

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

DISSERTATION

Analyse des *PRKAR1A*-Gens bei Patienten mit Akrodysostose
und Brachydaktylie Typ E

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Muhn

aus München

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. D. Horn
2. Prof. Dr. med. M. Zenker
3. Prof. Dr. U. Kornak

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Skelettentwicklung des Menschen.....	1
1.1.1	Extremitätenentwicklung des Menschen	1
1.2	Skelettale Fehlbildungen	5
1.2.1	Brachydaktylien.....	5
1.2.2	Akrodysostose	11
1.3	Regulatorische Untereinheit Typ I Alpha der cAMP-abhängigen Protein Kinase (PRKAR1A)	12
1.3.1	Aufbau	12
1.3.2	Funktionsmechanismus	13
1.3.3	<i>In vivo</i> Wirkung mit Schwerpunkt Knochenentwicklung	14
2	Zielsetzung.....	18
3	Materialien und Lösungen.....	19
3.1	Patienten	19
3.2	Reagenzien und Geräte	19
3.3	Lösungen.....	21
3.4	Software und Datenbanken	22
3.5	Primer-Design	22
4	Methoden	24
4.1	DNA-Extraktion aus EDTA-Blut	24
4.2	Polymerase-Kettenreaktion	25
4.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
4.4	Enzymatische Reinigung	27
4.5	Sequenzierung	27
4.6	Aufreinigung der Sequenzreaktion	27
5	Ergebnisse	29
5.1	Etablierung der PCR Bedingungen	29
5.2	Übersicht der Ergebnisse der Sequenzanalyse.....	29
5.3	In silico Analyse hinsichtlich der Pathogenität der Mutationen	31
5.4	Analyse des Konservierungsgrades der Mutationen	32
5.5	Klinische und laborchemische Patientendaten	34
6	Diskussion.....	52

6.1	Beurteilung der Mutationen im Hinblick auf die Proteinfunktion.....	52
6.2	Vergleichende Betrachtung von Geno- und Phänotyp	56
6.3	Auswirkung auf die genetische Diagnostik	58
7	Zusammenfassung.....	60
8	Literaturverzeichnis	62
9	Tabellen und Abbildungsverzeichnis.....	74

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
kb	Kilo-Basenpaare
Mb	Mega-Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	centi Meter
g	Gramm
L	Liter
M	Molare Masse, mol/L
μ	mikro, 10^{-6}
m	milli, 10^{-3}
mol	Mol
n	nano, 10^{-9}
n.a.	nicht anwendbar
nt	Nukleotid
p	piko, 10^{-12}
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rounds per minute
U	Unit
AHO	Albright Hereditary Osteodystrophy
BDE	Brachydaktylie Typ E
IHH	Indian Hedgehog
NMD	nonsense-mediated decay
PCR	Polymerase Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction
PDE4D	Phosphodiesterase 4D
PKA	Proteinkinase A
PRKAR1A	Regulatorische Untereinheit Typ I Alpha der cAMP-abhängigen Protein Kinase

PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon-ähnliches Hormon
PTHrP	Parathormon-verwandtes Protein
TSH	Thyreotropin
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: desoxyribonucleic acid
cDNA	komplementäre DNA
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid
mRNA	engl.: messenger RNA
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Cys	Cystein
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Skelettentwicklung des Menschen

Das menschliche Skelett entsteht aus Mesenchym, das entweder ektodermalen oder mesodermalen Ursprungs sein kann. Verschiedene Zelllinien bilden dabei unterschiedliche Skelettabschnitte. Das kraniofaziale Skelett entwickelt sich aus der ektodermalen Neuralleiste, das paraxiale Mesoderm ist verantwortlich für das axiale Skelett und aus dem Seitenplattenmesoderm geht das Extremitätenskelett hervor (Karaplis, 2002). Der Knochen entsteht zum einen durch die membranäre (desmale) Ossifikation: bei dieser differenzieren Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten. Zum anderen bildet sich Knochen über die chondrale Ossifikation, hier wird ein Primordialskelett aus Knorpelgewebe angelegt, das im Laufe der Entwicklung durch Knochen ersetzt wird. Sie beginnt in der 6. Embryonalwoche und ist erst mit der Beendigung des Längenwachstums abgeschlossen (Christ, 2003). Während der größte Teil des Schädelskeletts durch membranäre Ossifikation entsteht, entwickeln sich die Knochen, welche mesodermalen Ursprungs sind, hauptsächlich über chondrale Ossifikation (Chung, Kawaguchi, Takato, & Nakamura, 2004). Das axiale Skelett entsteht dabei aus Somiten genannten Strukturen, die sich bilateral entlang des Neuralrohrs entwickeln. Während der dorsale Teil des Somiten, das Dermomyotom, die Vorläuferzellen für die Dermis und Skelettmuskulatur enthält, birgt der ventrale Teil, das Sklerotom die Vorläufer für Knorpel, Knochen und Sehnen des Rücken (Brent & Tabin, 2002). Der posteriore Teil eines Sklerotoms bildet mit dem anterioren Abschnitt des unter ihm gelegenen Sklerotoms ein Wirbelsegment und Teile der entsprechenden Rippe (Saga & Takeda, 2001).

1.1.1 Extremitätenentwicklung des Menschen

Das Skelett der Extremitäten entwickelt sich aus mesenchymalen, knospenartigen Ausstülpungen (engl.: *limb buds*) an den Seiten des Embryos, aus welchen sich auch die anderen Gewebe der Extremitäten entwickeln. Diese Ausstülpungen wachsen in drei verschiedenen Achsen: der proximo-distalen Achse (PD) (Schulter zu Fingerspitze), der anterior-posterioren Achse (AP) (Daumen zu Kleinfinger, Radius zu Ulna) und der dorso-ventralen Achse (DV) (Handrücken zu Handfläche) (Niswander,

2003). Das Wachstum der AP-Achse wird laut Saunders (1948) durch die sogenannte apikale ektodermale Randleiste (engl.: *apical ectodermal ridge*, AER), einer ektodermalen Verdickung an der Spitze der Extremitätenanlage gesteuert. Entfernt man diese Struktur zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung in Hühnerembryonen, so entsteht ein verkürzter Flügel. Dieser ist umso kürzer je eher die Entfernung der AER erfolgt (Saunders, 1948). Als Vermittler der von der AER initiierten Verlängerung dienen die FGFs (engl.: *fibroblast growth factors*) (Niswander, Tickle, Vogel, Booth, & Martin, 1993). Das Zentrum, welches das Wachstum entlang der AP-Achse steuert ist die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) (engl.: *zone of polarizing activity*). Sie bestimmt das Anlegen der Knochen entlang der AP-Achse via dem Signalmolekül SHH (engl. *Sonic hedgehog*) (zusammengefasst in Towers und Tickle (2009)). So konnten durch Transplantation der ZPA im Hühnerembryo auf die gegenüberliegende Seite der Extremitätenanlage eine zusätzliche Fingeranlage in einem spiegelverkehrten Muster induziert werden (Saunders & Gasseling, 1968).

Reguliert werden die ZPA und die AER über die Familie der Homeobox-Transkriptionsfaktoren, insbesondere die Cluster HoxA und HoxD. Die Lage eines Gens innerhalb dieses Clusters bestimmt den Zeitpunkt der Expression und damit den Ort seiner Wirkung. Während Gene am 3'-Ende am frühesten exprimiert werden und Einfluss in den proximalen Extremitätenanteilen nehmen, geschieht dies für die am 5'-Ende gelegenen Gene später bzw. in distaleren Anteilen. Beispielsweise führen kombinierte Nullmutationen in *HOXA13* und *HOXD13* (den am weitesten 5'-gelegenen Gene) zu einer Verkümmerng des Autopodiums (**Abbildung 1-1**) (zusammengefasst in Zakany und Duboule (2007)).

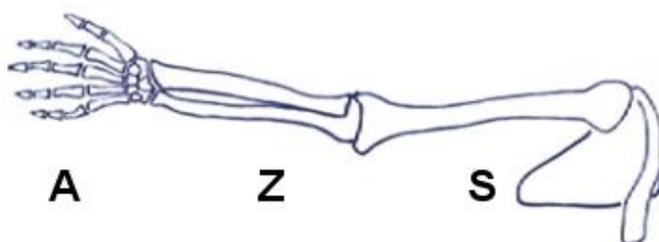


Abbildung 1-1 Darstellung der Extremitätenabschnitte des Menschen. A: Autopodium, Z: Zygopodium, S: Stylopodium. Verändert nach Zakany und Duboule (2007).

Innerhalb der Extremitätenanlage kommt es ab der 5. Embryonalwoche zur Knorpelbildung, welcher dann das Gerüst für die spätere Osteogenese bildet. Dies geschieht in einem von SOX9 abhängigen Vorgang, durch Kondensation von mesenchymalen Zellen, die dem Seitenplattenmesoderm entstammen, zu Prächondrozyten (Shimizu, Yokoyama, & Asahara, 2007). Durch den Einfluss von BMPs (engl.: *bone morphogenetic proteins*) und der HOX-Gene beginnen die Prächondrozyten nun zu proliferieren und differenzieren (Hall & Miyake, 2000). Hierbei durchlaufen die Chondrozyten in Säulen geordnet von epi- nach diaphysär verschiedene Phasen, welche sich als morphologisch voneinander abgrenzbare Zonen im werdenden Knochen abgrenzen lassen (**Abbildung 1-3**) Während die flachen und proliferierenden Chondrozyten noch von einer extrazellulären Matrix aus Proteoglykanen und Kollagen Typ II umgeben sind, sezernieren die hypertrophen Chondrozyten hauptsächlich Kollagen Typ X. Sind die Chondrozyten bis auf das 5-fache ihrer ursprünglichen Größe angewachsen, gehen die Zellen unter und hinterlassen trabekuläre Gebilde aus der zuvor abgesonderten mineralisierten extrazellulären Matrix, die als Gerüst zur Ablagerung von Knochengewebe durch vaskulär eingewanderte Osteoblasten genutzt wird. Im späteren Verlauf bilden sich ebenfalls durch Untergang hypertropher Chondrozyten und Einwanderung von Osteoblasten sekundäre Ossifikationszentren in den späteren Epiphysen (**Abbildung 1-2**) (Kronenberg, 2003; Mackie, Ahmed, Tatarczuch, Chen, & Mirams, 2008).

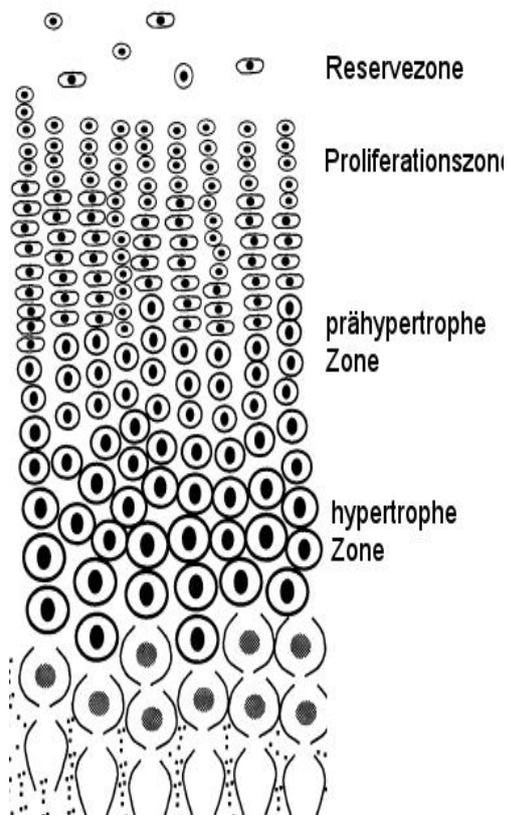


Abbildung 1-3 Darstellung der fortschreitenden Differenzierung der Chondrozyten innerhalb der Säulen. Verändert nach Stevens und Williams (1999)

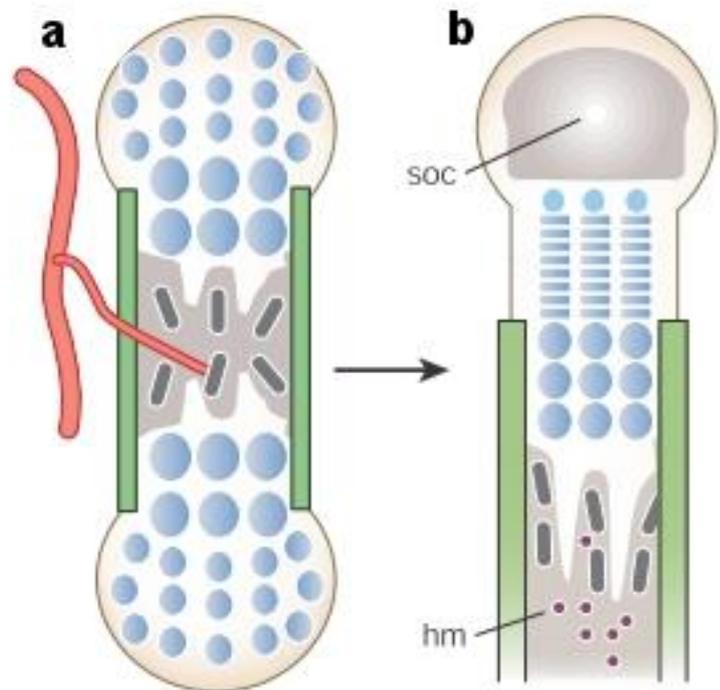


Abbildung 1-2 Ablauf der enchondralen Ossifikation (detaillierte Erläuterungen siehe Text) (a) Die von den Chondrozyten (blau) gebildete extrazelluläre Matrix (beige) wird von den durch Gefäße eingewanderten Osteoblasten (grau) als Gerüst zur Synthese der Spongiosa (braun) genutzt. (b) Später bilden sich in den Epiphysen sekundäre Ossifikationszentren. Die grüne Struktur stellt die perichondrale Knochenmanschette dar, welche das Dickenwachstum der Kortikalis bestimmt. (soc: sekundäres Ossifikationszentrum, hm: hämatopoetisches Knochenmark). Verändert nach Kronenberg (2003)

Als wichtiger regulatorischer Mechanismus dient hier eine negative Rückkopplungsschleife von IHH (engl.: *Indian hedgehog*) und PTHLH (*parathyroid hormone-like hormone*). IHH wird von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten gebildet und induziert die Bildung von PTHLH in den entfernt liegenden Chondrozyten der proliferativen Zone, welches den Übergang in den prähypertrophen Zustand hinauszögert (Stevens & Williams, 1999). Das Längenwachstum des entstehenden Knochens wird maßgeblich durch die Volumenzunahme der hypertrophierenden Chondrozyten bestimmt (Breur, VanEnkevort, Farnum, & Wilsman, 1991) sowie durch die Verlängerung der Chondrozytensäulen, welche durch horizontale Zellteilung und anschließende Interkalierung der Tochterzellen entsteht (Li & Dudley, 2009). Somit ist die Regulation des Verhältnisses von Proliferation zu Hypertrophie entscheidend für die korrekte Längenentwicklung des Knochens. Störungen in diesem Gleichgewicht können zu Skelettfehlbildungen führen.

1.2 Skelettale Fehlbildungen

1.2.1 Brachydaktylien

Der Terminus Brachydaktylie leitet sich von den griechischen Wörtern für „kurz“ (*brachy*) und „Finger“ (*daktylos*) ab. Bell (1951) definierte fünf verschiedene Typen dieser Entität (A, B, C, D, E), von denen A in 3 Subtypen untergliedert wird (A1, A2, A3), die sich jeweils durch eine Verkürzung bestimmter Mittelphalangen oder Metacarpalia auszeichnen. Die Untergliederung in die verschiedenen Typen erfolgt an Hand anatomischer, radiologischer und genetischer Kriterien (**Abbildung 1-4**).

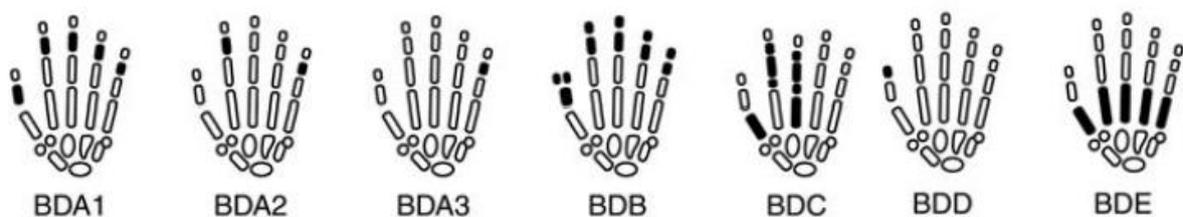


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der verschiedenen Brachydaktylie-Typen. Schwabe und Mundlos (2004). Betroffene Knochen beim jeweiligen Typ sind schwarz eingefärbt.

Brachydaktylie Typ A1

Die Brachydaktylie Typ A1 (BDA1) stellt sich in einer proportionierten Verkürzung aller Mittelphalangen dar. Betrachtet man Röntgenaufnahmen von Betroffenen, so findet man verkürzte oder fehlende Mittelphalangen, manchmal auch terminalen Symphalangismus (Temtamy & Aglan, 2008). Brachydaktylie A1 war die erste Anomalie an der ein autosomal dominanter Erbgang beim Menschen nachvollzogen wurde (Farabee, 1903). Gao et al. (2001) beschrieben Mutationen im *IHH*-Gen bei Betroffenen, von denen gezeigt werden konnte, dass sie die Induktion *IHH*-abhängiger Zielgene verringern (Guo et al., 2010). *IHH* nimmt eine zentrale Rolle in der enchondralen Ossifikation ein (Siehe Kap 1.1.1), außerdem trägt *IHH* über einen stromaufwärts des BMP-Signalwegs gelegenen Mechanismus zum distalen Wachstum der knorpeligen Phalanxanlage bei (Witte, Chan, Economides, Mundlos, & Stricker, 2010). Weiter wurde die Region 5p13.3-p.13.2 in Zusammenhang mit der BDA1 gebracht (Armour, McCready, Baig, Hunter, & Bulman, 2002), während eine Arbeit von Byrnes et al. (2010) eine Mutation in *GDF5* (*growth differentiation factor 5*), ein den BMPs verwandtes Protein, als ebenfalls ursächlich für BDA1 verifiziert.

Brachydaktylie Typ A2

Sind nur der Indexfinger und gelegentlich in geringem Ausmaß der V. Finger von der Verkürzung der Mittelphalanx betroffen, so spricht man von der Brachydaktylie Typ A2 (BDA2) (Mundlos, 2009), deren genetische Grundlage Mutationen in verschiedenen Genen des BMP-Signalwegs sind. So wurden bei Betroffenen Missense-Mutationen im Gen *BMPRI1B* (*bone morphogenetic protein receptor 1B*) nachgewiesen, die sich auch *in vitro* negativ auf die Chondrogenese auswirkten (Lehmann et al., 2006; Lehmann et al., 2003). Auch Mutationen in *GDF5*, die zu einer verminderten Signalweiterleitung nach Bindung an den Rezeptor führen, können für BDA2 verantwortlich sein (Kjaer et al., 2006; Seemann et al., 2005). Nachfolgend wurde in verschiedenen Familien mit BDA2 Duplikationen auf Chromosom 20p13.3 nachgewiesen, die stromabwärts des *BMP2*-Gens lagen und vermutlich zu einer Fehlregulation der *BMP2*-Expression führen (Dathe et al., 2009; Su et al., 2011).

Brachydaktylie Typ A3

Ist nur eine Verkürzung der Mittelphalanx des V. Fingers vorhanden, so liegt eine Brachydaktylie Typ A3 (BDA3) vor. Dies ist eine sehr häufige Veränderung, deren Auftreten je nach Population bei 3,4% bis 21% liegt. Für sie ist bislang keine genetische Grundlage beschrieben (Temtam & Aglan, 2008).

