

4. Diskussion

Ror2 ist eine Rezeptortyrosinkinase, die zur Familie der Ror-Proteine gehört und im Tierreich konserviert ist. Obwohl Ror2 bereits im Jahre 1992 beschrieben wurde (Masiakowski & Carroll, 1992) und zwei kongenitale Erkrankungen beim Menschen (rezessives Robinow Syndrom, Brachydaktylie Typ B) auf Mutationen in ROR2 zurückzuführen sind (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000; Oldridge et al., Schwabe et al., 2000), ist bis heute nur wenig über Signalwege, an denen Ror2 partizipiert, oder über Interaktionspartner von Ror2 bekannt. Daher war die Identifikation neuer intrazellulärer Bindungspartner von Ror2 das Ziel dieser Arbeit.

4.1 Identifikation von potentiellen Ror2-Bindungspartnern durch "*Yeast Two Hybrid*"- und "*Yeast Three Hybrid*"-Experimente

Für Ror2 sind sowohl phosphorylierungsabhängige als auch -unabhängige Funktionen beschrieben worden (Forrester et al., 1999; Hikasa et al., 2002). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Köderproteine kloniert, um sowohl mit einem unphosphorylierten, als auch mit einem phosphorylierten Ror2-Konstrukt die Hefe-Experimente durchführen zu können. In einem ersten Versuch wurde der intrazelluläre Teil von Ror2 an die LexA DNA-bindende Domäne fusioniert. Dieses Konstrukt zeigte jedoch im Western Blot keine Autophosphorylierung (Abb. 8), die aufgrund der Dimerisierungsfunktion von LexA erwartet wurde. Die Dimerisierung von RTK wird allgemein als Voraussetzung für die Aktivierung durch Autophosphorylierung angesehen (Schlessinger, 2000). In einem zweiten Versuch wurde daher eine Tpr-Dimerisierungsdomäne zwischen die LexA Domäne und den intrazellulären Teil von Ror2 kloniert, jedoch führte auch dies nicht zu der gewünschten Autophosphorylierung von Ror2 (Abb. 9).

Eine der Einschränkungen des klassischen "*Yeast Two Hybrid*"-Systems liegt im Fehlen einiger post-translationaler Modifikationen in der Hefe, wie z.B. der Tyrosin-Phosphorylierung (van Crielinge & Beyaert, 1999). Bis heute sind zwar Kinasen mit dualer Aktivität, jedoch keine spezifischen Tyrosinkinasen in der Hefe beschrieben. Um diese Limitierung zu umgehen, haben Osborne und seine Kollegen ein System entwickelt, mit dem Protein-Protein Interaktionen untersucht werden können, die z.B. eine post-translationale Modifikation erfordern (Osborne et al., 1995). In diesem System, welches als "*Yeast Tribid*"- oder auch "*Yeast Three Hybrid*"-System bezeichnet wird, kann neben dem Köder- und dem

Beuteprotein ein drittes Protein (z.B. eine Tyrosinkinase) in der Hefe exprimiert werden, das das Köderprotein modifiziert oder aber auch eine Brückenfunktion einnimmt. In dieser Studie wurde eine konstitutiv aktive Src-Kinase als drittes Protein exprimiert. Dabei konnte im Western Blot mit Hilfe eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers die Phosphorylierung des Ror2-Köderproteins gezeigt werden (Abb. 10). Diese Phosphorylierung läßt sich durch Zugabe von 1 mM Methionin stark reduzieren, da die Src-Kinase unter der Kontrolle eines durch Methionin reprimierbaren Promotors steht (Tirode et al., 1997). Deshalb wurde die transformierte Hefekultur im "Yeast Three Hybrid"-Experiment zur Hälfte auf Selektionsmedium ohne Methionin und zur anderen Hälfte auf Medium mit Methionin ausgestrichen. Auf beiden Medien ist eine vergleichbare Zahl an Hefekolonien gewachsen, so daß ein negativer Effekt der co-exprimierten Src-Kinase ausgeschlossen werden kann.

Die bestimmten Transformationseffizienzen lagen bei dem "Yeast Two Hybrid"-Screen bei $1,92 \times 10^7$ und beim "Yeast Three Hybrid"-Experiment bei $5,28 \times 10^7$ Hefetransformanden. Da die verwendete cDNA-Bank etwa 5×10^6 Klone enthält (Hollenberg et al., 1995), kann in beiden Ansätzen von einer ausreichenden Abdeckung der in der cDNA-Bibliothek enthaltenen Klone ausgegangen werden.

