Brieske, Petra Seemann, Jochen Hecht, Volkhard Seitz, Sigmar Stricker, Gundula Leschik, Evelin Schrock, Paul B. Selby und Stefan Mundlos (*geteilte Erstautorschaft)

J Clin Invest 2005, 115:900-9

Die „*short digits*“ (*Dsh*) Mausmutante ist eine durch Bestrahlung induzierte Mausmutante. Homozygote *Dsh*-Mäuse sind durch zahlreiche Malformationen gekennzeichnet und ähneln stark *Sonic hedgehog* Knock-out (*Shh*^{-/-})-Mäusen. Im Gegensatz zu unauffälligen *Shh*^{+/-}-Mäusen weisen heterozygote *Dsh*^{+/+}-Mäuse einen Reduktionsphänotyp der Extremitäten auf, der durch eine Fusion und Verkürzung der proximalen und Mittelphalangen aller Finger und Füße gekennzeichnet ist. Die Extremitätenfehlbildung ähnelt phänotypisch der humanen Brachydaktylie Typ A1, einer Malformation, die durch Mutationen des orthologen *Indian hedgehog* (*IHH*) Gens hervorgerufen wird. Wir kartierten *Dsh* auf das Mausechromosom 5 in eine Region, die *Shh* beinhaltet, und zeigten, daß *Dsh* durch eine 11,7 Megabasen große Inversion hervorgerufen wird. Der distale Bruchpunkt ist 13.298 Basenpaare 5' von *Shh* lokalisiert und trennt die kodierende *Shh*-Sequenz von mehreren konservierten nicht-kodierenden Elementen (NKE), die durch einen Interspeziesvergleich identifiziert wurden. Solche NKE stellen mögliche long-range Enhancer dar, welche die *Shh* Expression während der Entwicklung steuern. Die der *Dsh*-Mutante zugrunde liegende Inversion führt zur nahezu vollständigen Reduktion der *Shh*-Expression an den Tagen E9,5 bis E12,5 der Embryonalentwicklung und erklärt so den homozygoten *Dsh*-Phänotyp. An den Tagen E13,5 und E14,5 wird *Shh* jedoch in den phalangealen Anlagen der *Dsh*^{+/+}-Mausmutante zu einem Zeitpunkt und an einem Ort exprimiert, an dem *Shh* normalerweise nicht angeschaltet ist. Diese *Shh*-Dysregulation führt zu einer lokalen Überexpression der *Shh*-Zielgene *Patched*, *Gli1-3* und dem *Parathormon-ähnlichen-Hormon* (*Pthlh*) sowie zu einem Abschalten von *Ihh* und *Gdf5*. Folge dieser molekularen Veränderungen ist ein Arrest der Chondrozytendifferenzierung und eine Störung der Gelenkentwicklung, welche zu einer Verkürzung und Fusion der Phalangen mit Fehlen phalangealer Gelenke führen. Die *Dsh*-Mutante stellt somit einen besonderen Phänotyp zur Untersuchung der *Shh*-Regulation dar.

An Inversion Involving the Mouse *Shh* Locus Results in Brachydactyly through Dysregulation of *Shh* Expression

Michael Niedermaier*, Georg C Schwabe*, Stephan Fees, Anne Helmrich, Norbert Brieske, Petra Seemann, Jochen Hecht, Volkhard Seitz, Sigmar Stricker, Gundula Leschik, Evelin Schrock, Paul B. Selby and Stefan Mundlos (*these authors contributed equally to this work)

***J Clin Invest* 2005, 115:900-9**

<http://www.jci.org/articles/view/23675/pdf>

3. Diskussion

3.1 *DNAH11*-Mutationen als Ursache für die Primäre Ziliäre Dyskinesie und das Kartagener Syndrom mit normalem Axonem

Obwohl Zilien aus ungefähr 200 verschiedenen Proteinen bestehen, sind bisher nur vergleichsweise wenige Gene für PCD/KS bekannt. Für einige Formen der PCD konnte gezeigt werden, daß den Motilitätsstörungen des Ziliums Mutationen von Genen zugrunde liegen, die für Dyneinketten oder Strukturproteine des Ziliums kodieren. So liegen ungefähr bei 25% der PCD-Patienten Mutationen der schweren Dyneinkette *DNAH5* bzw. bei 11% Mutationen der intermediären Dyneinkette *DNAI1* vor (Pennarun et al., 1999; Olbrich et al., 2002; Hornef et al., 2006; Zariwala et al., 2006). Ebenfalls zu PCD führen Mutationen des *TXNDC3*-Gens, das für ein Thioredoxin-Protein kodiert (Duriez et al., 2007). X-chromosomal vererbte PCD wird gelegentlich durch *RPGR*- oder *OFD1*-Mutationen verursacht und ist mit Retinitis pigmentosa oder mentaler Retardierung assoziiert (Budny et al., 2006; Moore et al., 2006). Zahlreiche weitere Gene, wie beispielsweise die Dyneinketten *DNAI2*, *DNAH9* und *DNAL1* sowie die im Zilium bedeutsamen Gene *FOXJ1*, *PF20*, *TCTE3* und *DPCD* wurden bei PCD-Patienten ohne Erfolg auf Mutationen untersucht (Maiti et al., 2000; Pennarun et al., 2000; Bartoloni et al., 2001; Neesen et al., 2002; Pennarun et al., 2002; Zariwala et al., 2004; Horvath et al., 2005).

Die Bedeutung von *DNAH11*, einer weiteren schweren Dyneinkette, war bisher bei der Pathogenese der PCD umstritten. So existierte lediglich die Beschreibung eines einzelnen Patienten mit einer homozygoten *DNAH11*-Nonsense-Mutation, bei dem ein Situs inversus in Verbindung mit einer chronisch respiratorischen Erkrankung vorlag. Bei diesem Patienten bestand gleichzeitig eine zystische Fibrose (CF), die durch eine homozygote Mutation des *CFTR*-Gens hervorgerufen wurde. Die Homozygotie der *CFTR*- und *DNAH11*-Mutationen wurden beide durch uniparentale Disomie des Chromosoms 7 verursacht. Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte eine fehlende Motilität respiratorischer Zilien, die aber auch als Folge sekundärer Infektionen bei CF auftreten kann. In der Elektronenmikroskopie wiesen die respiratorischen Zilien eine normale Ultrastruktur der Axoneme auf, ein Befund der bei 3 bis 28% der PCD beschrieben ist (Zariwala et al., 2007). Somit blieb bisher unklar, ob *DNAH11*-Mutationen über einen Situs inversus hinaus (nodale Zilienaktivität) auch eine Immotilität respiratorischer Zilien verursachen.

Bei den von uns beschriebenen Individuen einer Familie mit PCD bzw. KS liegt eine compound (engl.) heterozygote Mutation des *DNAH11*-Gens vor. Alle betroffenen Individuen

waren Träger der Mutationen c.12384C>G und c.13552_13608del, die in der C-terminalen Domäne des *DNAH11*-Gens lokalisiert sind. Die Mutationen führen zu einem verkürztem DNAH11-Protein (p.Y4128X, p.A4518_A4523delinsQ) und beeinträchtigen wahrscheinlich die Funktion der DNAH11-Motordomäne. In der Videomikroskopie zeigten die respiratorischen Zilien der beschriebenen Patienten ein charakteristisch verändertes hyperkinetisches Schlagmuster mit reduzierter Flexibilität. Die axonemale Ultrastruktur wurde elektronenmikroskopisch untersucht und war wie bei der erstbeschriebenen homozygoten *DNAH11*-Mutation unauffällig. Ebenso zeigten sich normale äußere Dyneinarme in der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen die Proteine der äußeren Dyneinarme DNAH5 und DNAH9. Die von uns beschriebenen Patienten unterscheiden sich damit von Patienten mit *DNAH5*- und *DNAH11*-Mutationen (Hornef et al., 2006; Zariwala et al., 2006), bei denen kein oder nur ein minimaler Zilienschlag vorhanden ist, und die äußeren Dyneinarme fehlen (Pennarun et al., 1999; Olbrich et al., 2002; Fliegau et al., 2005).

