

1. Einleitung

Die Embryogenese vieler Tiere beginnt bei geschlechtlicher Vermehrung mit der Befruchtung der Eizelle, welche dadurch aktiviert wird und beginnt, sich in rascher Folge zu teilen. Dabei wird das verhältnismäßig große Volumen der Zygote auf viele kleinere Zellen verteilt. Auf diese schnellen Furchungsteilungen folgt eine Reihe von Zellbewegungen, die als Gastrulation bezeichnet werden und dazu führen, daß sich die Keimblätter ausbilden. In triploblastischen Tieren werden drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) angelegt, aus denen später die verschiedenen Organe und Gewebe hervorgehen. Dabei bildet das Ektoderm hauptsächlich das Nervensystem und die Epidermis mit ihren Anhängen (Nägel, Federn etc.). Aus dem Endoderm dagegen entwickeln sich vorwiegend die Epithelien des Verdauungstraktes, der Leber, der Lunge, der Harnblase und der Harnröhre, während aus dem Mesoderm das Blut, das Herz, die Nieren, Gonaden, Knochen, Muskeln und das Bindegewebe hervorgehen (Gilbert, 2000).

Nach der Gastrulation erfolgt bei den Vertebraten (Wirbeltiere) die Organogenese, die mit der Neurulation, also der Anlage des Gehirns und des Nervensystems, beginnt. Während der Organogenese werden alle wichtigen Organe angelegt und nehmen schon während der Embryonalentwicklung teilweise ihre Funktion auf.

Das Skelett ist ein zentrales Organ der Vertebraten. Es erfüllt wichtige Funktionen in unseren Körpern, wie z.B. eine Stützfunktion, ohne die es den Wirbeltieren nicht möglich wäre, sich fortzubewegen. Zum anderen bietet das Skelett wichtigen inneren Organen, wie dem Herz und der Lunge, aber auch dem Gehirn und Nervensystem Schutz vor äußeren Kräften. Das Skelett läßt sich in drei Bereiche untergliedern: das craniale, das axiale und das Extremitätenskelett. Dabei besteht das craniale Skelett aus den Schädelknochen, das axiale aus den Rippen, dem Brustbein und der Wirbelsäule und das Extremitätenskelett aus den Skelettelementen der Gliedmaßen. Die Extremitäten sind über den Schultergürtel und die Hüften mit dem axialen Skelett verbunden.

1.1 Skelett- und Knochenentwicklung

Das Wirbeltierskelett entwickelt sich aus drei verschiedenen Anlagen. Das craniale Skelett geht dabei aus Neuralleistenzellen hervor, das axiale Skelett wird aus dem axialen Mesoderm (Somiten) gebildet, während sich die Extremitäten aus dem Seitenplattenmesoderm entwickeln.

Grundsätzlich werden zwei Typen der Knochenentwicklung unterschieden. Bei der desmalen Ossifikation, die zur Bildung der Schädeldachknochen und Teilen des Gesichtschädels und des Schlüsselbeins führt, differenzieren mesenchymale Bindegewebszellen zu Osteoblasten und bilden so direkt Knochen. Bei der endochondralen Ossifikation werden die Skelettelemente zunächst knorpelig angelegt und dann nachfolgend durch Knochen ersetzt (Erlebacher et al., 1995; Hall & Myake, 2000). Die endochondrale Knochenbildung durchläuft verschiedene Stadien, die in Abbildung 1 dargestellt sind.