Mit Hilfe der "Yeast Two Hybrid"- und "Yeast Three Hybrid"-Analysen konnten insgesamt 23 potentielle Interaktionspartner von Ror2 gefunden werden, von denen ein Teil in den nachfolgenden Abschnitten genauer diskutiert werden soll.

4.2 Dlxin-1 als potentieller Ror2-Interaktionspartner

Dlxin-1, das im Menschen als MAGE-D1 bezeichnet wird, gehört zur MAGE Familie, die durch den Besitz einer strukturell konservierten MAGE Domäne gekennzeichnet ist. Die MAGE (*melanoma-associated antigen*) Gene werden in zwei Klassen unterteilt (Sasaki et al., 2005): Gene der ersten Klasse wurden als Melanom-assoziierte Antigene identifiziert (van den Bruggen et al., 1991). Die Expression dieser Gene wird in verschiedenen Tumoren induziert, wobei kurze Peptide, die aus der Degradation der MAGE Transkripte entstehen, als Antigene an der Zelloberfläche präsentiert werden und dem Immunsystem helfen, Tumorzellen zu erkennen. MAGE Gene dieses Typs werden in der Embryogenese und später in männlichen Keimzellen exprimiert, ansonsten aber im adulten Organismus durch Methylierung stillgelegt. Gene des zweiten Typs, zu denen auch Dlxin-1 gehört, werden dagegen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch im Adulten exprimiert (Sasaki et al., 2005).

Dlxin-1 wurde im Jahr 2001 als ein mit Dlx5 interagierendes Protein in einem “*Yeast Two Hybrid*”-Ansatz identifiziert (Masuda et al., 2001). Dlxin-1 besteht aus 775 Aminosäuren und besitzt am C-Terminus eine MAGE Domäne. Zusätzlich zu dieser Domäne ist eine in der Mitte des Proteins gelegene, tandem-artig angeordnete, Wiederholung einer Hexapeptidsequenz (mit der Consensus-Sequenz WQXPXX) charakteristisch für Dlxin-1. Diese Hexapeptidsequenz-Wiederholungen stellen vermutlich den Bindungsort von Dlx5 dar (Masuda et al., 2001).

Im “*Yeast Three Hybrid*”-Screen wurden insgesamt 190 Klone identifiziert, die dem Dlxin-1 Protein entsprechen. Wie im Ergebnisteil beschrieben (Abschnitt 3.3, Abb. 12), überlappen alle identifizierten Dlxin-1 Klone und definieren so den minimalen Interaktionsbereich von Ror2. Dieser minimale Interaktionsbereich umfaßt die isolierten Klone A1 und B48 und beinhaltet 14 der insgesamt 25 Hexapeptidsequenz-Wiederholungen. Durch Retransformations-Experimente in der Hefe konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Dlxin-1 an das distale Ende von Ror2 bindet, welches die Serin/Threonin-reichen und die Prolin-reiche Domäne beinhaltet (Abb. 13).

Im Jahr 2003 publizierten Matsuda und Mitarbeiter die Interaktion zwischen Ror2 und Dlxin-1, wobei ebenfalls die Interaktion von Dlxin-1 mit dem distalen Bereich von Ror2 gezeigt werden konnte (Matsuda et al., 2003). Aus diesem Grund wurde die Interaktion zwischen Dlxin-1 und Ror2 im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Interessanterweise haben jedoch Matsuda und Kollegen die Interaktion von Ror2 mit der C-terminalen MAGE Domäne von Dlxin-1 ausgemacht, während in dieser Studie eine Bindung von Ror2 an einen Teil der Hexapeptidsequenz-Wiederholungen gefunden wurde. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte im Phosphorylierungsstatus von Ror2 begründet liegen. Matsuda und Kollegen haben in ihrem Hefe-Experiment den cytoplasmatischen Teil einer Kinase-toten Variante von Ror2 eingesetzt. In dieser Arbeit wurde aber nun gerade versucht, ein phosphoryliertes Ror2-Köderprotein zu generieren, was mit Hilfe der co-exprimierten Src-Kinase gelang. Die Ror2/Dlxin-1 Interaktion wurde dabei sowohl mit einem stärker als auch einem schwächer phosphorylierten Ror2-Konstrukt gefunden. In diesem Zusammenhang wäre es in einem weiterführenden Experiment sicher interessant, den Ort der Bindung von Dlxin-1 an Ror2 zu bestimmen, wenn die Expression der Src-Kinase durch Zugabe von 5 mM Methionin unterdrückt wird und Ror2 damit unphosphoryliert vorläge.

