

**Molekularbiologische Untersuchungen zum  
Pathogenesemechanismus der Skelettfehlbildungen SYNS1  
und BDA2 im BMP-Signalweg**

---

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

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

vorgelegt von

**Anja Brehm**

aus Brandenburg an der Havel

**November 2009**



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2005 bis November 2009 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Mundlos und Prof. Dr. Seemann angefertigt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos**

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Arbeitsgruppe Development & Disease

Innestr. 73, 14195 Berlin

Tel.: 030/8413 1449

E-Mail: [mundlos@molgen.mpg.de](mailto:mundlos@molgen.mpg.de)

**2. Gutachterin: Prof. Dr. Petra Knaus**

Institut für Biochemie

Freie Universität Berlin

Thielallee 63, 14195 Berlin

Tel.: 030/838 52935

E-Mail: [knaus@chemie.fu-berlin.de](mailto:knaus@chemie.fu-berlin.de)

**Disputation am:** 23. November 2010





## Danksagung

Bei der erfolgreichen Umsetzung dieser Arbeit waren viele Menschen beteiligt, bewußt oder auch unbewußt. Nun sei ihnen hier vielmals gedankt!

Zunächst möchte ich **Prof. Dr. Stefan Mundlos** für die Bereitstellung des interessanten Themas, des bestens ausgestatteten Arbeitsplatzes am MPI und die uneingeschränkte Unterstützung danken. Das Interesse am Fortgang der Arbeit und ein knappes „Cool!“ gaben immer wieder Motivation.

**Prof. Dr. Petra Knaus** danke ich für die Übernahme des Koreferats und die interessanten Diskussionen während unserer Treffen, aus denen ich immer mit neuem Tatendrang zurück ins Labor ging.

Ein besonderer Dank geht an **Prof. Dr. Petra Seemann**, die mich während der gesamten lehrreichen Arbeit intensiv betreut und mich mit Rat und Tat auch zu später Stunde durch das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben geführt hat. Der gemeinsame Geburtstag unserer Söhne wird wohl immer ein Schmunzeln hinterlassen.

**Dr. Katarina Dathe** möchte ich sehr für die nette Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung sowie Aufarbeitung der klinischen Daten danken, auf die die gesamte Arbeit aufbaut.

An dieser Stelle sei auch allen Kooperationspartnern für die Bereitstellung von Daten bzw. Material gedankt: **Dr. Andreas Janecke, Dr. Cristina Rusu, Dr. Jens Pohl** und **Dr. Frank Plöger** von der Firma **Biopharm GmbH**, **Dr. Carsten Reissner, Dr. Klaus Kjaer, Dr. Jordao Neto, Dr. Decio Brunoni** und **Prof. Dr. Douglas Mortlock**.

Der **gesamten Arbeitsgruppe „Mundlos“** am MPI möchte ich von Herzen für das aufgeschlossene, hilfsbereite und manchmal sogar familiär anmutende Arbeitsklima im Labor danken. Ich habe mich immer sehr wohl in unserer kleinen Chaoswelt gefühlt.

**Pia** und **Nadine** möchte ich für stimmungsaufhellende Gespräche auch außerhalb des Laborrummels danken. Eure temperamentvolle Art brachte immer Leben und Abwechslung in den manchmal sehr tristen Laboralltag.

Bei unserem Methodenlexikon **Jochen** möchte ich mich neben den fachlichen Tipps auch für die nette Gesellschaft zu später Stunde bedanken, sei es mit hoch wissenschaftlichen Diskussionen über Laborphänomene sowie Gott und die Welt oder mit einem Riesenspagettieis im Herzen von Berlin.

**Florian** danke ich für viele Tipps und die genaue Einweisung in die Welt der Mikroskopie. So sind mir doch etliche schöne Bilder gelungen.

Den „**Seegirls**“ gilt ebenfalls ein besonderer Dank für ihren hilfsbereiten Einsatz, insbesondere wenn es bei mir mal wieder zeitlich eng wurde und die letzten Waschschriffe o.ä. noch ausstanden. **Maria** und **Mareen**, ihr ward mir eine sehr große Hilfe bei den gewaltigen Klonierungs- und Virusaufzuchtarbeiten. Meinen Leidensgenossinnen **Jana**, **Steffi** und den **drei Julias** danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit und ich hoffe wir behalten unsere kleinen Treffen und den Glühweinumtrunk auf dem Weihnachtsmarkt bei.

Nicht zu vergessen ist die tatkräftige Unterstützung des **Tierhauses**, insbesondere durch **Ingo** und **Monika**. Habt vielen Dank für die unzähligen Versuche transgene Mäuse zu generieren. Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei **Jana**, **Pia**, **Julia H.** und **Sigmar** für die Durchführung der kniffligen Injektionen und Beadimplantationen im Hühnchen bedanken.

Meinen Freunden **Rosi**, **Elke**, **Danny** und **Anja** danke ich für lange Telefonate und/oder für zwar seltene aber schöne Besuche, die immer für eine wertvolle Abwechslung und Befreiung von Laborsorgen sorgten.

Unserem Freund und Babysitter **Andi** möchte ich für die großartige und offenherzige Unterstützung danken, ohne die der Spagat zwischen Beruf und Familie bestimmt nicht so gut gelungen wäre.

In diesem Zusammenhang sei auch **meinen Schwiegereltern** gedankt, die all zu oft ganz unverhofft die Betreuung von Raik übernahmen und mir somit Zeit für die Wissenschaft verschafften.

Für die hilfreiche Durchsicht meiner Arbeit bedanke ich mich herzlich bei **Petra**, **Nadine**, **Jana**, **Rosi**, **Ralf**, **Netti** und **Papa**.

Ein ganz großer Dank gilt **meinen Eltern** für ihre großherzige Unterstützung bei meinem Werdegang. Ihr gabt mir immer wieder Kraft und Sicherheit um all das zu erreichen.

Zu guter Letzt gebührt meinem Liebsten **Robert** ein liebevoller Dank für all sein Verständnis, die vielseitige Hilfe und das Durchleben aller Höhen und Tiefen dieser Arbeit. Besonders die schönen Stunden zu dritt mit **Raik** gaben viel Zuversicht und Energie, um dieses Werk erfolgreich zu bewerkstelligen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Bedeutung des Skeletts</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Prozesse der Knochenentwicklung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Essentielle Signalwege der Extremitätenentwicklung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Angeborene Handfehlbildungen durch Störungen im BMP-Signalweg</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 BMP-Signalweg.....	10
1.5.2 Transkriptionelle Regulation .....	11
1.5.3 Extrazelluläre Antagonisten .....	13
1.5.4 Growth and Differentiation Factor 5 (GDF5).....	14
1.5.5 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) .....	16
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Materialien</b> .....	<b>19</b>
3.1.1 Chemikalien.....	19
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	19
3.1.3 Enzyme.....	19
3.1.4 Bakterien und Zelllinien.....	19
3.1.5 Vektoren.....	19
3.1.6 Primer.....	20
3.1.7 Kits.....	23
3.1.8 Medien, Puffer und Einwegartikel für die Zellkultur.....	24
3.1.9 Geräte.....	24
3.1.10 Comuterprogramme und Datenbanken .....	25
<b>3.2 Allgemein Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.2.1 Isolierung von genomischer DNA .....	25
3.2.2 Isolierung von Plasmid DNA .....	26
3.2.3 Isolierung von BAC-DNA.....	26
3.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	26
3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA.....	27
3.2.6 Herstellung von cDNA.....	27
3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
Kolonie-PCR.....	29
Sequenzierung.....	29
Genotypisierung .....	30

Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR).....	31
<b>3.3 Klonierungsstrategien.....</b>	<b>32</b>
3.3.1 Sondenklonierung .....	32
3.3.2 Klonierung von Kandidaten für Überexpressionsexperimente mittels RCAS .....	33
3.3.3 <i>In vitro</i> Mutagenese .....	33
3.3.4 <i>LacZ</i> -Expressionsvektor für Enhancerstudien.....	33
<b>3.4 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.4.1 Mikromass Kulturen vom Huhn .....	34
3.4.2 Anzucht und Präparation von RCAS-Viren .....	35
Anzucht .....	35
Transfektionstest .....	35
Virusaufkonzentrierung.....	36
Titerbestimmung .....	36
3.4.3 Kultivierung von DF1-Zellen.....	36
<b>3.5 Histologische Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.5.1 <i>In situ</i> Hybridisierung (ISH).....	38
Paraffineinbettung und Schnittanfertigung von Gewebepreparaten.....	38
Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden .....	39
Wohle mount <i>in situ</i> Hybridisierung (WM-ISH) .....	39
<i>In situ</i> Hybridisierung auf Paraffinschnitten (P-ISH).....	41
3.5.2 Alcian Blau-Färbung von Mikromass Kulturen .....	43
3.5.3 X-Gal-Färbung von Embryonen.....	43
3.5.4 Skelettpräparationen .....	44
3.5.5 Anfertigung von Vibratomschnitten .....	44
<b>3.6 <i>In vivo</i> Methoden.....</b>	<b>45</b>
3.6.1 Hühncheninjektionen .....	45
3.6.2 Beadimplantation.....	45
3.6.3 Herstellung transgener Mäuse.....	45
<b>3.7 Bioinformatische Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.7.1 Multiple Sequenz-Alignments.....	46
3.7.2 Proteinstrukturdarstellung .....	46
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Punktmutationen in GDF5 sind mit SYNS1 assoziiert .....</b>	<b>47</b>
4.1.1 Lokalisation der GDF5 Mutationen in primär- und tertiär-Proteinstruktur.....	49
4.1.2 Expressionsstudien von GDFs/BMPs und ihrer Interaktionspartner während der Extremitätenentwicklung .....	54
4.1.3 GDF5 Mutanten stimulieren die Chondrogenese und sind Nog-insensitiv.....	55

4.1.4	Homologe Mutation in BMP2/4/7 sind Nog-sensitiv .....	56
4.1.5	Bmp9 und Bmp10 stimulieren die Chondrogenese und sind Nog-insensitiv .....	58
4.1.6	Bmp9-dreifach-Mutante ist Nog-sensitiv .....	59
4.1.7	Nog-insensitive BMPs zeigen erhöhte chondrogene Aktivität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	61
4.1.8	Chondrogene BMPs induzieren Nog-Feedback Regulation .....	63
4.1.9	<i>Nog</i> zeigt überlappende Expression mit <i>Bmp9</i> und <i>Bmp10</i> .....	65
<b>4.2</b>	<b>Mikroduplikation in der 3'-Region von BMP2 ist mit BDA2 assoziiert.....</b>	<b>69</b>
4.2.1	Konservierte Region von ~1 kb fungiert als Extremitäten-spezifischer <i>Bmp2</i> -Enhancer ....	72
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Pathogenesemechanismus der GDF5 Mutationen N445T/K .....</b>	<b>75</b>
5.1.1	Heterozygote Punktmutationen an Position N445 in GDF5 bedingen SYNS1 .....	75
5.1.2	Verstärkte chondrogene Eigenschaften von GDF5 N445T/K beruhen auf Nog-Resistenz..	76
5.1.3	Modulierender Einfluss der Mutation N445T auf Rezeptorspezifität.....	78
5.1.4	Mutationsstelle N445 nimmt Schlüsselfunktion in Proteininteraktion mit NOG und BMPR1B ein .....	79
5.1.5	Korrelation von funktionellen Ergebnissen mit Expressionsstudien .....	81
5.1.6	Modell des Pathogenesemechanismus von GDF5 N445T/K .....	83
<b>5.2</b>	<b>Perspektive von NOG-insensitiven GDF5 Varianten in der klinische Anwendungen .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3</b>	<b>Heterozygote Duplikation einer cis regulatorischen Sequenz von BMP2 bedingt BDA2 ...</b>	<b>85</b>
5.3.1	Entstehungsmechanismen der genomischen Duplikation 3' von <i>BMP2</i> .....	86
5.3.2	Cis regulatorische Sequenz fungiert als <i>Bmp2</i> -Enhancer.....	87
5.3.3	Pathogenesemechanismus des duplizierten <i>BMP2</i> -Enhancers .....	88
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>weitere Verzeichnisse.....</b>	<b>108</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	108
9.2	Tabellenverzeichnis.....	110
9.3	Abkürzungsverzeichnis.....	111
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>113</b>
10.1	Lebenslauf .....	113
10.2	Publikationen .....	114
10.3	Selbständigkeitserklärung .....	115



## **1 Einleitung**

### **1.1 Die Bedeutung des Skeletts**

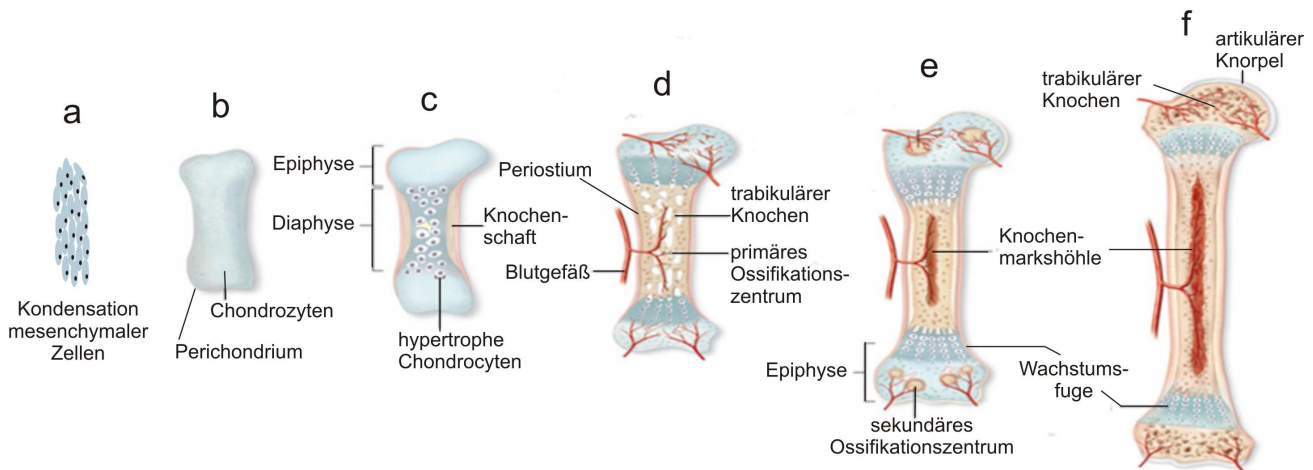
Der Mensch besitzt als Vertreter der Vertebraten ein aus über 200 Knochen bestehendes Endoskelett, welches dem Körper Gestalt und Stabilität verleiht. Man unterteilt das Skelett der Vertebraten in das kraniale Skelett, zu dem die Schädelknochen gehören, das axiale Skelett, dass aus Wirbelsäule, Rippen und Sternum besteht und das appendikuläre Skelett, welches die Extremitäten mit Schultergürtel und Hüfte umfasst. Für die erforderliche Beweglichkeit sorgen Fugen, Gelenke, Sehnen sowie Muskeln, die eine Verbindung zwischen den einzelnen Knochen bewerkstelligen. Neben der Stützfunktion erfüllt das Skelett auch eine Schutzfunktion für die inneren Organe und das Knochenmark. Letzteres ist maßgeblich bei der Blutbildung und Aufrechterhaltung des Immunsystems involviert. Des Weiteren dient das Skelett als flexibler Speicherort für Mineralien, wie Phosphat und Kalzium, und spielt als Quelle von Hormonen eine Rolle bei Stoffwechselprozessen wie der Blutzuckerregulation. Während des gesamten Lebens unterliegen die Knochen einem kontrollierten Umbau durch ein Gleichgewicht zwischen knochenaufbauenden Osteoblasten und knochenabbauenden Osteoklasten, der sogenannten Homöostase. Mit ihr wird eine dynamische Anpassung an äußere Einflüsse wie mechanische Belastung oder auch Entlastung sichergestellt (Mader, 2008). Die Behandlung von Erkrankungen des muskulo-skelettalen Systems stellt weltweit eine große Herausforderung dar und nahm 2006 in Deutschland ca. 26,6 Mrd. Euro an Behandlungskosten in Anspruch (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007). Dabei gibt es neben den Volkskrankheiten Osteoporose und Arthrose insbesondere bei der Behandlung von nichtheilenden komplizierten Knochenbrüchen oder Knochenverlust durch Trauma großes Optimierungspotential. Um gezielt in solche Prozesse eingreifen zu können, bedarf es einer intensiven Erforschung der Knochen- und Knorpelentwicklung, dessen Homöostase als auch Regeneration (Karsenty und Wagner, 2002).

### **1.2 Prozesse der Knochenentwicklung**

Die Knochenentwicklung durchläuft drei Phasen, die initiale Musterbildung, gefolgt von der Organogenese und dem Wachstum. Während der Musterbildung werden räumliche Lage, Anzahl und Gestalt der Knochen bestimmt. Daraufhin kann die Organogenese entweder nach

dem desmalen oder endochondralen Ossifikationsprozess verlaufen. Bei der desmalen Ossifikation differenzieren sich mesenchymale Osteoblastenvorläuferzellen aus der Neuralleiste direkt zu Osteoblasten, welche die Knochenmatrix ablagern. Dies lässt sich bei den meisten Schädelknochen, sowie Teilen des Schlüsselbeins beobachten. Ein vergleichbarer Prozess findet sich ebenfalls bei den kortikalen Strukturen der Röhrenknochen, bei dem die Zellen des Perichondriums direkt zu Osteoblasten differenzieren (Kronenberg, 2007).

Im Gegensatz dazu verläuft die endochondrale Ossifikation über den Zwischenschritt der knorpeligen Anlagen. Diese bilden sich zunächst aus Kondensationen mesenchymaler Vorläuferzellen, die zu Chondrozyten differenzieren und Knorpelmatrix sezernieren. Die knorpeligen Anlagen sind vom Perichondrium umgeben, welches durch den regen Austausch von Signalmolekülen während des Wachstums und der Differenzierung im Knorpel eine wichtige Funktion einnimmt (Alvarez u. a., 2001; Kronenberg, 2007).



**Abb. 1.1: Schematischer Ablauf der endochondralen Ossifikation.**

**a)** Kondensation mesenchymaler Vorläuferzellen; **b)** Differenzierung dieser Zellen zu Chondrozyten und Ausbildung des Perichondriums; **c)** Chondrozyten in der Diaphyse werden hypertroph, Apoptose terminal hypertropher Chondrozyten im Zentrum, kortikale Ossifikation in der Diaphyse bildet Knochenschaft; **d)** Invasion von Blutgefäßen mit gleichzeitigem Einwandern von Osteoklasten und Osteoblasten, Abbau der Knorpelmatrix durch Osteoklasten und Bildung des trabekulären Knochens durch Osteoblasten, Perichondrium wird im Bereich der Diaphyse zum Periostium; **e)** Abbau des trabekulären Knochens und Aufbau des kortikalen Knochens, Schaffung der späteren Knochenmarkshöhle, Etablierung der sekundären Ossifikationszentren in den Epiphysen; **f)** Einwanderung hämatopoetischer Zellen in die Knochenmarkshöhle, Bildung von trabekulären Knochen in den Epiphysen, Längenwachstum durch proliferierende Chondrozyten in den Wachstumsfugen. Abbildung verändert nach (Mader, 2008).

Daraufhin proliferieren die säulenartig entlang der Längsachse gepackten Chondrozyten bis zu einer charakteristischen Größe, die für jeden Knochen unterschiedlich ist. In dieser Phase stoppt die Proliferation in der Mitte des Skelettelements und die Chondrozyten werden hypertroph. Dabei nehmen sie um ein Vielfaches an Größe und Volumen zu und sterben schließlich durch Apoptose ab. Die Zellen im direkt an die hypertrophe Zone angrenzenden

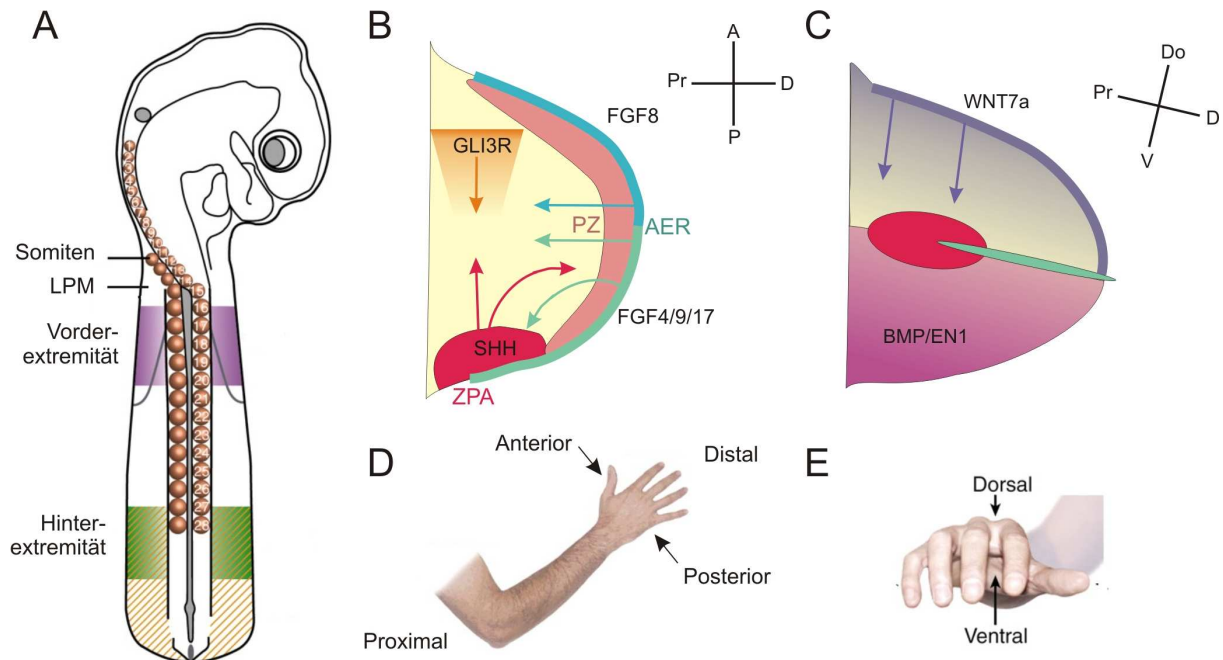


Perichondrium differenzieren zu Osteoblasten und formen den Knochenschaft, der später zum kortikalen Knochen wird. Gleichzeitig wachsen Blutgefäße in den Bereich der terminal hypertrophen Chondrozyten ein und ermöglichen ein Einwandern von Osteoklasten, die die Knorpelmatrix weiter zersetzen und Platz für einwandernde Osteoblasten schaffen. Von ihnen wird die primäre Spongiosa, der Vorläufer des trabekulären Knochens, gebildet. Durch die Ossifikation in der Diaphyse werden die Chondrozyten getrennt und es entstehen zwei Wachstumsfugen, in denen die Chondrozyten bis zum Erreichen der endgültigen Größe des Knochens proliferieren. Unterdessen werden die Osteoblasten, die den trabekulären und kortikalen Knochen aufbauen, von diesem umschlossen und differenzieren zu Osteozyten, die nun im Zusammenspiel mit den Osteoklasten an der Homöostase der Knochen beteiligt sind. Des Weiteren wird trabekulärer Knochen von den Osteoklasten wieder abgebaut, wodurch die Knochenmarkshöhle geschaffen wird, in die hämatopoetische Zellen einwandern. Im späten Verlauf der Knochenentwicklung bilden sich im Zentrum der Epiphysen sekundäre Ossifikationszentren, die auch eine Hypertrophie der Chondrozyten mit anschließender Invasion von Blutgefäßen und Osteoblasten durchlaufen. Erst mit dem Erreichen der Endgröße des Knochens werden die Wachstumsfugen geschlossen und mineralisieren vollständig.

### **1.3 Essentielle Signalwege der Extremitätenentwicklung**

Nachdem die Primärachse im Embryo angelegt ist, wird die Ausbildung der Extremitätenknospen aus dem lateralen Plattenmesoderm initiiert. Je nach Lage der paarweisen Knospen zu den Somiten entwickeln sich daraus obere oder untere Gliedmaßen. Die Knospe besteht aus mesodermalen Mesenchymzellen, welche von ektodermalen Epithelzellen umschlossen werden. Aus den Mesenchymzellen entwickeln sich die skelettären Elemente sowie Sehnen. Jedoch wandern Zellen zur Ausbildung von Muskeln, Nerven und Blutgefäße erst sekundär aus den Somiten ein (Johnson und Tabin, 1997). Der grundlegende Vorgang bei der Etablierung der Extremität ist die Ausbildung der drei Primärachsen: proximo-distal (Schulter - Finger), anterior-posterior (Daumen - kleiner Finger) sowie dorsal-ventral (Handrücken - Handinnenfläche). Dieses Grundmuster wird durch die Interaktion des Ektoderms mit dem Mesoderm in Kombination mit den zwei Organisationszentren, die apikale ektodermale Randleiste (AER) und die Zone polarisierender Aktivität (ZPA), realisiert. Dabei ist ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der FGF (Fibroblast Growth

Factors), WNT (Wingless/Int), Hh (Hedgehog) und BMP (Bone Morphogenetic Proteins) Signalkaskaden für die exakte Ausbildung der Extremitäten essentiell.



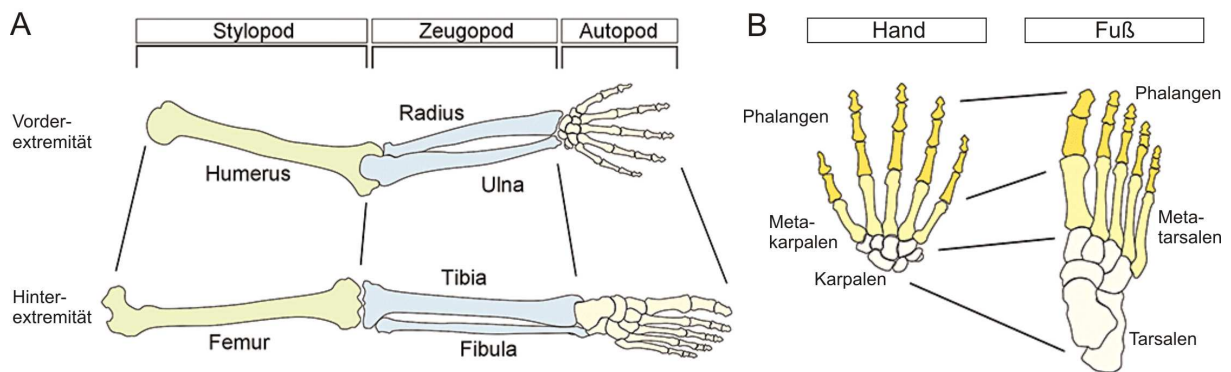
**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Extremitätenentwicklung und involvierte Signalwege der Achsenformierung.**

A) Darstellung eines Hühnerembryos im Hamburger Hamilton Stadium 15 (HH15). Die angehenden Extremitäten entwickeln sich aus definierten Zonen des Lateralplattenmesoderms (LPM). Für die Vorderextremität im Bereich der benachbarten Somiten 16-20. B) Darstellung der Signalwege, welche die proximo-distale und anterior-posteriore Achse etablieren. Die proximo-distale Achse wird über sezernierte FGF Proteine der apikale ektodermale Randleiste (AER, blau-grün dargestellt) induziert, wobei verstärkte Proliferation in der *progress zone* (PZ, hellrot) stattfindet. Die FGFs wechselwirken ebenfalls mit Sonic hedgehog (SHH), das vornehmlich für die anterior-posterioren Achsenformierung zuständig ist in Kombination mit der Repressorform von GLI-Zinkfingerprotein 3 (GLI3R). SHH wird in der ZPA (rot) exprimiert. C) Die dorso-ventrale Achse wird über BMP und Engrailed (EN1) von der ventralen Seite und über WNT7a von der dorsalen Seite gesteuert. D-E) Darstellung der drei Primärachsen der Vorderextremität im adulten Menschen. Abbildung verändert nach (Niswander, 2003) und (Logan, 2003).

### Proximo-distale Achse

Über die Sezernierung von FGF in der AER wird das Längenwachstum vermittelt (Niswander u. a., 1994). Jedoch gibt es in der Literatur zwei verschiedene Modelle, die das Auswachsen der Knospe beschreiben. Im älteren Modell, *progress zone model* genannt, regt FGF die Proliferation der Zellen unterhalb der AER an, weshalb dies als Wachstumszone oder *progress zone* bezeichnet wird. Erst nach Verlassen dieser Wachstumszone können sich die mesenchymalen Zellen verdichten und Knorpelkondensationen ausbilden. Hierbei erfolgt der Differenzierungsprozess von proximal nach distal, wonach zunächst die skelettären Elemente des Stylopods gefolgt vom Zeugopod und schließlich des Autopods angelegt werden. Somit scheint die Verweildauer der Zellen in der Wachstumszone entscheidend für ihre spätere

Identität zu sein (Wolpert, 2002). Im jüngeren Modell, *concept of early specification*, wird bereits im frühen Stadium der Knospe, vermutlich durch Gradientenausbildung der Signalmoleküle, eine bestimmte proximo-distale Spezifikation an die Mesenchymzellen vergeben. Somit werden schon zu Beginn des Längenwachstums Zellen für Stylopod, Zeugopod und Autopod definiert, die nach und nach ausdifferenzieren (Sun u. a., 2002; Dudley u. a., 2002). Die finale Gliederung und Nomenklatur der Extremitäten ist in Abb. 1.3 dargestellt.



**Abb. 1.3: Skelettärer Aufbau der adulten humanen Extremitäten.**

**A)** Terminologie der skelettären Elemente der Extremitäten und **B)** des Autopods. Abbildungen verändert nach (Tamura u. a., 2008).

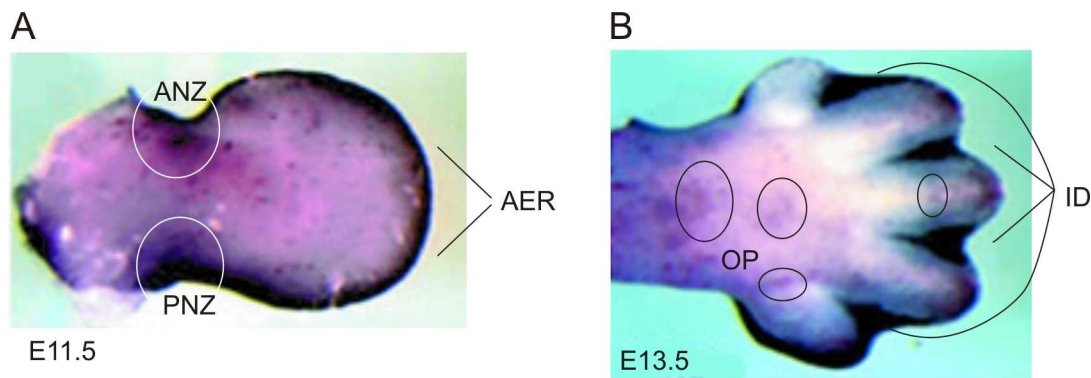
### Anterior-posteriore Achse

Die Expression von Sonic Hedgehog (SHH) in der ZPA beeinflusst die Ausbildung der anterior-posterioren und der proximo-distalen Achse maßgeblich (Niswander u. a., 1994; Johnson u. a., 1994). Es wird ein SHH Gradient vom posterioren zum anterioren Ende aufgebaut, der durch die Repressorform von GLI3 mit einer negativen Rückkopplung aufrechterhalten wird. An der anterioren Seite ermöglicht das Fehlen von SHH die Expression spezifischer Gene, die anteriore Identität verleihen.

### Dorso-ventrale Achse

Durch die Signalgebung des Ektoderms an das darunterliegende Mesoderm wird die dorso-ventrale Achse geprägt. Dabei exprimiert das ventrale Ektoderm BMP und induziert Engrailed (EN1), welches im Gegenzug WNT7a im ventralen Bereich unterdrückt. WNT7a wird im dorsalen Ektoderm exprimiert und induziert Lmx1b, welches die Differenzierung dorsaler Strukturen einleitet (Riddle u. a., 1995; Pizette u. a., 2001; Parr und McMahon, 1995).

Neben Wachstums- und Differenzierungsprozessen findet auch Apoptose in definierten Regionen statt. Dies ist essentiell für die Form- und Strukturgebung der Extremitäten (Chen und Zhao, 1998; Grotewold und Rüther, 2002b). So lassen sich am Beispiel der Extremitätenentwicklung in der Maus fünf prominente Apoptoseregionen definieren: 1. anteriore nekrotische Zone (ANZ), 2. posteriore nekrotische Zone (PNZ), 3. AER, 4. opaque patch (OP) und 5. interdigitales Mesenchym (ID).



**Abb. 1.4: Formverleihende Apoptose während der Extremitätenentwicklung.**

Whole-mount TUNEL-Färbung von Mäuseembryonen. **A)** Im Stadium E11.5 zeigt sich die TUNEL-Färbung im AER und in der anterioren als auch posterioren nekrotischen Zone (ANZ und PNZ). **B)** Im Stadium E13.5 konzentriert sich die Färbung auf das interdigitale Mesenchym (ID) und die sogenannten opaque patch (OP) in den Gelenksregionen. Abbildung modifiziert nach (Grotewold und Rüther, 2002b).

Der programmierte Zelltod in ANZ und PNZ bewirkt eine deutliche Abgrenzung des Autopods von der restlichen Extremität. Vom AER aus eingeleitet, setzt sich die Apoptose im interdigitalen Mesenchym fort und bewirkt dort die Trennung der Finger bzw. Zehen. Dieser Prozess wird vornehmlich durch die Expression von BMP im interdigitalen Mesenchym eingeleitet und verläuft in Spezies mit Schwimmhäuten reduziert (Grotewold und Rüther, 2002a; Gilbert, 2003). Die OPs nehmen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gelenke ein. Sie bewirken eine Segmentation der knorpeligen Kondensationen und schaffen somit Platz für die Etablierung von Gelenkstrukturen. So entstehen beispielsweise Humerus, Radius und Ulna aus einer Knorpelkondensation, die sich nachfolgend durch Apoptose verzweigt und segmentiert (Storm und Kingsley, 1996). Dabei spielen die BMPs als auch die WNTs eine wichtige Rolle (Archer u. a., 2003).

#### 1.4 Angeborene Handfehlbildungen durch Störungen im BMP-Signalweg

Die Entwicklung der Extremitäten in der Embryogenese ist ein komplexer und sehr störungsanfälliger Prozess. Daher können Fehl- oder Missbildungen der Hände und/oder Füße bereits bei geringen Abweichungen auftreten und abhängig vom gestörten Vorgang unterschiedliche Ausmaße annehmen. Nach (Bowe und Conway, 1956) hat eines von 626 Neugeborenen eine Fehlbildung an einer oberen Extremität. Neben isoliert auftretenden Handfehlbildungen können diese auch im Rahmen komplexer Missbildungen/Syndrome vorkommen. Sie treten entweder spontan als zufällige Störung im Entwicklungsprozess auf oder bestehen familiär gehäuft und sind somit erblich veranlagt. Grundsätzlich werden die Handfehlbildungen in sieben Gruppen unterteilt:

Gruppe 1: Fehlende Ausbildung von Extremitätenteilen (Aplasie)

Gruppe 2: Fehlende Differenzierung/Separation von Extremitätenteilen

Gruppe 3: Duplikationen

Gruppe 4: Gigantismus

Gruppe 5: Minderwachstum (Hypoplasie)


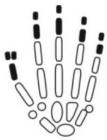


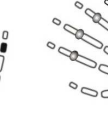





Gruppe 6: Schnürringsyndrom

Gruppe 7: Generalisierte muskulo-skelettale Anomalien.

Zu den phänotypisch häufigsten Fehlbildungen gehören u.a. die Untergruppen, Symphalangismus (Gruppe 2) und Brachydaktylie (Gruppe 1 / 2) (Wirth, 2003). Die Bezeichnung „-daktylie“ leitet sich von griech. *dáktylos*: Finger ab.

Der Symphalangismus (SYM) ist durch Fehlen einzelner oder mehrerer Gelenke zwischen den Phalangen gekennzeichnet. Dabei kommt es zu einer knöchernen Verbindung zwischen zwei Phalangen, auch Synostose („Knochenhaft“) genannt. Eine Ausweitung der Gelenkverknöcherungen auch auf weitere Gelenke der Extremitäten aber auch der Wirbelsäule wird unter dem Begriff Multiples Synostosesyndrom (SYNS) zusammengefasst. Bisher wurden Mutationen bei den Vertretern des BMP-Signalwegs GDF5 und seinem Antagonisten NOGGIN (NOG) als Ursache beschrieben. Beide Gene und die Rezeptoren BMPRI1B und ROR2 spielen auch eine entscheidende Rolle bei definierten Formen der Brachydaktylie. Unter Brachydaktylie (BD) werden Phänotypen mit verkürzten Fingern bzw. Zehen zusammengefasst. Es handelt sich meist um kongenitale Fehlbildungen, die vornehmlich autosomal dominant vererbt werden. In Abhängigkeit von den betroffenen Fingern, werden die Phänotypen in 5 Hauptgruppen (A-E) gegliedert, wobei neue Erkenntnisse bereits zur Definierung von Untergruppen geführt haben (Bell, 1951; Temtamy und McKusick, 1978; Schwabe und Mundlos, 2004; Temtamy und Aglan, 2008; Lehmann u.

a., 2007). In Abb. 1.5 werden in einer schematischen Übersicht die betroffenen Mitglieder des BMP-Signalwegs und ihre assoziierten Handfehlbildungen zusammengefasst (Kjaer u. a., 2006; Lehmann u. a., 2007, 2003, 2006; Hamamy u. a., 2006; Schwabe u. a., 2004, 2000; Oldridge u. a., 2000; Yang u. a., 2008; Polinkovsky u. a., 1997; Thomas u. a., 1996, 1997; Szczaluba u. a., 2005; Faiyaz-Ul-Haque u. a., 2002b, a; Demirhan u. a., 2005; Shore u. a., 2006; van Bokhoven u. a., 2000; Dixon u. a., 2001; Akarsu u. a., 1999).

Fehlbildung										
	BDA2	BDB1	BDB2	BDC	SYM1	SYNS1/2	TCC	AMCD	RS	FOP
Gen	GDF5 BMPR1B	ROR2	NOG	GDF5 BMPR1B	NOG GDF5	NOG GDF5	NOG	GDF5 BMPR1B	ROR2	ACVR1

**Abb. 1.5: Extremitätenfehlbildungen die mit BMP Signalmolekülen assoziiert sind.**

Schematische Darstellung der Handknochen. Die jeweils betroffenen Skelettelemente der BD Typen und Synostosearten sind in schwarz hervorgehoben, wobei grau hinterlegte Kreise progressive Synostoseereignisse darstellen. Für die komplexen Skelettfehlbildungen AMCD (Acromesomele Chondrodysplasien), RS (Robinow Syndrom) und FOP (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva) sind hier beispielhaft die Extremitäten dargestellt. Die jeweils betroffenen Gene sind darunter zugeordnet. TCC: Tarsal-Carpal-Coalition Syndrom. Rezeptoren: BMPR1B, ACVR1, ROR2; Antagonist: NOG; BMP: GDF5. Abbildung modifiziert nach (Temtamy und Aglan, 2008; Schwabe und Mundlos, 2004).

### 1.5 Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

In den 60er Jahren beschrieb Urist erstmals osteoinduktive Faktoren, die er Bone Morphogenetic Proteins nannte. Er machte die Beobachtung, dass demineralisierter Knochen ohne Hitzeinaktivierung eine ektopische Knochenneubildung induziert (Urist, 1965). Jedoch wurden die „knochen-gestaltenden“ Proteine erst 1988 als distinkte Proteine isoliert und identifiziert (Wozney u. a., 1988). Seither hat sich ein beachtliches Forschungsfeld um die Signalproteinfamilie der BMPs etabliert. Neben spezifischen Funktionen während der Knochenentwicklung zeigen BMPs ein multifunktionelles Spektrum in Bereichen der Embryogenese, Homöostase und Alterung von weiteren Geweben und Organen, so dass die Nomenklatur „*Body Morphogenetic Proteins*“ ihr Potential wohl besser beschreibt (Reddi, 2009). In der Extremitätenentwicklung nehmen sie wichtige Funktionen während der Chondrogenese, der Etablierung der Fingeranzahl und Fingeridentität sowie der interdigitalen Apoptose und Gelenkentwicklung ein (zusammengefasst in (Robert, 2007; Wu u. a., 2007)).

Aufgrund ihrer strukturellen Homologie zu den TGFβ-Proteinen wurden die BMPs der TGFβ-Superfamilie zugeordnet. Hier werden insgesamt vier Untergruppen nach ihrer

Sequenzhomologie unterschieden: 1. TGFβs, 2. BMPs/GDFs, 3. Activine/Inhibine und 4. heterogene Gruppe (z.B. NODAL, AMH, LEFTY 1/2). Die Gruppe der BMPs/GDFs nimmt dabei den größten Anteil ein und wird in Tab. 1.1 nach den wichtigsten Funktionen und bisher assoziierten humanen Krankheiten kurz zusammengefasst.