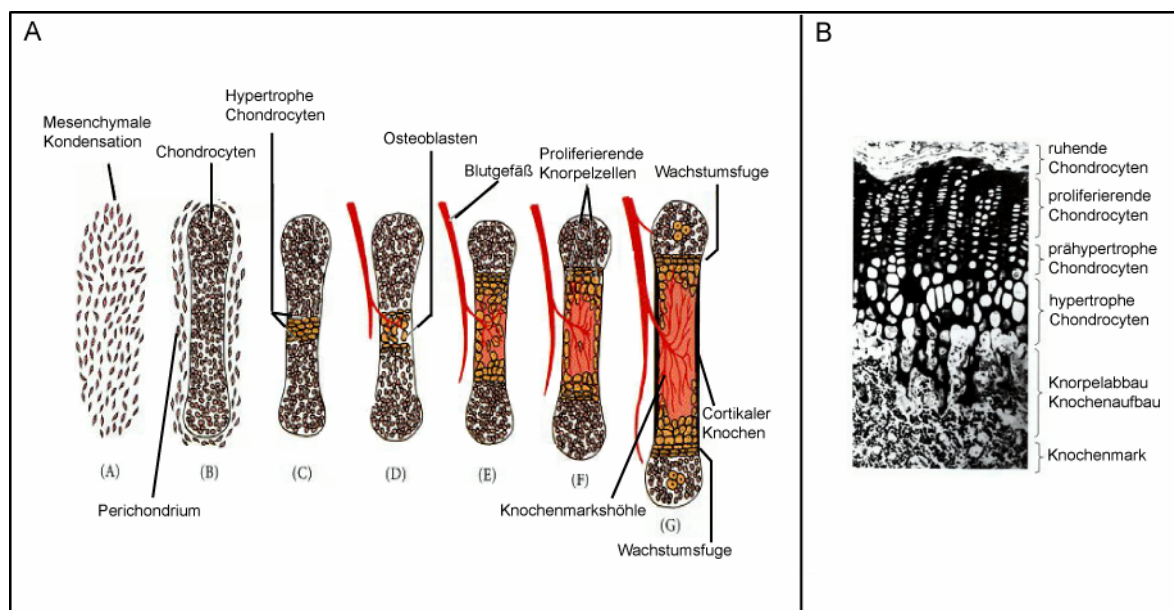


Abbildung 1: Endochondrale Ossifikation A: Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation Der Prozeß beginnt mit der Kondensation mesenchymaler Zellen (A), die dann zu Chondrocyten differenzieren und von Perichondrium umgeben werden (B). Die Chondrocyten differenzieren im Zentrum der Knorpelanlage zu hypertrophen Chondrocyten (C) und fangen dann an, ihre extrazelluläre Matrix zu degradieren und apoptotisch zu werden. Dies führt zur Invasion von Blutgefäßen und damit zur Einwanderung von Osteoblasten und Osteoklasten (D). Dadurch entsteht die Knochenmarkshöhle und der Knorpel wird durch trabekulären Knochen ersetzt (E). Die beiden Zonen der proliferierenden Chondrocyten sind durch Knochen getrennt (F). Das Längenwachstum erfolgt nun über die Wachstumsfugen an den distalen Enden des Knochens. Der cortikale Knochen verleiht Stabilität (G) **B: Histologische Darstellung der Wachstumsfuge** Die Zonen der verschiedenen Phasen in der Chondrocytendifferenzierung sowie die Verknöcherung sind morphologisch deutlich zu unterscheiden (A und B: abgewandelt nach S.F. Gilbert, 2000).

Der Prozeß beginnt mit der Kondensation mesenchymaler Zellen und ihrer Differenzierung zu Chondrocyten, hierbei spielt der Transkriptionsfaktor Sox9 eine essentielle Rolle (Lefebvre et al. 1999; Bi et al. 1999). Die Zellen, die die Kondensation umgeben, bilden die sogenannte Knorpelhaul (Perichondrium). Die Knorpelanlage wächst zum einen dadurch, daß die Chondrocyten anfangen, stark zu proliferieren. Dieser Prozeß wird unter anderem durch FGFs, BMPs und *Indian Hedgehog* gesteuert (Naski et al., 1998; St-Jaques et al., 1999;

Minina et al., 2001). Zum anderen werden weitere mesenchymale Zellen in die Kondensationen rekrutiert. In der Mitte der Knorpelanlage beginnen die Chondrocyten zu differenzieren. Dabei hören sie auf zu proliferieren (prähypertrophe Chondrocyten), vervielfachen ihr Zellvolumen und werden so hypertroph. Dabei hat die Expression von *Indian Hedgehog* (Ihh) in den prähypertrophen Knorpelzellen eine entscheidende Funktion (Vortkamp et al. 1996), Ihh induziert die Expression von *Parathyroid Hormone related Protein* (PTHrP) im periarticulären Perichondrium. PTHrP diffundiert durch die Wachstumsfuge zu seinem Rezeptor PTHR, der wiederum überlappend mit Ihh exprimiert wird. Die Aktivierung von PTHR verhindert eine weitere Differenzierung der Chondrocyten und führt zusätzlich zur indirekten Herunterregulierung der Ihh Expression. Durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die Proliferation und Differenzierung der Chondrocyten gesteuert (Lanske et al, 1996; Vortkamp et al., 1996).

Die hypertrophen Chondrocyten produzieren, bevor sie apoptotisch werden, Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Schipani et al. 2001), die zur Invasion von Blutgefäßen in den hypertrophen Bereich führen (Risau et al 1997). Zusätzlich zersetzen die hypertrophen Zellen ihre extrazelluläre Matrix (ECM), in dem sie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sezernieren und so Raum für die Invasion von Osteoblasten schaffen, die über die Blutgefäße einwandern. Nun kommt es zur eigentlichen Knochenbildung.

An den distalen Enden der Röhrenknochen bleibt jedoch eine knorpelige Zone erhalten (Wachstumsfuge), die für das Längenwachstum der Knochen bis zum Abschluß des Wachstums sorgt (siehe Abbildung 1A und B).

1.2 Die Rezeptortyrosinkinase Ror2

Ror2 wurde 1992 von Masiakowski und Carroll das erste Mal beschrieben. Dabei handelt es sich um eine Rezeptortyrosinkinase (RTK), die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Tyrosinkinase-Domäne zu Trk durch einen PCR-basierten Ansatz kloniert wurde. Gleichzeitig identifizierten Masiakowski und Mitarbeiter Ror1, das in seiner Struktur und Sequenz dem Ror2 sehr ähnlich ist. Aufgrund von Aminosäure-Sequenzvergleichen mit anderen Rezeptortyrosinkinasen, wurden die Ror-Proteine einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet (Masiakowski & Carroll, 1992).