Neben den erwähnten Interaktionen mit Ror2 sind in der Literatur Protein-Protein Interaktionen sowohl für die Hexapeptidsequenz als auch für die MAGE Domäne von Dlxin-1 beschrieben. So können z.B. Dlx5 und Dlx7 an die Hexapeptidsequenz-Wiederholungen

binden (Masuda et al., 2001). Sasaki und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Praja1, ein RING Finger Protein mit E3 Ubiquitin Ligase Aktivität, mit der MAGE Domäne von Dlxin-1 interagiert, wobei diese Interaktion zur Ubiquitinierung von Dlxin-1 führt, das somit dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Sasaki et al., 2002).

4.2.1 Mögliche Funktion der Ror2-Dlxin-1 Interaktion *in vivo*

Eine unabdingbare Voraussetzung für die biologische Relevanz einer Ror2-Dlxin-1 Interaktion ist die Co-Expression beider Gene. Matsuda und Kollegen konnten durch Whole Mount *in situ* Hybridisierung zeigen, daß Ror2 und Dlxin-1 in der Maus überlappend exprimiert werden. An Tag E10,5 zeigt sich eine Co-Expression beider Gene in den Branchialbögen und in den Extremitätenanlagen, wobei Transkripte beider Gene in der gesamten Extremitäten-knospe detektiert werden können. Zu späteren Zeitpunkten (E12,5 und E13,5) zeigt sich die Co-Expression von Ror2 und Dlxin-1 in der Entwicklung der Gliedmaßen im Perichondrium der Finger und in den marginalen Zonen der Extremitäten (Matsuda et al., 2003). Dlxin-1 zeigt generell eine recht weitläufige Expression, so konnte Expression im Herz, im Gehirn, in der Lunge, der Leber, Testis, Knorpel und Knochen gezeigt werden (Masuda et al., 2001; Bertrand et al., 2004). Ror2 ist ebenfalls weitläufig exprimiert (Al-Shawi et al., 2001; Matsuda et al., 2001; Oishi et al., 1999; Schwabe et al., 2004), so daß es weitere Überlappungen in der Expression dieser beiden Gene geben könnte. Masuda und seine Kollegen schlagen Dlxin-1 als einen Regulator der von Dlx- und Msx-Proteinen vermittelten transkriptionellen Aktivität vor, da Dlxin-1 an verschiedene Dlx- und Msx-Proteine binden (Dlx5, Dlx7 und Msx2, nicht an Dlx3) und die Aktivität von Dlx5 und Msx2 modulieren kann (Masuda et al., 2001; Matsuda et al., 2003).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die gezeigte Interaktion von Dlxin-1 mit Dlx5 und Msx2. Sowohl Dlx5 als auch Msx2 besitzen, wie Ror2, wichtige Funktionen in der Skelettentwicklung. So gilt Dlx5 als positiver Regulator der Chondrocytendifferenzierung in der endochondralen Ossifikation und wird in prähypertrophen und hypertrophen Knorpelzellen exprimiert. Die retrovirale Überexpression von Dlx5 im Huhn führt zu einer beschleunigten Reifung der prähypertrophen Chondrocyten. Dadurch entstehen zu viele terminal differenzierte, also hypertrophe Knorpelzellen. Zusätzlich wird die Proliferation der unreifen Chondrocyten, in denen Dlx5 normalerweise nicht exprimiert wird, durch die Missexpression von Dlx5 reduziert, diese Zellen werden in die Differenzierung getrieben. Durch die vorschnelle Reifung der prähypertrophen Knorpelzellen und die verringerte Proliferation der unreifen Chondrocyten kommt es zu einer Verkürzung der infizierten

