

Zusammenfassung

Entwicklung und Wachstum des Skeletts sind genetisch determinierte Vorgänge, die sich in verschiedene Entwicklungsphasen einteilen lassen. Zunächst kommt es gesteuert durch Gene der Musterbildung zur Festlegung von Form, Gestalt und Anzahl einzelner Knochen. In der darauffolgenden Phase der Organogenese bildet sich die Anlage der zukünftigen Knochen durch Kondensation und Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen. Die weitere Differenzierung erfolgt nach zwei grundsätzlich verschiedenen Mechanismen, der enchondralen Ossifikation wo eine knorpelige Anlage in Knochen umgewandelt wird und die desmale Ossifikation, bei der direkt aus Vorläuferzellen Knochen entsteht. Nach der Organogenese erfolgt das Wachstum, welches praktisch ausschließlich in der Wachstumsfuge stattfindet, indem hier Chondrozyten proliferieren, Matrix produzieren und dann deren Matrix in Knochen umgewandelt wird. Diese Vorgänge werden durch ein komplexes Regelwerk aus molekularen Signalen kontrolliert. Genetische Defekte in den einzelnen Phasen führen zu charakteristischen Krankheitsbildern.

Schlüsselwörter

Skelettdysplasien, Wachstumsfuge, enchondrale Ossifikation, desmale Ossifikation,

Summary

Skeletal development is a complex genetically determined process. In the initial phase genes that control patterning determine the overall size, number and gestalt of individual bones. During organogenesis mesenchymal progenitor cells condense and differentiate to form the anlage of the future bone. Differentiation and further growth follows two fundamentally different principles, endochondral ossification which is characterized by the formation of a transient cartilaginous template that is subsequently transformed into bone, and desmal ossification, a process that leads to the direct formation of bone. After organogenesis growth is generate almost exclusively in the growth plate by proliferation and matrix production of chondrocytes and the conversion of cartilage into bone. These processes are regulated by an intricate signaling network. Defekts in genes controlling this network result in distinct clinical phenotypes.

Key words

Skeletal development, endochondral ossification, desmal ossification, cartilage

Entwicklung

Das Skelett ist ein hoch komplexes Organ, bestehend aus einer Vielzahl von einzelnen Elementen (je nach Zählweise um die 210 einzelne Knochen), die miteinander artikulieren, um die notwendige Beweglichkeit zu erreichen. Die Funktion des Skeletts beschränkt sich nicht auf den Bewegungsapparat. Es dient zum Schutz innerer Organe (Hirn, Thorax), als Calcium- und Phosphatreservoir und als primärer Generator des Wachstums. Auch der Knochen des erwachsenen Menschen ist kein statisches Gebilde, sondern ist einem permanenten Umbau unterzogen. Knochenaufbau und -abbau müssen sich hierbei die Waage halten, sonst entsteht entweder zu wenig (Osteoporose) oder zu viel Knochen (Osteopetrose). Die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts geschieht nicht alleine über eine Regulation im Knochen, sondern umfasst auch das System der Muskeln und Bänder, die zusammen als Muskuloskelettales System eine Einheit bilden. Die Komplexität dieses Systems wird auch ersichtlich anhand der hohen Zahl an Erkrankungen, die das Skelettsystem betreffen. Zusammen mit dem Herzen ist das Skelett das am häufigsten von Fehlbildungen betroffene Organ. Eine große Zahl von Erkrankungen führt zum verminderten Knochenwachstum (für eine Übersicht über Erkrankungen und molekulare Mechanismen siehe Kornak, 2003).

Entwicklungsbiologisch lässt sich die Entstehung des Skeletts in drei prinzipielle Phasen unterteilen. Während

