

## 5 Diskussion

Vererbare Fehlbildungen des Skeletts stellen eine Gruppe von relativ häufig diagnostizierten Krankheiten dar. Die hohe Fehlbildungsrate ist zum einen in der Komplexität des Skeletts begründet, welches durch eine Vielzahl von Faktoren und Einzelprozessen bestimmt wird, und zum anderen, da diese Störungen phänotypisch auffällig sind und sich meist bereits den betroffenen Personen selbst erschließt. Die in dieser Arbeit behandelten Fehlbildungen der Extremitäten stellen variable Ausprägungen dar und führen zu einer Einschränkung der Funktionsfähigkeit der Hand bzw. zu starken kosmetischen Entstellungen. Handfehlbildungen können als Paradigma für die gestörte Skelettentwicklung dienen, da Hände und Füße in ihrer Knochenentwicklung durch die Vielzahl der Knochen sehr komplex sind, sich Störungen in grundlegenden Programmen ihrer Entwicklung deutlich als Malformationen abzeichnen und diese klinisch gut charakterisiert werden können. Das Studium der zugrunde liegenden molekularen Störungen ist von essentieller Bedeutung, da es Einblicke in die Koordination des komplex verlaufenden Programms der embryonalen Extremitätenentwicklung erlaubt. Die molekulare Analyse offenbart essentielle Protein-Protein-Wechselwirkungen und führt zum Verständnis der detaillierten Auswirkungen einer genetischen Veränderung. Insofern stand in dieser Arbeit zunächst die Entwicklung und Etablierung eines geeigneten *in vitro* Systems im Vordergrund, in welchem einerseits die Auswirkungen der veränderten Aminosäuresequenz funktionell analysiert werden und andererseits eine Manipulation der Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse durch die gezielte Zugabe von rekombinanten Proteinen erfolgen konnte.

### 5.1 Vor- und Nachteile des Mikromass-Kultur-Systems

Das Mikromass-Kultur-System ist ein *in vitro* Modell für die Knorpelzelldifferenzierung und wurde bereits in den 70er Jahren beschrieben (Ahrens, Solursh, & Reiter, 1977; Solursh, Ahrens, & Reiter, 1978). Es handelt sich dabei um mesenchymale Zellen, die aus den Extremitätenknospen von Hühnerembryonen gewonnen und in sehr hoher Dichte ( $2 \times 10^5$  Zellen in einem 10  $\mu$ l Tropfen) ausgesät werden. Diese primären Zellen wachsen drei-dimensional und formen bereits nach kurzer Zeit kleine Zellaggregate, die sich vergrößern und Knorpelkondensationen

bilden. Mit längerer Kultivierung differenzieren die Knorpelzellen ähnlich der in vivo-Situation weiter zu prähypertrophen und später zu hypertrophen Chondrozyten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Mikromass-Kultur-System für unsere Fragestellungen etabliert und mit chondrogenen Maus-Zelllinien verglichen. Die Vor- und Nachteile des Systems sollen hier kurz zusammengefasst werden.

Bei der Mikromass-Kultur handelt es sich um keine definierte Zelllinie, sondern um Primärzellen, die frisch isoliert werden müssen. Dabei haben sowohl die Art und Weise der Präparationstechnik als auch das Stadium der Extremitätenknospen, bzw. ob obere und/oder untere Extremitätenknospen zur Isolation verwendet werden, großen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der Mikromass-Kulturen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollten deswegen möglichst viele Parameter konstant gehalten werden. Grundsätzlich lässt sich jedoch sagen, dass zwei unterschiedliche Präparationen nicht direkt miteinander verglichen werden können. Es sollten in jedem Versuch die entsprechenden Kontrollen und Vergleichsparameter parallel untersucht werden. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Versuchansatzes ist gut. Die Wiederholung von je vier Kulturen pro Zeitpunkt ist ausreichend und die Standardabweichungen fallen gering aus.

Keine der in der Literatur bekannten chondrogenen Zelllinien (ATDC5, C3H10T1/2) – auch bei gleichartiger Kultivierung als Mikromass-Kultur (nicht im Monolayer), zeigen auch nur annähernd das Differenzierungspotential der primären Mikromass-Kultur.

Sowohl die erwähnten Zelllinien als auch die Mikromass-Kulturen lassen sich nur sehr ineffizient mit den handelsüblichen Transfektionsmethoden transfizieren (<10% Transfektionseffizienz), was die Analyse von Genen durch Überexpression erschwert. Die Hühner Mikromass-Kulturen bieten den großen Vorteil der Infektion mittels eines Hühner-spezifischen Retrovirus (RCAS). Dieser ist zwar etwas aufwendiger in der Klonierung und Präparation als typische Expressionsvektoren, ermöglicht aber dafür eine Transfektions-Effizienz von nahezu 100% (Hughes et al., 1987). Dieses Charakteristikum reduziert die Variabilität auf Grund von unterschiedlichen Transfektionseffizienzen.

