

**Leif Si-Hun Ludwig**

Jahrgang 1982. 2003–2008 Biochemiestudium (Diplom) an der FU Berlin. 2008–2016 Humanmedizinstudium an der Charité – Universitätsmedizin Berlin. 2011–2015 Promotion bei Prof. Dr. H. Lodish am Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA, und der

FU Berlin, gefördert durch die Studienstiftung des deutschen Volkes. Seit 2016 Postdoktorand am Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, und am Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA, USA.

Elisabeth-Gateff-Preis 2016 der GfG

Einfluss genetischer Varianten auf die humane Erythropoese

LEIF SI-HUN LUDWIG

BROAD INSTITUTE OF HARVARD AND MIT, CAMBRIDGE; BOSTON CHILDREN'S HOSPITAL, CENTER FOR LIFE SCIENCE, BOSTON, MA, USA

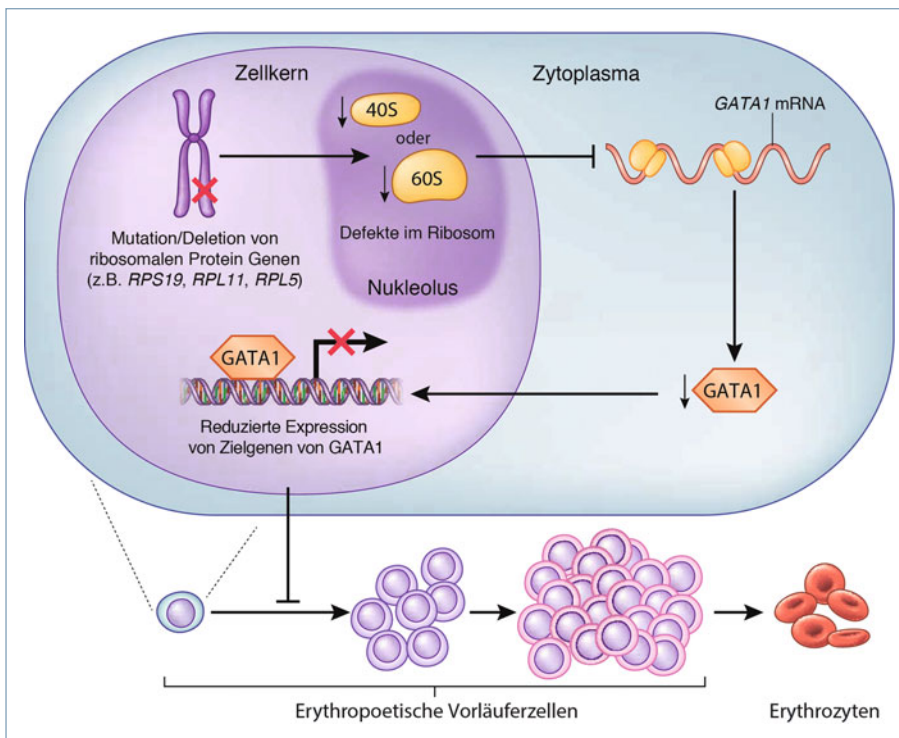
DOI: 10.1007/s12268-016-0755-3
© Springer-Verlag 2016

Die Entschlüsselung der vollständigen Sequenz der menschlichen Erbinformation im Rahmen des humanen Genomprojekts stellte einen Meilenstein für die Genetik und Medizin dar [1]. Mittlerweile kennen wir eine enorme Vielzahl an genetischen Varianten mit Einfluss auf die verschiedensten Merkmale des Menschen. So haben genomweite Assoziationsstudien bisher über 27.000 in der Bevölkerung weit verbreitete Polymorphismen identifiziert, die mit spezifischen huma-

nen Phänotypen bzw. Pathologien assoziiert werden [2]. Gleichermäßen hat die gezielte Sequenzierung der Protein-codierenden Sequenzen des Genoms (das Exom) zur Identifizierung einer Vielzahl von seltenen genetischen Varianten bei monogenetischen Erkrankungen geführt. Heute umfasst die Datenbank *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) über 23.000 Einträge und über 4.800 Phänotypen bzw. Syndrome mit bekannter molekularer Ursache [3]. In einer Vielzahl der Fälle sind bestimmte Varianten jedoch lediglich mit einem Phänotyp assoziiert und es fehlt ein detailliertes Verständnis