Mutationen des homologen *Dnahc11*-Gens der Maus liegen den *Lrd*-Mausmutanten (*Lrd*, *left/right-dynein*) zugrunde (Handel und Kennedy, 1984; Supp et al., 1997; Supp et al., 1999). So wird *lrd*^{iv} durch einen Austausch einer konservierten Aminosäure zwischen dem zweiten und dritten P-Loop (engl.) und *lrd*^{AP1} durch eine Deletion des ersten P-Loops verursacht. Beide Mutanten weisen eine randomisierte Organlateralisation auf, die durch immotile nodale Zilien verursacht wird, während die respiratorischen Zilien der Tiere als schlagend beschrieben werden. Um zu testen, ob *Lrd*-Mäuse ein geeignetes Modell für PCD darstellen, legen unsere Untersuchungen nahe, das Schlagmuster trachealer Zilien der *Lrd*-Mausmutanten mittels Videomikroskopie zu evaluieren.

Über die Bedeutung von DNAH11 in respiratorischen Zilien hinaus, deutet die Tatsache, daß der älteste Betroffene Vater eines Sohnes ist und seine Frau eine weitere Schwangerschaft berichtet, darauf hin, daß *DNAH11*-Mutationen nicht mit schwerer männlicher Infertilität assoziiert sind. Eine regelrechte Fertilität bzw. unauffällige Spermien wurden auch bei *lrd*-Mäusen beobachtet (Handel und Kennedy, 1984; Supp et al., 1999).

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, daß *DNAH11* bei der Entstehung der PCD und des KS des Menschen bedeutsam ist. Unsere Ergebnisse legen nahe, weitere PCD-Fälle mit normalem Axonem mit Videomikroskopie zu untersuchen und auf *DNAH11*-Mutationen zu testen.

3.2 Molekulargenetik von Extremitätenfehlbildungen beim Menschen und im Mausmodell

In den von uns durchgeführten Arbeiten konnten wir einen Beitrag zur Aufklärung der molekulargenetischen Ursachen der humanen Brachydaktylien Typ B und Typ C leisten. Darüber hinaus tragen unsere Untersuchungen zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Entstehung von Extremitätenmalformationen beim Mensch und im Mausmodell bei. Schließlich liefern unsere Ergebnisse Hinweise für die Bedeutung und Interaktion verschiedener Signaltransduktionskaskaden bei der skelettalen Musterbildung, Chondrozytendifferenzierung und Entstehung der Gelenke der Extremitäten.

3.2.1 *ROR2* ist bei der Extremitätenformation und der Chondrozytendifferenzierung bedeutsam

Patienten mit Brachydaktylie Typ B (BDB) weisen eine Dys- oder Aplasie distaler und Mittelphalangen sowie Nagelfehlbildungen auf (Bell, 1951). Das autosomal rezessive Robinow Syndrom (RRS) ist demgegenüber durch Kleinwuchs, eine spondylokostale Dysostose, mesomale Verkürzung der Extremitäten, eine typische Fazies und kleine externe Genitalien gekennzeichnet (Robinow et al., 1969). Der Entstehung dieser unterschiedlichen Skelettdysplasien liegen Mutationen der *ROR2*-RTK zugrunde (Afzal et al., 2000; Oldridge et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000).

In den von uns durchgeführten Untersuchungen konnten wir zeigen, daß BDB durch heterozygote *ROR2*-Nonsense-Mutationen hervorgerufen wird, die in zwei charakteristischen Domänen lokalisiert sind. Die Mutationen führen zu einer Verkürzung der *ROR2*-RTK unmittelbar proximal oder distal der TK-Domäne und resultieren so in einem kompletten oder partiellen Verlust des intrazellulären Rezeptoranteils. Patienten mit distalen *ROR2*-Mutationen weisen einen schwereren Phänotyp als Patienten mit proximalen Mutationen auf. Demgegenüber führen homozygote *ROR2*-Missense oder -Nonsense-Mutationen in der extrazellulären Frizzled-ähnlichen und Kringle-Domäne sowie in der TK-Domäne zum RRS. Ein von uns beschriebener Patient mit einer homozygoten, proximal der TK lokalisierten BDB-Mutation weist einen intermediären Phänotyp auf. Bei diesem Patienten besteht wie beim RRS eine spondylokostale Dysostose, die für das RS typische faciale Dysmorphie und die mesomalen Extremitätenveränderungen fehlen. Stattdessen weist dieser Patient einen sehr schweren Brachydaktylie-Phänotyp mit Fehlen nahezu aller Phalangen auf.

Der BDB-Phänotyp, die Lokalisation und die Art der BDB Mutationen deuten darauf hin, daß BDB nicht durch Haploinsuffizienz entsteht, sondern BDB-Mutationen möglicherweise zu einem Funktionsgewinn der ROR2-RTK führen. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, daß Patienten mit einer heterozygoten 9q22 Deletion (Oldridge et al., 2000) und heterozygote Anlageträger einer RRS-Mutation phänotypisch unauffällig sind (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000). Demgegenüber wird der RRS-Phänotyp sehr wahrscheinlich durch einen *ROR2*-Funktionsverlust hervorgerufen wird. So führen mit RRS assoziierte Nonsense-Mutationen entweder zum Verlust der Funktion der ROR2-TK oder zu einem verkürzten ROR2-Protein, das in der Folge abgebaut oder aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne nicht in die Plasmamembran integriert werden kann. Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, daß ROR2-Proteine mit Missense-Mutationen, die mit RRS assoziiert sind, im endoplasmatischen Retikulum degradiert werden (Chen et al., 2005).

Überexpression verschiedener mit BDB und RRS assoziierter *ROR2*-Mutationen in der Extremitätenanlage des Hühnerembryos bestätigen die Bedeutung von Ror2 bei der Chondrogenese, konnten aber keine entscheidenden Unterschiede zwischen Mutationen, die zu BDB und RRS führen, zeigen. So wiesen die manipulierten embryonalen Extremitäten Defekte in der Architektur der Wachstumsfuge und eine Störung der Chondrozytendifferenzierung auf. Darüber hinaus waren proximale Skelettelemente stärker als distale betroffen, es traten aber keine für BDB typischen Defekte der Musterbildung auf. Es wurde vermutete, daß die Defekte der Musterbildung durch einen dominant negativen Effekt des mutanten Ror2 gegenüber endogenem Ror2 und möglicherweise weiteren bei der Skelettformation bedeutsamen Proteinen entstehen. (Stricker et al., 2006).

Um die Ror2-Funktion bei der Embryogenese besser zu verstehen, untersuchten wir die *Ror2*-Expression während der Embryonalentwicklung von Mäusen. Unsere Ergebnisse zeigen, daß *Ror2* während der Entwicklung und Differenzierung zahlreicher embryonaler Gewebe exprimiert wird, die beim RRS bzw. bei der BDB betroffen sind. Um die zugrunde liegenden entwicklungsbiologischen Mechanismen bei der Entstehung des RS besser zu verstehen, führten wir eine detaillierte entwicklungsbiologische Untersuchung der Skelettmorphogenese bei *Ror2*^{-/-}-Mäusen durch. Die entwicklungsbiologische Untersuchung von *Ror2*^{-/-}-Mäusen zeigte, daß *Ror2* bei der Somitenentwicklung, beim Wachstum des appendikulären Skeletts und bei der kraniofazialen Entwicklung bedeutsam ist. *Ror2*^{-/-}-Mäuse sind durch eine spondylocostale Dysostose, eine mesomale Extremitätenverkürzung und

kraniofaziale Dysmorphien gekennzeichnet und weisen damit zahlreiche für das RRS typische Malformationen auf.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß *Ror2* bei der Signaltransduktion des nichtkanonischen *Wnt5a*-Signals bedeutsam ist. Erste Hinweise für eine mögliche Assoziation von *Ror2* mit der *Wnt*-Signaltransduktionskaskade gaben das Vorliegen einer *Wnt*-Bindungsstelle (Frizzled ähnliches-Motiv) in der CRD-Domäne des *Ror2*-Rezeptors, ein überlappendes Expressionsmuster und ähnliche Phänotypen der *Ror2*^{-/-}- und der *Wnt5a*^{-/-}-Mäuse (Xu und Nusse, 1998; Matsuda et al., 2001; Oishi et al., 2003; Forrester et al., 2004). In der Folge konnte in kultivierten Zellen des Krallenfroschs (*Xenopus*) und der Maus gezeigt werden, daß *Wnt5a* über die CRD-Domäne an *Ror2* bindet, die *Wnt*-abhängige JNK-Signaltransduktion aktiviert und beta-Catenin inhibiert (Oishi et al., 2003; Mikels und Nusse, 2006). Die Untersuchung der *Ror2*-Aktivierung und die Identifizierung weiterer mit *Ror2* interagierender Proteine stellen in Zukunft wichtige Meilensteine dar, um die Funktion von *Ror2* bei der Skelettentwicklung und -malformation besser zu verstehen.