Obwohl die genetischen Informationen über Maus oder Mensch besser verfügbar sind, lohnt sich die Klonierung des Hühner-Orthologs in den RCAS-Vektor. Da nur die Überexpression der Hühnersequenz eine gesicherte biologische Aktivität ermöglicht.

Bei sehr konservierten Proteinen besteht eine gute Chance, dass auch das humane und/oder murine Protein in den Hühnchenzellen seine Funktion ausübt (wie bei den BMP), allerdings führen manchmal schon geringe Sequenz-Unterschiede zu einer veränderten bzw. fehlenden biologischen Aktivität im Hühnersystem.

Die Analyse von Mutationen, welche die Funktion in eine gegenteilige Richtung beeinflussen, lassen sich gut und schnell identifizieren. Die Überexpression von WT *Bmpr1b* hat beispielsweise keinen Effekt – obwohl dieser Rezeptor essentiell für die chondrogene Differenzierung ist. Dieses Fehlen eines biologischen Effektes ist in der Signal-abhängigen Aktivierung des Rezeptors begründet – die Überexpression alleine führt ohne biologische Liganden zu keiner Aktivierung der Zielgene. Dominant negative oder auch konstitutiv aktive *Bmpr1b* Mutanten können in der Mikromass-Kultur jedoch leicht identifiziert werden. Ebenso hat die Überexpression von GDF5 einen sehr starken positiven Einfluss auf die Differenzierung der Mikromass Kultur, Funktionsverlust-Mutationen lassen sich in diesem Fall leicht identifizieren, wohingegen geringe Unterschiede wie veränderte Rezeptoraffinitäten in diesem Überexpressionsansatz nur schwer erkannt werden.

Für die Untersuchung von Punktmutationen in *BMPR1B* und *GDF5* stellte sich das Mikromass-Kultur-System in dieser Arbeit als sehr informativ und ausgezeichnet geeignet heraus.

## 5.2 Heterozygote Mutationen in *BMPR1B* verursachen BDA2

Die BDA2 ist charakterisiert durch eine autosomal dominant vererbte Verkürzung der Mittelphalanx des Finger II und wurde erstmals 1919 beschrieben (Mohr & Wried, 1919). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen von *BMPR1B* Punktmutationen (I200K, R486W), welche in zwei unabhängigen BDA2-Familien diagnostiziert wurden, zeigten erstmals, dass diese Mutationen über einen dominant negativen Effekt die molekulare Ursache der BDA2 darstellen.

Die beiden Punktmutationen I200K und R438L liegen in konservierten Bereichen des Rezeptors, in der GS-Box bzw. in der NANDOR-Box. Die Rolle der GS-Box wurde im TGF $\beta$ R1 bereits untersucht. FKBP12, ein Inhibitor des TGF $\beta$ -Signalweges, blockiert die unphosphorylierte GS-Box des Typ1 Rezeptors und stabilisiert so die inaktive Form. Die Phosphorylierung von mindestens drei Serinen oder Threoninen der GS-Box führt

zur Aktivierung der Kinase des TGF $\beta$ R1 (Huse et al., 2001). Die GS-Box setzt sich aus der namensgebenden GS-reichen zentralen Region und einer RTI Sequenz am C-Terminus der Domäne angrenzend zur Kinase-Domäne zusammen. Die I200K *BMPRI*B-Mutation ist homolog zur Position 201 in TGF $\beta$ R1 und ersetzt das Isoleucin im RTI-Motiv durch einen positiv geladenen Lysin-Rest. Im TGF $\beta$ R1 wurden bereits die analogen Mutationen, T200V und T204V, untersucht. T200V und T204V verhinderten die ligandeninduzierte Phosphorylierung der GS-Box, während die Mutation T204acidic zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führte (Dore et al., 2001; Wieser, Wrana, & Massague, 1995). In einem in vitro-Kinase Assay konnten wir analog zeigen, dass die I200K-Mutante keine Kinase-Aktivität mehr aufweist (Lehmann et al., 2003). Zusätzlich zeigten die Mikromass-Kulturen, dass die I200K-Mutante einen negativen Einfluss auf die Chondrogenese hat. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass die I200K-Mutation durch die strukturelle Veränderung im RTI-Motiv die Kinaseaktivität unterdrückt und dadurch über einen dominant negativen Mechanismus den für die Signalübertragung essentiellen Transphosphorylierungsprozess unterbindet.