Extremitäten (Ferrari & Kosher, 2002). Der Knockout von Dlx5 zeigt craniofaziale, vestibuläre und die Knochen des Schädels betreffende Defekte, aber keine offensichtliche Veränderung in der Musterbildung der Extremitäten (Acampora et al., 1999), obwohl Dlx5 in den Extremitäten exprimiert wird. Vermutlich wird die Funktion von Dlx5 in den Gliedmaßen der Dlx5-defizienten Mäuse von Dlx6, das im gleichen Gencluster wie Dlx5 liegt und eine sehr ähnliche Expression zeigt (Simeone et al., 1994), übernommen. Der Doppel-Knockout von Dlx5 und Dlx6 zeigt entsprechend, daß diese beiden Gene auch bei der Entwicklung des axialen Skeletts und des Extremitätenskeletts eine wichtige Rolle spielen (Robledo et al., 2002). Der auffälligste Defekt, der durch das Ausschalten der beiden Gene auftritt, ist der Verlust des mittleren Zehs in den hinteren Gliedmaßen. Dieser Phänotyp ähnelt der humanen Fehlbildung *Split-hand/Split-foot malformation* (SHFM, OMIM 183600), die u.a. ebenfalls mit Dlx5 und Dlx6 in Verbindung gebracht wird (Crackower et al., 1996). Interessanterweise führt jedoch das Ausschalten von Dlx5 und Dlx6 zusätzlich zu einer Verzögerung der endochondralen Ossifikation, die alle Elemente des Extremitätenskeletts und des axialen Skeletts betrifft. Dabei ist die Transition von Knorpel zu Knochen betroffen, die reifen Chondrocyten bleiben erhalten und werden nicht durch Knochen ersetzt (Robledo et al., 2002). Zusätzlich ist auch die Reifung der prähypertrophen Knorpelzellen zu hypertrophen Chondrocyten erheblich verzögert, was die Funktion von Dlx5 und Dlx6 als positive Regulatoren der Knorpeldifferenzierung unterstreicht.

Auch Msx2 spielt in der Chondrogenese und endochondralen Ossifikation eine wichtige Rolle. Msx2 wird in ruhenden und proliferierenden Chondrocyten der Wachstumsfuge und des articulären Knorpels, sowie im Perichondrium exprimiert. Msx2-defiziente Mäuse zeigen perinatal neben Defekten der Schädelknochen eine Verkürzung der axialen Skelettelemente und der Gliedmaßen. Dabei ist eine verringerte Zahl an ruhenden, proliferierenden und hypertrophen Chondrocyten mit zusätzlich kleineren hypertrophen Knorpelzellen in der Wachstumsfuge zu beobachten, was zu einer verkleinerten Wachstumsfuge führt. Die normalerweise säulenartige Anordnung der proliferierenden Chondrocyten ist im Gegensatz zu den Wildtypen gestört (Satokata et al., 2000).

Msx2 und Dlx5/6 spielen also eine wichtige Rolle in der Skelettentwicklung. *In vitro*-Studien (Zhang et al., 1997) lassen vermuten, daß es sich vermutlich bei Msx Proteinen um transkriptionelle Repressoren und bei Dlx Proteinen um transkriptionelle Aktivatoren handelt. In Zellkultur- und GST Pulldown-Experimenten konnte gezeigt werden, daß Dlx und Msx Proteine Heterodimere bilden können, wobei sich die transkriptionellen Aktivitäten dieser Proteine neutralisieren. Während der Embryonalentwicklung überlappt die Expression dieser

Gene in den Branchialbögen und in den Extremitätenknospen (Zhang et al., 1997), Bereiche, in denen auch Ror2 und Dlxin-1 zur Expression kommen.

Interessanterweise führt auch das Ausschalten von Ror2 zu einer Störung in der Chondrogenese. Ror2 wird während der Embryonalentwicklung in Chondrocyten aller Anlagen, die eine endochondrale Ossifikation durchlaufen, sowie im Perichondrium, exprimiert. Perinatal läßt sich Ror2 in ruhenden und proliferierenden Chondrocyten, in articulärem Knorpel und im Perichondrium/Periosteum, jedoch nicht in hypertrophen Knorpelzellen der Wachstumsfuge, detektieren. Ror2-defiziente Mäuse zeigen verkürzte Gliedmaßen, wobei es zu einer Verzögerung der Knorpeldifferenzierung und der anschließenden Verknöcherung kommt (De Chiara et al., 2000, Takeuchi et al., 2000). Dabei kommt es in den Wachstumsfugen zu einer vergrößerten Zone der ruhenden unreifen Knorpelzellen und zu einer verkleinerten Zone der proliferierenden und der hypertrophen Chondrocyten, wobei die Proliferationsraten in Humerus und Ulna im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen unverändert sind. Die verkürzten Extremitäten sind also nicht auf eine veränderte Proliferationsrate, sondern vermutlich auf eine verzögerte Chondrocyten-differenzierung zurückzuführen (Schwabe et al., 2004).

