

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Mikromass-Kultur zur Analyse von Skelettfehlbildungen

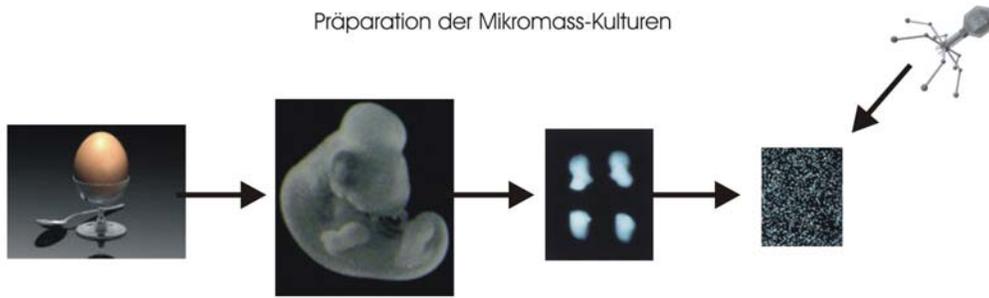
Zur funktionellen Charakterisierung der bei Patienten mit Handfehlbildungen identifizierten und in den nächsten Abschnitten dargestellten Mutationen, wurde das Mikromass-Kultur-System gewählt. Bei dem Mikromass-Kultur-System handelt es sich um ein *in vitro* Modell für die Knorpelzelldifferenzierung (Abb. 11). Extremitätenknospen von Hühnerembryonen im Entwicklungsstadium HH22-24 (homolog zu E11.5-E12.5 in der Maus) werden abgetrennt und anschließend verdaut, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. In hoher Dichte ausgesät durchlaufen die Mikromass-Kulturen die Knorpelzelldifferenzierung. Zunächst formen sich kleine Zellaggregate, die sich vergrößern und nach ungefähr drei Tagen in Kultur als Knorpelkondensationen deutlich sichtbar sind. Mit längerer Kultivierung differenzieren die Knorpelzellen, ähnlich der *in vivo*-Situation, weiter zu prähypertrophen und später zu hypertrophen Chondrozyten, welche unter speziellen Bedingungen sogar kalzifizieren können. Der Differenzierungsstatus der Mikromass-Kulturen lässt sich mit verschiedenen Methoden dokumentieren:

1. Quantitative Analyse der initialen Knorpeldifferenzierung (Matrixproduktion) mittels Alcian Blau-Färbung der Proteoglykane
2. Quantifizierung der späteren Knorpeldifferenzierung durch enzymatische Bestimmung der ALP (Alkalische Phosphatase-Aktivität)
3. Nachweis der terminalen Knorpeldifferenzierung (Mineralisierung) über den Nachweis von Kalzium in der Mikromasskultur mittels Alizarin Rot-Färbung
4. Verfolgung des Differenzierungsverlaufes über die Genexpression mittels Realtime-PCR von spezifischen Markergenen der Knorpel- und Knochenentwicklung (z.B. Collagen -1, -2, und -10, Indian Hedgehog, Sox-9, Bone Sialoprotein-2).

Die Überexpression von Genen in der Mikromass-Kultur ist mit Hilfe eines Hühnerspezifischen Retroviruses (RCAS) mit nahezu 100% Transfektions-Effizienz möglich (Hughes et al., 1987).

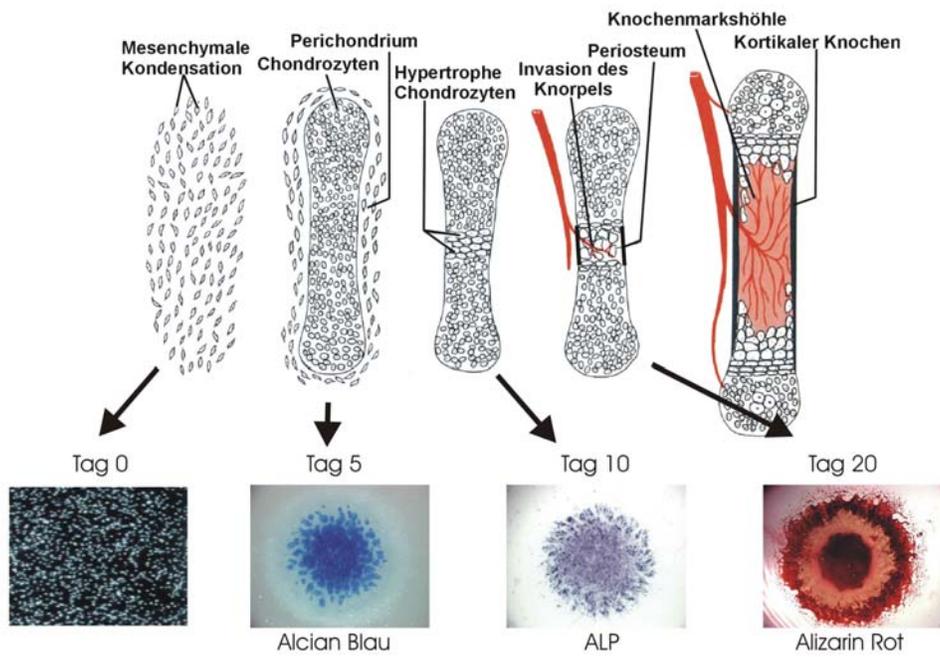
A

Präparation der Mikromass-Kulturen



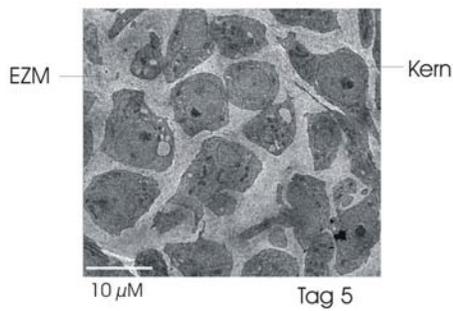
B

Differenzierung der Mikromass-Kulturen



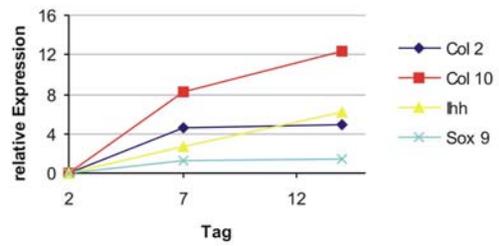
C

Elektronenmikroskopische Aufnahme



D

Expressionsprofil der Mikromass-Kulturen

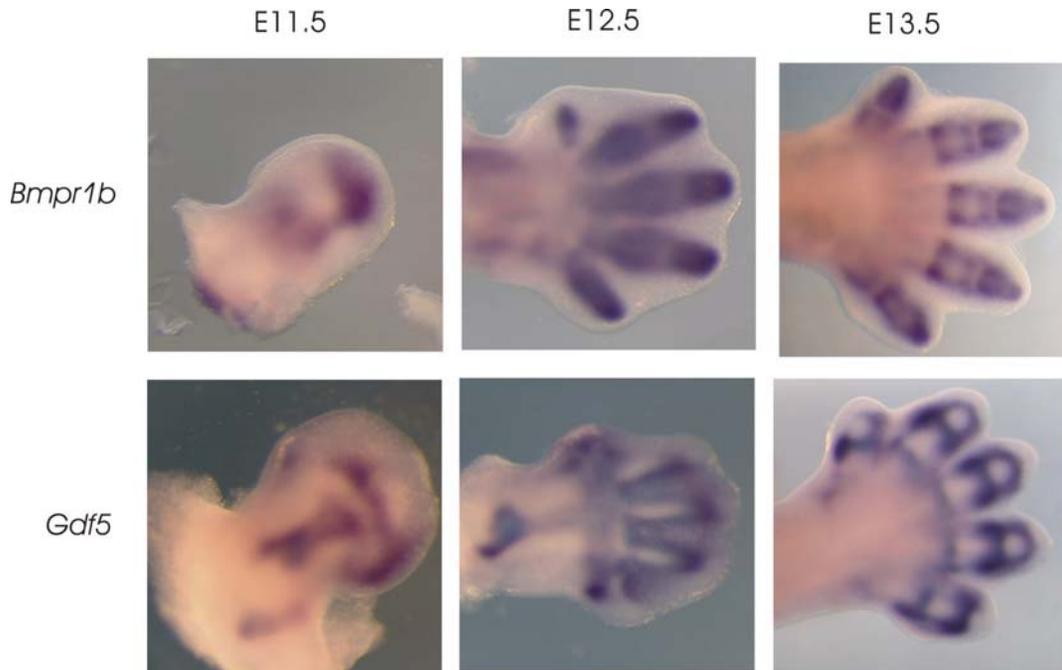


**Abb. 11 Mikromass-Kultur – ein in vitro Modell für die Knorpelzeldifferenzierung**

**A** Schematische Darstellung der Präparation von Mikromass-Kulturen. Befruchtete Hühnereier werden 4,5 Tage bei 37,5° C inkubiert und die Embryonen aus dem Ei präpariert. Die Extremitätenknospen werden abgetrennt und die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst. Diese Zellen können mit einem hühnerspezifischen Retrovirus (RCAS) infiziert werden, der das genetische Material zur Überexpression des gewünschten Proteins in die Zellen transportiert. **B** Differenzierung von Mikromass-Kulturen. Die Zellen werden in hoher Dichte ausgesät. Diese Kulturbedingungen imitieren die natürlichen mesenchymalen Verdichtungen, in denen später die Knorpeldifferenzierung folgt. Nach wenigen Tagen in Kultur sind erste Knorpelkondensationen erkennbar (Alcian Blau-Färbung). Danach differenzieren einzelne Zellen zu prähypertrophen Chondrozyten, welche sich durch eine Alkalische Phosphatase Aktivität (ALP) auszeichnen. Hält man die Mikromass-Kulturen für mehr als 3 Wochen in einem Mineralisierungsmedium in Kultur, können sogar terminale Knorpeldifferenzierungen oder auch ausgeprägte Kalzifizierungen des Knorpels mittels Alizarin Red nachgewiesen werden. **C** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Mikromass-Kultur nach 5 Tagen. Die von den Chondrozyten produzierte extrazelluläre Matrix (EZM) separiert die einzelnen Zellen deutlich voneinander. **D** Expressionsanalyse von Genen der Knorpeldifferenzierung (Col2: Kollagen Typ 2a; Col10: Kollagen Typ 10; Ihh: Indian hedgehog; Sox9: SRY-related HMG-BOX Gene 9) in der Mikromass-Kultur mittels Realtime-PCR. Der für die initiale Knorpeldifferenzierung notwendige Transkriptionsfaktor Sox9 ist während einer 14-tägigen Kultivierung der Mikromass-Kulturen stetig exprimiert. Typische Differenzierungsmarker wie Col2 (Marker für die frühe Differenzierung), Ihh (Marker für prähypertrophe Chondrozyten) und Col10 (Marker für die späte Differenzierung) werden im Laufe der Kultivierung induziert, so dass ihre Transkriptspiegel während der Kultivierung ansteigen.