Die Sequenz 482-491 (NANDOR-Box) im TGF $\beta$ R1 ist homolog zu 481-492 im humanen BMPRI1B. Diese Domäne ist im TGF $\beta$ R1 untersucht worden und beeinflusst entscheidend die Endozytose des TGF $\beta$ -Rezeptor-Komplexes. Darüber hinaus soll die NANDOR Box auch den Transphosphorylierungsprozess von TGF $\beta$ R2 und TGF $\beta$ R1 beeinflussen (Dore et al., 2001). In den Mikromass-Kulturen war die Überexpression der R486W-Mutante weniger stark inhibierend als die I200K Mutante. Im in vitro-Kinase Assay konnte zudem eine unverändert hohe Kinase-Aktivität nachgewiesen werden (Lehmann et al., 2003). Die Zelllokalisierung hat gezeigt, dass der mutierte Rezeptor (R486W), ebenso wie der WT Bmpr1b, an der Zelloberfläche exprimiert ist. Somit ist zu vermuten, dass die R486W Mutante einen dominant negativen Effekt ausübt. Da die R486W Rezeptormutante exprimiert wird und an der Zellmembran nachgewiesen werden kann, könnte der Prozess des regulierten natürlichen *turnovers* des Rezeptorkomplexes an der Zellmembran gestört sein. Es ist vorstellbar, dass nach Expression und Ligandenbindung oder während des ligandenunabhängigen *turnovers* die Internalisierung, Stabilität, das Ausmaß der Degradation oder das Recycling zurück an die Plasmamembran nach der intrazellulären Vesikelpassage beeinträchtigt sind.

Die Überexpression der Mutanten im Hühnchen bestätigte den in der Mikromass-Kultur beobachteten dominant-negativen Effekt (Lehmann et al., 2003). Die Hühnerextremitäten zeigten bei der Überexpression der Mutanten eine Verkürzung oder gar Fehlen von Phalangen, ähnlich dem menschlichen Phänotyp. Dieser Effekt wurde im Hühnchen bereits bei der Überexpression einer dominant negativen Variante des *Bmpr1b* beschrieben, welche eine Kinase-Inaktivität aufwies (Zou et al., 1997). Der dominante Phänotyp ist durch den Signalmechanismus der BMP-Rezeptoren zu erklären, da *Bmpr1b* durch die Bildung von oligomeren Rezeptorkomplexen auch andere intakte Tgß-Rezeptoren und deren Liganden negativ beeinflussen kann.

Das Fehlen ganzer Extremitäten im Hühnchen nach sehr starker Überexpression könnte eventuell den homozygoten Fall im Patienten widerspiegeln. Ein vergleichbarer Fallbericht mit homozygoter *BMPR1B* Funktionsverlustmutation zeigt einen DuPan-ähnlichen Phänotyp, ein extremer Phänotyp mit Verkürzung und Fehlbildung der gesamten Extremitäten, mit zusätzlichen Genitalanomalien und Infertilität (Demirhan et al., 2004).

Die Bedeutung von *BMPR1B* für die weibliche Reproduktion wurde bereits bei der Analyse von *Bmpr1b*-ko Mäusen beschrieben (Friedlaender et al., 2001). Auch im Menschen wurde eine erbliche BDA2 Form identifiziert, die bei einer großen brasilianischen Familie deutschen Ursprungs mit 117 Familienmitgliedern auftrat. Hier ist beobachtet worden, dass betroffene Mütter eine höhere Fertilität aufwiesen als nicht betroffene Frauen (Freire-Maia, Maia, & Pacheco, 1980). In den beiden in dieser Arbeit beschriebenen Familien mit den I200K und R486W Genotypen ergaben sich keine Hinweise auf eine veränderte Fertilität, wenngleich die Stammbaumgröße nicht aussagekräftig war.

