

# **Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner von Ror2**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Nicole Verhey van Wijk  
aus Kapstadt/Südafrika  
Juni 2006

**1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos**

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Ihnestr. 73, 14195 Berlin

Tel: 030/84131267

Email: [mundlos@molgen.mpg.de](mailto:mundlos@molgen.mpg.de)

**2. Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus**

Institut für Chemie-Biochemie

Freie Universität Berlin

Thielallee 63, 14195 Berlin

Tel. 030/8385 2935

Email: [knaus@chemie.fu-berlin.de](mailto:knaus@chemie.fu-berlin.de)

Disputation am: 22.09.06

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Skelett- und Knochenentwicklung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Rezeptortyrosinkinase Ror2 .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Modularer Aufbau der Ror-Proteine.....	4
1.2.2 Ror-Proteine sind im Tierreich konserviert.....	5
1.2.3 Expressionsmuster von Ror2 in der Maus.....	6
1.2.4 Ror2 spielt eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung .....	7
1.2.5 Signalwege und Interaktionspartner von Ror2 .....	10
<b>1.3 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien .....	14
2.1.2 Lösungen und Puffer .....	14
2.1.3 Enzyme .....	14
2.1.4 Vektoren .....	14
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Allgemein molekularbiologische Methoden .....	15
2.2.1.1 Plasmid-Isolierung.....	15
2.2.1.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	15
2.2.1.3 Isolierung von Total RNA .....	15
2.2.1.4 Reverse Transkription .....	15
2.2.1.5 Sequenzierung .....	15
2.2.2 Klonierung von Expressionskonstrukten.....	15
2.2.2.1 Köderproteine für " <i>Yeast Two Hybrid</i> "- und " <i>Yeast Three Hybrid</i> "-Analysen..	16
2.2.2.2 Expressionskonstrukte für Säugerzellen.....	17
2.2.3 Hefearbeit .....	19
2.2.3.1 Hefen kompetent machen .....	19
2.2.3.2 Hefetransformation.....	19
2.2.3.3 Herstellung von Protein-Lysaten aus Hefe.....	19
2.2.3.4 " <i>Yeast Two Hybrid</i> "- und " <i>Yeast Three Hybrid</i> "-Screen.....	20
2.2.3.5 LacZ Filter Lift.....	22
2.2.3.6 Isolierung von DNA aus Hefe .....	22
2.2.3.7 Herstellung elektrokompeter HB101 Zellen und Elektroporation.....	22
2.2.3.8 Kolonie PCR mit Hefezellen .....	23
2.2.3.9 Medien und Lösungen für die Hefearbeit.....	24
2.2.4. Zellkultur .....	25
2.2.4.1 Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode.....	25
2.2.4.2 Transfektion mit ExGene .....	25
2.2.5 Co-Immunopräzipitation .....	25
2.2.6 Northern Blot.....	26
2.2.7 Western Blot.....	27
2.2.8 Immuncytologie.....	27
2.2.9 Immunhistologie.....	28

2.2.10 <i>In situ</i> Hybridisierung .....	29
2.2.10.1 Herstellung DIG-markierter RNA Sonden .....	29
2.2.10.2 <i>In situ</i> Hybridisierung an Ganztierpräparaten (Whole Mount) .....	29
2.2.10.3 <i>In situ</i> Hybridisierung auf sagittalen Gefrierschnitten .....	30
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 “Yeast Two Hybrid” und “Yeast Three Hybrid” als Methoden der Wahl zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen .....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Identifikation von potentiellen Ror2-Bindungspartnern durch “Yeast Two Hybrid”- und “Yeast Three Hybrid”-Systeme.....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Klonierung und Expressionskontrolle der Köderproteine .....	33
3.2.2 “ <i>Yeast Two Hybrid</i> ”- und “ <i>Yeast Three Hybrid</i> ”-Screen .....	37
3.2.3 Analyse der Hefeklone .....	38
<b>3.3 Dlxin-1 als potentieller Ror2-Interaktionspartner.....</b>	<b>41</b>
3.3.1 Die Interaktion mit Dlxin-1 findet im distalen Bereich von Ror2 statt.....	43
<b>3.4 Wtip als potentieller Ror2-Interaktionspartner .....</b>	<b>43</b>
3.4.1 Wtip bindet an den distalen Bereich von Ror2.....	45
3.4.2 Die Interaktion zwischen Wtip und Ror2 ist in Hefe spezifisch .....	48
3.4.3 Klonierung und Analyse von Wtip.....	49
3.4.4 Bestätigung der Wtip-Ror2 Interaktion in einem unabhängigen System.....	50
3.4.5 Expressions- und Co-Lokalisationsstudien mit Ror2 und Wtip.....	54
<b>3.5 Identifikation von potentiellen Wtip-Interaktionspartnern durch einen automatisierten “Yeast Two Hybrid”- Screen.....</b>	<b>60</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Identifikation von potentiellen Ror2-Bindungspartnern durch "Yeast Two Hybrid"- und "Yeast Three Hybrid"-Experimente .....</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Dlxin-1 als potentieller Ror2-Interaktionspartner.....</b>	<b>64</b>
4.2.1 Mögliche Funktion der Ror2-Dlxin-1 Interaktion <i>in vivo</i> .....	66
<b>4.3 Wtip als potentieller Interaktionspartner von Ror2 .....</b>	<b>69</b>
4.3.1 Die Interaktion zwischen Wtip und Ror2 ist in Hefe spezifisch .....	70
4.3.2 Bestätigung der Ror2-Wtip Interaktion in einem unabhängigen System .....	71
4.3.3 Expressions- und Co-Lokalisationsstudien in der Maus .....	71
4.3.4 Mögliche Bedeutung der Ror2-Wtip Interaktion <i>in vivo</i> .....	72
<b>4.4 Andere potentielle Interaktionspartner von Ror2 .....</b>	<b>75</b>
<b>4.5 Potentielle Interaktionspartner von Wtip aus dem automatisierten "Yeast Two Hybrid"-Screen .....</b>	<b>76</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>

<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>80</b>
<b>7. LITERATUR .....</b>	<b>81</b>
<b>8. VERZEICHNISSE .....</b>	<b>89</b>
<b>8.1 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>8.2 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>8.3 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>9. ANHANG .....</b>	<b>91</b>
<b>9.1 Danksagung.....</b>	<b>91</b>
<b>9.2 Lebenslauf .....</b>	Error! Bookmark not defined.
<b>9.3 Kongreßbeiträge (Poster) .....</b>	<b>92</b>
<b>9.4 Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>93</b>