

DIPLOMARBEIT

zum Erwerb des akademischen Grades der
DIPLOM-BIOLOGIN

Charakterisierung der Interaktion der Rezeptortyrosinkinase Ror2 mit dem Liganden Noggin

vorgelegt von

Annika Mahl

geb. am 09. 02. 1983 in Berlin

angefertigt in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. S. Mundlos am
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

1.Gutachter: Herr Prof. Dr. S. Mundlos

2.Gutachter: Herr Prof. Dr. W. Schuster

Berlin, 30. Januar 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Humane Handfehlbildungen	4
1.1.1	Brachydaktylie	4
1.2	Skelettbildung und -wachstum bei Wirbeltieren	5
1.3	Entwicklung der Extremitäten.....	7
1.4	Der Bmp-Signalweg (bone morphogenetic proteins).....	9
1.4.1	Extrazelluläre Bmp-Antagonisten	10
1.4.2	Der Bmp-Antagonist Noggin	11
1.5	Der Wnt-Signalweg (wingless related)	12
1.5.1	Die Wnt-Proteine.....	12
1.5.2	Die Wnt-Signaltransduktion.....	13
1.6	Die Rezeptortyrosinkinase Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor2). 15	
1.6.1	Der Ror2-Aufbau.....	15
1.6.2	Ror2 in der Skelettentwicklung.....	16
1.6.3	Die Ror2-Signaltransduktion.....	17
2	Ziel der Arbeit	20
3	Material	21
3.1	Geräte	21
3.2	Chemikalien	22
3.3	Puffer und Lösungen	22
3.4	Molekularbiologische Reaktionssysteme/ Kits	24
3.5	Kulturzellen.....	24
3.6	Bakterienstämme und Kulturmedien.....	25
3.7	Antikörper	25
3.8	Tiere	25
3.9	Primer	26
3.10	Enzyme.....	26
3.11	Längenstandards.....	27
3.12	Software	27
4	Methoden.....	28
4.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
4.1.1	DNA-Extraktion	28

4.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
4.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
4.1.4	Transformation.....	30
4.1.5	Animpfen von Über-Nacht-Kulturen.....	30
4.1.6	Präparation von Glycerin-Stocks.....	31
4.1.7	Isolation von Plasmid-DNA.....	31
4.1.8	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren.....	31
4.2	Zellbiologische Methoden.....	32
4.2.1	Auftauen der Zellen.....	32
4.2.2	Medienwechsel und Inkubation.....	32
4.2.3	Splitten der Zellen.....	32
4.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	33
4.2.5	Aussaat von Zellen.....	33
4.2.6	Transfektion von Zellen.....	34
4.2.7	Stimulation der Zellen.....	35
4.2.8	Einfrieren der Zellen.....	35
4.2.9	Immuncytochemie.....	35
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	36
4.3.1	Zellyse.....	36
4.3.2	Western-Blot-System.....	36
4.3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
4.3.2.2	Western-Blot.....	37
4.3.2.3	Protein-Detektion mittels Antikörper.....	38
4.3.2.4	Entwicklung.....	38
4.3.2.5	Strippen.....	39
4.3.3	Co-Immunopräzipitation (CoIP).....	39
4.3.4	Aufreinigung von rekombinantem rGBD-GFP.....	40
4.4	Histologische Methoden.....	41
4.4.1	Skelettpräparation von Neugeborenen.....	41
4.4.2	Anfertigung von Kryoschnitten.....	41
4.4.3	Histologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP.....	41
5	Ergebnisse.....	43
5.1	Biochemische Interaktionsanalyse von Ror2 und Noggin durch Co-Immunopräzipitation.....	43

5.1.1	Interaktion von Ror2 und Noggin – Kartierung der beteiligten Rezeptordomänen.....	43
5.1.2	Interaktion von Ror2 und Noggin – Noggin-Einfluss auf die Rezeptordimerisierung	46
5.1.3	Funktionelle Relevanz der Interaktion von Noggin und Ror2 – Einfluss Noggins auf die Ror2-Phosphorylierung	48
5.2	Genetische Interaktion von Ror2 und Noggin -Phänotypenanalyse	49
5.3	Methodenetablierung - Zytologische und histologische Färbungen mit rekombinatem rGBD-GFP	52
5.3.1	Aufreinigung des rekombinanten rGBD-GFP.....	53
5.3.2	Zytologische Färbung mit rekombinatem rGBD-GFP.....	55
5.3.3	Histologische Färbung mit rekombinatem rGBD-GFP.....	56
6	Diskussion	58
6.1	Ror2 und Noggin interagieren über die CRD-Domäne.....	58
6.2	Beeinflussung der Ror2-Dimerisierung durch Noggin	59
6.3	Ror2 wird nach Noggin-Stimulation phosphoryliert.....	60
6.4	Mögliche Auswirkungen der Interaktion von Ror2 und Noggin	62
6.5	Phänotypenanalyse – Ror2 und Noggin interagieren genetisch.....	63
6.6	Zytologische und histologische Färbungen mit rGBD-GFP	65
7	Abschließende Betrachtung und Ausblick	68
8	Verzeichnisse	70
8.1	Abkürzungsverzeichnis	70
8.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	73
8.3	Literaturverzeichnis.....	74
9	Danksagung	79
10	Selbständigkeitserklärung	80

1 Einleitung

1.1 Humane Handfehlbildungen

Angeborene Handfehlbildungen treten in ihrer Gesamtheit sehr häufig auf. Sie beruhen auf Missregulation der embryonalen Differenzierungsprozesse in der sich entwickelnden Extremität. Die fehlerhafte Regulation dieses Entwicklungsprozesses kann dabei sowohl auf Umwelteinflüsse, als auch auf Genmutationen zurückgeführt werden. Dabei führen die Mannigfaltigkeit der betroffenen Gene und das weit gefächerte Spektrum an phänotypischen Ausprägungen zur Klassifizierung verschiedenster Fehlbildungsarten. So unterscheidet man grob Polyactylien (zusätzliches Auftreten von Fingern oder Teilen davon), Ectrodactylien (Fehlen distaler Extremitätenstrukturen), Syndactylien (Fusion einzelner Finger mit oder ohne Knochenbeteiligung), Symphalangismus (Fehlen der Fingergelenke) und Brachydaktylien (Verkürzung oder Fehlen einzelner Fingerglieder) (Schwabe and Mundlos, 2004).

Die einzelnen Formen können dabei sowohl isoliert, als auch in Kombination miteinander oder im Zusammenhang mit Syndromen auftreten und unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

1.1.1 Brachydaktylie

Die Brachydaktylie (grischisch: *brachus* = kurz, *daktylus* = Finger) tritt in ihrer isolierten Form als autosomal dominant vererbare Fehlbildung auf. Anhand der ursächlichen Gene sowie der phänotypischen Manifestierungen wird sie weiter in die fünf Untergruppen A-E unterteilt.

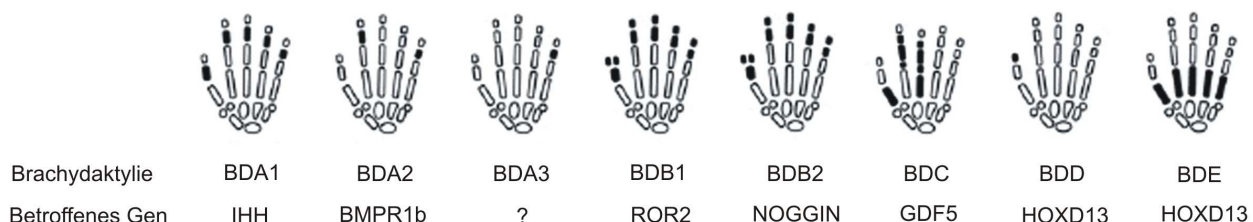


Abb.1: Brachydaktylie-Klassen und betroffene Gene

Schematische Darstellung der humanen Hand. Betroffene Skelettelemente sind schwarz markiert. Die den Phänotypen zugehörigen Brachydaktylie-Klassen A-E sowie die bisher identifizierten ursächlichen Gene stehen unter der entsprechenden Abbildung. Modifiziert nach (Schwabe and Mundlos, 2004) und (Lehmann et al., 2007)

Gekennzeichnet sind Brachydaktylien durch Hypoplasie (Verkürzung) oder Aplasie (Fehlen) einzelner Phalangen. Die dominante Brachydaktylie Typ B (BDB), auf der der Fokus dieser Arbeit liegt, weist charakteristischer Weise Hypo- oder Aplasien der distalen Phalangen, Nageldysplasien, Hypoplasien der mittleren Phalangen auf sowie distalen und proximalen Symphalangismus auf. Der Grad der Ausprägung einzelner Merkmale ist dabei variabel. Bisher konnten zwei Gene identifiziert werden, deren Mutationen neben anderen Skelettfehlbildungen auch zur Ausbildung einer BDB führen: ROR2 und NOGGIN (siehe Abschn. 1.6.2 (Lehmann et al., 2007; Schwabe et al., 2000)). Entsprechend des betroffenen Gens wird hierbei zwischen BDB1 (ROR2) und BDB2 (NOGGIN) unterschieden.

1.2 Skelettbildung und -wachstum bei Wirbeltieren

Das Skelett erfüllt im Körper vielfältige Aufgaben. Neben seiner Hauptfunktion als Stützapparat dient es als Ansatzstelle für Muskeln, als Calcium- und Phosphatspeicher sowie als Hormonquelle. Es wird eingeteilt in Kranialskelett (Schädel), Axialskelett (Wirbelsäule, Rippen und Brustbein) und appendikuläres Skelett (vordere und hintere Extremitäten, Schulter und Becken).

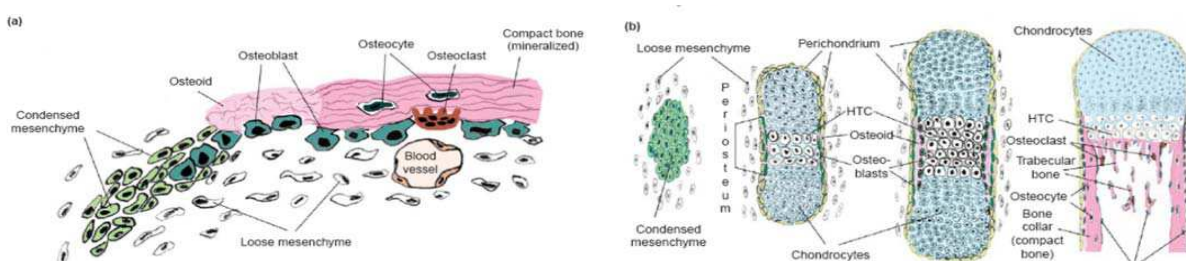


Abb. 2: (a) Desmale und (b) enchondrale Ossifikation

- (a) Bei der desmalen Ossifikation gehen die Osteoblasten durch Differenzierung direkt aus kondensiertem Mesenchym hervor. Sie produzieren eine nicht-mineralisierte Matrix, das Osteoid, das schließlich mineralisiert und zum Knochen wird. Die Osteoblasten differenzieren in der Knochenmatrix weiter zu Osteozyten
- (b) Bei der enchondralen Ossifikation gehen aus der mesenchymalen Kondensation Chondrozyten hervor. Initial entsteht eine vom Perichondrium (Knorpelhaut) umgebende Kondensation. Im deren Zentrum entstehen durch Differenzierung Chondrozyten, welche im distalen Knorpelbereich zunächst stark proliferieren um schließlich im Zentrum durch Differenzierung hypertroph zu werden. Im Periosteum, zwischen Perichondrium und hypertrophen Chondrozyten gelegen, treten erste Osteoblastenvorläufer auf, welche das Osteoid sezernieren. Im Zuge der Differenzierung (siehe Text) mineralisiert das Osteoid zu Knochen, in welchem die Osteoblasten zu Osteozyten differenzieren. Eingewanderte Osteoklasten stehen mit diesen im Gleichgewicht (Homeostasis) (Hartmann, 2006)

Dabei geht das Kranialskelett aus Neuralleistenzellen hervor, das axiale Skelett wird aus den Somiten und das appendikuläre Skelett aus dem Seitenplattenmesoderm gebildet.

Während der Entstehung des Skeletts werden im Zuge der Musterbildung zunächst die Anzahl und Form der Knochen festgelegt. Im Anschluss an diesen grundlegenden Vorgang findet die Organogenese statt, bei der die mesenchymalen Vorläuferzellen zu Chondrozyten differenzieren und schließlich durch Osteoblasten ersetzt werden. Neben dieser sog. enchondralen Ossifikation, bei der knöchernes Gewebe über eine knorpelige Vorstufe gebildet wird, können knochenbildende Osteoblasten aber auch direkt aus kondensierendem Mesenchym hervorgehen. Man spricht hierbei von der desmalen Ossifikation. Sie betrifft weitaus weniger Knochen, lediglich Teile des Gesichtsschädels, des Schädeldachs und das Schlüsselbein werden durch diese Art der Ossifikation gebildet. Der überwiegende Teil des Skeletts, vor allem die langen Röhrenknochen, unterliegt dem enchondralen Ossifikationsprozess (Hartmann, 2006).

Das Wachstum der Röhrenknochen findet an den Knochenenden, in den sog. Epiphysen- oder Wachstumsfugen statt. Hier findet zunächst eine erhöhte Proliferation statt, die schließlich in eine zunehmende Differenzierung der Chondrozyten übergeht. Entsprechend der Differenzierungsstufe unterscheidet man vier Bereiche: ruhende, proliferierende, prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten (Kornak and Mundlos, 2003) (Abb. 3). Der

Übergang zwischen diesen Zonen ist fließend und wird durch eine Vielzahl von Signalmolekülen gesteuert. Zu diesen zählt neben Vertretern der Bmp- (*bone morphogenetic protein*) und Fgf-Familien (*fibroblast growth factors*) auch Ihh (*Indian Hedgehog*). Dieses wird von Chondrozyten der prähypertrophen Zone exprimiert und regt in der Gelenkregion wiederum die Expression von PTHrP

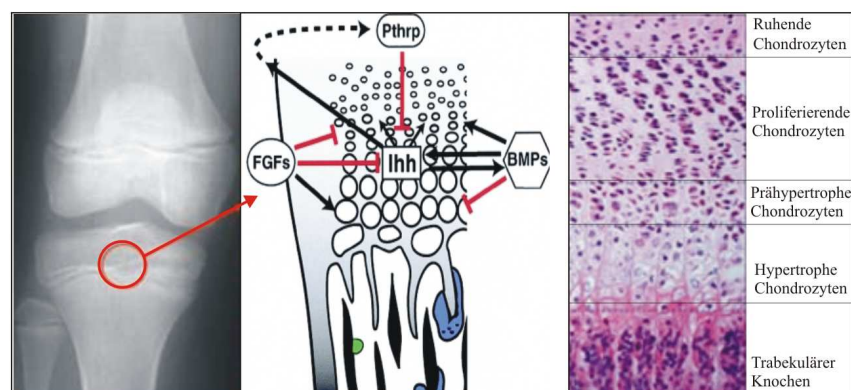


Abb 3: Zelldifferenzierung in der Wachstumsfuge eines Röhrenknochens
 Links: Röntgenaufnahme Articulatio cubiti. **Mitte:** Wachstumsfuge im Schema: Die prähypertrophen Chondrozyten exprimieren Ihh, welches über Pthrp-Expression die Differenzierung proliferierender Chondrozyten hemmt. Fgfs inhibieren die Proliferation und fördern die Differenzierung der Chondrozyten, wogegen Bmps antagonistisch wirken. Die Intensität der Schattierung symbolisiert den zunehmenden Grad der Matrixmineralisierung (Kornak and Mundlos, 2003) **Rechts:** Wachstumsfuge im histologischen Schnitt: Ihrer Differenzierung nach sind die Chondrozyten im wachsenden Knochen in vier Zonen angeordnet: ruhende, proliferierende, prähypertrophe und hypertrophe Chondrozyten. Die hypertrophen werden apoptotisch und durch Osteoblasten (Abb. Mitte, blau) und -klasten (Abb. Mitte, grün) ersetzt. Deutlich zu erkennen ist die Volumenzunahme der prä- und hypertrophen Chondrozyten und der Übergang zwischen den verschiedenen Zonen (www.EuroGrow.com).

(*Parathyroid hormone related protein*) an. PTHrP diffundiert in den Knorpel, bindet in der Epiphysenregion an seinen Rezeptor PTHR und hemmt durch dessen Aktivierung die Differenzierung der dort ansässigen Chondrozyten, erlaubt demnach den gegenläufigen Prozess der Proliferation. Im prähypertrophen und hypertrophen Bereich dagegen fehlt der hemmende Einfluss des PTHrPs, die Chondrozyten beginnen zu differenzieren und stellen somit die Proliferation ein (Abb. 3). Mit zunehmender Differenzierung lagern sich die an Volumen zunehmenden Chondrozyten in Stapeln an, produzieren Faktoren, die die Extrazellulärmatrix zersetzen sowie die Vaskularisierung einleiten und werden schließlich apoptotisch. Über das im Aufbau befindliche Vaskularsystem wandern Osteoblasten in die hypertrophe Knorpelzone ein und beginnen mit dem endgültigen Knochenaufbau. Zusätzlich zu den Osteoblasten wandern auch Osteoklasten ein, die die Knochenmatrix zersetzen können. Nur das dynamische Gleichgewicht aus Osteoklasten- und -blastenaktivität, welches als Homeostasis bezeichnet wird, ermöglicht die Anpassung der Knochen an spezifische Belastungen wie Zug und Druck (Lanske et al., 1996; Mundlos, 2000; Vortkamp et al., 1996)

1.3 Entwicklung der Extremitäten

Innerhalb der Tetrapoden sind die grundlegenden Mechanismen der Extremitätenentwicklung konserviert. Während die zunächst sichtbare Extremitätenknospe auf verdickte, stark proliferierende und von Ektoderm umhüllte mesenchymale Zellen des Seitenplattenmesoderms zurückgeht, aus denen schließlich Knorpel und Sehnen hervorgehen, wandern in der weiteren Entwicklung zusätzlich Zellen aus benachbarten Somiten in die auswachsende Extremität ein und bilden die Grundlage der Muskeln, Nerven und Blutgefäße (Johnson and Tabin, 1997).

Die ektodermale Schicht, die die Extremitätenknospe umgibt, bildet an deren distalen Ende eine epitheliale Struktur, die AER (*apical ectodermal ridge*). Die Zellen, die sich direkt unter der AER in der Progresszone (PZ) befinden, werden in einem proliferierenden Zustand gehalten, während am proximalen Ende der Extremität zunehmende Kondensationen und Differenzierungsprozesse zur Bildung von spezifischen Strukturanlagen führen.

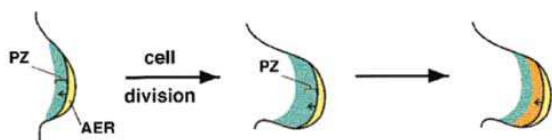


Abb. 4: Entwicklung der proximo-distalen Achse (PD)
Die Progresszone (PZ) befindet sich unterhalb der AER, unter deren Einfluss die Zellen der PZ in der Proliferation gehalten werden. Am proximalen Ende außerhalb der PZ differenzieren die Zellen zu Strukturanlagen, wodurch das proximo-distale Wachstum stattfindet. (Johnson and Tabin, 1997)

Die weitere Entwicklung der Gliedmaßen ist vor allem darauf abgestimmt, das Wachstum entlang der drei Hauptachsen zu steuern. Unterschieden wird hierbei die proximo-distale Achse (PD, Schulter-Finger) von der anterior-posterioren (AP, Daumen-kleiner Finger) und von der dorso-ventralen Achse (DV, Handrücken-Handfläche).

Für jede dieser Achsen gibt es Signalzentren in der Extremitätenknospe, die durch Regel- und Kopplungsmechanismen eng miteinander verzahnt sind. Die bereits angesprochene AER im distalen Ektoderm reguliert dabei das Wachstum der PD-Achse, ein Zusammenspiel aus dorsalem und ventralem Ektoderm charakterisiert die DV-Achse und Signale der ZPA (*zone of polarizing activity*) aus dem posterioren Mesoderm legen schließlich die AP-Achse fest. Die Signalzentren agieren jedoch nicht isoliert voneinander, sie sind über mehrere Signalkaskaden miteinander gekoppelt und aufeinander abgestimmt. So sind die Vertreter der Fgf-Familie die kennzeichnenden Signalmoleküle der AER und damit mitverantwortlich für das Wachstum entlang der PD-Achse. Zusätzlich wird, wie bereits ausgeführt, das Auswachsen entlang der PD-Achse im Zuge der Chondrogenese auch von Ihh reguliert (siehe Abschn. 1.2 und Abb. 3 (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996)).

Neben Ihh beeinflusst ein weiteres Protein der Hedehog-Familie, das zeitlich bereits früher in der ZPA exprimierte Shh (Sonic hedgehog), das proximo-distale Wachstum. Diese Beeinflussung ist zurückzuführen auf einen Rückkopplungsmechanismus zwischen dem Shh und Fgf4 aus der AER. Doch Shh reguliert die Extremitätengestaltung auch direkt, indem es entlang der AP-Achse als typisches Morphogen wirkt. Dabei bilden die Zellen, die der höchsten Shh-Konzentration ausgesetzt sind die posterioren, die mit der niedrigsten Konzentration die am weitesten anterior liegenden Strukturen aus (Zhu et al., 2008). Die dorso-ventrale Achse wird geprägt durch die ventrale Expression von En1 (Engrailed-1). Dieses hemmt die dortige Wnt7a- und Lmx1-Expression, es

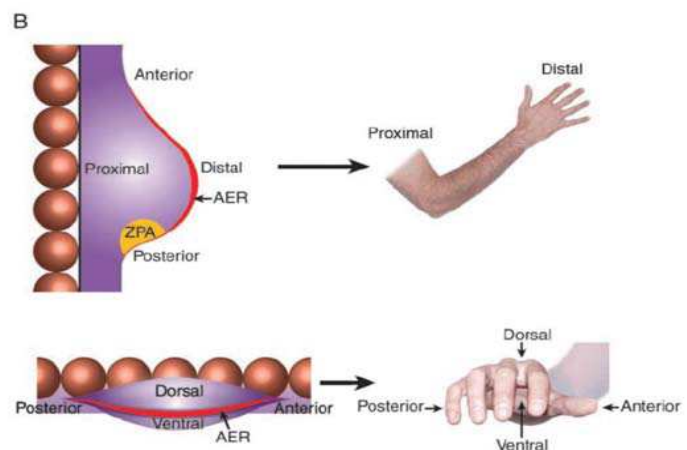


Abb. 5: Übersicht über die Entstehung der Hauptachsen einer Extremität.

Die Extremitätenknospe geht aus dem Seitenplattenmesoderm hervor, die AER befindet sich am distalen Ende, die ZPA im posterioren Bereich und trennt ventrales von dorsalem Ektoderm. Die violette Schattierung gibt die Tbx5-Expression wieder, Somiten sind als orangene Kugeln dargestellt (nach Logan, 2003))

entsteht ein von dorsal nach ventral abnehmender Gradient, so dass nur im dorsalen Bereich die von diesen Faktoren beeinflussten Strukturen ausgebildet werden (Loomis et al., 1996; Parr and McMahon, 1995). Zusätzlich wird durch die ventrale En1-Expression die r-fng (*radical fringe*) Aktivität auf das dorsale Ektoderm begrenzt und so u.a. die AER positioniert (Johnson and Tabin, 1997).

Zur finalen Ausbildung und Gestaltung der Gliedmaßen bilden sich mehrere Zonen mit erhöhter apoptotischer Aktivität aus, so dass die Extremität zum einen vom restlichen Körper getrennt wird und zum anderen die Finger voneinander gelöst werden (Grotewold and Ruther, 2002).

Da es in dieser Arbeit um die Interaktion eines Wnt-Rezeptors mit einem Bmp-Anatagonisten geht, wird im Folgenden genauer auf den Wnt-und Bmp-Signalweg, sowie deren Rezeptoren eingegangen.

1.4 Der Bmp-Signalweg (*bone morphogenetic proteins*)

Die Mitglieder der Bmp-Familie, eine Untergruppe der TGF β -Superfamilie (*transforming growth factors*), zu der auch die GDFs (*growth differentiation factors*) gehören, beeinflussen während der embryonalen Entwicklung der Extremitäten vielfältige Prozesse, wie z.B. die Etablierung der Fingerzahl- und -identität, Gelenkentwicklung und interdigitale Apoptose.

Die Bmps binden an Komplexe der Bmp-Rezeptoren des Typs 1 (ALK2, ALK3, ALK6) und des Typs 2 (BMPRII, ActRIIA, ActRIIB) und induzieren damit eine Trans-Phosphorylierung des Typ1-Rezeptors durch den Typ2-Rezeptor. Dieser Aktivierung folgt eine Signaltransduktionskette über Smad-Transkriptionsfaktoren oder den MAPK-Pathway (Wu et al., 2007). Reguliert wird der Bmp-Signalweg über diverse Proteine. Hierbei unterscheidet man extrazelluläre Antagonisten (Noggin, Chordin, u.a siehe Abschnitt 1.4.1.) von intrazellulären Proteinen (Ski, Smurf u.a.) und Pseudorezeptoren (Bambi, u.a.).

