

13. Jahresbericht über das Gemeinschaftsforschungsprojekt Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP)

von Dr. med. Frederick S. Kaplan, Dr. David L. Glaser und Dr. Eileen M. Shore

Karten aus der Antike eröffnen einen merkwürdigen und erstaunlichen Blick darauf, was Forscher und Kartographen dieser Zeit über die angebliche Realität wussten. Eine Karte aus dem frühen 13. Jahrhundert stellt ein Schiff dar, das um die Ecke fährt, während eine spätere Karte aus dem 17. Jahrhundert die vagen Umrisse der Kontinente wiedergibt, die noch nicht kartographisch erfasst waren und manchmal nur auf Phantasien beruhten. In vielerlei Hinsicht ist die FOP-Forschung wie das Erforschen einer Welt, die noch in ein Mysterium eingehüllt ist. Die FOP-Forschung ist im Grunde die Wissenschaft der Entdeckung und Hoffnung. Es ist die Mission der FOP-Forschung, die molekulare und genetische Topografie der FOP-Welt zu finden, und dieses Wissen für eine wirkungsvolle Prävention, Behandlungsmöglichkeiten und schließlich für eine Heilung herzunehmen. Jährlich werden die Karten des FOP-Universums besser und unsere Reise und deren endgültiges Ziel werden klarer.

Wichtige Fortschritte in der FOP-Forschung im Laufe des Jahres 2003:

1. Die Entdeckung, dass die Signalgebung überaktiver BMP4-Rezeptoren mit grundlegenden Abnormalitäten in der Leitung der BMP-Rezeptoren durch die Zellmembran zusammen hängt.
2. Die Entdeckung stark klebender Zellen aus peripherem Blut von FOP-Patienten, die in Kulturen spontan mineralisieren.
3. Die Einsatz der „Micoarray“-Technologie, um die nachgeschalteten Bahnen und Ziele der BMP4-Signalisierung in FOP-Zellen zu untersuchen.
4. Die Aufnahme von drei neuen Familien, in denen mehrere Generationen betroffen sind, in die genomweite Kopplungsanalyse. Damit sind es nun insgesamt sieben Familien weltweit, in denen mehrere Generationen betroffen sind.
5. Die Verfeinerung und Veröffentlichung von Versuchssystemen für heterotope Ossifikation, ausgelöst durch BMP4.
6. Die Aufnahme von Knochenmarkstammzelllinien von FOP-Patienten zur Untersuchung von früher nicht zugänglichen BMP-Signalbahnen in Bindegewebszellen.
7. Die Erforschung von Zelloberflächenheparansulfatproteoglykanen bei FOP- und Kontrollzellen und deren Rolle bei der Regulierung der BMP4-morphogenen Gradienten.
8. Die Erforschung antineoplastischer und antiangiogener Eigenschaften von Aminobisphosphonaten bei heterotoper Ossifikation, ausgelöst durch BMP4.
9. Die Veröffentlichung des „Proof-of-Concept“ der Noggin-Gen-Therapie für Krankheiten heterotoper Ossifikation, ausgelöst durch BMP4.
10. Die Zusammenarbeit mit Industriepartnern im Bereich der Entwicklung von induzierbaren Gen-Therapie-Vektoren, damit die Noggin-Gen-Therapie für die Behandlung von FOP vorangetrieben wird.

Zusätzlich zu neuen Pilotprojekten und laufenden Langzeitstudien richtet sich das Hauptaugenmerk unserer Forschungsarbeiten 2004 auf folgende Themen:

- a. Weitere molekulare Charakterisierung von BMP4-Rezeptorenabnormalitäten in FOP-Zellen.
- b. Die Kartierung von FOP-Gen-Standorten in höherer Auflösung, ermöglicht durch die genomweite Kopplungsanalyse von drei hinzugekommenen Familien, in denen mehrere Generationen betroffen sind.
- c. Vertiefte „Microarray“-Studien des BMP4-Signalwegs in FOP-Zellen.
- d. Die phänotypische und molekulare Charakterisierung aus Blut gewonnener, klebender Stammzellen von FOP-Patienten.
- e. Weiterführende vorklinische Arbeit am Einsatz der COX-2-Hemmer, Aminobisphosphate und der Noggin-Gen-Therapie für die Behandlung von FOP.
- f. Die Untersuchung von Technologien, um die BMP-Signalgebung in den FOP-Zellen am aktivierten BMP-Rezeptor oder dahinter angelagert zu blockieren.

Im diesjährigen Jahresbericht werden wir den Fortschritt im Kampf gegen FOP erörtern. Wir werden die Entdeckungen in den Labors und in der Klinik genauso beschreiben wie einen groben Abriss über unsere Forschungspläne für das kommende Jahr. Zusätzlich werden wir, wo es notwendig ist, den Hintergrund liefern, damit es Ihnen leichter fällt zu verstehen, wie diese Arbeit in das umfangreiche Bild der Entwicklung wirkungsvoller Vorkehrungsmaßnahmen, Behandlungen und schließlich einer Heilung für FOP passen.

Während die Mission der FOP-Forschung klar ist, sind die Forschungserkenntnisse in sich noch nicht abgeschlossen, aber Meilensteine auf einer Reise, die schließlich in einer Heilung für FOP enden

wird. Viele der Arbeiten, über die wir vergangenen April im zwölften Jahresbericht schrieben, entwickeln sich weiter. Viele dieser Projekte sind technisch komplex und werden einige Jahre benötigen, bis sie beendet sind. In einigen Projekten tauchen regelmäßig wertvolle Informationen auf, die schrittweise an Sie weitergegeben werden, zumal sie dann bereits von unseren Kollegen auf ihre Richtigkeit geprüft und kritisch unter die Lupe genommen wurden. In anderen Projekten tauchen nützliche Informationen unerwartet und unbeabsichtigt auf und wie jeder, der mit medizinischer Forschung zu tun hat, sind wir immer sehr gespannt auf diese aufklärenden Erkenntnisse. 2003 gab es einige solcher Entdeckungen und wir sind richtig nervös, Ihnen darüber zu berichten.

Der Ablauf wissenschaftlicher Untersuchungen unterliegt einem allgemein gültigen Standard und ist der am besten strukturierte unter allen menschlichen Bemühungen. Erkenntnisse gehen selten, wenn überhaupt, einen vorhersehbaren Weg. Manchmal kriechen sie voran und manchmal springen sie mit einem Schwung voran, der jeden sprachlos macht. Es gibt selten, wenn überhaupt, Vorzeichen für derartige Entdeckungen. Sie passieren, wie jedes Kind weiß das versucht ein Rätsel zu lösen, mit der plötzlichen Eingebung, dass gerade etwas Neues geschieht - Teile, die zuvor nicht stimmig schienen, fangen an auf eine völlig neue Art zusammen zu passen. Dies war vergangenes Jahr der Fall, als wir entdeckten, dass eine Zelle aus dem peripheren Blut von FOP-Patienten eine Anhäufung mineralisierter klebender Zellen in Kulturen zur Folge hat, was das Vorhandensein von zirkulierenden knochenbildenden Stammzellen vermuten lässt; mehr darüber aber später.

Kürzlich legten wir im „Proof-of-Concept“ dar, dass eine genetisch veränderte Form des Noggin-Proteins, eingebracht durch Gentherapie, heterotope Knochenbildung, ausgelöst durch das knochenmorphogenetische Protein 4 (BMP4), in einem Versuch mit Mäusen erfolgreich verhindern kann. Dies ist sehr wichtig für die Behandlung von FOP. In diesen Fortschritten, die überaktive BMP-4-Signalgebung in FOP-Zellen zu unterbrechen, steckt große Hoffnung für die Zukunft. Im Dezember 2003 wurde eine wichtige wissenschaftliche Abhandlung veröffentlicht, die diese bahnbrechende Arbeit beschreibt. Die endgültigen Behandlungsformen von FOP werden nur so gut sein wie es das Grundlagenwissen zulässt, und dieses Wissen resultiert aus einem Grundlagenwissen über die abnormalen genetischen Netzwerke und Signalbahnen der FOP-Zellen.

Dieses Jahr baut einer unserer beiden dargelegten Durchbrüche auf die Entdeckung des vergangenen Jahres im Bereich der molekularen Signalgebung auf.

Wir wissen seit Jahren, dass einige FOP-Zellen zu viel BMP-4, und nicht genügend BMP-4-Antagonisten, Noggin und Gremlin, produzieren. Wie wir bereits sagten, es ist, als würde das Gaspedal bei voller Geschwindigkeit feststecken und die Notbremse würde versagen. Wir haben kürzlich auch erkannt, dass die FOP-Zellen in ihrem Innern nicht in der Lage sind, die Konzentration von BMP-4 in ihrem Umfeld richtig zu erfassen, zu verarbeiten und zu regulieren. Damit bringt man eine verdunkelte Windschutzscheibe an ein bereits fahrendes Auto an. Diese Entdeckungen deuten auf zwei unterschiedlichen Untersuchungsbereichen auf den gleichen Bereich der Zellsignalisierung hin – auf die BMP-Rezeptoren und deren damit zusammen hängenden Moleküle, die den Pegel von BMP4 in der Zellumgebung erfassen, überwachen. und regulieren.

2002 erhielten wir die Bestätigung, dass FOP-Zellen einen Überfluss eines der BMP4-Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche haben und dass dieses Protein, das die BMP4-Konzentration richtig regulieren sollte, in der „an“-Stellung bleibt, sobald es aktiviert ist. 2003 begannen wir damit, den Mechanismus zu untersuchen, durch den diese Situation auftritt. Während wir bis jetzt noch nicht alle Antworten haben, fanden wir etwas sehr interessantes heraus; dass BMP-Rezeptoren nicht richtig in FOP-Zellen eingebaut sind.

Der Transfer des BMP-Rezeptors zu und von der Zelloberfläche heißt Rezeptor-Trafficking.

2003 entdeckten wir, dass das BMP-Rezeptor-Trafficking in FOP-Zellen grundlegend gestört ist.

Genau genommen schafft es der aktivierte BMP-Rezeptor nicht, in die Zelle zu gelangen, und folglich bleibt er auf der Membran aktiv. Mit anderen Worten scheint es auf der Zellmembran einen molekularen Stau zu geben, der den BMP-Signalweg dazu veranlasst, aktiv zu bleiben, wenn er erst einmal daran beteiligt ist. Diese wichtige molekulare Verknüpfung zwischen Signalgebung und Trafficking ist eine der heißesten Bereiche in der molekularen Zellbiologie und scheint stark in die FOP-Pathophysiologie mit eingebunden zu sein. Während wir bereits viel über die Beziehung zwischen dem Trafficking und der Signalgebung bei sich transformierenden Wachstumsfaktor-beta-Rezeptoren (die Obergruppe von Molekülen der BMP-Rezeptoren) wissen, wissen wir fast nichts darüber, wie sich die BMP-Rezeptoren über die Zellmembran bewegen. Wahrscheinlich gewinnen wir im kommenden Jahr mehr Kenntnisse und Einsichten über dieses äußerst wichtige und spannende Gebiet der FOP-Forschung.

Der zweite aufgeführte Durchbruch im diesjährigen Jahresbericht ergab sich auf dem Gebiet der Stammzellenbiologie bei Erwachsenen. Er beinhaltet die glückliche Entdeckung (im FOP-Labor Ende Mai 2003), dass eine stark anheftende und mineralisierende Gruppe von Stammzellen, die aus dem peripheren Blut bei FOP-Patienten stammen, existiert. Die Auswirkungen dieser beiden Entwicklungen sind potenziell unermesslich, aber mehr darüber später.

Wie gehabt, unterteilt sich der Jahresbericht von diesem Jahr ist in neun größere Abschnitte, die die riesige Menge an Arbeit und an Aktivitäten im FOP-Kernlabor und den damit in Zusammenarbeit stehenden Labors am Klarsten aufbauen. Diese Abschnitte sind:

- I. Gene
- II. Signalwege
- III. Zellen
- IV. Modelle
- V. Auslöser
- VI. Therapien
- VII. Präsentationen, Versammlungen, Berichte und Veröffentlichungen
- VIII. Ihr FOP-Labor
- IX. Danksagung

Wir hoffen, dass Sie den diesjährigen Jahresbericht wieder interessant, ansprechend und hoffnungsvoll finden. Dies ist die Einstellung, mit der wir jeden Tag diese Arbeit angehen.

I. GENE

Familien mit mehreren Generationen & Studien über die FOP-Gen-Lokalisation

Die Identifizierung des Gens, das (wenn es verändert ist), FOP verursacht, wird der Schlüssel dazu sein, FOP, ebenso wie mehrere allgemein bekannte Krankheiten, bei der Entwicklung des Skeletts zu verstehen. Die Veränderungen, die für die meisten genetischen Krankheiten verantwortlich sind, werden dadurch identifiziert, dass man die Erbmuster markanter Teile der DNS (Polymorphismen genannt) über mehrere Generationen einer Familie verfolgt. Jedoch wurde für FOP auf der ganzen Welt noch keine so große Familie mit vielen Betroffenen gefunden. Kürzlich begann sich unsere Arbeit jedoch auszuzahlen. Im Bereich der Identifizierung von Familien mit mehreren betroffenen Generationen traten einige zufällige Entwicklungen auf. Diese Entwicklungen war die unerwartete Entdeckung zweier zusätzlicher Familien mit mehreren Generationen – eine in Großbritannien (dank der Arbeit unserer geschätzten Kollegen und Mitarbeiter Dr. Roger Smith & Dr. James Triffitt von der Oxford Universität) und die andere aus den Vereinigten Staaten. Vergangenes Jahr berichteten wir, dass wir mit jeder dieser Familien Kontakt aufnahmen. 2003 wurde bei beiden Familien FOP bestätigt und alle dafür wichtigen DNS-Proben genommen und es wurde sowohl an der Universität von Pennsylvania als auch in Oxford mit einer genomweiten Kopplungsanalyse begonnen. Zusätzlich wurde im Oktober 2003 eine dritte Familie aus Brasilien mit FOP-Erkrankten in mehreren Generationen identifiziert. Diese neue Familie war Ende Oktober 2003 auf dem Ersten Lateinamerikanischen FOP-Familientreffen. Alle Familienmitglieder wurden angeschaut und untersucht, FOP wurde bestätigt und Blutproben für die DNS-Analyse genommen. Zur Zeit wird bei allen Familien, in denen FOP in mehreren Generationen auftritt, (aus den Vereinigten Staaten, aus Großbritannien und Brasilien) eine umfangreiche genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt, und die Ergebnisse dieser Daten werden den Informationen, die von den vier bereits identifizierten FOP-Familien, mit Betroffenen in mehreren Generationen, hinzugefügt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich festzustellen, ob wir durch die Erweiterung durch die drei neuen Familien, in denen es Betroffene in mehreren Generationen gibt, das genetische Intervall, in dem das FOP-Gen sitzt, erheblich eingrenzen können, aber die neuen Daten bringen uns auf jeden Fall einen Schritt näher heran.

Weitere Familien mit mehreren Generationen existieren wahrscheinlich, aber sie haben vielleicht zu wenig Kontakt zur Medizin. Die wachsende Zahl medizinischer Forschungsarbeiten über FOP und das wachsende internationale Netzwerk bei der Zusammenarbeit von Ärzten und Wissenschaftlern, die FOP erkennen, verändert die Lage. Wir dürfen auch die Möglichkeit des Internets nicht unterschätzen, neue Informationen zu verbreiten und die Aufmerksamkeit von Ärzten, Wissenschaftlern und den Familien selbst zu wecken. Die Entdeckung der neuen FOP-Familie aus Brasilien ist auf die harte Arbeit von Dr. David Glaser aus Philadelphia und Dr. Patricia Delai aus Sao Paulo, Brasilien, und das Glück, zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu sein, zurück zu führen. Harte Arbeit ist ein notwendiger Bestandteil beim Lösen des FOP-Rätsels, aber von Zeit zu Zeit ist ein bisschen Glück jederzeit willkommen.

Was ist eine genomweite Kopplungsanalyse?

In den vergangenen Jahren haben wir immer wieder auf die Wichtigkeit einer genomweiten Kopplungsanalyse zur Ortsbestimmung und Identifizierung des FOP-Gens hingewiesen, aber bis jetzt haben wir nicht erklärt, was es ist oder wie es funktioniert. Es wäre hilfreich, das jetzt zu tun. Also, was ist eine genomweite Kopplungsanalyse? Die einfache Antwort ist, dass sie ein wissenschaftliches Werkzeug ist, mit dem man die klinischen Einzelheiten einer Krankheit (wie FOP) mit bestimmten molekularen und genetischen Markern in Beziehung setzen kann, die mit dem beschädigten, in Frage

kommenden Gen über mehrere Generationen hinweg weitergegeben werden, um dann die Informationen, die aus vielen solcher Familien gesammelt wurden, zu vergleichen, um die Stelle auf den menschlichen Chromosomen, wo das Gen höchstwahrscheinlich liegt, einzugrenzen. Aber um die Leistung des Konzeptes und die Nützlichkeit dieser Vorgehensweise zu verstehen, lässt uns für einen Moment abschweifen und nochmals einige wichtige Hintergrundinformationen und genetische Prinzipien betrachten.

Auf diesem Stand der Diskussion ist es wichtig, einen sehr wichtigen Punkt zu beachten: Wir sprechen oft von „dem FOP-Gen“. Aber natürlich befindet sich dieses Gen nicht im menschlichen Genom um FOP zu verursachen, sondern um ein Protein zu verschlüsseln, das bei der Anordnung unseres normalen Skeletts etwa sehr wichtiges (und bis jetzt unbekanntes) tut. Wenn das Gen beschädigt (oder verändert) ist, entsteht FOP. Was immer sich bei diesem Gen herausstellt, die Menschen mit FOP haben eine beschädigte Kopie des Gens und eine normale Kopie. Menschen, die nicht an FOP leiden, haben zwei normale Kopien. Deshalb nennen wir es „das FOP-Gen“, aber in Wirklichkeit ist ein normales Gen, das, wenn eine der beiden Kopien beschädigt ist, zu FOP führen kann.

Obwohl FOP eine Genkrankheit ist, haben die meisten Menschen mit FOP weder davon betroffene Eltern noch Verwandte. Bei den meisten Personen tritt FOP als spontane neue Mutation in einem bis jetzt nicht identifizierten Gen auf. Wir sagen „spontane Mutation“, weil es erstmals bei dieser Person auftritt und nicht von einem Elternteil ererbt wurde. Wir haben sechs Milliarden Geninformationen, verschlüsselt in der DNS, im Kern jeder unserer Zellen. Wenn sich eine Zelle teilt, wird die DNS mit fast perfekter Genauigkeit kopiert. Nichtsdestotrotz können sich manchmal ein paar Fehler einschleichen, wenn sechs Milliarden Informationen kopiert werden. Wenn diese Veränderungen innerhalb der Gene auftreten, zerstören sie oft die Menge oder die Qualität eines Proteins, das durch dieses Gen erzeugt wird. Wenn eine Person erst einmal eine Genmutation, die FOP auslöst, hat, (was auch immer das Gen ist), besteht eine 50 %-ige Wahrscheinlichkeit, dass die betreffende Person die beschädigte Kopie des betroffenen Gens an jedes Kind, das er oder sie einmal bekommt, weitergibt.

Jede Zelle mit Kern in unserem Körper erhält eine vollständige Ausstattung mit 6 Milliarden Basenpaaren DNS, mit zwei Kopien jedes Gens, eine Hälfte vom Vater und eine von der Mutter, verteilt auf 23 Chromosomenpaare (22 Autosomen) und zwei Geschlechtschromosomen (XY bei Männern und XX bei Frauen). Jedoch verringern die Keimdrüsen (Hoden und Eierstöcke) durch den Prozess der Reifeteilung oder durch genetische Reduktion geschickt die Anzahl der Chromosomen auf die Hälfte, sodass jede Spermazelle und jede Eizelle nur eine statt zwei Kopien eines jeden Gens enthält. Würde das nicht passieren, hätten wir von Generation zu Generation mehr Chromosomen. Dies klingt vielleicht nach einer guten Sache, aber das ist sie nicht. Zuviel des Guten kann sehr schlecht sein. Drei Kopien eines Chromosoms (so wie z. B. bei drei Chromosomen 21) können zum Downsyndrom führen. Der Körper muss sicher stellen, dass nicht zu viele bzw. zu wenig Geninformationen vorhanden sind, sondern genau die richtige Anzahl in jeder Zelle. Also wird bei der Produktion jeder Sperma- und Eizelle die genetische Information auf die Hälfte reduziert, sodass bei der Befruchtung die Rekombination der DNS des Vaters und der Mutter genau die richtige Anzahl von Genen und Chromosomen in jeder Zelle ergibt.

Der Einfachheit halber stellt euch vor, dass es in jeder Zelle in unserem Körper nur ein Chromosomenpaar gibt – eine Kopie von der Mutter und eine vom Vater. Beim Prozess der Sperma- oder Eizellenbildung, gibt es am Ende die Hälfte der Gene in den elterlichen Körperzellen, wie wir vorher schon sagten. Aber es ist nicht so, dass ein Chromosom zu einer Spermazelle oder einer Eizelle wandert. Bevor ein Chromosom auf eine Spermazelle oder Eizelle verteilt wird, wird die DNS wieder aufgemischt (während des Prozesses der meiotischen Rekombination), sodass jedes Chromosom eine Kreuzung der elterlichen Chromosomen ist.

Stellt euch zum Beispiel vor, dass in einer elterlichen Zelle, die zwei Kopien des gleichen Chromosoms enthält, eine Kopie blau (ursprünglich vom Großvater) und eine Kopie rot (ursprünglich von der Großmutter) ist. Was bei der Bildung einer jeden Spermazelle oder Eizelle geschieht, ist, dass die genetische Information an jeder Stelle (Platz auf dem Chromosom) neu gemischt wird, so dass die zwei daraus entstehenden Chromosomen wie Zuckerstangen mit blauen und roten Streifen von den ursprünglichen Chromosomen aussehen. Also, anstatt zwei Chromosomen, ein rotes und ein blaues, besitzt die Zelle schließlich zwei Chromosomen, von dem jedes bunt wie eine Zuckerstange ist. Dann gelangt ein (hybrides) Zuckerstangen-Chromosom in die eine Spermazelle und das andere reziproke „Zuckerstangen“-Chromosom in die andere Spermazelle (beim Vater, oder in zwei verschiedene Eizellen bei der Mutter). Im Wesentlichen ist das der Ablauf, wie sich Großmutter und Großvaters DNS in den Keimdrüsen jeden Elternteils mischen bevor sie wieder auf jede Sperma- oder Eizelle

verteilt wird. Die Teile (jeder rote oder blaue Strang), die bei der Bildung der Keimzellen wieder gemischt werden (um jedes neue Hybridchromosom zu beinhalten), belaufen sich in der Länge vielleicht auf eine halbe Million oder eine Million Basenpaare.

Jeder Bereich der DNS hat von Person zu Person seine eigene individuelle Identität, die im Wesentlichen als molekularer Strichcode wirkt, um den Ursprung eines jeden Segments der DNS auf der gesamten Länge des neuen Hybridchromosoms zu identifizieren. Es ist diese einzigartige molekulare Signatur, die wir benutzen, um jedes zuckerstangenähnliche Feld der DNS, das in jeder Generation wieder neu gemischt wird, zu verfolgen, und es ist die Wiedervermischung der genetischen Informationen der Sperma- oder Eizelle, die uns als Grundlage der Kopplungsanalyse dient.

Jetzt stellen Sie sich vor, dass ein Mann mit FOP eine Frau heiratet, die nicht FOP hat, und dass sie beschließen, ein Familie zu gründen. Stellen Sie sich weiter vor, dass sie sich dazu entschließen, eine sehr große Familie mit 100 Kindern zu haben. Zufällig werden 50 der Kinder FOP bekommen und 50 nicht. Jedes dieser 50 Kinder, die FOP haben, hat eine beschädigte Kopie des FOP-Gens (um welches auch immer es sich dabei handelt) ihres betroffenen Vaters erhalten, während jedes der anderen 50 Kinder, die kein FOP haben, eine normale Kopie des FOP-Gens von ihrem Vater erhalten. Alle Kinder hätten natürlich eine normale Kopie des FOP-Gens von ihrer Mutter erhalten, da beide Kopien des FOP-Gens der Mutter normal sind. Da alle Gene (und der größte Teil der DNS, die sie umgibt) ihren einzigartigen molekularen Strichcode besitzen, ist es einfach zu verfolgen, welche Kopien eines jeden Gens welchem Kind im gekreuzten zuckerstangenähnlichen Chromosom übertragen wurden, das von jedem Elternteil in der Sperma- oder Eizelle stammt.

Der erste Schritt in der genomweiten Kopplungsanalyse ist, auf klinischem Weg herauszufinden, welche Kinder FOP haben und welche nicht. Dieser Teil ist einfach! Der nächste Schritt ist, Blutproben von Mutter, Vater und allen 100 Kindern zu entnehmen und die DNS aus den Blutzellen zu isolieren. Bei FOP ist dies der einfachste Weg DNS zu erhalten, da Blutabnahmen selbst keine FOP-Schübe verursachen solange sie vorsichtig entnommen werden. Wie wir bereits erwähnten, gibt es auf jedem kleinen Abschnitt der DNS entlang des Chromosoms einzigartige Marker, wie molekulare Strichcodes, die sich von Mensch zu Mensch unterscheiden und die dazu benutzt werden können, das elterliche Original eines jeden kleinen Segments der DNS zu identifizieren.

Wie bestimmen wir also, wo das FOP-Gen auf den Chromosomen liegt? Als nächstes führen wir eine Analyse durch, und dazu benutzen wir die einzigartigen Marker für jedes DNS-Segment und stellen die folgenden Fragen: Man nehme immer zwei Kinder dieser Familie, die FOP haben, und bestimme, welche Stücke von Vaters DNS sie gemeinsam haben (da in unserem hypothetischen Beispiel der Vater an FOP leidet). Es gibt Tausende von DNS-Stücken des betroffenen Vaters, die die zwei betroffenen Kinder rein zufällig gemeinsam haben. Dann nimmt man noch ein weiteres betroffenes Kind zur Analyse hinzu und stellt die gleiche Frage. Welche Stücke von Vaters DNS haben alle drei betroffenen Kinder gemeinsam? Indem man nach und nach betroffene Kinder in die Analyse mit einbezieht, wird man die DNS-Stücke, die sie zufällig gemeinsam haben, ausschließen können. Wenn genügend Kinder in die Analyse aufgenommen wurden, sollte man das einzige Segment der DNS des Vaters (in unserem Beispiel der betroffene Elternteil) herausfinden können, das alle 50 betroffenen Kinder gemeinsam haben (mit anderen Worten – das DNS-Stück, das die beschädigte Kopie des FOP-Gens enthält). Wenn man die gleiche Analyse mit den 50 nicht betroffenen Kindern durchführt, sollte man auf die gleiche Weise das einzige DNS-Stück vom Vater, das alle nicht betroffenen Kinder gemeinsam haben, finden können (bei dem es sich um die unbeschädigte Kopie des selben Gens handeln sollte). Wenn es in der Familie genug Kinder gibt (wie in unserem Beispiel bei einer einzigen hypothetischen Familie mit 100 Kindern), sollte man schließlich den Bereich der DNS eingrenzen können, der das Gen enthält, das hier von Interesse ist, und das alle betroffenen Kinder gemeinsam haben und das keines der nicht betroffenen Kinder (die nicht an FOP leiden) besitzt. Mit anderen Worten sollte man unterscheiden können zwischen dem väterlicherseits ererbten Segment (Genort) der beschädigten DNS, das bei allen betroffenen Kindern gemeinsam vorhanden ist, und der unbeschädigten Kopie des gleichen Genortes, den alle nicht betroffenen Kinder gemeinsam haben. Und dann ist dies der Punkt, auf dem das FOP-Gen sitzen muss.

Bei diesem Punkt in der Analyse weiß man jedoch nicht, was das Gen ist, aber man weiß, wo es sich auf dem Chromosom befindet. Das ist, in der Tat, der Prozess der Kopplungsanalyse. Auf diese Weise verknüpft man das beeinträchtigte Merkmal von FOP mit dem molekularen Strichcode, wo das FOP-Gen durch den Prozess der Eliminierung sitzen muss. Für einige genetisch bedingte Krankheiten, bei denen große Familien mit mehreren betroffenen Generationen existieren, ist es durchaus möglich, die Stelle des krankheitsverursachenden Gens durch die Durchführung einer genetischen Analyse in einer derartigen Familien genau fest zu legen. Für FOP existieren solch große

Einzelfamilien, bei denen mehrere Generationen betroffen sind, natürlich nicht, und es ist notwendig, die Schlüssel vieler kleinerer Familien zusammen zu stückeln.

Im nächsten Schritt analysiert man die DNS die das interessierende Gen enthält, um heraus zu finden, welche Gene sich hier befinden könnten. Abhängig von der Größe der Familie, in der mehrere Generationen betroffen sind oder der Anzahl dieser besagten Familien, die analysiert wurden, enthält das Segment vielleicht 5 bis 50 Gene. Vielleicht gibt es ein Gen, das bereits identifiziert wurde und das vielleicht das „richtige“ FOP-Gen ist. Dann entschlüsselt man das in Frage kommende Gen und untersucht es auf Mutationen. Bis jetzt haben wir nach in Frage kommenden Genen sowohl innerhalb verdächtiger Kopplungsbereiche als auch innerhalb funktionaler in Frage kommender Signalwege gesucht.

Eine Suche nach dem in Frage kommenden Gen in einem Bereich des Genoms, wo die Kopplungsanalyse das Vorhandensein des FOP-Gens voraussagt, ist strategischer ausgelegt als die Entschlüsselung aller in Frage kommender Gene, ungeachtet dessen, wo sie vielleicht auf dem Genom sitzen. Weil unsere Kopplungsanalyse nicht aussagekräftig genug war (Mangel an genügend Familien mit mehreren betroffenen Generationen und Mangel an genügend Personen innerhalb jeder Familie), mussten wir uns stärker auf den globaleren Ansatz hinsichtlich des in Frage kommen Genes stützen, als auf den Ansatz, das in Frage kommende Gen auf einen klar umrissenen chromosomalen Bereich einzugrenzen. Wir denken, das wird sich ändern.

Es ist auch möglich, dass das DNS-Segment, wo das FOP-Gen sitzt, vielleicht keine offensichtlich in Frage kommenden FOP-Gene enthält. Wie kann das sein? Ja, es könnte so sein, weil bis jetzt noch nicht alle Gene in diesem Bereich der DNS identifiziert worden sind. Wir kennen die gesamte Abfolge der DNS auf der gesamten Länge jedes Chromosoms, aber wir wissen weder genau, wo alle Gene sind, noch welche Proteine sie verschlüsseln. Aber wenn die Kopplungsanalyse die Lage des FOP-Gens vorhersagt (im Bereich von einigen hunderttausend Basenpaaren), kann man das molekulare Einsatzteam an die Stelle befördern, ohne genau zu wissen, was man finden wird, aber zu wissen, dass dieses der wahrscheinlichste Punkt ist, wo das Übeltäter-FOP-Gen sitzt. Um so mehr Familien mit mehreren betroffenen Generationen es gibt, und umso größer jede Familie ist, um so leichter wird es sein, die präzise Stelle und die Identität des FOP-Gens zu herauszufinden.

Eine wichtige Frage, die oft auftaucht, lautet: „Wenn das FOP-Gen entdeckt ist, wie wird uns das bei der Behandlung von FOP helfen?“ Wenn das FOP-Gen erst einmal identifiziert ist, wird einer der ersten Schritte sein zu versuchen, den selben genetischen Schaden in einer Maus zu erzeugen, um herauszufinden, ob es sich auch wirklich um das FOP-Gen handelt. Es ist möglich, dass der selbe genetische Schaden in einer Maus vielleicht kein FOP verursacht, aber es ist wahrscheinlich, dass es so sein wird. Dadurch, dass man Mäuse züchtet, die FOP haben, wird es viel einfacher sein, die echte Biologie von FOP zu untersuchen und zuerst Behandlungen bei Mäusen auszuwerten als bei Erwachsenen und Kindern, die an FOP leiden. Die Identifikation des FOP-Gens ist eindeutig das wichtigste Wissen das wir benötigen, um das Rätsel von FOP zu lösen.

