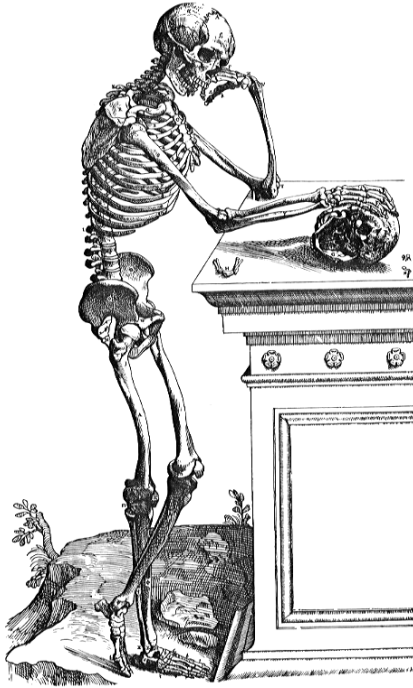


# 1 Einleitung

## 1.1 Das menschliche Skelett



**Abb. 1 Das menschliche Skelett**

Zeichnung von Andreas Vesalius  
(Vesalius, 1551)

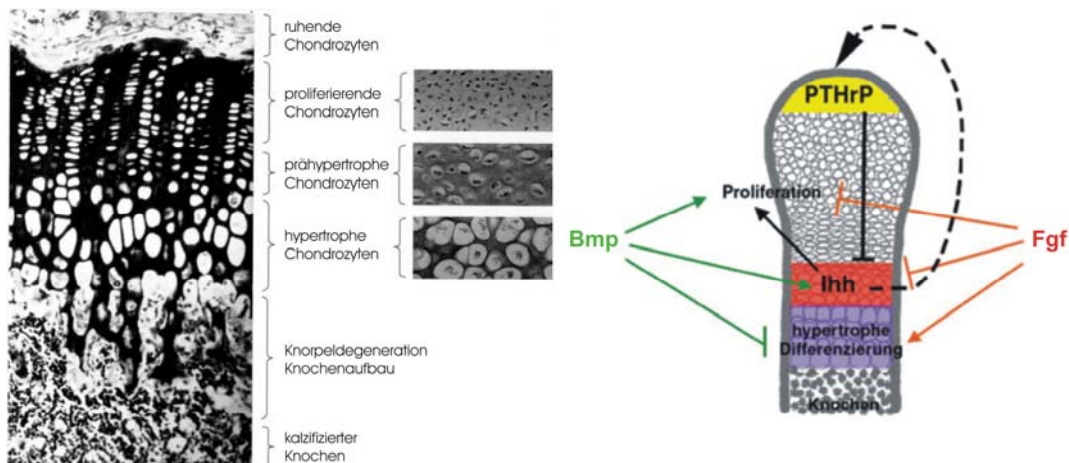
Das Wort Skelett leitet sich aus dem griechischen *skeletos* ab, welches einen *ausgetrockneten Körper* bezeichnet. Das menschliche Skelett besteht aus mehr als 200 Knochen, die über Fugen, Gelenke, Sehnen und Muskeln miteinander in Verbindung stehen, zusammen bilden sie den Bewegungsapparat (Abb. 1). Das Skelett verleiht dem Körper Gestalt und Stabilität. Neben der Stützfunktion bietet das Skelett den inneren Organen und dem Gehirn Raum und Schutz vor äußeren Einwirkungen. Des Weiteren ist das Skelett maßgeblich an der Blutbildung beteiligt und ein flexibler Speicherort für Mineralien, wie Kalzium und Phosphat, und somit essentiell für die Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Während des gesamten Lebens wird Knochensubstanz auf- und abgebaut. Die

Osteoblasten (Knochenzellen) sind für den Knochenaufbau und die Osteoklasten für den Knochenabbau verantwortlich. Bis zum 35. Lebensjahr überwiegt der Knochenaufbau, die Knochenmasse nimmt ständig zu. Danach vermindert sich die Knochenmasse normalerweise jährlich um etwa 0,5-1,5%. Bei der Osteoporose erreicht der Knochenabbau ein pathologisches Ausmaß, der Mineralgehalt des Knochens nimmt ab, was anhand von Resorptionslakunen im Knochen sichtbar ist.

Man unterscheidet das axiale, das kraniale und das appendikuläre Skelett. Das Axialskelett setzt sich aus der Wirbelsäule, den Rippen und dem Sternum zusammen und schließt mit dem Schädel ab. Das appendikuläre Skelett besteht aus den oberen und den unteren Extremitäten, welche über Schultergürtel und Hüfte mit dem Axialskelett verbunden sind.

Die Entwicklung des Skeletts erfolgt in einem dreistufigen Prozess. An die initiale Musterbildung schließen sich die Organogenese und das Wachstum der Skelettelemente an (Kornak & Mundlos, 2003). Die Musterbildung bestimmt die räumliche Anordnung, Anzahl und Gestalt der späteren Knochen. Während der Organogenese differenzieren mesenchymale Vorläuferzellen zu Chondrozyten (Knorpelzellen) oder Osteoblasten. Entwicklungsbiologisch unterscheidet man die desmale von der endochondralen Ossifikation. Während der desmalen Ossifikation differenzieren Osteoblasten direkt aus Mesenchymzellen. Desmal verknöchern die Platten des Schädeldaches, Teile des Gesichtsschädels und des Schlüsselbeins. Alle anderen Knochen entwickeln sich hingegen durch den Prozess der endochondralen Ossifikation. Hierbei wird zunächst eine knorpelige Anlage gebildet, die später durch Knochen ersetzt wird. Nach der Organogenese folgt das Wachstum der Skelettelemente. Dies findet in einem spezialisierten Bereich der Röhrenknochen statt, den man als Epiphysenfuge oder auch als Wachstumsfuge bezeichnet.

Innerhalb des Epiphysenfugenknorpels spielen sich die Vorgänge der Knorpeldifferenzierung in verschiedenen Zonen ab, die morphologisch gut zu unterscheiden sind (Abb. 2).



