

## 4) Diskussion

### 4.1) Die synpolydactyly homolog (spdh) Maus als Tiermodell für SPD

Die Synpolydaktylie ist ein seltenes dominant vererbtes Syndrom mit Handfehlbildungen beim Menschen. Es wurde gezeigt, dass die Fehlbildungen durch eine in-frame Insertion in einen Alanin-kodierenden Repeat im *HOXD13* Gen verursacht werden (Muragaki et al., 1996). Durch die Mutation wird dieser Repeat mit einer normalen Länge von 15 Alaninen auf 22 bis 29 Alanine expandiert. Der Phänotyp heterozygoter SPD-Patienten besteht aus Syndaktylie der Finger 3/4 und der Zehen 4/5 und einem zusätzlichen Finger und Zeh. Es besteht allerdings eine sehr hohe Varianz des Phänotyps und der Penetranz, sowohl intra- als auch interfamiliär. Dabei können von einer bis zu allen vier Extremitäten betroffen sein und die Schwere rangiert von Syndaktylie der Haut bis zur Duplikation eines kompletten Fingers/Zehs. In einer ausführlichen Studie mit 99 Patienten in 20 Familien konnte ein Zusammenhang zwischen der Zunahme der Penetranz und der Schwere der Fehlbildung mit einer Zunahme der Expansion festgestellt werden (Goodman, et al., 1997). Zusätzlich müssen aber auch andere genetische Faktoren und zufällige Ereignisse eine Rolle spielen, um die hohe Varianz innerhalb einer Familie und einzelner Individuen zu erklären. Interessanterweise nimmt die Schwere des Phänotyps in den seltenen homozygoten SPD-Fällen noch weiter zu. Bei diesen Patienten sind alle 4 Extremitäten einheitlich betroffen und sowohl Hände als auch Füße zeigen Syndaktylie des Gewebes und extreme Brachydaktylie der Metakarpalen und Metatarsalen. In den Füßen findet man zudem Oligodaktylie (Muragaki et al., 1996; Akarsu et al., 1995). Beim Menschen findet man also eine Zunahme der Schwere und Penetranz mit einer Zunahme der Expansion und auch einer Zunahme der Dosis des mutanten Gens.

Johnson et al. beschrieben 1998 eine Mausmutante, synpolydactyly homolog (spdh), die einen SPD-ähnlichen Phänotyp zeigt. Bei der verantwortlichen Mutation handelt es sich wie beim Menschen um eine in-frame Insertion im Alanin-kodierenden Repeat des *Hoxd13* Gens um 21 Basenpaare, die den Repeat auf insgesamt 22 Alanine verlängert. Heterozygote Mäuse für diese Mutation sind zwar deutlich schwächer betroffen als SPD-Patienten und zeigen nur in etwa 30% eine Verkürzung der Phalangen und vereinzelte Fusionen der Karpalen (Bruneau et al., 2001), doch in homozygoten Mäusen findet man Syndaktylie, Polydaktylie und Brachydaktylie wie auch bei den betroffenen Menschen. Man kann wohl davon ausgehen, dass innerhalb dieser Spezies der generelle Effekt der Mutation konserviert

ist, allerdings Variationen im quantitativen Zusammenspiel der Hox-Proteine bestehen, die sich in der unterschiedlichen Ausprägung des Phänotyps zeigen.

In dieser Studie wurde der Phänotyp der homozygoten Mäuse im Detail untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Mutation zu Defekten in 3 Entwicklungsprozessen kommt. Zum einen wird durch die Mutation die frühe Musterbildung in den Pfoten gestört, wodurch es zur Entstehung der Poly- und Syndaktylie kommt. Zusätzlich ist die Entwicklung der Gelenke in den Metakarpalen und den Phalangen stark gestört. Mit Ausnahme der distalen Gelenke und der Gelenke im 1. Finger findet keine normale Gelenkentwicklung statt. Als drittes ist auch die Differenzierung des Knorpels stark verzögert und die Entstehung von Knochen vermindert. Man findet in den Phalangen der Pfoten weder Knochen noch hypertrophe Chondrozyten bis nach der Geburt, während im Wt die Bildung von Knochen bereits im Embryonalstadium beginnt.

Der Phänotyp der homozygoten *spd*-Maus unterscheidet sich damit in einigen Aspekten von dem der SPD-Patienten, bei denen weder eine Störung der Gelenkentwicklung noch eine Verzögerung der Knochenbildung vorhanden ist. Allerdings stellt diese Mausmutante dennoch ein sehr geeignetes Tiermodell dar, um die genetischen Interaktionen von *Hoxd13* mit anderen *Hox*-Genen und den Mechanismus, der der Pathogenese dieser Mutation zu Grunde liegt, zu untersuchen.

#### **4.2) Expression der *Hox*-Gene in der *spd*-Maus**

Das Expressionsmuster und die Stärke der Expression von *Hoxd13* in wt und homozygoten Mäusen wurde durch Whole-Mount (WM-ISH) und radioaktive in situ Hybridisierungen (rISH) untersucht. *Hoxd13* wird im distalen Bereich der Extremitätenknospe stark exprimiert, einem Bereich in dem sich später die Finger entwickeln werden. In der homozygoten Maus erschien der Bereich der Expression etwas verkürzt im Vergleich zum Wt, aber das Expressionsmuster sah normal aus. Der verkürzte Bereich der Expression ist wahrscheinlich ein Sekundäreffekt durch Verkürzung des Bereichs der zukünftigen Finger. Wenn sich die Kondensationen der entstehenden Finger bilden, geht die Expression von *Hoxd13* im Wt im entstehenden Knorpel zurück, während sie in der Mutante unverändert im ganzen Autopod bestehen bleibt. Erst zu einem späteren Zeitpunkt ist auch in der Mutante die Expression hauptsächlich im Perichondrium der Kondensationen zu finden und nur noch schwach in den Knorpelzellen. Durch rISH auf Schnitten und RT-PCR von totaler RNA konnte gezeigt werden, dass *Hoxd13* sowohl im Wt als auch in der Mutante bis nach der

Geburt in den Pfoten exprimiert bleibt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass *Hoxd13* auch zu späteren Stadien der Entwicklung und darüber hinaus von Bedeutung ist.