Die Sequenzierung von Kandidatengen

Vorher berichteten wir von der Identifizierung einiger FOP-Familien, deren DNS-Analyse unsere Untersuchungen zur genetischen Kartierung ergänzen könnte. Obwohl keine der Familien eine traditionelle Familie mit mehreren Generationen war, besaß jede einzigartige genetische Charakteristika, die uns dabei halfen, der chromosomalen Lage des FOP-Gens näher zu kommen. Die Nützlichkeit solcher Studien für das weitere Eingrenzen der Lage des FOP-Gens ist wichtig, und neue Daten aus der genomischen Kartierung werden sorgfältig analysiert, gemeinsam mit den Daten der sieben traditionellen FOP-Familien mit mehreren betroffenen Generationen. Die Analyse läßt bis jetzt kleine Bereiche auf einigen Chromosomen vermuten und wir verfolgen diese Spur nachdrücklich. Zusätzlich untersuchen wir weiterhin in Frage kommende Gene sowohl innerhalb als auch außerhalb des Kopplungsbereichs; Gene die, wenn sie verändert sind, FOP verursachen könnten. Diese Kandidaten beinhalten Gene, die mit dem Signalweg des knochenbildenden Proteins zu tun haben, Gene, die die Entwicklung des Knochenbaus und/ oder des Knochenmarks kontrollieren, ebenso Gene, die bei der Immunfunktion und/ oder Entzündung eine Rolle spielen. Durch diese gezielte Sequenzierung schließen wir nach und nach vielversprechende, in Frage kommende Gene aus, aber es gibt noch viele weitere zu untersuchen. Während überall auf der Welt in den Laboratorien weiter daran gearbeitet wird, das menschliche Genom zu entschlüsseln, liefert die potenzielle Bedeutung eines neu identifizierten Gens wichtige Informationen und Perspektiven über das genetische Signalnetzwerk bezogen auf FOP. Da diese gezielte Arbeit bei der DNA-Sequenzierung sehr aufwendig ist, ist es wichtig, dass wir kein potenzielles FOP-Gen unerforscht lassen.

Gene ohne Proteine; Gene mit vielen Proteinen

Die Beziehung zwischen einem Gen und einer Krankheit ist der erste Schritt in der Genom-Medizin. Während des vergangenen Jahres haben sich einige sehr wichtige Einblicke, als Ergebnis der fortgeführten Arbeit am menschlichen Genomprojekt, aufgetan. Von den schätzungsweise 30.000 Genen im menschlichen Genom verschlüsseln ungefähr die Hälfte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht identifizierte Proteine. Mit Hilfe verfügbarer genetischer Techniken wird die Funktion dieser Proteine aufgeklärt.

Obwohl die Suche nach unserem in Frage kommenden FOP-Gen sowohl bekannte als auch unbekannte Gene einschließt, die mit der Regulierung der Skelettbildung zu tun haben, ist es sehr gut möglich, dass das FOP-Gen ein Protein verschlüsselt, das bis jetzt noch nicht bekannt ist. Des Weiteren verschlüsseln viele Gene keine Proteine, sondern vielmehr kleine Ribonukleinsäure (RNS)-Moleküle, die strukturelle oder regulative Funktionen bei der wichtigen Zellkommunikation und dem Austausch innerhalb des Netzwerks haben.

Kürzlich wurde (durch den Prozess der Kopplungsanalyse wie sie bereits im vorausgegangen Abschnitt dieses Berichtes beschrieben wurde) ein Gen für eine Skelettkrankheit entdeckt, aber dieses Gen codierte kein Protein. Es verschlüsselte vielmehr eine kleine RNS, die die Regulierung wichtiger Genschalter kontrolliert. Viele Gene verschlüsseln auch mehr als ein Protein. Der Protein-codierende Anteil eines Gens (im Unterschied zum Regulierungs- oder „Schalter“-Anteil eines Gens) wird Exon genannt. Die meisten menschlichen Gene setzen sich aus vielen Exons zusammen, jedes davon ist durch dazwischen geschobene nicht verschlüsselnde Segmente, die sogenannten Introns, weit auseinandergezogen. Wenn ein Gen „umgeschrieben“ oder „gelesen“ wird, wird die ganze DNS-Sequenz (der regulative Bereich ausgeschlossen) reproduziert. Dann werden die „intronischen“-Teile ausgeschnitten, sodass nur die „exonischen“ Teile übrig bleiben. Diese herausgetrennte „exonische“ RNS nennt man Messenger-RNS (mRNS), weil sie die „Nachricht“ für das native Protein enthält. Teile der RNS sind vielleicht zu Beginn von Natur aus auch regulativ und werden im Allgemeinen nicht in Proteine „umgearbeitet“.

Im Allgemeinen gilt es in biologischen Fachkreisen als akzeptiert, dass ein Gen eine Messenger-RNS verschlüsselt, und dass eine Messenger-RNS ein Protein verschlüsselt. Es ist jetzt ziemlich klar, dass im menschlichen Genom für viele Gene die Exons in verschiedenen Kombinationen zusammen geschweißt werden können, um viele Messenger-RNS und folglich auch viele Proteine zu verschlüsseln. Wenn ein Gen beispielweise 6 Exons hat, besteht vielleicht eine mRNS aus den Exons 1, 2, 3, 4, 5, 6. Eine andere mRNS, die durch das selbe Gen verschlüsselt wird, besteht vielleicht aus den Exons 2, 3, 4, 6. Folglich gibt es vielleicht von einem einzigen Gen eine immense Anzahl möglicher mRNS. Einige Mutationen in einem Gen haben vielleicht Auswirkungen auf die ganze mRNS und die Proteine, die durch dieses Gen verschlüsselt werden, wohingegen andere Mutationen sich vielleicht nur auf einen Teil der mRNS und die Proteine, die durch dieses Gen verschlüsselt werden, auswirken. Und das bedeutet auch nicht, dass alle Proteine, die durch das selbe Gen verschlüsselt werden, Auswirkungen auf den gleichen Signalweg haben. Ein Protein, das durch das Gen verschlüsselt wird, könnte im Gehirn eine wichtige Rolle spielen, ein anderes in den Nieren, ein weiteres im Fett und noch ein anderes im Bindegewebe und im Knochen. Also gibt es wahrscheinlich von einem einzigen Gen eine breite Palette von Proteinen, die ähnliche oder unterschiedliche Funktionen haben.

So, was hat das alles mit FOP zu tun? Vielleicht nicht viel; vielleicht eine ganze Menge. Es ist zu früh, das sicher zu wissen. Aber was sicher ist, ist, dass das Gen, das für die Progressive Ossäre Heteroplasie (POH) verantwortlich ist (die zu FOP verwandte Krankheit; beide, die Krankheit und das ursächliche Gen wurden in unserem Labor entdeckt) ein sehr komplexes Gen ist, genauso wie das oben beschriebene hypothetische Beispiel. Das POH-Gen namens GNAS sitzt auf dem menschlichen Chromosom 20 und setzt sich aus 13 Exons zusammen, die unterschiedlich verschweißt werden, um mehrere unterschiedliche mRNS und Proteine in vielen verschiedenen Geweben zu verschlüsseln, (von denen sich einige auf den Stoffwechsel des Gehirns und des Herzens, einige davon auf den Stoffwechsel der Nieren, einige davon auf die Zelldifferenzierung und den Stoffwechsel von Fett, und einige davon auf die Differenzierung und den Stoffwechsel der Knochen auswirken). Mutationen in verschiedenen Exons des GNAS-Gens können zu der heterotopen Ossifikation führen, die wir als POH kennen. Trotzdem es sich nicht um das gleiche Gen handelt, das FOP verursacht, hat es uns eine ganze Menge über die außergewöhnliche Komplexität eines einzigen Gens vermittelt – und es sind diese Lektionen, die wir uns merken, während wir uns entlang eines ähnlichen Weges fortbewegen, um das Gen, das für FOP verantwortlich ist, zu identifizieren.

Molekulare Vererbungsmuster bei FOP: Ungewöhnliche Hinweise

In einem vielversprechenden und sehr aufregenden Ansatz, den wir letztes Jahr erstmalig beschrieben haben, erforschen wir gezielte Bereiche des Genoms, in denen das FOP-Gen liegen könnte (identifiziert durch die Untersuchungen an unseren Familien mit mehreren Generationen). Dabei suchen wir nach dem Verlust von Erbgut einer der beiden Kopien der elterlichen DNS. Diese Art Untersuchung nennen wir „Verlust der Heterozygotie“-Studie. In diesem Zusammenhang bedeutet „hetero“ *unterschiedlich* während „zygot“ *elterlichen Ursprungs* bedeutet. Das Konzept des „Verlustes der Heterozygotie“ ist auch für das mitotische Rekombinationsprojekt wichtig und ist ein großartiges Beispiel dafür, wie die Arbeit in einem Bereich den Fortschritt in einem anderen Bereich auf unvorhergesehene Weise fördern kann.

Von den meisten Genen haben wir zwei Kopien – eine Kopie von unserer Mutter und eine Kopie von unserem Vater. Entsprechend der genetischen Verschiedenheit bei den Individuen, ist es möglich, die Kopie des Gens das vom Vater stammt und die Kopie des Gens das von der Mutter stammt, aufzuspüren, indem man spezielle Marker benutzt, die auf jede Kopie des Gens abgestimmt sind, wie wir es bereits im Abschnitt über die genetische Kopplungsanalyse beschrieben haben. Bei einigen Personen, die FOP haben, fehlt möglicherweise ein kleines Stück der DNS, und das fehlende Stück könnte eine Kopie des FOP-Gens enthalten. Aber das Stück der DNS ist möglicherweise zu klein, um es mikroskopisch zu erkennen und kann vielleicht nur durch genaue molekulare Untersuchungen erkannt werden. Wenn eine der elterlichen Kopien fehlt, ist es deshalb möglich, dass die genetische Kennzeichnung auf einem bestimmten Teilbereich auf dem Chromosom homogen aussehen würde (anstatt heterogen), weil man nur eine der beiden elterlichen Kopien identifizieren kann. Solche homogen erscheinenden Bereiche auf molekularer Ebene könnten einen genauen Hinweis dazu liefern, wo vielleicht ein kleines Stück der DNA fehlt und wo das FOP-Gen plaziert sein könnte.

2003 entdeckten wir durch die Anwendung der „Verlust der Heterozygotie“-Analyse eine beachtliche Löschung der genomischen DNS im Verknüpfungsbereich für FOP bei einem Kind, das schwer von dieser Krankheit betroffen ist. Die genomische Löschung wurde bei keinem der beiden Elternteile des Kindes festgestellt, was ein starker Beweis dafür ist, dass die Löschung keine normale oder neutrale Veränderung ist. Obwohl die Löschung der genomischen DNS den Verschlüsselungsbereich jeden bekannten Gens anscheinend nicht unterbricht, kann die Möglichkeit einer Löschung in einem Regulierungsbereich eines Gens nicht ausgeschlossen werden. Die klinische Bedeutsamkeit dieser Entdeckung ist momentan nicht bekannt und wird zum jetzigen Zeitpunkt im FOP-Labor eingehend untersucht.

Das mitotische Rekombinationsprojekt

In den vergangenen beiden Jahren berichteten wir über einen neuartigen Ansatz, das FOP-Gen zu finden, genannt das *mitotische Rekombinationsprojekt*. Das mitotische Rekombinationsprojekt, ein alternativer genetischer Ansatz, der völlig ohne DNS-Proben aus Familien mit mehreren Generationen auskommt, könnte unsere Möglichkeit sehr erweitern, die genetische Ursache von Krankheiten wie FOP heraus zu finden, für die es sehr schwierig ist, große Familien zu finden. Der Gedanke, der hinter dieser Untersuchung steckt, ist bemerkenswert einfach und neuartig und mit dessen Hilfe könnten wir uns vielleicht die geringe Ausbeute genetischer Informationen, die von Zeit zu Zeit in unseren somatischen Körperzellen (im Gegensatz zu den Keimzellen unseres Körpers wie den Sperma- oder Eizellen) auftritt, zu Nutze machen. Dieser neuartige Gedanke geht von einer Methode aus, FOP-Lymphozyten, die uns aus Blutproben im Labor, die Sie uns gespendet haben, zur Verfügung stehen, zu benützen, um „zelluläre Familien“ zu erzeugen, die dafür genommen werden könnten, das genetische Intervall, auf dem sich das FOP-Gen befindet, einzugrenzen.

Während die Strategie für dieses neuartige mitotische Rekombinationsprojekt einfach und elegant ist, ist die Logistik und die Vorgehensweise mit zahlreichen technischen Herausforderungen beladen. Während des vergangenen Jahres haben wir diesem Projekt viel Aufmerksamkeit geschenkt mit einem Versuch, die technischen Hindernisse zu umgehen, aber sie sind zu bewältigen. Wir haben bei dieser Arbeit jedoch sehr viel über das Verhalten von FOP-Zellen erfahren, was es uns ermöglichte, in anderen Projekten auf eine Art und Weise voran zu kommen, wie wir es nicht ahnen konnten, und wir haben einen viel besseren Überblick über die Arten von technischen Hürden, die überwunden werden müssen, gewonnen. Viele der Techniken, die wir im vergangenen Jahr entwickelt und in diesem Pilotprojekt angewandt haben, sind auf einige andere Projekte, die wir im FOP-Labor durchführen, einschließlich der „Verlust der Heterozygotie“-Analyse und auf die BMP-Signalweg-Studien, die eine stabile Transfektion der Lymphozyten erfordern, übertragbar. Es bleibt aber weiterhin eines der technisch schwierigsten Projekte im Labor, aber ungeachtet seines Resultats hat es uns schon eine Menge Wissen über das Verhalten von FOP-Zellen geliefert und hat neue technologische Ansätze aufgetan, die uns bei der Entdeckung des FOP-Gens helfen können.

II. SIGNALBAHNEN

Ein Fehler bei der Regulierung der Knochenbildung

Bei Knochenkrankheiten wie Fibröser Dysplasie oder Osteogenesis imperfecta ist die Knochenbildung abnormal. Im Gegensatz dazu ist an dem zusätzlichen Knochen bei FOP überhaupt nichts unnormal, außer, dass er nicht da sein sollte. FOP ist keine Krankheit der Skelettstruktur oder des Skelettaufbaus, sondern der Skelettregulierung.

Die Lektionen, die wir bei der Progressiven Ossären Heteroplasie (POH), der Schwesterkrankheit von FOP, gelernt haben, liefern einen wichtigen Kontrapunkt zum nächsten Abschnitt dieses Berichts. Bei POH haben wir das verursachende Gen entdeckt, aber haben bis jetzt noch keinerlei Wissen über die Bahnen, die das Gen benutzt, um heterotopen Knochen zu formen. Bei FOP kennen wir bis jetzt das genaue verursachende Gen nicht, aber wir gewinnen enorme Kenntnisse und Einsichten über die Signalbahnen, die von den Zellen benutzt werden, um heterotopen Knochen zu bilden. Bei beiden Krankheiten ist es notwendig, nicht nur das verursachende Gen zu kennen, sondern auch die Regulierungsbahnen, durch die der genetische Schaden zu heterotoper Knochenbildung führt.

Die Einführung einer wirksamen Behandlung einer genetisch bedingten Entwicklungsstörung wie FOP, wird aus der Identifizierung sowohl der Genmutation als auch der fehlregulierten Entwicklungsbahn, die FOP verursacht, resultieren. Bei FOP sind Familienstammbäume selten und genetische Kopplung und Klonen der genetischen Position schwierig. Ein alternativer Ansatz die primäre Pathologie bei FOP zu identifizieren beinhaltet Strategien, fehlregulierte molekulare Bahn zu isolieren und von da an den Weg zum beschädigten Gen zurück zu verfolgen. Während des vergangenen Jahres haben wir ununterbrochen viel Arbeit in diesen Ansatz gesteckt und die Resultate zeigen, dass es sich anfängt auszuzahlen.

In diesem Abschnitt des Jahresberichts werden wir eine der größeren Entdeckungen in der FOP-Forschung während des vergangenen Jahres beschreiben: Dass der BMP-Rezeptor auf der Oberfläche der FOP-Zellen chronisch aktiv ist und mit schweren Abnormalitäten bei seiner Bewegung und dem Trafficking über die Zellmembran zu tun hat. Bevor wir diesen spannenden neuen Weg der Forschung erläutern, wäre es hilfreich, auf Hintergrundmaterial zurück zu blicken, das im Jahresbericht des vergangenen Jahres erstmals erläutert wurde, da die diesjährigen Fortschritte direkt darauf aufbauen. Wir werden deshalb die folgenden drei Abschnitte besonders hervorheben: „Was ist ein Morphogen?“, „Selbstregulierende negative Feedbackschleifen“, „Fehlregulierung von selbstregulierenden negativen Feedbackschleifen in FOP-Zellen“, „Fehlregulierung der BMP-Bahn bei FOP“, „erhöhte Spiegel des BMP-Rezeptors auf der Zelloberfläche“, „BMP-Rezeptorenstaus auf der Zellmembran“, „Wer sind die BMP-Verkehrspolizisten auf der Zellmembran und welche Rolle spielen sie bei der BMP-Signalgebung?“ und „Welcher Weg führt zum Ziel?“. In diesen Abschnitten werden wir einige unserer neuesten Entdeckungen und die Hypothesen beschreiben, die Leitfaden dieses zukunftssträchtigen Zweiges unserer FOP-Forschungsarbeit sind.

Was ist ein Morphogen?

Das knochenbildende Protein 4 (BMP-4) ist eine besondere Art von Protein, bezeichnet als Morphogen und ist durch das Gen, das seinen Namen trägt, verschlüsselt. BMP-4 ist im Tierreich während der Evolution äußerst gut erhalten geblieben und hat viele verschiedene Funktionen während der Entwicklung und der darauffolgenden Geburt.

BMP-4 ist ein Morphogen und ein Morphogen ist ein verstecktes Molekül, das Signale aussendet und das ein Feld von umgebenden Zellen in ein Muster anordnet. Im Fall der Fruchtfliege (die keine Knochen hat), organisiert BMP-4 reife Stammzellnischen, das Muster für den Körperbau und für andere Strukturen, wie z.B. die Flügel. Im Falle des Menschen, organisiert BMP-4 das zelluläre Muster verschiedener Organe, einschließlich der Haarfollikel, des Mittelohres und des Skeletts an sich. BMP-4 bewirkt einen Konzentrationsgradienten, von lokalen Zellgruppen auswirkend und das BMP-4-Protein bestimmt die Anordnung und die Aufgaben der darauf ansprechenden Zellen, entsprechend der BMP-4-Konzentration, die von den Zellen in der Umgebung wahrgenommen werden. Der Gedanke eines morphogenen Gradienten ist eng verknüpft mit dem Konzept der Lageinformation. Eine Zelle in der Umgebung eines BMP-4-Moleküls liest seine Position am Konzentrationsgradienten ab und bestimmt dementsprechend seinen Entwicklungsverlauf. Morphogene schalten unterschiedliche Gene bei unterschiedlichen Konzentrationen an.

BMP-4 ist ein Morphogen, kein Enzym. Enzyme katalysieren chemische Reaktionen im Körper. Je mehr Enzyme vorhanden sind, desto mehr chemische Reaktionen gibt es. Wenn man die doppelte Konzentration von Enzymen hat, findet die doppelte Anzahl von chemischen Reaktionen statt und deshalb gibt es auch doppelt so viele Produkte aus diesen Reaktionen. Das ist bei Morphogenen wie BMP-4 nicht der Fall. Morphogene regen verschiedene Gene durch verschiedene Konzentrationen an.

Bei einer niedrigen Konzentration von BMP-4 wird z.B. ein Satz von Genen angeregt, bei mittlerer Konzentration ein anderer und bei hoher Konzentration wird noch ein dritter Satz von Genen angeregt. Dies ist natürlich eine Vereinfachung, aber das Konzept, dass Morphogene (solche wie BMP-4) bei unterschiedlichen Konzentrationen völlig verschiedene Effekte haben ist für FOP äußerst wichtig und relevant.

Wie sind dann die Steigerungsstufe eines Morphogens wie BMP-4 festgelegt und wie werden sie beibehalten, damit der Körper genau das bilden kann, was er braucht, genau dann, wenn er es braucht, genau da wo er es braucht und sonst nirgendwo anders?

Selbstregulierende negative Feedbackschleifen

Das Konzept der selbstregulierenden negativen Feedbackschleifen ist das Zentrum der Versuche, das Konzept der Morphogengradienten und die außerordentliche Genauigkeit ihrer Kontrolle zu begreifen. Während der vergangenen 5 Jahre wurden in den molekularen Relaischaltern zahlreiche Abläufe identifiziert und ans Licht gebracht, von den verborgenen Morphogenen (wie BMP-4) bis zur unterschwelligen Genkontrolle auf molekularer Stufe. Bei jedem Schritt im molekularen Relais, von den versteckten Morphogenen bis zu den unterschwelligen Auswirkungen auf die Zielzellen, hat die Natur negative Feedbackschalter eingebaut. Diese negativen Feedbackschalter sind in der Tat eine Anzahl stark regulierter Bremsen, die die Konzentration dazwischen liegender Moleküle auf der Signalbahn abtasten und als molekulares Führungssystem zusammen arbeiten, um das einwandfreie Funktionieren der Bahnen sicher zu stellen.

Diese negativen Feedbackschalter ermöglichen es den Zellen, innerhalb eines sehr engen Rahmens zu agieren, was auf keinen Fall zulässt, dass der Morphogengradient, egal in welchem Gewebe, weit von seinem Fixpunkt abweicht. Diese negativen Feedbackschleifen sind unerlässlich für das einwandfreie Funktionieren des Morphogengradienten, und deren Bekanntwerden wurde zum Mittelpunkt des Verstehens, wie diese Gefälle wirken.

Selbstregulierende negative Feedbackschalter in der Umgebung von Genen sorgen für enorme Stabilität und begrenzen gleichzeitig den Bereich, auf den sich die Konzentration von Netzwerkbestandteilen ausbreitet. Die Stabilität einer morphogenetischen Bahn, die durch die Selbstregulierung überwacht wird, ist viel besser als die einer unregulierten Bahn. Die BMP-4-Bahn wird nicht nur durch die selbstregulierenden negativen Feedbackschalter kontrolliert, sondern die selbstregulierenden negativen Feedbackschalter wurden auch in jedem einzelnen Abschnitt der BMP-4-Bahn gefunden.

Fehlregulierung selbstregulierender negativer Feedbackschalter in FOP-Zellen

Mit diesen Kenntnissen im Hinterkopf ist es einfacher, die wichtigste grundlegende wissenschaftliche Entdeckung des Labors während der vergangenen Jahre zu verstehen – Die Erkenntnis, dass FOP-Zellen nicht in der Lage sind, die BMP-4-Bahn als Reaktion auf ein BMP-4-Signal richtig zu regulieren. Das Unvermögen der FOP-Zellen, die Noggin- und Gremlinausschüttung von versteckten BMP-4-Antagonisten als Folge eines BMP-4-Signals entsprechend anzupassen, lässt das Fehlen eines negativen Feedbacks vermuten, wodurch die Höhe der BMP-4-Ausschüttung und auch die BMP4-Aktivität bei FOP wahrscheinlich deutlich erhöht und hoch gehalten wird.

Heterotope Ossifikation beginnt im Falle von FOP in der Kindheit und kann durch einen chirurgischen Eingriff, Bindegewebsverletzungen, Viruserkrankungen, intramuskuläre Impfungen oder Spritzen bei zahnärztlichen Behandlungen ausgelöst werden. BMP-4 wird vom Skelettmuskel produziert und seine Ausschüttung kann an Stellen mit Bindegewebsverletzungen überhöht sein. Unter normalen Bedingungen, stimuliert BMP-4 sehr stark die Ausschüttung von wenigstens einigen BMP-4-Antagonisten. Eine abgeschwächte BMP-4-Antagonisten-Reaktion, die auf ein Bindegewebsstrauma erfolgt, würde eine schnelle Ausbreitung eines BMP-4-Signals auslösen, das zu vermehrter Knochenbildung führt. Das Wachstum von stark vaskularisiertem fibroproliferativem Gewebe, im Zustand vor der Verknöcherung, das stellenweise als Reaktion auf die überhöhte Ausschüttung von BMP-4 auftritt, würde im Falle einer abgeschwächten BMP4-Antagonisten-Reaktion verstärkt und könnte die explosionsartige Knochenbildung erklären, die während eines FOP-Schubs auftritt. Diese Erkenntnisse über FOP zeigen deutlich die Wichtigkeit einer sorgfältigen Balance zwischen einem induktiven Morphogen (BMP-4), und dessen versteckten Antagonisten bei der Bildung eines ektopen Organsystems und lässt das Potential zur Entwicklung von Behandlungsstrategien für FOP auf der Basis von BMP-Antagonisten vermuten.

Zusätzlich haben die FOP-Zellen im Laborversuch einen intrinsischen Fehler im Bereich metabolischer Abläufe und Zellzyklusabläufe hinsichtlich der Fähigkeit die BMP-4-Pegel zu regulieren. In normalen

Zellen werden die BMP-4-Pegel während aller Phasen des Zellzyklus streng überwacht, während die Konzentrationen in FOP-Zellen sehr stark variieren. Die Unfähigkeit von FOP-Zellen die Konzentration von BMP-4 während des Zellzyklus zu regulieren, spiegelt vielleicht einen weitreichenden Defekt in der BMP-4-Signalbahn wieder. Die erste Aktion eines beschädigten Gens auf der BMP-4-Bahn wirkt sich vielleicht auf eine oder mehrere Komponenten aus, wie ein Wächter, der mehrere Überwachungsstellen bewacht. Alternativ hat ein Gendefekt, der sich nur auf einen Teilbereich der BMP-4-Bahn auswirkt, vielleicht nur sekundäre weitläufige Auswirkungen. Dies legt nahe, dass Gene, die Proteine verschlüsseln, die BMP-4 regulieren, BMP-4-Rezeptoren und vielleicht Proteine, die BMP-4 verringern oder zugehörige Rezeptoren in FOP-Zellen falsch funktionieren.

Fehlregulierung der BMP-4-Signalbahn bei FOP

Um diese Hypothese, dass die BMP-4-Bahn bei FOP fehlgeleitet ist, zu überprüfen, begannen wir mit einer detaillierten Untersuchung verschiedener selbstregulierender negativer Feedbackschalter auf der BMP-4-Bahn und fanden an zahlreichen Punkten Defekte. Diese Defekte beschränkten sich nicht nur auf die übermäßige Ausschüttung von BMP-4-Boten-RNS und Protein, und die Unfähigkeit verschiedenartige BMP-4-Antagonisten nach oben zu regulieren, sondern auch die Fülle und die unangebrachte Aktivierung des BMP-4-Rezeptor-Proteins auf der Zelloberfläche. Diese Entdeckungen werden zur Zeit in zahlreichen Zelllinien untersucht und liefern den schlagenden Beweis, dass die BMP4-Bahn bei FOP stark fehlgeleitet wird. Auf dieser Arbeit liegt momentan das Hauptaugenmerk intensiver Forschung im FOP-Labor. Der erste Teil der Arbeit, der 2003 veröffentlicht wurde, ist Thema in einem größeren wissenschaftlichen Magazins namens **The Journal of Bone & Joint Surgery (JBJS)**. Der Titel hieß: „Paresis of a bone morphogenic protein antagonist response in an genetic disorder of heterotopic skeletogenesis“

Der Kommentar der Fachleute über diesen Artikel lautete: „Dies ist ein äußerst interessanter, gut formulierter und wichtiger Artikel, der weitere Beweise liefert, dass das knochenmorphogenetische Protein in der Pathogenese (Entstehung) von FOP eine Rolle spielt.“

Während vorangegangene Berichte darauf hindeuteten, dass das übermäßige Vorkommen dieses Proteins für die Verursachung von FOP bedeutungsvoll sein könnte, ist nun die Möglichkeit, dass eine defekte Regulationskontrollschleife die Protein-Antagonisten beinhaltet, die wiederum an der Verursachung dieser Krankheit beteiligt sein könnten, zunehmend erkennbar und wichtig. Die Möglichkeit des FOP-Labors, genügend Proben aus Lymphblastenzellen von Patienten zu erhalten, die unter dieser seltenen Krankheit leiden, macht diesen Bericht zu einer einzigartigen und wertvollen Gelegenheit, sehr wichtige neue Informationen zu erfahren. Das Konzept, dass die BMP-Funktion beim Menschen durch ein enges Zusammenspiel zwischen BMP – BMP-Rezeptorenbindung von Morphogenen und deren Antagonisten reguliert wird, lässt die Frage aufkommen bezüglich seiner bedeutenden therapeutischen Rolle in der orthopädischen Chirurgie. Diese Aussicht, zusammen mit den Erkenntnissen dieses Berichts wirkt sich als sehr wichtiger Beitrag bezüglich der Rolle von osteoinduktiven Proteinen bei menschlichen Krankheiten und Therapien aus.“

Erhöhter BMP-Rezeptoren-Spiegel auf der Zelloberfläche

Wie wir bereits festgestellt haben, ist die BMP-4-Signalbahn in den Zellen von Patienten, die FOP haben, fehlgeleitet. Neue Studien zeigen, dass FOP-Zellen nicht in der Lage sind, entsprechende Konzentrationen von BMP-4-Antagonisten richtig zu regulieren.

Weitere neue Entdeckungen zeigen, dass einer der BMP-Rezeptoren auf der Oberfläche der FOP-Zellen in sehr hoher Konzentration auftritt, während ein anderer BMP-Rezeptor nur in sehr geringer Zahl vorhanden ist. Diese Daten sind logisch im Zusammenhang mit Entwicklungsstudien, die zeigen, dass eine übermäßige postnatale Ausschüttung einer der BMP-Rezeptoren (desjenigen, der im Übermaß vorhanden ist) heterotope Ossifikation verursachen kann und dass die zu geringe embryonale Ausschüttung des anderen BMP-Rezeptors (desjenigen, der in FOP-Zellen zu gering ausgeschüttet wird) Missbildungen am Zeh verursachen kann, die fast identisch sind mit denen, die bei FOP-Patienten zu sehen sind. Es gibt keine Veränderungen in der Kodierungssequenz von BMP-4, vielen BMP-4-Antagonisten oder den BMP-Rezeptoren bei FOP-Patienten. Alles in allem lassen diese Daten vermuten, dass ein primärer Defekt in der BMP-Signalbahn in FOP-Zellen existiert und dass einer der BMP-Rezeptoren vielleicht veranlagungsbedingt aktiv und unempfindlich für normale Signale in FOP-Zellen ist.

Zellen, die von FOP-Patienten stammen, liefern eine einzigartige Gelegenheit Einblicke in die Rolle zu gewinnen, die die veränderte BMP-Rezeptoren-Signalgebung bei der Auslösung enchondraler Knochenbildung, wie sie ektop bei Patienten mit FOP vorkommt, spielt. Dies führte zu unserer aktuellen Hypothese, dass abnormale BMP-Signale von zunehmenden Mengen eines der BMP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche herrührt und als Bindeglied für die zusätzliche Knochenbildung bei FOP fungiert, während die Veränderungen am großen Zeh aus der reziprok erniedrigten Menge und / oder Aktivität des BMP-Rezeptors an der Zelloberfläche herrührt.

BMP-Rezeptor-Staus auf der Zellmembran

Die neue Entdeckung der Fülle von BMP-Rezeptoren auf der Zellmembran, löste vergangenes Jahr eine riesige Menge neuer Arbeit im FOP-Labor aus. Zuerst wollten wir wissen: „Warum haben FOP-Zellen eine erhöhte Menge BMP-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche? Die zwei offensichtlichsten Möglichkeiten waren: sie produzieren mehr oder sie bauen weniger ab. Der einfachste Weg darüber nachzudenken geht über Kuchen in einer Bäckerei. Wenn man eines Tages plötzlich eine Bäckerei betritt und es stehen zehn Mal so viele Kuchen im Regal, gibt es zwei mögliche Gründe. Entweder der Bäcker bäckt mehr Kuchen, oder der Bäcker bäckt genauso viele Kuchen wie sonst, aber niemand kauft sie und sie stapeln sich in den Regalen. Um die Frage zu beantworten, warum es zu viele BMP-Rezeptoren auf der Oberfläche von FOP-Zellen gibt, entwarfen und entwickelten wir Versuche, um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden. Wir entdeckten, dass FOP-Zellen genauso viele BMP-Rezeptoren fabrizieren wie Kontrollzellen, aber sie können sie nicht so leicht los werden, genauso wie die Bäckerei, deren Regale voller Kuchen sind, nicht weil der Bäcker zu viele Kuchen gemacht hat, sondern weil sie niemand kauft und aus dem Lager nimmt.