**Abb. 2 Darstellung der Wachstumsfuge**

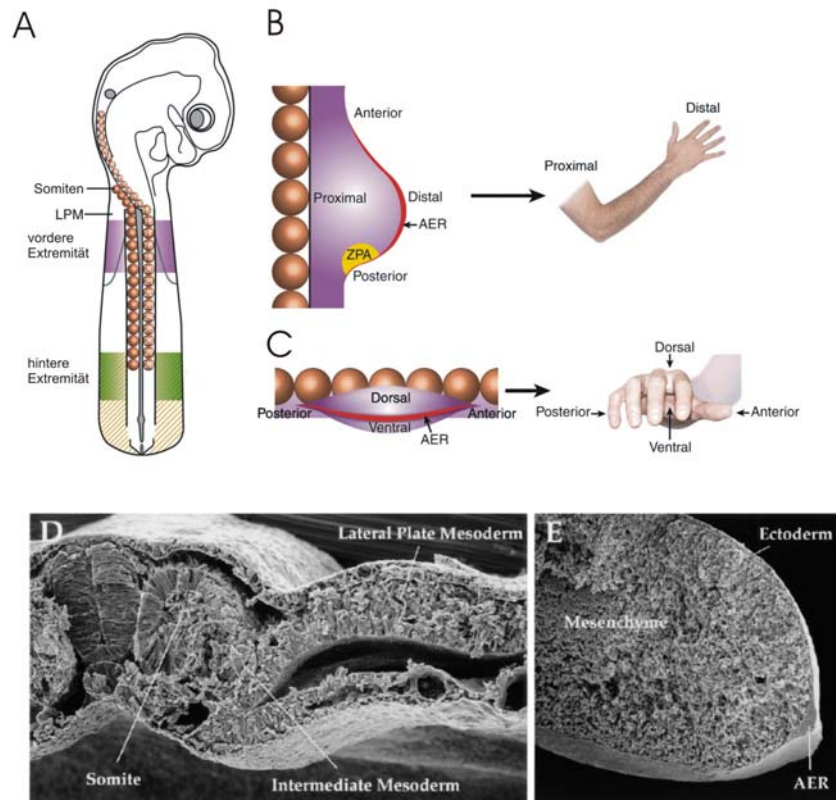
**links** Histologischen Schnitt durch den proximalen Teil eines embryonalen Humerus. Die Zonen der Knorpeldifferenzierung und des Übergangs zum trabekulären Knochen sind angegeben. **mittig** Vergrößerte Darstellung der Chondrozyten zu distinkten Entwicklungsphasen. Abbildung abgewandelt nach (S.F. Gilbert, 2003). **rechts** Schematische Darstellung der molekularen Prozesse während der endochondralen Ossifikation. PTHrP: *Parathyroid hormone related protein*; Bmp: *bone morphogenetic proteins*; Fgf: *fibroblast growth factors*; Ihh: *Indian hedgehog*. Abbildung abgewandelt nach (Minina et al., 2001).

An die Zone des ruhenden Knorpels schließt sich die Zone der Knorpelsäulen an. Hier kommt es zu einer starken Proliferation der Chondrozyten. Diese Proliferation wird durch Signalmoleküle wie den *Fibroblast growth factors* (Fgf), *Bone morphogenetic proteins* (Bmp) und *Indian hedgehog* (Ihh) gesteuert (Minina et al., 2001; Naski, Colvin, Coffin, & Ornitz, 1998). Anschließend kommt es in der Zone des großblasigen Knorpels zur terminalen Differenzierung der Knorpelzellen zu hypertrophen Chondrozyten. Die prähypertrophen Chondrozyten exprimieren Ihh (Vortkamp et al., 1996). Ihh induziert die Expression von *Parathyroid hormone related protein* (PTHrP) im periartikulären Perichondrium. PTHrP diffundiert durch die Wachstumsfuge zu seinem Rezeptor PTHR, der überlappend mit Ihh exprimiert ist. Dessen Aktivierung verhindert eine weitere Differenzierung der Chondrozyten und reguliert somit indirekt auch die Expression von Ihh wieder herunter. Dieser durch Ihh und PTHrP vermittelte negative Rückkopplungsmechanismus stellt einen der wesentlichen Steuerungsmechanismen des Knochenwachstums und der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung dar (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996). Osteoklasten lösen den Knorpel auf und zugleich wandern Blutgefäße in die Zone des hypertrophen Knorpels aus dem Periosteum (Knochenhaut) ein. Mit der Vaskularisierung des Knorpels gelangen Osteoblasten und Osteoklasten in die hypertrophe Region und beginnen die hypertrophe Zone durch Knochengewebe zu ersetzen.

## 1.2 Die Entwicklung der Extremitäten

Die Entwicklung der Extremitäten beginnt nachdem die Primärachse des Embryos angelegt ist. An den Seiten des Embryos bilden sich die Extremitätenknospen, die sich je nach Position zu den Somiten zu den oberen oder unteren Gliedmaßen entwickeln. Die frühe Extremitätenknospe besteht aus zwei Zelltypen, den mesodermalen Mesenchymzellen und den ektodermalen Epithelzellen, welche die mesenchymalen Zellen umhüllen. Die mesenchymalen Zellen stammen aus dem Lateralplattenmesoderm und bilden später die skelettären Elemente und Sehnen der Extremitäten. Alle anderen Gewebe, wie Nerven, Blutgefäße und Muskeln, werden von den Somiten gebildet und wachsen erst sekundär in die Extremitäten ein (R. L. Johnson & Tabin, 1997). Das Grundmuster der Extremitäten wird durch die Ausbildung von drei Achsen (proximo-