Zusätzlich zu den BDA2-verursachenden *BMPR1B* Mutationen der Patienten (I200K, R486W) wurde die in australischen Schafen (Merino strain) identifizierte *BMPR1B* Mutation Q249R in der Mikromass-Kultur überexprimiert. Die Merino-Schafe haben eine erhöhte Ovulationsrate pro Zyklus und somit signifikant gehäufte Mehrlingsgeburten. Skelettveränderung wurden bisher nicht beobachtet (Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001). In den Mikromass-Experimenten bestätigte sich, dass sie Q249R Mutation keinen Einfluss auf die Chondrogenese hat.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die essentielle und spezifische Bedeutung von *Bmpr1b* für die Skelettentwicklung und die weibliche Fertilität. Beide Bmp-Rezeptoren (*Bmpr1a* und *1b*) sind wichtig für die initiale Knorpelkondensation, allerdings werden sie zu verschiedenen Zeiten während dieses Prozesses unterschiedlich stark exprimiert. Nach erfolgter Knorpelkondensation wird *Bmpr1a* während der weiteren Entwicklung der Knorpel Elemente herunterreguliert, während *Bmpr1b* auch nach der Wachstumsphase stark exprimiert bleibt (Ashique, Fu, & Richman, 2002). Die Inaktivierung von *Bmpr1a* in der Maus verhindert die Entstehung des Mesoderms und ist im Stadium E9.5 embryonal letal (Mishina, Suzuki, Ueno, & Behringer, 1995). Die Inaktivierung von *Bmpr1b* in der Maus resultiert in einem rezessiven Brachydakylie-Phänotyp, der alle Fingerstrahlen gleichmäßig betrifft (Baur et al., 2000; Gao & He, 2004). Interessanterweise ist das restliche Skelett nicht betroffen. Dieser Befund unterstreicht, dass der *Bmpr1b*-Signalweg für die Finger, aber nicht für andere Skelettelemente essentiell ist. Die Liganden von *Bmpr1b* sind Mitglieder der Tgf $\beta$ -Superfamilie, insbesondere Bmp und Gdf. Diese Liganden binden unterschiedlich stark, wobei Gdf5 die höchste Affinität aufweist (Nishitoh *et al.*, 1996). Mutationen in *GDF5* führen im Menschen heterozygot zu einer speziellen Form der Brachydakylie, der BDC (Polinkovsky et al., 1997) und in der Maus homozygot zum *brachypodism (bp)* Phänotyp (Storm et al., 1994). Der Phänotyp von der *bp* Maus und die *Bmpr1b knock out* Maus sind sehr ähnlich. Die Ausprägung der BDA2 in den Patienten unterscheidet sich jedoch deutlich von den Phänotypen der beiden Mausmodelle, was auf Spezies-spezifische Unterschiede hinweist, und unterstreicht, dass die Maus weniger sensitiv auf den Verlust von bzw. Mutationen in *Bmpr1b* reagiert.

### 5.3 Phänotypisches Spektrum von *GDF5* Punktmutationen und ihre molekularen Auswirkungen

#### 5.3.1 BDC – *GDF5* (R438C) – der klassische Funktionsverlust

Die BDC ist charakterisiert durch eine autosomal dominant vererbte Verkürzung oder ein Fehlen der Mittelphalangen aller Finger, wobei der Ringfinger am wenigsten betroffen und somit oft der längste Finger ist. BDC (OMIM #113100) wurde erstmals 1920 von Vidal und Drinkwater beschrieben und wird durch heterozygote Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5* hervorgerufen (Everman *et al.*, 2002; Polinkovsky *et al.*, 1997). Eine Ausnahme stellt die Punktmutation M173V dar, welche in einem rezessivem Erbgang BDC verursacht. Es wird vermutet, dass die M173V Mutation, die in der Prodomäne von *GDF5* liegt, die Faltung, die Sekretion und die Stabilität von *GDF5* beeinflusst (Schwabe *et al.*, 2004).

Homozygote Funktionsverlust-Mutationen in *GDF5* resultieren in komplexen Skelettveränderungen, die als Gruppe der akromesomelen Chondrodysplasien zusammengefasst werden. Klinisch zählen zu diesen das Grebe Syndrom (z.B. homozygote *GDF5* Punktmutation C400Y (Thomas *et al.*, 1997)), das Hunter-Thompson Syndrom (homozygote *GDF5* frameshift Mutation (Thomas *et al.*, 1996)), und das DuPan Syndrom (homozygote *GDF5* Punktmutation L441P (Faiyaz-Ul-Haque *et al.*, 2002)). Die Patienten sind durch disproportionierten Kleinwuchs mit stark verkürzten Extremitäten und oft nur rudimentären Finger- und Zehenanlagen charakterisiert. Das DuPan Syndrom ist die mildeste Form der akromesomelen Chondrodysplasien und stellt wahrscheinlich keinen kompletten Funktionsverlust von *GDF5* dar, sondern gezielt den Verlust der BMPRI1B-Aktivierung, wie im nachfolgenden Kapitel 5.3.2 BDA2 – *GDF5* (L441P) bindet nicht mehr an BMPRI1B ausführlich diskutiert. Kürzlich ist ein dominant vererbtes DuPan Syndrom beschrieben worden, welches durch *GDF5* Mutationen hervorgerufen wurde. Dabei handelt es sich um eine Anhäufung von drei benachbarten Mutationen auf einem Allel, delta437, S439T und H440L (Szczałuba *et al.*, 2005). Es bleibt zu klären, ob die Kombination der drei Mutationen den Phänotyp verursacht, oder auch schon eine der drei Mutationen zu der Ausprägung des dominanten DuPan Syndroms führt.