In der Zelle sind die Dinge ein wenig komplexer, aber es herrscht die gleiche Idee vor. Wenn ein Bindungspartner oder ein signalgebendes Hormon, wie das BMP-4, sich am Rezeptor festklammert, löst der Vorgang die Hinzufügung eines Phosphatmoleküls an den Rezeptor aus. Dieses Phosphatmolekül ist wie ein molekularer Staffelstab, der den Rezeptor aktiviert. Dieser molekulare Staffelstab wird dem nächsten Molekülstrom im signalgebenden Wasserfall weitergegeben. Wie in einem Stafettenlauf, bewegen sich die Moleküle, die den molekularen Staffelstab bekommen und weitergeben, von Stelle zu Stelle, um ihre Arbeit zu tun. Wenn ein BMP-Rezeptor durch das Hinzufügen eines Phosphatmoleküls aktiviert wird, gibt er das Signal innerhalb der Zelle an das nachgelagerte Molekül weiter. Später wird die Phosphatgruppe vom Rezeptor entfernt und deaktiviert folglich den Rezeptor. Der inaktive Rezeptor wird entweder abgebaut oder wieder aufbereitet, damit er wieder verwendet werden kann. Der Deaktivierungsprozess kann jedoch nicht stattfinden, wenn der aktivierte Rezeptor nicht in die Zelle eindringt.

Nachdem ein BMP-Prozessor durch BMP-4 aktiviert wird, sollte der aktivierte Rezeptor normalerweise von der Zellmembran entfernt und durch einen Prozess, bekannt als Internalisierung oder Endozytosis, zurück in die Zelle gebracht und nachfolgend abgebaut werden. In einigen Fällen, werden einige der internalisierten Rezeptoren, anstatt abgebaut zu werden, für die Wiederverwendung auf der Zellmembran zurück geschleust. Wir entdeckten, dass in FOP-Zellen einer der BMP-Rezeptoren innerhalb der Zelle nicht richtig abgebaut wurde, nachdem er aktiviert worden war.

Um festzulegen, ob das Problem wirklich im Abbauprozess lag, bauten wir Versuche auf, um zu sehen, ob der aktivierte Rezeptor zuerst internalisiert wurde (das bedeutet, er wurde von der Zelloberfläche entfernt), da dieser Schritt zuerst stattfinden muss, bevor der Rezeptor abgebaut werden kann oder zerfällt. Zu unserer großen Überraschung fanden wir heraus, dass der BMP-Rezeptor nicht richtig internalisiert wurde. Die Entdeckung einer nicht ordnungsgemäßen Internalisierung des BMP-Rezeptors in FOP-Zellen ist von grundlegender Bedeutung für das Verstehen der Pathophysiologie von FOP. Dieses Jahr werden wir Versuche durchführen, um festzustellen, warum der BMP-Rezeptor nicht richtig internalisiert und in FOP-Zellen inaktiviert wird.

Eine der wegweisenden Fragen, die sich während unserer Arbeit im vergangenen Jahr ergab, lautete: Wie verändert das gestörte intrazelluläre Trafficking der BMP-Rezeptoren die Signalbahnen innerhalb der FOP-Zelle? Trotz der unglaublichen Wissenserweiterung über die Signalweitergabebahnen in den vergangenen Jahren in vielen Bereichen der Biologie, wissen wir fast nichts über das molekulare Trafficking, das angibt, wie die signalweitergebenden Moleküle in der Zelle bewegt werden, und wie ein solches molekulares Trafficking in Krankheiten wie FOP befallen wird. In der Tat ist es die Notwendigkeit, diese Interaktionen in FOP-Zellen zu verstehen, die aller Wahrscheinlichkeit nach wertvolle Einblicke für Wissenschaftler in anderen Labors liefert, die ebenfalls danach streben, zu verstehen, wie die BMP-Signalgebung normalerweise abläuft und wie sie vielleicht bei anderen Krankheiten gestört wird. Es ist klar, dass sich die Kontrolle des Traffickings von Molekülen von einem Zellbereich in den anderen auf die Effizienz des Informationsaustausches entlang der Signalbahn grundlegend auswirken kann. Darauf richtet sich das Hauptaugenmerk bei der Krebsforschung und -therapie und führte zur Entwicklung von Signalweitergabehemmern (STIs), Medikamente wie Gleevec zur Regulierung von promiskuitiver Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Aktivität bei einigen Formen von Leukämie. Es wäre sogar möglich, STIs zu entwickeln, um die promiskuitiv aktivierten BMP-Rezeptoren in FOP-Zellen zu blockieren. Es ist ganz klar, dass die Laboruntersuchungen bezüglich

des BMP-Rezeptoren-Traffickings und der Signalgebung in nächster Zukunft in der FOP-Forschung weiterhin das Hauptthema sein werden.

Wer sind die BMP-Verkehrspolizisten auf der Zellmembran und welche Rolle spielen sie bei der BMP-Signalgebung?

Endozytose ist ein dynamischer Prozess, der bei der Internalisierung, Aussortierung und dem Abbau der Moleküle abläuft, die an der Signalweitergabe beteiligt sind. Endozytose reguliert die Aktivität der Signalgebungsrezeptoren auf der Zelloberfläche. Die endozytische Maschinerie beginnt mit den ursprünglichen endozytischen Bläschen, die sich wie Knospen aus der Zellmembran bilden. Internalisierte Membranproteine, wie die Zelloberflächen-BMP-Rezeptoren nehmen junge Endosome auf, die entweder wieder auf die Zelloberfläche zurückgeführt oder zu den alten Endosomen und Lysosomen zum Abbau aussortiert werden.

Bis vor kurzem glaubte man, dass alle Rezeptoren der Zelloberfläche der selben Internalisierungsbahn folgen und durch Clathrin überzogene Gruben internalisiert werden, und zwar durch einen Vorgang, in dem die Zelloberflächenrezeptorenproteine an mit Clathrin verknüpfte Proteine gebunden sind.

Eine wichtige Abhandlung in **Nature Cell Biology** berichtete 2003, dass TGF-beta-Rezeptoren (verwandt mit BMP-Rezeptoren) entweder durch Clathrin- oder Caveolin-abhängiges Trafficking internalisiert werden können. Was an dem Artikel besonders auffällig war, war jedoch, dass sich das Schicksal der internalisierten Rezeptoren unterschied und von der Eintrittsbahn in die Zelle abhing. Die Autoren vermuteten, dass Internalisierung durch die Clathrin-Bahn eine Signalgebung vom Innern des Endosoms auslöste, wogegen die Internalisierung über die Caveolin-Bahn in einem beschleunigten Rezeptorenabbau mündete.

Obwohl in vieler Hinsicht ähnlich, unterscheidet sich die TGF-beta-Signalgebungsbahn von der BMP-Signalgebungsbahn in vielen Punkten. Einer der wesentlichsten Unterschiede besteht darin, dass sich die TGF-beta-Rezeptoren ständig einer Internalisierung unterziehen, ungeachtet dessen, ob oder ob nicht der TGF-beta-Ligand an den Rezeptor gebunden ist. BMP-Rezeptoren scheinen sich dahingehend unterschiedlich zu verhalten, dass die Internalisierung bei einem stabilen Stand nicht abläuft, es sei denn, dass BMP-4 an den BMP-Rezeptor gebunden ist. Weiterhin lassen Daten aus unserem Labor vermuten, dass BMP-Rezeptoren-Signalgebung gedrosselt wird, wenn die aktivierten Rezeptoren internalisiert werden. Mit anderen Worten wird in der TGF-beta-Bahn der molekulare Staffelstab weitergegeben, wenn die Rezeptoren erst einmal internalisiert sind, wogegen auf der BMP-Bahn der Staffelstab weitergegeben wird, wenn der Rezeptor auf der Zellmembran ist. Während vergangenes Jahr riesige Fortschritte gemacht wurden, die Beziehung zwischen Trafficking und Signalgebung auf der TGF-beta-Rezeptor-Bahn zu verstehen, weiß man bis jetzt sehr wenig über die normalen Beziehungen zwischen Trafficking und Signalgebung auf der BMP-Bahn.

Eine Analyse der Molekularpathologie des BMP-Rezeptor-Trafficking und der Signalgebung in FOP-Zellen fängt an, entscheidende Einblicke in den molekularen Mechanismus zu geben, der den frühen Abläufen in der Pathogenese von FOP unterliegt. Ein elementares Verstehen der molekularen und genetischen Regulierung des BMP-Trafficking und der Signalgebung in FOP-Zellen wird zu einem vernünftigeren therapeutischen Ansatz für FOP und ebenso zu einer breiten Vielfalt von Krankheiten, die mit der Auslösung von Knochenbildung beim Menschen zu tun haben, führen.

Welcher Weg führt zum Ziel?

Die standardmäßige Beschreibung einer Zell-Signalbahn geht ungefähr folgendermaßen: Ein Morphogen (wie BMP-4) wird von der Zelle erzeugt und ausgeschüttet und bindet sich an einen Zellmembranrezeptor, der die Aktivierung (Phosphorylierung) des Rezeptors auslöst. Diese Rezeptoraktivierung führt zu einer Kaskade von Ereignissen innerhalb der Zelle, die nachgeschaltete Zielgene, die Vorgänge wie Knochenbildung auslösen, aktiviert oder unterdrückt. Eines der großen Mysterien in der Biologie ist, wie die Zellen ihre nachgeschalteten Ziele mit derartiger Genauigkeit und derartigem Feingefühl regulieren. Was die BMP-Bahn angeht, gibt es viele Morphogene, viele Rezeptoren und viele dazwischen geschaltete Moleküle. Man dachte jedoch bis vor Kurzem, dass es nur eine große Bahn gebe, über die BMPs ihre nachgeschalteten Ziele regulieren könnten. In den vergangenen Jahren sind aus einigen Labors, einschließlich des unseren, Berichte aufgetaucht, die vermuten lassen, dass es mindestens zwei (und vielleicht sogar drei), gleich geschaltete (oder alternative) Bahnen gibt, durch die ein BMP-Signal die Zielrezeptoren beeinflussen könnte. Das ganze letzte Jahrzehnt dachte man, dass die BMPs ihre Ziele durch die gemeinsame SMAD-Bahn beeinflussen. Kürzlich haben wir herausgefunden, dass eine gleichgeschaltete oder alternative

Bahn, bekannt als die p38-Mitogenaktivierte Proteinkinase (MARK)-Bahn ebenfalls eine wichtige Rolle in den FOP-Zellen spielt und vielleicht die vorherrschende Bahn darstellt, durch die BMP-Rezeptoren der Zelloberfläche die nachgeschalteten signalgebenden Komponenten im lymphoblastoiden Zellsystem, mit dem wir zur Zeit arbeiten, regulieren. Neue Daten, die aus einigen Labors auftauchen, lassen vermuten, dass die jeweilige Summe und Konfiguration der BMP-Rezeptoren auf der Zellmembran vielleicht in erster Linie bestimmen, ob die Zelle die SMAD-Bahn oder die p38-MARK-Bahn zur nachgeschalteten Signalgebung nutzt und letztendlich darüber, welche nachgeschalteten Zielgene angeregt oder unterdrückt werden. Während die genaue Bedeutung dieser Entdeckung noch unklar ist, ist es ganz klar, dass je mehr man über die Bahnen erfahren kann über die BMP-4 seine Ziel-Gene Signale sendet, um so besser werden wir Behandlungsstrategien entwickeln können, die jedes molekulare Ungleichgewicht in diesen Bahnen unterbrechen und korrigieren können.

Genchip-Untersuchungen der Genexpressivität

Der Vergleich der Expressivitätsmuster vielfältiger Gene in der BMP-4-Bahn und damit in Beziehung stehender Bahnen in FOP-Zellen im Gegensatz zu Nicht-FOP-Zellen ist ein äußerst wichtiger erster Schritt, um das Verdrahtungsdiagramm der FOP-Zellen zu entschlüsseln. Wir haben im vorherigen Bericht bereits gesagt, dass die FOP-Forschung dem Entschlüsseln des Verdrahtungsdiagramms einer Atombombe, die von einem „Molekularterroristen“ (dem veränderten FOP-Gen) gebaut wurde, gleichkommt. Eine weitere umfassende Analyse von Genexpressivitätsmustern in den FOP-Zellen wird es uns ermöglichen, das dafür verantwortliche Verdrahtungsdiagramm auf der BMP4-Bahn zu bestimmen so dass wir schneller festlegen können, wie wir die Bombe wirkungsvoll deaktivieren können.

Zwei revolutionäre Entwicklungen in der Technologie haben kürzlich das Werkzeug dazu geliefert, tiefer in die Mysterien des menschlichen Genoms einzudringen, und sie haben uns neue und produktivere Untersuchungswege für das Verstehen der molekularen Basis genetischer Krankheiten eröffnet. Diese Entwicklungen sind für unsere laufenden Forschungen über FOP äußerst wichtig und beinhalten:

- Genchip-Untersuchungen der Genexpressivität
 - Hochgeschwindigkeitscomputeranalysen von vergleichenden Genom-Datenbanken
- Eine Synthese von Informationen kann oft genauso wichtig sein wie die Daten selbst. Die schnell entwickelte DNS-Chip-Technologie ermöglicht es uns, gleichzeitig Tausende von Genen zu überprüfen, und sie stellt einen bedeutenden technischen Vorteil dar, der anfängt, uns unvorhergesehene Einblicke in die Genexpressivität bei FOP zu gewähren. Genchip-Untersuchungen der Genexpressivität sowie die Computer und deren Software die benötigt wird, die überwältigende Flut von Daten, die durch diese Technologie hervorgebracht wird, zu analysieren, erlaubt es uns jetzt, die Freigiebigkeit des menschlichen Genoms zum Zwecke des besseren Verstehens der beschädigten Genbahnen bei FOP, zu unterminieren. Genchip-Analysen von Genexpressivitätsmustern in FOP-Zellen erfordern den Einsatz ganz spezieller Grundausrüstung und Computerausstattung außerhalb unseres FOP-Labors. Dieses Ausstattung wurde nun an der Universität von Pennsylvania etabliert und steht uns zur Verfügung.

Mit Unterstützung der Weldon Family FOP-Research-Stiftung, haben wir mit diesem spannenden Versuch begonnen. Die Grundausrüstung für die Genchipanalyse, die dem neuesten Stand der Technik entspricht, wurde an der Universität von Pennsylvania etabliert und sie ist ein enormer Gewinn für die Gestaltung und Durchführung dieses Versuchs, FOP zu erforschen. Untersuchungen, bei denen FOP-Zelllinien benutzt und Zelllinien kontrolliert wurden, wurden durchgeführt und einige Untersuchungsdatensätze werden auf Ähnlichkeiten und Unterschiede hin verglichen. Die Ergebnisse lassen stark vermuten, dass es eine unterschiedliche Ausschüttung nachgeschalteter Gene auf der BMP4-Bahn und in Kontrollzellen gibt, und dass einige dieser Gentargets und Muster vorhersagbar sind, andere wiederum nicht. Die vorhersehbaren Targetgene liefern eine wichtige Kontrolle für zukünftige Experimente, während die unvorhersehbaren Gentargets einen neuen Satz von Schlüsseln und Werkzeugen liefern, um die Beziehung zwischen dem Rezeptortrafficking und der nachgeschalteten Signalgebung, die in FOP-Zellen so grundlegend gestört ist, besser zu verstehen. Die Verfügbarkeit neuer Hemmer für die nachgeschaltete p38-MARK-Bahn, die bereits oben besprochen wurde, liefern wichtige molekulare Werkzeuge, um die nachgeschalteten Bahnen aufzugliedern, um zu untersuchen, wie unterschiedliche BMP-Rezeptoren-Spiegel und Konfigurationen die verschiedenen nachgeschalteten Genreaktionen, wie eine heterotope Knochenbildung, auslösen. Weil wahrscheinlich nicht eine einzige Versuchsmethode alle offenen Fragen über die BMP-Signalgebung in FOP-Zellen beantworten kann, werden die Genchipanalysen und die Datensätze große Einblicke in die BMP4-Signalgebungsbahn in FOP-Zellen gewähren.

Genchipuntersuchungen erzeugen große und vielschichtige Datensätze, die computergestützte Auswertungen erfordern, um unter den verglichenen Proben die wichtigen Ähnlichkeiten und Unterschiede zu identifizieren. Wir führen zur Zeit die statistische Analyse der fertigen Datensätze in unserem FOP-Hauptlabor durch und freuen uns sehr, Ihnen unseren Neuzugang in unserem Labor, Chaitanya Kommidi, bekannt zu geben, einen Bioinformatikstudenten im Aufbaustudium, dessen Anwesenheit sich schon für den Wert des Projektes ausgezahlt hat.

BMP-Signalbahnen, die sich gegenseitig beeinflussen

Aus Gründen, die oben bereits hervorgehoben wurden, richtet sich unsere Aufmerksamkeit auf den BMP-4-Signalweg bei FOP. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass andere Signaltransduktionsbahnen am FOP-Prozess beteiligt sind. Fast alle Untersuchungen in der Entwicklungsbiologie, die für die Studie über FOP von Bedeutung sind, lassen die mögliche Beteiligung weiterer fünf größerer untereinander in Beziehung stehender Signaltransduktionsbahnen vermuten. Eingeschlossen ist dabei auch die BMP-signalgebende Bahn, die Hedgehog (HH) Signalbahn, die WNT-Signalbahn, die NOTCH-Signalbahn und die Signalbahn des Fibroblastenwachstumsfaktors (FGF). Jede der vier genannten Signalbahnen hat eine sehr wichtige Wechselwirkung mit der BMP-Signalbahn und wir untersuchen diese Wechselwirkungen, da sie vielleicht für FOP bedeutend sind. Während wir bis heute keine ursprüngliche Pathologie bei der HH-Signalbahn, der WNT-Signalbahn oder der NOTCH-Signalbahn gefunden haben, liefert uns unsere Entdeckung, dass der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (bFGF2) bei krankhaften FOP-Veränderungen im Übermass vorhanden ist, eine Richtung für einige unserer laufenden Forschungsarbeiten.

Vergangenes Jahr berichteten wir von vorläufigen Entdeckungen in einem gemeinschaftlichen Forschungsprojekt, das vom Developmental Grants Program of The Center for Research in FOP & Related Disorders, unterstützt wird, untersucht Dr. Hyun Duck Nah, Professor für Forschung in der Abteilung Biochemie, an der Schule für Zahnmedizin an der University of Pennsylvania, die Wechselwirkungen der FGF2- und BMP4-Signalgebung bei enchondraler Ossifikation als einen möglichen pathogenen Mechanismus für FOP. Interessanterweise zeigen die Daten, dass FGF2 deutlich die BMP4-Gen-Expressivität sowohl in Vorläuferzellen der Knorpelzellen als auch in differenzierten Knorpelzellen deutlich nach oben reguliert. Dies hat zu der Hypothese geführt, dass FGF2 ein vorgeschalteter transkriptionaler Regulator des BMP4-Gens ist, und dass integrierte FGF2- und BMP4-Signalgebung eine wesentliche Rolle bei der enchondralen Ossifikation spielen.

Im Lauf des Jahres 2003 untersuchte Dr. Nah in einem Versuch, wie die FGF-Signalgebung bei der transkriptionalen Aktivierung des BMP4-Gens in Knorpelzellen, im Bereich des BMP4-Promotors (regulierende DNA-Sequenzen eines Gens), der FGF2-Antworten überträgt. Dr. Nah analysiert zur Zeit den BMP-Promotor, um den ansprechenden Bereich in den Knorpelzellen und in den Bindegewebszellen in Vorstadium zum Knorpel zu identifizieren. Aufgrund vorläufiger Daten kann man annehmen, dass es sich bei der ansprechende Region um eine Ausdehnung der regulativen DNS zwischen 700 und 1.600 vorgeschalteten Basenpaaren der transkriptionalen Startseite des BMP-4-Gens handelt.

Ein Zusammenfluss von Untersuchungen während der vergangenen Jahre aus zahlreichen Labors auf molekularem, zellulärem und klinischem Niveau zeigt eine wichtige Beziehung zwischen der FGF-Signalgebungsbahn und der BMP-Signalgebungsbahn in zahlreichen Entwicklungs- und Regenerationsvorgängen. Sehr oft gibt es eine molekulare Interaktion zwischen diesen beiden Signalgebungsbahnen, so zwischen FGF-10 und BMP-4 während der Lungenmorphogenese, zwischen FGF-8 und BMP-4 während der Zahnentwicklung, zwischen FGF-2 und BMP-4 während des Schlusses der cranialen Fuge, zwischen FGF-2 und BMP-4 während der Bildung der Gliederknospen und zwischen FGF-2 und BMP-4 während der Bruchheilung.

Der Fall einer FGF-2- und BMP-4-Interaktion während des Schlusses der cranialen Fuge ist für die FOP-Studie besonders wichtig. In einer Reihe von besonderen Untersuchungen zeigten Warren und seine Kollegen kürzlich, dass der BMP-Antagonist Noggin die Verschmelzung der cranialen Fuge sowohl bei der Maus als auch beim Menschen reguliert. Sie zeigten, dass die FGF-2-Signalgebungsbahn die Fähigkeit von BMP-4, die Ausschüttung von BMP-Antagonisten zu erhöhen, drastisch hemmt, demnach die Balance zugunsten der Knochenbildung kippt; nicht, indem der BMP-4-Spiegel erhöht wird, sondern durch die Hemmung der Nogginreaktion, die normalerweise auf ein BMP-4-Signal folgt. Obwohl bei FOP keine Abnormalitäten bei der cranialen Fuge bekannt sind, fordert die Überaktivität der FGF-Signalgebungsbahn bei FOP und die bekannte Interaktion zwischen diesen beiden stark regulierten und erhaltenen Signalgebungsbahnen eine besonders intensive Beachtung bei zukünftigen FOP-Studien.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Untersuchungen, die vorsichtig die Interaktionen zwischen der FGF- und der BMP-Signalgebungsbahn definieren, neue Einsichten in den wirkungsvollen Mechanismen geliefert haben, die der Bildung von ersten krankhaften Veränderungen bei FOP unterliegen und die anfangen, unser Denken hinsichtlich möglichen Nutzens von Medikamenten, die die Interaktionen zwischen diesen Bahnen verändern, indem sie das Wachstum der krankhaften FOP-Veränderungen kontrollieren, zu beeinflussen.

III. ZELLEN

Einblicke in die Identität der FOP-Zielzellen

Ein wichtiges Stück des FOP-Rätsels, das gelöst werden muss, damit die Komplikationen von FOP wirksam verhindert werden können, ist die Identifizierung der Zielzellen bei der heterotopen Knochenbildung. Es ist wichtig, nicht nur zu bestimmen, welche Moleküle die BMP-4-Bahn bei FOP aktivieren, sondern auch, welche Zellen die Nachricht erhalten und weiterverarbeiten, die zur Bildung heterotopen Knochens führen. Die Festlegung des Ursprungs der krankhaft veränderten Zellen bei FOP würde einen großen Durchbruch in der FOP-Forschung bedeuten, da es wahrscheinlich auf genaue Ziele und „heimliche Strategien“ für einen therapeutischen Eingriff hinweisen würde. Die Erkenntnisse über die Identität der Zellen, die fälschlicherweise während des Prozesses der heterotopen Ossifikation zu Knochenzellen werden, wird ein wichtiger Bestandteil in der Entwicklung von Behandlungen und Therapien nicht nur für FOP sein, sondern auch für eine Fülle gängiger Krankheiten heterotoper Ossifikation ebenso für die „Schwesterkrankheit“ von FOP, Progressive Ossäre Heteroplasie (POH). Während des vergangenen Jahres sind unsere Versuche, den zellulären Ursprung heterotopen Knorpels und Knochenbildung zu untersuchen, rasant vorangegangen und haben klare und überraschende Ergebnisse geliefert.

Das „Developmental Grants Program of The Center for Research in FOP & Related Disorders“, gegründet von der Cali Family Research Stiftung, hat in den vergangenen Jahren eine Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. David Goldhamer finanziert, um die reagierenden Zellen bei krankhaften FOP-Veränderungen heraus zu finden. Diese Arbeit, die vergangenes Jahr erstmalig beschrieben wurde und die nachstehend erläutert wird, stellt einen großen Durchbruch in der FOP-Forschung dar, da sie anfängt, die Ziele für therapeutische Eingriffe zu identifizieren. Aber zuerst müssen wir einige Hintergrundinformationen geben.

Ursprünglich war die Arbeit darauf ausgerichtet zu testen, ob Satellitenzellen, die fertigen Stammzellen des Skelettmuskelgewebes, Vorläufer heterotopen Knochens, der durch BMP4- ausgelöst wurde, sind. Die Triebkraft, diese Frage zu stellen, beruhte auf zwei Beobachtungen: 1. FOP-Erkrankungen sind oft im Skelettmuskelgewebe. 2. Unter gewissen Zellkulturbedingungen zeigen Muskelzellen Eigenschaften von Knochenzellen.

Zwei weitere Zelltypen, die sich im Skelettmuskelgewebe befinden - perivaskuläre Zellen (glatte Muskelzellen, die die kleinen Blutgefäße umgeben), und endotheliale Zellen (Zellen, die das Innere der Blutgefäßwände bilden) – lassen vermuten, dass diese Zelltypen mögliche Mitverantwortliche bei der heterotopen Knochenbildung sein könnten. Beide Zelltypen werden im Frühstadium von FOP-Erkrankungen gefunden und beide Zelltypen zeigen an anderen Schauplätzen knochenbildende Eigenschaften. Deshalb hat sich der Versuchsbereich der ursprünglichen Arbeit ausgeweitet, um diese zusätzlichen Zelltypen mit einzuschließen. Die Versuche benutzen eine ausgeklügelte Zellsuchmethode bei Mäusen, um den Werdegang von Satellitenzellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu verfolgen, nachdem die heterotope Knochenbildung mit rekombinantem BMP-4 angeregt wurde.

Bis vor kurzem waren Versuche zur Zellsuche aus technischen Gründen nicht möglich, da man nicht in der Lage war, spezielle Zellpopulationen sicher zu markieren. Diese technische Hürde wurde nun überwunden durch Methoden, die eine ständige, auf genetischer Basis beruhende, Markierung von besonderen Zelltypen zulassen, indem man eine ausgeklügelte Genbezeichnungsmethode anwendet.

Wir haben bereits zuvor gezeigt, dass die Injektion von BMP-4 in den Muskel von Mäusen eine heterotope Knochenbildung hervorruft, die histologisch zu jener identisch ist, die bei krankhaften FOP-Veränderungen auftritt. Indem man BMP-4 in den Muskel von Mäusen spritzt, deren Satellitenzellen, perivaskulären Zellen oder Endothelzellen genetisch gekennzeichnet sind, ist es uns jetzt möglich, sowohl das Vorhandensein als auch das Ausmaß des Beitrags zur heterotopen Knochenbildung eines jeden Zelltyps zu bestimmen.

Der erste Teil der Studie identifizierte zwei Vorläuferzellpopulationen, die zur heterotopen Knorpel- und Knochenbildung, ausgelöst durch BMP-4, beitragen. Ergebnisse mit den MyoD-Cre transgenetischen Mäusen (die Satellitenzellen kennzeichnen die Zellen, die den Muskel nach einer Verletzung regenerieren) zeigen eine Beteiligung von Satellitenzellen in der heterotopen Knochenbildung, übereinstimmend mit ihrem bereits identifizierten osteogenetischen Potential, obwohl sie anscheinend nicht den überwiegend daran beteiligten Zelltyp ausmachen.

Ein anzahlmäßig weitaus größerer Anteil an heterotopem Knorpel und Knochen wurde bei Zellen, gekennzeichnet durch die Tie-2-Gen-Expressivität (aus den Tie-2-Mäusen) beobachtet. Obwohl blutbildende Zellen Tie-2 ausschütten, lassen Knochenmarktransplantationsversuche vermuten, dass eine umfangreichere Beteiligung des Knochenmarks an durch BMP-4 ausgelöstem heterotopem Knorpel oder Knochen im Frühstadium der krankhaften Veränderungen kaum wahrscheinlich ist. Die wahrscheinlichste Quelle dieser Tie-2-positiven Zellen sind daher endotheliale (Blutgefäß-)Zellen der örtlichen Gefäßstruktur innerhalb des Skelettmuskels oder der Tie-2-Stammzellen, die sich im Muskelgewebe befinden.

Versuche mit Cre-Mäusen, mit langkettigem Myosin glatter Muskelzellen, in denen das Cre-Rekombinase-Enzym ausschließlich im weichen Muskel auftritt, zeigte keine Kennzeichnung der Knorpelzellen in den BMP-4-Implantierungs-Versuchen. Diese Daten schließen glatte Muskelzellen als Vorläufer heterotoper, durch BMP4-ausgelöster, Knochenbildung in diesem Tierversuch aus. Dieses Ergebnis war unerwartet, da glatte Muskelzellen osteogenetische Marker in Zellkulturen ausschütten und im Übermaß zwischen den fibroproliferativen Zellen bei den ersten FOP-Veränderungen auftreten.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen die unglaubliche und unerwartete Plastizität der Stammzellen, die aus den Muskeln und der örtlichen Gefäßstruktur in der Evolution der durch BMP ausgelösten Erkrankungen herrühren und deren Fähigkeit, verschiedene Marker während ihrer Transformation in einen Knorpel- oder Knochenphänotyp auszuschütten.

Diese Daten, gemeinsam mit denen aus den FOP-Erkrankungen selbst, lassen stark vermuten, dass die Zellen bei FOP-Kranken eher nicht aus Zelllinien glatter Muskeln hergeleitet werden können, sondern eher Marker glatter Muskelzellen auf ihrem Weg der Differenzierung in Knorpel und Knochen ausschütten. Trotz seiner Ähnlichkeiten mit FOP ist es jedoch wichtig, zu bedenken, dass sich die durch BMP4- ausgelösten Versuchssysteme für FOP in wesentlichen Teilen von denen bei FOP-Erkrankungen unterscheiden, obwohl die aktuelle Interpretation als wahrscheinlicher erscheint.

So hat uns ein wichtiges und neuartiges Projekt in der Zellbiologie einen außergewöhnlichen Einblick in die Zellentstehung bei FOP-ähnlichen Erkrankungen, ausgelöst durch BMP, gewährt. Unsere Forschung hat mindestens zwei Quellen von Vorläuferzellen identifiziert, die bei Mäusen zu heterotoper Knochenbildung beitragen. Ein geringerer Beitrag durch vermutete Muskel-Satellitenzellen wurde beobachtet, die an einigen Stellen in ihrer Entwicklungsgeschichte MyoD ausschütteten. Während unserer zukünftigen Arbeit werden wir untersuchen, ob diese Vorläuferzellen bewegungslose oder aktivierte Satellitenzellen darstellen oder ob eine vorhandene Stammzellenpopulation, die MyoD-Cre Transgene ausschüttet, verantwortlich ist. Einen weitaus wichtigeren Anteil haben die Zellen, die Tie-2 ausschütten. Endotheliale Zellen stellen einen großen Teil Tie-2-positiver Zelltypen im Skelettmuskel dar. Unsere Arbeitshypothese ist, dass reife Tie-2-positive endotheliale Zellen aus dem Skelettmuskel, in Anwesenheit reichlich vorhandener BMPs, eine phänotypische Umwandlung in Knorpel- und Knochenzellen durchlaufen. Laufende Experimente untersuchen die genaue Identität dieses Tie-2-positiven Vorläufers und des Mechanismus, durch den vaskuläre Marker während der Evolution FOP-ähnlicher Erkrankungen, ausgelöst durch BMP, ausgeschüttet werden. Diese Arbeit bezieht sich direkt auf die Zelloberflächenmarker, die in kohärenten Zellen des Blutes gefunden wurden, eine neue und wichtige Entdeckung aus dem Labor aus dem Jahr 2003, auf die wir in diesem Bericht später noch zu sprechen kommen.

