

Van gen naar ziekte; achondroplasie en andere skeletdysplasieën door een activerende mutatie in een receptor voor fibroblastgroeifactor

C.M.A.VAN RAVENSWAAIJ-ARTS EN M.LOSEKOOT

DE ZIEKTE

Achondroplasie wordt gekenmerkt door een extreme beperking in de lengtegroei ten gevolge van een verkorting van vooral de lange pijpbeenderen. Doordat de romp een geringere groeibeperking laat zien, is er een disproportionele groeistoornis. Daarnaast is er macrocefalie met een midfaciale hypoplasie, met als gevolg een prominierend voorhoofd met diepe neusbrug (figuur 1).

Sinds 1994 is bekend dat achondroplasie veroorzaakt wordt door een mutatie in *FGFR3*, het gen voor fibroblastgroeifactorreceptor 3 (FGFR3).^{1,2} Ook andere skeletaandoeningen, zoals hypochondroplasie en thanatofore dysplasie, worden veroorzaakt door mutaties in het *FGFR3*-gen. De plaats van de verandering in het gen bepaalt het uiteindelijke fenotype.

Hypochondroplasie heeft vergelijkbare, doch veel minder uitgesproken symptomen dan achondroplasie. Thanatofore dysplasie is een ernstige, vroeg neonatale, letale skeletaandoening met sterke verkorting van de ledematen, een zeer smalle thorax (met als gevolg ernstige longhypoplasie) en een relatief groot hoofd. Er worden twee typen thanatofore dysplasie onderscheiden: bij type I is er tevens verkromming van de lange pijpbeenderen (zie figuur 1), bij type II is er een ernstige craniosynostose (de zogenaamde klaverbladschedel).

HET GEN

Het *FGFR3*-gen is gelegen op de korte arm van chromosoom 4 (4p16.3).³ Het gen bestaat uit 19 exonen verdeeld over 16,5 kb genomisch DNA.⁴ Tijdens de embryonale ontwikkeling komt het *FGFR3*-gen vooral tot expressie in het mesenchym van de ledemaatsknoppen en de wervels, later in de groeischijven van de lange pijpbeenderen.⁵ Het ontbreken van één van beide genen, zoals bij een deletie van de korte arm van chromosoom 4, heeft geen skeletdysplasie tot gevolg. Uitschakeling van beide *FGFR3*-genen in de muis geeft zelfs botovergroei.⁶

HET EIWIT

Fibroblastgroeifactorreceptoren zijn tyrosinekinasereceptoren.³ Ze bestaan uit 3 extracellulair gelegen immunoglobulinedomeinen, een transmembraandomein en twee

intracellulaire tyrosinekinasedomeinen (figuur 2). Er bestaan vier verschillende fibroblastgroeifactorreceptoren, die met verschillende affiniteit fibroblastgroeifactoren aan zich binden. Aan fibroblastgroeifactorreceptor 3 binden van de 18 fibroblastgroeifactoren vooral typen 1, 2, 4, 8 en 9.⁷

DE CEL

De immunoglobulinedomeinen kunnen fibroblastgroeifactor aan zich binden, waarna zich een receptordimeer vormt van twee fibroblastgroeifactorreceptoren (zie figuur 2).³ Deze dimerisatie initieert een autofosforylatie van verschillende tyrosineresiduen in het intracellulaire deel van het eiwit. Hierdoor wordt de tyrosinekinaseactiviteit gestimuleerd, waarschijnlijk doordat de intracellulaire conformatie van de tyrosinekinasedomeinen dusdanig verandert dat ze goed toegankelijk worden voor ATP en substraten. Door de tyrosinekinaseactivatie wordt een signaalcascade in gang gezet.⁸ Fibroblastgroeifactorreceptor 3 lijkt de enchondrale ossificatie te reguleren, zodanig dat de celdeling van de chondrocyten wordt geremd en de celrijping en -differentiatie worden gestimuleerd.^{6,9}

De mutaties in het *FGFR3*-gen die verantwoordelijk zijn voor de skeletafwijkingen zijn zogenaamde 'gain of function'-mutaties.⁹ Ze leiden tot ligandafhankelijke receptoractivatie (in afwezigheid van groeifactoren wordt de receptor toch geactiveerd) of tot een overexpressie van de mutante receptor. Het gevolg is dat de pijpbeenderen een verstoorde lengtegroei laten zien door verminderde chondrocytenproliferatie, als gevolg van versnelde celrijping en -differentiatie. Plaats en type van de mutatie bepalen de mate van overactiviteit van fibroblastgroeifactorreceptor 3 en dus de ernst van de skeletaandoening (zie figuur 2).