In dieser Arbeit wurde die Punktmutation R438C, die dominant eine BDC verursacht (Everman *et al.*, 2002), vergleichend analysiert. Die Überexpression dieser Mutante in der Mikromass-Kultur bestätigte den zu erwartenden Funktionsverlust der GDF5 Aktivität. Die weiteren in dieser Arbeit untersuchten Punktmutationen in GDF5, die mit anderen Phänotypen assoziiert sind, konnten in dem Mikromass-Kultursystem durch unterschiedlich starke Aktivitäten von den klassischen GDF5-Funktionsverlustmutationen abgegrenzt werden. Diese weiteren GDF5 Varianten zeigten in der Mikromass-Kultur eine reduzierte GDF5-Aktivität (L441P), eine dem Wildtyp ähnliche (R438L) bzw. sogar eine stärkere GDF5 Aktivität (N445T) als WT Gdf5. Diese Varianten wurden rekombinant hergestellt und in weitergehenden biochemischen Analysen untersucht. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden Kapiteln explizit diskutiert.

### **5.3.2 BDA2 – GDF5 (L441P) bindet nicht mehr an BMPR1B**

Die BDA2 (OMIM #112600) wurde bisher mit heterozygoten Punktmutationen in *BMPR1B* assoziiert beschrieben (Lehmann *et al.*, 2003); dies wurde bereits im Kapitel 5.2 Heterozygote Mutationen in *BMPR1B* verursachen BDA2 dargestellt. Die heterozygote Punktmutation L441P in GDF5 ist ebenfalls mit einer BDA2 assoziiert. Die Darstellung der 3D-Struktur von GDF5 zeigt, dass die Mutation L441P innerhalb der Rezeptor-Interaktionsseite von GDF5 liegt. Die Vermutung, dass die Mutation zu einer veränderten Liganden-Rezeptor-Interaktion führt, bestätigte sich in BIACORE Analysen. Die Analysen der Bindungscharakteristika zeigten, dass die L441P Mutante eine dramatisch reduzierte Affinität zu BMPR1B im Vergleich zu WT GDF5 aufweist. Die Affinität zu NOG war hingegen nicht gestört, sodass mit einer Störung der Gesamtstruktur nicht zu rechnen ist (Seemann *et al.*, 2005). Die Überexpression der L441P Mutante in der Mikromass-Kultur zeigte nur eine geringe Induktion der Chondrogenese, was durch eine gestörte Interaktion mit BMPR1B zu erklären wäre. Diese Effekte unterscheiden sich jedoch deutlich von der Funktionsverlustmutante R438C, welche sich in einer BDC beim Menschen ausprägt. Liganden-Crosslinking Experimente haben gezeigt, dass GDF5 effizient an den Typ 2 und Typ 1b Rezeptor bindet, eine Signaltransduktion aber nur in Anwesenheit beider Rezeptoren stattfindet (Nishitoh *et al.*, 1996). BMP-Rezeptoren (Typ 1a, 1b und 2) formen auch in



Abwesenheit von Liganden sowohl homomere als auch heteromere Komplexe an der Zelloberfläche, so genannte präformierte Komplexe (Gilboa *et al.*, 2000; Nohe *et al.*, 2002).

Da die L441P Mutante nur die Typ 1 Rezeptorbindung negativ beeinflusst, kann diese Mutante zwar noch an den Typ 2 Rezeptor binden, allerdings dürfte hierbei durch den Typ 1 Rezeptor im heterodimeren Komplex der dominant negative Effekt ausgeübt werden.

Die L441P Stimulierung der chondrogenen Zelllinie ATDC5 mit rekombinantem Protein zeigte einen Verlust der GDF5-typischen ALP-Induktion. Hingegen zeigte die Stimulierung der prämyoblastischen Zelllinie C2C12 einen deutlichen Effekt. Die Myogenese wurde deutlich gefördert, ähnlich der Zugabe des BMP-Antagonisten NOG. Auch die Co-Stimulierung der C2C12 Zellen mit BMP2 und L441P zeigte, dass die Mutante die BMP2 Aktivität negativ beeinflusst. Diese Eigenschaft ist von besonderem Interesse bezüglich der Entwicklung von therapeutisch-relevanten Peptiden.

Die L441P Mutation wurde bereits in einer pakistanischen Familie mit rezessiven DuPan Syndrom beschrieben (Faiyaz-UI-Haque *et al.*, 2002). Der DuPan Phänotyp resultiert aus homozygoten Funktionsverlust-Mutationen im *BMPR1B* (Demirhan *et al.*, 2004). Die ähnlichen Phänotypen, die durch eine *BMPR1B*-Mutation oder die L441P Punktmutation in *GDF5* hervorgerufen werden, sprechen für die Hypothese, dass die L441P Mutation mit der *GDF5*-*BMPR1B* Interaktion interferiert.