Zusammenfassend haben wir herausgefunden, dass Erkrankungen, ausgelöst durch BMP-4, zelluläre Beihilfe von Muskel-Satellitenzellen als auch von endothelialen Zellen, die sich im Skelettmuskel befinden, erhalten. Gemeinsam mit den Erkenntnissen aus der Zusammenarbeit mit Catharine Shanahan von der Cambridge Universität, schütten FOP-Läsionen während des Verlaufes der Evolution Marker glatter Muskelzellen aus, obwohl es unwahrscheinlich ist, dass die Knorpel- und Knochenzellen bei FOP-Läsionen aus glatten Muskelzellen entstehen. Weiterhin weisen unsere

Versuche, die Zellabstammungslinien zu verfolgen, darauf hin, dass zusätzliche Zellpopulationen zu den fibroproliferativen Zellen, Knorpel- und Knochenzellen bei der Entwicklung von FOP-ähnlichen Läsionen hinzu kommen. Der Ursprung dieser Zellen ist momentan unbekannt, aber andere Vorläufer und Stammzellenpopulationen werden aktiv verfolgt, indem die Cre/lox-Abstammungslinientechologie eingesetzt wird, mit der wir zurzeit so erfolgreich sind. Genug zu sagen, dass eine äußerst wirkungsvolle molekulare Zellabstammungslinientechologie durch das FOP-Labor und seine Mitarbeiter entwickelt und verbessert wurde, um den tatsächlichen Ursprung der Zellen bei FOP-ähnlichen Erkrankungen, ausgelöst durch BMP-4 zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Zellabstammungslinientechologie (in Zusammenarbeit mit dem Goldhamer-Labor an der Universität von Pennsylvania) und die Ergebnisse der Untersuchungen von Zellen FOP-Erkrankter (in Zusammenarbeit mit dem Shanahan-Labor an der Universität von Cambridge) lässt stark vermuten, dass ein erheblicher Teil der Zellen im Frühstadium der Erkrankung aus Blutgefäßen im Skelettmuskel stammen. Eine bedeutende von Experten überprüfte wissenschaftliche Abhandlung, die die Erkenntnisse der Shanahan-Studie beschreibt, wurde 2003 in **The Journal of Pathology** veröffentlicht.

Die Rolle der Gefäßstruktur bei der enchondralen Ossifikation: Einblicke aus Sicht der Entwicklungsbiologie

In einem wichtigen und darauf bezogenen Developmental Grants-Projekt, das vom Pacifici-Labor an der Universität von Pennsylvania durchgeführt wurde, wurde ein Versuch aus der Entwicklungsbiologie dazu benutzt, die Rolle von Blutgefäßen beim Beginn, der Entwicklung und der Vollendung der Knochenbildung des normalen Skeletts zu untersuchen. Es ist wohlbekannt, dass Blutgefäße zur Ersetzung von Knorpel durch Knochen während des fetalen und frühen nachgeburtlichen Lebens erforderlich sind. Blutgefäße sind zur Reparatur von Brüchen ebenso erforderlich wie zur ektopen Knochenbildung. Jedoch lassen einige experimentelle Beweise vermuten, dass Blutgefäße vielleicht weitere und unvorhergesehene Rollen in viel früheren Stadien der Skelettbildung und der heterotopen Knochenbildung spielen. Um diese Hypothesen zu überprüfen, führte das Pacifici-Labor zwei Versuchsreihen durch, die äußerst wichtige Einblicke in die Beziehung zwischen dem sich entwickelnden Skelett und dem sich entwickelnden Gefäßsystem und den identifizierten Faktoren, die bei diesen Interaktionen möglicherweise den Vermittler spielen.

Zusammengefasst mit den Entdeckungen aus den Goldhamer und Shanahan Labors, tragen diese Daten zum Verstehen und der Wichtigkeit des Gefäßsystem bei der Bildung von FOP-ähnlichen Läsionen bei.

Wenn wir uns das Auftreten lymphozytischer Infiltration um die Blutgefäße des Skelettmuskels bei den ersten krankhaften Veränderungen bei FOP ins Gedächtnis zurückrufen, beginnt ein gewaltiges Bild über die Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem vaskulären System bei der Bildung von heterotopen Knochen zu entstehen. Zusammen mit den Erkenntnissen aus den Goldhamer und Shanahan Labors tragen die Daten aus dem Pacifici Labor zum Verstehen und zur Bedeutung der Gefäßstruktur (und der Kontrolle der vaskulären Entwicklung) bei der Bildung von FOP-Läsionen bei. Wenn wir das Vorhandensein der Lymphozyteninfiltration um die Blutgefäße des Skelettmuskels im Frühstadium der FOP-Läsionen im Gedächtnis behalten, beginnt ein kräftiger Eindruck von der Wechselwirkung des Immunsystems und des vaskulären Systems bei der Bildung heterotopen Knochens zu entstehen.

Wichtige Kenntnisse vom FOP-Hauptlabor, dem Goldhamer Labor, dem Shanahan Labor und dem Pacifici Labor deuten stark auf die Bedeutsamkeit des Immunsystems und der Gefäßstruktur im Allgemeinen und der Lymphozyten und endothelialen Zellen besonders in der Evolution der durch BMP4-ausgelösten heterotopen Knochenbildung hin. 2003 gingen die eingehenden Untersuchungen auf diesem Gebiet weiter. In einem der folgenden Abschnitte des Jahresberichtes mit dem Titel „eine historische E-Mail und ein Durchbruch in der FOP-Stammzellenforschung,“ werden wir eine der aufregendsten und glücklichsten Entdeckungen in der FOP-Forschung in den vergangenen Jahren beschreiben; aber zuerst ein wenig Hintergrundwissen über die Gewebeerneuerung und die Stammzellen.

FOP: Die andere Seite der Gewebe- und Organregeneration

Embryonale Entwicklung ist eine hypnotisierende Metamorphose, die in der Bildung differenzierter Zellen, Gewebe, Organe und Organismen endet. Phenotypen, wenn sie erst einmal spezifiziert sind, behalten ihre Identität bei und werden durch das regulative Netzwerk, das sie verschlüsselt, kontrolliert. Die Erhaltung stabiler Phenotypen ist eines der großen unerforschten Reiche der

modernen Biologie und bildet das Herzstück des Verstehens von FOP. Einige Organe haben das Potential, sich selbst nach einer Gewebeverletzung zu reparieren. Knochen ist jedoch die Ausnahme und kann sich selbst vollständig nach einer Verletzung regenerieren. Aber bei FOP läuft die Regeneration ungezügelt ab und tritt in einer zeitlich und räumlich fehlerhaften Weise auf. Als Ergebnis erlebt das Bindegewebe eine Ersetzung durch Knochen. Woher kommt diese unerwartete Metamorphose? Reife Stammzellen, multipotente Vorläuferzellen, die ihre wahre Identität nur während einer metabolischen und regenerativen Krise verleugnen, enthalten einige der Antworten auf diese Fragen.

Die Studien, die im vorausgegangenen Abschnitt dieses Berichtes beschrieben wurden, beginnen diese Punkte zu erforschen, indem sie versuchen diese Mitverschwörerstammzellen zu identifizieren, indem sie stabile Gewebemarker benutzen, um zu sehen, was sie unter Ruhebedingungen verheimlichen könnten – so ähnlich wie ein Attentäter, der einem normalen Beruf nachgeht, solange er nicht zu seinem anderen Beruf veranlasst wird.

Es ist ausreichend bekannt, dass reife Stammzellen oder multipotente Vorläuferzellen existieren und in vielen reifen Gewebearten auf Lauerstellung liegen, wie wir es bereits überzeugend bei den Tie2-positiven-Zellen im vorigen Abschnitt dieses Berichtes gesehen haben. Reife Stammzellen wurden für viele Gewebearten beschrieben, und ein allgemein auftretendes Thema ist, dass das Schicksal dieser reifen Stammzellen eher durch die Umgebung, in der sie sich befinden, als durch ihre spezifische Verknüpfung bestimmt werden können. Es gibt keinen vorhersagbaren Erscheinungsort von Stammzellen in den meisten reifen Geweben und wir besitzen immer noch nur ein begrenztes Handwerkszeug, sie zu identifizieren. Weiterhin lassen immer mehr Anzeichen vermuten, dass reife Stammzellen, wie metastatische Tumorzellen, gewöhnliche molekulare Mechanismen verwenden und es darauf absehen, Gewebe zu beschädigen. Zur Zeit ist sehr wenig über die molekularen Codes bekannt, die diese Art heimlicher Absicht zulassen.

Während viele Forscher die Stammzellenbiologie als ein Versprechen zur Geweberegeneration ansehen, muss das FOP-Forschungsteam den Ursprung und das Schicksal der Stammzellen verstehen, um die regenerative Antwort zur falschen Zeit und am falschen Ort zu stoppen.

Was genau sind diese Stammzellen? Wo befinden sie sich? Was hält sie normalerweise ruhig und noch wichtiger, wie bringen überaktive BMP-Bahn-Signale sie auf eine wilde Reise mit katastrophalen Konsequenzen?

Im nächsten Abschnitt dieses Berichtes, werden wir kurz die Biologie und Eigenheiten von Stammzellen untersuchen und zwar als Auftakt, um einen der größten Fortschritte in der FOP-Zellbiologie während der vergangenen Jahre zu beschreiben.

Was sind Stammzellen?

Es gibt zwei größere Klassen von Stammzellen: Embryonale Stammzellen und reife Stammzellen. Ungeachtet dessen, ob wir von embryonalen oder reifen Stammzellen sprechen, eine richtige Stammzelle muss bestimmte Funktionskriterien erfüllen. Zuerst muss eine Stammzelle eine Klon-Stammzelle sein, oder dazu fähig sein, sich selbst unbegrenzt zu vervielfältigen. Zweitens muss eine Stammzelle durch Teilung zu einer weiteren Stammzelle führen und sie muss auch in der Lage sein, vielfältig differenzierte Zelltypen zu bilden. Drittens muss eine Stammzelle die Fähigkeit besitzen, funktionsgemäß Gewebe *in vivo* (im Körper) wiederherzustellen, nicht nur in Zellkulturen. Demnach haben Stammzellen die einzigartige Fähigkeit, nicht nur mehr Stammzellen (Selbsterneuerung) wiederherzustellen, sondern auch zu differenzierten Abkömmlingen *in vivo* zu führen. Stammzellen sind in allen Entwicklungsstufen vorhanden und existieren wahrscheinlich in allen multizellulären Organismen.

Embryonale Stammzellen kommen aus dem Inneren der Zellmasse des Embryos im Frühstadium (und heißen Blastozyste) und haben die Fähigkeit, dass sie zu jeder Körperzelle werden können. Embryonale Stammzellen sind wirklich vielseitig wirksam und unterliegen nicht der Zellalterung. Sie sind leicht aus den Embryonen im Frühstadium zu gewinnen und wachsen in Kulturen unbegrenzt. Embryonale Stammzellen können genetisch manipuliert werden, um einen genetischen Defekt zu korrigieren und sie können durch den Gebrauch spezieller Kulturen oder durch Genmanipulation dazu gebracht werden, zu jedem Zelltyp zu werden.

Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen, sind reife Stammzellen in vielfacher Weise wichtig und unterliegen in Kulturen der Zellalterung. Reife Stammzellen sind wegen ihres, im Allgemeinen geringen Aufkommens in den unterschiedlichsten Geweben, schwierig zu bekommen, und man findet sie nach der Geburt überall im Gewebe verstreut. Ganz generell ist die therapeutische Wirksamkeit

reifer Stammzellen geringer als die embryonaler Stammzellen. Mit anderen Worten können sich aus embryonalen Stammzellen alle Zellarten im Körper bilden, wogegen reife oder gewebespezifische Zellen ein eingeschränkteres Repertoire an Differenzierung haben. Während embryonale Stammzellen genetisch manipuliert werden können, um einen genetischen Defekt mit der derzeitigen Technik zu korrigieren, können reife Stammzellen genetisch nur durch die Einführung retroviraler Transgene manipuliert werden.

Während außergewöhnliches Interesse, Leistungsvermögen und gegensätzliche Meinungen den Einsatz embryonaler Stammzellen umgeben, hat die Untersuchung und der Einsatz reifer Stammzellen in den vergangenen Jahren in einem weniger kontroversen Klima mehr an Aufmerksamkeit gewonnen. Von Martin Corblin und Zeev Estrov wurde im August 2003 in **The New England Journal of Medicine** eine ausgezeichnete kritische Abhandlung über das Gebiet reifer Stammzellen zur Gewebereparatur veröffentlicht.

Reife Stammzellen, die in den unterschiedlichen Geweben sitzen, haben ein unterschiedliches Repertoire an Erneuerung und Differenzierung. Die am besten erforschten Typen reifer Stammzellen befinden sich im Knochenmark. Untersuchungen, die sich über das vergangene Jahrzehnt erstreckten, haben zwei Typen von Markstammzellen erläutert. Es handelt sich dabei um hämatopoietische Stammzellen, die zu allen Zelltypen im peripheren Blut führen und die mesenchymalen Stammzellen, die zu zahlreichen, differenzierten Zelltypen, einschließlich des Knorpelknochens, der Sehnen, des Fetts und des Muskels führen. Der Mechanismus, durch den Knochenmarkstammzellen vielleicht für vielerlei differenziertes Gewebe erneuert werden, ist noch nicht gut erforscht. Es ist möglich, und in der Tat wahrscheinlich, dass der Körper vielfältige Stammzellquellen hat, die unter verschiedenen Bedingungen hergenommen werden können, um dem Prozess der Gewebereparatur und –regeneration dienlich zu sein und letztendlich bei Krankheiten wie FOP versagen.

Eine historische E-mail und ein Durchbruch in der FOP-Stammzellenforschung

Im November 2003 sagte der Physiker Brian Greene in einem Leitartikel in **Scientific American**: „Der Unterschied, ob man einen Durchbruch schafft oder nicht, liegt oft nur an einem kleinen Begriffselement“ oder, wie der weltbekannte Biologe Louis Pasteur sagte: „Die Chance begünstigt die bereits ausgearbeitete Ansicht.“ Diese Eigenschaften sind sehr beispielhaft in einer E-mail erläutert, die wir am Dienstag, dem 03. Juni 2003, von Dr. Robert Pignolo, einem Kollegen, der in unserem Labor an ein Projekt über POH arbeitete, bekamen. Dr. Pignolo ist ein Physik-Wissenschaftler, der sich auf geriatrische Medizin, mit einem wissenschaftlichen Interesse an der Zellbiologie des Alterns und der Regeneration spezialisiert hat. Er gesellte sich letztes Jahr als Stipendiat der Hartford Foundation in the Study of Aging zu unserem Labor und im Juli 2003 trat er der Fakultät der University of Pennsylvania, School of Medicine bei.

Von: Robert J. Pignolo
Gesandt: dienstag, 03. Juni 2003, 20:23 Uhr
An: Fred Kaplan und Eileen Shore
Betreff: Neue FOP-Daten

Fred and Eileen:

Obwohl ich hauptsächlich an Projekten arbeite, die POH betreffen, hielt mich das nicht davon ab, über FOP nachzudenken. Ich habe speziell über Wege nachgedacht, das Problem anzugehen, eine Krankheit zu untersuchen, bei der krankhaftes Gewebe nicht leicht verfügbar ist. Bis vor einem Monat fiel mir nichts ein, als dann zwei interessante Beobachtungen zusammen kamen. Die erste war ein Bericht, der weniger als zwei Jahre alt war, den ich kürzlich las und der Blut beschrieb, das aus haftenden Stammzellen (BdACs) abgeleitet wurde, die osteogenetisches (knochenbildendes) Potential besitzen. Als ich an verschiedenen Arten forschte, stellte sich heraus, dass Meerschweinchen BdACs haben, die mit Abstand das größte osteogenetische Potential haben. Bei der zweiten Beobachtung handelt es sich um etwas, über das auf einem Labor-Meeting gesprochen wurde, kurz nachdem ich im Labor angefangen hatte; es ging darum, dass Meerschweinchen zu einem hohen Prozentsatz heterotope Ossifikation haben. Das ließ die Frage aufkommen: Sind BdACs von FOP-Patienten irgendwie anders als die von Nichtbetroffenen? Die Möglichkeit, die Frage zu beantworten, ergab sich sehr bald, nachdem ich die Frage formulierte. Es gab genug Blut aus den Proben vom FOP-Familientreffen in Disney (Anfang Mai), um BdCA-Kulturen von FOP-Patienten und Nichtbetroffenen anzusetzen. Ich erhielt BdAC-Kulturen von 14 Personen (sieben FOP-Patienten und sieben Nichtbetroffene). Die drei bemerkenswerten Ergebnisse lauten wie folgt:

1. BdACs kommen bei Nichtbetroffenen selten vor, sind aber bei FOP-Patienten gängig.
2. Verglichen mit Nichtbetroffenen, scheinen sich die BdACs von Patienten mit FOP *in vitro* schneller zu vermehren.
3. BdACs von Patienten mit FOP erlangen eine morphologische Ausprägung von Zellen, die von Anfang an in den Kulturen vorkommen, und sich von Zellen Nichtbetroffener unterscheiden. Diese Ergebnisse sind für mich sehr aufregend und ich würde Ihnen diese neuen Daten gerne zeigen. Ich habe morgen Vormittag zwischen 9.00 und 10.30 Uhr eine Besprechung, aber danach könnte wir uns jederzeit treffen oder am Donnerstag.

Mit freundlichen Grüßen
Bob“

Die Wichtigkeit und die Auswirkungen dieser Erkenntnis werden jedem sofort klar. Dr. Pignolos Erkenntnisse lassen vermuten, dass es bei FOP vielleicht eine Quelle von aus Blut-abgeleiteten Stammzellen gibt, die die Fähigkeit der Selbsterneuerung und die Eigenschaft, mineralisiertes Gewebe *in vitro* und möglicherweise (muss noch erforscht werden) *in vivo* zu erzeugen, besitzen.

Es ist wohl bekannt, dass hämatopoietische Stammzellen aus dem Knochenmark das Blut vermehren und dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark Zellen des muskuloskeletalen Systems vermehren. Eine grundlegende Frage ist, ob zirkulierende Stammzellen eine Vermehrung der Zellen des muskuloskeletalen Systems bewirken und, wenn das der Fall ist, wo liegt ihr Gewebeansprung, die physiologische Rolle und das regenerative Potential bei Krankheiten wie FOP?

In der zweiten Hälfte des Jahres 2003 (seit der ersten Entdeckung) ging die Arbeit an dieser Neuentdeckung mit großer Begeisterung weiter und die Arbeit an diesem Projekt wird, finanziell unterstützt durch Gelder vom Center for Research in FOP and Related Disorders, fortgeführt. Im Laufe der nächsten zwei Jahre liegt die besondere Zielsetzung in der Bestimmung des molekularen Phentyps von BdACs bei FOP-Patienten, die Bestimmung des osteogentischen Potentials von BdACs von FOP-Patienten und Nichtbetroffenen und die Bestimmung des Ursprungs von BdACs durch die Methode der Verfolgung der Zellabstammung, ähnlich denjenigen, die in vorhergegangenen Abschnitten dieses Berichtes dargestellt wurden. Diese Arbeit an der Biologie reifer Stammzellen bietet die Möglichkeit unser Wissen über FOP zu revolutionieren.

Zusätzlich zu den Originalblutproben, die wir von der Disneyreise erhielten, bekamen wir zahlreiche zusätzliche Blutproben von großzügigen Patienten und Familienmitgliedern des ersten lateinamerikanischen FOP-Familientreffens in Sao Paulo, Brasilien, im Oktober 2003 (organisiert von Dr. Patricia Delai). Sie werden in laufenden Versuchen benötigt. Wie immer, sind wir den Patienten und Familien, die an diesen wichtigen Studien teilnehmen, dankbar.

Das Knochenmarkstammzellengeschenk

Während das Ursprungsgewebe des Blutes, das adhärenzte Zellen (BdACs) hervorbringt, wie es im vorherigen Abschnitt dieses Berichtes bereits beschrieben wurde, noch nicht entdeckt wurde, werden diesen Verknüpfungsstudien im kommenden Jahr einen unserer Arbeitsschwerpunkte darstellen. Es ist jedoch bekannt, dass mesenchymale Stammzellen, die aus dem Knochenmark stammen, die unverkennbare Eigenschaft haben, alle Arten von Bindegewebe hervor zu bringen. Bis jetzt wurde ein Großteil der Arbeit an FOP, besonders Arbeiten, die mit der genauen Darstellung der BMP-Bahnen in FOP-Zellen zu tun haben, auf Zellen hämatopoietischen Ursprungs, solchen wie Lymphozyten, beschränkt, da diese die einzigen Zelltypen sind, die überall und mit großer Sicherheit von den FOP-Patienten für die Studien zur Verfügung stehen.

Im Laufe der vergangenen Jahre wurde uns klar, dass eine sichere Quelle von reifen Stammzellen von FOP-Patienten unsere Bandbreite an Versuchen, die wir durchführen könnten und das daraus gewonnene Wissen, deutlich erweitern würde. Obwohl es möglich ist, solche Zellen aus dem Blut der Nabelschnur zu isolieren, erhielten wir voraussichtlich nur sehr wenige Arten von FOP-Patienten. Zudem könnte das Blut der Nabelschnur einen zukünftigen Nutzen haben, wenn eines Tages eine Genkorrekturtherapie möglich ist.

Der Eingriff, um reife Stammzellen aus dem Knochenmark von FOP-Patienten zu erhalten, ist höchst invasiv und traumatisch und würde wahrscheinlich zu FOP-Schüben führen. Die beste und sicherste Methode ist eine Knochenmarkspende nach dem Tod, um reife mesenchymale Stammzellen von FOP-Patienten zu erhalten. Im vergangenen Jahr wurden dem FOP-Labor von den Familien dreier ganz besonderer Personen Spenden gemacht: Andy Sando, Heidi Hostettler und Robert Waterman.

Wie Nancy Sando, Andys Frau vergangenes Jahr in ihren Urlaubsgrüßen bemerkte: „Sogar im Tod steckt Leben. Es gibt einen sehr brauchbaren und wertvollen Teil von Andy, der im FOP-Labor in Philadelphia noch am Leben ist. Unser Pathologe am Ort konnte Knochenmark entnehmen, das vom FOP-Team angefordert wurde und das eine bemerkenswerte Menge lebender Stammzellen enthielt. Das Forschungsteam hatte nie zuvor lebende Stammzellen von einem FOP-Patienten erhalten und hat über 10 Jahre auf eine Spende dieser Art gewartet. Was für ein Wunder! Seitdem gab es im vergangenen Jahr weitere Spenden dieser Art. Also gab Andy die Lebensspende, sogar im Tod, an die zukünftige Generationen derer weiter, bei denen die Diagnose „FOP“ gestellt wird.“ Wir selbst hätten es nicht besser ausdrücken können.

Es besteht weiterhin Bedarf an krankhaft verändertem FOP-Gewebe

Letztendlich ist es wichtig, zum wiederholten Male zu erwähnen, dass viele dieser Versuche, Erkenntnisse oder Entdeckungen der vergangenen zehn Jahre im FOP-Labor nicht möglich gewesen wären ohne die überaus wichtigen FOP-Biopsie-Proben, die ihr euch so großzügig nehmen ließt. Während viele der oben beschriebenen Versuche entweder Blutproben oder hochentwickelte Tierversuche zur heterotopen Knochenbildung einsetzten, beruhten sie doch alle auf ersten Erkenntnissen aus Mustern, gewonnen aus Biopsien bei FOP-Erkrankten. Obwohl wir erkennen, dass diese Biopsieproben immer vor der endgültigen FOP-Diagnose entnommen wurden und wir sie nie im Wissen der Diagnose entnehmen sollten (um weitere Läsionen zu verhindern), liefern diese Biopsiebeispiele außergewöhnliche Einblicke in FOP, die auf keine andere Art und durch keine anderen, momentan zur Verfügung stehenden Mittel reproduziert werden können. An alle diejenigen von Ihnen in der FOP-Gemeinschaft, die diesen Bericht lesen und an die Biopsien erinnert werden, die sie machen ließen, und deren Proben wir bis jetzt noch nicht im FOP-Labor haben, würden wir bitten, mit uns Kontakt aufzunehmen, damit wir diese Proben für weitere Untersuchungen vorliegen haben. Wie die Familien mit mehreren betroffenen Generationen so wichtig für das Vorankommen der Genidentifizierung sind, und die Blutproben so wichtig für die BMP-Bahn- und Stammzellenstudien sind, sind die Biopsien von FOP-Erkrankten von unschätzbarem Wert für die FOP-Merkmale auf zellulärer Ebene und der Gewebesebene.

Wenn Sie Kontakt mit uns aufnehmen, werden wir ihnen die entsprechenden Formulare zukommen lassen, die das Krankenhaus oder die Klinik (wo Biopsien durchgeführt wurden) dazu berechtigen, Proben für Prüfungs- und Untersuchungszwecke freizugeben.

IV. Modelle

Die Wichtigkeit von Tierversuchen für FOP

Die Entwicklung einschlägiger Tierversuche für FOP ist ein wichtiges Sprungbrett für die Entwicklung wirkungsvoller Behandlungen. Während FOP-ähnliche Erkrankungen immer wieder einmal bei Hauskatzen, einigen Schweinen und letztes Jahr bei einem Hund beschrieben wurden, gibt es momentan kein bekanntes lebendes Tier, das für Versuche in Frage kommt. Es ist sogar zweifelhaft, ob die FOP-ähnliche Krankheit bei der Katze, dem Schwein oder dem Hund wirklich FOP ist. Meerschweinchen bilden sporadisch heterotopen Knochen, aber es nicht FOP. Ein wirklich zuverlässiger Tierversuch für FOP beim Menschen wird wahrscheinlich noch bis zur Entdeckung des Gens, das für FOP verantwortlich ist, warten müssen. Nachdem die Entdeckung gemacht und bestätigt wird, werden sofort Versuche gemacht, um einen wirklich zuverlässigen Tierversuch, der auf der Manipulation des identischen Gens in der Maus beruht, aufzubauen.

Das BMP-4-Matrigel-System: Ein nützlicher Tierversuch

Das zuverlässigste Versuchssystem für die Induktion isolierter FOP-ähnlicher Veränderungen ist das rekombinante (genetisch-hergestellte) menschliche BMP-4-Protein, vermischt mit einer heterogenen Trägersubstanz namens Matrigel, die in den Muskel der Maus gespritzt wird. Bis heute ist dies eine gebräuchliche Art, alle bekannten Stadien FOP-ähnlicher, heterotroper Knochenbildung zu reproduzieren. Diese Stadien schließen die Infiltration der Lymphozyten und Mastzellen, den Tod der Skelettmuskelzellen, die Bildung fibroproliferativer Veränderungen mit starker Angiogenese, die Umformung fibroproliferativer Veränderungen in Knorpel und die Verkalkung von Knorpel mit frischem heterotopem Knochen, der Knochenmarkbestandteile aufweist, ein. Wir haben diesen Versuch gebraucht, um die ersten entzündlichen Vorgänge, die mit heterotoper Knochenbildung, ausgelöst durch BMP-4, einschließlich der Infiltration der Lymphozyten und Mastzellen einhergehen, zu untersuchen, und auch um die Auswirkungen der anti-angiogenetischen Präparate wie Squalamine und BMP-Antagonisten, wie Noggin, auszutesten. Der rekombinante BMP-4-Matrigel-Maus-Muskel-Einspritz-Versuch ist weiterhin ein nützliches Versuchssystem, um verschiedenartige Behandlungsmöglichkeiten für FOP zu erhalten und dies wird wahrscheinlich auch weiterhin so bleiben, bis ein besserer Tierversuch auf der Basis der präzisen FOP verursachenden Genmutation(en) entwickelt werden kann. Wir werden später im Abschnitt „Behandlung“ auf diesen

Tierversuch zu sprechen kommen, wenn wir die neue bahnbrechenden Entdeckung „Beweis des Konzeptes“, bei der wir die Noggin-Gen-Therapie anwenden, um die durch BMP-4 ausgelösten heterotope Knochenbildung bei der Maus zu unterbinden, beschreiben (letztes Jahr wurde es zum ersten Mal beschrieben). Ein wichtiger wissenschaftlicher Beitrag, in dem das BMP-4-Matrigel-System beschrieben ist, wurde im Dezember 2003 im **Journal of Bone and Joint Surgery** veröffentlicht.

Lymphozyten von FOP-Patienten lösen frühe FOP-ähnliche Läsionen bei Nacktmäusen aus

Während des vergangenen Jahres haben wir an der Entwicklung und Gültigkeit eines auf Lymphozyten zurückzuführenden Versuchs mit einem Zellkultursystem weiter gearbeitet, das für die frühe Molekularpathologie und Histopathologie von FOP wichtig ist. Die Gültigkeit dieses Lymphozytenzellsystems beruht auf einer Reihe von Beobachtungen und Erkenntnissen aus Versuchen mit FOP-Lymphozyten ebenso wie aus den BMP-4-Signalbahnen in wichtigen Zellen:

1. Perivaskuläre Anhäufung von B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (mit folgender Infiltration und dem Tod des Skelettmuskels) sind die ersten histopathologischen Anzeichen bei FOP.
2. BMP-4-Signalgebung reguliert eine frühe Lymphozytendifferenzierung
3. BMP-4 kommt in krankhaft veränderten Lymphozyten bei FOP-Patienten im Übermaß vor.
4. Normale Impfungen (iatrogene* Aktivierung des Immunsystems) (Anm. d. Übersetzers: iatrogen = durch ärztliche Einwirkung hervorgerufen) führt bei FOP-Patienten zu heterotoper Ossifikation des Skelettmuskels an der Einstichstelle, aber nicht bei gesunden Kontrollpatienten.
5. Zellen abgeleitet aus zirkulierenden Lymphozyten entfalten bei FOP-Patienten eine Fehlregulierung der BMP-Signalgebung.

Diese Daten lassen vermuten, dass die Lymphozyten eine informative Versuchszelle sind, die für die frühe Molekular- und Histopathologie von FOP bedeutend sind. Die ohne weiteres verfügbaren und sicher erhältlichen Lymphozyten aus peripherem Blut (durch eine routinemäßige Blutabnahme) können im Labor unsterblich gemacht werden und für Studien an einem Tierversuchssystem eingesetzt werden.

Um die Fähigkeit von FOP-lymphoblastoiden Zellen, FOP-Läsionen hervorzurufen, zu bestimmen, implantierten wir lymphoblastoide Zellen, die wir von FOP-Patienten und von nicht betroffenen Familienmitgliedern erhielten, in athymische Nacktmäuse (Mäuse, deren Immunsystem schwach ist, und die Zellen aus anderen Arten, wie z.B. des Menschen, nicht abstoßen). Zellen von Nichtbetroffenen sind weder gewachsen noch haben sie kleine Schwellungen mit einem kleinen Beweis fibrotischer oder angiogenetischer Reaktionen gebildet.

Im Gegensatz dazu bildeten Zellen von FOP-Patienten tumor-ähnliche Schwellungen.

Die histopathologische Evaluation dieser Veränderungen zeigt, dass FOP-Zellen Angiogenese und eine fibrotische Reaktion in der Wirtsmaus auslösen, von der Erscheinungsform ähnlich den frühen FOP-Läsionen. FOP-ähnliche, durch Zellen ausgelöste, Läsionen wurden gründlich auf menschenpezifische genetische Sequenzen untersucht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Zellen, die ursprünglich von FOP-Patienten stammen, Veränderungen beim Zellwachstum und/oder Differenzierungen und Scheinabläufe bei den ersten FOP-Läsionen auslösen. 2003 fingen wir an, das Noggin-Gen-Therapie-System (das im späteren Verlauf des Berichtes beschrieben wird) einzusetzen, um die Empfindlichkeit der durch Lymphozyten ausgelösten Läsionsbildung gegenüber dem BMP-Antagonisten-Noggin zu testen. Von jetzt an fängt die Implantation von Zellen, die von FOP stammen, bei Nacktmäusen an, ein äußerst nützliches Zellmodellsystem zur Untersuchung der Frühstadien der FOP-Krankheitsbildung zu werden, und schließlich wird es die Zwischenlösung für ein Versuchssystem zum Austesten möglicher Therapien sein.