3.2.2 *GDF5*-Mutationen führen zu Brachydaktylie und Chondrodysplasien

In weiteren von uns durchgeführten Untersuchungen beschreiben wir eine Sonderform einer stark ausgeprägten BDC des zweiten und dritten Fingers. Dieser BDC-Phänotyp wird durch eine neue homozygote *GDF5*-Missense-Mutation hervorgerufen, die zum Austausch einer Aminosäure in einer konservierten Region der *GDF5*-Prodomäne führt. Diese erstmals beschriebene p.M173V Mutation deutet auf eine wichtige Funktion der Prodomäne bezüglich der Signalreichweite und/oder der Stabilität von *GDF5* hin.

Das Signalmolekül *Gdf5* wird zu Beginn der Knorpelentwicklung um die chondrogenen Kondensationen herum und im weiteren Verlauf in der Interzone der Gelenke exprimiert. Es spielt eine bedeutsame Rolle bei der Chondrozytendifferenzierung. So weist die *Gdf5*^{bp-J}-Mausmutante eine Hypoplasie der Humeri, Femura, Metakarpalia und Phalangen sowie fehlende Interphalangealgelenke auf (Storm et al., 1994). Trotzdem führt *Gdf5*-Überexpression in Hühnerembryonen nur zu breiteren und längeren Knorpeln, aber nicht zur Bildung zusätzlicher Gelenke (Francis-West et al., 1998; Merino et al., 1999). Die Bedeutung der *GDF5*-Signaltransduktionskaskade bei der Handentwicklung des Menschen wird durch inaktivierende Mutationen des *GDF5*-Liganden und seines Rezeptors *BRIB* deutlich, die im heterozygoten Zustand zu den Phänotypen BDC und BDA2 führen (Polinkovsky et al., 1997; Everman et al., 2002; Lehmann et al., 2003; Seemann et al. 2005, Lehmann et al., 2006).

Demgegenüber führen aktivierende GDF5-Mutationen genau wie inaktivierende Mutationen des GDF5-Antagonisten NOG zu proximalem Symphalangismus (Gong et al., 1999; Seemann et al., 2005).

Bei der hier beschriebenen homozygoten Missense-Mutation p.M173V handelt es sich um die erste Beschreibung eines rezessiven Erbgangs einer BDC. BDC wird normalerweise durch heterozygote *GDF5*-Mutationen in der Prodomäne oder aktiven Domäne hervorgerufen. (Everman, 2002). Demgegenüber führen die bisher beschriebenen homozygoten *GDF5*-Mutationen zu Chondrodysplasien vom Typ Grebe (GC), Hunter-Thompson (HT), und DuPan (DP), die durch schwere Extremitätenmalformationen gekennzeichnet sind und zusätzlich weiter proximal lokalisierte Skelettelemente betreffen (Thomas et al., 1996; Thomas et al., 1997; Faiyaz-Ul-Haque et al., 2002). Vor diesem Hintergrund ist es bemerkenswert, daß die hier beschriebene homozygote Missense-Mutation nur zu einer zusätzlichen starken lateralen Deviation der verkürzten Index- und Mittelfinger führt. Heterozygote Anlageträger der Mutation wiesen außerdem in den durchgeführten metakarpophalangealen Profilen minimale Verkürzungen der Metakarpalia IV und V auf. Der hier dargestellte BDC-Phänotyp gehört damit zu den schweren BDC-Formen.

Die beschriebene p.M173V Missense-Mutation führt zu einem Austausch einer konservierten Aminosäure in einer konservierten Region der GDF5-Prodomäne. Als Mitglied der TGF-beta-Superfamilie von sezernierten Polypeptiden (Feng und Derynck, 2005) wird Gdf5 sehr wahrscheinlich ähnlich wie TGF-beta prozessiert, sezerniert und aktiviert (Abb. 7). Reifes TGF-beta wird als Vorläufermolekül synthetisiert und dimerisiert nach Abtrennung des Signalpeptids. Das Vorläufermolekül wird dann in reifes TGF-beta und die Prodomäne gespalten, die anschließend nicht kovalent an reifes TGF-beta gebunden und als latent-assoziiertes Peptid (LAP) bezeichnet wird. LAP maskiert die Rezeptorbindungsstellen des reifen TGF-beta Moleküls und erleichtert die Faltung und Sekretion des Proteinkomplexes. Mittels spezifischer Mutationen konnte gezeigt werden, daß die Prodomäne beim sekretorischen Transport und bei der korrekten Faltung des TGF-beta-Peptids bedeutsam ist (Sha et al., 1991). Nach der Sekretion wird der Komplex in der extrazellulären Matrix freigesetzt und aktiviert. Die Bedeutung der Prodomäne von TGF-beta für die skelettale Morphogenese wird durch Mutationen in der Prodomäne des *TGF-beta1*-Gens deutlich, die bei der Camurati-Engelmann-Osteosklerose zu einer Verminderung der TGF-beta1-Aktivität führen (Janssens et al., 2000). Es ist deshalb nahe liegend, daß die von uns beschriebene Missense-Mutation in der *GDF5*-Prodomäne in ähnlicher Weise zu veränderten Eigenschaften

in Bezug auf das Sekretionsverhalten, die Stabilität oder die Reichweite des GDF5-Proteins und somit zu einer Verminderung der Aktivität des GDF5-Proteins führt.

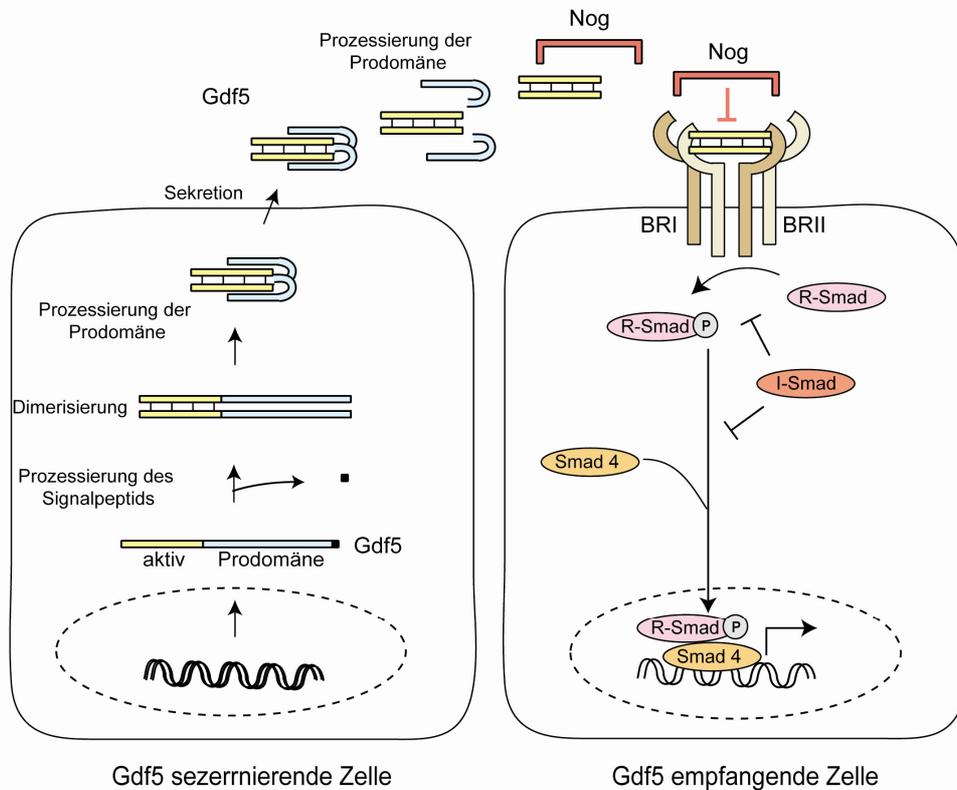


Abb. 7: TGF-beta/Bmp-Signaltransduktionskaskade am Beispiel des Gdf5-Moleküls. Gdf5 wird transkribiert und prozessiert. Die Prodomäne ist bedeutsam für die Reichweite bzw. Stabilität des Gdf5-Signals, Noggin inhibiert Gdf5-Aktivität. Gdf5-Bindung an den BRI-BRII-Rezeptor-Komplex führt zur Phosphorylierung aktivierender R-Smads, Translokation in den Nukleus und Aktivierung der Gdf5-Zielgene.