Die Mikromass-Kulturen bestehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen, die die Knorpelanlagen der Extremitäten bilden. Sie reflektieren das Stadium der initialen Knorpelkondensation während der Extremitätenentwicklung in vitro und eignen sich somit ideal zur Analyse von Mutationen, die zu Handfehlbildungen führen. Hier kann der Pathogenesemechanismus von humanen Mutationen funktionell analysiert werden, da die biochemischen Prozesse, die in vitro zur Knorpelkondensation führen und im Patienten gestört verlaufen, übertragbar sind. Da in der Mikromass-Kultur sowohl für Gdf5 als auch für Bmpr1b ein stimulierender Einfluss auf die Chondrogenese nachgewiesen wurde, erscheint das Mikromass-Kultursystem gut geeignet, um Mutationen in diesen beiden Genen in vitro zu analysieren. Eine Überexpression von Gdf5 bzw. konstitutiv aktiven Bmpr1b im Mikromass-Kultur-System führt zu einem drastischen Anstieg der Knorpelmatrixproduktion (Francis-West et al., 1999; Zou et al., 1997).

Gdf5 und Bmpr1b werden während der Extremitätenentwicklung gemeinsam exprimiert (Abb. 12). Die Expressionsmuster sind bei Mensch, Maus und Hühnchen sehr ähnlich.



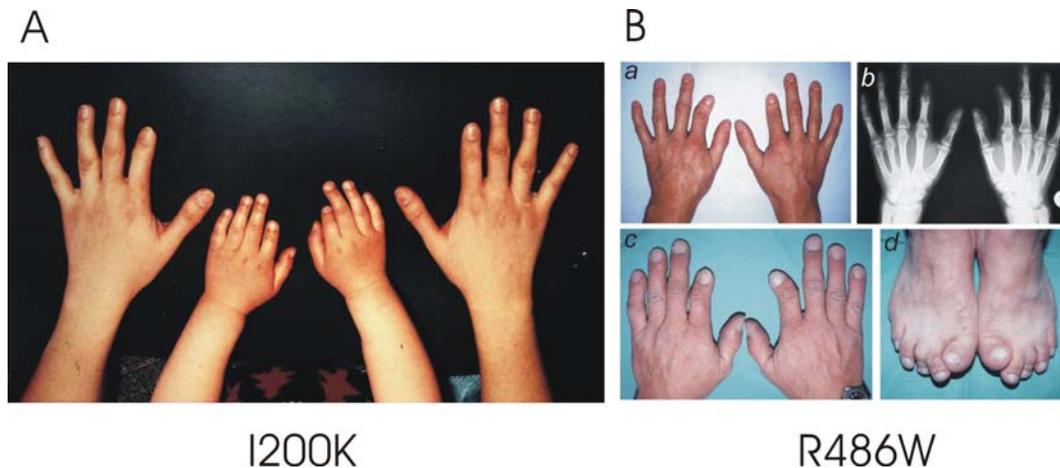
**Abb. 12 Expression von Gdf5 und Bmpr1b während der Extremitätenentwicklung**

Embryonalstadien E11.5 – E13.5 der Maus wurden mit antisense-RNA-Sonden hybridisiert und über den Farbniederschlag von BM Purple detektiert (violett). Man erkennt ein teilweise gut überlappendes Expressionsmuster des sezernierten Wachstumsfaktors Gdf5 und seines Rezeptors Bmpr1b.

Diese Kriterien haben uns bewogen, das Mikromass-Kultur-System für die funktionelle Analyse der zu untersuchenden Punktmutationen in *BMPRI1B* und *GDF5*, zu etablieren und zu optimieren. Ein heterozygoter Funktionsverlust in *GDF5* führt zu einer BDC und dürfte sich deshalb im Mikromass-Kultur-System in erster Linie durch das Fehlen der Knorpelmatrix-Induktion bemerkbar machen. Die Auswirkung von aktivierenden Mutationen von *GDF5* oder *BMPRI1B* dürften sich hingegen durch eine verstärkte Knorpelmatrix-Bildung äußern.

## 4.2 Punktmutationen in *BMPR1B* verursachen BDA2

Die Brachydaktylie Typ A2 (BDA2) wurde erstmals 1919 von Mohr und Wried beschrieben. BDA2 wird autosomal dominant vererbt und ist hauptsächlich durch eine Verkürzung der Mittelphalanx des 2. Fingers charakterisiert. In variabler Ausprägung ist die Mittelphalanx hypoplastisch oder fehlend. Zudem findet sich häufig eine Klinodaktylie des 5. Fingers, ebenfalls durch eine deltaförmige Mittelphalanx bedingt. Am Fuß kann eine ähnliche Symptomatik auftreten; ansonsten sind die betroffenen Patienten hinsichtlich des Skelettsystems unauffällig (Abb. 13).



**Abb. 13 Klinische Ausprägung der Brachydaktylie Typ A2 (BDA2)**

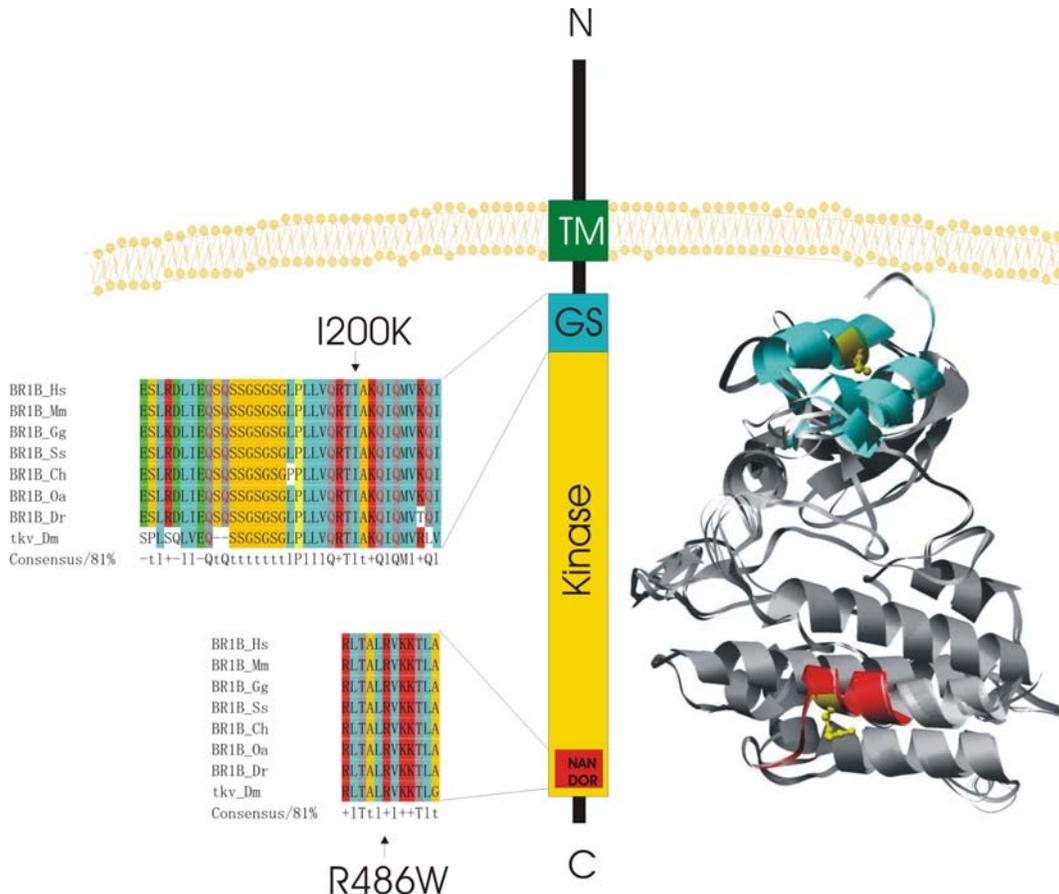
Die BDA2 ist charakterisiert durch einen verkürzten Zeigefinger, der auch medial gekrümmt sein kann; zudem tritt variabel auch eine Klinodaktylie des fünften Fingers auf. **A** Fotografie der Hände von Patienten mit dem Aminosäureaustausch I200K in *BMPR1B* **B** Fotografien und Röntgenbild der Hände und Füße von Patienten mit dem Aminosäureaustausch R486W in *BMPR1B* (**a** und **c**). Das Röntgenbild (**b**) zeigt eine hypoplastische Mittelphalanx des rechten Zeigefingers und eine fehlende Mittelphalanx des Zeigefingers der linken Hand. Die Abbildung eines betroffenen Fußes (**d**) illustriert einen kurzen, breiten großen Zeh mit Deviation und einen medial gekrümmten zweiten Zeh.

Durch eine Positionsklonierung konnte die genetische Ursache für die autosomal dominant vererbte BDA2 auf Chromosom 4q21-q25 kartiert werden. In diesem Bereich befindet sich u. a. das Gen *BMPR1B*, ein Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor der TGF $\beta$ -Superfamilie. Durch Studien in der Maus wurde bereits die Bedeutung von *BMPR1B* während der Extremitätenentwicklung gezeigt. Durch die molekulargenetische Analyse konnten in zwei unabhängigen Familien mit BDA2 heterozygote Punktmutationen im kodierenden Bereich des *BMPR1B* Gens diagnostiziert werden (durchgeführt von Dr. K. Lehmann an der Charité in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Nürnberg

am MDC, Berlin). In Familie 1 wurde im Exon 6 ein Austausch von T zu A an Position 599 identifiziert, was zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Lysin führt (I200K). In Familie 2 wurde im Exon 10 ein Austausch von C zu T an Position 1456 identifiziert, welcher einen Austausch von Arginin zu Tryptophan an Position 486 (R486W) bedingt (Abb. 13).

#### 4.2.1 Die *BMPRI1B* Mutationen befinden sich in konservierten Bereichen

Die Rezeptortyrosinkinase, *BMPRI1B*, besteht aus einem extrazellulären Bereich, welcher für die Ligandenbindung essentiell ist, einer Transmembran-Domäne und einem intrazellulären Bereich bestehend aus der GS-Box (Glycin-Serin-reiche Region), einer Serin-Threonin-Kinase-Domäne und der NANDOR-Box (*Non-Activating-Non-Down-Regulating Box*) (Abb. 14).