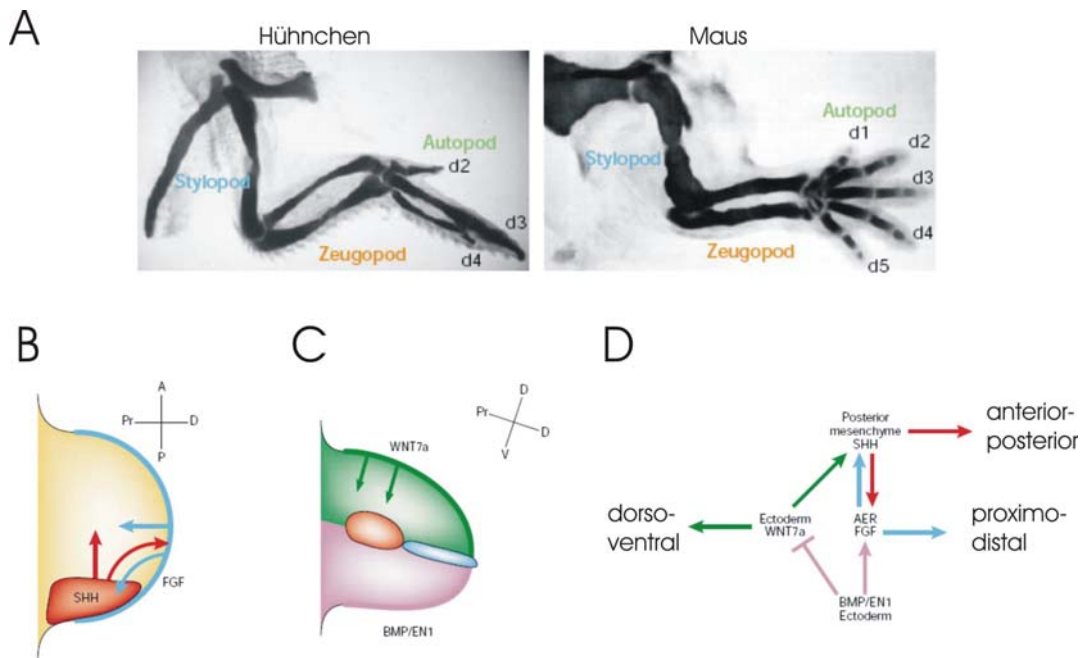
distal, dorso-ventral und anterior-posterior) festgelegt, welche durch die Interaktion des Mesenchyms mit dem darüber liegenden Ektoderm etabliert werden. Entlang ihrer proximo-distalen Achse (Schulter-Finger) verlängert sich die Extremität, während sie entlang ihrer anterior-posterioren Achse (Daumen-kleiner Finger) asymmetrisch wird und sich entlang ihrer dorso-ventralen Achse (Handrücken-Handflächen) abflacht (Abb. 3).



**Abb. 3 Darstellung der Entwicklung der oberen Extremität**

**A** Schematische Darstellung eines Embryonen. Die obere Extremität entwickelt sich aus dem Lateralplattenmesoderm benachbart zu den Somiten 16-20. Zu diesem Zeitpunkt ist die untere Extremität noch nicht angelegt. **B** und **C** Darstellung der drei Primärachsen der sich entwickelnden oberen Extremität und die äquivalenten Strukturen im adulten menschlichen Arm. Die apikale ektodermale Randleiste (AER, rot dargestellt) befindet sich am distalen Ende der Extremitätenknospe und unterteilt das dorsale von dem ventralen Ektoderm. Die Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA, gelb dargestellt) befindet sich im posterioren Bereich der Extremitätenknospe. **D** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Hühnerembryonen (Hamburger Hamilton Stadium, HH13). Gezeigt sind die Somiten, das intermediäre und das Lateralplattenmesoderm, aus welchem sich die skelettären Elemente des Flügels entwickeln. **E** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Hühnerembryonen (HH18). Zu sehen ist der lockere mesenchymale Zellverband umgeben von einer ektodermalen Schicht und einer ektodermalen Verdichtung am distalen Ende der Extremitätenknospe (AER). Abbildung A-C aus (Logan, 2003) und D-E aus (R. L. Johnson & Tabin, 1997).

Das Auswachsen der Extremitätenknospe in proximo-distaler Richtung wird hauptsächlich durch Fgf bestimmt, die von Zellen der apikalen ektodermalen Randleiste (AER) sezerniert werden (Sun, Mariani, & Martin, 2002). Mesenchymale Zellen unterhalb der AER proliferieren sehr stark, weshalb man diesen Bereich auch als Wachstumszone oder *progress zone* bezeichnet. Innerhalb dieser Zone findet keine Differenzierung statt, erst Zellen außerhalb der Wachstumszone können sich verdichten und die ersten Knorpelkondensationen bilden. Die Differenzierung erfolgt von proximal nach distal, demzufolge wird das Stylopodium (Humerus) zuerst angelegt, dann folgt die Differenzierung des Zeugopodiums (Radius und Ulna) und zum Schluss das Autopodium (Hand) (Abb. 4).



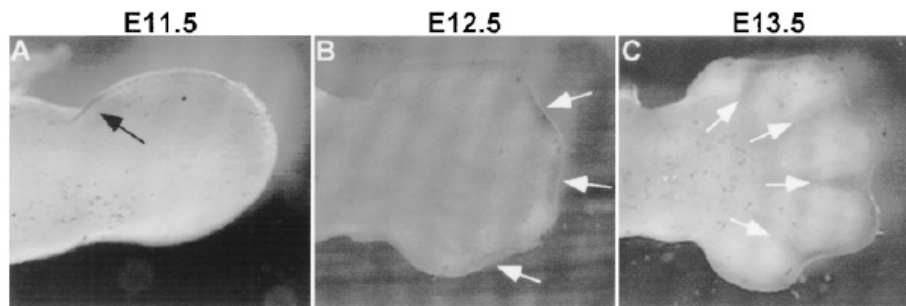
**Abb. 4 Signalwege, welche die Extremitätenentwicklung steuern**

**A** Vorderextremitäten des Hühnchens (**links**) und der Maus (**rechts**). **B** Darstellung der Signalwege, die die proximo-distale und die anterior-posteriore Achse etablieren. **C** Darstellung der Signalwege, die die dorso-ventrale Achse etablieren. **D** Schematische Darstellung der Signalwege, welche die drei Hauptachsen der Extremitätenentwicklung etablieren. Die Bildung der proximo-distalen Achse wird durch die von der Randleiste (AER, blau dargestellt) sezernierten FGF induziert. Die anterior-posteriore Achse wird durch die Expression von Sonic hedgehog (SHH) gesteuert, während die dorso-ventrale Achse durch BMP und Engrailed (EN1) vom ventralen Ektoderm und durch Wnt7a vom dorsalen Ektoderm etabliert wird. Abbildung abgewandelt nach (Niswander, 2003).

Die anterior-posteriore Musterbildung wird durch die Expression von *Sonic hedgehog* (Shh) im posterioren Bereich entscheidend beeinflusst. Diese Zone bezeichnet man auch als *Zone der polarisierenden Aktivität* (ZPA) (Niswander, Jeffrey, Martin, & Tickle, 1994; Riddle, Johnson, Laufer, & Tabin, 1993).

Die dorso-ventrale Musterbildung wird durch das Ektoderm, welches Signale an das darunter liegende Mesenchym weiterleitet, geprägt. Das ventrale Ektoderm exprimiert *Bmp* und induziert *Engrailed* (En1), das die Expression von *Wnt7a* im dorsalen Ektoderm beschränkt (Parr & McMahon, 1995). *Wnt7a* induziert *Lmx1b* im dorsalen Mesenchym, welches die Differenzierung dorsaler Strukturen einleitet (Pizette, Abate-Shen, & Niswander, 2001; Riddle et al., 1995).