Alle tot nu toe bij achondroplasie vastgestelde mutaties bevinden zich in hetzelfde nucleotide 1138.^{1,2,10} Meestal betreft het een verandering van G naar A, soms een verandering van G naar C. Beide mutaties hebben hetzelfde effect: substitutie van arginine door glycine op positie 380 in het transmembraandomein van het eiwit.

De mutatie leidt tot verhoogde activiteit van fibroblastgroeifactorreceptor 3 met als gevolg activatie van transcriptiefactoren en verhoogde expressie van de cyclusinhibitoren.^{11,12} Dit is waarschijnlijk het gevolg van het uitblijven van de zogenaamde receptorinternalisatie.¹³ Receptorinternalisatie vindt plaats door endocytose van de geactiveerde receptor en zorgt voor de 'down'-regulatie van de receptoractiviteit. De fibroblastgroeifactorreceptor met een mutatie in het transmembraandomein blijft te lang actief na ligandbinding en er treedt

Universitair Medisch Centrum St Radboud, afd. Antropogenetica, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Mw.dr.C.M.A.van Ravenswaaij-Arts, klinisch geneticus.

Leids Universitair Medisch Centrum, Klinisch-genetisch Centrum, afd. DNA-diagnostiek, Leiden.

Mw.dr.M.Losekoot, moleculair geneticus.

Correspondentieadres: mw.dr.C.M.A.van Ravenswaaij-Arts (c.vanravenswaaij@antrg.azn.nl).



FIGUUR 1. Skeletdysplasieën die worden veroorzaakt door mutaties in het *FGFR3*-gen ('FGFR' staat voor 'fibroblastgroeifactor-receptor'): (a) een 28 maanden oud meisje met achondroplasie: uitgesproken verkorting van de ledematen (totale lengte: 73 cm, dat is 14 cm < P₁₀; spanwijdte: 69 cm, dat is 12 cm < P₁₀; zithoogte: 50 cm, dat is 4 cm < P₁₀) bij een hoog-normale schedelomtrek (52 cm; P₉₀) (afgedrukt met schriftelijke toestemming van belanghebbende); (b) 'babygram' van een pasgeborene met thanatofore dysplasie type I; kenmerkend zijn de extreme verkorting van de ledematen en ribben en de sterke verkromming van de femura ("telephone receiver"-femur).

een stapeling van receptoren op in de celmembranen (zie figuur 2). De te hoge activiteit van transcriptiefactoren en celcyclusinhibitoren geeft een afname van de chondrocytenproliferatie in de groeischijven.

Opmerkelijk is de hoge mutatiefrequentie van nucleotide 1138 van het *FGFR3*-gen. Vrijwel alle achondroplasiepatiënten hebben een de-novomutatie; 97% heeft zelfs exact dezelfde mutatie. Eveneens bijzonder is de zeer sterke fenotype-genotypecorrelatie die bij mutaties in het *FGFR3*-gen bestaat (zie figuur 2).