Auf Grund der Komplexität des Bmp-Signalwegs resultieren Störungen oder Mutationen beteiligter Komponenten (Liganden, Rezeptoren, Antagonisten, Transduktionskomponenten) in diversen Phänotypen. So verursacht zum einen eine Mutation im Rezeptor BMPRIIB die Fehlbildung BDA2 (Brachydaktylie Typ A2) (Lehmann et al., 2006), eine Mutation im Bmp-Antagonisten Noggin zum anderen im Erscheinungsbild der BDB2 (Brachydaktylie Typ B2) (Lehmann et al., 2007; Lehmann et al., 2003).

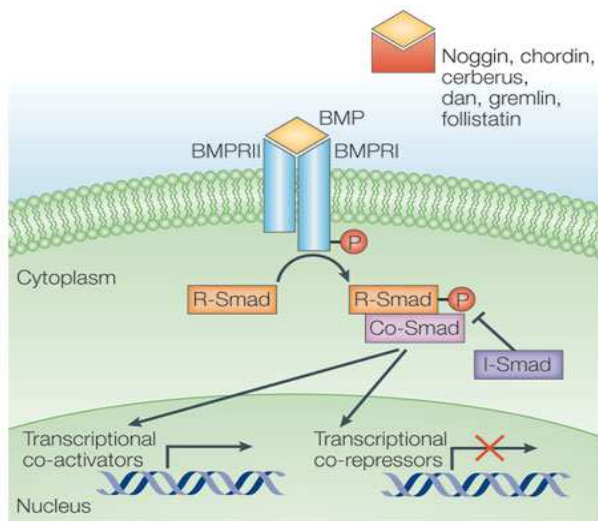


Abb. 6: Bmp-Signalweg über Smads

Die Bindung von Bmps an den heterodimeren Rezeptorkomplex führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von BMPRI durch BMPRII. Dadurch wird die Signaltransduktion via Smads induziert, die in den Nucleus gelangen und dort die Genexpression steuern, indem sie mit Transkriptionsaktivatoren und –repressoren interagieren. Reguliert wird der Signalweg zum einen über extrazelluläre Antagonisten wie Noggin, Chordin u.a., die die Bindung der Bmps an die Rezeptor verhindern, zum anderen über intrazelluläre Mediatoren (z.B. I-Smad), die hemmend in die Smad-Signalkette eingreifen. (Liu and Niswander, 2005)

1.4.1 Extrazelluläre Bmp-Antagonisten

Die sezernierten Bmp-Antagonisten hemmen die Bmp-Signaltransduktion, indem sie direkt mit den Bmps interagieren und so deren Bindung an die Rezeptoren verhindern. Strukturell zeichnen sie sich durch das Vorkommen einer konservierten Proteinstruktur, dem sog. Cysteinknoten, aus, die eine Zuordnung zur *Cystein-knot-superfamily* erlaubt. Anhand der Größe dieser Struktur werden die Antagonisten in drei Familien eingeteilt (Avsian-Kretchmer and Hsueh, 2004).

Zunächst die DAN-Familie (*Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma*), zu der neben Dan auch Cerebrus, Coco, PRDC, Gremlin, Sclerostin und USAG-1 gehören. Diese Proteine hemmen über Interaktion mit Bmps die durch Rezeptoraktivierung induzierte ALP-Aktivität (*Alkaline phosphatase*), interagieren aber auch mit dem Wnt-Signalweg (Piccolo et al., 1999) und beeinflussen in frühen Embryonalstadien die Gastrulation und die Ausbildung der AER in den Extremitätenknospen (Khokha et al., 2003). Daneben existiert der Antagonist TSG (*twisted gastrulation*), der gemeinsam mit Chordin über eine Metalloprotease einen Komplex mit Bmps aufbaut und diese so von ihrer Bindung an die Rezeptoren abhält. In anderem Kontext kann TSG aber auch aktivierend auf Bmp-Signale einwirken (Graf et al., 2002; Nosaka et al., 2003). Die dritte Gruppe wird aus Noggin und Chordin gebildet. Diese binden mit hoher Affinität an Bmp2 und -4 und verhindern so die Interaktion mit ihren Rezeptoren. Die Chordinaktivität wird dabei über eine Metalloprotease und TSG (s.o.) gesteuert. Doppel-Knockout (KO) Mäuse für Noggin und

Chordin weisen schwere Missbildungen im Kopf- und Gesichtsbereich sowie eine gestörte DV-Achse auf (Bachiller et al., 2003).

1.4.2 Der Bmp-Antagonist Noggin

Beim sezernierten Antagonisten Noggin handelt es sich um einen 32kDa großes, homodimeres Glykoprotein, welches zunächst durch seine Eigenschaft auffiel, den ventralisierenden Effekt von UV-Licht auf *Xenopus*-Embryonen auszugleichen (Smith and Harland, 1992). Bereits frühe Untersuchungen ergaben, dass Noggin im Tierreich mehrfach in konservierter Form auftritt. So konnte das Noggin codierende Gen im murinen Organismus auf Chromosom 11 und im humanen Organismus an Position 17q22 lokalisiert werden. Zudem wurde festgestellt, dass Noggin in mehrfacher Weise Einfluss auf die Entwicklung des embryonalen, aber auch des adulten Organismus nimmt: Neben der angesprochenen dorsalisierenden Wirkung in *Xenopus* spielt Noggin in Vertebraten eine wichtige Rolle in der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Nervensystems, wobei besonders hohe Nogginaktivität in den Purkinje-Zellen des Cerebellums und in der Region des Bulbus olfactorius festgestellt werden konnte (Valenzuela et al., 1995). In Bezug auf die Entwicklung von Extremitäten zeichnet sich Noggin vor allem durch seine inhibitorische Wirkung auf den Bmp-Signalweg aus. Es bindet mit verschiedenen starken Affinitäten an Bmp4, -5, -7, -2 und -6, sowie an GDF5 und -6 (Devlin et al., 2003; Zimmerman et al., 1996) und verhindert somit deren Bindung an ihre Rezeptoren. Dadurch hemmt Noggin u.a. die Induzierung der Chondrogenese durch Mitglieder der TGF β -Familie (Groppe et al., 2002) und fördert über diese Hemmung u.a. die Induktion von Gelenken (Brunet et al., 1998).

Mäuse mit Noggin-Überexpression in den Osteoblasten weisen eine erhöhte Rate an Osteopenie, d.h. eine verminderte Knochendichte auf. Damit einher gehen die Reduktion der

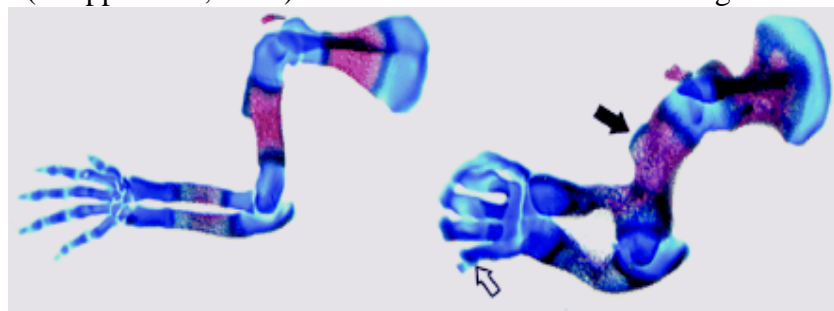


Abb. 7: Skelettfehlbildung in Noggin-defizienten Mäusen

Skelettpräparation der Vorderextremität von 18,5 dpc Embryonen; links: WT, rechts: Mutante; blau = Knorpel, rot = Knochen; Auffällig ist die verstärkte Knorpelbildung im Mutanten und das Fehlen vom Gelenk zwischen Radius und Humerus (schwarzer Pfeil) und zusätzlichen Knorpelbildungen (weißer Pfeil) im Handbereich (nach (Brunet et al., 1998))

Osteoblastendifferenzierung und ein mit dem Alter zunehmender Schwund an trabekulärer Knochenorganisation (Devlin et al., 2003).

Der Einfluss von Noggin auf die Ausbildung korrekter Handstrukturen wird bei Betrachtung homozygoter muriner Nog-KO Phänotypen besonders deutlich (Abb. 7): Die Chondrogenese ist drastisch erhöht, die Gliedmaßen insgesamt kürzer, aber entlang der AP-Achse breiter, zudem treten Gelenkfusionen im Bereich des Ellenbogens auf, es fehlen Gelenke in den Fingern und teilweise sind zusätzliche Knorpelsporne ausgebildet (Brunet et al., 1998). Während die phänotypischen Ausprägungen der Noggin-Mutanten im Mausorganismus jedoch erst im homozygoten Zustand in Erscheinung treten, schlägt sich beim Menschen bereits der heterozygote Zustand in Fehlbildungen des Skeletts nieder. Je nach NOGGIN-Mutation kann es dabei zum proximalen Symphalangismus, zum multiplen Synoytosis Syndrom, zum Teunissen-Cremers Syndrom und auch zur Brachydaktyly B2 kommen. Charakterisiert werden diese Krankheiten durch Fusionen oder Fehlbildungen der Gelenke, Finger-, bzw. Zehenglieder und Nägel. Diese können unterschiedlich stark ausgeprägt sein und reichen von Aplasien über Hypoplasien zu verschiedenen Formen des Symphalangismus und zu Synostosen. Diese auffälligen Dysplasien werden teilweise von einer auf Verwachsungen der Hörknochen zurückzuführenden Schwerhörigkeit begleitet (Hirshoren et al., 2008; Lehmann et al., 2007; T Takahashi, 2001).

1.5 Der Wnt-Signalweg (*wingless related*)

1.5.1 Die Wnt-Proteine

Die Mitglieder der Wnt-Familie finden sich in konservierter Form im gesamten Tierreich. Es handelt sich dabei um sezernierte Faktoren, die eine essentielle Rolle bei Induktion und Musterbildung von Extremitäten spielen. Sie induzieren die Extremitätenknospenbildung (Ng et al., 2002) und sind wichtige Komponenten der Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen in Chondrozyten und Osteoblasten. Zudem regulieren sie die Bildung und Aufrechterhaltung von Gelenken (Hartmann and Tabin, 2001). Die differentielle Expression von Wnt7a und anderen Faktoren beeinflusst die Ausbildung der DV-Achse und positioniert indirekt die AER (Loomis et al., 1996; McMahon et al., 2003).

Ursprünglich wurden die Wnt-Liganden in kanonisch und nicht-kanonisch eingeteilt. Dies geschah nach ihrer transformierenden Eigenschaft in Brustepithelzellen und ihrer Fähigkeit in Xenopus-Embryonen eine zweite Achse zu induzieren (McMahon and Moon, 1989; Wong et al., 1994). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Wnts je nach Gewebe und

interagierendem Partner verschiedene Wirkungen haben können. Daher sollten die Wnts als Liganden nicht mehr in kanonisch, bzw. nicht-kanonisch unterschieden werden, sondern die durch sie in einem bestimmten Kontext induzierten Signalwege. Dabei würden unter *kanonisch* alle β -Catenin-vermittelten Signalwege, unter *nicht kanonisch* alle β -Catenin-unabhängig verlaufenden Signaltransduktionen fallen.

1.5.2 Die Wnt-Signaltransduktion

Um die Diversität von Wnt-Signalen zu erreichen, existieren mehrere Wnt-Rezeptoren, die teils alleine, teils als Co-Rezeptoren agieren. Charakteristisch für die Klasse der transmembranständigen Frizzled-Rezeptoren (Fzd) ist die extrazelluläre CRD-Domäne (*cystein rich domain*), die sich aus einer konservierten Abfolge von zehn Cystein-Resten zusammensetzt. Diese Domäne ist essentiell für die Bindung der Wnt-Liganden und findet sich auch in alternativen Wnt-Rezeptoren, z.B. der Rezeptortyrosinkinase Ror2 (*Receptor tyrosin kinas-like orphan receptor 2*) (Hikasa et al., 2002) wieder. Neben den Fzd-Rezeptoren fungieren die

beiden in Vertebraten bekannten Vertreter der Lrp-Familie (*low density lipoprotein*) Lrp5 und Lrp6 als wichtigste Co-Rezeptoren für die Signaltransduktion über den kanonischen Wnt-Signalweg (Masiakowski and Carroll, 1992; Mikels and Nusse, 2006).

Die durch die Wnt-Bindung verursachte Aktivierung der Rezeptoren zieht die Induktion intrazellulärer Signalwege nach sich. Hierbei unterscheidet man zwischen dem kanonischen, β -Catenin gekoppelten, Weg und den nicht-kanonischen, d.h. β -Catenin unabhängigen Signalwegen. Dabei sollte beachtet werden, dass es durchaus zur Überkreuzung und

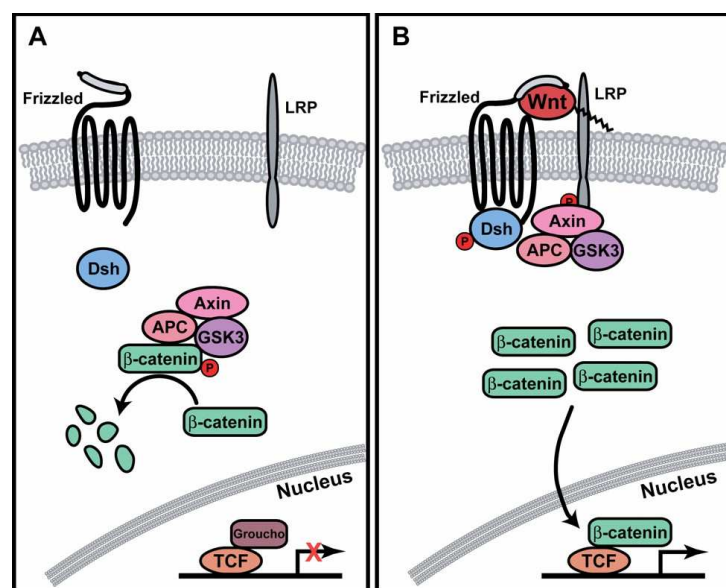


Abb. 8: Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs

- (A) Zustand ohne Wnt-Stimulus: β -Catenin wird über den Abbaukomplex APC/Axin/GSK3 phosphoryliert und schließlich proteasomal degradiert
- (B) Wnt-Stimulus führt zur Rekrutierung von Axin an die Membran, β -Catenin wird cytosolisch stabilisiert und wirkt nach Translokation in den Nucleus über die Entfernung des Suppressors Groucho als Effektorprotein für die Expressionsinduktion von TCF-Zielgenen (nach(Gordon and Nusse, 2006)

gegenseitigen Einflussnahme der verschiedenen Wege kommen kann und diese nicht statisch ablaufen (Miller, 2001).

Neben der Verknüpfung des kanonischen und der nicht-kanonischen Signalwege über die Rezeptorinteraktion und das Auftreten gemeinsamer zentraler Komponenten wird eine weitere Regulierung durch das Einwirken von Antagonisten und Adaptermolekülen auf die Wnt-Liganden und -Rezeptoren erreicht. Zum einen existieren sezernierte Antagonisten, wie z.B. Sfrp (*secreted frizzled-related proteins*), die direkt mit den Wnt-Liganden interagieren und damit kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg gleichermaßen hemmen (Kawano and Kypta, 2003), zum anderen treten z.B. Mitglieder der Dkk-Familie (Dikkopf) bevorzugt mit Lrp-Rezeptoren in Interaktion und unterdrücken somit verstärkt den kanonischen Signalweg, indem sie die Interaktion der Fzd-Rezeptoren mit ihren Co-Rezeptoren verhindern (Chen et al., 2008). Erst das Zusammenspiel von Rezeptorkontext, Liganden, Antagonisten und Adaptoren entscheidet letztlich über die Signalantwort.

Die am besten beschriebene Wnt-Signalkaskade ist die des kanonischen Wnt/ β -Catenin Wegs. Ohne Stimulus wird das im Cytosol lokalisierte β -Catenin im Komplex mit Axin durch die Kinasen CK1 und GSK3 phosphoryliert, damit für die Ubiquitin-Ligase β -Trcp markiert und über das Proteasom abgebaut. Das β -Catenin-Level wird dadurch niedrig gehalten. Unter Wnt-Stimulus dagegen bindet der Wnt-Ligand an Fzd- und Lrp-Rezeptoren. Diese Komplexbildung führt intrazellulär über Phosphorylierung von Lrp6 und Rekrutierung von Axin und Dvl an die Membran zur Inhibition des β -Catenin-Abbaukomplexes und damit zur Stabilisierung und Anreicherung von β -Catenin im Cytoplasma. Dies resultiert schließlich in einer Translokalisierung in den Nukleus, wo β -Catenin als Effektorprotein agiert und zusammen mit Tcf/Lef Faktoren die Expression entsprechender Zielgene induziert (Cadigan, 2008; Clevers, 2006). Besonders die Polarität und Migration von Zellen wird dagegen über die bisher schlechter verstandenen Varianten des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs reguliert. Der PCP-Weg (*planar cell polarity*) reguliert in Vertebraten u.a. die gerichtete Zellebewegung bei der Gastrulation (*convergent extension*) (Wallingford et al., 2002). Die Wnt-Liganden binden hierbei nur an die Fzd-Rezeptoren und aktivieren über Dvl und kleine GTPasen (Rac, Rho) die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) (McEwen and Peifer, 2000; Semenov et al., 2007). Beim Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg wird über G-Protein-Vermittlung eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels erreicht, wodurch u.a. Proteinkinasen aktiviert werden (Kühl et al., 2000; Yamamoto et al., 2007).

1.6 Die Rezeptortyrosinkinase Ror2 (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor2*)

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehören zu den transmembranen Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen. Typischerweise besteht eine RTK aus einem ligandenbindenden extrazellulären Teil und einem intrazellulärem Abschnitt, dem enzymatische Aufgaben zufallen. In der Regel führt die Bindung eines Liganden am extrazellulären Bereich des Rezeptors zu einer Dimerisierung desselben und schließlich zu einer Autophosphorylierung durch die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne (Schlessinger, 2000). Durch die Konformationsänderung werden Bindungsstellen für intrazelluläre Signalmoleküle frei, die das Signal ins Innere der Zelle weiterleiten (Pawson and Schlessinger, 1993). Ror2 wurde 1992 das erste Mal beschrieben und gemeinsam mit Ror1 auf Grund von Aminosäurevergleichen mit anderen RTKs einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet (Masiakowski and Carroll, 1992).

1.6.1 Der Ror2-Aufbau

Ror2 entspricht in seinem modularen Aufbau dem Schema einer RTK. Innerhalb der Vertebraten zeigt sich ein konservierter Aufbau: Extrazellulär findet sich am N-terminalen Ende eine Immunglobulin-artige Domäne (IG), gefolgt von der bereits angesprochenen cysteinreichen Domäne (CRD) und der membrannahen Kringle Domäne (KR). Der Durchtritt durch die Zellmembran

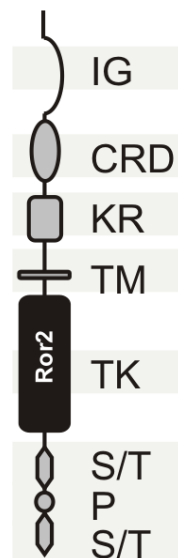


Abb. 9:

Modularer Ror2-Aufbau

Extrazellulär ist Ror2 durch die Immunglobulinartige- (IG), die Cysteinreiche- (CRD) und die Kringle-Domäne (KR) gekennzeichnet. Diese Bereiche dienen vorrangig der Ligandenbindung. Im Anschluss an die Transmembrandomäne (TM) findet sich intrazellulär membranproximal die Tyrosinkinasedomäne (TK), gefolgt von zwei Serin/Threoninreichen (S/T) Domänen, die eine Prolin-reiche (P) Domäne flankieren.

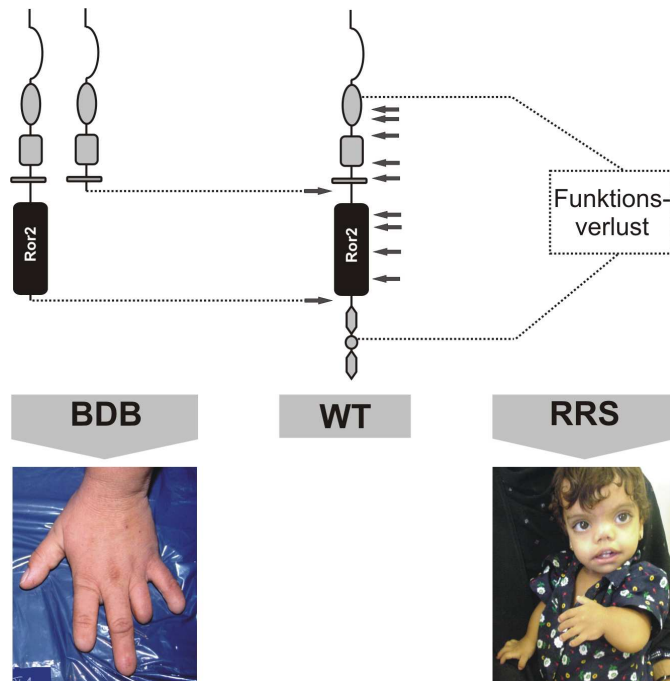
erfolgt im Bereich der Transmembrandomäne (TM). Der intrazelluläre Teil besteht aus der Tyrosinkinase-Domäne (TK) und zwei Serin/Threonin-reichen Abschnitten (S/T), welche eine Prolin-reiche Domäne (P) flankieren. Die IG-Domäne von Ror2 ähnelt der von Fgf-Rezeptoren, die CRD-Domäne zeigt Übereinstimmungen mit der Wnt-bindenden CRD-Domäne der Fzd-Rezeptoren und wurde bereits mit der Bindung von Wnt-Liganden in Zusammenhang gebracht (Hikasa et al., 2002). Beide Domänen vermitteln die Protein-Protein-Interaktionen bei der Bindung von Liganden und der Komplexbildung bei Rezeptorinteraktionen (Masiakowski and Carroll, 1992; Oishi et al., 2003). Kennzeichnend

für die Ror-Proteinfamilie, welche aus Ror1 und Ror2 besteht, sind die intrazellulären S/T- und P-Domänen und die für RTKs ungewöhnliche KR-Domäne. Ror-Orthologe wurden in mehreren Tierarten identifiziert, wobei Vertreter der Mammalia, sowie *Xenopus* zwei paraloge Gene (Ror1 und Ror2) aufwiesen, während sich in *C.elegans* und *Drosophila* nur eines findet (Sossin, 2006).

1.6.2 Ror2 in der Skelettentwicklung

Dass Ror2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Skeletts spielt, wird bei Betrachtung der resultierenden Phänotypen von Ror2-Mutanten sowohl am Mausmodell, als auch am Menschen deutlich. Ror2-defiziente Mäuse zeigen diverse Fehlbildungen, die von geringerer Körpergröße und verkürzte Gliedmaßen über Fehlbildungen des Gesichtsschädels und des axialen Skeletts reichen. Der homozygote Ror2-Ausfall wirkt sich neonatal letal aus, da die Atmung der Tiere, vermutlich auf Grund von Alveolarschäden, behindert ist und sie so kurz nach der Geburt ersticken (Oishi et al., 2003; Takeuchi et al., 2000).

Beim Menschen werden zwei verschiedene Phänotypen in Zusammenhang mit ROR2-Mutationen gebracht (Abb. 10). Zum einen das rezessiv auftretende Robinow-Syndrom (RRS) (Afzal et al., 2000) und die dominant vererbte Brachydactylie Typ B1 (BDB1) (Oldridge et al., 2000; Schwabe et al., 2000). Symptomatisch für das RRS sind Kleinwüchsigkeit, Wirbelkörperfusionen und charakteristische Fehlbildungen des Gesichts (*fetal face*), aber auch Brachydactylien und urogenitale Fehlbildungen. Zurückzuführen sind diese Erscheinungen auf einen Funktionsverlust des ROR2-Proteins (*loss of function*). Mehrere bisher im Zusammenhang mit RRS beschriebenen Mutationen führen zu einem Verbleib des Proteins im ER und seiner anschließenden Degradation (Chen et al., 2005). Im Falle der dominanten BDB1 dagegen wird ein Funktionsgewinn von ROR2 (*gain of function*) vermutet. Alle bisher bekannten Mutationen führen zu einem frühzeitigen Stop-Codon, was während der Proteinbiosynthese zu trunkierten ROR2-Versionen führt. Dabei konzentrieren sich die zu BDB-führenden Trunkationen auf den Bereich direkt vor oder direkt hinter der TK-Domäne. Erstaunlicherweise führt die weiter distal gelegene Mutation dabei zu einem ausgeprägteren Phänotyp als die proximal trunkierte Variante. Die BDB äußert sich in einer Hypo- oder Aplasie der distalen und mittleren Phalangen, Nageldysplasien und Syndactylien in verschiedenen starken Ausprägungen. Neben Mutationen in ROR2 konnte mittlerweile gezeigt werden, dass auch Mutationen im Bmp-Antagonisten NOGGIN ursächlich für das Auftreten der BDB sein können (Lehmann et al., 2007).