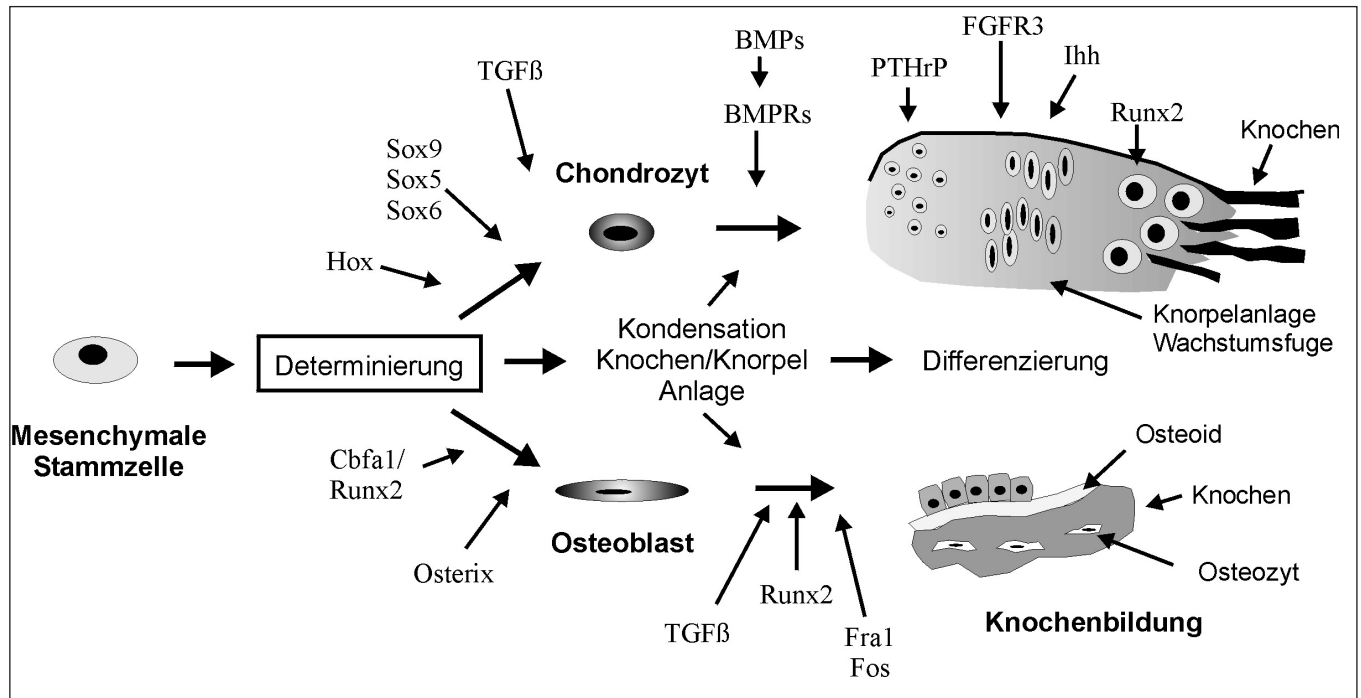


Abb 1 Schematische Darstellung der Differenzierungsstufen von Chondrozyten und Osteoblasten und Mechanismen der enchondralen (oben) und desmalen (unten) Ossifikation.

Mesenchymale Vorläuferzellen differenzieren nach erfolgter Determinierung durch entsprechende Gene (Hox, Sox, Runx2, Osterix) in Chondrozyten bzw. Osteoblasten. Im Zuge der enchondralen Ossifikation bildet sich zunächst durch Kondensation von Vorläuferzellen eine knorpelige Anlage, die dann weiter differenziert. Innerhalb der Anlage kommt es zur Ausbildung einer Wachstumszone mit der charakteristischen Morphologie und zur Bildung von periostalen und trabekulärem Knochen. Bei der desmalen Ossifikation kommt es direkt zur Differenzierung von Vorläuferzellen in Osteoblasten, die zunächst Osteoid produzieren, dass dann zum eigentlichen Knochen verkalkt. Hierdurch mauern sich die Osteoblasten ein und werden zu Osteozyten. Osteoklasten bauen den Knochen ab. Die wichtigsten molekularen Faktoren, die diese Differenzierungsstrecke steuern, sind mit Pfeilen eingezeichnet.

der Musterbildung wird die Gesamtgestalt sowie Anzahl und Form der einzelnen Elemente festgelegt. Die so determinierten Zellen differenzieren an den vorgelegten Positionen zu Knorpel produzierenden Chondrozyten oder Knochen produzierenden Osteoblasten. Hiermit findet die zweite Entwicklungsphase statt, die Organogenese des Knochens. Diese Phase ist beim Menschen mit dem Ende der Embryonalperiode, also 10 Wochen post konzeptionem abgeschlossen. Danach erfolgt nur noch Wachstum über zwei grundlegende Mechanismen. In allen langen Röhrenknochen wie auch in den Wirbeln erfolgt die Knochenbildung über enchondrale Ossifikation. Hierbei wird ein zunächst knorpelig angelegtes Modell

sukzessive in Knochen umgebaut. Bei diesem Vorgang spielt die Wachstumsfuge die entscheidende Rolle. Im Gegensatz hierzu kommt es bei der desmalen Ossifikation zur direkten Bildung von Knochen. Desmale Ossifikation findet im wesentlichen in der Schädelkalotte, der Mandibula und der lateralen Clavicula statt. Abb. 1 zeigt schematisch diese Vorgänge.