Während das Wachstum und die Differenzierung in drei Achsen der Extremitätenknospe voran schreitet, erfolgt Apoptose in definierten Regionen um die Struktur und Form der Extremität auszubilden (Abb. 5) (Chen & Zhao, 1998).



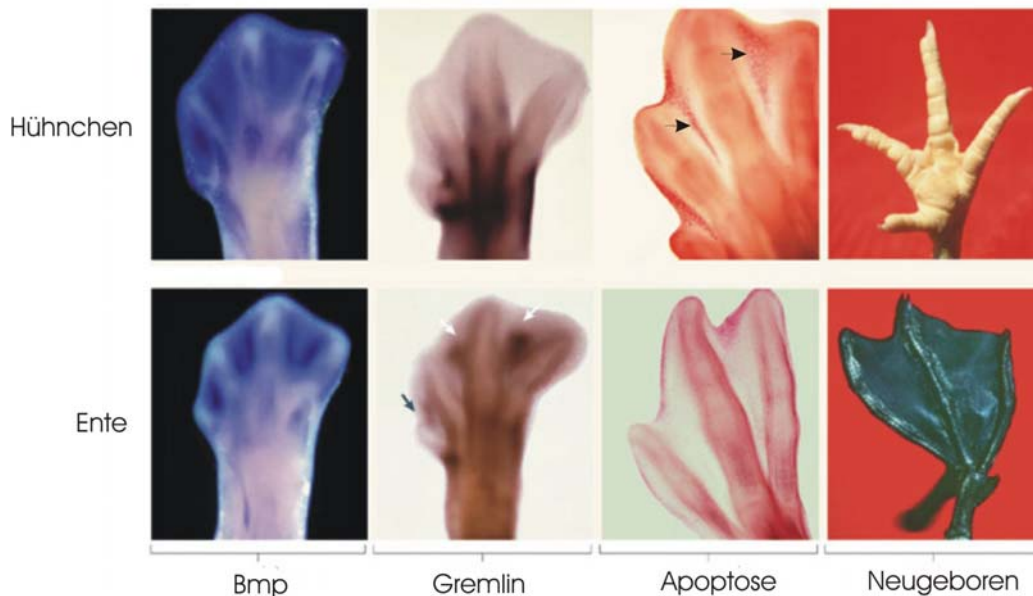
#### **Abb. 5 Apoptose während der Extremitätenentwicklung**

Nile Blau Färbung von apoptotischen Zellen während der Extremitätenentwicklung der Maus **A** Extremitätenknospe (E11.5) – die Apoptose ist sichtbar in der anterioren nekrotischen Zone (ANZ) **B** Extremitätenknospe (E12.5) – die Apoptose ist im AER sichtbar **C** Extremitätenknospe (E13.5) – die Apoptose ist deutlich im interdigitalen Mesenchym zu erkennen. Abbildung aus (Chen & Zhao, 1998).

In der oberen Extremität der Maus ist die Apoptose im E11.5 zuerst in dem oberflächigen Mesoderm am anterioren Ende der Extremitätenknospe angrenzend an den Körper zu beobachten. Diesen Bereich bezeichnet man auch als anteriore nekrotische Zone (ANZ). Zu einem späteren Zeitpunkt, E12.5, bilden sich zwei weitere Zentren, in denen ein massiver programmierter Zelltod erfolgt. Man spricht von der posterioren nekrotischen Zone (PNZ) und dem opaque patch (OP). Die PNZ befindet sich am posterioren Ende zwischen Extremitätenknospe und Körper, während der OP zwischen zwei knorpeligen Kondensationen zu erkennen ist und für die Separation von Radius und Ulna in der oberen bzw. von Fibula und Tibia in der unteren Extremität

sorgt. Zu einem späteren Zeitpunkt E13.5 ist die Apoptose im interdigitalen Mesenchym zu erkennen, was die Separation der einzelnen Finger bzw. der Zehen bewirkt. Die Apoptose in diesem Bereich ist in Spezies mit Schwimmhäuten reduziert, wie man es beispielsweise bei Enten beobachten kann (Abb. 6) (Hurle & Colvee, 1982).

Inzwischen ist bekannt, dass vor allem die Expression von Bmp im interdigitalen Mesenchym die Apoptose einleitet und somit für die Separierung der Finger verantwortlich ist (S. F. Gilbert, 2003).



**Abb. 6 Regulation der interdigitalen Apoptose durch Bmp**

Gezeigt sind Autopodien der unteren Extremitäten vom Hühnchen (**oben**) und der Ente (**unten**) in vergleichbaren Entwicklungsstadien. Die In situ Hybridisierungen zeigen, dass Bmp sowohl im interdigitalen Mesenchym des Hühnchens als auch der Ente exprimiert sind. Doch nur im interdigitalen Mesenchym der Ente ist eine Coexpression von Gremlin zu sehen. Gremlin ist ein BMP-Antagonist und verhindert das Absterben der Zellen zwischen den Zehen, was zu der Bildung von Schwimmhäuten führt. Abbildung aus (S. F. Gilbert, 2003)

Der Prozess der Apoptose ist auch bei der Entwicklung von Gelenken von Bedeutung. Humerus, Radius und Ulna entwickeln sich aus einer Knorpelkondensation. Diese vergrößert sich zunächst, verzweigt dann und segmentiert schließlich, um drei einzelne Knochen zu bilden, die über Gelenke miteinander in Verbindung stehen (Storm & Kingsley, 1996). Die molekulare Abfolge während der Gelenkentwicklung ist bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Man vermutet, dass vornehmlich Bmp und Wnt hier eine wichtige Rolle spielen (Archer, Douthwaite, & Francis-West, 2003; Hartmann & Tabin, 2001).

### 1.3 Die Bone Morphogenetic Proteins (BMP)

Die Bone Morphogenetic Proteins, übersetzt „die dem Knochen gestaltgebenden Proteine“, wurden von Urist in den 60er Jahren erstmals beschrieben (Urist, 1965). Urist beobachtete, dass demineralisierter Knochen in der Lage war, ektopisch Knochenneubildung zu induzieren. Diese osteoinduktiven Faktoren nannte er BMP, welche erst über 20 Jahre später als distinkte Proteine isoliert und identifiziert wurden (Wozney et al., 1988).

BMP haben während der Extremitätenentwicklung wichtige Funktionen; sie steuern die Fingerbildung, Chondrogenese, Spezifizierung der Fingeridentitäten, Apoptose der Fingerzwischenräume und die Gelenkbildung (vergleiche Kapitel: 1.2 Die Entwicklung der Extremitäten).