Abb. 10:

ROR2-Mutationen als Ursache für dominante Brachydaktylie B1 (BDB) und rezessives Robinow Syndrom (RRS)

Die Mutationen, die zu RRS führen sind über die gesamte Proteinsequenz verteilt und führen zum Funktionsverlust (*loss of function*) von ROR2. Für BDB ursächliche Mutationen führen zu truncierten ROR2-Versionen, für die ein Funktionsgewinn (*gain of function*) angenommen wird.

1.6.3 Die Ror2-Signaltransduktion

Da bei Entdeckung und Klassifizierung von Ror2 weder etwas über Interaktionspartner, noch über nachgeschaltete Signalwege bekannt war, fügte man dem Namen den Zusatz *orphan* (= verwaist) hinzu. Doch dank stetiger Forschung auf diesem Gebiet konnten mittlerweile einige Ror2-abhängige Signalwege beschrieben werden.

So kann Ror2 über die CRD-Domäne mit Wnt-Liganden interagieren. Im einfachsten Fall kann es durch dieses Abfangen der Wnt-Liganden ohne intrazelluläre Signalweiterleitung zu einer Inhibierung des Wnt-Signalwegs kommen, da die Wnts nicht mehr für die Interaktion mit den Fzd-Rezeptoren zur Verfügung stehen, was bei *C. elegans* gezeigt wurde. (Green et al., 2007). Des Weiteren kann die Bindung von Wnts an Ror2 aber auch zu einer Signalwegsaktivierung führen. Dies ist z.B. im bisher am besten charakterisierten Wnt5A/Ror2/ATF2-Signalweg der Fall. Hierbei führt die Interaktion von Ror2 mit Wnt5A über eine Aktivierung verschiedener Kinasen (PI3K, Cdc42, JNK) und die Expressionsfaktoren c-Jun und ATF2 zur Expression von XPAPC (*Xenopus paraxiales procadherin*), welches Einfluss auf die Ausbildung der Körperachse nimmt (Schambony and Wedlich, 2007). Wichtig ist bei der Betrachtung der Ror2-vermittelten Signale immer der Rezeptorkontext. So kann die Bindung von Wnt5A neben der Aktivierung des oben beschriebenen Wnt5A/Ror2/ATF2-Signalwegs auch über phosphoryliertes Ror2 und unter

Beteiligung von JNK und Filamin-A zur Induktion der Zellmigration führen (Nishita et al., 2006; Nomachi et al., 2008). Daneben kann die Bindung von Wnt5A den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg inhibieren (zusammengefasst in (Green et al., 2008) (Abb. 11). Konträr dazu wird dieser bei Bindung von Wnt1 oder Wnt3a an Ror2 aktiviert (Billiard et al., 2005; Winkel et al., 2008). In Bezug auf die Skelettentwicklung ist es besonders erwähnenswert, dass eine Wnt5A-induzierte Dimerisierung des Rezeptors zur Autophosphorylierung desselben führt und über Inhibierung des Gerüstproteins 14-3-3 die Knochenbildung aktiviert (Liu et al., 2007). Neben den diversen und komplexen Einflüssen auf die Wnt-Signalwege scheint Ror2 aber auch auf andere Signalkaskaden einzuwirken. So inhibiert Ror2 im Komplex mit Bmpr1b die Smad1/5/8-vermittelte Chondrogenese nach Gdf5-Stimulus (Sammar et al., 2004). Zusätzlich zu den verschiedenen Liganden und Rezeptoren interagiert Ror2 zudem mit extrazellulären Adaptoren. Die Orientierung der zum Hören essentiellen Cilien des Corti-Organs wird so über die Interaktion von Ror2, Frizzled-Rezeptoren und dem Adapter Cthrc-1 reguliert (Yamamoto et al., 2008).

Anhand der hier beispielhaft angeführten Interaktionen und Signalwege in welche Ror2 involviert ist wird deutlich, dass es sich bei diesem Rezeptor um eine zentrale Verknüpfungsstelle verschiedener Signalkaskaden zu handeln scheint. Die Signaltransduktion ist dabei stets vom Rezeptorkontext in Verbindung mit vorhandenen Liganden und Adaptoren abhängig. Mit Ausnahme des Wnt5A/Ror2/ATF2-Signalwegs sind die beteiligten Komponenten dabei oft noch nicht bekannt.

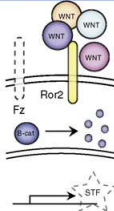
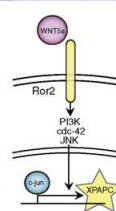
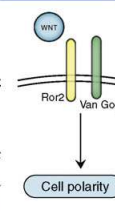
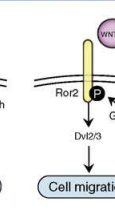
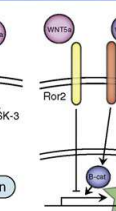
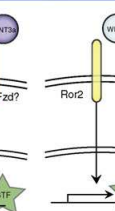
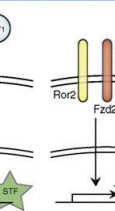
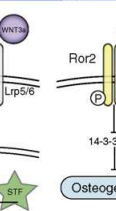
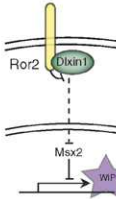
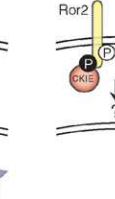
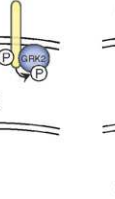
1. Ror function	(a) Ror sequesters Wnts	(b) Ror2 mediates Wnt5a signal by activating JNK	(c) Ror2 mediates Wnt effects on cell polarity	(d) Ror2 mediates Wnt5a signal in cell migration	(e) Ror2 mediates Wnt5a antagonism of Wnt3a activity	(f) Ror2 potentiates Wnt1 activity (kinase-dependent)	(g) Ror2 potentiates Wnt3a activity (kinase-independent)	(h) Ror2 functions as a homodimer
2. System(s)	<i>C. elegans</i> and U2OS cells	<i>Xenopus</i> CE and NIH3T3 cells	<i>C. elegans</i> , vertebrate organ of Corti (sensory hair cells)	NIH3T3, MEFs, A7, L cells	293, L, H441, A549, U2OS and HT-29 cells	U2OS cells	L and H441 cells	T/C28a2, U2OS, hMSCs, SaOS-2, HOB-01-09 cells and ex vivo bone culture
3. Molecular interactions								

Abb. 11: Signalwege mit Ror2-Beteiligung
 Oben: Einfluss auf die Wnt-Signalkaskade
 Rechts: Wnt-unabhängige Signalwege mit Ror2-Partizipation
 (nach (Green et al., 2008))

1. Ror function	(a) Ror2 recruits Dlxin-1 to the membrane	(b) Ror2 interacts with CKIε and GRK2	(c) Ror2 modulates GDF5 and BMPR1b signaling
2. System(s)	<i>C. elegans</i> and U2OS cells	293, NIH3T3 cells	COS7, ATDC5 cells
3. Molecular interactions			

2 Ziel der Arbeit

Neben Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase Ror2 resultieren auch Mutationen im Bmp-Antagonisten Noggin in der Ausbildung einer Brachydaktylie-Form. Die These der 'Molecular disease family' geht davon aus, dass Mutationen in verschiedenen Proteinen, die in einem gemeinsamen Signalweg agieren, zu ähnlichen Phänotypen führen (Brunner and van Driel, 2004; Goh et al., 2007; Jiang et al., 2008). Dieser Ansatz führte neben dem Wissen über die Co-Expression beider Gene in der sich entwickelnden Extremität zur Hypothese, dass Ror2 und Noggin miteinander interagieren könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Bestätigung und weiterführend die Charakterisierung dieser Interaktion *in vitro*. Hierfür wurden Co-Immunopräzipitationsversuche mit unterschiedlich trunkierten Ror2-Konstrukten durchgeführt. Als zweiter Aspekt der Arbeit wurde die Ror2-Noggin Interaktion auf genetischer Ebene *in vivo* untersucht. Hierfür wurden Ror2- und Noggin-defiziente Mauslinien verkreuzt und die Skelette der daraus hervorgehenden Phänotypen analysiert.

3 Material

3.1 Geräte

Tab. 1: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Zusatzbezeichnung	Hersteller
Axio Cam	HRC oder MRC5	Zeiss
Binokular	MZ 12	Leica
Blotkammer	Transblot Semi-Dry	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator	Steri-Cycle HEPA Class 100	Thermo
Eismaschine	AF30	Scotsman
Filmentwickler	Curix 60	Agfa-Gevaert AG
Gefrierschrank	-80 °C, Forma 906	Thermo
Geldokumentationssystem	Easy Win.32	Herolab
Gelelektrophorese-Zubehör	Schlitten, Kammern, Kämmen	PeqLab
Heizblock	Ori-Block OV 3	Techne
Kryotom	HM 560	Microm
Kühlgefrierkombination	4 °C, -20 °C	Bosch
Laborwaage	FI1500	Fischer
Magnetrührer	Combimag RET	IKA
Mikroskop	Fluoreszenz Axiovert 200	Zeiss
Mikrotom	Cool-Cut oder 2050 Supercut	Microm oder Reichert-Jung
Mikrowelle	8020	Privileg
Pipetten	10µl, 20µl, 200µl 1ml	Eppendorf
Photometer	Biophotometer	Eppendorf
pH -Meter	MP220	Mettler
Pipettierhilfe	Pipettboy acu	ISS Intergra Bioscience
Präparierbesteck	Pinzette, Embryonenlöffel, Schere	FST, Dumont
Rocking Plattform		Biometra
Rollator	Roller Mixer SRT9	Stuart
Schüttler	G10 Gyrotory shaker	New Brunswick Scientific
Sterilbank	HERA safe	Kendro
Stickstoffbehälter	Cryo Diffusion	Nalgene
Stoppuhr		Roth
Strom-/Spannungsversorger		Peqlab

Thermal Cycler	2720	AB Applied Biosystems
Thermomixer	Comfort, für 1,5 ml tubes	Eppendorf
Transilluminator		Hartenstein
UV-Dunkelkammer		Hormuth-Vetter
Vortex	Microspin FV-2400	Lab4you
Wärmeschrank		Memmert
Wasserbad	D1	Haake fisions
Zellzählkammer	Tiefe 0,100 mm; 0,0025 mm	Marienfeld
Zentrifugen	Biofuge pico	Thermo
	3417R	Eppendorf
	RC-5 Superspeed	DuPont Instruments Sorvall
	Megafuge 1.0	Heraeus

3.2 Chemikalien

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert im Text darauf hingewiesen wird, über die Firmen Merck, Sigma und Roth bezogen.

3.3 Puffer und Lösungen

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Genotypisierung	
PK/SDS (Tailtip)	0.85% SDS, 17 mM EDTA, 170 mM NaCl, 17 mM Tris/HCl; pH 7.5 , + 200 µg/ml Proteinase K
DNA-Polymerasepuffer (10x)	750 mM Tris HCl pH 8.8, 200 mM (NH ₄) SO ₄ , 15 mM MgCl ₂ mit H ₂ O auffüllen, steril filtrieren
Ladepuffer (6x) für Agarosegele	15g Sucrose, 0.175 Orange G auf 50ml H ₂ O
TAE (10x)	0.04M Tris, 5 mM Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 8
CoIP	
Lysepuffer 150 mM	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1 % Triton X-1000, add A. bidest auf 500 ml
Lysepuffer 350 mM	50 mM HEPES, 350 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 % Glycerol,

	1 % Triton X-1000, add A. bidest auf 500 ml
Inhibitoren für Lysepuffer (kurz vor Gebrauch hinzufügen)	auf 10 ml Lysepuffer: 100 µl PMSF (stock 50 mM), 10 µl Aprotinin (stock 1 mg/ml), 10 µl Pepstatin (stock 1 mg/ml), 2 µl Leupeptin (stock 5 mg/ml), 50 µl NaF (stock 200 mM), 50 µl Na ₃ VO ₄ (stock 200mM, aktiviert)
BSA/Lysepuffer	5 % BSA in 150 mM Lysepuffer lösen, immer frisch ansetzen
Western Blot	
SDS-Ladepuffer (red., 4x)	2 ml 1 M Tris, 4 ml Glycerin, 2ml 20 % (w/v) SDS, 400 µl 1 % Bromphenolblau, 600 µl H ₂ O, 1 ml 40x Reduktionsmittel (z.B. β-Mercaptoethanol), pH 7.5
SDS-Laufpuffer (5x)	25 mM Tris, 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Transferpuffer (10x)	29 g Glycin; 58 g Tris Base; 40 ml 10 % (w/v) SDS, add 1 l mit A. bidest
Transferpuffer (1x)	100 ml Transferpuffer 10x, 200 ml MeOH, 700 ml A. bidest
TBST (10x)	300 ml 5 M NaCl, 100 ml 1 M Tris pH 7,5, 10 % (v/v) Tween-20, add 1 l mit A.bidest
Milch/TBST	5 % Milchpulver in 1x TBST lösen
BSA/TBST	5 % BSA in 1x TBST lösen
Strippuffer	7.5 ml 1 M Glycin, 2 ml 10 % (w/v) SDS / 50ml H ₂ O, pH 2.5
Proteinaufreinigung	
Waschpuffer Proteinaufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol; auf pH 8 einstellen, add 1 l mit A. bidest
Elutionspuffer Proteinaufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol; auf pH 8 einstellen, add 1l mit A. bidest
Lysepuffer Proteinaufreinigung	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol; auf pH 8 einstellen , add 1 l mit A. bidest
Histologische Methoden	
PBS (10x)	80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na ₂ PO ₄ , 2.4 g KH ₂ PO, auffüllen auf 1l mit H ₂ O-DEPC, pH 7.4
4 % PFA/PBS	40g PFA in 1l PBS durch Erhitzen lösen; pH 7,4
Alcian-Blau Färbelösung	500 mg Alcian Blau; 800 ml EtOH 100%, 200 ml Eisessig
Alizarin-Rot Färbelösung	50 mg Alizarion Rot in 1% KOH

Tab. 3: Verwendete Medien und deren Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
Zellkultur Nährmedium	DMEM mit 4,5 g/L Glucose, 1% L-Glutamin, 1% Pen/Strep, 10 % FCS für Hek293T, 5 % FCS für Cos-1
Zellkultur Einfriermedium, 1x	3,5 ml Medium, 0,5 ml DMSO 10 %, 1 ml FCS 20 %
LB-Medium	10 g pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl; pH 7,4, autoklavieren

2xTy-Medium	10 g Hefeextrakt, 16 g Trypton, 5 g NaCl, add 1 l mit A. bidest; autoklavieren
LB-Agar	1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium, autoklavieren

3.4 Molekularbiologische Reaktionssysteme/ Kits

Tab. 4: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Plasmid DNA Purification Kit Nucleobond AX 100	Machery-Nagel
E.Z.N.A. DNA-Plasmid Mini	PeqLab
TurboFect	Fermentas
RotiLumin	Roth
ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare

3.5 Kulturzellen

Das dem Medium zugefügte FCS wurde zuvor durch einstündige Inkubation bei 72°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Tab. 5: Verwendete Kulturzellen

Zelllinie		Medium
HEK 293T	humane Nierenzelllinie	DMEM mit 4,5 g/L Glucose, 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep
Cos-1	Nierenzelllinie grüne Meerkatze	DMEM mit 4,5 g/L Glucose, 5 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep

3.6 Bakterienstämme und Kulturmedien

Für die Gewinnung der Expressionskonstrukte für die CoIPs wurde als Standard der *E. coli* Stamm XL1Blue verwendet, für die Isolation und Aufreinigung des rekombinanten Proteins kam der BL21DE3-Stamm zum Einsatz. Dieser wurde in 2xTy-Medium gehalten, während für den XL1Blue Stamm LB-Medium verwendet wurde.

3.7 Antikörper

Tab. 6: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung			Kommentar
		Cyto	Histo	Blot	
goat anti hRor2	R&D AF2064	1:500		1:1000	
rabbit anti HA	SIGMA			1:1000	
rabbit anti p-Serin	Zymed 61-8100			1:100	beide AK mischen; Blocken in BSA/TBST
rabbit anti p-Threonin	CellSignaling 9381			1:500	
rabbit anti goat Alexa-flour	Invitrogen	1: 500		1:100	Blocken in BSA/TBST
rGBD-GFP	eigene Aufreinigung, Referenz A. Schambony, Erlangen	1:20	1:20		rek. Protein als AK gebraucht
rabbit anti goat HRP	SIGMA			1:1000	
goat anti rabbit HRP	Calbiochem			1:1000	

3.8 Tiere

Alle Verpaarungen und die Aufzucht der untersuchten Mauslinien wurden freundlicherweise vom Personal des institutseigenen Tierhauses übernommen. Verwendung fanden die folgenden Linien: 1) Nog-KO durch eine lacZ-Insertion, (McMahon et al., 1998)

2) Ror2-KO (Takeuchi et al., 2000)

3) BI/6

Verwendet wurden Embryonen des Stadiums E15,5 für die Kryoschnitte und Neugeborene des Stadiums P0 für die Skelettpräparationen.

3.9 Primer

Alle hier aufgeführten Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tab. 7: Für die Genotypisierungen verwendete Primer

Name	Sequenz
mRor2-wt	CCTACTATAGACTCTGATCCTTCTGCC
mRor2-ko-neo1500	ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG
mRor2-ext-4	CTTAACTGTTCTAGGTCAAGTATG
wt210x211	GAGCAGCGAGCGCAGCAGCG
ko210x212	AAGGGCGATCGGTGCGGGCC
reverse	GCATGGAGCGCTGCCCCAGC

3.10 Enzyme

Tab. 8: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP); Puffer: 10x SAP-Puffer	Fermentas
Proteinase K	Boehringer
Taq-Polmerase; Puffer: 10x PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Hauseigen; MBI Fermentas
Trypsin EDTA	BioWhittaker Cambrex

3.11 Längenstandards

Zur Ermittlung der DNA-, bzw Proteingrößen wurde bei jeder Elektrophorese ein Längenstandard mitlaufen gelassen. Im Falle der Agarose-Gelelektrophorese war dies der DNA-GeneRuler 100bp plus, im Falle der SDS-Page wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder SM1811 eingesetzt. Beide Marker wurden von Fermentas bezogen.

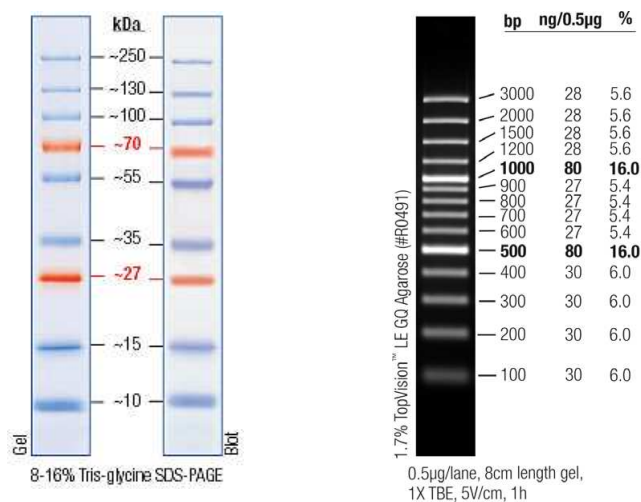


Abb. 12: Verwendete Längenstandards

links: DNA-GeneRuler 100 bp plus; rechts: PageRuler Plus Presatined Protein Ladder SM 1811

3.12 Software

Tab. 9: Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Programm	Verwendung
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung
Axio Vision 4.6	Digitale Photographie
CorelDraw 12	Bildbearbeitung
EASY Win 32	Geldokumentation
Microsoft Office	Auswertung
NCBI	Datenbankrecherchen
Windows XP	Betriebssystem

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 DNA-Extraktion

Zum Genotypisieren der Mäuse wurde bei Neugeborenen Haut, bei Embryonen das Amnion zur DNA-Extraktion verwendet. Dieses Gewebe wurde zunächst mit 0m ml PK/SDS-Mix versetzt und bei 55°C 2-3 Std. auf dem Schüttler inkubiert, bis das Gewebe vollständig gelöst war. Daraufhin wurden 0,25 ml einer 5 M NaCl-Lösung hinzugefügt und die DNA 10 min bei RT auf der Wippe gefällt. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis und eine Zentrifugation über 12 min bei 7.000 rpm und 4°C. Vom Überstand wurden 500 ml in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 1 ml eiskaltem Ethanol versetzt. Daraufhin erfolgte erneut eine Zentrifugation über 10 min bei 13.000 rpm und 4°C. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut 6 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, anschließend für einige Minuten luftgetrocknet und schließlich in 100 µl A. bidest über Nacht bei 4°C gelöst.

4.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische DNA-Abschnitte durch eine DNA-Polymerase gezielt vervielfältigt. Um den zu amplifizierenden Bereich einzugrenzen wird dieser durch spezifische Oligonukleotide, die Primer, flankiert. Diese werden so gewählt, dass ihre Basenfolge jeweils komplementär zu der eines DNA-Einzelstrangs ist. So können sie sich an die DNA anlagern und bilden die Ansatzpunkte für die Polymerase. Die Amplifikation der DNA erfolgt, indem die thermostabile Polymerase einzelne dNTP's zu einem fortlaufenden Strang synthetisiert. Dieser Prozess verläuft im Wesentlichen über drei Reaktionsschritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Dabei wird der DNA-Doppelstrang zunächst bei 94-98°C denaturiert und liegt damit einzelsträngig vor. Durch das Absenken der Temperatur kurz unter den Schmelzpunkt der Primer lagern sich diese an die Einzelstränge an. Durch anschließende Temperaturerhöhung auf das Aktivitätsoptimum der Polymerase (ca.72°C) wird die Elongation initiiert und ein neuer DNA-Strang aufgebaut. Die Dauer der einzelnen Schritte hängt u.a. von der Fragmentlänge

und der Polymeraseaktivität ab. Durch 25-35fache Wiederholung des gesamten Zyklus liegt am Ende eine große Menge des DNA-Abschnitts von Interesse vor.

Tab. 10: Pipettierschema eines Standard PCR-Ansatzes

Reagenz	Menge
Template-DNA	2 μ l
10x PCR-Puffer; 12,5 mM MgCl ₂	2,5 μ l
12,5 mM dNTP's	0,1 μ l
Fwd. Primer (100 pmol/ μ l)	0,1 μ l
Rev. Primer (100 pmol/ μ l)	0,1 μ l
Taq-Polymerase	1 μ l
A. bidest	add 25 μ l

Tab. 11: Standard PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	25-35
Primer Annealing	je nach Primer	30 sec	
Elongation	72°C	je nach DNA-Länge; Taq: 1min/ 1000bp + 30sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	1
Kühlung	4°C	∞	1

4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente ihrer Größe nach im elektrischen Feld auftrennen. Hierfür wurde 1,5% Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, anschließend auf 55°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (0,00005% (v/v)) versetzt. Die Gellösung wurde in einen dafür präparierten Schlitten gegossen und am oberen Ende mit einem Kamm versehen, so dass beim Polymerisieren des Gels Taschen entstehen. Nach vollständiger Aushärtung des Gels wurde dieses in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und die aufzutrennende DNA nach Versetzung mit Ladepuffer in die Probenaschen gefüllt. Die Kammer wurde im Anschluss für 30-60 min an eine Gleichstromquelle mit einer Spannung von ca. 100 V angeschlossen, so dass die DNA-Fragmente entsprechend ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zum positiven Pol. Dabei laufen kleinere Fragmente schneller als große, so dass diese voneinander

getrennt werden. Je nach erwarteter Fragmentgröße kann die Agarosekonzentration variiert werden: Je höher die Konzentration, desto effektiver lassen sich kleine Fragmente voneinander trennen. Durch die erfolgte Zugabe von Ethidiumbromid, welches sich in die große Furche der DNA-Doppelhelix lagert und dadurch unter UV-Licht fluoresziert, ist eine Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente unter Verwendung einer UV-Geldokumentationsanlage möglich. Zur Beurteilung der Fragmentgrößen wurde ein Längenstandard mitlaufen gelassen.

4.1.4 Transformation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterien. Hierfür wurden kompetente *E.coli* Bakterien des Stamms XL1 BLUE verwendet. Für die Transformation der Expressionskonstrukte wurden 100 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des zu transformierenden DNA-Konstrukts versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock (43°C, 45 sec) ausgesetzt und anschließend rasch wieder auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikum und eine einstündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler.

Daraufhin wurde der Ansatz für 1 Minute bei 5.000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf 100 µl abgenommen. Das entstandene Zellpellet wurde in diesen 100 µl resuspendiert, die Suspension auf einer LB-Platte mit Antibiotikazusatz ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Art des Antibiotikazusatzes richtete sich dabei nach der Antibiotikaresistenz, die den Bakterien durch Aufnahme des Plasmids übertragen wurde.

4.1.5 Animpfen von Über-Nacht-Kulturen

Für die Präparation von großen Mengen an Expressionskonstrukten aus den Bakterien sind große Mengen von Bakterienklonen notwendig. Hierfür wurden 200 ml LB-Medium in einem Erlenmeyer-Kolben vorgelegt und mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000) versetzt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde die Kolonie eines neu transformierten Klons von der entsprechenden LB-Platte gepickt und diese in das Kulturgefäß gegeben. Waren bereits Glycerin-Stocks von Kulturen vorhanden, wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine kleine Menge der gefrorenen Kultur abgenommen und direkt in das Kulturgefäß überführt.