Rezeptortyrosinkinasen sind transmembrane Zelloberflächen-Rezeptoren, die in der Kontrolle vieler zellulärer Prozesse eine fundamentale Rolle spielen (Schlessinger, 2000). Sie regulieren z.B. so verschiedene Prozesse wie den Zellcyclus, Metabolismus, die Migration von Zellen,

Apoptose, Proliferation und Differenzierung. Dabei wird die RTK im allgemeinen durch ein extrazelluläres Signal aktiviert. Fast alle RTK dimerisieren nach Aktivierung durch einen Liganden, was zur Autophosphorylierung ihrer cytoplasmatischen Domänen führt (Schlessinger, 1988). Dadurch werden Bindungsstellen für intrazelluläre Adaptoren und Signalmoleküle zugänglich, die über spezielle Domänen (z.B. SH2-, SH3- und PTB-Domänen) binden und das extrazelluläre Signal des Liganden so ins Innere der Zelle weiterleiten (Pawson & Schlessinger, 1993).

1.2.1 Modularer Aufbau der Ror-Proteine

Wie andere RTK sind auch die Ror-Proteine aus verschiedenen Domänen zusammengesetzt. In Abbildung 2 ist der modulare Aufbau des humanen ROR2 dargestellt, jedoch findet sich derselbe Aufbau auch im ROR1 Protein. Extrazellulär befindet sich am N-terminalen Ende eine Immunglobulin-artige Domäne (Ig), der sich eine Cystein-reiche Domäne (CRD) und eine membranproximale Kringle Domäne anschließen. Der Transmembran Domäne (TM) folgt der intrazelluläre Teil des Proteins mit der Tyrosinkinase Domäne (TK) und zwei Serin/Threonin-reichen Bereichen (S/T), die durch eine Prolin-reiche Domäne (P) getrennt werden. Die Immunglobulin-artige Domäne ist in ihrem Aufbau den in FGF-Rezeptoren gefundenen Ig Domänen ähnlich (Masiakowski & Carroll, 1992) und könnte der Vermittlung von Protein-Protein Interaktion dienen (Wiesmann et al., 2000). Gleiches trifft auch auf die CRD zu, die unter anderem Homologien zu den in Frizzled Rezeptoren gefundenen CRD hat und oft auch als Frizzled-artige Domäne (Masiakowski & Yancopoulos, 1998; Rehn et al., 1998; Saldanha et al., 1998) bezeichnet wird. In Frizzled Rezeptoren wird die Bindung der Wnt Liganden über die Cystein-reiche Domäne vermittelt. Die Kringle Domäne dient vermutlich auch der Protein-Bindung (Patthy et al., 1984), ist jedoch für RTK eine ungewöhnliche Domäne. Einzigartig sind auch die Serin/Threonin- und Prolin-reichen Domänen am C-Terminus der Ror-Proteine. Die Prolin-reiche Sequenz könnte der Bindung von SH3 Domänen-haltigen Proteinen dienen (Pawson, 1995).

Alle Ror-Proteine der Wirbeltiere zeigen diese beschriebene modulare Struktur, jedoch sind in anderen Spezies verschiedene Modifikationen zu beobachten, die im nachfolgenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

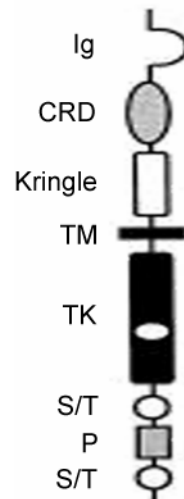


Abbildung 2: Modularer Aufbau des humanen ROR2 Extrazellulär befinden sich eine Immunglobulin-artige Domäne (Ig), eine Cystein-reiche Domäne (CRD) und eine Kringle Domäne. Der Transmembrandomäne (TM) folgen intrazellulär die Tyrosinkinase Domäne (TK) und Bereiche, die Serin/Threonin- (S/T), bzw. Prolin-reich (P) sind (modifiziert nach Schwabe et al., 2000).

1.2.2 Ror-Proteine sind im Tierreich konserviert

Ror-Orthologe wurden bisher in verschiedenen Tieren identifiziert. Dabei scheint es in *C. elegans* und *Aplysia* nur ein Ror-Protein zu geben, während in *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, in Maus, Ratte und Mensch zwei Ror-Proteine beschrieben wurden.

Das *C. elegans* Ror-Ortholog Cam-1 (Forrester et al., 1999) wird während der Entwicklung in verschiedenen Zellen exprimiert, z.B. in Neuronen, in der Pharynxmuskulatur, in intestinalen und in hypodermalen Zellen. Forrester und seine Kollegen beschreiben, daß Cam-1 in *C. elegans* eine Rolle bei der Migration bestimmter Neurone spielt, die Zellpolarität bei asymmetrischen Teilungen beeinflusst und außerdem die Orientierung des Axonenauswuchses bestimmter Neuronen reguliert. Diese Prozesse werden sowohl phosphorylierungsabhängig, als auch phosphorylierungsunabhängig gesteuert. Im Vergleich zu den Ror-Proteinen der Vertebraten fehlen bei Cam-1 der Prolin-reiche und der C-terminale Serin/Threonin-reiche Bereich.