### **5.3.3 SYM1 – GDF5 (R438L) bindet zusätzlich an BMPR1A**

Der SYM1 ist durch eine autosomal dominant vererbte Fusion der proximalen interphalangealen Gelenke charakterisiert (Cushing, 1916). SYM1 (OMIM #185800) ist klassischerweise mit Funktionsverlust-Mutationen in *NOG* assoziiert (Gong *et al.*, 1999). Die *GDF5*-R438L Mutante zeigt einen Phänotyp, der nicht von Patienten mit *NOG*-Mutationen unterschieden werden kann. Die Mutation R438L liegt, wie auch die L441P Mutation, in der Rezeptor-Interaktionsseite von *GDF5*. Zusätzlich zeigt die 3D-Struktur von BMP7 mit NOG im Komplex, dass die in BMP7 homologe Aminosäure R438 im direkten Kontakt mit NOG steht. Dennoch konnten in Zellkultorexperimenten und in Bindungsstudien keine Unterschiede in der R438L-*NOG*-Interaktion festgestellt werden, welche den Symphalangie-Phänotyp erklären könnten. Insofern liegt hier die

Vermutung nahe, dass es sich um eine Veränderung der Interaktion zum Rezeptor handelt.

Die Analyse der 3D-Struktur von BMP2 mit dem BMPR1A Rezeptor zeigt, dass die Reste L51-D53 (in GDF5 L437-S439) essentiell für die Bindung von BMP2 an BMPR1A sind (Keller, Nickel, Zhang, Sebald, & Mueller, 2004). Es fällt weiterhin auf, dass nur in GDF5 eine positiv geladene Aminosäure an Position R438 (Arginin) konserviert ist, während sich in BMP2 und den anderen BMP wie auch in DPP hier ein unpolarer hydrophober Alanin-Rest befindet. In der Mutante R438L ist diese Position mit einem ebenfalls hydrophoben Leucin-Rest besetzt. Hierdurch dürfte das Molekül das dem BMP2 ähnlicher werden. In vitro Mutagenesen an dieser Stelle im BMP2 haben bereits gezeigt, dass ein Austausch an dieser Position die BMP2 Affinität an Bmpr1a verändert (Kirsch, Nickel, & Sebald, 2000; Nickel, Kotzsch, Sebald, & Mueller, 2005). Ein L51P Austausch führt zu einem Verlust der Bindung von BMP2 an den Typ 1 Rezeptor, die Interaktion mit NOG oder dem Typ 2 Rezeptor bleibt jedoch unbeeinflusst (Keller et al., 2004). Unsere Bindungsstudien zeigen, dass die R438L Mutante noch immer an den BMPR1B binden kann. Doch im Gegensatz zu WT GDF5 ist diese Mutante zusätzlich in der Lage an den BMPR1A Rezeptor zu binden, wenn auch etwas weniger stark als BMP2 (Seemann *et al.*, 2005). Die Mutation R438L führt zu einem GDF5 mit BMP2-ähnlichen Eigenschaften, welches neben dem Spezifitätsverlust für BMPR1B auch Charakteristiken eines Funktionsgewinns durch die BMP2-ähnliche Affinität zu BMPR1A aufweist.

Diese Hypothese konnte in Zellexperimenten untermauert werden. Die R438L zeigte eine hohe Aktivität in allen Tests und wirkte stärker als WT GDF5. Der größte Unterschied zwischen R438L und GDF5 wurde in den C2C12-Versuchen deutlich. C2C12 Zellen sind mesenchymale Vorläuferzellen, die spontan zu Muskelzellen differenzieren, wenn sie konfluent wachsen. Es ist bekannt, dass die Stimulation mit BMP2 zu einer osteoblastischen Differenzierung der C2C12 Zellen führt, was sich durch die Induktion von ALP Aktivität äußert. WT GDF5 ist nicht in der Lage, ALP Aktivität zu induzieren, vermutlich weil Bmpr1b im Gegensatz zu Bmpr1a in diesen Zellen nicht exprimiert wird (Sebald, Nickel, Zhang, & Mueller, 2004). In diesem Versuch zeigte die R438L Mutante jedoch eine BMP2-ähnliche Aktivität. Nach Stimulation mit dem mutanten Protein konnten ALP-positive Osteoblasten

nachgewiesen werden, und die Bildung von Muskelzellen war deutlich reduziert. Wir vermuten, dass die R438L Mutante ihre BMPR1B-Spezifität verloren hat und nun in der Lage ist, ähnlich wie BMP2, an BMPR1A zu binden und somit die osteoblastische Differenzierung einleiten kann.

Der Pathogenesemechanismus der R438L-Mutation kann durch zwei alternative Hypothesen erklärt werden. Zum einen kann es zu einer Verstärkung der normalen GDF5-Signalwirkung durch eine höhere Affinität bzw. stabilere Bindung der Mutante zum BMPR1B kommen. Zum anderen wäre ebenfalls denkbar, dass eine Aktivierung von alternativen Signalwegen durch die Bindung von R438L an BMPR1A erfolgt.

