

**Zur Bedeutung des Wachstumsfaktors GDF5**  
**Funktionelle Analyse und Genotyp-Phänotyp Korrelation**

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

Petra Seemann  
aus Holzminden

Dezember 2005

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

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Innestraße 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 Chemie-Biochemie

Freie Universität Berlin

Thielallee 63, 14195 Berlin

Tel. 030 – 8385 2935

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

**Disputation am 6. April 2006**

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das menschliche Skelett.....	1
1.2	Die Entwicklung der Extremitäten .....	3
1.3	Die Bone Morphogenetic Proteins (BMP) .....	8
1.4	Der Growth and Differentiation Factor 5 (GDF5).....	12
1.5	Angeborene Handfehlbildungen .....	14
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>18</b>
3.1.1	Chemikalien .....	18
3.1.2	Pufferlösungen.....	18
3.1.3	Enzyme .....	18
3.1.4	Molekularbiologische Reaktionssysteme (Kits) .....	18
3.1.5	Vektoren und Plasmide.....	19
3.1.6	Bakterienstämme .....	19
3.1.7	Oligonukleotid-Primer .....	20
3.1.8	Medien und Puffer für die Zellkultur.....	22
3.1.9	Einwegartikel für die Zellkultur.....	22
3.1.10	Zelllinien.....	22
3.1.11	Tiere .....	22
3.1.11.1	Mäuse .....	22
3.1.11.2	Hühnerembryonen .....	22
3.1.12	Datenbanken und Server.....	23
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.2.1	Plasmid-Isolierung .....	23
3.2.2	Isolierung von DNA Fragmenten .....	23
3.2.3	Aufreinigung von PCR Produkten.....	24
3.2.4	RNA-Isolierung.....	24
3.2.5	In vitro Mutagenese .....	24
3.2.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	24
3.2.7	Sequenzierung.....	25
3.2.8	Klonierung der RCAS-Konstrukte .....	25
3.2.8.1	Bmpr1b .....	25
3.2.8.2	Gdf5 .....	25
3.2.9	Realtime-PCR .....	26

<b>3.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>27</b>
3.3.1	Präparation von Mikromass-Kulturen .....	27
3.3.2	Präparation der RCAS-Viren .....	28
3.3.3	Differenzierung von C2C12 Zellen .....	29
<b>3.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.4.1	Western Blot Analyse .....	29
3.4.2	Immunzytologie.....	31
3.4.2.1	anti-HA.....	31
3.4.2.2	anti-Myosin.....	31
3.4.3	ALP-Nachweis, quantitativ.....	32
<b>3.5</b>	<b>Histologische Methoden</b> .....	<b>33</b>
3.5.1	In situ Hybridisierung .....	33
3.5.1.1	Transkription DIG-markierter Sonden .....	33
3.5.1.2	Wholemout In situ Hybridisierung (WISH).....	33
3.5.1.3	In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten (ISH) .....	34
3.5.2	Klassische Färbungen .....	36
3.5.2.1	Alcian Blau .....	36
3.5.2.2	ALP, qualitativ .....	36
3.5.2.3	Alizarin Rot.....	36
3.5.3	Elektronenmikroskopie .....	37
<b>3.6</b>	<b>Bioinformatische Methoden</b> .....	<b>37</b>
3.6.1	Sequenz-Alignments.....	37
3.6.2	Protein-3D-Darstellung .....	37
3.6.3	Protein-Struktur-Vorhersage.....	37
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Mikromass-Kultur zur Analyse von Skelettfehlbildungen</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Punktmutationen in <i>BMPR1B</i> verursachen BDA2</b> .....	<b>42</b>
4.2.1	Die <i>BMPR1B</i> Mutationen befinden sich in konservierten Bereichen ..	43
4.2.2	<i>Bmpr1b</i> Mutationen sind dominant negativ .....	44
4.2.2.1	<i>Bmpr1b</i> Mutationen inhibieren die Chondrogenese in vitro .....	44
4.2.2.2	<i>Bmpr1b</i> Mutanten sind membranständig .....	46
<b>4.3</b>	<b><i>GDF5</i> Mutationen verursachen BDA2, BDC, SYM1 oder SYNS1 ...</b>	<b>47</b>
4.3.1	<i>GDF5</i> Mutationen in konservierten Bereichen der Signaldomäne .....	49
4.3.2	<i>Gdf5</i> Mutationen zeigen veränderte biologische Aktivitäten .....	52
4.3.2.1	Einfluss der <i>Gdf5</i> Mutanten auf die Chondrogenese .....	52
4.3.2.2	In vitro Synthese und Sezernierung der <i>Gdf5</i> Mutanten .....	54
4.3.2.3	Dosis-abhängige Aktivität der <i>GDF5</i> Mutanten auf ATDC5 Zellen .....	56
4.3.2.4	<i>GDF5</i> Mutanten beeinflussen das C2C12-Differenzierungsverhalten .....	57

4.4	<b><i>Gdf5</i> und <i>Bmpr1b</i> Expression während der Gelenkentwicklung ..</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
5.1	<b>Vor- und Nachteile des Mikromass-Kultur-Systems.....</b>	<b>62</b>
5.2	<b>Heterozygote Mutationen in <i>BMPR1B</i> verursachen BDA2.....</b>	<b>64</b>
5.3	<b>Phänotypisches Spektrum von <i>GDF5</i> Punktmutationen und ihre molekularen Auswirkungen.....</b>	<b>68</b>
5.3.1	BDC – <i>GDF5</i> (R438C) – der klassische Funktionsverlust .....	68
5.3.2	BDA2 – <i>GDF5</i> (L441P) bindet nicht mehr an <i>BMPR1B</i> .....	69
5.3.3	SYM1 – <i>GDF5</i> (R438L) bindet zusätzlich an <i>BMPR1A</i> .....	70
5.3.4	SYNS1 – <i>GDF5</i> (N445T) weist eine NOG-Resistenz auf .....	72
5.3.5	Pathogenesemechanismen der <i>GDF5</i> Punktmutationen .....	73
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>89</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis .....	89
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	91
9.3	Tabellenverzeichnis.....	92
<b>10</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>93</b>
10.1	Lebenslauf .....	93
10.2	Publikationsverzeichnis .....	94
10.3	Selbständigkeitserklärung.....	95