Gendefekte, die die Musterbildung betreffen, resultieren in Malformationen. Diese sind zum Zeitpunkt der Geburt abgeschlossen und das veränderte Gen hat keine krankheitsrelevante Funktion mehr. Störungen der Organogenese und insbesondere des Wachstums hingegen, sind auch nach der Geburt noch aktiv und resultieren in sogenannten Dysplasien. Dysplasien betreffen immer Organsysteme, also z.B. Knorpel oder/und Knochen und resultieren dadurch in Kleinwuchs. Die zentrale Störung des Wachstums liegt in der Disorganisation der Wachstumsfuge.

Wachstum

Longitudinales Wachstum erfolgt über die Konversion von Knorpel zu Knochen. Die frühe knorpelige Anlage eines jeden Skelettelements besteht noch ausschließlich aus Chondrozyten und den umgebenden Perichondrium. Im weiteren Verlauf differenzieren die Chondrozyten entlang einer genetisch determinierten Linie in mehrere histologisch und funktionell charakterisierbare Zonen. In der Mitte des zukünftigen Knochens entsteht das primäre Ossifikationszentrum. Von dort gesehen, bilden sich auf beiden Seiten die

Differenzierungszone der Wachstumsfugen. Mit dem weiteren Wachstum vergrößert sich die primäre Ossifikationszone und die Wachstumsfugen wandern immer mehr in Richtung der Knochenenden. Innerhalb der Wachstumszone lassen sich dann verschiedene Bereiche unterscheiden. Am meisten distal gelegen ist die sogenannte Reservezone. Hier sind die Zellen klein, von relativ viel Matrix umgeben und erscheinen in einer zufälligen Anordnung. Anschließend an die Reservezone folgt die Proliferationszone. In der muren Wachstumszone findet sich hier, wie der Name sagt, die höchste Rate der Proliferation. Die Chondrozyten sind dichter gepackt und fangen an, sich in sogenannten Säulen anzuordnen. In der Zone des Säulenknorpels sind die Chondrozyten komplett abgeflacht und ziegelsteinartig übereinander getürmt. Zwischen diesen Säulen von Chondrozyten befindet sich reichlich chondrozytäre Matrix. Der Säulenknorpel verändert im weiteren Verlauf seine Form, die Zellen werden größer und runder. Hier beginnt die Zone des hypertrophen Knorpels. In dieser Zone durchlaufen die Zellen einen kompletten Wandel ihrer Morphologie von der flachen relativ kleinen Zelle des Säulenknorpels mit viel extrazellulärer Matrix zu einer großen runden Zelle mit wenig extrazellulärer Matrix. Kurz bevor der Knorpel die Knochenreihe erreicht, kalzifiziert die extrazelluläre Matrix, eine Region, die auch terminal hypertropher Knorpel genannt wird. In diesem Bereich scheinen die Zellen apoptotisch zu werden und werden schließlich durch Osteoklasten abge-