Die letztere Hypothese wird durch In situ Hybridisierungen von *Gdf5*, *Bmp2*, *Nog*, *Bmpr1a* und *Bmpr1b* während der murinen Gelenkentwicklung unterstützt. Eine Aktivierung von *Bmpr1a* durch *Gdf5* ist auf Grund der Co-Expression dieser beiden Proteine im Gelenkspalt möglich. Die *Bmp2* Expression ist stringent reguliert, sowohl auf Expressionsebene als auch posttranslational durch die Interaktion mit Antagonisten wie Chordin oder Nog. Wenn ein verändertes *Gdf5* zu einer Deregulation der *Bmp2*-Aktivität führt, kann sich dies in einem Symphalangismus äußern.

Um die Mutanten auch in einem in vivo System zu analysieren, wurden die Mutanten in Hühnerextremitäten überexprimiert (Seemann et al., 2005). Ähnlich früherer Studien, wurden Gelenksfusionen und eine generelle Vergrößerungen der Knorpelanlagen beobachtet (Francis-West et al., 1999). Analoge Beobachtungen sind für *Gdf5* beschrieben und wurden von uns in einem stärkeren Ausmaß bei der R438L Mutante beobachtet.

#### **5.3.4 SYNS1 – GDF5 (N445T) weist eine NOG-Resistenz auf**

Das SYNS1 (OMIM #186500) ist durch multiple Gelenkfusionen in den Extremitäten charakterisiert (Fuhrmann & Steffens, 1966) und wurde bereits mit Mutationen in NOG assoziiert (Gong et al., 1999; Krakow et al., 1998). Die heterozygote Punktmutation N445T in GDF5 ist ebenfalls mit SYNS1 assoziiert. Die 3D-Struktur von BMP7 mit NOG im Komplex verdeutlicht, dass die in BMP7 homologe Aminosäure N445 in Kontakt mit NOG steht. Die Überexpression der N445T Mutante in der Mikromass-Kultur zeigte eine deutlich stärkere Aktivität als WT *Gdf5*. Bei einer Co-Expression von *Nog* und WT *Gdf5* ist der Effekt von *Nog* gegenüber WT *Gdf5* dominant, d.h. die

Chondrogenese wird inhibiert. Im Gegensatz dazu zeigen Mikromass-Kulturen, die mit N445T und Nog co-infiziert wurden, einen deutlichen Anstieg der Knorpelmatrixproduktion, der sogar über der nicht-infizierten Kontroll-Kulturen liegt. Der Eindruck, dass die N445T Mutante resistent gegenüber Nog sein könnte, bestätigte sich ebenfalls in Zellkulturexperimenten. C2C12 Zellen, die stabil mit dem Bmpr1b transfiziert wurden (C2C12-1B), zeigten eine starke ALP Induktion nach Stimulation mit rekombinantem N445T. Die ALP Induktion ließ sich nicht durch die Zugabe von rekombinantem NOG unterdrücken, wie es für WT GDF5 oder BMP2 gezeigt werden konnte. Ein partielles Sequenz-Alignment der TGF $\beta$ -Superfamilie macht deutlich, dass N445 zusammen mit 2 weiteren Aminosäuren (NHA-Motiv) in etwa der Hälfte aller Mitglieder vorkommt. Bei nur wenigen Mitgliedern der TGF $\beta$ -Superfamilie ist dieses Motiv verändert, in den übrigen fehlt es ganz.

Offenbar werden nur die TGF $\beta$ -Superfamilienmitglieder, die das NHA-Motiv besitzen, durch NOG reguliert. Dies zeigt eine systematische Literaturanalyse, denn diese Nog-abhängige Regulation ist experimentell für BMP2, 4, 5, 6, 7, GDF5 und 6 nachgewiesen (C. Chang & Hemmati-Brivanlou, 1999; Merino et al., 1999; Zimmerman, De Jesus-Escobar, & Harland, 1996). Hingegen bindet NOG nicht an Activin oder TGF $\beta$  (Massague & Chen, 2000), welche kein NHA-Motiv aufweisen.