**Abb. 14 Schematische Darstellung der BMPR1B Struktur und relative Positionen der Mutationen**

**links** Sequenz-Alignment von Bereichen des BMPR1B, in denen Mutationen von Patienten mit BDA2 identifiziert wurden. Die Aminosäuresequenzen von BMPR1B aus verschiedenen Spezies zeigen eine hohe Konservierung der Sequenzbereiche, in denen die mutierten Aminosäuren liegen. **mittig** Schematische Struktur von BMPR1B mit den funktionell definierten Domänen und Zuordnung der Position der Mutationen. I200K liegt im Bereich der GS-Box, welche für die Transphosphorylierung des Rezeptors durch BMPR2 essentiell ist. R486W liegt innerhalb der sog. NANDOR-Box, welche für die Endozytose des Rezeptors von Bedeutung zu sein scheint. **rechts** Vorhergesagte 3D-Struktur des intrazellulären Bereichs von BMPR1B. Die GS-Box ist blau und die NANDOR-Box ist rot dargestellt, die Mutationen in diesen konservierten Domänen sind in gelb hervorgehoben.

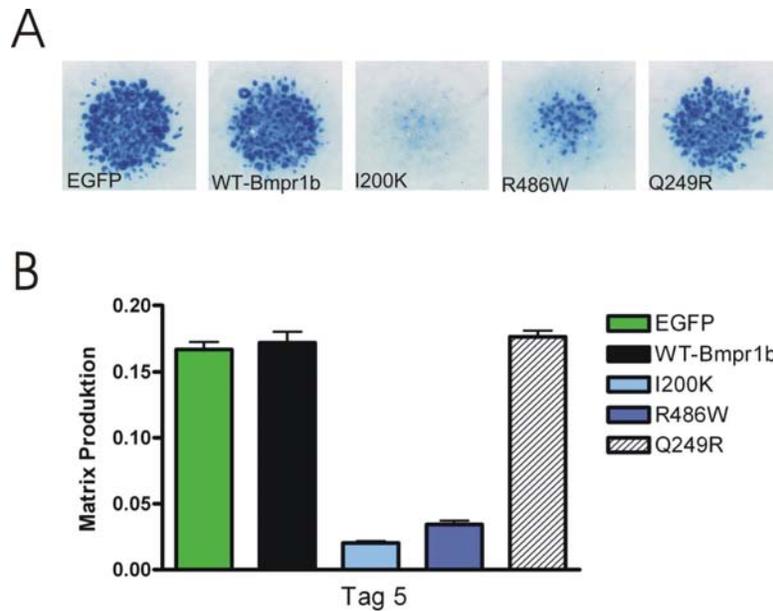
Die Mutation I200K befindet sich innerhalb der GS-BOX. Die GS-Box besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices die eine 11 Aminosäure große Schleife flankieren, die aufgrund ihrer vielen Glycin- und Serinreste für die GS-Box namensgebend ist (Huse et al. 1999). Die Transphosphorylierung durch den Typ II Rezeptor von mindestens drei dieser Serin- aber auch Threoninreste hat eine Konformationsänderung zur Folge, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Aktivierung der Kinase des Typ I Rezeptors führt (Wieser et al. 1995).

Die Mutation R486W befindet sich innerhalb der NANDOR-Box. NANDOR beschreibt den im äquivalenten Tg $\beta$ r1 beobachteten Funktionsverlust in der Aktivierbarkeit des Rezeptors, sowie den Einfluss auf die Regulation des Rezeptors an der Zelloberfläche, welche durch die Endozytose vermittelt über die NANDOR-Box reguliert wird (Garamszegi et al., 2001).

## 4.2.2 *Bmpr1b* Mutationen sind dominant negativ

### 4.2.2.1 *Bmpr1b* Mutationen inhibieren die Chondrogenese in vitro

Um den Einfluss der Aminosäureaustausche auf die Chondrogenese zu analysieren, wurden die Mutationen zunächst mittels In vitro Mutagenese in die kodierende Sequenz des Hühnchen-*Bmpr1b* eingebracht. Nach erfolgter Verifikation der Sequenz wurde der kodierende Bereich der mutierten *Bmpr1b* Varianten in das RCAS-Plasmid inseriert und der Virus produziert. Mikromass-Kulturen wurden mit den Viren infiziert, wodurch eine Überexpression in den Zellen erfolgte (Abb. 15). Als Kontrollen wurden RCAS-Viren mit der unveränderten *Bmpr1b* Sequenz (WT *Bmpr1b*) und EGFP-exprimierende Viren (EGFP) genutzt.



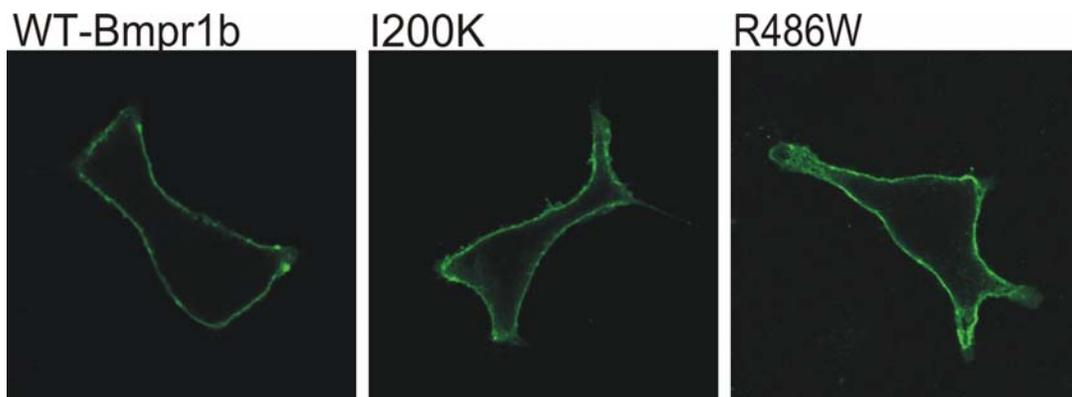
**Abb. 15 Retroviral-vermittelte Überexpression von *Bmpr1b*-Mutationen und Kontrollproteinen in der Mikromass-Kultur**

**A** Alcian Blau-gefärbte Mikromass-Kulturen, 5 Tage nach der Infektion mit einer Negativ-Kontrolle [enhanced GFP (EGFP)] RCAS, einer Positiv-Kontrolle (WT *Bmpr1b*), oder den infizierten *Bmpr1b* Mutanten. Im Vergleich zu den Kulturen, die EGFP bzw. WT *Bmpr1b* exprimieren, inhibieren die *Bmpr1b* Mutanten I200K und R486W die frühe Chondrogenese. **B** Die Quantifizierung der Alcian Blau Färbung der extrazellulären Matrix des Knorpels zeigt die Produktion von Proteoglykan-reicher Matrix 5 Tage nach Infektion. Beide Mutanten inhibieren die Knorpelbildung deutlich. Hingegen zeigt die Q249R Mutation, die in Merino Schafen (Booroola strain) beschrieben ist und keinen Skelettphänotyp verursacht, keinen Einfluss auf die Chondrogenese.

Die Überexpression von WT *Bmpr1b* in den Mikromass-Kulturen zeigte keinen Unterschied während der frühen Knorpelzellendifferenzierung im Vergleich zu nicht infizierten bzw. EGFP-überexprimierenden Kontrollen, was mit einer Alcian Blau Färbung nachgewiesen wurde. Hingegen zeigte die Überexpression der Mutanten I200K und R486W eine sehr starke Inhibierung der Knorpelmatrix-Produktion, wobei die Mutante I200K einen stärkeren Phänotyp verursacht als die R486W Mutante (Abb. 15). Parallel wurde zum Vergleich die bereits publizierte Mutation Q249R getestet (Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001). Diese Mutation wurde in australischen Schafen (Booroola strain) identifiziert, welche sich durch eine außergewöhnlich hohe Ovulationsrate mit signifikant gehäuften Mehrlingsschwangerschaften auszeichnen. Ein skelettaler Defekt wurde in dieser Schafsrace nicht festgestellt. Die Überexpression dieser Mutante zeigte entsprechend auch in den Mikromass-Kulturen keinen Einfluss auf die Chondrogenese.

#### 4.2.2.2 Bmpr1b Mutanten sind membranständig

Mutationen in konservierten Bereichen von Rezeptoren können neben einem Funktionsverlust von der Kinaseaktivität auch zu Veränderungen der Stabilität oder intrazellulären Lokalisation des Proteins führen. Da die R486R Mutante die NANDOR-Box verändert, könnte diese Mutante einen Einfluss auf die Endozytose haben. Um zu untersuchen, ob die mutierten Rezeptoren an die Zelloberfläche gelangen, wurden HA-getaggte Varianten des unveränderten *Bmpr1b* und der Mutanten (WT *Bmpr1b*, I200K bzw. R486W) kloniert und in COS-7 Zellen überexprimiert. Anschließend wurde die Lokalisation der exprimierten Proteine mittels Immunzytologie durch Antikörpervermittelte Detektion des HA-Tags analysiert (Abb. 16).



**Abb. 16 Membranständige Lokalisation von Bmpr1b in COS-7 Zellen**

Überexpression von HA-getaggten murinen *Bmpr1b*-Konstrukten in COS-7 Zellen. **links:** WT *Bmpr1b*, **mittig:** I200K *Bmpr1b* und **rechts:** R486W *Bmpr1b*. Die Immunfärbung gegen das HA-Tag zeigt, dass sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

Sowohl der WT *Bmpr1b*, als auch die mutierten Rezeptoren sind an der Zellmembran lokalisiert.