In der Maus konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *Hoxd13* zu einem anderen Phänotyp führt als bei *spdh* in der Maus oder bei SPD beim Menschen. Eine *Hoxd13* knock-out Maus (*Hoxd13<sup>st</sup>*) zeigt eine Verkürzung der Finger II und V und zum Teil Polydaktylie (Dollé et al., 1993). Stattdessen führt die Deletion der drei letzten Gene des *HoxD*-Clusters, *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxd13* zusammen (*Del3*), zu einem synpolydaktylie-ähnlichen Phänotyp (Zakany und Duboule, 1996). Die zusätzliche Inaktivierung eines Allels des *Hoxa13*-Gens führt zu einer starken Brachydaktylie, die dem homozygoten Phänotyp der SPD beim Menschen vergleichbar ist (Zakany, et al., 1997). Man geht davon aus, dass die Alanin-Expansionen in *Hoxd13*, die zu SPD und *spdh* führen, nicht zu einem Funktionsverlust führen, sondern zu einem dominant-negativen Effekt auf die *Hox*-Gene, die co-exprimiert sind.

Die Expression dieser *Hox*-Gene wurde in der homozygoten *spdh*-Maus untersucht und mit dem *Wt* verglichen. Für alle 3 Gene, *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxa13*, konnte gezeigt werden, dass sowohl Muster als auch Stärke der Expression im Vergleich zur *wt* Maus vergleichbar war. Dieses Ergebnis wurde auch von einer anderen Gruppe bestätigt (Bruneau et al., 2001). Die Mutation in *Hoxd13* hat also keinen Einfluss auf die Transkription anderer *Hox*-Gene, sondern der dominant-negative Effekt beruht wahrscheinlich auf einer funktionellen Beeinträchtigung. Dies wurde durch Komplementationstest durch Verkreuzung mit den oben erwähnten transgenen Mäusen untersucht. Bruneau et al. konnten zeigen, dass die Verkreuzung der *spdh*-Mutante mit der *Del3*-Maus zu einem stärkeren Phänotyp führt als die Verkreuzung der *Del3*-Maus mit der *Hoxd13<sup>st</sup>*-Maus. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die *spdh*-Mutation die Aktivität der Gene *Hoxd11* und *Hoxd12* beeinträchtigt. Die zusätzliche Inaktivierung eines Allels des *Hoxa13*-Gens verstärkt den Phänotyp der heterozygoten *spdh*-Maus wie es auch schon bei der *Del3*-Maus der Fall war. Der Verlust eines Allels von *Hoxa13* verstärkt also den dominant-negativen Effekt der *spdh*-Mutation, wodurch gezeigt wird, dass eine funktionelle Kooperation der *Hoxa*- und *Hoxd*-Gene bei der Bildung der Finger nötig ist. Es ist allerdings nicht möglich zu sagen, ob die *spdh*-Mutation auch direkt die Funktion von *Hoxa13* beeinflusst.

In der *wt* Maus zeigten *Hoxd11* und *Hoxd12* im Stadium E12.5 Expression in den frühen Gelenkanlagen der Finger. Interessanterweise konnte diese Expression in der Mutante nicht gefunden werden. Da in der *spdh*-Mutante die Gelenkentwicklung gestört ist, könnte dies ein Hinweis auf eine mögliche Rolle dieser *Hox*-Gene bei der Gelenkentwicklung sein. Es

konnte bereits im Huhn gezeigt werden, dass Missexpression von *Hoxd11* zu einer größeren Kondensation des I. Fingers und einem zusätzlichen Gelenk führt (Morgan, et al., 1992). Zudem zeigen Mäuse mit einer Inaktivierung beider *Hoxd13* Allele variable Fusionen der metakarpal-phalangealen Gelenke der Finger II und III, sowie das Fehlen der mittleren Phalangen der Finger II und V (Dollé et al., 1993; Davis und Capecchi, 1996). Die Ergebnisse dieser Studie liefern damit einen weiteren Hinweis darauf, dass *Hox*-Gene auch bei der Entwicklung der Gelenke eine Rolle spielen. Die Entstehung von Gelenken ist ein komplizierter Prozess, der noch nicht vollständig verstanden ist. Im Abschnitt 4.3.2 wird noch ausführlicher darauf eingegangen.

### **4.3) Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung in der *spdh*-Maus**

#### **4.3.1) Musterbildung und Kondensation**

Bei der Musterbildung in der Hand spielt der *Sonic Hedgehog* (*Shh*) Signalweg eine entscheidende Rolle. *Shh* wird in der "Zone der polarisierender Aktivität" (ZPA) auf der posterioren Seite der Hand exprimiert und es konnte gezeigt werden, dass eine Verdopplung des ZPA und die Expression von *Shh* auf der anterioren Seite zu Polydaktylie führen kann (Chan et al., 1995; Masuya et al., 1997). Auch die Missexpression von *Hoxd12* kann ektope *Shh*-Expression induzieren und führt zu einer spiegelbildlichen Polydaktylie (Knezevic et al., 1997). In den *spdh* Mutanten ist die Polydaktylie allerdings anders, da sie nicht spiegelbildlich ist, sondern präaxiale, postaxiale und zentrale Polydaktylie verbindet. Es konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die frühe Expression der *Hox*-Gene im posterioren Bereich der Extremitätenknospe für die örtlich begrenzte Aktivierung von *Shh* verantwortlich ist (Zakany et al., 2004). Es ist möglich, dass die Expression von *Shh* in der *spdh*-Maus verändert ist und so die Musterbildung in der distalen Extremität gestört wird. Allerdings wurde in dieser Arbeit die Expression von *Shh* aufgrund der phänotypischen Unterschiede nicht untersucht.