3.2.3 Bedeutung der Regulation von *Sonic hedgehog* bei der Entwicklung und Malformationen der Extremität

Hedgehog Gene kodieren für Signalmoleküle, die während der Embryonalentwicklung Wachstum, Musterbildung und Morphogenese zahlreicher Gewebe steuern. *Hh*-Signale sind in der Lage dosisabhängig Zelldifferenzierung, Musterbildung, Überleben von Zellen und Proliferation zu steuern (Ingham und McMahon, 2001). Das Segmentierungsgen *Hh* wurde ursprünglich bei *Drosophila* identifiziert, bei Vertebraten existieren drei orthologe Gene *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) und *Desert hedgehog* (*Dhh*). *Shh* ist während der Embryonalentwicklung im embryonalen Knoten, im Zentralnervensystem (ZNS) und im Darm exprimiert. Darüber hinaus stellt *Shh* ein Schlüsselmolekül bei der Extremitätenentwicklung dar. Es vermittelt die morphogenen Eigenschaften der Zone

polarisierender Aktivität (ZPA) und bestimmt somit die antero-posteriore Polarität der Hand (Riddle et al., 1993; Saunders, 1998).

Die wesentlichen Schritte der Hh-Signaltransduktionskaskade sind von *Drosophila* bis zum Menschen konserviert. Der C-terminale Anteil des Shh-Moleküls wird nach der Synthese autokatalytisch abgespalten, in eine aktive Form prozessiert und sezerniert. Shh bindet an seinen Rezeptor Ptc. In der Shh empfangenden Zelle werden so die Transkriptionsfaktoren Gli1 und Gli2 aktiviert, die Prozessierung des Gli3-Repressors inhibiert und somit *Shh*-Zielgene angeschaltet. In Abwesenheit von Shh verhindert der Gli3-Repressor die Aktivierung der Zielgene.

Die Bedeutung der *HH*-Gene wird durch Mutationen der *HH*-Signaltransduktionskaskade bei genetischen Syndromen und Tumoren deutlich (Villavicencio et al., 2000). *SHH*-Mutationen führen zu Holoprosencephalie (HPE), einer kongenitalen Malformation, die durch fehlende Trennung der frontalen ZNS-Hemisphären und kraniofaziale Malformationen charakterisiert ist (Wallis und Muenke, 2000). Mutationen von *IHH*, das bei der Chondrozytendifferenzierung bedeutsam ist, sind mit den Skelettdysplasien akrocapitofemorale Dysplasie (ACFD) und Brachydaktylie Typ A1 (BDA1) assoziiert (Hellemans et al., 2003).

In unseren Untersuchungen analysierten wir die Mausmutante „*short digits*“ (*Dsh*), die eine veränderte *Shh*-Regulation aufweist. Homozygote *Dsh*-Mäuse sind durch eine HPE, Fehlbildungen der inneren Organe und Extremitäten mit Fehlen der Akren und radio-ulnarer Fusion charakterisiert. *Dsh/Dsh*-Mäuse sind phänotypisch nahezu mit *Shh*^{-/-}-Mäusen identisch. Im Gegensatz zu unauffälligen heterozygoten *Shh*^{+/-}-Mäusen weisen heterozygote *Dsh*^{+/-}-Mäuse jedoch die namensgebende Brachydaktylie auf, die durch Fusion der Phalangen 1 und 2 gekennzeichnet ist. Mit Hilfe eines genetischen Ansatzes identifizierten wir die molekulare Ursache des *Dsh*-Phänotyps und untersuchten die Folgen der Mutation während der embryonalen Handentwicklung. Wir kartierten *Dsh* in die *Shh*-Region auf dem Mauschromosom 5 und wiesen eine 11,7 Mb umfassende Inversion durch Identifizierung beider Bruchpunkte nach. Der telomere Bruchpunkt befindet sich 13,3 kb 5' der *Shh*-kodierenden Region und ist außerhalb des Bereichs der Gen-nahen regulatorischen Bodenplatten- und ZNS-Enhancer lokalisiert (Abb. 8).

Ferner konnten wir zeigen, daß die Brachydaktylie der *Dsh*^{+/-}-Mutante durch eine ektope *Shh*-Expression in den Chondrozyten und im Perichondrium der Anlagen der Phalangen an E13,5 verursacht wird (Abb.9). Entsprechend sind die *Shh*-Zielgene *Ptc* und *Gli1* ebenfalls ektop in den Anlagen der Phalangen exprimiert. Während des

Knorpelwachstums aktiviert normalerweise *Ihh*, das in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, *Pthlh* in den proliferierenden Chondrozyten, welches wiederum *Ihh* hemmt. Dieser Regulations-Kreislauf ermöglicht die Kontrolle der Chondrozytenproliferation und -differenzierung. In den *Dsh/+*-Phalangen führt ekto exprimiertes *Shh* zur Dysregulation des *Pthlh*-*Ihh*-Regulations-Kreislaufs, indem es *Pthlh* ekto aktiviert und dadurch die *Ihh*-Expression hemmt. Somit kommt es zur Verzögerung der Chondrozytenproliferation und -differenzierung in den Phalangen.

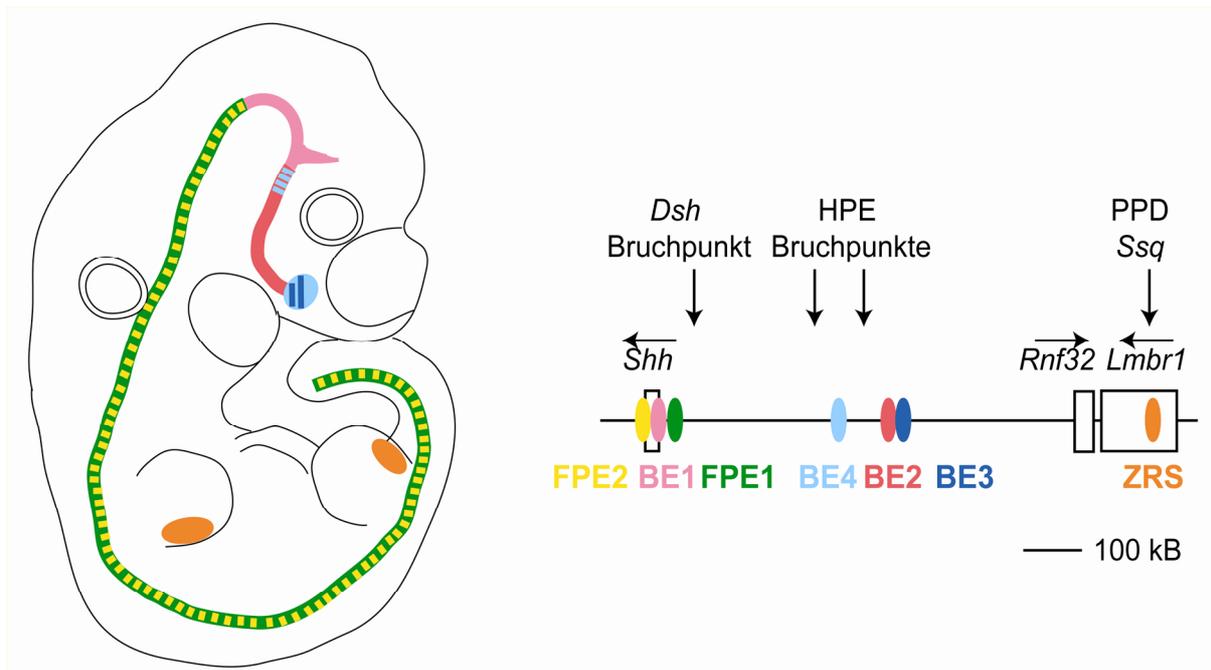


Abb. 8 *Shh* und cis-regulatorische Enhancer. Schematischer Überblick über die *Shh*-Expression und verschiedene cis-regulatorische *Shh*-Enhancer während der Embryonalentwicklung. **FPE**-floor plate enhancer (engl.), **BE**-brain enhancer (engl.), **ZRS**-Zone of polarising activity (ZPA) regulatory sequence (engl.). Die Pfeile markieren Bruchpunkte oder Mutationen, die *Shh*-Enhancer betreffen. **HPE**-Holoprosencephalie, **PPD**-präaxiale Polydaktylie, ***Ssq***-Sasquatch Mausmutante.