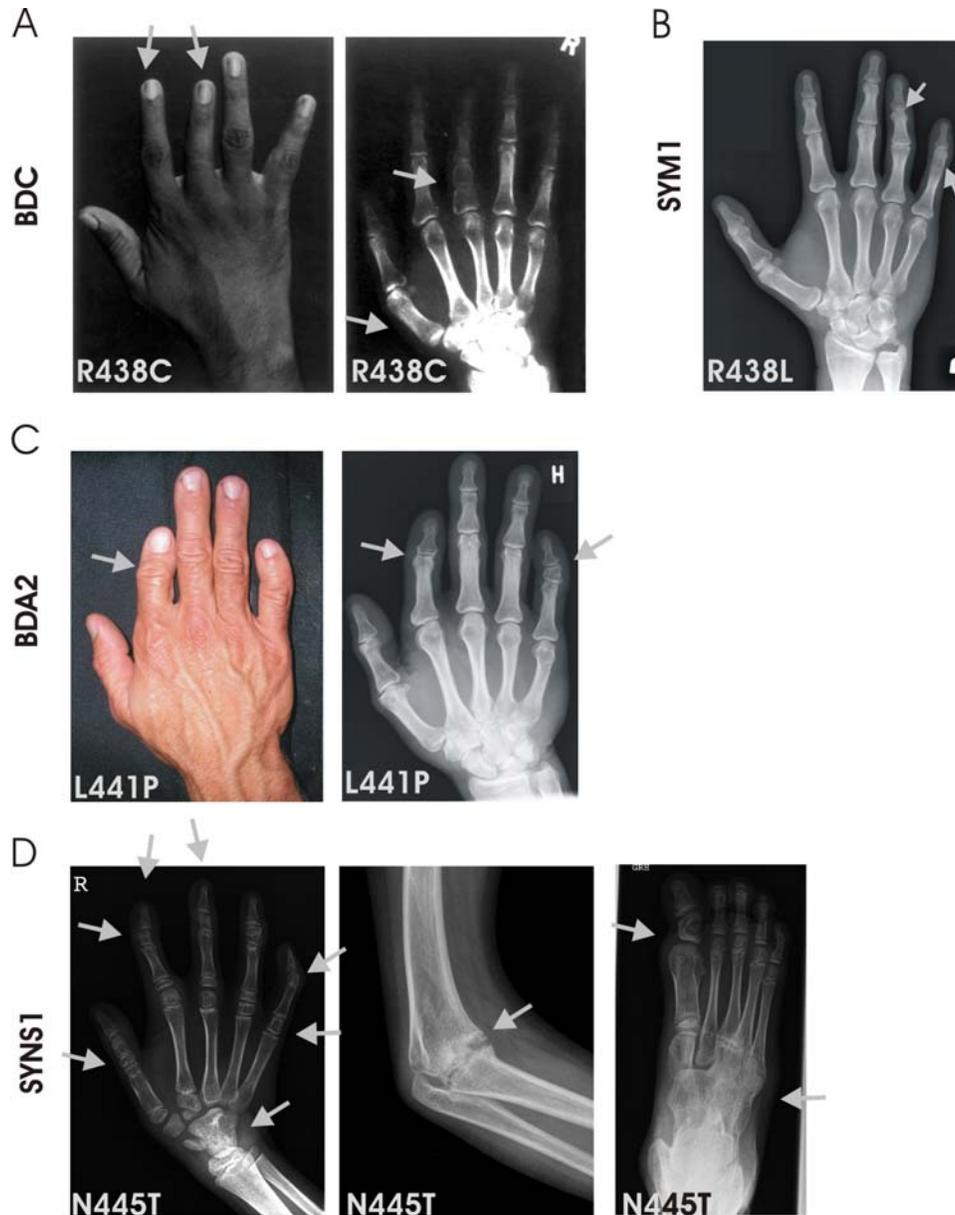
### 4.3 *GDF5* Mutationen verursachen BDA2, BDC, SYM1 oder SYNS1

Heterozygote Funktionsverlust-Mutationen von *GDF5* führen beim Menschen zu Brachydaktylie Typ C (BDC), wie die Mutation R438C (Abb. 17A) (Everman et al., 2002). Wir haben neuartige heterozygote missense-Mutationen in *GDF5* (R438L, L441P und N445T) identifiziert, die zu außergewöhnlichen Handfehlbildungen führen, welche bisher nicht mit Mutationen in *GDF5* assoziiert waren (Abb. 17).

Durch Dr. D. Krakow vom Cedar-Sinai Medical Center in Los Angeles wurde die Punktmutation R438L in *GDF5* bei einem Patienten mit proximalem Symphalangismus (SYM1) identifiziert. Aufgrund des vollständigen Verwachsens der Mittelphalanx mit der proximalen Phalanx des Fingers V und der teilweisen Synostierung am Finger IV, besteht eine Bewegungseinschränkung der Finger IV und V. Eine Mutationen in *NOG*, die bereits bei Patienten mit SYM1 beschrieben wurden (Gong et al., 1999), konnten als Ursache bei diesem Patienten ausgeschlossen werden (Abb. 17B) (Seemann et al., 2005).

In Zusammenarbeit mit Dr. K. Kjaer vom Department of Medical Genetics in Kopenhagen konnten wir in einer Familie mit dominant vererbter BDA2 die Punktmutation L441P in *GDF5* identifizieren (Kjaer et al., 2005; Seemann et al., 2005). Typischerweise sind Mutationen im *BMPRI1B* für die beobachtete BDA2 ursächlich, wie von uns bereits beschrieben (Abb. 17C) (Lehmann et al., 2003). Diese Ursache konnte aber anhand der Sequenzierung von *BMPRI1B* bei den betroffenen Familienmitgliedern ausgeschlossen werden. Der beobachtete Phänotyp ist charakterisiert durch einen verkürzten Zeigefinger, bedingt durch eine Hypo- oder Aplasie der zweiten Phalanx des Fingers II und mit variabler Penetranz eine Verkürzung oder Klinodaktylie des Fingers V.

In Zusammenarbeit mit Dr. A. Janecke vom Institut für Medizinische Genetik der Universität Innsbruck wurde ein Patient mit einem multiplen Synostose Syndrom (SYNS1) untersucht. Die Sequenzierung ergab keinen Hinweis auf *NOG*-Mutationen, die bei diesem klinischen Bild bereits beschrieben wurden. Hingegen konnten wir Mutationen in *GDF5* feststellen. Hierbei handelte es sich um die Punktmutation N445T in *GDF5* (Abb. 17D).



**Abb. 17 Phänotypische Ausprägungen von Extremitätenfehlbildungen von Patienten mit heterozygoten Mutationen in *GDF5* (R438C, R438L, L441P und N445T)**

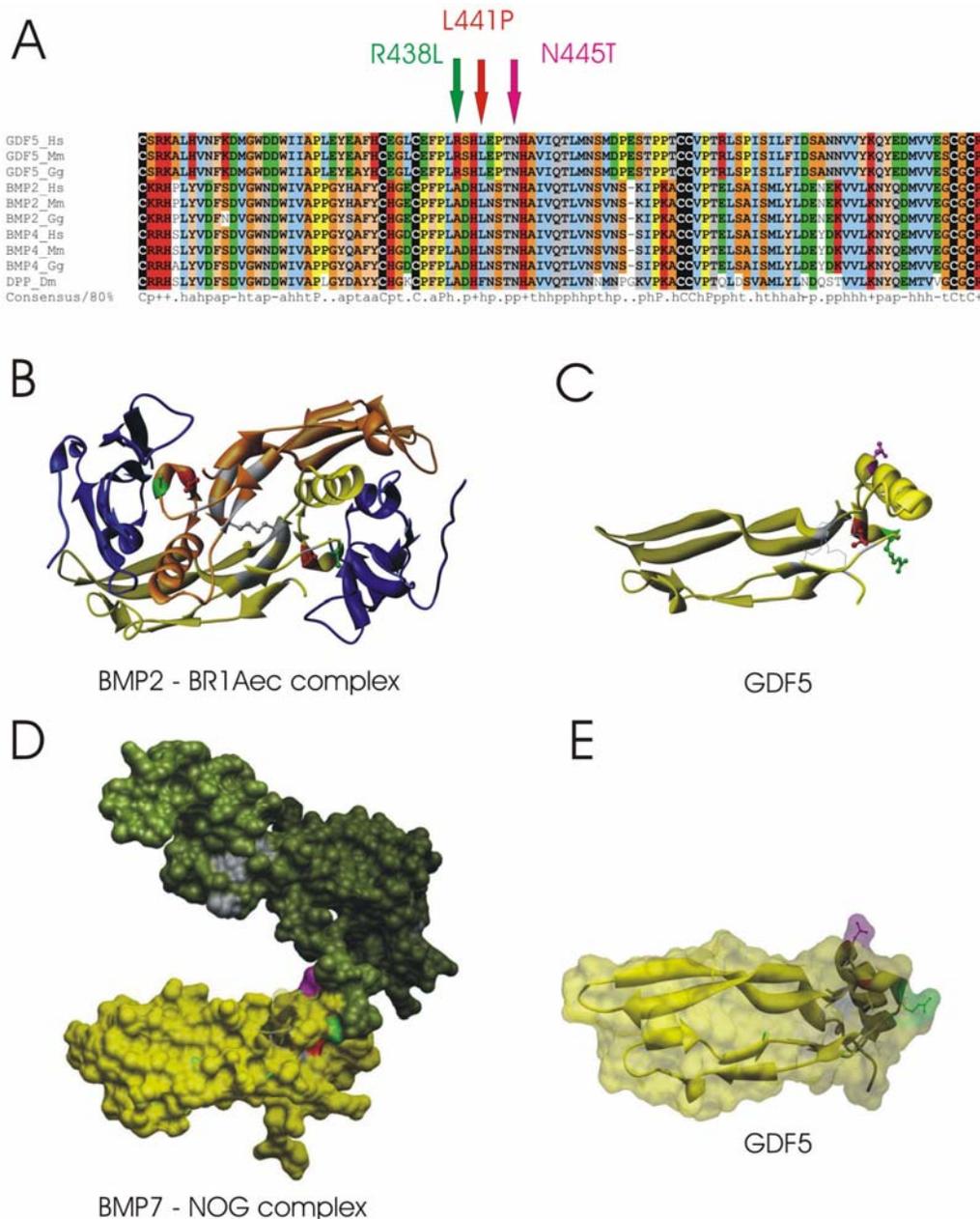
**A** Klinische Ausprägungen der Brachydaktylie Typ C (BDC), wie sie in Patienten mit einer R438C-Mutation in *GDF5* vorkommen können. Bilder entnommen aus (Everman et al., 2002). **links** Hand eines Erwachsenen mit BDC – die Finger II und III sind disproportional verkürzt. **rechts** Röntgenbild desselben Patienten – sichtbar sind deutliche Veränderungen mit Hypoplasie der Phalangen des Fingers II und III mit Hypersegmentierung der proximalen Phalanx an Finger III sowie eine Verkürzung von Metakarpale I. **B** Röntgenbild eines Patienten mit proximalem Symphalangismus (SYM1), hervorgerufen durch eine R438L-Mutation in *GDF5*. Die R438L Mutation bewirkt eine Gelenkfusion des proximalen Interphalangealgelenkes des Fingers V und ein abnormales Interphalangealgelenk des Fingers IV. **C** Die Mutation L441P in *GDF5* ist assoziiert mit einer Brachydaktylie Typ A2 (BDA2), charakterisiert durch eine Verkürzung des Fingers II durch ein fehlendes Mittelglied und einer Klinodaktylie des Fingers V. **D** Klinische und radiographische Ausprägung eines multiplen Synostose Syndromes (SYNS1), hervorgerufen durch eine Mutation N445T in *GDF5*. Sichtbar sind multiple Gelenkfusionen der Hand- und Fußwurzelknochen, sowie zwischen Radius und Humerus und in den Phalangen von Fingern und Zehen.