Brachydaktylie Typ B

Bei der Brachydaktylie Typ B (BDB) besteht eine Verkürzung der distalen und/oder mittleren Phalangen aller Finger, was einen amputationsähnlichen Phänotyp zur Folge hat (Mundlos, 2009). Es wurden Mutationen im *ROR2*-Gen beschrieben (Schwabe et al., 2000), einer Rezeptortyrosinkinase, die die hemmende Wirkung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs auf das distale Wachstum der Phalanxanlagen negativ reguliert (Witte et al., 2010).

Brachydaktylie Typ B2

Brachydaktylie Typ B2 (BDB2) ist ein Subtyp der Brachydaktylie B und geht zusätzlich zur Hypoplasie der distalen Phalangen mit proximalem Symphalangismus und der Fusion von Mittelhandknochen einher. Hier führen Mutationen im verantwortlichen Gen *NOG*, einem Antagonisten der BMPs, nicht zu einem kompletten Funktionsverlust, sondern verändern die Fähigkeit BMPs zu binden und stören somit das sensible Gleichgewicht des BMP-Signalwegs (Lehmann et al., 2007).

Brachydaktylie Typ C

Bei dieser Form der Brachydaktylie liegt eine Brachymesophalangie des II., III., und V. Fingers vor, in Kombination mit Pseudoepiphysen des II. und III. Fingers, sowie einer Verkürzung des I. Metakarpalknochens (Temtam & Aglan, 2008). In mehreren Familien mit Brachydaktylie Typ C (BDC) wurden Mutationen im Gen *GDF5* verifiziert (Everman et al., 2002). Dies erscheint passend, da sich das klinische Bild milder Formen von BDC und BDA2 ähnelt (Mundlos, 2009).

Brachydaktylie Typ D

Die Verkürzung der distalen Daumenphalanx in verschiedener Ausprägung beschreibt die Brachydaktylie Typ D (BDD). Sie tritt in verschiedenen Bevölkerungen zwischen 0,41% und 4,0% auf und ist damit als nicht selten anzusehen (Temtam & Aglan, 2008). In Betroffenen, deren Phänotyp sich teils mit dem der Brachydaktylie Typ E (BDE, siehe unten) überschneidet, wurden Mutationen im *HOXD13*-Gen nachgewiesen (Johnson et al., 2003).

Brachydaktylie Typ E

Der Typ E der Brachydaktylien (BDE) zeichnet sich durch die Verkürzung der Metakarpalknochen aus (**Abbildung 1-5**). Er wurde von Hertzog (1968) in drei verschiedene Subtypen eingeteilt, dabei besteht bei Typ E1 lediglich eine Verkürzung des IV. Metakarpalknochens, bei Typ E2 sind verschiedene Metacarpalia betroffen, einschließlich der Verkürzung der distalen Phalanx des I. und III. Fingers sowie der Mittelphalanx des II. und V. Fingers. Typ E3 besteht in der Kombination verschiedener verkürzter Metacarpalia ohne verkürzte Phalangen. Die BDE kann isoliert oder als Teil eines Syndroms vorkommen (Temtam & Aglan, 2008). Beispiele für syndromologisches Vorkommen wären die Akrodysostose (MIM 101800), die „Albright hereditary osteodystrophy“ (AHO; MIM 103580) oder das „Brachydactyly mental retardation syndrome“ (BDMR; MIM 600430). Oft tritt die BDE auch in Kombination mit mildem Kleinwuchs auf.



Abbildung 1-5 Röntgenaufnahmen zweier Patienten mit BDE. Linkes Bild: Verkürzung des III. Metacarpale. Rechtes Bild: Verkürzung der Metacarpalia III, IV und V. Nach Oude Luttikhuis, Williams, und Trembath (1996) (links) und Syrou et al. (2002) (rechts). Die Pfeile markieren die verkürzten Knochen.

Für die isolierte Form einer BDE, die auch phänotypische Merkmale der BDD enthielt zeigten Johnson et al. (2003) Mutationen im *HOXD13*-Gen, nachträglich fanden sich auch Veränderungen im *HOXD13*-Gen bei einem Patienten mit isolierter BDE (Jamsheer, Sowinska, Kaczmarek, & Latos-Bielenska, 2012). *HOXD13* gehört zum *HOXD*-Cluster der Familie der Homeobox-Transkriptionsfaktoren, welche eine wichtige Rolle in der Extremitätenentwicklung einnimmt (siehe Kap. 1.1.1). *HOXD13* ist das am weitesten am 5'-Ende gelegene Gen seines Clusters (Zakany & Duboule, 2007).

Als weitere Ursache für eine BDE mit Kleinwuchs wurden in Betroffenen Mutationen des *PTH1H*-Gens (engl.: *parathyroid hormone-like hormone*) nachgewiesen und gleichzeitig ein Funktionsverlust des entsprechenden Proteins PTHrP (engl.: *parathyroid hormone-related peptide*) für eine der Mutationen gezeigt (Klopocki et al., 2010). Im Mausmodell führen Nullmutationen von *PTH1H* zu letalen Skelettfehlbildungen, die mit einer Verkleinerung der Wachstumsfuge in den Röhrenknochen einhergehen (Karaplis et al., 1994). PTHrP wird während der enchondralen Ossifikation von den Chondrozyten am Ende des Knochens gebildet und diffundiert zu angrenzenden, etwas differenzierteren Chondrozyten (K. Lee, Deeds, & Segre, 1995). Dort verlangsamt es das Übertreten der

Chondrozyten in den hypertrophen Zustand (K. Lee et al., 1996). Induziert wird die Bildung von PTHrP über *IHH*, welches wiederum von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten gebildet wird. Somit bilden diese beiden Moleküle eine Rückkopplungsschleife, welche die Chondrozytenproliferation der Wachstumsfuge steuert (Chung, Schipani, McMahon, & Kronenberg, 2001). Während ein konstitutiv aktiver Rezeptor (Pthr) für Pthrp bei Mäusen mit deletiertem *Pthlh* zu einem verlängerten Überleben führt (Schipani et al., 1997), zeigen Mäuse mit Nullmutationen im Pthr einen den Nullmutationen im *Pthlh* gleichenden Phänotyp (Lanske et al., 1996). Dieser Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Jüppner et al., 1991) und aktiviert die Phospholipase C sowie die Adenylatcyclase (Abou-Samra et al., 1992).

G-Proteine liegen im inaktiven Zustand als Heterotrimer vor (α , β und γ Untereinheit). Dabei hat die α -Untereinheit GDP gebunden. Die Bindung eines Liganden (hier: PTHrP) an den G-Protein gekoppelten Rezeptor löst eine Konformationsänderung des Rezeptors aus und führt zur Bindung an die α -Untereinheit. Dies hat zur Folge, dass GDP durch GTP ersetzt wird und eine Konformationsänderung der α -Untereinheit einsetzt, die sich damit von den anderen beiden Untereinheiten löst. In der freien, GTP-gebundenen Form kann sie mit dem Effektormolekül interagieren (zusammengefasst aus Deutzmann (2006)).

Im Falle von PTHrP wird die intrazelluläre Wirkung auf das Knochenwachstum durch die Untereinheit $G\alpha_s$, kodiert durch das Gen *GNAS*, vermittelt. Diese aktiviert die Adenylatcyclase, welche cAMP synthetisiert. Nullmutationen des *Gnas*-Gens in Mäusen resultierten in einem ähnlichen Phänotyp, wie Nullmutationen im *Pthr* (Bastepe et al., 2004; Sakamoto, Chen, Kobayashi, Kronenberg, & Weinstein, 2005). Auch die Proteinkinase A (PKA), welche durch cAMP aktiviert wird, ist zur Wirkung von PTHrP nötig (Zuscik et al., 2002).

Passend erscheint, dass verschiedene syndromologische Erkrankungen, die mit einer BDE einhergehen durch Mutationen in Genen dieser Signalkaskade verursacht werden. So wird die AHO mit oder ohne Hormonresistenz (je nachdem ob das mütterliche oder das väterliche Allel betroffen ist) durch Mutationen, die zum Funktionsverlust im *GNAS*-Gen führen, verursacht (Ahrens et al., 2001). Das Krankheitsbild der Akrodysostose mit Hormonresistenz wird durch Mutationen im *PRKAR1A*-Gen (*protein kinase A R1-alpha*

regulatory subunit), das für die regulatorische Untereinheit der PKA kodiert, verursacht (Linglart et al., 2011) und gliedert sich damit in diesen Signalweg ein. Das BDMR-Syndrom wird durch Veränderungen im *HDAC4*-Gen (*histone deacetylase 4*) verursacht (Williams et al., 2010), welches PTHrP-abhängig die Chondrozytenproliferation verzögert (Kozhemyakina, Cohen, Yao, & Lassar, 2009).

1.2.2 Akrodysostose

Periphere Dysostose bezeichnet eine Form der Dysostose, die mit Verkürzung der Röhrenknochen von Händen und Füßen sowie zapfenförmigen Epiphysen einhergeht (**Abbildung 1-6**) (Robinow et al., 1971).



Abbildung 1-6 Röntgenaufnahme der Hände des in **Abbildung 1-7** gezeigten Patienten, mit deutlich verkürzten Metacarpalia und phalangealen Knochen und Rudimenten von Zapfenepiphysen. Nach Butler, Wadlington, und Feingold (1990)



Abbildung 1-7 Typische Fazies eines Akrodysostose-Patienten mit hypoplastischer Nasenwurzel, nach oben gewandter Nasenspitze und vorgewölbter Stirn. Nach Butler et al. (1990)

Als Akrodysostose (MIM #101800) wird eine seltene Form der peripheren Dysostose bezeichnet, die von Maroteaux und Malamut (1968) beschrieben wurde, die zusätzlich mit Kleinwuchs, nasaler Hypoplasie, akzeleriertem Knochenalter und mentaler

Retardierung verbunden ist (**Abbildung 1-7**) (Butler, Rames, & Wadlington, 1988). Eine weitere radiologische Auffälligkeit können kalkspritzerähnliche Veränderungen in den Epiphysen (engl. „*epiphyseal stippling*“) im Säuglingsalter sein (Viljoen & Beighton, 1991). Während über die Jahre hinweg die meisten annotierten Fälle sporadisch auftraten, gibt es einzelne Berichte, die ein familiäres Vorkommen mit einer autosomal-dominanten Vererbung nahe legen (Sheela, Perti, & Thomas, 2005; Steiner & Pagon, 1992).

2011 wurde das Gen *PRKAR1A* als verantwortlich für Akrodysostose mit Hormonresistenz identifiziert. Es wurde in 3 sporadischen Fällen von nicht miteinander verwandter Patienten, die zusätzlich zur fazialen Dymorphologie Zeichen der Akrodysostose endokrinologische Auffälligkeiten besaßen, die heterozygote Mutation p.Arg368Stop detektiert, welche zu einem Verlust der letzten 13 Aminosäuren des Proteins führt und somit zu einer verringerten Sensitivität der Proteinkinase A (PKA) gegenüber cAMP (Linglart et al., 2011).

1.3 Regulatorische Untereinheit Typ I Alpha der cAMP-abhängigen Protein Kinase (PRKAR1A)

1.3.1 Aufbau

Das Gen *PRKAR1A* (engl.: *protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha*) (MIM 188830) findet sich beim Menschen auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q24.2) und kodiert für ein aus 381 Aminosäuren bestehendes Protein, welches als regulatorische Untereinheit Typ I Alpha (R1 α) der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) fungiert.

Das Genprodukt selbst besteht aus 4 Elementen (**Abbildung 1-8**): der N-terminal gelegenen Dimerisations-Domäne, es folgt eine Inhibitor-Sequenz (IS), die an das aktive Zentrum der katalytischen (C) Untereinheit der PKA bindet sowie die beiden cAMP-bindenden Elemente (A und B) [engl.: *nucleotide binding domain* (NBD)] (Anand et al., 2003). Innerhalb der beiden NBDs findet sich jeweils eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, die sogenannte *phosphate binding cassette* (PBC), welche durch

Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen den Phosphatrest des cAMP umschließt (Diller, Madhusudan, Xuong, & Taylor, 2001). Die Enden der beiden NBDs bilden je zwei miteinander verbundene helikale Strukturen, die sogenannte B/C-Helix (Gullingsrud, Kim, Taylor, & McCammon, 2006).

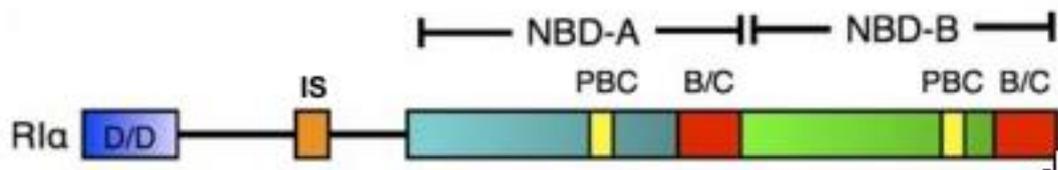


Abbildung 1-8 Aufbau der R1 α -Untereinheit, verändert nach Gullingsrud et al. (2006). D/D: dimerization/docking domain, IS: inhibitory site, NBD-A/-B: nucleotide binding domain A/B, PBC: phosphate binding cassette, B/C: B/C-Helix

1.3.2 Funktionsmechanismus

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) dient als „Second Messenger“ in der Signaltransduktion durch Hormone, Neurotransmitter oder anderer Substanzen vermittelter zellulärer Prozesse. Hierfür interagiert es hauptsächlich mit der PKA, die nach cAMP-Aktivierung die Phosphorylierung bestimmter Zielproteine katalysiert.

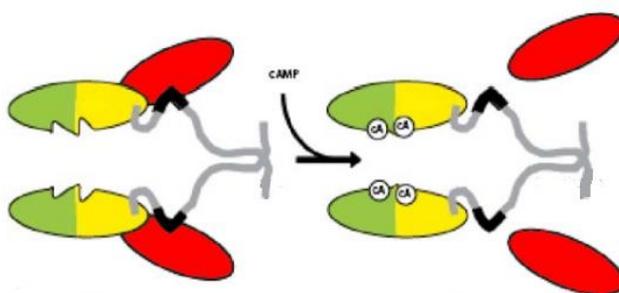


Abbildung 1-9 Schematische Darstellung eines Tetramers aus zwei katalytischen (C) Untereinheiten (rot) und einem R1 α -Homodimer (grün: NBD-B, gelb: NBD-A, schwarz: IS), verändert nach Scholten, Aye, und Heck (2008). Durch cAMP-Bindung an die R1 α -Untereinheiten kommt es zu Konformationsänderungen, die zur Dissoziation der C-Untereinheiten führen.

PKA liegt in Abwesenheit von cAMP als inaktives Holoenzym bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten und einem Dimer aus zwei regulatorischen Untereinheiten vor (Hansson, Skalhegg, & Tasken, 2000). Erst durch Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit kommt es zur Dissoziation der katalytischen Untereinheiten und damit zur möglichen Phosphorylierung der Substrate (**Abbildung 1-9**).

Für beide Untereinheiten existieren verschiedene Isoformen, drei für die katalytische (C α , C β und C γ) sowie vier für die regulatorische (R1 α , R1 β , R2 α , R2 β). Hierbei liegen C α und C β ubiquitär vor, C γ scheint spezifisch in Hodengewebe aufzutreten. Die regulatorischen Untereinheiten R1 α und R2 α werden ubiquitär exprimiert, während die Verteilung der Expression von R1 β und R2 β eher auf das zentrale Nervensystem und die Geschlechtsorgane begrenzt ist (Scott, 1991).

Das in dieser Arbeit analysierte Gen *PRKAR1A* kodiert für die R1 α -Untereinheit, welche an verschiedenen Stellen an die C-Untereinheit gebunden ist, erstens über die IS an das katalytische Zentrum der C-Untereinheit, zweitens an einem hydrophoben Teil der PBC der NBD-A und drittens über die erste B/C-Helix, welche auch die beiden NBDs verbindet (Kim, Xuong, & Taylor, 2005). Als vierte Stelle wurde von Kim, Cheng, Saldanha, und Taylor (2007) eine Sequenz zu Beginn der NBD-B identifiziert. Um diese Verbindungen zu lösen, ist das Zusammenspiel beider NBDs nötig. Denn die Dissoziation der C-Untereinheit wird durch Bindung von cAMP an NBD-A vermittelt, welche allerdings durch NBD-B vor cAMP-Bindung geschützt ist. Demzufolge ist zuerst eine Anlagerung von cAMP an NBD-B nötig, was eine Konformationsänderung der Domäne initiiert, die den Zugang für cAMP an NBD-A und somit die Dissoziation der C-Untereinheit ermöglicht (Herberg, Taylor, & Dostmann, 1996).

1.3.3 *In vivo* Wirkung mit Schwerpunkt Knochenentwicklung

In der freien Form kann die C-Untereinheit nun ihre katalytische Wirkung entfalten und vermittelt die Übertragung einer Phosphatgruppe eines ATP-Moleküls auf einen Serin- oder Threoninrest des Substrats. Die Wirkung dieser Reaktion kann einerseits kurzzeitig ausfallen, wenn zytoplasmatische Proteine phosphoryliert werden, die

daraufhin für wenige Minuten ihre Aktivität ändern, andererseits können aber auch bestimmte Transkriptionsfaktoren phosphoryliert werden, welche anschließend Einfluss auf die Expression ihrer Zielgene nehmen und so für einen länger anhaltenden Effekt sorgen (Shemarova, 2009).

Dieser Mechanismus wird durch das sogenannte „*cyclic AMP response element binding protein*“ (CREB) vermittelt, welches als Dimer an eine als „*cAMP responsive element*“ (CRE) definierte DNA-Sequenz gebunden ist. Wird das CREB durch die in den Zellkern diffundierte C-Untereinheit der PKA phosphoryliert führt das zur Rekrutierung des „*CREB binding proteins*“ (CBP), das über die Stabilisierung der DNA Polymerase II die Transkription nachgeschalteter Gene reguliert (Mayr & Montminy, 2001) (siehe auch **Abbildung 1-10**)

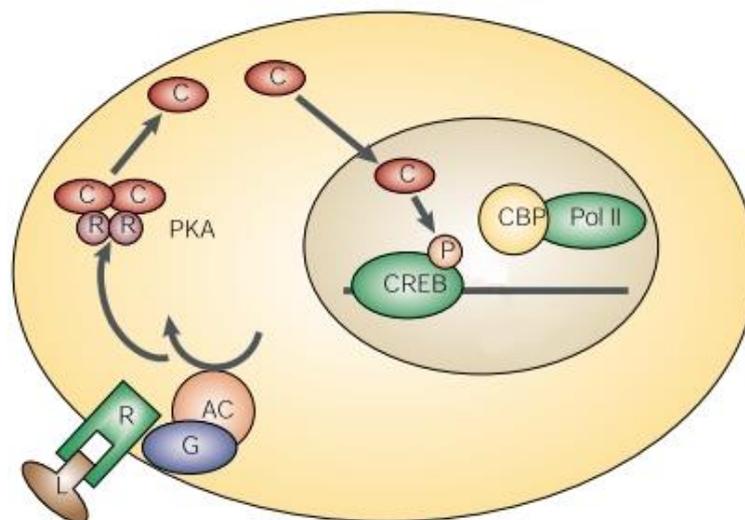


Abbildung 1-10 Die cAMP-CREB-Signalkaskade von der Rezeptoraktivierung bis zur Transkriptionsregulation, verändert nach Mayr und Montminy (2001) (Erläuterung siehe Text) L: Ligand, R: Rezeptor, G: G-Protein, AC: Adenylatcyclase, R: regulatorische Untereinheit, C: katalytische Untereinheit, P: Phosphat, Pol II: DNA-Polymerase II

In Chondrozyten der Wachstumsfuge führt die Bindung von PTHrP an seinen Rezeptor, wie in Kapitel 1.2.1 dargestellt, zur Aktivierung der PKA. In diesem Falle resultiert hieraus die Induktion der Expression von Zfp521 (*zinc finger protein 521*). Dabei fördert Zfp521 die Expression von Cyclin D1 und Bcl-2 (*b-cell lymphoma 2*) und verringert die Expression von Runx2 (*runt-related protein*). Dies führt in Kombination zu einer vermehrten Proliferation und verzögerter Hypertrophie der Chondrozyten. (Correa et al., 2010). Dies passt mit den Beobachtungen zusammen, die man zu den einzelnen Genen gemacht hat. So fördert RUNX2 die Differenzierung der Chondrozyten in den hypertrophen Zustand (Wuelling & Vortkamp, 2011), während Cyclin D1 für Phosphorylierung, Ubiquitylierung und schließlich proteasomalen Abbau von Runx2 verantwortlich ist (Zhang et al., 2009). Auch Bcl-2 besitzt einen, die Chondrozytenreifeung verlangsamen Effekt (Amling et al., 1997).