In *Aplysia* ist das Ror-Protein Apror ausschließlich im Nervensystem exprimiert. Apror verfügt über die gleiche Domänenstruktur wie die Wirbeltier Ror-Proteine (McKay et al. 2001). Über seine Funktion ist noch nichts genaues bekannt, jedoch wird spekuliert, daß Apror eine Funktion in der Organisation funktioneller Domänen innerhalb von Neuronen haben könnte.

Wie in *Aplysia* sind die beiden bekannten Ror-Proteine in *Drosophila melanogaster* ausschließlich im Nervensystem exprimiert. Dabei kann die Expression von Dnrk und Dror

sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem nachgewiesen werden. Beiden Proteinen fehlt die N-terminale Immunglobulin Domäne. Während in Dnrk (Oishi et al., 1997) die erste Serin/Threonin-reiche Domäne noch vorhanden ist, fehlen sowohl diese als auch die beiden restlichen C-terminalen Domänen in Dror (Wilson et al., 1993). Dror und Dnrk werden in der Fliege nicht früh-embryonal, sondern erst während der Keimbandausstreckung exprimiert. Dort kommen beide Gene in dem ventralen Bereich zur Expression, der dem neurogenen Ektoderm entspricht.

Das Ror2-Protein (Xror2) in *Xenopus laevis* entspricht in seiner Struktur dem humanen Ror2 (siehe Abbildung 2). Es wurde von Hikasa und Mitarbeitern im Jahre 2002 beschrieben.

Whole Mount *in situ* Hybridisierungen zeigen Expression von Xror2 in der dorsalen Marginalzone im frühen Gastrula-Stadium, sowie Expression im Notochord und dem posterioren Neuroektoderm. Xror2 scheint in *Xenopus* eine wichtige Rolle bei den konvergenten Extensionsbewegungen während der Gastrulation zu spielen, durch die die anterior-posteriore Körperachse ausgebildet wird. Zusätzlich ist Xror2 für die Schließung der Neuralplatte während der Neurulation wichtig.

Interessanterweise beeinflusst neben dem Wildtyp-Konstrukt auch ein trunkiertes Xror2-Konstrukt, bei dem der intrazelluläre Teil fehlt, die konvergenten Extensionsbewegungen in *Xenopus*, so daß die Funktionen von Xror2 in diesen morphogenetischen Bewegungen scheinbar phosphorylierungsabhängig aber z.T. auch phosphorylierungsunabhängig vermittelt werden (Hikasa et al., 2002).

1.2.3 Expressionsmuster von Ror2 in der Maus

Das Expressionsmuster von Ror2 in der Maus wurde per *in situ* Hybridisierung von mehreren Gruppen detailliert analysiert und beschrieben (Al-Shawi et al., 2001; Matsuda et al., 2001; Oishi et al., 1999; Schwabe et al., 2004). Ror2 läßt sich in der Embryonalentwicklung bereits an Tag E7.5 im Primitivstreifen detektieren. An E8,5 ist Ror2 in vielen neuronalen, wie auch nicht neuronalen Geweben exprimiert, dazu gehören z.B. das Proencephalon, Mesencephalon, der dorsale Teil des Neuralrohrs, Neuralleistenzellen der ersten beiden Branchialbögen und weiterhin der Primitivstreifen.

In späteren Stadien (E9,5-E10,5) läßt sich Ror2 im Dermomyotom, im Sclerotom, im Vorder- sowie Mittelhirn, in den Branchialbögen und im entstehenden Gesicht nachweisen. Auch im präsomitischen Mesoderm und den Somiten läßt sich Ror2-Expression zeigen (E10,5-E11,5). Während der Extremitätenentwicklung läßt sich Ror2 in den Gliedmaßen detektieren. Dabei finden sich die Transkripte an E10,5 im gesamten Mesenchym, jedoch nicht im Ektoderm.

Mit fortschreitender Entwicklung der Extremität verlagert sich die Expression von Ror2. An Tag E12,5 und E13,5 der Mausentwicklung läßt sich Ror2 mRNA in den chondrogenen Kondensationen, am Rand der Extremitäten und im Perichondrium der Finger bzw. Zehen nachweisen.

Zusätzlich kann Ror2-Expression an E13,5 in den Alveolen der sich entwickelnden Lunge und im Herzen nachgewiesen werden. Im Herz wird Ror2 dabei in der Aortenklappe, im Ventrikelseptum, im Herzmuskel und im Vorhof exprimiert.

Zu späteren Zeitpunkten wird Ror2 auch in den Zahnanlagen, den Genitalanlagen und im Cortex der Nieren exprimiert.

Während der Embryonalentwicklung der Maus überlappt die Ror2-Expression zumindest teilweise mit der Expression von Ror1. In Gesicht, Herz, Lunge und in den Extremitäten können beiden Transkripte nachgewiesen werden (Al-Shawi et al., 2001; Matsuda et al., 2001; Oishi et al., 1999). Durch die Verkreuzung von Ror1^{-/-} Mäusen mit Ror2^{-/-} Mäusen konnten Nomi und seine Kollegen redundante Funktionen von Ror1 und Ror2 in der Entwicklung des Skeletts und des Herzens nachweisen (Nomi et al., 2001).