**Tab. 1.1: Auflistung der wichtigsten Funktionen der Mitglieder der BMP/GDF Gruppe und ihrer bisher assoziierten humanen Erbkrankheiten.**

Gen	Synonym	Funktion	humane Krankheiten	OMIM
BMP2	BMP2a	Extremitäten-, Herz-, Augen-, Gelenkentwicklung, Apoptose, Osteoblastendifferenzierung, Haarfollikelbildung	geringe Knochendichte (BMND7)	*112261
BMP3		inhibiert Chondrozytenreifung und Knochenmineralisierung	keine	*112263
BMP4	BMP2b; BMP2b1	Extremitäten-, Herz-, Augenentwicklung, Haarfollikelbildung, Neurogenese	Anophthalmia-Microphthalmia und/oder Retinal Dystrophy, Lippen- und Gaumenspalte	*112262
BMP5		Chondrogenese im Perichondrium, Formgebung der Knochen	keine	*112265
BMP6	VGR1	Chondrogenese, Osteoblastendifferenzierung, Immunantwort, Eisenhomöostase	vermutlich Hemochromatosis	*112266
BMP7	OP-1	Nieren- und Augenentwicklung, Morphogenese, knocheninduktiv	keine	*112267
BMP8	OP-2; BMP8b	in sich entwickelnden Skelettelementen exprimiert	keine	*602284
BMP9	GDF2	Nervensystem, Angiogenese hemmend	keine	*605120
BMP10		Herzentwicklung	keine	*608748
BMP15	GDF9b; POF4	stimuliert Follikelwachstum	vorzeitige Ovarialinsuffizienz (POF)	*300247
GDF1		Links-rechts-Asymmetrie, Gehirnentwicklung	Herzgefäßfehlbildungen: TOF, TGA, DORV	*602880
GDF3	ECAT9; VGR2	Stammzellregulation, Fettgewebemhomöostase, im Gehirn exprimiert	keine	*606522
GDF5	BMP14; CDMP1	Chondrogenese, Gelenkentwicklung und -homöostase in Extremitäten	AMCD:- Du Pan Typ - Grebe Typ - Hunter-Thompson Typ BDA2, BDC, SYM1, SYNS2 Osteoarthritis	*601146
GDF6	BMP13; CDMP2	Augenentwicklung, inhibiert Osteogenese	kongenitale Halswirbelsynostose sehr kleine Augen (MCOP4)	*601147
GDF7	BMP12; CDMP3	Nervensystem, Entwicklung der Samenblase	keine	*604651
GDF8	Myostatin	Muskelentwicklung, hemmt Muskelwachstum	Muskelhyperthrophie	*601788
GDF9		Follikelentwicklung	vermutlich Polycystische Ovarien Zweieiige Zwillinge	*601918
GDF10	BMP3b	exprimiert in Gehirn, Pankreas, Skelettmuskulatur, Lunge, Testis	keine	*601361
GDF11	BMP11	Musterbildung von Mesoderm und Nervengewebe	keine	*603936
GDF15	PLAB; PDF; MIC1	reduziert Wachstum von Granulocyten und Makrophagen	keine	*605312

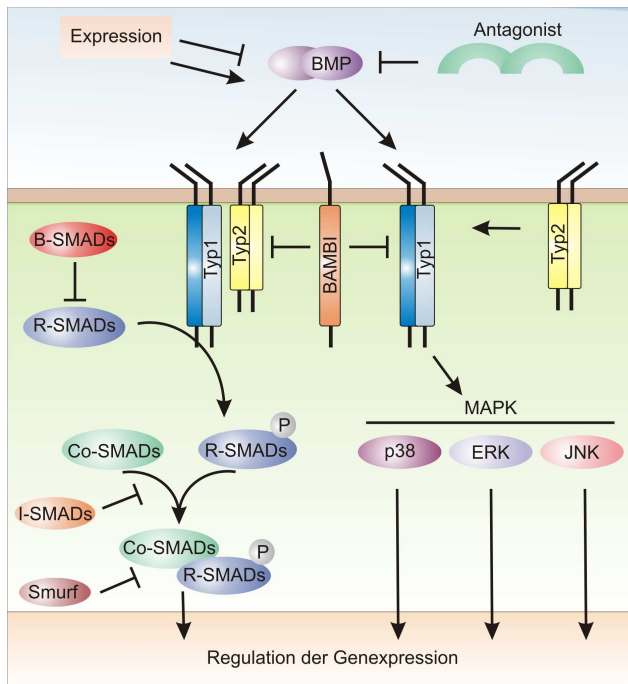
Neben der Heterogenität in ihrer Funktion unterliegen die Signalproteine basierend auf ihrer Sequenzhomologie einem gemeinsamen Mechanismus der Synthese, Prozessierung und Signaltransduktion. Sie werden als Präproprotein synthetisiert, N-terminal beginnend mit dem Signalpeptid, gefolgt von der Prodomäne und abschließend der C-terminalen matura Domäne. Nach der Sezernierung, bei der das Signalpeptid durch Signalpeptidasen abgespalten wird, hilft die Prodomäne als internes Chaperon bei der Proteinfaltung und hält die matura Domäne weitestgehend inaktiv. Mit der Hilfe von Proprotein-Konvertasen wird die Prodomäne abgespalten und somit der Prozess der „Proteinreifung“ abgeschlossen.

Die matura, dimere Form des Signalproteins ist durch einen charakteristischen Cystein-Knoten gekennzeichnet, der durch die sieben hoch konservierten Cysteinreste realisiert wird. Davon bilden sechs Cysteine intramolekulare Disulfidbrücken, wohingegen das vierte Cystein mit einer intermolekularen Disulfidbrücke die Dimerisierung der Signalproteine stabilisiert (Scheufler u. a., 1999). Hierbei ist anzumerken, dass sowohl Homodimere als auch Heterodimere gebildet werden können (Israel u. a., 1996).

### 1.5.1 BMP-Signalweg

Die Signaltransduktion erfolgt über spezifische Rezeptoren. Derzeit sind sieben verschiedene Typ1 Rezeptoren (Alk1-7) und fünf verschiedene Typ2 Rezeptoren für die gesamte TGF $\beta$ -Superfamilie bekannt. Forschungsergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass jedes BMP individuelle Rezeptoraffinitäten zu den verschiedenen Rezeptoren besitzt, was eine Signalgebung abhängig vom Zellkontext ermöglicht. Jedoch ist es den meisten BMPs/GDFs gemein, dass sie eine allgemein höhere Affinität zu den Typ1 Rezeptoren besitzen als zu den Typ2 Rezeptoren. Die jeweils als Dimer vorliegenden Typ1 und 2 Rezeptoren können die BMP-Liganden in einem vorgeformten tetrameren Komplex an der Zelloberfläche binden oder es kommt erst nach Bindung des Liganden am Typ1 Rezeptor zur Rekrutierung des Typ2 Rezeptors. Mit der Ausbildung des finalen Liganden-Rezeptorkomplexes findet nachfolgend eine Transphosphorylierung an den intrazellulären Domänen der Rezeptoren statt und somit eine Aktivierung des Typ1 Rezeptors durch den Typ2 Rezeptor. Die Signaltransduktionskaskade setzt sich je nach Form der Komplexbildung über einen SMAD-abhängigen Signalweg (vorgeformter Rezeptorkomplex) oder über einen MAPK-Signalweg (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) fort. Dabei kommt es zur Interaktion mit weiteren Signalwegen (WNT, Hedgehog und FGF) und einer daraufhin abgestimmten Regulation der Genexpression in der Zelle (Nohe u. a., 2004; Sieber u. a. 2009).





**Abb. 1.6: BMP-Signalweg.**

Erläuterungen im Text.

B-SMADs: SMAD-Bindeproteine;  
 R-SMAD: Rezeptor regulierte-SMADs;  
 Co-SMADs: coaktivierende SMADs;  
 I-SMADs: inhibitorische SMADs;  
 p38, ERK, JNK: verschiedene Mitogen-Activated Protein Kinase-Wege (MAPK);  
 BAMBI: Pseudorezeptor.

Die Aktivität der BMPs/GDFs kann auf verschiedenen Ebenen moduliert werden. Zu denen gehören u.a.:

1. Expressionskontrolle durch cis-regulatorische Elemente;
2. Inhibition durch extrazelluläre Antagonisten (z.B. NOGGIN);
3. Anwesenheit von dominant negativen Pseudorezeptoren (z.B. BAMBI);
4. Blockierung der Signalkaskade durch inhibitorische SMADs (SMAD6/7);
5. Blockierung der Signalkaskade durch SMAD-Bindeproteine (z.B. TOB);
6. Ubiquitinylierung und Proteosomen-gesteuerter Abbau von Komponenten der Signalkaskade (z.B. Smurf-Proteine).

Diese Vielzahl an Regulationsebenen kombiniert mit den differierenden Affinitäten der beteiligten Proteine untereinander ermöglicht die komplexe zeit- und ortsspezifische Aktivität der BMPs/GDFs während allen Entwicklungsstufen des Organismus (Gazzerro und Canalis, 2006).

Im Folgenden wird kurz auf die Expressionskontrolle durch cis-regulatorische Elemente und extrazelluläre Antagonisten eingegangen und daraufhin auf die Vertreter GDF5 und BMP2.

### 1.5.2 Transkriptionelle Regulation

Die einwandfreie zeitlich als auch räumlich abgestimmte Expression der Gene wird durch genomische Informationsverarbeitungseinheiten gewährleistet, auch unter dem Begriff cis-regulatorische Sequenzen (CRS) zusammengefasst. CRSs enthalten Transkriptionsfaktor-Bindestellen von ca. 50 bp - 1,5 kb Größe, die sowohl aktivierend als auch inhibierend in

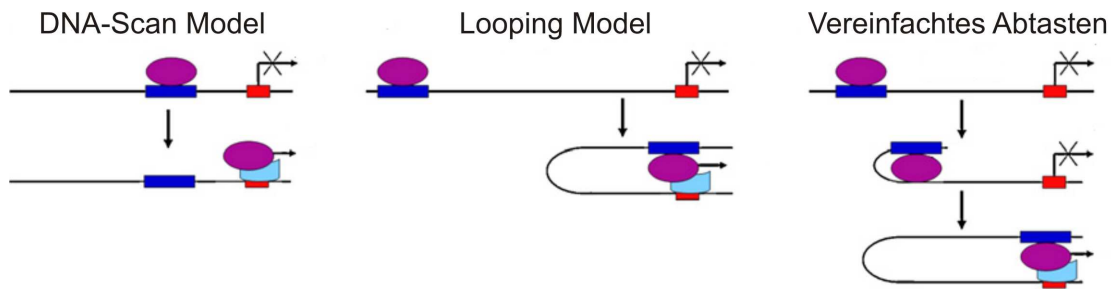
Form von Enhancern, Silencer, Promotoren, Ortskontrollregionen (LRS) und Abgrenzungselemente (Insulatoren) agieren (Jeziorska u. a., 2009). Sie haben die Fähigkeit auch weit entfernt vom Zielgen ihren Einfluss geltend zu machen und können in dieser Hinsicht wenige Basenpaare (bp) bis zu hunderte von Kilobasen (kb) entfernt vom Basalpromotor lokalisiert sein. Zu den möglichen Positionen zählen upstream und downstream vom Gen, in der kodierenden Sequenz des Gens, innerhalb von Introns aber auch auf anderen Chromosomen. Innerhalb der CRS erfolgt die Verarbeitung von Input-Signalen wie die Konzentration eines aktiven Transkriptionsfaktors in Kombination mit Co-Faktoren in einem bestimmten Zelltyp zur definierten Zeit. Zusätzlich kann ein einzelnes Gen durch mehrere CRSs reguliert werden, deren Aktivitäten untereinander Einfluss nehmen und somit ein komplexes vierdimensionales Expressionsmuster ermöglichen (Mortlock u. a., 2003; Chandler u. a., 2007). Darüber hinaus spielt bei der Kontrolle der CRS-Aktivität die Regulation der Chromatinstruktur eine wichtige Rolle (Kouzarides, 2007; Dillon, 2006).

In der Literatur werden drei Modelle zur Wirkweise von CRSs beschrieben, die in Abb. 1.7. schematisch dargestellt sind.

**1. Das DNA-Scan Modell:** Transkriptionsfaktoren binden zunächst an CRS und bewegen sich dann kontinuierlich entlang der DNA bis sie den Basalpromotor des zugeordneten Gens erreichen und aktivieren diesen. Dieses Modell ist kompatibel mit der Funktionsweise von Insulatoren, jedoch erklärt es nicht die Funktionsweise von CRS auf anderen Chromosomen und ist nur für kurze Distanzen realisierbar (Blackwood und Kadonaga, 1998).

**2. Das Looping Modell:** Transkriptionsfaktoren binden fest an CRS und stehen durch DNA-Looping mit dem Promotor und der sich dort bildenden Transkriptionsmaschienerie in direktem Protein-Protein-Kontakt (Wang und Giaever, 1988). Dies wurde durch Ergebnisse mit Chromatin Capture Assays (Dekker u. a., 2002) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (Tolhuis u. a., 2002) untermauert. Mit diesem Modell können die Funktionsweisen von weit entfernten CRSs und interchromosomale Interaktionen erklärt werden, jedoch nicht die Funktion von Insulatoren.

**3. Das Vereinfachte Abtasten:** Dieses Modell vereint das DNA-Scan Modell mit dem Looping Modell. Transkriptionsfaktoren binden fest an die CRS, worauf hin sich der Komplex in eine Richtung entlang der DNA bis zum Promotor bewegt. Dabei wird ein DNA-Loop ausgebildet (Hatzis und Talianidis, 2002; Blackwood und Kadonaga, 1998). Dieses Modell korreliert mit den Insulatoren, den weit entfernten CRSs und der orientierungsunabhängigen Transkriptionsaktivierung. Jedoch ist es unvereinbar mit interchromosomal agierenden CRSs.



**Abb. 1.7: Modelle zur Aktivität von cis-regulatorischen Sequenzen.**

Erläuterungen im Text. Abbildung modifiziert nach (Jeziorska u. a., 2009).

Eine veränderte Genregulation wird in den letzten Jahren immer häufiger als Voraussetzung für Abläufe, die unsere Morbidität und Mortalität beeinflussen, in Verbindung gebracht (Epstein, 2009). So sind laut statistischer Erhebung der Human Gene Mutation Database (HGMD, 2009) bereits 1548 Mutationen aus 912 verschiedenen Genen in regulatorischen Elementen beschrieben, die vererbte Krankheiten im Menschen verursachen. Sie betreffen ein großes Spektrum an morphologischen, physiologischen und neurologischen Phänotypen, wie z.B. Osteoporose (Grant u. a., 1996), Preaxiale Polydaktylie (Lettice u. a., 2003) und Holoprosencephalie (Jeong u. a., 2008).

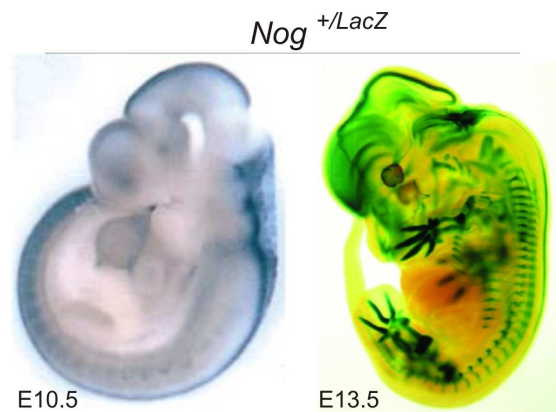
### 1.5.3 Extrazelluläre Antagonisten

Die Signaltransduktion der BMPs/GDFs kann bereits vor der Rezeptorbindung inhibiert werden. Dies wird durch dimerisierte BMP-Antagonisten realisiert, welche ebenfalls sezerniert werden und einen charakteristischen Cystein-Knoten in ihrer Struktur aufweisen. Sie binden mit unterschiedlichen Affinitäten an die BMPs/GDFs, wodurch ihre Rezeptorbindungsstellen blockiert werden (Groppe u. a., 2002). Anhand von Sequenz-Alignment-Studien werden die BMP-Antagonisten in vier Untergruppen gegliedert:

1. Noggin (Nog);
2. Chordin-Familie (Chrd, Chrd11, Chrd12, Amn, Nell1, Nell2, Crim1, Crim2, Crim3);
3. Twisted Gastrulation (Tsg);
4. Dan-Familie (Dan, Grem1, Grem2, Sost, USAG-1, Cer1, Coco, Caronte, Dante)  
(Avsian-Kretchmer und Hsueh, 2004).

Nog ist einer der am besten charakterisierten BMP-Antagonisten. Er bindet in unterschiedlichen Affinitätsgraden an BMP2, 4, 5, 6, 7 und GDF5, 6 (Zimmerman u. a., 1996). Die spezifische Überexpression in Osteoblasten führt *in vivo* zur Reduktion der Knochendichte und erhöhter Frakturanfälligkeit, da die Osteoblastenaktivität vermindert ist

(Devlin u. a., 2003). *In vitro* konnte ebenfalls ein hemmender Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung und –aktivität beobachtet werden (Gazzerro u. a., 1998; Abe u. a., 2000). Demgegenüber ist ein homozygoter *Nog*-Verlust bereits im Embryonalstadium letal, da schwerwiegende Fehlbildungen bei der Neuralrohrformierung, des Axialskeletts und des Herzens auftreten (Wijgerde u. a., 2005; McMahon u. a., 1998; Brunet u. a., 1998; Choi u. a., 2007).



**Abb. 1.8: Expression von *Nog*<sup>+/LacZ</sup>.**

*Nog* ist in der frühen Embryonalentwicklung der Maus im Herz, im Neuralrohr und im Gehirn exprimiert. In E13.5 weitet sich das Expressionsmuster auf Elemente des Axial-, Appendikular- sowie Mandibularskeletts aus. Abbildung modifiziert nach (Stottmann u. a., 2001; Brunet u. a., 1998).

Die Bedeutung von *NOG* spiegelt sich ebenfalls im Menschen wieder, wo heterozygote Missense Mutationen zu proximalen Symphalangismus (*SYM1*) und Multiplen Synostosesyndrom (*SYNS1*) führen (Gong u. a., 1999; Marcelino u. a., 2001; Takahashi u. a., 2001; Lehmann u. a., 2007). Vergleichbare Skelettfehlbildungen lassen sich ebenfalls mit *GDF5* assoziieren (Akarsu u. a., 1999; Wang u. a., 2006; Seemann u. a., 2009; Yang u. a., 2008).

#### 1.5.4 Growth and Differentiation Factor 5 (*GDF5*)

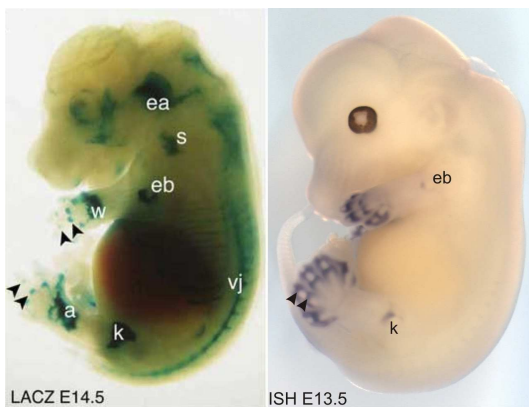
*GDF5* (auch bekannt als *cartilage derived morphogenetic protein* (*CDMP1*) oder *BMP14*) spielt als Mitglied der *TGFβ*-Superfamilie eine essentielle Rolle während der Entwicklung des appendikulären Skeletts. Dies wurde deutlich durch die Assoziation natürlich auftretender Mutationen des *GDF5* mit Fehlbildungen von Extremitäten in Mensch und Maus.

Heterozygote Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5* resultieren in Brachydaktylie vom Typ C (*BDC*), die durch unterentwickelte oder fehlende Phalangen und Metakarpalen der Finger 1, 2, 3 und 5 gekennzeichnet ist (siehe auch Abb. 1.5) (Polinkovsky u. a., 1997).

Homozygote Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5* resultieren in weitaus schwerwiegenden Phänotypen, die als brachypodism in der Maus und als Gruppe der akromesomelen Chondrodysplasien (*AMCD*) im Menschen bekannt sind. Die brachypodism-Maus zeigt

verkürzte Extremitäten, während das Axialskelett nicht betroffen ist (Storm u. a., 1994). Beim Menschen zählen klinisch gesehen das Grebe Syndrom (Faiyaz-Ul-Haque u. a., 2002b; Thomas u. a., 1997), das Hunter-Thompson Syndrom (Thomas u. a., 1996) und das DuPan Syndrom (Faiyaz-Ul-Haque u. a., 2002a) zu den auftretenden komplexen Skelettfehlbildungen. Hierbei stellt das Grebe Syndrom die schwerste Form der Skelettfehlbildung dar, mit hochgradigem Kleinwuchs, extremer Verkürzung der Extremitäten und rudimentären Fingeranlagen.

Während der Extremitätenentwicklung in Maus und Huhn ist Gdf5 in den frühen Knorpelkondensationen, im Bereich der sich bildenden Gelenke (früher Gelenkmarker), im Perichondrium, im Gelenkspalt und in späteren Stadien in der Gelenkkapsel exprimiert (Storm und Kingsley, 1996; Francis-West u. a., 1999b). Dabei beschleunigt Gdf5 die initialen Schritte der Chondrogenese durch erhöhte Zelladhäsion und kontrolliert im weiteren Verlauf die Chondrozytendifferenzierung und -proliferation (Francis-West u. a., 1999a; Hötten u. a., 1996; Nakamura u. a., 1999). Bindungs- und Zellkulturanalysen zeigten, dass GDF5 über seinen Hochaffinitätsrezeptor BMPR1B signalisiert, zusätzlich aber auch BMPR1A nutzt (Sebald u. a., 2004). Beide BMP Typ1 Rezeptoren bilden dabei mit BMPR2 als Typ2 Rezeptor den aktiven Ligand-Rezeptorkomplex.



**Abb. 1.9: Gdf5-Expression.**

Gdf5-cre Rekombination ermöglicht LacZ-Reporterexpression zur Visualisierung der Gdf5-Promotoraktivität. LacZ Expression im Ohr (ea), Schultergelenke (s), Ellenbogen (eb), Handgelenk (w), Knie (k), Knöchel (a), Rückenwirbel (vj) und Phalangen (Pfeilspitzen) im Mausembryo E14.5. Abbildung modifiziert nach (Rountree u. a., 2004). Gdf5-WM-ISH zeigt Expression in Ellenbogen, Knie und interphalangealen Gelenken.

Reporteranalysen des GDF5-Promotors deckten zusätzlich zu den mittels ISH erkenntlichen Expressionsorten im Perichondrium und den Gelenkanlagen noch weitere Expressionsorte im sich entwickelnden Ohr, den Rippen, dem Sternum, im Gesicht und einigen Regionen des Gehirns und Rückenmarks auf. Postnatal wurde zusätzliche Reporteraktivität in Haarfollikeln, Sehnen, Ohrknorpel, Wachstumsfuge sowie Gehirn und Rückenmark beobachtet (Rountree u. a., 2004). Dieses komplexe Muster korreliert mit den veröffentlichten Ergebnissen, dass GDF5 neben der Morphogenese des Gelenks auch eine

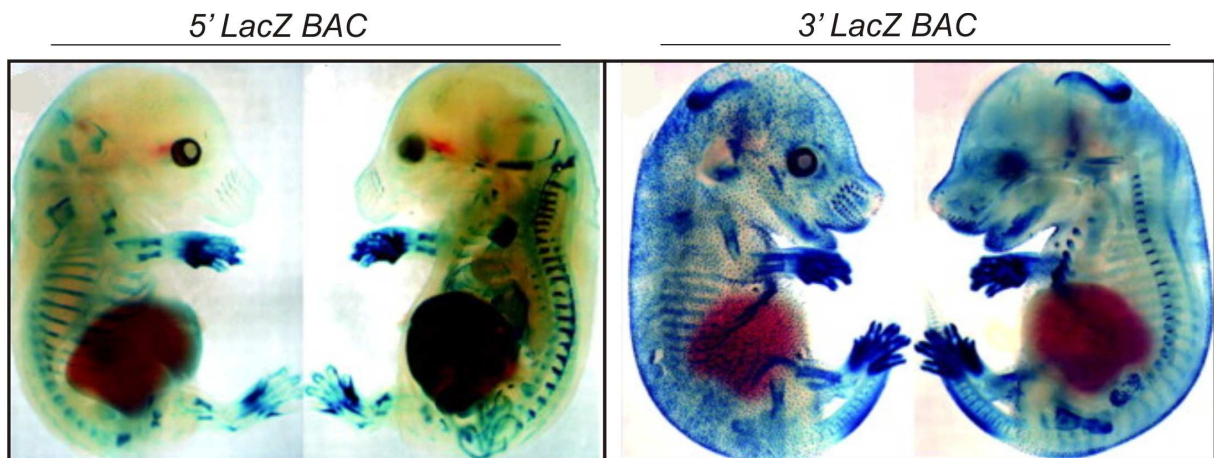
Rolle während der Sehnen und Ligamentformierung (Wolfman u. a., 1997; Aspenberg und Forslund, 1999), der Zahnbildung (Morotome u. a., 1998), der Angiogenese (Yamashita u. a., 1997) und der Neuronendifferenzierung (Sullivan und O'Keeffe, 2005) spielt. Daraus haben sich potentielle klinische Anwendungsmöglichkeiten von GDF5 beispielsweise im Bereich der Behandlung der Parkinson Krankheit (Sullivan und O'Keeffe, 2005), der Knorpelregeneration (z.B. bei Arthrose) (Edwards und Francis-West, 2001) und der Knochenregeneration (z.B. bei nicht heilenden Frakturen, Trauma) (Kim u. a., 2009) entwickelt. Letztgenannte Anwendung wird u.a. bereits mit BMP2 erfolgreich praktiziert.

### **1.5.5 Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2)**

Wie ausführliche Expressionsanalysen von *Bmp2* in Maus und Huhn zeigen, spielt dieser Vertreter der TGF $\beta$ -Superfamilie während der embryonalen Entwicklung vielfältige Rollen bei der Musterbildung, Morphogenese, Zelldifferenzierung und Apoptose. *Bmp2* ist dabei dynamisch in einer Vielzahl von Geweben zeit- und ortsspezifisch exprimiert, wie u.a. in Nieren, Haarfollikel, Zahnanlagen, Darmepithelium und Lunge (Bitgood und McMahon, 1995; Kulesa u. a., 2000; Lyons u. a., 1990, 1989; Dudley und Robertson, 1997). In der frühen Mausentwicklung (E8.5-E9.5) ist *Bmp2* im extraembryonalen Gewebe und im Herzmesoderm exprimiert (Zhang und Bradley, 1996; Lyons u. a., 1989). Ein homozygoter Verlust von *Bmp2* führt auf Grund von Fehlentwicklungen in den letztgenannten Geweben zur Letalität.

Während der Extremitätenentwicklung ist *Bmp2* bei der Musterbildung im AER und Mesenchym exprimiert, was sich im interdigitalen Mesenchym fortsetzt (Hogan, 1996). Hier nimmt *Bmp2* eine wichtige Rolle bei der Initialisierung der apoptotischen Vorgänge zur Fingertrennung ein (Gilbert, 2003). In späteren Stadien ist *Bmp2* maßgeblich an der Knorpel- und Knochenformierung beteiligt. So ist es bei endochondralen Knochen in hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge und im osteogenen Perichondrium exprimiert (Lyons u. a., 1989; Pathi u. a., 1999). Darüber hinaus ist *Bmp2* in der Lage die Osteoblastendifferenzierung zu stimulieren (Chen u. a., 2004a). Die Signalgebung erfolgt bevorzugt über die beiden BMP Typ1 Rezeptoren BMPR1A und BMPR1B, was sowohl in Zellkulturexperimenten als auch über Affinitätsanalysen gezeigt werden konnte (Sebald u. a., 2004). Eine fein abgestimmte Regulation des komplexen Expressionsmusters wird sowohl über den Promotorbereich als auch einer Vielzahl an cis regulatorischen Elementen weit abseits des *Bmp2*-Gens realisiert.

Jedoch konnte bisher nur ein Enhancer-Element in der 3' Region von *Bmp2* für die Expression in Osteoblastenvorläuferzellen genau lokalisiert werden (Chandler u. a., 2007).



**Abb. 1.10: Bmp2 cis-regulatorische Aktivität.**

Whole-mount X-Gal-Färbung von LacZ BAC transgenen Mäuseembryonen E15.5 reflektiert *Bmp2* Expression, die durch cis-regulatorische Sequenzen gesteuert wird. *5' LacZ BAC*: umfasst genomische Sequenz -185 kb bis +53 kb von *Bmp2* Transkriptionsstart. Spezifische Färbung u.a. in Gelenken, hypertrophe Chondrozyten, Darmepithelium, Leber, Lunge, Haut. *3' LacZ BAC*: umfasst genomische Sequenz -2,7 kb bis +207 kb von *Bmp2* Transkriptionsstart. Spezifische Färbung u.a. in Zahnanlagen, Niere, Haarfollikel, Gehirn, interdigitales Mesenchym. Überlappende Färbung beider Konstrukte u.a. in Retina, Schnurrhaare, Zunge. Abbildung verändert nach (Chandler u. a., 2007).

Die Bedeutung von BMP2 bei der ordnungsgemäßen Bildung und Homöostase von Knochen wird durch die Assoziation mit Osteoporose-Krankheitsfällen im Menschen untermauert. So konnten Polymorphismen im Gen identifiziert werden, die eine Osteoporose vor der Menopause bedingen (Styrkarsdottir u. a., 2003). Darüber hinaus steht BMP2 aufgrund seiner osteoinduktiven Fähigkeit im besonderen Fokus für den Einsatz als Therapeutikum (Sykaras und Opperman, 2003). Klinische Anwendungen bei der Knochenregeneration von komplizierten oder nichtheilenden Knochenbrüchen, bei Spinalfusion und bei Unterkieferknochenrekonstruktion wurden bereits erfolgreich durchgeführt (Rihn u. a., 2009; Herford u. a., 2007; Bishop und Einhorn, 2007; Govender u. a., 2002; Hsu und Wang, 2008).



## **2 Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Pathogenese zweier Skelttfehlbildungen, des Multiplen Synostose Syndroms und der Brachydaktylie A2, untersucht werden. Hierbei steht die Korrelation des klinischen Phänotyps und der genetischen Ursache mit der daraus resultierenden funktionellen Veränderung im Vordergrund.

Für das Multiple Synostose Syndrom sollen die GDF5 Mutanten N445T und N445K *in vitro* als auch *in vivo* vergleichend zum Wildtyp GDF5 funktionell untersucht werden. Über die Lokalisation der Mutationen im Sequenzvergleich als auch im 3D-Proteinstrukturmodell und der Korrelation mit den Ergebnissen der ersten *in vitro* Experimente, die eine veränderte Antagonistensensitivität ergaben, sollen vergleichende Analysen mit weiteren Vertretern der BMP/GDF Familie unternommen werden. Dies soll Aufschluss über die Konservierung von essentiellen Protein-Protein-Interaktionsbereichen geben bzw. die Auswirkungen von Sequenzunterschieden verdeutlichen. Somit soll neben der Aufklärung des Pathogenesemechanismus das Verständnis für Mutationen in kritischen Proteinbereichen erweitert werden und funktionell wichtige Sequenzbereiche auch für homologe Proteine identifiziert werden. Daraus abgeleitet wäre dies ein Schritt zur Aufklärung differierender Proteinaffinitäten, was zusätzlich für die Optimierung von BMPs für therapeutische Ansätze in der regenerativen Medizin hilfreich ist.

Für die Brachydaktylie A2 soll die funktionelle Korrelation mit einer Mikroduplikation in einem nicht kodierenden DNA-Sequenzabschnitt 110 kb downstream von *BMP2* untersucht werden. Hierbei wird mit Hilfe einer Reporteranalyse im Mausmodell eine mögliche cis regulatorische Funktion des Mutationslokus analysiert. Es soll somit geklärt werden, ob die nicht kodierende Sequenz Einfluss auf die *BMP2* Expression nimmt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf die kritische Funktion des Mutationsbereiches für die Feinregulation des BMPRII-Signalwegs geben, der bisher mit diesem Phänotyp assoziiert wurde. Zusätzlich sollen somit Einblicke in die Bedeutung von nicht kodierenden Sequenzen auf die Skelettentwicklung und deren Erkrankungen gewährt werden.



### **3 Materialien und Methoden**

#### **3.1 Materialien**

##### **3.1.1 Chemikalien**

Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

##### **3.1.2 Puffer und Lösungen**

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden Puffer und Lösungen nach dem Handbuch *Molecular Cloning* (Sambrook u. a., 2001) hergestellt.

##### **3.1.3 Enzyme**

Die verwendeten Enzyme und Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), New England Biolabs (Ipswich) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und laut Herstellerprotokoll verwendet.

##### **3.1.4 Bakterien und Zelllinien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

*E. coli* Top 10 (Invitrogen) und *E. coli* XL1-Blue (Stratagene).

Des Weiteren wurde folgende Zelllinie eingesetzt:

DF-1 Hühner Fibroblasten (ATCC).

##### **3.1.5 Vektoren**

**Tab. 3.1: Verwendete Vektoren**

<b>Vektor</b>	<b>Referenz</b>
pTA-GFP	Herstellung Arbeitsgruppen-intern
pSLAX-13	(Morgan und Fekete, 1996)
RCAS-A	(Hughes u. a., 1987)
RCAS-B	(Hughes u. a., 1987)
pSfi	(Portnoy u. a., 2005)

### 3.1.6 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 Plus entworfen und von MWG-Biotech AG synthetisiert.

**Tab. 3.2: Primer für Klonierungen.**

Die Primernamen enthalten Speziesabkürzung (h= human, m= mouse), Gensymbol, Position des Primers und angehängte Restriktionsschnittstelle (klein und fett hervorgehoben in Sequenz).

<b>Bezeichnung</b>	<b>Nukleotidsequenz 5'→ 3'</b>
hBMP2-5'-BsmBI	<b>acgtctccc</b> ATGGTTGCCGCCACCCGCTC
hBMP2-3'-BamHI	<b>aggatcc</b> TCAGCGGCACCCGCAGCCCT
mBmp4-5'-BsmBI	<b>gcgtctccc</b> ATGATTCCTGGTAACCGAATG
mBmp4-3'-BamHI	<b>aggatcc</b> TCAGCGGCATCCACACCCCT
mBmp7-5'-BsmBI	<b>acgtctccc</b> ATGCACGTGCGCTCGCTGCG
mBmp7-3'-BamHI	<b>aggatcc</b> CTAGTGGCAGCCACAGGCC
mBmp9-5'-BsmBI	<b>acgtctccc</b> ATGTCCCCTGGGGCCTTCCG
mBmp9-3'-BamHI	<b>tggatctac</b> CTACACCCACACTCA
mBmp10-5'-BsmBI	<b>gatacgtctccc</b> ATGGGGTCTCTGGTTCTGCC
mBmp10-3'-XmaI	<b>gatccccggg</b> CTATCTACAGCCACACTCAGAC
mBmp2-Enh-K1-NotI-for	<b>gactgcgccgc</b> GCCATGGCATTAAATCAGACA
mBmp2-Enh-K1-NotI-rev	<b>gactgcgccgc</b> TTCAGCACACCGTGCTTATC
mBmp2-Enh-K2-NotI-for	<b>gactgcgccgc</b> CAGTTCTCAGGTCCCTGCTG
mBmp2-Enh-K2-NotI-rev	<b>gactgcgccgc</b> GGCCTCCTTCAGAAGACAGA
mBmp2-Enh-K3-NotI-for	<b>gactgcgccgc</b> GTTCGGAGTTCACTGGCTTC
mBmp2-Enh-K3-NotI-rev	<b>gactgcgccgc</b> TGGCTAAAATGCACTGACCA

**Tab. 3.3: Primer für *in vitro* Mutagenesen.**

Die Primernamen enthalten Speziesabkürzung (ch= chicken, h= human, m= mouse), Gensymbol und erzielter Aminosäureaustausch an definierter Position.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
chGdf5 N445K	CCCACCTGGAGCCACCAAACACGCCGTTATCCAAA
hBMP2 N341T	GATCATCTGAACTCCACTACTCATGCCATTGTTTCAGAC
mBmp4 N365T	GATCACCTCAACTCAACCACCCATGCCATTGTGCAGAC
mBmp7 N374T	CCTACATGAACGCCACCACCCACGCCATCGTCCAG
mBmp9 K348L	GACAGCTGGATCATTGCACCCctGGAATATGACGCCTATG
mBmp9 K371N	GACGTGACACCCACCAACCATGCCATCGTGCAG
mBmp9 YH415Q	GGTGCCAACCCTCAAGCAgTATGAGGGGATGAGTGTG
mBmp9 TL412VY	CAAGGATGACATGGGGGTGCCAgtCtaCAAGTACCACTATGAGG
mBmp9 E336K	CTTCTCTCAGGGTGAACTTTaAGGACATCGGCTGGGACAG
mBmp9 TL412VY E336K	CAAGGATGACATGGGGGTGCCAgtCtaCAAGCAgTATGAGG

**Tab. 3.4: Primer für Sequenzierung.**

Die Primernamen enthalten Speziesabkürzung (ch= chicken, h= human, m= mouse), Gensymbol, Position des Primers und Orientierung.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'
chGdf5-429-for	CTCCTTCAAACGAAGAAGA
chGdf5-929-for	TCGAACTGGAACTTTTGAC
hBMP2-443-for	CAGAGCTTCAGGTTTTCCG
hBMP2-846-for	TCAAGCCAAACACAAACAGC
mBmp4-454-for	CGTTTCCTCTTCAACCTCAG
mBmp4-909-for	ACGTAGTCCCAAGCATCACC
mBmp7-406-for	GTCAACCTAGTGGAACATGAC
mBmp7-979-for	CAGGCCTGCAAGAAACATG
mBmp9-1019-rev	CAGCCGATGTCCTCAAAGTT
mBmp9-799-for	ACCAGACTGGAGCTGAAGGA
mBmp10-333-for	ACTGTTTTCTCAACCAGTCAC
mBmp10-853-for	AGGATCTGGACCTGGACTCA
mBMP2-Enh-seq1-for	CATCAGGCCACACTAAAAGG
mBMP2-Enh-seq2-for	CCTACTTTCAAAGCCCCACA
mBMP2-Enh-seq3-for	CAAGTCACTTTTAGTTAGTTGTTCTTGG
mBMP2-Enh-seq4-for	GTGATGCTTCAAAAAGTTGTCC

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5'→3'
mBMP2-Enh-seq5-for	GCTGAAATCCATGAACCACA
mBMP2-Enh-seq6-for	CAATTCATTACACCGTAAACTGTCC
mBMP2-Enh-seq7-for	CCAGGTGAAATGGTCACTCCT
mBMP2-Enh-seq8-for	GGATGAACAAGGAGCAAAAGC
mBMP2-Enh-seq9-for	CCATGGTCAGTGCATTTTAGC
mBMP2-Enh-seq10-for	AGATGTGGACCCGAATGAAG
mBMP2-Enh-seq11-rev	ACAAAGCAAACCCAACCTG
mBMP2-Enh-seq12-rev	CCGGGTAAGGATGACACAAG
mBMP2-Enh-seq13-rev	GGTATGCACAAGTGGCAGAA
lacZ_322_rev	AATGGGATAGGTTACGTTGGTG
lacZ_2832_for	GAATTATGGCCCACACCAGT
Sp6	CATTTAGGTGACACTATAG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
RCAS5-ClaI_-68-for	ACGCTTTTGTCTGTGTGCTGC
RCAS3-ClaI_+331-rev	ATCTCTGCAATGCGGAATTCAGTG

**Tab. 3.5: Primer für Sondenamplifikation.**

Für die aufgeführten Gene sind jeweils die flankierenden Primer der Sondensequenz und die Sondenlänge aufgelistet.

Gen	5'-Primer	3'-Primer	bp
mBmp9	ACGTAAGGTGTGAAGGAAG GAG	GCCTTGTCCTCTGTGGAGTCC	628
mBmp10	CAAAGCAATGACAAGGAGC A	AGACACAGCCATCCCTTCAT	470
BMP-Rezeptoren			
mAlk1 (Acvr11)	ATGACCTTGGGGAGCTTCA G	CTAGTGAATCACTTTGGGC	1509
mAlk3 (Bmpr1a)	ATGACTCAGCTATACACTT AC	TCAAATCTTTACATCCTGGGA	1598
mAlk6 (Bmpr1b)	ATGCTCCTTACGAAGCTC	TCAGAGTTTAATGTCCTGGGAC	1508
mBmpr2	GTGAGGTCAACAACAATG GC	GACCTTTAGAAAATGGTCCAA	474

**Tab. 3.6: Primer für weitere Anwendungen.**

Verwendung: Genotypisierung von transgenen Mäusen, Real Time-PCR (RT-PCR).

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	Verwendung
Hsp68-lacZ-pro1-rev	GTAAAACGACGGGATCATCG	Genotypisierung
Hsp68-lacZ-pro2-rev	GTCTGGTGGAGCTTCCCC	Genotypisierung
mBmp2-K2-geno-for	TCTGTCTTCTGAAGGAGGCCGCGGCC	Genotypisierung
chGAPDH_RT_for	GATGATGTTCTGGCAGCACCTC	RT-PCR
chGAPDH_RT_rev	GATTCTACACACGGACACTTCAAGG	RT-PCR
chβ-Actin_RT_for	CAACAGAGAGAAGATGACACAGATCA	RT-PCR
chβ-Actin_RT_rev	ACAGCCTGGATGGCTACATACA	RT-PCR
chNog_RT_for	TCTGTCCCAGAAGGCATGGT	RT-PCR
chNog_RT_rev	CGCCACCTCAGGATCGTTAA	RT-PCR
mGAPDH_RT_for	TCTTCTGGGTGGCAGTGATG	RT-PCR
mGAPDH_RT_rev	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	RT-PCR
mβ-Actin_RT_for	CGTGAAAAGATGACCCAGATCA	RT-PCR
mβ-Actin_RT_rev	GGG ACA GCA CAG CCTGGA T	RT-PCR
mBmp9_RT_for	AGGTTCCAAAAACCTGCCCT	RT-PCR
mBmp9_RT_rev	TTGCTGCGGTCATTGGAGA	RT-PCR

### 3.1.7 Kits

**Tab. 3.7: Verwendete molekularbiologische Reaktionssysteme.**

Kit	Hersteller
BigDye Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems
DIG RNA Labeling Kit	Roche
Gel out extraction Kit	A&A Biotechnology
PCR Purification Kit	OMNI Life Science GmbH
Plasmid DNA Mini Kit	A&A Biotechnology
Plasmid Midi Kit (Nucleobond PC 100)	Macherey-Nagel
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNeasy Kit	Qiagen
SYBR green PCR Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories Inc.

### 3.1.8 Medien, Puffer und Einwegartikel für die Zellkultur

Die benutzten Medien, Puffer und Supplemente für die Zellkultur wurden von der Firma Cambrex bezogen und gemäß Herstellerempfehlungen eingesetzt.

Benötigte Einwegartikel aus Plastik, wie Zellkulturschalen und –platten bzw. Stripetten, wurden von der Firma TPP<sup>®</sup> bzw. Costar<sup>®</sup> verwendet.

