

3. Ergebnisse

Ror2 ist eine Rezeptortyrosinkinase (RTK), die im Tierreich stark konserviert ist und die vermutlich in verschiedenen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Um neue Aufschlüsse über die Funktion von Ror2 in der Embryonalentwicklung zu gewinnen und um die Rolle von Ror2 in der Pathogenese des Robinow Syndroms und der Brachydaktylie Typ B besser verstehen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach neuen Ror2-Bindungsproteinen gesucht.

3.1 “Yeast Two Hybrid” und “Yeast Three Hybrid” als Methoden der Wahl zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen

Eine der gebräuchlichsten Methoden zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen ist der “Yeast Two Hybrid”-Screen, der erstmals von Fields und Song 1989 beschrieben wurde. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren aus zwei funktionell unabhängigen Domänen bestehen, nämlich aus einer DNA-bindenden (DB) und einer transkriptionsaktivierenden Domäne (AD). Diese Domänen werden im “Yeast Two Hybrid”-System räumlich voneinander getrennt, so daß sie einzeln keine Transkription von Genen aktivieren können. Werden diese beiden Domänen jedoch in enge räumliche Nähe gebracht, wird ihre Funktion als Transkriptionsfaktor wieder voll hergestellt. Im “Yeast Two Hybrid”-Experiment wird die DNA-bindende Domäne oft mit einem Protein oder einem Teil eines Proteins fusioniert, das man näher untersuchen möchte, dieses Fusionsprotein wird auch als Köderprotein (im Englischen: “Bait”) bezeichnet. Mit diesem Köderprotein können nun Interaktionen mit bereits bekannten Proteinen näher untersucht werden, um z.B. den Bereich in einem Protein zu identifizieren, an dem die Interaktion stattfindet. Es können aber auch unbekannte Proteine als Bindungspartner identifiziert werden. Dazu wird entweder das zweite Protein von Interesse an die aktivierende Domäne fusioniert oder aber eine cDNA-Bank in einen Vektor inkloniert, der für die aktivierende Domäne codiert. Die Fusionsproteine, die die aktivierende Domäne beinhalten, werden als Beuteproteine (engl. “Prey”) bezeichnet. Köder- und Beuteproteine werden dann in der Hefe co-exprimiert. Findet eine Interaktion der beiden Proteine statt, wird die Transkription von einem oder mehreren Markergenen aktiviert. Dies können z.B. Selektionsmarker sein, die die Hefen auf Medien wachsen lassen, denen essentielle Nährstoffe fehlen (siehe Abb. 7A).

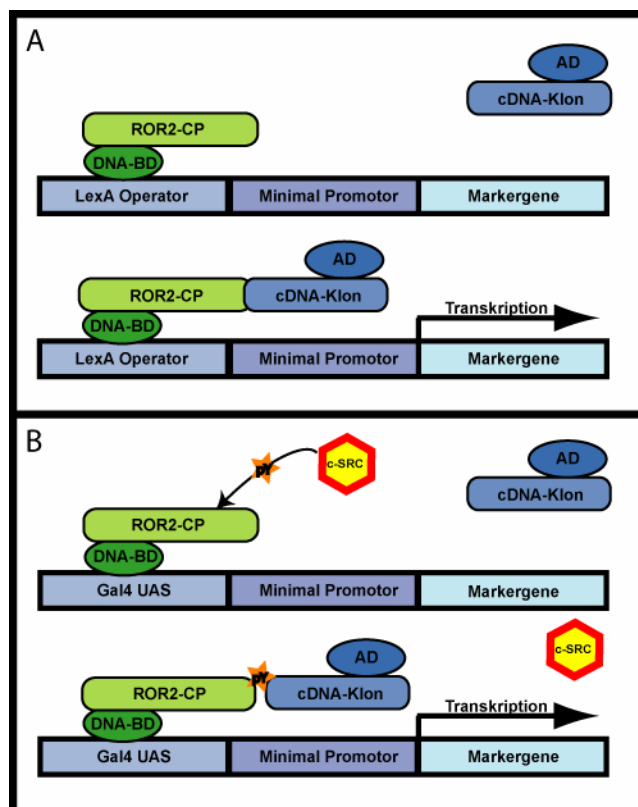


Abbildung 7: Prinzip der "Yeast Two Hybrid"- und "Yeast Three Hybrid"- Systeme **A:** Der cytoplasmatische Teil von Ror2 wird an eine LexA DNA-bindende Domäne (DNA-BD) fusioniert und kann alleine keine Transkription von Markergenen aktivieren. Findet jedoch eine Interaktion mit einem Protein statt, das aus einer cDNA-Bank stammt, die an die Aktivierungsdomäne von VP16 (AD) fusioniert wurde, werden die DNA-BD und die AD in enge räumliche Nähe gebracht und können so die Transkription von Markergenen (*HIS3* und *LacZ*) aktivieren. Die Expression dieser Markergene läßt eine Selektion der Klone zu, in denen die Köder- und Beuteproteine miteinander interagieren. Die hier verwendete cDNA-Bibliothek stammt aus Maus-Embryonen der Stadien E9,5-E10,5 (abgewandelt nach Matchmaker LexA Two-Hybrid System, User Manual, Clontech) **B:** Das Prinzip des "Yeast Three Hybrid"-Screen funktioniert sehr ähnlich. In dieser Arbeit wurde der cytoplasmatische Teil von Ror2 an eine Gal4-DNA-DB gebunden. Das Plasmid, welches für das Köderprotein codiert, enthält noch eine zweite "Multiple Cloning Site" (MCS) hinter einem unabhängigen Promotor, die eine gleichzeitige Expression eines weiteren Proteins (in diesem Fall der konstitutiv aktiven Src-Kinase) erlaubt. Das zweite Protein kann eine Brücken- oder aber eine modifizierende Funktion einnehmen. Bindet ein Beuteprotein nun z.B. an das modifizierte Köderprotein, wird die Transkription der Markergene aktiviert, was wiederum die Selektion Interaktions-positiver Hefeklone erlaubt.

Der "Yeast Three Hybrid"-Screen (Osborne et al., 1995) folgt im wesentlichen dem gleichen Prinzip. Jedoch wird zusätzlich zu den zwei Fusionsproteinen noch ein weiteres Protein exprimiert, welches z.B. eine Brückenfunktion oder eine modifizierende Funktion (z.B. Tyrosinkinase-Aktivität) haben kann (siehe Abb. 7B). Tirode und Mitarbeiter haben 1997 einen "Yeast Three Hybrid"-Assay beschrieben, bei dem das dritte exprimierte Protein in der Hefe unter der Kontrolle eines Methionin-reprimierbaren Promotors steht (Tirode et al., 1997), so daß die Expression dieses Proteins kontrollierbar ist. So lassen sich z.B.

phosphorylierungsabhängige und -unabhängige Interaktionen in einem Experiment untersuchen.

3.2 Identifikation von potentiellen Ror2-Bindungspartnern durch “*Yeast Two Hybrid*”- und “*Yeast Three Hybrid*”-Systeme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Ror2-Köderproteine eingesetzt. Stets wurde der intrazelluläre Teil von Ror2 verwendet, um zu gewährleisten, daß weder das Signalpeptid noch der transmembrane Bereich des Ror2-Proteins die nucleäre Lokalisation des Köderproteins beeinträchtigt, welche Voraussetzung für eine Interaktion mit einem Beuteprotein im Kern der Hefe ist. Da es sich bei Ror2 um eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) handelt, sollte versucht werden, ein Tyrosin-phosphoryliertes Köderprotein im “*Yeast Two Hybrid*”- bzw. “*Yeast Three Hybrid*”-Experiment einzusetzen. Daher wurden verschiedene, im nachfolgenden Abschnitt genauer beschriebene Köderproteine generiert.

3.2.1 Klonierung und Expressionskontrolle der Köderproteine

Die Generierung aller Köderproteine erfolgte über eine PCR, bei der der intrazelluläre Teil von Ror2 ab Nucleotid 1288 der codierenden Sequenz mit Oligonucleotiden amplifiziert wurde, die 5' und 3' der passenden Sequenz mit Restriktionsschnittstellen versehen waren. Zusätzlich wurden 5' der passenden Sequenz drei Nucleotide eingefügt, die für die Aminosäure Glycin codieren, um die Fusion zwischen der DNA-BD und dem intrazellulären Teil von Ror2 räumlich möglichst flexibel zu halten.

Für die “*Yeast Two Hybrid*”-Analysen wurde die entsprechende Ror2-Sequenz in den “*Bait*”-Vektor BTM116 inkloniert (s Abb. 8A). Nach der Verifizierung des Konstruktes durch Sequenzierung wurde das Plasmid in den Hefestamm L40 transformiert, um die Expression des Köderproteins in der Hefe zu überprüfen. Mit den gewachsenen Hefekolonien wurden Über Nacht-Kulturen angeimpft, aus denen Hefelysate hergestellt wurden. Diese konnten mit Hilfe eines Antikörpers, der die LexA Domäne erkennt, per Western Blot analysiert werden. In dem in Abb. 8B gezeigten Western Blot läßt sich in Spur 2 das exprimierte Köderprotein erkennen. Zusätzlich wurde ein Fusionsprotein zwischen der LexA Domäne und einer trunkierten Variante von Ror2 erzeugt (mit Ror2-CP Δ 745), die in Spur 3 zu erkennen ist. Diese Variante entspricht einer trunkierenden Mutation, die im Menschen Brachydaktylie Typ B1 (BDB) verursacht (siehe Einleitung). Als positive Kontrolle wurde eine LexA-Fusion mit der Met-Kinase verwendet, die freundlicherweise von Dr. U. Schaeper

zur Verfügung gestellt wurde. Als Negativkontrolle wurde ein Lysat aus untransfizierten L40-Hefen aufgetragen.

Die Hybridisierung desselben Western Blots mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper (siehe Abb. 8C) zeigt eine Phosphorylierung der Positivkontrolle (Spur 1), jedoch keine Phosphorylierung der beiden Ror2-Proteine (siehe Spuren 2 und 3).

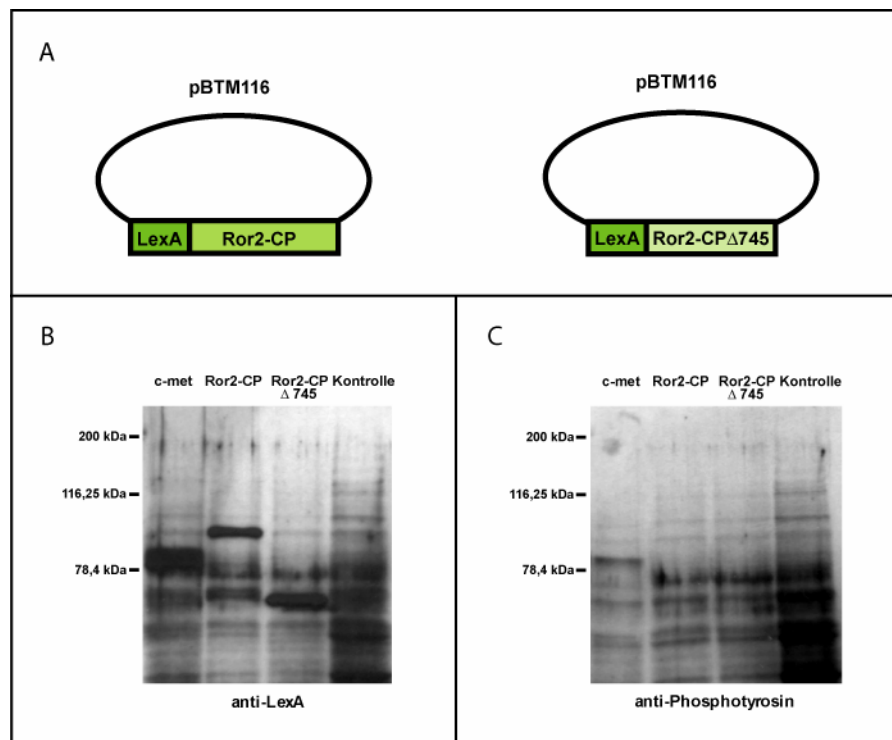


Abbildung 8: Expression und Phosphorylierung des Köderproteins LexA-Ror2-CP

A: Schematische Darstellung des Köderkonstruktes Ror2-CP. Der cytoplasmatische Teil von Ror2 wurde dem Leseraster folgend hinter eine LexA DNA-bindende Domäne kloniert (links). Zusätzlich wurde eine trunkierte Ror2-Variante erzeugt (rechts, Erläuterung siehe Text) **B:** Western Blot, der die Expression des Köderproteins (Spur2) und des trunkierten Konstrukts (Spur3) in L40 Hefen zeigt. In der untransformierten Kontrolle werden vom anti LexA-Antikörper keine Banden in vergleichbarer Höhe (Spur4) erkannt. **C:** Ror2-CP liegt nicht Tyrosin-phosphoryliert vor, anti pY-Antikörper detektieren in Spur2 keine Bande in entsprechender Höhe.

Aus diesem Grunde wurde ein weiteres Köderprotein erzeugt, bei dem 5' der Ror2-Sequenz eine Tpr-Dimerisierungsdomäne (siehe Abb. 9A) eingefügt wurde. In Abbildung 9B ist die Expression der Positivkontrolle (Spur 2) und der beiden LexA-tpr-Ror2-Konstrukte (Spur 3, bzw. Spur 4) mit Hilfe des LexA-Antikörpers gezeigt. Aus Abbildung 9C (Spur 3 und 4) geht jedoch hervor, daß die zusätzliche Dimerisierungsdomäne nicht zu einer Autophosphorylierung der Ror2-Fusionsproteine führt.

In einem weiteren Versuch, ein Tyrosin-phosphoryliertes Köderprotein zu generieren, wurde

der intrazelluläre Teil von Ror2 in einen “*Yeast Three Hybrid*”-Vektor (pBridge) einkloniert, wodurch eine Fusion mit einer GAL4 DNA-bindenden Domäne entstand (siehe Abb. 10A).