Es sind verschiedene Krankheitsbilder beschrieben, die durch Keimbahnmutationen im *PRKAR1A*-Gen verursacht werden: Akrodysostose mit Hormonresistenz (MIM 101800) und der Carney-Komplex Typ I (MIM 160980). Außerdem sind Fälle von somatischen Mutationen bei Schilddrüsenkarzinomen verzeichnet, in denen ein Fusionsgen aus *RET* und *PRKAR1A* als krankheitsverursachend gesehen wurde (Bongarzone et al., 1994).

Carney-Komplex Typ I zeichnet sich durch die Kombination von Pigmentveränderungen der Haut und Schleimhäute aus sowie kardialen, endokrinen, kutanen und neuronalen myxomatösen Tumoren. Hier wurden zuerst Frameshift- oder Nonsense-Mutationen beschrieben, die zu einem Abbau der mRNA durch *nonsense-mediated decay* (NMD) und somit einem Verlust im Sinne einer Haploinsuffizienz der R1 α -Untereinheit führten. Die nun verminderte Regulation der PKA durch die R1 α -Untereinheit führt zu einer gesteigerten PKA-Aktivität (Kirschner et al., 2000), (Casey et al., 2000). Anschließend fanden sich weitere Mutationen, deren mRNA nicht durch NMD abgebaut wurde, und die dennoch, vermutlich durch reduzierte Bindung der mutierten PRKAR1A an cAMP und/oder an die katalytische Untereinheit, zu einer erhöhten PKA-Aktivität führten (Greene et al., 2008).

Die einzige bislang in der Literatur verzeichnete Mutation in *PRKAR1A* bei Patienten mit Akrodysostose liegt in der NBD-B und führt an Position 368 zu einem verfrühten Stop-Codon und einem um 13 Aminosäuren verkürzten Protein. Es resultiert ein

vermindertes Ansprechen der PKA auf cAMP und somit eine verminderte Aktivität (Linglart et al., 2011). Durch die Verminderung der PKA-abhängigen Antwort auf die hypophysären „Releasinghormone“ erklärt sich die Hormonresistenz. Die skelettalen Auffälligkeiten ergeben sich durch die Auswirkung der verminderten PKA-Aktivität auf die oben genannten Signalwege.

Interessanterweise resultieren Funktionsverlust-Mutationen im maternalen Allel des *GNAS*-Gens, welches für die Initiierung der cAMP-Generierung notwendig ist, in einer verminderten cAMP-Bereitstellung und führen zu einem der Akrodysostose ähnlichen klinischen Bild, dem Pseudohypoparathyreoidismus Typ Ia, der mit Parathormon-Resistenz sowie klinischen Auffälligkeiten wie Kleinwuchs und Brachydaktylie einhergeht (Bastepe & Juppner, 2005). Im Gegensatz dazu haben im Mosaik vorliegende Mutationen im *GNAS*-Gen, die zu einer Verstärkung des Signalwegs führen, das Mc-Cune-Albright-Syndrom zur Folge, welches in bestimmten Manifestationen wiederum dem Carney-Komplex Typ I ähnelt (Weinstein et al., 1991).

2 Zielsetzung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Suche nach Sequenzveränderungen der kodierenden Bereiche im *PRKAR1A*-Gen bei Patienten mit Akrodysostose sowie einem Patientenkollektiv von Patienten mit Brachydaktylie Typ E. Mutationen dieses Gens wurden als verantwortlich für eine Akrodysostose mit Hormonresistenz beschrieben, allerdings wurde bisher nur eine einzige Mutation bei drei nicht verwandten Patienten (Linglart et al., 2011) identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es, das Ergebnis der Arbeit von Linglart et al. bei einer größeren Gruppe von Patienten mit Akrodysostose zu bestätigen und gegebenenfalls andere *PRKAR1A*-Mutationen bei Betroffenen nachzuweisen. Im Anschluss sollte überprüft werden, inwieweit sich die klinischen, radiologischen und laborchemischen Auffälligkeiten bei Patienten mit gleichartiger Mutation ähneln und welche Unterschiede im Phänotyp bei andersartigen Mutationen im *PRKAR1A*-Gen bestehen.

Da Mutationen im *PTHLH*-Gen ein Grund für eine Form der Brachydaktylie Typ E (BDE) sein können, aber nicht in allen Patienten mit BDE eine solche Mutation nachgewiesen werden kann, sollte eine Kohorte von Patienten mit BDE hinsichtlich Sequenzveränderungen im *PRKAR1A*-Gen analysiert werden, da das Genprodukt als Untereinheit der PKA im *PTHLH*-Signalweg eine wichtige Rolle einnimmt.

Abschließend sollte beurteilt werden, welchen Stellenwert die Sequenzanalyse des *PRKAR1A*-Gens bei diesen beiden Krankheitsbildern besitzt.

3 Materialien und Lösungen

3.1 Patienten

Der größere Teil der Patienten, deren DNA in dieser Arbeit analysiert wurde, waren keine Patienten der Charité, mehrere stammten aus verschiedenen Ländern und wurden dort bereits vor längerer Zeit vorgestellt. So ließ sich in einigen Fällen kein Kontakt zu den ehemals behandelnden Ärzten herstellen, zum Teil konnten diese keinen Patientenkontakt erreichen bzw. die Patienten standen nicht für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Dies führte bedauerlicherweise zu teilweise unvollständigen Informationen bezüglich des klinischen Phänotyps und der Laborparameter.

3.2 Reagenzien und Geräte

Reagenz	Hersteller
“Distilled water” (DNAse/RNAse free)	Invitrogen, Karlsruhe
PCR	
10X PCR Buffer	Applied Biosystems, Warrington, GB
Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Warrington, GB
Dimethylsulfoxid (DMSO) reinst	Merck, Darmstadt
dNTP Set (100 mM)	GE Healthcare, Freiburg
Q-Solution	Qiagen, Hilden
Agarose-Gel	
1 kb plus Marker	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Roth, Karlsruhe
Sequenzierung	

Agencourt® CleanSeq® Kit	Beckman Coulter, Krefeld
BigDye Terminator v1.1/v3.1	
Sequenzierpuffer (5-fach)	Applied Biosystems, Warrington GB
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Warrington GB
Ethanol 85%	J.T. Baker, Griesheim
	NEB - New England Biolabs, Frankfurt am Main
Exonuklease I (20000 U/mL)	
“Shrimp alkaline phosphatase” (SAP, 1 U/μL)	Roche, Mannheim
„Water“	J.T. Baker, Griesheim

Gerät**Hersteller**

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

3.3 Lösungen

Lösungen zur DNA-Extraktion

Lösung A

Saccharose	109,5 g
1 M MgCl	2 - 5 mL
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 mL
Triton X 100	10 mL
destilliertes H ₂ O	ad 1000 mL
→ autoklavieren	

Lösung B

0,5 M Na-EDTA	12 mL
1 M NaCl	15 mL
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	40 mL
destilliertes H ₂ O	ad 95 mL
→ autoklavieren	
20% SDS (Sodiumdodecylsulfat)	5 mL

Lösung C

Natriumperchlorat	100 g
destilliertes H ₂ O	ad 142 mL

1x TE-Puffer

1 M Tris-HCl (pH 7,5)	5 mL
0,5 M EDTA	1 mL
destilliertes H ₂ O	ad 500 mL
→ autoklavieren	

Lösungen für Agarosegele

50x TAE-Puffer

Tris-HCl	242 g
C ₂ H ₄ O ₂	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 mL
destilliertes H ₂ O	ad 1000 mL

DNA-

Gelladepuffer

Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
destilliertes H ₂ O	ad 10 mL

DNA-Marker

100 bp Marker/	
1 kb plus Marker	10 µL
5x Gelladepuffer	20 µL
destilliertes H ₂ O	ad 100 µL

3.4 Software und Datenbanken

Es wurde mit der Version 18 und 19 des Humangenomprojekts (HF 18 und HG19) sowie dem Ensembl-Release 64 bzw. 65 (ab Dezember 2011) gearbeitet.

Tool	URL
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
Primer3 Input (v. 0.4.0)	http://frodo.wi.mit.edu/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
ECR Browser: Evolutionary Conservation of Genomes	http://ecrbrowser.dcode.org/
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Software	Hersteller
SeqMan TM II	DNASTAR, Madison, USA
Biomek Software	Beckman Coulter, Krefeld

3.5 Primer-Design

Als gewünschtes PCR-Produkt wurde das Transkript mit der Ensembl ID ENST00000358598 gewählt. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe von Primer3 (v. 0.4.0) über die aus Ensembl eingelesene DNA-Sequenz ermittelt. Als Bedingungen bestanden, dass die Primerlänge zwischen 18 und 24 nt liegen müsse, die Primer-Bindetemperatur wurde auf 58 °C bis 62 °C festgesetzt und die maximale Anzahl an sich hintereinander wiederholenden gleichartigen Basen betrug 3, ansonsten wurden

die Voreinstellungen übernommen. Mögliche Primersequenzen wurden mittels der BLASTN Funktion von Ensembl auf ihre Spezifität am gewünschten Locus überprüft. Die so erhaltenen Primer wurden bei MWG Biotech GmbH (München) bestellt und sind nachfolgend aufgelistet (**Tabelle 3.1**).

Tabelle 3.1 Primersequenzen und Positionen

	Sequenz (5' → 3')	Position (hg18, chr17)	Produktgröße
Ex2f	aaatccctgtgaatcagttgct	64023027-64023048	527
Ex2r	tggaaccctttattagccaag	64023532-64023553	
Ex3f	gaacatgagagtgccagcttt	64030427-64030447	366
Ex3r	ccaagaattgtacaggatgg	64030772-64030792	
Ex4f	tatttaggcctggctgtaggc	64031246-64031266	468
Ex4r	tctctccgtgaatttcaaaca	64031692-64031713	
Ex5f	taagggtgtgatcccaaattgt	64031589-64031610	415
Ex5r	ccaatacaaagtggttctgccatc	64031980-64032003	
Ex6f	ccctgaaagattgtgtagttgt	64032515-64032538	244
Ex6r	gctcggagcgatcaataca	64032739 -64032758	
Ex7f	tcgtcagaaatcacctattctctc	64033324-64033348	497
Ex7r	agctgggcttaatgcaaagt	64033801-64033820	
Ex8f	ttcatagcattatgtggtgataa	64035509-64035532	199
Ex8r	tccaagtcacccaattct	64035688-64035707	
Ex9f	ggcatggctatttggtgaa	64036510-64036529	318
Ex9r	ttagcccactcttccctctt	64036807-64036827	
Ex10f	tgtgcacccttaagcacct	64037439-64037458	565
Ex10r	gcaaagatgggtaacaggctaa	64037982-64038003	
Ex11f	gtgcactgcttaaggaaatgtt	64037948-64037970	357
Ex11r	CAGACAGGAAGCTGCGATG	64038284-64038304	

4 Methoden

4.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Zur Gewinnung genomischer DNA wurde 1 mL EDTA-Blut in ein 15 mL Röhrchen vorgelegt und anschließend zur Lyse der Erythrozyten mit 6 mL Lösung A versetzt. Nach vierminütiger Einwirkzeit mit regelmäßigem „Vortexen“ wurde das Gefäß fünf Minuten bei 1300 rcf zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das entstandene Pellet zur Zelllyse in 600 µL Lösung B resuspendiert. Die Deproteinisation

erfolgte durch die Zugabe von 125 μL Lösung C und vorsichtigem Mischen. Zur DNA-Extraktion wurden nachfolgend 700 μL Chloroform hinzu pipettiert und die Lösung 6 Minuten bei 1300 rcf zentrifugiert. Von den entstandenen drei Phasen wurde die oberste, welche die gelöste DNA enthält, unter Vermeidung der Interphase (Proteine) mittels Transferpipette in ein neues 1,5 mL Gefäß überführt. Durch Hinzufügen von 510 μL Isopropanol und anschließendem Invertieren wurde die DNA gefällt. Nach fünfminütigem Zentrifugieren (13000 rpm) wurde das Isopropanol entfernt und das entstandene Pellet mit 500 μL 70%-igem Ethanol bei zehnminütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4°C) gewaschen. Nach Trocknung des Pellets wurde dieses in TE-Puffer, pH 8,0 bei 37°C über Nacht resuspendiert. Zur ersten Einordnung der Konzentration und zum Ausschluss der DNA-Degradierung wurde eine Elektrophorese mit 0,8%-igem Agarosegel (siehe 4.3) durchgeführt. Vor der weiteren Verwendung erfolgte eine genaue Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm.

4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: polymerase chain reaction) dient zur in vitro Vervielfältigung (Amplifikation) genomischer DNA-Abschnitte. Durch zwei Oligonukleotide (Primer), die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren, wird das Endprodukt festgelegt. Zusätzlich verwendet man Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), eine hitzestabile DNA-Polymerase (z.B. die aus *Thermus aquaticus* gewonnene Taq-Polymerase), die die für die DNA-Denaturierung notwendigen Temperaturen übersteht, Mg^{2+} -Ionen, welche die DNA-Polymerase für ihre Aktivität benötigt und eine Pufferlösung um ein für die Polymerase geeignetes alkalisches Milieu zu schaffen.

Die PCR verläuft in 3 Schritten: Thermische Auftrennung des DNA-Doppelstranges in zwei DNA-Einzelstränge (Denaturierung), die Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA („Annealing“) und die Synthese des Produkts (Elongation). Diese Schritte werden vielfach wiederholt und führen theoretisch pro Zyklus stets zu einer Verdoppelung der Anzahl der definierten DNA-Abschnitte.

Ein PCR-Ansatz bestand aus 20 μL Gesamtvolumen und setzte sich aus 2,0 μL 10x Puffer, 0,2 μL eines dNTP-Mixes in dem jedes dNTP in einer Konzentration von 20 mM vorlag, 0,2 μL Ampli-Taq Polymerase [5U/ μL], jeweils 0,5 μL beider Primer [10 pmol/ μL] sowie 1 μL Template-DNA [30 – 60 ng/ μL] zusammen. Der Ansatz für Exon 6 enthielt, bei ursprünglich schwachem Produkt, zudem noch 2 μL DMSO. Die Differenz zu 20 μL wurde mit H_2O aufgefüllt. Um DNA-Verunreinigungen der einzelnen Komponenten auszuschließen, wurde stets eine Leerprobe ohne Template-DNA mit angefertigt.

Es wurde eine Mehrschritt-PCR im Thermocycler durchgeführt. Die Schritte Denaturierung (94°C) und Elongation (72°C) wurden bei der Amplifikation von *PRKAR1A* stets bei genannten Temperaturen durchgeführt. Der „Annealing“-Schritt wurde im Verlauf von 61°C auf 55°C gesenkt (**Tabelle 4.1**).

Tabelle 4.1 Cycling-Protokoll Mehrschritt PCR

Cycling-Protokoll Mehrschritt-PCR		
94 °C	4 min	
94 °C	30 sek	3 Zyklen
61 °C	45 sek	
72 °C	60 sek	
94 °C	30 sek	3 Zyklen
59 °C	45 sek	
72 °C	60 sek	
94 °C	30 sek	3 Zyklen
57 °C	45 sek	
72 °C	60 sek	
94 °C	30 sek	31 Zyklen
55 °C	45 sek	
72 °C	60 sek	
72 °C	10 min	

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte sowie der extrahierten DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Für DNA wurde ein 0,8%-iges (m/V), für PCR-Produkte ein 1,5%-iges Gel verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Kochen gelöst und anschließend mit Ethidiumbromid [10 mg/mL] versetzt. In der Elektrophorese liefen 0,8%-ige Gele bei 80 V, 1,5%-ige bei 100 V für jeweils 25 Minuten.

4.4 Enzymatische Reinigung

Der nächste Schritt bestand in der enzymatischen Aufreinigung des PCR-Produktes, dabei entfernt eine Exonuklease überzählige Primer und andere einzelsträngige DNA, während die „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) die verbleibenden dNTPs abbaut. Ein Ansatz bestand aus 1,62 μL H_2O , 0,3 μL SAP [1U/ μL], 0,08 μL Exonuklease I [10 U/ μL] und 8 μL des PCR-Produktes. Die Inkubation erfolgte im Thermocycler für 15 Minuten bei 37 °C, die Inaktivierung bei 72 °C für 15 Minuten.

4.5 Sequenzierung

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte mit 1,0 – 4,0 μL des gereinigten PCR-Produktes. Jeder Ansatz enthielt zudem 0,5 μL BigDye Terminator v3.1, 0,75 μL BigDye Terminator v1.1/3.1 Puffer (5X), 0,5 μL des jeweiligen forward- oder reverse-Primers und wurde mit H_2O auf 5 μL aufgefüllt. Die Ansätze mit 4,0 μL PCR-Produkt enthielten die doppelte Menge der oben genannten Reagenzien, anschließend wurde hier mit H_2O auf 10 μL aufgefüllt. Danach erfolgte im Thermocycler eine einminütige Denaturierungsphase bei 96 °C, dann 25 Zyklen mit Denaturierung (96 °C, 30 Sekunden), Annealing (50 °C, 30 Sekunden) und Elongation (60 °C, 4 Minuten).

4.6 Aufreinigung der Sequenzreaktion

Die Produkte der Sequenz-PCR (SPCR) wurden anschließend in der Biomek ® Laboratory Automation Workstation mittels 7 μL Agencourt ® CleanSEQ ® und 85%-igem Ethanol aufgereinigt und schließlich in H_2O eluiert. Hierbei bindet das SPCR-

Produkt an magnetische „Beads“, die nachfolgend mit Hilfe eines Magnetfelds an den Rand des Gefäßes geheftet werden. Die nicht magnetisch gebundenen Verunreinigungen werden nun in mehreren Waschsritten mit Ethanol entfernt, abschließend wird das SPCR-Produkt wieder von den „Beads“ gelöst.