Später wurden andere Funktionen von BMP während der Embryonalentwicklung entdeckt, die Bezeichnung dieser Proteinfamilie blieb jedoch aus historischen Gründen erhalten. Aufgrund der Ähnlichkeit zu dem früher entdeckten *Transforming Growth Factor beta* (TGF $\beta$ ) wurden sie der TGF $\beta$ -Superfamilie zugeordnet. Anhand von Sequenzhomologien unterteilt man diese in vier Subgruppen: die TGF $\beta$ , die Activine/Inhibine, die BMP/GDF (*Growth and Differentiation Factors*) und eine heterogene Gruppe, zu der unter anderen MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) und NODAL zu zählen sind. In Tabelle 1 sind die derzeit bekannten Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie mit ihren Funktionen dargestellt.

**Tab. 1 Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie mit ihren alternativen Bezeichnungen, einer kurzen Beschreibung ihrer Funktion und der Referenznummer in der humangenetischen Datenbank des NIH (Online Mendelian Inheritance in Men, OMIM).**

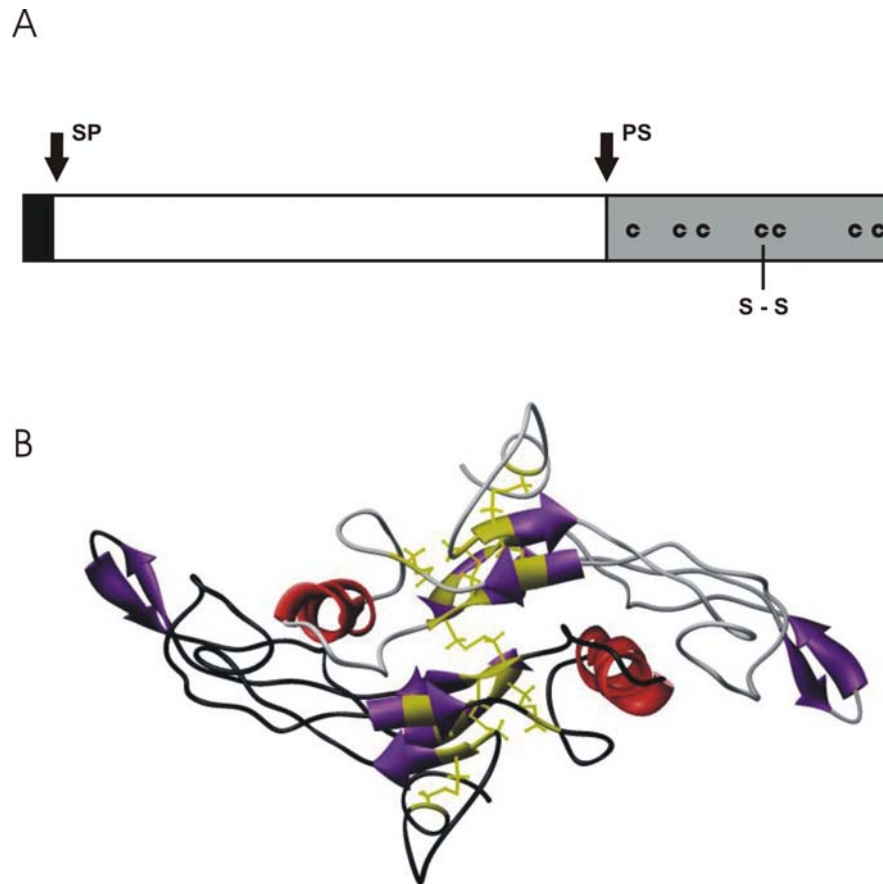
TGF $\beta$	Synonyme	Funktion	OMIM
<b>BMP1</b>	Procollagen C Proteinase TOLLOID	Metalloprotease, embryonale Musterbildung	*112264
<b>BMP2</b>	BMP2a	knocheninduktiv, Osteoblastendifferenzierung, Apoptose, Extremitätenentwicklung	*112261
<b>BMP3</b>		inhibiert die Osteogenese	*112263
<b>BMP4</b>	BMP2b	knocheninduktiv, Mesoderm-Induktion, Zahn-, Augen-, Lungenentwicklung, Extremitätenbildung, Frakturheilung	*112262
<b>BMP5</b>		Chondrogenese	*112265
<b>BMP6</b>	VGR1	Osteoblastendifferenzierung, Chondrogenese	*112266
<b>BMP7</b>	OP-1	knocheninduktiv, Nieren- und Augenentwicklung	*112267
<b>BMP8</b>	OP-2	knocheninduktiv	*602284
<b>GDF2</b>	BMP9	Nervensystem	*605120



<b>TGFβ</b>	<b>Synonyme</b>	<b>Funktion</b>	<b>OMIM</b>
<b>BMP10</b>		Herzentwicklung	<u>*608748</u>
<b>GDF10</b>	BMP3B	exprimiert in Lunge, Gehirn, Skelettmuskulatur, Pankreas und Testis	<u>*601361</u>
<b>GDF11</b>	BMP11	Musterbildung des Axialskeletts	<u>*603936</u>
<b>GDF7</b>	BMP12; CDMP3	Nervensystem	<u>*604651</u>
<b>GDF6</b>	BMP13; CDMP2	induziert Sehnen und Ligament-ähnliche Gewebe	<u>*601147</u>
<b>GDF5</b>	BMP14; CDMP1	Chondrogenese, stimuliert Sehnenheilung und Knochenbildung	<u>*601146</u>
<b>BMP15</b>	GDF9B	modifiziert die FSH-Aktivität	<u>*300247</u>
<b>GDF15</b>	PLAB; PDF; MIC1	reduziert das Wachstum von Granulozyten und Makrophagen	<u>*605312</u>
<b>GDF8</b>	Myostatin	Myostatin Überexpression bewirkt in der Maus Muskel- und Fettschwund	<u>+601788</u>
<b>LEFTY A</b>	TGFB4; EBAF	Links-rechts-Asymmetrie	<u>+601877</u>
<b>LEFTY B</b>	LEFTB		<u>*603037</u>
<b>INHIBINA</b>	Inh A	Inhibin A kommt in zwei Zuständen vor (Inhibin β a und Inhibin β b), die beide die hypophysäre FSH Sekretion inhibieren.	<u>*147380</u>
<b>INHIBINBA</b>	Inhibin-B-1; FSH-Releasing Protein; Erythroid Differentiation Factor; EDF		<u>*147290</u>
<b>INHIBINBB</b>	Inhibin B-2; Activin B-B Activin B	Dimere von 2 β-Untereinheiten stimulieren FSH Sekretion und werden Activin genannt.	<u>*147390</u>
<b>INHIBINBC</b>		Funktion unbekannt	<u>*601233</u>
<b>MIF</b>	MMIF - Macrophage Migration Inhibitory Factor.	MIF wird von Makrophagen und T-Zellen nach Stimulation mit Glukokortikoiden sezerniert	<u>*153620</u>
<b>TGFB1</b>	TGFβ; TGFB; TGF-beta	Proliferation und Differenzierung.	<u>*190180</u>
<b>TGFB2</b>	TGF-beta 2	supprimiert Interleukin-2-abhängiges T-Zellwachstum.	<u>*190220</u>
<b>TGFB3</b>	TGF-beta 3	Gaumen- und Lungenentwicklung, Epithelial-Mesenchym Interaktionen	<u>*190230</u>
<b>GDF1</b>		Links-rechts-Asymmetrie	<u>*602880</u>
<b>GDF3</b>	ECAT9; VGR2	BMP-Inhibitor	<u>*606522</u>
<b>GDF9</b>		Follikulogenese	<u>*601918</u>
<b>NODAL</b>		Herzentwicklung, Links-rechts-Asymmetrie	<u>*601265</u>