#### 4.3.1 *GDF5* Mutationen in konservierten Bereichen der Signaldomäne

Um die evolutionäre Konservierung von *GDF5* zu analysieren und um den mutierten Aminosäuren spezifische Funktionen zuordnen zu können, ist mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Eike Staub ein Sequenz-Alignment des hochkonservierten Cystein-reichen Bereiches von *GDF5* und BMP aus unterschiedlichen Spezies erstellt worden. Eine Darstellung der 3D-Strukturmodelle der betroffenen Bereiche von *GDF5* im Vergleich mit der analogen Sequenz aus BMP2 von verschiedenen Spezies zeigt, dass sich die Mutationen R438L, L441P und N445T in konservierten Bereichen des *GDF5* befinden (Abb. 18). Ein Vergleich des *GDF5*-Strukturmodells mit der Struktur von BMP2 im Komplex mit den Ektodomänen von BMPR1A und BMP7 im Komplex mit NOG zeigt die exponierte Position der mutierten Aminosäuren und weist auf ihre potentielle Bedeutung für die Protein-Protein Wechselwirkungen hin.

Alle mutierten Aminosäuren (R438L, L441P und N441T) sind innerhalb von *GDF5* Proteinen verschiedener Spezies konserviert. L441 und N445 sind darüber hinaus auch innerhalb verschiedener BMP konserviert. Hingegen erscheint R438 *GDF5*-spezifisch und ist durch ein Alanin in BMP und dem *Drosophila*-BMP-Homolog DPP ersetzt (Abb. 18A).

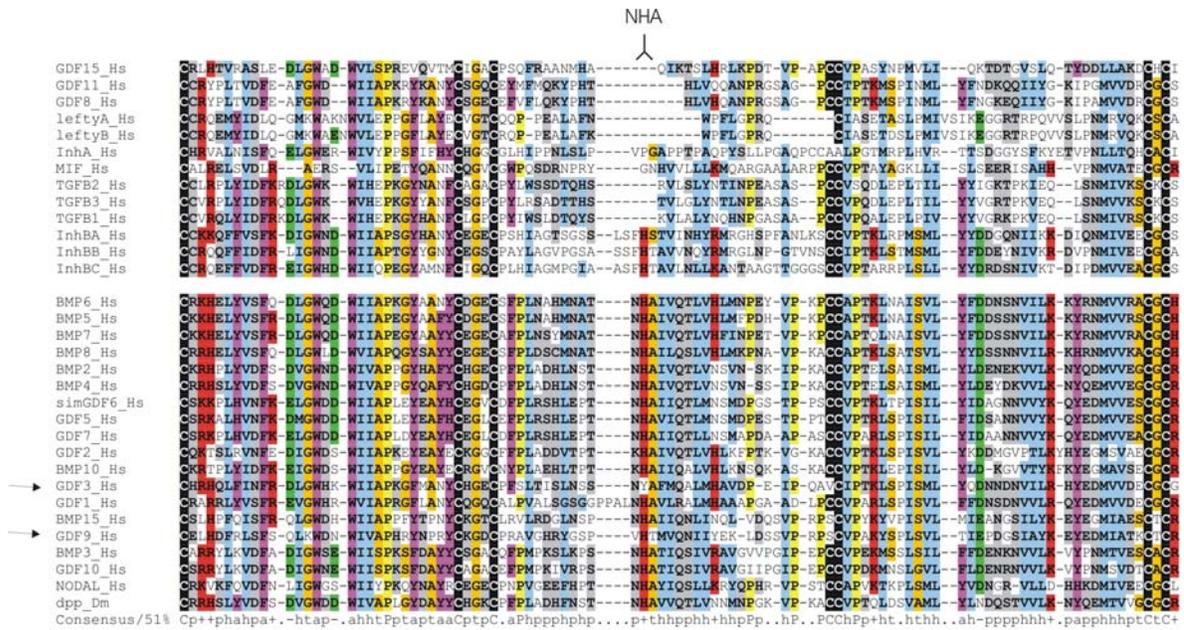
Ein 3D-Modell von *GDF5* zeigt die räumliche Position der mutierten Aminosäuren (Abb. 18C und E). Die Darstellung von BMP-Strukturen im Komplex mit Interaktionspartnern (BMP2 mit BMPR1A und BMP7 mit NOG) und die Darstellung der äquivalenten Aminosäuren, die in *GDF5* mutiert sind, gibt in Analogie Aufschluss über die potentiell funktionellen Bereiche von *GDF5*. Am Modell von BMP2 mit den BMPR1A-Ektodomänen lässt sich erkennen, dass die Aminosäuren R438 und L441 in der Rezeptor-Interaktionstasche von *GDF5* liegen. Das Modell von BMP7 im Komplex mit NOG zeigt auf, dass die Aminosäuren R438 und N445 Kontakt mit dem Antagonisten NOG haben.



**Abb. 18 Sequenz-Alignment und 3D-Modelle von GDF5 und anderen Mitgliedern der TGF $\beta$ -Superfamilie im Komplex mit Interaktionspartnern**

**A** Primärstruktur-Alignment von GDF5, BMP2 und BMP4 von unterschiedlichen Spezies mit dem Drosophila-BMP-Homolog Decapentaplegig (DPP). Die Positionen der Punktmutationen in GDF5 (R438L, L441P und N445T) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Aminosäuren L441 und N445 sind in den verschiedenen BMP konserviert, hingegen ist R438 spezifisch für die GDF5 Unterfamilie. **B** 3D-Rückgrat-Modell eines BMP2 Dimers (dargestellt in gelb und gold) verbunden durch eine Disulfidbrücke und assoziiert an zwei Ektodomänen von BMPR1A (BR1Aec); PDB: 1ES7, (Kirsch, Sebald, & Dreyer, 2000). Die Aminosäuren, die in GDF5 mutiert sind, erscheinen in grün (R438), rot (L441). Die Mutationen R438L und L441P, befinden sich direkt in der Rezeptor-Interaktions-Domäne. **C** 3D-Rückgrat-Modell eines GDF5 Monomers; PDB: 2BHK, (Schreuder, Liesum, Pohl, Kruse, & Koyama, 2005). Die mutierten Aminosäuren sind in grün (R438), rot (L441) bzw. magenta (N445) dargestellt. **D** 3D Oberflächen-Modell von BMP7 (gelb) mit dem BMP-Antagonisten NOG (grün); PDB: 1M4U, (Groppe et al., 2002). Die Aminosäuren, die in GDF5 mutiert sind, erscheinen in grün (R438), rot (L441) und magenta (N445). Die Mutationen R438L und N445T befinden sich in der NOG-Interaktions-Domäne. **E** 3D Oberflächen-Strukturmodell eines GDF5 Monomers (PDB 2BHK). Die mutierten Aminosäuren in grün (R438), rot (L441) bzw. magenta (N445) hervorgehoben.

Ein partielles Sequenz-Alignment der TGF $\beta$ -Superfamilie macht deutlich, dass N445 zusammen mit zwei weiteren Aminosäuren HA in etwa der Hälfte aller Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie vorkommt, bei wenigen Mitgliedern ist dieses Motiv verändert, bei den restlichen fehlt es ganz (Abb. 19). Da N445 mit NOG eine Interaktion eingeht (vergl. Abb. 18D), könnte das Fehlen dieser drei Aminosäuren darauf hindeuten, dass diese BMP nicht mit NOG interagieren.



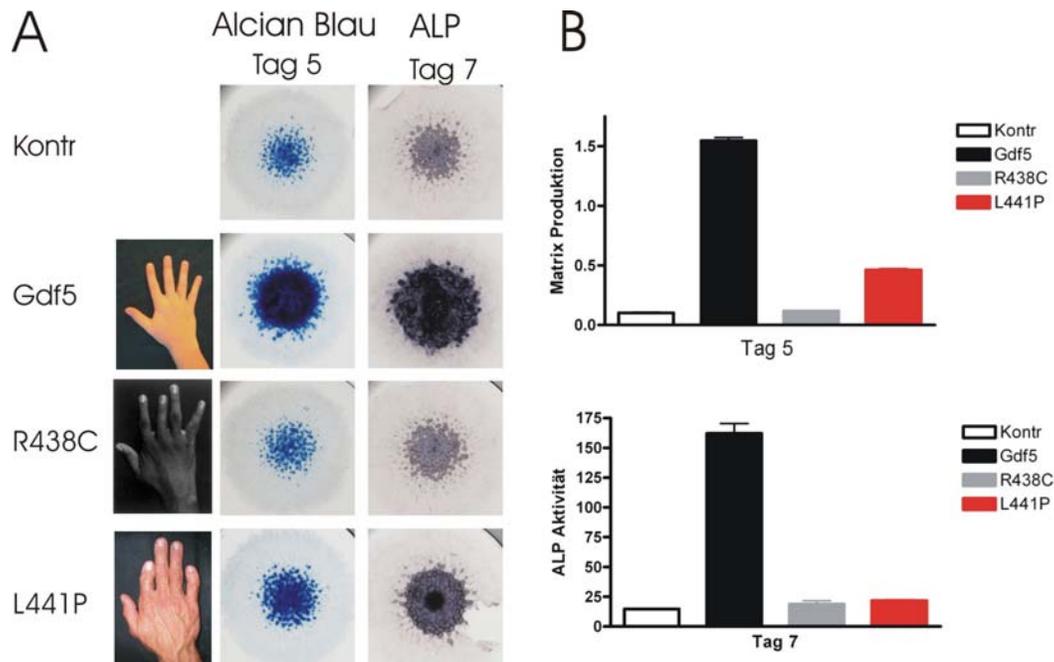
**Abb. 19 Sequenz-Alignment des hochkonservierten Bereiches der Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie**

Primärstruktur-Alignment von Mitgliedern der humanen TGF $\beta$ -Superfamilie mit dem Drosophila-BMP-Homolog Decapentaplegic (DPP). Die Position der Punktmutation N445T in GDF5 ist gekennzeichnet. Beachtenswert ist die Konservierung der Aminosäurefolge NHA in einer Untergruppe der TGF $\beta$ -Superfamilie, während diese Sequenz in den anderen ganz fehlt. Da N445 mit NOG eine Interaktion eingeht (vergl. Abb. 17D), könnte das Fehlen dieser drei Aminosäuren darauf hindeuten, dass diese BMP nicht mit NOG interagieren.