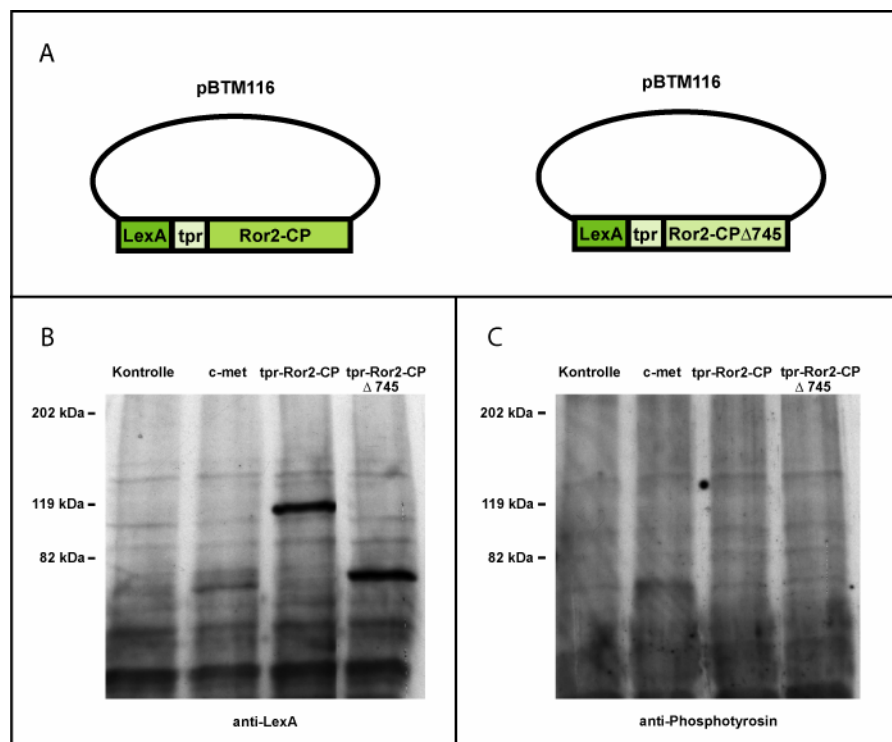


Abbildung 9: Expression und Phosphorylierung des Köderproteins LexA-Tpr-Ror2-CP

A: Schematische Darstellung des Köderkonstruktes Tpr-Ror2-CP und des Konstruktes Tpr-Ror2-CP Δ 745. Die Tpr-Dimerisierungsdomäne und der cytoplasmatische Teil von Ror2 wurden dem Leseraster folgend hinter eine LexA DNA-bindende Domäne kloniert. **B:** Western Blot, der die Expression des Köderproteins (Spur3) und des trunkeierten Konstrukts (Spur4) in L40 Hefen zeigt. In der untransformierten Kontrolle werden vom anti LexA-Antikörper keine Banden in vergleichbarer Höhe (Spur1) erkannt. **C:** Tpr-Ror2-CP liegt nicht Tyrosin-phosphoryliert vor. Anti pY-Antikörper detektieren in Spur3 keine Bande in entsprechender Höhe.

Daher mußte für dieses Experiment ein anderer Hefestamm als L40 verwendet werden, da in L40 Hefen die Selektionsmarker unter der Kontrolle des LexA Promotors stehen. In diesem Experiment müssen die Markergene jedoch unter der Kontrolle eines Gal4 Promotors stehen, damit die Selektionsmarker im Falle einer Interaktion von Köder- und Beuteprotein transkribiert werden können. In die zweite “*Multiple Cloning Site*” von pBridge wurde die Sequenz der konstitutiv aktiven Src-Kinase eingebracht. Die Expression von Src steht unter der Kontrolle eines unabhängigen Promotors und kann durch die Zugabe von 1 mM Methionin reprimiert werden.

Um die Expression und Phosphorylierung dieses Köderproteins zu kontrollieren, wurde der verifizierte “*Bait*”-Vektor in den Hefestamm AH109 transformiert. Aus den gewachsenen Hefekolonien wurden Über Nacht-Kulturen angeimpft, Hefelysate hergestellt und per

Western Blot analysiert. Abbildung 10B zeigt die Expression des Ror2-Köderproteins mit und ohne Zugabe von Methionin zum Wachstumsmedium der Hefen (Abb. 10B, Spur 1 und 2). Als Negativkontrolle wurden untransformierte Hefen des AH109-Stamms verwendet (Spur 3). Wie aus Abb. 10C deutlich hervorgeht, führt die gleichzeitige Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase zu einer Phosphorylierung des Köderproteins. Die Zugabe von 1 mM Methionin führt zu einer Reprimierung der Src-Expression und somit zu einer deutlichen Verringerung der Phosphorylierung des Ror2-Köderproteins, wie in Spur 2 gut zu erkennen ist. Die Zugabe von 1 mM Methionin führt aber scheinbar nicht zu einer vollständigen Reprimierung der Expression von Src, da in Spur 2 noch eine schwache anti Phosphotyrosin-positive Bande in Höhe des Köderproteins zu erkennen ist. Erst die Zugabe von 5 mM Methionin führt zu einer vollständigen Unterdrückung der Src-Expression (Daten nicht gezeigt).

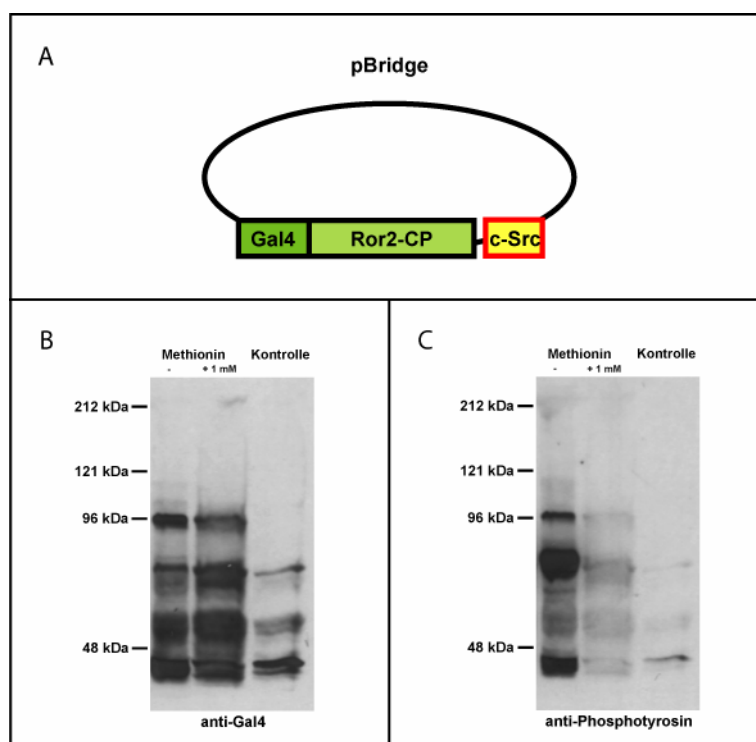


Abbildung 10: Expression und Phosphorylierung des Köderproteins Gal4-Ror2-CP

A: Schematische Darstellung des Köderkonstruktes Gal4-Ror2-CP. Der cytoplasmatische Teil von Ror2 wurde dem Leseraster folgend hinter eine Gal4 DNA-bindende Domäne kloniert. In eine zweite MCS wurde eine konstitutiv aktive Src-Kinase einkloniert, deren Expression von einem unabhängigen Promotor kontrolliert wird. **B:** Western Blot, der die Expression des Köderproteins (Spur1) in AH109 Hefen zeigt. Anti-Gal4-Antikörper erkennen eine Bande von etwa 96 kDa. In der untransformierten Kontrolle (Spur3) ist in vergleichbarer Höhe keine Bande zu erkennen. **C:** Die Co-Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase führt zur Tyrosin-Phosphorylierung von Gal4-Ror2-CP (Spur1). Die Zugabe von 1 mM Methionin führt zu einer Reprimierung der Expression des Src-Konstruktes und damit zu einer schwächeren Phosphorylierung des Köderproteins (Spur2). Anti pY-Antikörper detektieren in der untransformierten Kontrolle (Spur3) keine Bande in entsprechender Höhe.

3.2.2 “Yeast Two Hybrid”- und “Yeast Three Hybrid”-Screen

Für den eigentlichen “Yeast Two Hybrid”-, bzw. “Yeast Three Hybrid”-Screen wurden mit dem jeweiligen Köderprotein prätransformierte Hefekulturen (L40-, bzw. AH109-Hefen) in einem großen Ansatz mit der Hollenberg cDNA-Bank (Maus E9,5-10,5; Hollenberg et al., 1995) transformiert.

Als Negativkontrolle wurden direkt vor der Transformation der cDNA-Bank je 50 µl der kompetenten, prätransformierten Hefen mit dem leeren “Prey”-Vektor (VP16) transformiert. Auf keiner der Kontrollplatten kam es zu Wachstum von Hefekolonien, so daß sowohl eine unspezifische Interaktion zwischen dem Köderprotein und der Aktivierungsdomäne als auch eine Kontamination ausgeschlossen werden konnten.

Die Transformationseffizienz wurde bestimmt, in dem nach Transformation der cDNA-Bank 1/100.000 des entsprechenden Gesamtansatzes auf einer Platte mit Nährmedium ohne Tryptophan und Leucin (-TL: Selektion auf Köder- und Beuteplasmid) ausplattiert wurde. Nach zwei Tagen Inkubation bei 30° C konnten die gewachsenen Hefekolonien ausgezählt werden. Im “Yeast Two Hybrid”-Screen wurden $1,92 \times 10^7$ Hefetransformanden und im “Yeast Three Hybrid”-Screen $5,28 \times 10^7$ Transformanden durchsucht.

Die restlichen transformierten Hefen wurden im “Yeast Two Hybrid”-Ansatz auf einem Nährmedium ausgestrichen, dem außer Tryptophan und Leucin (s.o.) zusätzlich noch Histidin, Uracil und Lysin (-THULL) fehlte, dies diente der Selektion auf eine Interaktion der exprimierten Proteine.

Im “Yeast Three Hybrid”-Experiment wurde die transformierte Hefekultur aufgeteilt: Eine Hälfte wurde auf Platten ausgestrichen, denen Tryptophan, Histidin, Leucin und Methionin fehlten (-THLM, entspricht Ansatz A), die andere Hälfte der Hefekultur wurde auf Platten verteilt, denen zusätzlich 1 mM Methionin ins Medium gegeben wurde (-THL+1 mM M, entspricht Ansatz B). Der Zusatz von Methionin führt zur teilweisen Reprimierung der konstitutiv aktiven Src-Kinase und damit zu einer geringeren Phosphorylierung des Ror2-Köderproteins (s. Abb. 10C)

In beiden Experimenten konnten nach 3 Tagen die ersten Hefekolonien auf den Selektionsplatten beobachtet werden. Um die Zahl falsch-positiver Interaktionen zu minimieren, wurden die gesammelten Hefekolonien insgesamt 3x auf frische Selektionsplatten neu ausgestrichen. Zusätzlich wurden alle Kolonien auch auf -TL-Platten ausgestrichen, mit deren Hilfe die Expression eines weiteren Selektionsmarkers untersucht wurde. Dazu wurden die Kolonien durch einen Filter Lift-Assay auf Expression des LacZ-

Markers untersucht. Im “*Yeast Two Hybrid*”-Experiment wuchsen insgesamt nur 5 Kolonien, von denen jedoch alle 5 LacZ-positiv waren.

Im “*Yeast Three Hybrid*”-Ansatz konnten insgesamt 176 Kolonien auf den -THLM-Platten und 209 Kolonien auf den -THL+1 mM M-Platten beobachtet werden. Davon waren 155, bzw. 138 zusätzlich LacZ-positiv.

Für die weiteren Analysen wurden nur Kolonien ausgewählt, die sowohl His3⁺- als auch LacZ- positiv waren. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der His3⁺- und LacZ-positiven Kolonien der Hefeexperimente.

Experiment	His3 ⁺ positive Kolonien	LacZ-positiv Kolonien
“ <i>Yeast Two Hybrid</i> ”-Screen	5	5
“ <i>Yeast Three Hybrid</i> ” Screen -THLM (=A)	176	155
“ <i>Yeast Three Hybrid</i> ” Screen -THL+1 mM M (=B)	209	138

Tabelle 1: Zusammenfassung der Zahlen der His3⁺- und LacZ- positiven Hefekolonien aus den durchgeführten Hefe-Experimenten

3.2.3 Analyse der Hefeklone

Da im “*Yeast Two Hybrid*”-Experiment nur wenige Hefekolonien gewachsen waren, wurden alle Beuteproteine genauer analysiert. Dazu mußte aus allen Klonen DNA isoliert werden, die anschließend in den Bakterienstamm HB101 elektroporiert wurde. Dieser besitzt eine Leucin-Defizienz, so daß auf Nährmediumsplatten ohne Leucin nur Bakterienkolonien wachsen können, denen durch die Elektroporation ein Beuteplasmid eingebracht wurde. Da in Hefen durch Transformation mehrere Plasmide in eine Zelle gelangen können, wurden aus jeder *E. coli*-Transformation zwei Bakterienklone ausgewählt, aus denen dann DNA isoliert wurde. Ein anschließender Restriktionsverdau zeigte, ob sich ein oder mehrere Plasmide in den Hefen befunden haben müssen. Abb. 11 zeigt ein Agarosegel, aus dem hervorgeht, daß sich in Hefekolonie Nr. 3 zwei verschiedene Beutepasmide befunden haben müssen, da die DNAs aus zwei verschiedenen HB101-Kolonien ein unterschiedlich großes Restriktionsfragment zeigen (siehe Spur 5 und Spur 7). In diesem Fall wurden beide Klone weiter bearbeitet. Die anderen Klone zeigten die gleiche Fragmentgröße, daher wurde nur ein Klon ausgewählt und weiter analysiert.

Die Beuteproteine wurden zusammen mit dem Köderprotein in Hefen retransformiert, um die Protein-Protein Interaktion zu bestätigen. Als Kontrollen wurden zusätzlich zum Beuteprotein die LexA DBD (leerer "Bait"-Vektor), sowie das Köderprotein ohne Tpr-Dimersierungsdomäne und das trunkierte Tpr-Ror2-CP Δ 745 exprimiert. Klon 3.1 ließ sich in der Retransformation nicht bestätigen, die Interaktion wurde vermutlich durch das zweite isolierte

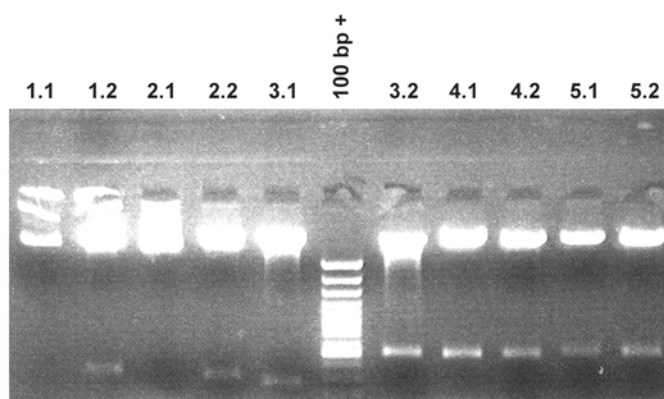


Abbildung 11: NotI-Restriktionsverdau der isolierten Beuteplasmide aus dem "Yeast Two Hybrid"-Experiment Gezeigt ist ein Agarosegel, auf dem NotI-verdaute Beuteplasmide aufgetragen wurden. Die Fragmentgrößen liegen zwischen etwa 300-500 bp. Hefekolonie 3 muß mindestens zwei verschiedene Beuteplasmide enthalten haben, da die entsprechenden HB101-Klone unterschiedliche Größen der Restriktionsfragmente aufweisen.

Plasmid (3.2) vermittelt. Daher wurde Klon 3.1 nicht weiter bearbeitet. Die Klone 2.2, 4.1 und 5.1 waren zwar in der Retransformation mit Tpr-Ror2-CP, jedoch nicht mit Ror2-CP positiv, so daß die Interaktion in diesen Fällen an der Tpr-Dimerisierungsdomäne stattfinden muß. Nachfolgend wurde durch Sequenzierung der DNA festgestellt, um welches Beuteprotein es sich handelt. Dabei stellte sich heraus, daß nur Klon 3.2 im richtigen Leseraster und in der richtigen Orientierung vorlag. Die Resultate dieser Experimente sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Klon	Identität	Leseraster/ Orientierung	Acc. Nr.	Retransformation			
				pBTM116	Tpr-Ror2- CP	Tpr-Ror2- CP Δ 745	Ror2-CP
1.2	Solute carrier family 25	Orientierung -	BC003222	-	+	+	+
2.2	LAMP-1	Leseraster -	BC049097	-	+	+	-
3.2	Wtip	Leseraster +	BC054125	-	+	-	+
4.1	LAMP-1	Leseraster -	BC049097	-	+	+	-
5.1	LAMP-1	Leseraster -	BC049097	-	+	+	-

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des "Yeast Two Hybrid"-Screens mit Tpr-Ror2-CP als Köderprotein

Im “*Yeast Three Hybrid*”-Screen sind wesentlich mehr Klone gewachsen, was eine effizientere Analyse der Klone erforderte. Daher wurden nur die jeweils ersten 5 LacZ⁺-Klone der -THLM und der -THL+1 mM M-Ansätze wie oben beschrieben analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß 7 der 10 analysierten Kolonien das gleiche Beuteprotein, Dlxin-1, enthielten. Um die Zahl der zu bearbeitenden Kolonien reduzieren zu können, wurden aus allen His3⁺- /LacZ-positiven Hefekolonien Lysate hergestellt, die anschließend in eine Hefe Kolonie PCR mit Dlxin-1-spezifischen Primern eingesetzt wurden.