Obwohl die Mitglieder der TGFβ-Superfamilie ganz unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung haben, liegt ihnen ein gemeinsamer Mechanismus der Signaltransduktion zu Grunde (Lutz & Knaus, 2002).

Alle Mitglieder der TGFβ-Superfamilie werden als Präproteine von ca. 400-500 Aminosäuren Länge synthetisiert. Das Präprotein enthält N-terminal ein Signalpeptid, eine Prodomäne und den reifen C-terminalen Bereich (Abb. 7).



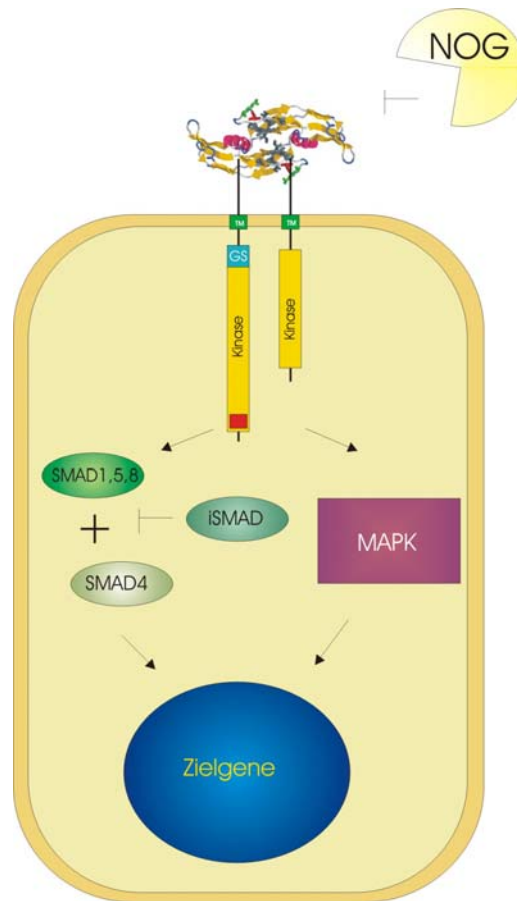
**Abb. 7 Schematische Darstellung der Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie am Beispiel des namengebenden Signalmoleküls TGF $\beta$  (Prototyp)**

**A** Monomeres Präproprotein, *schwarz*: Signalpeptid, *weiß*: Prodomäne, *SP*: Spaltstelle der Signalpeptidase *PS*: Proprotein-Prozessierungsstelle, *grau*: reife Domäne mit 7 konservierten Cysteinen, von denen das vierte eine Disulfidbrücke im Homodimer ausbildet (S-S). **B** Schematische Darstellung der 3D-Struktur des maturated TGF $\beta$ s (Dimer); PDB: 1KLC, (Hinck et al., 1996), rot:  $\alpha$ -Helices, lila:  $\beta$ -Faltblätter, gelb: konservierte Cysteine.

Alle Mitglieder dieser Familie werden sezerniert, doch bevor sie an Rezeptoren binden können, müssen sie durch Proprotein-Konvertasen an spezifische R-X-X-R Erkennungssequenzen prozessiert werden. Erst die Abspaltung der Prodomäne von der reifen Domäne versetzt die Proteine in einen aktiven Zustand. Diese „Reifung“ stellt einen für die weitere Signalübertragung essentiellen Prozess dar.

Die reife Form des Signalmoleküls ist charakterisiert durch ein stark konserviertes Strukturelement, dem sog. Cysteinknoten (*cysteine knot*), bestehend aus sieben Cysteinen. Während sechs dieser Cysteine intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden, dient das vierte Cystein der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke im Homodimer.

In Säugetieren sind insgesamt sieben verschiedene Typ 1- und fünf verschiedene Typ 2 Rezeptoren bekannt, die für die Signaltransduktion aller Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie verantwortlich sind. Für die Subgruppe der BMP wurden bisher zwei BMP-Rezeptoren vom Typ 1 (BMPR1A und BMPR1B) sowie ein BMP-Rezeptor vom Typ 2 (BMPR2) identifiziert (Nohe, Keating, Knaus, & Petersen, 2004). An der Zelloberfläche bilden die Rezeptoren Komplexe zu aktiven Hetero- bzw. Homodimeren (Gilboa et al., 2000). Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptorkomplex resultiert eine Transphosphorylierung und somit die Aktivierung des Typ 1 Rezeptors durch den



**Abb. 8 BMP-Signaltransduktion**

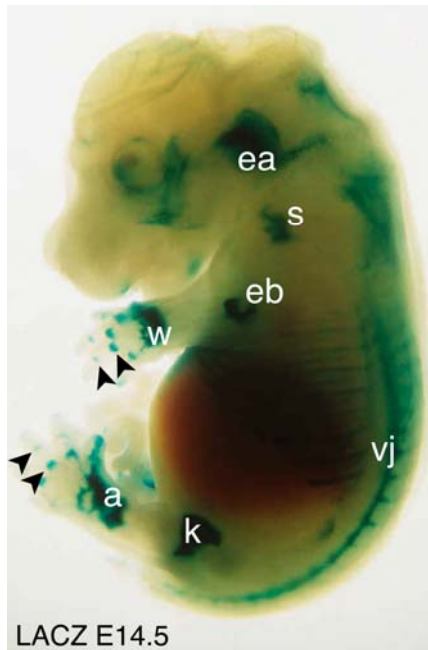
Erläuterung siehe Text

Typ 2 Rezeptor. Die Bindung von BMP an präformierte heteromere Rezeptorkomplexe führt intrazellulär zu einer Aktivierung des SMAD-Signalweges, wohingegen ein Zusammenführen der Rezeptoren durch die Ligandenbindung zu einer Aktivierung des *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) Signalweges führt (Abb. 8) (Hassel et al., 2003; Nohe et al., 2002).