1.2.4 Ror2 spielt eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung

Durch die Erzeugung von Ror2-defizienten Mäusen konnten im Jahr 2000 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen, daß Ror2 eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung spielt (DeChiara et al., 2000; Takeuchi et al., 2000). Dabei zeigen die Knockout Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Tieren eine geringere Körpergröße und verkürzte Extremitäten, wobei die distalen Elemente stärker betroffen sind als die proximalen. Als weitere Fehlbildungen des Skeletts sind die Verkürzung des Schwanzes und Malformationen im Gesichtsbereich (Verkürzung der Schnauze), an den Wirbelkörpern und an den Rippen zu nennen. Diese Defekte können z.T. darauf zurückgeführt werden, daß die Chondrocyten in den Knorpelkondensationen nicht ausreichend proliferieren, sich nicht säulenartig anordnen und Störungen in der weiteren Reifung aufweisen.

Zusätzlich zu den bereits aufgeführten Defekten zeigen die Knockout Mäuse ventrikuläre Septumsdefekte, werden kurz nach der Geburt cyanotisch und sterben. Eine der Ursachen liegt möglicherweise darin, daß die Alveolen nach der Geburt nicht komplett expandieren und die Mäuse dadurch Probleme beim Atmen haben.

Weitere entscheidende Hinweise, die für eine wichtige Rolle von ROR2 in der Skelettentwicklung sprechen, kommen aus der Humangenetik. Afzal und van Bokhoven gelang es im Jahr 2000, ROR2 als eine der Ursachen für das autosomal rezessiv vererbte

Robinow Syndrom (Robinow et al., 1969) zu identifizieren (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000). Nahezu zeitgleich konnten Oldridge und Schwabe ROR2 als Ursache der dominant vererbaren Handfehlbildung Brachydaktylie Typ B ausmachen (Oldridge et al., 2000; Schwabe et al., 2000).

Das rezessiv vererbare Robinow Syndrome (OMIM 268310) ist durch eine Vielzahl von Symptomen charakterisiert, die in unterschiedlich schwerer Ausprägung zur Geltung kommen können. Generell treten häufig Kleinwuchs, die Verkürzung von Gliedmaßen, Wirbelkörperfusionen, Brachydaktylie, urogenitale Fehlbildungen und ein charakteristisches Erscheinungsbild des Gesichtes (*“fetal face”*) auf. Schwabe und Mitarbeiter konnten 2004 zeigen, daß die von Takeuchi und Kollegen generierte Ror2-defiziente Maus als Modell für das autosomal rezessive Robinow Syndrom dienen kann (Takeuchi et al., 2000; Schwabe et al., 2004). Alle Mutationen, die bisher im humanen ROR2 Gen gefunden wurden und zum Robinow Syndrom führen, sind entweder Missense-, Nonsense- oder Frameshift-Mutationen, die vermutlich zu einem Funktionsverlust von Ror2 führen. Diese Mutationen liegen über das gesamte Gen verteilt vor. Einige dieser Mutationen sind in Abbildung 3 dargestellt.