### 4.3.2 *Gdf5* Mutationen zeigen veränderte biologische Aktivitäten

#### 4.3.2.1 Einfluss der *Gdf5* Mutanten auf die Chondrogenese

Um die physiologischen Konsequenzen der GDF5 Mutationen funktionell zu charakterisieren, wurden Mikromass-Kulturen mit WT *Gdf5* oder den Mutanten infiziert und der Einfluss auf die Chondrogenese analysiert (Abb. 20 und Abb. 21).

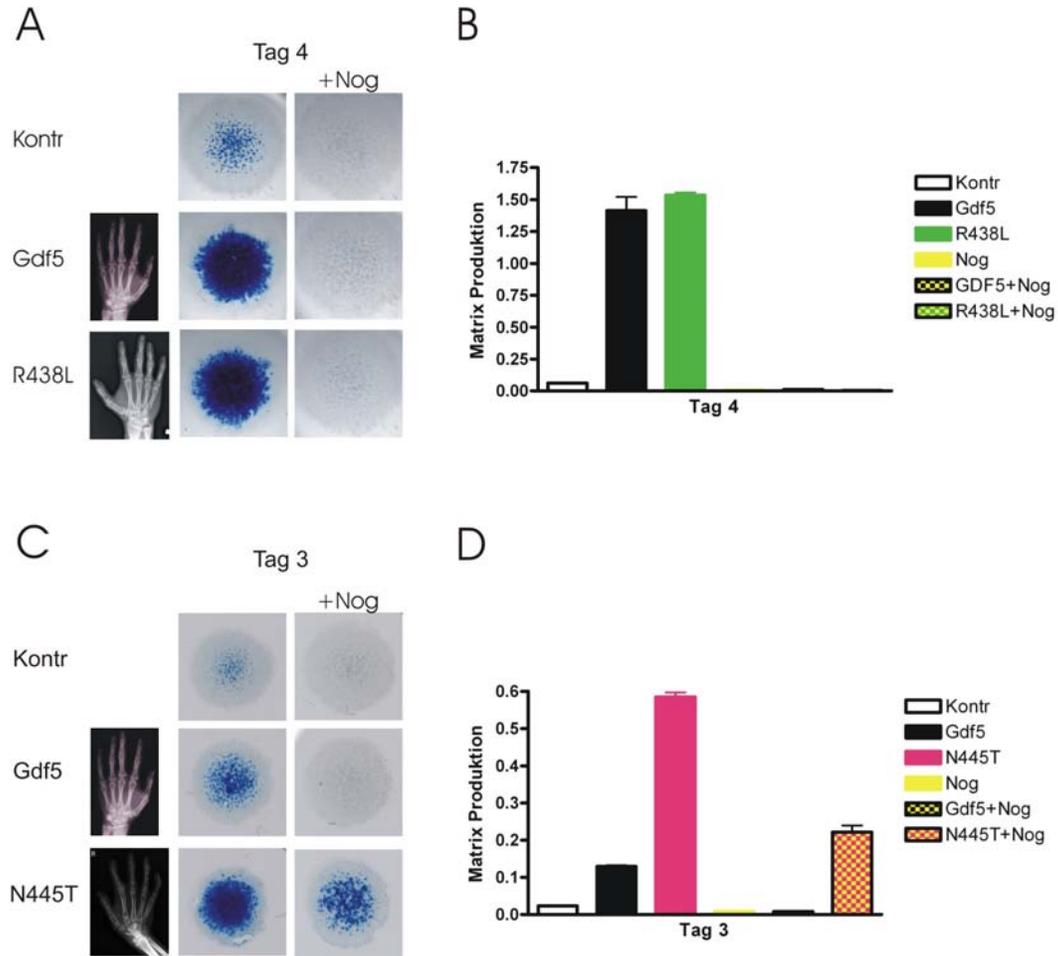


**Abb. 20 Retroviral-vermittelte Überexpression der GDF5-Mutanten R438C und L441P in der Mikromass-Kultur**

**A** Alcian Blau-gefärbte Mikromass-Kulturen fünf Tage nach Infektion mit chGdf5, oder den induzierten *Gdf5* Mutanten bzw. ALP Färbung sieben Tage nach der Infektion. **B oben** Die Quantifikation der Alcian Blau Färbung der extrazellulären Matrix nach fünf Tagen zeigt die Produktion von proteoglykanreicher Matrix des Knorpels. **unten** Quantifikation der Alkalischen Phosphatase Aktivität nach sieben Tagen in Kultur. Während die R438C keine Aktivität mehr zeigt, hat die L441P-Mutante eine reduzierte Aktivität in der Mikromass-Kultur im Vergleich zu WT *Gdf5*.

Wie erwartet, führt die Infektion von Mikromass-Kulturen mit WT *Gdf5* zu einer massiven Induktion von Knorpel, was sich einerseits in der starken Alcian Blau Färbung und andererseits an der erhöhten ALP Aktivität zeigt. Im Gegensatz dazu zeigt die Überexpression der R438C-Mutante keine Steigerung der Knorpelmatrix-Produktion oder ALP-Aktivität. Wie der BDC-Phänotyp schon erwarten ließ, handelt es sich hierbei um einen Funktionsverlust. Hingegen besitzt die BDA2-Mutante L441P noch eine

Restaktivität, was sich durch die Steigerung der Knorpelmatrix, nicht jedoch in der Induktion der ALP-Aktivität bemerkbar macht (Abb. 20B unten).



**Abb. 21 Retroviral-vermittelte Überexpression der Gdf5-Mutanten R438L und N445T in der Mikromass-Kultur**

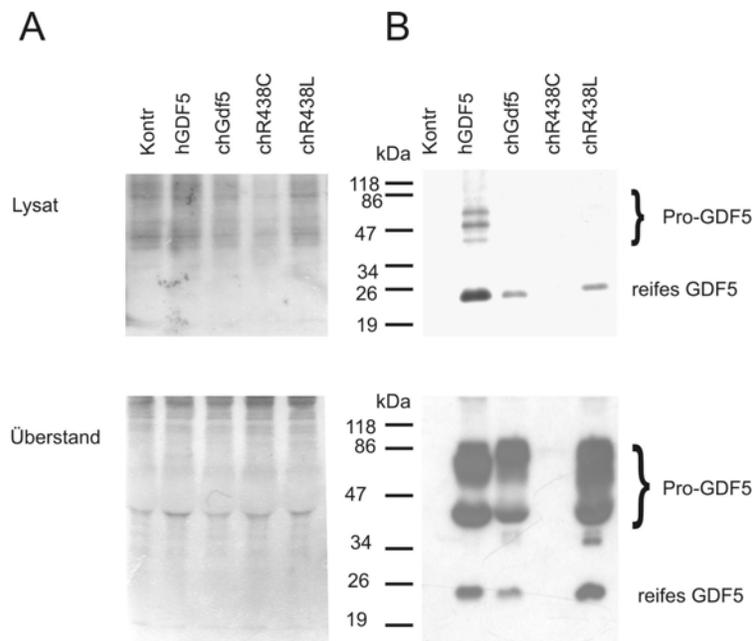
**A** Alcian Blau-gefärbte Mikromass-Kulturen vier Tage nach Infektion mit chGdf5 oder R438L, jeweils alleine bzw. nach Co-Infektion mit dem BMP-Antagonisten Nog. **B** Quantifizierung der Alcian Blau Färbung der extrazellulären Matrix nach vier Tagen zeigt die Produktion von proteoglykanreicher Matrix des Knorpels. **C** Alcian Blau-gefärbte Mikromass-Kulturen drei Tage nach Infektion mit chGdf5 oder N445T, jeweils alleine bzw. nach Co-Infektion mit dem BMP-Antagonisten Nog. **D** Quantifizierung der Alcian Blau Färbung der extrazellulären Matrix zeigt nach drei Tagen die Produktion von proteoglykanreicher Matrix des Knorpels. Die Aktivität von N445T kann nicht durch eine Co-Infektion von Nog inhibiert werden, wie es bei der Aktivität von WT Gdf5 der Fall ist.

Die Überexpression der R438L Mutante zeigte eine ähnlich starke Induktion der Knorpelmatrix und der ALP Aktivität wie WT Gdf5, während die N445T Mutante eine deutlich stärkere Aktivität aufzeigte. Hier verknorpeln die Kulturen so stark, dass sie sich am vierten Tag bereits ablösen. Da beide Aminosäurenpositionen im BMP7-NOG-

Modell mit NOG interagieren, wurden Co-Infektionen der Mutanten mit Nog in der Mikromass-Kultur durchgeführt. Einzeln exprimiert inhibiert die Überexpression von Nog die Knorpelmatrixproduktion in der Mikromass-Kultur vollständig. Bei einer Co-Expression von Nog und WT Gdf5 ist der Effekt von Nog dominant gegenüber WT Gdf5. Auch die R438L Mutante lässt sich durch Nog vollständig hemmen, während die N445T Mutante gegen Nog resistent zu sein scheint.

#### 4.3.2.2 In vitro Synthese und Sezernierung der Gdf5 Mutanten

Für die Mutation R438C wurde bereits eine Fehlfaltung des Proteins beschrieben (Everman et al., 2002). Da die Mutante R438L den Aminosäureaustausch an der gleichen Stelle aufweist, wurde überprüft, ob sich diese Mutante korrekt falten kann. Dazu wurden WT Gdf5 und die Mutanten R438C und R438L in DF-1 Zellen überexprimiert und das Protein sowohl in den Zelllysaten als auch im Medienüberstand mittels Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 22).