Identität	Accession Nr.	Häufigkeit im Screen	Zahl auf -THLM	Zahl auf -THL +1 mM M	Retransformation	
					Ror2-CP	Ror-CP Δ745
Dlxin-1	BC031461	190	94	96	+	-
Brain-1	MUSPOUDOMA	7	7	0	÷	÷
Eukaryotic translation factor1 delta (Eef1d)	NM_029663	6	2	4	÷	÷
Peg10	NM_130877	4	1	3	÷	÷
Sox5	NM_011444	3	2	1	÷	÷
Dazap2 / Brbp	BC083347	2	0	2	÷	÷
HoxB2	BC019414	2	2	0	÷	÷
OTU domain containing 4, transcript variant 4	XM_899855	2	2	0	÷	÷
PolyA binding protein, cytoplasmatic 1 (Pabpc1)	BC011207	2	2	0	÷	÷
Wtip	BC054125	1	1	0	+	-
Cartilage homeo protein1 (Cart1)	NM_172553	1	1	0	÷	÷
Ship2	AF162781	1	1	0	÷	÷
Stathmin (Stmn1)	BC054396	1	1	0	÷	÷
Predicted PR domain containing 2 (Prdm2)	XM_915500	1	1	0	÷	÷
Pumilio2	BC041773	1	1	0	÷	÷
Pax3	NM_130877	1	1	0	÷	÷
Ataxin 2- like (Atxn2l)	NM_183020	1	1	0	÷	÷
Predicted Bat2 domain containing 1	XM_924912	1	1	0	÷	÷
Zinc finger protein 67 (Zfp67)	AK149976	1	0	1	÷	÷
Ubiquitin like-5	AK012803	1	0	1	÷	÷
LPS-induced TNFα factor/ Proline rich region profile/ Cysteine rich region profile containing protein (LITAF)	AK149939	1	0	1	÷	÷
Ring finger protein 38 (Rnf38)	BC060730	1	0	1	÷	÷
RNA binding motif protein 9 (Rbm9)	BC002124	1	0	1	÷	÷

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse des “*Yeast Three Hybrid*”-Screens mit Ror2-CP als Köderprotein und der co-exprimierten konstitutiv aktiven Src-Kinase

Die Dlxin-1-negativen Hefelysate wurden mit einer weiteren Kolonie-PCR analysiert, bei der VP16 (Beutevektor)-spezifische Primer zum Einsatz kamen. Die so amplifizierte Fragmente wurden enzymatisch aufgereinigt und mit VP16 Primern sequenziert. Falls in der Kolonie-PCR mehr als eine Bande entstand, wurden diese Banden aus dem Gel ausgeschnitten, durch Gelextraktion aufgereinigt und ebenfalls sequenziert. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse des "Yeast Three Hybrid"-Screens zusammenfassend dargestellt.

Von insgesamt 293 LacZ-positiven Kolonien enthielten 232 Proteinsequenzen, die sich im richtigen Leseraster und in der richtigen Orientierung befanden. Insgesamt wurden in diesem Experiment 23 potentielle Interaktionspartner von Ror2 identifiziert. Dabei fällt auf, daß Dlxin-1 am häufigsten und in beiden Ansätzen (-/+ Methionin) etwa gleich häufig gefunden worden ist.

Die Interaktion zwischen Ror2 und Wtip, die schon im "Yeast Two Hybrid"-Experiment gefunden wurde, konnte in diesem zweiten, unabhängigen Experiment bestätigt werden.

Diese beiden identifizierten, potentiellen Ror2-Interaktionspartner wurden im folgenden weiter bearbeitet.

3.3 Dlxin-1 als potentieller Ror2-Interaktionspartner

Dlxin-1 besteht aus 775 Aminosäuren und gehört zur Necdin/Melanoma associated antigen (MAGE)-Proteinfamilie, da es mit diesen Proteinen Ähnlichkeiten im C-Terminus aufweist (Masuda et al, 2000). Der entsprechende Bereich wird auch als "MAGE homology domain" bezeichnet. Zusätzlich zu dieser Domäne ist eine in der Mitte des Proteins gelegene tandemartig angeordnete Wiederholung einer Hexapeptidsequenz (mit der Consensus-Sequenz WQXPXX) für Dlxin-1 charakteristisch.

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ist Dlxin-1 mit 190 positiven Kolonien der am häufigsten gefundene Interaktionspartner von Ror2-CP im "Yeast Three Hybrid"-Experiment. Er stellt 82% aller gefundenen Interaktionspartner von Ror2 und ist damit deutlich überrepräsentiert.

In Abb. 12 ist die Lage einiger isolierter Fragmente innerhalb der codierenden Sequenz von Dlxin-1 dargestellt, dabei entsprechen die verschiedenfarbigen Striche unter- und oberhalb der Peptidsequenz der Lage verschiedener Klone. Die Sequenz aller gefundenen Klone überlappt, dieser minimale Überlappungsbereich entspricht der Sequenz der Fragmente A1 und B48 und ist durch den roten Strich oberhalb der Aminosäuresequenz kenntlich gemacht. Daraus kann nun geschlossen werden, daß die Interaktion zwischen Ror2-CP und Dlxin-1 in diesem

atggctcagaaacccggacggcggtgacggcctccgcggttccaggctgaggcctctgtt
M A Q K P D G G A G L R G F Q A E A S V
gaagacagcgccttgcctgtgacaccttgatggaagccatccagatctccgaggctccg
E D S A L L V Q T L M E A I Q I S E A P
cccaccgcccagccagcagctgccagtgggcacaatgctagtcctccagaggttcacag
P T S Q A T A A A S G P N A S P Q S S Q
cccccaactgccaatgagaaggctgatactgaggtttccagcagctgctgccaggcctaag
P P T A N E K A D T E V S A A A A R P K
acaggctttaaggcccagaatgccaccacaaaggggccaatgattactctcaggcagct
T G F K A Q N A T T K G P N D Y S Q A R
aatgccaaaggagatgccaaagaatcagctotaaggcggcctttaagtcacagaatggcacc
N A K E M P K N Q S K A A F K S Q N G T
cctaaaggctocactgctgcttacttctccaggcagcaccacaggcacaatcagct
P K G P H A A S D F S Q A A P T G K S A
aaaaagtctgaaatggcctttaagggtcagaatagcactaaggctggccccgggtaccacc
K K S E M A F K G Q N S T K A G P G T T
tacaatttccctcagctcccagtgccaatgagatgaccaaacaccagcctaagacagct
Y N F P Q S P S A N E M T N N Q P K T A
aaggcttggaatgacactactaaggctccctggagctgatgccagaccagaatgtaaat
K A W N D T T K V P G A D A Q T Q N V N
caggccaaaatggctgagcagtaggaccagcaggtatctctgagctgagtggtgcagca
Q A K M A D V G T S A G I S E A D G G A A
gcccagacatcagcagatggctcccagactcagaacgtggagctcccggactataatcgg
A Q T S A A D G S Q T Q N V E S R T I I R
ggaagagaccgcccgttaactgaaatggaagaaacacacagtggtggggaatcaa
G K R T R K V N N L N V E E N N S G D Q
aggcgtgctcactggcctcagggaactggaggtctgctccgggttcagtgaccactcag
R R A S L A S G N W R S A P V P V T T Q
cagaaccacactggagcaccctcaatgtggtggtggcagacaccactggcttggcagaac
Q N P P G A P P N V V W Q T P L A W Q N
ccatcaggctggcaaacccagacagccaggcagaccaccagcagcagctcagagctccc
P S G W Q N Q T A R Q T P P A A R Q S P
ccagctagcagacaccatcagcttggcagaaccagcttgcagatggcagaatccagtgatc
P A R Q T P S A W Q N P V A W Q N P V I
tggcctaaccagctgacttggcagaatccagtgatctggcacaaccccttctctggcct
W P N P V I W Q N P V I W P N P I V W P
ggcccaatgtctggcccaaacccctggcagagtagacacactggatggcagagccca
G P I V W P N P M A W Q S T P G W Q S P
cccagctggcagctcccactagctggcagagccctcaagatggcagggcccctccagat
P S W Q A P P S W Q S P Q D W Q G P P D
tggcaggtaccactgactggtcaatgctcctgactggtctcttccctccgactggcct
W Q V P P D W S M P P D W S F P S D W P
tttccacctgactggatccccggcactggccaatccacctgactggcagaacttacga
F P P D W I P A D W P I P P D W G L L R
ccctcacctaactctgagatccctcctcaactctcgtgctcagcagaaccagggtcctcca
P S P N L R S S S N S R A S Q N O G P P
cagccccagatgtggccttctcaggaagagcaataagttggtcaagtacctgatg
Q P R D V A L L Q E R A N K L V L G L M
cttaaaactacacgaagtgcccacaaagcgtcagaaaatgctgagggatataatccga
L K D Y T K V P I K R S E M L R D I I R
gaatacactgatgtctccagaatcattgagcgcagctgcttctgctggagaagaaa
E Y T D V Y P E I I E R A C F V L E K K
tttggaaatccagctgaaggaaaatogacaaagaagagcatctgtatattctcatcagttacc
F G I Q L K E I D K E E H L Y I L I S T
cctgagctcctggctggcactcaggaacgacaaagacacccgaagctggcctctc
P E S L A G I L G T T K D T P K L G L L
ttagtgattctggcattatctctcatgaaatggcaaccgctgcccaggcggcctctctgg
L V I L G G I I F M N G N R A T E A V L W
gaagcactggcgaagtgaggactcgtcctgggtgagacacccctcctctggtgactg
E A L R K M G L R P G V R H P L L G D L
agaaaactcttacttacgagttgttaaagcagaaaatcctggactatagacgagtgccc
R K L L T Y E F V K Q K Y L D Y R R V P
aacagcaaccctcctgagatgagttcctctggggcctccgctcctaccatgagactagc
N S N P P E Y E F L W G L R S Y H E T S
aagatgaaagtctgagattcattgacagagttcagaagagagaccctcgtgactggact
K M K V L R F I A E V Q K R D P R D W T
gcacagttcaggaagctgcagatgaagccttgatgctctggtgctgctgctgagctgag
A Q F M E A A D E A L D A L D A A A A E
gcagaggccccggctgaagcagaaaacccgcatgggaattggagatgaggctgtgtctggt
A E A R A E A R N R M G I G D E A V S G
ccctggagctggatgacattgattgagctgctgacctgggatgaggaaggagatttt
P W S W D D I E F E L L T W D E E G D F
ggagatccttggctccagatcccccttaccctctggccagataccaccagaatgcccg
G D P W S R I P F T F W A R Y H Q N A R
tccaggttccaggccttactggccccatcattggccccagtggtactgccaccgccc
S R F P Q A F T G P I I G P S G T A T A
aacttccgcccactcgggtgccattggcttctctgggttgagtaa
N F A A N F G A I G F F W V E -

Abbildung 12: Lage verschiedener, im "Yeast Three Hybrid"-Screen identifizierter Fragmente innerhalb der codierenden Sequenz von Dixin-1 Dargestellt sind die Nucleotid- und die Aminosäuresequenz von Dixin-1. Der Bereich, der durch die Wiederholung einer Hexapeptid-Sequenz mit dem Consensus **WQXPXX** (Masuda et al., 2001) gekennzeichnet ist, wurde durch rote Schriftfarbe hervorgehoben.

Eingezeichnet ist die Lage von 11 verschiedenen Klonen, die im "Yeast Three Hybrid"-Experiment identifiziert wurden. Dabei entspricht der blaue Strich unterhalb der Aminosäuresequenz der Lage des Klons B43 und der grüne Strich der Lage des Klons A 30.

Der gelbe Strich (oberhalb der Aminosäuresequenz) markiert die Lage der Klone A13, A26, A159, B4, B5, B6, B19 und B49, wobei der rote Strich (oberhalb der Aminosäuresequenz) der Lage der Klone A1 und B48 entspricht. Jedes beschriebene Fragment enthält den Bereich der Klone A1 und B48, so daß diese Sequenz den minimalen Überlappungsbereich aller isolierten Fragmente darstellt. Die Oligonucleotide, die in der Kolonie-PCR zur Amplifikation von Dixin1-haltigen Sequenzen verwendet wurden, liegen ebenfalls innerhalb des Bereiches der Hexapeptidwiederholungen. Somit kann gefolgert werden, daß der Bereich der Bindung des cytoplasmatischen Bereiches von Ror2 an Dixin-1 innerhalb der Sequenz der Fragmente A1 und B48 liegt.

Bereich von Dlxin-1 stattfindet, der durch die mehrfache Wiederholung der Hexapeptidsequenz (dargestellt in roter, dicker Schrift) gekennzeichnet ist.

3.3.1 Die Interaktion mit Dlxin-1 findet im distalen Bereich von Ror2 statt

Zur Bestätigung der Interaktion von Ror2 und Dlxin-1 wurden Retransformationen in der Hefe durchgeführt. Dabei wurde ein isoliertes Dlxin-1-Beuteplasmid (entspricht Klon B6, siehe Abb. 12) mit verschiedenen Köderplasmiden in AH109-Hefen co-transformiert und das Wachstum der Hefen auf verschiedenen Selektionsmedien untersucht. Dabei wird auf den Medien -TLM und -TL +1 mM Methionin auf die erfolgreiche Aufnahme der beiden co-transformierten Plasmide selektioniert. Die beiden oberen Reihen in Abb. 13A und 13B zeigen, daß alle Plasmide erfolgreich in die Hefen transformiert wurden. Diese Hefen können nun jedoch nur auf -THLM-, bzw. -THL +1 mM Methionin-Platten wachsen, wenn eine Interaktion zwischen dem Köder- und dem Beuteprotein stattfindet. Dies ist in beiden Experimenten nur zwischen dem isolierten Dlxin-1-Fragment und dem cytoplasmatischen Teil von Ror2 der Fall (siehe Reihe 4, Bild 2 in Abbildung 13A und 13B). Dabei scheint die Reprimierung der Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase (durch Zugabe von 1 mM Methionin) die Interaktion zwischen Dlxin-1 und Ror2 nicht zu beeinflussen (Abb. 13B). Der Bereich, in dem diese Interaktion stattfindet, muß im distalen Bereich von Ror2 liegen, da keine Interaktion zwischen Dlxin-1 und dem distal trunkierten Ror2-Köderprotein (Ror2-CP Δ 745) beobachtet werden kann (Reihe 4, Bild 3 in Abb. 13A und 13B).