Eine weitere mögliche Ursache für die gestörte Musterbildung in der *spdh/spdh* Maus kann eine veränderte Expression von Signalmolekülen wie die *Bone Morphogenetic Proteins* (*Bmp*) sein, eine Untergruppe der *TGF- $\beta$*  Familie. Es wurde beschrieben, dass die Identität der Finger durch Signale des interdigitalen Mesoderms bestimmt wird und die *Bmps* gute Kandidaten für diese Regulierung sind (Dahn und Fallon, 2000). In der homozygoten *spdh*-Maus war das Expressionsmuster von *Bmp2* und *Bmp7* deutlich verändert im Vergleich zum

Wt. So war *Bmp2* in der Mutante im Bereich des Mesoderms sehr viel schwächer exprimiert und das Muster unregelmäßig und irregulär. Letzteres trifft auch auf die Expression von *Bmp7* zu. In einer neueren Veröffentlichung wurde gezeigt, dass das Fehlen von *Bmp4* im Mesoderm der Extremitätenknospe zu einem gestörten Patterning der Finger mit Polydaktylie führt (Selever et al., 2004). *Bmp4* zeigte in den frühen Stadien ein vergleichbares Muster, aber eine schwächere Expression in der Mutante im Vergleich zum Wt. Die Expression von *Bmp4* kann direkt durch *Hoxd13* aktiviert werden (Suzuki et al., 2003). Es ist deshalb möglich, dass auch die Expression anderer *Bmps*, wie *Bmp2* und *Bmp7*, direkt von *Hoxd13* aktiviert werden kann. Die Entstehung der Polydaktylie in der *spdh*-Mutante ist deshalb möglicherweise auf eine veränderte Regulierung der *Bmps* durch *Hoxd13* zurückzuführen (siehe auch 4.6).

#### 4.3.2) Gelenkentwicklung

In der *spdh/spdh* Maus ist die Gelenkentwicklung in den Metakarpalen und Phalangen stark gestört. Es werden nur Gelenke im Finger I und zwischen den mittleren und distalen Phalangen der restlichen Finger gebildet. Bei der Entwicklung der Gelenke werden die Kondensationen der einzelnen Finger hintereinander in die einzelnen Metakarpalen und Phalangen unterteilt (Shubin und Alberch, 1986). Zu Beginn der Gelenkentwicklung kondensieren Zellen im Bereich des zukünftigen Gelenks und bilden die sogenannte Interzone, die sich in mehrere Schichten unterteilt. Die Zellen der mittleren Schicht werden apoptotisch und bilden so den Gelenkspalt. Bei diesem Prozess ist unter anderem der *Growth/Differentiation Factor 5* (*Gdf5*) beteiligt. Mutationen in *Gdf5* führen zu einer Verkürzung der Extremitäten und fehlender Gelenkentwicklung in bestimmten Phalangen (Storm et al., 1994). Allerdings führt die Überexpression von *Gdf5* nicht zur Bildung zusätzlicher Gelenke (Francis-West et al., 1999; Storm und Kingsley, 1999). In der *spdh/spdh* Maus ist die Expression von *Gdf5* stark reduziert und das Muster disorganisiert. Es kommt in der Mutante auch nicht zur Entstehung der Interzone und damit auch nicht zu einer Expression von *Gdf5*. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Expression der *Wnt*-Gene (*Wnt4*, *Wnt14* und *Wnt16*) der erste Schritt für die Bildung von Gelenken ist und diese für die Expression von *Gdf5* und der Bildung der Interzone notwendig sind (Guo et al., 2004). Es ist daher möglich, dass in der *spdh*-Mutante die fehlende Expression von *Gdf5*, durch eine gestörte Expression dieser *Wnt*-Gene verursacht wird und so die Bildung von Gelenken nicht induziert wird.

Ein weiterer Faktor, der bei der Gelenkentwicklung beteiligt sein könnte, ist Noggin, ein Antagonist der Bmps. Mutationen im *NOGGIN*-Gen führen beim Menschen zum Symphalangismus (Gong et al., 1999) und die Inaktivierung von *Noggin* in der Maus führt zum Ausbleiben der Entwicklung von Gelenken (Brunet et al., 1998). In der *spdh/spdh* Maus ist das Expressionsmuster von *Noggin* verändert. Während die Expression im Wt auf den Knorpel beschränkt ist, der die Gelenke umgibt, bleibt die Expression in der Mutante in den gesamten Knorpelanlagen der Finger vorhanden.

Auch für den Hedgehog Signalweg wurde eine mögliche Beteiligung an der Gelenkentwicklung beschrieben. Die Inaktivierung von *Shh* in der Maus führt zur Fusion des Ellbogengelenks (Chiang et al., 1996) und die Inaktivierung von *Ihh* (*Indian Hedgehog*) führt zu einem kompletten Verlust an Segmentierung (St-Jacques et al., 1999). *Ihh* wird in der Mitte der Metakarpalen und Phalangen exprimiert und dabei von den Hedgehog regulierten Genen *Gli1* und *Patched1* (*Ptc1*) umgeben. Die Region des zukünftigen Gelenks bleibt frei von Expression dieser Gene. In der *spdh*-Mutante ist das Expressionsmuster stark verändert, die Expression von *Ihh* wird nicht unterteilt, sondern bleibt in den Phalangen zunächst durchgehend exprimiert. Die Expressionsmuster von *Gli1* und *Ptc1* sind ebenso nicht unterteilt, auch die Regionen, in denen sich die Gelenke bilden sollten, sind nicht frei von Expression. Es ist wahrscheinlich, dass die Missexpression von *Ihh* zu einer Missexpression der Zielgene in der *spdh/spdh* Maus führt und damit zu einer gestörten Entwicklung der Gelenke. Durch das Fehlen der Gelenke fehlt auch ein wichtiges Signalzentrum, das für die weitere Differenzierung des Knorpels entscheidend ist. Unter anderem wird hier das *Parathyroid Hormone-like Hormone* (*Pthlh*) exprimiert, das zusammen mit *Ihh* die Chondrozytendifferenzierung steuert. *Pthlh* wirkt durch seinen Rezeptor PTHR, dessen Expression in den *spdh*-Mutanten komplett fehlt. Die Expression von *Ihh* ist zwar zunächst in der *spdh/spdh* Maus vorhanden, verschwindet aber bevor die Differenzierung der Chondrozyten beginnt.