Die mehrfach vererbte Exostose und FOP: Das Erforschen der Beziehungen

Stellt euch für einen Moment die Membranoberfläche einer Zelle vor – eine dichte Blase bedeckt mit Rezeptoren, die nach Hormonen, Wachstumsfaktoren, Morphogenen und signalgebenden Molekülen aus der nächsten Umgebung greifen. Nachdem sie sie gebunden haben, übertragen sie Nachrichten in das Innere der Zelle in ein molekulares Relais, das nachgeschaltete Targets an und ausschaltet. Zwischen den Rezeptoren der Zelloberfläche zwischengelagert, befinden sich Kanalproteine – molekulare Zugänge, die wie eine Reihe von Dämmen und Sperren wirken, um Wassermoleküle und Ionen nach geringem Kraftaufwand in die Zelle herein und heraus zu lassen. Jetzt stellt euch für einen Moment vor, dass um diese zellspezifische molekulare Maschinerie von Rezeptoren und Kanälen herum ein dichter Wald bestehend aus Proteinen, die im rechten Winkel auf der Zellmembran verankert sind wie Bäume, die die Proteinkanäle und Rezeptoren auf dem Waldboden unten hemmen. Ausgehend von diese Proteinstämmen gibt es ein dichtes Netzwerk senkrechter Zweige, bestehend aus langen Ketten sich wiederholender Zuckermoleküle. Diese großen und zahlreichen großen baumähnlichen Moleküle mit ihrem dichten Netzwerk zuckerähnlicher Zweige nennt man Zelloberflächen-Heparan-Sulfat-Proteoglycane (HSPGs). Die Zuckermoleküle, die sich vom Proteinkern heraus ausbreiten wie große Zweige, sind reich an Sulfatgruppen, die ein Einnisten der

Wachstumsfaktoren, Hormone und Morphogene möglich machen. Unter den Wachstumsfaktoren, Hormonen und Morphogenen, die eine besondere Neigung zu den Sulfatzweigen dieser riesigen baumähnlichen Moleküle haben, sind die Fibroblastwachstumsfaktoren, die Igelproteine und die knochenmorphogenetischen Proteine und deren Antagonisten Noggin und Gremlin.

Die großen baumähnlichen Proteinstämme der HSPGs, die diese riesige Kappe von Sulfatzuckerverzweigungen unterstützen, heißen Syndekane und Glypikane und sind durch Gene des gleichen Namens verschlüsselt. Die Zuckerverzweigungen sind nicht durch Gene verschlüsselt, aber ihre Ansammlung auf dem Proteinstamm ist durch Enzyme gesteuert, die durch die Gene EXT1 und EXT2 verschlüsselt sind. Die Hinzufügung von Sulfatgruppen zu den zuckerähnlichen Verzweigungen wird auch durch Enzyme reguliert und verwandelt sie in molekulare Klettverschlüsse für die verschiedenartigen Morphogene und Morphogenantagonisten, die mit ihnen zusammenhängen.

Diese HSPGs (die riesigen baumähnlichen Proteinkerne mit ihren dicht mit Sulfaten besetzten zuckerähnlichen Verzweigungen) sind Regulatoren molekularer Zusammenstöße auf der Zellmembran. Viele HSPGs wirken wie Co-Rezeptoren bei der morphogenen Signalgebung. Diesen HSPGs wurde kürzlich viel Aufmerksamkeit bei der BMP-Signalgebung und der Krebsbiologie geschenkt und erregten viel Aufmerksamkeit bei der Knochenentwicklung. Neueste Beweise unterstützen auch die Tatsache, dass einige HSPGs als Co-Rezeptoren bei der BMP-Signalgebung agieren und eine äußerst wichtige Rolle bei der Bildung und Regulierung von BMP-Morphogengradienten spielen, indem sie die Bindung von Noggin, einem möglichen BMP-Antagonisten, regulieren. Daher scheint es, dass HSPGs vielleicht eine äußerst wichtige Rolle dabei spielen, den Zugang der Morphogene, wie BMP4, zu deren Zelloberflächenrezeptoren zu regulieren.

Heterozygote Mutationen in EXT1 und EXT2, Gene, die die Enzyme verschlüsseln, die die Verbindung der Heparansulfatverzweigungen auf den HSPGs katalysieren, sind der wahrscheinliche Grund für mehrfach vererbte Exostosen (MHE).

Exostosen (auch bekannt als Osteochondrome) sind gutartige enchondrale Knochentumore mit einer knorpeligen Kappe, die aus dem Schaft der Knochen in der Nähe der Wachstumsplatten heraus wächst. Patienten mit multiplen vererbten Exostosen (MHE) haben überall in ihrem Skelett viele solcher Läsionen und leiden deswegen wahrscheinlich an chronischen Schmerzen, Unbeweglichkeit und unergründlichen Wachstumsstörungen.

Während über FOP viel geschrieben wird, ist es immer noch eine kaum bekannte Tatsache, dass Patienten mit FOP eine Vorliebe für die Entwicklung multipler Osteochondrome haben, die denen ähneln, die bei Patienten mit MHE beobachtet werden können (obwohl sie normalerweise bei FOP in eingeschränkter Anzahl und Streuung auftreten). Die meisten Patienten mit FOP entwickeln symmetrische Osteochondrome in verschiedenartigen Mustern um das Knie herum aber auch in anderen Bereichen.

Zur Zeit ist unklar, wie die daraus resultierenden zellulären und molekularen Anomalien in Heparan-Sulfat-Protoglykan-(HSPG)Metabolismen zur jeweiligen Pathologie führen, wie sie bei Patienten, die MHE haben und als Folge FOP, erkannt wurden. Man glaubt jedoch, dass die Abnormalität bei der Fähigkeit der HSPGs, Morphogene, wie knochenmorphogenetische Proteine und deren Antagonisten, zu binden und abzusondern, vielleicht eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung dieser gutartigen enchondralen Tumore spielt. Die Gene, die EXT1 und EXT2 verschlüsseln, die Enzyme, die die Verbindung der mit Sulfat überhäuftten zuckerähnlichen Verzweigungen auf den HSPG-Proteinkernen katalysieren, fungieren als Tumorerdrückergene. Der Verlust einer Genreproduktion in Gremlin führt zu einer zunehmenden Anfälligkeit, Osteochondromen zu entwickeln. Der Verlust der zweiten Reproduktion des Gens in perichondralen Zellen in der Nähe der Wachstumsplatte ermöglicht die Bildung dieser gutartigen osteochondralen Tumore.

Obwohl die ursprüngliche genetische Schädigung, die für FOP verantwortlich ist, unbekannt ist, zeigen die Zellen von FOP-Patienten zahlreiche Defekte auf der BMP-Signalgebungsbahn, einschließlich der Unfähigkeit entsprechend auf BMP4 und dessen geheime Antagonisten, Noggin und Gremlin zu reagieren. BMP4 und seine geheimen Antagonisten sind HSPG-bindende Proteine. Die HSPGs mit ihrem herausragendem Netzwerk mit Sulfat belegter zuckerähnlicher Verzweigungen, die BMP4 und Noggin sowie andere morphogenähnliche Moleküle binden, agieren also normalerweise als starke Regulatoren der BMP-Signalgebung. Daher ist es verständlich, dass man sich fragt, ob die Unfähigkeit von FOP-Zellen entsprechend auf BMP4 und dessen geheime Antagonisten zu reagieren, vielleicht

das Ergebnis von Veränderungen entweder in der Zusammensetzung oder Konzentration der Zelloberflächen-HSPGs auf FOP-Zellen ist.

Die Möglichkeit, dass zwischen FOP und MHE auf der molekularen Ebene eine Beziehung besteht, ist faszinierend. Es gibt viele Ähnlichkeiten zwischen FOP und MHE. Es ist nicht schwer, die zwei Krankheiten auseinander zu halten, oder eine genaue Diagnose bei einer bestimmten Person bezüglich der einen oder anderen Krankheit zu treffen. Patienten mit MEH und FOP haben jedoch viele klinische Eigenschaften, wie oben erwähnt, gemeinsam. Es ist auch möglich, dass sie auf molekularer Ebene eine Verknüpfung gemeinsam haben, was dazu beitragen könnte, wichtige pathologische Geheimnisse ans Licht zu bringen, die immer noch beide Krankheiten umhüllen.

Ende 2003 begann eine Reihe von Versuchen, um das molekulare Profil der HSPGs auf FOP-Zellen zu erforschen und Zellen zu kontrollieren, um festzustellen, ob es irgendwelche Unterschiede bezüglich der Fähigkeit, BMP4 und dessen Antagonisten zu binden, gibt. Während es noch zu früh ist, irgendwelche endgültigen Kommentare über diese Studien abzugeben, ist es möglich, dass diese Moleküle eine wichtige primäre oder sekundäre Rolle bei den abnormalen BMP4-Morphogengradienten der FOP-Zellen spielen. Im Laufe des nächsten Jahres werden wir auch weiterhin unsere Aufmerksamkeit auf diesen neuen, faszinierenden und äußerst wichtigen Aspekt der FOP-Forschung richten.

Krebs und FOP: Fehldiagnosen und verpasste Chancen: Das Denken außerhalb der Norm

Im engsten Sinne des Wortes sind FOP-Läsionen „Tumore“ oder „Neoplasmen“ – neue Gewächse, die nicht da sein sollten wo sie sind. Zusätzlich sind die Osteochondrome (Exostosen), die sich um das Knie des FOP-Patienten herum bilden, auch gutartige Tumore enchondralen Ursprungs. Trotz dieser semantischen Exkurse zu Läsionen, Neoplasmen, Tumoren, Knoten und Beulen werden bei FOP-Patienten oft Fehldiagnosen getroffen – sie hätten Krebs. Während die meistverbreitete Fehldiagnose bei Patienten, die an FOP leiden, die aggressive juvenile Fibromatose (ein gutartiger aber aggressiver Tumor) ist, wird bei vielen FOP-Patienten gefährlicherweise die Fehldiagnose – abhängig vom Reifegrad der FOP-Läsion zur Zeit, als die Biopsie gemacht wurde - gestellt, dass sie ein Fibrosarkom, Chondrosarkom oder Osteosarkom (alles überaus bösartige Tumore) hätten.

Während FOP-Läsionen dahingehend aggressiv sind, dass sie den umgebenden Skelettmuskel zerstören und ihn durch Knochen ersetzen, hört die Knochenbildung, die dadurch entsteht, schließlich auf. Das histologische und pathologische Erscheinungsbild der Läsion erscheint unter dem Mikroskop jedoch (für das untrainierte Auge) als bösartige Läsion, besonders im Frühstadium der Bildung. Daher sind zwei Tatsachen über FOP ganz klar: 1. FOP ist ein Beispiel für einen fehlgeleiteten aber kontrollierten Prozess zur Gewebereparatur, der in vielerlei Hinsicht an Krebs erinnert und 2. FOP ist **kein** Krebs. Während wir uns mit der Tatsache trösten können, dass FOP, trotz der regenerativen Falschantwort, die sich daraus ergibt, kein bösartiger Tumor ist, klingt das Sprichwort, dass „in jedem Problem eine Verheißung steckt“ wahr. Wir sollten nicht die Tatsache aus den Augen verlieren, dass es auf der zellulären und molekularen Ebene Ähnlichkeiten zwischen Krebs- und FOP-Zellen gibt, die uns helfen könnten, beide Prozesse besser zu verstehen. Wenn wir die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen FOP- und Krebszellen erforschen, besteht die Gelegenheit, kreativ darüber nachzudenken, damit wir die Pathophysiologie von FOP besser verstehen können.

In einer kürzlich erschienen Kritik über die Ursprünge von Krebs in der Ausgabe von **Scientific American**, im Juli 2003 beschreibt W. Wayt Gibbs kurz und bündig die sechs diabolischen Supermächte von Krebs. Interessanterweise kommen vier dieser Supermächte ganz genau so bei FOP vor.

1. Krebs- und FOP-Zellen wachsen sogar in Abwesenheit normaler „go“-Signale. Die meisten normalen Zellen warten auf externe Anweisungen bevor sie sich teilen, aber Krebs- und FOP-Zellen teilen die Eigenschaft, dass sie ihre eigenen Wachstumszusage-Anweisungen fälschen. Die meisten FOP-Läsionen werden durch eine äußere Verletzung ausgelöst, die die BMP-Signalisierungsbahn auslösen, die in FOP-Zellen stark gestört ist. Folglich erhalten FOP-Zellen, ebenso wie Krebszellen, abweichende „go“-Signale. Was sind die normalen „go“-Signale, die es einem Knochen erlauben, sich zu bilden oder zu regenerieren? Und wie genau werden jene Signale bei FOP gestört? Im Fall von Krebs, ist es vielleicht ein promiskuitiver Tyrosinkinase-Rezeptor, der die Zellteilung falsch reguliert. Im Fall von FOP ist es vielleicht ein promiskuitiver Serine-Threoninkinase-Rezeptor (ein BMP-Rezeptor aufgrund des falschen BMP-Rezeptor-Trafficking), der die induktiven Signale zur Ossifikation falsch reguliert.

2. Krebszellen wachsen trotz „Stop“-Befehlen, die von den Nachbarzellen erteilt werden. Bei FOP-Zellen, werden diese „Stop“-Befehle, die Produktion und die Sekretion der BMP-Antagonisten wie Noggin und Gremlin auf unbekannte Art abgeschaltet oder unwirksam gemacht. Schließlich hört die Bildung von FOP-Läsionen jedoch auf, und gelegentlich bilden sich Läsionen im Frühstadium spontan wieder zurück. Welches sind die Signale aus den Nachbarzellen, die zulassen, dass FOP-Läsionen aufhören zu wachsen, und welches sind die molekularen Signale, die eine Läsion im Frühstadium zur spontanen Rückbildung bewegen? Solche Hinweise aus dem Bereich der Krebszellen könnten uns helfen, eine frühe FOP-Läsion vor der Knochenbildung sehr wirkungsvoll zu hemmen, sodass FOP eher eine Beeinträchtigung als eine lebenslange Behinderung darstellt.

3. Krebszellen vermeiden eingebaute Selbstzerstörungsmechanismen. In gesunden Zellen aktiviert ein genetischer Schaden oberhalb eines bestimmten Levels gewöhnlich eine Apoptose oder ein Zellselbsterstörungsprogramm. Krebszellen umgehen diesen Mechanismus. FOP-Zellen umgehen diesen Mechanismus gelegentlich, aber zu einer anderen Zeit tun sie es nicht. Diese Apoptose oder dieses Zellselbsterstörungsprogramm ist in der molekularen Maschinerie der Zelle fest verankert. Unter welchen Umständen rufen FOP-Zellen das Selbstzerstörungsprogramm auf, um eine Läsionsrückbildung zu veranlassen, bevor sie sich zu einem reifen Stück heterotopen Knochens entwickeln? Um welche molekularen Ereignisse handelt es sich, die die Aktivierung dieser Zellselbsterstörungsprogramme in FOP-Zellen lenken, und wie können sie noch effektiver angeregt werden, damit es zu Signalen zur Selbstzerstörung der Läsion kommt?

4. Krebs- und FOP-Zellen haben beide die Fähigkeit, die Blutgefäßbildung anzuregen, die die FOP-Läsionen oder das Tumorstadium anheizen. Sind diese Mechanismen, durch die Angiogenese in Krebs- und FOP-Zellen angeregt wird, die selben? Werden bei beiden Krankheiten die gleichen Typen von „Tumor“- oder „Läsions“-Blutgefäßzellen angeregt oder handelt es sich um unterschiedliche? Können Endothelzellen bei Krebs und FOP unterschiedlich reguliert werden?

5. Krebszellen (nicht aber FOP-Zellen) sind unsterblich. Sie können sich endlos teilen und haben keine reproduktiven Grenzen. Obwohl FOP-Zellen zur Zeit des Frühstadiums der Läsionsbildung anscheinend unkontrollierbar wachsen, sind sie sterblich und haben in Kulturen relativ normale Reproduktionskapazitäten. Während bei Krebs Veränderungen in den Zellkreislaufregulationsgenen gängig sind, gibt es keinen Hinweis darauf, dass die selben Gene in FOP-Zellen vorrangig zerstört werden.

6. Krebszellen können in anderes Gewebe eindringen und sich auf andere Organe ausbreiten. BdAc-Typ-Stammzellen scheinen bei FOP die Fähigkeit zu haben, zu zirkulieren, anzuhafeln und Knochen zu bilden. Welches sind die chemoattraktiven Moleküle, durch die FOP BdACs angezogen, um Gewebe zu zerstören? In welcher Form ähneln oder unterscheiden sich diese chemoattraktiven Moleküle in der Tie-2-positiven Stammzelle des Skelettmuskels? oder in den invasiven Lymphozyten, beobachtet bei FOP-Läsionen im Frühstadium?

Folglich unterscheiden sich FOP-Zellen maßgeblich von Krebszellen und zwar dadurch, dass FOP-Zellen nicht unsterblich sind und die Fähigkeit besitzen, das Wachstum zu stoppen und eine endgültige Differenzierung zu durchleben. Sie teilen klar viele Eigenheiten der Krebszellen, wie das Wachstum trotz Fehlens normaler „Go“-Signale, die Sperrung der normalen „Stop“-Signale, eine teilweise Umgehung eingebauter Selbstzerstörungsmechanismen, die Fähigkeit, die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) anzuregen und die Kraft, mit jedem neuen Schub in anderes Gewebe einzudringen.

Die Diskussion über Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen FOP- und Krebszellen wurde nicht zu dem Zweck angeregt, dass versucht wird, Krebs und FOP in Nischen zu zwingen, in die sie nicht gehören, sondern um einen Anfang zu machen, Ähnlichkeiten und Unterschiede auf molekularer Ebene zu erforschen, damit wir FOP besser verstehen. Es gibt einen riesigen Schatz an Informationen bezüglich der Genregulierung, des Rezeptorenablaufs, der Molekularbahnkreisläufe, der Stammzellenbiologie, und der Signaltransduktionshemmerentwicklung aus dem Gebiet der Krebsforschung, die sich auf auffallende Sachverhalte bei FOP übertragen lassen. Des Weiteren wirft die Nebeneinanderstellung zellulärer Eigenschaften zwischen FOP- und Krebszellen viele wichtige Fragen auf, die auf dem Gebiet der FOP-Forschung zu verpflichtenden Versuchen führen kann.

V. TRIGGER (= AUSLÖSER* Anm. d. Übersetzers)

Das Immunsystem und FOP

Die sich anhäufenden Beweise aus allen Ebenen der Untersuchungen lassen eine Beteiligung des Immunsystems bei FOP vermuten. Das Vorhandensein von Lymphozyten und Mastzellen im Frühstadium der FOP-Läsionen, der mit Lymphozyten zusammenhängende Tod der Skelettmuskulatur, Schübe nach Virusinfektionen, die dazwischen liegende Zeit zwischen Schüben und die unmittelbare Reaktion früher Schübe auf Corticosteroide sind allesamt wichtige Beweisstücke, dass das Immunsystem an der Pathogenese von FOP-Schüben beteiligt ist. Einige haben auch gezeigt, dass die klinischen und pathologischen Charakteristika von FOP wahrscheinlich eine autoimmune Komponente dieser Krankheit vermuten lassen, vielleicht einen autoimmunen Trigger. Autoimmunkrankheiten, mit Ausnahme rheumatischer Arthritis und autoimmuner Schilddrüsenentzündung sind einzeln gesehen selten, aber insgesamt sind schätzungsweise 5 Prozent der Bevölkerung in den westlichen Ländern davon betroffen. Autoimmunkrankheiten sind eine faszinierende, aber schwer zu verstehende Gruppe von Krankheiten. Eine Autoimmunkrankheit ist definiert als eine klinische Krankheit, verursacht durch die Aktivierung der T- oder B-Lymphozyten oder von beiden bei Nichtvorhandensein einer akuten Infektion oder anderer erkennbarer Ursachen. Genetische Empfänglichkeit, äußere und innere Auslöser von Autoreaktionen, Veränderungen in den pathologischen Prozessen während die Krankheit fortschreitet und vielfältige Mechanismen von Gewebeerkrankungen werden als Ursachen für Autoimmunkrankheiten in Betracht gezogen. Eine brauchbare Unterteilung der Autoimmunkrankheiten unterscheidet zwischen jenen, bei denen es eine allgemeine Veränderung bei der Auswahl, Regulierung oder dem Tod der T- oder B-Lymphozyten gibt und jenen, bei denen eine falsche Reaktion auf ein gewisses Antigen Autoimmunität verursacht.

Lymphozyten-Endothelzell-Interaktion: Frühe Anzeichen einer Entzündung

Die Wanderung der Lymphozyten von einer intravaskulären Position an einen Platz gerade außerhalb der Endothelzellmembran ist das früheste mikroskopisch erkennbare Ereignis bei einem FOP-Schub. Wie verlässt der Lymphozyt das Blutgefäß und erhält Zugang zum Skelettmuskel, wo kurz darauf der Tod der Skelettmuskelzellen eintritt? Integrine, Zellsensoren, die als signalgebende Moleküle agieren, werden von den meisten Lymphozyten ausgeschüttet. Integrine interagieren mit Integrinrezeptoren, wie den Vaskulärzellenhaftmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen, um die Infiltration der Lymphozyten in feste Organe, wie den Muskel, zu regulieren. Alpha-4-Integrin, ein Glycoprotein, kommt auf der Oberfläche aktivierter Lymphozyten und Monozyten vor und spielt eine entscheidende Rolle bei ihrer Haftung an das vaskuläre Endothel und in der darauffolgenden Wanderung in verschiedene Organe. Wir untersuchen zurzeit die Identität dieser Integrinmarker an Lymphozyten und Endothelzellen in dem begrenzten FOP-Gewebe, das uns zur Verfügung steht. Die Identifikation spezifischer Integrine an aktivierten Lymphozyten bei FOP-Läsionen könnte wichtige therapeutische Ziele für die pharmakologisch verfügbaren menschlichen monoklonalen Antikörper im frühesten Stadium einer FOP-Läsion liefern. Menschliche monoklonale Antikörper, die direkt gegen B- oder T-Zellen-Oberflächen-Marker oder gegen die im Übermaß und im Wesentlichen aktiven BMP-Rezeptoren (oder mit den Rezeptoren verbundenen Proteine) gerichtet sind, erweisen sich als wichtige Ziele für die Therapie. Dies wird weiterhin ein wichtiger Punkt der Untersuchungen im Jahr 2004 sein, und Sie werden in zukünftigen Berichten mehr darüber erfahren.

V. BEHANDLUNGEN

Das endgültige Ziel der FOP-Forschung ist es, eine Therapie zu entwickeln, die das Fortschreiten der Krankheit verhindert, stoppt und schließlich in die umgekehrte Richtung lenkt.

BMP4-Antagonisten: Das Pflastern des Weges

2002 beschrieben wir eine wichtige Entdeckung in der FOP-Forschung auf dem Gebiet der Gentherapie. Die Entdeckung, genauer bezeichnet als „A Proof of Concept“, enthält die Grundlage für die laufenden Arbeiten auf diesem Gebiet. Um einen umfassenden Überblick über diese wichtige Arbeit und auch über andere Langzeitprojekte im Labor zu geben, planen wir, jedes Jahr den relevanten Hintergrund erneut zu schildern, so dass diejenigen, die neu dazukommen, die Entwicklungen und Fortschritte klar verstehen können.

Nachfolgend auf die Entdeckung der Überexpressivität von BMP-4 in FOP-Zellen, schrieb Brigid Hogan, eine bekannte Entwicklungsbiologin an der Vanderbilt Universität in Nashville, Tennessee, in der Zeitschrift **Science**: „*Da soviel darüber herausgefunden wird, wie BMPs agieren, müßte es möglich sein, Medikamente zu entwickeln, die einige Bereiche der BMP4-Bahn blockieren – und daher das Fortschreiten dessen, was eine schreckliche alpträumhafte Krankheit ist, zu verhindern.*“

Noggin: Das Blockieren der BMP-4-Bahn

Das Protein Noggin, das von unserem Kollegen Dr. Richard Harland von der Universität von California-Berkeley, entdeckt wurde, war bekannt dafür, dass es starke Auswirkungen auf die Aktivität als Antagonist bei BMP-4 hat. Einen Tag nachdem unsere Entdeckung über die Überexpressivität von BMP-4 in **The New England Journal of Medicine** veröffentlicht wurde, veröffentlichten Dr. Harland und seine Kollegen eine folgenreiche Abhandlung im Magazin **Cell**, in der er darlegte, dass das Noggin-Protein sich direkt an das native BMP-4-Molekül anhängt und es an der Interaktion mit den eigenen Rezeptoren hindert. Die Wichtigkeit von Noggin für die FOP-Geschichte wurde sofort erkennbar und Noggin wurde an die vorderste Front bei der Entwicklung einer FOP-Behandlung gestellt.

Noggin spielt auch eine Rolle bei der Kontrolle der Menge an Skelett, das gebildet wird, indem es die Konzentration des für das Körpergewebe verfügbaren BMP-4 reguliert. Aus diesem Grund erweckt Noggin die Hoffnung, dass es wildes Knochenwachstum bei FOP kontrollieren kann. Bald nach der Entdeckung der Überexpressivität von BMP-4 bei FOP, nahmen Wissenschaftler von Regeneron Pharmaceuticals mit uns Kontakt auf und schlugen eine Zusammenarbeit zwischen dem FOP-Labor, Dr. Harlands Labor, den Wissenschaftlern, die mit der Entwicklung von Gentherapievektoren zu tun hatten und den Wissenschaftlern von Regeneron Pharmaceuticals vor, um die Möglichkeit zu ergründen, Noggin als Behandlung für FOP zu entwickeln. Seither arbeiten wir zusammen.

A Proof-of-Concept (= Ein Beweis-des-Konzeptes)-Versuch in der Noggin-Gen-Therapie

Vor einigen Jahren begannen wir einen entscheidenden „Beweis-des-Konzeptes“-Versuch. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten sehr deutlich, dass eine gentechnische Form des Proteins Noggin über eine Säugetierleber hergestellt werden kann, nachdem eine gezielte Einbringung des veränderten Noggins stattgefunden hat und systemisch zirkuliert, um die durch BMP-4 ausgelöste heterotope Knochenbildung bei der Maus vollständig zu blockieren.

Der Zweck dieser Studie war es, einen wirkungsvollen Gen-Therapie-Ansatz für die Verhinderung von heterotoper Knochenbildung, an der BMP-4 beteiligt ist, zu entwickeln, der vom Prinzip her auf FOP-Patienten übertragen werden könnte. Um dieses Ziel zu erreichen, benutzten wir eine Übertragung des genetisch-veränderten Noggin-Gens, an der das Adenovirus mitwirkte.

Ein natürlich vorkommendes Noggin-Protein zirkuliert nicht im Blut und hat eine sehr kurze Halbwertszeit im Körper. Der Grund, dass Noggin nicht durch das Blut zirkuliert, ist, dass sich das Noggin-Protein an Zuckerkomplexe (die Heparan-Sulfat-Proteoglykane oder HSPGs) an den Wänden der Blutgefäße anhängt. Diese sind die selben Moleküle, die bei der Entwicklung von Osteochondromen wegen ihrer Klebrigkeit an Noggin eine Rolle spielen.

Eine derartige „Klebrigkeit“ von Noggin wäre für eine Behandlung wie FOP nicht wünschenswert. Wenn Noggin also für die systemische (körperweite) Belieferung in Frage kommt, muss zuerst das Gen, das das Nogginprotein verschlüsselt, verändert werden, damit das Noggin-Gen im Blut zirkulieren kann und eine lange Halbwertszeit bei der Zirkulation hat.

Das ursprüngliche menschliche Noggin-Gen wurde verändert, indem die DNA-Sequenz entfernt wurde, die den Teil des Proteins verschlüsselt, der es zulässt, dass es sich an den Wänden der Blutgefäße festsetzt. Diese Veränderung des Noggin-Gens wurde erreicht und das Protein, das durch das veränderte Gen hergestellt wurde, konnte in den Blutgefäßen zirkulieren ohne sich an den Wänden der Gefäße fest zu setzen, während es weiterhin die Fähigkeit besaß, das BMP-4-Molekül zu binden und inaktiv zu machen. Weiterhin erhöhte diese Veränderung im Noggin-Gen und dem dazugehörigen Protein die Halbwertszeit von Noggin während der Zirkulation, was es für die systemische Belieferung sogar noch wünschenswerter macht.

Der Mäuseversuch zur heterotopen Knochenbildung, ausgelöst durch BMP-4, wurde in einem ganz bestimmten Versuch angewandt. Dieser Versuchsaufbau, der weiter vorne im Jahresbericht schon beschrieben und im Jahr 2003 veröffentlicht wurde, machte es uns möglich, die verschiedenen Stufen der Knochenbildung, ausgelöst durch BMP-4, herauszufinden, die auf fast gleiche Weise die Stufen der Knochenbildung bei FOP-Läsionen nachahmen.

Versuchs- und Kontrollimplantate wurden in allen Tieren entfernt. Die Implantate, die rekombinantes menschliches BMP-4 enthielten, lösten eine akute fibroproliferative Erkrankung mit früher Knorpelbildung nach sieben Tagen und heterotoper Knochenbildung nach 14 Tagen bei den Kontrolltieren aus. Bei den Tieren, die mit dem veränderten Noggin-Gen vorbehandelt waren, verursachten die BMP-4-Implantate weder nach sieben noch nach 14 Tagen eine krankhafte Bildung.

Diese bemerkenswerte Studie zeigt, dass die Beförderung von Noggin über eine Gentherapiemethode, beim Mäuseversuch erfolgreich heterotope Ossifikation, ausgelöst durch BMP-4, verhindert. Es liefert den „Beweis-des-Konzeptes“, dass ein genetisch veränderter Morphogen-Antagonist (Noggin) in vivo hergestellt werden kann und systematisch dafür sorgt, dass heterotope Ossifikation, an der BMP-4 beteiligt ist, verhindert wird, was wiederum für die Behandlung von FOP klinisch relevant ist.

Dieser große Durchbruch in der fortgeschrittenen Therapie bestätigt das Konzept, dass das Noggin-Gen verändert werden kann, um eine systemische Beförderung des biologisch veränderten Proteins zuzulassen; dass das Gen in einen Virenüberträger eingebaut werden kann; dass die Leber als Fabrik zur Herstellung einer aktiven Form des modifizierten Proteins wirken kann; dass das veränderte Protein systemisch als Hormon zirkulieren kann und dass das veränderte Noggin Protein bei therapeutischer Konzentration auftretende Mengen des rekombinanten menschlichen BMP-4 wirkungsvoll binden und inaktiv machen und die Bildung sogar der rudimentärsten FOP-ähnlichen Läsionen völlig blockieren kann.

Veröffentlichung einer bedeutenden Abhandlung über die Noggin-Gentherapie im Jahr 2003

Ein bedeutende wissenschaftliche Abhandlung über unser „Proof-of-Concept“ der Noggin-Gen-Therapie wurde im Dezember 2003 in **The Journal of Bone and Joint Surgery** veröffentlicht. Die Abhandlung trägt den Titel: „In Vivo Somatic Cell Gene Transfer of an Engineered Noggin Mutein Prevents BMP4-Induced Heterotopic Ossification“ („In vivo verhindert ein somatischer Zellgentransfer eines konstruierten Nogginmutanten heterotope Ossifikation, die durch BMP4 ausgelöst wird). Die Autoren der Abhandlung sind David L. Glaser, M.D., Frederick S. Kaplan, M.D., und Eileen M. Shore, Ph.D., aus dem Forschungszentrum für FOP und verwandte Krankheiten; Lili Wong, Ph.D. und James M. Wilson, M.D., Ph.D., vom Zentrum für Gentherapie in der Abteilung für medizinische Genetik der medizinischen Fakultät der Universität von Pennsylvania; und Aris N. Economides, Ph.D., Xia Liu, M.S., Robert D. Kimball, Ph.D., James P. Fandel, Ph.D., und Neil Stahl, Ph.D. von Regeneron Pharmaceuticals.