Im "*Yeast Three Hybrid*"-Experiment wird die konstitutiv aktive Src-Kinase als separates Protein (ohne DNA-bindende Domäne) co-exprimiert. Um auszuschließen, daß die Src-Kinase die Bindung zwischen Ror2 und Dlxin-1 vermittelt, in dem sie eine Brückenfunktion erfüllt, wurde das Dlxin-1-Fragment mit der konstitutiv aktiven Src-Kinase, die an eine Gal4 DNA-bindende Domäne fusioniert wurde, in AH109-Hefen co-exprimiert. Wie aus Bild 4 in Reihe 4 der Abb. 13A und 13B hervorgeht, kommt es zu keinem Wachstum der so transformierten Hefen. Das bedeutet, daß die Interaktion zwischen Ror2 und Dlxin-1 am Ror2-Protein selber stattfindet, und nicht direkt durch Src vermittelt wird.

3.4 Wtip als potentieller Ror2-Interaktionspartner

Eine Interaktion zwischen dem cytoplasmatischen Bereich von Ror2 und Wtip wurde sowohl im "*Yeast Two Hybrid*"- als auch im "*Yeast Three Hybrid*"-Experiment gefunden. Wtip gehört zur Familie der LIM Domänen-Proteine, die durch das Vorhandensein von einer oder

mehreren LIM Domänen gekennzeichnet sind. Das Wtip-Protein enthält drei C-terminal gelegene LIM Domänen. Zusätzlich sind in Maus, Ratte und Mensch zwei Prolin-reiche Abschnitte, die SH3 Domänen-Bindungsstellen darstellen könnten und eine C-terminale PDZ Domänen Bindungsstelle (Srichai et al., 2004) beschrieben.

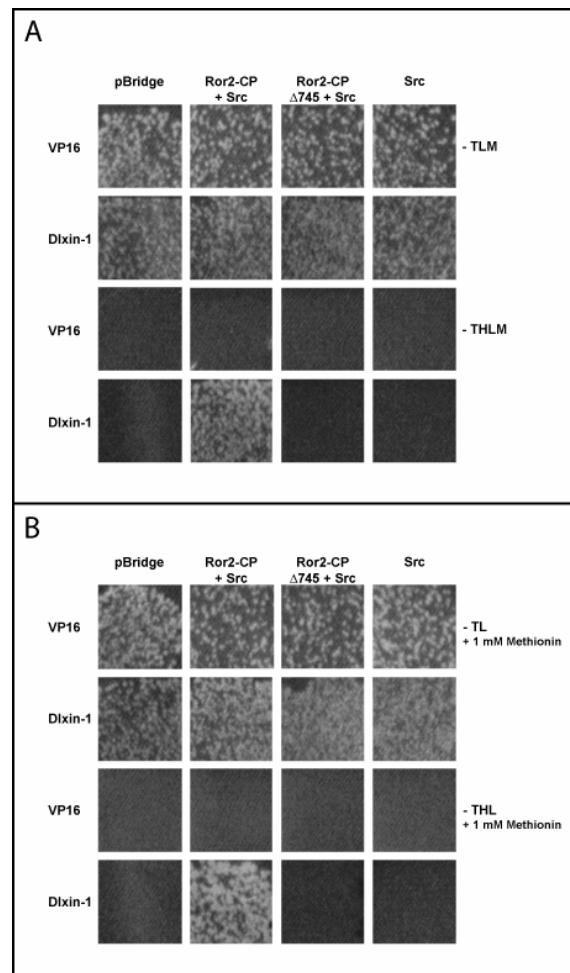


Abbildung 13: Bestätigung der Ror2-Dlxin-1 Interaktion in AH109-Hefen durch Retransformation **A:** AH109-Hefen wurden mit leerem Beute- (VP16), bzw. Dlxin-1-Beutevektor und verschiedenen Köderplasmiden transformiert. Die oberen beiden Reihen zeigen, daß sämtliche Co-Transformationen erfolgreich waren, da die Hefen nur durch Aufnahme der beiden Köder- und Beuteplasmide in der Lage sind, auf –TL-Medien zu wachsen. Das Wachstum auf –THLM setzt dagegen eine Interaktion der exprimierten Köder- und Beuteproteine voraus, die zur Expression von Selektionsmarkern (in diesem Fall Histidin) führen. Diese Interaktion findet nur zwischen Dlxin-1 und dem Köderprotein Ror2-CP statt (siehe Bild 2, Reihe 4), wohingegen keine Interaktion mit dem trunkierten Ror2-Konstrukt (Bild 3, Reihe 4) oder mit der Src-Kinase (siehe Bild 4, Reihe 4) beobachtet werden kann. Das Fehlen von Methionin in den Selektionsmedien führt zur vollen Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase. **B:** Diese Abbildung entspricht im wesentlichen Abbildung A, jedoch wurden die Hefe-Co-Transformationen auf Selektionsmedien ausgestrichen, denen 1 mM Methionin zugesetzt wurde. Dies führt zu einer Reprimierung der Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase. Diese Reprimierung ist allerdings nicht vollständig (siehe auch Abb. 10C). Auch dieses Experiment zeigt nur eine Interaktion zwischen dem Dlxin-1 Fragment und dem cytoplasmatischen Teil von Ror2 (Reihe 4, Bild 2). Da keine Interaktion mit der trunkierten Variante von Ror2-CP stattfindet (Reihe 4, Bild 3), kann gefolgert werden, daß der Bindungsort von Dlxin1 an Ror2 im distalen Bereich von Ror2 liegen muß.

In Abbildung 14 ist die Lage der beiden isolierten Hefeklone (Wtip-Y2H) innerhalb der codierenden Sequenz von Wtip durch eine dickere, rote Schrift dargestellt. Interessanterweise sind die beiden unabhängig voneinander identifizierten Wtip-Fragmente in ihrer Sequenz identisch. Die bunten Kästen markieren die drei LIM Domänen, wobei der blaue Kasten LIM Domäne 1, der grüne Kasten der zweiten und der gelbe Kasten der dritten LIM Domäne entspricht. Dabei wird deutlich, daß nur die ersten beiden LIM Domänen innerhalb der isolierten Wtip-Klone liegen. Die dritte LIM Domäne scheint demnach für die Interaktion von Wtip mit Ror2 nicht von Relevanz zu sein.

3.4.1 Wtip bindet an den distalen Bereich von Ror2

Um die Interaktion von Ror2 und Wtip zu bestätigen und näher zu charakterisieren, wurden Retransformationen in L40-Hefen durchgeführt. Dabei wurde das im "Yeast Two Hybrid"-Experiment isolierte Wtip-Fragment (Wtip-Y2H) mit verschiedenen Köderplasmiden in der Hefe co-exprimiert. Zusätzlich wurde als Kontrolle das leere Beuteplasmid untersucht. Die Bilder in den oberen zwei Reihen von Abbildung 15 zeigen Hefekolonien, die auf -TL-Nährmedien gewachsen sind. -TL selektioniert auf die Expression der Köder- (-T), bzw. Beuteplasmide (-L). Aus diesen Bildern geht hervor, daß alle durchgeführten Co-Transformationen zur Expression der beiden jeweiligen transformierten Plasmide führen. Durch das Ausplattieren des halben Hefetransformationsansatzes auf -THULL-Platten konnte nun untersucht werden, ob die entsprechenden Köder- und Beuteproteine miteinander interagieren. Die Co-Transformation des leeren Beuteplasmids (VP16) mit allen eingesetzten Köderproteinen (Reihe 3) führt erwartungsgemäß zu keinem Wachstum von Hefen auf -THULL-Platten. Somit kann eine Interaktion der Köderproteine mit der Aktivierungsdomäne ausgeschlossen werden. Ebenso können eine Interaktion der Aktivierungsdomäne (VP16) und des Beuteproteins Wtip (Y2H) mit der DNA-bindenden LexA Domäne ausgeschlossen werden, da eine Co-Transformation mit dem leeren Ködervektor (BTM116) zu keinem Hefewachstum auf -THULL-Platten führt (Abb. 15, Spalte 1, Bild 3 und 4). Die Co-Expression des Wtip-Fragments mit den Köderplasmiden Tpr-Ror2-CP und Ror2-CP erlaubt es den transformierten Hefen jedoch, auf -THULL-Medium zu wachsen (Abb. 15, Reihe 4, Bild 2 und 4). Diese Proteine interagieren also in der Hefe. Wtip scheint dabei mit dem Ror2-Bereich zu interagieren, da die Interaktion auch ohne die Expression der Tpr-Dimerisierungsdomäne stattfindet. Transformiert man nun aber das Wtip-Fragment mit dem distal trunkierten Ror2-Konstrukt (Tpr-Ror2-CP Δ 745), kommt es dagegen zu keiner

```

atgcagcgtcgcggacggccgcgacgacgcggtctgctcctggccgggctgggctg
M Q R S R T A A D D A A L L L A G L G L
cgcgagtcggagccgaccgcccggctccccagggcgctgcgggcgggccgagggccgtg
R E S E P T A G S P G R V R R G P R A V
gacgagggcgccgacgctcgggcccggagggcaaggggtggctgcgggcgcccccagggcc
D E A A P A S G R R G K G G C G G P E A
gcgcccagcgtcccagagcccggagcgagggcccgcgcccagcctcggggctcggac
A P D V P S R P E R G P R A S L A G S D
ggcggcagcgcgctcagcgggtatcagcctgggctatgaccagcggccagggcccggc
G G S A R S S G I S L G Y D Q R H G P G
cccgggcccgtcgggggacgcgcgctccagcgtgtccagcctgggtcccgtggc
P G P P S G G S A R S S V S S L G S R G
tcagcgggcccgtgtgcagacctgctgccgcccggctcggcccggcgcccggcctct
S A G A C A D L L P P G V G P A P A R S
ccggagcctgccagttccccttcccgttgccgtcgtgcccgtgccccgggcccgggag
P E P A Q F P F P L P S L P L P P G R E
ggcggcccagtgcgcccgagcggcggtggaggcgctcacgcggaactggagcgcgcg
G G P S A A E R R L E A L T R E L E R A
ctcagggcgcgcacggcgcgagactactttggcatttgtatcaagtgtggccttggcatc
L E A R T A R D Y F G I C I K C G L G I
tacggagcagggcagggcgtgccaggcgatggggagcctgtatcacaccgactgcttcac
Y G A R Q A C Q A M G S L Y H T D C F I
tgtgactcctgtgggagacggctccgtgggaagcccttctataacgtgggtgagaaagt
C D S C G R R L R G K A F Y N V G E K V
tactgccagggacttccctgtactccgggtccagcaaacagctgacaagtgtagctg
Y C Q E D F L Y S G F Q Q T A D K C S V
tgtggacacctcatggagatgattctgcaagcccttqcaatcctaccaccaqcc
C G H L I M E M I L O A L G K S Y H P G
tcttccactgctcagtgatgcaacgactgcttggatgaggttcccttactgtgagatg
C F R C S V C N E C L D G V P F T V D V
gacaacaacatttactgcttagagactatcatacgggtgtttgaccaaactgtgcc
D N N I Y C V R D Y H T V F A P K C A S
tgtgcccgtcccacccctcctgcacagggctgtgagacaaccattcgtgtggtgctcatg
C A R P I L P A Q G C E T T I R V V S M
gacagagactaccatgtggaggtgtaccactgtgagagactgtgggctgcagctgagtgqg
D R D Y H V E C Y H C E D C G L Q L S G
gaggagggacgcccgtgctatcccctggaggggacctgctctgccggcgatgccacctg
E E G R R C Y P L E G H L L C R R C H L
aggcgccttgggcagggcccggctcccctcgcctgctgtgcatgtgactgagctctga
R R L G Q G P L P S P A V H V T E L -

```

Abbildung 14: Lage der im "Yeast Two Hybrid"- und "Yeast Three Hybrid"-Screen identifizierten Fragmente innerhalb der codierenden Sequenz von Wtip In dieser Abbildung sind sowohl die Nucleotid-, als auch die Aminosäuresequenz von Wtip dargestellt. Die beiden unabhängig voneinander isolierten Hefeklone (Wtip-Y2H) sind in ihrer Sequenz identisch. Ihre Lage ist durch eine rote, dickere Schrift hervorgehoben. Die LIM Domänen von Wtip sind durch drei unterschiedlich farbige Kästen markiert (Blauer Kasten = LIM Domäne 1, grüner Kasten = LIM Domäne 2, gelber Kasten = LIM Domäne 3). Die ersten beiden LIM Domänen sind komplett in den identifizierten Wtip-Fragmenten enthalten. Die dritte LIM Domäne scheint für die Bindung von Wtip an Ror2 nicht benötigt zu werden.

Interaktion der Proteine, die Hefen können folglich nicht mehr auf dem Selektionsmedium wachsen (Abb. 15, Spalte 3, Bild 4). Daraus läßt sich schließen, daß die Interaktion zwischen Wtip und Ror2 in der distalen Region von Ror2 innerhalb der Prolin-, bzw. Serin/Threoninreichen Bereiche stattfinden muß.

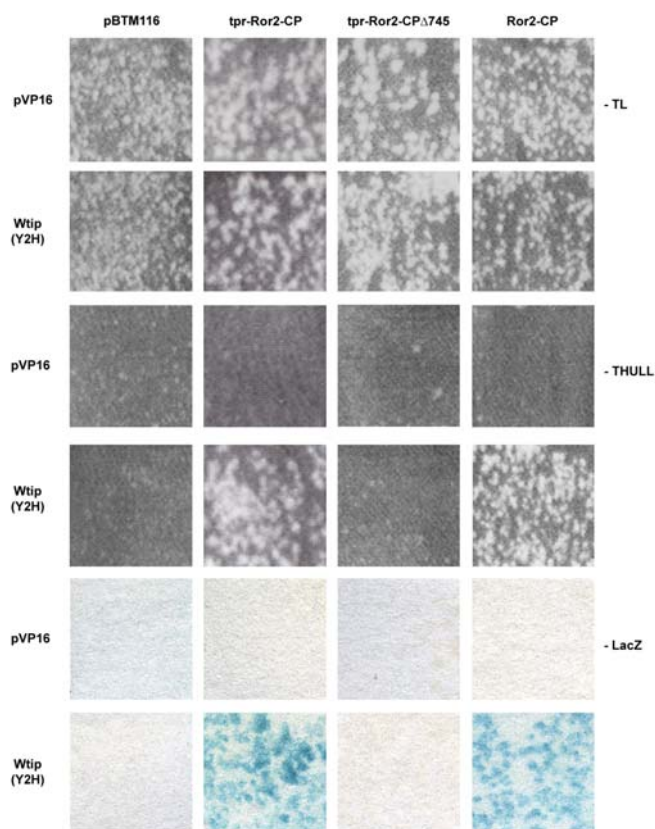


Abbildung 15: Bestätigung der Ror2-Wtip Interaktion in L40-Hefen durch Retransformation der isolierten Plasmide Durch Retransformation wurde das aus der Hefe isolierte Beuteprotein Wtip auf Interaktion mit den Köderproteinen Tpr-Ror2-CP und Ror2-CP untersucht. Dabei wurde die eine Hälfte des Transformationsansatzes auf –TL-Platten und die andere Hälfte auf –THULL-Platten ausgestrichen. Das Wachstum von Hefen auf –TL-Medien bestätigt, daß sowohl das Köder-, als auch das Beuteplasmid in der Hefe zur Expression kommen (Reihen 1 und 2). Jedoch können nur solche Hefen auf –THULL-Medien wachsen, in denen Köder- und Beuteproteine miteinander interagieren. Das Wtip-Fragment interagiert also mit Tpr-Ror2-CP (Reihe 4, Bild 2) und mit Ror2-CP (Reihe 4, Bild 4), jedoch nicht mit Tpr-Ror2-CP Δ 745 (Reihe 4, Bild 3) oder der LexA DNA-bindenden Domäne (pBTM116: Reihe 4, Bild 1). Diese Interaktionen lassen sich zusätzlich durch einen LacZ-Assay bestätigen. Die Interaktion von Wtip mit Tpr-Ror2-CP (Reihe 6, Bild 2) und mit Ror2-CP (Reihe 6, Bild 4) führt zur Expression des β -Galaktosidase-Markergens und damit zu einer Blaufärbung der Hefekolonien nach Zugabe von X-Gal. Die Co-Transformation von allen untersuchten Köderplasmiden mit dem leeren Beutevektor führt weder zu Wachstum von Hefekolonien auf –THULL-Platten (Reihe 3) noch zu einer Blaufärbung im LacZ-Assay (Reihe 5).