über die dem Phänotyp zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

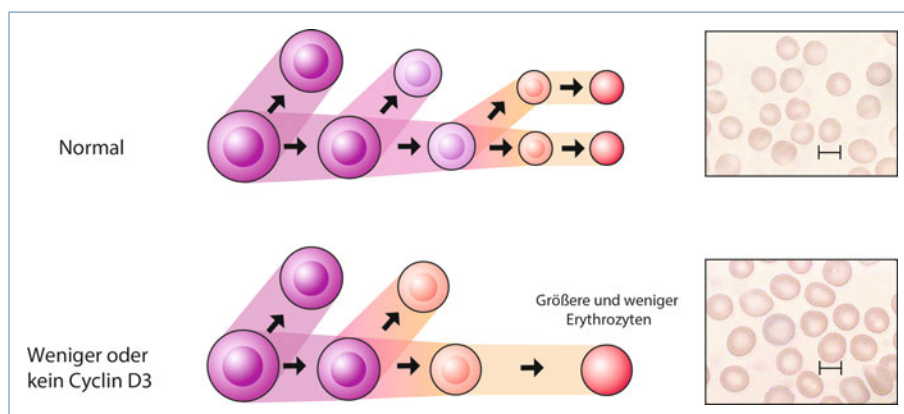
Im Rahmen meiner Arbeit habe ich den Einfluss von genetischen Varianten auf die Entwicklung von Erythrozyten funktionell untersucht. Ein Schwerpunkt lag dabei auf dem seltenen kongenitalen Syndrom Diamond-Blackfan Anämie (DBA), das mit einer Funktionsstörung des Ribosoms assoziiert ist [4]. Über 50 Prozent der Patienten weisen heterozygote Funktionsverlustmutationen in den Genen ribosomaler Proteine auf. Dieses führt zu einer sogenannten ribosomalen Haploinsuffizienz. Obwohl ribosomale Proteine, als fundamentale Bausteine des Ribosoms, ubiquitär exprimiert werden, manifestiert sich die Erkrankung in Patienten mit DBA vor allem in Form einer Anämie. Dieser zelltypspezifische Defekt stellte Kliniker und Wissenschaftler lange Zeit vor ein Rätsel. Zu Beginn meiner Arbeit wurde beschrieben, dass in seltenen Fällen bei DBA-Patienten Mutationen im Gen des für die Erythropoese essenziellen Transkriptionsfaktors GATA1 vorliegen [5]. Es blieb jedoch unklar, ob der Anämie in diesen Patienten, sowie in Patienten mit ribosomaler Haploinsuffizienz eine gemeinsame Pathophysiologie zugrunde liegt. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass DBA-Patienten mit Defekten in ribosomalen Proteinen eine beeinträchtigte Proteinsynthese des Transkriptionsfaktors GATA1 aufweisen. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass ribosomale Haploinsuffizienz die Translation von GATA1-mRNA beeinflusst und stellen somit eine Verbindung zwischen den beiden scheinbar ungleichen molekularen Läsionen her. Aufgrund der ribosomalen Haploinsuffizienz besitzt die Zelle eine reduzierte Anzahl funktioneller Ribosomen. Dieses resultiert in einem verringerten Translationsinitiationspotenzial, welches die effiziente Translation von GATA1-mRNA verhindert. Die scheinbar selektiv beeinträchtigte Translation konnte auf eine ausgeprägt strukturierte 5'-untrans-



▲ Abb. 1: Modell zur Rolle des Transkriptionsfaktors GATA1 in der Pathogenese der Diamond-Blackfan-Anämie. Mutationen oder Deletionen in ribosomalen Proteinen führen zu Defekten in der Biogenese von Ribosomen. Die Translation von GATA1-mRNA findet daraufhin nur eingeschränkt statt und es werden reduzierte Mengen GATA1-Protein gebildet. In der Folge kommt es zu einer globalen und spezifischen Reduktion der Expression von GATA1-Zielgenen und daraus resultierend zu Defekten in der Differenzierung von erythropoetischen Vorläuferzellen mit der Folge der Anämie. Abbildung modifiziert nach [7] mit Erlaubnis der Nature Publishing Group.

latierte Region zurückgeführt werden, welche die effiziente Translation der *GATA1*-mRNA verhindert. Eine Analyse des Transkriptom primärer Zellen von Patienten mit ribosomalen Mutationen zeigte eine signifikante Transkriptreduktion der *GATA1*-Zielgene und untermauert somit dessen Rolle in der Pathogenese der Anämie. Die ektopische Expression von *GATA1* in diesen Zellen führte entsprechend zu einer starken Verbesserung der zuvor beeinträchtigten Erythropoese. Diese Ergebnisse erlauben neue Einblicke in die Pathophysiologie von DBA (**Abb. 1**) und erklären erstmals nicht nur die Spezifität des Defekts, sondern bereiten auch den Weg für neue mögliche therapeutische Ansätze wie die Gentherapie mittels *GATA1* [6, 7].