### 3.1.9 Geräte

#### Zentrifugen:

Mikrotiterplattenzentrifuge 5416	Eppendorf
Mikrozentrifuge 5415 D	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5	Thermo Electron
Ultrazentrifuge L7.55	Beckmann

#### Thermocycler:

GeneAmp PCR System 2720	Applied Biosystems
Real-time Cycler ABIPrism 7900 HT	Applied Biosystems

#### Mikroskope und Digitalkamera:

Binokular MZ12	Leica Mikrosysteme
Mikroskop Leica DMR	Leica Mikrosysteme
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss MicroImaging
Digitalkamera AxioCam HRc und MRC5	Carl Zeiss MicroImaging

#### Gewebepräparation:

Entwässerungsautomat TP 1020	Leica
Einbettstation EC 350 1/EC 350 2	Microm
Hybridisierungsöfen OV 2	Biometra
Mikrotom Cool Cut oder 2050 Supercut	Microm oder Reichert Jung
Vibratom HM650V	Microm

### 3.1.10 Computerprogramme und Datenbanken

Tab. 3.8: Verwendete Programme und Datenbanken.

Programm	Verwendung
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung
Axio Vision 4.6	Digitale Photoaufnahmen
Chimera	Proteinstrukturanalysen
Chroma	Alignmentcoloration
Corel Draw 12.0	Bildbearbeitung
DNA-Star (EditSeq, MapDraw, SeqMan)	Sequenzbearbeitung und -auswertung
Easy Win 32	Geldokumentation
ENSMBL	Bioinformatische Genomdatenbank
GraphPad Prism	Datenauswertung / Diagramme
MGI	Maus-Genom Datenbank
NCBI	Bioinformatische Genomdatenbank
PDB	Datenbank für Proteinstrukturen
Primer3 Plus	Primerdesign und -check
pubmed	Literaturdatenbank
SDS 2.1	Real Time PCR Datenauswertung
T-Coffee	Multiples Sequenz Alignment
UCSC	Bioinformatische Genomdatenbank
Vector NTI 10.0	Sequenzanalysen, Vektorkartenherstellung

## 3.2 Allgemein Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken, wie Bakterienaufzucht, Medienherstellung, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau oder Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt, wie sie in dem Handbuch *Molecular Cloning* beschrieben sind (Sambrook u. a., 2001).

### 3.2.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung von Mäuseembryonen wird Amnionsackgewebe über Nacht (üN) bei 55 °C in 0,5 ml Proteinase K-SDS-Puffer (0,85 % SDS; 17 mM EDTA; 170 mM NaCl; 17 mM Tris/HCl, pH 7,5; 200 µg/ml Proteinase K) verdaut. Anschließend werden 250 µl 5 M NaCl-Lösung zugegeben und für 10 min bei 55 °C

und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 9000 UpM werden 500 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml eiskaltem 100 % Ethanol überführt. Der Fällungsprozess der DNA wird für 10 min bei -20 °C fortgeführt, wonach erneut für 20 min bei 13000 UpM zentrifugiert wird. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, danach an der Luft getrocknet und anschließend in 100 – 200 µl Wasser aufgenommen.

### **3.2.2 Isolierung von Plasmid DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das Plasmid DNA Mini Kit der Firma A&A Biotechnology (Gdynia, Polen) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab (Midi- und Maxipräparation) erfolgte nach Herstellerangaben mit den Kits Nucleobond PC100 bzw. PC500 von Macherey-Nagel.

### **3.2.3 Isolierung von BAC-DNA**

5 ml Übernachtskultur werden bei 3000 UpM für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wird das Zellpellet vorsichtig mit einer gekappten 1 ml-Pipettenspitze in 300 µl L1- Puffer des Plasmid DNA Mini Kit der Firma A&A Biotechnology (Gdynia, Polen) resuspendiert. Mit 300 µl L2-Puffer erfolgt die Lyse der DH10B Zellen für maximal 3 min bei RT. Durch Zugabe von 300 µl G13 Puffer werden die Zellproteine 5 min auf Eis gefällt und mittels 20 minütiger Zentrifugation bei 10.000 UpM bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wird in 800 µl Isopropanol für 10 min auf Eis überführt, was die Fällung der BAC-DNA herbeiführt. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 10.000 UpM für 10 min bei 4 °C. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol gespült, trocken pipettiert, jedoch nicht an der Luft getrocknet und schließlich in 40 µl H<sub>2</sub>O sehr behutsam resuspendiert. Die Lagerung der DNA ist für einige Wochen bei 4 °C möglich.

### **3.2.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Zur Isolierung gewünschter DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen oder Restriktionsverdau wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung das Gel Out Kit der Firma A&A Biotechnology (Gdynia, Polen) verwendet. Die Aufreinigung erfolgt durch die Adsorption an eine Silika-Matrix nach den Angaben des Herstellers.



PCR Produkte, die keine Trennung von weiteren DNA-Fragmenten bedürfen, wurden mit dem PCR Purification Kit der Firma A&A Biotechnology (Gdynia, Polen) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA wurde mit peqGOLD TriFast (peqLab) isoliert. Hierzu wird das Gewebe in mindestens zehnfachem Volumen TriFast mit Hilfe des Tissue Lyser (Qiagen) homogenisiert. Anschließend werden pro ml TriFast 200 µl Chloroform zugegeben, gut geschüttelt und für 3 min bei RT inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 15 – 20 min bei 4 °C und 13000 UpM wird eine Phasentrennung erzielt. Zur Fällung der RNA wird die obere wässrige Phase, vorsichtig und ohne Interphase oder organische Phase mitzunehmen, abgenommen und mit 500 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und kurz gemischt. Nach 10 min Inkubation bei RT wird erneut für 15 – 20 min bei 4 °C und 13000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen, kurz bei RT getrocknet und in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Für eine besondere Reinheit der RNA wird diese anschließend über Qiagen RNeasy Mini-Säulchen nach dem RNA-Cleanup-Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Zur Entfernung von Kontaminationen durch genomische DNA wird während der Aufreinigung über RNeasy-Säulchen ein DNase-Verdau mit dem RNase-freien DNase Set (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 3.2.6 Herstellung von cDNA

Die benötigte cDNA für die qRT-PCR wird mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems) nach Anleitung des Herstellers mit jeweils 1 µg Gesamt-RNA in 100 µl Reaktionsvolumen hergestellt. Dabei werden Random Hexamer-Primer verwendet.

Für die Amplifikation von Sonden und Genen aus cDNA wird die cDNA mit Hilfe des Kits SuperScript II (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers mit Oligo(dT) Primer hergestellt.

### 3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die meisten Sequenzen mit Hilfe einer Standard PCR Methode unter Verwendung der *Taq*- oder *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert. Die *Taq*-DNA-Polymerase produziert 3' A-Überhänge, besitzt keine Fehlerkorrektur und wurde vornehmlich für Sondenklonierung, Kolonie-PCR und Genotypisierung eingesetzt. Für die Amplifizierung

von Genen und deren Mutagenese wurde stets die *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, die zur Korrektur von Fehlern eine 3'-5' Exonucleaseaktivität besitzt.

Menge	Reagenz
20-100 ng	DNA-Matrize
5 µl	10x DNA-Polymerase Reaktionspuffer (Fermentas)
1 µl	dNTPs (12,5 mM, Fermentas)
1 µl	5'-Primer (10 pmol/µl, MWG)
1 µl	3'-Primer (10 pmol/µl, MWG)
1 µl (ca. 0,5 U)	DNA-Polymerase (im Institut hergestellt)
add 50 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	3 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	35
Primer-Annealing	55-65 °C (je nach T <sub>m</sub> )	30 sec	
Elongation: <i>Taq</i> -Polymerase <i>Pfu</i> -Polymerase	72 °C 68 °C	1 min/1 kb 30 sec/1 kb	
Finale Elongation: <i>Taq</i> -Polymerase <i>Pfu</i> -Polymerase	72 °C 68 °C	7 min	
Kühlung	4 °C	∞	

im Thermocycler (GeneAmp; Perkin Elmer)

Die Optimierung von PCR Reaktionen erfolgte je nach Anwendung mit einer Veränderung der DNA-Matrizen Konzentration, der Zugabe von 5-10% DMSO, Verwendung von Touch down PCR Programmen (schrittweise Verringerung der Annealing Temperatur von 68 °C auf 55 °C) und Nested-PCR Strategie (1. PCR: Verwendung von Primern, die außerhalb der zu amplifizierenden Sequenz liegen; 2. PCR: Primer für Zielsequenz).

Abschließend erfolgte die Analyse der PCR mit einer Agarosegelelektrophorese mit 1 %igem Agarosegel.

### Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Verifizierung der erhaltenen Klone nach Ligation und Transformation auf erfolgreiche Insertion des amplifizierten Inserts und dessen Orientierung im Vektor. Dabei wurde anstatt isolierter DNA etwas Bakterienmaterial als Ausgangsmaterial für die PCR eingesetzt. Mit geeigneter Wahl der Primer wird das Vorhandensein des Inserts im Vektor (Sp6/T3/T7) und gegebenenfalls die Orientierung (ein Vektorprimer (Sp6/T3/T7) und ein Insertprimer) ermittelt.

Reaktionsansatz:

Menge	Reagenz
2 µl	10 x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (1,25 mM)
0,4 µl	5'-Primer
0,4 µl	3'-Primer
0,25 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
16,45 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	
96 °C	30 sec	40
55 °C	30 sec	
72 °C	2,5 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Je nach Anzahl der zu testenden Klone wird ein „Master-Mix“ für alle Ansätze hergestellt, der dann in 20 µl Aliquots auf die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße verteilt wird. Die zu testenden Kolonien werden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und das Bakterienmaterial zunächst auf eine Replika-Platte übertragen. Anschließend wird der Rest des Bakterienmaterials an der Pipettenspitze mit dem PCR-Ansatz gut vermischt. Die Replika-Platte wird üN bei 37 °C inkubiert, um gegebenenfalls von positiven Klonen Übernachtskulturen animpfen zu können.

### Sequenzierung

Nach Vorselektion der Klone auf erfolgreiche Insertion des Inserts in den Vektor und dessen Orientierung erfolgte üblicherweise eine genaue Überprüfung mittels Sequenzierungen nach der Ketten-Abbruch-Methode (Sanger et al., 1977). Dabei wurde BigDye v3.1 (Applied Biosystems) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Menge	Reagenz
1 µl	BigDye Sequenziermix
2 µl	5 x BD-Reaktionspuffer
1 µl	Sequenzierprimer
50-100 ng	Plasmid-DNA
add 10 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	1 min	
96 °C	10 sec	40
50 °C	10 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

Direkt vor der Fällung der DNA nach der Sequenzier-PCR wird der Ansatz mit 1 µl 2 %igem SDS versehen und für 10 min bei 98 °C inkubiert um eventuell entstandene Aggregate zu lösen. Die Fällung erfolgt durch Zugabe von 25 µl 100 % EtOH bei 4000 UpM und 4 °C für 1 h. Danach wird das DNA-Pellet 2 x mit 150 µl 70 % EtOH bei 4000 UpM für 30 min gewaschen und abschließend kurz trocken-zentrifugiert. Die Analyse der Sequenzierplatte wurde am Institut für Medizinische Genetik der Charité mit einem ABI 3730 Kapillarsequenzierautomaten (Applied Biosystems) durchgeführt.

**Genotypisierung**

Für alle Genotypisierungs-PCRs wurde genomische DNA aus Amnien gewonnen. Standardmäßig wurde die gefällte DNA in 100-200 µl H<sub>2</sub>O bidest aufgenommen und gegebenenfalls 1:10 oder 1:20 verdünnt. Im Folgenden sind alle PCR-Programme der erstellten Transgenkonstrukte aufgeführt.

***mBmp2-Enhancer K1 in pSfi-Hsp68LacZ***

Reaktionsansatz:

Menge	Reagenz
20-50 ng	genomische DNA
2 µl	10x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (1,25 mM)
0,5 µl	mBmp2-Enh-seq10-for
0,5 µl	lacZ_322_rev
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
add 20 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	
96 °C	30 sec	40
57 °C	30 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

wt: keine Bande    mut: 1200 bp

***mBmp2-Enhancer K2 in pSfi-Hsp68LacZ***

Reaktionsansatz:

Menge	Reagenz
20-50 ng	genomische DNA
2 µl	10x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (1,25 mM)
0,5 µl	mBmp2-K2-geno-for
0,5 µl	Hsp68-lacZ-lang-rev
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
add 20 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	
96 °C	30 sec	40
64 °C	30 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

wt: keine Bande    mut: 3000 bp

***mBmp2-Enhancer K3 in pSfi-Hsp68LacZ***

Reaktionsansatz:

Menge	Reagenz
20-50 ng	genomische DNA
2 µl	10x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (1,25 mM)
0,5 µl	mBmp2-Enh-seq8-for
0,5 µl	Hsp68-lacZ-kurz-rev
0,2 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
add 20 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklen
96 °C	5 min	
96 °C	30 sec	40
57 °C	30 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

wt: keine Bande    mut: 1400 bp

**Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)**

Die relative Quantifizierung von RNA, ein Maß für die Transkription eines Gens, erfolgt durch die spezifische Bindung von SYBR Green an doppelsträngige DNA während einer PCR-Reaktion. Dabei wird die Zunahme der Fluoreszenz durch die Zunahme des amplifizierten Produkts in Echtzeit gemessen.

Um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen, werden Intron-überspannende Primerpaare verwendet. Die Primer wurden mit Hilfe der Software Primer Express (Applied Biosystems) nach den empfohlenen Spezifikationen des Herstellers ausgewählt. Die RT-PCR

wird in einem 18 µl Reaktionsansatz in 384-Well Platten auf einem ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Pipettierschema für einen qRT-PCR Ansatz:

Menge	Reagenz
6 µl	cDNA Verdünnung
3 µl	Primermix (4,5 pmol pro Primer)
9 µl	SYBR Green PCR Master Mix (2x)

Alle cDNA Proben (1:10 Verdünnungen nach reverser Transkription) wurden in Triplikaten eingesetzt, wobei ebenfalls eine cDNA-Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Standardkurve vorgenommen wurde. Die Auswertung erfolgte mit der SDS 2.0 Software, wonach eine relative Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe der Standardkurvenmethode durchgeführt wurde. Zum Abgleich der cDNA Mengen wurden die Haushaltsgene *Actin* und *Gapdh* verwendet.

### 3.3 Klonierungsstrategien

#### 3.3.1 Sondenklonierung

Als Zielsequenz wurde meistens das 3'-Ende der kodierenden Kandidatensequenz inklusive der 3'-UTR mit einer Länge von ca. 500 bp gewählt. Um die Spezifität der Sonde zu gewährleisten wurde die zu amplifizierende Sequenz noch gegen das Mausgenom abgeglichen und bei Bedarf verändert. Zeigte die Sonde eine zu geringe Spezifität nach Abgleich mit dem Mausgenom oder nach erfolgter *in situ* Hybridisierung, wurde, soweit umsetzbar, eine Sonde hergestellt, die die komplette kodierende Sequenz des Zielgens umfasst (Primerauflistung siehe Tab. 3.5). Mit einer PCR auf Maus-cDNA (E12.5-E14.5, sowie Gehirn adult) wurde die Sequenz amplifiziert und über TA-Klonierung in pTA-GFP ligiert. Es folgte die Transformation in Top10 CC. Die Selektion auf erfolgreiche Insertion der Sondensequenz in den Vektor sowie die Bestimmung der Orientierung erfolgte mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung. Bereits vorhandene Sondenvektoren: *chNog* (Pathi, Rutenberg et al. 1999), *mBmp2*, *mBmp4*, *mBmp7*, *mGdf5*, *mNog* (Albrecht, Schwabe et al. 2002).

### 3.3.2 Klonierung von Kandidaten für Überexpressionsexperimente mittels RCAS

Die kodierende Sequenz des Kandidatengens wurde mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase aus Maus-cDNA (E12.5-E14.5, sowie Gehirn adult) amplifiziert, was eine geringe Fehlerquote sicherstellte. Dabei wurden Primer mit der benötigten Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in pSLAX verwendet. Nach der Zwischenklonierung in pTA-GFP und Verifikation durch Sequenzierung erfolgte die Umklonierung durch spezifischen Restriktionsverdau in pSLAX. Dabei war darauf zu achten, dass am 5'-Ende des Gens eine *NcoI/BsmBI/BbsI* Schnittstelle und am 3' Ende eine *BamHI/EcoRI/XmaI* Schnittstelle mittels der designten Primer angefügt wurde. Die Auswahl der Schnittstelle richtete sich nach der Abwesenheit der Schnittstelle im Gen selbst. Die gerichtete Insertion des Gens ermöglicht die korrekte Positionierung des Gens hinter die Kosac-Sequenz in pSLAX. Mittels *ClaI* Verdau wird die Expressionskassette aus den Shuttlevektor pSLAX in den retroviralen Vektor RCAS-A oder RCAS-B transferiert, wobei mittels Kolonie-PCR auf die richtige Orientierung gescreent werden mußte.

### 3.3.3 *In vitro* Mutagenese

Punktmutationen innerhalb eines Gens wurden mit Hilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) eingeführt. Dafür wurden zunächst 2 komplementäre Primer mit der integrierten Mutation bei MWG bestellt und nachfolgend für eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase auf das zu mutierende Gen, welches sich in pSLAX befindet, genutzt. Das DNA-Template wird nach der PCR mittels einstündigem *DpnI*-Verdau bei 37 °C beseitigt und der mutierte Vektor nach Standard-Protokoll in *E. coli* Top10 (chemisch kompetent) transformiert. Eine Überprüfung der Mutagenese per Sequenzierung ist unerlässlich.

### 3.3.4 *LacZ*-Expressionsvektor für Enhancerstudien

Der potentielle Enhancerbereich in der 3' Region von *mBmp2* wurde mit Hilfe der *Pfu*-Polymerase aus der DNA des BAC-Klons RPC124-82A15 mit den entsprechenden Primern (siehe Tab. 3.2) amplifiziert und zunächst in pTA-GFP zwischenkloniert. Es folgte eine Verifizierung der Enhancersequenz per Sequenzierung und eine Umklonierung in den Reportegenvektor *pSfi-Hsp68LacZ* über *NotI* Schnittstellen. Mittels Kolonie-PCR wurde nach erfolgreicher Insertion und korrekter Orientierung gescreent und dies per Sequenzierung bestätigt. Daraufhin wurden 30 µg Plasmid-DNA mit *SalI* linearisiert und über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung der linearisierten DNA nach

Verwendung des Gel Out Kits (A&A Biotechnology) wurde mit einem Konzentrationsgel und einer Nanodrop-Messung vorgenommen. Es ist zu beachten, dass für die Elution der DNA von den Gel Out Säulchen bereits der Injektionspuffer (10 mM TrisHCl; 0,1 mM EDTA; pH 7,6) für die späteren Injektionen der Oocyten benutzt wurde.

### 3.4 Zellbiologische Methoden

#### 3.4.1 Mikromass Kulturen vom Huhn

Mit Hilfe der Mikromass Kulturen (MM) können umfangreiche Analysen der Knorpeldifferenzierung unter definierten Bedingungen vorgenommen werden. Die Präparation und Kultivierung der Zellen wurde bereits ausführlich beschrieben (DeLise u. a., 2000; Morgan und Fekete, 1996). SPF-Eier werden 4,5 Tage bei 38 °C in einem Eierinkubator bebrütet. Daraufhin erfolgt die Präparation der Embryonen (HH22-HH24) aus dem Ei mit Überführung in PBS. Die Extremitätenknospen werden mit einer Pinzette abgetrennt, in HBSS gesammelt und anschließend ca. 15 min bei 37 °C mit Dispase (3 mg/ml in HBSS) verdaut. Das sich dabei lösende Ektoderm wird durch mehrmaliges Waschen mit HBSS entfernt und es folgt die Auflösung des Zellverbandes durch einen Verdau mit 0,1 % Collagenase TypIa; 0,1 % Trypsin; 5 % FCS in PBS ohne Ca/Mg bei 37 °C für 30 min mit nachfolgender Zugabe von 1 ml chMM –Medium (DMEM:F12; 10 % FCS; 0.2 % CS; 1 % Pen/Strep; 1 % L-Glutamin), Vereinzelung der Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren und Filtration der Zellsuspension durch ein Zellsieb (40 µm, BD Falcon). Nach Bestimmung der Zellzahl und Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 min wird die Zellzahl auf  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt, woraufhin 10 µl-Tropfen der Zellsuspension in 24 Well Zellkulturplatten ausgesät und nach erfolgter Anheftung der Zellen (ca. 1 h) mit chMM–Medium bedeckt werden. Das Medium wird alle 2-3 Tage gewechselt.

Zur Überexpression von Genen werden die Zellen mit replikations-kompetenten Retroviren infiziert. Die hier verwendeten Retroviren (RCAS-A und RCAS-B) basieren auf dem Rous-sarcoma-Virus und infizieren Hühnerzellen mit hoher Effizienz. Zur Infektion mit einem Virus bzw. Co-Infektion mit zwei Viren (RCAS- A und RCAS-B) wird vor dem Ausplattieren der Zellen jeweils 1 µl des Viruskonzentrats und bei Bedarf Medium zum Auffüllen hinzugefügt und danach je 12 µl ausgesät. Bei diesem Schritt ist auf eine Angleichung des Virustiters aller Viren in einem Experiment zu achten.



Zur Stimulierung der Zellen mit rekombinanten Proteinen wird 24 h nach Zellaussaat ein Mediumwechsel vorgenommen, wobei pro Well 1 ml Medium mit dem gewünschten rekombinanten Protein supplementiert wird. Verwendete rekombinante Proteine: rhGDF5 und rh GDF5 N445T (Biopharm GmbH, 10 mM HCl); rhBMP2 (von W. Sebald zu Verfügung gestellt, 4 mM HCl, 0,1 % BSA); rhBMP9 (R&D Systems, 4 mM HCl, 0,1 % BSA); rhNOG (Regeneron Pharmaceuticals Inc., 0,1 % BSA/PBS).

### 3.4.2 Anzucht und Präparation von RCAS-Viren

#### Anzucht

Um infektiöse RCAS-Viren nach dem Klonierungsprozess für Überexpressionsexperimente zu erhalten und zu amplifizieren, werden Verpackungszellen benötigt. Dafür wird die Hühnerfibroblasten-Zelllinie DF-1 bei 70 % Konfluenz mit 3 µg RCAS-Konstrukt unter Verwendung von 10 µl ExGene 500 (Fermentas) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Daraufhin werden die Zellen mehrfach passagiert unter Verwendung des DF1-Standardmediums (DMEM 1 g/l Glucose, w/o L-Glutamin; 10 % FCS; 2 % CS; 1 % Pen/Strep; 1 % L-Glutamin), bis 6 Zellkulturschalen mit 15 cm Ø konfluent sind. Es folgt ein Mediumwechsel auf 15 ml DF1- Hungermedium (DMEM 1 g/l Glucose, w/o L-Glutamin; 1 % FCS; 0,2 % CS; 1 % Pen/Strep; 1% L-Glutamin), indem sich die Viruspartikel nach Inkubation üN ansammeln. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wird der Virusüberstand abgenommen und nach Schockgefrieren in flüssig N<sub>2</sub> bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

#### Transfektionstest

Während der Anzucht werden die DF1 Zellen zur Sicherstellung der RCAS-Produktion einem Transfektionstest unterzogen. Dabei werden transfizierte DF1-Zellen in einer 24-Well Zellkulturplatte für 15 min mit 4 % PFA fixiert. Daraufhin werden nach dreimaligem Waschen mit PBS die Zellen mit MST (DMEM; 10 % FCS; 0,2 % Triton-X-100) für 30 min geblockt und danach für 30 min mit dem monoklonalen RCAS-Antikörper 3C2 (als Zellüberstand aliquotiert vorliegend) 1:5 verdünnt in MST bei RT inkubiert. Es folgt dreimaliges Waschen mit MST und die Detektion für 30 min mit dem Zweitantikörper Alexa 488 goat anti-mouse (Molecular Probes), der 1:1000 in MST zusammen mit DAPI eingesetzt wird. Nach abschließendem dreimaligem Waschen mit PBST wird die Anfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop (Fluoreszenz Axiovert 200) ausgewertet.

### **Virusaufkonzentrierung**

Der eingefrorene Virusüberstand wird bei 37 °C aufgetaut und auf Eis durch einen 0,45 µm Durapore-Filter (Millipore) mit Vorfilter (Millipore Glass Fibre Prefilter) filtriert. Anschließend werden die Viren durch Ultrazentrifugation bei 22000 UpM (Rotor SW-32; Beckman) für 3 h bei 4 °C pelletiert. Nach Abkippen des Überstandes wird das Pellet in dem verbleibenden Medium im Zentrifugenröhrchen für 1 h in einem Eisbad auf einem Schüttler resuspendiert. Anschließend werden 30 µl Aliquots in flüssig N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **Titerbestimmung**

Zur Bestimmung des Virustiters werden von den konzentrierten Retrovirus-Überständen Verdünnungen von  $1 \times 10^{-3}$  bis  $1 \times 10^{-6}$  angesetzt. DF-1 Zellen werden in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät, indem die konfluenten Zellen von einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche trypsinisiert und anschließend auf eine Zellzahl von  $7,6 \times 10^4$  Zellen/ml eingestellt werden. In jedes Well werden nun 1 ml Zellsuspension ausgesät, wobei Erschütterungen bei der Handhabung zu vermeiden sind. Nach einer Inkubation üN im Brutschrank sind die Zellen 70-80 % konfluent und werden mit jeweils 1 µl/well und 10 µl/well der Virusverdünnungen infiziert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Virus-infizierte Zellen können mit dem monoklonalen Antikörper 3C2 markiert (siehe Transfektionstest) und mit dem Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories Inc.) nach Angaben des Herstellers detektiert werden. Dabei entspricht die Zahl der gefärbten Zellen (N) in der  $1 \times 10^{-5}$ -Verdünnung (N Viruspartikel pro µl) einem Virustiter von  $N \times 10^8$  IU (infectious units) pro ml. Für eine effiziente Infektion von Mikromasskulturen sind mindestens  $5 \times 10^7$  IU/ml erforderlich.

### **3.4.3 Kultivierung von DF1-Zellen**

#### **Auftauen von DF1-Zellen**

Die Zellen werden aus der Lagerung in flüssig N<sub>2</sub> schnell im 37 °C Wasserbad aufgetaut und sofort in 15 ml vorgewärmtes DF1-Standardmedium (DMEM 1 g/l Glucose, w/o L-Glutamin; 10 % FCS; 2 % CS; 1 % Pen/Strep; 1 % L-Glutamin) überführt. Daraufhin werden die Zellen zur Beseitigung des Einfriermediums für 5 min bei 1000 UpM pelletiert und der Überstand verworfen. Mit 10 ml frischem DF1-Standardmedium erfolgt die Resuspendierung und Aussaat in einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche, wobei die weitere Kultivierung bei 37 °C und 5 %

CO<sub>2</sub> Sättigung bei regelmäßigem Mediumwechsel (alle 2-3 Tage) in einem Brutschrank erfolgt.

### **Splitten von DF1-Zellen**

90 – 100 % konfluente Zellen werden zur weiteren Kultivierung geteilt und in neue Zellkulturflaschen umgesetzt (passagiert). Dafür werden sie mit DPBS gewaschen und bei einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 3 ml vorgewärmten Trypsin für 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch zusätzliches Klopfen der Kulturflasche gegen die Handfläche lösen sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden, woraufhin der Verdauungsprozess des Trypsins durch Zugabe von 7 ml vorgewärmten DF1-Standardmedium abgestoppt wird. Anschließend werden die Zellen mit gewünschter Zellzahl in frische Zellkulturflaschen, -schalen oder -platten ausgesät.

### **Einfrieren von DF1-Zellen**

Zur Vorbereitung der Zellen auf die Lagerung in flüssig N<sub>2</sub> werden 90 – 100 % konfluente Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit DPBS gewaschen und vom Flaschenboden durch Trypsinisierung abgelöst (siehe Splitten von DF1-Zellen). Daraufhin werden die Zellen 5 min bei 1000 UpM pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4,5 ml Einfriermedium (DMEM 1 g/l Glucose; 20 % FCS; 10 % DMSO; 2 mM L-Glutamin) resuspendiert. 1,5 ml Aliquots in Kryoröhrchen werden in einer Zelleinfrierbox zu -80 °C gestellt und nach 2-3 Tagen in flüssigen N<sub>2</sub> überführt.

### **Bestimmung der Zellzahl**

Um eine bestimmte Zellzahl zu definieren wurde die Anzahl der Zellen in einer Lösung gezählt. Dazu wurden 20 µl einer Zelllösung in eine Neubauer-Zellkammer pipettiert und die vier Quadrate jeweils ausgezählt. So ließ sich ein Mittelwert bestimmen, der die Zellzahl x10<sup>4</sup> angab.

Alternativ wurde Zellzahlbestimmung mit einem Casytron-Gerät nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.5 Histologische Methoden**

#### **3.5.1 *In situ* Hybridisierung (ISH)**

Die *in situ* Hybridisierung ist eine direkte Nachweismethode für mRNA in einzelnen Zellen, Geweben und intakten Embryonen. Dabei wird mit einer synthetisierten und mit Digoxigenin (DIG) markierten RNA-Sonde am Ort der Expression die mRNA des zu untersuchenden Gens sichtbar gemacht, indem die antisense Sonde und die komplementäre mRNA hybridisieren. Die Hybriden werden mit einem gegen DIG gerichteten Antikörper, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist, detektiert und daraufhin durch eine enzymatische Reaktion farblich sichtbar gemacht. Auf diese Weise lassen sich der Expressionslevel und das Expressionsmuster des jeweiligen Gens gewebespezifisch und im Verlauf der embryonalen Entwicklung nachvollziehen.

#### **Paraffineinbettung und Schnittanfertigung von Gewebepreparaten**

Die einzubettenden Gewebe werden sofort nach Präparation der Mäuseembryonen in 4 % PFA/PBS-DEPC überführt und darin  $\text{üN}$  bei 4 °C belassen. Am darauf folgenden Tag werden die Präparate 2 x 5 min in PBS-DEPC gewaschen, danach für mindestens 1 h in 50 % EtOH bei RT inkubiert und anschließend mindestens 2 x 2 h in 70 % EtOH dehydriert. Die weiteren notwendigen Entwässerungsschritte und die Überführung in Paraffin wurden mit Hilfe des Entwässerungsautomaten nach folgendem Programm vollzogen: 2 h 90 % EtOH, 2 h 95 % EtOH, 3 x 2 h mit Vakuum 100 % EtOH, 2 x 15 min mit Vakuum Ultra Clear, 30 min mit Vakuum Ultra Clear, 3 h mit Vakuum Ultra Clear/Paraffin 1:1, 3 h mit Vakuum Paraffin bei 60 °C.

Die dann im flüssigen Paraffin befindlichen Präparate wurden an der Einbettstation in Einbettförmchen mit frischem Paraffin in der gewünschten Position eingebettet. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die eingebetteten Präparate aus den Formen gelöst und bei 4 °C gelagert. Für *in situ* Hybridisierungen wurden 7  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte am Paraffin-Mikrotom (Mikrom, Reichert-Jung 2050 Supercut) angefertigt, wobei diese üblicherweise nach der Streckung im 37 °C warmen Wasserbad seriell auf silanisierte Objektträger gezogen wurden. Nach dem Schneiden wurden die Objektträger bei 40 °C gründlich getrocknet und zusätzlich  $\text{üN}$  bei 37 °C in einem Trockenofen inkubiert. Eine Lagerung der Schnitte ist bei 4 °C über mehrere Wochen möglich.

### **Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden**

Für die *in vitro*-Transkription wurden die benötigten DNA-Templates zunächst durch PCR mit dem 5'-Primer des Sondenfragments und einem Promotorprimer als 3'-Primer (Sp6 oder T7 je nach Orientierung des Sondenfragments in pTA-GFP) amplifiziert und mittels PCR-Purification aufgereinigt (siehe 3.2.4). Die *in vitro* Sondentranskription und Markierung mit DIG wurde mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

- 1 µl Template-DNA (100-200 ng PCR-Produkt)
- 1 µl 10x Transkriptions Puffer
- 2 µl DIG-Labeling-Mix
- 0,5 µl RNase-Inhibitor
- 1 µl RNA-Polymerase (Sp6/T7)
- 4,5 µl H<sub>2</sub>O-DEPC

Die *in-vitro*-Transkription erfolgte für 1,5 h bei 37 °C. Anschließend wurde 1 µl DNase I zugegeben und für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert, um die Template-DNA abzubauen. Dieser Vorgang wurde durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-DEPC abgestoppt. Die markierte Sonde wurde daraufhin gefällt, indem das Volumen auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O-DEPC aufgefüllt, der Ansatz mit 10 µl 4 M LiCl sowie 300 µl eiskaltem EtOH 100% versehen und mindestens 1 h bei -80 °C inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 13000 U<sub>p</sub>M bei 4 °C wurde mit 70 % EtOH gewaschen und das finale RNA Sediment in 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei -80 °C langfristig gelagert. Die Kontrolle der Sondenqualität erfolgte auf einem Agarosegel.

### **Wohle mount *in situ* Hybridisierung (WM-ISH)**

Für eine WM-ISH wurden Bl6 Mäuseembryonen der Stadien E10.5 – E13.5 in PBS/DEPC präpariert und üN in 4 % PFA/PBS-DEPC fixiert. Bei Mäuseembryonen E14.5 wurden lediglich die Extremitäten und bei Hühnerembryonen HH25-30 die Rumpfe mit den Extremitäten für die WM-ISH vorgesehen. Am folgenden Tag wurden die Embryonen 2 x 15 min in PBST gewaschen und mit einer steigenden Methanolreihe (je 30 min in 25 %, 50 %, 75 % MetOH/PBST-DEPC, 100 % MetOH) auf Eis dehydriert. Nach einem Wechsel des 100 % MetOH war eine Lagerung der Embryonen bei -20 °C über mehrere Monate möglich.

Zur Hybridisierung wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert, mit PBST 2 x gewaschen und in 6 % Wasserstoffperoxid in PBST-DEPC für 1 h bei 4 °C gebleicht. Je nach Entwicklungsstadium schloss sich nach gründlichem Waschen mit PBST-DEPC ein 3-15 minütiger Verdau mit Proteinase K (PK) bei RT an, der das Gewebe für die Sonde besser zugänglich macht. Die Stadien E10.5–E11.5 wurden mit 10 µg/ml PK für 3 min; E12.5 mit 20 µg/ml PK für 5 min; E13.5 mit 20 µg/ml PK für 8 min; E14.5 mit 30 µg/ml PK für 12 min und HH25-30 mit 50 µg/ml PK für 10 min verdaut. Mit PBST/Glycin (2 mg/ml) wurde der Verdau abgestoppt, worauf mehrmaliges Waschen mit PBST, RIPA-Puffer und wieder PBST folgte. Daraufhin wurden die Embryonen für 20 min in 4 % PFA / 0,2 % Glutaraldehyd fixiert und wieder mehrfach in PBST, PBST/Hybridisierungspuffer und Hybridisierungspuffer gewaschen. Nach der Prähybridisierung bei 65 °C für mindestens 3 h mit Hybridisierungspuffer wurden die Embryonen  $\ddot{u}$ N mit dem Sondenmix bei ebenfalls 65 °C inkubiert. Für die Herstellung des Sondenmixes wurden Hybridisierungspuffer und tRNA (100 µg/ml) 100:1 gemischt und je 1 ml davon mit 10 µl Sonde vereint. Dieser Mix wurde zur Denaturierung der Sonde 5 min bei 80 °C inkubiert und im Anschluss auf die Embryonen gegeben.

Überschüssige Sonde wurde am nächsten Tag entfernt indem zweimal 30 min bei 65 °C mit frischem Hybridisierungspuffer gewaschen wurde. Nachdem die Embryonen auf RT abgekühlt waren, folgte ein RNaseA-Verdau bei 37 °C, um nicht hybridisierte RNA-Sonden abzubauen. Anschließend wurde 12 x mit SSC/FA/T bei 65 °C gewaschen, zunächst 3 x 5 min, dann 3 x 10 min und schließlich 6 x 30 min. Daraufhin folgte ein Umpuffern auf MABT bei RT. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für den Anti-DIG-Antikörper wurden die Präparate in Blockierlösung (5 % BBR in MABT) mindestens 1 h bei RT vorbehandelt und anschließend  $\ddot{u}$ N bei 4 °C mit Anti-DIG-Fab-ALP Antikörper (Roche) 1:5000 in 1 % BBR/MABT rotierend inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde während 12maligem Waschen (3 x 5 min und 8 x 30 – 60 min) am Folgetag mit PBST/Tetramisol (500 mg/l) entfernt. Zur Detektion des Antikörpersignals wurden die Embryonen zunächst 3 x für 20 min in ALP-Puffer äquilibriert und anschließend mit BM Purple ALP Substrat (Roche) versehen. Die Inkubation erfolgte bei RT in Dunkelheit bis ein deutlich sichtbares Signal zu erkennen war.

Zur Konservierung der Signale wurden die Präparate letztlich 3 x mit ALP-Puffer gewaschen und in 4 % PFA / PBS / 5 mM EDTA / 0,2 % Glutaraldehyd fixiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem Binokular und der AxioVision Software. Eine Lagerung der gefärbten Embryonen war bei 4 °C möglich.

ALP-Puffer:	0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 % Tween 20; 0,1 M Tris/HCl pH 9,5; 0,05 % Tertramisol; in bidest H <sub>2</sub> O
Hybridisierungspuffer:	50 % Formamid; 5 x SSC pH 4,5; 0,05 mg/ml Heparin; 0,1 % Tween 20; in DEPC-H <sub>2</sub> O
RIPA-Puffer:	0,05 % SDS; 0,15 M NaCl; 1 % NP40; 0,5 % NaDeoxycholat; 1 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; in DEPC H <sub>2</sub> O
RNaseA:	0,5 M NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 % Tween 20; in bidest H <sub>2</sub> O; 0,1 mg/ml RNase A
PK-Puffer:	20 mM Tris/HCl pH 7,0; 1 mM EDTA; in DEPC H <sub>2</sub> O
SSC/FA/T:	2 x SSC; 50 % Formamid; 0,1 M Tween 20; in bidest H <sub>2</sub> O
5 x MABT:	0,5 M Malein Säure pH 7,5; 0,75 M NaCl; 0,5 % Tween 20; in bidest H <sub>2</sub> O

### ***In situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitten (P-ISH)**

Für eine *in situ* Hybridisierung auf 7 µm dicken Paraffin-Gewebeschnitten wurden diese erst entparaffinisiert und rehydriert. Dazu wurde 2 x 15 min in Ultra Clear, 2 x 10 min in 100 % EtOH, 5 min in 75 % EtOH, 5 min in 50 % EtOH/PBS, 5 min in 25 % EtOH/PBS und dann 2 x 5 min in PBS inkubiert. Fixiert wurde 10 min in 4 % PFA/PBS, worauf 3 x mit PBST gewaschen und in PK-Lösung für 10 min verdaut wurde. Hierbei war die Konzentration der PK abhängig davon, wie alt die Embryonen bei der Präparation waren. Für E12.5 und E13.5 wurden 1,5 µg/ml, für E14.5 3 µg/ml eingesetzt. Nach der PK Behandlung wurde erneut 2 x in PBST gewaschen, für 5 min in 4 % PFA/PBS fixiert und wiederum 3 x mit PBST gespült. Zum Acetylieren wurde frische Acetylierungslösung angesetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach finalem dreimaligen Waschen mit PBST waschen wurde für mindestens 4 h mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei 65 °C in einer Feuchtkammer, die mit 5 x SSC / 50 % Formamid versehen war, vorhybridisiert um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die eigentliche Sondenhybridisierung fand üN bei 65 °C ebenfalls in einer Feuchtkammer statt. Hierfür wurde die Sonde in einem Verhältnis von 1:100 im Hybridisierungspuffer verdünnt und vor der Verwendung bei 85 °C für 5 min denaturiert.

Am folgenden Tag wurde nach einem kurzen Waschschrift in 5 x SSC und anschließendem Waschen in 1 x SSC / 50 % Formamid die überschüssige Sonde entfernt. Hierbei wurde erst 10 min bei 37 °C in RNase-Waschpuffer inkubiert, wonach für 30 min bei 37 °C in RNase Waschpuffer mit 20 µg/ml RNase A nicht hybridisierte Sonde abgebaut wurde. Es folgten ein finales Waschen in RNase-Waschpuffer und weitere Waschschrift: 20 min bei 65 °C in

2 x SSC; 2 x 20 min bei 65 °C in 0,2 x SSC. Hiernach wurden die Objektträger für die Antikörperinkubation vorbereitet. Nach 2 x Waschen in MABT bei RT wurde für mindestens 2 h mit 20 % HISS/MABT in einer Feuchtkammer bei RT geblockt um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper zu vermeiden. Während des Blockierens wurde der Antikörper Anti-DIG-Fab-AP (Roche) in 5 % HISS/MABT bei 4 °C in einer Verdünnung von 1:2500 vorinkubiert und schließlich üN in einer Feuchtkammer bei 4 °C auf die Objektträger appliziert.

Zur Detektion des Antikörpers wurden die Schnitte 3 x in MABT, 10 min in ALP-Puffer gewaschen und letztlich die enzymatische Reaktion mit Hilfe von NBT/BCIP in ALP-Puffer bei RT herbeigeführt. Die Schnitte wurden lichtgeschützt so lange inkubiert, was häufig auch über mehrere Tage bei 4 °C oder RT stattfand, bis ein deutlich dunkles spezifisches Signal sichtbar war. Zum Beenden der Reaktion wurden die Objektträger 10 min in ALP-Puffer und 2 x in PBS gewaschen, wonach die Schnitte 30 min bei RT in 4 % PFA/PBS fixierten. Abschließend folgte zweimaliges Waschen in PBS und Eindecken in HydroMatrix.

Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation der Färbungen erfolgte mit dem Mikroskop Leica DMR und der AxioVision Software. Eine Lagerung der Präparate ist über einen sehr langen Zeitraum bei RT möglich.