Hefen, in denen Köder- und Beuteproteine interagieren, exprimieren als weiteren Marker die β -Galaktosidase. Diese Hefekolonien verfärben sich nach Zugabe von X-Gal blau, während Hefen ohne interagierende Proteine ihre ursprüngliche Farbe beibehalten. Dazu werden die Kolonien per Filter-Lift von den -TL-Platten auf Filterpapiere übertragen. In mehreren Einfrier-/Auftau-Cyclen werden die Zellwände der Hefen aufgebrochen. Die Filter werden dann in einem X-Gal-haltigen Puffer bei 30° C inkubiert und auf Blaufärbung untersucht. Die Interaktion zwischen dem cytoplasmatischen Bereich von Ror2 und dem Wtip-Fragment läßt

sich auf diesem Wege bestätigen. Sowohl die mit Tpr-Ror2-CP und Wtip (Abb. 15, Reihe 6, Bild 2) als auch die mit Ror2-CP und Wtip (Reihe 6, Bild 2) co-transformierten Hefekolonien zeigen eine kräftige Blaufärbung. Eine Bindung von Wtip an die Tpr Domäne kann jedoch ausgeschlossen werden, da Wtip nicht an Tpr-Ror2-CP Δ 745 (Abb. 15, Reihe 4 und 6, Bild 3) bindet.

3.4.2 Die Interaktion zwischen Wtip und Ror2 ist in Hefe spezifisch

Da in der Literatur Interaktionen zwischen LIM Domänen-Proteinen und Rezeptortyrosinkinasen beschrieben sind (Wu & Gill, 1994; Wu et al., 1996), war es von Interesse zu untersuchen, ob Wtip auch mit anderen RTK in der Hefe interagiert. Dazu wurden Köderproteine verwendet, an deren DNA-bindende Domäne die cytoplasmatischen Bereiche verschiedener RTK (c-Met, Insulin-Rezeptor, Ret, Ros, CSF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor) fusioniert waren (alle Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. U. Schaeper zur Verfügung gestellt). Diese Köderplasmide wurden mit dem isolierten Wtip-Fragment in Hefen co-transformiert und diese dann auf -TL- und -THULL-Platten ausgestrichen. Obwohl die Co-Transformation in allen Fällen erfolgreich war (siehe Hefekolonien auf -TL-Medien in der oberen Reihe in Abbildung 16), sind nur Hefeklone auf einer einzigen -THULL-Platte gewachsen (Abb. 16: Reihe 2, Bild 3). Das Experiment zeigt, daß das Wtip-Fragment spezifisch mit dem cytoplasmatischen Teil von Ror2 in L40 Hefen interagiert.

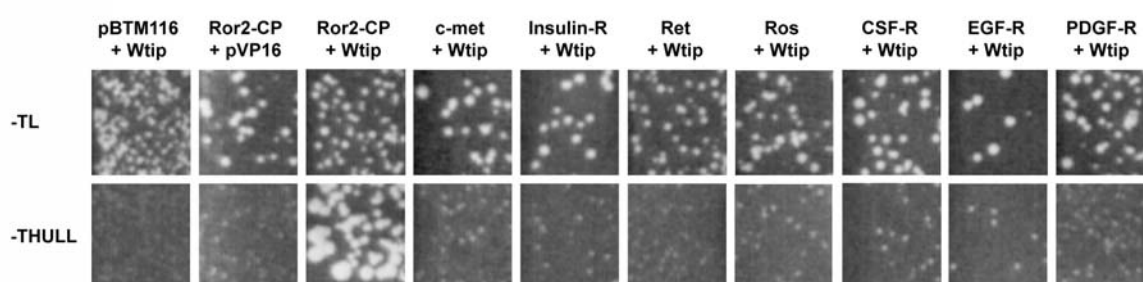


Abbildung 16: Wtip interagiert in L40 Hefen mit Ror2, aber nicht mit anderen getesteten Rezeptortyrosinkinasen Um die Spezifität der Interaktion von Wtip (Y2H) mit Ror2 zu untersuchen, wurden Co-Transformationen mit anderen LexA-Fusionsproteinen in der Hefe durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob das isolierte Wtip-Fragment auch mit den cytoplasmatischen Bereichen anderer Rezeptortyrosinkinasen interagieren kann. Aus der oberen Reihe der Abbildung geht hervor, daß alle Co-Transformationen erfolgreich waren, da die transformierten Hefen auf -TL-Platten wachsen können. Dahingegen kommt es nur bei der Co-Transformation von Wtip (Y2H) und Ror2-CP zu deutlichem Wachstum von Hefen auf -THULL-Platten (siehe Reihe 2 Bild 3). Das bedeutet, daß Wtip sehr spezifisch mit Ror2 interagiert. Mit den anderen getesteten Kinasen kommt es zumindest in der Hefe mit Wtip zu keiner Interaktion.

3.4.3 Klonierung und Analyse von Wtip

Da zu dem Zeitpunkt der Isolierung des Wtip-Fragments aus dem “*Yeast Two Hybrid*”-Experiment Wtip weder publiziert noch die Sequenz in voller Länge beschrieben war, mußte zuerst durch das Aneinanderreihen verschiedener EST-Sequenzen die codierende Sequenz *in silico* zusammengesetzt werden. Daraufhin wurden Oligonucleotide entworfen, die stromaufwärts und stromabwärts der codierenden Wtip-Sequenz Restriktionsschnittstellen beinhalten, die das Einklonieren des durch PCR generierten Fragmentes in einen Expressionsvektor erlauben. Da die ersten 500 Basen der codierenden Sequenz von Wtip sehr GC-reich sind (81% G/C; 19% A/T), ließ sich das gesamte Fragment vorerst nicht in einem Stück amplifizieren. Daher wurde eine Restriktionsschnittstelle in der Sequenz von Wtip gesucht, die nur einmal im codierenden Bereich vorkommt. Über diese Schnittstelle (StuI: nt 692- 697) wurden zwei Oligonucleotide gelegt, die die getrennte Amplifikation des 5’ und 3’ gelegenen Fragmentes möglich machen. Für die Amplifikation des 5’ Bereiches wurden mit dem Einsatz von PCRx-Enhancer-Lösung (Invitrogen) Bedingungen gefunden, die eine Amplifikation des sehr GC-reichen Teils von Wtip erlauben. Durch anschließende Ligation der beiden amplifizierten Fragmente in den gewählten Expressionsvektor konnte das “volle Länge” Wtip kloniert werden.

Die codierende Sequenz von Wtip in der Maus besteht aus 1194 Nucleotiden, bzw. 398 Aminosäuren. Auf genomischer Ebene ist Wtip in 8 Exons organisiert, die laut der ensembl-Datenbank (www.ensembl.org) in *Mus musculus* eine Region von 23,72 kb auf Chromosom 7 umschließen.

In Abbildung 17 werden die codierenden Sequenzen von Wtip aus verschiedenen Spezies (Maus, Mensch, Ratte, Fruchtfliege, Zebrafisch und Huhn) miteinander verglichen. Dabei fällt auf, daß es einen hohen Grad an Konservierung innerhalb des C-terminalen Bereiches des Wtip-Proteins gibt, in dem sich die LIM Domänen (durch farbige Kästen kenntlich gemacht) befinden. Alle Cystein-Reste, die innerhalb der LIM Domänen das Zink-Atom koordinieren, sind in den betrachteten Spezies konserviert. Außerdem läßt sich feststellen, daß die Prolinreichen Regionen (Consensus-Sequenz: Aminosäuren 230-261 und 254-268 (Srichai et al.) nur innerhalb der Säugetiere auftreten. Dies trifft ebenso auf die PDZ Domänen Bindungsstelle (Consensus-Sequenz: Aminosäuren 529-532) zu.

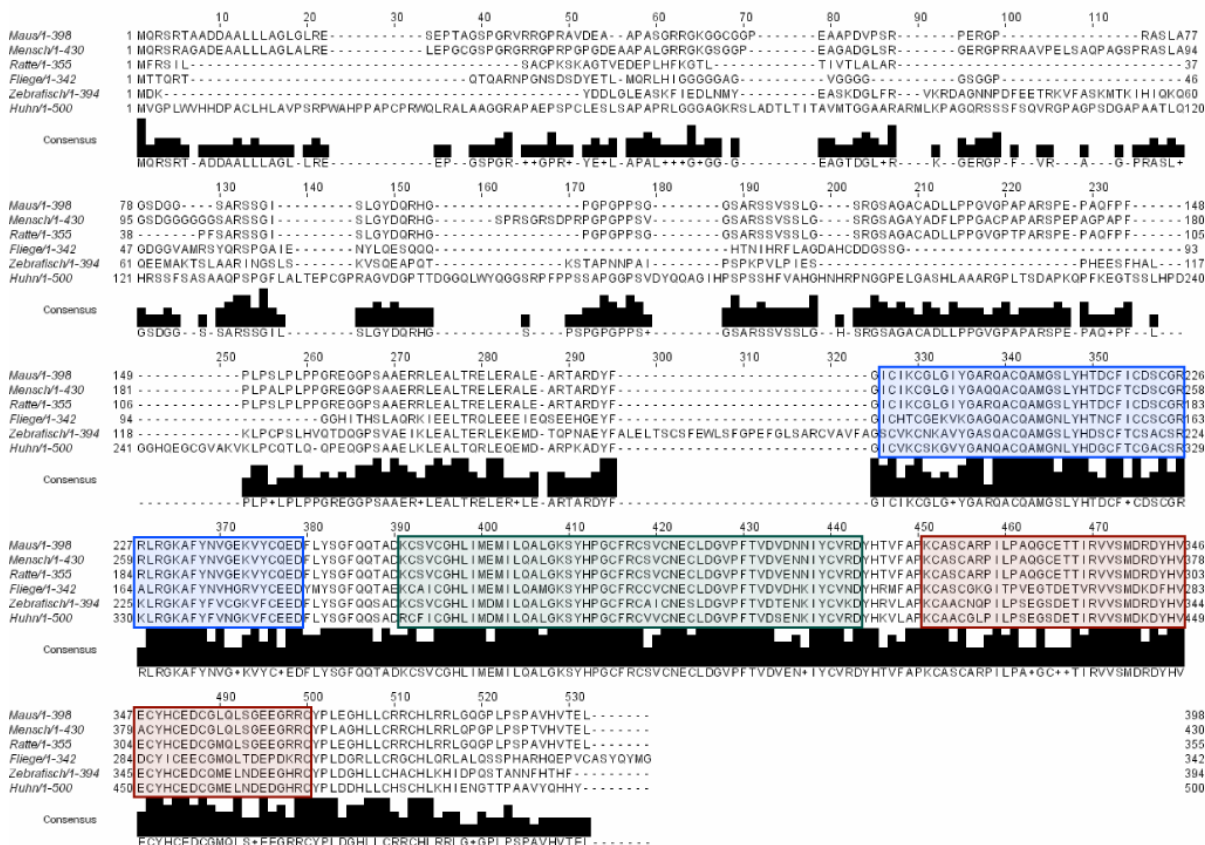


Abbildung 17: Vergleich der codierenden Sequenz von Wtip aus verschiedenen Spezies

Dargestellt ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von Wtip aus Maus (Acc. AAH54125), Mensch (XP_059037), Ratte (XP_341840), Fruchtfliege (NP_572930) Zebrafisch (XP_691259) und dem Huhn (XP_418800). Unterhalb der Aminosäuresequenz ist der Grad an Konservierung der Sequenz durch schwarze Balken dargestellt. Die LIM Domänen 1-3 sind durch farbige Kästen markiert. Das Alignment zeigt, daß vorwiegend der C-Terminus, der die drei LIM Domänen beinhaltet, zwischen den verschiedenen Spezies konserviert ist.

Zur weiteren Analyse von Wtip wurde ein Northern Blot durchgeführt, bei dem Total RNA aus Maus-Embryonen der Stadien E11,5 und E13,5 zum Einsatz kam. Für die Sondenherstellung wurde das im "Yeast Two Hybrid"-Experiment isolierte Fragment genutzt. In Abb. 18 ist im oberen Bild zu erkennen, daß Wtip in den beiden untersuchten Stadien exprimiert wird. Die detektierte Bande hat eine ungefähre Größe von 2 kb. Dies deckt sich mit der in der ensembl-Datenbank angegebenen Transkriptgröße von 1958 bp. In beiden Stadien ließ sich nur diese eine Bande erkennen, mögliche Spleiß-Varianten konnten nicht nachgewiesen werden.

3.4.4 Bestätigung der Wtip-Ror2 Interaktion in einem unabhängigen System

Eine der Hauptschwächen des "Yeast Two Hybrid"-Systems ist die verhältnismäßig hohe Zahl an falsch positiven Interaktionen. Daher ist es von großer Bedeutung, die gefundenen Protein-Protein Interaktionen in einem unabhängigen System zu überprüfen.

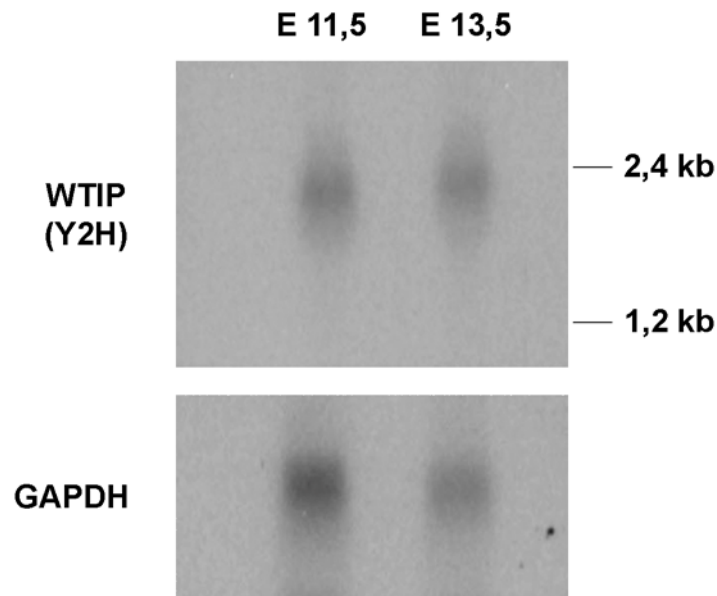


Abbildung 18: Wtip Northern Blot Gezeigt ist die Northern Blot Analyse von Total RNA aus Maus-Embryonen des Stadiums E 11,5 und E 13,5. Das obere Bild zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten antisense Sonde, die dem isolierten Wtip-Fragment aus dem "Yeast Two Hybrid"-Experiment entspricht. In beiden Maus RNAs läßt sich eine Bande von etwa 2 kb nachweisen, die in ihrer Größe, der erwarteten Transkriptgröße von Wtip entspricht. Als Ladekontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer GAPDH-Sonde durchgeführt (siehe unteres Bild).