Zusammenfassend sind die Segmentierung der Kondensationen und die Bildung von Gelenken ein komplizierter Prozess, bei dem mehrere Signalwege beteiligt sind. Neben dem Hedgehog-Signalweg spielt besonders der Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway und die Signalmoleküle Gdf5, die Bmps und Noggin eine entscheidende Rolle. In der *spdh*-Mutante ist die zeitliche und räumliche Expression und dadurch auch die korrekte Interaktion dieser Gene gestört, wodurch die Gelenkentwicklung beeinflusst wird.

### 4.3.3) Knorpeldifferenzierung und Knochenentwicklung

In der *spdh/spdh* Maus ist die Differenzierung der Knorpelzellen stark gestört, wie in den Skelettpräparationen und Plastikschnitten deutlich zu sehen ist. Die Knochen der Extremitäten bilden sich durch die endochondrale Ossifikation. Dabei bilden sich zunächst Knorpelanlagen, deren Zellen dann proliferieren und differenzieren und schließlich durch Knochen ersetzt werden.

Der Prozess der Differenzierung der Chondrozyten von proliferierenden zu hypertrophen Zellen wird durch mehrere Signalwege gesteuert. Dabei kontrolliert *Ihh* über einen negativen Feedback-Loop mit dem Parathyroid Hormone-like Hormone (*Pthlh*) die Rate, mit der Zellen den proliferierenden Zustand verlassen und hypertroph werden (Vortkamp et al., 1996; Karp et al., 2000). In der *spdh*-Mutante verschwindet die Expression von *Ihh* nach E14.5 bevor die Knorpelzellen differenziert sind. Es konnte gezeigt werden, dass die *Hox*-Gene des D-Clusters bei der Regulierung der Expression von *Shh* in den Extremitäten beteiligt sind (Zakany et al., 2004). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sie auch bei der Regulierung von *Ihh* eine Rolle spielen und so einen Einfluss auf die Proliferation und die Differenzierung der Chondrozyten haben. In der *spdh/spdh* Maus fehlt außerdem die Expression vom *Pthlh*-Rezeptor (*PTHR*), der bei der Regulierung der Proliferation der Knorpelzellen eine wichtige Rolle spielt (Juppner, 2000). Damit ist in der *spdh*-Mutante ein entscheidender Signalweg gestört, was zu einer gestörten Differenzierung der Chondrozyten führt. Es ist möglich, dass *Hoxd13* bei der Steuerung dieser Signalkaskade beteiligt ist und die Expression beteiligter Gene wie *Ihh* reguliert.

Die fehlende Expression von *Col10*, einem Marker von hypertrophen Chondrozyten, in der *spdh/spdh* Maus ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Differenzierung der Knorpelzellen in den Mutanten gestört ist und diese in einem nicht-proliferierenden und undifferenzierten Zustand stehen bleiben.

### 4.3.4) Brachydaktylie in der *spdh*-Maus

Die *spdh*-Mutante zeigt eine ausgeprägte Verkürzung der Finger und Zehen. Eine mögliche Ursache für diesen Phänotyp besteht darin, dass bereits die Größe der Knorpelanlagen verringert ist. Zudem könnte aber auch die Proliferationsrate der Knorpelzellen reduziert oder ihre Apoptoserate erhöht sein.

In dieser Studie konnte in der *spdh/spdh* Maus keine erhöhte Rate an Apoptose in den Zellen der Knorpelanlagen gefunden werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die

Proliferation der Chondrozyten in den Mutanten deutlich reduziert ist. Dies ist sowohl zu frühen Entwicklungsstadien (E13.5) als auch später (E15.5) und noch nach der Geburt der Fall. Man geht davon aus, dass *Hox*-Gene eine entscheidende Rolle bei der Musterbildung spielen und dass sie auch einen Einfluss auf die Proliferation von Zellen haben (Duboule, 1995). Im Huhn konnte zudem gezeigt werden, dass die Überexpression von *Hoxd13* zu Verkürzungen von Knochen durch eine Reduzierung der Proliferationsrate führt (Goff und Tabin, 1997). Die reduzierten Teilungsraten der Chondrozyten in der *spdh*-Mutante sind nun ein weiteres Indiz dafür, dass *Hoxd13*, und wahrscheinlich auch die anderen *Hox*-Gene, das Wachstum von Skelettelementen während der Entwicklung und auch nach der Geburt durch Regulation der Proliferation, direkt oder indirekt, beeinflusst.

Es ist außerdem bekannt, dass *Gdf5* die Chondrogenese moduliert, indem die Zelladhäsion und die Proliferation erhöht wird (Francis-West et al., 1999). In der *spdh/spdh* Maus ist die Stärke der Expression von *Gdf5* deutlich reduziert, was eine weitere Erklärung für die kleineren Kondensationen und die niedrigere Proliferationsrate der Knorpelzellen sein kann. Ein weiterer wichtiger Regulator der Proliferation der Chondrozyten ist *Ihh*. *Ihh* wird in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und aktiviert die Proliferation in den naheliegenden Knorpelzellen. Außerdem induziert *Ihh* die Expression von *Bmps* im Perichondrium und den proliferierenden Chondrozyten. Diese *Bmps* induzieren dann unabhängig ebenfalls die Proliferation der Chondrozyten (Minina et al., 2001). In der *spdh/spdh* Maus ist der *Ihh*-Signalweg gestört und die beteiligten Gene zeigen veränderte Expressionsmuster und verminderte Expressionsstärken. Diese Studie zeigt, dass in der *spdh*-Mutante wichtige Signalketten gestört sind, die für die Regulation der Proliferation und auch der Differenzierung der Knorpelzellen entscheidend sind, was die deutliche Brachydaktylie und die fehlende Differenzierung erklärt.