Die Analyse der Sequenzen erfolgte im 3730 DNA-Analyzer und wurde mittels der Software SeqMan TM II ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung der PCR Bedingungen

Zur Etablierung der Standardbedingungen für jedes Primerpaar wurde zunächst eine PCR sämtlicher Exons mit dem in Kapitel 4.2 beschriebenen Standardansatz und „Cycling“-Protokoll durchgeführt. Nachfolgend wurde durch Agarose-Gelelektrophorese geprüft, für welche Exons eine ausreichende Menge an reinem Produkt entstanden war. An Hand der mitgeführten „1kb plus ladder“ konnte die Produktgröße ermittelt werden (Fragmentgrößenvergleich) (**Abbildung 5-1**) und wurde mit der erwarteten Größe verglichen. Für Exon 6 wurden anschließend Ansätze mit 2 μ L DMSO oder 4 μ L Q-Solution angefertigt und erneut amplifiziert. Der mit DMSO versetzte Ansatz zeigte die kräftigste Bande, so dass in den folgenden Reaktionen dieses Schema beibehalten wurde.

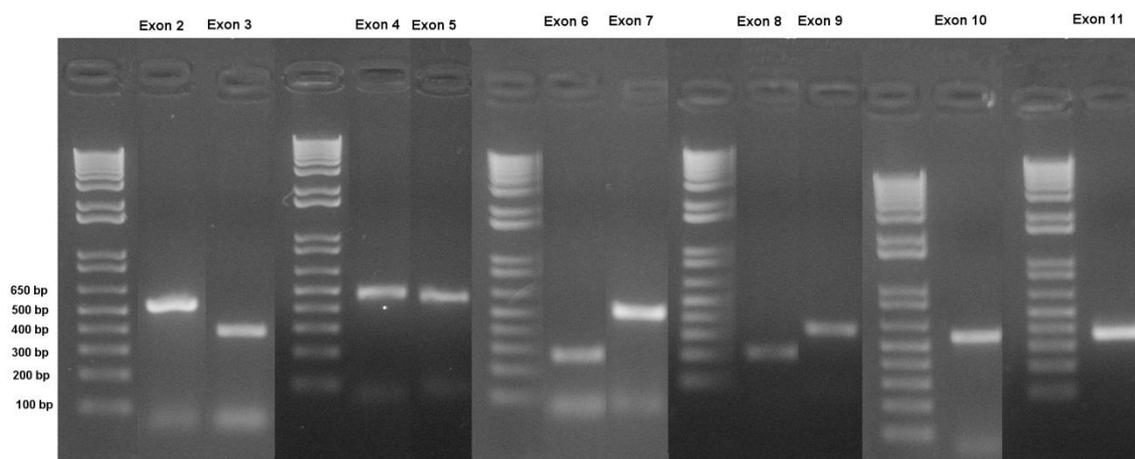


Abbildung 5-1 Zusammenstellung der einzelnen Exons nach Agarose-Gelelektrophorese. Die Größe der PCR-Produkte lässt sich an der jeweils links stehenden „Ladder“ entnehmen.

5.2 Übersicht der Ergebnisse der Sequenzanalyse

Als Konsequenz einer Deletion, Insertion oder Austausch einzelner Basenpaare kann es zu einer veränderten Aminosäuresequenz und einer eventuell gestörten Proteinfunktion kommen. In dieser Arbeit wurden zur Identifikation dieser

Veränderungen die Exons 2-11 einschließlich flankierender Intronbereiche des Gens *PRKAR1A* sequenziert und anschließend analysiert.

Bei 5 von 8 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose ließen sich Punktmutationen einzelner Basenpaare nachweisen. Bei Pat. 6 fand sich die bereits von Linglart et. al (2011) beschriebene Nonsense-Mutation c.1102C>T (R368X), die restlichen 4 Mutationen waren sämtlich Missense-Mutationen in den kodierenden Bereichen von *PRKAR1A* (**Tabelle 5.1**).

Zusätzlich konnte bei einer der Patienten aus einem Kollektiv von 48 Patienten mit BDE ebenfalls eine Variante im kodierenden Bereich von *PRKAR1A* nachgewiesen werden (**Tabelle 5.1**).

Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Mutationen

Patient	Verdachtsdiagnose	Mutation	<i>De novo</i> Nachweis	Lokalisation
Pat. 1	BDE	c.679G>A (p.Asp227Asn)	Keine DNA der Eltern	NBD-A
Pat. 2	Akrodysostose	c.637G>A (p.Ala213Thr)	+	PBC der NBD-A
Pat. 3	Akrodysostose	c.1118A>G (p.Tyr373Cys)	+	NBD-B
Pat. 4	Akrodysostose	c.866G>A (p.Gly289Glu)	+	NBD-B
Pat. 5	Akrodysostose	-	n.a.	n.a.
Pat. 6	Akrodysostose	c.1102C>T (p.Arg369Stop)	+	NBD-B
Pat. 7	Akrodysostose	-	n.a.	n.a.
Pat. 8	Akrodysostose	-	n.a.	n.a.
Pat. 9	Akrodysostose	c.1003C>T (p.Arg335Cys)	Keine DNA der Eltern	PBC der NBD-B

n.a.; nicht anwendbar

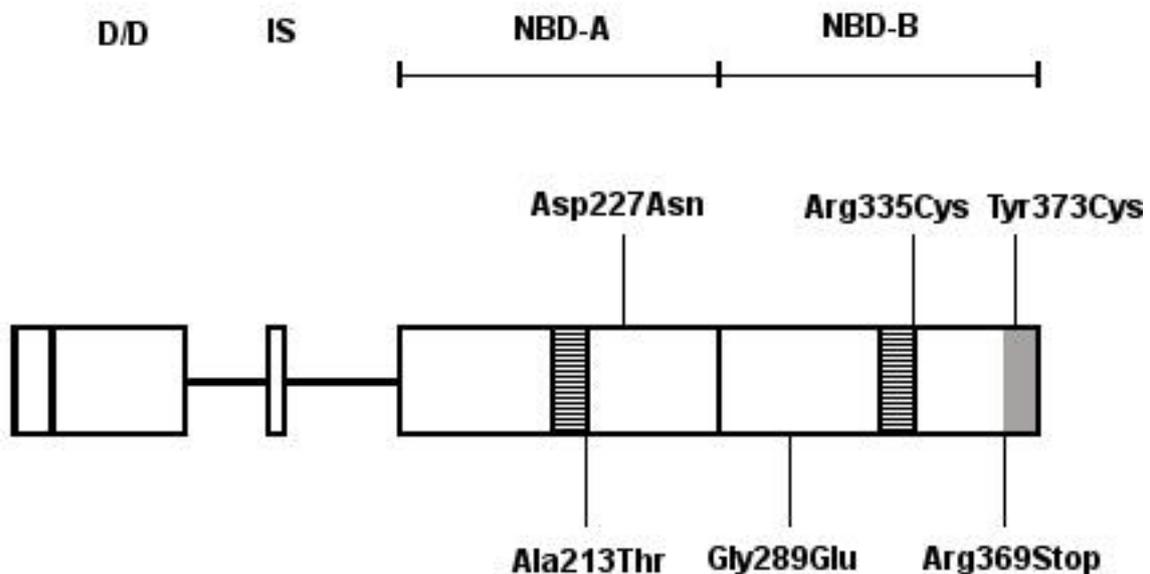


Abbildung 5-2 Übersicht der Lage der gefundenen Mutationen im Protein. Die schraffierten Bereiche stellen die PBC dar, der grau unterlegte Bereich entspricht dem durch die Mutation p.Arg369Stop deletierten Abschnitt.

5.3 In silico Analyse hinsichtlich der Pathogenität der Mutationen

Die detektierten Mutationen wurden zur Einschätzung ihrer Pathogenität mittels der Datenbanken PolyPhen und MutationTaster geprüft. Diese Datenbanken errechnen die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität einer Missense-Mutation unter Einbeziehung der Lage des Basen- bzw. Aminosäureaustausches, dem Konservierungsgrad sowie der Umgebung der Mutation.

Im MutationTaster fand sich für alle Mutationen eine 99,99%-ige Wahrscheinlichkeit, krankheitsverursachend zu sein. Diese Einstufung wurde auf Grund möglicher Proteinveränderungen und eventueller „Splice Site“-Veränderungen getroffen.

In der Untersuchung mit PolyPhen fand sich für 5 Mutationen die Einschätzung „probably damaging“, während die Veränderung p.Asp227Asn als benigne Variante eingeschätzt wurde.

5.4 Analyse des Konservierungsgrades der Mutationen

Es wurde mittels des „ECR Genome Browsers“ der Konservierungsgrad der mutierten Basen über 10 Spezies bzw. im Falle der Mutation p.Arg369Stop die Konservierung des deletierten Bereichs, ermittelt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 5-3** dargestellt.

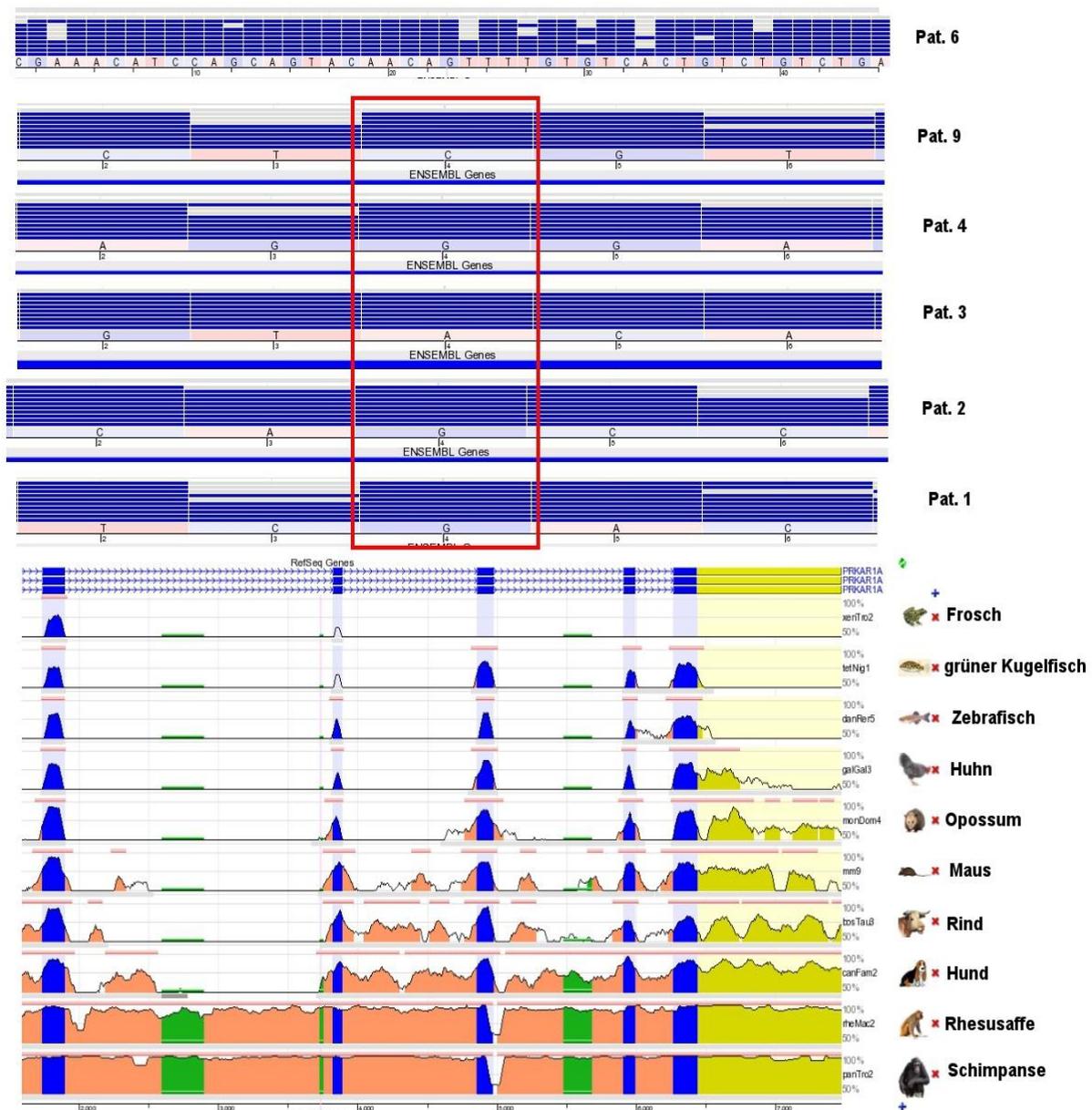


Abbildung 5-3 Darstellung des Konservierungsgrades der einzelnen mutierten Basen. Kodierende Bereiche erscheinen blau. Die betroffenen Nukleotide sind rot umrandet dargestellt. Jeder blaue Streifen entspricht der Konservierung in der jeweiligen rechts der Grafik aufgelisteten Spezies. So sind die ursprünglichen Basen der Mutationen c.637G>A (Pat. 2) und c.679G>A (Pat. 1) über diese 10 Spezies konserviert, während die restlichen über 9 Spezies konserviert sind, nur beim Frosch fehlen die Exons 8 - 11. Auch für den bei Patientin 6 durch die Nonsense-Mutation betroffenen Abschnitt zeigt sich ein hoher Konservierungsgrad. Die geringer konservierten Basen dieses Abschnitts liegen an dritter Stelle des jeweiligen Basentriplets und verändern somit in der Regel nicht die Aminosäure, für welche das jeweilige Triplet kodiert.

5.5 Klinische und laborchemische Patientendaten

Das folgende Kapitel beinhaltet Auswertung der klinischen Untersuchungsbefunde, Röntgenaufnahmen und Laborparameter für jeden Patienten bei dem eine Mutation im *PRKAR1A*-Gen nachgewiesen werden konnte oder bei dem der Verdacht auf Akrodysostose bestand. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse kann **Tabelle 5-2** entnommen werden.

Patientin 1

Diese Patientin war zum Zeitpunkt der Vorstellung 44 Jahre alt. Ihre Körpergröße lag mit 150 cm unterhalb der 3. Perzentile (-2,7 SD). Somit liegt ein Kleinwuchs vor. In der Röntgenaufnahme zeigte sich eine Brachydaktylie Typ E mit Verkürzung der Metacarpalia IV beider Hände (**Abbildung 5-4**).



Abbildung 5-4 Handröntgenaufnahme der 44-jährigen Patientin 1. Eine Verkürzung des Os Metacarpale IV rechts und links ist deutlich erkennbar. Zusätzlich besteht ein kurzes Endglied I.

In der laborchemischen Untersuchung ergaben sich Normwerte für PTH (58 ng/L, Norm: 12 - 72 ng/L) und ein im Grenzbereich liegendes TSH (2,896 mIU/L, Norm: 0,4 – 2,5 mU/L, Grenzbereich 2,5 – 4,0 mU/L), bei normwertigen freiem Thyroxin (1,18 ng/dL, Norm: 0,6 – 1,8 ng/dL). Zur psychomotorischen Entwicklung lagen keine Angaben vor.

Die Sequenzanalyse des *PRKAR1A*-Gens erbrachte die Variante c.679G>A (**Abbildung 5-5**), die einen Aminosäureaustausch an Position 227 von Asparaginsäure zu Asparagin (p.Asp227Asn) bewirkt.

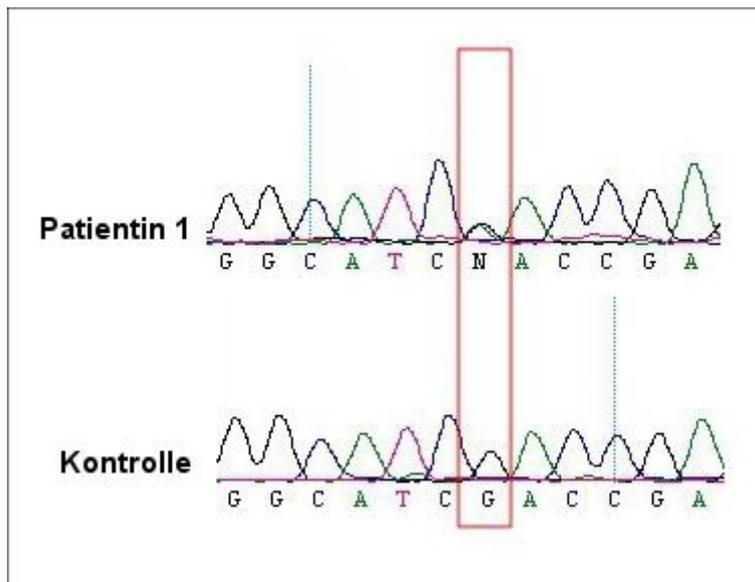


Abbildung 5-5 Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Patientin 1. Rot umrandet ist die Sequenzveränderung bei Patientin 1.

Patientin 2

Die zum Zeitpunkt der Untersuchung 15-jährige Patientin wurde mit Kleinwuchs, skelettalen Auffälligkeiten und Lernschwäche vorgestellt. Entsprechend der ärztlichen Unterlagen betrug die Körpergröße 143 cm (< 3. Perzentile; -3,3 SD), Gewicht und Kopfumfang lagen im Normbereich. Bei der Patientin liegt eine kombinierte Entwicklungsverzögerung mit einer leichten Intelligenzminderung vor. Es bestanden folgende Auffälligkeiten: eine etwas breite Nase (insbesondere Nasenspitze), kräftiges Haupthaar, ein etwas gedrungener Hals, ein Café au lait-Fleck am Rücken. An den Extremitäten zeigte sich eine Brachydaktylie der Hände und Füße (bei Schuhgröße 31). Die Verkürzungen an den Händen erschienen ungleich, besonders kurz waren die Daumen, ebenso verkürzt ist Finger II und an der linken Hand auch Finger III.

Die Röntgenaufnahme der linken Hand dorso-volar zeigt eine erhebliche Verkürzung sämtlicher Metacarpalia, die distalen Enden sind verbreitert und kolbig aufgetrieben. An den Basen der Grundphalangen II, III und V sowie der Mittelphalangen II – V lassen sich ehemalige Zapfenepiphysen erkennen. Die Mittelphalangen und Endphalangen sind verkürzt. Es ist ein akzeleriertes Knochenalter zu erkennen (**Abbildung 5-6**). Die Aufnahme des rechten Fußes ergab einen Befund mit gleichartigen Veränderungen (**Abbildung 5-7**). Neben einer S-förmigen Skoliose im Bereich der LWS fielen hier zudem verkürzte Interpedikularabstände auf, die ebenfalls in Zusammenhang mit Akrodysostose beschrieben sind (Graham, Krakow, Tolo, Smith, & Lachman, 2001).

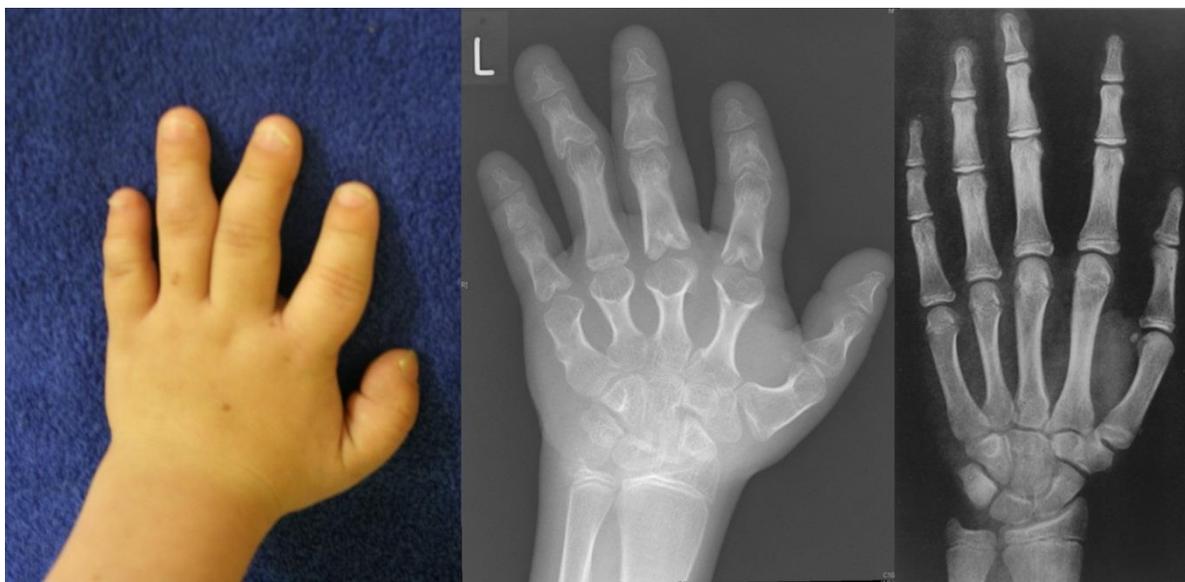


Abbildung 5-6 Links befindet sich die linke Hand der Patientin 2, im Alter von 13,5 Jahren als Foto, mittig als Röntgenaufnahme, rechts sieht man den Normalbefund einer Hand eines 13,5-jährigen Mädchens. Auffallend bei der Patientin ist die Verkürzung aller Metacarpalia mit den aufgetriebenen distalen und proximalen Enden sowie die zapfenartigen Einziehungen der Grundphalangen II, III und V sowie der Mittelphalangen II – V. Nicht mehr sichtbare Epiphysenfugen der Phalangen entsprechen einer Akzeleration des Knochenalters. Die Carpalia, die Radius- und Ulnaepiphyse erscheinen in ihrer Reifung altersgerecht.