Um Verunreinigungen der Kultur zu verhindern wurde der Hals des Gefäßes nach dem Öffnen stets abgeflammt. Die Inkubation der Kultur erfolgte über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (ca.200 rpm).

4.1.6 Präparation von Glycerin-Stocks

Glycerin-Stocks von Bakterienkulturen dienen einerseits der langfristigen Lagerung, andererseits ermöglichen sie die Arbeit mit stets den gleichen Expressionskonstrukten.

Zur Herstellung eines Glycerin-Stocks wurde 1 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur in einem Kryo-Tube mit 600 µl 87%igem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte im Gefrierschrank bei -80°C.

4.1.7 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung der Expressionskonstrukte aus den Kulturen der transformierten Bakterien kamen für analytische Zwecke das „E.Z.N.A. DNA-Plasmid-Mini“-Kit von PeqLab zum Einsatz, für die Weiterverwendung der Plasmid-Konstrukte in der Zellkultur wurde eine Midi-Präparation nach Anleitung Kits „Plasmid DNA Purification 100“ von Machery-Nagel durchgeführt.

4.1.8 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Um die isolierte DNA in folgenden Anwendungen in der richtigen Menge einsetzen zu können, ist eine Konzentrationsbestimmung von Nöten. Diese erfolgte unter Verwendung eines Photometers. Hierbei wurden 99 µl A. bidest mit 1 µl der isolierten DNA-Lösung versetzt und die Lichtabsorption, bzw. die optische Dichte bei 260 nm gemessen und die Konzentration der DNA-Lösung ermittelt.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Auftauen der Zellen

Eingefrorene Zellen werden langfristig als 1ml Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde eines der Aliquots aus dem Stickstofftank entnommen und zunächst für 30 min im -80°C Gefrierschrank zum Abdampfen des Stickstoffs zwischengelagert.

Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, zügig in 10 ml vorgewärmtes Medium (siehe 3.2.2) überführt und bei 800 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10-12 ml frischem Medium resuspendiert und die Suspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Durch vorsichtiges Schwenken wurde die Zellen gleichmäßig in der Flasche verteilt und im Anschluss im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für eine bessere Akklimatisierung der Zellen wurde vor ihrer Verwendung in Versuchen mindestens einmal ein Medienwechsel oder ein Aufsplitten durchgeführt.

4.2.2 Medienwechsel und Inkubation

Durch den Stoffwechsel der Zellen nimmt der Gehalt an Nährstoffen im Medium während der Inkubation stetig ab, zusätzlich sammeln sich mit der Zeit Stoffwechselendprodukte darin an. Um den Zellen fortwährend optimale Wachstumsbedingungen bieten zu können wurde das alte Medium in regelmäßigen Abständen abgesaugt und durch 37°C warmes frisches Medium ersetzt. Um ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden zu verhindern wurde dabei darauf geachtet, dass die Zellen keinem direkten Flüssigkeitsstrom ausgesetzt waren. Die weitere Inkubation erfolgte wie zuvor bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator. Um den Bedürfnissen der verschiedenen Zelllinien gerecht zu werden, wurden die kultivierten Zellen der Linie Hek 293T in 10 % FCS-, 1 % PS- und 1% LG-haltigem DMEM (LONZA, BioWhittaker with 4,5 g/L Glucose) gehalten, während für die Cos1-Linie 5 % FCS-, 1 % PS- und 1 % LG-haltiges Medium verwendet wurde.

4.2.3 Splitten der Zellen

Um den Zellen ausreichend Platz zum Wachsen zu bieten, wurde die Zelldichte regelmäßig durch das Aufsplitten der Kultur auf mehrere Zellkulturflaschen verringert.

Hierfür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und durch 4 ml Trypsin ersetzt. Nach 3 min. Inkubation im Inkubator konnten die Zellen durch Klopfen gegen die Flasche vom Boden gelöst werden. Durch anschließende Hinzugabe von 12 ml frischem Medium wurde die Aktivität des Trypsins gehemmt. Die Suspension wurde daraufhin in ein 50ml-Falcon überführt und bei 800 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Absaugen des Überstands in 10 ml frischem vorgewärmten Medium resuspendiert und 1ml der Suspension in eine neue 75 cm² Flasche gegeben, in die zuvor 10 ml warmes Medium vorgelegt wurden. Durch diesen Vorgang erfolgt ein Aufsplitten der Kultur im Verhältnis 1:10. Durch abschließendes Schwenken der Flasche erfolgte die gleichmäßige Verteilung der Zellen, bevor die Inkubation unter den bereits beschriebenen Bedingungen fortgesetzt wurde.

Je nach Zelllinie treten beim Splitvorgang geringe Abweichungen von der beschriebenen Vorgehensweise auf: Während die verwendeten Cos1-Zellen trypsiniert wurden, konnte bei der Linie Hek 293T darauf verzichtet werden. Hierbei wurden die Zellen direkt durch Klopfen von Boden gelöst und durch auf- und abpipettieren eine Vereinzelnung von Zellclustern erreicht. Der eigentliche Vorgang des Splittens unterschied sich dabei nicht von der oben beschriebenen Vorgehensweise.

4.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zum gleichmäßigen Aussähen der Zellen für Versuche ist es von Nöten die Zellzahl zu bestimmen. Hierfür kam eine Neubauer-Zellzählkammer zum Einsatz. Diese ist in 4 Quadrate gegliedert, die sich wiederum in 16 kleine Quadrate unterteilen. Auf diesen definierten Bereich wurde ein Deckgläschen gelegt und 20 µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Mikroliterpipette darunter gegeben. Die Zellen konnten daraufhin bei Betrachtung der Zählkammer durch das Mikroskop gezählt werden. Die so ermittelte Zahl wurde als Grundlage zur Berechnung der Zellzahl pro ml verwendet, die sich nach folgender Formel bestimmen ließ: *Anzahl gezählter Zellen x Kammerfaktor $0,25 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$*

4.2.5 Aussaat von Zellen

Um in den Versuchen unter stetig vergleichbaren Bedingungen arbeiten zu können, wurden die Zellen in stets der Gleichen Dichte von 6×10^5 Zellen/Schale ausgesät.

Dafür wurden die Zellen wie in 3.2.3 beschrieben gelöst, vereinzelt, zentrifugiert und resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt (4.2.4) und durch Verdünnen mit

Zellkulturmedium auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurden jeweils 2 ml in eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 6 cm gegeben und die Zellen durch Schwenken der Schalen gleichmäßig verteilt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation (37°C , 5% CO_2) von mind. 24 Stunden, damit sich die Zellen absetzen und festheften konnten.

4.2.6 Transfektion von Zellen

Unter dem Begriff der Transfektion versteht man die Aufnahme von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Durch die Aufnahme der DNA wird diese daraufhin von den Zellen vermehrt und die eingeschleusten Gene exprimiert. Neben der stabilen Transfektion, bei der die eingebrachte DNA dauerhaft ins Genom eingebaut wird gibt es auch die vorübergehende Einbringung von Fremd-DNA in die Wirtszelle. Man spricht hierbei von einer transienten Transfektion. Alle Versuche dieser Arbeit wurden mittels transients Transfektion realisiert. Als Transfektionsreagenz wurde dabei „TurboFect *in vitro* Transfection Reagent“ von Fermentas nach Herstellerangaben verwendet. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 70 %, wobei unmittelbar vor und 12 Std. nach der Transfektion ein Medienwechsel durchgeführt wurde um den Stress für die Zellen möglichst gering zu halten. Bei der Co-Transfektion zweier Konstrukte, deren potentielle Interaktion hier via CoIP untersucht wurde (siehe Abschnitt 4.3.3), wurde die Gesamtmenge an zu transfizierender DNA 1:1 zwischen beiden aufgeteilt, also 2,5 μg eines jeden Konstrukts eingesetzt.

Tab. 12a und b: Transfektionsschemata am Beispiel der Rezeptorkartierungs- und Phosphorylierungsversuche

Mapping	
Nr.	Co-Transfektion
1	Nog-HA + PcDNA3
2	Nog-HA + Ror2wt-FLAG
3	Nog-HA + Ror2 Δ CRD-FLAG
4	Nog-HA + Ror2 Δ CRD/KR-FLAG

Phosphorylierung			
Nr.	Transfektion	Stimulation	Kommentar
1	mRor2-FLAG	--	SAP nach IP, Lyse ohne NaF, NaOV
2	mRor2-FLAG	--	
3	mRor2-FLAG + CK1	--	
4	mRor2-FLAG	Wnt5A	
5	mRor2-FLAG	Noggin	
6	mRor2 Δ CRD/KR-FLAG	Noggin	

4.2.7 Stimulation der Zellen

Vor der Stimulation der Cos1-Zellen wurden diese zunächst 16-20 Std. in FCS-freiem Medium gehungert um die Expression zu drosseln. Daraufhin erfolgte die Stimulation mit rekombinantem Protein über einen Zeitraum von 2 Std. Dabei wurde Noggin mit der Konzentration 1µg/ml und Wnt5A mit der von 300 ng/ml eingesetzt. Um eine Beeinflussung der Zellen durch Medienzusätze zu verhindern, wurde die Stimulation ebenfalls in FCS-freiem Medium durchgeführt.

4.2.8 Einfrieren der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden noch in der Kulturflasche in 10 ml DPBS gewaschen, mit 4 ml Trypsin für 3 min im Brutschrank inkubiert, anschließend durch Klopfen und Pipettieren vom Flaschenboden gelöst und in ein 50 ml-Falcon mit 10 ml vorgewärmten Nährmedium überführt. In diesem erfolgte eine Zentrifugation bei 800 rpm für 5 min. Das erhaltene Pellet einer 75cm²-Kulturflasche wurde in 1,5 ml Medium aufgenommen und jeweils 0,5 ml davon in ein beschriftetes Kryoröhrchen gegeben. Es folgte die Hinzugabe von jeweils 0,5 ml 2x-Einfriermedium und die anschließende Überführung der Kryoröhrchen in eine auf 4°C vorgekühlte Einfrierkammer. Sofort im Anschluss erfolgte das Wegfrieren der Zellen in dieser Einfrierbox im Gefrierschrank bei -80°C über Nacht. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.9 Immuncytochemie

Bei der Immuncytochemie nutzt man die spezifische Bindung von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern an Proteinstrukturen aus um diese zu detektieren. Hierfür wurden ca. 20.000 Zellen pro Well in einer 12-well-Platte gesät, in welcher zuvor Deckgläschen ausgelegt wurden. Diese wurden zur Vermeidung von Kontaminationen vorab in 70% Ethanol getaucht und anschließend abgeflammt. Nach dem Aussähen erfolgten Inkubation, Transfektion und Stimulation wie beschrieben.

Anschließend erfolgten bei RT das zweimalige Waschen mit PBS, die Fixierung in 4 % PFA/PBS für 15 min und die Permeabilisierung durch 0,2 % TritonX-100/PBS für 15 min. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen jeweils dreifach mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Antikörperinkubation mit DAPI (1:1000) und

Phalloidin 568 (1:200) in PBS für weitere 30 min, gefolgt von erneutem dreifachen Waschen in PBS. Im Falle des rGBD-GFP Einsatzes wurden die Zellen durch 10 minütige Inkubation in -20°C kaltem Methanol fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem rGBD-GFP Konstrukts erfolgte bei in einer dunklen Feuchtkammer bei RT für 1 Stunde, indem ein Tropfen des Proteineluats (1:20) auf Parafilm gegeben und das Deckglas mit den Zellen nach unten zeigend darauf platziert wurde. Im Anschluss erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS und schließlich die Gegenfärbung mit DAPI und Phalloidin wie oben beschrieben. Abschließend wurde auf einen Objektträger ein Tropfen „Fluoromount G Einbettmedium“ von Southern Biotech aufgebracht und das Deckgläschen mit den Zellen zum Objektträger zeigend darauf platziert. Das fertige Präparat wurde zunächst über Nacht im Dunkeln bei RT getrocknet und im Folgenden bei 4°C im Dunkeln gelagert.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Zellyse

Die Zellen wurden vor der Lyse auf Eis stehend gekühlt, das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit Wasser gewaschen und anschließend $500\ \mu\text{l}$ Lysepuffer (150 mM mit Inhibitoren, siehe Tab.2) hinzugegeben. Der Lysevorgang erfolgte bei 4°C auf der Wippe. Dabei wurde die Dauer der Lyse den Zellen und dem Versuch angepasst. Die Hek 293T –Zellen lysierten für die Mapping-Experimente 1 Stunde, während die Lysedauer bei den Cos-1-Zellen für den Phosphorylierungsnachweis auf 20 min verkürzt wurde. Im Anschluss an die Lyse wurde das Zellysat in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Tubes überführt und für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert oder direkt weiterverwendet.

4.3.2 Western-Blot-System

Das Prinzip des Western Blots ermöglicht die Auftrennung und anschließende Analyse von Proteingemischen. Hierfür werden die Proteine zunächst über ein Polyacrylamid-Gel der

Größe nach aufgetrennt, anschließend durch den Blotvorgang auf eine Membran übertragen, auf der dann z.B. eine Proteindetektion mit Antikörpern erfolgen kann.

4.3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ein typisches SDS-Gel besteht aus Sammel- und Trenngel. Je nach Proteingrößen wird die Konzentration variiert. Je kleiner die zu trennenden Proteine, desto höher die Acrylamid-Konzentration. Für die Analyse der Rezeptorkartierung und der Dimerisierung wurden 12 %ige, für die Analyse der Phosphorylierung 8 %ige Gele verwendet.

Tab. 13: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele

Gelkomponenten	Trenngel, 50 ml		Sammelgel, 10 ml
	12%	8%	5%
A. bidest	16,5 ml	23,5 ml	6,8 ml
Acrylamid	20,0 ml	13,3 ml	1,7 ml
Tris-HCl pH 8,8	12,5 ml	12,5 ml	1,25 ml
SDS 10 %	0,5 ml	0,5 ml	0,1 ml
APS 10 %	0,5 ml	0,5 ml	0,1 ml
Temed	0,02 ml	0,03 ml	0,01 ml

Vor dem Laden der Lysate in die Probestaschen wurden die Proben mit 4x reduzierendem SDS-Ladepuffer (Tab. 2) versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Das SDS-Gel wurde in der mit 1x SDS-Laufpuffer (Tab. 2) gefüllten Laufkammer an eine Gleichstromquelle mit der Spannung von 80-100 V angeschlossen. Das Auftrennen der Proteine dauert dabei je nach Laufweite 1,5-2 Stunden. Um die Proteingrößen abschätzen zu können wurde immer der SL1811 Proteinmarker von Fermentas mitlaufen gelassen.

4.3.2.2 Western-Blot

Beim Blotten wurde das Prinzip der Halbtrockenkammer verwendet. Hierfür wurde zunächst eine PVDF-Membran für 2-3 min in Methanol aktiviert und anschließend in A. bidest gewaschen. Es folgte die Inkubation von Membran und SDS-Gel in 1x Transferpuffer (Tab. 2). für 10 min. Parallel dazu wurde extradickes Whatman-Filterpapier in 1x Transferpuffer getränkt. Der eigentliche Übertrag der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, so dass die Proteine vom negativen

(hier oben) zum positiven Pol (hier unten) wandern. Demnach wurden Gel, Membran und Filterpapier wie folgt von unten nach oben angeordnet: Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier. Beim Zusammensetzen der Komponenten wurde dabei darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen befanden. Der Proteinübertrag erfolgte dann bei einer Spannung von 20 V innerhalb von 20 min.

4.3.2.3 Protein-Detektion mittels Antikörper

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran nach dem Blotten mindestens 1 Std. in 5 % Milch/TBST (Tab. 2) für die Dimerisierung und das Mapping, für den Phosphorylierungsnachweis in 5 % BSA/TBST (Tab. 2) zum Absättigen der unspezifischen Bindungen geblockt. Bei Verwendung von phospho-Antikörpern wird mit BSA geblockt, da in Milch bereits Phosphoproteine enthalten sind und durch Bindung dieser an den Antikörper ein starkes Hintergrundsignal entstehen würde. Im Anschluss an das Blocken erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Tab. 6). in einem 50 ml-Falcon. Die Inkubation wurde in der Regel in 5 % Milch/TBST bei 4°C über Nacht auf dem Rollbrett, die Inkubation mit Phospho-Antikörpern erfolgte allerdings in 5 % BSA/TBST. Bevor weitergehend die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugiertem sekundären Antikörper über 2 Stunden bei RT stattfand, wurde der Blot dreifach in TBST bei RT gewaschen.

4.3.2.4 Entwicklung

Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran zunächst mehrfach in TBST gewaschen. Für die Detektion der gebundenen Antikörper wurde das „RotiLumin“-Kit von Roth im Falle des Mappings und der Dimerisierung verwendet, für den Nachweis der Phosphorylierung dagegen kam das „ECL Plus Western Blotting Detection System“ von GE Healthcare nach Herstellerangaben zum Einsatz. Die Luminollösungen stellen dabei das Substrat für die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase dar. Durch deren Aktivität wird Licht abgestrahlt, welches einen aufgelegten Röntgenfilm an entsprechender Stelle zu schwärzen vermag. Das Auflegen der Röntgenfilme auf die mit Entwicklerlösung benetzten und in Folie eingeschlagenen Membranen, sowie die Entwicklung der Filme erfolgte in der Dunkelkammer.

4.3.2.5 Strippen

Um auf einem Blot mehrere Antikörperdetektionen durchführen zu können, müssen zwischen diesen die alten Antikörper entfernt werden. Diesen Vorgang nennt man Strippen. Hierbei wurde der Blot zunächst mehrfach in 1x TBST gewaschen und anschließend 2x 10min bei RT auf der Wippe in Stripping-Buffer (Tab. 2) inkubiert. Es folgte nochmaliges Waschen in 1x TBST, ein erneutes Blocken in 5 % Milch/TBST und daraufhin die neue Antikörper-Inkubation (siehe Abschnitt 4.3.2.3).

4.3.3 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Durch die CoIP können Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden. Hierfür werden Antikörper, die einen bestimmten Protein-Tag erkennen an eine Matrix gebunden. Gibt man auf diese Matrix ein Proteingemisch, in dem Proteine mit dem entsprechenden Tag enthalten sind, so binden die Antikörper an diese getaggten Proteine.

Über Waschschrte werden die so an die Matrix gebundenen Proteine aufgereinigt. Bindet das Tag-fusionierte Protein an ein nicht markiertes Protein, so wird dieses mit aus dem Gemisch herausgezogen und kann anschließend über spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Für die durchgeführten CoIPs wurde als Matrix „ANTI-FLAG M2-Agarose from mouse“ von SIGMA verwendet.

Für die CoIP wurden zunächst 20 µl FLAG-beads in 1,5 ml Eppendorf-Tubes vorgelegt und dreifach mit 150 mM Lysepuffer (Tab. 2) gewaschen. Dafür wurden nach jedem Waschschrte die Agarosebeads kurz bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert, so dass der Überstand vorsichtig abgenommen werden konnte. Anschließend wurden sie bei 4°C für 1 Std. auf dem Drehrad in 3 % BSA/Lysepuffer 150 mM geblockt und anschließend erneut dreifach mit 150 mM Lysepuffer gewaschen. Daraufhin wurde das aufbereitete Lysat der transfizierten Zellen zu den beads gegeben und diese für weitere 2 Std. auf der Drehscheibe bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte für die Erhöhung der Stringenz dreimaliges Waschen mit 350 mM Lysepuffer (Tab. 2) und dreimaliges Waschen mit 150 mM Lysepuffer. Zum Abschluss wurden die beads mit 40 µl 4x SDS-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert.

4.3.4 Aufreinigung von rekombinantem rGBD-GFP

Das rGBD-GFP Konstrukt wurde für den Nachweis aktiver Rho-GTPase verwendet. Als Expressionsvektor diente hierbei der Vektor pH10, welcher zusätzlich zur aktiven Bindedomäne der Rho-GTPase ein vorgeschaltetes GFP, eine Amp-Resistenz und einen His-Tag trägt (Referenz: A.Schambony, Erlangen).

Das Konstrukt wurde via Re-Trafo in E.coli Zellen des Stamms BL21DE3 eingebracht, welche anschließend auf einer Amp-haltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Von einem der Klone wurde im Anschluss eine 10 ml Ü/N- Kultur in 2xTy-Medium angesetzt, welche am folgenden Tag mit dem gleichen Medium auf 500 ml verdünnt wurde. Diese Kultur wurde bei 37°C auf dem Schüttler zunächst bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ wachsen gelassen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0,6 mM IPTG. Die hierdurch induzierte Expression verlief über 4 Stunden bei 26°C auf dem Schüttler. Im Anschluss daran wurde die Kultur abzentrifugiert (4°C, 6000 rpm, 15 min) und das Protein isoliert und aufgereinigt.

Die Isolierung und Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen nach Protokoll 9 und 12 des Handbuchs „The QIAexpressionist 06/2003“. Dabei wurde dem Lysepuffer 10 mM β -Mercaptoethanol hinzugefügt und die in Protokoll 9, Schritt 4 beschriebene RNase-Behandlung übergangen. Die Sonifizierung erfolgte mit einer 5 mm Spitze auf Eis (Output 3, Duty 40, Timer 4 \rightarrow 3 min, 1 s Puls). Gelagert wurde das über eine Ni-NTA Säule aufgereinigte Protein bei -80°C, wobei das Eluat zuvor mit 50 % Glycerin versetzt wurde.

Die Überprüfung des Aufreinigungserfolgs erfolgte über das Western-Blot-System. Hierbei wurde von jedem Reinigungsschritt eine 5 μ l Probe über ein SDS-Gel aufgetrennt, anschließend geblottet und mit einem primären GFP-Antikörper inkubiert. Dieser wurde schließlich über einen sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper nachgewiesen und über dessen Peroxidase-Aktivität detektiert. So konnte anhand der Banden auf dem Röntgenfilm nachgewiesen werden konnte in welcher Fraktion sich das gereinigte Protein befand.

4.4 Histologische Methoden

4.4.1 Skelettpräparation von Neugeborenen

Die Neugeborenen wurden zunächst durch Begasung mit CO₂ betäubt und anschließend mittels Genickbruch getötet und bei -20°C tiefgefroren. Daraufhin erfolgte in PBS die Präparation des Skeletts. Hierfür wurden Haut, Organe, Fett und lockeres Bindegewebe vorsichtig entfernt und das Tier anschließend zum Entwässern über Nacht in 100 %igen Ethanol überführt. Es folgte eine 12-16 stündige Inkubation in der „Alcian Blue“ Färbelösung (Tab. 2) und eine anschließende Entfärbung mit 70 %igem Ethanol über 12 Std., wobei dieser mehrfach gewechselt wurde. Daraufhin wurden die Präparate über Nacht in „Alizarin Red/ 1 % KOH“ (Tab. 2) gefärbt und anschließend je nach Bedarf das zurückgebliebene Gewebe in 3 % KOH verdaut. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Skelette in einer aufsteigenden Reihe von 30 % über 60 % in 80 % Glycerin überführt.

4.4.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Extremitäten der Embryonen wurden direkt nach der Präparation in PBS in „TissueTek“ (Einbettmedium überführt und dort zunächst 15-20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Gewebe komplett in „TissueTek“ (Jung) eingebettet, welches in Einbettförmchen vorgelegt in -20°C kaltem CO₂ vorgekühlt wurde. Nach der Einbettung wurden die Kryo-Blöckchen im Gefrierschrank bei -20°C durchgefroren und anschließend am Kryostat 12 µm dick geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und bei -20°C gelagert.

4.4.3 Histologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP

Zum Nachweis der Rho-GTPase wurde das aufgereinigte rGBD-GFP-Protein ähnlich einem Antikörper bei der Immunhistologie eingesetzt.

Die Schnitte wurden zunächst in einer Glasküvette 15 min in eiskaltem Methanol fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie mit einem Fettstift umrandet und in einer lichtundurchlässigen Feuchtkammer mit dem rGBD-GFP (1:20, ca. 350 µl pro Objektträger) beschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Dunkeln bei 4°C. Im Anschluss daran wurde dreifach mit PBS gewaschen und mit DAPI (1:1000, ca. 350 µl pro

Objektträger) für 20 min bei RT gegengefärbt. Abschließend wurde erneut dreifach mit PBS gewaschen, das Präparat unter Verwendung von Fluoromount G eingedeckelt und bei RT im Dunkeln trocknen gelassen.

5 Ergebnisse

Neben Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase Ror2 führen auch Mutationen im sezernierten Bmp-Antagonisten Noggin zur Ausbildung einer Brachydaktylie (Lehmann et al., 2007). Beide hervorgerufenen Phänotypen können zwar dem Brachydaktylie B (BDB) Typ zugeordnet werden, da sie aber durch Mutationen in verschiedenen Proteinen hervorgerufen werden und zudem leicht unterschiedliche Phänotypen aufweisen, wird zwischen BDB1 (durch Mutationen in ROR2) und BDB2 (durch Mutationen in NOGGIN) unterschieden. Der überlappende Phänotyp von BDB1 und BDB2 sowie das Wissen über die Co-Expression beider Gene in der sich entwickelnden Extremität führten zur Hypothese, dass Ror2 und Noggin miteinander interagieren könnten.