**Abb. 22 Analyse der Sezernierung von WT GDF5 und mutiertem GDF5**

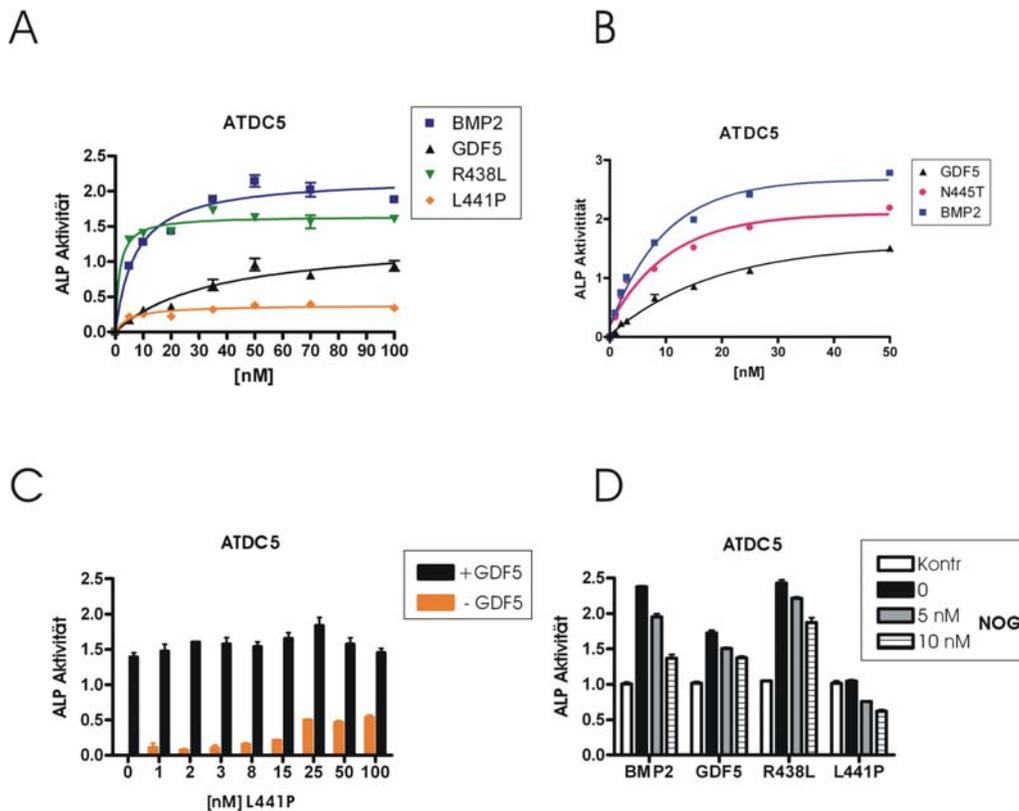
DF-1 Zellen wurden mit WT GDF5 (human und chicken), sowie den GDF5-Mutanten R438C und R438L retroviral infiziert; als Negativkontrolle dienten EGFP-infizierte Zellen. **A** Ponceau Rot Färbung der Western Blot Membranen zeigt eine gleichmäßige Proteinbeladung. **B** Anti-GDF5 Western Blot der Zelllysate (oben) oder Überstände (unten) der infizierten DF-1 Zellen. Im Zelllysate lässt sich die Expression von WT GDF5 und der R438L-Mutante nachweisen, nicht jedoch von der R438C-Mutante. Die Analyse der Medienüberstände zeigt, dass sowohl WT GDF5 als auch die R438L-Mutante effizient sezerniert werden. Im Gegensatz dazu lässt sich kein biologisch aktives GDF5-Dimer der R438C Mutante nachweisen.

---

Wie bereits beschrieben, lässt sich die R438C Mutante nicht mit einem Antikörper gegen biologisch aktives dimeres GDF5 nachweisen (Everman et al., 2002), während sich die Mutante R438L sowohl im Zelllysate als auch im Kulturüberstand nachweisen lässt. Dies macht deutlich, dass es sich im Falle der R438L-Mutante um einen anderen Pathogenese-Mechanismus handeln muss, als bei der R438C-Mutante, obwohl die gleiche Stelle im GDF5 betroffen ist. Das Ergebnis deutet daraufhin, dass entweder die R438C Mutante nicht gebildet wurde, weil sie einer kurzen biologischen Halbwertszeit unterliegt, oder der Antikörper die antigene Determinante in dieser Mutante nicht erkennt.

#### 4.3.2.3 Dosis-abhängige Aktivität der GDF5 Mutanten auf ATDC5 Zellen

Um die Mutanten weiter zu charakterisieren, wurden alle funktionellen Mutanten (R438L, L441P und N445T) von Biopharm rekombinant produziert. Mit diesen rekombinanten Proteinen wurde die chondrogene Zelllinie ATDC5, die ein etabliertes Gdf5-responsives System darstellt (Nakamura *et al.*, 1999), stimuliert und die induzierte ALP-Aktivität bestimmt (Abb. 23).



**Abb. 23 Charakterisierung der ALP-Induktion der GDF5-Mutanten in der chondrogenen Zelllinie ATDC5**

Die ALP-Aktivität wurde nach einer dreitägigen Stimulation von ATDC5-Zellen mit rekombinanten Proteinen bestimmt. **A** und **B** Rekombinantes BMP2, GDF5, R438L und N445T zeigen eine charakteristische Dosis-abhängige Induktion der ALP-Aktivität in ATDC5-Zellen. Die Mutanten R438L und N445T zeigen eine stärkere ALP-Induktion im Vergleich zu WT GDF5, wohingegen die L441P-Mutante nur eine geringe Restaktivität besitzt. **C** Um den Einfluss der L441P Mutante auf WT GDF5 zu analysieren, wurden ATDC5 Zellen mit L441P bzw. mit L441P und WT GDF5 co-stimuliert. Dabei wurden weder stimulierende noch inhibierende Effekte der L441P-Mutante auf WT GDF5 beobachtet. **D** Um zu testen, ob sich die GDF5 Mutanten durch die Zugabe von rekombinatem NOG in ihrer Wirkung neutralisieren lassen, wurden ATDC5 Zellen zunächst mit BMP2, GDF5, R438L und L441P stimuliert und die Abnahme der ALP Aktivität nach Zugabe von ansteigenden NOG-Konzentrationen gemessen. GDF5, R438L und L441P zeigten eine ähnliche Inhibition durch NOG.

Die Stimulation von ATDC5 Zellen mit WT GDF5 führt zu einer Dosis-abhängigen Induktion der ALP Aktivität. Die gleichen BMP2 Konzentrationen zeigen in dieser Zelllinie einen deutlich stärkeren Effekt (Abb. 23A). Während die Mutanten R438L und N445T jeweils die ALP Aktivität stärker induzierten als WT GDF5, zeigte die L441P Mutante so gut wie keine Aktivität in diesem System (Abb. 23A und B).

Um zu testen, ob die L441P Mutante einen Einfluss auf die Signalwirkung von WT GDF5 hat, wurden ATDC5 Zellen mit 10 nM WT GDF5 und ansteigenden Konzentrationen L441P stimuliert (Abb. 23C). Es zeigt sich weder eine aktivierende noch eine inhibierende Wirkung von L441P auf WT GDF5.

Die Induzierung der ALP Aktivität in ATDC5 Zellen durch BMP2 kann durch die Zugabe von rekombinantem NOG neutralisiert werden (Abb. 23D). Auch die Aktivität von WT GDF5 und der R438L Mutante konnte durch die Zugabe von NOG supprimiert werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die R438L Mutante noch an NOG binden kann. Generell fällt jedoch auf, dass sich WT GDF5 weniger effizient inhibieren lässt als BMP2.

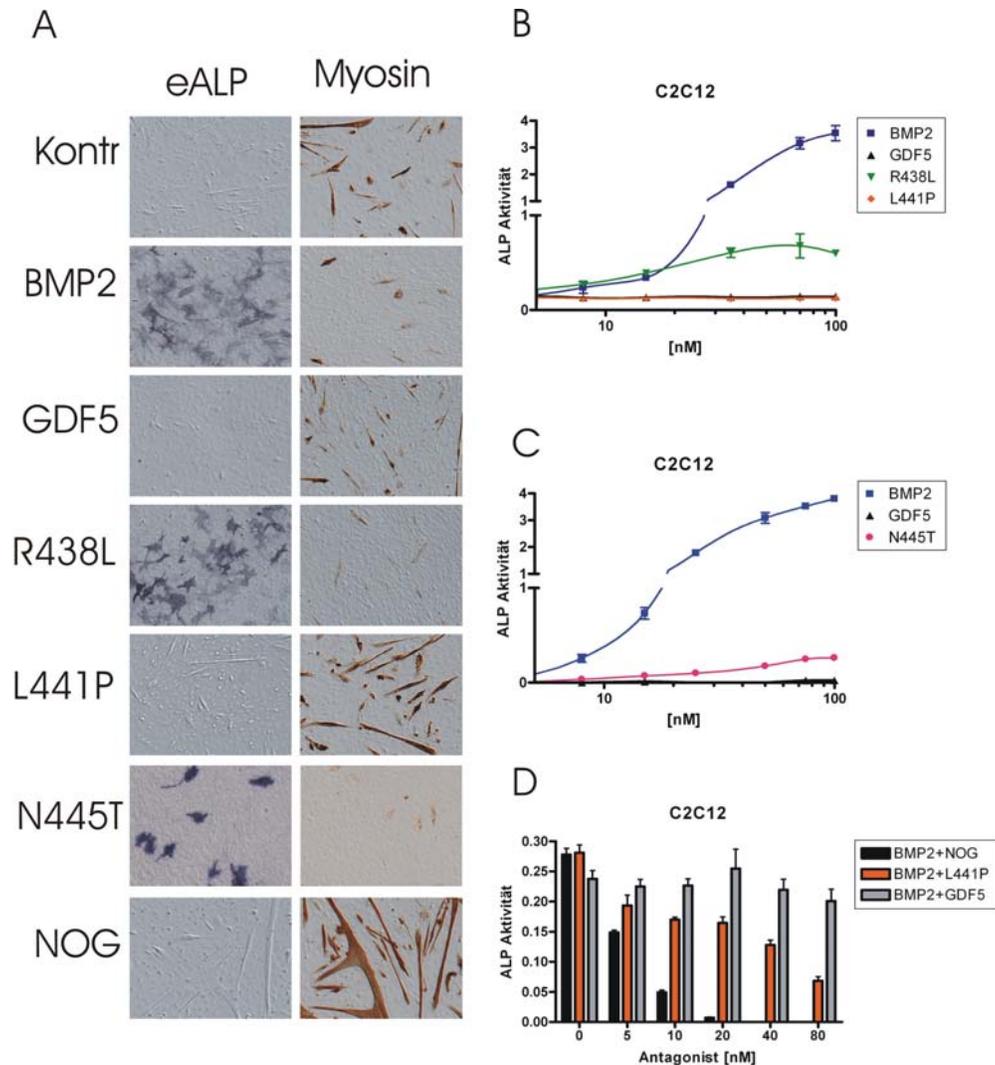
#### **4.3.2.4 GDF5 Mutanten beeinflussen das C2C12-Differenzierungsverhalten**

C2C12 Zellen sind eine prämyoblastische Vorläuferzelllinie, die spontan zu Myoblasten differenzieren kann. Durch Zugabe von BMP2 differenzieren die C2C12 Zellen jedoch zu Osteoblasten. Auf GDF5 reagieren diese Zellen nur geringfügig, da kein *Bmpr1b* exprimiert wird (Abb. 24). Die GDF5 Mutanten R438L, L441P und N445T wurden bezüglich ihres Effektes auf das Differenzierungsverhalten von C2C12 Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach fünftägiger Stimulation mit rekombinantem Protein immunzytochemisch angefärbt, um die Differenzierung zu Muskelzellen (anti-Myosin-Immunzytologie) oder Osteoblasten (ALP Aktivität) zu verfolgen (Abb. 24A). Unstimulierte Zellen zeigten eine leichte Differenzierung zu Muskelzellen, Osteoblasten konnten ohne Stimulation nicht nachgewiesen werden. Die Stimulation mit BMP2 inhibierte die Muskeldifferenzierung und induzierte stattdessen die Osteoblastendifferenzierung. Die Stimulierung der Zellen mit WT GDF5 führte zu einer leichten Inhibierung der Muskeldifferenzierung, es wurden jedoch keine Osteoblasten induziert. Erstaunlicherweise induzierten die Mutanten R438L und N445T ein BMP2-

ähnliches Differenzierungsverhalten. In beiden Fällen waren praktisch keine Muskelzellen mehr nachweisbar, jedoch fanden sich viele Osteoblasten. Die Mutante L441P hat einen gegenteiligen Effekt, sie verstärkt die Myogenese ähnlich der Stimulation mit NOG.