Die Aktivität der BMP kann durch ebenfalls sezernierte Antagonisten wie NOGGIN (NOG), Chordin, Follistatin, Ventroptin, Twisted gastrulation und durch Mitglieder der DAN/Cerberus Familie inhibiert werden. Die Inhibierung erfolgt durch die Bindung der Antagonisten an die BMP, welche dann nicht mehr an ihre Rezeptoren binden können (Wan & Cao, 2005).

## 1.4 Der Growth and Differentiation Factor 5 (GDF5)

GDF5 ist als Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie essentiell für die Entwicklung des appendikulären Skelettes beim Menschen und der Maus. Das menschliche *GDF5* Gen wurde erstmals 1994 kloniert (S. C. Chang et al., 1994; Hotten, Neidhardt, Jacobowsky, & Pohl, 1994). Es liegt auf Chromosom 20q11.2 und setzt sich aus zwei Exonen zusammen.



**Abb. 9 GDF5 Expression**

Cre-Rekombinaseaktivität unter dem GDF5-Promotor ist durch LacZ-Färbung sichtbar im Ohr (ea), in den Gelenken der Schulter (s), des Ellenbogens (eb), der Hand (w), des Knies (k), des Fußes (a), der Wirbel (vj), und der Phalangen (schwarze Pfeile) in einem Mausembryo E14.5 abgewandelt nach (Rountree et al., 2004).

Expressionsstudien in der Maus und dem Huhn haben gezeigt, dass *Gdf5* in den frühen Knorpel-Kondensationszentren und im weiteren Verlauf der Gliedmaßenentwicklung im Gelenkspalt und im Perichondrium exprimiert wird (Luyten, 1997; Storm et al., 1994). Mäuse, welche die Cre-Rekombinase unter dem *Gdf5*-Promotor exprimieren und mit einer Indikatormaus verkreuzt wurden, zeigten Cre-Aktivität in der sich entwickelnden Ohrmuschel, in den Rippen, dem Sternum, im Gesicht und in einigen Regionen des Gehirns und des Rückenmarks (Abb. 9). Nach der Geburt war Cre-Aktivität ebenfalls in den Sehnen und in den Hand- und Fußknöcheln nachweisbar. Im Alter von 5 Wochen wurde die Expression zudem in den Haarfollikeln, im Ohrknorpel, in der Wachstumsfuge und im Gehirn sowie im Rückenmark beobachtet (Rountree et al., 2004).

Mäuse mit homozygoten *Gdf5*-Mutationen (*brachypodism*, *bp*) zeigen verkürzte Extremitäten,

während das Axialskelett nicht betroffen ist. Der Phänotyp kristallisiert sich im Stadium E12.5 heraus, zu einem Zeitpunkt in dem sich normalerweise die ersten Knorpelkondensationen ausprägen. Diese sind in der *bp* Maus reduziert, und die Knorpeldifferenzierung ist verzögert. Die Röhrenknochen der Extremitäten sind kürzer, und die medialen und proximalen Phalangen fusionieren (Storm et al., 1994). Hingegen

führt die Überexpression von Gdf5 in der Maus (Tsumaki et al., 1999) und im Hühnchen (Buxton, Edwards, Archer, & Francis-West, 2001) zu einer verstärkten Knorpelkondensation und sekundär zu einer Verdickung der knorpeligen Anlagen. Diese Studien zeigen, dass Gdf5 die initiale Knorpelbildung reguliert, indem es die Zelladhäsion und Kondensation von mesenchymalen Zellen bewirkt, aus deren nachfolgender Differenzierung die Chondrozyten entstehen. Im weiteren Verlauf kontrolliert Gdf5 im Perichondrium die Proliferation dieser Knorpelzellen und beeinflusst somit das Wachstum und die Form der sich entwickelnden Knochen. Gdf5 wird zudem in den zukünftigen Gelenkzonen exprimiert, wo es entscheidenden Einfluss auf die Bildung der Gelenke hat (Francis-West et al., 1999; Storm & Kingsley, 1999). Da die Gdf5-Expression schon detektiert werden kann, bevor die Spaltregion histologisch nachweisbar ist, stellt Gdf5 einen der am häufigsten genutzten Marker für die frühe Gelenkentwicklung dar (Merino et al., 1999; Storm & Kingsley, 1996).

Die Essentialität von GDF5 für die humane Extremitätenentwicklung wird an den Patienten besonders deutlich, die Funktionsverlust-Mutationen (*loss of function*) in *GDF5* tragen. Heterozygote Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5* führen zu einer Handfehlbildung, der Brachydaktylie Typ C (BDC) (vergl. nachstehendes Kapitel: 1.5 Angeborene Handfehlbildungen) (Polinkovsky et al., 1997). Homozygote *GDF5*-Funktionsverlust-Mutationen führen zu komplexen Skelettveränderungen, die als Gruppe der akromesomelen Chondrodysplasien zusammengefasst werden. Klinisch zählen zu diesen das Grebe Syndrom, das Hunter-Thompson Syndrom und das DuPan Syndrom. Patienten mit Grebe Syndrom zeigen die schwerste Form der Skelettveränderung mit einem hochgradigen Kleinwuchs, extremer Verkürzung der Extremitäten und rudimentären Fingeranlagen (Thomas et al., 1997). Patienten mit Hunter-Thompson Syndrom weisen einen ähnlichen Phänotyp auf, der jedoch insgesamt weniger schwerwiegend erscheint (Thomas et al., 1996). Das DuPan Syndrom bezeichnet den mildesten Typ der akromesomelen Chondrodysplasien, der als klinische Besonderheit eine Fibula-Aplasie beinhaltet, welche zu schweren Gangbehinderungen bei den Patienten führt (Faiyaz-Ul-Haque et al., 2002).