Ein neuer Leitartikel, der auch in **The Journal of Bone and Joint Surgery** veröffentlicht wurde, stellt die Arbeit des FOP-Labors während der vergangenen Jahre heraus. Dr. Lawrence C. Rosenberg, M.D.; stellvertretender Redakteur für die Forschung von **The Journal of Bone and Joint Surgery** schrieb: „Die BMP-Signaltransduktion wird durch BMP-Antagonisten, wie z.B. Noggin, reguliert, die sich außerhalb der Zelle an BMP anbinden und die Anbindung von BMP an dessen Rezeptoren blockieren. Kürzlich wurde bewiesen, dass BMP4 bei Patienten mit Fibrodisplasia Ossificans Progressiva im Übermaß auftritt, und dass Zellen normaler menschlicher Wesen eine zunehmende Ausschüttung von BMP-Antagonisten zur Einwirkung auf hohe BMP4-Konzentrationen aufweisen, Zellen von FOP-Patienten dagegen nicht. Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung einer Vorgehensweise, bei der der Gentransfer eines konstruierten Nogginmutanten mit einbezogen wurde, der die durch BMP4-ausgelöste heterotope Ossifikation bei der Maus verhindert. Folglich basieren Studien, die über die Pathogenese einer genetischen Krankheit beim Menschen Aufschluss geben, auf dem Wissen über molekulare Mechanismen, die die BMP-Aktivität ausgleichen und regulieren. Ergebnisse dieser Studien führten wiederum zur Entwicklung einer neuen Therapiemodalität, um pathologische Ossifikation zu verhindern. Diese Informationen liefern die Grundlage für die Entwicklung neuer Behandlungsmodalitäten bei Skeletterkrankungen.“

Unser Artikel in der Dezemberausgabe von **The Journal of Bone and Joint Surgery** stellt diese Ausführungen und Entwicklungen heraus und Exzerpte dieser Abhandlung werden nachfolgend aufgeführt, um die Entdeckungen zu verdeutlichen und um die Aufregung über diese Arbeit zu teilen: „BMP4, ein starkes Skelettmorphogen kommt in Zellen von Patienten, die an FOP leiden, vermehrt vor. Dazu kommt, dass Noggin, ein abgesondertes Protein, das als starker Affinitätsantagonist von BMP2, BMP4 und einigen anderen BMPs wirkt, in den Zellen von FOP-Patienten zu wenig vorkommt. Deshalb beinhaltet eine vernünftige Strategie für die Behandlung der Krankheit die Hemmung der BMP4-Aktivität oder deren Signaltransduktionsbahnen.“

Noggin wirkt, indem es BMPs bindet und die Interaktion zwischen den BMPs und dessen Transmembranrezeptoren unterbindet. Wie BMP4 und die meisten osteoinduktiven BMPs, bindet Noggin Heparansulfatproteoglykane und bindet BMP an der Stelle des Nogginvorkommens.

Während der embryonalen Entwicklung der Wirbeltiere wird das Nogginvorkommen und die Sekretion durch die BMP-Signalgebung ausgelöst und wirkt, um die Grenzen der durch BMP ausgelösten

Strukturen zu definieren. Als Teil des negativen Feedbacksystems regulieren die BMPs das Vorkommen von Noggin in einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Systemen. Die völlige Löschung des Noggin-Gens ist bei Mäusen kurz nach der Geburt aufgrund vielfältiger Defekte tödlich. Die Untersuchung des Skeletts von Mäusen, denen Noggin fehlte, legte offen, dass der Nogginmangel zu übermäßiger heterotoper Ossifikation im Mutterleib, zu einem Zusammenwachsen der Brustwände und einem Fehlen der Gelenkbildung im ganzen Körper führt.

Die postnatale Rolle von Noggin ist weniger gut definiert. BMP4 wird von Knochen- und Muskelzellen produziert und sein übermäßiges Vorkommen wächst an Stellen mit Bindegewebsverletzungen. Unter normalen Umständen reguliert BMP4 das Vorkommen der BMP-Antagonisten wie Noggin und Gremlin nach oben. *In vitro*-Versuche, bei denen Zellen, die von FOP-Patienten stammen, benutzt werden, zeigen eine deutlich abgeschwächte Reaktion des Nogginvorkommens auf die BMP4-Stimulation. Eine inadäquate BMP-Antagonisten-Reaktion, die auf das Bindegewebsstrauma folgt, würde eine sehr schnelle Ausbreitung des BMP-morphogen-Gradienten beim FOP-Patienten zulassen und könnten die explosionsartige Knocheninduktion, wie sie bei einem FOP-Schub beobachtet werden kann, erklären. Diese Erkenntnisse bei einer seltenen und zur Behinderung führenden genetischen Erkrankung zeigen die Wichtigkeit einer entscheidenden Ausgewogenheit zwischen einem induktiven Morphogen wie BMP4 und dessen abgesonderten Antagonisten bei der Bildung eines ektopischen Organsystems und lässt das Aktionspotential für die Entwicklung von Strategien, die auf BMP-Antagonisten basieren, für die Behandlung von FOP erahnen.

Wir stellten die Hypothese auf, dass Noggin vielleicht bei der Behandlung von FOP und anderen Erkrankungen, bei denen abnormale Knochenbildung eine Rolle spielt, von Nutzen sein könnte, indem es ein osteoinduktives Signal, das von einer üppigen BMP-Signalgebung herrührt, blockiert. Die ursprüngliche Form des Noggins zirkuliert jedoch nicht im System. Um für die Behandlung refraktärer Erkrankungen mit weit verbreiteter heterotopischer Ossifikation, wie bei FOP, von Nutzen zu sein, muss Noggin erst systemisch zirkulieren können und BMP aktiv an entlegenen Zielen abblocken. Wir berichten hier über die Konstruktion einer Zirkulationsform von Noggin und demonstrieren außerdem, dass dieses Noggin-Mutein (der Ausdruck „Mutein“ bezieht sich auf ein Protein mit erhöhter Aminosäuresequenz, das gewöhnlich neue Bestandteile importiert, vergleichbar mit einem Wildtypen-Protein) *in vivo* entweder durch systemische Verabreichung oder durch einen somatischen Zellgentransfer abgegeben werden kann, um die BMP-induzierte heterotope Ossifikation in einem Versuch mit Mäusen über Fibrodysplasia ossificans progressiva zu blockieren. Die Untersuchung zeigt, dass heterotope Ossifikation, ausgelöst durch BMP4, durch ein Noggin-Mutein vollständig blockiert werden kann und liefert proof-of-concept für dessen Einsatz bei der Behandlung von heterotoper Ossifikation, vermittelt durch BMP, wie z.B. bei FOP.

Die Ergebnisse, von denen in der aktuellen Studie berichtet wird, stützen die mögliche klinische Brauchbarkeit eines Noggin-Mutein bei Erkrankungen, bei denen heterotope Ossifikation nicht mit anderen Methoden verhindert oder behandelt werden kann. Ein extremes Beispiel dafür ist natürlich FOP, und sie war die Motivation für diese Studie. Obwohl FOP sehr selten vorkommt, treten andere klinische Situationen verallgemeinerter und zur Behinderung führender heterotoper Ossifikation als Folge von Verletzungen des Zentralen Nervensystems oder als Folge einer Operation, bei der ein künstliches Hüftgelenk eingesetzt wird, wiederholter Muskelverletzungen oder Verbrennungen auf. Das pathologische Vorkommen osteogener BMPs spielt vielleicht auch eine Rolle bei der Knochenmetastasierung, wie sie bei Prostatakrebs und bei Osteosarkomen zu sehen ist. Vor kurzem zeigte sich, dass eine craniale Synostose das Ergebnis eines Noggin-Mangels in cranialen Wundnähten ist, die normalerweise offen bleiben. Die Rekonstruktion des Nogginvorkommens, bei der das Noggin-Mutein oder eine Applikation des Nogginproteins benutzt wird, läuft auf eine Durchgängigkeit cranialer Wundnähte hinaus. Deshalb gibt es viele mögliche klinische Nogginanwendungen als ein therapeutisches Protein.

Bevor Noggin oder andere BMP-Antagonisten vielleicht als mögliche therapeutische Wirkstoffe bei Patienten in Betracht gezogen werden, muss noch mehr Forschung und Entwicklung betrieben werden, um die Auswirkungen einer systemischen Langzeitverabreichung auf die Knochen, genauso wie auf die anderen Organe zu bestimmen. Die Auswirkungen des übermäßigen Nogginvorkommens im Skelett bei sich entwickelnden Mäusen, zeigen sich in schwerer Osteoporose und auch in spontanen Brüchen, die klar machen, dass die Blockierung der BMPs während der Entwicklung und Reifung des Skeletts für die richtige Knochenbildung schädlich ist. Es sollte jedoch festgehalten werden, dass das Nogginvorkommen in diesen transgenen Mäusen im Alter von 6 Monaten weniger wird und, obwohl ihre Knochen noch eine verringerte Mineraleichte zeigen, es weniger neue Brüche gibt, was zeigt, dass eine gewisse Heilungsart statt findet, wenn der Nogginspiegel zu fallen beginnt.

Zusätzlich machten wir zuvor deutlich, dass Noggin intramembrane Ossifikation in einem Versuch zur Knochenregeneration hemmt. In gemeinsamer Betrachtung mit der Tatsache, dass die BMPs zahlreiche Auswirkungen haben und dass sie in und vermutlich auf vielen verschiedenen Gewebearten wirken, sollten sie als mögliche therapeutische Mittel nur nach äußerst vorsichtigen toxikologischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Die Verfügbarkeit eines möglichen und systemisch lieferbaren BMP-Antagonisten, wie z.B. das Noggin-Mutein, eröffnet neue Möglichkeiten für eine Studie der biologischen BMPs. Das Gebiet der BMP-Antagonisten ist nicht auf Noggin begrenzt. Andere Sorten von Hemmern von BMPs wurden identifiziert: die Follistatinfamilie, die Chordinfamilie und die DAN/Cerberusfamilie. Von diesen Molekülen zeigt jedes einzelne einzigartige Bindungseigenschaften, da sie im Zusammenspiel mit verschiedenen BMP-Teilmengen stehen und unterschiedliche Affinitäten zu ihren verwandten BMPs demonstrieren. Der mögliche Einsatz dieser Moleküle muß noch erforscht werden.

Insgesamt gesehen zeigt diese Studie, dass Noggin dazu benutzt werden kann, heterotope Knochenbildung, ausgelöst durch BMP, in vivo zu blockieren, entweder durch örtliche Verabreichung oder durch Mittel zur systemischen Lieferung eines Noggin-Muteins durch einen somatischen Zellgentransfer. Diese Studie liefert den „Proof-of-Concept“, dass ein abgesonderter Morphogenantagonist, der normalerweise örtlich wirkt, so konstruiert werden kann, dass es systemisch wirkt. Bei der laufenden Untersuchung wurde es dazu benutzt, heterotope Ossifikation in einem Tierversuch zu verhindern, ist aber klinisch bedeutend für katastrophale Erkrankungen mit progressiver heterotoper Ossifikation beim Menschen, besonders bei FOP.

Die Entwicklung verbesserter Tierversuche, die auf einem verbesserten Wissen der molekularen Genetik von FOP beruhen, und die Entwicklung sicherer und wirkungsvoller Viralvektoren mit induzierenden Promotoren zu systemischen und dauerhaften Lieferung von Noggin-Muteinen führt vielleicht letztendlich zu wirkungsvolleren Behandlungen von heterotoper Ossifikation. Für Patienten, die FOP haben, bietet ein sicherer, stabiler und regulierter Gentransfer eines induzierten BMP4-Antagonisten wie Noggin vielleicht eine Lösung, wenn alle anderen Modalitäten versagt haben.“

Noggin-Gen-Therapie: Neue Entwicklungen

Es gab sechs wichtige Entwicklungen in der Noggin-Gen-Therapie, seit dem Abschluss der bahnbrechenden „Proof-of-Concept“-Versuche (voriger Abschnitt):

1. Die Entwicklung einer hochsensiblen, und spezifischen Radioimmunoanalyse zur Messung der Konzentration des veränderten Noggingenproteins im Blut.
2. Die Erforschung, die Entwicklung und der Einsatz sichererer Virenvektoren (adenoverwandter Viren) zur systemischen Noggingenübertragung.
3. Studien, um festzulegen, ob die genmanipulierte Form von Noggin eine organspezifische Toxizität bei der Maus verursacht.
4. Studien, um das Potential der Noggin-Gen-Therapie zur Unterbindung früher FOP-ähnlicher Läsionen, ausgelöst durch FOP-Lymphoblastoidzellen, zu ermitteln.
5. Die Erforschung eines spezifischen, auf Zellen basierenden Übertragungssystems für die genetisch manipulierte Noggingentherapie.
6. Das Auskundschaften gemeinschaftlicher Projekte mit Industriepartnern, um hochentwickelte, einführbare Promotoren einzusetzen, um das Timing und die Dosis der Noggin-Gen-Therapie bei FOP-Läsionen, ausgelöst durch BMP4, Lymphoblastoidzellen und aus dem Blut stammenden adhären Zellen (BdAC).

Die Entwicklung einer hochsensiblen, und spezifischen Radioimmunoanalyse zur Messung der Konzentration des veränderten Noggingenproteins im Blut ist für alle zukünftigen Versuche an Tieren und schließlich auch am Menschen ist etabliert und notwendig. Diese Arbeit wurde vergangenes Jahr im FOP-Hauptlabor durchgeführt. Die Noggin-Radioimmunoanalyse ist nicht nur für das Bestimmen des Spiegels des veränderten Nogginproteins in der Zirkulation der Versuchstiere bedeutend, sondern auch um zu bestimmen, ob die Mäuse Antikörper gegen das modifizierte Nogginprotein entwickeln oder nicht. Es ist möglich, dass die Maus vielleicht im Lauf der Zeit Antikörper gegen das ursprüngliche oder genetisch-modifizierte menschliche Nogginprotein entwickelt. Obwohl die Nogginproteine des Menschen und der Maus sich in der Sequenz sehr ähneln, sind sie vielleicht verschieden genug, um eine Reaktion auf einen Antikörper zu entlocken, die die Analyse durcheinander bringen könnte.

Von größerer Bedeutung für die Studien am Menschen wird sein, ob die Veränderung des ursprünglichen menschlichen Noggingens dem Patienten eine Antikörperreaktion entlockt oder nicht. Das Stutzen des Noggingens, um ein verändertes aber zirkulierendes Nogginprotein (Noggin-Mutein), dem die heparinbindende Stelle fehlt, zu verschlüsseln, führt zu einem Molekül, das eine etwas andere Form und eine Festigung im dreidimensionalen Raum hat als das ursprüngliche Nogginprotein. Ein derart verändertes Protein könnte vom menschlichen Immunsystem als fremdes Protein erkannt werden. Daraus resultiert, dass letztendlich detailliertere und intensive immunologische Studien am Menschen notwendig sein werden. Wir kennen diese Betrachtungen alle sehr gut und sie passen weitgehend schon gut in unsere Vorstellungen, wie eine definitivere FOP-Therapie gestaltet werden könnte. Es wäre zum Beispiel möglich, das ursprüngliche Noggin-Gen (eher als das veränderte Noggin-Gen) gezielt in die Zellen im Skelettmuskel wie die Tie-2-positiven Zellen oder vielleicht die aus dem Blut stammenden klebenden Stammzellen einzubringen, wo die FOP-Krankheit vielleicht beginnt. Das erlangte Wissen über derartige Zelltypen, wie sie bereits im vorherigen Teil des Berichts beschrieben wurden, könnte einen solchen Ansatz in der Zukunft ermöglichen.

Die Entwicklung und der Einsatz sichererer Virenvektoren für die Noggingenübertragung wird entscheidend, wenn wir in Betracht ziehen, ob das Noggingen oder ein verändertes Noggingen via eines auf Viren basierenden Übertragungssystems für den Einsatz am Menschen gehandhabt werden kann. Obwohl das Adenovirus ein ausgezeichneter Überträger ist, um den „Proof-of-Concept“ der Noggingentherapie zu zeigen, entlockt der Adenovirus eine intensive systemische Immunreaktion und ist für einen langzeitigen Einsatz beim Menschen unbrauchbar.

Unsere Kollegen in der Abteilung für Humangenetik an der Penn haben neue adenoverwandte Viren isoliert und entwickeln sie als Vektoren für die menschliche Gentherapie. Im Allgemeinen sind adenoverwandte Viren vom System her weniger toxisch (aber sie haben immer noch eine gewisse Toxizität) und entlocken dem Immunsystem eine weniger heftige Reaktion. Die Hoffnung war, dass diese neuartigen mit dem Adenovirus verwandten Viren vielleicht als Vektoren für die menschliche Gentherapie entwickelt werden könnten und dass sie bewiesene Wirksamkeiten für den Gentransfer aufweisen, und dass sie nicht als Antikörper, geschaffen für adenoverwandte Virusinfektionen beim Menschen erkannt werden. Das war in der Tat der Fall. Wir fuhrten vergangenes Jahr fort, diese neuen Überträgervektoren bei den Versuchen zu unserer Therapie mit dem veränderten Noggingen einzusetzen. Wir freuen uns, mitteilen zu können, dass sie äußerst wirkungsvoll bei der systemischen Übertragung entsprechender Dosen des veränderten Nogginproteins waren, um heterotope Knochenbildung im Tierversuch zu verhindern.

Diese neuartigen, mit dem Adenovirus verwandten Viren, sind bei Mäusen viel weniger toxisch als die Adenoviren, die wir benutzten, und sie rufen eine viel schwächere Entzündungsreaktion hervor, besonders in der Leber, wo das veränderte Noggingenprotein hergestellt wird. Dieser sicherere virale Genübertragungsweg ist bei Tierversuchen notwendig, um alle möglichen toxischen Effekte des veränderten Noggingenproteins bei hochdosierten Dauergaben zu untersuchen und zu isolieren. Mit anderen Worten, es ist zuerst notwendig, die toxischen Effekte des Überträgers (Virus), der das veränderte Noggin-Gen in den Körper transportiert, zu minimieren, bevor wir alle möglichen toxischen Auswirkungen des veränderten Noggingenproteins selbst effektiv untersuchen können. Die Studien, in denen untersucht wird, ob diese neuartigen mit dem Adenovirus verwandten Viren hergenommen werden könnten, um das veränderte Noggingenprotein bei entsprechend hohen Spiegel zu übertragen, um heterotope Knochenbildung zu unterbinden, waren äußerst erfolgreich.

Frühere Toxizitätsstudien bei Mäusen, in den das neuartige mit dem Adenovirus verwandte Virus-(AAV)Überträgersystem eingesetzt wurde, zeigen, dass, obwohl der mit dem Adenovirus verwandte Virenvektor eine kleinere Entzündung in der Leber auslöst als das Adenovirus, das Nogginprotein und das veränderte Nogginprotein selbst bei Dauergabe hoher Dosen vielleicht toxisch ist. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Studien überein, die zeigen, dass BMPs bei der Entwicklung und Erhaltung der Leber wichtig sind. Wenn Noggin also für den Einsatz beim Menschen in Betracht gezogen wird, muss es genau reguliert und auf den niedrigsten, wirkungsvollen Spiegel für den kürzesten Zeitraum gehalten werden, um heterotope Knochenbildung zu unterbinden. Folglich ist es jetzt noch zwingender, dass wir regulierte und induzierte Systeme für die Übertragung der BMP-Antagonisten (solche wie Noggin) erforschen, und dann die Noggin-Gentherapie auf Zellen richten, die entweder direkte Ziele von BMP-Aktionen sind, oder auf Zellen in der Nähe der BMP-Ziele.

Weiter oben in diesem Jahresbericht (Abschnitt III. Zellen) berichteten wir von wichtigen Durchbrüchen bei der Bestimmung zellulärer Ziele von BMP-Aktionen innerhalb des Skelettmuskels und von zirkulierenden Stammzellen (BdACs). Diese neuen und spannenden Entdeckungen in der Zellbiologie

der heterotopen Knochenbildung werden ausgesprochen wichtig sein für den Aufbau der geeignetsten, auf Zellen basierenden Therapien, um die Gentherapie zu erfassen. Letztlich sollte ein induzierbarer Promotor für das ursprüngliche Noggin-Gen am besten genau jene Zellen als Ziel haben, die am besten auf das BMP4-Signal innerhalb des Skelettmuskels (oder im peripheren Blut als Folge der Neuentdeckung der BdACs) reagieren und die Transformation in Knochen auslösen. Während die Laborerkenntnisse und die Untersuchungen im Hinblick auf die Behandlung oft in getrennten Abschnitten des Jahresberichtes dargestellt werden, sollte man die alles umfassende Art der FOP-Forschung nicht aus den Augen verlieren.

Zurzeit erforschen wir die Alternativen dieser neuen auf Zellen basierenden Genübertragung während wir gleichzeitig mit Kollegen zusammen daran arbeiten, einen induzierbaren Promotor für den durch das neuartige adenoverwandte Virus veränderten Noggingenüberträger zu entwickeln. Wir arbeiten zur Zeit mit Vertretern und Wissenschaftlern zweier Pharmazieunternehmen zusammen, um die Entwicklung eines induzierbaren Promotors (ein durch Medikamente regulierter Molekularschalter) voranzubringen, der in der nächsten Phase der Noggingentherapiestudien eingesetzt werden kann.

Noggin-Gen-Therapie: Die Zukunft

Solange die Möglichkeit, eine Form der Noggin-Gen-Therapie zur Behandlung von FOP einzusetzen, weiterhin vielversprechend ist, gibt es zahlreiche Herausforderungen – einige besonders bei FOP und einige ganz allgemein im Bereich der Gentherapie -, die zuerst gelöst werden müssen, bevor die Gentherapie Wirklichkeit werden kann. Die zwei entscheidendsten Fragen in Bezug auf FOP sind die Empfindlichkeit des Bahnziels und die Spezifität der Zielzelle. Während die BMP4-Überexpressivität ein vernünftiges Ziel für einen Gen-Therapie-Ansatz ist, werden sich wahrscheinlich bessere und sensiblere Bahnziele ergeben, da wir immer mehr über die spezifische Natur der Genmutation erfahren, die zu FOP und zu den daraus resultierenden Abnormalitäten beim BMP-Rezeptor-Trafficking und der Signalgebung führt. Stellt euch beispielsweise vor, dass jemand an einer unbekanntem Küstenlinie entlang segelt, für die es keine Karten gibt. Aus der Ferne sucht man nach einer Stelle, die vielleicht wie ein Hafen zum Anlegen mit dem Schiff aussieht. Kommt man jedoch näher an die Küste, kommen vielleicht noch bessere Ankerplätze in Sicht, die aus größerer Entfernung nicht sichtbar waren.

Wenn jemand die Möglichkeit der Gentherapie bei FOP in Betracht zieht, muss man immer die Spezifität der Zielzelle mit berücksichtigen. Ist es besser, Noggin im ganzen Körper zu verteilen, oder ist es besser, es direkt auf diese Zellen, entweder im Skelettmuskel oder vielleicht an einer entfernten Stelle im Knochenmark, das die Stammzellen beherbergt, die auf die Überläufer-BMP4-Bahnsignale reagieren, abzielen?

Eine weitere FOP-spezifische Überlegung ist bei jedem möglichen Gen-Therapie-Programm die Selektivität der Moleküle, die man verwendet. Obwohl das rekombinante native Noggin vielleicht in das Immunsystem des Körpers eindringt, könnte es sein, dass es die Zielstellen in den Stammzellen nicht wirkungsvoll erreicht. Ein Noggin-Mutein zirkuliert und erreicht vielleicht im Gegensatz dazu die spezifischen Zielzellen, die vom Immunsystem aufgespürt und im Lauf der Zeit inaktiviert werden. Nur weiteres Probieren wird ergeben, welches die bessere Methode ist. Weitere FOP-spezifische Bedenken sind die Sicherheit der Moleküle, die befördert werden sollen. Obwohl klar ist, dass zu viel BMP4 zu exzessiver Knochenbildung führen kann, beeinträchtigt zuviel Noggin vielleicht stark die normale Knochenbildung.

Da Noggin ein Antagonist zu vielfältigen BMPs ist und die BMPs eine wichtige Rolle außerhalb des Skelettsystems spielen, beeinträchtigt zu viel Noggin vielleicht die Funktion anderer Organe. Im Wesentlichen ist zu viel BMP schlecht für den Körper und zu viel Noggin ist auch schlecht für den Körper. Der Körper mag anscheinend keine übermäßigen Mengen von etwas und möchte seine entscheidenden Bahn-regulierenden Moleküle im Gleichgewicht wissen. Deshalb besteht die Herausforderung darin, die genaue Ursache des Ungleichgewichtes beim BMP-Trafficking und der Signalgebung heraus zu finden, und sie auf die sicherste und wirkungsvollste Weise wieder herzustellen, ohne Moleküle in höheren Konzentrationen als sie der Körper benötigt, will oder tolerieren kann, einzubringen. Nur durch sorgfältige Studien, bei denen ein induzierbarer Promotor für Noggin benutzt wird, in Verbindung mit einem spezifischen Tierversuch für FOP, werden wir die sichersten und wirkungsvollsten Kuren zur Blockierung der Bildung von FOP-Läsionen festlegen können.

Zusätzlich zu den FOP-spezifischen Bedenken, wie die Empfindlichkeit des Bahnziels, die Spezifität der Zielzelle, die Auswahl des therapeutischen Moleküls und die Sicherheit des Überträgers, gibt es Gen-Therapie-spezifische Bedenken bezüglich der Sicherheit Überträgers, die in einem größeren

wissenschaftlichen Umfeld angesprochen werden müssen, bevor die Gentherapie sicher und wirkungsvoll beim Menschen eingesetzt werden kann.

Ein Leitartikel in der Ausgabe vom August 2003 von **Nature Medicine**, spricht spezifische Bedenken hinsichtlich der Genübertragung an. Der Leitartikel sagt: „Der Bereich der Gentherapie hielt eine Achterbahnfahrt bevorstehender Verheißungen und schwerer Rückschläge aus. Trotz des Letztgenannten bleiben die Experten optimistisch, dass angewandte Therapien für menschliche Erkrankungen bevorstehen. Aber um das volle Potential der Gentherapie zu erkennen, gibt es einige grundlegende Hürden, die zuerst überwunden werden müssen. Der einschränkende Faktor, der die Anwendung aller dieser Ansätze verhindert, sind die pragmatischen Bedenken hinsichtlich der Genübertragung. Die Herausforderung, das therapeutische Molekül spezifisch und wirkungsvoll an den Handlungsort zu lenken, beeinträchtigt weiterhin die wirkungsvolle Umsetzung vom Labor zur Klinik.

Die entscheidende Wichtigkeit des Vektorsystems, das bei der Gentherapie eingesetzt wird, wird durch die letzten Tragödien bei klinischen Versuchen sehr deutlich gezeigt. Der Tod von Jesse Gelsinger 1990, wurde direkt dem viralen Vektor, der zur Übertragung eines funktionalen Gens benutzt wurde, zugeordnet. Gelsinger erlitt eine massive Entzündungsreaktion auf den viralen Vektor, die zum Tod führte. Erst neulich entwickelten zwei Kinder, die sich einer Gentherapie unterzogen, um einen tödlichen schweren kombinierten Immundefekt auf dem x-Chromosom zu korrigieren, eine leukämieähnliche Krankheit. Der retrovirale Vektor, der benutzt wird, um ein funktionales Gen in die T-Lymphozyten des Patienten einzubringen, hat sich in einem Onkogen (krebserzeugendes Gen) festgesetzt und gibt den Zellen einen großen selektiven Wachstumsvorteil und führt zu leukämieähnlichen Erkrankungen.

Jetzt wird die Entwicklung neuer Modalitäten für eine sichere und wirkungsvolle Wiederherstellung der Gene vorangetrieben, aber die chromosomale Integration therapeutischer Wirkungsmoleküle, um eine gleichbleibenden Genexpressivität zu sichern, bleibt ein Hauptpunkt dieser Bemühungen. Nicht-virale Vektoren werden entwickelt und Transposone (springende Gene) mit ortsspezifischen Enzymen, die eine Integration zulassen, verfeinern vielleicht die chromosomale Zielfindung. Dazu benötigt man eine große Auswahl an Vektoren, die inaktiv und unschädlich sind; die endgültige Auswahl wird von der jeweiligen Krankheit abhängen.

Vektorenwirt-Interaktionen werden auch weiterhin ein vorrangiges Anliegen sein. Komplikationen aufgrund von Immunreaktionen auf die viralen Capsidproteine sind mit die größten Hindernisse, aber auch für andere Probleme muss eine Lösung gefunden werden. Angenommen, dass die Ergebnisse beim Menschen mit den Daten aus den Tierversuchen so gut wie nicht übereinstimmen, wird dies eine Bewertung beim menschlichen System erfordern. Zur Zeit kämpfen diese wichtigen toxikologischen Studien nur um finanzielle Unterstützung. Die U.S. National Institutes of Health und ihre Kollegen müssen die Forschungsagenda voran treiben, die innovative Forschung an neuen Vektorsystemen unterstützen und Gelder für die banaleren vorklinischen Versuche, die ausschlaggebend für die Untersuchung des Vektorenpotentials beim Menschen sind, freigeben. Die Gentherapie wird ihre Versprechen erst einlösen können, wenn sie sichere, wirkungsvolle und spezifische Übertragungssysteme in Händen halten.

Insgesamt gesehen müssen zahlreiche größere technische Hindernisse beseitigt werden, bevor die Noggin-Gentherapie oder eine ihrer Abwandlungen als Behandlung für Patienten mit FOP in Frage kommt. Dies schließt auch eine Verfeinerung von sicheren und wirkungsvollen Virenüberträgern für den Einsatz beim Menschen, die erfolgreiche Entwicklung einer künstlich herbeigeführten und regulierten Beförderung des Noggin-Gens, vollständige Toxizitätsstudien über systemisch verabreichtes Noggin und verändertes Noggin, und schließlich die Entwicklung von verbesserten Tierversuchen, die auf dem Wissen der Molekulargenetik bei FOP beruhen, ein.

Molekularbiologen werden helfen, Überträger zu schaffen, die zu einer zell- und gewebespezifischen Ausschüttung des veränderten Noggin-Gens in der Lage sind. Immunologen werden fortfahren, Wege zu entwickeln, ungewollte immunologische Folgen der Virenüberträger und deren veränderte Nogginladung zu verhindern. Zellbiologen werden Wege aufzeigen, den Gentransfer zu den verschiedenen Gewebearten zu erleichtern, und sie werden die führende Rolle spielen, wenn es um das Identifizieren der Muskel- oder Stammzellen geht, in die der Überträger eingeführt werden kann. Klinikärzte werden die klinischen Versuche am Patienten mit FOP mit den besten Überträgern, die die Wissenschaftler zu bieten haben, durchführen. Um zu einer

erfolgreichen Gentherapie bei Patienten zu kommen, müssen viele Zweige der Biologie und Medizin zu diesem Bestreben ihren Beitrag leisten.

Es ist jetzt noch nicht absehbar, wann oder ob überhaupt die Noggin-Gentherapie eine durchführbare klinische Wirklichkeit für Kinder und Erwachsene mit FOP werden wird, aber sie ist zurzeit unsere größte Hoffnung und wir werden sie weiterhin unbarmherzig verfolgen, bis sie entweder Wirklichkeit wird oder sich bessere Lösungen auftun. Ob die Noggin-Gentherapie schließlich bei Patienten mit FOP angewandt wird oder nicht, hängt von wesentlichen technischen Hürden, die oben bereits erwähnt wurden, und von wissenschaftlichen Hürden ab, die bereits am Anfang des diesjährigen und im letztjährigen Jahresbericht herausgehoben wurden. Was am Wichtigsten ist, ist, dass das FOP-Gen gefunden wird, dass die Zielzellen identifiziert werden, und dass die molekularen Bahnen aufgeklärt werden. Dann wird sich die beste Behandlung für FOP ergeben. In der Zwischenzeit werden wir zügig mit unserem Experimentieren an der Noggin-Gentherapie weiter machen, da sie unsere größte Hoffnung ist, die wir jetzt haben.

Noggin: Kristallklar

Dr. Jay Groppe, ein Röntgenkristallograph, der am Salt Lake Institute in La Jolla, Kalifornien, arbeitet, veröffentlichte kürzlich in der Zeitschrift **Nature** einen größeren Artikel über eine Arbeit, die mit unserer in Zusammenhang steht, nämlich über die röntgenkristallographische (molekulare 3D) Struktur des Nogginproteins, wenn es an ein BMP-Molekül angebunden ist. Die Arbeit ist eine außerordentlich technische Tour-de-Force (Anm. d. Übersetzers: force = Kraft). In dem Artikel mit der Überschrift „**Die strukturelle Basis der BMP-Signal-Hemmung durch Noggin, ein neuartiges Zystin-Knotenprotein**“, erörtern Dr. Groppe und seine Kollegen, wie das Zwischenspiel zwischen den knochenmorphogenetischen Proteinen und deren Antagonisten zahlreiche Entwicklungs- und Zellprozesse im menschlichen Körper und im gesamten Tierreich beherrschen. In diesem Artikel zeigen sie genau und elegant, wie die dreidimensionale Struktur des Noggins es ermöglicht, dass die BMP-Signalisierung durch das Blockieren der Interaktion von BMP mit seinen beiden Transmembranrezeptoren, unterbunden wird. Sie zeigen weiterhin, dass die Bindung von BMP an Noggin das BMP-Molekül in einen inaktiven Komplex absondert.