Abbildung 5-7 Rechter Fuß der Patientin als Foto und Röntgenaufnahme (13,5 Jahre). Hier stellt sich klinisch eine deutliche Brachydaktylie und radiologisch eine Verkürzung aller Metatarsalia dar, mit kolbenartigen Auftreibungen am distalen und proximalen Ende.

An auffälligen endokrinologischen Befunden bestanden ein erhöhtes TSH (6,21 mU/L, Norm: 0,4 – 2,5 mU/L, Grenzbereich von 2,5 – 4,0 mU/L) bei normalem fT_4 und ein erhöhter PTH-Wert (91 ng/L, Norm: 12 - 72 ng/L). Die Gs_α -Aktivität war normal.

Zum Ausschluss eines Pseudohypoparathyreoidismus Typ Ic und eines Pseudopseudohypoparathyreoidismus wurde zuvor das *GNAS*-Gen mittels Sequenzierung untersucht. Dabei zeigte sich ein unauffälliges Ergebnis.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse des *PRKAR1A*-Gens erbrachte die heterozygote Mutation c.637G>A (p.Ala213Thr) in Exon 7, welche an Position 213 den

Austausch der Aminosäure Alanin durch Threonin bewirkt. Die DNA-Proben der Eltern zeigten an entsprechender Stelle einen Normalbefund.

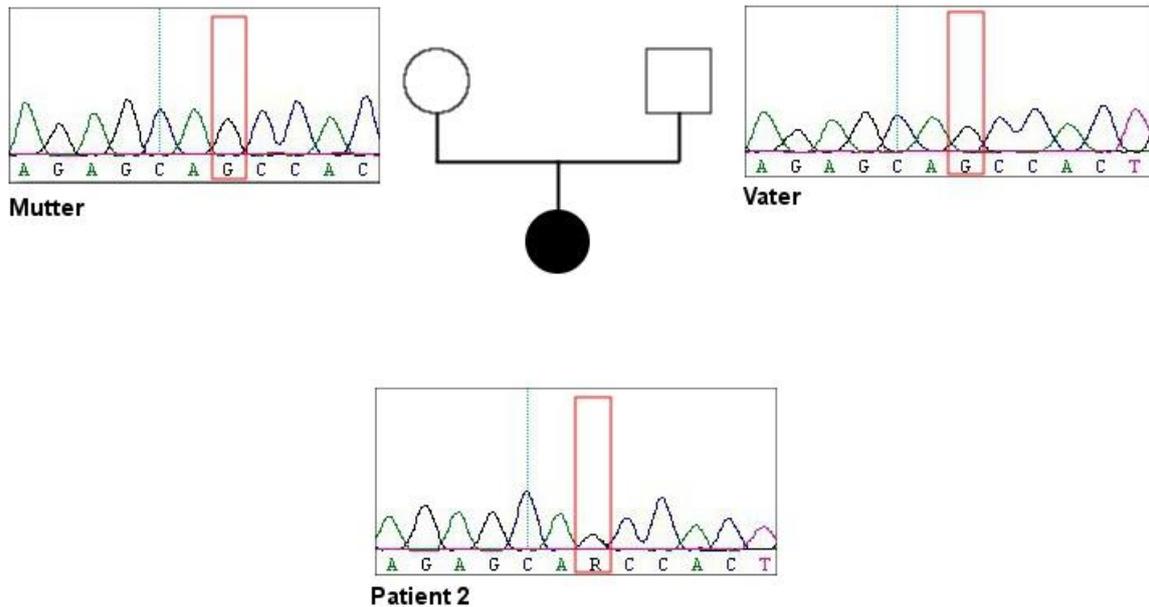


Abbildung 5-8 Stammbaum der Familie von Patientin 2 mit Ausschnitt der Sequenzierung. Rot hervorgehoben ist die bei der Patientin veränderte Base, an selber Position der Eltern findet sich ein Guanin.

Patient 3

Der zum Zeitpunkt der Untersuchung 31-jährige Patient war kleinwüchsig mit einer Körpergröße von 152,5 cm (< 3. Perzentile; -3,3 SD), der Kopfumfang liegt mit 58 cm im Normbereich. Eine Beschreibung von fazialen oder anderen morphologischen Auffälligkeiten war nicht zu erhalten. Es besteht eine Brachydaktylie der Hände und Füße. Auf den Röntgenaufnahmen der Hände ist eine Verkürzung aller Metacarpalia zu sehen, wobei der Indexfinger der rechten Hand am wenigsten stark betroffen erscheint. Die distalen Enden aller Metacarpalia sind kolbig aufgetrieben und es finden sich Zapfenepiphysen an den proximalen Enden der Grundphalangen I, II, IV und V links und rechts (**Abbildung 5-9**). Auch die übrigen phalangealen Knochen sind verkürzt.



Abbildung 5-9 Röntgenaufnahme der Hände von Patient 3 im Alter von 30 Jahren. Es zeigt sich eine Verkürzung aller Metacarpalia, wobei der II. Finger rechts schwächer betroffen ist. An allen distalen und proximalen Enden der Metacarpalia finden sich kolbige Auftreibungen, Zapfenepiphysen werden an den proximalen Enden der Grundphalangen der Finger II – V abgebildet. Weiterhin bestehen kurze phalangeale Knochen, insbesondere Endphalangen.

Die psychomotorische Entwicklung sei unauffällig verlaufen, der Patient sei ein durchschnittlicher Schüler gewesen. An Laborparametern bestand ein erhöhtes PTH (8,8 pmol/L, Norm: 1,5-6,0 pmol/L), FSH (9,1 U/L, Norm: 1 – 8 IU/L (Männer)). Es bestand ein normales TSH (1,49 mIU/L, Norm: 0,4 – 2,5 mIU/L) bei bestehender Thyroxinmedikation von 100 µg/d.

Als Ergebnis der Sequenzanalyse des *PRKAR1A*-Gens zeigte sich hier die heterozygote Mutation c.1118A>G, die in Position 373 und damit am Ende der NBD-B,

den Austausch der Aminosäure Tyrosin zu Cystein bewirkt (Tyr373Cys). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation *de novo* aufgetreten ist.

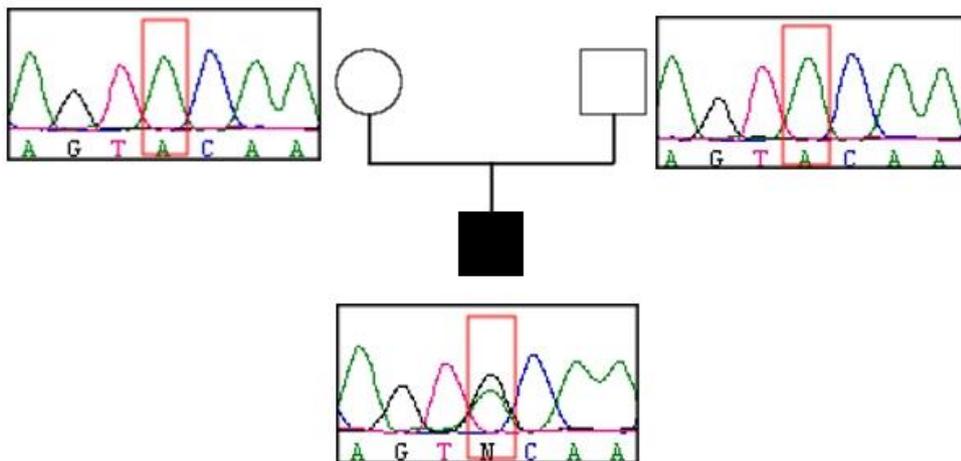


Abbildung 5-10 Stammbaum der Familie von Patient 3 mit Ausschnitt der Sequenzierung. Rot hervorgehoben ist die bei dem Patienten veränderte Base, an selber Position der Eltern findet sich ein Alanin.

Patient 4

Bei Patient 4 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt der Erstvorstellung 9-jährigen Jungen, die Körpergröße lag mit 126 cm zwischen der 3. und 10. Perzentile (-1,6 SD). Klinisch war ein groß wirkender Kopf (Kopfumfang 53,5 cm, 75. – 90. Perzentile) mit großem Hirnschädel, prominenter Stirn, flacher Nasenwurzel, Telekanthus und Hypertelorismus auffällig. Die Hände erschienen klein und plump, ebenso die Füße. Eine Röntgenaufnahme der Hände ergab eine Verkürzung sämtlicher Ossa metacarpalia. Das Knochenalter erschien akzeleriert (**Abbildung 5-11**). In der Labordiagnostik zeigten sich im Verlauf von 5,5 Jahren stets erhöhte Werte für PTH, TSH und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃, erniedrigte Werte bestanden für 25-

Hydroxyvitamin D im Serum und DHEA-S. Die psychomotorische Entwicklung war unauffällig, aktuell besucht der Patient ein Gymnasium.



Abbildung 5-11 Links: Photographische Aufnahme der linken Hand von Patient 4. Rechts: Eine entsprechende Röntgenaufnahme der linken Hand (im Alter von 9 Jahren). Alle Metacarpalia sind verkürzt und zeigen kolbige Auftreibungen an den distalen und proximalen Enden. Auch die phalangealen Knochen sind verkürzt, insbesondere die Endphalangen. Die Epiphysenfugen der Metacarpalia sind nicht mehr sichtbar, dies entspricht einer Akzeleration des Knochenalters, währenddessen das übrige phalangeale und das karpale Knochenalter altersgerecht erscheint.



Abbildung 5-12 Die Füße von Patient 4 erscheinen kurz, insbesondere sind die Zehen II – V verkürzt.

Hier fand sich in der Sequenzierung von PRKAR1A die Mutation c.866G>A (p.Gly289Glu). Diese führt an Position 289 zum Austausch der Aminosäure Glycin zu Glutaminsäure. Bei den Eltern fand sich keine entsprechende Mutation.

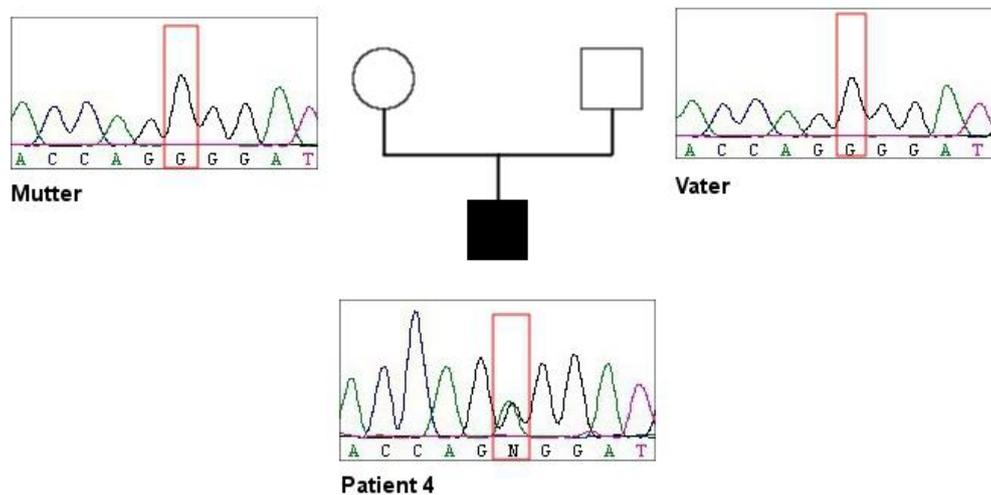


Abbildung 5-13 Stammbaum der Familie von Patient 4 mit dem Ergebnis der Sequenzierung. Rot markiert ist die Sequenzveränderung beim Patienten selbst sowie die entsprechenden erhaltenen Basen bei den Eltern

Patient 5

Zu diesem Patienten waren, über die klinische und radiologische Diagnose Akrodysostose hinaus, keine klinischen Informationen zu erhalten. Die Sequenzanalyse aller kodierenden Bereiche des *PRKAR1A*-Gens zeigte ein unauffälliges Ergebnis.

Patient 6

Aus den klinischen Angaben zur 11,5-jährigen Patientin 6 geht hervor, dass sie eine Körperlänge von 139,3 cm (10. Perzentile, -1,1 SD) hat. Das Gewicht liegt mit 55,5 kg im Bereich der 97. Perzentile, der Kopfumfang mit 56,7 cm über 97. Perzentile. Allerdings ließen sich sowohl beim Vater als auch bei beiden gesunden Schwestern Kopfumfänge oberhalb der 97. Perzentile nachweisen. An fazialen Dysmorphiezeichen zeigten sich eine Mittelgesichtshypoplasie, kleine Nase mit eingezogener Nasenwurzel, kurzes Philtrum, schmales Lippenrot, Zahnfehlstellung, Prognathie und ein kurzer Hals (**Abbildung 5-14**). Die psychomotorische Entwicklung verlief regelrecht, aktuell besucht die Patientin eine reguläre Volks-/Hauptschule.



Abbildung 5-14 Aufnahmen des Gesichts von Patientin 6. Es zeigen sich die im Text beschriebenen Dysmorphiezeichen.



Abbildung 5-15 Fotografische Aufnahme des rechten Fußes von Patientin 6 (11,5 Jahre) im Vergleich zur Röntgenaufnahme. Die Metatarsalia als auch die Phalangen sind verkürzt, insbesondere ist der erste Strahl plump.

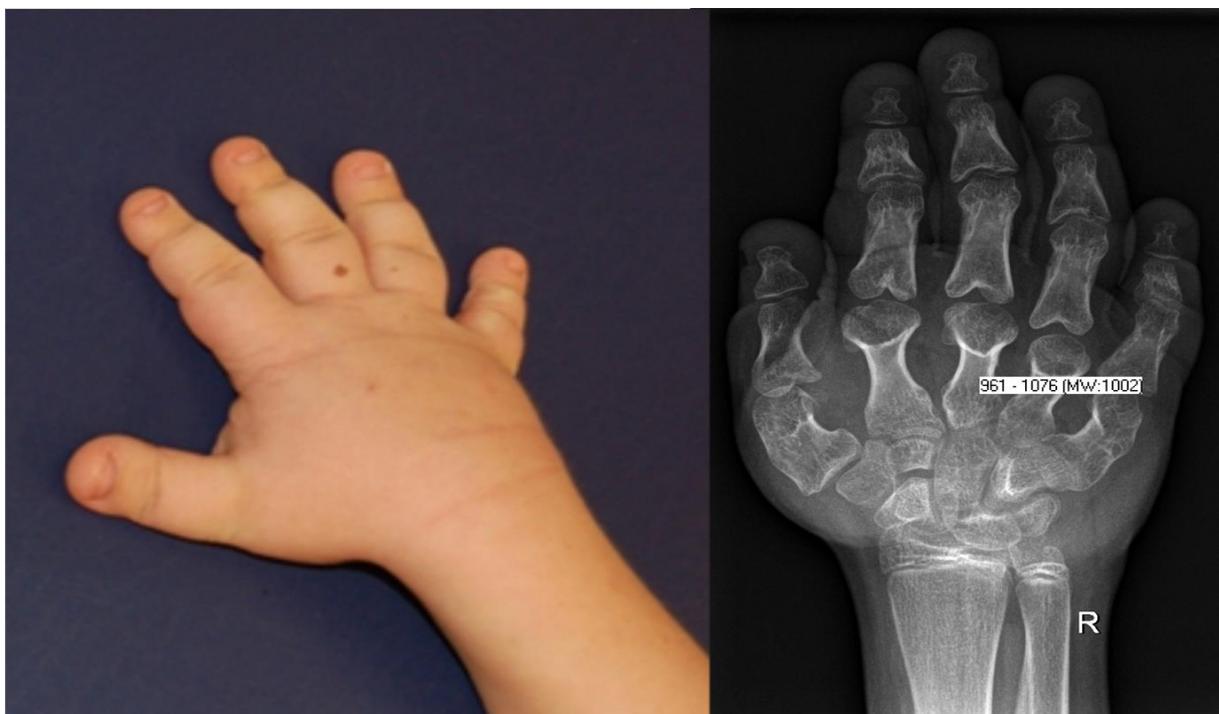


Abbildung 5-16 Klinische Aufnahme und Röntgenaufnahme der rechten Hand von Patientin 6 im Alter von 11,5 Jahren. Sämtliche Metacarpalia sind verkürzt und deren distale und proximale Enden kolbig aufgetrieben. Außerdem erkennt man

Zapfenepiphysen an den proximalen Enden aller Grundphalangen. Alle phalangealen Knochen sind verkürzt. Die Epiphysenfugen der Phalangen und Metacarpalia sind bereits verschlossen, dies entspricht einer Akzeleration der Knochenreifung. Die Reifung der Carpalia, der Radius- und Ulnaepiphyse erscheint altersgerecht.

In der Aufnahme des rechten Fußes lässt sich eine Verkürzung aller Metatarsalia erkennen (**Abbildung 5-15**). Weiter fielen breite Daumen und Großzehen, brüchige Nägel und Oligodontie auf. Das Röntgenbild der rechten Hand zeigte Zapfenepiphysen und eine Verkürzung aller Metacarpalia und der phalangealen Knochen. Außerdem ließ sich ein akzeleriertes Knochenalter erkennen (**Abbildung 5-16**).

An laborchemischen Veränderungen fielen ein erhöhtes TSH (7,41 mIU/L, Norm: 0,4 – 2,5 mU/L, Grenzbereich von 2,5 – 4,0 mU/L) (bei normalem fT4) und HGH (13,45 ng/mL, Norm: 0,30 – 12,10 ng/mL) auf. Der HGH-Wert war bei einer zweiten Messung im Normbereich. In der Sequenzanalyse des *PRKAR1A*-Gens wurde bei Patientin 6 die Mutation c.1102C>T detektiert. Diese führt an Position 369 zu einem verfrühten Stopcodon (p.Arg369Stop) und damit einer „Trunkierung“ des Proteins. Die Eltern zeigten die beschriebene Veränderung nicht.