Acetylierungslösung:	0,1 M TEA, 0,25 % Essigsäureanhydrid; in DEPC H <sub>2</sub> O
ALP-Puffer:	0,1 M NaCl; 0,1M Tris/HCl pH 9,5; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,05 % Tween 20
Blocking-Puffer:	10 % BBR in 1 x MABT
Hybridisierungspuffer:	10 mM TrisHCl pH 7,5; 0,6 M NaCl; 1 mM EDTA; 0,25 % SDS; 10 % Na Dextransulfat; 1x Denhardt's; 0,2 mg/ml Yeast tRNA (Gibco); 50 % Formamid; in DEPC-H <sub>2</sub> O
100 x Denhardt's:	2 % Ficoll 400; 2 % Polyvinylpyrrolidon K30; 2 % BSA; in bidest H <sub>2</sub> O
5 x MABT:	0,5 M Malein Säure pH 7,5; 0,75 M NaCl; 0,5 % Tween 20; in bidest H <sub>2</sub> O
10 x RNase-Waschpuffer:	4 M NaCl; 0,1 M TrisHCl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 8,0



### 3.5.2 Alcian Blau-Färbung von Mikromass Kulturen

Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 1 x mit DPBS gewaschen. Unter dem Abzug wurden die Kulturen für 10 min bei RT mit Kahles Fixativ fixiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Zur Färbung der differenzierenden Zellen wurden diese mit Alcian Blau Färbelösung bedeckt und üN bei RT auf der Wippe gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit voll entsalztem Wasser gespült, bis sich kein Farbstoff mehr löste und danach in den Zellkulturplatten getrocknet und abschließend dokumentiert.

Zur Quantifizierung der Färbung wurden je Well 500 µl 6 M Guanidin-HCl in H<sub>2</sub>O zupipettiert und üN bei RT auf einem Taumler inkubiert. Der Farbstoff löste sich dabei quantitativ aus den Kulturen. 200 µl der Extraktlösung wurden in eine 96-Well Zellkulturplatte überführt, wonach sämtliche Proben und Replikate gegen reine 6 M Guanidin-HCl als Leerwert photometrisch in einem Elisa-Reader bei 595 nm vermessen wurden. Die grafische Auswertung der ermittelten Werte erfolgte mit GraphPad Prism.

Kahles Fixativ: 28 % EtOH; 0,37 % Formaldehyd; 3,9 % Essigsäure

Alcian Blau Färbelösung: 1 % Alcian Blau; 0,1 M HCl

### 3.5.3 X-Gal-Färbung von Embryonen

Die X-Gal-Färbung basiert auf der Expression des *LacZ*-Gens (*E. coli*), welches für die  $\beta$ -Galactosidase codiert. Dieses Enzym setzt das chromogene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D.galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl um, welches nach Oxidation an der Luft dimerisiert und eine tiefblaue Färbung zeigt. In dieser Arbeit wurden Färbungen an kompletten Embryonen gefolgt von Paraffinschnitten durchgeführt.

Embryonen oder Extremitäten von transgenen Mäuseembryonen E11.0-E15.0 wurden in PBS gewaschen und bei 4 °C für 45-60 min in 2 % PFA / 0,2 % Glutaraldehyd fixiert. Nach 3 x 15 min waschen in PBS erfolgte die Färbung üN bei RT unter Lichtausschluss. Die Präparate wurden nach mehrmaligem Waschen in PBS und erneuter Fixierung in 2 % PFA / 0,2 % Glutaraldehyd mit einem Binokular fotografiert. Da die Gefahr einer Nachdunkelung besteht, sollte die Dokumentation der Präparate zeitnah erfolgen.

Generell bleibt hier anzumerken, dass die Färbung von Embryo zu Embryo variiert aufgrund differierender Penetrationsvorgänge der Färbelösung und unterschiedlicher Anzahl von Integrationsereignissen des Reporter-genektors ins Genom.

Färbelösung: 1 mg/ml X-Gal, 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 2 mM  $MgCl_2$  in PBS, Eisenlösungen zuletzt zufügen

### 3.5.4 Skelettpräparationen

Zur Anfertigung von Skelettpräparationen wurden Hühnerembryonen HH25-30 enthauptet und in 100 %igem EtOH überführt, worin sie üN bei 4 °C fixierten. Daraufhin wurde für 2 Tage mit einer Skelettfärbelösung, die Alcian Blau als auch Alizarin Rot enthält, gefärbt.

Alcian Blau färbt die Polysaccharide im Knorpel blau, wohingegen Alizarin Rot kalzifizierte extrazelluläre Matrix (also Knochen) rot färbt. Die Präparate wurden nachfolgend kurzzeitig mit 1 %iger KOH und später mit 0,3 %iger KOH unter ständiger Beobachtung verdaut, bis das weiche Gewebe und die Haut klar und durchsichtig und die Skelettelemente der Extremitäten deutlich zu erkennen waren. Dabei ist zu beachten, dass ein zu langer Verdau die Integrität der Skelettelemente zerstört. Der Verdau wird durch Lösungswechsel in 30 % Glycerin abgestoppt. Daraufhin werden die Präparate in 50 % Glycerin und abschließend in 80 % Glycerin überführt und darin langfristig gelagert. Die photographische Analyse erfolgte mit einem Binokular, CCD-Kamera und AxioVision Software.

Skelettfärbelösung: 819,75 ml 70 % EtOH, 131,25 ml Essigsäure, je 33 ml Alcian Blau und Alizarin Rot Stock

Alcian Blau Stock: 0,14 % Alcian Blau in 70 % EtOH

Alizarin Rot Stock: 0,06 % Alizarin Rot S in 95 % EtOH

### 3.5.5 Anfertigung von Vibratomschnitten

Bei schon gefärbten Embryonen oder Extremitäten konnten zur weiteren Analyse Vibratomschnitte angefertigt werden. Dazu wurden die Präparate in PBS gewaschen und bei 4 °C jeweils 1 h in 5 %, 15 % und 30 % Sucrose in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung in 0,5 % Gelatine / 30 % Albumin (BSA) / 20 % Sucrose in PBS, worin die Präparate auch geringe Zeit bei 4 °C gelagert werden konnten. Die Einbettung erfolgte in 1 ml derselben Lösung unter Zugabe von 100 µl 25 % Glutaraldehyd, wobei die Aushärtung durch Kühlung verlangsamt werden konnte. Schließlich wurden am Vibratom (Mikrom) 10 - 30 µm dicke Schnitte angefertigt und in Hydromatrix eingebettet. Die Analyse erfolgte unter dem Mikroskop.

### **3.6 *In vivo* Methoden**

#### **3.6.1 Hühncheninjektionen**

Die Injektionen wurden von Sigmar Stricker und Julia Haupt durchgeführt. SPF Hühnereier wurden bei 38 °C im Eierinkubator bebrütet, bis das gewünschte Stadium (HH10 ca. 1,5 Tage) erreicht war. Konzentrierter Virusüberstand wurde mit FastGreen zur besseren Visualisierung beim Injektionsprozess versetzt und in die rechten Extremitätenfelder (HH10) der Hühnerembryonen nach Morgan und Fekete (1996) injiziert. Die linke Extremität blieb uninfiziert und diente als interne Kontrolle. Nach der Injektion wurden die geöffneten Eier mit Klebeband versiegelt und wieder bei 38 °C bis zum gewünschten Entwicklungsstadium (Tag 7) inkubiert.

#### **3.6.2 Beadimplantation**

Die Beadimplantationen wurden von Pia Kuss und Jana König durchgeführt. SPF Hühnereier wurden bei 38 °C im Eierinkubator bebrütet, bis das gewünschte Stadium (HH20 ca. 4,5 Tage) erreicht war. Daraufhin wurden die Eier geöffnet, die Fruchthüllen über dem Embryo vorsichtig entfernt und je Embryo ein Heparin-Bead in eine der Hinterextremitäten implantiert. 20 µl Heparin-Beads wurden zuvor in einem Zeitraum von 1,5 h mehrfach mit PBS gewaschen und danach für 1 h in 5 µl BMP-Lösung gewünschter Konzentration bei RT inkubiert. Um auszuschließen, dass es sich bei eventuell sichtbaren Effekten um Implantationsartefakte handelt, wurden als Kontrollen PBS-getränkte Beads ebenfalls implantiert. Nach Abschluß der Implantation wurden die Eier mit Klebeband versiegelt und für weitere 20 - 22 h bei 38 °C inkubiert. Verwendete rekombinante Proteine siehe 3.4.1.

#### **3.6.3 Herstellung transgener Mäuse**

Die Herstellung transgener Mäuse wurde von Ingo Voigt und Monika Dopatka im Maushaus des MPI für Molekulare Genetik vorgenommen. Dabei wurde nach Standardprotokollen gearbeitet (Nagy u. a., 2003).

Die zu injizierende und aufgereinigte DNA wird mit Injektionspuffer (Chemikon -800-437-7500) auf 2 ng/µl verdünnt. Zur Gewinnung von befruchteten Eizellen werden C57/B16 Spenderweibchen einer Superovulation unterzogen mit anschließender üN Verpaarung. Dafür werden 51 h vor der Verpaarung 5 U PMGS (*Pregnant Mare's Serum Gonadotropin*)

und 48 h später 5 U hCG (*human chorionic Gonadotropin*) intraperitoneal verabreicht. Nach makroskopischer Überprüfung der Begattung anhand der Vaginalpfröpfe werden die Spenderweibchen getötet, die Eizellen aus den Eileitern präpariert und zur Abtrennung der Cumuluszellen in M2-Medium (Sigma -M7167) mit 300 µg Hyaluronidase/ml überführt. Danach werden die Eizellen in M2-Medium ohne Enzym gewaschen und mit Hilfe einer Mikroinjektionsanlage mit der Reporter-gen-DNA injiziert. Dabei werden ca. 1-2 pl DNA-Lösung (2 ng/µl) mit einer Injektionskapillare in den männlichen (größeren) Vorkern einer befruchteten Eizelle eingebracht. 20-30 der so manipulierten Eizellen werden in die Eileiter einer scheinträchtigen Maus transferiert. Dafür werden sexuell intakte CD1 Weibchen mit vasktomierten Männchen verpaart und nach erfolgreicher Begattung narkotisiert. Nach Präparation von Ovar, Eileiter und Uterus werden die Eizellen über den Infundibulum eingesetzt. Anschließend werden die Organe wieder in die Bauchhöhle gelegt, die Wunden geschlossen und die Schwangerschaft bis zur Entnahme der Embryonen im gewünschten Entwicklungsstadium fortgesetzt.

### **3.7 Bioinformatische Methoden**

#### **3.7.1 Multiple Sequenz-Alignments**

Proteinsequenzen aus der NCBI Datenbank wurden mit Hilfe der Software T-Coffee (Notredame u. a., 2000) alignt. Daraufhin erfolgte eine Analyse der Konservierung mit CHROMA (Goodstadt und Ponting, 2001) und die farbige Darstellung des Alignments.

#### **3.7.2 Proteinstrukturdarstellung**

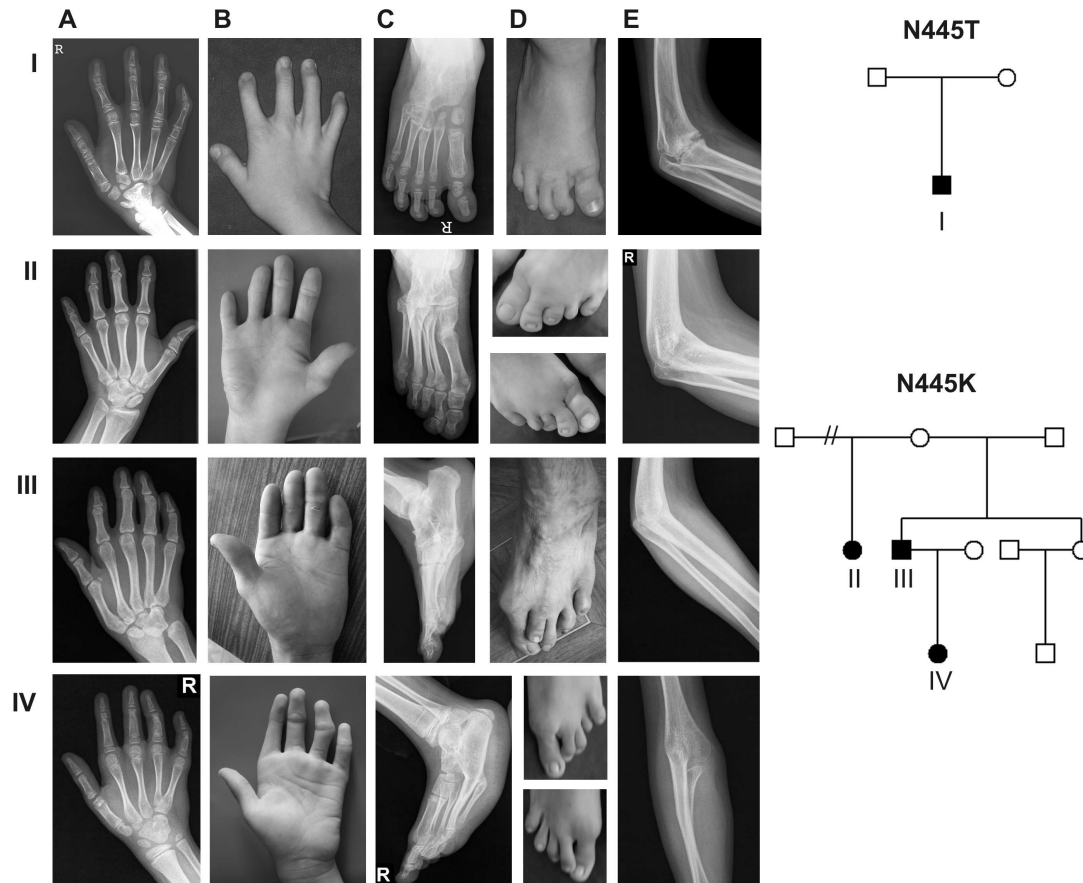
Superpositionsmodelle zur Vorhersage von Proteininteraktionen anhand bekannter Proteinstrukturen wurden von Carsten Reissner (Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Münster) erstellt. Zur Darstellung der Proteinstrukturen wurde das Programm Chimera (Pettersen u. a., 2004) verwendet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Punktmutationen in GDF5 sind mit SYNS1 assoziiert**

Neben bereits beschriebenen Mutationen in *NOG* können auch *GDF5* Mutationen ursächlich für das Multiple Synostosesyndrom (*SYNS1*) sein. In Zusammenarbeit mit Andreas Janecke (Institut für Medizinische Genetik der Universität Innsbruck), Cristina Rusu (University of Medicine and Pharmacy, Romania) und Katarina Dathe (Institut für Medizinische Genetik der Charité-Universitätsmedizin Berlin) wurden Patienten mit *SYNS1* untersucht. Deren Sequenzierungsergebnisse aus genomischer DNA ergaben keine Auffälligkeiten bei *NOG* jedoch heterozygote Punktmutationen in *GDF5*. In Patient I (siehe Abb. 4.1) wurde eine *de novo* Punktmutation an Position c.1334A>C identifiziert, die zu einem Asparagin zu Threonin (p.N445T) Aminosäureaustausch im Protein führt. Zu dieser Mutation N445T in *GDF5* des Patienten von A. Janecke wurden bereits erste Untersuchungen in der Dissertation von Petra Seemann durchgeführt. Darüber hinaus wurde in einer weiteren, nicht verwandten Familie an gleicher Position im *GDF5*-Protein die N445K Mutation an unserem Institut identifiziert. Dabei liegt bei den 3 Patienten (siehe II-IV in Abb. 4.1) die Punktmutation c.1335T>G im Genom vor, die zum Austausch der hydrophilen Aminosäure Asparagin mit dem basischen Lysin führt.

Der Phänotyp von *SYNS1* in den untersuchten Patienten ist charakterisiert durch mehrfache Synostosen in den Händen und Füßen, was sich äußerlich als Symphalangismus und Brachydaktylie äußert. Die zusätzlichen Synostosen der Ellenbogengelenke bedingen insgesamt eine stark einschränkende Unbeweglichkeit der Extremitäten bei den Patienten.



**Abb. 4.1: GDF5-Punktmutationen an Position N445 sind mit SYNS1 assoziiert.**

Die Stammbäume zweier betroffener Familien sind links dargestellt. In A-E ist der klinischen Phänotyp abgebildet, der durch die Mutationen N445T (I) und N445K (II-IV) in GDF5 hervorgerufen wurde. Die Abbildungen in einer horizontalen Reihe sind jeweils einem Patienten zugeordnet. I, Phänotyp im Alter von 5 Jahren ist assoziiert mit der *de novo* Mutation N445T; II-IV, der Phänotyp zeigt sich in einer Großfamilie, die beiden Erwachsenen (II, III) und das damals 9 jährige Mädchen tragen die Mutation N445K. **A)** Röntgenbilder der Hand zeigen Fusionen und abnormale Stellung der Karpalknochen als auch proximalen Symphalangismus der Finger II bis V in allen Patienten. A-I) Verkürzung des ersten Metakarapalknochens ist bei Patient I zu beobachten. A-II) Verkürzung der ersten proximalen Phalangen sind bei Patient II ersichtlich. **B)** Die klinischen Bilder zeigen die Brachydactylie der Finger II bis V und die fehlende Beweglichkeit (siehe II, III). Die Fingernägel sind hypoplastisch bzw. fehlen mehr oder weniger bei Patient I. Das Auftreten einer milden hautbasierten Syndactylie ist möglich. **C und D)** Die Füße sind vergleichbar betroffen mit Fusion der Tarsalknochen, proximalen Symphalangismus, verkürzte Zehen, hypoplastischen Zehnnägel oder terminalen Verlust der Zehe ohne Nagel, was eine Brachydactylie Typ B kennzeichnet. **E)** Die Synostose von Humerus und Radius führt zu einer Versteifung des Elbogengelenks. Abbildung modifiziert nach (Seemann u. a., 2009).

### 4.1.1 Lokalisation der GDF5 Mutationen in primär- und tertiär-Proteinstruktur

Zur Klärung der evolutionären Konservierung und funktionellen Stellung der Aminosäure Asparagin an Position 445 in GDF5 wurden zum einen partielle Spezies- und Proteinfamilie-übergreifende Alignments erstellt sowie Strukturanalysen am 3D-Proteinstrukturmodell mit freundlicher Unterstützung von Carsten Reissner vorgenommen.

Im Spezies-übergreifenden Alignment (Abb. 4.2) zeigt sich, dass N445 in einem hoch konservierten Bereich von GDF5 zwischen dem 3. und 4. konservierten Cystein, dem sogenannten Wrist-Epitop, lokalisiert ist. Neben der hohen Beständigkeit der Aminosäuresequenz unter den Wirbeltieren ist N445 mit seinen direkt benachbarten Aminosäuren ebenfalls bei Vertretern der Wirbellosen Tieren den Insekten und Nesseltieren hoch konserviert.

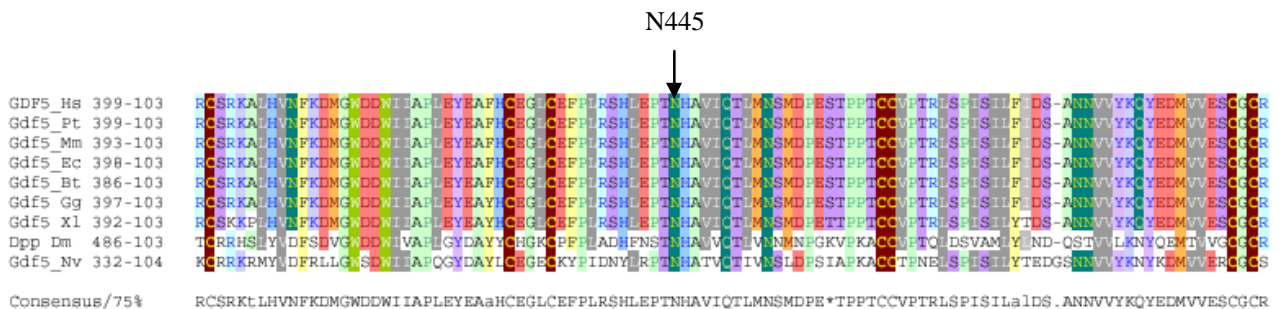
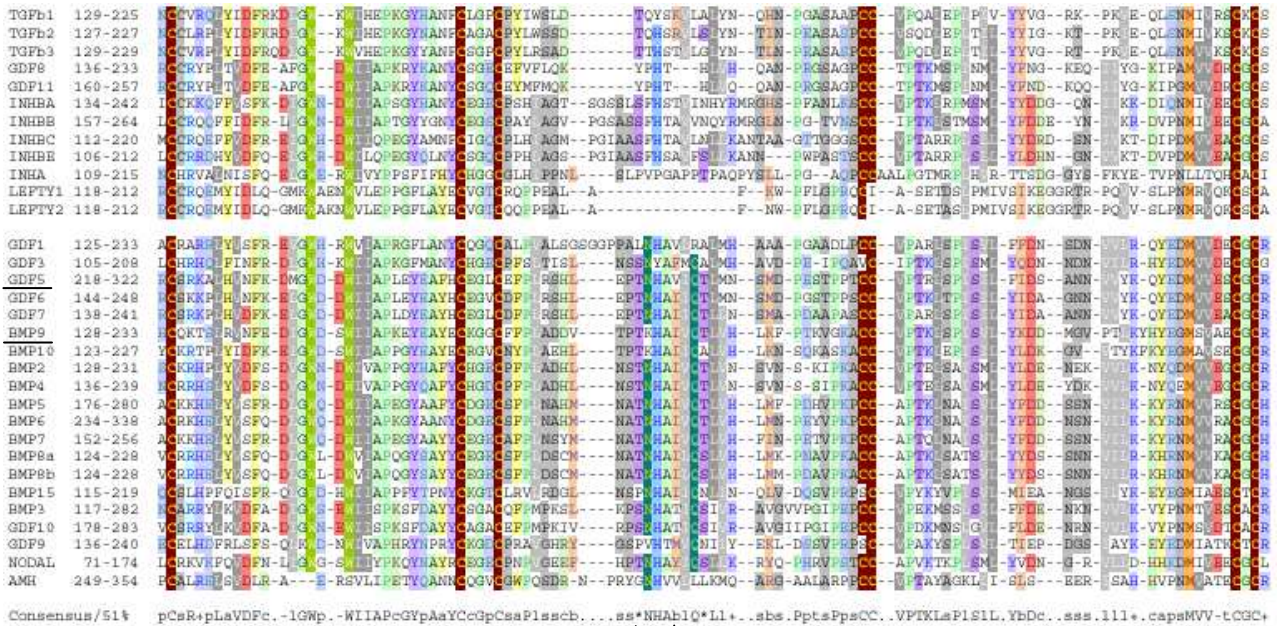


Abb. 4.2: Partielles multiples Sequenz-Alignment von GDF5-Orthologe verschiedener Spezies.

Speziesfolge: Mensch (Homo Sapiens-Hs), Schimpanse (Pan troglodytes-Pt), Maus (Mus Musculus-Mm), Pferd (Equus caballus-Ec), Rind (Bovis tauris-Bt), Huhn (Gallus gallus-Gg), Krallenfrosch (Xenopus leavis-Xl), Drosophila (Drosophila melanogaster-Dm) und Seeanemone (Nematostella vectensis-Nv). Decapentaplegic-Dpp. Position von N445 ist hervorgehoben. Unter den Wirbeltieren ist die Aminosäuresequenz sehr hoch konserviert. Bemerkenswert ist die Konservierung des TNHA-Motivs auch bei den Wirbellosen Tieren.

Innerhalb der TGFβ-Superfamilie zeigt sich ebenfalls eine Konservierung des Asparagins in ca. 2/3 der Vertreter (siehe Abb. 4.3), jedoch vornehmlich innerhalb der BMPs und GDFs. Hier fällt zusätzlich auf, dass das Asparagin durch eine bevorzugte Aminosäureabfolge von TNHA umgeben ist, welche bei einigen wenigen BMPs und GDFs leicht verändert, aber bei den TGFβs, den Inhibinen, den Leftys und GDF8, 11 und 15 stark verändert bzw. abwesend ist. Hervorzuheben ist ebenfalls die natürliche Anwesenheit von Lysin in BMP9 und BMP10 an der homologen Position von N445, wobei die weiteren umgebenden Aminosäuren identisch zu GDF5 sind. Dieser Aminosäureaustausch N445K in GDF5 verursachte letztlich den Phänotyp SYNS1. Daher ist eine vergleichende Analyse der GDF5-Mutanten mit BMP9/10 von großem Interesse.

# Ergebnisse

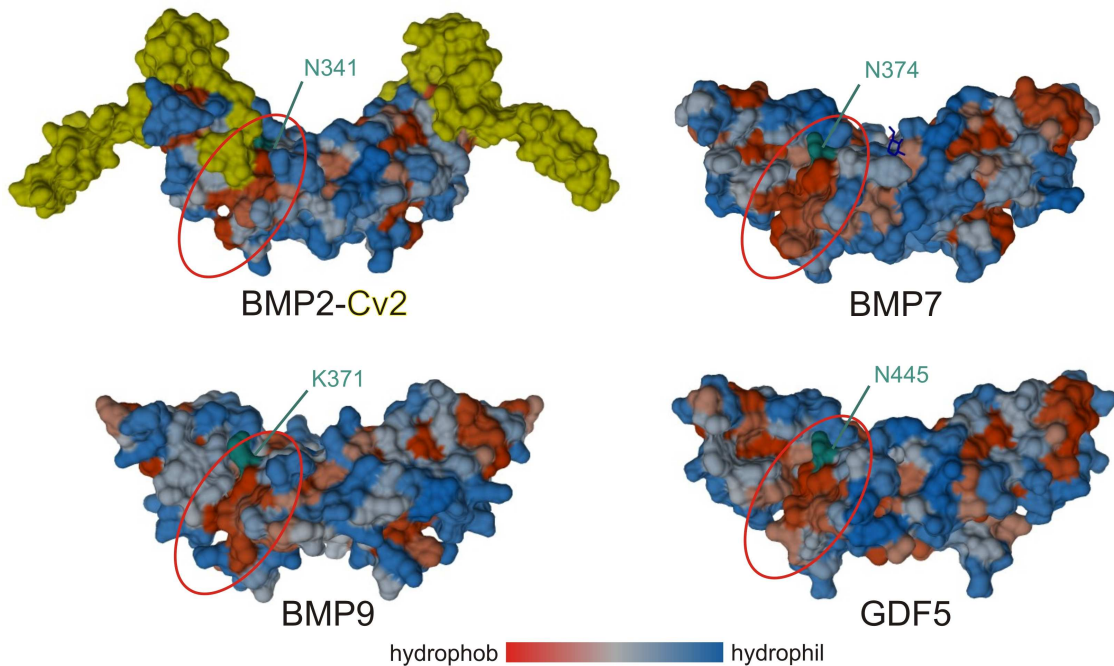


**Abb. 4.3:** Partielles multiples Sequenz-Alignment der humanen TGFβ-Superfamilie.

Position von N445 ist hervorgehoben. Diese ist zusammen mit direkt benachbarten Aminosäuren als TNHA-Abfolge in einem Großteil der BMPs/GDFs konserviert. Jedoch ist sie bei Vertretern der Inhibine, Leftys und TGFβs stark verändert bzw. fehlt komplett. Zu beachten ist der natürlich vorkommende punktuelle Austausch von Asparagin mit Lysin bei BMP9 und 10, der mit der identifizierten humanen Punktmutation N445K vergleichbar ist.

Bei der Analyse der Oberflächenstruktur von GDF5 nach ihren hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften zeigt sich, dass unterhalb der hydrophilen Aminosäure N445 eine hydrophobe Tasche ausgebildet wird. Ein Austausch von N445 durch Threonin oder Lysin würde die Hydrophobizität in der Umgebung nicht ändern, jedoch würde die längere Nebenkette von Lysin mehr Raum auf der Oberfläche einnehmen. Im Gegensatz dazu würde Threonin weniger Raum beanspruchen. Des Weiteren wird im Vergleich mit anderen Vertretern der BMP Familie deutlich, dass die hydrophobe Tasche unterhalb von N445 bei GDF5 ein kleineres Ausmaß einnimmt als bei BMP2, BMP7 und BMP9.





**Abb. 4.4: Vergleich der Hydrophobizität im 3D-Proteinstrukturmodell.**

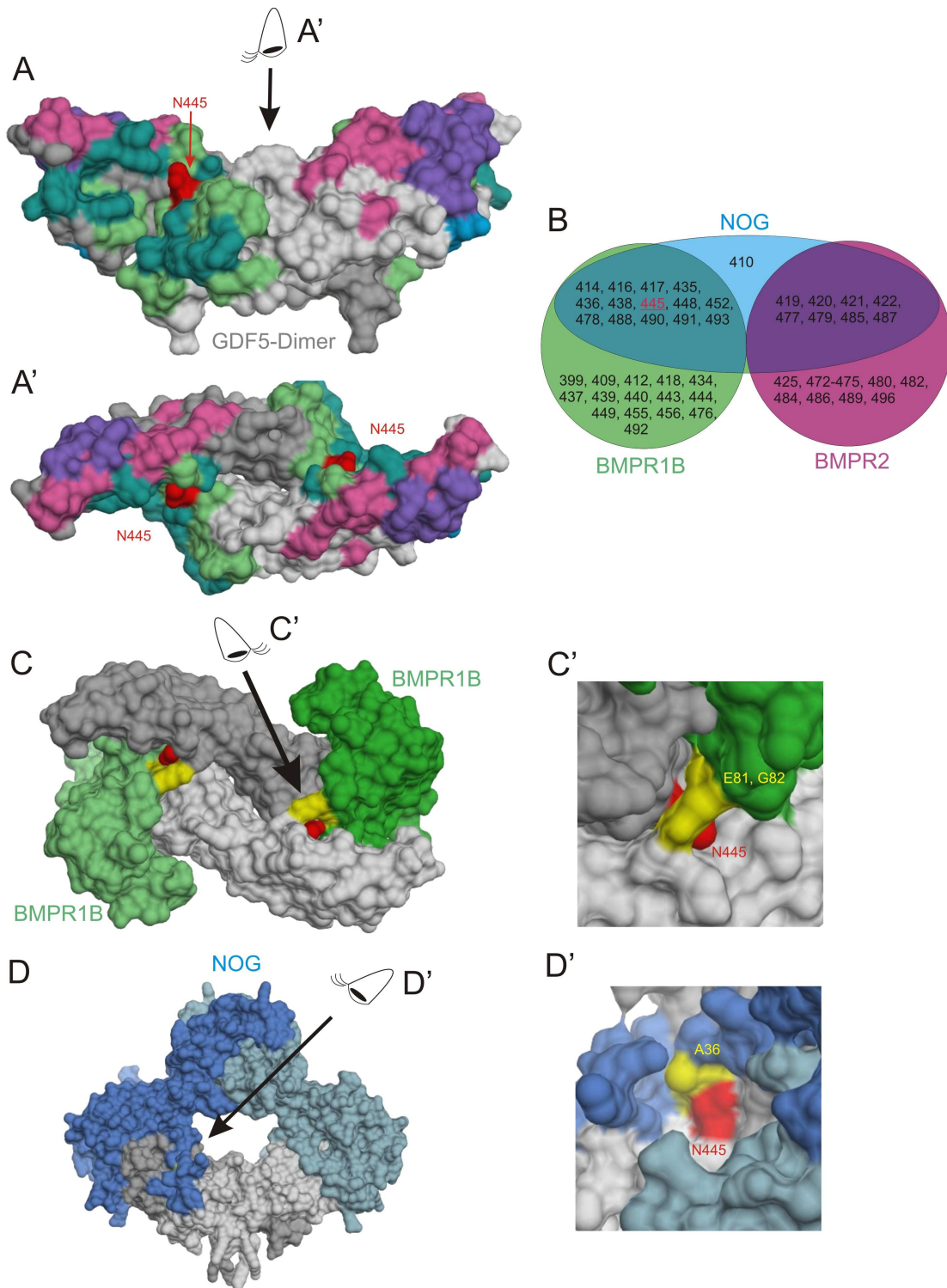
Die Proteinoberflächenstrukturmodelle von BMP2 (PDB: 3BK3), BMP7 (PDB: 1LXI), BMP9 (PDB: 1ZKZ) und GDF5 (PDB: 1WAQ) wurden mit Chimera nach ihrer Hydrophobizität analysiert; rot-hydrophob, blau hydrophil. Die Positionen der untereinander homologen Mutationsstelle wurde türkis hervorgehoben. Im Vergleich untereinander weisen die BMPs eine ausgeprägtere hydrophobe Tasche (rote Umrandung) unterhalb der Mutationsstelle auf als GDF5.

Im 3D-Proteinstrukturmodell von GDF5 (PDB: 1WAQ) ist die Mutationsstelle N445 am N-terminalen Ende der großen  $\alpha 3$ -Helix positioniert, wobei die Amid-Nebenkette tangential verläuft und eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückrat des langen Fingers 2 über den Carbonylrest von E491 entlang der Dimerinteraktionsfläche ausgebildet wird. In Abb. 4.4 ist ein 3D-Proteinoberflächenmodell des GDF5-Dimers dargestellt, hierbei sind die Interaktionsflächen mit den BMP-Rezeptoren und NOG farblich hervorgehoben.

Bei der Analyse der GDF5 Proteinstruktur im Interaktionsmodell mit BMPR1B (PDB: 3EVS) scheint N445 von den Aminosäuren E81 und G82 vom Rezeptor umschlossen zu sein, wobei durch die Bindung des Rezeptors an GDF5 eine Art Ring ausgebildet wird, in dessen Mitte sich die Nebenkette von N445 befindet. Es entsteht der Eindruck eines Schlüssel-Schloss Prinzips (siehe Abb. 4.5 C und C'). Mit Hilfe eines Superpositionsmodells der GDF5 Kristallstruktur im BMP7-NOG Interaktionskomplex (PDB: 1M4U) konnte eine Vorhersage der Interaktionsflächen von GDF5 mit NOG getroffen werden (siehe Abb. 4.5 D). Hierbei

bildet das konservierte Asparagin wie im BMP7-NOG-Komplex mit dem Amid des Aminosäurerests zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Carbonylresten des Proteinrückrats aus. Eine besteht, wie bereits beschrieben, mit E491 entlang der Dimerisierungsoberfläche in GDF5 und die zweite Wasserstoffbrücke wird mit A36 von NOG ausgebildet. Zusätzlich kommt noch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylrest der Asparaginseitenkette und dem Amid von A36 von NOG zum tragen.

Durch diese Modelle lässt sich ableiten, dass beim Austausch von Asparagin 445 (Carbonyl- und Amidgruppe) mit Lysin (längere Seitenkette und Amidgruppe) oder Threonin (kleinere Seitenkette und Hydroxylgruppe) durch den Wechsel der Art und Position der funktionellen Gruppen die spezifische Interaktion mit NOG als auch BMPRI1B in der Form nicht mehr gewährleistet ist.



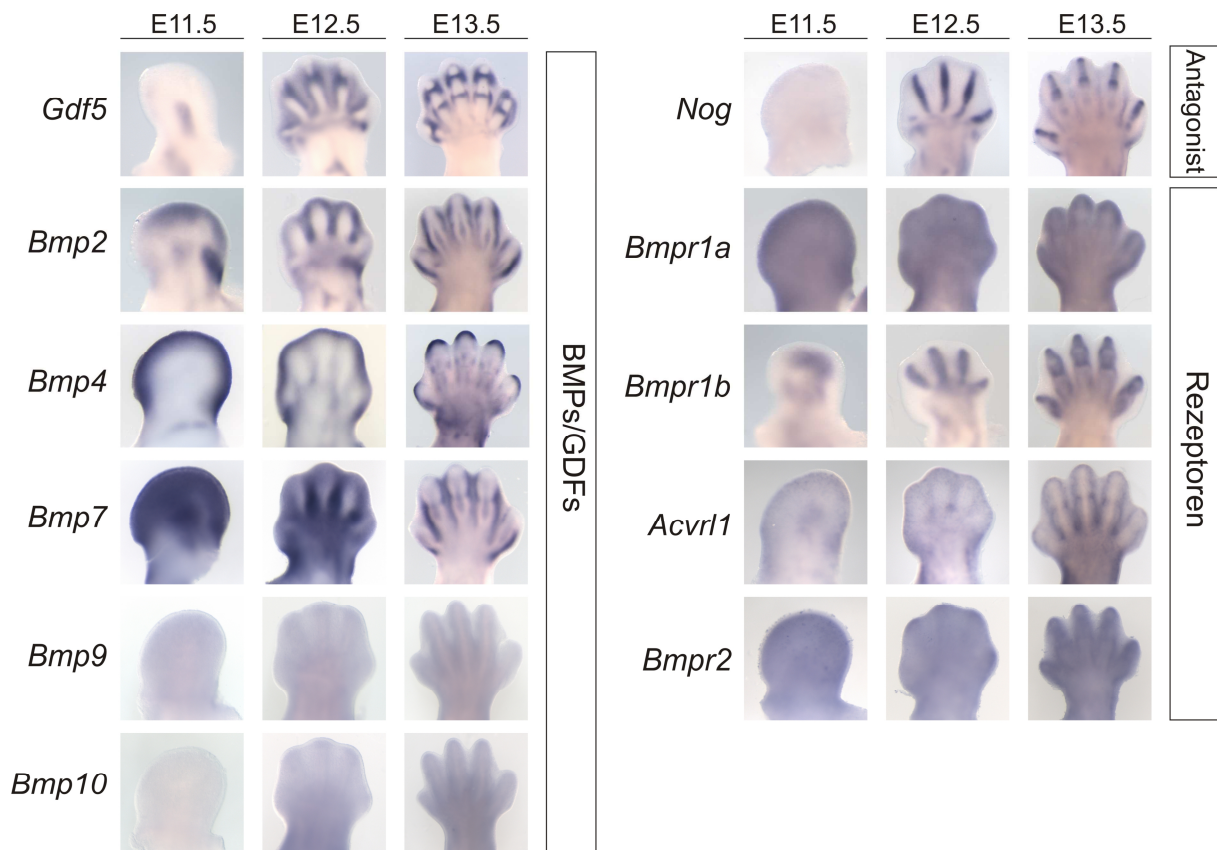
**Abb. 4.5: Lokalisation der Mutationsstelle im 3D Proteinoberflächenmodell eines GDF5-Dimers.**

**A)** Das GDF5 Dimer (hellgrau und dunkelgrau) ist über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Die Aminosäuren der jeweiligen Interaktionsflächen sind farblich hervorgehoben: alleinig mit BMPR1B (grün), BMPR2 (pink), NOG (blau); überlappend BMPR1B & NOG (türkis) und BMPR2 & NOG (violett). Die Aminosäure N445 ist rot eingefärbt und befindet sich innerhalb der Interaktionsbereiche zu BMPR1B und NOG. PDB: 1WAQ. **A')** Draufsicht von **A**. **B)** Venn-Diagramm der vorhergesagten Aminosäuren von GDF5, die wichtig für die Interaktion mit den Rezeptoren und NOG sind. **C)** Draufsicht eines GDF5 Dimers im Komplex mit BMPR1B. N445 (rot) ist umschlossen von E81 und G82 von BMPR1B. PDB: 3EVS. **C')** Anderer Blickwinkel von **C** in Vergrößerung. **D)** Superpositionsmodell eines GDF5 Dimer in Komplex mit NOG abgeleitet aus BMP7-NOG-Komplex PDB: 1M4U. N445 (rot) interagiert mit A36 von NOG. **D')** Anderer Blickwinkel von **D** in Vergrößerung. Abbildung modifiziert und erweitert (Seemann et al.2009).

#### 4.1.2 Expressionsstudien von GDFs/BMPs und ihrer Interaktionspartner während der Extremitätenentwicklung

Für die weiteren Untersuchungen sollen *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp7* als bereits gut charakterisierte chondrogene Faktoren, die ebenfalls wie *Gdf5* eine wichtige Rolle während der Extremitätenentwicklung spielen und durch *Nog* inhibierbar sind, vergleichend herangezogen werden. Insbesondere *Bmp2* und *Bmp7* nehmen durch ihre Bedeutung für klinische Anwendungen in der regenerativen Medizin, für die *Gdf5* ebenfalls in Betracht gezogen wird, eine wichtige Stellung als Vergleichsreferenz ein. Zusätzlich werden *Bmp9* und *Bmp10* aufgrund ihrer Sequenzauffälligkeit im Alignment der TGF $\beta$ -Superfamilie (Abb. 4.3) untersucht. Beide Proteine tragen an der homologen Mutationsstelle N445 in *GDF5* natürlicherweise ein Lysin, wie die *GDF5* Variante N445K. Dies bildet einen interessanten Ausgangspunkt für tieferegehende Analysen.

Um zunächst einen Eindruck über die Rolle dieser Vertreter während der Extremitätenentwicklung zu bekommen, wurden Wholemount *in situ* Hybridisierungen (WM-ISH) durchgeführt, die ihre Interaktionspartner, die *Bmp*-Rezeptoren und *Nog*, miteinschließen.



Abbildungslegende siehe nächste Seite.

### **Abb. 4.6: Expression ausgewählter BMPs/GDFs und ihrer Interaktionspartner während der Extremitätenentwicklung.**

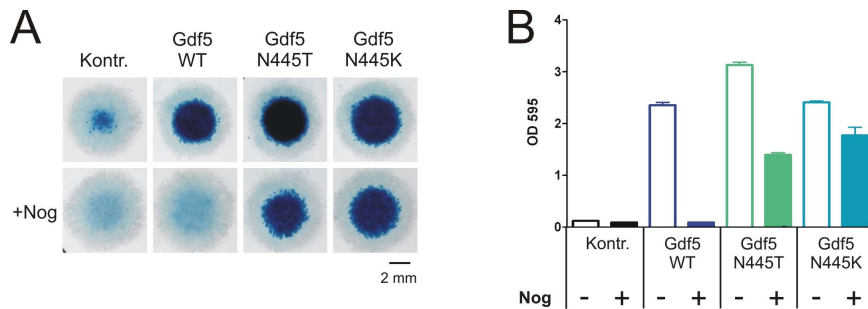
Mausembryonen der Stadien E11.5 bis E13.5 wurden einer WM-ISH unterzogen. Blauer Farbniederschlag repräsentiert Expressionsorte der untersuchten Gene. *Gdf5* ist vornehmlich in den Gelenkanlagen und im Gelenkspalt exprimiert. *Bmp2* und *Bmp7* zeigen eine sehr dynamische Expression vom Extremitätenfeld über das interdigitale Mesenchym bis hin zu entstehenden Sehnen und Gelenke. *Bmp4* ist hingegen vornehmlich im AER exprimiert und nur schwach in der Gelenksregion. *Bmp9/10* weisen kein spezifisches Signal in den Extremitäten auf. *Nog* zeigt sich stark in den frühen Kondensationen. Die Rezeptoren *Bmpr1a* und *Bmpr2* sind ubiquitär exprimiert, wohingegen *Bmpr1b* bzw. *Acvr11* spezifisch um die Kondensationen bzw. auch im Gelenk zu finden sind.