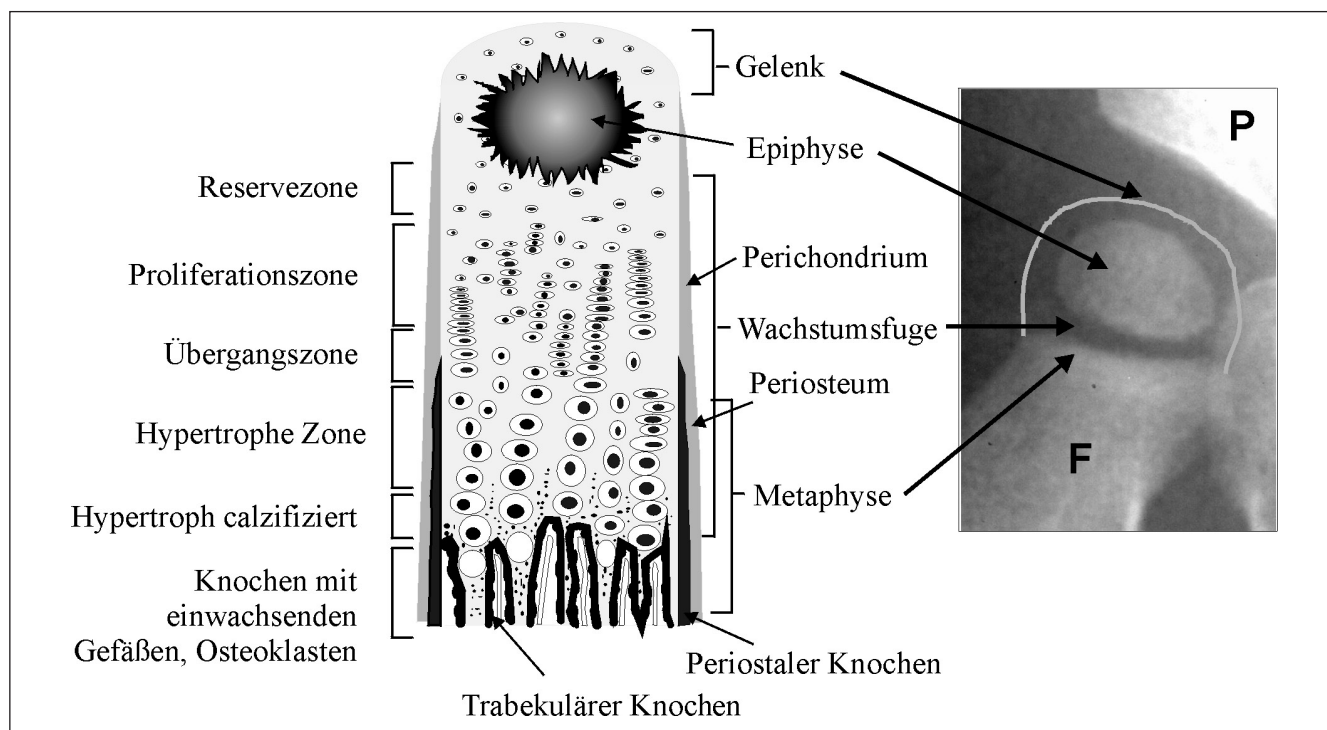


Abb 2 Schematische Darstellung der Wachstumsfuge (links) und radiologische Darstellung der Epiphyse (Femurkopf)

Die verschiedenen histologisch differenzierbaren Zonen sind auf der linken Seite dargestellt.

Die Wachstumsfuge generiert das Längenwachstum durch die Proliferation von Chondrozyten, die Produktion von chondrozytärer Matrix und die Umwandlung derselben in Knochen. Undifferenzierte Chondrozyten durchlaufen die verschiedenen Stadien der Differenzierung und ändern hierbei drastisch ihre Morphologie. Die Matrix hypertropher Chondrozyten verkalkt schließlich, wird von Osteoklasten abgeräumt und durch Knochen ersetzt. Mit dem Abschluss des Wachstums fusionieren primäres (Metaphyse) und sekundäres Ossifikationszentrum (Epiphyse), so dass nur noch der Gelenkknorpel von der ursprünglich knorpeligen Anlage übrig bleibt. Störungen dieses Vorgangs führen zum skelettalen Kleinwuchs (Osteochondrodysplasie). Die (vermutliche) Ausdehnung des knorpeligen Femurkopfes ist durch eine graue Linie gekennzeichnet.

P = Pelvis
F = Femur

räumt. Die chondrozytäre Matrix wird durch Knochenmatrix, produziert von Osteoblasten, ersetzt. Die Wachstumsfuge ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

Wesentlich für die Funktion dieses Prozesses ist zum einen die Integrität der extrazellulären Matrix von Knochen und Knorpel und zum anderen die außerordentlich komplexe Signaltransduktion und Steuerung von Proliferation und Chondrozytendifferenzierung. Die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten in der Wachstumsfuge wird von verschiedenen, miteinander interagierenden Signalwegen gesteuert. Besonders wichtig scheint hierbei die Abstimmung zwischen ruhenden Chondrozyten (Reservezone), den proliferierenden Chondrozyten (Proliferationszone) und den differenzierenden Chondrozyten (prähypertrophe und hypertrophe Zone) zu sein. So führt z.B. nicht nur die fehlende Differenzierung zum Kleinwuchs, sondern auch die zu schnelle Differenzierung der Chondrozyten, da hierdurch der gesamte Ablauf gestört wird und nicht genügend Zeit zur Generierung von Wachstum zur Verfügung steht.