Bei einem besonderen Besuch Ende November 2002 am Center for Research in FOP and Related Disorders erklärte Dr. Groppe, wie Noggin und verschiedene BMPs anscheinend aus einem bekannten Urgen entstand. Die Proteine, verschlüsselt durch die BMP-Gene und das Noggin-Gen sind nicht nur bezüglich ihrer Struktur sondern auch bezüglich ihrer Form eng verwandt. Wenn sich Noggin an BMP bindet, verbindet es sich in der Tat auf die Rücken-an-Rücken-Weise, bei der beide Moleküle plan zueinander sind. „Es ist, als wenn zwei Schmetterlinge Rücken an Rücken verbunden sind, wobei das größere Noggin-Gen das kleinere BMP-Molekül im „Nelson-Griff“ festhält“, erklärte Dr. Groppe.

Dr. Groppe zeigte weiterhin, wie sowohl BMP als auch Noggin heparinbindende Bereiche haben – Aminosäurerückstände in ihren jeweiligen Proteinen, die es den Molekülen erlauben, an der Zelloberfläche Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) zu binden, die die Moleküle nahe der Zellsignalisierung an der Membranoberfläche zusammendrängt. Am bedeutendsten war, dass er uns zeigte, dass die heparinbindenden Stellen des BMP und des Noggin an den entgegengesetzten Enden der Moleküle liegen, von denen sich die beiden Moleküle aneinander binden, was es wiederum ermöglicht, dass sich die heparinbindenden Stellen jedes Moleküls an entsprechende Zelloberflächen andocken können. Dies hat enorme Auswirkungen auf die Regulierung der BMP-Signalisierung.

Was noch wichtiger war, Dr. Groppe zeigte grafisch und eindrucksvoll, dass die molekulare Veränderung zur Entfernung der heparinbindenden Stelle des Noggin-Gens überhaupt keine Auswirkung auf die Fähigkeit des Moleküls, BMPs zu binden und abzusondern hat, eine wichtige Bestätigung für unsere Therapieveruche mit dem veränderten Noggin-Gen, die im vorigen Abschnitt beschrieben wurde. Experimentelle Beweise auf biochemischem Niveau aus unserer Gen-Therapie-Arbeit haben gezeigt, dass Dr. Groppe's Hypothese richtig war. Die Schönheit und die Kraft der röntgenkristallographischen Studien zeigten, warum das tatsächlich stimmte.

In einem noch neueren Artikel über die Struktur von Noggin mit dem Titel „Die strukturelle Basis der BMP-Signalgebungs-Hemmung durch Noggin, ein Neues Zwölfgliedriges Cystein Knoten Protein“, veröffentlicht im Oktober 2003 im **Journal of Bone and Joint Surgery**, beschrieb Dr. Groppe im Besonderen die wichtige Beziehung, die diese Arbeit zur Studie über FOP hat. Er stellte fest, dass die Struktur von Noggin die Basis für die Konstruktion von Nogginvarianten bildet, die therapeutische Anwendungen bei der Behandlung von FOP sein könnten. Dr. Groppe stellte fest, „FOP ist eine

seltene genetische Erkrankung des Bindegewebes, diagnostiziert bei weniger als 150 Patienten in den Vereinigten Staaten, die aus dem Fehlvorkommen von BMPs durch Lymphozyten resultiert. Diese Fehlvorkommen geschehen oft an Entzündungsherden und führt zu einer Umfunktionierung von Muskel in Knochen. Der Mangel an Noggin ist nicht ursächlich für FOP, da keine Veränderungen an den Nogginstellen bei Patienten identifiziert wurden, trotz intensiver Analysen in verschiedenen Labors. Einer Variante von Noggin, der jedoch die heparinbindende Seite fehlt und die ohne den Vorteil der dreidimensionalen Struktur von Noggin konstruiert wurde, war sehr vielversprechend als mögliches therapeutisches Mittel gegen BMP-induzierte heterotope Ossifikation in einem Versuch an Mäusen für FOP. Eine zweite Generation Mutanten, bei denen die heparinbindende Seite gelöscht wurde, können jetzt auf der Basis der Kristallstruktur von Noggin konstruiert werden. Diese Mutanten sollten größere Stabilität besitzen, was deren Potential als therapeutische Mittel durch das Senken des Spiegels, der bei Patienten mit FOP eingestellt werden muss, erhöhen wird.“

Alles in allem hat Dr. Groppes Arbeit tiefe Auswirkungen auf die BMP4-Signalisierung bei FOP und für die Noggin-Gentherapie sowie auf die Biologen in zahlreichen Gebieten, der Molekular-, Entwicklungs- und Strukturbioogie.

Die natürliche Regulierung von Noggin

Zusätzlich zu der Fähigkeit von Noggin, vielfältige BMPs zu binden und abzusondern und diese so daran zu hindern, die BMP-Bahn zu aktivieren, arbeiten einige unserer Kollegen daran, besser zu begreifen, wie Noggin *in vivo* reguliert wird. Während eines Besuchs Ende November 2002 im Center for Research on FOP & Related Disorders erklärte unser Kollege Dr. Aris Economides von Regeneron Pharmaceuticals, wie die Familie der Moleküle des Fibroblastwachstumsfaktoren (FGF) und deren bekannte Rezeptoren bei der Fusion der Kranialnähte (die weichen Teile am Babyschädel, die die Ausweitung der Knochen, die den Schädel bilden, ermöglichen) während der Entwicklung die Fähigkeit der BMPs dämpfen, die Expressivität deren Antagonisten (wie Noggin) zu erhöhen. Also hindert die Überaktivität der Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptoren (wie es in der Craniosynostose, einer Krankheit, bei der sich die Schädelknochen verfrüht zusammenfügen) die BMPs daran, die Expressivität von Noggin entsprechend zu erhöhen. Daraus resultierend entsteht ein gefährliches Ungleichgewicht zwischen BMP und Noggin, was zu einer exzessiven Knochenbildung und einem verfrühten Zusammenwachsen der Schädelknochen führt. Äußerst wichtig ist, dass die Molekularpathologie der Craniosynostose und FOP zeigt, dass es nicht einfach nur zuviel BMP ist, sondern zu wenig an Antagonisten, die vielleicht dieses Problem verursachen.

In einer Arbeit, die zu unserer Bezug hat, zeigen vorläufige Daten von Dr. David Diefenderfer von der Universität von Pennsylvania School of Dental Medicine (der kürzlich mit einem Developmental Grant vom FOP-Center ausgezeichnet wurde), dass Glukocorticoide (Medikamente wie Prednison) womöglich die Fähigkeit besitzen, die Expressivität von Noggin *in vitro* zu erhöhen. Derartige Erkenntnisse, wenn sie sich *in vivo* bestätigen, hätten wertvolle und wichtige Auswirkungen auf die Therapie von Krankheiten wie FOP und anderen Krankheiten mit heterotoper Ossifikation.

Antiangiogenetische Wirkstoffe

Die Entwicklung und das Wachstum des menschlichen Embryos sowie das Wachstum und die Rückbildung vieler Tumore sind von der Kontrolle neuer Bildung von Blutgefäßen abhängig (Angiogenese). Angiogenese ist auch absolut erforderlich für die Bildung und Entwicklung des Skeletts, für die erfolgreiche Heilung von Brüchen und für die Bildung von heterotopem Knochen. Die Frühstadien der Skelette embryogenese und Bruchheilung entsprechen den stark mit Blutgefäßen durchzogenen fibroproliferativen Schwellungen vor der Verknöcherung, wie man es bei FOP sehen kann. Angiogenese, eine bekannte histopathologische Eigenschaft von FOP-Läsionen im Zustand vor der Verknöcherung, wird ein wichtiges Ziel für die Therapie.

Der Basic fibroblast growth factor (= Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (Anm. d. Übersetzers)) (bFGF), ein heparinbindender endothelialer Zellwachstumsfaktor, ist ein äußerst starker *in vivo* Angiogenesestimulator und wird mit dem Wachstum fester Tumore in Zusammenhang gebracht. bFGF wurde bei FOP-Patienten untersucht, um fest zu stellen, ob er auch mit den pre-osseous Läsionen in Zusammenhang steht. bFGF-Spiegel im Harn sind bei Patienten mit FOP deutlich erhöht, besonders während akuter Schübe im Laufe der Krankheit. Im Gegensatz dazu wurden keine erhöhten bFGF-Werte im Urin festgestellt, wenn die Krankheit ruht. Diese Daten lassen vermuten, dass bFGF im Urin ein biochemischer Marker für Krankheitsschübe bei FOP-Patienten ist und eine biochemische Basis ist, eine anti-angiogenetische Therapie in den Frühstadien des Krankheitsverlaufes in Betracht zu ziehen.

Squalamine, ein neuer anti-angiogenetischer Wirkstoff, von möglichem Interesse für FOP, wurde 1992 im FOP-Labor von Dr. Michael Zasloff entdeckt. Dr. Zasloff isolierte Squalamine aus dem Körpergewebe eines Hundshais, und entdeckte zufällig dessen anti-angiogenetische Eigenschaften. Squalamine ist ein natürlich vorkommendes cholesterin-ähnliches Molekül, das die Proliferation endothelialer Zellen (Blutgefäßzellen) hemmt und eine wirkungsvolle anti-angiogenetische Aktivität bei Labortieren und Menschen zeigt. Squalamine verändert die Antwort der endothelialen Zellen auf Proteine, die deren Form und Struktur ausbilden.

Squalamine wird zurzeit synthetisch, unter sterilen Bedingungen hergestellt und muss nicht mehr aus Haien gewonnen werden. In vorklinischen Studien wurde nachgewiesen, dass Squalamine Angiogenese und das darauf folgende Wachstum einiger solider Tumore hemmt. Durch das direkte Blockieren des angiogenetischen Prozesses, hat Squalamine das Potential, das Fortschreiten der FOP-Läsionen im Muskel zu verlangsamen.

Ein Phase I - klinischer Test von Squalamine bei FOP wurde von der U.S. FDA genehmigt und wird bei einer kleinen Gruppe erwachsener FOP-Patienten getestet, die schwere Schübe im Stadium vor der Verknöcherung haben. Die erste Studie ist dazu bestimmt, die Sicherheit und Wirksamkeit von intravenösem Squalamine zur Hemmung der Angiogenese zu beurteilen und erlaubte eine Registrierung von nicht mehr als zehn erwachsene Patienten mit FOP. Die Studie wurde von der FDA, The Institutional Review Board der Universität von Pennsylvania, The General Clinical Research of The Hospital der Universität von Pennsylvania, The Radiation Safety Board, The Clinical Studies Monitoring Unit der Universität von Pennsylvania vollständig zugelassen.

Wegen des Mangels an Registrierungen wurde die Studie durch die Sponsoren aus der Pharmazie jedoch nach zwei Jahren verschoben. hierbei geht es um mehrere Faktoren, einschließlich der Komplexität des Versuchsaufbaus, der Schwierigkeiten für die Patienten, im vorgegebenen Zeitraum von sieben Tagen nach Einsetzen eines Schubes, nach Philadelphia zu reisen und der Unmöglichkeit, Kinder aufgrund des Fehlens der Genehmigung durch die FDA, mit der es erlaubt wäre, Kinder mit FOP in die Studie aufzunehmen. Der Sponsor aus der Pharmazie fährt mit seinen Studien über Squalamine bei Makuladegeneration, einer vaskulären Erkrankung, die das Sehvermögen beeinträchtigt, fort und wird erst einen reproduktiven Toxizitätstest durchführen müssen, bevor Squalamine an der pädiatrischen FOP-Bevölkerung untersucht werden könnte.

Trotz der Verschiebung des Squalamine-Versuchs wegen fehlender Registrierung, wird die Angiogenese möglicherweise durch zahlreiche andere anti-angiogenetische Wirkstoffe, wie z.B. Aminobisphosphonate, Thalidomid, Cyclooxygenase-2(COX-2)-Hemmer, vaskuläre endothele Wachstumsfaktorklappen und vermenschlichte monoclonale Antikörper, die gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtet sind, minimiert. Zur Zeit befinden sich einige dieser Wirkstoffe in vorklinischer Entwicklung oder in der Frühphase I klinischer Studien. Richtlinien für den nicht namentlich benannten Einsatz einiger dieser Wirkstoffe (Aminobisphosphonate und COX-2-Hemmer) bei Patienten mit FOP kann man im Text und den Übersichtstafeln der FOP-Treatment-Guidelines, verfügbar auf der IFOPA-Webseite unter: www.ifopa.org, finden.

Prostaglandine & die COX-2 Hemmer: Entzündung & FOP

In den vergangenen Jahren wurden wir auf eine neue wichtige Kategorie von Medikamenten mit zuvor unerwarteten und wichtigen Auswirkungen für die Behandlung von FOP aufmerksam. Dies sind die Cyclooxygenase-2 (COX-2) Hemmer, Medikamente, die besonders auf die entzündungsfördernden Prostaglandine abzielen.

Der Körper stellt im Wesentlichen zwei Typen von Prostaglandinen her: „physiologische“ Prostaglandine und „entzündliche“ Prostaglandine. Physiologische Prostaglandine werden normalerweise in vielen Körpergeweben hergestellt und schützen Organe wie den Magen vor metabolischen Verletzungen. Entzündliche Prostaglandine werden als Reaktion auf Verletzungen hergestellt und spielen eine wesentliche Rolle bei der entzündlichen Reaktion bei Verletzungen. Traditionell nicht-steroidale entzündungshemmende Medikamente, wie Aspirin, Ibuprofen und Indometacin hemmen die Bildung sowohl der physiologischen als auch der entzündlichen Prostaglandine. Die neuen Cyclooxygenase 2-(COX-2) Hemmer hemmen in erster Linie die entzündlichen Prostaglandine und die physiologischen Prostaglandine bleiben weitgehend intakt.

Entzündliche Prostaglandine sind zusammen mit BMPs starke mitstimulierende Moleküle bei der Auslösung heterotoper Knochenbildung. Abhandlungen in der orthopädischen Literatur haben gezeigt, dass ein Senken des Prostaglandinpegels bei Versuchstieren die Schwelle zur heterotopen

Ossifikation stark erhöht und so eine Knochenbildung erheblich erschwert wird. Tiere, die mit Prostaglandin-Hemmern vorbehandelt wurden, bildeten keine heterotopen Knochen, nachdem ihnen eine BMP-haltige, entmineralisierte Knochengrundsubstanz intramuskulär gespritzt worden war. Im Gegensatz dazu bildeten Tiere, die gleichzeitig oder kurz nach einer Injektion mit entmineralisierter Knochensubstanz mit Prostaglandinhemmern behandelt wurden, noch heterotopen Knochen. Diese Daten lassen darauf schließen, dass, falls die Prostaglandinhemmer wirklich effektiv eine heterotope Knochenbildung verhindern, die medikamentöse Behandlung „im System“ vorhanden sein muss (mit anderen Worten: in therapeutisch richtiger Menge im Blut zirkulieren muss), bevor ein Signal zur Knochenbildung auftritt. Zusätzlich zu ihren entzündungshemmenden Eigenschaften, zeigte eine neue Studie unerwarteterweise, dass COX-2 Hemmer starke anti-angiogenetische und entzündungshemmende Eigenschaften haben, eine Tatsache, die sie noch wünschenswerter bei der Anwendung bei FOP machen.

Ein wichtiger Bericht, der 2002 von Kollegen der University of Rochester veröffentlicht wurde, zeigte in überzeugender Weise, dass Tiere, die dahingehend genetisch manipuliert wurden, dass ihnen beide Kopien des Gens fehlen, dass das COX-2-Enzym (COX-2 knockouts) verschlüsselt, nicht in der Lage sind, an einer Bruchstelle die Bildung neuen Knochens zu veranlassen, wodurch die Wichtigkeit des COX-2-Enzyms bei der entzündlichen Knochenbildung gezeigt wird. Während pharmakologische Dosen des COX-2-Hemmers (Medikamente, die die Aktivität des COX-2-Enzyms blockieren), die normalen Tieren verabreicht werden, einen ähnlichen Effekt haben, könnte die Hemmung der Knochenbildung in beiden Fällen (bei COX-2-knockouts und Tieren, die mit COX-2-Hemmern behandelt wurden) mit enormen Mengen an rekombinantem BMP überwunden werden, was zeigt, dass die COX-2-Aktivität stromaufwärts bei der BMP-Signalgebung auftritt und dass eine starke Überaktivität der BMP-Bahn (wie man es bei FOP beobachten kann) glaubhaft eine COX-2-Blockade überwinden könnte. Ähnliche Ergebnisse wurden von einer separaten Studie berichtet, unter der Leitung eines früheren FOP-Labormitarbeiters, der jetzt an der Universität für Medizin und Zahnmedizin in New Jersey arbeitet.

Die Spiegel von entzündlichem Prostaglandin sind im Serum von FOP-Patienten drastisch erhöht, besonders während Krankheitsschüben. Entzündliche Prostaglandine stimulieren direkt die Zuführung angiogenetischer Peptide, die ihrerseits die Knochenbildung fördern. Diese Beobachtungen deuten auf folgende Hypothese hin: das Senken des normalen Prostaglandinspiegels bei Patienten mit FOP erhöht vielleicht die Schwelle der heterotopen Knochenbildung sogar trotz eines erheblichen endogenen BMP. Diese Hypothese ist ausschlaggebend für die klinische Testreihe und wird der Mittelpunkt einer Placebo-kontrollierten Studie sein, um die Sicherheit und Wirksamkeit der COX-2-Hemmer bei der Verhinderung von FOP-Schüben bewerten zu können.

Während der große Nutzen der neuen COX-2 Hemmer zur Verhinderung heterotoper Knochenbildung nicht größer ist als die vorhandene Reihe nicht-steroidaler entzündungshemmender Medikamente, bieten die neuen COX-2-Hemmer die Möglichkeit eines geringeren gastrointestinalen Risikos als die jetzigen Zusammensetzungen. Außerdem hilft die Halbwertszeit einiger der neuen COX-2-Hemmer mit einer Tagesdosis auszukommen, eine Tatsache, die hilft die regelmäßige Einnahme durch die Patienten zu fördern.

Während die COX-2-Hemmer im Allgemeinen sicher sind, muss ihr Verhalten sorgfältig überwacht werden, besonders bei denen, die die Medikation über eine lange Zeit einnehmen, da seltene aber lebensbedrohliche Nebeneffekte und Nierenschäden auftreten können. So wie bei jeder Krankheit müssen die Risiken und Vorteile wirkungsvoller Therapien gegen die großen Risiken der zugrundeliegenden Krankheit, die behandelt wird, abgewogen werden.

COX-2-Hemmer sind auf Rezept erhältlich. Sie werden zurzeit an Kindern mit rheumatischer Arthritis getestet und werden gelegentlich von pädiatrischen Spezialisten zur Behandlung schwerer entzündlicher Erkrankungen, wie z.B. FOP, eingesetzt, bei denen es auch noch einige andere Behandlungsmöglichkeiten gibt. Zur Zeit wurde eine Placebo-kontrollierte Studie für einen der COX-2-Hemmer aufgebaut und wartet auf die endgültige Freigabe. Die Studie wurde im FOP-Labor aufgebaut, um fest zu stellen, ob diese neue Art der Medikation vielleicht bei der Verhinderung von FOP-Schüben nützlich sein kann. Die Arbeit über den COX-2-Hemmer berücksichtigt wichtige Entdeckungen über die Prostaglandinproduktion, Mastzellenverstärkung und die angiogenetische Faktorenfreisetzung mit den pathologischen Entdeckungen schwerer Entzündungen bei FOP-Läsionen vor der Verknöcherung aus dem FOP-Labor.

Aminobisphosphonate: Ein Update für 2004

Bisphosphonate sind eine starke Medikamentengruppe, die große Auswirkungen auf den Wiederaufbau der Knochen haben und ihre ursprüngliche Wirkung zeigten, indem sie die Lebensdauer der Osteoklasten verringerten. Bisphosphonate werden also weitgehend zur Behandlung zahlreicher Knochenerkrankungen eingesetzt, bei denen der Knochenrückgang gegenüber Knochenbildung überwiegt – Krankheiten wie Osteoporose, Osteogenesis imperfecta, das Paget-Syndrom, Fibröse Dysplasie und Knochenkrebs.

Das erste klinisch eingesetzte Etidronat hemmt, wenn es in hohen Dosen verabreicht wird, möglicherweise die Mineralisierung neu gebildeten Knorpels und Knochenproteins und wurde bis vor etwa 30 Jahren als mögliche Behandlung für FOP und andere Krankheiten heterotoper Knochenbildung ins Auge gefasst.

Etidronate werden wegen ihrer hemmenden Auswirkung auf die Knochenmineralisierung und ihres Potentials zur Verschlechterung der Ossifikation bei Gabe von hohen Dosen untersucht. Unglücklicherweise verursacht es bei hohen Dosen auch Osteomalazie (weiche Knochen) und verschlechtert die Knochenbildung des gesamten Skelettsystems, nicht nur des heterotopen Knochens des „zweiten Skeletts“. Seine Einsetzbarkeit ist deshalb äußerst begrenzt.

In einer veröffentlichten Untersuchung wurden die Auswirkungen intravenös verabreichter Etidronate und oraler Corticosteroide bewertet. Einunddreißig FOP-Schübe wurden bei sieben Patienten im Laufe von durchschnittlich 6 aufeinander folgenden Jahren überwacht. Bei 29 Schüben beobachtete der Autor während der ersten sieben Tage der Behandlung eine sehr schnelle Rückläufigkeit der lokalen Entzündung, Schwellung und des Schmerzes. Trotz der Etidronatbehandlung wurden jedoch 10 neue Ossifikationen beobachtet, die eine starke Verschlechterung der Gelenkbeweglichkeit bei allen betroffenen Patienten verursachte. Bei 21 Schüben trat keine neue ektopische Knochenbildung auf. Die radiologischen Bilder bereits bestehender Ossifikationen veränderten sich während der Behandlung nicht. Die Ergebnisse könnten auf die Möglichkeit hindeuten, dass eine intravenöse Verabreichung von Etidronat und oraler Corticosteroide vielleicht hilfreich wäre, aber es werden mehr Kontrolldaten über die spontane Lösung von Schüben im Frühstadium benötigt. Während hochdosiertes Etidronat die Mineralisierung für eine gewisse Zeit hemmt, besitzen die neueren Bisphosphonate diese Aktivität nicht. Zum jetzigen Zeitpunkt verwenden wir Etidronat nicht regelmäßig zur Behandlung von FOP.

Da seine Wirksamkeit bei FOP ungewiss ist, genoss Etidronat nur begrenzten Einsatz bei Behandlungen von eher lokal auftretenden Krankheiten heterotoper Ossifikation, wie etwas diejenigen, die nach einem Bindegewebsstrauma oder Verletzungen des Zentralnervensystems auftreten. Im Gegensatz zu Etidronat haben die neueren Bisphosphonate (und auch Aminobisphosphonate) keine nennenswerte Auswirkung auf die Hemmung der Mineralisierung, aber sie sind hundert- bis tausendmal stärker als Etidronate bei der Hemmung des Knochenschwundes, eine Eigenschaft, die ihren momentanen Einsatz bei einer großen Palette von Knochenkrankheiten, die durch exzessiven Knochenschwund gekennzeichnet sind, zwingend vorschreibt.

Warum sollten also die neueren Aminobisphosphonate, die in erster Linie den Knochenschwund hemmen, die sogar im Zusammenhang mit FOP erörtert und diskutiert wurden, bei einer Krankheit, bei der verringerter Knochenschwund vorliegt (wenigstens im heterotopen Skelett) nicht wünschenswert sein? Auf den ersten Blick würde es scheinen, als gäbe es für den Einsatz von Präparaten, wie den neueren Aminobisphosphonaten bei der Behandlung von FOP zu wenig rationalen Nutzen. So einfach ist die Geschichte jedoch nicht.

Alle Medikamente haben Nebenwirkungen, aber es ist eine interessante Randerscheinung medizinischer Praxis, dass die Medikamente entweder fälschlicherweise oder zufällig mit ungeahnt nützlichen Wirkungen angewandt werden. Sehr oft wird ein neuer Anwendungsbereich für ein altes Medikament erst zufällig nach der Zulassung eines Medikaments für eine spezielle Anwendung entdeckt.

Ein ähnliches Szenario spielte sich kürzlich mit dem Einsatz von Aminobisphosphonaten bei der Behandlung von FOP ab. Einige glaubwürdige Einzelberichte (an FSK & DLG) von Ärzten und FOP-Patienten weltweit hoben die Reaktion auf Pamidronat, eines der neueren Aminobisphosphonate, bei FOP-Schüben besonders hervor. Einer dieser Berichte von Dr. Mordechai Weiss, M.D., Leiter des Endocrine Institute of Assaf Harofeh Medical Centers in Zerifin, Israel, und Dr. Orly Doron-Goldstein, ein Molekularbiologe am Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel, dokumentiert eine ziemlich

prägnante und brillante Anzahl klinischer Beobachtungen über die Anwendung von Pamidronat bei FOP-Schüben. Aber warum käme Pamidronat sogar als Behandlung bei FOP-Schüben in Frage? Ironischerweise wurde in allen drei Fällen, von denen wir hörten, die Medikation mit dem Irrglauben angewandt, dass Pamidronat bei der Hemmung der Mineralisierung stärker wirke als Etidronat. Das stimmt nicht. Keines der neueren Bisphosphonate einschließlich Pamidronat hat irgendeine Auswirkung auf die Hemmung der Mineralisierung. Nichts desto trotz berichteten alle drei Patienten von einer deutlich geringeren Schwellung, Rötung und Schmerz als Folge einer hochdosierten intravenösen Pamidronatgabe während eines neuen Schubes. Bei einem Patienten wurde nur Pamidronat verabreicht, während es bei den beiden anderen Patienten einige Tage lang zusammen mit der Einnahme eines Steroids (wie Prednison) im Frühstadium eines neuen FOP-Schubs verabreicht wurde.

Alle in unserer FOP-Gemeinschaft wissen, dass derartige Einzelbeobachtungen rein zufällig sein könnten – das heißt, dass der Schub vielleicht ohne Behandlung spontan wieder nachgelassen hätte und dass Pamidronat überhaupt nichts mit der berichteten Besserung zu tun gehabt hätte, besonders weil Glucocorticoide zusätzlich bei zwei von drei Patienten oral verabreicht wurden. Man kann auch einen möglichen Placeboeffekt bei einer unkontrollierten Beobachtung nicht unberücksichtigt lassen. Nichts desto trotz wissen wir auch, dass derartige Beobachtungen starker Besserungen von FOP-Schüben nicht übersehen werden können. Es ist absolut möglich, dass es sich lohnt, über etwas zu stolpern, auch wenn es der falsche Grund ist!

Als sich die Kunde von dieser Reaktion auf Pamidronat (mit oder ohne Steroiden) im vergangenen Jahr (hauptsächlich per Internet zwischen den Patienten und Familien) sehr schnell in der FOP-Gemeinschaft verbreitete, nahmen 21 Patienten (nach Rücksprache mit uns und ihren Hausärzten) empirisch Pamidronat (entweder alleine oder mit Steroiden) zur Behandlung von akuten Schüben, besonders bei solchen, bei denen größere Gelenke betroffen sind. Bei 16 von 21 Patienten (76 %) kam es zu einer berichteten Besserung der Symptome eines FOP-Schubs. Bei fünf von 21 Patienten (24 %) kam es zu keiner berichteten Besserung, als die Krankheit auftrat, weder in den Augen des Arztes noch in denen des Patienten. Interessanterweise schien es bei keinem Patienten, die entweder mit einer einzigen Dosis oder über drei Tage hinweg mit Pamidronat intravenös behandelt wurden, in irgendeiner Weise eine Schutzwirkung für nachfolgende Schübe zu geben. Deshalb waren die Besserungen, egal welcher Art, die es gegeben haben mag, vorübergehend und hatten nur auf vorhandene Läsionen zum Zeitpunkt des Schubs eine Auswirkung.

Die Behandlungsprotokolle basieren auf veröffentlichten Richtlinien für Kinder und Heranwachsende mit Osteogenesis imperfecta, da diese Patientengruppe die größte Gruppe von Kindern und Heranwachsenden stellt, bei der Pamidronat intravenös verabreicht wird. Der Drei-Tages-Zyklus der intravenösen Pamidronat-Behandlung sollte nur während der Schübe wiederholt werden, bei denen größere Gelenke betroffen sind, und die Behandlung sollte nicht öfter als vier Mal jährlich wiederholt werden. Pamidronat sollte nach dem Auftreten eines Schubes so früh wie möglich eingesetzt werden, wenn möglich und am Besten innerhalb der ersten 48 Stunden.

Orale Corticosteroide (Prednison) können gemäß den Richtlinien, die in den **FOP-Richtlinien** (www.ifopa.org) aufgezählt werden, zusätzlich zu den Behandlungskuren verabreicht werden. Im Allgemeinen werden Corticosteroide gleichzeitig vier Tage lang zur Behandlung von Schüben, bei denen mehrere größere periphere Gelenke, das Kiefer oder der Unterkieferbereich betroffen sind, verabreicht. Corticosteroide werden im Allgemeinen nicht in Verbindung mit Pamidronat eingesetzt bei Schüben im Nacken, Rücken oder Brustbereich, da es im Allgemeinen schwieriger ist, den Beginn der Schübe in diesen Bereichen zu bestimmen und der berichtete Erfolg von Prednison bei Schüben in diesen Bereichen fragwürdiger ist als bei Schüben in den größeren peripheren Gelenken. Der kombinierte Einsatz von Prednison und Pamidronat bei Schüben im Torso und im Rücken wurde deshalb nicht systematisch bewertet und ist nur bei einem Kind mit einem Einzelerfolg erprobt.

Zur Behandlung akuter Schübe an größeren peripheren Gelenken, erhielten die Patienten eine Behandlung mit einer oralen Prednisongabe an 4 aufeinanderfolgenden Tagen in Verbindung mit einem 3-Tageszyklus von i.v.-Pamidronat. Es traten bei intravenösen Infusionen u.a. Nebenwirkungen wie grippeähnliche Symptome mit Fieber, Schüttelfrost und Muskelschmerzen auf. Diese Symptome können oft durch die Vorbehandlung mit Azetaminophen verringert werden. Eine Patientin bekam eine Tetanie (unkontrollierte Muskelkontraktionen aufgrund eines niedrigen Vitamin-D-Spiegels im Blut vor der Pamidronattherapie) und ein Patient bekam Periphlebitis (Venenentzündung) an der Stelle der intravenösen Infusion, die eine intravenöse Antibiotikabehandlung im Krankenhaus erforderte. Ein neuer Fallbericht aus dem Jahr 2003, der in **The New England Journal of Medicine** veröffentlicht

wurde, dokumentierte die Entwicklung von Osteopetrose (Marmorknochenkrankheit) bei einem Kind, das alle drei Wochen innerhalb von zwei Jahren mit 60 mg i.v.-Pamidronat behandelt wurde. Das Kind litt nicht an FOP.

Einsicht und Beistand für den Einsatz von Pamidronat bei FOP erhielten wir 2003 durch die Studie an Kindern und Heranwachsenden mit Osteogenesis imperfecta (O.I.).

Die Behandlung mit zyklischen intravenösen Pamidronatinfusionen (3 – 4 Zyklen jährlich) führen zu erheblichen Verbesserungen bei der klinischen Handhabung von Kindern und Heranwachsenden mit O.I., durch eine allgemeine Verbesserung der Knochendichte und deutlich weniger sich daraus ergebender Brüche im ganzen Skelett. Trotz seiner wohlbekannten positiven Effekte auf den Skelettwiederaufbau und die Knochenhärte, sind die Auswirkungen von Pamidronat auf die neue enchondrale Skeletogenese der Art, die an einer Bruchstelle auftreten würde, noch nicht gut beschrieben. In einer ausführlichen Studie zeigte Dr. Francis Glorieux und dessen Kollegen am Shriners Hospital for Children und der McGill University in Montreal, das nicht ausgeheilte Knochenbrüche bei Patienten mit O.I. doppelt so häufig vorkamen, wenn vor dem Auftreten der Fraktur mit einer Pamidronat-Therapie begonnen wurde. Außerdem trat eine verzögerte Osteotomieheilung fast viermal so oft auf, wenn vor dem Eingriff mit Pamidronat begonnen wurde. Die Studie zeigte, dass die zyklische intravenöse Pamidronat-Therapie mit einer signifikanten Verzögerung bei der Bruch- und Osteomieheilung bei Kindern und Heranwachsenden mit O.I. einherging. Obwohl die Studie aus völlig anderen Gründen und an einer anderen Patientengruppe als FOP durchgeführt wurde, unterstützt die Studie die Hypothese, dass Pamidronat die Knochendichte verstärken und die Häufigkeit von Brüchen im normotopen Skelett durch seine Auswirkung auf die Knochenwiederherstellung verringern kann, während gleichzeitig die enchondrale Skeletogenese an normalen Stellen gehemmt wird.