In dieser Arbeit wurde die Bindung von Wtip an Ror2 durch verschiedene Co-Immunopräzipitations-Experimente bestätigt.

Dazu wurden Ror2 und Wtip (Y2H-Fragment, mit Flag-Tag) in Expressionsvektoren kloniert, die dann per Calcium-Phosphat-Methode in HEK293 Zellen transfiziert wurden. Aus diesen Zellen wurden Lysate hergestellt, die mit anti Flag-Beads inkubiert wurden.

Im Falle der Interaktion von Ror2 mit Wtip(-Flag), wird dieses über die Flag-Beads mit Wtip co-präzipitiert und kann dann in einem Western Blot nachgewiesen werden. Abbildung 19 zeigt einen solchen Western Blot. In den rechten beiden Spuren wurden Lysate analysiert, die aus Ror2/Wtip-Flag doppeltransfizierten HEK293 Zellen gewonnen wurden. Die ganz rechte Spur zeigt nach Inkubation mit einem Ror2-spezifischen Antikörper (freundliche Gabe von Prof. P. Knaus) die Ror2-Expression in diesen Zellen (L=Lysat). In der Spur daneben wurde das gleiche Zell-Lysat aufgetragen, allerdings wurde dieses vorher mit Flag-Beads inkubiert (IP=Immunopräzipitat). Es ist deutlich zu erkennen, daß Ror2 von dem Wtip-Flag/Flag-Beads Komplex co-präzipitiert wurde.

In dem Kontrollexperiment, dessen Ergebnis in den beiden mittleren Spuren dargestellt ist, wird hingegen deutlich, daß das Flag-Peptid alleine (durch Expression eines leeren Flag-Vektors) nicht in der Lage ist, Ror2 zu binden. In der linken dieser mittleren Spuren ist daher

keine Ror2 positive Bande zu erkennen. Daraus läßt sich schließen, daß die Interaktion also tatsächlich mit Wtip und nicht mit dem Flag-Peptid stattfindet.

In den linken beiden Spuren wurden Lysate analysiert, die aus Trk-Met/Wtip-Flag doppelt-transfizierten HEK293 Zellen hergestellt wurden. In der rechten dieser beiden Spuren ist die Expression von Trk-Met nach Inkubation mit einem Met-spezifischen Antikörper (von Dr. U Schaeper zur Verfügung gestellt) gezeigt. In dem Lysat, welches mit Flag-Beads inkubiert wurde (IP), läßt sich jedoch kein Trk-Met mehr nachweisen. Wtip ist also auch in Säuger-Zellen nicht in der Lage, mit der Met-Tyrosinkinase zu interagieren. Dies bestätigt die Ergebnisse, die bereits in der Hefe gewonnen wurden (siehe Abschnitt 3.3.2), die Interaktion zwischen Ror2 und Wtip scheint sehr spezifisch zu sein.

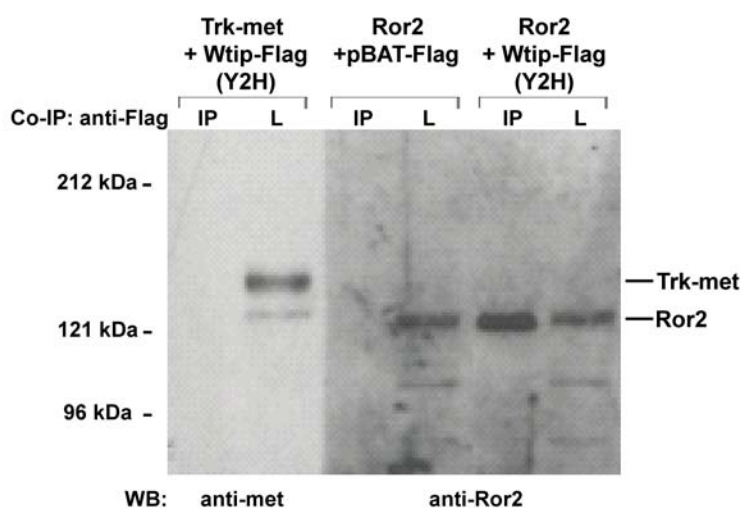


Abbildung 19: Co-Immunopräzipitation von Ror2 und Wtip (Y2H-Fragment) HEK293 Zellen wurden mit verschiedenen Expressionskonstrukten co-transfiziert. Die aus diesen Zellen gewonnenen Lysate wurden durch Western Blots mit Ror2-spezifischen Antikörpern auf Expression von Ror2 (Lysat L: Spur 4 und 6), bzw. mit Met-spezifischen Antikörpern auf die Expression von Trk-met (L: Spur 2) überprüft. Desweiteren wurden die Lysate mit “Flag-Beads” inkubiert und anschließend ebenfalls auf die Expression von Ror2, bzw. Trk-met untersucht. Durch die Beads wurde an Wtip-Flag gebundenes Ror2 co-präzipitiert (Immunopräzipitat IP: Spur 5). Das Flag-Peptid alleine (Transfektion eines leeren Flag-Vektors) ist dagegen nicht in der Lage, Ror2 zu binden und dieses zu präzipitieren (IP: Spur 3). Ebenso läßt sich keine Interaktion zwischen Wtip-Flag und einer anderen Rezeptortyrosinkinase (Trk-met) in diesen Zellen nachweisen (IP: Spur1), was die bereits in der Hefe beschriebene Spezifität der Interaktion zwischen Ror2 und Wtip (siehe 3.3.2.) bestätigt.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob auch das “volle Länge” Wtip (siehe Abschnitt 3.3.3) in der Lage ist, mit Ror2 zu interagieren. Dazu wurden Wtip, Ror2 und das distal trunkierte Ror2 Δ 745 in verschiedenen Kombinationen in HEK293 Zellen transfiziert (siehe Abbildung 20, rechte Seite). Die aus diesen Zellen hergestellten Proteinlysate wurden wiederum per Western Blot auf die Expression der jeweiligen Proteine überprüft und nach

Inkubation mit *Flag-Beads* auf eine Interaktion der beiden exprimierten Proteine untersucht. Die Transfektionen 1, 2, 4 und 5 führen zur Expression von Ror2 (siehe L1 und L4 im oberen Bild), bzw. zur Expression des distal trunkierten Ror2 (siehe L2 und L5 im oberen Bild), was durch die Verwendung eines Ror2-spezifischen Antikörpers gezeigt werden kann. Auch die Expression von Wtip kann durch einen Wtip-spezifischen Antikörper in allen Lysaten der entsprechend transfizierten Zellen nachgewiesen werden (siehe unteres Bild: L3, L4 und L5). In den Spuren IP3, IP4 und IP5 im unteren Bild läßt sich erkennen, daß Wtip-Flag über die *Flag-Beads* präzipitiert wird.

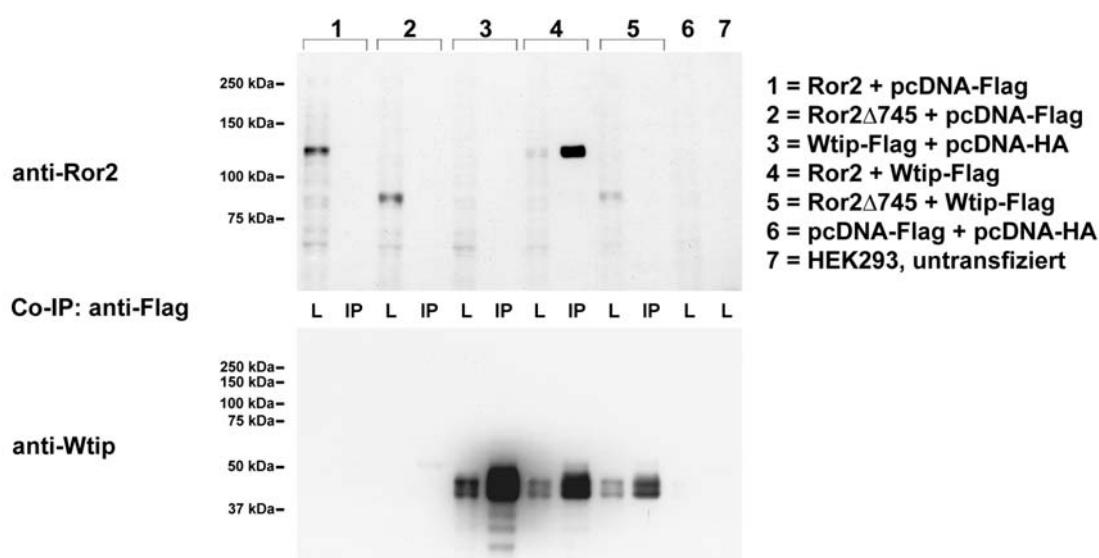


Abbildung 20: Co-Immunopräzipitation von Ror2 und dem "volle Länge" Wtip HEK293 Zellen wurden mit verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert (rechts in der Abbildung dargestellt). Die aus diesen Zellen gewonnenen Lysate wurden durch Western Blots mit spezifischen Antikörpern (anti Ror2 im oberen Blot, bzw. anti Wtip im unteren Blot) auf Expression, bzw. Interaktion der jeweiligen transfizierten Konstrukte untersucht. Die Lysate (L) und Immunopräzipitationen (IP, mit *Flag-Beads* durchgeführt) sind immer abwechselnd auf das SDS-Gel aufgetragen worden. Bei Transfektion 1, 2 und 3 sind die Ror2- bzw. Wtip-DNAs mit leeren Expressionsvektoren (pcDNA-Flag und pcDNA-HA) auf die gleiche zu transfizierende Gesamt DNA-Menge aufgefüllt worden, die auch in den Doppeltransfektionen (Experiment 4 und 5) zum Einsatz kam. In den Lysaten der Transfektionen 1-5 konnte die Expression aller überexprimierten Proteine gezeigt werden (siehe L1, L2, L4 und L5 im oberen Blot: Nachweis des "volle Länge" und des distal trunkierten Ror2; siehe auch L3, L4 und L5 im unteren Blot: Expressionsnachweis von Wtip-Flag durch Wtip-Antikörper). Jedoch kommt es nur zu einer einzigen positiven Co-Immunopräzipitation (siehe IP4), die zum Nachweis des Ror2-Proteins in der Co-Immunopräzipitation mit Wtip-Flag führt. Die Interaktion zwischen Wtip-Flag und Ror2 findet demnach also auch statt, wenn beide Proteine in "voller Länge" in der Zelle vorliegen. Dahingegen kommt es, wie in der Hefe (siehe Abschnitt 3.3.1), zu keiner Interaktion zwischen dem distal trunkierten Ror2-Protein und Wtip, so daß das trunkierte Ror2-Protein nach Inkubation mit den *Flag-Beads* gewaschen wird und damit nicht mehr nachweisbar ist (siehe IP5). Als Kontrollexperiment wurden beide Ror2-Konstrukte mit Flag-Peptid co-exprimiert, jedoch führt die Präzipitation des Flag-Peptids in keinem Fall zu einer Co-Präzipitation des entsprechenden Ror2 Konstruktes. Als Kontrollen wurden Lysate von untransfizierten und mit den verwendeten Leervektoren transfizierte HEK293 Zellen mit aufgetragen.

Wtip-Flag interagiert in diesem Experiment nur mit dem “volle Länge” Ror2, was zur Co-Präzipitation von Ror2 durch den Wtip-Flag/Flag-*Beads*-Komplex führt (siehe IP4 im oberen Bild). Ror2 interagiert dagegen jedoch nicht mit dem Flag-Peptid alleine, so daß in der IP1 (oberes Bild) kein Ror2 nachzuweisen ist.

Die Bindung von Wtip an den distalen Bereich von Ror2, die in der Hefe gezeigt werden konnte (siehe 3.3.1), läßt sich in diesem Experiment bestätigen. Das distal trunkierte Ror2-Protein läßt sich mit dem “volle Länge” Wtip nicht co-präzipitieren (oberes Bild, IP5), es findet also keine Interaktion mehr statt.

Aus den Hefe-Experimenten und den Co-Immunopräzipitations-Untersuchungen läßt sich also schließen, daß die ersten zwei LIM Domänen von Wtip ausreichen, um die Bindung an Ror2 zu vermitteln, und daß diese Interaktion im C-terminalen Bereich von Ror2 stattfinden muß.

3.4.5 Expressions- und Co-Lokalisationsstudien mit Ror2 und Wtip

Damit zwei Proteine in einer Zelle interagieren können, müssen sie zumindest zum Zeitpunkt der Interaktion im gleichen Kompartiment der Zelle lokalisieren. Um dies für die Ror2/Wtip Interaktion zu untersuchen, wurden beide Proteine sowie das distal trunkierte Ror2 (Ror2 Δ 745) in HEK293 Zellen überexprimiert. Die Expression der Proteine wurde durch die Verwendung von anti FLAG-, bzw. anti HA-Antikörpern und Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht und ist in Abbildung 21A dargestellt. Die Überexpression von Wtip führt zu einem punktförmigen, vesikulären Expressionsmuster, während die Überexpression des “volle Länge” Ror2, wie auch der trunkierten Variante, wie erwartet, zu einer Lokalisation der Proteine an der Zellmembran führt. Die Identität der Wtip-Vesikel wurde durch Co-Färbung mit verschiedenen Vesikel-Markern (Rab5, Rab7, *Clathrin heavy chain* (CHC) und LAMP-1) näher untersucht, jedoch führte keines dieser Experimente zu einem eindeutigen Ergebnis, so daß momentan unklar bleibt, um was für Vesikel es sich handelt. Dabei scheint die Zahl und Größe der Wtip-Vesikel von der Menge an transfizierter DNA abhängig zu sein (Daten nicht gezeigt).

Die Co-Expression von Wtip und Ror2, die in Abbildung 21B oben gezeigt ist, führt zu einer Co-Lokalisation beider Proteine an der Plasmamembran, so daß eine Interaktion zwischen Ror2 und Wtip möglich scheint.