#### **4.4) Alanin-Expansionen in *Hoxd13* führen zu Aggregatbildung**

*Hoxd13* ist ein Transkriptionsfaktor und das Protein ist normalerweise im Zellkern lokalisiert, um dort die Transkription von Zielgenen zu aktivieren. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Expansionen im Alanin-Repeat von *Hoxd13* *in vitro* zu Proteinaggregaten im Zytoplasma führen. Dabei spielt die Länge der Expansion eine Rolle. Der Vergleich verschiedener Konstrukte mit Expansionen von +7 bis +21 zusätzlicher Alanine zeigte, dass die Häufigkeit der Aggregatbildung in transfizierten Zellen mit der Länge des Repeats zunimmt. Diese Zunahme an Aggregatbildung korreliert mit einer

klinischen Studie mit SPD Patienten, bei der gezeigt werden konnte, dass die Länge der Alanin-Expansion mit der Stärke und der Penetranz des Phänotyps korreliert (Goodman et al., 1997).

Die Lokalisation von wt und mutantern (+14Ala) Protein in transfizierten Zellen wurde auch im Elektronenmikroskop analysiert. Auch hier fand sich das wt Protein ausschließlich im Zellkern, hauptsächlich in Regionen mit Chromatin Kondensationen. Das +14Ala-Protein bildete lockere Aggregate im Zytoplasma, die keine erkennbare Struktur aufwiesen. Im Unterschied dazu führen Alanin-Expansionen von +3 bis +9 Alaninen in *PABNP1* zu charakteristischen Protein-Einschlüssen im Zellkern, die aus tubulären Filamenten bestehen und meist palisadenartig angeordnet sind (Brais et al., 1998; Calado et al., 2000). *PABNP1* kodiert für ein poly-A bindendes Molekül und Mutationen führen zu OPMD (Oculopharyngeale Muskeldystrophie), einer progressiven Muskelschwäche mit spätem Krankheitsausbruch. Damit zeigen die Alanin-Expansionen in *PABNP1* eine große Ähnlichkeit zu den Krankheiten, die mit Expansionen in Polyglutamin-kodierenden Bereichen assoziiert sind. Auch diese führen zu progressiven Neurodegenerationen, die erst im mittleren Alter beginnen und die Mutationen führen zu Aggregatbildung der fehlgefalteten Proteine, die ähnliche Strukturen aufweisen (Cummings und Zoghbi, 2000).

Die Entstehung von Proteinaggregaten durch die Expansion des Alanin-Repeats konnte inzwischen auch in 2 weiteren Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. In *ARX* bildet das expandierte Protein Aggregate im Zellkern in etwa 30% der Zellen. Zusätzlich ist die Zelltodrate in diesen Zellen erhöht. Die Überexpression von HSP70 führt zu einer deutlichen Reduzierung der Aggregatbildung, was darauf schließen lässt, dass die Aggregate durch Fehlfaltung der Proteine entstehen (Nasrallah et al., 2004).

Auch in *FOXL2* führt die Expansion des Alanin-Repeats zu Aggregatbildung im Zellkern und zusätzliche Lokalisation des Proteins im Zytoplasma, in dem es zum Teil auch Aggregate bildet (Caburet et al., 2004).

Der mögliche Einfluss der Proteinaggregate auf das wt Hoxd13-Protein und auf andere Hox-Proteine wurde anhand von Co-Transfektionen in Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das wt Hoxd13-Protein in den Aggregaten co-lokalisiert ist und daran gehindert wird, in den Zellkern zu wandern. Dies könnte eine Erklärung für den dominanten Charakter der Mutation der SPD beim Menschen sein.

Die *Hox*-Gene, die im Autopod mit *Hoxd13* co-exprimiert sind, zeigten dagegen keine Veränderung in der Protein-Lokalisation. Sowohl Hoxd11 als auch Hoxd12 gingen ungehindert von den Aggregaten des mutierten Hoxd13-Proteins in den Zellkern. Es wurde

bisher angenommen, dass die Mutation bei SPD zu einem Funktionsgewinn des Proteins mit einem negativ-dominanten Effekt über die anderen *Hox*-Gene führt (siehe 4.2). Komplementationstests durch Verkreuzungen der *spd*-Maus mit transgenen Mäusen, bei denen entweder die 3 Gene *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxd13* zusammen deletiert sind (Del3) oder *Hoxd13* alleine (*Hoxd13<sup>st</sup>*) inaktiviert ist, lassen darauf schließen, dass die Funktion von *Hoxd11* und *Hoxd12* in den *spd*/*spd*-Mäusen verändert sein muss (Bruneau et al., 2001). Die Zellkulturergebnisse in dieser Studie deuten aber darauf hin, dass *Hoxd13*-Proteine mit verlängerten Alanin-Repeats keinen direkten Effekt auf andere *Hox*-Proteine ausüben, da diese in ihrer Expression und Lokalisation nicht beeinflusst werden. Es ist aber möglich und wahrscheinlich, dass durch die Fehlfaltung des mutierten *Hoxd13*-Proteins die Interaktion mit anderen *Hox*-Proteinen verhindert wird, was sich dann auch negativ auf deren Funktion auswirken kann.

#### **4.5) *Hoxd13* Aggregate entstehen durch Fehlfaltung des mutierten Proteins**

Bei der Prozessierung der Proteine in der Zelle spielen Chaperone eine entscheidende Rolle, da sie bei der Erkennung fehlgefalteter Proteine beteiligt sind. Zu ihnen gehören die Hitze Schock Proteine (HSP) 40 und 70, die auch die Fähigkeit besitzen, Proteine neu zu falten und Protein-Aggregate in lösliche native Formen zu zerteilen (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Die Zellkulturexperimente in dieser Studie zeigen, dass die *Hoxd13* Aggregate mit HSP40 und HSP70 co-lokalisieren und die Proteine in diesen Zellen stärker exprimiert werden. Allerdings reicht die erhöhte Expression und die Rekrutierung dieser HSPs nicht dazu aus, die Aggregatbildung zu verhindern.