*Gdf5* und *Bmp2/4/7* zeigen jeweils eine sehr spezifische Expression während der Extremitätenentwicklung, wobei alle im Bereich des sich entwickelnden Gelenks bei E13.5 anzutreffen sind. Demgegenüber konnten für *Bmp9/10* keine Expressionssignale in der Extremität festgestellt werden, somit ist ihnen keine Bedeutung während der Extremitätenentwicklung beizumessen. Jedoch wird bemerkenswerterweise ihr Bmp-Typ1 Rezeptor *Acvr11* (*Alk1*) schwach im interdigitalen Mesenchym als auch in der Gelenksregion exprimiert. Die beiden anderen Typ1 Rezeptoren, *Bmpr1a* und *-b*, als auch *Bmpr2* zeigen ein überlappendes Expressionsmuster mit *Gdf5* und *Bmp2/4/7*. Im Gegensatz dazu weist der Antagonist *Nog* eine komplementäre Expression in den frühen Kondensationen auf.

### **4.1.3 GDF5 Mutanten stimulieren die Chondrogenese und sind Nog-insensitiv**

Zur funktionellen Analyse der chondrogenen Eigenschaften der GDF5 Mutanten wurde das Mikromass Kultursystem, ein *in vitro* Modell für Knorpelzellendifferenzierung, verwendet (Seemann, 2006). Dabei handelt es sich um mesenchymale Vorläuferzellen, die aus den Extremitätenknospen von Hühnerembryonen isoliert werden und das Stadium der initialen Knorpelkondensation während der Extremitätenentwicklung *in vitro* reflektieren. Nach kurzer Zeit differenzieren diese Kulturen, ähnlich einer *in vivo*-Situation, zu Chondrozyten und formen Knorpelkondensationen. Dieses Zellsystem kann zu Beginn der Kultivierung mittels eines hühnerspezifischen Retrovirus (RCAS) mit nahezu 100 %iger Transfektions-Effizienz infiziert und somit für Expressions- und Coexpressionsexperimente genutzt werden. Da in der Mikromasskultur für GDF5 ein stimulierender Einfluss auf die Chondrogenese nachgewiesen wurde und die biochemischen Prozesse, die zur Handfehlbildung im Patienten führen, übertragbar sind, erscheint das Mikromass Kultursystem gut geeignet, um Mutationen in diesem Gen *in vitro* zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurden Viruskonzentrate von den RCAS-Klonen, die für die Gdf5-Varianten Wildtyp (WT), N445T und N445K als auch den BMP-Antagonist Nog kodieren, hergestellt und zur Infektion der Mikromass-Zellen herangezogen. Das Differenzierungsstadium wurde quantitativ über die Anfärbung der Proteoglykane mit Alcian Blau analysiert.



**Abb. 4.7: Gdf5 Mutationen N445T und N445K werden nicht durch Nog in der Mikromass inhibiert.**

Mikromass Kulturen aus Hühnchen Extremitätenknospen werden zur Proteinüberexpression retroviral infiziert und nach 5 tägiger Kultivierung mit Alcian Blau gefärbt. **A)** WT Gdf5 und Gdf5 Mutanten N445T und N445K stimulieren die Chondrogenese stark. Co-Infektion mit Nog inhibiert diesen Effekt bei der Kontrolle und bei WT Gdf5. Im Gegensatz dazu werden die Gdf5 Mutanten N445T und N445K nur leicht von Nog inhibiert. **B)** Quantifizierung der Alcian Blau Färbung nach Extraktion und photometrischer Vermessung bei OD<sub>595</sub>, n=4. Abbildung modifiziert nach (Seemann u. a., 2009).

Entsprechend der bereits beschriebenen Ergebnisse, induziert WT Gdf5 eine massive Knorpeldifferenzierung, die komplett durch die Co-Infektion mit dem BMP-Antagonisten Nog unterbunden wird. Dies zeigt sich durch die Anfärbung der Kulturen mit Alcian Blau (Abb. 4.7).

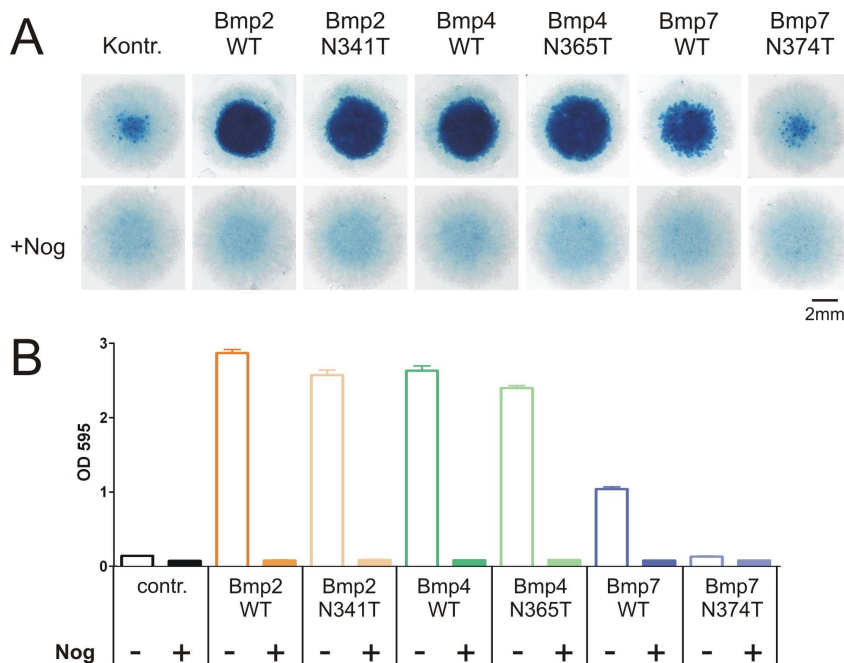
Im Vergleich dazu bewirken die beiden Gdf5 Mutanten ebenfalls eine massive Chondrogenese, wobei sich diese nur teilweise durch Nog inhibieren lässt. Darüber hinaus ist das chondrogene Potential der N445T-Mutante leicht erhöht, was sich aus der Quantifizierung der Alcian Blau Färbung ableitet.

#### 4.1.4 Homologe Mutation in BMP2/4/7 sind Nog-sensitiv

Eine zielgerichtete Veränderung der biologischen Aktivität hin zur Antagonistenresistenz ist insbesondere für Bmp2 und Bmp7, als Wirkstoffe zur Induktion der Knochenregeneration, von großem Interesse. Beide BMPs sind wie Gdf5 Nog-sensitiv, was bei der Anwendung zur Frakturheilung durch die negative Feedback-Regulation über Nog eine verminderte



Effektivität der Behandlung bedingt. Daher könnten Nog-insensitive BMP-Varianten für eine höhere Erfolgsquote und eine geringere Einsatzmenge des Proteins während der Behandlung sorgen. Zur Analyse, ob die homologe Mutationsstelle zu N445 in Gdf5 bei den anderen Vertretern der Bmp-Familie eine vergleichbare Veränderung der biologischen Aktivität bewirkt und eine derart entscheidene Rolle bei der Antagonisteninteraktion einnimmt, wurden analoge Mutationen in Bmp2 (N341T), Bmp4 (N365T) und Bmp7 (N374T) durch Mutagenese eingeführt und ebenfalls RCAS-Viruskonzentrate hergestellt. Daraufhin wurden diese ebenfalls im Mikromass Kultursystem getestet.



**Abb. 4.8: Die homologe GDF5 Mutation N445T beeinflusst in Bmp2, Bmp4 und Bmp7 nicht die Nog Inhibierung.**

Retrovirale Expression der aufgeführten Proteine in Hühnchen Mikromass Kulturen und Färbung der Kulturen mit Alcian Blau nach 5 Tagen Kultivierung. **A)** WT Bmp2, WT Bmp4, WT Bmp7 und die homologen Mutanten zu Gdf5 N445T namentlich Bmp2 N341T und Bmp4 N365T induzieren die Chondrogenese stark. Im Gegensatz dazu führt die Mutation bei Bmp7 N374T zu einem Funktionsverlust. Alle Bmp's und Bmp Varianten lassen sich vollständig durch Nog inhibieren. **B)** Photometrische Quantifizierung der Alcian Blau Färbung bei OD<sub>595</sub>, n=4.

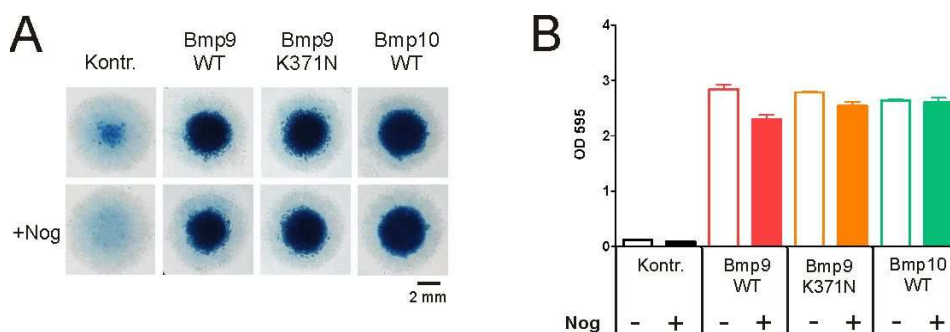
Die WT-Varianten von Bmp2/4/7 bewirken im Knorpeldifferenzierungsmodell eine starke Induktion der Chondrogenese im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle, wobei Bmp7 ein geringeres Potential zur Induktion besitzt. Alle drei Bmp's lassen sich durch Nog vollständig inhibieren.

Im Vergleich zu den WT-Proteinen zeigen die Mutanten ebenfalls eine vollständige Inhibierbarkeit durch Nog. Das chondrogene Potential bleibt durch die Mutation bei Bmp2 und Bmp4 erhalten, wohingegen Bmp7 seine Fähigkeit, die Chondrogenese zu induzieren, scheinbar verliert und nur eine vergleichbare Menge an Kondensationen wie in der Kontrolle zu beobachten ist.

Demzufolge haben die Mutationen in den untersuchten Bmp's keinen Einfluss auf die Interaktion mit dem BMP-Antagonisten Nog, wohingegen bei Bmp7 die biologische Aktivität in Bezug auf die chondrogene Eigenschaft stark beeinträchtigt wird.

#### 4.1.5 Bmp9 und Bmp10 stimulieren die Chondrogenese und sind Nog-insensitiv

Da BMP9 und BMP10 im Alignment der TGF $\beta$ -Superfamilie (Abb. 4.3) durch die Anwesenheit der Aminosäure Lysin an der homologen Mutationsstelle N445T/K in GDF5 aufgefallen sind, wurden diese ebenfalls für vergleichende Untersuchungen im Mikromass Kultursystem herangezogen (Abb. 4.9). Die ersten Mikromass Ergebnisse der GDF5 N445T/K Mutanten zeigten, dass durch Mutation an dieser Position eine Nog-Insensitivität bewirkt wird, daher ist eine Nog-Resistenz bei Bmp9 und Bmp10 zu vermuten. Parallel wurde ebenfalls die Mutagenese K371N im Bmp9 vollzogen, welche einer „Rückmutation“ zur GDF5-Sequenz entspricht und dessen Wirkung im Idealfall die Inhibition von Bmp9 durch Nog ermöglicht. Dieses Experiment soll zeigen, wie essentiell dieser Aminosäureloкус für die Nog-Interaktion ist.



**Abb. 4.9: Bmp9 und Bmp10 sind Nog-resistent.**

Retrovirale Expression von Bmp9 und Bmp10 in Hühnchen Mikromass Kulturen und Färbung der Kulturen mit Alcian Blau nach 5 Tagen Kultivierung. **A**) WT Bmp9, WT Bmp10 und Bmp9 K371N zeigen einen starken chondrogenen Effekt, der nicht durch Nog inhibiert werden kann. **B**) Photometrische Quantifizierung der Alcian Blau Färbung bei OD<sub>595</sub>, n=4.



Die untersuchten Bmp's bewirken im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle eine massive Induktion der Chondrogenese, die sich nur minimal bzw. gar nicht durch Nog beeinflussen lässt. Somit zeigen diese Proteine eine biologische Aktivität im Mikromass-System, die vergleichbar ist zu Gdf5 N445T/K.

Jedoch bewirkte die Mutation K371N in Bmp9 keine Nog-Sensitivität. Demnach ist zu vermuten, dass bei Bmp9 noch weitere potentielle Interaktionsstellen mit Nog für eine spezifische Bindung modifiziert werden müssten und die Position 371 nicht allein verantwortlich für die Nog-Sensitivität ist.

### **4.1.6 Bmp9-dreifach-Mutante ist Nog-sensitiv**

Die einfache „Rückmutation“ K371N von Bmp9, homolog zu WT Gdf5, bewirkte keine Nog-Sensitivität, was verdeutlicht, dass auch andere Interaktionspunkte zwischen GDFs bzw. BMPs und NOG von entscheidender Bedeutung sind.

Daher wurden in Kooperation mit Carsten Reissner vergleichende Proteinstrukturanalysen mit GDF5 und BMP9 vorgenommen. Diese ergaben weitere wichtige Interaktionsstellen, die voraussichtlich von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Interaktion zwischen BMP9 und NOG sind. Im Folgenden sind diese Stellen mit sinkender Priorität aufgelistet:

K371N > K348L > YH415Q > TL412VY > E336K.

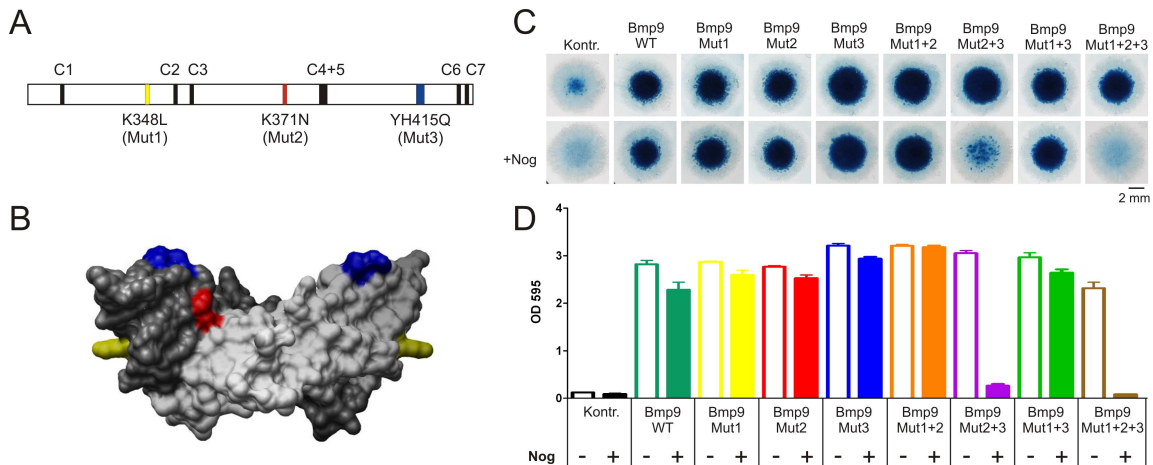
Daraufhin wurden diese Mutationen einzeln und in den verschiedenen Kombinationen untereinander in Bmp9 eingeführt, entsprechend RCAS-Viruskonzentrate hergestellt und im Mikromass System ausgetestet (vergl. Tab. 4.1). Dadurch soll geklärt werden, ob durch rationale Mutagenese anhand von Proteinstrukturvergleichen eine gezielte Veränderung der biologischen Aktivität erreicht werden kann.

**Tab. 4.1: Zusammenstellung der untersuchten Bmp9-Varianten mit einfach, zweifach, dreifach, vierfach und fünffach Mutationen.**

Die jeweils enthaltene Mutation ist grau markiert. Chondrogener Effekt in der Mikromass: + leicht stimulierend, ++ stimulierend, +++ stark stimulierend; Inhibition durch Nog: - keine, + leicht inhibierend, ++ inhibierend, +++ vollständige Inhibition.

K371N	K348L	YH415Q	TL412VY	E336K	Stamm	Effekt	Nog-Inhibition
					750	+++	-
					764	+++	-
					823	+++	-
					765	+++	-
					853	+++	+
					952	+++	-
					827	+++	-
					784	+++	++
					862	+++	-
					951	+++	-
					824	+++	-
					854	+	+++
					985	+++	-
					856	+++	-
					983	+++	-
					975	+++	-
					828	+++	+++
					855	+	+++
					986	+++	-
					863	+++	-
					984	+++	-
					976	+++	-
					864	+++	-
					973	+++	-
					979	+++	-
					977	+++	-
					865	++	+++
					974	+++	-
					980	+++	-
					978	+++	-
					982	+++	-
					953	+++	-

Zusammenfassend konnte eine Bmp9-Variante ermittelt werden, welche die Kombination von drei Mutationen (K348L, K371N, YH415Q) trägt, dabei das hohe chondrogene Potential wie WT Bmp9 aufweist, sich jedoch vollständig durch Nog inhibieren lässt. Die Kombination von zwei Mutationen (K371N und YH415Q) ermöglichte lediglich eine teilweise Inhibierbarkeit.



**Abb. 4.10: Dreifachmutation in Bmp9 ermöglicht Nog-Sensitivität.**

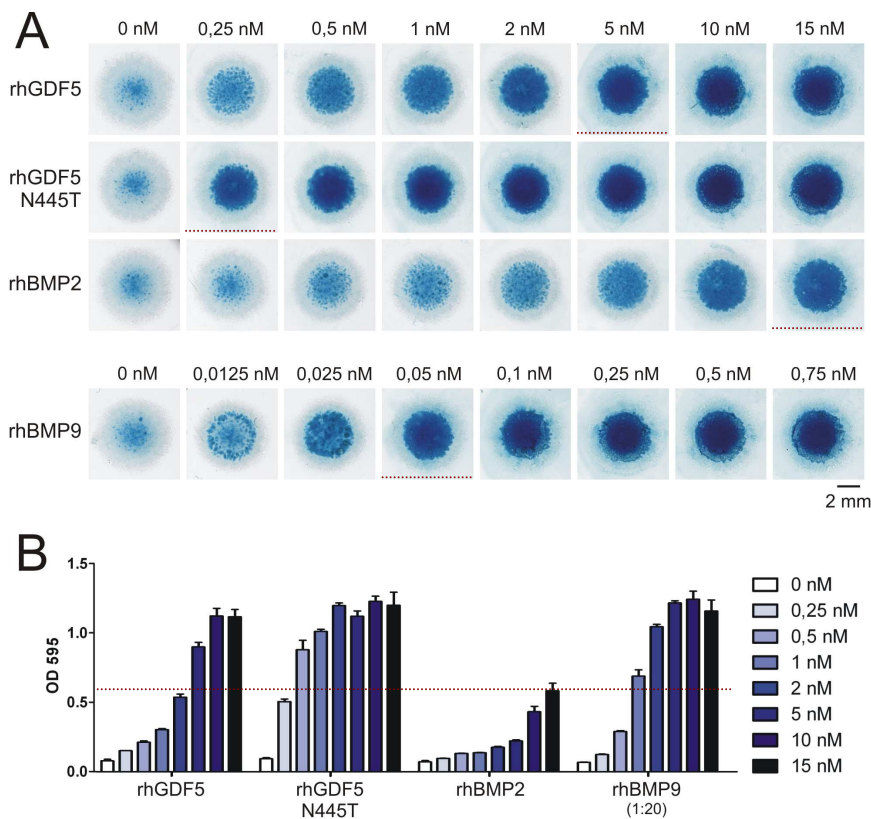
A) Schematische Übersicht der maturen Domäne von Bmp9 der Maus. Die konservierten Cysteine sind in schwarz markiert. B) 3D Proteinoberflächenmodell des Bmp9 Dimers (hellgrau und dunkelgrau; PDB:1ZKZ), welches über eine Sulfidbrücke verbunden ist. A) und B) Mut2 (K371N) repräsentiert die homologe Mutationsstelle zu GDF5 N445T und ist rot hervorgehoben. Mut1 (K348L, gelb) and Mut3 (YH415Q, blau) sind zusätzliche homologe Mutationsstellen, für die eine wichtige Rolle bei der Interaktion von GDF5 mit Nog vorhergesagt wird. C) WT Bmp9 zeigt einen starken chondrogenen Effekt, der nicht durch Nog inhibiert werden kann. Die Bmp9 Mutanten Mut1, Mut2, Mut3, Mut1+2 und Mut2+3 verhalten sich vergleichbar zu WT Bmp9, wohingegen die Bmp9 Mutante Mut2+3 sich teilweise durch Nog inhibieren läßt. Eine Kombination der gesamten 3 Mutationen in Bmp9 Mut1+2+3 (K348L, K371N, YH415Q) führt zu einer vollständigen Inhibition des chondrogenen Effekts durch Nog. D) Quantifizierung der Alcian Blau Färbung nach Extraktion und photometrischer Vermessung bei OD<sub>595</sub>, n=4. Abbildung modifiziert nach (Seemann u. a., 2009).

#### 4.1.7 Nog-insensitive BMPs zeigen erhöhte chondrogene Aktivität *in vitro* und *in vivo*

In den ersten Mikromass-Assays konnte eine leicht erhöhte chondrogene Aktivität der Gdf5 Mutante N44T im Vergleich zur WT-Form ermittelt werden (Abb. 4.7). Zur weiteren Charakterisierung der chondrogenen Aktivität wurden Mikromass-Kulturen mit unterschiedlichen Mengen von rekombinantem Protein ausgewählter BMPs/GDFs für 72 h stimuliert.

Die Stimulation mit der GDF5-Mutante N445T resultierte in einer stärkeren Chondrogenese der mesenchymalen Zellen als mit WT GDF5 oder BMP2. Demgegenüber zeigte BMP9 ein besonders starkes chondrogenes Potential, so dass zur Vermeidung von Sättigungseffekten eine 1:20 Verdünnung der Konzentrationsreihe gegenüber den anderen getesteten Proteinen eingesetzt werden musste.

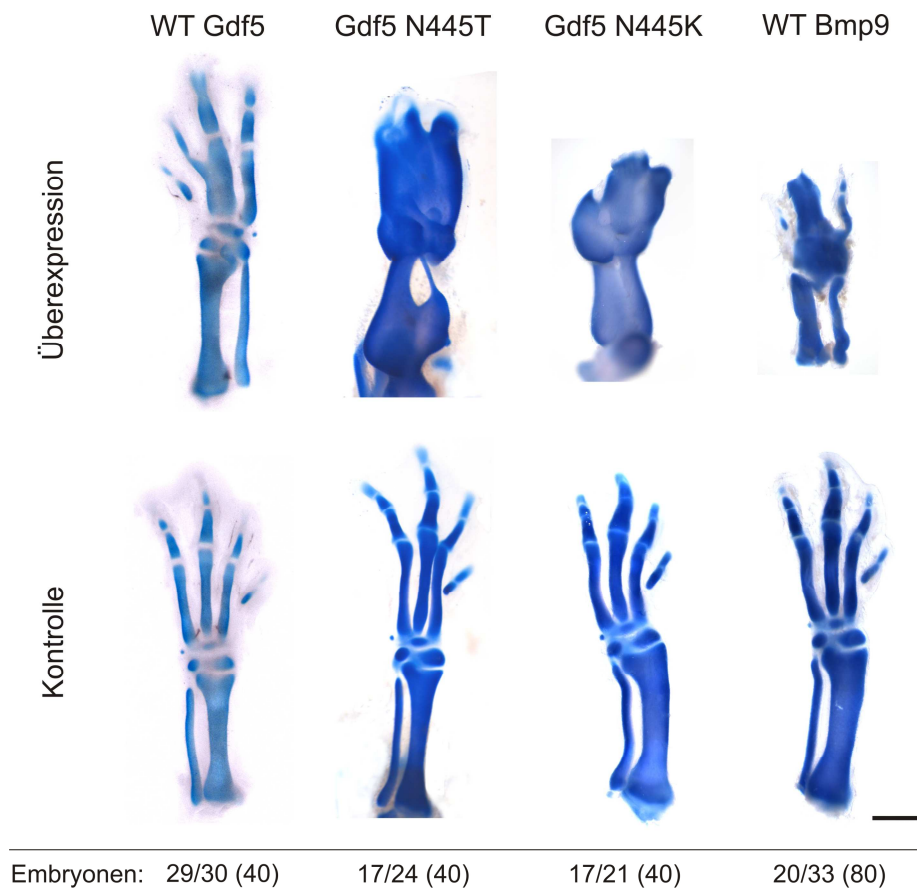
Zusammenfassend wurde eine annähernd vergleichbare chondrogene Induktion mit 2 nM WT GDF5, 0,25 nM N445T GDF5, 15 nM BMP2 und 0,05 nM BMP9 erreicht, was einen Konzentrationsunterschied von ca. 1:300 zwischen BMP9 und BMP2 bedeutet.



**Abb. 4.11: Die GDF5 Mutante N445T besitzt eine verstärkte chondrogene Aktivität.**

Stimulierung von Hühnchen Mikromass Kulturen nach 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von rhGDF5, rhGDF5 N445T, rhBMP2, und rhBMP9 für 72 h. **A)** Alcian Blau Färbung der 4 Tage alten Mikromass Kulturen. RhGDF5 N445T zeigt eine starke Induktion der Chondrogenese bereits bei niedrigen Konzentrationen. Im Vergleich dazu wird bei rhBMP2 ein weitaus geringerer prochondrogener Effekt ersichtlich. RhBMP9 besitzt das höchste chondrogene Potential. **B)** Photometrische Quantifizierung der Alcian Blau Färbung, n=3. Abbildung modifiziert nach (Seemann u. a., 2009).

Auch *in vivo* zeigten sich beträchtliche Unterschiede nach Überexpression der Gdf5 Mutanten und Bmp9 gegenüber WT Gdf5. In die Hinterextremität von 1,5 Tage alten Hühnerembryonen wurden die entsprechenden RCAS-Konstrukte injiziert, die eine Überexpression der Bmp's bis zum Tag 7 ermöglichte. Danach erfolgte eine Skelettpräparation, die das zunächst knorpelig (blau) angelegte Skelett in Erscheinung treten lässt. Die Überexpression von WT Gdf5 bewirkt eine allgemeine Verdickung der Skelettelemente als auch teilweise Fusionen der Gelenke und Zehen. Im Gegensatz dazu verursachte die Überexpression der Gdf5 Mutanten N445T/K einen weitaus schwerwiegenderen Phänotyp. Die gesamte Extremität erscheint als ein einzelnes, überdimensioniertes Knorpel-element, welches keine Zehen und Gelenke mehr erkennen lässt. Einen ähnlichen Phänotyp brachte die Überexpression von Bmp9 hervor, jedoch wurde zusätzlich ein letaler Effekt nach der Injektion erkennbar.



**Abb. 4.12: Die Gdf5 Mutanten N445T und N445K als auch Bmp9 bewirken eine verstärkte chondrogene Differenzierung nach Überexpression in Hühnerextremitäten.**

Die retrovirale Überexpression der aufgeführten Proteine erfolgt nach Injektion in die Hinterextremitäten der Hühnerembryonen im Stadium HH10. Die nicht injizierte kontralaterale Extremität dient als Kontrolle. Am Tag 7,5 der embryonalen Entwicklung wurden die Embryonen für die Durchführung einer Skelettpräparation gesammelt. WT Gdf5 bewirkt Gelenkfusionen in den Phalangen und Metakarpalknochen als auch zu einer teilweisen Fusion von Finger 1 und 2. Im Gegensatz dazu verursachen die Gdf5 Mutanten N445T und N445K als auch Bmp9 sehr schwerwiegende Phänotypen mit massiver Knorpelbildung, die zur Fusion fast aller Skelettelemente in der Extremität und dem Verlust des interdigitalen Mesenchyms führt. Embryonen: Anzahl Phänotypen/Anzahl überlebende Embryonen (Anzahl der durchgeführten Injektionen). Größenmaßstab: 1 mm. Abbildung modifiziert nach (Seemann u. a., 2009).

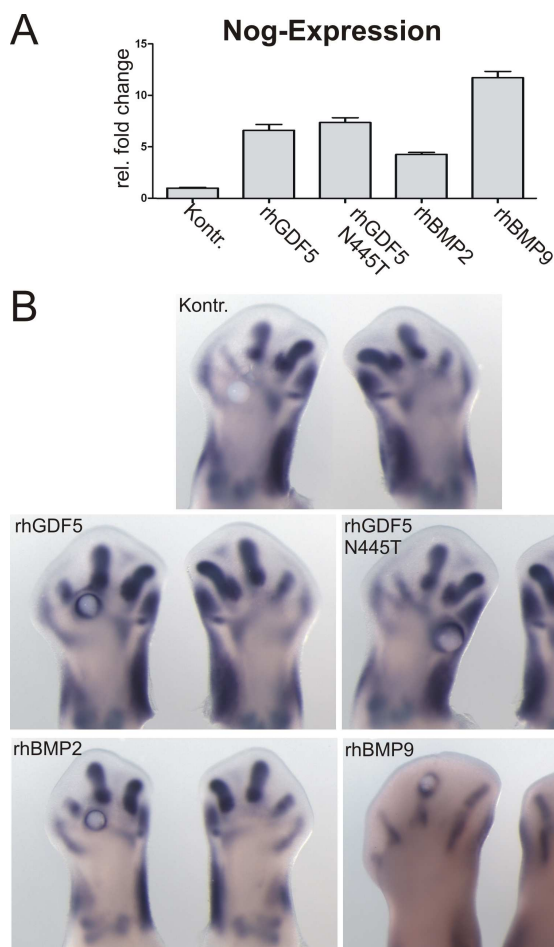
#### 4.1.8 Chondrogene BMPs induzieren Nog-Feedback Regulation

*In vitro* als auch *in vivo* zeigen die Gdf5 Varianten N445T/K als auch BMP9 eine weitaus höhere chondrogene Aktivität als WT Gdf5 und Bmp2. Um diese großen Unterschiede der biologischen Aktivität näher zu untersuchen, wurde neben differierenden Rezeptoraffinitäten auch die Nog-Feedbackregulation in Betracht gezogen, die nur bei WT Gdf5 und Bmp2 greift. Demzufolge wurde die endogene *Nog*-Expression nach 12 stündiger BMP-Stimulation der Mikromass-Kulturen mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert. Diese ergab eine

deutliche Induktion der *Nog*-Expression bei allen untersuchten BMPs gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

Zur zusätzlichen Verifizierung dieser Beobachtung wurden *in vivo* Beadimplantationen in den Extremitäten von Hühnerembryonen vorgenommen. Dafür wurden Heparinbeads mit rekombinantem Protein getränkt, wonach diese in die Extremitätenknospen von Hühnerembryonen platziert wurden. Nach 22 stündiger Inkubationszeit wurde eine WM-ISH mit einer *chNog*-Sonde angeschlossen. Da die Implantation von BMP9-Beads (0,5 mg/ml) im Stadium HH25-27 zu letalen Effekten führte (lediglich 7 von 40 injizierten Embryonen überlebten), wurde hier die Implantation zu einem späteren Stadium (HH29-30) mit einer niedrigeren Konzentration von 0,25 mg/ml präferiert.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der *in vitro* Studie wurde *in vivo* durch die Stimulierung mit rekombinanten BMPs direkt angrenzend an die Beads eine ektope *Nog*-Expression induziert. Dies war sowohl bei den WT Formen als auch bei der GDF5 Mutante N445T zu beobachten. Demgegenüber zeigte sich um die Kontrollbeads keine zusätzliche *Nog*-Expression.



**Abb. 4.13: GDF5, BMP2 und BMP9 induzieren Nog-Feedback Expression.**

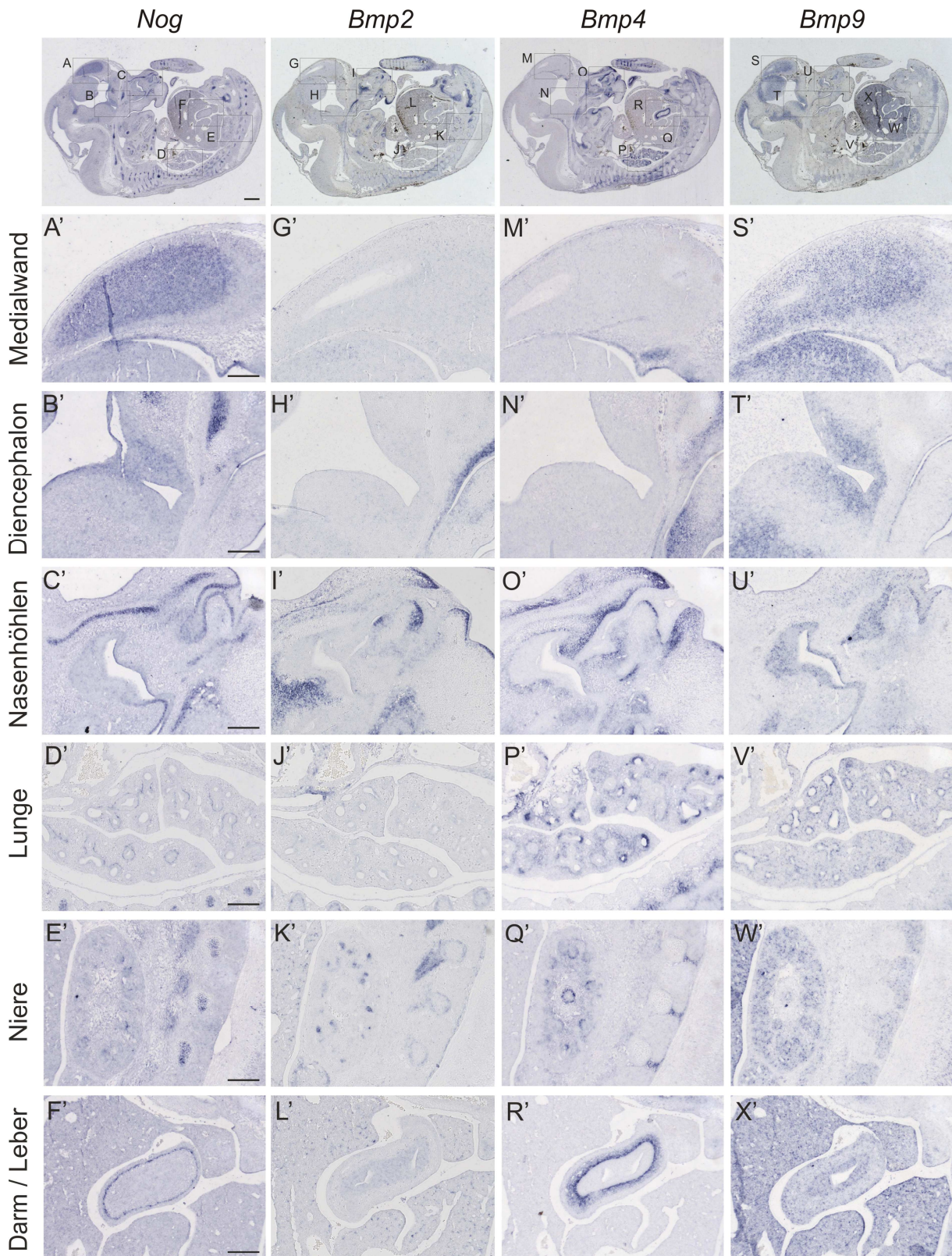
A) Semi-qRT-PCR für *chNog* nach 12 stündiger Stimulierung 24 h alter Hühner Micromass Kulturen mit 5 nM rhGDF5, rhN445T, rhBMP2 und 0.5 nM rhBMP9. Die Stimulierung mit rekombinanten Proteinen induzierte einen starken Anstieg der endogenen *Nog* Expression. B) WM-ISH zeigt die Expression von *Nog* in den Hinterextremitäten des Hühners nach Implantation von Heparinkügelchen, die mit 4 mM HCl + 0.2 % BSA, 0.5 mg/ml rhN445T, 0.5 mg/ml rhGDF5, 0.5 mg/ml rhBMP2 und 0.25 mg/ml rhBMP9 getränkt wurden. Die Kügelchen wurden zwischen den HH Stadien 25-27 und HH28 (Bmp9) implantiert, worauf die Embryonen ca. 20 h später gesammelt wurden. Im Gegensatz zur Kontrolle induzierten alle BMP-getränkten Kügelchen eine *Nog* Expression rund um das Implantat. Größenmaßstab: 0,5 mm. Abbildung modifiziert nach (Seemann u. a., 2009).

#### **4.1.9 *Nog* zeigt überlappende Expression mit *Bmp9* und *Bmp10***

Während der Extremitätenentwicklung in den Stadien E11.5 - E13.5 ist keine klare endogene Expression von *Bmp9* und *Bmp10* erkennbar (siehe Abb. 4.6). Somit konnte keine Aussage getroffen werden, ob eine Coexpression oder eine komplementäre Expression mit dem Antagonisten *Nog* stattfindet. Da jedoch eine biologische Relevanz der *Nog*-Insensitivität beider Proteine zu vermuten ist, wurden Expressionsanalysen mittels *in situ* Hybridisierung auf den gesamten Embryo ausgeweitet.

Hierbei konnten im Stadium E14.5 der Mausentwicklung mehrere Bereiche der engen Coexpression von *Bmp9* und *Nog* bestimmt werden (siehe Abb. 4.14). Neben Colokalisationen in verschiedenen Teilen des Gehirns, wie die Medialwand und im Hypothalamus des Diencephalons, zeigen sich eng beieinander liegende Expressionsmuster in der Niere, der Lunge, im Darm und im primordialen Knorpelgewebe, welches die nasalen Höhlen umgibt. Darüber hinaus konnten neben der starken Expression in der Leber weitere bisher unbekannte Expressionsorte von *Bmp9* im Dach des Mesencephalons, im Rückenmark als auch im Cerebellar Primordium identifiziert werden. Jedoch war es nicht möglich, die Genexpression von *Bmp9* in weiteren Geweben des sich bildenden Skeletts neben dem Nasalknorpel zu dokumentieren. Vergleichend dazu wurde auf parallelen Schnitten die Expression von *Bmp2* und *Bmp4* untersucht, deren Expression deutlich stets angrenzend zur *Nog*-Expression verläuft.





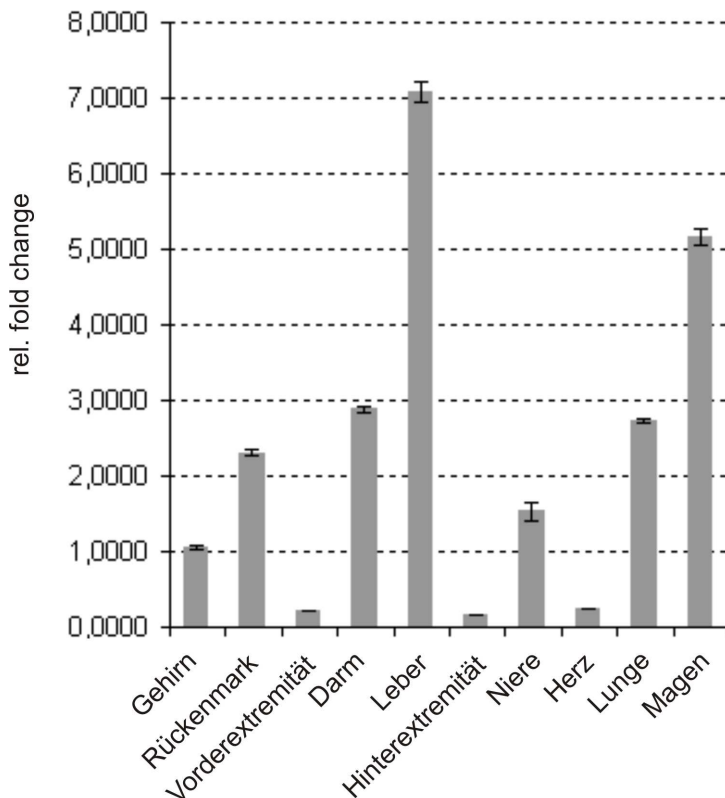
Abbildungslegende siehe nächste Seite.



**Abb. 4.14: Expression von *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp9* und *Nog* im Mausembryo.**

P-ISH von *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp9* und *Nog* auf sagitalen Schnitten eines Mausembryos im Stadium E14.5. A'-X' zeigen Expressionsorte mit höherer Vergrößerung. *Bmp9* ist vornehmlich in der Leber exprimiert, aber auch in anderen Geweben wie im Gehirn (S' Medialwand, T' Teilen des Diencephalons (Thalamus und Hypothalamus), im intraventrikularen Bereich des Cerebellar Primordium und Dach des Mesencephalon), der Niere (W'), der Lunge (V'), dem Darm (X'), im Rückenmark und in Umgebung der nasalen Höhlen (U'). *Nog* ist in chondrogenen Strukturen des appendikulären und axialen Skeletts, in Bereichen des Gehirns (A' Medialwand, F' Hypothalamus) und im Knorpelgewebe der nasalen Höhlen exprimiert. Weitere schwache Expressionen konnten in der Lunge (D'), der Niere (E') und in Darm und Leber (F') gefunden werden. *Nog* und *Bmp9* sind unter anderem co-exprimiert in der Medialwand des Gehirns, im Diencephalon, in den sich entwickelnden Glomeruli der Niere, in der Lunge und Bereich des nasalen Knorpelgewebes. *Bmp2* und *Bmp4* sind in dichter Umgebung zu *Bmp9* und *Nog* an verschiedenen Orten exprimiert. Größenmaßstab: 0.2 mm.