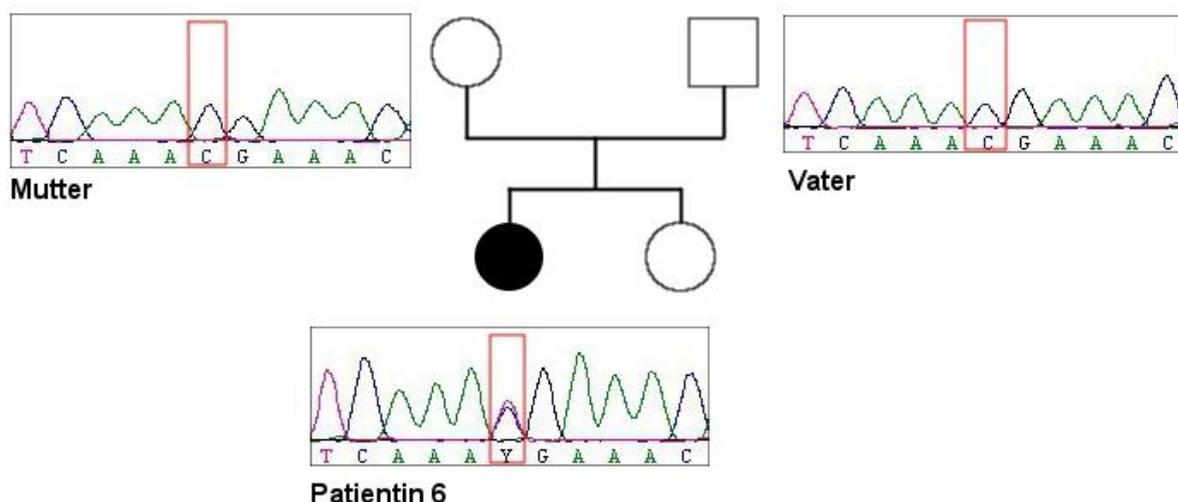


Abbildung 5-17 Stammbaum von Patientin 6 (schwarz ausgefülltes Symbol) mit dem Ergebnis der Sequenzanalyse. Die detektierte Sequenzveränderung ist rot umrahmt, ebenso die entsprechenden Basen der Eltern.

Patient 7

Bei Patientin 7 handelt es sich um ein, zum Zeitpunkt der Vorstellung, 11-jähriges Mädchen mit deutlicher Wachstumsverzögerung. Ihr Wachstum verlief stets unterhalb der 3. Perzentile. Sie war zum Zeitpunkt der Vorstellung 128 cm groß (< 3. Perzentile, -2,3 SD). Es wurden bereits Untersuchungen hinsichtlich eines Turner-Syndroms, eines Noonan-Syndroms und einer Mutation im SHOX-Gen durchgeführt, die sämtlich unauffällig waren. Ebenfalls unauffällig fielen ein Wachstumshormon-Stimulationstest sowie die Werte für Calcitonin und Parathormon aus. Eine Röntgenaufnahme der Hand zeigte kurze Handwurzel- und Fingerknochen bei angedeuteten Zapfenepiphysen. In der klinischen Untersuchung fielen verkürzte Hände und Füße (Schuhgröße 29) auf. Außer einem etwas breiten und flächigen Thorax mit eher eng stehenden Mamillen bestanden keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten.

Diese Befunde legten den Verdacht einer Akrodysostose nahe. In der durchgeführten Sequenzanalyse fand sich allerdings keine Veränderung in den kodierenden Bereichen des *PRKAR1A*-Gens.

Patient 8

Zu diesem Patienten waren über die klinische und radiologische Diagnose Akrodysostose hinaus, keine klinischen Informationen zu erhalten. Die Sequenzanalyse aller kodierenden Bereiche des *PRKAR1A*-Gens zeigte ein unauffälliges Ergebnis.

Patientin 9

Diese 31-jährige Patientin aus Vietnam wurde mit Skelettfehlbildungen und leichter Innenohrschwerhörigkeit vorgestellt. Eine Familienanamnese war nicht zu erheben, da die Patientin als Vollwaise aufwuchs. Bei der körperlichen Untersuchung zeigte sich eine Körperlänge von 135 cm (< 3. Perzentile, -4,3 SD), ein Kopfumfang von 52 cm (< 3. Perzentile, -1,8 SD) und ein Körpergewicht von 38 kg (< 3. Perzentile, -3,6 SD). Äußerlich fielen eine eingesunkene Nasenwurzel, nasale Hypoplasie, ein kurzer Hals sowie ein disproportionierter Kleinwuchs auf.

Zur psychomotorischen Entwicklung wurden keine Angaben gemacht.

In den Röntgenaufnahmen der Hände zeigen sich Zapfenepiphysen und eine Verkürzung aller Metacarpalia mit Ausnahme des II. Metacarpale der rechten Hand.

Auch die Metatarsalia sind, ausgenommen der II. Metatarsalia rechts und links, in entsprechenden Aufnahmen der FüÙe, sämtlich verkürzt. Weiterhin waren kurze Endglieder auffällig (**Abbildung 5-18**).



Abbildung 5-18 Röntgenaufnahme der Hände von Patientin 9 im Erwachsenenalter. Die Metacarpalia beider Hände sind mit Ausnahme des II. Metacarpale der rechten Hand verkürzt. Es zeigen sich Zapfenepiphysen an den Grundphalangen (I., II. und V. Finger links sowie Finger I, II, IV und V rechts). Verkürzt stellen sich ebenfalls die Mittel- und Endphalangen dar.



Abbildung 5-19 Röntgenaufnahme der Füße von Patientin 9. Außer dem II. Metatarsale rechts und links sind alle Metatarsalia verkürzt. Alle Knochen des ersten Strahls sind plump.

Laborwerte für TSH und PTH waren nicht zu erhalten.

Eine Chromosomenanalyse erbrachte bei ihr einen unauffälligen weiblichen Chromosomensatz mit dem Karyotyp 46,XX.

Die klinischen Befunde ließen die Verdachtsdiagnose Akrodysostose zu, die auch schon in Kombination mit Schwerhörigkeit beschrieben wurde (Reiter, 1978).

In der Sequenzierung des *PRKAR1A*-Gens zeigte sich die Mutation c.1003C>T in Exon 11, die einen Aminosäureaustausch an Position 335 Arginin zu Cystein bewirkt (p.Arg335Cys).

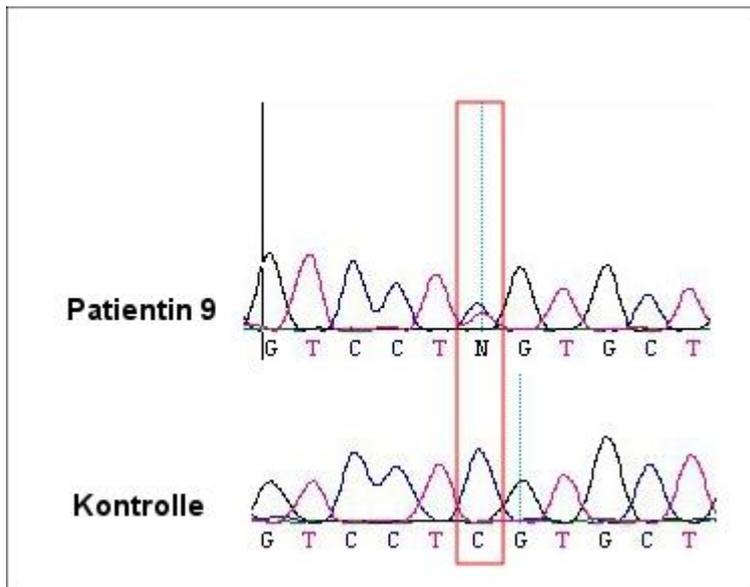


Abbildung 5-20 Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Patientin 9. Rot umrandet ist die Sequenzveränderung bei Patientin 9 im Vergleich zu einer Kontrolle

Tabelle 5.2 Klinische und laborchemische Patientendaten

Patient	Alter	Geschlecht	Körpermaße	Klinische Untersuchungsbefunde	Radiologische Befunde	Laborchemische Befunde	Psychomotorische Entwicklung
Pat. 1	44 Jahre	w	Körperlänge 150 cm (< 3. Perz., -2,7 SD)	Brachydaktylie Typ E	Verkürzung Os metacarpale IV rechts und links, kurzes Endglied I Zapfenepiphysen an den Basen der Grundphalangen II, III und V, sowie der Mittelphalangen II - V. Verkürzung der Mittel- und Endphalangen der Finger, akzeleriertes Knochenalter, S-förmige Skoliose im Bereich der LWS, enge Interpedikularabstände	Normwert für PTH (58 ng/L), TSH im unteren Grenzbereich (2,896 mIU/L)	n. a.
Pat. 2	15 Jahre	w	Körperlänge 143 cm (< 3. Perz., -3,3 SD) Gewicht und Kopfumfang im Normbereich	Brachydaktylie Typ E der Hände und Füße, etwas breite Nase, kräftiges Haupthaar, etwas gedrungener Hals, Café-au-lait-Fleck am Rücken,	Verkürzung aller Metacarpalia, Zapfenepiphysen der Finger II - V, kurze Endphalangen Verkürzung sämtlicher Ossa metacarpalia der Hände und Füße, Verkürzung der phalangealen Knochen (insbesondere Endphalangen), akzeleriertes Knochenalter	erhöhtes TSH (6,21 mIU/L) erhöhtes PTH (91 pg/ml)	kombinierte leichte Entwicklungsverzögerung
Pat. 3	31 Jahre	m	Körperlänge 152,5 cm (< 3. Perz., -3,3 SD) Kopfumfang 58 cm (75. - 90. Perz.)	Brachydaktylie der Hände und Füße, ansonsten keine Angaben	Verkürzung aller Metacarpalia, Zapfenepiphysen der Finger II - V, kurze Endphalangen Verkürzung sämtlicher Ossa metacarpalia der Hände und Füße, Verkürzung der phalangealen Knochen (insbesondere Endphalangen), akzeleriertes Knochenalter	erhöhtes PTH (8,8 pmol/L) und FSH (9,1 IU/L), normwertiges TSH (1,49 mIU/L) unter Thyroxinmedikation	unauffällig
Pat. 4	9 Jahre	m	Körperlänge 126 cm (3. - 10. Perz., -1,26 SD) Kopfumfang 53,5 cm (75. - 90. Perz.)	Kleine plumpe Hände und Füße, großer Hirschkäbel, prominente Stirn, flache Nasenwurzel, Telekanthus, Hypertelorismus	Verkürzung aller Metacarpalia der Hand, Verkürzung aller phalangealen Knochen, Verkürzung aller Metacarpalia und Metatarsalia, akzeleriertes Knochenalter	erhöhte Werte für TSH, PTH und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃ , erniedrigte Werte für 25-Hydroxyvitamin und DHEA-S	unauffällig
Pat. 5	n. a.	n. a.	n. a.	Vererbar mit der klinischen Diagnose Akrodyostose	Vererbar mit der klinischen Diagnose Akrodyostose Zapfenepiphysen an allen Metacarpalia der Hand,	n. a.	n. a.
Pat. 6	11,5 Jahre	w	Körperlänge 139,3 cm (10. Perz., -1,1 SD) Körpergewicht 55,5 kg (97. Perz.) Kopfumfang 56,7 cm (> 97. Perz.)	Brachydaktylie der Hände und Füße, breite Daumen und Großzehen, Mittelgesichtshypoplasie, kleine Nase mit einbezogener Nasenwurzel, kurzes Philtrum, schmales Lippenrot, Zahnfehlstellung, Prognathie, kurzer Hals, brüchige Nägel, Oligodontie	Verkürzung aller phalangealen Knochen, Verkürzung aller Metacarpalia und Metatarsalia, akzeleriertes Knochenalter	erhöhtes TSH (7,41 mIU/L) und HGH (13,45 ng/mL)	unauffällig
Pat. 7	11 Jahre	w	Körperlänge 128 cm (< 3. Perz., -2,3 SD)	verkürzte Hände und Füße, breiter Thorax, eng stehende Mamillen	kurze Handwurzel- und Fingerringen, bei angedeuteten Zapfenepiphysen	Normwerte für Calcitonin und PTH	unauffällig
Pat. 8	n. a.	n. a.	n. a.	Vererbar mit der klinischen Diagnose Akrodyostose	Vererbar mit der klinischen Diagnose Akrodyostose Zapfenepiphysen der I., II. und V. Finger links sowie der Finger I, II, IV und V rechts,	n. a.	n. a.
Pat. 9	31 Jahre	w	Körperlänge 135 cm (< 3. Perz., -4,3 SD) Kopfumfang 52 cm (< 3. Perz.) Körpergewicht 38 kg (< 3. Perz.)	Brachydaktylie der Hände und Füße, Innenohrschwerhörigkeit, eingesunkene Nasenwurzel, nasale Hypoplasie, kurzer Hals, disproportionaler Kleinwuchs	Verkürzung aller Metacarpalia, mit Ausnahme des II. rechts, Verkürzung der Mittel- und Endphalangen	n. a.	n. a.

Ü.B.G.: nicht anwendbar, Normwerte: TSH: 0,3–2,5 mIU/L Grenzbereich TSH 2,5 – 4,0 mIU/L, PTH: 12–72 ng/L oder 1,5–6,0 pmol/L, HGH: 0,30 – 12,10 ng/mL, FSH: 1 – 8 IU/L (Männer)

6 Diskussion

6.1 Beurteilung der Mutationen im Hinblick auf die Proteinfunktion

Insgesamt konnte bei 5 von 8 der Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose eine Mutation im *PRKAR1A*-Gen verifiziert werden. Die gefundenen Mutationen entstanden *de novo*, nur bei Patientin 9 konnte dies nicht überprüft werden, da sie als Waise aufwuchs. Im Patientenkollektiv von Betroffenen mit BDE fand sich lediglich bei einer Patientin eine Variante im *PRKAR1A*-Gen. Leider stand hier keine DNA der Eltern zur Verfügung, um die *de novo*-Entstehung der Mutation zu überprüfen. Im Folgenden sollen die Mutationen hinsichtlich ihrer Pathogenität analysiert werden.

Patientin 1

Die Variante p.Asp227Asn befindet sich im Protein innerhalb der NBD-B direkt vor dem Beginn der B/C-Helix, welche eine der Bindungsstellen an die C-Untereinheit darstellt. Das an Position 228 folgende Arginin dient als Drehpunkt der, durch cAMP-Bindung ausgelösten, Bewegung in der B/C-Helix, die mit zur Dissoziation der C-Untereinheit führt (Kim et al., 2007). So könnte die beschriebene Mutation über kurz reichende Wechselwirkungen diese Drehung behindern und somit das Ablösen der C-Untereinheit erschweren. Auch können durch einen einzelnen Aminosäureaustausch größere Konformationsänderungen verursacht werden, die in einer veränderten Proteinfunktion mit geringerer Aktivität des Holoenzym resultieren.

An Hand der Röntgenaufnahmen lässt sich das Krankheitsbild Akrodysostose nicht bestätigen, es liegt hier lediglich eine Brachydaktylie Typ E mit verkürztem Os metacarpale IV beidseits vor. Zwar ergab die Analyse der Sequenzabweichung im MutationTaster eine 99,9%-ige Wahrscheinlichkeit für diese krankheitsverursachend zu sein, allerdings stufte die Datenbank PolyPhen den Aminosäureaustausch als benigne ein. Auch die laborchemischen Parameter der Patientin ergeben keinen Hinweis für eine Resistenz gegenüber Parathormon oder den hypophysären Effektorhormonen, lediglich ein TSH-Wert im unteren Grenzbereich besteht. Somit erscheint es fraglich, ob die gefundene Variante im *PRKAR1A*-Gen ursächlich für den Phänotyp von Patientin 1

ist. Wahrscheinlicher dürfte es sich hier um eine Normvariante zu handeln. DNA der Eltern der Patientin war nicht zu erhalten.

Patientin 2

Erstaunlicherweise zeigten Greene et al. (2008) bei Patienten mit dem sogenannten Carney-Komplex, dass die Mutation p.Ala213Asp, welche an selber Position liegt, wie die bei der Patientin verifizierte Veränderung p.Ala213Thr, zu einer erhöhten PKA-Aktivität führt.

Zwar wurde dort eine verminderte cAMP-Bindung an R1 α beobachtet, allerdings bindet R1 α selbst schlechter an die C-Untereinheit, so dass diese vermehrt im freien, katalytisch wirksamen Zustand vorliegt, was die Aktivitätssteigerung erklärt. Passend dazu erscheint, dass die PBC der NBD-A, in welcher die Mutation gelegen ist, neben ihrer Rolle in der cAMP-Bindung, vor allem mit ihren hydrophoben Anteilen, maßgeblich an der Bindung von R1 α an die C-Untereinheit beteiligt ist (Kim et al., 2005). Die von Greene beschriebene Mutation könnte so einerseits die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen regulatorischer und katalytischer Untereinheit stören oder aber über eine Konformationsänderung die Bindung der C-Untereinheit verschlechtern.

Patientin 2 zeigt keinerlei mit dem Carney-Komplex vereinbare Pigmentierungsauffälligkeiten (lediglich ein Café-au-lait-Fleck am unteren Rumpf), es sind keine Myxome oder andersartige Neoplasien beschrieben. Auch die endokrinologischen Parameter lassen sich im Sinne einer Hormonresistenz deuten, im Gegensatz zu der beim Carney-Komplex beobachteten hormonellen Überfunktion. Die morphologischen, radiologischen und endokrinologischen Auffälligkeiten lassen die klinische Verdachtsdiagnose Akrodysostose zu. Auch die vorhandene leichte mentale Retardierung wird bei Patienten mit Akrodysostose gesehen (Butler et al., 1988; Robinow et al., 1971). Zusätzlich beobachteten H. Lee et al. (2012) bei 2 Patienten mit Akrodysostose und Mutationen im *PRKAR1A*-Gen ebenfalls eine milde mentale Retardierung.

Eine mögliche Erklärung, dass die bei dieser Patientin vorliegende Mutation zum Krankheitsbild der Akrodysostose führt, obwohl sie sich an selber Aminosäureposition wie die bereits beschriebene, für den Carney-Komplex verantwortliche Mutation

befindet, wäre, dass die Mutation p.Ala213Thr zwar zu einer Verschlechterung der cAMP-Bindung führt, jedoch, anders als die Mutation p.Ala213Asp, die Interaktion mit der C-Untereinheit nicht entscheidend beeinträchtigt. Hieraus würde ein vermindertes Ansprechen des PKA-Holoenzym auf cAMP resultieren, welches den Phänotyp der Patientin erklären kann.

Die Mutation p.Ala213Asp ist neben der von Nagasaki et al. (2012) detektierten Mutation p.Thr239Ala, für die gezeigt werden konnte, dass sie die Aktivierbarkeit der PKA durch cAMP senkt, die einzige Sequenzveränderung, welche bislang in der NBD-A bei Patienten mit NBD-A detektiert wurde.

Letztendlich lässt sich die Relevanz dieser Sequenzveränderung nur durch funktionelle Bestimmungen, z.B. nach den in Greene et al. (2008) oder in Linglart et al. (2011) dargestellten Methoden, verifizieren.