Die Zugabe von Geldanamycin, einem Krebswirkstoff, der HSP90 inaktiviert und damit die Expression von *HSP40* und *HSP70* steigert, bereits während der Transfektion allerdings führt zu einer Abnahme der Aggregatbildung und Zunahme der Lokalisation des Proteins im Zellkern. Damit konnte gezeigt werden, dass die HSPs 40 und 70 in der Lage sind, die *Hoxd13*-Aggregate aufzulösen und möglicherweise durch Re-Faltung der Proteine den Transport in den Zellkern zu ermöglichen, wenn sie bereits zu Beginn der Proteinexpression vorhanden sind. Ein ähnlicher Effekt konnte auch mit Hungtintin Aggregaten erzielt werden (Sittler et al., 2001), die durch Expansionen in Glutamin-Repeats entstehen. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass auch Alanin-Expansionen zu einer Fehlfaltung der Proteine führen, die dann Aggregate bilden. Eine Aktivierung dieser Chaperone stellt damit eine

Therapiemöglichkeit dar, um Krankheiten, die durch Aggregatbildung hervorgerufen werden, zu behandeln.

Wenn ein Protein nicht richtig gefaltet ist, wird es normalerweise von Proteasomen im Zytoplasma abgebaut. Es ist allerdings möglich, dass zuviel fehlgefaltetes Protein angesammelt wird, dass nicht mehr über Proteasome abgebaut werden kann. In diesem Fall kann es zur Bildung eines Aggresoms kommen (Johnston et al., 1999). Dabei werden die fehlgefalteten Proteine über die Filamente des intrazellulären Zytoskeletts zum „Microtubule Organizing Center“ (MTOC) transportiert und bilden dort einen perinukleären Einschlusskörper (Garcia-Mata et al., 1999). Schließlich werden Ubiquitin, HSP70 und die 20S Untereinheit des Proteasoms aus dem Zytoplasma ans MTOC rekrutiert, um das Aggresom abzubauen (Wigley, et al., 1999).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Aggregate des mutierten Hoxd13 nicht im Aggresom lokalisiert sind. Das Zytoskelett aus Vimentin-Filamenten ist unverändert in den Zellen mit Aggregaten. Zudem sind die Hoxd13 Aggregate nicht am MTOC lokalisiert. Es konnte auch keine Co-Lokalisation mit den Untereinheiten des Proteasoms oder des Golgi-Apparats, der auch beim Abbau von Proteinen beteiligt ist, gefunden werden.

Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass Hoxd13 möglicherweise nicht im endoplasmatischen Retikulum, sondern von Polysomen im Zytoplasma translatiert wird. Dies wurde auch schon für andere Transkriptionsfaktoren gezeigt. Einzelne mRNA-Stränge können dabei von mehreren Polysomen besetzt sein, die die mRNA in Peptide translatieren. Auf diese Weise können an einer Stelle eine große Menge an Peptiden entstehen. Falls diese nicht richtig gefaltet werden können, bilden diese erste kleine Aggregate, die dann weitere Peptide binden und zu großen Aggregaten wachsen. Eine Untersuchung des Verlaufs der Aggregatbildung des mutierten Hoxd13 Proteins zeigte, dass zu Beginn der Expression das mutierte Protein im Zellkern lokalisiert ist. Mit zunehmender Dauer der Expression beginnen sich kleine verteilte Aggregate im ganzen Zytoplasma zu bilden, die mit der Zeit anwachsen und zu großen Proteinanhäufungen fusionieren und damit diese Theorie der Aggregatentstehung erhärten.

#### **4.6) Alanin-Expansionen in Hoxd13 verringern die Transkriptionsaktivität**

Es wurde gezeigt, dass Hoxd13 spezifisch die Transkription von *Bmp4* stimuliert (Suzuki et al., 2003). In dieser Studie wurde die Aktivität von Hoxd13 mit verschiedenen langen Alanin-Repeats in einem Luciferase-Assay untersucht. Wt Hoxd13 zeigt eine deutliche Aktivierung

des *Bmp4*-Promoters, die durch die Zugabe eines weiteren Transkriptionsfaktors (SP-1), der mit Hoxd13 kooperiert, noch verstärkt wurde. Interessanterweise zeigte das Konstrukt mit einer Verkürzung des Repeats auf insgesamt 2 Alanine eine ebenso deutliche Aktivierung. Für die Konstrukte mit Expansionen des Repeats konnte allerdings gezeigt werden, dass die Aktivität mit zunehmender Länge abnimmt. Bereits beim +7Ala Konstrukt ist die Aktivität unter 50% im Vergleich zum Wt gesunken, das +21Ala Konstrukt zeigt überhaupt keine Aktivität mehr. Es scheint, dass der Alanin-Repeat keine essentielle Rolle bei der Transkriptionsaktivität von Hoxd13 spielt, da eine Verkürzung keinen Einfluss auf die Aktivität zu haben scheint. Eine Verlängerung führt aber zu einem starken Rückgang der Aktivität, wobei nicht eindeutig gesagt werden kann, ob dies auf eine Beeinträchtigung der DNA-Bindung, z. B. durch eine Fehlfaltung des Proteins, oder durch die verringerte Lokalisation des Proteins im Zellkern zurückzuführen ist. Der deutliche Rückgang der Aktivität bereits beim +7Ala Hoxd13 um über 50% deutet darauf hin, dass es nicht ausschließlich an der Lokalisation des Proteins im Zytoplasma liegen kann, da bei dieser Länge der Expansion noch in fast 80% der Zellen das Protein im Zellkern lokalisiert ist. Die Länge des Alanin-Repeats spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der korrekten Faltung des Proteins.