Zur Überprüfung dieser These wurden zum einen biochemische Interaktionsstudien auf Proteinebene via Co-Immunopräzipitation durchgeführt, zum anderen wurde die genetische Interaktion durch Verkreuzung und Phänotypenanalyse von Ror2- und Noggin-defizienten Mauslinien untersucht.

5.1 Biochemische Interaktionsanalyse von Ror2 und Noggin durch Co-Immunopräzipitation

Für die CoIP-Experimente wurden Cos-1 Zellen mit getagten Ror2- und Noggin-Konstrukten co-transfiziert und anschließend Immunopräzipitationen aus den Zelllysaten durchgeführt (siehe Abschn. 4.3.3). Die Analyse der Versuche erfolgte über das Western-Blot-System und darauf folgender Immunodetektion.

5.1.1 Interaktion von Ror2 und Noggin – Kartierung der beteiligten Rezeptordomänen

Der extrazelluläre Teil von Ror2 besitzt zwei bekannte Ligandenbindungsdomänen, die cysteinreiche Domäne (CRD) und die Kringle-Domäne (KR). Um die Beteiligung dieser Domänen an der Protein-Protein-Interaktion zu analysieren, wurden neben „volle Länge“

Ror2 verschieden trunkeerte FLAG-getagte Rezeptorvarianten in Cos-1 Zellen überexprimiert und auf Interaktion mit Noggin untersucht.

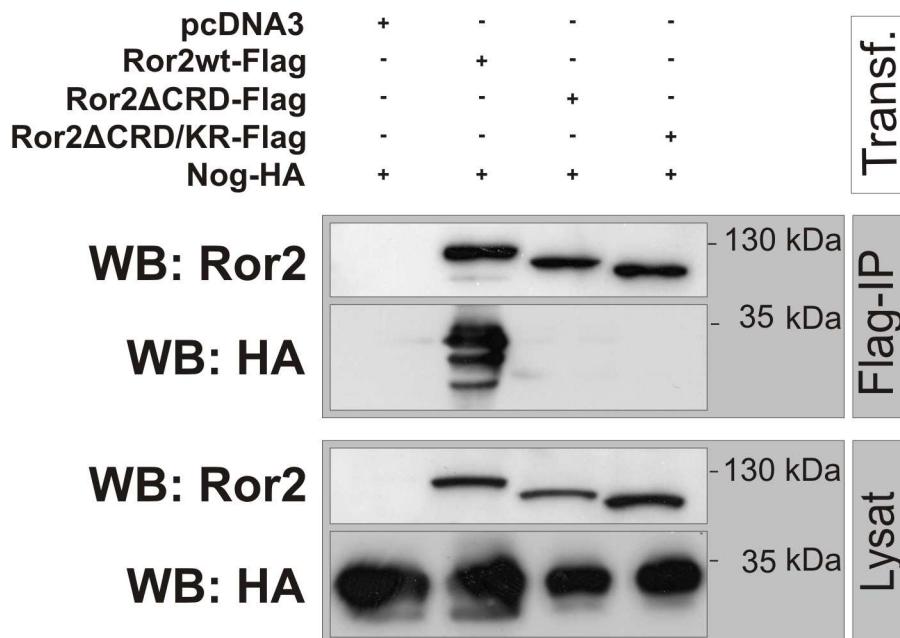


Abb. 13: Western Blot (WB): Interaktion von Ror2 und Noggin

Cos-1 Zellen wurden mit Noggin-HA und verschiedenen FLAG-Ror2-Konstrukten co-transfiziert. Der Leervektor pcDNA3 diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Resultate der Proteindetektion mittels anti-Ror2 (aus Ziege) und anti-HA (aus Hase) Antikörpern jeweils vor (Lysat) und nach der Immunopräzipitation (IP) mit anti-FLAG-beads. wt-Ror2 und Noggin interagieren, während diese Interaktion mit der CRD-, bzw. CRD/KR- trunkeerte Ror2-Version nicht besteht.

Cos-1 Zellen wurden mit Nog-HA und FLAG-getagten Ror2-Konstrukten co-transfiziert. Über den FLAG-tag der Ror2-Konstrukte lassen sich diese durch Inkubation mit anti-FLAG beads aus dem Zellysat ziehen. Interagiert Noggin mit Ror2, so wird es mit isoliert und ist im IP-Blot nachweisbar. Aus dem Lysatblot der Abb. 13 lässt sich zunächst entnehmen, dass alle transfizierten Expressionskonstrukte von den Zellen exprimiert werden und über das Western-Blot-System unter Verwendung von goat-anti-Ror2 und rabbit-anti-HA Antikörpern detektierbar sind. Das im Lysat stark exprimierte Noggin-HA ist bei Co-Expression mit dem Leervektor pcDNA3 nach durchgeführter Immunopräzipitation (IP) nicht detektierbar, Noggin-HA bindet demnach nicht unspezifisch an die beads. Im Gegensatz dazu lässt sich Noggin nach erfolgter IP detektieren, wenn es mit dem wt-Ror2 co-exprimiert wird. Demnach interagieren Noggin und wt-Ror2. Werden aber Noggin und die CRD-, bzw. CRD/KR-trunkeerte Ror2-Version co-exprimiert, ist Noggin nach dem Pulldown der FLAG-getagten Ror2-Konstrukte nicht mehr nachweisbar, d.h. die Interaktion geht verloren.

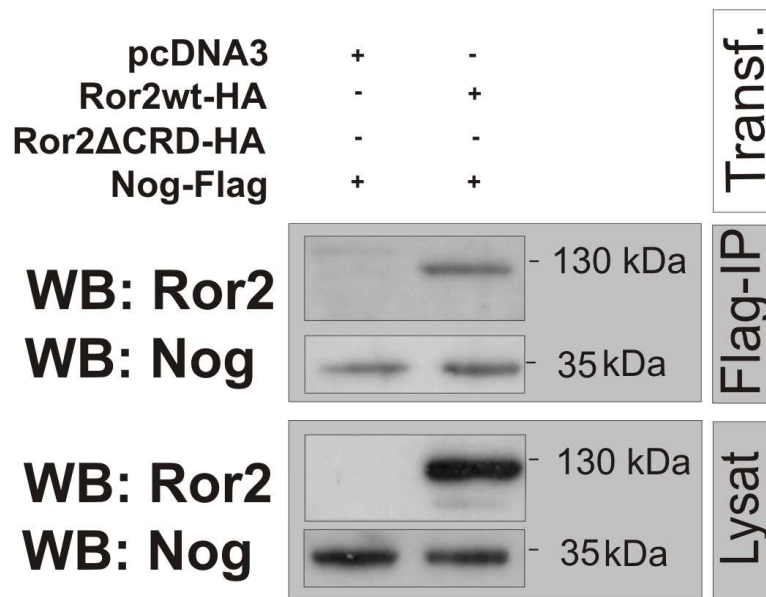


Abb.14: Western Blot: Interaktion von Ror2 und Noggin

Cos-1 Zellen wurden mit Noggin-FLAG und verschiedenen Ror2-HA-Konstrukten co-transfiziert. Der Leervektor pcDNA3 diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Resultate der Proteindetektion mittels anti-Ror2 (aus Ziege) und anti-Noggin (aus Ziege) Antikörpern jeweils vor (Lysat) und nach der Immunopräzipitation (IP) mit anti-FLAG-beads. Es zeigt sich, dass wt-Ror2 und Noggin interagieren.

CoIP-Versuche mit FLAG-getagtem Noggin und Ror2-HA-Konstrukten bestätigen die beschriebenen Ergebnisse: Beim Immunopräzipitieren des Noggins über den FLAG-tag wird wt-Ror2 mit aus dem Lysat isoliert und ist auf dem IP-Blot detektierbar (Abb. 14). Demnach interagieren Noggin und wt-Ror2.

Zusammenfassend lässt sich durch diese CoIP-Experimente die Ror2-Noggin Interaktion verifizieren und auf der Rezeptorseite auf die CRD-Domäne kartieren.

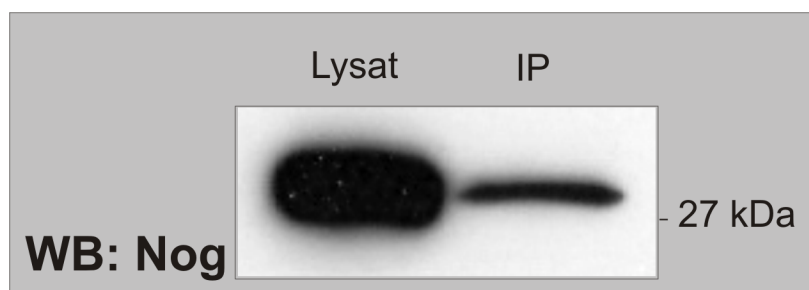


Abb. 15: Western Blot: Test des rekombinanten Noggins

Rekombinantes, ungetagtes Noggin wurde in Lysepuffer mit anti-FLAG beads inkubiert. Noggin ist nach der IP via anti-Noggin Antikörper (aus Ziege) detektierbar, d.h. es bindet an die leeren beads

Um eine mögliche Beeinflussung der Interaktion durch den HA-tag des Noggins auszuschließen, wurde angestrebt die IPs mit rekombinantem Noggin durchzuführen. Um unspezifische Bindungen Noggins an die leeren anti-FLAG beads ausschließen zu können, wurden die beads mit dem ungetagten Noggin in Lysepuffer inkubiert. Nach Auftrennung via Western-Blot-System ist Noggin sowohl im Lysat als auch nach der IP detektierbar. Auch wenn das Noggin-Signal nach der IP deutlich schwächer ausfällt als das des Lysats, bedeutet dies, dass das rekombinante Noggin unspezifisch an die leeren beads bindet. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

5.1.2 Interaktion von Ror2 und Noggin – Noggin-Einfluss auf die Rezeptordimerisierung

Da Noggin in seiner Rolle als Bmp-Antagonist als homodimeres Protein agiert, wurde vermutet, dass es in dieser Form auch an Ror2 bindet und der Rezeptor durch die Bindung des Dimers ebenfalls dimerisiert werden könnte. Um dies zu erörtern, wurden jeweils ein getagtes und ein ungetagtes Ror2-Konstrukt in Cos-1 Zellen überexprimiert. Durch das Herausziehen des getagten Rezeptors aus dem Zelllysat via Immunopräzipitation wird die ungetagte Ror2-Variante im Falle einer Dimerisierung mit aus dem Lysat isoliert. Als ungetagtes Ror2 wurde dabei hRor2-1396insA-Konstrukt verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Ror2-Version, die intrazellulär proximal der Tyrosinkinase trunkiert ist. Durch die dadurch hervorgerufene Größendifferenz lassen sich getagtes und ungetagtes Ror2 auf dem Blot unterscheiden. Um zusätzlich die an der Dimerisierung beteiligten Domänen zu identifizieren wurden hierbei verschieden trunkierte Ror2-Konstrukte verwendet. Der Einfluss Noggins auf die Rezeptordimerisierung wurde durch Stimulation der Zellen mit rek. Noggin untersucht.

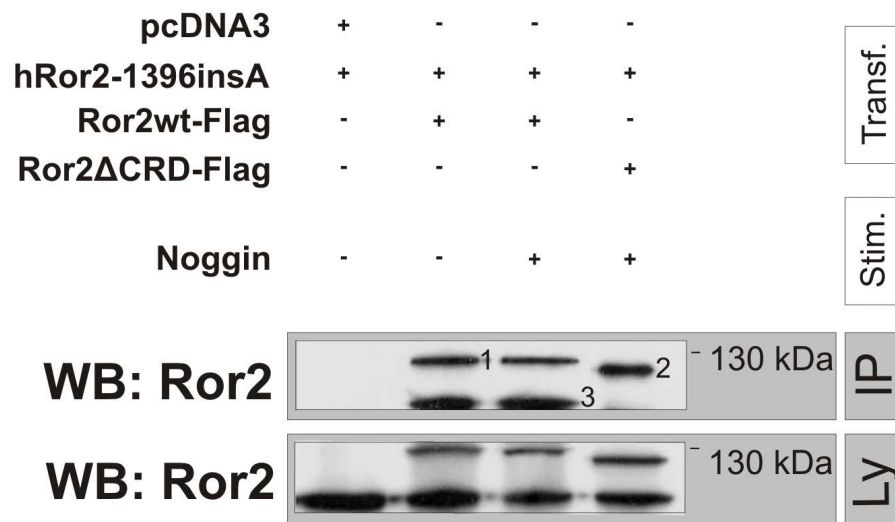


Abb. 16: Western-Blot: Dimerisierungsstudie zur Interaktion von Ror2 und Noggin

Cos-1 Zellen wurden mit verschiedenen Ror2-Konstrukten co-transfiziert, davon jeweils eines un- und eines FLAG-getagt. Nach Stimulation mit rekombinantem Noggin (2 Std mit 500 ng/ μ l Medium) und der Immunopräzipitation durch FLAG-beads fand die Detektion über einen anti-Ror2 (aus Ziege) Antikörper statt. Während alle Ror2-Konstrukte im Lysatblot nachweisbar sind, ist dies nach der Immunopräzipitation nur noch dann der Fall, wenn wt-Ror2 mittransfiziert wurde. Ein Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Ansätzen ist nicht erkennbar.

Ror2 Δ CRD = CRD-trunkiert, hRor2-1396insA = intrazelluläre Trunkation proximal der Tyrosinkinase; 1 = Ror2wt-FLAG, 2 = Ror2 Δ CRD-FLAG, 3 = hRor2-1396insA

Die detektierten Proteine im Lysat zeigen, dass alle transfizierten Konstrukte exprimiert werden und nachweisbar sind. Da sich hRor2-1396insA bei Co-Expression mit dem Leervektor pcDNA3 nur im Lysat, nicht aber nach der IP detektieren lässt, bindet das ungetagte Ror2-Konstrukt nicht unspezifisch an die beads. Nach der IP lässt sich im Ansatz mit co-transfizierten Ror2 Δ CRD-FLAG und hRor2-1396insA nur die getagte Ror2 Δ CRD-Version detektieren. Dagegen lassen sich in den Ansätzen, in denen wt-Ror2-FLAG und hRor2-1396insA nebeneinander überexprimiert wurden beide Ror2-Versionen feststellen. Dabei zeigen sich zwischen Noggin-stimuliertem und unstimuliertem Ansatz keine Unterschiede. Zusammenfassend lässt sich aus diesem Versuch ableiten, dass Ror2 in einer Überexpressionssituation bereits im Dimer vorliegt. Durch Noggin-Stimulation scheint diese Dimerisierung nicht erhöht zu werden. Zudem scheint die Dimerisierung von Ror2 über die CRD-Domäne vermittelt zu werden.

5.1.3 Funktionelle Relevanz der Interaktion von Noggin und Ror2 – Einfluss Noggins auf die Ror2-Phosphorylierung

Die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor allein bedeutet noch nicht, dass dies auch die Induzierung eines intrazellulären Signalwegs zur Folge hat. Um eine Signalweiterleitung zu induzieren muss Ror2 in einem initialen Schritt zunächst aktiviert werden. Dies geschieht über die Phosphorylierung intrazellulärer Rezeptordomänen (Yamamoto et al., 2007). Um die funktionelle Relevanz der Noggin-Ror2 Interaktion in Bezug auf die Rezeptoraktivierung zu zeigen, wurde der Einfluss Noggins auf den Phosphorylierungsstatus von Ror2 untersucht. Hierfür wurde zunächst die tyrosinreiche Domäne auf Phosphorylierung überprüft, doch auf Grund von Antikörperproblemen konnte hier bis heute noch kein Ergebnis erzielt werden. Da für Ror2 jedoch die Tyrosin-Phosphorylierung als Folge einer vorherigen Serin/Threonin-Phosphorylierung auftreten kann, wurde alternativ der Phosphorylierungsstatus der Serin/Threonin-reichen Domäne analysiert.

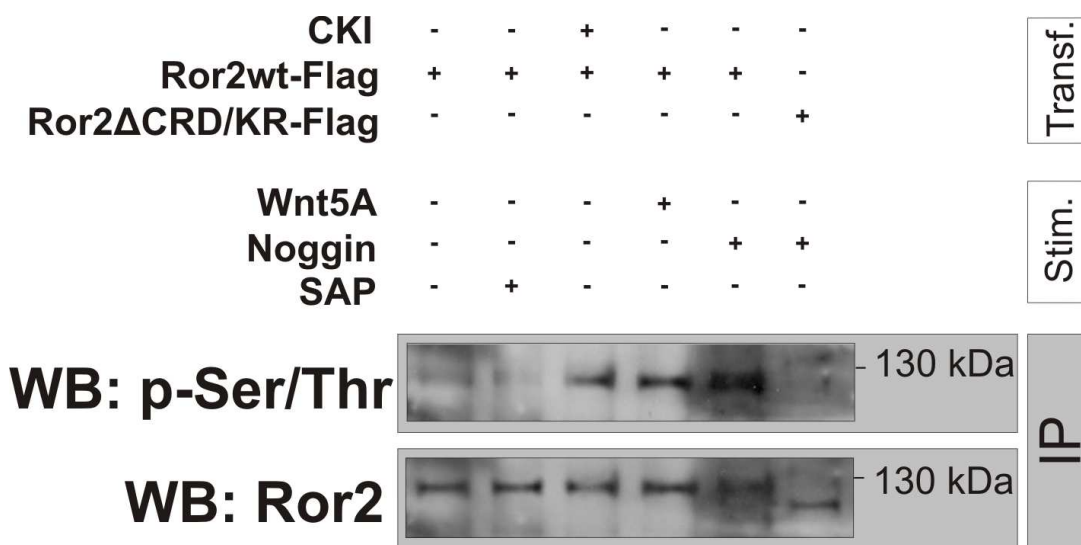


Abb. 17: Western Blot: Phosphorylierungsstudie zur Interaktion von Ror2 und Noggin

Cos-1 Zellen wurden mit verschiedenen FLAG-Ror2-Konstrukten co-transfiziert, zusätzlich wurde in einem Ansatz Caseinkinase Iepsilon (CKI) überexprimiert. Vor der Immunopräzipitation (IP) mit Flag-beads erfolgte je nach Ansatz die Stimulation mit rekombinantem Noggin oder Wnt5A, nach der IP im Kontrollansatz die Behandlung mit Shrimp alkaline phosphatase (SAP). Die Auftrennung und Detektion der Proteine erfolgte über das Western-Blot-System unter Verwendung von anti-Ror2 (aus Ziege) und anti-phospho-Serin/Threonin (aus Ziege) Antikörpern. Während nach der IP von wtRor2 sowohl mit als auch ohne SAP-Behandlung keine Phosphorylierung detektierbar ist, weisen alle andern Ansätze mit wtRor2 Überexpression eine Phosphorylierung auf. Diese ist bei Verwendung der CRD/KR-trunkierten Ror2-Version nicht erkennbar.

Der Nachweis von Ror2 über den anti-Ror2 Antikörper nach erfolgter Immunopräzipitation zeigt, dass die Ror2-FLAG Konstrukte in allen Ansätzen exprimiert und über die FLAG-IP aus dem Lysat gezogen werden können. Bei alleiniger Expression von wt-Ror2 ist keine Phosphorylierung der Serin/Threonin-reichen Domäne detektierbar. Ebenso verhält es sich für die alleinige wt-Ror2 Expression mit anschließender SAP-Inkubation (*Shrimp alkaline phosphatase*), da hier potentiell phosphoryliertes Ror2 durch SAP aktiv dephosphoryliert wird. Es ist bekannt, dass Ror2 durch Überexpression von CKI und Wnt5A-Stimulus Serin/Threonin-phosphoryliert wird (Yamamoto et al., 2007). Passend dazu weist wt-Ror2 bei Co-Expression mit der Caseinkinase I, sowie nach Stimulation mit rekombinantem Wnt5A eine Serin/Threonin-Phosphorylierung auf. Noggin-Stimulation führt ebenfalls zu einer solchen wt-Ror2-Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung ist jedoch bei Noggin-Stimulation der CRD/KR-trunkierten Ror2-Version, die Noggin ja nicht mehr binden kann, nicht nachweisbar.

Zusammenfassend zeigt dies, dass nur wt-Ror2 nach Noggin-Stimulation an der Serin/Threonin-reichen Domäne phosphoryliert und damit möglicherweise aktiviert wird.

5.2 Genetische Interaktion von Ror2 und Noggin -Phänotypenanalyse

Interagieren Proteine miteinander, bzw. sind sie in einen gemeinsamen Signalweg oder ein funktionelles Netzwerk eingebunden, kann man als weiteren Beweis der Funktionalität der Interaktion einen genetischen Interaktionstest heranziehen. Hierfür wurden Ror2- und Noggin-defiziente Mauslinien verkreuzt und die daraus resultierenden Phänotypen analysiert. Von genetischer Interaktion spricht man, wenn bei Doppelmutanten Phänotypen auftreten, die stärker sind als die Summe der Einzelphänotypen.

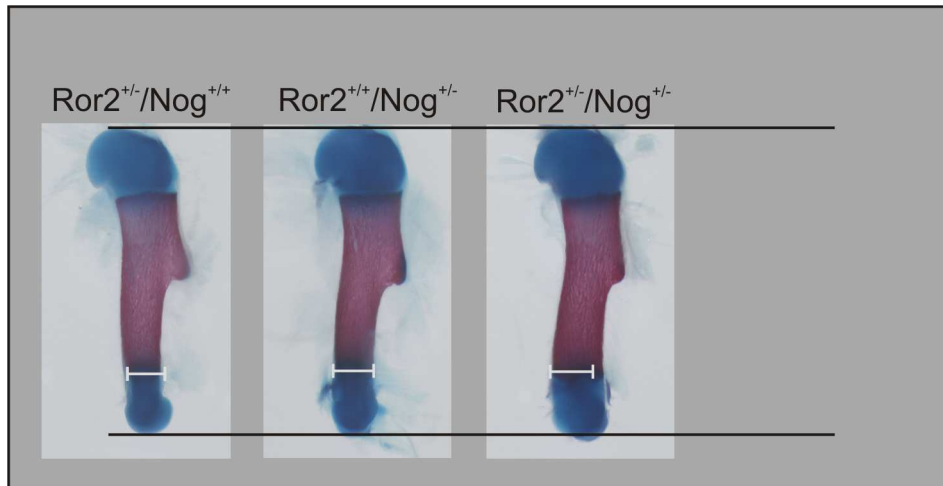


Abb. 18a: Phänotypenanalyse Ror2- und Noggin-defizienter Mäuse

Humeri neugeborener Mäuse unterschiedlichen Genotyps wurden mit Alcian Blue und Alizarin Red gefärbt: Rot = ossifiziertes Gewebe, blau = Knorpel; Verglichen werden die Gesamtlänge der Knochen und die Breite im Bereich der Wachstumsfuge (weißer Balken). Während sich die Knochenlänge innerhalb der verschiedenen Geno-, bzw. Phänotypen nicht unterscheidet, weist der doppelt heterozygote Phänotyp eine verbreiterte Wachstumsfuge auf.

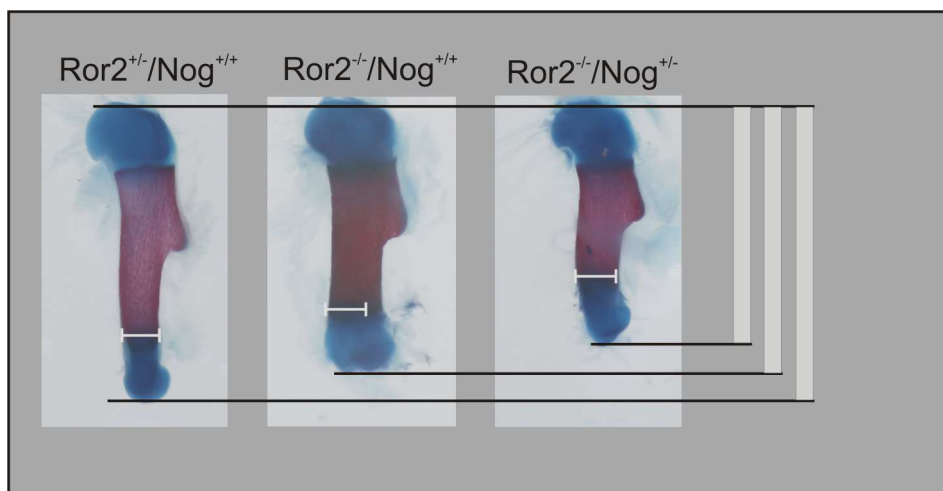


Abb. 18b: Phänotypenanalyse Ror2- und Noggin-defizienter Mäuse

Methode und Färbung wie für Abb.18a beschrieben. Während der Phänotyp mit Ror2-heterozygotem Hintergrund keine Besonderheiten aufweist (vgl. Abb.18a), weisen beide Knochen aus Ror2-homozygot defizientem Hintergrund eine geringere Länge auf, wobei die Verkürzung im Fall Ror2^{-/-}/Nog^{+/-} am extremsten ist. Zusätzlich ist der Humerus des Ror2^{-/-}/Nog^{+/-} Phänotyps in der Wachstumsfuge verbreitert

Sowohl im Fall von $Ror2^{+/-}Nog^{+/+}$, als auch im aus $Ror^{+/+}Nog^{+/-}$ resultierenden Phänotyp sind keine Besonderheiten an der Knochengestalt festzustellen. Zudem unterscheiden sich die beiden Phänotypen nicht voneinander und sind mit dem Wildtyp vergleichbar. Erst im doppelt heterozygoten Fall tritt ein Effekt zu Tage, hier ist der Knochen im Bereich der Wachstumsfuge leicht verbreitert, während die Länge unverändert ist (Abb. 18a).