Ror2, Dlx5/6 und Msx2 spielen also alle eine Rolle in der Chondrocytendifferenzierung, in dem sie die Reifung der Knorpelzellen regulieren. Aufgrund der überlappenden Expressionsmuster von Ror2, Dlx5/6, Msx2 und Dlxin-1 und der beschriebenen Funktionen dieser Gene in der Skelettentwicklung, läßt sich nun spekulieren, daß Ror2 über die Bindung von Dlxin-1 die Lokalisation und das Zusammenspiel von Dlx5/6 und Msx2 beeinflussen könnte, wodurch eine Feinregulation in der Knorpeldifferenzierung erreicht werden könnte. Zusätzlich könnte diese Feinregulation durch die Aktivität von Praja1 moduliert werden, welches die Stabilität von Dlxin-1 durch Ubiquitinierung beeinflussen kann (Sasaki et al., 2002). Bedeutend erscheint in diesem Zusammenhang, daß die Bindung von Dlxin-1 am distalen Bereich von Ror2 ausgemacht wurde, einem Bereich, der bei einem Teil der von Brachydaktylie B und Robinow Syndrom betroffenen Patienten fehlt. Eine Verkürzung der Gliedmaßen, bzw. die Trunkierung der Finger-/Zehenglieder ließe sich durch einen gestörten Ablauf in der Chondrocytendifferenzierung erklären.

4.3 Wtip als potentieller Interaktionspartner von Ror2

Wtip wurde sowohl im “*Yeast Two Hybrid*”- als auch im “*Yeast Three Hybrid*”-Experiment als Interaktionspartner von Ror2 identifiziert. Wtip gehört zur Familie der LIM Domänen Proteine, die alle durch den Besitz von mindestens einer LIM Domäne gekennzeichnet sind und vermutlich in allen Eukaryoten vorkommen.

LIM Domänen bestehen aus etwa 50-60 Aminosäuren und wurden zeitnah in drei verschiedenen Proteinen identifiziert. Die Anfangsbuchstaben der Namen dieser drei Proteine (**L**in-11: Freyd et al., 1990; **I**sl-1: Karlsson et al., 1990; **M**ec-3: Way et al., 1988) gaben der Domäne ihren Namen. Eine LIM Domäne besteht aus einem Doppel-Zinkfingermotiv (siehe Abb. 26), das durch ein bestimmtes Aminosäure-Muster charakterisiert ist (Consensus-Motiv: **C(X)₂C(X)₁₆₋₂₃(H/C)(X)_{2/4}(C/H/E)(X)₂C(X)₂C(X)₁₄₋₂₁(C/H)(X)_{2/1/3}(C/H/D/E)X**), welches sich von dem anderer Zinkfinger Domänen unterscheidet. Dabei gibt es in jedem Zinkfinger vier hochkonservierte Reste (meist Cysteine), die jeweils ein Zinkatom binden (Kadmas & Beckerle, 2004).

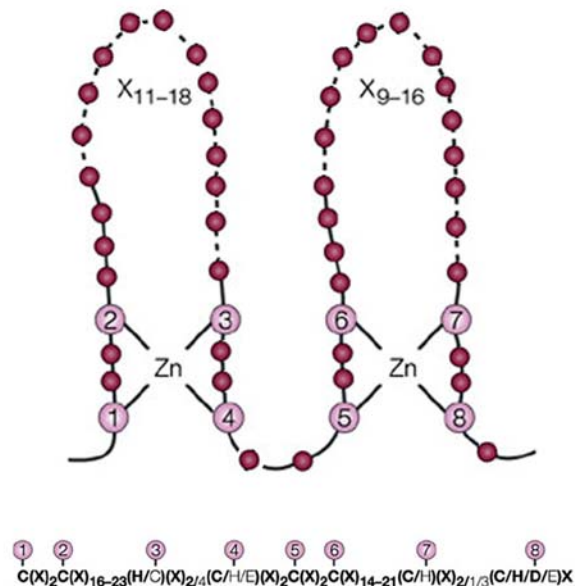


Abbildung 26: Konservierte Sequenz und Struktur einer LIM Domäne Im oberen Teil der Abbildung ist das Doppel-Zinkfingermotiv einer LIM Domäne dargestellt. Jeweils 4 hochkonservierte Reste (meist Cystein, durch lila Kreise markiert) koordinieren ein Zinkatom. Der variable Bereich nicht konservierter Aminosäuren, der die Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt, ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Im unteren Teil der Abbildung ist die Consensus-Sequenz einer LIM Domäne dargestellt. Dabei sind die Aminosäuren, die das Zinkatom binden, durch nummerierte lila Kreise gekennzeichnet (modifiziert nach Kadmas & Beckerle, 2004).

In beiden Hefe-Experimenten wurde ein identisches Wtip Fragment identifiziert. Es beinhaltet die ersten beiden LIM Domänen und noch 25 weitere Aminosäuren, die N-terminal der ersten LIM Domäne liegen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Interaktion wahrscheinlich über eine der beiden oder über beide LIM Domänen vermittelt wird.