Hauptsignalwege der Chondrozytendifferenzierung

Derzeit sind 3 Hauptsignalwege bekannt, die diese Feinabstimmung von Wachstum, Proliferation und Differenzierung regulieren (Vortkamp, 2001). Zum einen ist hier der Indian hedgehog (Ihh) / Parathyroid-hormone-related-peptide (PTHrP) Signalweg zu nennen (Juppner, 2000). Ihh wurde vor einigen

Jahren als ein zentrales Signalmolekül in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung identifiziert. Ihh wird in den prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und signalisiert von dort entweder direkt an die angrenzenden undifferenzierten Chondrozyten oder indirekt über das Perichondrium und PTHrP. Hierbei scheint Ihh direkte und indirekte Funktionen zu haben. Indirekt reguliert es die Expression von PTHrP, welches normalerweise in der Gelenk nahen Region exprimiert wird. PTHrP wiederum signalisiert über den PTH-Rezeptor, der von proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird, dass diese Zellen in einem nichthypertrophen proliferativen Status belassen werden. Ihh und PTHrP formen somit einen Rückkopplungsmechanismus, wobei Ihh die Synthese von PTHrP hochreguliert und dabei indirekt den Prozess der Chondrozytenhypertrophie verlangsamt.

Der andere wichtige Signalweg betrifft FGF und seine Rezeptoren, die FGFRs (Ornitz, 2002). FGFs sind in eine Vielzahl von Entwicklungs- und anderen physiologischen Prozessen involviert, wo sie als potente Mitogene und Differenzierungsfaktoren wirken. Die Aktivität und Spezifität von FGF/FGFR-Komplexen hängt direkt von der gewebespezifischen Expression der Rezeptoren, der Liganden sowie von splice-Varianten und der Komposition der extrazellulären Matrix ab. Die extrazelluläre Matrix bindet FGFs. Für die FGF-Signaltransduktion sind vor allem Heparansulfate notwendig. Unter Anwesenheit von Heparansulfaten bindet der Li-

gand FGF an einen der Rezeptoren, der dann mit einem anderen FGF-Rezeptor dimerisiert, was zur Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion durch gegenseitige Phosphorylierung der Rezeptoren führt. Im Knorpel scheinen besonders FGFR1 und FGFR3 wichtig zu sein. FGFR3 wird in den proliferierenden Chondrozyten exprimiert, während FGFR1 vornehmlich in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird. FGFR3 wirkt als ein Regulator der Chondrozytenproliferation und -hypertrophie. Dies zeigt sich z.B. durch Inaktivierungsexperimente in der Maus, bei dem ein Fgfr3-knockout zum verstärkten Wachstum der

langen Röhrenknochen führt, während die Expressionen von aktivierenden Mutationen zum Kleinwuchs führen.

Der dritte wichtige Signalweg bei der Chondrozytendifferenzierung involviert die große Familie der TGF β -Faktoren und hier insbesondere die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und deren Rezeptoren (Reddi, 2001). In der Wachstumszone werden eine Reihe verschiedener BMPs exprimiert, teilweise im Perichondrium (BMP2, BMP4), teilweise in den hypertrophen Chondrozyten (BMP6). Ähnlich wie bei den FGFRs scheint sich hier eine Spezifität des Signals durch die verschiedene Kombination von Liganden (BMPs) mit deren Rezeptoren zu finden. Diese Rezeptoren bilden Homodimäre und Heterodimäre und tragen somit zur weiteren Signaldiversifizierung bei. Die 3 Signalwege IHH/PTHrP, FGF und BMP interagieren. In der Wachstumszone inhibieren FGFs die Funktionen von BMPs, in dem sie die Expression von IHH inhibieren, was zu einer herabgesetzten Chondrozytenproliferation führt bei gleichzeitig akzellerierter Differenzierung.

Der letzte Schritt der enchondralen Ossifikation ist der Ersatz des hypertrophen Knorpels durch Knochen. Dies setzt eine vaskuläre Invasion voraus, ein Vorgang, der initiiert und kontrolliert wird durch eine Reihe von antiangiogenen und angiogenen Faktoren (Gerber, 2000). Hypertrophe Chondrozyten exprimieren den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der die vaskuläre Invasion initiiert, wenn er aktiviert wird. VEGF wird vom Transkriptionsfaktor RUNX2 reguliert, der bei der cleidocranialen Dysplasie mutiert ist (siehe Abschnitt „cleidocraniale Dysplasie“). Dies kann möglicherweise zum Kleinwuchs dieser Patienten beitragen. VEGF wird durch den Verdau mit bestimmten Metalloproteinasen (Mmp9) aktiviert. Mmp9 wiederum wird von Osteoklasten produziert. Der hypertrophe Chondrozyt unterstützt außerdem seine eigene Beseitigung indem er Mmp13 exprimiert. Mmp13, alleine hat wenig proteolytische Aktivität, wird aber stark durch Mmp9 aktiviert.