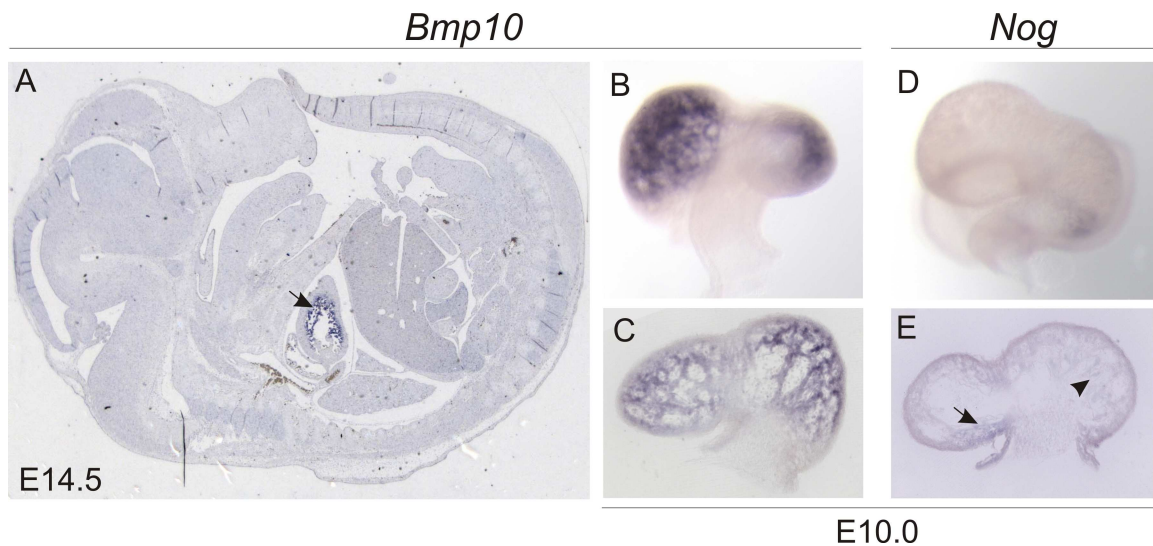
Zur Bestätigung der P-ISH-Ergebnisse wurden für ausgewählte Gewebe RT-PCR Analysen durchgeführt. Die stärkste *Bmp9* Expression ist in Leber und Magen zu verzeichnen, wohingegen in den Extremitäten und im Herz nahezu keine Expression stattfindet.



**Abb. 4.15: RT-PCR: Expression von *BMP9* in Geweben eines Mausembryos E14.5.**

Semi-qRT-PCR für *BMP9* auf RNA-Isolaten der aufgeführten Gewebeproben. Die Extremitäten als auch das Herz zeigt keine *BMP9*-Expression. Die stärksten Expressionen finden in Leber und Magen statt. In Gehirn, Rückenmark, Darm, Niere und Lunge sind leichte Expressionen von *BMP9* nachweisbar, n=3.

Für *Bmp10* wurde, wie bereits in der Literatur ausführlich dokumentiert ist (Chen u. a., 2004b), lediglich eine starke Expression im sich entwickelnden Herzen beobachtet. Eine temporär überlappende Expression mit *Nog* findet im Stadium E10 der embryonalen Mausentwicklung statt. *Nog* ist hierbei sehr schwach im trabekulären und kompakten Myocardium exprimiert, wobei die Expression von *Bmp10* zu diesem Zeitpunkt auf das trabekuläre Myocardium beschränkt ist.



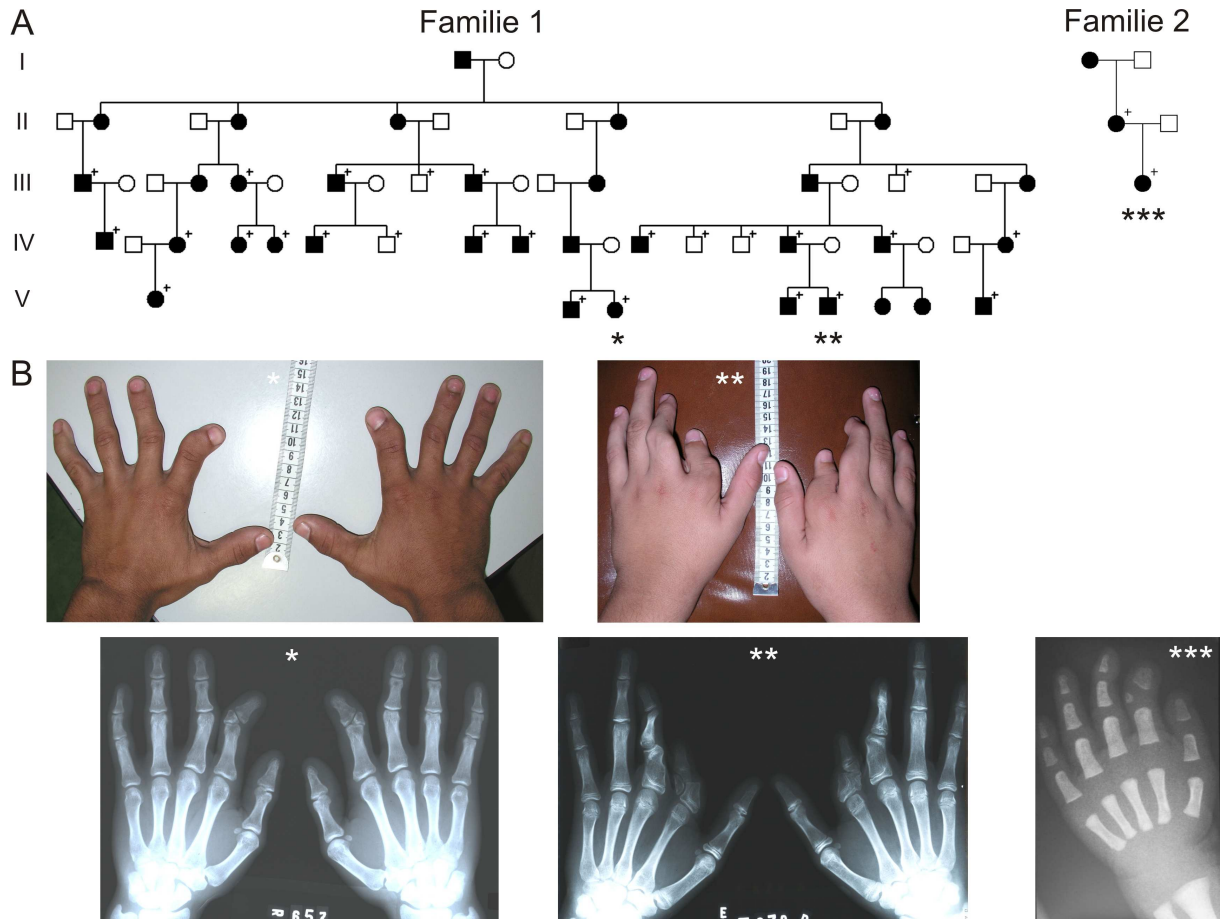
**Abb. 4.16: *Bmp10* und *Nog* sind im Herz coexprimiert.**

ISH auf Paraffingewebeschnitten (E14.5, A) und ganzen Körpern (E10.0, B-E) von Mäusemryonen. Wobei C bzw. E Vibratomschnitte von B bzw. D sind. A-C) *Bmp10* ist im trabekulären Myocardium exprimiert, siehe Pfeil. D-E) *Nog* zeigt eine sehr schwache Expression im trabekulären (Pfeilspitze) als auch kompakten (Pfeil) Myocardium.

#### **4.2 Mikroduplikation in der 3'-Region von BMP2 ist mit BDA2 assoziiert**

In Zusammenarbeit mit Jordao Neto und Decio Brunoni (Centro de Genetica Medica, Universidade Federal de Sao Paulo) sowie Klaus Kjaer (Institute of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen) und Katarina Dathe (Institut für Medizinische Genetik Charité) wurden zwei nichtverwandte Familien europäischen Ursprungs untersucht, in denen die Brachydaktylie vom Typ A2 diagnostiziert wurde (siehe Abb. 4.17). Einige Mitglieder der brasilianische Großfamilie 1 mit deutschem Ursprung wurden bereits in (Freire-Maia u. a., 1980) phänotypisch beschrieben.

Die autosomal dominant vererbte Brachydaktylie ist gekennzeichnet durch eine hypoplastische, dreieckige Mittelphalange des Fingers 2 kombiniert mit einem medial abgewinkelten Gelenk, welches einen atypischen oder auch fehlenden Bewegungsradius aufweist. Zusätzlich wurde bei einigen Betroffenen eine eingeschränkte Bewegungsfähigkeit der distalen oder proximalen Fingergelenke in den Fingern 2, 3 und 5 festgestellt. Die Füße sind im Allgemeinen milder betroffen, was sich mit einer verkürzten und radial abgewinkelten 2. Zehe z.T. auch kombiniert mit einem Hallux Valgus der großen Zehe äußert. Nur bei einem Patienten zeigt sich bei unauffälligen Händen eine beidseitige Verkürzung der 2. Zehe als einziges phänotypisches Merkmal. Die am stärksten betroffene Person (\*\* in Abb. 4.17) weist beidseitig eine Verkürzung und Fehlbildung der meso- und proximalen Phalangen in den Fingern 2 und 3 auf, wobei die Beweglichkeit der Gelenke z.T. stark eingeschränkt oder gar nicht möglich ist. Dies ähnelt einer BD Typ C, jedoch zeigt sich in den Füßen nur eine Verkürzung und dreieckige Form des Mesophalanx der 2. Zehe mit einem Hallux Valgus der großen Zehe.



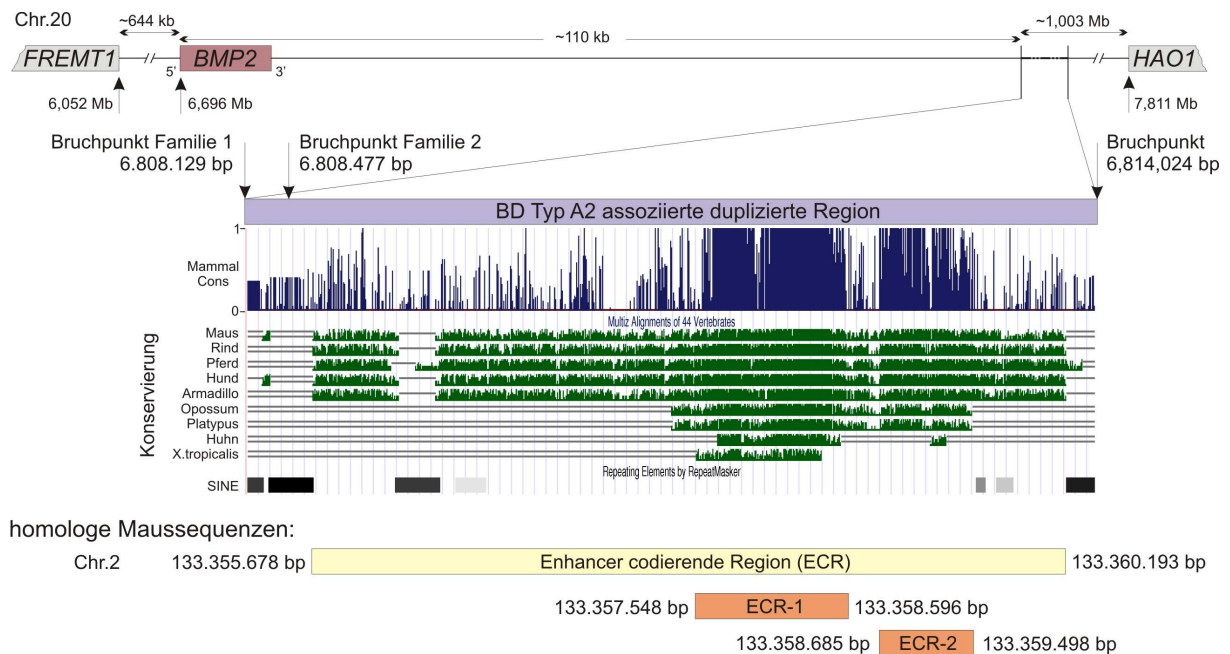
**Abb. 4.17: Stammbaum und Phänotyp der BDA2-Patienten.**

A) In den Stammbäumen sind die betroffenen Personen mit schwarz gefüllten Symbolen hervorgehoben. Mit einem + markierte Personen wurden klinisch untersucht und für die molekularen Untersuchungen herangezogen. B) Durch Duplikation verursachter klinischer Phänotyp. Es zeigte sich eine BD Typ A2 bei fast allen Betroffenen, exemplarisch dargestellt Foto und Röntgenaufnahmen eines betroffenen Erwachsenen (\*) und eines 18 Monate alten Kindes (\*\*\*). Die BD Typ A2 ist durch einen verkürzten und medial abgeknickten 2. Finger gekennzeichnet, der durch eine hypoplastische und dreieckige Mittelphalange bedingt ist. Eine betroffene Person in Familie 1 (\*\*) wies einen schwerwiegenderen Phänotyp auf. Finger 2 und 3 sind verkürzt als auch abgeknickt, was durch hypoplastische und fehlgeformte proximal und mittel-Phalangen bedingt ist. Dies ähnelt einer BD Typ C. Abbildung modifiziert nach (Dathe u. a., 2009).

Bei den Untersuchungen der DNA-Proben betroffener Personen am Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin konnte keine sonst übliche Mutation in der kodierenden Sequenz von *GDF5* oder *BMPR1B* festgestellt werden. Auch die Sequenzierung von sonst üblichen Brachydaktylie Kandidaten wie *IHH*, *ROR2* und *HOXD13* ergab keine Auffälligkeiten. Mittels Kopplungsanalysen und Mikrosatellitenmarker konnte in der Großfamilie 1 der Mutationsort auf ca. 1,3 Mb auf Chromosom 20 p12.3 eingegrenzt werden. In diesem Bereich befindet sich unter anderem das *BMP2*-Gen, welches jedoch laut Sequenzierungsergebnisse keine Mutation aufweist. Auch die weiteren 12 annotierten Gene in diesem Bereich waren mutationsfrei. Daraufhin konnte Katarina Dathe mit Hilfe eines hochauflösenden,

benutzerdefinierten Arrays (Sondenabstand 8 bp, Roche) eine Mikroduplikation von ca. 5,5 kb in der 3'-Region von *BMP2* identifizieren, etwa 110 kb vom *BMP2*-Transkriptionsstart entfernt (siehe Abb. 4.18).

Nachfolgende Sequenzierungen und Bruchpunktanalysen am Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin ergaben eine Tandemduplikation von 5895 bp in Familie 1 (UCSC Human Genome (March2006) chr20: 6,808,129-6,814,024) und 5547 bp in Familie 2 (chr20: 6.808.477-6.814.024), wobei der centromerische Bruchpunkt identisch in beiden Familien ist. Die Duplikation befindet sich innerhalb eines genfreien Bereiches (*gene desert*), welcher *BMP2* umgibt und speziesübergreifend besteht. Unter den Säugetieren und der Vogelspezies Huhn sind zwei hoch konservierte Regionen von ca. 1 kb und 0,6 kb Größe existent, welche cis regulatorische Enhancer Elemente vermuten lassen.



**Abb. 4.18: Schematische Darstellung des Duplikationslokuses.**

Im Menschen ist *Bmp2* von einem großen genfreien Bereich auf Chr. 20 flankiert. Innerhalb der 3' Region, ca. 110 kb downstream, beginnt die duplizierte Region von Familie 1 bei 6.808.477 bp und endet nach ca. 5,9 kb bei 6.814.024 bp. Bei Familie 2 liegt der 5' Bruchpunkt bei 6.808.477 bp und die Duplikation endet an gleicher Stelle wie bei Familie 1 (Sequenzpositionen nach UCSC Human Genome March 2006). Im multiplen Spezies-Alignment des UCSC Genome Browsers fallen zwei hoch konservierte Regionen zwischen Säugetiere und Huhn auf. Des Weiteren liegen die Bruchpunkte innerhalb von repetitiven Elementen, den SINE-Sequenzen. Die Positionen der homologen Mausequenzen auf Chr. 2 sind unter dem Alignment aufgeführt (UCSC Mouse Genome February 2006). Diese drei Sequenzen, ECR, ECR-1 sowie ECR-2, wurden für Enhancerstudien in pSfi-*HspLacZ* kloniert. Abbildung in Anlehnung an (Dathe u. a., 2009).

#### 4.2.1 Konservierte Region von ~1 kb fungiert als Extremitäten-spezifischer *Bmp2*-Enhancer

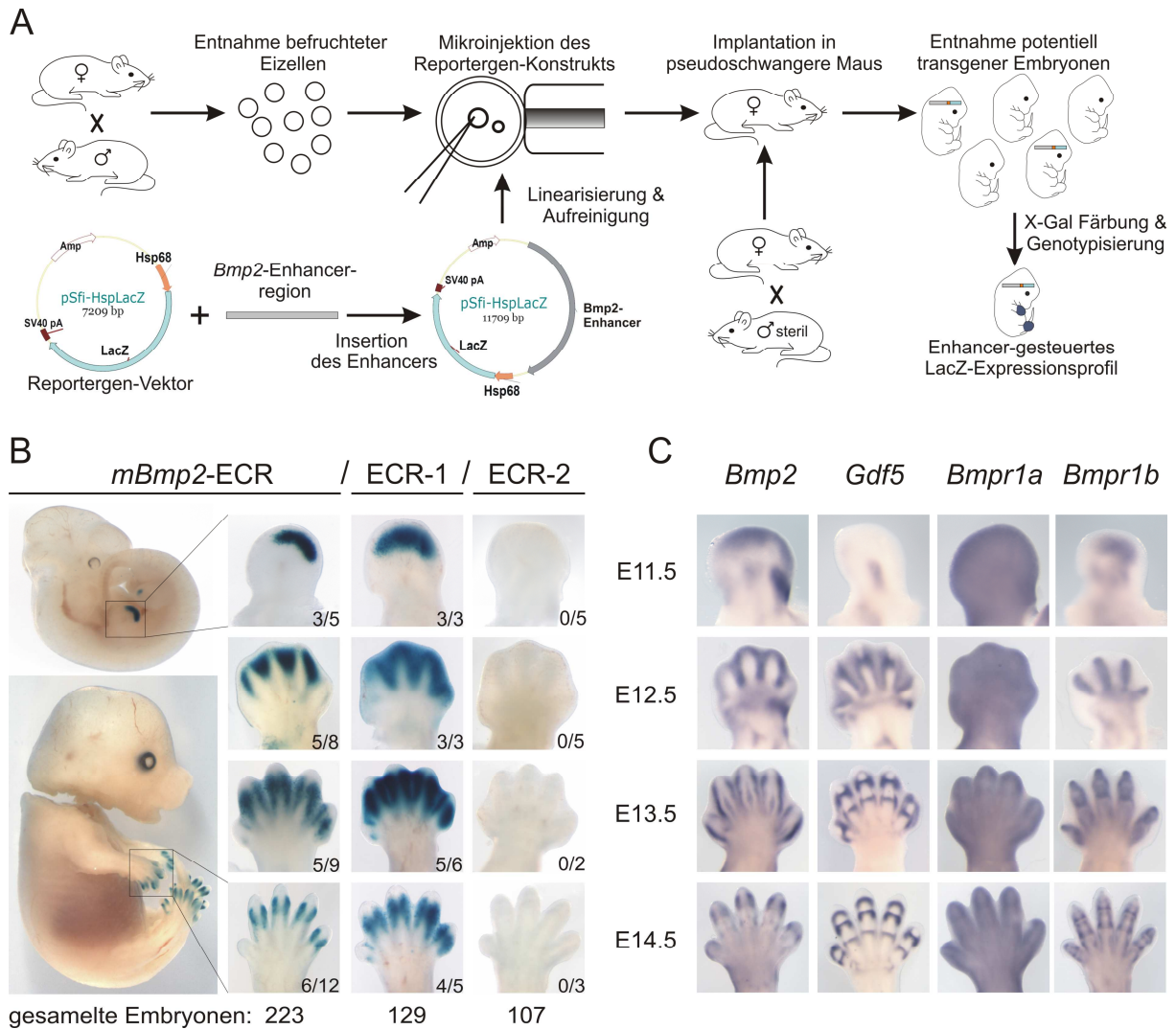
Um herauszufinden, in welchem Entwicklungsstadium und in welchem Gewebe die potentielle cis regulatorische Sequenz zu einer Genexpression führt, wurden folgende Mausequenzen in den Reporter-genvektor pSfi-*Hsp68-LacZ* inseriert und zur Generierung von transgenen Mäusen genutzt (siehe auch Abb. 4.18 und Abb. 4.19):

1. ECR – gesamte homologe Mausequenz der im Menschen identifizierten Duplikation (Enhancer kodierende Region kurz: ECR, UCSC Mouse Genome (Feb2006) chr2: 133.355.678-133.360.193)
2. ECR-1 – erste hoch konservierte Region innerhalb der ECR (UCSC Mouse Genome (Feb2006) chr2: 133.357.548-133.358.596)
3. ECR-2 – zweite hoch konservierte Region innerhalb der ECR (UCSC Mouse Genome (Feb2006) chr2: 133.358.685-133.359.498)

Die Konstrukte mit ECR-1 und ECR-2 sollen eine Feinkartierung des Enhancers auf DNA-Ebene ermöglichen, d.h. ergeben ECR-1 oder ECR-2 das gleiche Reporter-genexpressionsmuster wie ECR, so kann die Lokalisation des BMP2-Enhancers auf einen kleineren DNA-Bereich eingegrenzt werden.

Zur Umsetzung dieses Vorhabens wurden die 3 verschiedenen potentiellen Enhancer-Sequenzen in den Reporter-genvektor pSfi-*HspLacZ* upstream vom *LacZ*-Gen integriert, wobei das Reporter-gen unter der Kontrolle des Minimalpromotors *Hsp68* steht. Nach der Linearisierung und Aufreinigung der Reporter-genkonstrukte wurden diese zur Pronukleus-Injektion von C57BL6 befruchteten Eizellen im Einzellstadium herangezogen. Daraufhin wurden die erfolgreich injizierten Eizellen in scheinchwangere Mäuse implantiert und die Enhancer-induzierte LacZ-Expression in mehreren embryonalen Stadien (E11.5-E14.5) über X-Gal Färbung dokumentiert. Vergleichend dazu wurden Wholemount *in situ* Hybridisierungen zur Darstellung der Expressionsmuster von *Bmp2*, *Gdf5*, *Bmpr1b* und zusätzlich *Bmpr1a* herangezogen (Abb. 4.19).





**Abb. 4.19: Expressionsprofil von *LacZ* in transgenen Mausembryonen ähnelt der Expression von *Bmp2* und nicht der von *Gdf5*, *Bmpr1a* und *Bmpr1b*.**

**A)** Schematische Darstellung der Generierung von transgenen Mäusen. **B)** Es sind vier Entwicklungsstadien von X-Gal gefärbten transgenen Embryonen gezeigt, die unterschiedliche ECR-Reportergenkonstrukte tragen. Die Anzahl der Embryonen mit spezifischer X-Gal Färbung in den Extremitäten gegenüber der Gesamtzahl an positiven transgenen Embryonen ist jeweils in der unteren rechten Ecke angegeben. Zu beachten ist, dass die X-Gal Färbung ausschließlich im Autopod von ECR und ECR-1 transgenen Mausembryonen auftritt. Im Stadium E11.5 zeigt sich die Färbung in einer begrenzten Region des distalen Autopods. Daraufhin verschiebt sich im Stadium E12.5 die Färbung begleitend zur Ausbildung der Fingeranlagen in die interdigitale Region. Schließlich begrenzt sich die Färbung immer weiter im Stadium E13.5 und E14.5 übers Perichondrium auf die interphalangeale Gelenksregion des distalen Gelenks bzw. aufs Perichondrium der sich formierenden Mittelphalangen. **C)** WM-ISH von *Bmp2*, *Gdf5* und ihren Rezeptoren *Bmpr1a* und *Bmpr1b*. Das Expressionsmuster von *LacZ* (siehe B) überlappt teilweise mit dem von *Bmp2*. *Gdf5* ist in den sich entwickelnden Gelenken exprimiert. *Bmpr1a* ist ubiquitär in der ganzen Extremität exprimiert wohingegen sich die Expression von *Bmpr1b* auf die Fingeranlagen und später auf die interphalangealen Gelenke begrenzt ist. B) und C) in Anlehnung nach (Dathe u. a., 2009).

Für ECR konnten 223 überlebende Embryonen untersucht werden, von denen 34 (15 % von allen) nach der Genotypisierung positiv auf Reportergeninsertion getestet wurden. Davon

zeigten wiederum 19 Embryonen (56 % der Genotyp-Positiven) eine spezifische Färbung in den Extremitätenknospen. Diese Färbung ähnelt sehr der *Bmp2*-Expression in den Extremitätenknospen, wobei weitere *Bmp2*-Expressionsorte wie Barthaarfollikel und Somiten bei den X-Gal-gefärbten Embryonen nicht zu beobachten sind.

Im Stadium E11.5 wird *Bmp2* in der apikalen ektodermalen Randleiste (AER), im darunter liegenden Mesenchym und an der posterioren Seite der Extremitätenknospe exprimiert. Die letztgenannte Domäne und die AER sind bei den transgenen Embryonen nicht X-Gal-gefärbt.

Im Stadium E12.5 wird *Bmp2* vornehmlich zwischen den sich formierenden Fingern (interdigitales Mesenchym), im Bereich der Handgelenke und in den distalen Gelenken von Radius und Ulna exprimiert. Die X-Gal Färbung der transgenen Embryonen beschränkt sich jedoch auf das interdigitale Mesenchym.

Im Stadium E13.5 begrenzt sich die *Bmp2* Expression auf die dorsalen Sehnen der Finger und eine Zellschicht, die die Knorpelkondensationen umgibt, das Perichondrium. Dies ist auch bei den X-Gal-gefärbten transgenen Embryonen zu beobachten, wobei eine klare Abgrenzung der Sehnen nicht erkennbar ist.

Im Stadium E14.5 konzentriert sich die *Bmp2*-Expression hauptsächlich um die Gelenksregion der Mittel- und proximalen Phalangen und im Perichondrium rund um die sich formierenden Mittelphalangen in den einzelnen Fingern. Dieses Expressionsmuster ist in den X-Gal gefärbten transgenen Embryonen ebenfalls zu beobachten.

Die X-Gal Färbungen der Embryonen mit ECR-1-Reporterinsertion ergaben vergleichbare Expressionsmuster von *LacZ* wie bei ECR. Bei diesem Versuch wurden 129 überlebende Embryonen untersucht, wovon 17 (13 % von allen) im Genotyp positiv auf Reporterinsertion getestet wurden und davon 15 (88 % der Genotyp-Positiven) eine Extremitäten-spezifische X-Gal Färbung aufweisen.

Demgegenüber konnte für ECR-2 keine Expression von *LacZ* in den Extremitätenknospen nachgewiesen werden. Hierbei wurden 107 Embryonen untersucht, wovon 15 (14 % von allen) im Genotyp positiv waren.

Daher ist davon auszugehen, dass die ECR-1 Sequenz ein cis regulatorisches Element vermutlich in Funktion eines Enhancers für die Expression von *Bmp2* in den Extremitätenknospen darstellt.



## **5 Diskussion**

Die Aufklärung der molekularen Pathogenesemechanismen von Skelettfehlbildungen ist essentiell für das Verständnis der komplexen Vorgänge während der Knorpel- und Knochenentstehung in der Embryogenese als auch des permanenten Gewebeumbaus („remodeling“) und der Regeneration im adulten Organismus. Dabei spielen BMPs als Signalmoleküle eine wichtige Rolle. Sie beeinflussen das Wachstum, die Differenzierung, die Matrixproduktion und die Apoptose von Zellen und besitzen chemotaktische Fähigkeiten. Ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Expressionsort, -zeit und -menge der einzelnen Komponenten im BMP-Signalweg bestimmt den Verlauf der Organogenese, wobei stets ein Wechselwirken mit weiteren Signalwegen wie dem WNT-, FGF- und Hedgehog-Signalweg realisiert wird.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Pathogenese zweier Handfehlbildungen, BDA2 und SYNS1, die nach genetischen Analysen mit Mutationen betreffend BMP2 bzw. GDF5 assoziiert sind. Darüber hinaus bietet die molekulare und funktionelle Analyse detailliertere Einblicke in Protein-Protein-Wechselwirkungen und ermöglicht ein besseres Verständnis der Feinregulation innerhalb des BMP-Signalwegs.

### **5.1 Pathogenesemechanismus der GDF5 Mutationen N445T/K**

#### **5.1.1 Heterozygote Punktmutationen an Position N445 in GDF5 bedingen SYNS1**

Im Gegensatz zu Funktionsverlustmutationen in GDF5, die eine Brachydaktylie vom Typ C im Patienten hervorbringen, handelt es sich bei denen in dieser Arbeit untersuchten GDF5 Varianten (N445T und N445K) um Missense-Mutationen, bei denen ein Aminosäureaustausch von Asparagin mit Tyrosin bzw. Lysin eine andere Handfehlbildung verursacht. Das vererbte Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch mehrfache Gelenksfusionen in den Händen und Füßen sowie der Ellenbogengelenke, was eine stark eingeschränkte Beweglichkeit der Extremitäten zur Konsequenz hat. Außerdem können Fusionen im Hüftgelenk und in Wirbelkörpern auftreten. Hierbei handelt es sich um das Multiple Synostosesyndrom (SYNS1), welches bereits mit zwei heterozygot dominanten Mutationen in NOG assoziiert wurde (W217G, c58delC) (Gong u. a., 1999; Takahashi u. a.,

2001). Zusätzlich konnten weitere heterozygote NOG-Mutationen mit dem weniger schwerwiegenden aber überlappenden Phänotyp des proximalen Symphalangismus (SYM1) in Verbindung gebracht werden (Gong u. a., 1999; Takahashi u. a., 2001; Lehmann u. a., 2007). Hierbei sind vornehmlich die proximalen Gelenke in einzelnen Fingern fusioniert, wobei die Ausprägung von Patient zu Patient variiert. Aber auch einige Fusionen in den Karpal- und Tarsalknochen konnten beobachtet werden.

In den letzten Jahren wurden in weiteren SYM1 Patienten dominant heterozygote GDF5 Mutationen identifiziert (Wang u. a., 2006; Yang u. a., 2008; Seemann u. a., 2005). Hierbei konnte für die SYM1 verursachende Punktmutation R438L ein Funktionsgewinn in Form einer erweiterten Rezeptoraffinität (BMPRI1A und BMPRI1B) ermittelt werden, wohingegen WT GDF5 vornehmlich über BMPRI1B signalisiert (Seemann u. a., 2005). Somit fügen sich die GDF5 Mutationen N445T/K in das bisher beschriebene Spektrum von SYM1 und SYNS1, wobei der schwerwiegendere Phänotyp SYNS1 in allen betroffenen Familienmitgliedern – bisher einmalig für GDF5 beschrieben – auf das Zusammenwirken von zwei Effekten zurückzuführen ist, der Resistenz gegenüber den Antagonisten NOG und eine verändertere Signalweiterleitung.

### **5.1.2 Verstärkte chondrogene Eigenschaften von GDF5 N445T/K beruhen auf Nog-Resistenz**

Die in dieser Arbeit dargelegten funktionellen Analysen der SYNS1-assoziierten GDF5 Mutanten weisen auf eine aktivierende Auswirkung der Mutationen durch Verlust der NOG-Sensitivität hin. Bei der retroviralen Überexpression der Gdf5 Mutanten N445T und N445K im Mikromass Kultursystem zeigte sich eine leicht erhöhte bzw. ähnliche chondrogene Aktivität im Vergleich zu WT Gdf5. Jedoch waren besonders deutliche Unterschiede bei der Co-Expression mit Nog zu erkennen. So wird die Chondrogenese bei mit WT Gdf5 stimulierten Kulturen durch Nog vollständig unterdrückt, wohingegen dieser dominant negative Effekt von Nog bei Gdf5 N445T/K nicht zu beobachten ist. Hier tritt lediglich eine leichte Inhibierung auf (Abb. 4.7). In einem weiteren *in vitro* Assay konnte die Resistenz der Gdf5 Mutante N445T verifiziert werden. Hierbei wurden C2C12-Zellen, die stabil mit Bmpr1b transfiziert sind und somit ein ALP read out auch für WT GDF5 bieten, mit rekombinanten WT GDF5, GDF5 N445T und BMP2 stimuliert, worauf eine dosisabhängige ALP-Induktion zu beobachten war. Durch Zugabe von steigenden Mengen an rekombinanten

Nog bei gleichbleibender BMP-Stimulation konnte die ALP-Induktion bei WT GDF5 und BMP2 unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu war dies nicht bei GDF5 N445T möglich (Seemann u. a., 2009).

Bei weiterer Charakterisierung der chondrogenen Aktivität des rekombinanten GDF5 N445T im Mikromass Kultursystem zeigte bereits eine 1:10 Verdünnung des eingesetzten Proteins im Vergleich zur WT GDF5 Konzentration eine vergleichbare Induktionsstärke der Chondrogenese (Abb. 4.11). Dieser Verstärkungseffekt konnte auch bei *in vivo* Überexpressionsstudien bestätigt werden. Dort führte die Überexpression von Gdf5 N445T/K in Hinterextremitäten von Hühnerembryonen zur Bildung eines zusammenhängenden großflächigen Knorpellements, welches keine Gelenke und abgegrenzte Zehen aufweist. Im Gegensatz dazu bewirkte WT GDF5 lediglich eine Verdickung der Skelettanlagen und Fusionen einzelner Gelenke und Zehen (Abb. 4.12). Der starke chondrogene Effekt der GDF5 Mutanten konnte durch BMP9 übertroffen werden. In mesenchymalen Vorläuferzellen der Extremität bewirkt ektop appliziertes BMP9 bereits bei einer 1:50 Verdünnung im Vergleich zur WT GDF5 Konzentration eine vergleichbare Induktion der Chondrogenese (Abb. 4.11). Jedoch können auch Art und Weise der Herstellung der rekombinanten Proteine die gravierenden Aktivitätsunterschiede zwischen GDF5-Proteine und BMP9 erklären. So wurden WT GDF5 und GDF5 N445T in *E. coli* produziert, wohingegen BMP9 mit Hilfe von CHO-Zellen hergestellt wurde. Die eukaryotischen CHO-Zellen (Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters) können im Gegensatz zu den prokaryotischen *E. coli* Zellen posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Glycosylierung und Proteinfaltung, analog zu menschlichen Zellen bewerkstelligen. Biotechnologisch hergestellte Proteine in *E. coli* liegen in *inclusion bodies* vor und müssen nach Isolation aufwendig renaturiert werden.

Zusätzlich wurde eine Nog-Feedbackregulation untersucht. Sowohl GDF5 WT und N445T als auch BMP2 und BMP9 induzierten *in vitro*, im Mikromass Kultursystem, sowie *in vivo*, Beadimplantation in Hühnerextremität, eine starke endogene Nog-Expression (Abb. 4.13). Mit diesem Mechanismus wird im Organismus eine überschießende Signalweiterleitung verhindert und eine zeitliche Begrenzung der Stimulation gewährleistet, um nachfolgende Differenzierungsprozesse zu ermöglichen. Wird dieser Mechanismus durch Resistenz gegenüber dem Antagonisten Nog ausgehebelt (wie bei GDF5 N445T/K und BMP9), so erfolgt eine andauernde Signalweiterleitung, die den Prozess der Knorpelentwicklung verlängert und räumliche Grenzen überschreiten lässt, was Fusionen der Skelettelemente zur Folge hat (Abb. 4.12 und SYNS1 Patienten). Daher ist eine natürliche Expression von *Bmp9* in skelettären Geweben nicht wünschenswert und erfolgt auch nicht (Abb. 4.6 und Abb. 4.14).

Demgegenüber sind Bmp9 und Nog u.a. im Gehirn und Lunge coexprimiert. Es ist zu vermuten, dass hier die Expression von Nog-sensitiven BMPs verhindert werden soll und der jeweilige Differenzierungsprozess durch Bmp9 reguliert wird (Abb. 4.14).

### **5.1.3 Modulierender Einfluss der Mutation N445T auf Rezeptorspezifität**

Für die GDF5 Mutation R438L konnte bereits eine gravierende Veränderung der Rezeptorspezifität zugunsten von BMPR1A als Pathogenesemechanismus eines SYM1 Phänotyps ermittelt werden, wohingegen eine Nog-Resistenz ausgeschlossen werden konnte (Seemann u. a., 2005). Da dieser Phänotyp überlappende Merkmale zu SYNS1 aufweist und die Mutationsstelle N445 ebenfalls wie R438 im überlappenden Interaktionsbereich mit BMPR1A und NOG liegt, wurde für die GDF5 Mutante N445T ebenfalls eine Veränderung der Rezeptorspezifität in Betracht gezogen.

Erste vergleichende Analysen der Bindungskonstanten von WT GDF5 und GDF5 N445T zu den BMP Typ 1 Rezeptoren BMPR1A und BMPR1B im Biacore Assay ergaben keine signifikanten Unterschiede. Jedoch zeigte sich bei der Stimulation der myoblastischen C2C12 Zelllinie ein deutlich verändertes Wirkspektrum. WT GDF5 inhibiert die myoblastische Ausdifferenzierung der C2C12 Zellen. Im Gegensatz dazu fördert GDF5 N445T, vergleichbar mit BMP2 und BMP9, die Differenzierung in Osteoblasten und induziert ALP Aktivität. Daher lässt sich eine erweiterte Rezeptorspezifität vermuten, was jedoch in einem Neutralisierungsassay mit extrazellulären Domänen (ecd) der TGF $\beta$  TypI Rezeptoren nicht bestätigt werden konnte. So lassen sich WT GDF5 als auch GDF5 N445T ausschließlich von ecd BMPR1A als auch ecd BMPR1B inhibieren, wobei GDF5 N445T etwas sensitiver aber nicht deutlich signifikant stärker auf die Inhibierung anschlägt (Seemann u. a., 2009). Somit bleibt die genaue molekulare Ursache des veränderten Wirkspektrums weiter offen. Mögliche Faktoren die in Betracht gezogen werden könnten, wären veränderte Assoziations- bzw. Dissoziationsraten der GDF5-Rezeptorkomplexe, die die Stärke und Dauer der Signaltransduktion beeinflussen. Außerdem könnten veränderte Affinitäten zu Co-Rezeptoren oder Co-Faktoren vorhanden sein, die eine erweiterte Rezeptorspezifität ermöglichen und nicht mit dem beschriebenen Assay erfasst werden können.

#### **5.1.4 Mutationsstelle N445 nimmt Schlüsselfunktion in Proteininteraktion mit NOG und BMPR1B ein**

Im multiplen Sequenzalignment der TGF $\beta$ -Superfamilie (Abb. 4.3), welches ab dem ersten hochkonservierten Cystein dargestellt ist, befindet sich die Mutationstelle N445 zwischen dem dritten und vierten konservierten Cystein. Dieser Bereich umfasst das sogenannte Wrist-Epitop, welches eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem BMP Typ1 Rezeptor einnimmt (Sebald u. a., 2004). In ca. 2/3 der TGF $\beta$ -Superfamilie und speziesübergreifend in allen GDF5 homologen ist die Aminosäure N445 konserviert. Es fällt jedoch auf, dass insbesondere unter den TGF $\beta$ s, den Inhibinen, den Leftys und GDF8/11/15 das Wrist-Epitop stark in seiner Aminosäuresequenz abweicht und die bevorzugte Aminosäureabfolge TNHA, welche unter den BMPs/GDFs vornehmlich existiert, nicht mehr besteht. Diese Abweichungen könnten die verschiedenen Affinitäten der Signalproteine zum einen zu ihren spezifischen Rezeptoren reflektieren. So binden BMPs und GDFs mit unterschiedlichen Affinitäten an ihre Typ1 und Typ2 Rezeptoren, die entweder bereits in einem ternären Komplex vorliegen oder erst nach Ligandenbindung an einer der Rezeptorhomodimere den funktionellen Rezeptorkomplex ausbilden (Nohe u. a., 2002). Hierbei sei erwähnt, dass GDF5 bzw. BMP2 eine sehr hohe Affinität zu BMPR1B bzw. BMPR1A besitzen. Im Gegenzug bindet GDF5 nur schwach an BMPR1A und BMP2 moderat an BMPR1B (Sebald u. a., 2004). Demgegenüber binden die TGF $\beta$ s zuerst an ihren affineren Typ2 (TGF $\beta$ R2) Rezeptor, wonach kooperativ die Rekrutierung des schwach affinen Typ1 (TGF $\beta$ R1) Rezeptors erfolgt. Somit könnte das Wrist-Epitop ein entscheidender Faktor für eine gesteigerte Affinität der BMPs und GDFs zu ihren Typ1 Rezeptoren sein.

Zum anderen könnten die auffälligen Sequenzabweichungen im Wrist-Epitop innerhalb der TGF $\beta$ -Superfamilie auch die verschiedenen Affinitäten der Signalproteine zum großen Spektrum an Antagonisten reflektieren. So sind beispielsweise die sekretierten TGF $\beta$ s zunächst nur in einem inaktiven latenten Komplex vorliegend und werden nicht von Antagonisten reguliert sondern von Proteinen, die die Latenz aufheben können (z.B. Tsp1). Im Gegensatz dazu sind BMPs/GDFs nach ihrer Sezernierung und stetigen Prozessierung bereits aktiv und können im picomolar-Bereich an ihre spezifischen Antagonisten binden (z.B. Cer1-Bmp4; Nog-Bmp2/4/7, GDF5) (Massagué und Chen, 2000).

Des Weiteren konnte durch eine Analyse der 3D-Proteinstruktur von GDF5 die wichtige Position des Mutationsortes N445 bei der Stabilisierung und Spezifizierung der

Komplexbildung von GDF5 mit seinen Interaktionspartnern ermittelt werden. Im Komplex mit BMPR1B (PDB: 3EVS) scheint N445 mit 2 Aminosäuren des Rezeptors (E81, G82) zu interagieren, wobei diese einen Ring im Komplex ausbilden, der die Asparaginseitenkette umschließt. Es entsteht der Eindruck eines Schlüssel-Schloß-Prinzips. Eine vergleichbar wichtige Stellung nimmt N445 im Komplex mit NOG ein. Das Asparagin geht zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit A36 und eine Wasserstoffbrücke mit E491 von NOG ein. Somit würde ein Austausch des Asparagins mit Threonin oder Lysin zwei stabilisierende Wasserstoffbrücken im GDF5-NOG-Komplex verhindern und die spezifische Schlüssel-Schloß-Interaktion im GDF5-BMPR1B-Komplex aufweichen.