In dieser Studie ist damit zum ersten Mal gezeigt worden, dass Alanin-Expansionen in Hoxd13 zu einer verringerten Transkriptionsaktivität führen und damit zu einer geringeren Expression der Zielgene wie *Bmp4*. Die Rolle, die *Bmps* bei der Musterbildung, Proliferation und Differenzierung spielen, wurde bereits erläutert. Dies ist nun ein erster direkter Hinweis, wie die Mutation in *Hoxd13* bei der *spdh*-Mutante zum beschriebenen Phänotyp führt.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Alanin-Expansionen in *ZIC2* zu einer verminderten DNA-Bindung und einer stark reduzierten Transkriptionsaktivität der Proteine führen (Brown et al., 2005). Dies bestärkt die Vermutung, dass Alanin-Repeats bei der DNA-Bindung und der Transkription eine Rolle spielen. Es ist möglich, dass ihre Funktion zum Teil darin besteht, als Distanzhalter zwischen Domänen, die bei der DNA-Bindung und der Interaktion mit anderen Proteinen beteiligt sind, zu fungieren. Wird dieser spezifische Abstand durch die Expansion verändert, hat dies möglicherweise einen Einfluss auf die DNA-Bindung und/oder auf die Interaktionen mit anderen Proteinen, die für die Transkriptionsaktivität wichtig sind. Andererseits deuten aber die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass die Länge der Alanin-Expansionen auch ein wichtiger Faktor bei der korrekten Faltung der Proteine ist und diese gestört wird, wenn der Repeat eine bestimmte Länge übersteigt.

#### **4.7) Proteindegradation und Lokalisation im Zytoplasma des mutierten Hoxd13-Proteins in der spd<sup>h</sup>-Maus**

Um zu untersuchen, wo das mutierte Protein *in vivo* lokalisiert ist, wurde das Tiermodell für SPD, die spd<sup>h</sup>-Mausmutante verwendet. Mit einem spezifischen Antikörper konnte auf Schnitten gezeigt werden, dass die Menge an Protein in der spd<sup>h</sup>/spd<sup>h</sup> Maus im Vergleich zum Wt stark reduziert ist. Dieses Ergebnis wurde auch per Western Blot bestätigt. In der homozygoten Mutante ist die Proteinmenge um etwa 90% reduziert, in der heterozygoten Maus um etwa 50%. Damit zeigt sich, dass *in vivo* das mutierte Protein zum Großteil degradiert wird. Auf den gefärbten Schnitten sieht man allerdings auch, dass das vorhandene mutierte Protein nicht im Zellkern lokalisiert ist, sondern im Zytoplasma. Im Gegensatz dazu befindet sich das wt-Protein ausschließlich im Zellkern. Es scheint damit so, dass das Protein in der spd<sup>h</sup>/spd<sup>h</sup> Maus nicht komplett abgebaut wird und sich kleine Mengen im Zytoplasma sammeln.

Der Phänotyp der spd<sup>h</sup>-Mutante kann nicht mit einem Funktionsverlust des Hoxd13-Proteins erklärt werden, da die komplette Inaktivierung des Gens nicht zu einem so starken Phänotyp führt (Dollé et al., 1993). Bisher wurde vermutet, dass das Protein mit einer Alanin-Expansion einen dominant-negativen Effekt über die anderen co-exprimierten *Hox*-Gene ausübt. In dieser Studie konnte aber *in vitro* gezeigt werden, dass das mutierte Hoxd13-Protein keinen direkten Einfluss auf die anderen Hox-Proteine hat. Die Ergebnisse dieser Studie, die zeigen, dass das mutierte Protein *in vivo* deutlich schwächer vorhanden ist, deuten darauf hin, dass die Zelle das Protein abbaut. Allerdings scheint die Abbaumaschinerie überlastet zu sein und die Kapazität der Zelle, das mutierte Protein abzubauen, wird überschritten, wodurch sich die fehlgefalteten Proteine im Zytoplasma anhäufen. Es wurde bereits beschrieben, dass von massivem Abbau eines mutierten Proteins auch andere Komponenten der Zelle betroffen sein können und dadurch andere Zellfunktionen beeinflusst werden (Selkoe, 2003). Dies ist ein weiterer Effekt, der bei der Pathologie der Mutation in der spd<sup>h</sup>/spd<sup>h</sup> Maus eine Rolle spielen könnte.

#### 4.8) Alanin-Expansionen in 3 weiteren Genen führen zu Aggregatbildung

Von den insgesamt 9 Genen, bei denen bisher Alanin-Expansionen beschrieben wurden, konnte bereits bei einem gezeigt werden, dass die Mutation zu Aggregatbildung führt. Expansionen in *PABNP1* führen zu Aggregaten aus tubulären Filamenten im Zellkern (Calado et al., 2000). *PABNP1* kodiert ein polyA-bindendes Protein, die anderen 8 beschriebenen Gene kodieren alle Transkriptionsfaktoren (Tabelle1).

Gen	Erkrankung	Vererbung	Mutation	Funktion	Referenzen
<i>HOXD13</i>	Synpolydaktylie	AD	15A→22-25A, 29A	Homeobox TF des D-Clusters	Muragake et al., 1996; Goodman et al., 1997; Goodman et al., 2002
<i>HOXA13</i>	Hand-Foot-Genital-Syndrom	AD	1) 14A→24A 2) 12A→18A 3) 18A→24-30A	Homeobox TF des A-Clusters	Goodman et al., 2000; Innis et al., 2004; Goodman et al., 2002
<i>RUNX2</i>	Cleidocraniale Dysplasie	AD	17A→27A	Runt-Domänen TF	Mundlos et al., 1997
<i>SOX3</i>	Mentale Retardierung mit Wachstumshormondefizienz	XR	15A→26A	SRY-verwandter TF	Laumonnier et al., 2002
<i>ARX</i>	Mentale Retardierung, Epilepsie, West Syndrom, Partington Syndrom	XR	1) 16A→18, 23A 2) 12A→20A	Aristaless-verwandter TF	Stromme et al., 2002; Bienvenu et al., 2002; Kato et al., 2004
<i>FOXL2</i>	Blepharophimosis Epicanthus Inversus Syndrom	AD	14A→22, 24A	Helix/Forkhead TF	Crisponi et al., 2001; De Baere et al., 2003
<i>PHOX2B</i>	Congenital Central Hypoventilation Syndrom	AD	20A→25-33A	paired-like Homeobox TF	Amiel et al., 2003; Matera et al., 2004
<i>ZIC2</i>	Holoprosencephalie Typ5	AD	15A→25A	odd-paired TF	Brown et al., 1998; Brown et al., 2001
<i>PABNP1</i>	Oculopharyngeale Muskeldystrophie	AD, AR	10A→12-17A (AD) 10A→11A (AR)	Poly(A)-bindendes Protein	Brais et al., 1998; Brais, 2003

**Tabelle1: Liste der Gene mit Polyalanin-Expansionen**

Abkürzungen: AD, autosomal-dominant; AR, autosomal-rezessiv; XR, X-linked rezessiv; TF, Transkriptionsfaktor Bei mehreren Alanin-Repeats in einem Gen sind sie vom N-Terminus aus durchnummeriert.