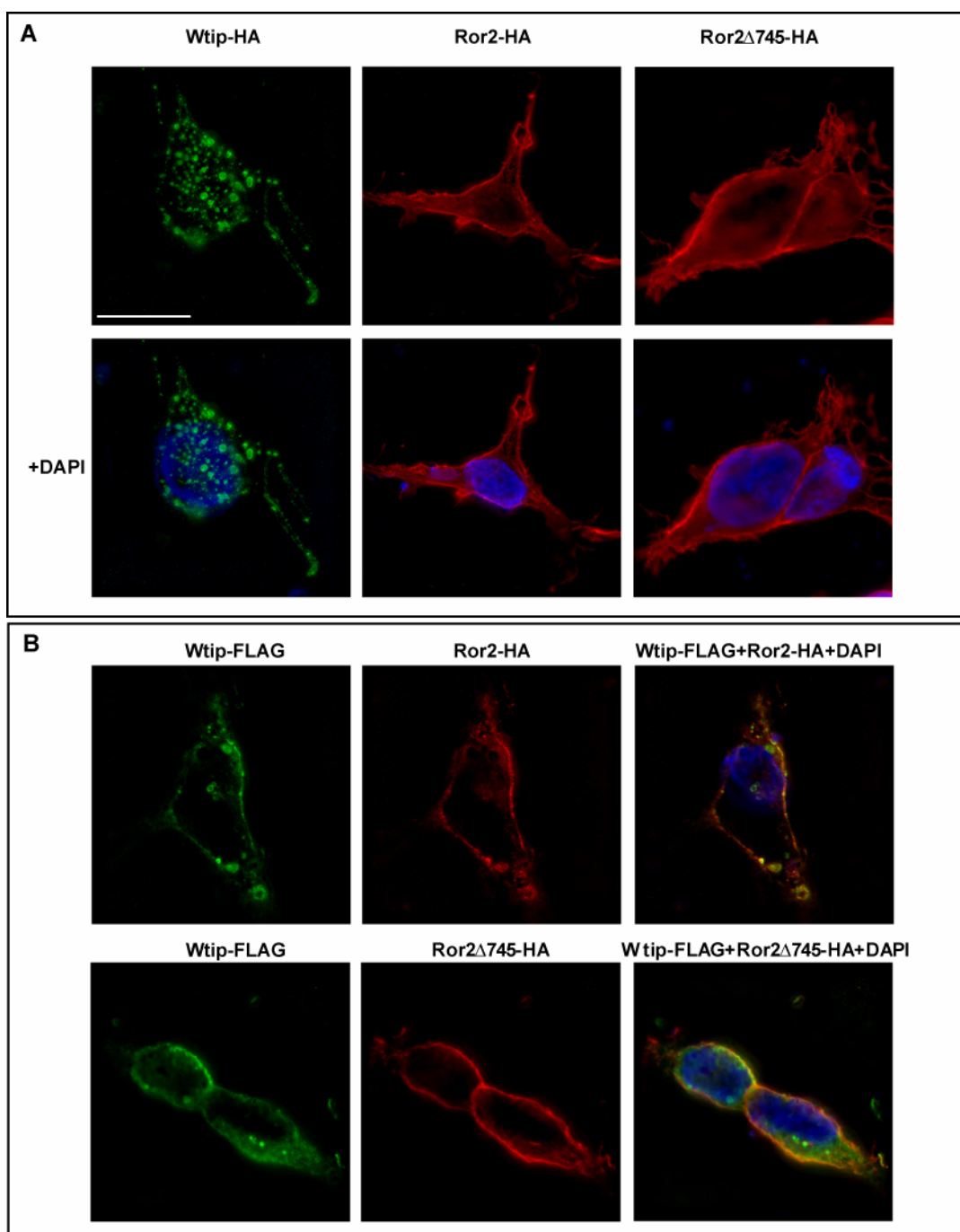


Abbildung 21: Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Wtip, Ror2 und Ror2 Δ 745 in HEK293 Zellen **A:** Einzeltransfektionen von Wtip-HA, Ror2-HA und Ror2 Δ 745-HA (der weiße Balken in der Abbildung oben links entspricht 50 μ m). Die Expression von Wtip ist durch eine grüne, die der beiden Ror2-Konstrukte durch eine rote Färbung dargestellt. In der unteren Zeile ist zusätzlich der durch DAPI angefärbte Kern zu erkennen. **B:** In allen Bildern sind doppelt transfizierte HEK293 Zellen dargestellt, die Expression von Wtip (links) ist durch eine grüne, die der Ror2-Konstrukte durch eine rote Färbung (mittig) dargestellt. Bereiche, in denen die Proteine co-lokalisieren, sind im rechten Bild durch eine gelb/orange Färbung gekennzeichnet. Zusätzlich ist der Kern durch eine blaue Färbung gezeigt.

Obwohl Wtip, wie in den Retransformations- und Co-Präzipitations-Experimenten gezeigt, nicht mit dem distal trunktierten Ror2 interagiert, führt die Überexpression beider Proteine in HEK293 Zellen zu einer Co-Lokalisation der Proteine an der Zellmembran (siehe Abb. 21B,

unteres Bild). Dies könnte dadurch zustande kommen, daß Wtip mit endogenem Ror2 oder einem anderen Protein an der Membran interagiert. Auch in Zellen, die nur mit Wtip transfiziert wurden, konnte teilweise eine partielle Membranfärbung beobachtet werden.

Damit die Interaktion von Wtip mit Ror2 auch von biologischer Relevanz sein kann, ist es unabdingbar, daß diese Gene co-exprimiert werden und auch *in vivo* in derselben Zelle vorkommen. Dazu wurde die Expression von Ror2 und Wtip per *in situ* Hybridisierung an Ganztierpräparaten (Whole Mount) und auf Gefrierschnitten untersucht. Zusätzlich wurde per Immunhistochemie auf Gefrierschnitten die Lokalisation der Wtip und Ror2-Proteine auf Zellebene analysiert.

Abbildung 22 zeigt eine *in situ* Hybridisierung an Maus-Ganztierpräparaten der Embryonalstadien E9,5 bis E13,5. Zum frühesten untersuchten Zeitpunkt lassen sich Ror2- und Wtip-Transkripte (blaues Signal) in den Branchialbögen, der Ohrplakode und in den Somiten nachweisen. Auch in der sich gerade bildenden Vorderextremitätenknospe lassen sich beide Gene detektieren. Die Co-Expression von Wtip und Ror2 in den Extremitätenanlagen ist noch deutlicher im Stadium E10,5 zu sehen, hier läßt sich die Co-Expression beider Gene sowohl in den Vorder- als auch in den hinteren Extremitätenanlagen gut erkennen. Zu den späteren Stadien läßt sich die überlappende Expression der untersuchten Gene weiterhin beobachten, jedoch macht die Expression von Wtip einen weitläufigeren und weniger distinkten Eindruck, während Ror2 in sehr definierten Regionen zur Expression kommt.

Zur genaueren Analyse der Co-Expression von Wtip und Ror2 wurde eine *in situ* Hybridisierung auf sagittalen Gefrierschnitten des Embryonalstadiums E14,5 durchgeführt (siehe Abb. 23). In Abbildung 23A sind Übersichtsbilder der Wtip-(links) und der Ror2-(rechts) Expression dargestellt, wobei schon bei dieser schwachen Vergrößerung deutliche Überschneidungen innerhalb der Expressionsmuster sichtbar werden. So kann Co-Expression der beiden Gene in der Zunge, in den Rippen, im Herz, in der Niere und Nebenniere, der Lunge, dem Gehirn, dem Darm, den dorsalen Wurzelganglien und den Somiten im Schwanzbereich durch die entsprechenden RNA-Sonden gezeigt werden. Abbildung 23B zeigt eine vergrößerte Aufnahme eines Teils der Niere und der Nebenniere. Sowohl Ror2 als auch Wtip sind im Cortex dieser beiden Organe nachzuweisen. In der Lunge können Ror2 und Wtip Transkripte im Epithel der Bronchien detektiert werden (Abb. 23C). Abbildung 23D zeigt Co-Expression von Ror2 und Wtip im Herzen, wohingegen in Abb. 23E beide Gene in den Rippen nachgewiesen werden können. Wtip ist im Vergleich zu Ror2 auch im Gewebe,

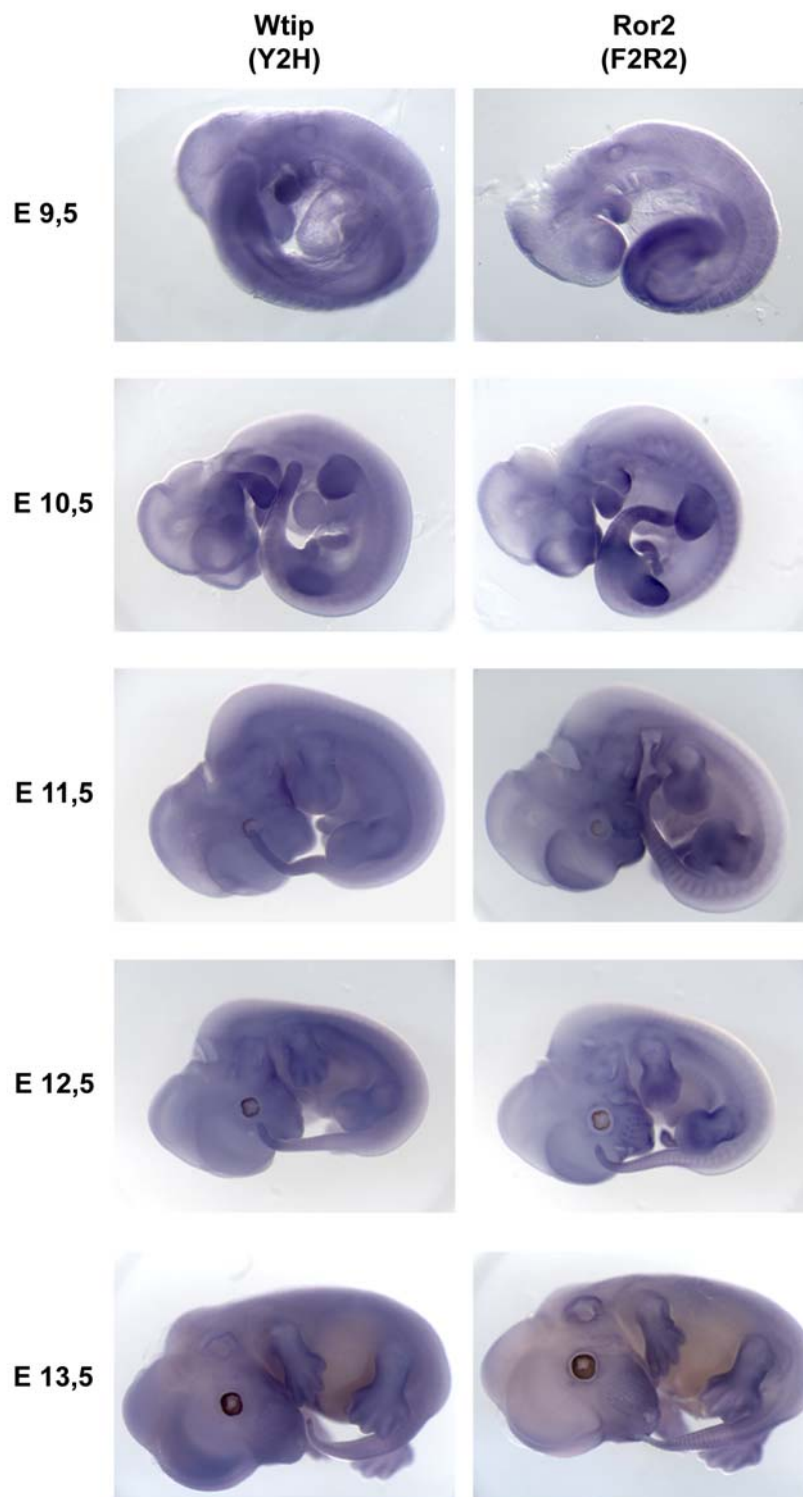


Abbildung 22: Whole Mount *in situ* Hybridisierung mit Wtip und Ror2 DIG-markierten RNA-Sonden Gezeigt ist die Wtip Expression im Vergleich zur Ror2 Expression in Maus-Embryonalstadien E9,5 bis E13,5. An Tag E9,5 zeigt sich eine überlappende Expression (blaues Signal) der beiden Gene in den Branchialbögen, der Ohrplakode, in der sich auswachsenden Vorderextremität, in den Somiten und im Schwanz. Einen Tag in der Entwicklung später, kommt es zu einer deutlichen Co-Expression beider Gene in den vorderen und hinteren Extremitätenanlagen. Diese Co-Expression zeigt sich auch in den späteren Stadien, wobei Wtip im Vergleich zu Ror2 weitläufiger und weniger begrenzt exprimiert wird.

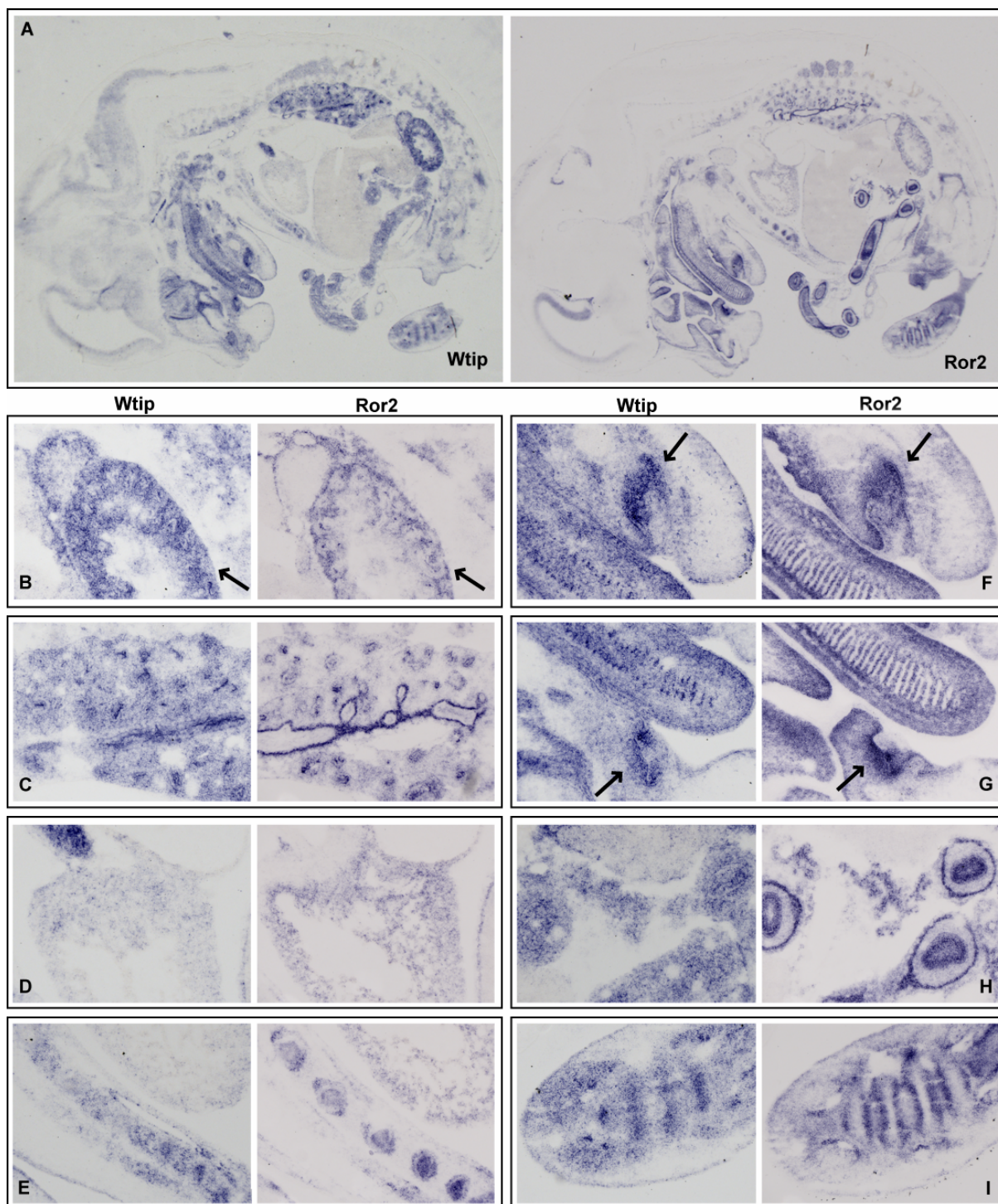


Abbildung 23: *In situ* Hybridisierung auf Maus-Gefrierschnitten (Embryonalstadium E14,5) mit Wtip und Ror2 DIG-markierten RNA-Sonden (blaues Signal) **A:** Übersichtsbild: Links ist die Wtip-, rechts die Ror2-Expression dargestellt. Überlappende Expression ist in verschiedenen Geweben, wie der Zunge, Niere, Lunge, Darm, den Rippen, in den dorsalen Wurzelganglien, im Gehirn und in den Somiten im Schwanz zu erkennen. **B-I:** Ausschnittsvergrößerungen **B:** gezeigt sind Teile der Niere (Pfeil) und die Nebenniere, in beiden Geweben findet Co-Expression von Ror2 und Wtip statt. **C:** Überlappende Expression von Wtip und Ror2 in der Lunge **D:** Ror2 und Wtip-Transkripte im Herz **E:** Expression der untersuchten Gene in den Rippen **F:** und **G:** Co-Expression von Ror2 und Wtip in der Zunge und in der oberen (F, Pfeil), bzw. unteren (G, Pfeil) Zahnanlage **H:** Überlappende Expression von Wtip und Ror2 im Darm **I:** Wtip- und Ror2-Expression in Somiten im Schwanzbereich

das die Rippen umgibt, recht stark exprimiert, so daß die Konturen der Rippen nicht so deutlich zu erkennen sind.