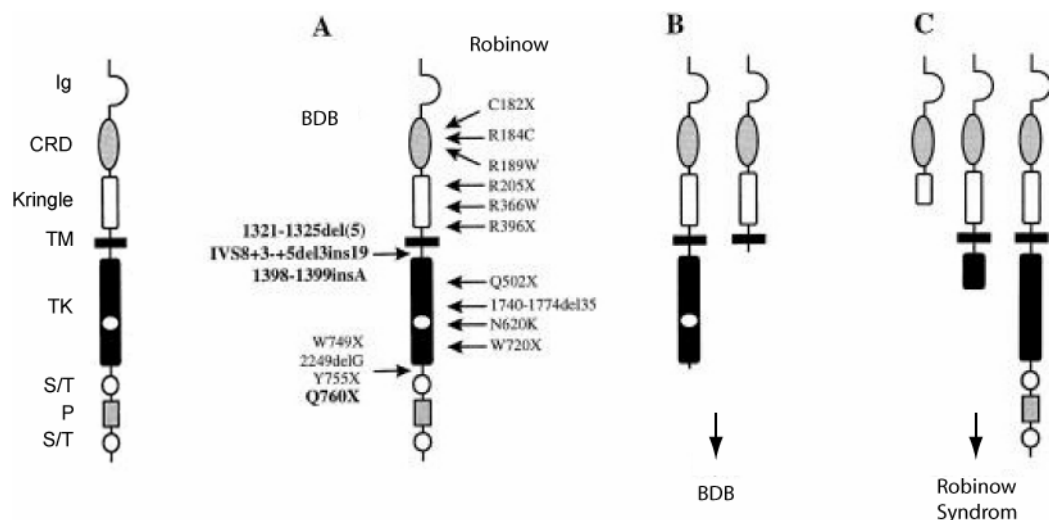


Abbildung 3: Darstellung von Mutationen in ROR2 und den daraus resultierenden Phänotypen
A: Dargestellt ist die Verteilung verschiedener Mutationen im Ror2-Protein. Auf der linken Seite sind die Mutationen eingezeichnet, die zur Brachydaktylie Typ B (BDB) führen. Sie konzentrieren sich auf zwei Bereiche im Protein. Auf der rechten Seite sind Mutationen vermerkt, die zum Robinow Syndrom (RRS) führen, die Mutationen verteilen sich über fast die gesamte Länge des Proteins. **B:** Auswirkungen der BDB verursachenden Mutationen auf das Protein. ROR2 wird entweder direkt vor oder direkt hinter der Tyrosinkinasedomäne trunciert. **C:** Auswirkungen der RRS verursachenden Mutationen in ROR2. Da RRS rezessiv vererbt wird, ist bei allen dargestellten Trunkierungen, bzw. der Inaktivierung der Kinasedomäne, kein funktionelles Ror2-Protein mehr zu erwarten (modifiziert nach Schwabe et al., 2000).

Kürzlich haben Chen und seine Kollegen die ER-assoziierte Protein-Degradation als einen Mechanismus vorgeschlagen, der u.a. im Robinow Syndrom zum Funktionsverlust von ROR2 führen könnte (Chen et al., 2005). Dabei führt das Endoplasmatische Reticulum (ER) eine Art Qualitätskontrolle durch. Das veränderte Protein wird im ER zurückgehalten und erreicht dadurch nicht den Ort seiner normalen Funktion.

Als Brachydaktylien werden kongenitale Extremitätenfehlbildungen bezeichnet, bei denen eine Verkürzung der Finger/Zehen aufgrund der abweichenden Entwicklung eines oder mehrerer Finger/Zehenglieder, bzw. Mittelhand- oder Mittelfußknochen auftritt. Brachydaktylien treten meist als autosomal dominant vererbte Fehlbildung auf (Schwabe & Mundlos, 2004). In Abhängigkeit der betroffenen Finger werden die Brachydaktylien nach Bell in fünf Gruppen unterteilt (A-E, Bell, 1951), die in Abbildung 4 dargestellt sind. Für alle Brachydaktylien, außer Brachydaktylie Typ A3, konnte die jeweilige molekulare Ursache inzwischen aufgeklärt werden (Gao et al., 2001; Lehmann et al., 2003, Oldridge et al, 2000; Schwabe et al., 2000; Polinkovsky et al., 1997; Johnson et al., 2003). Die betroffenen Gene sind ebenfalls in Abbildung 4 dargestellt.

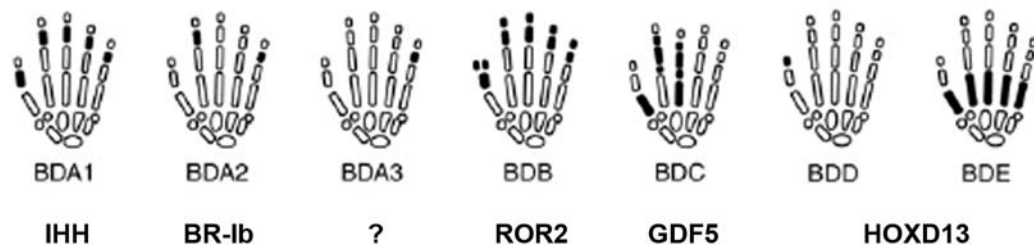


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Brachydaktylien und der jeweils betroffenen Gene Die Hand ist jeweils mit Metacarpalia und den drei Phalangen gezeigt, betroffene Skelettelemente sind schwarz dargestellt. BDA1: Brachydaktylie Typ A1; BDA2: Brachydaktylie Typ A2; BDA3: Brachydaktylie Typ A3; BDB: Brachydaktylie Typ B; BDC: Brachydaktylie Typ C; BDD: Brachydaktylie Typ D; BDE: Brachydaktylie Typ E; IHH: Indian Hedgehog; ROR2: Receptor Tyrosin like Orphan Receptor 2; GDF5: Growth and Differentiation Factor 5; HOXD13: Homeobox gene D13 (modifiziert, nach Schwabe & Mundlos, 2004).

Die Brachydaktylie Typ B (OMIM 113000) ist durch das Fehlen, bzw. die Hypoplasie der distalen Phalangen gekennzeichnet. Zusätzlich treten Nageldysplasien, Hypoplasien der mittleren Phalangen und in variabler Ausprägung Symphalangismus (fehlende Gelenksbildung) auf. In einigen Fällen können auch Syndaktylien (Verwachsung von Fingern /Zehen) beobachtet werden

Alle bisher identifizierten Mutationen, die im Menschen Brachydaktylie Typ B verursachen, konzentrieren sich genau auf zwei bestimmte Stellen im ROR2-Protein (siehe Abbildung 3) und führen zur Trunkierung des Proteins entweder direkt vor oder direkt hinter der Tyrosinkinasedomäne. Bei den Mutationen handelt es sich um Insertionen, Deletionen (Verschiebung des Leserasters) oder Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon und damit zur Trunkierung des Proteins führen.