Patient 3

Als Ergebnis der Sequenzanalyse des *PRKAR1A*-Gens zeigte sich hier die Mutation c.1118A>G, die in Position 373 und damit am Ende der NBD-B, den Austausch der Aminosäure Tyrosin zu Cystein bewirkt (Tyr373Cys). Für eine Mutation des Tyrosins an Position 371 der aus dem Schwein gewonnenen R1 α zu Phenylalanin (Tyr371Phe) (dies entspricht der Position 373 im Menschen) wurde eine verminderte cAMP-Bindung an die NBD-B sowie eine erschwerte Aktivierbarkeit des Holoenzym im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Bubis, Saraswat, & Taylor, 1988). Auch für die Mutation Tyr371Ala wurde ein vergleichbarer Befund nachgewiesen (Kim et al., 2007). Hierbei scheinen sowohl die Wechselwirkungen des aromatischen Rings des Tyrosins, als auch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Glutamat an Position 324 der R1 α eine Rolle zu spielen (Kapphahn & Shabb, 1997). Die verminderte Fähigkeit der NBD-B cAMP zu binden führt über den in Kapitel 1.3.2 erläuterten Mechanismus zu einer verminderten Aktivität des Holoenzym. Diese verminderte Aktivität würde den Phänotyp des Patienten 3 erklären. Michot et al. (2012) wiesen eine andere Mutation an gleicher Position (p.Tyr373His) bei einem Betroffenen mit Akrodysostose nach. In den Laborbefunden zeigte sich ein erhöhtes PTH und LSH, jedoch ein normwertiges TSH. Allerdings erfolgte bei dem zum Zeitpunkt der Blutentnahme Patienten eine

Thyroxintherapie, was schließen lässt, dass zu einem vorangegangenen Zeitpunkt ein erhöhtes TSH bestand. Diese für Akrodysostose-Patienten typischen Laborveränderungen in Verbindung mit den charakteristischen skelettalen Veränderungen stützen die Annahme, dass die gefundene Mutation im *PRKAR1A* Gen krankheitsverursachend ist.

Patient 4

Die gefundene Sequenzveränderung p.Gly289Glu von Patient 4 liegt in der NBD-B, welche als „gatekeeper“ die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA kontrolliert (Kap. 1.3.2). Der beschriebene Aminosäureaustausch in dieser Domäne könnte Konformationsänderungen induzieren. Diese wiederum könnten entweder, auf Grund der Nähe zu einer Bindungsstelle mit der C-Untereinheit (Positionen 279-288) (Kim et al., 2007), die Dissoziation der R-Untereinheit von der C-Untereinheit beeinträchtigen, oder aber die Fähigkeit der NBD-B cAMP zu binden vermindern. In beiden Fällen würde dies zu einem verminderten Ansprechen des PKA-Holoenzym auf cAMP führen. Der Phänotyp des Patienten in Kombination mit den Laborbefunden legt diese Schlussfolgerung nahe.

Patientin 6

In der Sequenzanalyse des *PRKAR1A*-Gens wurde bei Patientin 6 die Mutation p.Arg369Stop beschrieben. Es wurden bereits von Linglart et al. (2011) drei Patienten mit Akrodysostose beschrieben, welche die identische Mutation tragen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde bereits nachgewiesen, dass die beschriebene Mutation, vermutlich durch Verlust des Tyrosins an Position 373 (siehe Patient 3), zu einer Funktionsminderung der PKA führt. Auch Michot et al. (2012) beschrieben 4 Patienten mit der identischen Mutation. Da auch die klinischen Befunde, vor allem die Handröntgenaufnahme, aber auch die eingesunkene Nasenwurzel und die Mittelgesichtshypoplasie das Bild einer Akrodysostose ergeben, wurde dieses Krankheitsbild bei Patientin 6 auch molekulargenetisch bestätigt.

Patientin 7

Zur weitergehenden Klärung könnte noch die Untersuchung des kürzlich als verantwortlich für Akrodysostose beschriebenen Gens *PDE4D* erfolgen. Differentialdiagnostisch könnte man auch eine Albright-Osteodystrophie erwägen, für die Mutationen im *GNAS*-Gen verantwortlich sind. Diesbezüglich könnte ebenfalls eine molekulargenetische Untersuchung erfolgen, auch eine Bestimmung der $G_s\alpha$ -Aktivität erscheint sinnvoll.

Patientin 9

Die bei Patientin 9 beschriebene Mutation p.Arg335Cys ist in der PBC der NBD-B (Kim et al., 2007) lokalisiert und könnte eine verschlechterte Bindung von cAMP an die NBD-B bewirken und damit über die bereits erwähnten Mechanismen die katalytische Aktivität des Holoenzym vermindern. Tatsächlich zeigten Herberg et al. (1996), dass für die aus dem Schwein gewonnene $R1\alpha$ mit einem an Position 333 mutierten Arginin (Arg333Lys), welches dem menschlichen Arginin an Position 335 entspricht, eine deutlich höhere Konzentration an cAMP zur vollständigen Aktivierung des Holoenzym notwendig ist. Da für diese Position keine anderen Funktionen innerhalb des Proteins beschrieben sind, erscheint es in Kombination mit dem Phänotyp von Patientin 9 schlüssig, dass die bei Patientin 9 gefundene Mutation gleichartige Auswirkungen auf die Proteinfunktion hat, d.h. ein vermindertes Ansprechen des PKA-Holoenzym auf cAMP. Diese wird durch die Tatsache gestützt, dass H. Lee et al. (2012) eine Mutation an gleicher Position (p.Arg335Pro) bei einem Patienten mit Akrodysostose nachweisen konnten. Somit ließ sich die klinische Verdachtsdiagnose Akrodysostose molekulargenetisch bestätigen.

6.2 Vergleichende Betrachtung von Geno- und Phänotyp

Auf Grund der im vorherigen Abschnitt dargelegten fraglichen Relevanz des molekulargenetischen Befundes bei Patientin 1 mit Brachydaktylie Typ E, soll diese in den folgenden Kapiteln nur am Rande betrachtet werden.

Bei dieser Analyse des *PRKAR1A*-Gens bei 8 Patienten mit Verdacht auf Akrodysostose zeigten sich 5 Missense-Mutationen in den NBDs und eine Nonsense-Mutation kurz vor dem Ende des kodierenden Bereichs des letzten Exons, deren mRNA somit nicht von einem NMD betroffen ist. Dies erscheint passend, da größere Deletionen oder Nonsense-Mutationen, deren mRNA von einem NMD betroffen ist, zu einer verminderten Menge an $R\alpha$ führen. Die hieraus resultierende, verringerte Inhibition der C-Untereinheit der PKA würde zu einer gesteigerten PKA-Aktivität führen.

Die erste in der Literatur beschriebene Veränderung im *PRKAR1A*-Gen, die bislang in Zusammenhang mit Akrodysostose beschrieben wurde (p.Arg369Stop), wurde im vorhandenen Patientenkollektiv einmal beobachtet (Patientin 6). Im Unterschied zu den von Linglart et al. (2011) beschriebenen 3 Patienten bestand bei Patientin 6 im Alter von 11,5 Jahren ein Wachstum entlang der 10. Perzentile, während die in der Literatur erwähnten Patienten alle einen Kleinwuchs mit einer Körpergröße unter der 3. Perzentile aufwiesen. Allerdings beschrieben auch Michot et al. (2012) einen Patienten mit der identischen Mutation, der zum 8. Lebensjahr keinen Kleinwuchs aufwies. An skelettalen Auffälligkeiten, die bei den zuvor beschriebenen Patienten bestanden, lag bei Patientin 6 ebenfalls eine ausgeprägte periphere Dysostose sowie Brachydaktylie und ein akzeleriertes Knochenalter vor. Dagegen waren bei ihr nicht die beschriebene maxilläre Hypoplasie sowie kalkspritzerähnliche Veränderungen an den Epiphysen („epiphyseal stippling“) an Hand der vorhandenen Röntgenaufnahmen nicht zu beobachten. Eine Röntgenaufnahme der Wirbelsäule, bezüglich der Beurteilung Interpedikularabstände, lag nicht vor.

Bei Patientin 6 bestand, wie bei einem Großteil der Referenzpatienten, ein erhöhter TSH-Wert (bei normwertigen T_4) allerdings erscheint die von Linglart et al. (2011) ebenfalls konsensuell beobachtete GHRH-Resistenz hier, bei erst erhöhtem und später normwertigen GH, nicht plausibel. Die Serum-PTH-Konzentration sowie der Plasma-cAMP-Spiegel konnten leider nicht bestimmt werden.

Sämtliche anderen detektierten Genveränderungen wurden zuvor noch nicht beschrieben und traten auch in der Untersuchung dieses Patientenkollektivs nur jeweils einmal auf. Von den anderen neu beschriebenen Mutationen befinden sich drei in der NBD-B und eine in der NBD-A. Diese Patienten zeigten die skelettalen Befunde der Akrodysostose und, wenn erhoben, erhöhte Spiegel von TSH und PTH. In dieser Arbeit

zeigte in dieser Arbeit allein die Trägerin der einzigen Mutation der NBD-A eine leichte mentale Retardierung (Patientin 4). Auch die von Nagasaki et al. (2012) beschriebene Patientin, die eine Mutation in der NBD-A trägt, zeigte eine milde Entwicklungsverzögerung. Ob allerdings ein Zusammenhang zwischen den Mutationen in der NBD-A und der mentalen Retardierung besteht, lässt sich an Hand der vorhandenen Daten nicht aussagen.

Abgesehen von fehlenden Zapfenepiphysen bei Patient 4 ergaben sich ansonsten keine wegweisenden Unterschiede in den jeweiligen Phänotypen der beschriebenen Patienten.

Die erhobenen Befunde legen nahe, dass, bei Patienten mit Akrodysostose und *PRKAR1A*-Mutationen, hormonelle Normabweichungen in Form erhöhter Spiegel von TSH und PTH vorliegen, wobei diese in ihrer Ausprägung variieren können. Zu den weniger häufigen Befunden bei Akrodysostose-Patienten mit *PRKAR1A*-Mutationen zählen die charakteristischen fazialen Dysmorphien, noch seltener werden eine Innenohrschwerhörigkeit und eine milde mentale Retardierung gesehen. Diese Beobachtungen werden durch die von H. Lee et al. (2012) und Michot et al. (2012) erhobenen Befunde gestützt.

Durch Analyse des Phänotyps bei Patientin 6 konnte zudem gezeigt werden, dass die Mutation p.Arg369Stop nicht immer zu einem Kleinwuchs mit Wachstum unter der 3. Perzentile führt.

6.3 Auswirkung auf die genetische Diagnostik

Zur molekulargenetischen Bestätigung bei Akrodysostose ist die Untersuchung von *PRKAR1A* sinnvoll. So wurden in dieser Arbeit, zusätzlich zu der ursprünglich bekannten Mutation p.Arg369Stop, weitere, mit hoher Wahrscheinlichkeit pathogene, Sequenzveränderungen nachgewiesen. Dennoch ist diese Stop-Mutation mit insgesamt 8 beschriebenen Betroffenen in der Literatur (Linglart et al., 2011; Michot et al., 2012) und dieser Dissertation die häufigste Mutation. Von den weiteren 8 beschriebenen Mutationen in der Literatur (H. Lee et al., 2012; Michot et al., 2012; Nagasaki et al., 2012) und dieser Dissertation lagen 2 weitere an Position 373 der Aminosäuresequenz

und damit auch in Exon 11 des *PRKAR1A*-Gens, so dass dieses Exon 10 der 16 der bislang bekannten Mutationen im *PRKAR1A*-Gen bei Akrodysostose-Patienten beinhaltet.

Zwar konnte in dieser Arbeit nicht für alle Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose eine Mutation in *PRKAR1A* nachgewiesen werden, allerdings wurde jüngst ein weiteres Gen, *PDE4D*, als ursächlich für Akrodysostose bekannt. Mutationsträger in diesem Gen zeigen ebenfalls die skelettalen Besonderheiten, jedoch deutlich weniger hormonelle Auffälligkeiten (H. Lee et al., 2012; Michot et al., 2012). Die Untersuchung von *PDE4D* erscheint somit insbesondere sinnvoll für Patientin 7 dieser Arbeit, da diese klinische Auffälligkeiten vereinbar mit Akrodysostose zeigt, jedoch keine auffälligen hormonellen Parameter detektiert wurden.

Im Hinblick auf die zukünftige genetische Diagnostik bei Verdacht auf Akrodysostose, könnte zunächst die Bestimmung verschiedener endokrinologischer Parameter erfolgen - der TSH-Wert und Serum-PTH-Spiegel erscheinen hierbei am geeignetsten – um in Abhängigkeit dieser Untersuchung zuerst die Analyse von *PRKAR1A* (bei auffälligen Werten) oder *PDE4D* (bei Ergebnissen in der Norm) durchzuführen.

Bei nur einem einzigen Patienten im BDE-Kollektiv von 48 Patienten wurde eine *PRKAR1A*-Sequenzveränderung detektiert, deren Pathogenität, bei fehlenden hormonellen Auffälligkeiten und einer in der Datenbank PolyPhen ermittelten benignen Auswirkung auf Proteinebene, zweifelhaft erscheint. Daher ist es nicht klar, ob eine Veränderung im *PRKAR1A*-Gen als Ursache für eine isolierte Brachydaktylie Typ E in Frage kommt. Eine abschließende Klärung dieses Sachverhalts könnten nur funktionelle Analysen der Variante p.Asp227Asn erbringen, welche den Einfluss der Veränderung auf die Aktivität der PKA messen. Bis zu dieser Klärung sollte in der molekulargenetischen Diagnostik bei einer isolierten Brachydaktylie Typ E, die Analyse von *PRKAR1A*, wenn überhaupt, erst nach Ausschluss von Mutationsanalysen in den in Kapitel 1.2.1 genannten Genen, wie z.B. *PTHLH* oder *HDAC4*, erfolgen.

7 Zusammenfassung

Akrodysostose ist ein erstmals 1969 von (Maroteaux & Malamut) beschriebene Krankheitsbild einer peripheren Dysostose, welches zusätzlich mit Kleinwuchs, nasaler Hypoplasie, akzeleriertem Knochenalter und mentaler Retardierung verbunden sein kann. Im Jahr 2011 zeigten Linglart et al., dass Sequenzveränderungen im *PRKAR1A*-Gen verantwortlich für eine Akrodysostose mit Hormonresistenz sein können.

In dieser Dissertation wurden 8 Patienten mit Verdacht auf Akrodysostose auf das Vorliegen von Mutationen in *PRKAR1A* untersucht. Es wurde durch Sequenzierung die bereits von Linglart et al. (2011) beschriebene Nonsense-Mutation p.Arg369Stop ebenfalls in einer Patientin mit Akrodysostose nachgewiesen. Zusätzlich konnte bei vier weiteren Patienten mit Akrodysostose eine jeweils bisher nicht beschriebene Missense-Mutation detektiert werden (p.Ala213Thr, p.Tyr373Cys, p.Gly289Glu, p.Arg335Cys). Die Zusammenschau von klinischen Befunden und laborchemischen Veränderungen ergab für jede der Mutationen ausreichend Argumente, diese als krankheitsverursachend anzusehen. Die Kausalität dieser Mutationen wurde auch durch den *de novo*-Nachweis in allen Familien unterstützt, bei denen elterliche DNA verfügbar war. Dies belegte, dass die Analyse von *PRKAR1A* bei der molekulargenetischen Bestätigung der Akrodysostose sehr sinnvoll erscheint. Bei drei Patienten mit Verdacht auf Akrodysostose wurde keine Mutation in *PRKAR1A* gefunden. Damit ist *PRKAR1A* ein Hauptgen für Akrodysostose.

Zusätzlich konnte ein Vergleich des Phänotyps der Patientin, welche die Mutation p.Arg369Stop trug, mit dem Phänotyp der bereits von Linglart et al. (2011) beschriebenen Patienten zeigen, dass der dort beobachtete Kleinwuchs nicht zwingend mit dieser Mutation einhergeht, zumindest nicht präpubertär. Die in dieser Arbeit beschriebene Patientin zeigte ein Wachstum zwischen der 3. und 10. Perzentile.

Die Laborbefunde der Mutationsträger legten zudem nahe, dass pathogene Mutationen im *PRKAR1A*-Gen zu erhöhten PTH- und TSH-Werten führen. Durch Erhebung dieser Parameter vor der genetischen Diagnostik bei der klinischen Verdachtsdiagnose Akrodysostose könnte sich die Entscheidung treffen lassen, welches der für dieses Krankheitsbild in Frage kommenden Gene zuerst untersucht werden sollte: *PRKAR1A* bei auffälligen Werten, *PDE4D* bei Werten in der Norm.

Außerdem wurde in dieser Arbeit bei einer einzigen Patientin aus einem Kollektiv von 48 Patienten mit Brachydaktylie Typ E die Variante p.Asp227Asn nachgewiesen. Bei fehlenden laborchemischen Veränderungen und unpassenden radiologischen Auffälligkeiten wurde diese Sequenzveränderung als Normvariante eingestuft. Somit konnte ausgesagt werden, dass *PRKAR1A* in der molekulargenetischen Diagnostik bei BDE keine entscheidende Rolle einnimmt.

8 Literaturverzeichnis

- Abou-Samra, A. B., Juppner, H., Force, T., Freeman, M. W., Kong, X. F., Schipani, E., . . . et al. (1992). Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. [Comparative Study; In Vitro]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(7), 2732-2736.
- Ahrens, W., Hiort, O., Staedt, P., Kirschner, T., Marschke, C., & Kruse, K. (2001). Analysis of the GNAS1 gene in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, *86*(10), 4630-4634.
- Amling, M., Neff, L., Tanaka, S., Inoue, D., Kuida, K., Weir, E., . . . Baron, R. (1997). Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Cell Biol*, *136*(1), 205-213.
- Anand, G. S., Law, D., Mandell, J. G., Snead, A. N., Tsigelny, I., Taylor, S. S., . . . Komives, E. A. (2003). Identification of the protein kinase A regulatory RIalpha-catalytic subunit interface by amide H/2H exchange and protein docking. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(23), 13264-13269. doi: 10.1073/pnas.2232255100
- Armour, C. M., McCready, M. E., Baig, A., Hunter, A. G., & Bulman, D. E. (2002). A novel locus for brachydactyly type A1 on chromosome 5p13.3-p13.2. [Letter]. *J Med Genet*, *39*(3), 186-188.
- Bastepe, M., & Juppner, H. (2005). GNAS locus and pseudohypoparathyroidism. [Review]. *Horm Res*, *63*(2), 65-74. doi: 10.1159/000083895
- Bastepe, M., Weinstein, L. S., Ogata, N., Kawaguchi, H., Juppner, H., Kronenberg, H. M., & Chung, U. I. (2004). Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(41), 14794-14799. doi: 10.1073/pnas.0405091101

- Bell, J. (1951). *On brachydactyly and symphalangism* (Vol. 5). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Bongarzone, I., Butti, M. G., Coronelli, S., Borrello, M. G., Santoro, M., Mondellini, P., . . . Pierotti, M. A. (1994). Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cancer Res*, *54*(11), 2979-2985.
- Brent, A. E., & Tabin, C. J. (2002). Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Research Support, U.S. Gov't, P.H.S., Review]. *Curr Opin Genet Dev*, *12*(5), 548-557.
- Breur, G. J., VanEnkevort, B. A., Farnum, C. E., & Wilsman, N. J. (1991). Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. [Comparative Study, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Orthop Res*, *9*(3), 348-359. doi: 10.1002/jor.1100090306
- Bubis, J., Saraswat, L. D., & Taylor, S. S. (1988). Tyrosine-371 contributes to the positive cooperativity between the two cAMP binding sites in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Biochemistry*, *27*(5), 1570-1576.
- Butler, M. G., Rames, L. J., & Wadlington, W. B. (1988). Acrodysostosis: report of a 13-year-old boy with review of literature and metacarpophalangeal pattern profile analysis. [Case Reports, Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. *Am J Med Genet*, *30*(4), 971-980. doi: 10.1002/ajmg.1320300416
- Butler, M. G., Wadlington, W. B., & Feingold, M. (1990). Picture of the month. Acrodysostosis. *Am J Dis Child*, *144*(5), 577-578.
- Byrnes, A. M., Racacho, L., Nikkel, S. M., Xiao, F., MacDonald, H., Underhill, T. M., & Bulman, D. E. (2010). Mutations in GDF5 presenting as semidominant brachydactyly A1. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Hum Mutat*, *31*(10), 1155-1162. doi: 10.1002/humu.21338
- Casey, M., Vaughan, C. J., He, J., Hatcher, C. J., Winter, J. M., Weremowicz, S., . . . Basson, C. T. (2000). Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. [Research

- Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, 106(5), R31-38. doi: 10.1172/JCI10841
- Christ, B. (2003). Skelett- und Muskelsystem. In D. Drenckhahn, B. Christ, A. Benninghoff & D. Benninghoff (Eds.), *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie* (16., völlig neu bearb. Aufl. ed., Vol. Band 1 Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, pp. XI, 956 S.). München [u.a.]: Urban & Fischer.
- Chung, U. I., Kawaguchi, H., Takato, T., & Nakamura, K. (2004). Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. [Review]. *J Orthop Sci*, 9(4), 410-414. doi: 10.1007/s00776-004-0786-3
- Chung, U. I., Schipani, E., McMahon, A. P., & Kronenberg, H. M. (2001). Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, 107(3), 295-304. doi: 10.1172/JCI11706
- Correa, D., Hesse, E., Seriwatanachai, D., Kiviranta, R., Saito, H., Yamana, K., . . . Baron, R. (2010). Zfp521 is a target gene and key effector of parathyroid hormone-related peptide signaling in growth plate chondrocytes. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Dev Cell*, 19(4), 533-546. doi: 10.1016/j.devcel.2010.09.008
- Dathe, K., Kjaer, K. W., Brehm, A., Meinecke, P., Nurnberg, P., Neto, J. C., . . . Mundlos, S. (2009). Duplications involving a conserved regulatory element downstream of BMP2 are associated with brachydactyly type A2. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, 84(4), 483-492. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.03.001
- Deutzmann, R. (2006). *Duale Reihe Biochemie* (Vol. 1). Stuttgart, D: Georg Thieme Verlag.
- Diller, T. C., Madhusudan, Xuong, N. H., & Taylor, S. S. (2001). Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Structure*, 9(1), 73-82.