Die überlappende Expression von Wtip und Ror2 läßt sich auch in den unteren (Abb. 16F) und oberen Zahnanlagen (Abb. 23G), sowie in der Zunge (Abb. 23E und 23F) zeigen. Als weitere Orte gemeinsamer Expression können noch der Darm (Abb. 23H) und die Somiten genannt werden (Abb. 23H, bzw. 23I).

Die Untersuchungen der Genexpression von Ror2 und Wtip durch die *in situ* Hybridisierungen lassen erkennen, daß beide Gene überlappend in verschiedenen Geweben exprimiert werden. Doch wie sieht es mit der Lokalisation der Genprodukte, also der Proteine aus?

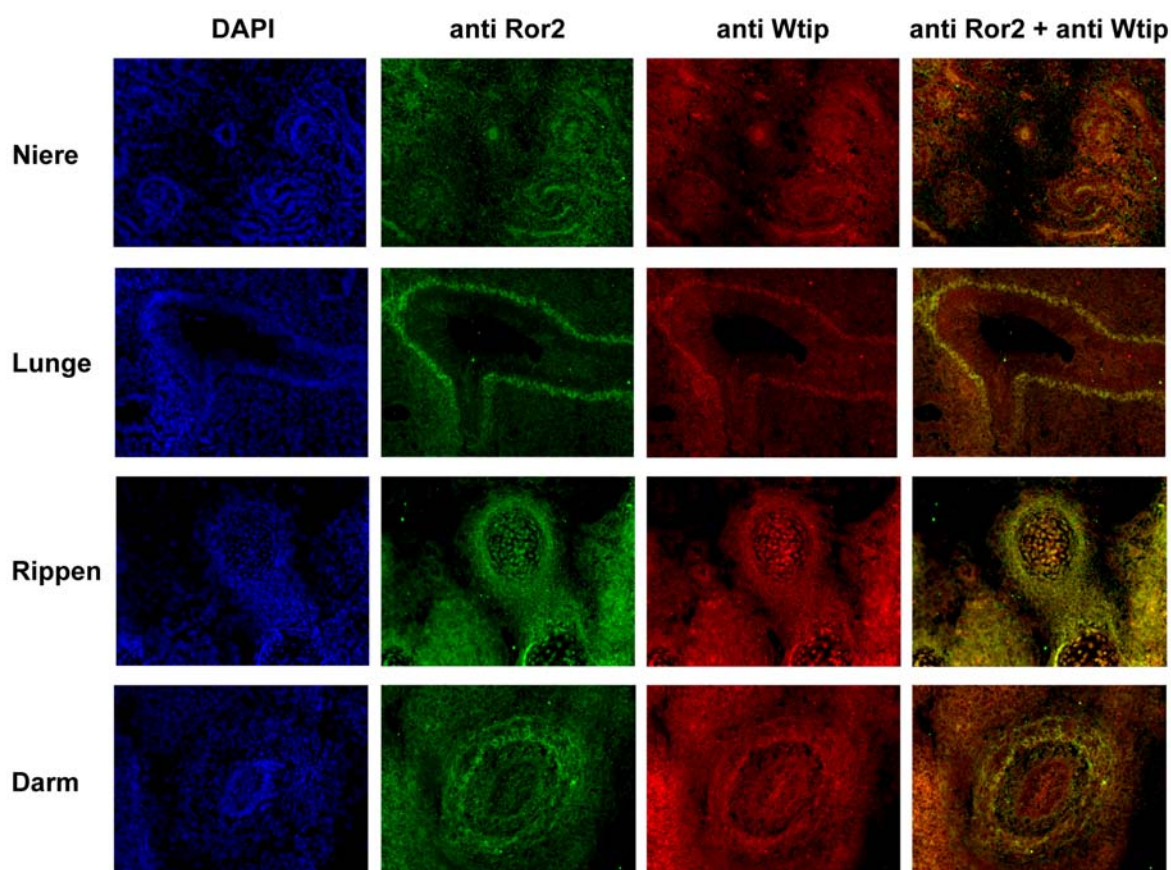


Abbildung 24: Immunhistologische Analyse der Expression von Wtip und Ror2 auf Maus-Gefrierschnitten (Embryonalstadium E14,5) In diesem Experiment wurden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt, Ror2 ist durch eine grüne und Wtip durch eine rote Färbung dargestellt. In der rechten Spalte sind die grüne und die rote Färbung überlagert dargestellt, so daß Bereiche, in denen beide Proteine nachgewiesen werden können, gelb erscheinen. In der oberen Reihe ist ein Ausschnitt der Niere gezeigt, in dem sich die Co-Expression von Ror2 und Wtip innerhalb derselben Zellen erkennen läßt. Die Lokalisation der beiden Proteine in den gleichen Zellen läßt sich ebenfalls in der Lunge, den Rippen und im Darm gut sichtbar machen. Ror2 und Wtip sind also nicht nur in den gleichen Geweben exprimiert, sondern lokalisieren auch in denselben Zellen.

Durch immunhistologische Analysen auf sagittalen Gefrierschnitten, die gleichzeitig mit polyklonalen Ror2-, bzw. Wtip-Antikörpern (siehe Abb. 24) hybridisiert wurden, kann gezeigt werden, daß beide Proteine in derselben Zelle exprimiert werden. In der linken Spalte sind die mit DAPI angefärbten Zellkerne gut zu erkennen. In der Spalte rechts daneben ist das Ror2-Protein durch grüne Fluoreszenz sichtbar gemacht. Wtip ist durch eine rote Fluoreszenzfärbung dargestellt (Spalte 3). Die ganz rechte Spalte zeigt eine Überlagerung der grünen und der roten Färbung, so daß Bereiche, in denen beide Proteine synthetisiert werden, gelb erscheinen.

Durch die Immunhistologie kann gezeigt werden, daß Ror2 und Wtip-Proteine in der Niere, der Lunge, den Rippen und im Darm in den gleichen Zellen vorkommen.

3.5 Identifikation von potentiellen Wtip-Interaktionspartnern durch einen automatisierten “*Yeast Two Hybrid*”- Screen

Diese Arbeit wurde zum Teil im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 577 (Molekulare Grundlagen klinischer Variabilität monogen bedingter Krankheiten, Charité Berlin) angefertigt, was die Möglichkeit bot, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Erich Wanker (Max Delbrück Zentrum, Berlin) einen automatisierten “*Yeast Two Hybrid*”-Screen mit Wtip durchzuführen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben verschiedene Wtip-Konstrukte hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.2.1, Abb.5), wovon jedoch nur vier tatsächlich in dem verwendeten Matrix-basierten Ansatz (Goehler et al. 2003) zur Anwendung kamen. Die anderen drei Konstrukte (Wtip “volle Länge”, Wtip Δ LIM Domäne 3 und Wtip Δ N-Terminus) waren autoaktivierend, d.h. daß diese Köderproteine alleine in der Lage waren, die Expression der Markergene zu aktivieren. Die anderen Wtip-Konstrukte (Wtip Δ LIM Domäne 1, Wtip Δ LIM Domäne 2, Wtip Δ LIM Domäne 1,3 und Wtip Δ LIM Domäne 2,3) wurden in der Gruppe von Prof. Wanker gegen 5609 humane Proteine, bzw. Proteinfragmente getestet (siehe Stelz et al., 2005).

Dabei konnten insgesamt 23 Hefekolonien (siehe Abb. 25A, Klone 16-38 auf der SD2-Selektionsplatte, Abb. 25A) identifiziert werden, von denen nach der Retransformation (siehe SD4-Selektionsplatte, Abb. 25A) und Untersuchung auf β -Galaktosidase-Aktivität insgesamt 19 Klone bestätigt werden konnten. Da während des Matrix-Screens verschiedene

Köderproteine vereinigt wurden, war es nun nötig, die gefundenen Interaktionen den einzelnen Köderproteinen zuzuordnen.

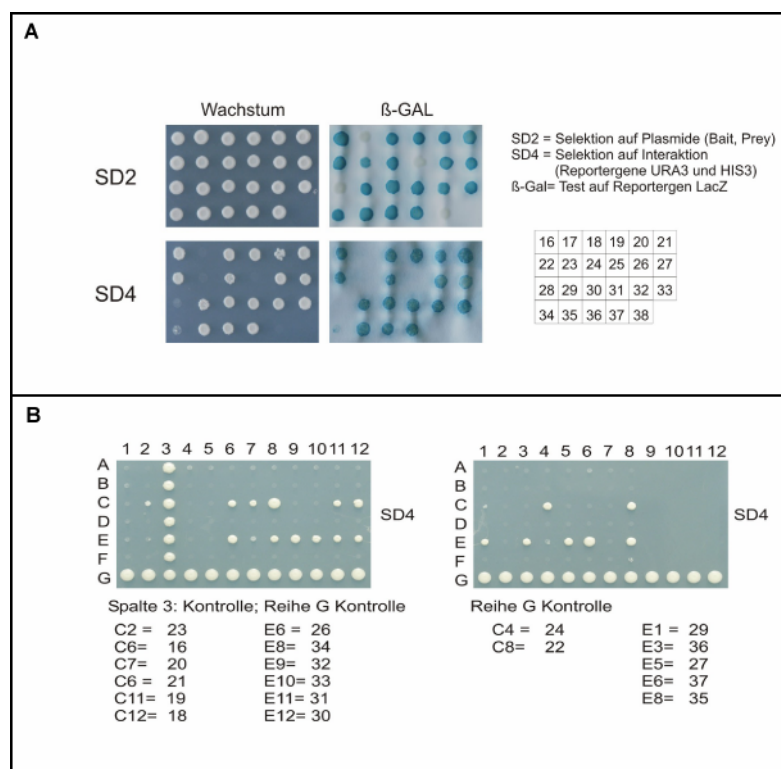


Abbildung 25: Automatisierter, Matrix-basierter “Yeast Two Hybrid”-Screen mit verschiedenen, gepoolten Wtip-Köderproteinen **A:** Retransformation und LacZ-Test in der Hefe, von 23 im Screen gefundenen Interaktionen ließen sich 19 bestätigen. **B:** Rückkreuzung der Hefen mit den gefundenen Beuteproteine (1-12) gegen Hefen, die die einzelnen Köderproteine exprimieren (A-F). Alle 19 identifizierten Protein-Protein Interaktionen lassen sich auch mit den isolierten Wtip Köderproteinen zeigen (Abbildung: Dr. H. Goehler, modifiziert)

Dazu wurden Rückkreuzungen zwischen den verschiedenen Hefen durchgeführt. Werden dabei zwei Hefekolonien unterschiedlichen Mating-Typs verkreuzt, deren exprimierte Köder-, bzw. Beuteproteine interagieren, sind diese Hefen in der Lage, auf SD4-Selektionsmedien zu wachsen. In Abb. 25B ist ein solches Rückkreuzungsexperiment dargestellt.

Die Protein-Protein Interaktionen, die mit dem automatisierten “Yeast Two Hybrid”-Screen für die verschiedenen Wtip-Konstrukte gefunden werden konnten, sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Dabei wird eine Interaktion von Vimentin, Zinkfinger Helicase, Mitofilin und KIAA1377 sowohl mit Wtip Δ LIM Domäne 1 als auch mit Wtip Δ LIM Domäne 2,3 gefunden. Diese Interaktionen müßten demnach am N-Terminus von Wtip stattfinden, da keine der LIM Domänen an der Interaktion beteiligt zu sein scheint.

Die Interaktionen der Klone an Position 20 und Position 24 könnten sowohl über den N-Terminus von Wtip, als auch über die erste LIM Domäne vermittelt werden, wohingegen die

Interaktionen der Klone an Positionen 27, 29, 32, 33, 36 und 37 nicht an der ersten LIM Domäne von Wtip stattfinden können. Bei den Klonen der Position 17, 28 und 38 stimmten entweder das Leseraster oder die Orientierung des Fragmentes nicht.

Köderprotein	Position	Acc. Nr.	Identität	Aminosäure
WTIPΔLIM Domäne 2,3	16	Q9P2H0	KIAA1377	445-988
WTIPΔLIM Domäne 2,3	17	÷	÷	nicht o.k.
WTIPΔLIM Domäne 2,3	18	P08670	Vimentin	189-465
WTIPΔLIM Domäne 2,3	19	Q9Y4I0	Zinkfinger helicase	1830-2000
WTIPΔLIM Domäne 2,3	20	Q9BS30	Similar to RIKEN cDNA 1810018M11 gene	1-226
WTIPΔLIM Domäne 2,3	21	Q16891	Mitochondrial inner membrane protein; Mitofilin	212-758
WTIPΔLIM Domäne 2,3	22	Q9P2H0	KIAA1377	445-988
WTIPΔLIM Domäne 2,3	23	CAD97612	Hypothetical protein [Homo sapiens]	378 - 576
WTIPΔLIM Domäne 2,3	24	O60318	80 kDa MCM3-associated protein (GANP protein)	1029 - 1228
WTIPΔLIM Domäne 1,3	25	÷	÷	nicht o.k.
WTIPΔLIM Domäne 1	26	Q9P2H0	KIAA1377	445-988
WTIPΔLIM Domäne 1	27	AAH67234	FALZ protein	
WTIPΔLIM Domäne 1	28	÷	÷	nicht o.k.
WTIPΔLIM Domäne 1	29	O60383	Growth/differentiation factor 9 precursor	276-454
WTIPΔLIM Domäne 1	30	P08670	Vimentin	189-465
WTIPΔLIM Domäne 1	31	Q9Y4I0	Zinkfinger helicase	1830-2000
WTIPΔLIM Domäne 1	32	P55855	Ubiquitin-like protein SMT3B (Sentrin 2) (HSMT3)	1-95
WTIPΔLIM Domäne 1	33	Q9Y383	CGI-74 protein	159-270
WTIPΔLIM Domäne 1	34	Q16891	Mitochondrial inner membrane protein; Mitofilin	212-758
WTIPΔLIM Domäne 1	35	Q9P2H0	KIAA1377	445-988
WTIPΔLIM Domäne 1	36	AAH04542	Plexin B2	227 - 438
WTIPΔLIM Domäne 1	37	NP_002948	Retinoid X receptor, alpha	4-227
WTIPΔLIM Domäne 2	38	÷	÷	nicht o.k.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des automatisierten "Yeast Two Hybrid"-Screens mit trunktierten Wtip-Konstrukten als Köderprotein (Tabelle: Dr. H. Goehler, modifiziert)