Im $Ror2$ -defizienten Hintergrund dagegen sind stärkere Abweichungen in der Knochenausbildung zu erkennen. Der komplette Ausfall von $Ror2$ ($Ror2^{-/-}Nog^{+/+}$) wirkt sich im direkten Vergleich mit dem $Ror2^{+/-}Nog^{+/+}$ -Phänotyp, der dem Wildtyp entspricht, sowohl auf Länge als auch auf Breite aus. Der Knorpel ist zum einen insgesamt, besonders aber im Epiphysenbereich verbreitert, zum anderen leicht verkürzt. Der verkürzende Effekt wird bei zusätzlichem Ausfall eines Noggin-Allels ($Ror2^{-/-}Nog^{+/-}$) noch einmal verstärkt. Eine zusätzliche Verbreiterung findet sich hier jedoch nicht (Abb. 18b).

Die Tatsache, dass die Kombination von phänotypisch unauffälligen Genotypen zu Doppelmutanten in der Ausbildung phänotypischer Auffälligkeiten resultiert, legt nahe, dass $Ror2$ und $Noggin$ genetisch miteinander interagieren. Von dieser Interaktion werden sowohl Knochenlänge als auch Knochenbreite beeinflusst.

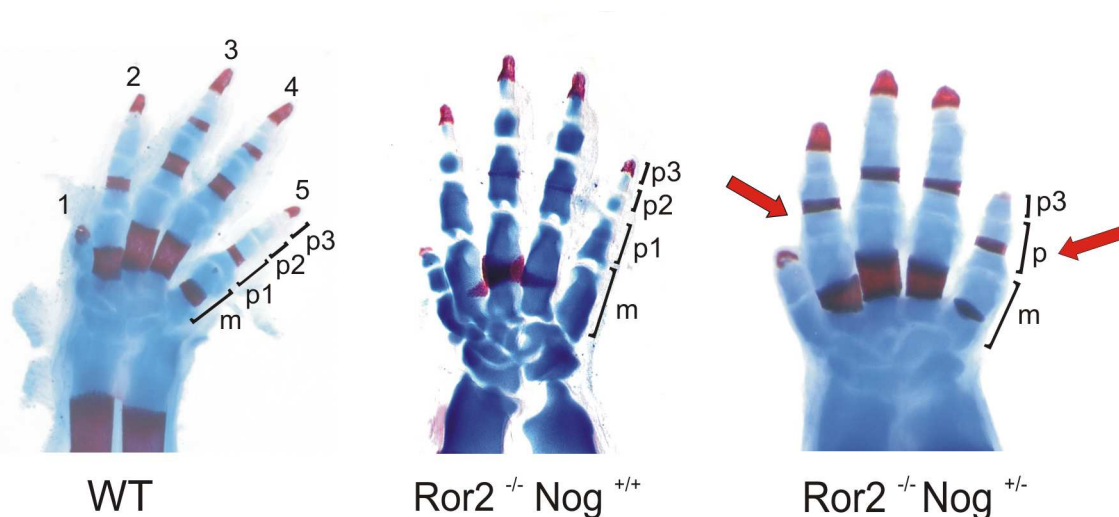


Abb. 18c : Phänotypenanalyse $Ror2$ - und $Noggin$ -defizienter Mäuse

Hände neugeborener Mäuse unterschiedlichen Genotyps wurden mit Alcian Blue und Alizarin Red gefärbt: Rot = ossifiziertes Gewebe, blau = Knorpel

Während der Wildtyp und der $Ror2$ -defiziente Genotyp keine Auffälligkeiten zeigen, weist die Doppelmutante ($Ror2^{-/-}Nog^{+/-}$) einen Brachydaktylie-Phänotyp auf. Es fehlt jeweils eine Phalanx im Finger 2 und 5 (rote Pfeile)

p1, 2, 3 = Phalanx 1, 2, 3; m = Metacarpale; 1-5 = Finger 1-5

Auch bei der Analyse der Hände zeigt sich, dass die Doppelmutante ($Ror2^{-/-}Nog^{+/-}$) phänotypische Besonderheiten aufweist: Während die Finger des Wildtyps und des $Ror2$ -defizienten Genotyps jeweils aus Metacarpale und drei Phalangen bestehen, fehlt der Doppelmutante an Finger 2 und 5 jeweils eine Phalanx. Das bedeutet, dass die $Ror2$ -Noggin-Doppelmutante eine Brachydaktylie aufweist.

Durch das Auftreten phänotypischer Auffälligkeiten in Doppelmutanten, welche aber nicht in Mutanten mit nur einem betroffenen Gen vorkommen, scheint die genetische Interaktion von $Ror2$ und Noggin bestätigt.

5.3 Methodenetablierung - Zytologische und histologische Färbungen mit rekombinantem rGBD-GFP

Die Ligandenbindung eines Rezeptors stellt den initialen Schritt einer Signaltransduktion dar und zieht zunächst die Aktivierung des Rezeptors nach sich. Die Signaltransduktion selbst verläuft meist in mehreren Schritten über die Aktivierung oder Deaktivierung beteiligter Moleküle. Dabei werden Komponenten oft transloziert, z.B. an die Membran rekrutiert oder durch vesikulären Transport in der Zelle verteilt. Die Immunchemie stellt hierbei eine Möglichkeit dar Proteine innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes zu lokalisieren und somit Stimulus-induzierte Veränderungen zu detektieren.

$Ror2$ ist als alternativer Co-Rezeptor in den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg involviert. Hierfür besteht bisher weder auf zytologischer, noch auf histologischer Ebene ein Auslesesystem. Der einzige im Detail bekannte $Ror2$ -vermittelte Signalweg läuft dabei über die kleine GTPase Cdc42. Im Zusammenhang mit GTPasen ist weiterhin bekannt, dass RhoA in der nicht-kanonischen Wnt-Signalkette eine zentrale Rolle einnimmt und zudem $Ror2$ und RhoC in sich entwickelnden Fingerspitzen co-exprimiert werden (Ref. Florian Witte, MPIMG Berlin, Daten noch unveröffentlicht und (Montero et al., 2007)). Dabei ist die Co-Expression in der Fingerspitze besonders interessant, da die humane durch ROR2-Mutationen induzierte Brachydaktylie Typ B und das damit vergleichbare Mausmodell durch den Verlust eben dieser Fingerstruktur gekennzeichnet sind.

Nun soll anhand dieser neuen Methode herausgefunden werden, ob die $Ror2$ -Signaltransduktion möglicherweise via RhoA realisiert wird. Dabei muss zunächst ein System etabliert werden, dass aktive Rho GTPase nachweist. Durch Anwendung dieser

Methode auf Ror2-Mutanten mit gestörter Chondrozytendifferenzierung könnte dann festgestellt werden, ob und in welcher Weise Ror2 die Aktivität von Rho beeinflusst und welche Rolle dies in der Fingerentwicklung spielt. Beim hierfür verwendeten rGBD-GFP handelt es sich um ein Expressionskonstrukt, das die an GFP fusionierte RhoA-bindende Domäne von Rhotekin (rGBD) enthält. Diese rGBD-Domäne bindet spezifisch an die aktive, GTP gebundene Form der RhoA GTPase. Das durch das GFP herbeigeführte Fluoreszenzsignal dieses Konstrukts innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes gibt also Aufschluss über die Lokalisierung der aktiven RhoA GTPase, die Intensität des Signals repräsentiert die Stärke der GTPase-Aktivität ((Benink and Bement, 2005), Bezug der Expressionskonstrukte über A. Schambony, Universität Erlangen).

5.3.1 Aufreinigung des rekombinanten rGBD-GFP

Zur Gewinnung eines rekombinanten Proteins wird das für das entsprechende Protein codierende Gen in einen Expressionsvektor kloniert, mit welchem im Anschluss Bakterien, meist *E.coli*, transformiert werden. Durch IPTG-Stimulation der Kultur wird die Genexpression über die Aktivierung des *lac*-Operons induziert. Das Protein kann nach erfolgter Expression isoliert und aufgereinigt werden.

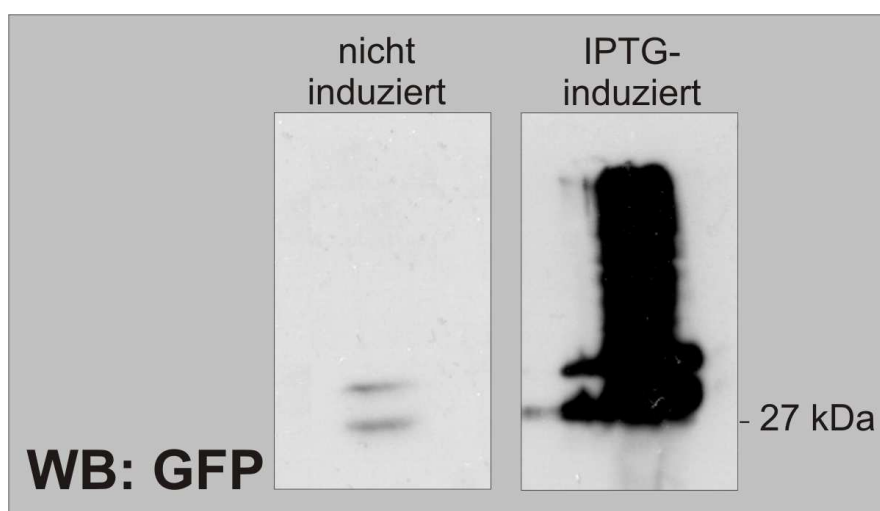


Abb. 19: Western Blot: Expressionsnachweis über anti-GFP Antikörpereinsatz
E.coli des Stamms BL21DE3 wurden mit dem rGBD-GFP Expressionskonstrukt (Referenz: A. Schambony, Erlangen) transformiert und kultiviert. Es folgte die IPTG-induzierte (0,6 mM) Expression über 4 Stunden bei 26°C. Proben der Kultur wurden vor und nach Expression abzentrifugiert, das Pellet mit SDS-Puffer aufgekocht und über SDS-Page aufgetrennt. Die Detektion des rGBD-GFP Konstrukts wurde über anti-GFP (aus Maus) Antikörpereinsatz realisiert.
 links: GFP-Detektion vor IPTG-Gabe rechts: GFP-Detektion nach 4 Stunden IPTG-induzierter Expression. Das Signal nach IPTG-Stimulatoin ist stärker, die Expression des rGBD-GFP Konstrukts hat demnach stattgefunden

Aus Abb. 19 lässt sich erkennen, dass das GFP-Signal nach der IPTG-induzierten Expression deutlich stärker ist. Das heißt, dass die Induktion der Konstruktexpression erfolgreich war und das Protein nach Expression in den Bakterien angereichert vorliegt.

Bei Aufreinigungen, die über mehrere Schritte laufen, droht bei jedem Schritt die Gefahr das Protein zu verlieren. Um den Erfolg einer Aufreinigung zu überprüfen oder gegebenenfalls festzustellen an welcher Stelle das Protein verloren ging, empfiehlt es sich Proben von jeder Reinigungsstufe zu nehmen und diese zu analysieren.

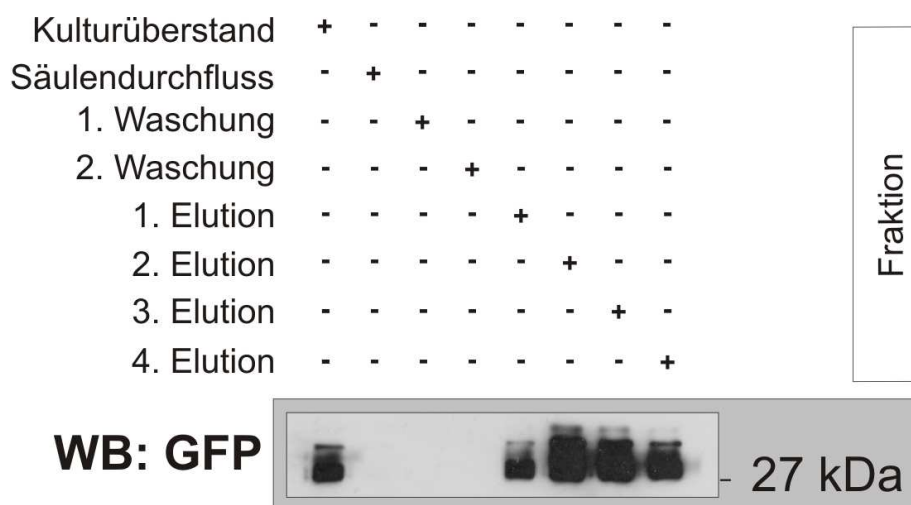


Abb. 20: Western Blot: Kontrolle der Aufreinigung über anti-GFP Antikörpereinsatz

Von jedem Schritt der nach Protokoll durchgeführten Aufreinigung wurden 5 µl abgenommen und über das Western-Blot-System mit anti-GFP (aus Maus) Antikörper analysiert. Es zeigt sich, dass nur im Überstand der pelletierten Expressionskultur und den finalen Elutionsfraktionen ein GFP detektierbar ist.

Es zeigt sich, dass GFP im Überstand der abzentrifugierten Expressionskultur, sowie den finalen Elutionsfraktionen detektierbar ist, während die Proben der Waschschritte und des Säulendurchflusses kein GFP enthalten. Das stärkste Signal ist hierbei in der 2. und 3. Elutionsfraktion festzustellen. Somit war die Aufreinigung des Proteins erfolgreich und lediglich im Überstand der initialen Bakterienkultur kam es zu einem geringen Verlust des Proteins.

5.3.2 Zytologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP

Es ist bereits bekannt, dass die Stimulierung von Ror2 mit Wnt5A einen über kleine GTPasen laufenden Signalweg induziert. Um den Nachweis der aktiven Rho GTPase mittels rGBD-GFP zu etablieren wurden Cos1-Zellen daher mit hRor2 transfiziert und mit Wnt5A stimuliert.

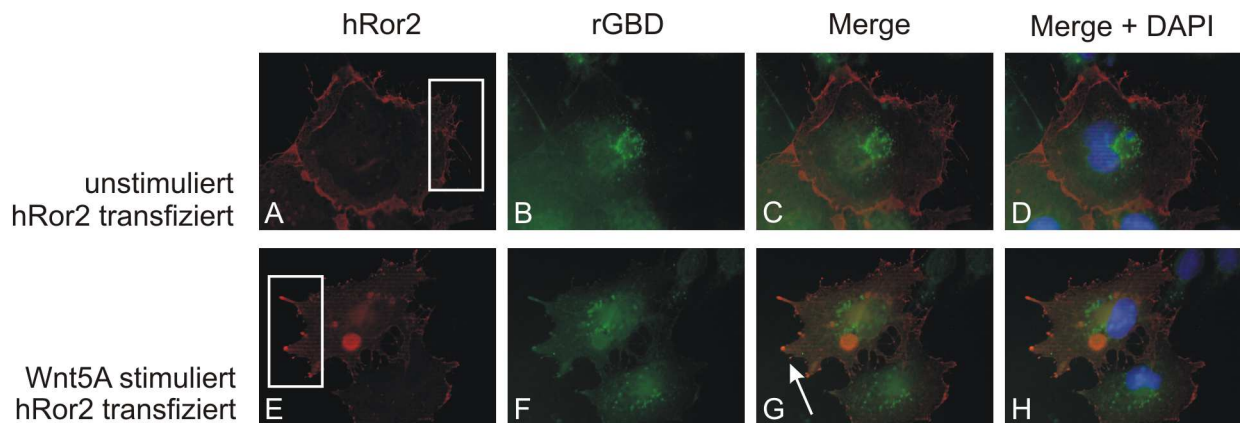
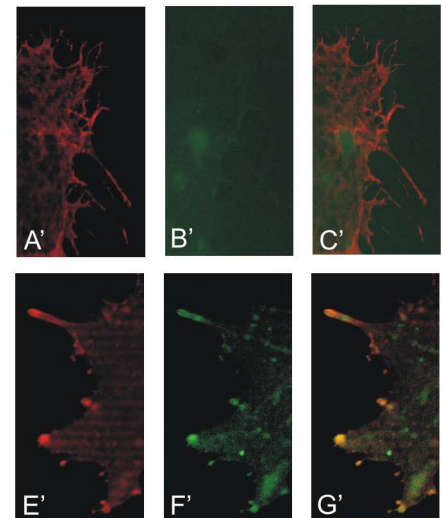


Abb. 21: Zytologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP

Cos-1 Zellen wurden mit wt-hRor2 transfiziert. Die Detektion erfolgte über einen anti-hRor2 (aus Ziege) Antikörper und einen Fluoreszenzgekoppelten sekundären anti-Ziege Antikörper. rGBD-GFP wurde wie ein Antikörper zur Detektion der aktiven Rho GTPase eingesetzt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Ror2 ist an der Membran lokalisiert, während das rGBD-Signal im perinukleären Raum am intensivsten ist. Übereinstimmungen beider Signale sind mit dem weißen Pfeil markiert. Nach Wnt5A-Stimulation verstärkt sich das GFP-Signal an der Membran der Filopodien. Weiße Rahmen in Bild A und E zeigen den Ausschnitt der Vergrößerungen (A'-G') an. Vergrößerung: 63-fach



Auf den Aufnahmen A und E lässt sich die spezifische Membranlokalisierung von wt-hRor2 erkennen. Der Nachweis der aktiven Rho GTPase durch rGBD zeigt das stärkste Signal im perinukleären Raum, wobei die granuläre Struktur des Signals auffällt. Die unterschiedliche Lokalisierung der Signale zeigt, dass Ror2 und aktives RhoA in der Zelle zunächst räumlich voneinander getrennt agieren. Diese Situation ändert sich aber durch Wnt5A-Stimulation. Hier zeigen sich Übereinstimmungen im Bereich der Filopodien-Zellmembran (Pfeil im Bild G; Vergrößerung A'-C'). Die Wnt-Stimulation führt also zu einer Rekrutierung der aktiven

RhoA-GTPase an die Zellmembran im Bereich der Filopodien. Zudem spricht die Spezifität des Signals für ein grundsätzliches Funktionieren dieser neuen Detektionsmethodik.

5.3.3 Histologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP

Nach dem Nachweis der Rho GTPase in isolierten Zellen stellt ihre Detektion in einem komplexen Gewebe den nächsten Schritt der Methodenetablierung dar. Nach der hier gezeigten Etablierung auf Wildtyp-Gewebe könnten nachfolgend Detektionen auf Gewebeschnitten von Ror2-Mutanten durchgeführt werden. So könnte der Vergleich der RhoA Aktivität im Wildtyp und im BDB-Mausmodell Aufschluss über mögliche Interaktionen von RhoA und Ror2 geben. Ror2 ist maßgeblich an der Etablierung der Extremitätenstruktur beteiligt. Wenn die Ror2-vermittelte Signaltransduktion über RhoA abläuft, sollte demnach von einer erhöhten GTPase-Aktivität im sich differenzierenden Gewebe ausgegangen werden.

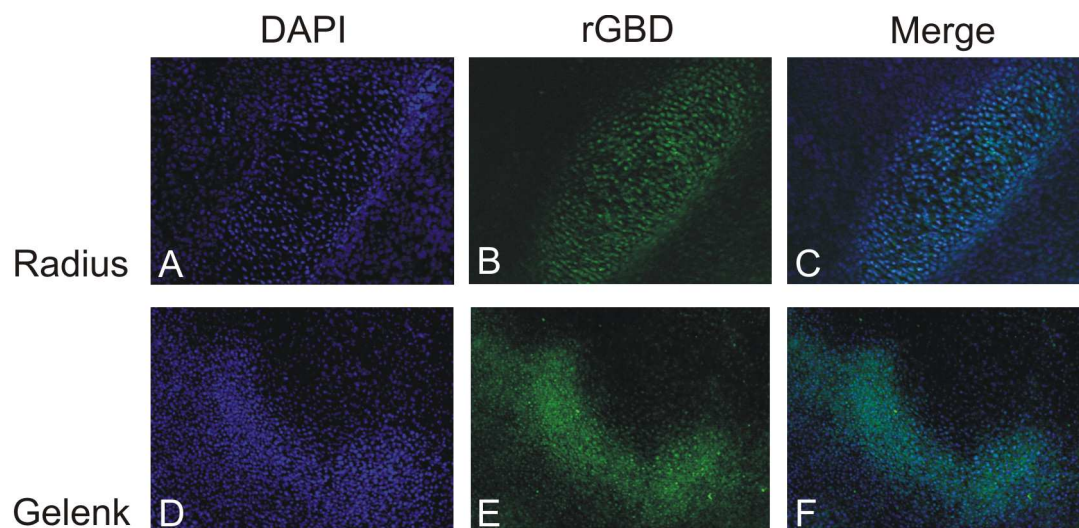


Abb. 22: Histologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP

Kryolängsschnitte einer Vorderextremität eines 13,5dpc wt-Mausembryos wurde mit rekombinantem rGBD-GFP (1:20, über 1 Std.) inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Beide Signale sind im Bereich der Zellkondensation stärker als im umgebenden Gewebe, wobei das rGBD-GFP Signal stärker auf den Kondensationsbereich beschränkt ist als das DAPI-Signal

Vergrößerung: 63-fach

Zu erkennen sind die Zellkondensationen im Bereich der Radiusanlage und im Bereich eines in Bildung begriffenen Gelenks. Die DAPI-Färbung zeigt die Lage der Zellkerne an, während die Färbung mittels rGBD-GFP die aktive Rho GTPase nachweist. Beide Farbsignale weisen grob zunächst Überlappungen im Bereich der Kondensationen auf. Hierbei ist aber zu erkennen, dass sich das rGBD-Signal im Kondensationsbereich deutlich von Hintergrundsignal absetzt. Es konnte also eine potentielle Aktivierung der Rho-GTPase im Bereich der Radiusanlage und im Bereich des entstehenden Gelenks gezeigt werden.

Somit war die Etablierung des Nachweises aktiver RhoA-GTPase mittels rekombinantem rGBD-GFP sowohl auf Ebene der Zellkultur, als auch auf histologischen Schnitten erfolgreich.

6 Diskussion

6.1 Ror2 und Noggin interagieren über die CRD-Domäne

Grundsätzlich ist zu erwähnen, dass es sich bei der CoIP-Methode um ein artifizielles System handelt, da sowohl mit Überexpression als auch mit tags gearbeitet wird. Beides kann einen Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen haben. Um diesen auszuschließen und die Interaktion zu bestätigen ist es sinnvoll die Interaktionsstudien unter Verwendung von rekombinanten und unmarkierten Proteinen im Zuge eines BiaCore-Assays zu wiederholen. Die hierfür notwendigen Klonierungen und Aufreinigungen wurden daher bereits begonnen. Doch insgesamt bietet die CoIP eine fundierte Möglichkeit relativ einfach und schnell einen ersten Eindruck von Proteininteraktionen zu gewinnen.

Da sich Noggin bei Co-Expression mit dem Leervektor pcDNA3 nach der IP nicht detektieren lässt, bindet Noggin nicht an die leeren Agarose anti-FLAG beads. Eine Detektion von Noggin nach dem Pulldown kann demnach nur durch eine Interaktion mit einem an die beads bindenden Protein zurückzuführen sein. Zwar binden alle verwendeten Ror2-Konstrukte über ihren FLAG-tag an die beads, doch ein Nachweis von Noggin ist nur bei Co-Expression mit der „volle Länge“-Variante des Rezeptors möglich. Dies lässt darauf schließen, dass Noggin und wt-Ror2 tatsächlich interagieren und so Noggin an wt-Ror2 gebunden mit aus dem Lysat gezogen wird.

Hierbei ist hervorzuheben, dass die hier identifizierte Interaktion eines sezernierten Bmp-Antagonisten mit einem Rezeptor zuvor noch nie beschrieben wurde. Damit könnte Noggin neben der Inhibierung des Bmp-Signalwegs eine weitere Funktion im Sinne einer Signalweg-Aktivierung zukommen. Für den Wnt-Signalweg ist solch ein Fall mit dem sezernierten Wnt-Antagonisten Dkk (Dkk) bereits bekannt. Dieser bindet an den Wnt-Co-Rezeptor Lrp. Dadurch wird zum einen die Bindung der Wnts an Lrp verhindert, was eine Hemmung des kanonischen Wnt-Signalwegs nach sich zieht. Zum anderen kann Dkk in Interaktion mit Lrp den Wnt-Signalweg aber auch aktivieren (Li et al., 2002).