Durch Retransformations-Experimente in der Hefe konnte der Bindungsort von Wtip auf den distalen Bereich von Ror2 festgelegt werden (3.4.1, Abb. 15). Die Interaktion scheint phosphorylierungsunabhängig zu sein, da Wtip sowohl mit dem phosphorylierten, als auch mit dem unphosphorylierten Ror2-Köderprotein gefunden werden konnte. Die Identifizierung von Wtip in zwei voneinander unabhängigen Experimenten, in denen verschiedene Ror2-Köderproteine verwendet wurden, kann als weiterer Hinweis auf die Echtheit der Interaktion zwischen Ror2 und Wtip interpretiert werden.

4.3.1 Die Interaktion zwischen Wtip und Ror2 ist in Hefe spezifisch

In der Literatur ist eine Interaktion des LIM Domänen Proteins Enigma mit zwei RTK beschrieben, wobei Enigma mit seiner zweiten LIM Domäne an die Ret-Kinase und mit der dritten LIM Domäne an den Insulin Rezeptor (InsR) binden kann. Daher sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden, ob Wtip in der Lage ist, auch mit anderen RTK zu interagieren (3.4.2, Abb. 16). Dazu wurde das isolierte Wtip-Fragment mit den cytoplasmatischen Bereichen verschiedener RTK (c-Met, InsR, Ret, Ros, CSF-R, EGF-R und PDGF-R an DNA bindende Domänen fusioniert) in der Hefe co-exprimiert. Eine positive Interaktion sollte dabei durch Aktivierung der Selektionsmarker in der Hefe gezeigt werden. Jedoch konnte in diesem Experiment nur die Interaktion von Ror2 und Wtip bestätigt werden, eine Interaktion der ersten beiden LIM Domänen von Wtip mit den anderen getesteten RTK ließ sich nicht nachweisen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die Funktion von Wtip wahrscheinlich nicht die eines allgemeinen Adapterproteins darstellt, welches mit vielen RTK interagieren kann, sondern daß Wtip vermutlich in sehr spezifischen Interaktionen eine Rolle spielt.

Die spezifische Interaktion scheint ein übliches Merkmal von LIM Domänen zu sein. Bis heute konnte keine Consensus-Sequenz definiert werden, die eine Bindung von LIM Domänen erlaubt. Bei LIM Domänen wird die Interaktion mit anderen Proteinen über die variablen Bereiche innerhalb der Zinkfinger vermittelt. LIM Domänen sind vor allem über ihre Struktur, die von den konservierten Cystein Resten und dem koordinierten Zinkatom bestimmt wird, definiert und nicht über eine bestimmte Aminosäuresequenz, was das Fehlen einer definierten Consensus-Bindungssequenz erklärt (Brown et al., 2001; Kadmas & Beckerle, 2004).

4.3.2 Bestätigung der Ror2-Wtip Interaktion in einem unabhängigen System

Einer der Nachteile der “*Yeast Two Hybrid*”-, bzw. “*Yeast Three Hybrid*”-Systeme ist die verhältnismäßig hohe Zahl falsch positiver Interaktionen, also das Auftreten von Interaktionen die *in vivo* aus verschiedenen Gründen nicht stattfinden würden. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, gefundene Interaktionen in einem unabhängigen System zu bestätigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von Wtip und Ror2 in HEK293 Zellen durch Co-Immunopräzipitation bestätigt (siehe 3.4.4). Der Vorteil an diesem System liegt darin, daß die jeweiligen Proteine dazu in Säugerzellen exprimiert werden und man davon ausgehen kann, daß sowohl die Faltung als auch die post-translationale Modifikation der *in vivo* Situation nahe kommen. Durch Co-Präzipitation konnte sowohl die Interaktion des Wtip-Fragments (WtipY2H) aus der Hefe (Abb. 19) als auch die des “volle Länge” Wtip mit dem “volle Länge” Ror2 (Abb. 20) in HEK293 Zellen gezeigt werden. Zusätzlich konnte in den HEK293 Zellen bestätigt werden, daß Wtip an den distalen Bereich von Ror2, der die Serin/Threonin- und Prolin-reichen Domänen beinhaltet, bindet (Abb. 20). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Wtip und Ror2 auch *in vivo* miteinander interagieren könnten.