Bei Betrachtung der bisher identifizierten NOG-Mutationen, die mit SYM1 und SYNS1 assoziiert sind, fallen insbesondere P35A, P35S, P35R und A36P auf (Gong u. a., 1999; Lehmann u. a., 2007). Die Aminosäuren A36 und P35 stehen in direkten bzw. nahen Kontakt mit N445 von GDF5. Diese Korrelation von Phänotyp sowie Mutations- und Interaktionsstelle im GDF5-NOG-Komplex unterstreicht die überaus sensible und störungsanfällige Protein-Protein-Interaktion. Im Vergleich zum BMP7-NOG Komplex zeigen sich bedeutende Unterschiede in der Konformation des Aminosäurerückrats und der dazugehörigen Seitenketten im kurzen Finger 1. Hier wird in BMP7 eine hydrophobe Tasche ausgebildet, in die P35 und z.T. A36 von NOG aufgenommen werden (Groppe u. a., 2003). Diese hydrophobe Umgebung wird jedoch bei GDF5 nur teilweise erreicht, so dass hier nur geringe hydrophobe Stabilisierungskräfte auf die Proteininteraktion wirken und möglicherweise bereits geringfügige Veränderungen in der Aminosäuresequenz eine gravierende Störung hervorrufen können. Daraus abgeleitet scheint die Interaktion von GDF5 und NOG schwächer zu sein als die zwischen BMPs und NOG.

In einem Titrationsassay konnten wir diese Annahme durch den überstoichiometrischen Bedarf an NOG zur GDF5 Inhibition untermauern. Wohingegen bereits geringe Mengen an NOG eine deutliche BMP2 Inhibition ermöglichten (Seemann u. a., 2009). Die Tatsache, dass die homologe Mutation zu N445T in Bmp2/4/7 zu keiner erkennbaren Veränderung im Mikromass Kultursystem in Bezug auf die Inhibierbarkeit durch Nog führt (siehe Abb. 4.8), stützt ebenfalls die Annahme einer stabileren Interaktion aufgrund größerer hydrophober Wechselwirkungen zwischen BMP's und NOG. Bei Bmp7 resultierte die Mutation sogar in einem Funktionsverlust, was darauf hindeutet, dass diese Position in Bmp7 eine sehr wichtige Rolle bei der Rezeptorinteraktion spielt.

Bmp9 und Bmp10, die als einzige Vertreter der TGF $\beta$ -Superfamilie an Stelle des konservierten Asparagins ein Lysin tragen (Abb. 4.3), verhalten sich insensitiv gegenüber Nog im Mikromass Kultursystem (Abb. 4.9), wobei strukturell gesehen, die angrenzende hydrophobe Tasche im Vergleich zu den anderen BMPs ähnliche Ausmaße einnimmt. Die Nog-Insensitivität konnten wir in einem weiteren *in vitro* Assay bestätigen. Hierbei wurden Zellen der myoblastischen Mauszelllinie C2C12-Bmpr1b mit rekombinanten BMP9 stimuliert, wobei eine Co-Stimulation mit steigender Konzentration an NOG keine Inhibierung bewirkte (Seemann u. a., 2009). Ein einfacher Aminosäureaustausch des Lysins mit Asparagin (K371N) war unzureichend für die Etablierung einer Nog-Sensitivität. Erst zwei zusätzliche Mutagenesen, K348L und YH415Q, führten in Kombination mit K371N zu einer ausgeprägten Nog-Sensitivität. Die GDF5-angleichenden Mutagenesen K348L und YH415Q liegen im jeweiligen Interaktionsbereich mit BMPR2 und NOG, wohingegen K371N den überlappenden Interaktionsbereich mit BMPR1 und NOG betrifft. So kann zusammenfassend abgeleitet werden, dass durch gezielte Punktmutationen in den strukturell sehr hoch konservierten BMPs/GDFs eine Sensitivität bzw. Resistenz erreicht werden kann. Bei GDF5 wird bereits durch eine einzelne Mutation eine Nog-Insensitivität herbeigeführt. Demgegenüber führten bei Bmp9 drei rationale Mutationen, die auf Grundlage von Proteinstrukturvergleichen zwischen BMP9 und GDF5 ermittelt wurden, zu einer gravierenden Veränderung der biologischen Aktivität, einer Nog-Sensitivität. Daher erscheint ein rationelles Design zur Optimierung einer gewünschten Wirksamkeit durch den vorteilhaften Umstand der strukturellen Homologie der BMP/GDF-Familie als auch ihrer Komplexe mit den Rezeptoren und Antagonisten durchaus auf weitere BMPs übertragbar.

### 5.1.5 Korrelation von funktionellen Ergebnissen mit Expressionsstudien

*Gdf5*, *Bmp2*, *Bmp4* als auch *Bmp7* zeigen während der Extremitätenentwicklung ein sehr spezifisches Expressionsmuster, welches einen dynamisch Verlauf in den verschiedensten Gewebetypen der jeweiligen Entwicklungsstufe aufweist. *Gdf5* wird im Entwicklungsstadium E11.5 in mesenchymalen Vorläuferzellen exprimiert woraufhin begleitend zur Anlage der frühen Kondensationen in E12.5 die Expression angrenzend zu den Kondensationen im Perichondrium und in den Gelenkanlagen zu beobachten ist. Im weiteren Verlauf der Entwicklung konzentriert sich die *Gdf5*-Expression immer weiter auf die Gelenksregion. Auch *Bmp2*, *Bmp4* und *BMP7* weisen eine zeitlich begrenzte Expression in der Gelenksregion

auf (Abb. 4.6) (Seemann u. a., 2005; Hogan, 1996). Im Gegensatz dazu wird *Nog*, der Hauptantagonist von Gdf5, komplementär zu *Bmp2/4/7* und *Gdf5* in den frühen Kondensationen exprimiert. Die komplementäre Expression von Antagonist und Ligand gewährleistet somit eine lokal begrenzte Signalweiterleitung mittels extrazellulärer Signalproteine, die über Diffusions- und Transportmechanismen in der extrazellulären Matrix auch die Möglichkeit der Signalweiterleitung außerhalb des Expressionsbereiches haben. Demzufolge bedingt die Resistenz eines Liganden gegenüber seinen Antagonisten einen lokal vergrößerten Einflussbereich, der im Fall von GDF5 zu einer verstärkten Knorpelbildung und der daraus resultierenden Fusion von Gelenken führt. Dieser Effekt konnte im *in vivo* Überexpressionsmodell anschaulich nachgestellt werden und ist im milderen Ausmaß im SYNS1 Phänotyp der Patienten ausgeprägt.

Die Rezeptoraffinitäten von *Bmp2/4* und *Gdf5* spiegeln sich ebenfalls im Expressionsmuster der BMP Rezeptoren wieder (Abb. 4.6). So wird *Bmpr1b*, der Hochaffinitätsrezeptor von *Gdf5*, ebenfalls angrenzend der frühen Kondensationen exprimiert und konzentriert sich im weiteren Verlauf der Extremitätenentwicklung auf die Gelenksregion (Seemann u. a., 2005). *Bmpr1a* hingegen ist wie *Bmpr2* ubiquitär in der Extremitätenknospe anzutreffen und bietet somit einer Vielzahl von BMPs/GDFs (z.B. *Bmp2/4/6/7*) die Möglichkeit der Signalweiterleitung. Erstaunlicherweise konnte ebenfalls eine Expression von *Acvr11*, der Hochaffinitätsrezeptor von *Bmp9/10* (David u. a., 2007), beobachtet werden, obwohl *Bmp9/10* nicht in der Extremitätenknospe zu detektieren waren. *Acvr11* ist schwach im interdigitalen Mesenchym und nachfolgend um die Kondensationen und in der Gelenksregion exprimiert.

Weitergehende Expressionsanalysen von *Bmp9* und *Bmp10* ergaben mit *Nog* überlappende Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung, was auf eine biologische Relevanz der *Nog*-Insensitivität gegenüber beiden *Bmp*'s schließen läßt. *Bmp10* nimmt während der Herzentwicklung eine wichtige Rolle ein. Die Expression konzentriert sich auf das trabekuläre Myocardium (Abb. 4.16) (Chen u. a., 2004b; Somi u. a., 2004; Neuhaus u. a., 1999), nachdem die Musterbildung abgeschlossen ist und das Wachstum und die Kammerreifung einsetzt. Im Gegensatz dazu ist *Nog* mehr dynamisch im kompakten als auch trabekulären Myocardium exprimiert (Abb. 4.16) (Choi u. a., 2007) und überlappt somit mit *Bmp10* bei E9.5-E10.0. *Nog* nimmt eine wichtige Funktion beim korrekten Ablauf der Herzmorphogenese ein und reguliert dabei die Wirkung von *Bmp2/4/7* (Choi u. a., 2007). Darüber hinaus spielen *Bmp9* und *Bmp10* eine hemmende Rolle während der Angiogenese (David u. a., 2008), was sich ebenfalls in den *in vivo* Experimenten mit BMP9 zeigte. Hierbei wurde eine erhöhte Letalität aufgrund stark verminderter Blutgefäßausbildung in der

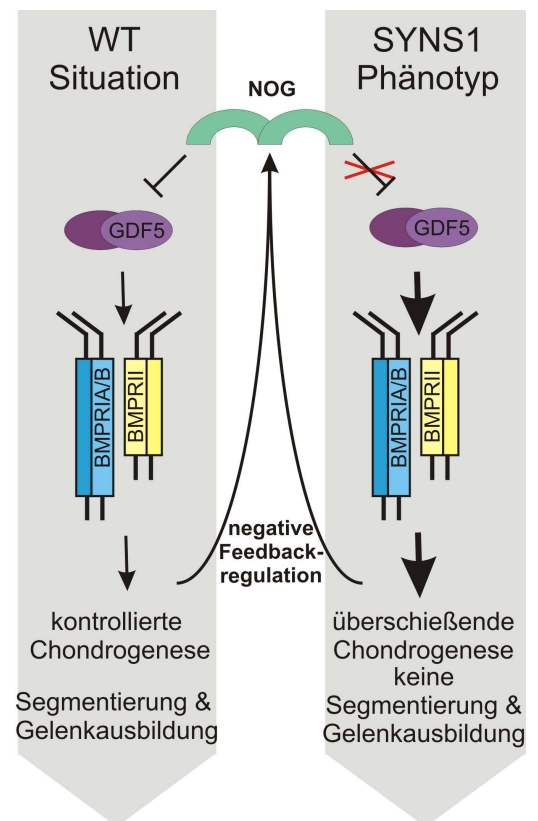


Fruchthülle als auch im Embryo festgestellt. *Bmp9* ist vornehmlich in der Leber exprimiert (Miller u. a., 2000), konnte jedoch in dieser Arbeit auch an weiteren Orten detektiert werden (Abb. 4.14). So zeigt *Bmp9* eine überlappende Expression mit *Nog* im Gehirn, Darm Endothelium, in Nasalhöhlen, Lunge, Niere, und wie bereits beschrieben im Rückenmark. Es konnte jedoch keine spezifische Expression von *Bmp9* neben den Nasalhöhlen in weiteren chondrogenen als auch Skelettstrukturen beobachtet werden, was den RT-PCR Studien von (Suttapreyasri u. a., 2006) widerspricht. Das geringe Expressionslevel von *Bmp9* kombiniert mit der geringeren Sensitivität der ISH-Methode im Vergleich zum RT-PCR Verfahren könnte die Diskrepanz der Ergebnisse erklären. Daher wurde das beobachtete Expressionspattern von *Bmp9* in der WM-ISH als auch Paraffin-ISH zusätzlich durch eigene RT-PCR Ergebnisse verifiziert (Abb. 4.15), wobei die ISH-Ergebnisse bestätigt werden konnten.

### 5.1.6 Modell des Pathogenesemechanismus von GDF5 N445T/K

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen für die Pathogenese von SYNS1 folgender Mechanismus abgeleitet werden.

Die NOG resistenten Varianten von GDF5 N445T und N445K induzieren über den BMPR1B-Signalweg im Perichondrium und in den Gelenkanlagen verstärkt Chondrogenese. Auch umliegende Zellschichten der Kondensationen und der Gelenkzwischenzone, in denen *Nog* exprimiert wird (Seemann u. a., 2005), werden davon beeinflusst. Die Segmentierung der Kondensationen in die einzelnen Phalangen wird dadurch unterbunden und es resultiert ein Synostosephänotyp.



**Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Pathogenesemechanismus der GDF5-Varianten N445T/K.**

Im Gegensatz zur WT Situation bleibt die Signalweiterleitung bei den GDF5-Mutanten unreguliert, da die negative Feedbackregulation über den BMP-Antagonisten NOG aufgrund unzureichender Proteinwechselwirkungen keine Wirkung hat. Dies führt im umliegenden Gewebe zur vermehrten Chondrozytendifferenzierung und -proliferation und damit verbunden zur Unterdrückung der Segmentierung und Gelenkausbildung in den Knorpelanlagen der Extremitäten. Daraus ergibt sich SYNS1.

## 5.2 Perspektive von NOG-insensitiven GDF5 Varianten in der klinische Anwendungen

Die Entwicklung von effektiven Therapien zur Regeneration von Knochen und Knorpel ist ein wichtiges klinisches Langzeitziel, hinter dem sich ein breites Forschungsfeld verbirgt. Knochenverlust durch Trauma, Tumore, Operationsmaßnahmen, angeborene Fehlbildungen oder Erkrankungen im Zahnwurzelbereich birgen weltweit einen großen Bedarf an regenerativen Maßnahmen zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten und zur Entlastung des Gesundheitssystems. Eine Vielzahl an Therapiemöglichkeiten haben sich bisher entwickelt zu denen Knochentransplantate, Applikation allogener Knochenmatrix oder vorkultivierter Zellen, Einbettung von rhBMPs in Trägermaterialien und die in der Entwicklung befindlichen Gentherapieansätze gehören (Gautschi u. a., 2007; Franceschi, 2005; Elangovan u. a., 2009). Dabei zeichnen sich die rhBMPs mit ihrer Eigenschaft Knochenneubildung an ektopen als auch orthotopen Stellen zu induzieren besonders aus. Sie sind Teil der natürlich ablaufenden Regenerationsprozesse nach Knochenbruch und stimulieren die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten und Osteoblasten (Khan u. a., 2000; Gerstenfeld u. a., 2003; Cho u. a., 2002).

Derzeit werden rhBMP2, rhBMP7 und rhGDF5 in klinischen Anwendungen zur Knochenregeneration und -neuaufbau genutzt oder werden für solche und weitere klinische Verfahren untersucht. BMP2 und BMP7 werden beispielsweise für Spinalfusion, nicht heilende Frakturen und Unterkieferknochenrekonstruktion eingesetzt (Gruber u. a., 2009; Kim u. a., 2009; Weng u. a., 2009; Rihn u. a., 2009). Jedoch zeichnen sich bei den klinischen Anwendungen im Menschen starke Unterschiede zu den *in vitro* Experimenten ab. So treten Limitationen im Bereich der Proteinstabilität und der Art der Applikation auf. Außerdem müssen im Menschen weitaus höhere Konzentrationen an rekombinantem Protein eingesetzt werden als im kleinen Tiermodell oder der Zellkultur, um den gewünschten Effekt der Knochenneubildung zu erreichen (Govender u. a., 2002). Mögliche Gründe wären die bereits erwähnte Proteinstabilität als auch der Einfluss von BMP Antagonisten (z.B. NOG), die während der Frakturheilung ebenfalls reguliert werden (Kwong u. a., 2009a, b; Tsiologiannis u. a., 2009). Sie können die exogen applizierten BMPs im Rahmen der endogenen Regulation der BMP Signalkaskade neutralisieren und somit höhere Konzentrationen *in vivo* bedingen. Diese Annahme wird durch die in dieser Arbeit dargelegte Induktion der Nog-Expression nach BMP Stimulation gestützt (Abb. 4.13). Die Verwendung von hohen BMP-Konzentrationen ermöglicht nur eine teilweise Umgehung der Feedbackregulation, scheint aber nicht das Mittel der Wahl zu sein. Demgegenüber könnten BMP Varianten, die insensitive

gegenüber Antagonisten sind (Superagonisten), die Knochenbildung effektiver induzieren und einen Einsatz von geringeren Proteinkonzentrationen realisieren.

Hiermit eröffnet sich der unter Pathogeneseumständen identifizierten GDF5 Variante N445T/K eine mögliche klinische Anwendung, da sie insensitiv gegenüber NOG ist. Darüber hinaus können die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über wichtige Protein-Protein Interaktionsstellen zwischen BMPs und NOG ein rationelles Design zur Erlangung von NOG-resistenten BMP2 und BMP7 Varianten forcieren und die Etablierung einer „2. Generation an BMPs“ in der klinischen Anwendung ermöglichen. Eine einfache Mutagenese homolog zur GDF5 Mutante N445T in *Bmp2* und *Bmp7* erbrachte jedoch nicht die erhoffte Nog-Resistenz in den BMPs. Somit scheint diese Aminosäure nicht alleinig essentiell für die Interaktion mit Nog zu sein.

### **5.3 Heterozygote Duplikation einer cis regulatorischen Sequenz von *BMP2* bedingt BDA2**

Die BDA2 ist durch hypoplastische oder aplastische Mittelphalangen der Finger 2 und manchmal auch der Finger 5 gekennzeichnet. Jedoch variieren Ausprägungsstärke des charakteristischen Phänotyps innerhalb der untersuchten brasilianischen Familie von unauffälliger Verkürzung des Zeigefingers bis BDC ähnlichem Phänotyp, der eine starke Verkürzung der Finger 2 und 3 mit begleitender Beweglichkeitseinschränkung aufweist (Familie 1 Abb. 4.17) (Dathe u. a., 2009; Kjaer u. a., 2006; Freire-Maia u. a., 1980). Die genetische Ursache für die beschriebene Brachydaktylie ist heterogen. Bisher wurden bestimmte Missense Mutationen in GDF5 und dominant negative Mutationen im korrespondierenden Rezeptor BMPR1B mit BDA2 assoziiert (Seemann u. a., 2005; Plöger u. a., 2008; Lehmann u. a., 2003, 2006; Kjaer u. a., 2006). Dabei konnten mit Hilfe funktioneller Studien für GDF5 L441P ein Affinitätsverlust zum BMPR1B, für GDF5 R380Q eine gestörte Proteinreifung und für BMPR1B I200K ein Verlust an Kinaseaktivität als molekulare Auswirkung der Mutation ermittelt werden, wobei alle Ereignisse eine starke Verminderung des BMPR1B vermittelten BMP-Signalwegs resultieren (Seemann u. a., 2005; Lehmann u. a., 2003; Plöger u. a., 2008). Jedoch wurden für beide mit BDA2 betroffenen Familien, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, eine Mutation innerhalb der Gene *GDF5* und *BMPR1B* ausgeschlossen. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen in der Großfamilie 1, einer weiteren Eingrenzung mittels Mikrosatellitenmarker und einer benutzerdefinierten, hochauflösenden

Arrayanalyse konnte auf Chromosom 20 eine Mikroduplikation von 5,5 kb in Tandemorientierung als Mutationsereignis ermittelt werden. Die Duplikation befindet sich innerhalb der genfreien Region, welche *BMP2* umgibt. Solche sogenannten „gene deserts“/“Genwüsten“, die sich im Fall von *BMP2* über ~600 kb upstream und ~1,1 Mb downstream erstreckt, sind spezieübergreifend konserviert und beinhalten nichtkodierende hochkonservierte Sequenzen, die für cis regulatorische Sequenzen sprechen. Neben *BMP2* konnten auch für weitere Gene, wie *SHH*, *SHOX*, *PAX6*, *SOX9*, *GDF6*, *BMP4*, *BMP5*, die in zahlreichen Aspekten der Mustergebung und Morphogenese des Körpers involviert sind, cis regulatorische Elemente beschrieben werden (Kleinjan und van Heyningen, 2005; DiLeone u. a., 1998; Klopocki u. a., 2008; Chandler u. a., 2009; Mortlock u. a., 2003). Sie regulieren eine gewebsspezifische Expression der Gene, die insbesondere während der embryonalen Entwicklung in einem zeitlich definierten Fenster erfolgt. Beispielsweise erfolgt die Expressionskontrolle von *SHH* in der ZPA über die hochkonservierte cis regulatorische Sequenz namens ZRS (ZPA regulatory sequence), ca. 980 kb upstream von *SHH*. Über die definierte Expression von *SHH* in der ZPA wird die Anzahl und Identität der Finger während der Extremitätenentwicklung gesteuert. Punktmutationen innerhalb der ZRS wurden bereits mit preaxialer Polydaktylie Typ2 und 3 assoziiert (Lettice u. a., 2003; Gurnett u. a., 2007). Des Weiteren weisen intensive Untersuchungen von 6 chinesischen Familien darauf hin, dass die Duplikation der ZRS ebenfalls mit triphalangealem Thumb-Polysyndactyly Syndrome (TPTPS) and Syndactyly type IV (SD4) assoziiert ist (Sun u. a., 2008).

Auch innerhalb der BDA2 assoziierten Duplikation ~110 kb downstream von *BMP2* befinden sich zwei hochkonservierte Sequenzen von ca. 1 kb Größe, die eine Funktion als cis regulatorische Sequenzen vermuten lassen.

### **5.3.1 Entstehungsmechanismen der genomischen Duplikation 3' von *BMP2***

Zur Entstehung der identifizierten Duplikationen können verschiedene Mechanismen in Betracht gezogen werden. Beispielsweise kann eine Translokation zwischen den homologen Chromosomen stattgefunden haben oder es kam zu einer ungleichen Rekombination. Die telomerischen Bruchpunkte beider Duplikationen und der gemeinsame centromerische Bruchpunkt befinden sich innerhalb von Short Interspersed Elements (SINEs) der Alu-Genfamilie. Alu-Elemente enthalten repetitive Sequenzen und können daher ungleiche Rekombination vermitteln, die schätzungsweise für 0,3 % aller genetischen Krankheiten im Menschen ursächlich ist (Batzer und Deininger, 2002).

Als Alternativmechanismus kann auch eine nichtallelische homologe Rekombination, die durch Topoisomerasen vermittelt wird, in Betracht gezogen werden. Anhaltspunkte dafür sind die Mikrohomologiesequenzen von sieben Nukleotiden, in denen die Bruchpunkte lokalisiert sind. Innerhalb dieser Sequenzen befindet sich eine Erkennungssequenz (5'-GTT-3') für die Topoisomerase I. Die darauf folgende illegitime Rekombination, bei der eine Mikrohomologie von zwei bis sechs Nukleotiden nach dem Schnittpunkt notwendig ist, wird bei den hier beschriebenen Duplikationen durch drei Nukleotide 5'-CAC-3' realisiert (Zou u. a., 1997).

Letztlich ist auch ein replikationsbasiertes Modell denkbar, welches Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) genannt wird. Hierbei stockt die Replikationsgabel in einer genomisch instabilen Region (z.B. bei repetitiven Sequenzen) während der DNA-Replikation. Daraufhin wechselt der „lagging“-Strang zu einer anderen aktiven Replikationsgabel in näherer Umgebung, wenn eine Mikrohomologie wie bei den identifizierten Bruchpunkten vorliegt. So kann eine DNA-Sequenz nochmals repliziert werden, was in eine Duplikation resultiert (Lee u. a., 2007).

### **5.3.2 Cis regulatorische Sequenz fungiert als *Bmp2*-Enhancer**

Zur funktionellen Charakterisierung der potentiellen cis regulatorischen Sequenzen wurden beide konservierten Elemente als auch die gesamte Duplikation im transgenen Mausmodell analysiert. Dabei konnte für die erste konservierte Region (UCSC Mouse Genome Feb2006 chr2: 133.357.548-133.358.596) eine Enhanceraktivität festgestellt werden. Sie führte im Mausmodell zu einer Reporterexpression ausschließlich im Autopod der Extremitäten, die mit der endogenen *Bmp2* Expression aber nicht mit *Gdf5*, *Bmpr1a* und *Bmpr1b* überlappt. Zusammengefasst zeigt sich eine Enhancer-gesteuerte Reporterexpression im distalen Extremitätenfeld (E11.5), im interdigitalen Mesenchym (E12.5), im Perichondrium (E13.5), in der distalen Gelenksregion der Finger und im Perichondrium der Mittelphalangen (E14.5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *Bmp2* Expression in den Extremitäten unter anderem durch einen 3' cis-regulatorischen Enhancer, der sich innerhalb der Duplikation befindet, reguliert wird.

Korrelierende Resultate ergaben die Untersuchungen von Chandler und Kollegen. Sie zeigten, dass ein BAC, der die Duplikationsregion beinhaltet, eine fingerspezifische Reporterexpression ermöglicht. Wird jedoch die Duplikationsregion im BAC deletiert, bleibt die Expression in den Fingern aus. Darüber hinaus wurde ein cis regulatorischer

Enhancer 160 kb 3' von *Bmp2* identifizieren, der die Expression von *Bmp2* in differenzierende Osteoblasten reguliert (Chandler u. a., 2007).

Demnach ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl von weiteren regulatorischen Elementen innerhalb der „Genwüste“ von *BMP2* existiert und dessen Expression in den verschiedenen Geweben und Stadien der Entwicklung kontrolliert. Hierfür sprechen ebenfalls die vielseitigen detaillierten Expressionsanalysen von *Bmp2*, bei denen eine Expression u.a. in den Nieren, Haarfollikel, Zahnknospen und Darmepithelium nachgewiesen wurde (Bitgood und McMahon, 1995; Kulesa u. a., 2000; Lyons u. a., 1990, 1989; Dudley und Robertson, 1997). Während der Skelettentwicklung ist *Bmp2* in hypertrophen Chondrozyten, Wachstumsfuge, Perichondrium und Osteoblasten exprimiert (Lyons u. a., 1989; Pathi u. a., 1999). Zusätzlich zeigt sich *Bmp2* in der Umgebung der zukünftigen interphalangealen Gelenke und wird sogar im Stadium E14.5 in der Zwischenzone des Gelenks beobachtet (Seemann u. a., 2005).

### **5.3.3 Pathogenesemechanismus des duplizierten *BMP2*-Enhancers**

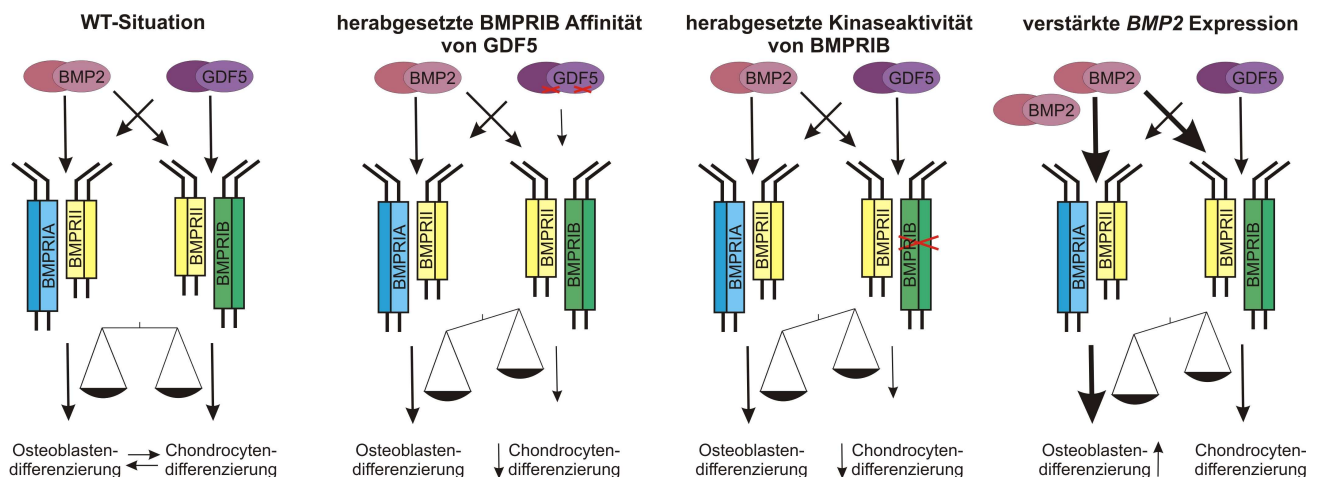
Funktionelle Untersuchungen einiger Mutationen, die eine BDA2 oder BDC bedingen, weisen auf eine Misregulation des BMP-Signalwegs hin. Hierbei tritt eine Störung des Gleichgewichts zwischen GDF5 und seinen BMP Typ 1 Rezeptoren auf, dass zu einer verminderten GDF5-BMPRII Signalgebung führt (Lehmann u. a., 2006, 2003; Seemann u. a., 2005; Plöger u. a., 2008). Aufgrund ähnlicher Phänotypen der beiden hier beschriebenen Familien mit den bisher funktionell untersuchten Mutationen in GDF5 und BMPRII lässt sich ein negativer Einfluss der duplizierten BMP2-Enhancerregion auf den BMPRII-Signalweg vermuten. Dahingehend wären verschiedene Pathogenesemechanismen denkbar.

Die Duplikation eines regulatorischen Elements in Tandemorientierung könnte dessen Funktion aus sterischen Gründen beeinträchtigen und dadurch eine verminderte BMP2 Expression hervorrufen. Jedoch zeigt ein konditioneller knock out von *Bmp2* im Mesenchym der Mausextremitäten, dass eine Kompensation über *Bmp4* und *Bmp7* greift (Bandyopadhyay u. a., 2006). Daher scheint eine Verminderung der BMP2 Expression keinen Effekt auf die Ausbildung der Extremität zu haben und ist somit als Pathogenesemechanismus unwahrscheinlich.

Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre die Misexpression von BMP2 an einem zusätzlichen Ort, so dass Misregulation des BMP-Signalwegs während der Fingerausbildung

erfolgt. So führt beispielsweise die Inversion einer DNA-Region *Shh* betreffend zu einer ektopten Expression von *Shh* in den Fingern, was einen BDA-ähnlichen Phänotyp in der Maus verursacht (Niedermaier u. a., 2005). Die Duplikation der ZRS, einer weit entfernten Kontrollregion von *Shh* für die Extremitäten, resultiert in eine ektope *Shh* Expression am anterioren Rand der Extremität. Hierbei ist eine preaxiale Polydaktylie und Syndaktylie zu beobachten (Klopocki u. a., 2008). Demnach stellt eine ektope *BMP2* Expression ein mögliches Szenario als Pathogenesemechanismus dar.

Jedoch ist eine Überexpression von *BMP2* ebenfalls denkbar. Dies würde mit zwei bereits beschriebenen Fällen korrelieren. Hierbei trugen beide Patienten große Duplikationen von Chromosom 20 Abschnitten, einschließlich des *BMP2* Gens und des duplizierten Enhancers, was sich in einer BDA2 in Kombination mit etlichen weiteren Fehlbildungen äußerte (Pfeiffer u. a., 1997; Lucas u. a., 1985). Durch die Duplikation des gesamten *BMP2* Gens und seiner regulatorischen Elemente ist eine erhöhte *BMP2* Expression in diesen beschriebenen Fällen anzunehmen. Somit erscheint aufgrund der Annahme, dass ähnliche Phänotypen durch ähnliche Mechanismen verursacht werden, eine erhöhte *BMP2* Expression als Mechanismus für eine isolierte BDA2 als sehr wahrscheinlich. Jedoch bezieht sich die erhöhte *BMP2* Expression nur auf die Extremitäten und nicht auf den gesamten Körper, wie bei einer chromosomalen Duplikation.



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung potentieller Pathogenesemechanismen der BDA2.**

Die funktionellen Studien der bisher beschriebenen Mutationen in *GDF5* und *BMPR1B* weisen auf eine Verminderung der *BMPR1B* Signalgebung hin. Dies würde im Perichondrium das Gleichgewicht des *BMP*-Signalwegs stören und die Chondrozytendifferenzierung verringern. Im Gegensatz dazu würde eine erhöhte *BMP2* Expression durch verstärkte Enhanceraktivität das Gleichgewicht zur Förderung der Osteoblastendifferenzierung hinlenken. Beide Prozesse, Verringerung der Chondrozytendifferenzierung und Steigerung der Osteoblastendifferenzierung, verkürzen das Größenwachstum der Knorpelanlage und bedingen letztlich hypoplastische Phalangen.

Wie bereits in vielen Studien gezeigt wurde, ist der komplex regulierte BMP Signalweg sehr konzentrationsabhängig. Einige Fehlexpressionen können kompensiert werden, jedoch zeigt sich insbesondere während der Morphogenese der Phalangen und Gelenke in den Extremitäten ein feinabgestimmtes Zusammenspiel. Dabei nimmt GDF5, als früher Marker der Gelenkentwicklung, eine Schlüsselrolle ein. Im Gegensatz zu BMP2, welches über BMPR1A und BMPR1B signalisiert, bindet GDF5 vornehmlich an seinen hoch affinen Rezeptor BMPR1B und nur schwach an BMPR1A (Sebald u. a., 2004). Alle 4 Komponenten sind während der Extremitätenentwicklung in enger Nachbarschaft und überlappend exprimiert, so dass stets eine Interaktion untereinander und somit ein ständig neues Austarieren der BMP-Signalgebung stattfindet. Zu viel BMP2 könnte daher ein Ungleichgewicht durch die Erhöhung des BMPR1A-Signals mit nachfolgender relativer Erniedrigung des BMPR1B-Signals verursachen. Obwohl BMP2 an beide Typ1 Rezeptoren mit vergleichbarer Affinität bindet und augenscheinlich keine Erniedrigung des BMPR1B-Signals zu erwarten wäre, kann dieser Effekt durch das spezifische Expressionsmuster von BMPR1B in definierten Zellen erreicht werden. BMPR1A ist hingegen ubiquitär in der Extremität exprimiert und ist für BMP2 stets zugänglich (Abb. 4.6). Des Weiteren ist auch ein kompetitiver Effekt zwischen BMP2 und GDF5 um BMPR1B denkbar, so dass das Gleichgewicht hin zu BMPR1A verschoben wird.

Resultierend aus den Verschiebungen im BMPR1A/BMPR1B Verhältnis wäre für die bisher beschriebenen Mutationen in GDF5 und BMPR1B eine Verringerung der Chondrozytendifferenzierung im Perichondrium denkbar. Für die BMP2-Enhancermutation mit verbundener Erhöhung der BMP2-Expression käme eine beschleunigte Osteoblastendifferenzierung im Perichondrium in Frage (Chen u. a., 2004a). Beide Prozesse würden in einem verfrühten Abbruch der Wachstumsvorgänge in den knorpeligen Anlagen führen, woraufhin eine Verkürzung der Phalangen eintritt.

Um diese verschiedenen Hypothesen untersuchen zu können, in wieweit sich die BMP2 Expression durch die Duplikation des Enhancerelements verändert, sind tieferegehende Analysen mit transgenen Mauslinien, die einerseits die homologe Duplikation und andererseits eine Deletion tragen, erforderlich. Außerdem könnte über die Identifikation des korrespondierenden Transkriptionsfaktors eine genauere Charakterisierung der Enhancerfunktion erfolgen.



## **6 Zusammenfassung**

Während der embryonalen Entwicklung und im adulten Organismus nimmt der BMP-Signalweg eine essentielle Rolle im Bereich der Musterbildung, der Organogenese, des Wachstums und der Homöostase des Skeletts ein. Insbesondere während der Extremitätenentwicklung ist ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Expressionsort, -zeit und -menge sowie der Proteininteraktion der einzelnen Komponenten im BMP-Signalweg entscheidend, da bereits geringe Abweichungen während des komplexen Bildungsprozesses zu Fehlbildungen führen.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Pathogenese zweier Handfehlbildungen, BDA2 und SYNS1, die nach genetischen Analysen mit Mutationen betreffend der sezernierten Signalmoleküle BMP2 bzw. GDF5 assoziiert sind. Beide Proteine sind Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie und zeigen ein z.T. überlappendes Expressionsprofil während der embryonalen Extremitätenentwicklung in der Gelenksregion und im Perichondrium. Die dort verlaufenden Vorgänge sind besonders kritisch für die Etablierung eines korrekt ausgebildeten Gelenks und der Determinierung der Phalangen.

Für die GDF5 Mutationen N445T und N445K, die mit SYNS1 assoziiert und in der überlappenden Proteininteraktionsoberfläche mit Nog und BMPR1B lokalisiert sind, konnte *in vitro* eine Insensitivität gegenüber dem BMP-Antagonisten Nog nachgewiesen werden. Darüber hinaus deuten Zellkulturexperimente auf einen veränderten Signalisierungsprozess hin. Beide Effekte zusammen resultieren *in vitro* als auch *in vivo* in einer verstärkten chondrogenen Aktivität, die zusätzlich die endogene negative Feedback-Regulation durch Nog umgeht. Die Position N445 ist unter den BMPs hochkonserviert, jedoch tragen BMP9 und BMP10 natürlicherweise dort ein Lysin und sind wie die GDF5 Mutanten Nog-insensitiv. Während ein einfacher Aminosäureaustausch von Lysin mit Arginin keine Nog-Sensitivität in Bmp9 induziert, konnte durch gezielte Mutagenese an zwei weiteren potentiellen Interaktionsstellen eine nahezu vollständige Nog-Sensitivität vermittelt werden. Zusätzlich zeigten zu GDF5 N445T analoge Mutationen in BMP2/4/7 keine Veränderung der Nog-Sensitivität. Aus diesen Ergebnissen kann dem Asparagin eine sehr wichtige Funktion bei der Interaktion mit Nog zugesprochen werden, jedoch ist diese im Gegensatz zu GDF5 bei weiteren Vertretern der BMPs weniger essentiell. Diese Erkenntnisse können, im Hinblick auf klinische Anwendungen im Bereich der regenerativen Medizin, beim Design von BMPs der 2. Generation (Superagonists) genutzt werden, um eine effektivere Therapie mit geringeren Proteinkonzentrationen zu ermöglichen.

Für die Mikroduplikation 110 kb downstream von *BMP2* konnte mit Hilfe eines transgenen Mausmodells die Fähigkeit ermittelt werden, Reporterogenaktivität spezifisch in den sich entwickelnden Extremitäten zu induzieren. Das resultierende Expressionspattern von LacZ überlappt mit endogener Bmp2 Expression, was auf die Anwesenheit eines Extremitäten-spezifischen Bmp2-Enhancer in der duplizierten Region hindeutet. Darüber hinaus konnte die Position der cis regulatorischen Sequenz auf ca. 1 kb eingegrenzt werden. Diese Ergebnisse haben einen zusätzlichen Pathogenesemechanismus der BDA2 aufgedeckt, der daraufhindeutet, dass durch die Duplikation eines Enhancer die Expression von BMP2 in der Extremität verändert und das Signalisierungsgleichgewicht zwischen BMPR1A und BMPR1B verschoben wird.

Beide funktionellen Untersuchungen zur Genotyp-Phänotyp Korrelation untermauern die hochsensible Regulation des BMP-Signalwegs und bieten grundlegende Einblicke in die aufeinander abgestimmten Proteininteraktionen, die sich überschneidende Signalkaskaden während Entwicklungsprozesse ermöglichen.

## **7 Summary**

BMP-signalling plays throughout the whole embryonic development and in the adult organism an essential role in pattern formation, organogenesis, growth and homeostasis of the skeleton. Especially during the limb development the fine-tuning of a dose dependent as well as spatially and temporally controlled expression pattern in combination with defined protein interactions between the members of the BMP-signalling pathway is crucial. Only small changes in these complex processes can result in skeletal abnormalities.

This PhD thesis is devoted to clarify the pathogenesis of two skeletal malformations, BDA2 and SYNS1, which are associated with mutations concerning the secreted signalling molecules BMP2 and GDF5, respectively. Both proteins are members of the TGF $\beta$ -superfamily and show during limb development an overlapping expression pattern in the joint region as well as in the perichondrium. Patterning and differentiation processes at these locations are critical for establishing correct developed joints and phalanges.

The GDF5 mutations N445T and N445K, which are associated with SYNS1, are situated in the overlapping receptor (BMPRII) and antagonist (NOG) interface. Functional *in vitro* analysis of the GDF5 variants revealed a Nog-insensitivity and a change of signalling mode. Both effects result *in vivo* and *in vitro* in an enhanced protein activity supported by circumvented negative feedback loop of Nog. Interestingly, the residue N445 is highly conserved among the BMP-family except of BMP9 and BMP10 in which it is naturally substituted with lysine. Like the mutant GDF5, both BMPs are insensitive to Nog and show a high chondrogenic activity. While a simple exchange of arginine with lysine doesn't induce Nog-sensitivity, successive introduction of two additional substitutions imparted high to total sensitivity on customized variants of Bmp9. Furthermore, homologous mutations to GDF5 N445T in BMP2/4/7 didn't lead to Nog-insensitivity in these BMPs. Taken together, these results suggest a critical role of the asparagine in the BMP-NOG interaction face, which is less essential in BMPs than in GDF5. Out of this, these findings are useful for the design of second generation BMPs (superagonists), which can improve the effectivity of BMPs in low dosages for clinical applications in regenerative medicine.

The microduplication 110 kb downstream of *BMP2*, which is associated with BDA2, contains evolutionary highly conserved sequences. By using a transgenic mouse model it was shown that this duplicated sequence is able to drive limb-specific reporter gene expression. The almost complete overlap of *LacZ* with endogenous *Bmp2* expression indicates that a limb specific BMP2 enhancer is located within the duplicated sequence. Furthermore, the location

of the cis-regulatory sequence was narrowed down to a ~1 kb fragment. These results reveal an additional pathogenesis mechanism of BDA2 which suggest an altered BMP2 expression through duplication of the enhancer resulting in a misbalanced BMPR1A and BMPR1B signaling in the developing limb.

Both functional studies in this work concerning genotype-phenotype correlation emphasize the sensible regulation of the BMP pathway in the limb. Furthermore, they provide fundamental insights into the fine tuned protein interactions which make overlapping signalling cascades possible.