In Bezug auf die Ror2-Noggin Interaktion kann zum momentanen Zeitpunkt noch nicht gesagt werden, ob es sich um eine direkte Bindung handelt oder ob hierbei noch andere Adaptermoleküle oder Co-Rezeptoren eine Rolle spielen. Da jedoch bei alleinigem Verlust der CRD-Domäne die Proteininteraktion verloren geht, ist bereits klar, dass diesem Teil des

Rezeptors essentielle Bedeutung bei der Ausbildung der Bindung zukommt. Die CRD-Domäne tritt in konservierter Form auch in anderen Rezeptoren, u.a. dem Wnt-Rezeptor Frizzled auf (Masiakowski and Yancopoulos, 1998). Demnach sollte in weiterführenden Studien die Interaktion von Noggin mit anderen Rezeptoren, die die CRD-Domäne besitzen untersucht werden. Am Fzd-Rezeptor vermittelt die CRD-Domäne die Bindung der Wnt-Liganden. Durch den Umstand, dass die Bindung der Wnt-Liganden auch an ihrem alternativen Rezeptor Ror2 über die CRD-Domäne realisiert wird, ermöglicht hier eine weitere Verknüpfung des Bmp- und Wnt-Signalwegs über Ror2.

6.2 Beeinflussung der Ror2-Dimerisierung durch Noggin

Die Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase folgt typischerweise einer ligandeninduzierten Dimerisierung. Dabei kann dem Ligand die Stabilisierung eines schon bestehenden Dimers oder aber die tatsächliche Induktion der Dimerisierung als Funktion zukommen. Die Dimerisierung selbst wird über die Transmembrandomänen der Rezeptoren vermittelt, die Art der Dimerisierung (Homo- oder Heterodimer) dagegen hängt oft vom Liganden ab. Durch das Vorliegen im Komplex schließlich wird durch eine *trans*-Autophosphorylierung der Rezeptor aktiviert und eine Signaltransduktion initiiert (Li and Hristova, 2006).

Da es sich bei Noggin um ein homodimeres Protein handelt, lag die Vermutung nahe, dass es an einen dimeren Ror2-Rezeptorkomplex bindet, bzw. die Bindung an Ror2 zu einer Dimerisierung desselben führt. Um dies zu überprüfen, wurden jeweils ein FLAG-getagtes und ein ungetagtes Ror2-Konstrukt co-transfiziert und -exprimiert. Über die Immunopräzipitation mit anti-FLAG beads kann das getagte Ror2-Konstrukt aus dem Lysat gezogen werden. Sollte die Noggin-Stimulation wie erwartet zu einer Rezeptordimerisierung führen oder diese zumindest verstärken, so müsste es möglich sein über diese Komplexbildung das ungetagte Ror2 mit aus dem Lysat zu ziehen und nach der IP über einen Ror2-Antikörper zu detektieren. Als ungetagter Rezeptor wurde die intrazellulär membranproximal der Tyrosinkinase trunke Variante hRor2-1396insA gewählt, da sich anhand des aus der Trunkation resultierenden Größenunterschieds die co-exprimierten Rezeptoren auf dem Blot unterscheiden lassen. Um zusätzlich die an der Dimerisierung beteiligten Domänen bestimmen zu können, wurde neben dem wt-Ror2 Konstrukt auch der CRD-trunke Rezeptor (Ror2 Δ CRD) als FLAG-getagte Rezeptorversion verwendet.

Da sich das ungetagte hRor2-1396insA nach der IP auf dem Blot nicht detektieren lässt, bindet es nicht an die leeren beads. Ebenso wenig lässt sich hRor2-1396insA nach Immunopräzipitation detektieren, wenn es mit Ror2 Δ CRD co-exprimiert wurde, was eine essentielle Bedeutung der CRD-Domäne für die Dimerisierung andeutet. Werden aber getagtes wt-Ror2 und hRor2-1396insA nebeneinander exprimiert, so lässt die Detektion beider Proteine nach IP darauf schließen, dass zwischen den beiden eine Interaktion stattfindet und hRor2-1396insA im Komplex mit wt-Ror2 über dessen FLAG-tag aus dem Zelllysat gezogen wird. Auch hierbei kommt der CRD-Domäne also eine essentielle Bedeutung zu.

Wäre die Dimerisierung allein der Bindung von Noggin an Ror2 zuzuschreiben, so wäre zu erwarten, dass die stimulusfreie Co-Expression von wt-Ror2 und hRor2-1396insA zu keiner Dimerisierung führt. Die Detektion beider Konstrukte nach dem Pulldown widerspricht dieser Erwartung jedoch. Auch lässt sich nach Noggin-Stimulation keine Intensivierung der Banden erkennen, die auf eine erhöhte Dimerisierungsrate durch Noggin-Einfluss schließen lassen würde. Erste, noch unveröffentlichte Ergebnisse der Co-Patching Studien zur Dimerisierung von Ror2, die in Kooperation mit Petra Knaus (FU Berlin, Inst. für Biochemie) und Yoav Henis (Tel-Aviv University, Dep. of Neurobiology) erzielt wurden, bestätigen diese Ergebnisse. Demnach liegen bei der Rezeptorüberexpression rund 45% der Ror2-Rezeptoren bereits im homodimeren Zustand vor, wobei auch hier Stimulation mit Noggin zu keiner Erhöhung dieser Rate führt. Um den tatsächlichen Einfluss Noggins auf die Ror2-Dimerisierung zu analysieren, müsste man demnach dem Einfluss der Überexpression ausweichen und eine IP auf endogenes Ror2 durchführen. Um die Dimer-Komponenten zu unterscheiden, müssten hierfür aber eine getagte und eine ungetagte Ror2-Version unterschiedlicher Länge endogen co-exprimiert werden. Hierfür wäre es denkbar murine embryonale Fibroblasten des heterozygoten Brachydaktylie B1-Mausmodells (W749X(Flag), (Raz et al., 2008)) in Kultur zu nehmen. Dieses System ist momentan jedoch noch nicht realisiert.

6.3 Ror2 wird nach Noggin-Stimulation phosphoryliert

Um die funktionelle Relevanz der Bindung von Noggin an Ror2 zu erfassen und so einen ersten Einblick in die der Bindung folgenden intrazellulären Ereignisse zu erlangen, wurde der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors überprüft.

Es ist bereits bekannt, dass Ror2 über die prolinreiche Domäne mit der Casein Kinase I (CKI) interagiert und dadurch an der proximalen Serin/Threonin-reichen Domäne phosphoryliert wird. Dies führt zur Autophosphorylierung der tyrosinreichen Domäne und letztlich zur Rezeptoraktivierung, denn der Übertrag der Phosphatgruppe auf die tyrosinreiche Domäne aktiviert die Tyrosinkinase. Dies initiiert schließlich über die Phosphorylierung der G-Protein gekoppelten Rezeptor Kinase 2 (GRK2) (Kani et al., 2004). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation mit Wnt5A zur Serin/Threonin-Phosphorylierung des Rezeptors führt und so der Wnt/JNK-Signalweg aktiviert wird. Hierbei wird die Rezeptoraktivierung über die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) erzeugt (Yamamoto et al., 2007). Daher diente die Überexpression der CKI, sowie die Stimulation mit Wnt5A als Positivkontrolle, während die Inkubation des Lysats mit alkalischer Phosphatase (SAP) als Negativkontrolle diente, da dies zu einer aktiven Dephosphorylierung des Rezeptors führt. Der Vergleich von un- und Noggin-stimuliertem wt-Ror2 zeigt deutlich, dass die Serin/Threonin-reiche Domäne des unstimulierten Rezeptors dephosphoryliert vorliegt, während am stimulierten Rezeptor eine Phosphorylierung detektierbar ist. Noggin-Stimulation der CRD-trunkierten Rezeptorversion dagegen führt zu keiner Phosphorylierung, was erneut die essentielle Bedeutung dieser Domäne für die Ror2-Noggin Interaktion zeigt.

Diese Ergebnisse führen gemeinsam mit den Ergebnissen der Kartierung der Rezeptorbeteiligung zur Hypothese, dass Noggin über die CRD-Domäne an Ror2 bindet und der Rezeptor daraufhin an der Serin/Threonin-reichen Domäne phosphoryliert wird. Ob es sich bei der Phosphorylierung um eine direkte Folge der Noggin-Bindung handelt und der Rezeptor tatsächlich aktiviert wird, kann dabei momentan noch nicht gesagt werden. Hierfür sollte die Rezeptoraktivierung durch den Nachweis der Tyrosin-Phosphorylierung, welche eine Aktivierung der Tyrosinkinase nach sich ziehen würde, verifiziert werden. Die hierfür notwendigen Assays wurden zwar bereits durchgeführt, führten aber bisher auf Grund von Detektionsproblemen in Bezug auf den anti-phospho-Tyrosin Antikörper zu keinem Ergebnis, da selbst in der Positivkontrolle (durch CKI-Überexpression forcierte Ror2-Aktivierung) kein Signal detektierbar war.

Da die die Phosphorylierung der Serin/Threonin-reichen Domäne aber typischerweise bereits den initialen Schritt in der Rezeptor-Aktivierung und damit den ersten Schritt eines Signalwegs darstellt, ist es denkbar, dass im Fall von Ror2 und Noggin die Noggin-Bindung zunächst zur Rekrutierung einer Serin/Threonin-Kinase führt. Dies könnte die Aktivierung der Tyrosinkinase nach sich ziehen und schließlich einen eigenen Ror2-Signalweg induzieren. Dabei ist es sowohl denkbar, dass dieser über mehrere Schritte zur Expression spezifischer

Zielgene führt, als auch, dass es zu einer intrazellulären Beeinflussung bereits bekannter Signalwege kommt. Um die Frage nach der Phosphorylierungsart und der daran beteiligten Komponenten zu beantworten, wäre es denkbar die potentiell beteiligten Kinasen, z.B. GSK3, spezifisch zu inhibieren und so deren Beteiligung an der Phosphorylierung zu überprüfen. Zudem ist noch ungeklärt, ob allein die Bindung von Noggin die Phosphorylierung veranlasst oder zusätzlich andere Rezeptoren und/ oder sezernierte Liganden unter Noggin-Stimulus an der angenommenen Rezeptoraktivierung beteiligt sind.

6.4 Mögliche Auswirkungen der Interaktion von Ror2 und Noggin

Wnt- und Bmp-Signalwege agieren teils getrennt voneinander, doch sind sie teilweise auch an gemeinsamen Prozessen beteiligt. Dabei wirken sie meist antagonistisch aufeinander. So fördern Wnts die Myo- und hemmen die Chondrogenese, während Bmps hemmend auf Myo-, dafür steigernd auf Chondrogenese wirken. Ebenso wirken beide Signalwege antagonistisch in der Melanozyten-Segregation während der Neurogenese (Jin et al., 2001). Interessant hierbei ist, dass Wnt1 in der Lage ist die Noggin-Expression zu induzieren, was wiederum die Hemmung des Bmp-Signalwegs nach sich ziehen würde (Hirsinger et al., 1997).

Stellt man Ror2 an zentrale Stelle zwischen Bmp- und Wnt-Signalweg, so sind mehrere Möglichkeiten denkbar, wie sich die Interaktion von Ror2 und Noggin auf das balancierte Gleichgewicht der Signalwege auswirken könnte:

Die Bindung Noggins an Ror2 könnte auf der einen Seite zu einer Herabregulierung der Bmp-Inhibition führen, da weniger Noggin zur Bmp-Ligandenbindung frei ist. Auf der anderen Seite könnte das gebundene Noggin am Ror2 die Bindestelle für die Wnt-Liganden blockieren. Dadurch könnten zum einen die Ror2-vermittelten

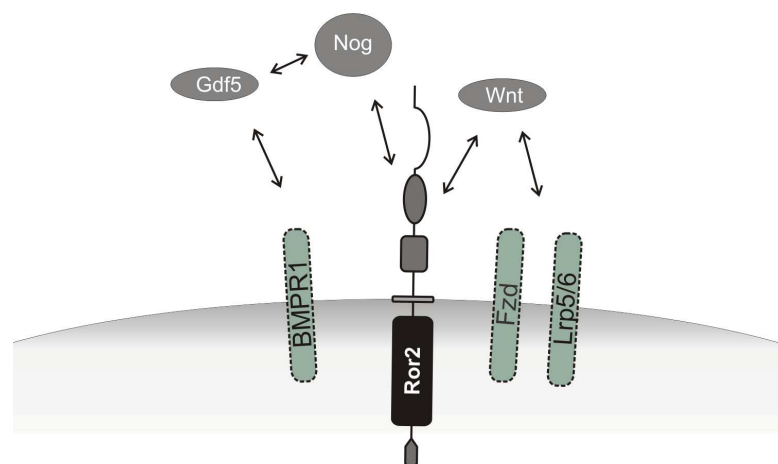


Abb. 23: Ror2 als Schaltstelle zwischen Bmp- und Wnt-Signalweg
Schematische Übersicht über die Ligand-Rezeptor-Interaktionen im Signalnetzwerk um Ror2. Gdf5 bindet an BMPRI. Noggin bindet als Antagonist an Gdf5 und als Ligand an Ror2. Wnt bindet an Fzd und Lrp, sowie an Ror2

Wnt-Signalwege nicht mehr induziert werden, zum anderen ständen mehr freie Wnt-Liganden für die Bindung an die Rezeptoren Frizzled und Lrp zur Verfügung. Dies würde z.B. bedingen, dass der Wnt-induzierte Wnt/ β -Catenin-Signalweg verstärkt ablaufen könnte. In diesem Zusammenhang ist auch auf die konträre Situation zu verweisen. Durch die Bindung der Wnts an Ror2 stände der Rezeptor nicht mehr für die Interaktion mit Noggin zur Verfügung, was eine erhöhte Bmp-Inhibition nach sich ziehen würde. Ror2 und Noggin könnten so als verbindende Schaltstelle das Gleichgewicht zwischen Bmp- und Wnt-Signalweg durch Verschieben des balancierten Gleichgewichts regulieren und beide miteinander verknüpfen.

6.5 Phänotypenanalyse – Ror2 und Noggin interagieren genetisch

In den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Noggin *in vitro* an Ror2 bindet, woraufhin der Rezeptor über Phosphorylierung möglicherweise aktiviert wird. Die Analyse der genetischen Interaktion dient nun dazu die gezeigte *in vitro* Interaktion zu stützen und die *in vivo* Auswirkungen zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass der Verlust nur eines Allels Ror2 oder Noggin in den Genotypen Ror2^{+/+}Nog^{+/-} und Ror2^{+/-}Nog^{+/+} keine Auswirkung auf die Knochenausbildung hat, der kombinierte Verlust von Allelen beider Gene dagegen zu einer Verbreiterung der Metaphyse im Humerus und zur Ausbildung einer Brachydaktylie in der Hand führt. Zur Entstehung dieser Situation sind verschiedene „Szenarien“ denkbar:

Sind durch den heterozygoten Zustand nur halb so viele Ror2-Rezeptoren vorhanden, reicht dies immer noch aus, um die für eine ordnungsgemäße Knochenentwicklung nötige Signaltransduktion aufrecht zu erhalten. Ebenso verhält es für den Zustand mit nur heterozygot vorhandenem Noggin. Die reduzierte Anzahl an vorhandenen Noggin-Molekülen genügt für die korrekte Knochenbildung. Erst bei dem Fehlen je eines Allels beider Gene kann dieser Prozess nicht mehr aufrechterhalten werden, weshalb es zu einer Fehlregulierung der Chondrozytendifferenzierung kommt. Das Auftreten eines Phänotyps bei einem doppelt heterozygoten Mutanten deutet immer darauf hin, dass beide beteiligten Gene in einem bestimmten Prozess, hier der Chondrozytendifferenzierung, in einem gemeinsamen Signalweg agieren. Die im Zuge der Phänotypenanalyse gezeigte Brachydaktylie und die zusätzliche Humerusverkürzung tritt allerdings erst im Ror2^{-/-}Nog^{+/-} Zustand auf. Sollte es ausschließlich einen direkten Signalweg von Noggin über Ror2 auf ein Zielgen geben, sollte

man hier eigentlich keinen zusätzlichen Phänotypen erwarten. Daher ist eher davon auszugehen, dass Ror2 und Noggin in einem gemeinsamen Signalnetz interagieren. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass Ror2-KO- und Nog-KO-Mutanten allein unterschiedliche Phänotypen aufweisen.

Hierbei muss auch die nächst höhere Stufe der Komplexität betrachtet werden, da Noggin und Ror2 neben der Interaktion miteinander noch andere Aufgaben zukommen. Das im heterozygoten Zustand vorhandene Noggin muss auch noch die Liganden-bindende Funktion zur Bmp-Inhibition erfüllen. Ror2 fungiert auch im heterozygoten Zustand weiterhin als alternativer Wnt-Rezeptor. Hierdurch kann es zum Verschieben des balancierten Gleichgewichts zwischen diesen Signalwegen kommen (siehe Abschn. 6.4).

Wie wichtig die Noggin-Ror2 Interaktion für die Etablierung der Extremitätenstruktur ist, zeigt sich bereits bei homozygotem Ror2-Verlust. Da kein Ror2 zur Bindung Noggins zur Verfügung steht, könnte dieses vermehrt an Bmps binden, d.h. die Bmp-induzierte Chondrogenese würde gehemmt. Der in dieser Arbeit gezeigte Brachydakylie-Phänotyp weist Überlappungen mit dem Phänotyp der humanen BDA2 auf. Diese wiederum beruht auf einer Mutation im BMPR1b, was ebenfalls eine Inhibition des Bmp-Signalwegs nach sich zieht. Neben Mutationen im ROR2 und im BMPR1b führen auch Mutationen im NOGGIN zur Ausbildung einer Brachydakylie (BDB2). Hierbei könnte das veränderte Bindungsverhalten NOGGINS zur Verschiebung des Signalgleichgewichts führen. Bände das mutierte NOGGIN schwächer an ROR2, würde der BMP-Signalweg durch stärkere Inhibition verringert ablaufen, was eine verringerte Chondrogenese nach sich zöge.

Fällt beim $Ror2^{-/-}Nog^{+/+}$ Genotypen zusätzlich ein Allel Noggin aus ($Ror2^{-/-}Nog^{+/-}$), so verändert sich quantitativ der Einfluss Noggins auf den Bmp-Signalweg. Zudem fehlt in beiden Ror2-defizienten Genotypen vollständig der Ror2-Einfluss auf die Wnt-Signalwege. Anhand dieser Überlegungen wird deutlich, wie wichtig die Abstimmung der verschiedenen auf die Chondrozytendifferenzierung einwirkenden Signalwege ist und wie Missregulationen des bestehenden Gleichgewichts zur Ausbildung verschiedener Fehlbildungen führen könnten. Die Tatsache, dass Mäuse mit unterschiedlicher Ror2- und Noggin-Defizienz verschiedene Phänotypen ausbilden unterstreicht die Bedeutung der beiden Gene und ihrer Interaktion innerhalb dieses spezifischen Prozesses. Zudem zeigt sich, dass der Einfluss von Noggin und Ror2 auf diese Maschinerie zwar immens, aber erst unzureichend verstanden ist.

6.6 Zytologische und histologische Färbungen mit rGBD-GFP

Wnt-induzierte Ror2-Signalwege laufen über mehrere Schritte ab. Hierbei wird das extrazelluläre Signal je nach Liganden- und Rezeptorkontext unter Beteiligung verschiedenster Komponenten verarbeitet und umgesetzt. Die Signaltransduktion selbst läuft dabei u.a. über die Aktivierung kleiner GTPasen. Dies wurde für Cdc42 im Wnt5A/Ror2/ATF2 bereits gezeigt (Schambony and Wedlich, 2007). GTPasen binden die Nukleotide GDP und GTP. Im aktiven, GTP-gebundenen Zustand sind sie in der Lage eine Phosphatgruppe auf ein anderes Molekül der Signalkette zu übertragen. Durch den Übertrag dieser einen Phosphatgruppe gehen sie in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand über. Eine erneute Phosphatgruppen-Aufnahme führt wiederum zur Reaktivierung. Fast alle GTPasen sind membranassoziiert, können aber auch in ihrem inaktiven Zustand stabilisiert im Cytoplasma gehalten werden. GTPasen sind an der Regulation von Endo- und Exocytose, an Zelldifferenzierung und -migration sowie intrazellulärem Vesikeltransport beteiligt. Ror2 ist bekanntlich über Wnt-Stimulierung in die Steuerung der Zellpolarität und -migration eingebunden (Green et al., 2008; He et al., 2008). Die ebenfalls an diesen Prozessen beteiligten GTPasen sind Rho, Rac und Cdc42. Zudem ist RhoA an der Chondrogenese beteiligt. Während der Chondrogenese führt die Zellpolarität der Chondrozyten zu einer spezifischen Anordnung im Kondensationsbereich. Um herauszufinden, ob die Ror2-Signaltransduktion über Rho läuft und ob Ror2 in diesen Prozessen RhoA aktivieren kann, musste zunächst eine Methode etabliert werden, mit der aktive GTPase detektiert werden kann. Das hierfür verwendete Protein, rGBD-GFP, besteht aus der aktiven Bindedomäne von Rotheikin (rGBD) und einem daran fusionierten GFP. Das bedeutet, dass das wie ein Antikörper eingesetzte Protein an aktive RhoA-GTPase bindet und damit die GFP-Signaldetektion das Vorhandensein und die Intensität der GTPase-Aktivität repräsentiert. Die Aktivierung der GTPase geht meist einher mit einer Rekrutierung an die Membran. Zu erwarten wäre also, dass Wnt-induzierte Ror2- und RhoA-Aktivierung eine Rekrutierung RhoAs an die Membran nach sich zieht und das detektierte GFP-Signal dort stärker ausfällt. Es zeigt sich zunächst, dass das GFP-Signal im unstimulierten Fall nicht mit der Membranfärbung übereinstimmt, und sowohl im un- als auch im stimulierten Fall im perinukleären Raum am intensivsten ist. Doch die Tatsache, dass es sich vom Hintergrund abhebt spricht für die Spezifität der Bindung.

Es ist bekannt, dass RhoA in die Umstrukturierung des Aktinskeletts involviert ist, welche u.a. bei Überexpression von Ror2 in Form von Filopodienausbildung induziert wird.

Überlappungen beider Signale an den distalen Filopodienenden nach Wnt-Stimulation bestätigen diese Verbindung und sprechen für einen gemeinsamen Signalweg. Zwar liegt auch im stimulierten Fall noch immer ein starkes Signal um den Nucleus vor, doch ist auch nicht zu erwarten, dass alles in der Zelle vorhandene RhoA an die Membran rekrutiert wird. Neben der bekannten Hauptfunktion, die Umstrukturierung des Zytoskeletts bringen Studien, welche die Lokalisierung und Funktionen der GTPasen beschreiben, RhoA auch mit Vesikeltransport im Zuge von Endo- und Exocytose in Verbindung (Heasman and Ridley, 2008). Die granuläre Struktur des Signals würde dies unterstützen, doch ist die perinukleäre Lokalisierung des Signals dadurch nur unzureichend erklärt. Die Ansammlung des Signals in diesem Bereich spricht eher für eine Lokalisierung am ER, späten Endosomen oder dem Golgiapparat. GTPase-Aktivitäten in Endosomen und dem Golgi sind für Cdc42 und RhoB bereits beschrieben (Ridley, 2006), während bisher keine GTPase-Aktivität im ER beschrieben wurde. Beim Einsatz des rGBD-GFPs auf differenziertem Gewebe zeigt sich, dass das grün fluoreszierende Signal im Bereich der Kondensation stärker ist als im umgebenden Gewebe. Die Gegenfärbung mit DAPI weist keinen so deutlichen Unterschied in der Signalintensität auf. Demnach scheint auch hier die Spezifität gegeben zu sein. Die lokal intensivere Signalstärke spricht daher dafür, dass die über rGBD-GFP detektierte Rho-Aktivität im Bereich der differenzierenden Chondrozyten höher ist als im mesenchymalen Gewebe. Sowohl Ror2 als auch Rho sind in die Ausbildung der Zellpolarität und –migration involviert (Green et al., 2008; Heasman and Ridley, 2008). Die genaue Ausrichtung der Zellen bei der Ausbildung von Knorpel, Knochen und Gelenken baut auf diesen Prozessen auf, so dass eine Beteiligung von Rho wahrscheinlich ist. Studien zur RhoA-Aktivität bestätigen dies durch die Feststellung, dass RhoA im Zuge der Chondrogenese die Abrundung der mesenchymalen Zellen während der Kondensation kontrolliert (Riento and Ridley, 2003; Woods and Beier, 2006).