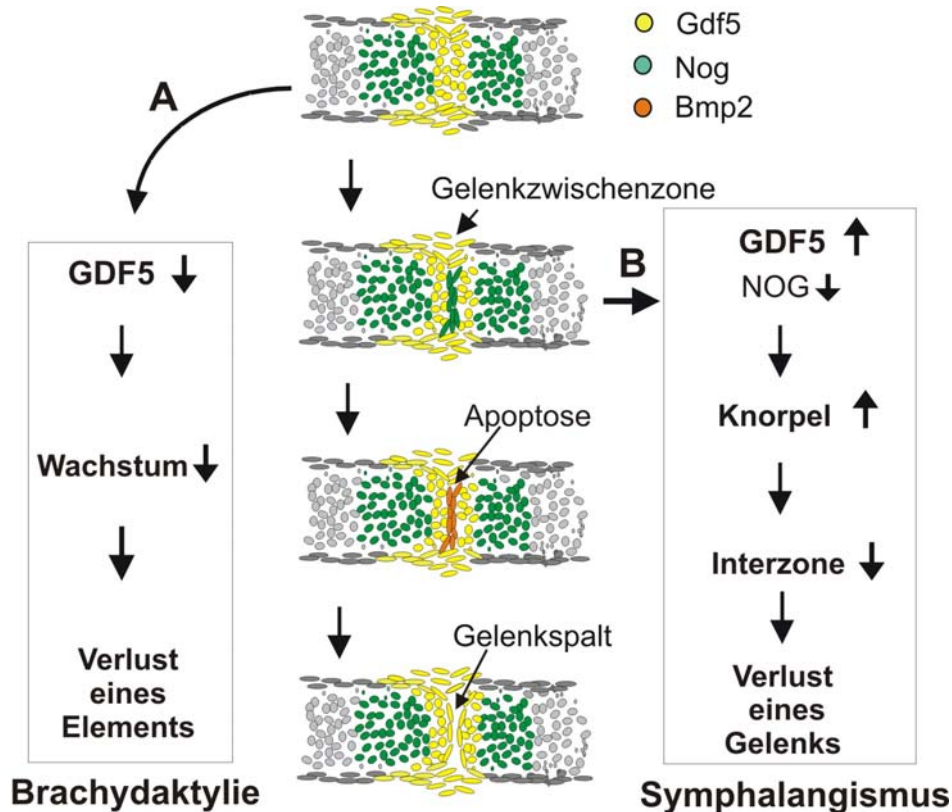
Die multiple Synostose, hervorgerufen durch die heterozygote GDF5 Mutation N445T, ist demnach auf die Resistenz von GDF5 gegen eine NOG-abhängige Inhibition zurückzuführen, und hat somit die gleichen Auswirkungen wie ein NOG-Funktionsverlust.

### **5.3.5 Pathogenesemechanismen der GDF5 Punktmutationen**

Der mögliche Pathogenesemechanismus, der durch die Punktmutationen von GDF5 zu Handfehlbildungen führt, ist schematisch in Abb. 27 dargestellt.

Hieraus lässt sich ein Modell ableiten, in dem GDF5 die Proliferation anregt und durch NOG in der späteren Gelenkzone inhibiert wird, was zu einer Dedifferenzierung der Zellen in der Interzone führt. Die Hochregulation von BMP2 induziert hierbei die Apoptose und ermöglicht so die Entstehung des Gelenkspalts. Im Gegensatz dazu würde eine Inhibierung von GDF5 wie in der L441P Mutation zu einer Verkürzung des Längenwachstums führen, was folglich eine Hypo- oder Aplasie von Phalangen bedingt.

Wie in Abb. 27 gezeigt, kann der Symphalangismus entweder durch ein überaktives GDF5 oder durch ein inaktives NOG hervorgerufen werden. Beide Veränderungen resultieren in einem Ungleichgewicht von Signal und Inhibitor, was zu einem Verbleiben von Knorpel im Gelenkspalt führt und somit die Ausprägung des Gelenkes verhindert.



**Abb. 27** Schematische Darstellung der Entwicklung des metakarpalphalangealen Gelenks und die Expression von Gdf5, Nog und Bmp2 während der Mausentwicklungsstadien E12.5 bis E14.5

*Gdf5* induziert das Längenwachstum am distalen Ende der Phalangen. Der Bmp Inhibitor *Nog* ist in den Knorpel-Anlagen und in der Gelenkzwischenzone exprimiert und wird dort später durch die Expression von *Bmp2* abgelöst. Apoptose, mechanische Kräfte und andere Faktoren führen zu der Bildung eines Gelenkes. Die Kästen an der linken und rechten Seite zeigen den hypothetischen Pathogenese-Mechanismus für die Brachydaktylie (A) und den Symphalangismus (B). Die Reduktion des Gdf5-Signals, hervorgerufen durch die heterozygote L441P Mutation führt zu einem reduziertem Längenwachstum der Phalangen und somit zu einer Verkürzung der Fingerglieder. Eine Verstärkung des Gdf5 Signals, wie durch die heterozygote R438L oder N445T Mutation, ebenso aber auch durch Funktionsverlust-Mutationen von NOG, inhibiert die Gelenkbildung und führt zu einem Symphalangismus.