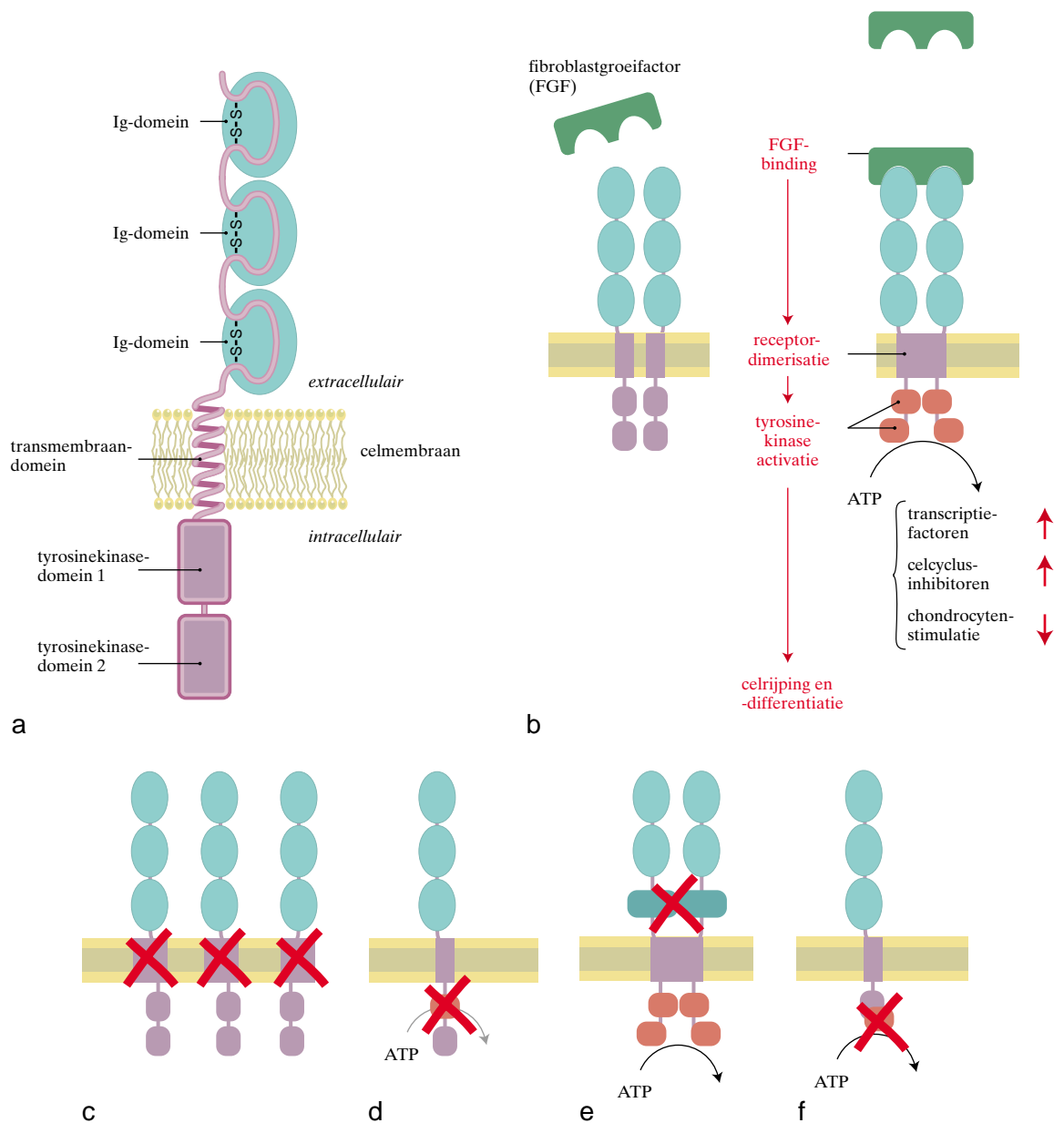
Bij de veel mildere aandoening hypochondroplasie worden alleen mutaties gevonden in codon 540, dat codeert voor asparagine in het tyrosinekinase-1-domein.¹⁴ Waarschijnlijk leidt dit tot een geringe, spontane tyrosinekinaseactiviteit.