4.3.3 Expressions- und Co-Lokalisationsstudien in der Maus

Um weitere Hinweise auf die Bedeutung der Interaktion von Ror2 und Wtip zu erhalten, wurde untersucht, ob Ror2 und Wtip *in vivo* in den gleichen Geweben exprimiert werden (siehe Abschnitt 3.4.5). Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen an Ganztierpräparaten (Abb. 22) und *in situ* Hybridisierungen an Gefrierschnitten (Abb. 23) durchgeführt. Durch diese Analysen läßt sich Co-Expression von Wtip und Ror2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung in verschiedenen Geweben zeigen. Beide Gene werden in den Branchialbögen, der Ohrplakode, in den Extremitäten und Somiten transkribiert. Auf den Gefrierschnitten läßt sich zusätzlich die Expression von Ror2 und Wtip in der Zunge, den Rippen, im Herz, in Niere und Nebenniere, der Lunge, dem Gehirn, dem Darm und in Zahnanlagen zeigen. Da die *in situ* Hybridisierungen auf parallelen Schnitten, bzw. an unterschiedlichen Maus-Embryonen durchgeführt wurden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob beide Proteine in der selben Zelle vorkommen. Das wäre aber eine Grundvoraussetzung für eine Interaktion der beiden Proteine *in vivo*. Daher wurde die Lokalisation der Ror2 und Wtip-Proteine durch immunhistologische Methoden näher untersucht (Abb. 24). Dazu wurden Maus-Gefrierschnitte des Embryonalstadiums E14,5 gleichzeitig mit polyklonalen Antikörpern hybridisiert, die zum einen Wtip und zum anderen

Ror2 erkennen. Durch die Antikörperfärbung konnte in Darm, Niere, Rippen und Lunge eine Expression von Wtip und Ror2 in den selben Zellen gezeigt werden.

Die Co-Expression von Ror2 und Wtip zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Geweben und das Vorkommen beider Proteine in einer Zelle sprechen für eine mögliche Interaktion *in vivo*, wobei diese Interaktion relevant für die Embryonalentwicklung sein könnte.

4.3.4 Mögliche Bedeutung der Ror2-Wtip Interaktion *in vivo*

Die in dieser Studie zusammengetragenen Ergebnisse stützen eine *in vivo* stattfindende Interaktion zwischen Wtip und Ror2. Da allerdings bis heute nur wenige Daten über die Expression von Wtip, bzw. Informationen über mögliche Interaktionspartner in verschiedenen Zellen oder Geweben bekannt sind, läßt sich eine Hypothese über eine Funktion von Ror2, die über Wtip vermittelt wird, nur schwer aufstellen.

Wtip wurde erst vor kurzem in einem “*Yeast Two Hybrid*”-Experiment als Interaktionspartner von WT-1 identifiziert und publiziert (Srichai et al, 2004). WT-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Niere und Herz spielt. WT-1 Knockout Mäuse haben keine Nieren und sterben während der Embryonalentwicklung an Herzdefekten (Kreidberg et al, 1993). Im Menschen verursachen Mutationen in WT-1 verschiedene Erkrankungen, z.B. den Wilms Tumor, der die häufigste Nierenkrebskrankung bei Kindern darstellt und dem Protein seinen Namen gab (zur Übersicht Rivera & Haber, 2005).

Srichai und seine Kollegen beschreiben Wtip Expression in der Maus in Niere, Lunge, im Ovar und im Auge. Zusätzlich zeigen sie die Expression von Wtip in undifferenzierten und differenzierten Podocyten. Podocyten sind hochspezialisierte Zellen in den Gefäßknäueln (Glomeruli) der Niere, die mit ihren vielen Zellfortsätzen und dem Endothel der Gefäßkapillaren durch eine Schlitzmembran die Blut-Harn-Schranke bilden, an der aus Blut der Primärharn (das Ultrafiltrat) gebildet wird. Srichai und seine Mitarbeiter zeigen, daß das im Hefe-Experiment isolierte Wtip-Fragment im Kern mit WT-1 co-lokalisiert und in der Lage ist, die WT-1 abhängige Aktivierung des Amphiregulin Promotors (Zielgen von WT-1) zu inhibieren. Das “volle Länge” Wtip-Protein lokalisiert dagegen im Cytoplasma der Zelle und zwar primär an Zell-Zell Kontakten. Die Autoren schlagen vor, daß die Funktion von Wtip darin besteht, als eine Art Sensorprotein zu wirken, das den Status der Podocytenmembran mißt. Bei Verletzung der Podocytenmembran kann Wtip demnach seine

subzelluläre Position ändern und in den Kern gelangen, wo es WT-1 abhängige Genexpression moduliert.