- Everman, D. B., Bartels, C. F., Yang, Y., Yanamandra, N., Goodman, F. R., Mendoza-Londono, J. R., . . . Warman, M. L. (2002). The mutational spectrum of brachydactyly type C. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Am J Med Genet*, *112*(3), 291-296. doi: 10.1002/ajmg.10777
- Farabee, W. C. (1903). *Hereditary and sexual influence in meristic variation: a study of digital malformations in man*. Ph.D., Harvard University.
- Gao, B., Guo, J., She, C., Shu, A., Yang, M., Tan, Z., . . . He, L. (2001). Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Genet*, *28*(4), 386-388. doi: 10.1038/ng577
- Graham, J. M., Jr., Krakow, D., Tolo, V. T., Smith, A. K., & Lachman, R. S. (2001). Radiographic findings and Gs-alpha bioactivity studies and mutation screening in acrodysostosis indicate a different etiology from pseudohypoparathyroidism. [Case Reports, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Pediatr Radiol*, *31*(1), 2-9.
- Greene, E. L., Horvath, A. D., Nesterova, M., Giatzakis, C., Bossis, I., & Stratakis, C. A. (2008). In vitro functional studies of naturally occurring pathogenic PRKAR1A mutations that are not subject to nonsense mRNA decay. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, N.I.H., Intramural]. *Hum Mutat*, *29*(5), 633-639. doi: 10.1002/humu.20688
- Gullingsrud, J., Kim, C., Taylor, S. S., & McCammon, J. A. (2006). Dynamic binding of PKA regulatory subunit RI alpha. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Structure*, *14*(1), 141-149. doi: 10.1016/j.str.2005.09.019
- Guo, S., Zhou, J., Gao, B., Hu, J., Wang, H., Meng, J., . . . He, L. (2010). Missense mutations in IHH impair Indian Hedgehog signaling in C3H10T1/2 cells: Implications for brachydactyly type A1, and new targets for Hedgehog signaling. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Mol Biol Lett*, *15*(1), 153-176. doi: 10.2478/s11658-009-0040-2
- Hall, B. K., & Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. *Bioessays*, *22*(2), 138-147. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4

- Hansson, V., Skalhegg, B. S., & Tasken, K. (2000). Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. [Corrected and Republished Article, Review]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73(1-2), 81-92.
- Herberg, F. W., Taylor, S. S., & Dostmann, W. R. (1996). Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Biochemistry*, 35(9), 2934-2942. doi: 10.1021/bi951647c
- Hertzog, K. P. (1968). Brachydactyly and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*, 17(3), 428-438.
- Jamsheer, A., Sowinska, A., Kaczmarek, L., & Latos-Bielenska, A. (2012). Isolated brachydactyly type E caused by a HOXD13 nonsense mutation: a case report. *BMC Med Genet*, 13, 4. doi: 10.1186/1471-2350-13-4
- Johnson, D., Kan, S. H., Oldridge, M., Trembath, R. C., Roche, P., Esnouf, R. M., . . . Wilkie, A. O. (2003). Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, 72(4), 984-997.
- Jüppner, H., Abou-Samra, A. B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., . . . et al. (1991). A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. [Comparative Study, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 254(5034), 1024-1026.
- Kapfahn, M. A., & Shabb, J. B. (1997). Contribution of the carboxyl-terminal regional of the cAMP-dependent protein kinase type I alpha regulatory subunit to cyclic nucleotide interactions. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Arch Biochem Biophys*, 348(2), 347-356.
- Karaplis, A. C. (2002). Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of bone biology* (Vol. 2nd ed). San Diego: Academic Press.
- Karaplis, A. C., Luz, A., Glowacki, J., Bronson, R. T., Tybulewicz, V. L., Kronenberg, H. M., & Mulligan, R. C. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of

- the parathyroid hormone-related peptide gene. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genes Dev*, 8(3), 277-289.
- Kim, C., Cheng, C. Y., Saldanha, S. A., & Taylor, S. S. (2007). PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell*, 130(6), 1032-1043. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.018
- Kim, C., Xuong, N. H., & Taylor, S. S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1alpha) subunits of PKA. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S., Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 307(5710), 690-696. doi: 10.1126/science.1104607
- Kirschner, L. S., Sandrini, F., Monbo, J., Lin, J. P., Carney, J. A., & Stratakis, C. A. (2000). Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet*, 9(20), 3037-3046.
- Kjaer, K. W., Eiberg, H., Hansen, L., van der Hagen, C. B., Rosendahl, K., Tommerup, N., & Mundlos, S. (2006). A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Med Genet*, 43(3), 225-231. doi: 10.1136/jmg.2005.034058
- Klopocki, E., Hennig, B. P., Dathe, K., Koll, R., de Ravel, T., Baten, E., . . . Mundlos, S. (2010). Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, 86(3), 434-439. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.01.023
- Kozhemyakina, E., Cohen, T., Yao, T. P., & Lassar, A. B. (2009). Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Mol Cell Biol*, 29(21), 5751-5762. doi: 10.1128/MCB.00415-09
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. [Review]. *Nature*, 423(6937), 332-336. doi: 10.1038/nature01657
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., . . . Kronenberg, H. M. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 273(5275), 663-666.

- Lee, H., Graham, J. M., Jr., Rimoin, D. L., Lachman, R. S., Krejci, P., Tompson, S. W., . . . Cohn, D. H. (2012). Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations in Acrodysostosis. *Am J Hum Genet*, *90*(4), 746-751. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.004
- Lee, K., Deeds, J. D., & Segre, G. V. (1995). Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Endocrinology*, *136*(2), 453-463.
- Lee, K., Lanske, B., Karaplis, A. C., Deeds, J. D., Kohno, H., Nissenson, R. A., . . . Segre, G. V. (1996). Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development. [Comparative Study, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Endocrinology*, *137*(11), 5109-5118.
- Lehmann, K., Seemann, P., Boergemann, J., Morin, G., Reif, S., Knaus, P., & Mundlos, S. (2006). A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. [Case Reports, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Eur J Hum Genet*, *14*(12), 1248-1254. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201708
- Lehmann, K., Seemann, P., Silan, F., Goecke, T. O., Irgang, S., Kjaer, K. W., . . . Mundlos, S. (2007). A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, *81*(2), 388-396. doi: 10.1086/519697
- Lehmann, K., Seemann, P., Stricker, S., Sammar, M., Meyer, B., Suring, K., . . . Mundlos, S. (2003). Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(21), 12277-12282. doi: 10.1073/pnas.2133476100
- Li, Y., & Dudley, A. T. (2009). Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Development*, *136*(7), 1083-1092. doi: 10.1242/dev.023820

- Linglart, A., Menguy, C., Couvineau, A., Auzan, C., Gunes, Y., Cancel, M., . . . Silve, C. (2011). Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. [Case Reports]. *N Engl J Med*, *364*(23), 2218-2226. doi: 10.1056/NEJMoa1012717
- Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K. S., & Mirams, M. (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. [Review]. *Int J Biochem Cell Biol*, *40*(1), 46-62. doi: 10.1016/j.biocel.2007.06.009
- Maroteaux, P., & Malamut, G. (1968). L'acrodysostose. *Presse Med*(76), 2189-2192.
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. [Review]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *2*(8), 599-609. doi: 10.1038/35085068
- Michot, C., Le Goff, C., Goldenberg, A., Abhyankar, A., Klein, C., Kinning, E., . . . Cormier-Daire, V. (2012). Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations as Another Cause of Acrodysostosis. *Am J Hum Genet*, *90*(4), 740-745. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.003
- Mundlos, S. (2009). The brachydactylies: a molecular disease family. [Review]. *Clin Genet*, *76*(2), 123-136.
- Nagasaki, K., Iida, T., Sato, H., Ogawa, Y., Kikuchi, T., Saitoh, A., . . . Fukami, M. (2012). PRKAR1A Mutation Affecting cAMP-Mediated G Protein-Coupled Receptor Signaling in a Patient with Acrodysostosis and Hormone Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. doi: 10.1210/jc.2012-1369
- Niswander, L. (2003). Pattern formation: old models out on a limb. [Review]. *Nat Rev Genet*, *4*(2), 133-143. doi: 10.1038/nrg1001
- Niswander, L., Tickle, C., Vogel, A., Booth, I., & Martin, G. R. (1993). FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, *75*(3), 579-587.
- Oude Luttikhuis, M. E., Williams, D. K., & Trembath, R. C. (1996). Isolated autosomal dominant type E brachydactyly: exclusion of linkage to candidate regions 2q37 and 20q13. *J Med Genet*, *33*(10), 873-876.

- Reiter, S. (1978). Acrodysostosis. A case of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, mental retardation and impaired hearing. [Case Reports]. *Pediatr Radiol*, 7(1), 53-55.
- Robinow, M., Pfeiffer, R. A., Gorlin, R. J., McKusick, V. A., Renuart, A. W., Johnson, G. F., & Summitt, R. L. (1971). Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis Child*, 121(3), 195-203.
- Saga, Y., & Takeda, H. (2001). The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. [Review]. *Nat Rev Genet*, 2(11), 835-845. doi: 10.1038/35098552
- Sakamoto, A., Chen, M., Kobayashi, T., Kronenberg, H. M., & Weinstein, L. S. (2005). Chondrocyte-specific knockout of the G protein G(s)alpha leads to epiphyseal and growth plate abnormalities and ectopic chondrocyte formation. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Bone Miner Res*, 20(4), 663-671. doi: 10.1359/JBMR.041210
- Saunders, J. W., Jr. (1948). The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J Exp Zool*, 108(3), 363-403.
- Saunders, J. W., Jr., & Gasseling, M. T. (1968). Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In R. Fleischmejer & R. E. Billingham (Eds.), *Mesenchymal-Epithelial Interactions* (pp. pp. 78-97). Baltimore: Williams and Wilkin.
- Schipani, E., Lanske, B., Hunzelman, J., Luz, A., Kovacs, C. S., Lee, K., . . . Juppner, H. (1997). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 13689-13694.
- Scholten, A., Aye, T. T., & Heck, A. J. (2008). A multi-angular mass spectrometric view at cyclic nucleotide dependent protein kinases: in vivo characterization and structure/function relationships. [Review]. *Mass Spectrom Rev*, 27(4), 331-353. doi: 10.1002/mas.20166

- Schwabe, G. C., & Mundlos, S. (2004). Genetics of congenital hand anomalies. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 36(2-3), 85-97. doi: 10.1055/s-2004-817884
- Schwabe, G. C., Tinschert, S., Buschow, C., Meinecke, P., Wolff, G., Gillessen-Kaesbach, G., . . . Mundlos, S. (2000). Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, 67(4), 822-831. doi: 10.1086/303084
- Scott, J. D. (1991). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S., Review]. *Pharmacol Ther*, 50(1), 123-145.
- Seemann, P., Schwappacher, R., Kjaer, K. W., Krakow, D., Lehmann, K., Dawson, K., . . . Mundlos, S. (2005). Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. [Research Support, N.I.H., Extramural, Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, 115(9), 2373-2381. doi: 10.1172/JCI25118
- Sheela, S. R., Perti, A., & Thomas, G. (2005). Acrodysostosis: autosomal dominant transmission. [Case Reports]. *Indian Pediatr*, 42(8), 822-826.
- Shemarova, I. V. (2009). cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. [Review]. *Crit Rev Microbiol*, 35(1), 23-42. doi: 10.1080/10408410802645646
- Shimizu, H., Yokoyama, S., & Asahara, H. (2007). Growth and differentiation of the developing limb bud from the perspective of chondrogenesis. [Review]. *Dev Growth Differ*, 49(6), 449-454. doi: 10.1111/j.1440-169X.2007.00945.x
- Steiner, R. D., & Pagon, R. A. (1992). Autosomal dominant transmission of acrodysostosis. [Case Reports]. *Clin Dysmorphol*, 1(4), 201-206.
- Stevens, D. A., & Williams, G. R. (1999). Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. *Mol Cell Endocrinol*, 151(1-2), 195-204.
- Su, P., Ding, H., Huang, D., Zhou, Y., Huang, W., Zhong, L., . . . Wang, Y. (2011). A 4.6 kb genomic duplication on 20p12.2-12.3 is associated with brachydactyly type A2 in a Chinese family. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Med Genet*, 48(5), 312-316. doi: 10.1136/jmg.2010.084814

- Syrrou, M., Keymolen, K., Devriendt, K., Holvoet, M., Thoelen, R., Verhofstadt, K., & Fryns, J. P. (2002). Glypican 1 gene: good candidate for brachydactyly type E. [Case Reports]. *Am J Med Genet*, *108*(4), 310-314.
- Temtamy, S. A., & Aglan, M. S. (2008). Brachydactyly. [Review]. *Orphanet J Rare Dis*, *3*, 15. doi: 10.1186/1750-1172-3-15
- Towers, M., & Tickle, C. (2009). Growing models of vertebrate limb development. [Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. *Development*, *136*(2), 179-190. doi: 10.1242/dev.024158
- Viljoen, D., & Beighton, P. (1991). Epiphyseal stippling in acrodysostosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Med Genet*, *38*(1), 43-45. doi: 10.1002/ajmg.1320380111
- Weinstein, L. S., Shenker, A., Gejman, P. V., Merino, M. J., Friedman, E., & Spiegel, A. M. (1991). Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. [Case Reports]. *N Engl J Med*, *325*(24), 1688-1695. doi: 10.1056/NEJM199112123252403
- Williams, S. R., Aldred, M. A., Der Kaloustian, V. M., Halal, F., Gowans, G., McLeod, D. R., . . . Elsea, S. H. (2010). Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. [Case Reports, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Hum Genet*, *87*(2), 219-228. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.07.011
- Witte, F., Chan, D., Economides, A. N., Mundlos, S., & Stricker, S. (2010). Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (ROR2) and Indian hedgehog regulate digit outgrowth mediated by the phalanx-forming region. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(32), 14211-14216. doi: 10.1073/pnas.1009314107
- Wuelling, M., & Vortkamp, A. (2011). Chondrocyte proliferation and differentiation. [Review]. *Endocr Dev*, *21*, 1-11. doi: 10.1159/000328081
- Zakany, J., & Duboule, D. (2007). The role of Hox genes during vertebrate limb development. [Review]. *Curr Opin Genet Dev*, *17*(4), 359-366. doi: 10.1016/j.gde.2007.05.011
- Zhang, M., Xie, R., Hou, W., Wang, B., Shen, R., Wang, X., . . . Chen, D. (2009). PTHrP prevents chondrocyte premature hypertrophy by inducing cyclin-D1-dependent

Runx2 and Runx3 phosphorylation, ubiquitylation and proteasomal degradation. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Cell Sci*, 122(Pt 9), 1382-1389. doi: 10.1242/jcs.040709

Zuscik, M. J., O'Keefe, R. J., Gunter, T. E., Puzas, J. E., Schwarz, E. M., & Rosier, R. N. (2002). Parathyroid hormone-related peptide regulation of chick tibial growth plate chondrocyte maturation requires protein kinase A. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Orthop Res*, 20(5), 1079-1090. doi: 10.1016/S0736-0266(02)00027-X

9 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	2
Abbildung 1-2	4
Abbildung 1-3	4
Abbildung 1-4	5
Abbildung 1-5	9
Abbildung 1-6	11
Abbildung 1-7	11
Abbildung 1-8	13
Abbildung 1-9	13
Abbildung 1-10	15
Abbildung 5-1	29
Abbildung 5-2	31
Abbildung 5-3	33
Abbildung 5-4	35
Abbildung 5-5	36
Abbildung 5-6	37
Abbildung 5-7	38
Abbildung 5-8	39
Abbildung 5-9	40
Abbildung 5-10	41
Abbildung 5-11	42
Abbildung 5-12	43
Abbildung 5-13	43
Abbildung 5-14	44
Abbildung 5-15	45
Abbildung 5-16	45
Abbildung 5-17	46
Abbildung 5-18	48
Abbildung 5-19	49
Abbildung 5-20	50

Tabellen und Abbildungsverzeichnis	75
Tabelle 3.1 Primersequenzen und Positionen	24
Tabelle 4.1 Cycling-Protokoll Mehrschritt PCR	26
Tabelle 5.1 Zusammenfassung der Mutationen	30
Tabelle 5.2 Klinische und laborchemische Patientendaten	51

Lebenslauf

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

Erklärung

Ich, Florian Muhn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse des PKRAR1A-Gens bei Patienten mit Akrodysostose und Brachydaktylie Typ E“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Frau Dr. Denise Horn bedanken. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas, Ihre tolle, freundliche Betreuung und Unterstützung, dass Sie jederzeit ansprechbar waren und mir immer schnellstmöglich geholfen haben.

Dasselbe gilt für Dr. Eva Klopocki. Danke für deine Hilfe während des ganzen Projekts, dass ich mich bei Problemen an dich wenden konnte und du mir jederzeit geholfen hast. Alles Gute für deine Zeit nach Berlin.

Großer Dank gebührt auch Randi Koll und Fabienne Trotier, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn ich, durch meine Schusseligkeit, nicht nur mich an den Rande der Verzweiflung pipettiert hatte. Nur das Beste für euch und viel Freude mit eurem Nachwuchs.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Luitgard Graul-Neumann für die Hilfe bei Ihrer Patientin, aber auch für Ihre Unterstützung seitdem ich am Institut bin, die dafür gesorgt hat, dass ich mich dort immer wohl gefühlt habe. Das gilt auch für Erika Benderoth, Anke Wittwer und Marko sowie all die anderen, noch nicht erwähnten Personen, die dafür verantwortlich sind, dass ich immer gerne zur Arbeit gegangen bin.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne eure Unterstützung hätte ich diese Dissertation erst gar nicht anfangen können.

Und natürlich dir, Vanessa, da du dafür gesorgt hast, dass es mir trotz des ganzen Stresses immer und überall prima gegangen ist und weil ich das sowieso viel öfter machen sollte.