Thanatofore dysplasie type I wordt meestal veroorzaakt door een omzetting van één van de aminozuren in het extracellulaire domein in een cysteïne.¹⁵ Cysteïne-residuen kunnen onderling zwavelbruggen vormen. De

extracellulaire cysteïneresiduen kunnen hierdoor spontane receptordimerisatie en -activatie veroorzaken. Bij thanatofore dysplasie type II wordt steeds dezelfde mutatie gevonden in het tyrosinekinase-2-domein (omzetting van lysine in glutamine op positie 650).¹⁶ Deze mutatie zorgt voor een dusdanige conformatieverandering van de tyrosinekinasedomeinen dat spontane activatie optreedt. Ook bij een aantal craniosynostosesyndromen worden *FGFR3*-mutaties gevonden.^{3,17}

DE POPULATIE

Achondroplasie is de frequentst voorkomende (1 op de 15.000 tot 40.000 levendgeborenen) en verreweg bekendste skeletdysplasie.¹⁸ De aandoening erft autosomaal dominant over, maar meer dan 90% van de casussen is het gevolg van een de-novomutatie. Dit komt niet alleen doordat personen met achondroplasie slechts zelden nakomelingen hebben, maar vooral ook door de hoge spontane mutatiefrequentie van het *FGFR3*-gen.



FIGUUR 2. Schematische weergave van de fibroblastgroeifactorreceptor 3 (FGFR3) met 3 extracellulaire immunoglobuline(Ig)-, 1 transmembraan- en 2 tyrosinekinasedomeinen (a), die wordt geactiveerd door fibroblastgroeifactor(FGF)-binding en receptordimerisatie (b). Effecten van de verschillende mutaties in het *FGFR3*-gen zijn: (c) de mutatie in het transmembraandomein bij achondroplasia zorgt voor een toename van het aantal receptoren ten gevolge van een verminderde internalisatie of 'down'-regulatie van receptoren; (d) de mutatie in het tyrosinekinase-1-domein bij hypochondroplasia geeft een zwakke spontane activatie van de receptor; (e) bij thanatofore dysplasie type I treedt spontane receptordimerisatie op door cysteinebruggen in het extracellulaire deel; (f) thanatofore dysplasie type II wordt veroorzaakt door een mutatie in het tyrosinekinase-2-domein, dat een sterk activerend effect heeft.

De de-novomutaties bevinden zich altijd in het paternale allel en de mutatiefrequentie neemt toe met de paternale leeftijd.¹⁹

DIAGNOSTIEK

Naast de eerder genoemde klinische kenmerken is er een aantal radiologische symptomen; het opvallendste

daarvan, behalve de verkorting van de lange pijpbeenderen, is het naar caudaal afnemen van de interpedunculaire afstand in de wervelkolom (dat wil zeggen toenemende vernauwing van het wervelkanaal). De diagnose 'achondroplasia' kan derhalve goed op grond van de biometrische, faciale en radiologische kenmerken gesteld worden. Omdat slechts één mutatie verantwoorde-

lijk is voor achondroplasie, is de moleculaire diagnostiek eenvoudig. Dit heeft uiteraard ook grote implicaties voor de prenatale diagnostiek. Personen met achondroplasie hebben immers een 50%-risico op aangedane kinderen en de diagnose is prenatiaal met behulp van DNA-diagnostiek eerder in de zwangerschap en met veel grotere betrouwbaarheid te stellen dan met ultrageluids-onderzoek mogelijk is.

Omdat bij hypochondroplasie de klinische verschijnselen minder uitgesproken zijn, is de moleculaire diagnostiek hierbij belangrijk voor het bevestigen van de diagnose.

Het behoeft geen betoog dat het bevestigen van de diagnose met DNA-onderzoek van de thanatofore dysplasieën van belang is voor het adviseren van de ouders. Omdat er hierbij altijd sprake is van nieuwe mutaties, is het herhalingsrisico laag. Toch wordt ook hierbij prenatiaal DNA-onderzoek aangeboden.

ABSTRACT

From gene to disease; achondroplasia and other skeletal dysplasias caused by an activating mutation of a fibroblast growth factor receptor. – Achondroplasia, the most common and best known skeletal dysplasia, is inherited in an autosomal dominant fashion. Like a number of other skeletal dysplasias, among which hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia, achondroplasia is caused by mutations in the fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) gene. *FGFR3* is a negative regulator of bone growth. Binding of fibroblast growth factors to the *FGFR3* receptor stimulates its tyrosine kinase activity in the cell. This activates a signal transduction pathway that regulates enchondral ossification by inhibition of cell division and stimulation of cell maturation and differentiation. Mutations in the *FGFR3* gene give rise to activation of the receptor in the absence of growth factors, thus causing abnormal long bone development. Position and type of mutation in the *FGFR3* gene determine the extent of overactivation and thus the severity of the skeletal abnormality.