## 1.5 Angeborene Handfehlbildungen

Angeborene Handfehlbildungen sind relativ häufig. Sie treten als Primärfehlbildungen oder als Teil verschiedener Syndrome auf. Die hohe Fehlbildungsrate ist in der Komplexität des Skeletts begründet, welches durch eine Vielzahl von Faktoren und Einzelprozessen bestimmt wird. Bereits kleine Abweichungen während des Prozesses der Musterbildung können die Fehlbildungen hervorrufen. Dies kann sowohl genetisch wie auch durch äußere Einflüsse, beispielsweise durch die Einnahme von Medikamenten während der Schwangerschaft, bedingt sein. Hier ist das Thalomidpräparat Contergan zu nennen, welches in den 1960er Jahren schwangeren Frauen als Schlafmittel und gegen die morgendliche Übelkeit verabreicht wurde und zu schweren Fehlbildungen bis hin zu dem Fehlen von Organen oder Gliedmaßen der Kinder geführt hat (Botting, 2002; Mujagic, Chabner, & Mujagic, 2002).

Die phänotypische Vielfalt an isolierten Handfehlbildungen wird in Gruppen unterteilt. Man unterscheidet Formen der Ektrodaktylie, Polydaktylie, Syndaktylie, Synpolydaktylie, Symphalangismus und Brachydaktylie.

Die Ektrodaktylie beschreibt eine zentrale Spaltbildung von Händen und Füßen, welches in der Regel mit dem Fehlen von einzelnen Strahlen einhergeht.

Das Auftreten von zu vielen Fingern bezeichnet man als Polydaktylie, wobei präaxiale (zusätzliche Fingeranlage auf der Seite des Daumens), mesoaxiale (zusätzliche zentrale Fingeranlage) und postaxiale (zusätzliche Fingeranlage auf der Seite des kleinen Fingers) Polydaktylien unterschieden werden. Diese Störung kann durch Defekte im Hedgehog-Signalweg auftreten.

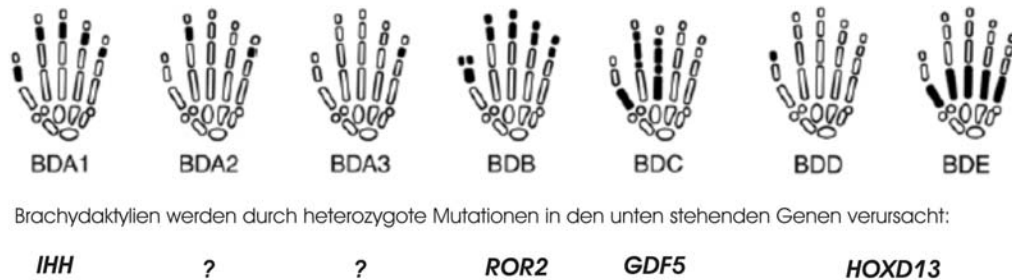
Als Syndaktylien bezeichnet man häutige oder knöcherne Verwachsungen von Fingern oder Zehen.

Tritt eine Polydaktylie in Kombination mit einer Syndaktylie auf, spricht man von einer Synpolydaktylie.

Das Fehlen eines oder mehrerer Gelenke an den Phalangen mit einhergehender Versteifung des Gelenkes bezeichnet man als Symphalangismus. Als Ursache hierfür wurden Mutationen in dem BMP-Antagonisten *NOG* beschrieben (Gong et al., 1999).

Als Brachydaktylie bezeichnet man die Verkürzung der Finger oder Zehen bzw. der Metakarpalia oder Metatarsalia aufgrund einer Fehlentwicklung der Hand- oder

Fußknochen. Das Wort Brachydaktylie leitet sich vom griechischen „brachy“, im deutschen „kurz“, und „dactylos“, der „Finger“, ab. In Abhängigkeit von den betroffenen Fingern unterscheidet man nach Julia Bell 5 Gruppen von Brachydaktylien (A-E), die in Abb. 10 dargestellt sind (Bell, 1951).



**Abb. 10 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Brachydaktylie Typen, klassifiziert nach Bell mit Angabe der bekannten molekulargenetischen Ursache.**

Schwarz markiert sind die für die jeweilige Brachydaktylie betroffenen Handknochen. Abkürzungen: BDA1: Brachydaktylie Typ A1; BDA2: Brachydaktylie Typ A2; BDA3: Brachydaktylie Typ A3; BDB: Brachydaktylie Typ B; BDC: Brachydaktylie Typ C; BDD: Brachydaktylie Typ D; BDE: Brachydaktylie Typ E; *IHH*: Indian Hedgehog; *ROR2*: Receptor Tyrosin like Orphan Receptor 2; *GDF5*: Growth and Differentiation Factor 5; *HOXD13*: Homeobox gene D13. Abbildung abgewandelt nach (Schwabe & Mundlos, 2004).

Bei den Brachydaktylien handelt es sich um Phänotypen, die typischerweise autosomal dominant vererbt werden. Die molekularen Ursachen dieser Fehlbildungen sind für einige Typen bekannt und werden im Folgenden erwähnt.

Die BDA zeichnet sich allgemein durch eine Verkürzung der Mittelphalangen aus. Man unterteilt die BDA in drei Subtypen: BDA1, bei der alle Mesophalangen betroffen sind, BDA2, bei der insbesondere die Mesophalangen II und V hypoplastisch sind und BDA3, bei der ausschließlich die Mesophalanx des fünften Fingers betroffen ist. Die BDA1 wird durch Mutationen im Signalmolekül *IHH* hervorgerufen (Gao & He, 2004). Bei Patienten mit BDB sind vor allem die distalen Phalangen einzelner Finger und Zehen betroffen. Die Finger- und Zehenendglieder können gänzlich fehlen und imitieren einen „Amputationsphänotyp“. Zusätzliche Besonderheiten, wie Daumen- oder Großzehenveränderungen sowie Nagelanomalien treten ebenfalls auf. Die BDB kann durch Mutationen in *ROR2* (*Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan Receptor 2*) hervorgerufen werden (Oldridge et al., 2000; Sammar et al., 2004; Schwabe et al., 2000).

---

Die BDC betrifft insbesondere die Phalangen und Metakarpalia der Finger I, II und III. Der Ringfinger ist in der Regel nicht betroffen und ist somit oft der längste Finger. Mutationen in *GDF5* führen zu BDC (Polinkovsky et al., 1997).

Bei der Brachdaktylie Typ D ist nur die distale Phalanx des Daumens und/oder des großen Zehes verkürzt und breit.

Die Brachydaktylie Typ E kennzeichnet sich durch eine Verkürzung der Metakarpale und Metatarsale.

Punktmutationen in *HOXD13* können in BDD und BDE resultieren (D. Johnson et al., 2003).