Um die Differenzierung zu quantifizieren, wurden erneut C2C12 Zellen mit den rekombinanten Proteinen stimuliert und die ALP Induktion gemessen. Es bestätigte sich die Dosis-abhängige ALP-Induktion in C2C12 Zellen nach Stimulation mit den Mutanten R438L und N445T. Dieser Effekt war jedoch deutlich niedriger als bei BMP2, aber deutlich über der Grundaktivität der C2C12 Zellen liegend. WT GDF5 und die L441P Mutante konnten keine ALP Aktivität induzieren (Abb. 24B und C).

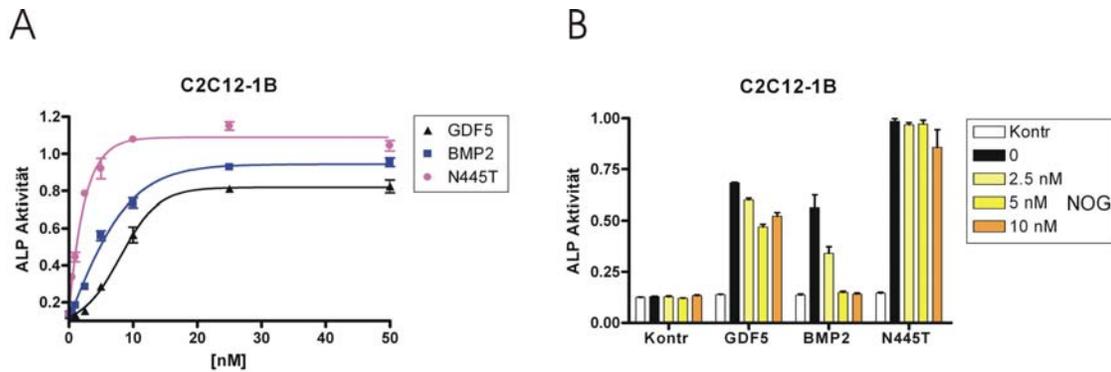
Um den positiven Einfluss der L441P Mutante auf die Myogenese genauer zu analysieren, wurden C2C12 Zellen mit BMP2 stimuliert und mit steigenden Konzentrationen L441P, NOG oder WT GDF5 versetzt (Abb. 24D). Während sich die BMP2 Aktivität mit NOG total neutralisieren lässt, hat WT GDF5 keinen Einfluss auf die BMP2 induzierte ALP Aktivität. Hingegen zeigt die L441P Mutante einen deutlich inhibierenden Effekt auf BMP2.



**Abb. 24 Einfluss der GDF5-Mutanten auf das Differenzierungsverhalten der prämyoblastischen Zelllinie C2C12**

**A** Die Differenzierung von C2C12 Zellen wurde durch das Anfärben von Osteoblasten mittels ALP und der Immunfärbung von Muskelzellen durch das Markieren von Myosin nach 5-tägiger Stimulierung mit 10 nM der angegebenen Proteine bestimmt. Die Stimulierung von C2C12 Zellen mit WT GDF5 zeigt einen leicht negativen Einfluss auf die Muskel-Differenzierung, erkennbar an der geringeren Größe der Muskelzellen im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigt eine Stimulation mit der L441P-Mutante eine gesteigerte Muskeldifferenzierung, ähnlich dem BMP-Antagonisten NOG. Die Inkubation mit BMP2 resultiert hingegen in einer starken Induktion der ALP-Aktivität und einer Suppression der Muskeldifferenzierung, ähnlich wie bei der R438L und der N445T Mutante. **B** und **C** Quantifizierung der ALP-Aktivität nach 3-tägiger Stimulierung der C2C12-Zellen mit BMP2, WT GDF5, R438L, L441P und N445T. WT GDF5 und die L441P Mutante zeigen keine Induktion der ALP-Aktivität in C2C12 Zellen. Im Gegensatz dazu induzieren die Mutanten R438L und N445T mit vergleichbarer Stärke, aber etwas schwächer als BMP2, die ALP-Aktivität. **D** Die Zugabe von NOG inhibiert Dosis-abhängig die BMP2 induzierte ALP-Aktivität. Ein ähnlicher, wenn auch schwächerer Effekt wird durch Zugabe von der L441P-Mutante erzeugt, wohingegen WT GDF5 keinen negativen Effekt auf die BMP2-Aktivität hat.

C2C12 Zellen, die mit *Bmpr1b* transfiziert wurden (C2C12-1B), zeigen nach einer Stimulation mit GDF5 eine ALP Induktion wie bei BMP2 (Abb. 25A). Da die C2C12-1B Zellen eine niedrigere Grund-ALP-Aktivität haben als die ATDC5 Zellen, wurde die C2C12-1B Zelllinie verwendet, um die Inhibierung von N445T durch NOG zu beobachten.



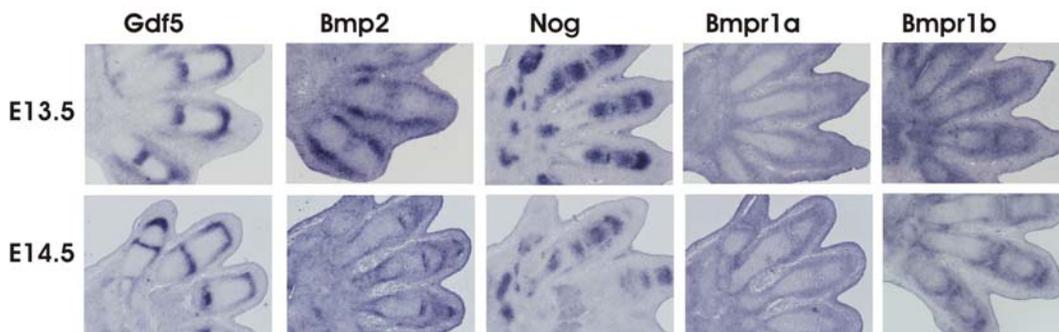
**Abb. 25 Charakterisierung der ALP-Induktion von GDF5-Mutanten in C2C12 Zellen, die stabil den *Bmpr1b* exprimieren (C2C12-1B)**

Die ALP-Aktivität wurde nach einer 3-tägigen Stimulation von C2C12-1B-Zellen mit den angegebenen rekombinanten Proteinen bestimmt. **A** Rekombinantes BMP2, GDF5, und N445T zeigen eine charakteristische Dosis-abhängige Induktion der ALP-Aktivität in C2C12-1B-Zellen. Die N445T-Mutante zeigt eine höhere ALP-Aktivität als WT GDF5 oder BMP2. **B** Inhibierung der BMP-induzierten ALP-Aktivität in C2C12-1B Zellen durch rekombinantes NOG. Die ALP-Aktivität wurde nach Inkubation mit 5 nM rekombinatem BMP2, GDF5 oder N445T und ansteigenden Mengen NOG gemessen. Während sich GDF5 und BMP2 durch NOG inhibieren lassen, ist die N445T-Mutante resistent.

Die Stimulierung von C2C12 Zellen mit N445T zeigt eine deutliche Induktion der ALP Aktivität, welche sich durch die Zugabe von NOG nicht hemmen ließ. Die Aktivität von BMP2 und WT GDF5 war hingegen durch NOG-Zugabe unterdrückbar.

#### 4.4 *Gdf5* und *Bmpr1b* Expression während der Gelenkentwicklung

Um das Zusammenspiel von Bmp mit dem Antagonisten Nog und den Rezeptoren auch in einem räumlichen und zeitlichen Aspekt einordnen zu können, wurden in situ Hybridisierungen in den Extremitäten der Maus zum Zeitpunkt der Gelenkentwicklung durchgeführt (Abb. 26).



**Abb. 26 Expressionsanalyse während der Gelenkentwicklung**

In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten von murinen Vorderpfoten der Embryonalstadien E13.5 und E14.5 mit RNA antisense Sonden, die spezifisch für *Gdf5*, *Bmp2*, *Nog*, *Bmpr1a*, und *Bmpr1b* sind. Die *Gdf5*-Expression markiert in beiden Entwicklungsstadien die späteren Gelenkzonen. *Bmp2* ist zunächst in longitudinalen Streifen (korrespondierend zu den sich entwickelnden Sehnen) und erst ab E14.5 in der Gelenkzone exprimiert. Der BMP-Antagonist *Nog* ist im Stadium E13.5 als schmaler Streifen in der sich entwickelnden Gelenkzone exprimiert, und einen Tag später nicht mehr nachweisbar. *Bmpr1b* ist in den Chondrozyten der Gelenke stark exprimiert, während *Bmpr1a* ein ubiquitäres Expressionsmuster mit etwas stärkerer Expression im Perichondrium und in den sich entwickelnden Gelenken zeigt.

Die Expression von *Bmpr1a* ist ubiquitär und erfolgt verstärkt im sich entwickelnden Gelenk. Die Expression von *Bmp2* ist zunächst in den sich entwickelnden Sehnen und erst im Stadium E14.5 in einem kleinen Streifen des späteren Gelenkspaltes zu beobachten. Die *Nog* Expression ist in den Phalangen sehr stark und wird zum Zeitpunkt E13.5 zusätzlich in einem schmalen Streifen des zukünftigen Gelenkspaltes beobachtet. Diese Expression verschwindet aber zum Zeitpunkt E14.5 wieder, wenn *Bmp2* an dieser Stelle hochreguliert wird. Im Gelenkspalt sind *Gdf5* und *Nog* co-exprimiert. Die Hemmung der *Gdf5*-Aktivität durch *Nog* könnte eine Voraussetzung der Interzonenentwicklung sein.