Interessanterweise verursachen die distal gelegenen Mutationen, die zur Trunkierung des Proteins hinter der Tyrosinkinase führen, einen stärkeren Phänotyp bei den Patienten, als die proximal gelegenen Mutationen. Möglicherweise kommt es hier zu einem Funktionsgewinn des distal trunkierten Proteins.

Sowohl die distalen, als auch die proximalen Mutationen könnten zu einem dominanten Effekt des mutierten Proteins über einen möglichen Dimerisierungspartner führen. Wie bereits erwähnt, ist die Dimerisierung von RTK meist eine direkte Folge der Ligandenbindung, die zur Aktivierung (Autophosphorylierung) des Rezeptors führt (siehe Abschnitt 1.2, S.4). Im Falle der trunkierten Ror2-Varianten, die zur BDB führen, wäre das mutierte Protein zwar in der Lage mit einem anderen Rezeptor zu dimerisieren, jedoch wäre die intrazelluläre Signalweiterleitung vermutlich gestört. Dies könnte z.B. zu einer geringeren Signalweitergabe führen, da Rezeptor-Komplexe, die trunkierte Proteine enthalten, Liganden wegfangen, die somit nicht mehr an reguläre Komplexe binden können.

1.2.5 Signalwege und Interaktionspartner von Ror2

Zu Beginn dieser Arbeit waren weder Liganden noch Interaktionspartner von Ror2 veröffentlicht. In der Zwischenzeit wurden jedoch ein paar potentielle Liganden von Ror2 publiziert. Zum einen wird Ror2 mit Wnt-Signalwegen in Verbindung gebracht. Hikasa und seine Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Funktion von Xror2 in den konvergenten Extensionsbewegungen während der Gastrulation in *Xenopus* über die CRD vermittelt wird (Hikasa et al., 2002). In früheren Arbeiten von Heisenberg und Tada konnte gezeigt werden, daß der Prozeß der konvergenten Extension in *Xenopus* und in Zebrafischen von Wnt11 gesteuert, und daß diese Funktion über einen nicht kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt wird (Heisenberg et al., 2000; Tada & Smith, 2000). Hikasa und seine Kollegen konnten daraufhin durch Co-Immunopräzipitations-Experimente zeigen, daß Xror2 sowohl Xwnt11 als auch Xwnt5a binden kann. Diese und weitere Ergebnisse schlagen Ror2 als einen Teil des planaren Zellpolaritäts-Signalweges vor (zur Übersicht: Miller, 2001).

Inzwischen mehren sich die Hinweise für eine Interaktion von Ror2 mit Wnt-Signalwegen. Oishi und seine Kollegen beschreiben die phänotypische Ähnlichkeit der Wnt5a- und Ror2-defizienten Mäuse und konnten in Co-Präzipitationsstudien die Interaktion von Wnt5a mit Ror2 aus der Maus demonstrieren. Zusätzlich konnten sie die Assoziation von Ror2 mit verschiedenen Frizzled-Rezeptoren zeigen. Aber auch eine Verknüpfung von Ror2 mit dem kanonischen Wnt-Signalweg konnte inzwischen hergestellt werden. Billiard und ihre Mitarbeiter konnten eine physische Interaktion zwischen Ror2 und Wnt1/Wnt3, zwei klassischen kanonischen Wnt-Molekülen, nachweisen. Dabei antagonisiert Ror2 die Wnt1-, bzw. Wnt3-vermittelte Stabilisierung von β -Catenin im Cytoplasma von Osteoblasten (Billiard, 2005). Mikels und Nusse konnten in diesem Jahr zeigen, daß Wnt5a in Abhängigkeit vom Rezeptor-Kontext in der Lage ist, den kanonischen Wnt-Signalweg zu beeinflussen. Dabei führt die Expression von Wnt5a zusammen mit Ror2 zu einer Inhibierung, während die Expression von Wnt5a und Fzd4 zu einer Aktivierung des kanonischen Signalweges führt.

Ror2 wird jedoch auch mit einem anderen wichtigen Signalweg, dem BMP/TGF β -Signalweg, in Verbindung gebracht. Sammar und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Ror2 mit dem BMP-Rezeptor Typ I (BRI-b) interagiert. Diese Interaktion kann unabhängig von der Bindung des BRI-b-Liganden Gdf5 stattfinden und führt zur Transphosphorylierung von Ror2 durch den BMP-Rezeptor (Sammar et al., 2004). Bisher ist beschrieben, daß die Aktivierung z.B. durch Gdf5 oder andere BMPs zur Transphosphorylierung des BRI-b durch den konstitutiv aktiven BMP-Rezeptor Typ II führt und daß dies wiederum intrazellulär zur Phosphorylierung der Smads 1, 5 und 8 führt, die mit Hilfe von Smad4 in den Kern gelangen und dort die Transkription von Zielgenen regulieren (Nohe et al., 2002). Sammar und Mitarbeiter konnten nun zeigen, daß die Bindung von Ror2 an den BRI-b zur Inhibition der Gdf5/BRI-b vermittelten Aktivierung der Smads 1, 5 und 8 führt, Ror2 also den Gdf5/BRI-b Signalweg negativ modulieren kann. Dies konnte auch funktionell an ATDC5-Zellen gezeigt werden, wo die Co-Expression von Ror2 und BRI-b die Gdf5-abhängige Chondrogenese, die bei Überexpression der beiden einzelnen Rezeptoren (Ror2, BRI-b) induziert wird, inhibieren kann (Sammar et al., 2004).