Die Misexpression der Gene *Gli1*, *Gli2*, *Gli3* und *Gdf5* führt bei der *Dsh/+*-Mausmutante entweder direkt oder indirekt zur Veränderung der Gelenkformation und der Musterbildung. Das Zusammenspiel der *Ihh*- und *Gdf5*-Expression bei der Gelenkformation wird durch den Verlust der *Ihh*-Expression in den Extremitätenanlagen der *Gdf5^{bp-J}*-Mausmutante und den Verlust der *Gdf5*-Expression bei *Ihh^{-/-}*-Mäusen deutlich. Beiden Mutanten fehlen Gelenke des Extremitätenskeletts.

Aufgrund unserer Ergebnisse postulierten wir, daß die zugrunde liegende Inversion der *Dsh*-Mutante cis-regulatorische Elemente vom *Shh*-Promotor trennt. Zu diesem Zeitpunkt waren lediglich drei ZNS-Enhancer bekannt, die *Shh*-Expression in der Bodenplatte und im Stamm- und Mittelhirn des sich entwickelnden ZNS steuern, die aber nicht von der Inversion

betroffen waren (Epstein et al., 1999; Muller et al., 1999). Weitere Hinweise für die Existenz sog. long range (engl.) cis-regulatorischer Elemente stammten aus der Untersuchung von HPE-Patienten, die Translokationen außerhalb der kodierenden *SHH*-Region aufwiesen (Roessler et al., 1997). In ähnlicher Weise deuteten Mutationen eines konservierten Elements in einem Intron des benachbarten *C7ORF2* (*Lmbr1*)-Gens bei Patienten mit Extremitätenfehlbildungen auf die Existenz eines long range (engl.) Extremitäten-Enhancers hin (Ianakiev et al., 2001; Lettice et al., 2002; Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2004).

Mit Hilfe von transgenen Reporter-Mäusen konnte gezeigt werden, daß die *Shh*-Expression im anterioren Telencephalon durch weitere drei long-range cis-regulatorische *Shh*-Enhancer aktiviert wird (Jeong et al., 2006). Darüber hinaus gelang mittels eines cis-trans-Tests und der Generierung von transgenen und Knock-out-Mäusen der funktionelle Beweis, daß *Shh*-Expression in der Extremität durch den im *C7ORF2* (*Lmbr1*)-Gen lokalisierten long-range *Shh*-Extremitäten-Enhancer, der knapp 1 MB vom *Shh*-Promotor entfernt ist, gesteuert wird (Lettice et al., 2002; Lettice et al., 2003; Sagai et al., 2005).

Der Mechanismus der späten ektopen *Shh*-Reexpression während der phalangealen Chondrozytendifferenzierung der *Dsh*-Mäuse ist bisher nicht geklärt. Möglicherweise gehen

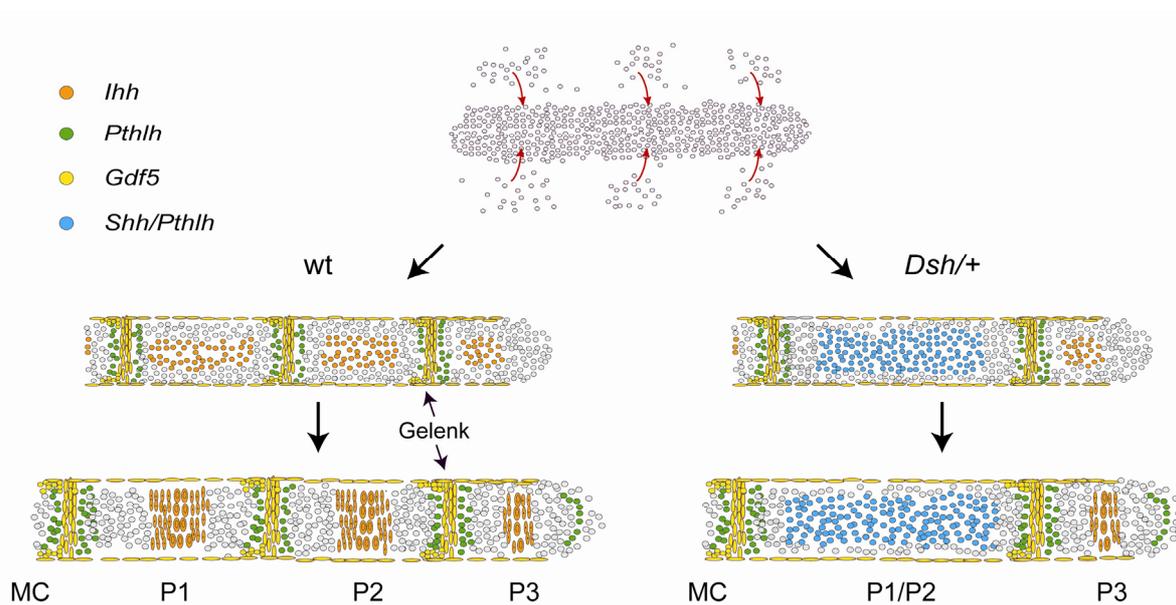


Abb. 9. Entwicklung der Phalangen und Gelenke im *wt* und bei der *Dsh/+* Mutante mit Expressionsmustern der Gene *Ihh*, *Gdf5*, *Pthlh* und *Shh* an E12.5 (oben), E13.5 (Mitte) und E14.5 (unten). Normalerweise induziert *Ihh* in einer gewissen Entfernung *Pthlh* und reguliert so die Chondrozytendifferenzierung. *Gdf5* wird um der kartilaginären Anlage und in sich entwickelnden Gelenken exprimiert und reguliert die Proliferation. In *Dsh/+* Phalangen wird dieser Prozess an E13.5 durch ektopische *Shh*-Expression in der kartilaginären Anlage von P1 und P2 gestört. Dies führt zur Aktivierung von *Pthlh*, zum Verlust der *Ihh*-Expression in der Wachstumsgugel und zu einer reduzierten *Gdf5*-Expression im Gelenk, **MC**-Metakarpalknochen, **P1**-Grundphalanx, **P2**-Mittelfalanx, **P3**-Endphalanx.

Repressor-Eigenschaften des *Shh*-Extremitäten-Enhancers verloren oder *Shh* gerät durch die Inversion unter die Kontrolle anderer Enhancer.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß unsere Untersuchungen wichtige Erkenntnisse über die Mechanismen der *Shh*-Regulation während der Extremitätenentwicklung liefern. Es ist denkbar, daß weitere *Shh*-Expressionsdomänen ebenfalls von cis-regulatorischen Enhancern gesteuert werden. Die Tatsache, daß Mutationen in long-range Enhancern auch bei den entwicklungsbiologisch bedeutsamen Genen *SOX9*, *PAX6*, *FOXC1*, *TWIST*, *POU3F4* und *SIX3* nachgewiesen wurden, zeigt die Bedeutung dieser Elemente. In Zukunft stellt die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Enhancer aktivieren, einen wichtigen Baustein für das Verständnis der Aktivierung von *Shh* und des regulatorischen Netzwerks zwischen den verschiedenen Signaltransduktionskaskaden dar.