In dieser Studie wurde die Proteinlokalisierung von 3 weiteren Genen mit Expansionen eines Alanin-Repeats in der Zellkultur untersucht. Expansionen in *HOXA13* (+11 Alanine) führen zum Hand-Foot-Genital-Syndrom (HFGS) (Mortlock und Innis, 1997), Expansionen in *RUNX2* (+10 Alanine) führen zu Cleidocraniale Dysplasie (CCD) (Mundlos et al., 1997) und Expansionen in *SOX3* (+11 Alanine) führen zu X-linked mentaler Retardierung (Laumonnier, et al., 2002). Bei allen 3 Genen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren und

das wt-Protein ist im Zellkern lokalisiert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Expansionen des Alanin-Repeats bei allen zu einer Lokalisation des mutierten Proteins im Zytoplasma mit Aggregatbildung führt. Es ist daher möglich, dass es sich bei der Aggregatbildung und der Verschiebung der Proteinlokalisierung vom Zellkern ins Zytoplasma um einen generellen Mechanismus der Expansionen von Alanin-Repeats handelt.

Die Funktion von Alanin-Repeats ist bisher unklar. Bioinformatische Untersuchungen ergaben aber einen Zusammenhang von Alanin-Repeats mit Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen mit nukleärer Lokalisation (Lavoie et al., 2003). Dies ist ein Hinweis, dass ihre Funktion auch mit dem Zellkern assoziiert ist, wie DNA-Bindung und Regulation der Transkription. Zudem sind sie innerhalb der Säuger hoch konserviert und ihre Länge ist auf maximal 20 Alanine beschränkt.

Diese Daten und die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die Verlängerung eines Alanin-Repeats über 18-22 in der Fehlfaltung und/oder Aggregatbildung des Proteins aufgrund biophysikalischer Beschränkungen resultiert. In Zusammenarbeit mit der AG Wanker am MDC in Berlin konnte in einem Filterpräzipitations-Assay gezeigt werden, dass auch rekombinantes Hoxd13-Protein mit einer Expansion des Alanin-Repeats im Gegensatz zum wt-Protein spontan Aggregate bildet (Albrecht et al., 2004). Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass die Expansion des Alanin-Repeats für die Aggregatbildung alleine verantwortlich ist. Es ist denkbar, dass *in vivo* die Aggregatbildung dosis- und umgebungsabhängig ist. Zudem spielt auch die Effizienz des Abbaus eine Rolle. Es gibt bei einigen der Transkriptionsfaktoren mit Alanin-Expansionen auch andere, loss-of-function Mutationen, die den selben Phänotyp auslösen. Bei diesen Genen wird wahrscheinlich das mutierte Protein effizient abgebaut und bildet keine Aggregate. Alanin-Expansionen die zu SPD, der Cleidocranialen Dysplasie und dem Hand-Foot-Genital-Syndrom führen, zeigen dagegen andere oder stärker ausgeprägte Phänotypen als die Funktionsverlust-Mutationen. In diesen Fällen wird das mutierte Protein wahrscheinlich nicht mehr effizient abgebaut und bildet so Aggregate, die die normalen Zellfunktionen stören, wodurch es zu ausgeprägteren oder auch anderen Phänotypen kommt.

#### **4.9) Ausblick**

In dieser Studie konnten einige Aspekte der Pathogenese von Polyalanin-Expansionen in Hoxd13 und anderen Transkriptionsfaktoren aufgeklärt werden. Natürlich sind aber noch viele Fragen offen, die noch weiter untersucht werden müssen.

Zum einen sollte eine mögliche Auswirkung der Mutation in *Hoxd13* auf die Expression von *Shh* untersucht werden, da kürzlich gezeigt wurde, dass bei der Regulierung der Expression von *Shh* im ZPA auch die *Hoxd*-Gene beteiligt sind. *Shh* spielt eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der Anzahl und Identität der Finger.

Ein weiterer Aspekt, der noch weiter untersucht werden sollte, ist die Regulierung der Transkription der *Bmps* durch *Hoxd13*. Bisher konnte für *Bmp4* gezeigt werden, dass *Hoxd13* die Transkription aktiviert, es ist aber gut möglich, dass dies auch auf andere *Bmps*, wie *Bmp2* und *Bmp7*, zutrifft. Um dies zu klären, sollten weitere Luciferase-Assays mit Promoter-Konstrukten dieser *Bmps* durchgeführt werden.

Der Luciferase-Assay bietet auch eine gute Möglichkeit, bei weiteren Genen zu testen, ob ihre Transkription durch *Hoxd13* aktiviert wird und ob diese durch Expansionen des Alanin-Repeats verändert wird. Zu den Kandidaten, die auf diese Weise untersucht werden sollten, gehört vor allem *Ihh*, aber auch die *Gli*-Gene 1, 2 und 3.

Eine weitere Möglichkeit, um die Pathogenese der Aggregatbildung zu untersuchen, besteht darin, die Zusammensetzung dieser Aggregate zu analysieren. In dieser Studie wurde gezeigt, dass sich außer dem mutierten auch das wt *Hoxd13*-Protein in den Aggregaten befindet. Außerdem werden die Hitze-Schock-Proteine 40 und 70 rekrutiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich noch weitere Proteine in den Aggregaten befinden, deren Identifizierung möglicherweise weitere Hinweise dafür liefert, welche negativen Auswirkungen die Aggregatbildung innerhalb der Zelle mit sich bringt.