Eine wichtige Frage, die diese Beobachtungen von der Seite der klinischen Routineversorgung von FOP-Patienten aufwirft, ist: „Was könnte die physiologische Grundlage für eine sehr gute positive Wirkung der Aminobisphosphonate bei der Behandlung von FOP-Schüben sein? Als Folge seiner starken Hemmung des Knochenschwundes, hemmen die Aminobisphosphonate wirkungsvoll die Freisetzung der Wachstumsfaktoren und der Morphogene (wie BMPs), die in der extrazellulären Knochenmatrix des Skeletts eingelagert sind. Die Sache mit den Bisphosphonaten bezüglich der Unterdrückung des Knochenschwundes dauert ausnehmend lang, länger als für jede andere Art von Medikamenten, und erstreckt sich über Monate, sogar Jahre. Wenn Aminobisphosphonate FOP-Erkrankungen unterdrücken, indem Sie die Freisetzung von BMPs, die im Skelett eingelagert sind, herabsetzen, würde man jedoch eine betontere Wirkung auf die Verhinderung nachfolgender Schübe erwarten, die bei den behandelten Patienten nicht wahrgenommen wurde. Deutlich gesagt, wenn die Aminobisphosphonate bei der Behandlung von FOP-Schüben wirklich von Nutzen sind, muss es einen Aktionsmechanismus geben, der sehr kurz und völlig anders ist, als der der Osteoklastenhemmung, der die Medikation ihre wohltuenden Wirkungen beim normotopen Skelett verdankt.

Alle Bisphosphonate haben eine Neigung für Stellen normaler und pathologischer Mineralisierung. Der letztgenannte Effekt erklärt schlüssig das eifrige Aufnehmen von Bisphosphonaten an Stellen schwerer Muskelverletzungen, wo Kalzium aus den Mitochondrien und dem sarkoplasmatischen Retikulum sterbender Muskelzellen freigesetzt wird. Diese grundlegende Eigenschaft aller Bisphosphonate, sich in Bereichen normaler oder pathologischer Mineralisierung wie heimliche Raketen nieder zu lassen, könnte ein möglicher Mechanismus der Bisphosphonatabsonderung an Stellen von FOP-Läsionen im Frühstadium sein, wo Muskelzellen absterben. Wenn Bisphosphonate tatsächlich an Stellen von FOP-Läsionen im Frühstadium abgesondert werden, wie es aufgrund von radionuklid Knochenscans scheint, würden die Bisphosphonate biologisch für eine große Vielzahl von Targetzellen (Lymphozyten, Mastzellen fibroproliferative Zellen, angiogenetische Zellen) verfügbar sein, die die frühe Entwicklungsstufe einer FOP-Läsion ausmachen. Einmal von einer Targetzelle (für FOP-Zellen noch nicht bestimmt) aufgenommen, trennen die möglichen Aminobisphosphonate, wie Pamidronat die Mevalonat-Bahn durch die spezielle Hemmung der Aktivität des Farnesyl-Diphosphat-Synthase-Enzyms innerhalb der Zellen. Als Ergebnis dieser enzymatischen Hemmung werden die Targetzellen für eine post-translationale Prenylation (eine Art Proteinmodifikation) schmaler GTPasen, wie Ras, Raf und Rac, die für die zelluläre Aktivität wichtig sind, unbrauchbar gemacht. Folglich werden die Zielzellen funktional inaktiv gemacht und durchleben den apoptotischen Tod.

Während der mögliche Aktionsmechanismus der Aminobisphosphonate bei frühen FOP-Läsionen oder FOP-ähnlichen Läsionen, ausgelöst durch BMP, spekulativ bleibt, enthalten zwei Berichte, die kürzlich veröffentlicht wurden, einige verlockende Anhaltspunkte. Diese zwei Abhandlungen, die in der Krebsliteratur, die von Experten überprüft wurde, veröffentlicht wurden, dokumentieren die äußerst

starken antiangiogenetischen Wirkungen (verminderte Bildung neuer Blutgefäße) von Pamidronat und Zoledronsäure (Zoledronat) *in vitro* und *in vivo*. Gemäß einem Bericht, in dem Pamidronat intravenös verabreicht wurde, wurde der Spiegel des vaskulären Endothelwachstumsfaktors (VEGF) und des Basis-Fibroblastwachstumsfaktor (bFGF) bei Krebspatienten mit Knochenmetastasen dramatisch gesenkt. Sowohl VEGF als auch basic-FGF sind starke angiogene Faktoren in Bezug auf Tumore. In einem anderen Bericht, der im Oktober 2003 in der wissenschaftlichen Grundlagenliteratur veröffentlicht wurde, wurde berichtet, dass Zoledronsäure die Adhäsion, die Migration und das Überleben endothelialer Zellen und endotheliale Zellen, die sensibilisiert sind für den programmierten Zelltod, ausgelöst durch den Tumor-Nekrose-Faktor, beeinträchtigt. Der Tumor-Nekrose-Faktor ist ein der Tat eines der Moleküle, die durch Aminobisphosphonate stimuliert werden und einer der Hauptschuldigen der grippeähnlichen Symptome, die nach einer intravenösen Verabreichung von Bisphosphonaten auftreten. Weiterhin zeigte die Studie, dass Zoledronsäure die Aktivität der endothelialen Zellen beeinträchtigt, indem sie die fortwährende Aktivierung der Fokal-Adhäsions-Kinase und die Proteine-Kinase B/Akt, eine wichtige interzelluläre Signalbahn, die vorher nicht mit der Aminobisphosphonataktivität in Verbindung gebracht wurde, unterdrückt.

Die Wirkung von Pamidronat und anderer Aminobisphosphonate auf die Hemmung der Angiogenese bei Mäusen war völlig unerwartet aber nicht überraschend im Licht der außergewöhnlichen Wirkungen dieser Medikationen als begleitende Therapien bei verschiedenen Krebsarten. Starke antiangiogenetische Wirkungen von Pamidronat bei FOP stimmen mit der bekannt kurzen Halbwertszeit der Medikation im Kreislauf überein, eher als mit der stabilen Einlagerung über lange Zeit im Skelett und könnte erklären, warum die Medikation vielleicht eine Auswirkung auf akute krankhafte Veränderungen, aber nicht auf die Verhinderung neuer krankhafter Veränderung hat. Intravenöses Pamidronat hat auch gezeigt, dass es die Gamma-Delta-Lymphozyten-Subpopulation der Zirkulation anpasst und dass es als Nebenwirkung, abhängig von der Dosis des Medikaments, zu grippeähnlichen Symptomen kommt. Wir können jetzt noch nicht die Möglichkeit ausschließen, dass Pamidronat eventuell mit der frühen Lymphozyteninfiltration in den Skelettmuskel zu tun hat, die sowohl bei FOP-ähnlichen Läsionen, ausgelöst durch BMP-4, als auch bei FOP-Läsionen selbst beobachtet werden kann.

Andere mögliche Mechanismen, durch die sich Pamidronat vielleicht auf FOP-Läsionen auswirkt, schließen eine direkte Hemmung der Proliferation einer sich rapide teilenden Zellpopulation ein. Ein derartiger Effekt wurde kürzlich in einer Studie bemerkt, die die Wirkungen von Aminobisphosphonaten auf Krebszellen *in vitro* untersuchte. Es ist sicherlich möglich, dass Pamidronat sich auf einen oder mehr Zelltypen, einschließlich der mesenchymalen Vorläuferzellen, der Endothelzellen oder sogar der BdACs bei einer FOP-Läsion im Frühstadium auswirkt.

Während der Mechanismus der Pamidronateinwirkung auf die Bruchheilung noch ermittelt werden muss, ist die mögliche Hemmung der Matrix-Metalloproteinase (MMP)-Aktivität durch die Bisphosphonate ein wahrscheinlich mitwirkender Faktor. Studien, die 2003 veröffentlicht wurden, zeigten, dass Aminobisphosphonate mögliche Hemmer von fast allen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind. Knochenbildung und Skelettregeneration sind beim Fehlen spezifischer MMPs erheblich eingeschränkt. Es bleibt bei FOP und in entsprechenden Tierversuchen zu BMP-induzierter heterotoper Ossifikation abzuwarten, ob zyklische Pamidronatinfusionen oder eher die potente Aminobisphosphonat-Zoledronsäure (Zoledronat) die enchondrale Skeletogenese an heterotopen Stellen verringern kann. Vorklinische Laboruntersuchungen, die die Rolle der Aminobisphosphonate bei der Hemmung BMP-induzierter heterotoper Ossifikationen untersuchen, wurden im Januar 2004 begonnen und die Zulassung folgte durch The Institutional Animal Care and Use Committee.

Trotz der Hoffnung auf das Gegenteil, muss man die sachliche Möglichkeit bedenken, dass es vielleicht keine positiven Auswirkungen, welcher Art auch immer, von Pamidronat bei FOP-Läsionen geben wird, und dass die Berichte bis zum heutigen Zeitpunkt die Ergebnisse voreingenommener Beobachtung bzw. Zufall sind. Nur stark kontrollierte Laboruntersuchungen *in vitro* und *in vivo*, sowie Placebo-kontrollierte klinische Versuche werden diese Möglichkeiten endgültig entschlüsseln und eine solide vernünftige Basis für die Bestimmung bilden, ob oder ob nicht die Aminobisphosphonate vielleicht eine heilsame Rolle bei der Behandlung von FOP spielen.

Schließlich könnte der Einsatz der Aminobisphosphonate, abgesehen von deren geforderter und beobachteter Auswirkung auf die enchondrale Skeletogenese, bei jedem FOP-Patienten in Betracht gezogen werden, der chronisch oder mit Unterbrechungen mit hohen Dosen von Glukocorticosteroiden bei neuen FOP-Schüben behandelt wird. Die Aminobisphosphonate haben im Allgemeinen eine ausgezeichnete Sicherheit und Wirkungsprofil beim Schutz des normotopen Skeletts

vor den schweren osteopenischen Auswirkungen hochdosierter Glukocorticosteroide, die mit Unterbrechungen als Kur gegeben werden und die oft eingesetzt werden, um akute FOP-Schübe in den Griff zu bekommen.

Laboruntersuchungen, die sowohl einen starken therapeutischen Nutzen als auch einen wirkungsvollen Mechanismus der Aminobisphosphonataktion in dem Versuch der BMP-induzierten heterotopen Ossifikation als auch im Versuch mit Lymphoblastoidzellimplantationen (bereits früher in diesem Bericht erörtert) beurteilen, werden gerade im FOP-Labor durchgeführt. Gleichzeitig wird gerade eine kontrollierte klinische Studie aufgebaut, um den großen Nutzen von intravenösen Aminobisphosphonaten bei der Behandlung akuter FOP-Schübe zu bewerten. Die Studie wird dann Gegenstand einer harten Prüfung zahlreicher Untersuchungsgremien an der Universität von Pennsylvania, dem Children's Hospital of Philadelphia, des Pharmakonzerns, der die Studie sponsert und der FDA sein, ebenso von zahlreichen örtlichen Prüfungsausschüssen in Verbindung mit privaten Praxen, wo ein Kind oder ein Erwachsener untersucht und behandelt wird. Wir würden die Studie gern derart gestalten, dass sie an verschiedenen Orten ausgeführt werden könnte und daher ein Transport nach Philadelphia kein Thema wäre. Auch wenn die Logistik hierfür schwierig werden könnte, werden wir daran arbeiten.

Die Ergebnisse einer derart sorgfältig kontrollierten klinischen Studie würden uns fast sofort einen besseren Einblick in die mögliche Wirksamkeit von Aminobisphosphonaten bei der Behandlung von FOP-Schüben geben. Wie bereits erwähnt, ist es jedoch äußerst wichtig, streng kontrollierte Beobachtungen zu haben, um den möglichen Einsatz dieser Medikation (und anderer Aminobisphosphonate) für eine Langzeitbehandlung zu verstehen.

Wird Pamidronat oder die neuere Generation von Aminobisphosphonaten (wie z.B. Zoledronat, noch nicht für die Anwendung bei Kindern genehmigt) bei der Behandlung von FOP Wirkung zeigen? Nur die Zeit und starke experimentelle Anstrengungen werden auf diese Frage klare Antworten liefern. Während die Noggin-Gentherapie und darauf bezogene Versuche, wie die Entwicklung von BMP-Rezeptor-Antagonisten und BMP-Bahn-Antagonisten, BMP-Signaltransduktionshemmer und monoklonale Antikörper, die es auf die aktivierten Lymphozyten oder Komponenten der BMP-Signalgebungsbahn abzielen, schließlich zeigen werden, ob sie bei der endgültigen Behandlung und Verhinderung von FOP eindeutiger sind, hoffen wir, dass der Einsatz von schneller verfügbaren Medikamenten, wie Glukocorticoide, Leukotrienhemmern, Mastzellstabilisatoren, COX-2-Hemmern und vielleicht die Aminobisphosphonate uns Zeit für die Patienten gewinnen lassen. So wie Jeri Licht, die Mutter von Daniel Licht in der **BBC**-Dokumentation *The Skeleton Key* so redegewandt und überzeugt feststellte: „Sie müssen das Fortschreiten dieser Krankheit verlangsamen und die Knochenbildung, wenn der Schub begonnen hat, verlangsamen oder stoppen. Dann werden sie Zeit haben und wir genießen den Luxus, dass sie sich um eine vollständige Heilung dieser Krankheit kümmern.“

VII. Präsentationen, Versammlungen, Berichte und Veröffentlichungen

Im Laufe des Jahres 2003 waren wir privilegiert, größere Vorträge über FOP zu halten an:

- Baylor College of Medicine; Houston, Texas
- Beth Israel Deaconess Medical Center; Boston, Massachusetts
- Campbell Clinic; Memphis, Tennessee
- Dallas Children's Hospital; Dallas, Texas
- Harvard University; Cambridge, Massachusetts
- Indiana University – Perdue University School of Medicine, Indianapolis, Indiana
- Johns Hopkins University School of Medicine; Baltimore, Maryland
- Johnson & Johnson Research Foundation; New Brunswick; New Jersey
- Kinderklinik & Rheumakinderklinik; Garmisch-Partenkirchen; Deutschland
- Loyola University; Stritch School of Medicine; Chicago, Illinois
- Mayo Clinic; Rochester, Minnesota
- Northwestern University; Feinberg School of Medicine; Chicago, Illinois
- Orthopaedic Research Society; New Orleans; Louisiana
- Rush University Medical Center; Chicago, Illinois
- Stanford University School of Medicine; Stanford, California
- Texas Scottish Rite Hospital for Children; Dallas, Texas
- University of Alabama School of Medicine; Birmingham, Alabama
- University of Chicago, Pritzker School of Medicine; Chicago, Illinois
- University of Medicine & Dentistry of New Jersey, Robert Wood Johnson Medical School; Piscataway, New Jersey

- University of Minnesota School of Medicine; Minneapolis, Minnesota
- University of Santa Casa de Misericordia School of Medicine; Sao Paulo, Brasilien
- University of Saskatchewan College of Medicine; Saskatoon, Saskatchewan, Kanada
- University of Tennessee Health Science Center; Memphis, Tennessee
- University of Texas Southwestern Medical Center; Dallas, Texas
- University of Western Ontario Faculty of Medicine and Dentistry; London, Ontario, Kanada
- University of Winnipeg School of Medicine; Winnipeg; Manitoba, Kanada

Im Laufe des Jahre 2003 hatten wir die Ehre, Höhepunkte der FOP-Forschung auf größeren regionalen, nationalen und internationalen FOP-Familientreffen und Versammlungen zu präsentieren und zwar in

- Aberdeen, Schottland
- Fontenay-aux-Roses, Frankreich
- Montclair, New Jersey
- Orlando, Florida
- Philadelphia, Pennsylvania
- Santa Maria, California
- Sao Paulo, Brasilien
- Sausalito, California
- Valbert, Deutschland

Sechs größere Vorträge über FOP wurden im September 2003 von Mitgliedern des FOP-Labors vor der American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) in Minneapolis, Minnesota, gehalten. Einige dieser Erörterungen wurden auf der Plenarsitzung der Versammlung, die von mehr als 6.000 Ärzten und Wissenschaftlern weltweit besucht wird, vorgetragen. Wie immer war es eine wunderbare Gelegenheit, wichtige Höhepunkte und Entdeckungen des FOP- und POH-Labors einer ausnehmend großen und erlesenen Gruppe von Wissenschaftlern und Ärzten aus der ganzen Welt zu präsentieren.

Vergangenes Jahr experimentierte die Harvard University zum ersten Mal in den unteren Studiensemestern mit einem neuen Programm. Unter der Leitung von Dr. William Gelbart, Professor der Molekular- und Entwicklungsbiologie an der Harvard University, wurde eine größere Biologiekunde von Studienanfängern in den Lehrplan eingeführt. Im Gegensatz zu den meisten Einführungskursen in Biologie, die auf der ganzen Welt unterrichtet werden und die alle einem ähnlichen Schema folgen, in dem sie mit Molekülen und Zellen und deren Komplexität beginnen, stürzte sich Dr. Gelbarts Kurs mit dem Titel „Gene und Genome“ in eine überwältigende Ausbildungsabenteuer. Der Kurs wandte einen neuen Ansatz des Lehrens von Biologie und Genetik am Beispiel einer kleinen Auswahl menschlicher, genetischer Krankheiten an. Der gesamte Studienplan dieser Klasse rankte sich um sechs genetische Erkrankungen. Eine dieser sechs, die für diese eingehenden Studien ausgewählt wurde, war FOP.

Wir fühlen uns sehr geehrt und freuen uns, dass FOP ein Schwerpunkt dieses neuen Kurses von Studienanfängern an der Harvard Universität ist, und wir fühlten uns geehrt, dass wir eine umfassendere Vorlesung über FOP vor den Studienanfängern in der Biologiekunde von Dr. Gelbart am Harvard College halten durften. Der Enthusiasmus der Studenten war sehr groß und einige haben uns bereits wegen der Möglichkeit angesprochen, im Sommer eine Forschungsstelle im FOP-Labor zu erhalten.

Dr. Gelbart ist der Entdecker des Decapentaplegie(DDP)-Gens, des Drosophila-Homologs von BMP2 und BMP4. Ebenso ist er der Entdecker der größeren vorgeschalteten Signalgebungsmoleküle auf der BMP-Signalgebungsbahn. Dr. Gelbart ist seit Anfang ein wichtiger Mitarbeiter in der FOP-Forschung und ist ein wunderbarer Freund der FOP-Gemeinschaft. Dr. Gelbart erschien 1999 in der preisgekrönten Dokumentation über die FOP-Forschung **BBC Horizon**.

Wir sind Dr. Gelbart sehr dankbar, dass er FOP in den Studienplan des Einführungskurses Biologie für Studienanfänger an der Harvard University mit aufgenommen hat, und wir sind gespannt auf die Gelegenheit, den Köpfen der jungen, brillanten und enthusiastischen Studenten aus allen Stufen der akademischen Ausbildung die Prinzipien der FOP-Forschung nahe zu bringen.

Center for Research in FOP & Related Disorders

Als er für den **Scientist** schrieb, stellte John Trojanowski, M.D., Director of The Institute on Aging an der Universität von Pennsylvania fest: „Die meisten der heutigen biologischen Probleme erfordern Forschungsstrategien in vielen Disziplinen, was den Einsatz vielfältiger, diverser Methoden zur Folge hat, die ein einziger Forscher nicht meistern kann. Der greifbarste Nutzen von Center- und Programmstipendien ist vielleicht der schnelle und wirtschaftliche Gewinn von Einsichten in komplexe biologische Fragen, die aus der Forschung resultieren, die von angesehenen Forschern in gemeinschaftlicher Arbeit durchgeführt wird.“ The Center for Research in FOP & Related Disorders wurde vor einigen Jahren durch den Cali-Family-Fund mit dem gleichen Gedanken ins Leben gerufen.

Seit seinem Beginn hat das Development Grants program of the Center for Research in FOP and Related Disorders 12 neue Projekte unterstützt, die für unsere Langzeitmission wichtig sind. Bereits sechs größere, von Fachleuten anerkannte Abhandlungen wurden als Ergebnis dieser Unterstützung veröffentlicht und einige andere größere Abhandlungen sind in Vorbereitung.

Während des vergangenen Jahres unterstützte das Developmental Grants Program of the Center for Research In FOP and Related Disorders vier große Projekte in angeschlossenen Labors an der Universität von Pennsylvania. Einige dieser Projekte wurden bereits in vorhergehenden Abschnitten dieses Berichtes (oder in vorhergegangenen Berichten) hervorgehoben, und sie haben auch schon wichtige Ergebnisse und Einsichten für die FOP-Forschung hervorgebracht. Arbeiten, die während der vergangenen Jahre durch das Developmental Grants Program finanziell unterstützt wurden, beinhalteten Studien zur Identifizierung von Targetzellen bei BMP-induzierter heterotoper Ossifikation, Studien zur Charakterisierung der Rolle der Angiogenese während zweier kritischer Phasen der Skeletogenese, die Arbeit zur Entwicklung neuer adeno-verwandter Viralvektoren zur Anwendung bei den Noggin-Gen-Therapie-Versuchen, Studien zur Definierung der Rolle der Fibroblastenwachstumsfaktorenbahn bei der BMP-Antagonisten-Signalgebung, die Arbeit zur Klärung der Rolle neuraler Kammstammzellen bei der Osteogenese, Studien zur Bestimmung der Rolle der Glukocorticoide bei der Anpassung der BMP-Antagonisten-Reaktion auf ambiente BMP4-Spiegel und die Bemühungen zum Einsatz der Microarray-Chip-Studien, um die Reaktion der Chondrozyten auf die Fluorquinolone-stimulierten apoptotischen Signale in den Chondrozyten zu bestimmen. Das Zentrum unterstützt zur Zeit die Arbeit zur Erforschung des Nutzens von Zebrafischen als einen lebensfähigen Wirbeltiersversuch für FOP, sowie die aufregende Arbeit zur Definierung der Rolle der aus dem Blut stammenden adhärennten Stammzellen von FOP-Patienten bei der heterotopen Ossifikation.

Wir sind glücklich, dass wir eine außerordentlich talentierte Gruppe von Forschern haben, die mit uns an der Universität von Pennsylvania zusammenarbeitet, und wir sind hoch erfreut über den Fortschritt und versprechen, dass sich dieses einzigartige Programm rechtfertigt. Im Mai 2003 hielten wir unser zweites jährliches wissenschaftliches Ein-Tages-Symposium für Wissenschaftler an der Penn, die Unterstützung durch das Developmental Grants Program bekamen. 2004 werden wir damit beginnen, die Möglichkeiten zu erforschen, diese Arbeit auf Forscher und mögliche Mitarbeiter außerhalb von Institutionen auszuweiten.

Die medizinische Umgang mit FOP – online

Im September 2003 veröffentlichten wir die zweite Ausgabe von **The Medical Management of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): Current Treatment Considerations**. Das Dokument, auch bekannt als **The FOP Treatment Guidelines**, ist über die IFOPA-Webseite (www.ifopa.org) erhältlich, kann leicht heruntergeladen werden und steht allen Interessierten zur Verfügung. Dank der großzügigen Hilfe von Freunden und Übersetzern, ist das Dokument ins Französische und Portugiesische übersetzt und an der Überetzung ins Spanische und Chinesischen wird zur Zeit gearbeitet. Wir raten allen eindringlich, die dieses Dokument noch nicht gesehen haben, es zu lesen und es von der IFOPA-Homepage (www.ifopa.org) herunter zu laden. Eine Diskette/ CD kann man bekommen, indem man mit Dr. Kaplans Assistentin, Kamlesh Rai unter: kamlesh.rai@uphs.upenn.edu Kontakt aufnimmt.

Artikel in der Presse

2003 gab es elf große, von führenden Wissenschaftlern überprüfte Veröffentlichungen über FOP und POH. Einige Abhandlungen befinden sich gerade im Druck, viele sind in Vorbereitung, und es werden noch weitere folgen!

VIII. IHR FOP-LABOR

Die FOP-Forschung wird langsam ein Forschungszentrum mit erweiterbaren Wänden. Während das FOP-Hauptlabor schätzungsweise eine Fläche von 200 Quadratmetern einnimmt, haben wir uns in den vergangenen vier Jahren durch die Bildung des Developmental Grants Project und der wunderbaren Zusammenarbeit mit Kollegen in vielen Abteilungen und an einigen Schulen über die ganze Universität von Pennsylvania ausgebreitet. Die Bilder unserer FOP- und POH-Kinder zieren die Gänge unseres Hauptlabors und erinnern uns ständig an unserer Ziele und unsere Mission. Also sagen wir den Kindern und Erwachsenen, die das Fop-Zentrum und -Labor besuchen: „Dies ist wirklich *euer* Zentrum und Labor. Wir freuen uns sehr, wenn ihr zu Besuch kommt.

Während des Jahres 2003 bestand die Belegschaft aus 17 Wissenschaftlern: drei verantwortliche Forscher, fünf Forschungsspezialisten, vier Mitarbeiter, die gerade ihren Abschluss gemacht haben, zwei Studenten kurz vor dem Abschluss, ein Medizinstudent, und zwei angehende Medizinstudenten. Zusätzlich arbeiteten im Sommer 2003 vier Collegestudenten an FOP-Projekten im Labor mit.

IX. DANK

Im Krieg gegen FOP finden wir uns alle selbst in einen großen Kampf verstrickt. Das Schlachtfeld selbst ist klein, aber die Folgen für unsere Gemeinschaft sind groß, und die Folgen für die weitere Welt derer, die an weitaus bekannteren Gebrechen des Skeletts leiden, sollten nicht unterschätzt werden.

Dies sind hoffnungsvolle Zeiten in unserem Kampf gegen FOP. Wir sind dankbar, dass ständig riesengroße Fortschritte gemacht werden. Wir sind stolz, dass wichtige Entdeckungen, die im FOP-Hauptlabor und den Labors, die mit uns zusammen arbeiten, gemacht werden, jetzt anfangen, in klinische Protokolle übertragen zu werden und in Pilotprojekte aufgenommen werden, die unter strengen wissenschaftlichen Regeln durchgeführt werden können. Wenn eine Heilung gefunden ist, dann ist der Kampf gewonnen. Bis dahin werden wir ihn an allen Fronten führen bis er gewonnen ist. Wir werden nicht schlapp machen; wir werden uns nicht geschlagen geben; wir werden uns nicht erweichen lassen.

Wie wir schon viele Male zuvor erwähnt haben, *cause (Ursache)* and *cure (Heilung)* sind die beiden Wörter, die uns motivieren und die den Leitgedanken für alles, was wir tun, beinhalten: Die genaue genetische und molekulare Ursache von FOP zu entdecken und dieses Wissen dazu zu benutzen, effektive Behandlungen und eine Heilung zu entwickeln. Unsere Arbeit hat dies auch weiterhin in erster Linie im Visier und wir glauben, dass ein großer Teil unseres heutigen Erfolgs der unermüdete Blick auf unsere Ziele ist. Das FOP-Zentrum und Hauptlabor sind auch weiterhin eine einzigartige weltweite Quelle sowohl für Patienten als auch die medizinische Gemeinschaft. Wir streben nach hervorragenden Leistungen und Führung in allen Bereichen, die mit unserer Mission zu tun haben: Patientfürsorge, Aufklärung und das Schaffen neuen Wissens.

Zusammenfassend war 2003 ein Jahr großer Entwicklungen für die FOP-Forschung und wurde gekrönt vom Hinzukommen drei ausnehmend wichtiger FOP-Familien, in denen FOP in mehreren Generationen vorkommt, zu den genomweiten Verknüpfungsstudien, von zukunftssträchtigen Entdeckungen über die Fehlregulierung der BMP-Rezeptor-Signalgebung und des Trafficking in FOP-Zellen, durch wichtige Einblicke aus den gewaltigen FOP-Microarray-Versuchen, durch die Identifikation aus dem Blut stammender adhärenter Stammzellen bei FOP-Patienten, durch die Bestätigung und Veröffentlichung neuer FOP-Tierversuche, durch die Identifikation möglicher neuer Medikamente und Medikamentenziele und durch die Entwicklung sicherer und noch viel effektiverer viraler Überträgersysteme für die Noggin-Gentherapie bei FOP. Wie gesagt, es gibt noch viel zu tun. Wir sind zuversichtlich, dass 2004 ein Jahr noch größerer Meilensteine in der FOP-Forschung werden wird, und dass spannende Entdeckungen das vor uns liegende Jahr mit Höhepunkten versehen werden.

Die FOP-Gemeinschaft durchlief während der letzten 13 Jahre einen langen und schwierigen Weg, aber es ist erstaunlich, wie weit wir gekommen sind. In der Tat werden wir auch weiterhin eine echte und kraftvolle Gemeinschaft sein, die die ganze Welt umspannt. In unseren Bemühungen bilden wir eine Einheit und wir besitzen den Impuls und den Schwung, die Ziele zu erreichen, die wir uns gesetzt haben. Wir werden jeden Tag daran erinnert, dass wir noch einen weiten Weg zu gehen haben, um diese Ziele zu erreichen, aber wir werden durch das, was wir erreicht haben, ermutigt und unsere Herausforderungen geben uns Energie.

Wie immer gilt unser herzlicher Dank den Kindern, Erwachsenen und Familien, die in jedem Augenblick ihres Lebens mit FOP leben. Ihre Gelassenheit und Würde sind uns die ständige Inspiration, die diese Arbeit und alle, die die Ehre haben mit zu arbeiten, würdigt.

Das FOP Collaborative Research Projekt ging aus dem starken Verlangen hervor, die Ursache für diese Behinderung festzustellen und eine Heilung zu finden. Wir werden dieses Ziel erreichen und wir werden uns durchsetzen. Wie immer ist das Finden einer Heilung für FOP kein Beruf, es ist eine Berufung.

Wir alle im FOP-Hauptlabor, in dem Developmental Grants Program und in den angegliederten Unternehmen, die mit uns auf der ganzen Welt zusammenarbeiten, sind sehr stolz, Teil dieser Berufung zu sein und sind sehr dankbar denen gegenüber, die diese regen Forschungsbemühungen unterstützen:

- The International FOP Association (IFOPA)
- The National Institutes of Health (The People of the United States of America)
- The Center for Research in FOP & Related Disorders
- The Cali Family Endowment for FOP Research
- The Weldon Family Endowment for FOP Research
- The Isaac and Rose Nassau Professorship of Orthopaedic Molecular Medicine
- The Allison Weiss Fellowships in Orthopaedic Molecular Medicine
- The Born-Lotke Zasloff Fellowship in Orthopaedic Molecular Medicine
- The Whitney Weldon – Stephen Roach Fellowship
- The Roemex Fellowship
- The Grampian Fellowship
- The Progressive Osseous Heteroplasia Association
- The Hartford Foundation
- The Medical Research Council and Oxford University (United Kingdom)
- The Association Française Contre Les Myopathies (France)
- Members of the FOP International Research Consortium
- Johnson & Johnson, Inc.
- Regeneron Pharmaceuticals
- The People of Santa Maria (11 years of extraordinary service)
- Und die vielen Personen, Familien und Freunde auf der ganzen Welt, die so großzügig und unermüdlich für die FOP-Arbeit spenden.

FOP ist auch weiterhin eine der menschlichen Krankheiten mit den meisten Hindernissen und den verzwicktesten Gegebenheiten. Wir haben oft gesagt, wenn sie so bekannt wäre wie Muskeldystrophie oder Krebs, würden Tausende von Wissenschaftlern und Labors auf der ganzen Welt daran arbeiten, das Rätsel um FOP zu lösen. Trotz ihrer Seltenheit glauben wir ehrlich daran, dass die FOP-Forschung nicht nur der Schlüssel zum Verstehen von FOP ist, sondern auch von vielen anderen bekannten Krankheiten, die mit dem Skelett zu tun haben. Sie ist grundsätzlich der Skelettschlüssel.

Wie immer vielen Dank für Ihre ständige großzügige und herzliche Unterstützung dieser grundlegenden Arbeit.