4. Literaturverzeichnis

- Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. 2007. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Development* 134:3133-3144.
- Afzal AR, Rajab A, Fenske CD, Oldridge M, Elanko N, Ternes-Pereira E, Tuysuz B, Murday VA, Patton MA, Wilkie AO, Jeffery S. 2000. Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet* 25:419-422.
- Akam M. 1989. Hox and HOM: homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 57:347-349.
- Asai DJ, Koonce MP. 2001. The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol* 11:196-202.
- Bartoloni L, Blouin JL, Maiti AK, Sainsbury A, Rossier C, Gehrig C, She JX, Marron MP, Lander ES, Meeks M, Chung E, Armengot M, Jorissen M, Scott HS, Delozier-Blanchet CD, Gardiner RM, Antonarakis SE. 2001. Axonemal beta heavy chain dynein DNAH9: cDNA sequence, genomic structure, and investigation of its role in primary ciliary dyskinesia. *Genomics* 72:21-33.
- Bell J. 1951. On brachydactyly and symphalangism. In: *Treasury of human inheritance*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 1-31.
- Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M. 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47:1033-1040.
- Budny B, Chen W, Omran H, Fliegauf M, Tzschach A, Wisniewska M, Jensen LR, Raynaud M, Shoichet SA, Badura M, Lenzner S, Latos-Bielenska A, Ropers HH. 2006. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Hum Genet* 120:171-178.
- 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.
- Connor JM, Ferguson-Smith MA. 1987. *Essential Medical Genetics*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Consortium IHG. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945.
- Craig FM, Bentley G, Archer CW. 1987. The spatial and temporal pattern of collagens I and II and keratan sulphate in the developing chick metatarsophalangeal joint. *Development* 99:383-391.
- Culp JS, Webster LC, Friedman DJ, Smith CL, Huang WJ, Wu FY, Rosenberg M, Ricciardi RP. 1988. The 289-amino acid E1A protein of adenovirus binds zinc in a region that is important for trans-activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6450-6454.
- Driever W, Nusslein-Volhard C. 1989. The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 337:138-143.
- Dudley AT, Ros MA, Tabin CJ. 2002. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418:539-544.
- Duriez B, Duquesnoy P, Escudier E, Bridoux AM, Escalier D, Rayet I, Marcos E, Vojtek AM, Bercher JF, Amselem S. 2007. A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3336-3341.
- Epstein DJ, McMahon AP, Joyner AL. 1999. Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development* 126:281-292.

- Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R. 1995. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80:371-378.
- Everman DB, Bartels CF, Yang Y, Yanamandra N, Goodman FR, Mendoza-Londono JR, Savarirayan R, White SM, Graham JM, Jr., Gale RP, Svarch E, Newman WG, Kleckers AR, Francomano CA, Govindaiah V, Singh L, Morrison S, Thomas JT, Warman ML. 2002. The mutational spectrum of brachydactyly type C. *Am J Med Genet* 112:291-296.
- 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.
- Feng XH, Derynck R. 2005. Specificity and versatility in *tgf-beta* signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-693.
- Fliegauf M, Benzing T, Omran H. 2007. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:880-893.
- Fliegauf M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, Knowles MR, Omran H. 2005. Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1343-1349.
- Forrester WC, Kim C, Garriga G. 2004. The *Caenorhabditis elegans* Ror RTK CAM-1 inhibits EGL-20/Wnt signaling in cell migration. *Genetics* 168:1951-1962.
- Francis-West P, Ladher R, Barlow A, Graveson A. 1998. Signalling interactions during facial development. *Mech Dev* 75:3-28.
- 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.
- Gehring WJ, Hiromi Y. 1986. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet* 20:147-173.
- Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, Hudgins L, Cremers CW, Cremers FP, Brunner HG, Reinker K, Rimoin DL, Cohn DH, Goodman FR, Reardon W, Patton M, Francomano CA, Warman ML. 1999. Heterozygous mutations in the gene encoding *noggin* affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* 21:302-304.
- Gordon JW, Ruddle FH. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244-1246.
- Handel MA, Kennedy JR. 1984. Situs inversus in homozygous mice without immotile cilia. *J Hered* 75:498.
- Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, Mortier GR. 2003. Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet* 72:1040-1046.
- Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkun G, et al. 1988. The POU domain: a large conserved region in the mammalian *pit-1*, *oct-1*, *oct-2*, and *Caenorhabditis elegans* *unc-86* gene products. *Genes Dev* 2:1513-1516.
- Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegauf M, Loges NT, Wildhaber J, Noone PG, Kennedy M, Antonarakis SE, Blouin JL, Bartoloni L, Nusslein T, Ahrens P, Griesse M, Kuhl H, Sudbrak R, Knowles MR, Reinhardt R, Omran H. 2006. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med* 174:120-126.
- Horvath J, Fliegauf M, Olbrich H, Kispert A, King SM, Mitchison H, Zariwala MA, Knowles MR, Sudbrak R, Fekete G, Neesen J, Reinhardt R, Omran H. 2005. Identification and

- analysis of axonemal dynein light chain 1 in primary ciliary dyskinesia patients. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:41-47.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV. 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426:83-87.
- Ianakiiev P, van Baren MJ, Daly MJ, Toledo SP, Cavalcanti MG, Neto JC, Silveira EL, Freire-Maia A, Heutink P, Kilpatrick MW, Tsipouras P. 2001. Acheiropodia is caused by a genomic deletion in *C7orf2*, the human orthologue of the *Lmbr1* gene. *Am J Hum Genet* 68:38-45.
- Ingham PW. 1988. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335:25-34.
- Ingham PW, McMahon AP. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059-3087.
- Janssens K, Gershoni-Baruch R, Guanabens N, Migone N, Ralston S, Bonduelle M, Lissens W, Van Maldergem L, Vanhoenacker F, Verbruggen L, Van Hul W. 2000. Mutations in the gene encoding the latency-associated peptide of TGF-beta 1 cause Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet* 26:273-275.
- 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.
- Johnson RL, Tabin CJ. 1997. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90:979-990.
- Kimura S, Shiota K. 1996. Sequential changes of programmed cell death in developing fetal mouse limbs and its possible roles in limb morphogenesis. *J Morphol* 229:337-346.
- Lakso M, Pichel JG, Gorman JR, Sauer B, Okamoto Y, Lee E, Alt FW, Westphal H. 1996. Efficient *in vivo* manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5860-5865.
- Lawrence PA, Morata G. 1992. Developmental biology. Lighting up *Drosophila*. *Nature* 356:107-108.
- Lehmann K, Seemann P, Silan F, Goecke TO, Irgang S, Kjaer KW, Kjaergaard S, Mahoney MJ, Morlot S, Reissner C, Kerr B, Wilkie AO, Mundlos S. 2007. A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist *NOGGIN*. *Am J Hum Genet* 81:388-396.
- Lehmann K, Seemann P, Boergermann J, Morin G, Reif S, Knaus P, Mundlos. 2006. A novel R486Q mutation in *BMPRI1B* resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur J Hum Genet* 14:1248-54.
- Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Suring K, Majewski F, Tinschert S, Grzeschik KH, Muller D, Knaus P, Nurnberg P, Mundlos S. 2003. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12277-12282.
- 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, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S.

2002. Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7548-7553.
- Maiti AK, Bartoloni L, Mitchison HM, Meeks M, Chung E, Spiden S, Gehrig C, Rossier C, DeLozier-Blanchet CD, Blouin J, Gardiner RM, Antonarakis SE. 2000. No deleterious mutations in the FOXJ1 (alias HFH-4) gene in patients with primary ciliary dyskinesia (PCD). *Cytogenet Cell Genet* 90:119-122.
- Matsuda T, Nomi M, Ikeya M, Kani S, Oishi I, Terashima T, Takada S, Minami Y. 2001. Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mech Dev* 105:153-156.
- McCarroll SA, Altshuler DM. 2007. Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat Genet* 39:S37-42.
- McGinnis W, Levine MS, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ. 1984. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* 308:428-433.
- McGrath J, Brueckner M. 2003. Cilia are at the heart of vertebrate left-right asymmetry. *Curr Opin Genet Dev* 13:385-392.
- McLean W, Olsen BR. 2001. Mouse models of abnormal skeletal development and homeostasis. *Trends Genet* 17:S38-43.
- McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK, Fulton R, Kucaba TA, Wagner-McPherson C, Barbazuk WB, Gregory SG, Humphray SJ, French L, Evans RS, Bethel G, Whittaker A, Holden JL, McCann OT, Dunham A, Soderlund C, Scott CE, Bentley DR, Schuler G, Chen HC, Jang W, Green ED, Idol JR, Maduro VV, Montgomery KT, Lee E, Miller A, Emerling S, Kucherlapati, Gibbs R, Scherer S, Gorrell JH, Sodergren E, Clerc-Blankenburg K, Tabor P, Naylor S, Garcia D, de Jong PJ, Catanese JJ, Nowak N, Osoegawa K, Qin S, Rowen L, Madan A, Dors M, Hood L, Trask B, Friedman C, Massa H, Cheung VG, Kirsch IR, Reid T, Yonescu R, Weissenbach J, Bruls T, Heilig R, Branscomb E, Olsen A, Doggett N, Cheng JF, Hawkins T, Myers RM, Shang J, Ramirez L, Schmutz J, Velasquez O, Dixon K, Stone NE, Cox DR, Haussler D, Kent WJ, Furey T, Rogic S, Kennedy S, Jones S, Rosenthal A, Wen G, Schilhabel M, Gloeckner G, Nyakatura G, Siebert R, Schlegelberger B, Korenberg J, Chen XN, Fujiyama A, Hattori M, Toyoda A, Yada T, Park HS, Sakaki Y, Shimizu N, Asakawa S, Kawasaki K, Sasaki T, Shintani A, Shimizu A, Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Ramser J, Seranski P, Hoff C, Poustka A, Reinhardt R, Lehrach H. 2001. A physical map of the human genome. *Nature* 409:934-941.
- Merino R, Macias D, Ganan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurler JM. 1999. Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud. *Dev Biol* 206:33-45.
- Mikels AJ, Nusse R. 2006. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4:e115.
- Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, Clement A, Geremek M, Delaisi B, Bridoux AM, Coste A, Witt M, Duriez B, Amselem S. 2006. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *J Med Genet* 43:326-333.
- Muller F, Chang B, Albert S, Fischer N, Tora L, Strahle U. 1999. Intronic enhancers control expression of zebrafish sonic hedgehog in floor plate and notochord. *Development* 126:2103-2116.
- Mundlos S. 2000. Skeletal morphogenesis. *Methods Mol Biol* 136:61-70.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-

- helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- Neesen J, Drenckhahn JD, Tiede S, Burfeind P, Grzmil M, Konietzko J, Dixkens C, Kreutzberger J, Laccone F, Omran H. 2002. Identification of the human ortholog of the t-complex-encoded protein TCTE3 and evaluation as a candidate gene for primary ciliary dyskinesia. *Cytogenet Genome Res* 98:38-44.
- Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y, Hamada H. 2002. Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* 418:96-99.
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N. 1998. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95:829-837.
- Noone PG, Bali D, Carson JL, Sannuti A, Gipson CL, Ostrowski LE, Bromberg PA, Boucher RC, Knowles MR. 1999. Discordant organ laterality in monozygotic twins with primary ciliary dyskinesia. *Am J Med Genet* 82:155-160.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801.
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y. 2003. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8:645-654.
- Olbrich H, Haffner K, Kispert A, Volkel A, Volz A, Sasmaz G, Reinhardt R, Hennig S, Lehrach H, Konietzko N, Zariwala M, Noone PG, Knowles M, Mitchison HM, Meeks M, Chung EM, Hildebrandt F, Sudbrak R, Omran H. 2002. Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. *Nat Genet* 30:143-144.
- Oldridge M, Fortuna AM, Maringa M, Propping P, Mansour S, Pollitt C, DeChiara TM, Kimble RB, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Wilkie AO. 2000. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet* 24:275-278.
- Parr BA, McMahon AP. 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374:350-353.
- Patten JL, Johns DR, Valle D, Eil C, Gruppuso PA, Steele G, Smallwood PM, Levine MA. 1990. Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Engl J Med* 322:1412-1419.
- Pennarun G, Bridoux AM, Escudier E, Dastot-Le Moal F, Cacheux V, Amselem S, Duriez B. 2002. Isolation and expression of the human hPF20 gene orthologous to *Chlamydomonas* PF20: evaluation as a candidate for axonemal defects of respiratory cilia and sperm flagella. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:362-370.
- Pennarun G, Chapelin C, Escudier E, Bridoux AM, Dastot F, Cacheux V, Goossens M, Amselem S, Duriez B. 2000. The human dynein intermediate chain 2 gene (DNAI2): cloning, mapping, expression pattern, and evaluation as a candidate for primary ciliary dyskinesia. *Hum Genet* 107:642-649.
- Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, Bridoux AM, Cacheux V, Roger G, Clement A, Goossens M, Amselem S, Duriez B. 1999. Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia. *Am J Hum Genet* 65:1508-1519.
- Persaud TVN, Tath FRC, Path FF. 1990. *Environmental Causes of Human Birth Defects*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Polinkovsky A, Robin NH, Thomas JT, Irons M, Lynn A, Goodman FR, Reardon W, Kant SG, Brunner HG, van der Burgt I, Chitayat D, McGaughan J, Donnai D, Luyten FP,

- Warman ML. 1997. Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat Genet* 17:18-19.
- Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75:1401-1416.
- Robinow M, Silverman FN, Smith HD. 1969. A newly recognized dwarfing syndrome. *Am J Dis Child* 117:645-651.
- Roessler E, Ward DE, Gaudenz K, Belloni E, Scherer SW, Donnai D, Siegel-Bartelt J, Tsui LC, Muenke M. 1997. Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. *Hum Genet* 100:172-181.
- Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL. 1979. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5818-5819.
- Sagai T, Hosoya M, Mizushina Y, Tamura M, Shiroishi T. 2005. Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* 132:797-803.
- Sagai T, Masuya H, Tamura M, Shimizu K, Yada Y, Wakana S, Gondo Y, Noda T, Shiroishi T. 2004. Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog (Shh). *Mamm Genome* 15:23-34.
- Saunders JW, Jr. 1998. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. 1948. *J Exp Zool* 282:628-668.
- 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.
- Scott MP, Carroll SB. 1987. The segmentation and homeotic gene network in early Drosophila development. *Cell* 51:689-698.
- Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K, Stricker S, Pohl J, Ploger F, Staub E, Nickel J, Sebald W, Knaus P, Mundlos S. 2005. Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 115:2373-2381.
- Sha X, Yang L, Gentry LE. 1991. Identification and analysis of discrete functional domains in the pro region of pre-pro-transforming growth factor beta 1. *J Cell Biol* 114:827-839.
- Shubin NH, Alberch P. 1986. A morphogenic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. In: Hecht MK, Wallace B, Prace G, editors. *Evolutionary Biology*. New York: Plenum Press. pp 319-387.
- Spater D, Hill TP, O'Sullivan R J, Gruber M, Conner DA, Hartmann C. 2006. Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Development* 133:3039-3049.
- Spranger J, Benirschke K, Hall JG, Lenz W, Lowry RB, Opitz JM, Pinsky L, Schwarzacher HG, Smith DW. 1982. Errors of morphogenesis: concepts and terms. Recommendations of an international working group. *J Pediatr* 100:160-165.
- Stanford WL, Cohn JB, Cordes SP. 2001. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2:756-768.
- Storm EE, Huynh TV, Copeland NG, Jenkins NA, Kingsley DM, Lee SJ. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 368:639-643.
- Stricker S, Verhey van Wijk N, Witte F, Brieske N, Seidel K, Mundlos S. 2006. Cloning and expression pattern of chicken Ror2 and functional characterization of truncating mutations in Brachydactyly type B and Robinow syndrome. *Dev Dyn* 235:3456-3465.
- Supp DM, Brueckner M, Kuehn MR, Witte DP, Lowe LA, McGrath J, Corrales J, Potter SS. 1999. Targeted deletion of the ATP binding domain of left-right dynein confirms its

- role in specifying development of left-right asymmetries. *Development* 126:5495-5504.
- Supp DM, Witte DP, Potter SS, Brueckner M. 1997. Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice. *Nature* 389:963-966.
- 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.
- Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. 1991. *Thompson and Thompson Genetics in Medicine*. Philadelphia: WB Saunders.
- van Bokhoven H, Celli J, Kayserili H, van Beusekom E, Balci S, Brussel W, Skovby F, Kerr B, Percin EF, Akarsu N, Brunner HG. 2000. Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet* 25:423-426.
- Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. 2000. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67:1047-1054.
- Wallis D, Muenke M. 2000. Mutations in holoprosencephaly. *Hum Mutat* 16:99-108.
- Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. 1989. The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* 57:645-658.
- Xu YK, Nusse R. 1998. The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Curr Biol* 8:R405-406.
- Zariwala M, O'Neal WK, Noone PG, Leigh MW, Knowles MR, Ostrowski LE. 2004. Investigation of the possible role of a novel gene, DPCD, in primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:428-434.
- Zariwala MA, Knowles MR, Omran H. 2007. Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol* 69:423-450.
- Zariwala MA, Leigh MW, Ceppa F, Kennedy MP, Noone PG, Carson JL, Hazucha MJ, Lori A, Horvath J, Olbrich H, Loges NT, Bridoux AM, Pennarun G, Duriez B, Escudier E, Mitchison HM, Chodhari R, Chung EM, Morgan LC, de Jongh RU, Rutland J, Pradal U, Omran H, Amselem S, Knowles MR. 2006. Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 174:858-866.