Ein zweiter Schwerpunkt meiner Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Polymorphismen auf die Bildung von Erythrozyten. Genomweite Assoziationsstudien haben bisher 75 verschiedene Polymorphismen identifiziert, welche vor allem mit der Anzahl und Größe der Erythrozyten assoziiert wurden [8]. Wir haben einen Polymorphismus nahe dem Gen *Cyclin D3* (*CCND3*) funktionell genauer untersucht. In der Bevölkerung sind an der Position des Polymorphismus die beiden Allele Guanosen und Adenosin zu finden. Vereinfacht dargestellt haben Menschen mit einem Guanosen an dieser Position im Durchschnitt weniger und größere Erythrozyten. Personen mit einem Adenosin hingegen weisen mehr aber dafür kleinere Erythrozyten auf. Der entsprechende Polymorphismus konnte in der Bindungsstelle von erythropoetischen Transkriptionsfaktoren lokalisiert werden. Eine Untersuchung der Enhancer-Aktivität durch Reportergen-Analysen zeigte unterschiedliche Aktivitäten für die assoziierten Allele und deutete so auf variierende Mengen an *Cyclin D3*-Transkripten als Ursache für die Beeinflussung von Erythrozyten-Merkmalen hin. Da das Gen wesentlich an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt ist, erfolgte die Analyse von Zellzyklusparametern in erythropoetischen Vorläuferzellen nach Modulation der Level oder der Aktivität von *Cyclin D3*. Es zeigte sich,



▲ **Abb. 2:** Modell, wie die variable Produktion von *Cyclin D3* zur Produktion einer unterschiedlichen Anzahl an Erythrozyten mit variierender Größe führt. In der terminalen Erythropoese werden die Vorläuferzellen mit jeder Zellteilung physiologisch kleiner. In Abwesenheit ausreichender Mengen an *Cyclin D3* kommt es zu weniger Zellteilungen und es entstehen größere, aber dafür insgesamt weniger Erythrozyten. Rechts sind Blutausstriche von Wildtyp-Mäusen (oben) und Mäusen ohne *Cyclin D3* (unten) zu sehen, die im Einklang mit den genetischen Beobachtungen im Menschen weniger und sichtbar größere Erythrozyten produzieren. Abbildung modifiziert nach [9] mit Erlaubnis der Cold Spring Harbor Laboratory Press. Maßstab 5 μm .

dass geringere *Cyclin D3*-Level zu einem frühzeitigen Stopp des Zellzyklus führen, ohne die Differenzierung der Erythrozyten wesentlich zu beeinflussen. In der terminalen Erythropoese werden die Vorläuferzellen mit jeder Teilung physiologisch kleiner. Durch die reduzierte Produktion von *Cyclin D3* kam es aufgrund weniger Zellteilungen entsprechend zur Bildung von weniger, aber dafür deutlich größeren Erythrozyten (**Abb. 2**). Umgekehrt führten erhöhte Mengen *Cyclin D3* zu einer erhöhten Anzahl an kleineren Erythrozyten. Diese Daten erlaubten uns, die Wirkung eines Polymorphismus mit Einfluss auf die Anzahl und Größe der Erythrozyten mechanistisch zu beschreiben und erklären beispielhaft wie Polymorphismen die natürlich vorkommende Variation in Erythrozytenmerkmalen in der menschlichen Bevölkerung beeinflussen können [9]. ■

Literatur

- [1] Lander ES (2011) Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 470:187–197
- [2] Burdett T, Hall PN, Hastings E et al. (2016) The NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies. www.ebi.ac.uk/gwas

- [3] Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). <http://omim.org>
- [4] Vlachos A, Ball S, Dahl N et al. (2008) Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 142:859–876
- [5] Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R et al. (2012) Exome sequencing identifies *GATA1* mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 122:2439–2443
- [6] Ludwig LS, Gazda HT, Eng JC et al. (2014) Altered translation of *GATA1* in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 20:748–753
- [7] Boulwood J, Pellagatti A (2014) Reduced translation of *GATA1* in Diamond-Blackfan anemia. *Nat Med* 20:703–704
- [8] van der Harst P, Zhang W, Mateo Leach I et al. (2012) Seventy-five genetic loci influencing the human red blood cell. *Nature* 492:369–375
- [9] Sankaran VG, Ludwig LS, Sicinska E et al. (2012) *Cyclin D3* coordinates the cell cycle during differentiation to regulate erythrocyte size and number. *Genes Dev* 26:2075–2087

Korrespondenzadresse:

Dr. Leif Si-Hun Ludwig
Broad Institute of Harvard and MIT
415 Main Street
Cambridge, MA 02142, USA

Boston Children's Hospital
Center for Life Science
3 Blackfan Circle
Boston, MA 02115, USA

ludwig@broadinstitute.org