## **8 Literaturverzeichnis**

- Abe, E., M. Yamamoto, Y. Taguchi, B. Lecka-Czernik, C.A. O'Brien, A.N. Economides, N. Stahl, R.L. Jilka, und S.C. Manolagas. 2000. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J. Bone Miner. Res.* 15(4): 663-673.
- Akarsu, A.N., T. Rezaie, M. Demirtas, D.D. Farhud, und M. Sarfarazi. 1999. Multiple synostosis type 2 (SYNS2) maps to 20q11.2 and caused by a missense mutation in the growth/differentiation factor 5 (GDF5). *Am. J. Hum. Genet. Suppl.* (65): A281.
- Alvarez, J., J. Horton, P. Sohn, und R. Serra. 2001. The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation. *Dev. Dyn.* 221(3): 311-321.
- Archer, C.W., G.P. Dowthwaite, und P. Francis-West. 2003. Development of synovial joints. *Birth Defect Res C.* 69(2): 144-155.
- Aspenberg, P., und C. Forslund. 1999. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop Scand.* 70(1): 51-54.
- Avsian-Kretchmer, O., und A.J.W. Hsueh. 2004. Comparative genomic analysis of the eight-membered ring cystine knot-containing bone morphogenetic protein antagonists. *Mol. Endocrinol.* 18(1): 1-12.
- Bandyopadhyay, A., K. Tsuji, K. Cox, B.D. Harfe, V. Rosen, und C.J. Tabin. 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2(12): e216.
- Batzer, M.A., und P.L. Deininger. 2002. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3(5): 370-379.
- Bell, J. 1951. *Treasury of Human Inheritance*. Cambridge University Press, London.
- Bishop, G.B., und T.A. Einhorn. 2007. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 31(6): 721-727.
- Bitgood, M.J., und A.P. McMahon. 1995. Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell-Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Developmental Biology.* 172(1): 126-138.
- Blackwood, E.M., und J.T. Kadonaga. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science.* 281(5373): 60-63.
- van Bokhoven, H., J. Celli, H. Kayserili, E. van Beusekom, S. Balci, W. Brussel, F. Skovby, B. Kerr, E.F. Percin, N. Akarsu, und H.G. Brunner. 2000. Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat. Genet.* 25(4): 423-426.

- Bowe, J., und H. Conway. 1956. Congenital deformities of the hands. *Plast Reconstr Surg* (1946). 18(4): 286-290.
- Brunet, L.J., J.A. McMahon, A.P. McMahon, und R.M. Harland. 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 280(5368): 1455-1457.
- Chandler, K.J., R.L. Chandler, und D.P. Mortlock. 2009. Identification of an ancient Bmp4 mesoderm enhancer located 46 kb from the promoter. *Developmental Biology*. 327(2): 590-602.
- Chandler, R.L., K.J. Chandler, K.A. McFarland, und D.P. Mortlock. 2007. Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. *Mol Cell Biol*. 27(8): 2934-51.
- Chen, D., M. Zhao, und G.R. Mundy. 2004a. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*. 22(4): 233-241.
- Chen, H., S. Shi, L. Acosta, W. Li, J. Lu, S. Bao, Z. Chen, Z. Yang, M.D. Schneider, K.R. Chien, S.J. Conway, M.C. Yoder, L.S. Haneline, D. Franco, und W. Shou. 2004b. BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*. 131(9): 2219-31.
- Chen, Y., und X. Zhao. 1998. Shaping limbs by apoptosis. *J. Exp. Zool*. 282(6): 691-702.
- Cho, T., L.C. Gerstenfeld, und T.A. Einhorn. 2002. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res*. 17(3): 513-520.
- Choi, M., R.W. Stottmann, Y. Yang, E.N. Meyers, und J. Klingensmith. 2007. The bone morphogenetic protein antagonist noggin regulates mammalian cardiac morphogenesis. *Circ. Res*. 100(2): 220-8.
- Dathe, K., K.W. Kjaer, A. Brehm, P. Meinecke, P. Nurnberg, C.G. Neto, D. Brunoni, N. Tommerup, C.E. Ott, E. Klopocki, P. Seemann, und S. Mundlos. 2009. Duplications involving a Conserved Regulatory Element Downstream of BMP2 are Associated with Brachydactyly Type A2. *AJHG*.: accepted.
- David, L., C. Mallet, M. Keramidas, N. Lamandé, J. Gasc, S. Dupuis-Girod, H. Plauchu, J. Feige, und S. Bailly. 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res*. 102(8): 914-922.
- David, L., C. Mallet, S. Mazerbourg, J. Feige, und S. Bailly. 2007. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 109(5): 1953-1961.
- Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker, und N. Kleckner. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science*. 295(5558): 1306-1311.

- DeLise, A.M., E. Stringa, W.A. Woodward, M.A. Mello, und R.S. Tuan. 2000. Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro model for chondrogenesis and cartilage maturation. *Methods Mol. Biol.* 137: 359-375.
- Demirhan, O., S. Türkmen, G.C. Schwabe, S. Soyupak, E. Akgül, D. Tastemir, D. Karahan, S. Mundlos, und K. Lehmann. 2005. A homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies. *J. Med. Genet.* 42(4): 314-317.
- Devlin, R.D., Z. Du, R.C. Pereira, R.B. Kimble, A.N. Economides, V. Jorgetti, und E. Canalis. 2003. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology.* 144(5): 1972-1978.
- DiLeone, R.J., L.B. Russell, und D.M. Kingsley. 1998. An extensive 3' regulatory region controls expression of Bmp5 in specific anatomical structures of the mouse embryo. *Genetics.* 148(1): 401-408.
- Dillon, N. 2006. Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus. *Chromosome Res.* 14(1): 117-126.
- Dixon, M.E., P. Armstrong, D.B. Stevens, und M. Bamshad. 2001. Identical mutations in NOG can cause either tarsal/carpal coalition syndrome or proximal symphalangism. *Genet. Med.* 3(5): 349-353.
- Dudley, A.T., und E.J. Robertson. 1997. Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev. Dyn.* 208(3): 349-362.
- Dudley, A.T., M.A. Ros, und C.J. Tabin. 2002. A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature.* 418(6897): 539-544.
- Edwards, C.J., und P.H. Francis-West. 2001. Bone morphogenetic proteins in the development and healing of synovial joints. *Semin. Arthritis Rheum.* 31(1): 33-42.
- Elangovan, S., S. Srinivasan, und S. Ayilavarapu. 2009. Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. *Expert Opin Biol Ther.* 9(4): 399-410.
- Epstein, D.J. 2009. Cis-regulatory mutations in human disease. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 8(4): 310-316.
- Faiyaz-Ul-Haque, M., W. Ahmad, S.H.E. Zaidi, S. Haque, A.S. Teebi, M. Ahmad, D.H. Cohn, und L. Tsui. 2002a. Mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein-1 (CDMP1) gene in a kindred affected with fibular hypoplasia and complex brachydactyly (DuPan syndrome). *Clin. Genet.* 61(6): 454-458.
- Faiyaz-Ul-Haque, M., W. Ahmad, A. Wahab, S. Haque, A.C. Azim, S.H.E. Zaidi, A.S. Teebi, M. Ahmad, D.H. Cohn, T. Siddique, und L. Tsui. 2002b. Frameshift mutation in the cartilage-derived morphogenetic protein 1 (CDMP1) gene and severe acromesomelic chondrodysplasia resembling Grebe-type chondrodysplasia. *Am. J. Med. Genet.* 111(1): 31-37.

- Franceschi, R.T. 2005. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J. Dent. Res.* 84(12): 1093-1103.
- Francis-West, P.H., A. Abdelfattah, P. Chen, C. Allen, J. Parish, R. Ladher, S. Allen, S. MacPherson, F.P. Luyten, und C.W. Archer. 1999a. Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development. *Development.* 126(6): 1305-1315.
- Francis-West, P.H., J. Parish, K. Lee, und C.W. Archer. 1999b. BMP/GDF-signalling interactions during synovial joint development. *Cell Tissue Res.* 296(1): 111-119.
- Freire-Maia, N., N.A. Maia, und C.N. Pacheco. 1980. Mohr-Wriedt (A2) brachydactyly: analysis of a large Brazilian kindred. *Hum. Hered.* 30(4): 225-231.
- Gautschi, O.P., S.P. Frey, und R. Zellweger. 2007. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg.* 77(8): 626-631.
- Gazzerro, E., V. Gangji, und E. Canalis. 1998. Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 102(12): 2106-2114.
- Gazzerro, E., und E. Canalis. 2006. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord.* 7(1-2): 51-65.
- Gerstenfeld, L.C., D.M. Cullinane, G.L. Barnes, D.T. Graves, und T.A. Einhorn. 2003. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J. Cell. Biochem.* 88(5): 873-884.
- Gilbert, S.F. 2003. Opening Darwin's black box: teaching evolution through developmental genetics. *Nat Rev Genet.* 4(9): 735-741.
- Gong, Y., D. Krakow, J. Marcelino, D. Wilkin, D. Chitayat, R. Babul-Hirji, L. Hudgins, C.W. Cremers, F.P. Cremers, H.G. Brunner, K. Reinker, D.L. Rimoïn, D.H. Cohn, F.R. Goodman, W. Reardon, M. Patton, C.A. Francomano, und M.L. Warman. 1999. Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet.* 21(3): 302-304.
- Goodstadt, L., und C.P. Ponting. 2001. CHROMA: consensus-based colouring of multiple alignments for publication. *Bioinformatics.* 17(9): 845-846.
- Govender, S., C. Csimma, H.K. Genant, A. Valentin-Opran, Y. Amit, R. Arbel, H. Aro, D. Atar, M. Bishay, M.G. Börner, P. Chiron, P. Choong, J. Cinats, B. Courtenay, R. Feibel, B. Geulette, C. Gravel, N. Haas, M. Raschke, E. Hammacher, D. van der Velde, P. Hardy, M. Holt, C. Josten, R.L. Ketterl, B. Lindeque, G. Lob, H. Mathevon, G. McCoy, D. Marsh, R. Miller, E. Munting, S. Oevre, L. Nordsletten, A. Patel, A. Pohl, W. Rennie, P. Reynders, P.M. Rommens, J. Rondia, W.C. Rossouw, P.J. Daneel, S. Ruff, A. Rüter, S. Santavirta, T.A. Schildhauer, C. Gekle, R. Schnettler, D. Segal, H. Seiler, R.B. Snowdowne, J. Stapert, G. Taglang, R. Verdonk, L. Vogels, A. Weckbach, A. Wentzensen, und T. Wisniewski. 2002. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am.* 84-A(12): 2123-2134.



- Grant, S.F., D.M. Reid, G. Blake, R. Herd, I. Fogelman, und S.H. Ralston. 1996. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat. Genet.* 14(2): 203-205.
- Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A.N. Economides, W. Kwiatkowski, M. Affolter, W.W. Vale, J.C.I. Belmonte, und S. Choe. 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 420(6916): 636-642.
- Groppe, J., J. Greenwald, E. Wiater, J. Rodriguez-Leon, A.N. Economides, W. Kwiatkowski, K. Baban, M. Affolter, W.W. Vale, J.C. Belmonte, und S. Choe. 2003. Structural Basis of BMP Signaling Inhibition by Noggin, a Novel Twelve-Membered Cystine Knot Protein. *J Bone Joint Surg Am.* 85(suppl\_3): 52-58.
- Grotewold, L., und U. Rüther. 2002a. Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int. J. Dev. Biol.* 46(7): 943-947.
- Grotewold, L., und U. Rüther. 2002b. The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J.* 21(5): 966-975.
- Gruber, R.M., A. Ludwig, H. Merten, S. Pippig, F. Kramer, und H. Schliephake. 2009. Sinus floor augmentation with recombinant human growth and differentiation factor-5 (rhGDF-5): a pilot study in the Goettingen miniature pig comparing autogenous bone and rhGDF-5. *Clin Oral Implants Res.* 20(2): 175-182.
- Gurnett, C.A., A.M. Bowcock, F.R. Dietz, J.A. Morcuende, J.C. Murray, und M.B. Dobbs. 2007. Two novel point mutations in the long-range SHH enhancer in three families with triphalangeal thumb and preaxial polydactyly. *Am. J. Med. Genet. A.* 143(1): 27-32.
- Hamamy, H., N. Saleh, M. Oldridge, A. Al-Hadidy, und K. Ajlouni. 2006. Brachydactyly type B1: report of a family with de novo ROR2 mutation. *Clin. Genet.* 70(6): 538-540.
- Hatzis, P., und I. Talianidis. 2002. Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol. Cell.* 10(6): 1467-1477.
- Herford, A.S., P.J. Boyne, und R.P. Williams. 2007. Clinical applications of rhBMP-2 in maxillofacial surgery. *J Calif Dent Assoc.* 35(5): 335-341.
- HGMD. 2009. HGMD®. Available at <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (verified 24 September 2009).
- Hogan, B.L. 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development.* 10(13): 1580-1594.
- Hötten, G.C., T. Matsumoto, M. Kimura, R.F. Bechtold, R. Kron, T. Ohara, H. Tanaka, Y. Satoh, M. Okazaki, T. Shirai, H. Pan, S. Kawai, J.S. Pohl, und A. Kudo. 1996. Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs. *Growth Factors.* 13(1-2): 65-74.

- Hsu, W.K., und J.C. Wang. 2008. The use of bone morphogenetic protein in spine fusion. *Spine J.* 8(3): 419-425.
- Hughes, S.H., J.J. Greenhouse, C.J. Petropoulos, und P. Sutrave. 1987. Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J. Virol.* 61(10): 3004-3012.
- Israel, D.I., J. Nove, K.M. Kerns, R.J. Kaufman, V. Rosen, K.A. Cox, und J.M. Wozney. 1996. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors.* 13(3-4): 291-300.
- Jeong, Y., F.C. Leskow, K. El-Jaick, E. Roessler, M. Muenke, A. Yocum, C. Dubourg, X. Li, X. Geng, G. Oliver, und D.J. Epstein. 2008. Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. *Nat. Genet.* 40(11): 1348-1353.
- Jeziorska, D.M., K.W. Jordan, und K.W. Vance. 2009. A systems biology approach to understanding cis-regulatory module function. *Semin. Cell Dev. Biol.* Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19660565> (verified 24 September 2009).
- Johnson, R.L., R.D. Riddle, E. Laufer, und C. Tabin. 1994. Sonic hedgehog: a key mediator of anterior-posterior patterning of the limb and dorso-ventral patterning of axial embryonic structures. *Biochem. Soc. Trans.* 22(3): 569-574.
- Johnson, R.L., und C.J. Tabin. 1997. Molecular Models for Vertebrate Limb Development. *Cell.* 90(6): 979-990.
- Karsenty, G., und E.F. Wagner. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell.* 2(4): 389-406.
- Khan, S.N., M.P. Bostrom, und J.M. Lane. 2000. Bone growth factors. *Orthop. Clin. North Am.* 31(3): 375-388.
- Kim, T., U.M.E. Wikesjö, K. Cho, J. Chai, S.D. Pippig, M. Siedler, und C. Kim. 2009. Periodontal wound healing/regeneration following implantation of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) in an absorbable collagen sponge carrier into one-wall intrabony defects in dogs: a dose-range study. *J. Clin. Periodontol.* 36(7): 589-597.
- Kjaer, K.W., H. Eiberg, L. Hansen, C.B. van der Hagen, K. Rosendahl, N. Tommerup, und S. Mundlos. 2006. A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *J. Med. Genet.* 43(3): 225-231.
- Kleinjan, D.A., und V. van Heyningen. 2005. Long-Range Control of Gene Expression: Emerging Mechanisms and Disruption in Disease. *The American Journal of Human Genetics.* 76(1): 8-32.
- Klopocki, E., C. Ott, N. Benatar, R. Ullmann, S. Mundlos, und K. Lehmann. 2008. A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *J. Med. Genet.* 45(6): 370-375.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128(4): 693-705.

- Kronenberg, H.M. 2007. The Role of the Perichondrium in Fetal Bone Development. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1116(1): 59-64.
- Kulesa, H., G. Turk, und B.L. Hogan. 2000. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J*. 19(24): 6664-6674.
- Kwong, F.N.K., J.A. Hoyland, C.H. Evans, und A.J. Freemont. 2009a. Regional and cellular localisation of BMPs and their inhibitors' expression in human fractures. *Int Orthop*. 33(1): 281-288.
- Kwong, F.N.K., J.A. Hoyland, A.J. Freemont, und C.H. Evans. 2009b. Altered relative expression of BMPs and BMP inhibitors in cartilaginous areas of human fractures progressing towards nonunion. *J. Orthop. Res*. 27(6): 752-757.
- Lee, J.A., C.M.B. Carvalho, und J.R. Lupski. 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*. 131(7): 1235-1247.
- Lehmann, K., P. Seemann, F. Silan, T.O. Goecke, S. Irgang, K.W. Kjaer, S. Kjaergaard, M.J. Mahoney, S. Morlot, C. Reissner, B. Kerr, A.O.M. Wilkie, und S. Mundlos. 2007. A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am. J. Hum. Genet*. 81(2): 388-396.
- Lehmann, K., P. Seemann, J. Boergemann, G. Morin, S. Reif, P. Knaus, und S. Mundlos. 2006. A novel R486Q mutation in BMPRI1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur. J. Hum. Genet*. 14(12): 1248-1254.
- Lehmann, K., P. Seemann, S. Stricker, M. Sammar, B. Meyer, K. Süring, F. Majewski, S. Tinschert, K. Grzeschik, D. Müller, P. Knaus, P. Nürnberg, und S. Mundlos. 2003. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(21): 12277-12282.
- Lettice, L.A., S.J.H. Heaney, L.A. Purdie, L. Li, P. de Beer, B.A. Oostra, D. Goode, G. Elgar, R.E. Hill, und E. de Graaff. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*. 12(14): 1725-35.
- Logan, M. 2003. Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development*. 130(26): 6401-6410.
- Lucas, J., F. Le Mée, B. Le Marec, K. Pluquailec, H. Journal, und F. Picard. 1985. [Trisomy 20p derived from a maternal pericentric inversion and brachymesophalangy of the index finger]. *Ann. Genet*. 28(3): 167-171.
- Lyons, K.M., R.W. Pelton, und B.L. Hogan. 1989. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor-beta-like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. *Genes & Development*. 3(11): 1657-1668.

- Lyons, K., R. Pelton, and B. Hogan. 1990. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A). *Development*. 109(4): 833-844.
- Mader, S.S. 2008. *Human Biology*. McGraw-Hill, New York.
- Marcelino, J., C.M. Sciortino, M.F. Romero, L.M. Ulatowski, R.T. Ballock, A.N. Economides, P.M. Eimon, R.M. Harland, and M.L. Warman. 2001. Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(20): 11353-11358.
- Massagué, J., and Y. Chen. 2000. Controlling TGF- $\beta$  signaling. *Genes & Development*. 14(6): 627-644.
- McMahon, J.A., S. Takada, L.B. Zimmerman, C.M. Fan, R.M. Harland, and A.P. McMahon. 1998. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev.* 12(10): 1438-1452.
- Miller, A.F., S.A. Harvey, R.S. Thies, and M.S. Olson. 2000. Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J. Biol. Chem.* 275(24): 17937-45.
- Morgan, B.A., and D.M. Fekete. 1996. Manipulating gene expression with replication-competent retroviruses. *Methods Cell Biol.* 51: 185-218.
- Morotome, Y., M. Goseki-Sone, I. Ishikawa, and S. Oida. 1998. Gene expression of growth and differentiation factors-5, -6, and -7 in developing bovine tooth at the root forming stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244(1): 85-90.
- Mortlock, D.P., C. Guenther, and D.M. Kingsley. 2003. A general approach for identifying distant regulatory elements applied to the Gdf6 gene. *Genome Res.* 13(9): 2069-81.
- Nagy, A., M. Gershenstein, and K. Vintersten. 2003. *Manip the Mouse Embryo-3rd Ed (P): A Laboratory Manual*. 3. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Nakamura, K., T. Shirai, S. Morishita, S. Uchida, K. Saeki-Miura, and F. Makishima. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp. Cell Res.* 250(2): 351-363.
- Neuhaus, H., V. Rosen, and R.S. Thies. 1999. Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.* 80(2): 181-4.
- Niedermaier, M., G.C. Schwabe, S. Fees, A. Helmrich, N. Brieske, P. Seemann, J. Hecht, V. Seitz, S. Stricker, G. Leschik, E. Schrock, P.B. Selby, and S. Mundlos. 2005. An inversion involving the mouse Shh locus results in brachydactyly through dysregulation of Shh expression. *J. Clin. Invest.* 115(4): 900-909.
- Niswander, L. 2003. Pattern formation: old models out on a limb. *Nat Rev Genet.* 4(2): 133-143.

- Niswander, L., S. Jeffrey, G.R. Martin, und C. Tickle. 1994. A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature*. 371(6498): 609-612.
- Nohe, A., S. Hassel, M. Ehrlich, F. Neubauer, W. Sebald, Y.I. Henis, und P. Knaus. 2002. The Mode of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Oligomerization Determines Different BMP-2 Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 277(7): 5330-5338.
- Nohe, A., E. Keating, P. Knaus, und N.O. Petersen. 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.* 16(3): 291-299.
- Notredame, C., D.G. Higgins, und J. Heringa. 2000. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology.* 302(1): 205-217.
- Oldridge, M., A.M. Fortuna, M. Maringa, P. Propping, S. Mansour, C. Pollitt, T.M. DeChiara, R.B. Kimble, D.M. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, und A.O. Wilkie. 2000. Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat. Genet.* 24(3): 275-278.
- Parr, B.A., und A.P. McMahon. 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374(6520): 350-353.
- Pathi, S., J.B. Rutenberg, R.L. Johnson, und A. Vortkamp. 1999. Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev. Biol.* 209(2): 239-253.
- Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, und T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25(13): 1605-1612.
- Pfeiffer, R.A., C. Kändler, E. Sieber, A. Rauch, und U. Trautmann. 1997. Brachydactyly in a child with duplication-deficiency subsequent to t(15;20)(q25.2;p12.2)mat. Candidate regions on one or both chromosomes? *Clin. Genet.* 51(5): 357-360.
- Pizette, S., C. Abate-Shen, und L. Niswander. 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development.* 128(22): 4463-4474.
- Plöger, F., P. Seemann, M. Schmidt-von Kegler, K. Lehmann, J. Seidel, K.W. Kjaer, J. Pohl, und S. Mundlos. 2008. Brachydactyly Type A2 Associated with a Defect in proGDF5 Processing. *Hum Mol Genet.*
- Polinkovsky, A., N.H. Robin, J.T. Thomas, M. Irons, A. Lynn, F.R. Goodman, W. Reardon, S.G. Kant, H.G. Brunner, I. van der Burgt, D. Chitayat, J. McGaughan, D. Donnai, F.P. Luyten, und M.L. Warman. 1997. Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat. Genet.* 17(1): 18-19.
- Portnoy, M.E., K.J. McDermott, A. Antonellis, E.H. Margulies, A.B. Prasad, D.M. Kingsley, E.D. Green, und D.P. Mortlock. 2005. Detection of potential GDF6 regulatory elements by multispecies sequence comparisons and identification of a skeletal joint enhancer. *Genomics.* 86(3): 295-305.

- Reddi, H. 2009. BMPs: From Bone Morphogenetic Proteins to Body Morphogenetic Proteins.
- Riddle, R.D., M. Ensini, C. Nelson, T. Tsuchida, T.M. Jessell, und C. Tabin. 1995. Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by WNT6a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell*. 83(4): 631-640.
- Rihn, J.A., C. Gates, S.D. Glassman, F.M. Phillips, J.D. Schwender, und T.J. Albert. 2009. The use of bone morphogenetic protein in lumbar spine surgery. *Instr Course Lect*. 58: 677-688.
- Robert, B. 2007. Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev. Growth Differ*. 49(6): 455-468.
- Rountree, R.B., M. Schoor, H. Chen, M.E. Marks, V. Harley, Y. Mishina, und D.M. Kingsley. 2004. BMP receptor signaling is required for postnatal maintenance of articular cartilage. *PLoS Biol*. 2(11): e355.
- Sambrook, J., D.W. Russell, und J.E. Sambrook. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Scheufler, C., W. Sebald, und M. Hülsmeier. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 287(1): 103-115.
- Schwabe, G.C., und S. Mundlos. 2004. Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 36(2-3): 85-97.
- Schwabe, G.C., S. Tinschert, C. Buschow, P. Meinecke, G. Wolff, G. Gillessen-Kaesbach, M. Oldridge, A.O. Wilkie, R. Kömec, und S. Mundlos. 2000. Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene *ROR2* cause brachydactyly type B. *Am. J. Hum. Genet*. 67(4): 822-831.
- Schwabe, G.C., S. Türkmen, G. Leschik, S. Palanduz, B. Stöver, T.O. Goecke, und S. Mundlos. 2004. Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of *CDMP1*. *Am. J. Med. Genet. A*. 124A(4): 356-363.
- Sebald, W., J. Nickel, J. Zhang, und T.D. Mueller. 2004. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biological Chemistry*. 385(8): 697-710.
- Seemann, P. 2006. Zur Bedeutung des Wachstumsfaktors GDF5. : 95 Available at <http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=980833663> (verified 27 April 2009).
- Seemann, P., A. Brehm, J. König, C. Reissner, S. Stricker, P. Kuss, J. Haupt, S. Renninger, J. Nickel, W. Sebald, J. Groppe, F. Plöger, J. Pohl, M. Schmidt-von Kegler, M. Walther, I. Gassner, C. Rusu, A. Janecke, K. Dathe, und S. Mundlos. 2009. Mutations in *GDF5* Reveal a Key Residue Mediating BMP Inhibition by *NOGGIN*. *PLoS Genetics*. accepted.

- Seemann, P., R. Schwappacher, K.W. Kjaer, D. Krakow, K. Lehmann, K. Dawson, S. Stricker, J. Pohl, F. Plöger, E. Staub, J. Nickel, W. Sebald, P. Knaus, und S. Mundlos. 2005. Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J. Clin. Invest.* 115(9): 2373-81.
- Shore, E.M., M. Xu, G.J. Feldman, D.A. Fenstermacher, T. Cho, I.H. Choi, J.M. Connor, P. Delai, D.L. Glaser, M. LeMerrer, R. Morhart, J.G. Rogers, R. Smith, J.T. Triffitt, J.A. Urtizberea, M. Zasloff, M.A. Brown, und F.S. Kaplan. 2006. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat. Genet.* 38(5): 525-527.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., Knaus, P. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20(5-6):343-55.
- Somi, S., A.A.M. Buffing, A.F.M. Moorman, und M.J.B. Van Den Hoff. 2004. Expression of bone morphogenetic protein-10 mRNA during chicken heart development. *The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology.* 279(1): 579-82.
- Statistisches Bundesamt Deutschland. 2007. destatis Krankheitskosten. Available at <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Krankheitskosten/Aktuell.psml> (verified 23 September 2009).
- Storm, E.E., T.V. Huynh, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, D.M. Kingsley, und S.J. Lee. 1994. Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature.* 368(6472): 639-643.
- Storm, E.E., und D.M. Kingsley. 1996. Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development.* 122(12): 3969-3979.
- Stottmann, R.W., R.M. Anderson, und J. Klingensmith. 2001. The BMP Antagonists Chordin and Noggin Have Essential but Redundant Roles in Mouse Mandibular Outgrowth. *Developmental Biology.* 240(2): 457-473.
- Styrkarsdottir, U., J. Cazier, A. Kong, O. Rolfsson, H. Larsen, E. Bjarnadottir, V.D. Johannsdottir, M.S. Sigurdardottir, Y. Bagger, C. Christiansen, I. Reynisdottir, S.F.A. Grant, K. Jonasson, M.L. Frigge, J.R. Gulcher, G. Sigurdsson, und K. Stefansson. 2003. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol.* 1(3): E69.
- Sullivan, A.M., und G.W. O'Keefe. 2005. The role of growth/differentiation factor 5 (GDF5) in the induction and survival of midbrain dopaminergic neurones: relevance to Parkinson's disease treatment. *J. Anat.* 207(3): 219-226.
- Sun, M., F. Ma, X. Zeng, Q. Liu, X. Zhao, F. Wu, G. Wu, Z. Zhang, B. Gu, Y. Zhao, S. Tian, B. Lin, X. Kong, X. Zhang, W. Yang, W.H. Lo, und X. Zhang. 2008. Triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome and syndactyly type IV are caused by genomic duplications involving the long range, limb-specific SHH enhancer. *J. Med. Genet.* 45(9): 589-595.

- Sun, X., F.V. Mariani, und G.R. Martin. 2002. Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*. 418(6897): 501-508.
- Suttapreyasri, S., S. Koontongkaew, A. Phongdara, und U. Leggat. 2006. Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 35(5): 444-52.
- Sykaras, N., und L.A. Opperman. 2003. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci*. 45(2): 57-73.
- Szczaluba, K., K. Hilbert, E. Obersztyn, B. Zabel, T. Mazurczak, und K. Kozlowski. 2005. Du Pan syndrome phenotype caused by heterozygous pathogenic mutations in CDMP1 gene. *Am. J. Med. Genet. A*. 138(4): 379-383.
- Takahashi, T., I Takahashi, M Komatsu, Y Sawaishi, K Higashi, G Nishimura, H Saito, und G Takada. 2001. Mutations of the *NOG* gene in individuals with proximal symphalangism and multiple synostosis syndrome. *Clinical Genetics*. 60(6): 447-451.
- Tamura, K., Sayuri Yonei-Tamura, Tohru Yano, Hitoshi Yokoyama, und Hiroyuki Ide. 2008. The autopod: Its formation during limb development. *Development, Growth & Differentiation*. 50(s1): S177-S187.
- Temtamy, S.A., und V.A. McKusick. 1978. The genetics of hand malformations. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 14(3): i-xviii, 1-619.
- Temtamy, S.A., und M.S. Aglan. 2008. Brachydactyly. *Orphanet J Rare Dis*. 3: 15.
- Thomas, J.T., M.W. Kilpatrick, K. Lin, L. Erlacher, P. Lembessis, T. Costa, P. Tsipouras, und F.P. Luyten. 1997. Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in CDMP1. *Nat. Genet*. 17(1): 58-64.
- Thomas, J.T., K. Lin, M. Nandedkar, M. Camargo, J. Cervenka, und F.P. Luyten. 1996. A human chondrodysplasia due to a mutation in a TGF-beta superfamily member. *Nat. Genet*. 12(3): 315-317.
- Tolhuis, B., R.J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld, und W. de Laat. 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell*. 10(6): 1453-1465.
- Tsiologiannis, E., I. Polyzois, Q. Oak Tang, G. Pavlou, E. Tsiridis, M. Heliotis, und E. Tsiridis. 2009. Targeting bone morphogenetic protein antagonists: in vitro and in vivo evidence of their role in bone metabolism. *Expert Opin. Ther. Targets*. 13(1): 123-137.
- Urist, M.R. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 150(698): 893-899.
- Wang, J.C., und G.N. Gjaever. 1988. Action at a distance along a DNA. *Science*. 240(4850): 300-304.
- Wang, X., Fuying Xiao, Qinbo Yang, Bo Liang, Zhaohui Tang, Linbin Jiang, Qihui Zhu, Wei Chang, Jiuxi Jiang, Chuanming Jiang, Xiang Ren, Jing-Yu Liu, Qing K. Wang, und Mugen Liu. 2006. A novel mutation in *GDF5* causes autosomal dominant



- symphalangism in two Chinese families. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 140A(17): 1846-1853.
- Weng, D., S. Poehling, S. Pippig, M. Bell, E. Richter, O. Zuhr, und M.B. Hürzeler. 2009. The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 24(1): 31-37.
- Wijgerde, M., S. Karp, J. McMahon, und A.P. McMahon. 2005. Noggin antagonism of BMP4 signaling controls development of the axial skeleton in the mouse. *Dev. Biol*. 286(1): 149-157.
- Wirth, C.J. 2003. *Orthopädie und orthopädische Chirurgie: Ellenbogen, unterarm, hand / herausgegeben von Abdul-Kader Martini*. Georg Thieme Verlag.
- Wolfman, N.M., G. Hattersley, K. Cox, A.J. Celeste, R. Nelson, N. Yamaji, J.L. Dube, E. DiBlasio-Smith, J. Nove, J.J. Song, J.M. Wozney, und V. Rosen. 1997. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J. Clin. Invest*. 100(2): 321-330.
- Wolpert, L. 2002. The progress zone model for specifying positional information. *Int. J. Dev. Biol*. 46(7): 869-870.
- Wozney, J.M., V. Rosen, A.J. Celeste, L.M. Mitsock, M.J. Whitters, R.W. Kriz, R.M. Hewick, und E.A. Wang. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 242(4885): 1528-1534.
- Wu, X., W. Shi, und X. Cao. 2007. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1116: 29-49.
- Yamashita, H., A. Shimizu, M. Kato, H. Nishitoh, H. Ichijo, A. Hanyu, I. Morita, M. Kimura, F. Makishima, und K. Miyazono. 1997. Growth/differentiation factor-5 induces angiogenesis in vivo. *Exp. Cell Res*. 235(1): 218-226.
- Yang, W., L. Cao, W. Liu, L. Jiang, M. Sun, D. Zhang, S. Wang, W.H.Y. Lo, Y. Luo, und X. Zhang. 2008. Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydactyly type C and proximal symphalangism. *J. Hum. Genet*. 53(4): 368-374.
- Zhang, H., und A. Bradley. 1996. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development*. 122(10): 2977-2986.
- Zimmerman, L.B., J.M. De Jesús-Escobar, und R.M. Harland. 1996. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*. 86(4): 599-606.
- Zou, H., R. Wieser, J. Massagué, und L. Niswander. 1997. Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage. *Genes Dev*. 11(17): 2191-2203.

## **9 weitere Verzeichnisse**

### **9.1 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1: Schematischer Ablauf der endochondralen Ossifikation. ....	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Extremitätenentwicklung und involvierte Signalwege der Achsenformierung. ....	4
Abb. 1.3: Skelettärer Aufbau der adulten humanen Extremitäten. ....	5
Abb. 1.4: Formverleihende Apoptose während der Extremitätenentwicklung. ....	6
Abb. 1.5: Extremitätenfehlbildungen die mit BMP Signalmolekülen assoziiert sind. ....	8
Abb. 1.6: BMP-Signalweg.....	11
Abb. 1.7: Modelle zur Aktivität von cis-regulatorischen Sequenzen. ....	13
Abb. 1.8: Expression von <i>Nog</i> <sup>+/<i>LacZ</i></sup> . ....	14
Abb. 1.9: <i>Gdf5</i> -Expression. ....	15
Abb. 1.10: <i>Bmp2</i> cis-regulatorische Aktivität.....	17
Abb. 4.1: GDF5-Punktmutationen an Position N445 sind mit SYNS1 assoziiert.....	48
Abb. 4.2: Partielles multiples Sequenz-Alignment von GDF5-Orthologe verschiedener Spezies. ....	49
Abb. 4.3: Partielles multiples Sequenz-Alignment der humanen TGFβ-Superfamilie.....	50
Abb. 4.4: Vergleich der Hydrophobizität im 3D-Proteinstrukturmodell. ....	51
Abb. 4.5: Lokalisation der Mutationsstelle im 3D Proteinoberflächenmodell eines GDF5-Dimers. ....	53
Abb. 4.6: Expression ausgewählter BMPs/GDFs und ihrer Interaktionspartner während der Extremitätenentwicklung. ....	55
Abb. 4.7: <i>Gdf5</i> Mutationen N445T und N445K werden nicht durch <i>Nog</i> in der Mikromass inhibiert. ....	56
Abb. 4.8: Die homologe GDF5 Mutation N445T beeinflusst in <i>Bmp2</i> , <i>Bmp4</i> und <i>Bmp7</i> nicht die <i>Nog</i> Inhibierung. ....	57
Abb. 4.9: <i>Bmp9</i> und <i>Bmp10</i> sind <i>Nog</i> -resistent.....	58
Abb. 4.10: Dreifachmutation in <i>Bmp9</i> ermöglicht <i>Nog</i> -Sensitivität. ....	61
Abb. 4.11: Die GDF5 Mutante N445T besitzt eine verstärkte chondrogene Aktivität.....	62
Abb. 4.12: Die <i>Gdf5</i> Mutanten N445T und N445K als auch <i>Bmp9</i> bewirken eine verstärkte chondrogene Differenzierung nach Überexpression in Hühnchenextremitäten.....	63
Abb. 4.13: GDF5, BMP2 und BMP9 induzieren <i>Nog</i> -Feedback Expression. ....	64

Abb. 4.14: Expression von <i>Bmp2</i> , <i>Bmp4</i> , <i>Bmp9</i> und <i>Nog</i> im Mausembryo.....	67
Abb. 4.15: RT-PCR: Expression von <i>BMP9</i> in Geweben eines Mausembryos E14.5.....	67
Abb. 4.16: <i>Bmp10</i> und <i>Nog</i> sind im Herz coexprimiert. ....	68
Abb. 4.17: Stammbaum und Phänotyp der BDA2-Patienten.....	70
Abb. 4.18: Schematische Darstellung des Duplikationslokuses. ....	71
Abb. 4.19: Expressionsprofil von <i>LacZ</i> in transgenen Mausembryonen ähnelt der Expression von <i>Bmp2</i> und nicht der von <i>Gdf5</i> , <i>Bmpr1a</i> und <i>Bmpr1b</i> .....	73
Abb. 5.1: Schematische Darstellung des Pathogenesemechanismus der GDF5-Varianten N445T/K.....	83
Abb. 5.2: Schematische Darstellung potentieller Pathogenesemechanismen der BDA2.....	89

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Auflistung der wichtigsten Funktionen der Mitglieder der BMP/GDF Gruppe und ihrer bisher assoziierten humanen Erbkrankheiten.....	9
Tab. 3.1: Verwendete Vektoren.....	19
Tab. 3.2: Primer für Klonierungen.....	20
Tab. 3.3: Primer für <i>in vitro</i> Mutagenesen.....	21
Tab. 3.4: Primer für Sequenzierung.....	21
Tab. 3.5: Primer für Sondenamplifikation.....	22
Tab. 3.6: Primer für weitere Anwendungen.....	23
Tab. 3.7: Verwendete molekularbiologische Reaktionssysteme.....	23
Tab. 3.8: Verwendete Programme und Datenbanken.....	25
Tab. 4.1: Zusammenstellung der untersuchten Bmp9-Varianten mit einfach, zweifach, dreifach, vierfach und fünffach Mutationen.....	60

### 9.3 Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
AER	apikale ektodermale Randleiste
ALP	Alkalische Phosphatase
ANZ	anteriore nekrotische Zone
BBR	Boehrings Blocking Reagent
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyolphosphat
BD	Brachydaktylie
BDA2	Brachydaktylie Typ A2
bidest	zweifach destilliert
BMP	Bone Morphogenic Protein(s)
BMPR	BMP Rezeptor
bp	Basenpaare
ch	chicken (Speziesbezeichnung Hühnchen)
CHO	chinese hamster ovar
Chr.	Chromosom
CRS	cis regulatorische Sequenz
CS	chicken serum
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dubledecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
E	Embryonalstadium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECR	Enhancer codierende Sequenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDF	Growth and Differentiation Factor
h	Stunde
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution
HH	Hamburger-Hamilton Entwicklungsstadium des Hühnchens
HISS	Hitze inaktiviertes Schafserum
Hsp	Hitzeschockprotein
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kb	Kilobase(n)
Kontr.	Kontrolle
LacZ	Genbezeichnung beta-Galaktosidase aus <i>E. coli</i>
LB	Luria Bertami
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-Activated Proteine Kinase
Mb	Megabase(n)
MetOH	Methanol
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MM	Mikromass
mRNA	messenger RNA

## Abbildungsverzeichnis

---

Mut	Mutation
NBT	Nitro blue tetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NOG	Noggin
OD	optische Dichte
P-ISH	Paraffin <i>in situ</i> Hybridisierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
PK	Proteinase K
PNZ	posteriore nekrotische Zone
PZ	proliferierende Zone
qRT	quantitative Real-Time
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
Shh	sonic hedgehog
SINE	Short Interspersed Element
SPF	Spezifiziert Pathogen Frei
SSC	Standard Saline Citrate Puffer
SYM	proximaler Symphalangismus
SYNS1	multiples Synostosesyndrom Typ 1
T	Tween
TEA	Triethanolamin
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	Unit
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
WM-ISH	whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung
WNT	Wingless-related MMTV integration site
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D.galactopyranosid
ZPA	Zone polarisierender Aktivität
ZRS	ZPA regulatory sequence
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

Im DUDEN enthaltene Abkürzungen sowie Einbuchstabencode der Aminosäuren und Genbezeichnungen sind nicht aufgeführt.

## **10 Anhang**

### **10.1 Lebenslauf**

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

## 10.2 Publikationen

### Veröffentlichungen:

Katarina Dathe\*, Klaus W. Kjaer\*, Anja Brehm, Peter Meinecke, Peter Nürnberg, Jordao C. Neto, Decio Brunoni, Nils Tommerup, Claus E. Ott, Eva Klopocki, Petra Seemann, Stefan Mundlos

#### **Duplications Involving a Conserved Regulatory Element Downstream of BMP2 Are Associated with Brachydactyly Type A2**

*The American Journal of Human Genetics* 2009, 84: 483–492.

Petra Seemann\*, Anja Brehm\*, Jana König, Carsten Reissner, Sigmar Stricker, Pia Kuss, Julia Haupt, Stephanie Renninger, Joachim Nickel, Walter Sebald, Jay C. Groppe, Frank Plöger, Jens Pohl, Mareen Schmidt-von Kegler, Maria Walther, Ingmar Gassner, Cristina Rusu, Andreas R. Janecke, Katarina Dathe, Stefan Mundlos

#### **Mutations in GDF5 Reveal a Key Residue Mediating BMP Inhibition by NOGGIN**

*PLoS Genetics* 2009, accepted.

\* gleichwertige Autorenschaft

### Posterbeiträge auf Kongressen:

- jährliche PhD-Tagung der STA (Student Association Max-Planck Institut Berlin);  
2006-2009, Berlin
- 4<sup>th</sup> International PhD Student Symposium Horizons in Molecular Biology; 2007, Göttingen
- 10<sup>th</sup> International Conference on Limb Development and Regeneration; 2008, Madrid
- 1<sup>st</sup> International BMP Workshop - Modern Trends in BMP Signaling; 2009, Berlin  
Posterpreis: Luzie-Fabisch Poster Award für beste Posterpresentation  
Teilnahmeutschein für 8<sup>th</sup> International Conference on BMPs



### **10.3 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen, als die angegebenen, Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, daß ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 25.11.2009

---

Anja Brehm