5. Zusammenfassung

Kongenitale Malformationssyndrome treten beim Menschen mit einer Häufigkeit von drei Prozent bei Geburt auf. Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden ist heute eine verbesserte Diagnostik der molekularen Ursachen vieler genetisch bedingter Erkrankungen möglich. Darüber hinaus geben molekulare und entwicklungsbiologische Untersuchungen von Modellorganismen Einblicke in die Funktion biologischer Prozesse während der Embryonalentwicklung.

Die Kenntnis der Embryonalentwicklung stellt die Grundlage für das Verständnis der Entstehung kongenitaler Malformationen dar. Die Embryogenese wird durch zahlreiche Entwicklungskontrollgene gesteuert, die den Bauplan des Körpers festlegen. Diese konservierten Gene steuern nicht nur die Entwicklung der primären Körperachse, sondern sind auch bei der Lateralisierung und bei der Entwicklung sekundärer Körperachsen, wie der Anlage und Determinierung der Extremitäten wichtig. In den von uns durchgeführten Untersuchungen wurden die molekularen Grundlagen genetischer Malformationssyndrome beim Mensch und der Maus untersucht, die durch Veränderungen und Defekte der Lateralisierung und der Extremitätenentwicklung gekennzeichnet sind.

In den letzten Jahren konnte die Bedeutung motiler und nicht motiler Zilien bei der Entstehung von Lateralisierungsdefekten und kongenitalen Malformationen gezeigt werden. In unseren Untersuchungen detektierten wir bei einer großen Familie mit Primär Ziliärer Dyskinesie (PCD) bzw. Kartagener Syndrom (KS) und normaler axonemaler Ultrastruktur Mutationen der schweren Dyneinkette *DNAH11* und konnten damit die Bedeutung von *DNAH11* bei der Pathogenese der PCD bzw. des KS untermauern.

In weiteren von uns durchgeführten Untersuchungen identifizierten wir die molekulargenetischen Ursachen der kongenitalen humanen Handfehlbildungen Brachydaktylie Typ B und Typ C und untersuchten die Pathogenese von Extremitätenmalformationen im Mausmodell. Wir identifizierten Mutationen der *ROR2*-Rezeptortyrosinkinase (RTK) in zwei Bereichen distal der Tyrosinkinase als Ursache für die Entstehung der Brachydaktylie Typ B. Als Modell für die Pathogenese des autosomal rezessiven Robinow Syndroms analysierten wir *Ror2*^{-/-}-Mäuse und zeigten die Bedeutung der *Ror2*-RTK während der embryonalen Skelettmorphogenese. In weiteren Untersuchungen beschrieben wir eine rezessive Form der Brachydaktylie Typ C, die durch eine Mutation in der Prodomäne des *GDF5*-Signalmoleküls vermutlich zu einer veränderten Verfügbarkeit von aktivem GDF5 führt.

Ferner klärten wir die molekulargenetischen Ursachen der *Shh*-regulatorischen Mausmutante „*short digits*“ (*Dsh*) auf und analysierten die entwicklungsbiologischen Folgen der Mutation während der embryonalen Handentwicklung. Wir identifizierten die Bruchpunkte der zugrunde liegenden 11,7 Megabasen umfassenden Inversion. Die Mutation führt zur Dislokation mehrerer long range cis-regulatorischer Enhancer, die die *Shh*-Expression während der ZNS- und Handentwicklung steuern. Die Brachydaktylie der heterozygoten *Dsh*/+-Mutante wird durch eine *Shh*-Reexpression in den Phalangen verursacht zu einem Zeitpunkt, an dem *Shh* normalerweise nicht aktiv ist. Dadurch wird die Chondrozytendifferenzierung und Gelenkentwicklung stark beeinträchtigt. Die *Dsh*-Mutante stellt ein besonderes Beispiel dar, das die Bedeutung cis-regulatorischer Enhancer-Elemente bei der Regulation des *Shh*-Gens aufzeigt.

Unsere Ergebnisse liefern einen wichtigen Beitrag zum Verständnis angeborener Extremitätenmalformationen und von Lateralisierungsdefekten beim Mensch und im Mausmodell. Derzeitiges Ziel ist es, die molekularen Grundlagen kongenitaler Malformationen aufzuklären und deren Ursachen besser zu verstehen. Trotz der immensen Fortschritte der molekulargenetischen Diagnostik der letzten Jahre existieren bei zahlreichen kongenitalen Entwicklungsstörungen und insbesondere bei Skeletterkrankungen bisher keine kausalen molekularen Therapien im Stadium der klinischen Anwendung. Die Entwicklung molekularer Therapien für angeborene und erworbene Erkrankungen des Skeletts stellt deshalb eine der zukünftigen wissenschaftlichen Herausforderungen dar.

6. Danksagung

Der erfolgreiche Abschluß der vorliegenden Habilitationsarbeit hing von vielen Faktoren ab. Meinen Eltern möchte ich für Ihre Unterstützung während meines Medizinstudiums danken, in dem ich die Grundlagen für meine spätere Tätigkeit als Kinderarzt und Wissenschaftler lernte. Bei Herrn Prof. Peter Gruß und bei Herrn Prof. Hermann-Josef Gröne möchte ich mich bedanken, in deren Labors ich als Medizinstudent erste wissenschaftliche Erfahrungen sammeln durfte, die mein wissenschaftliches Denken im weiteren Verlauf stark geprägt haben. Herrn Prof. Wolfram Scheurlen danke ich dafür, daß er mich in die Kinderheilkunde und wissenschaftlichen Grundlagen der Onkologie einführte. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Stefan Mundlos, der mein Interesse im Bereich der Humangenetik sehr förderte und in dessen Labor ich mich wissenschaftlich bedeutend weiterentwickeln konnte. Herrn Prof. Gerhard Gaedicke danke ich für den Zuspruch und die Unterstützung bei der Rückkehr in die Kinderklinik. Frau Prof. Annette Grüters-Kieslich danke ich besonders für die wissenschaftliche Integration und Förderung an der Charité.

Der Beginn dieser Arbeit hing von einer Kombination aus Zufall und Neugier ab, durch die ich auf den großen Stammbaum einer türkischen Familie mit Brachydaktylie stieß. Ohne die Unterstützung zahlreicher Helfer wäre die erfolgreiche Durchführung undenkbar gewesen. Ich danke Familie Dalkiran für ihre Kooperation und Gastfreundlichkeit in Istanbul, Leonore Senf und Christian Buschow für die initiale Unterstützung bei der Etablierung des Projekts und beim Umzug nach Berlin. Dr. Michael Niedermaier, Norbert Brieske und Dr. Britta Trepzik für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, Kai Albring, Malte Kriegs und Jana Schneider für ihre Hilfe bei zahlreichen Präparationsarbeiten. Dr. Sigmar Stricker danke ich für anregende wissenschaftliche Diskussionen im Labor und bei gelegentlichen Weinverkostungen außerhalb des Labors. Bei Dr. Jochen Hecht, Dr. Volkhard Seitz und Dr. Petra Seemann bedanke ich mich die für experimentelle Unterstützung in der Endphase der Fertigstellung der *Dsh*-Veröffentlichung. Prof. Bodo Niggemann, Dr. Lucia Bartoloni, Prof. Heymut Omran und Daniel Birker danke ich für ihr Engagement bei der *DNAH11*-Analyse. Allen weiteren, nicht genannten klinischen und wissenschaftlichen Kooperationspartnern danke ich für ihre Unterstützung. Den Mitgliedern der Forschergruppe Mundlos danke ich für anregende Diskussionen und die unvergessene Zeit am MPI für molekulare Genetik. Besonders dankbar bin ich meiner Frau Renate für ihre Liebe, ihr Verständnis und ihre Unterstützung und unseren Kindern Alexandra, Franziska und Maximilian für ihre Liebe und Kraft, die sie uns täglich geben.

ERKLÄRUNG

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

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- 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

.....
Unterschrift