Um die Spezifität des Signals abzusichern und die hier erst grob detektierte Lokalisierung zu spezifizieren, sollten zur Methodenetablierung weitere Versuche durchgeführt werden. Dabei wäre es zunächst sinnvoll, parallel zur RhoA-Detektion Marker für Golgi und ER einzusetzen. Zusätzlich muss ausgeschlossen werden können, dass es sich beim detektierten Signal um ein Artefakt des GFPs handelt. Dafür sollte eine sichere Negativkontrolle entwickelt werden, denkbar wäre hier GFP ohne fusionierte Bindedomäne. Zudem sollte die Optimierung der Methode über Variationen von Konzentration und Inkubationszeit des rekombinanten Proteins erfolgen. Um letztlich den Ror2-Einfluss auf Rho-Proteine im Zuge der Chondrogenese und weitergreifend im Zuge der Extremitätenentwicklung zu untersuchen, sollte mit der optimierten

Methode nach Veränderungen der Rho-Aktivität und –Lokalisierung in Ror2-Mutanten gesucht werden. So würde z.B. die Detektion von Veränderungen der Rho-Aktivität in den Knorpel- und Knochenanlagen der Brachydaktylie-Phänotypen zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Fehlbildung beitragen. Weiterhin wäre es interessant über diese Methode den möglichen Einfluss Noggins über Ror2 auf diese Prozesse zu untersuchen.

7 Abschließende Betrachtung und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte anhand von CoIP-Experimenten gezeigt werden, dass Noggin und Ror2 *in vitro* miteinander interagieren. Die Bindung Noggins erfolgt dabei über die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne CRD. Ob diese Bindung direkt oder unter Beteiligung anderer Rezeptoren oder Adaptoren erfolgt, kann momentan noch nicht gesagt werden. Der Noggin-Einfluss auf die Rezeptor-Dimerisierung konnte mit den hier verwendeten Methoden zwar nicht gezeigt werden, dafür ließ sich Noggin-Stimulation aber mit einer Phosphorylierung des Rezeptors an der intrazellulären Ser/Thr-Domäne in Verbindung bringen. Da die Rezeptorphosphorylierung für eine Aktivierung Ror2s spricht, ist es wahrscheinlich, dass die gezeigte Interaktion funktionelle Relevanz hat und möglicherweise eine eigene Noggin/Ror2-Signalkette aktiviert.

Rezeptortyrosinkinase-Signalketten laufen häufig über GTPasen. Um festzustellen ob auch im Ror2-Signalweg kleine GTPasen involviert sind, soll weiterführend mit Hilfe rekombinanten rGBD-GFPs geklärt werden. Hierfür wurde innerhalb dieser Arbeit eine neue RhoA-Detektionsmethode etabliert, die es zukünftig zu optimieren gilt. Neben den *in vitro* Untersuchungen wurde als weiterer Aspekt die genetische Interaktion *in vivo* anhand von Phänotypenanalysen untersucht. Durch das Auftreten verschiedener Phänotypen mit auf gestörter Chondrozytendifferenzierung begründeten Fehlbildungen wird die Bedeutung der Ror2-Noggin Interaktion unterstrichen. Dabei bestätigt besonders das Auftreten einer Brachydaktylie durch die genetische Interaktion, bzw. die gestörte genetische Interaktion von Ror2 und Noggin den Ausgangspunkt dieser Arbeit: Überlappende, durch Noggin- und Ror2-Mutationen hervorgerufene Brachydaktylie Phänotypen und die These der „Molecular disease family“ führten zur Annahme, dass beide miteinander interagieren könnten. Das Auftreten eines weiteren überlappenden Phänotyps auf Grund einer Interaktion beider Gene scheint dies zu bestätigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu dem Schluss, dass Ror2 neben seiner Rolle als Wnt-Co-Rezeptor auch an zentraler Stelle zwischen Wnt- und Bmp-Signalweg interagiert. Zudem wird ein eigener Ror2-Signalweg vermutet. Hierbei kommt Noggin möglicherweise eine neue Rolle als Aktivator zu, die bisher noch nicht beschrieben wurde und die von der bekannten Funktion als sezernierter Bmp-Antagonist abweicht. Ob und in welcher Weise tatsächlich ein eigener Noggin-Ror2-Signalweg besteht, welche Komponenten in diesen eingebunden sind und was letztlich der Effekt dieses Weges ist, ist bisher noch nicht klar.

Dies herauszufinden wird Thema weiterführender Studien sein. Hierbei ist eine Absicherung der Interaktion über einen BiaCore-Assay geplant. Dieser könnte zudem nicht nur genaueren Aufschluss über die Art der Interaktion geben, sondern auch die aufgeworfene Frage nach dem weiteren Bindungsverhalten Noggins beantworten. Auch ist die Balance des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Signalwegen noch nicht im Detail verstanden. Die Identifikation und initiale Charakterisierung der Noggin-Ror2-Interaktion liefert hierbei die Grundlage auf dem Weg zum besseren Verständnis der Situation. Um zudem die genetische Interaktion und vor allem die Pathogenese der Brachydaktylie Typ B2 besser verstehen zu können ist geplant ein auf Noggin-Mutationen beruhendes Brachydaktylie-Mausmodell zu kreieren und zu etablieren. Solch ein Mausmodell existiert bereits für eine auf einer Ror2-Mutation beruhende Brachydaktylie (Ror2^{W749X} (Raz et al., 2008)). Analysen beider Mausmodelle und insbesondere die Untersuchung der aus Verkreuzungen beider Linien hervorgehende Nachkommen werden helfen die komplexe Wechselwirkung von Ror2 und Noggin und ihren Einfluss auf die Entwicklung besser zu verstehen.

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A. bidest	Aqua bidestillata
Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
add	zufügen
AER	Apical ectodermal ridge
Amp	Ampicillin
AP	Anterior/Posterior (Körperachse)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BDB	Brachydaktylie Typ B
Bmp	Bone morphogenetic protein
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CKI	CaseinkinaseI
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	Cystein-reiche Domäne
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dkk	Dikkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days postcoitum
DV	Dorsal/Ventral (Körperachse)
E	Embryonalstadium
E. coli	Escherichia coli
En1	Engrailed-1
ER	Endoplasmatisches Retikulum

et al.	et alteri
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
Fwd	Forward
Fzd	Frizzled
g	Gramm
GDF	Growth and differentiation factor
GFP	Green fluorescence Protein
GSK3	Glycogensynthasekinas 3
h	human
h/Std	Stunde
H ₂ O	Wasser
het.	heterozygot
HRP	Horsereddish peroxidase
IG	Immunglobulin
Ihh	Indian hedgehog
IP	Immunopräzipitation
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
KO	Knock-out
KR	Kringle
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Lef	Lymphoid enhanced factor
LG	L-Gluthamin
M	Molar
m	murin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
Nog	Noggin
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCP	Planar cell polarity
PD	Proximal/Distal (Körperachse)
PEG	Polyethylenglycol

PFA	Paraformaldehyd
pH	potential Hydrogenii
PS	Penicillin/Streptomycin
PTHrP	Parathyroid hormone related protein
PVDF-	
Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
PZ	Progresszone
Rev	Reverse
rGBD	RhoA-bindene Domäne von Rhotekin
Ror2	Receptor tyrosine-like orphan receptor 2
rpm	Rounds per minute
RRS	Recessive Robinow Syndrome
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAP	Shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodium lauryl sulfate
sek	Sekunde
Ser/Thr	Serin/Threonin
sFRP	Secreted frizzled related proteins
Shh	Sonic hedgehog
Stim.	Stimulation
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus (DNA-Polymerase)
TBST	Tris-buffered saline Tween-20
TGF- β	Transforming growth factor β
Tm	Annealing Temperatur
Transf.	Transfektion
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
u.a.	unter anderem
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WIF1	Wnt inhibitory factor 1
Wnt	Wingless-related
wt	Wildtyp
x	Xenopus
z.B.	zum Beispiel
ZPA	Zone of polarising activity

8.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Brachydakylie-Klassen und betroffene Gene
Abb. 2	Desmale und enchondrale Ossifikation
Abb. 3	Zelldifferenzierung in der Wachstumsfuge eines Röhrenknochens
Abb. 4	Entwicklung der proximo-distalen Achse (PD)
Abb. 5	Übersicht über die Entstehung der Hauptachsen einer Extremität
Abb. 6	Bmp-Signalweg über Smads
Abb. 7	Skelettfehlbildung in Noggin-defizienten Mäusen
Abb. 8	Schematische Darstellung des kanonischen Wnt-Signalwegs
Abb. 9	Modularer Ror2-Aufbau
Abb. 10	ROR2-Mutationen als Ursache für dominante Brachydakylie (BDB) und rezessives Robinow Syndrom (RRs)
Abb. 11	Signalwege mit Ror2-Beteiligung
Abb. 12	Verwendete Längenstandards
Abb. 13	Western Blot: Interaktion von Ror2 und Noggin
Abb. 14	Western Blot: Interaktion von Ror2 und Noggin
Abb. 15	Western Blot: Test des rekombinanten Noggins
Abb. 16	Western Blot: Dimerisierungsstudie zur Interaktion von Ror2 und Noggin
Abb. 17	Western Blot: Phosphorylierungsstudie zur Interaktion von Ror2 und Noggin
Abb. 18a-c	Phänotypenanalyse Ror2- und Noggin-defizienter Mäuse
Abb. 19	Western Blot: Expressionsnachweis über anti-GFP Antikörpereinsatz
Abb. 20	Western Blot: Kontrolle der Aufreinigung über anti-GFP Antikörperinsatz
Abb. 21	Zytologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP
Abb. 22	Histologische Färbung mit rekombinantem rGBD-GFP
Abb. 23	Ror2 als Schaltstelle zwischen Bmp- und Wnt-Signalweg
Tab. 1	Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte
Tab. 2	Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen
Tab. 3	Verwendete Medien und deren Zusammensetzung
Tab. 4	Verwendete Kits
Tab. 5	Verwendete Kulturzellen
Tab. 6	Verwendete Antikörper
Tab. 7	Für die Genotypisierungen verwendeten Primer
Tab. 8	Verwendete Enzyme
Tab. 9	Verwendete Computerprogramme und Datenbanken
Tab. 10	Pipettierschema eines Standard PCR-Ansatzes

Tab. 11	Standard PCR-Programm
Tab. 12a und b	Transfektionsschemata am Beispiel der Rezeptorkartierungs- und Phosphorylierungsversuche
Tab. 13	Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele

8.3 Literaturverzeichnis

- Afzal, A. R., Rajab, A., Fenske, C. D., Oldridge, M., Elanko, N., Ternes-Pereira, E., Tuysuz, B., Murday, V. A., Patton, M. A., Wilkie, A. O. et al.** (2000). Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet* **25**, 419-22.
- Avsian-Kretchmer, O. and Hsueh, A. J. W.** (2004). Comparative Genomic Analysis of the Eight-Membered Ring Cystine Knot-Containing Bone Morphogenetic Protein Antagonists. *Mol Endocrinol* **18**, 1-12.
- Bachiller, D., Klingensmith, J., Shneyder, N., Tran, U., Anderson, R., Rossant, J. and De Robertis, E. M.** (2003). The role of chordin/Bmp signals in mammalian pharyngeal development and DiGeorge syndrome. *Development* **130**, 3567-3578.
- Benink, H. A. and Bement, W. M.** (2005). Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *J. Cell Biol.* **168**, 429-439.
- Billiard, J., Way, D. S., Seestaller-Wehr, L. M., Moran, R. A., Mangine, A. and Bodine, P. V.** (2005). The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* **19**, 90-101.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Harland, R. M.** (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**, 1455-7.
- Brunner, H. G. and van Driel, M. A.** (2004). From syndrome families to functional genomics. *Nat Rev Genet* **5**, 545-551.
- Cadigan, K. M.** (2008). Wnt/beta-catenin signaling: turning the switch. *Dev Cell* **14**, 322-3.
- Chen, L., Wang, K., Shao, Y., Huang, J., Li, X., Shan, J., Wu, D. and Zheng, J. J.** (2008). Structural Insight into the Mechanisms of Wnt Signaling Antagonism by Dkk. *J. Biol. Chem.* **283**, 23364-23370.
- Chen, Y., Bellamy, W. P., Seabra, M. C., Field, M. C. and Ali, B. R.** (2005). ER-associated protein degradation is a common mechanism underpinning numerous monogenic diseases including Robinow syndrome. *Hum Mol Genet* **14**, 2559-69.
- Clevers, H.** (2006). Wnt/[beta]-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **127**, 469-480.
- Devlin, R. D., Du, Z., Pereira, R. C., Kimble, R. B., Economides, A. N., Jorgetti, V. and Canalis, E.** (2003). Skeletal Overexpression of Noggin Results in Osteopenia and Reduced Bone Formation. *Endocrinology* **144**, 1972-1978.
- Goh, K.-I., Cusick, M. E., Valle, D., Childs, B., Vidal, M. and Barabási, A.-L. s.** (2007). The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 8685-8690.
- Gordon, M. D. and Nusse, R.** (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* **281**, 22429-33.

- Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D. B., Fisher, A. G. and Merckenschlager, M.** (2002). The Developmentally Regulated Expression of Twisted Gastrulation Reveals a Role for Bone Morphogenetic Proteins in the Control of T Cell Development. *J. Exp. Med.* **196**, 163-171.
- Green, J. L., Inoue, T. and Sternberg, P. W.** (2007). The *C. elegans* ROR receptor tyrosine kinase, CAM-1, non-autonomously inhibits the Wnt pathway. *Development* **134**, 4053-62.
- Green, J. L., Kuntz, S. G. and Sternberg, P. W.** (2008). Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol* **18**, 536-44.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C. I. and Choe, S.** (2002). Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* **420**, 636-642.
- Grotewold, L. and Ruther, U.** (2002). Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol* **46**, 943-7.
- Hartmann, C.** (2006). A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* **16**, 151-8.
- Hartmann, C. and Tabin, C. J.** (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* **104**, 341-51.
- He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza-Lewis, R., Liu, C., Gu, S., Nishita, M., Suzuki, K., Yamada, G., Minami, Y. et al.** (2008). Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development* **135**, 3871-3879.
- Heasman, S. J. and Ridley, A. J.** (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701.
- Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. and Taira, M.** (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase Xror2 modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-39.
- Hirshoren, N., Gross, M., Banin, E., Sosna, J., Bargal, R. and Raas-Rothschild, A.** (2008). P35S mutation in the NOG gene associated with Teunissen-Cremers syndrome and features of multiple NOG joint-fusion syndromes. *European Journal of Medical Genetics* **51**, 351-357.
- Hirsinger, E., Duprez, D., Jouve, C., Malapert, P., Cooke, J. and Pourquie, O.** (1997). Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Development* **124**, 4605-14.
- Jiang, X., Liu, B., Jiang, J., Zhao, H., Fan, M., Zhang, J., Fan, Z. and Jiang, T.** (2008). Modularity in the genetic disease-phenotype network. *FEBS Letters* **582**, 2549-2554.
- Jin, E.-J., Erickson, C. A., Takada, S. and Burrus, L. W.** (2001). Wnt and BMP Signaling Govern Lineage Segregation of Melanocytes in the Avian Embryo. *Developmental Biology* **233**, 22-37.
- Johnson, R. L. and Tabin, C. J.** (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* **90**, 979-90.
- Kani, S., Oishi, I., Yamamoto, H., Yoda, A., Suzuki, H., Nomachi, A., Iozumi, K., Nishita, M., Kikuchi, A., Takumi, T. et al.** (2004). The Receptor Tyrosine Kinase Ror2 Associates with and Is Activated by Casein Kinase I{epsilon}. *J. Biol. Chem.* **279**, 50102-50109.
- Kawano, Y. and Kypta, R.** (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* **116**, 2627-2634.
- Khokha, M. K., Hsu, D., Brunet, L. J., Dionne, M. S. and Harland, R. M.** (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* **34**, 303-7.

- Kornak, U. and Mundlos, S.** (2003). Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet* **73**, 447-74.
- Kühl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. and Moon, R. T.** (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in Genetics* **16**, 279-283.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C. et al.** (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273**, 663-6.
- Lehmann, K., Seemann, P., Boergemann, J., Morin, G., Reif, S., Knaus, P. and Mundlos, S.** (2006). A novel R486Q mutation in BMPR1B resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur J Hum Genet* **14**, 1248-54.
- Lehmann, K., Seemann, P., Silan, F., Goecke, T. O., Irgang, S., Kjaer, K. W., Kjaergaard, S., Mahoney, M. J., Morlot, S., Reissner, C. et al.** (2007). A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist NOGGIN. *Am J Hum Genet* **81**, 388-96.
- Lehmann, K., Seemann, P., Stricker, S., Sammar, M., Meyer, B., Suring, K., Majewski, F., Tinschert, S., Grzeschik, K. H., Muller, D. et al.** (2003). Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12277-82.
- Li, E. and Hristova, K.** (2006). Role of Receptor Tyrosine Kinase Transmembrane Domains in Cell Signaling and Human Pathologies. *Biochemistry* **45**, 6241-6251.
- Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W. and Wu, D.** (2002). Second Cysteine-rich Domain of Dickkopf-2 Activates Canonical Wnt Signaling Pathway via LRP-6 Independently of Dishevelled. *J. Biol. Chem.* **277**, 5977-5981.
- Liu, A. and Niswander, L. A.** (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* **6**, 945-954.
- Liu, Y., Ross, J. F., Bodine, P. V. and Billiard, J.** (2007). Homodimerization of Ror2 tyrosine kinase receptor induces 14-3-3(beta) phosphorylation and promotes osteoblast differentiation and bone formation. *Mol Endocrinol* **21**, 3050-61.
- Logan, M.** (2003). Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* **130**, 6401-6410.
- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M. and Joyner, A. L.** (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* **382**, 360-3.
- Masiakowski, P. and Carroll, R. D.** (1992). A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* **267**, 26181-90.
- Masiakowski, P. and Yancopoulos, G. D.** (1998). The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases. *Curr Biol* **8**, R407.
- McEwen, D. G. and Peifer, M.** (2000). Wnt signaling: Moving in a new direction. *Current Biology* **10**, R562-R564.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W. and Tabin, C. J.** (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* **53**, 1-114.
- McMahon, A. P. and Moon, R. T.** (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58**, 1075-84.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M. and McMahon, A. P.** (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-52.
- Mikels, A. J. and Nusse, R.** (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* **4**, e115.
- Miller, J.** (2001). The Wnts. *Genome Biology* **3**, reviews3001.1 - reviews3001.15.

- Montero, J. A., Zuzarte-Luis, V., Garcia-Martinez, V. and Hurle, J. M.** (2007). Role of RhoC in digit morphogenesis during limb development. *Developmental Biology* **303**, 325-335.
- Mundlos, S.** (2000). Skeletal morphogenesis. *Methods Mol Biol* **136**, 61-70.
- Ng, J. K., Kawakami, Y., Buscher, D., Raya, A., Itoh, T., Koth, C. M., Esteban, C. R., Rodriguez-Leon, J., Garrity, D. M., Fishman, M. C. et al.** (2002). The limb identity gene *Tbx5* promotes limb initiation by interacting with *Wnt2b* and *Fgf10*. *Development* **129**, 5161-5170.
- Nishita, M., Yoo, S. K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A. and Minami, Y.** (2006). Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase *Ror2* is required for *Wnt5a*-induced cell migration. *J Cell Biol* **175**, 555-62.
- Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M. and Minami, Y.** (2008). Receptor tyrosine kinase *Ror2* mediates *Wnt5a*-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *J Biol Chem*.
- Nosaka, T., Morita, S., Kitamura, H., Nakajima, H., Shibata, F., Morikawa, Y., Kataoka, Y., Ebihara, Y., Kawashima, T., Itoh, T. et al.** (2003). Mammalian Twisted Gastrulation Is Essential for Skeleto-Lymphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2969-2980.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C. et al.** (2003). The receptor tyrosine kinase *Ror2* is involved in non-canonical *Wnt5a*/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 645-54.
- Oldridge, M., Fortuna, A. M., Maringa, M., Propping, P., Mansour, S., Pollitt, C., DeChiara, T. M., Kimble, R. B., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D. et al.** (2000). Dominant mutations in *ROR2*, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet* **24**, 275-8.
- Parr, B. A. and McMahon, A. P.** (1995). Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* **374**, 350-3.
- Pawson, T. and Schlessingert, J.** (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* **3**, 434-42.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and Robertis, E. M. D.** (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and *Wnt* signals. *Nature* **397**, 707-710.
- Raz, R., Stricker, S., Gazzo, E., Clor, J. L., Witte, F., Nistala, H., Zabski, S., Pereira, R. C., Stadmeier, L., Wang, X. et al.** (2008). The mutation *ROR2W749X*, linked to human BDB, is a recessive mutation in the mouse, causing brachydactyly, mediating patterning of joints and modeling recessive Robinow syndrome. *Development* **135**, 1713-23.
- Ridley, A. J.** (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* **16**, 522-529.
- Riento, K. and Ridley, A. J.** (2003). ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 446-456.
- Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G. C., Sieber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W. et al.** (2004). Modulation of *GDF5*/*BRI-b* signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor *Ror2*. *Genes Cells* **9**, 1227-38.
- Schambony, A. and Wedlich, D.** (2007). *Wnt-5A*/*Ror2* regulate expression of *XPAPC* through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779-92.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25.
- Schwabe, G. C. and Mundlos, S.** (2004). Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir* **36**, 85-97.
- Schwabe, G. C., Tinschert, S., Buschow, C., Meinecke, P., Wolff, G., Gillessen-Kaesbach, G., Oldridge, M., Wilkie, A. O., Komec, R. and Mundlos, S.** (2000). Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene *ROR2* cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet* **67**, 822-31.

- Semenov, M. V., Habas, R., Macdonald, B. T. and He, X.** (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* **131**, 1378.
- Smith, W. C. and Harland, R. M.** (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* **70**, 829-840.
- Sossin, W. S.** (2006). Tracing the evolution and function of the Trk superfamily of receptor tyrosine kinases. *Brain Behav Evol* **68**, 145-56.
- T Takahashi, I. T. M. K. Y. S. K. H. G. N. H. S. G. T.** (2001). Mutations of the *NOG* gene in individuals with proximal symphalangism and multiple synostosis syndrome. *Clinical Genetics* **60**, 447-451.
- Takeuchi, S., Takeda, K., Oishi, I., Nomi, M., Ikeya, M., Itoh, K., Tamura, S., Ueda, T., Hatta, T., Otani, H. et al.** (2000). Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells* **5**, 71-8.
- Valenzuela, D. M., Economides, A. N., Rojas, E., Lamb, T. M., Nunez, L., Jones, P., Lp, N. Y., Espinosa, R., 3rd, Brannan, C. I. and Gilbert, D. J.** (1995). Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J. Neurosci.* **15**, 6077-6084.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. and Tabin, C. J.** (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**, 613-22.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E. and Harland, R. M.** (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* **2**, 695-706.
- Winkel, A., Stricker, S., Tylzanowski, P., Seiffart, V., Mundlos, S., Gross, G. and Hoffmann, A.** (2008). Wnt-ligand-dependent interaction of TAK1 (TGF-beta-activated kinase-1) with the receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt-signalling. *Cell Signal* **20**, 2134-44.
- Wong, G. T., Gavin, B. J. and McMahon, A. P.** (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* **14**, 6278-86.
- Woods, A. and Beier, F.** (2006). RhoA/ROCK Signaling Regulates Chondrogenesis in a Context-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **281**, 13134-13140.
- Wu, X., Shi, W. and Cao, X.** (2007). Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* **1116**, 29-49.
- Yamamoto, H., Yoo, S. K., Nishita, M., Kikuchi, A. and Minami, Y.** (2007). Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells* **12**, 1215-23.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H. and Sasaki, H.** (2008). Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* **15**, 23-36.
- Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M.-T., Bao, X., Akiyama, H. and Mackem, S.** (2008). Uncoupling Sonic Hedgehog Control of Pattern and Expansion of the Developing Limb Bud. *Developmental Cell* **14**, 624-632.
- Zimmerman, L. B., De Jesús-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell* **86**, 599-606.

9 Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Menschen bedanken, die zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Stefan Mundlos danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit innerhalb seiner Arbeitsgruppe am MPI für molekulare Genetik anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schuster möchte ich für die Betreuung und Begutachtung der Diplomarbeit von universitärer Seite, vor allem aber für die stets offene Tür, seine Präsenz und Geduld während der Studienzeit danken. Für die Bereitstellung des Themas sowie die konstruktiven Verbesserungsvorschläge beim Verfassen der Arbeit danke ich herzlich Dr. Sigmar Stricker. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle vor allem Florian Witte für die Übernahme der Betreuung im Labor. Deine Ideen, sowie deine praktische und moralische Unterstützung haben von Anfang an maßgeblich zum Vorantreiben der Arbeit beigetragen. Zudem haben mich dein Humor und aufmunternde Worte aus manchem Motivationstief herausgeholt, wenn ein Versuch mal wieder nicht so lief wie geplant. Dafür Danke!

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der AG Mundlos für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die angenehme Arbeitsatmosphäre...mit euch war es wirklich nie langweilig! Nadine und Pia danke ich dabei besonders für die Versüßung der Mittagspausen und die moralische Unterstützung.

Natürlich möchte ich hier auch herzlich meiner Familie für das entgegengebrachte Vertrauen und die bedingungslose Unterstützung danken. Ohne Euch wäre ich heute nicht an dieser Stelle! Dank gilt schließlich auch meinen langjährigen Freunden, die stets zur richtigen Zeit da waren, auf die immer Verlass war und die stets ein offenes Ohr für mich hatten! Merci!

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich die Arbeit weder in dieser noch in anderer Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 30. Januar 2009