LITERATUUR

- 1 Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, et al. Mutations in the transmembrane domain of *FGFR3* cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994;78:335-42.
- 2 Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, et al. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 1994;371:252-4.
- 3 Vajo Z, Francomano CA, Wilkin DJ. The molecular and genetic basis of fibroblast growth factor receptor 3 disorders: the achondroplasia family of skeletal dysplasias, Muenke craniosynostosis, and Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Endocr Rev* 2000; 21:23-39.
- 4 Perez-Castro AV, Wilson J, Altherr MR. Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 3 (*FGFR3*) gene and comparative sequence analysis with the mouse *Fgfr3* gene. *Genomics* 1997;41:10-6.
- 5 Peters K, Ornitz D, Werner S, Williams L. Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev Biol* 1993;155:423-30.
- 6 Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1996;12:390-7.
- 7 Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996;271:15292-7.

- 8 Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM. Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 1998;125:4977-88.
- 9 Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 1996;84:911-21.
- 10 Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M, et al. Achondroplasia is defined by recurrent G380R mutations of *FGFR3*. *Am J Hum Genet* 1995;56:368-73.
- 11 Webster MK, Donoghue DJ. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J* 1996;15:520-7.
- 12 Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, et al. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 4455-60.
- 13 Monsonego-Ornan E, Adar R, Feferman T, Segev O, Yayon A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol* 2000;20:516-22.
- 14 Deutz-Terlouw PP, Losekoot M, Aalfs CM, Hennekam RCM, Bakker E. Asn540Thr substitution in the fibroblast growth factor receptor 3 tyrosine kinase domain causing hypochondroplasia. *Hum Mutat* 1998;Suppl 1:S62-5.
- 15 Rousseau F, El Ghouzi V, Delezoide AL, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, et al. Missense *FGFR3* mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I (TD1). *Hum Mol Genet* 1996;5:509-12.
- 16 Webster MK, D'Avis PY, Robertson SC, Donoghue DJ. Profound ligand-independent kinase activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the activation loop mutation responsible for a lethal skeletal dysplasia, thanatophoric dysplasia type II. *Mol Cell Biol* 1996;16:4081-7.
- 17 Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertić AL, Alonso LG, Kitoh H. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat* 1999;14:115-25.
- 18 Stoll C, Dott B, Roth MP, Alembik Y. Birth prevalence rates of skeletal dysplasias. *Clin Genet* 1989;35:88-92.
- 19 Wilkin DJ, Szabo JK, Cameron R, Henderson S, Bellus GA, Mack ML, et al. Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet* 1998;63:711-6.

Aanvaard op 16 januari 2001

Bladvulling

Meesters in het mallengeren

Cochinchina. – *La Belgique médicale* bevat een berichtje over de kunsten, waarmede de Cochinchineezers zich aan de militairen dienst weten te onttrekken. Zekere planten, die zij gebruiken, verwekken temperatuursverhoging en polsversnelling. Door zich te krabben met vuile nagels verwekken de Annamieten huidaandoeningen, die er allerakeligst uitzien. Otorrhoe wordt nagemaakt met honing of plantensappen, otitis externa verwekt door scherpe vloeistoffen of wafjes met scherpe poeders of zalven in het oor te brengen, conjunctivitis door behandeling der oogen met koolpoeder, tabaksasch, zout, citroensap, wolmelk, zelfs met blennorrhagische etter. Door het inbrengen van bepaalde suppositoria, die bloeding en slijmafscheiding teweeg brengen, kunnen zij aan dysarterie doen gelooven, met krijt en gips een beslagen tong maken, door het toebrengen van brandwondjes sjankers simuleeren en orchitis door het scrotum in te wrijven met euphorbiumsap.

(Berichten Buitenland. *Ned Tijdschr Geneesk* 1901;45II:1216-7.)