Interessanterweise haben Gdf5 und BRI-b wie Ror2 wichtige Funktionen in der Skelett- und Extremitätenentwicklung (Baur et al., 2000). Gdf5 spielt zum Beispiel eine wichtige Rolle in der anfänglichen Knorpelbildung, in dem es die Zelladhäsion und Kondensation der mesenchymalen Zellen bewirkt, bevor diese zu Chondrocyten differenzieren. Außerdem hat Gdf5 einen entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung der Gelenke (Francis-West et al.,

1999; Storm et al., 1994) . Auch für den BRI-b ist eine chondrogene Wirkung beschrieben, so führt die Überexpression von BRI-b *in vitro* und *in vivo* zu einer verstärkten Chondrogenese (Zou et al., 1997), während der Verlust von BRI-b zu verringerter Proliferation und gestörter Differenzierung der Chondrocyten in den Fingern und Zehen führt (Yi et al., 2000).

Sowohl Gdf5 als auch BRI-b werden in den Zusammenhang mit Brachydaktylien gebracht. Mutationen, die im humanen Ortholog von Gdf5, in CDMP1, gefunden wurden, verursachen Brachydaktylie Typ C (Polinkovsky et al., 1997), während Mutationen im BRI-b zu Brachydaktylie Typ A2 führen können (Lehmann et al., 2003). Insofern ist ein Zusammenspiel von Ror2, BRI-b und Gdf5 gerade in Bezug auf die Handentwicklung besonders interessant.

Als intrazelluläre Interaktionspartner von Ror2 konnten bis dato nur die Casein Kinase Iε (Kani et al., 2004) und Dlxin-1 (Matsuda et al., 2004) identifiziert werden. Dlxin-1 wurde ursprünglich als Bindungspartner von Dlx5 identifiziert und scheint dessen transkriptionelle Aktivität regulieren zu können (Masuda et al., 2001). Desweiteren wurde eine Interaktion zwischen Dlxin-1 und Dlx7, bzw. Msx2 beschrieben.

Matsuda und seine Kollegen konnten nun zeigen, daß Dlxin-1 und Msx2 in Abwesenheit von Ror2 primär im Zellkern lokalisieren. Es wird vermutet, daß Dlxin-1 dort vermutlich auch die transkriptionelle Aktivität von Msx2 regulieren kann. Bei Expression von Ror2, Dlxin-1 und Msx2 verändert sich jedoch die Lokalisation von Dlxin-1, es co-lokalisiert nun mit Ror2 an der Plasmamembran. So könnte Ror2 indirekt Einfluß auf die Msx2-abhängige Transkription nehmen, in dem es die subzelluläre Lokalisation von Dlxin-1 verändert (Matsuda et al, 2004). Weiterhin wurde eine Interaktion zwischen Ror2 und Casein Kinase Iε beschrieben. Dabei konnten Kani und Mitarbeiter zeigen, daß Ror2 durch Casein Kinase Iε an bestimmten Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert wird, was wiederum zur Autophosphorylierung von Ror2 führt. In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, daß das so aktivierte Ror2 für die Tyrosin-Phosphorylierung der *G protein coupled receptor kinase 2* (GRK2) sorgt (Kani et al., 2004). Casein Kinase Iε gilt als ein wichtiger Regulator des kanonischen Wnt-Signalweges. Dabei scheint der initiale Schritt in der Markierung von β-Catenin für den proteasomalen Abbau in der Phosphorylierung von β-Catenin durch Casein Kinase Iε zu liegen (Ding & Dale, 2002). Es läßt sich spekulieren, daß Ror2 nicht nur extrazellulär über die Bindung von Wnt-Liganden in der Lage ist, Wnt-Signalwege zu modulieren, sondern, daß dies auch auf intrazellulärer Ebene erfolgen kann.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten intrazelluläre Bindungspartner von Ror2 identifiziert werden, um weitere Erkenntnisse über die Funktion von Ror2 in der Skelettentwicklung zu gewinnen und um die durch Mutationen in Ror2 verursachten Erkrankungen im Menschen (Robinow Syndrom, Brachydaktylie Typ B) besser zu verstehen.

Dazu wurde eine Maus-embryonale cDNA-Bibliothek (E9,5-E10,5) durch *“Yeast Two Hybrid”*- und *“Yeast Three Hybrid”*-Experimente nach Ror2-Bindungspartnern durchsucht.

Potentielle Bindungspartner sollten anschließend näher charakterisiert werden. Dabei standen Expressions- und Co-Lokalisationsstudien im Vordergrund. Zusätzlich sollten potentielle Interaktionen in einem unabhängigen Experiment bestätigt werden, zu diesem Zweck wurden Co-Immunopräzipitations-Experimente durchgeführt.