Dieses komplexe Zusammenspiel regelt zusammen mit einer großen Zahl von weiteren Faktoren, den Abbau von Knorpel versus den Neubau von Knochen.

Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die extrazelluläre Matrix (ECM) der Chondrozyten trägt erheblich zur Funktion der Wachstumsfuge bei (Olsen, 2000). Knorpel ist durch eine einzigartige ECM charakterisiert, die ungefähr 90% des Gewebevolumentums ausmacht. Die Hauptkomponente ist fibrilläres Kollagen, welches dem Gewebe seine Festigkeit verleiht. In ruhenden und proliferierenden Chondrozyten wird insbesondere Kollagen Typ II produziert, welches zusammen mit Kollagen Typ XI und Kollagen Typ IX Fibrillen bildet. Im Gegensatz hierzu wird Typ X Kollagen spezifisch von hypertrophen Chondrozyten hergestellt. Proteoglykane, insbesondere Aggrecan, sind in großen Mengen im Knorpel vorhanden. Diese riesigen Moleküle mit einer gelartigen Konsistenz bestehen aus einem zentralen Protein, an das verschiedene Arten von Glykosaminoglykanen angehängt sind, die hoch sulfatiert und daher negativ geladen sind. Dieses wiederum führt zur Bindung von Wassermolekülen, was zur großen Elastizität des Knorpels beiträgt. Proteoglykane und Kollagene werden durch verschiedene Verbindungsmoleküle zu einem großen Netz zusammengehalten: Hierzu gehört u.a., das cartilage oligomeric matrix protein (Comp). Im Gegensatz zum Knorpel besteht Knochen vorwiegend aus Kollagen Typ I. Knochen enthält nur wenig Proteoglykane, statt dessen jedoch 2/3 Hydroxyapatit, was zur rigiden Struktur des Knochens entscheidend beiträgt. Die extrazelluläre Matrix ist nicht nur notwendig für die Belastbarkeit und die physikalische Stärke des Gewebes, sondern dient gleichzeitig auch als Substrat für die Regulation von Signalmolekülen. Insbesondere die Glykosaminoglykane scheinen entscheidend die Diffusion von bestimmten Signalen wie FGFs, Ihh, und wohl auch den BMPs zu beeinflussen, wodurch die Signaltransduktion weiter modifiziert wird.

Entscheidend für die normale Funktion der Wachstumsfuge ist somit eine fein abgestimmte Regulierung von Proliferation und Differenzierung. Jede Störung dieser Balance, sei es durch Veränderungen in den wichtigen Signalmolekülen, oder durch eine Mutation in einem Matrix kodierenden Gen, führt unweigerlich zu einer Störung dieses Gleichgewichts und somit zum verminderten Wachstum. Die große Anzahl von verschiedenen Phänotypen, hervorgerufen durch Mutationen in Genen, die eine Rolle im Skelett spielen, reflektiert dieses komplexe Geschehen und führt uns gleichzeitig zu wichtigen Erkenntnissen über die biologische Funktion einzelner Komponenten dieses Systems. Langfristig bleibt zu hoffen, dass unsere zunehmende Erkenntnis über die Biologie dieses Prozesses auch zu Erkenntnissen führt, die in erfolgreiche Therapien für Patienten mit Chondrodysplasien umgewandelt werden können.

Literatur

- Gerber HP, Ferrara N (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med* 10: 223-8.
- Juppner H (2000) Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol* 14: 606-11.
- Kornak U, Mundlos S (2003) Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet* 73: 447-74.
- Olsen BR, Reginato AM, Wang W (2000) Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 191-220.
- Ornitz DM, Marie PJ (2002) FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 16: 1446-65.
- Reddi AH (2001) Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis Res* 3: 1-5.
- Vortkamp A (2001) Interaction of growth factors regulating chondrocyte differentiation in the developing embryo. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A: S109-17.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Stefan Mundlos
Institut für Medizinische Genetik
Charité, Campus Virchow
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin
stefan.mundlos@charite.de