Podocyten reagieren auf Verletzung oder Schädigung mit einer Dedifferenzierung, wobei die Zellfortsätze zurückgezogen werden und sich Zell-Zell Kontakte lösen. Damit können sie ihre Funktion in der Bildung des Primärharns nicht aufrechterhalten. Experimentell läßt sich eine solche Verletzung an kultivierten, differenzierten Podocyten durch Behandlung mit PAN (Puromycin Aminonucleosid) simulieren, was zu den beschriebenen Effekten führt. Rico und ihre Kollegen beschreiben, daß Wtip in so behandelten Podocyten von den Zell-Zell Kontakten in den Kern wandert und dort die WT-1 abhängige Rbbp7 Expression inhibiert (Rico et al., 2005).

Bisher ist Wtip nur im Zusammenhang mit seiner Funktion in den hochspezialisierten Podocyten beschrieben, so daß eine Spekulation über die Wtip Funktion gerade während der Embryonalentwicklung in Bezug auf Ror2 schwer fällt. Dabei ist jedoch aufgrund der Expressionsmuster eine Funktion in der Entwicklung von Darm, Lunge, Herz, Niere und in der Skelett- und Extremitätenentwicklung denkbar.

Die Ror2 Knockout Mäuse sterben kurz nach der Geburt. Die möglichen Ursachen hierfür liegen in der unvollständigen Expansion der Lungenalveolen und möglicherweise auch in einem Herzdefekt. Ror2 und Wtip sind in diesen Organen co-exprimiert, wie im Rahmen dieser Studie gezeigt werden konnte. Es kann spekuliert werden, daß ein Teil der Funktionen von Ror2 über Wtip durch den Transkriptionsfaktor WT-1 ausgeführt werden. Hierzu wären allerdings noch weitere Expressionsanalysen nötig. Weitere Hinweise über die Funktion von Wtip können durch das Ausschalten dieses Gens gewonnen werden. Dabei könnte es sein, daß der Phänotyp des Wtip Knockouts Überschneidungen mit dem Phänotyp der Ror2 Knockout Mäuse zeigt.

Möglicherweise ist die Funktion von Wtip als Sensormolekül, das Signale von der Zellmembran in den Kern weiterleitet, eine allgemeine Funktion, die von Wtip auch in anderen Zellen, bzw. Organen wahrgenommen werden könnte. Ein Hinweis darauf liegt in den Funktionen anderer LIM Domänen Proteine (z.B. Zyxin, Ajuba, CRP3/MLP), die zur selben Protein Unterfamilie wie Wtip gehören. Für CRP3, ein in Skelettmuskeln exprimiertes Protein mit zwei LIM Domänen, konnte gezeigt werden, daß es die Integrität der Muskeln überwacht. Bei Verletzung der Muskulatur kann CRP3 in den Kern wandern und dort die Transkription Muskel-spezifischer Gene wie z.B. MyoD aktivieren (Bach, 2000; Kadmas, 2004). Auch für Zyxin und Ajuba sind cytoplasmatisch-nucleäre Translokationen bereits gezeigt worden. Es ist also durchaus vorstellbar, daß die Funktion der Mitglieder der Zyxin-

Familie darin besteht, den Zustand von Membranen zu messen und bei Bedarf in den Kern zu gehen und dort Genexpression zu regulieren.

Ein direkter Hinweis, daß Ror2 in dieser Funktion eine Rolle spielen könnte, fehlt allerdings bisher. Jedoch konnte in Zellkultur-Experimenten gezeigt werden, daß Wtip und Ror2 an der Zellmembran von HEK293 Zellen co-lokalisieren (Abb. 21), so daß es denkbar wäre, daß Wtip von dort aus in den Kern gelangen könnte. In der Literatur sind Interaktionen von LIM Domänen Proteinen mit RTK beschrieben, wobei Tyrosin-Reste immer eine wichtige Rolle bei der Interaktion spielen. Enigma ist ein Protein, das drei C-terminale LIM Domänen enthält (Wu & Gill, 1994; Wu et al., 1996). Durick und seine Mitarbeiter wollten einen Interaktionspartner der Ret Kinase identifizieren, der bei der mitogenen Funktion von Ret eine Rolle spielt. In einem "Yeast Two Hybrid"-Ansatz identifizierten sie Enigma als Ret Interaktionspartner und konnten zeigen, daß die zweite LIM Domäne von Enigma die Interaktion mit Ret vermittelt. Dabei spielt ein Tyrosin Rest im C-Terminus von Ret bei der Bindung von Enigma eine wichtige Rolle. Jedoch konnte gezeigt werden, daß diese Interaktion nicht phosphorylierungsabhängig ist (Durick et al., 1996). Enigma bindet noch an eine weitere RTK. Es konnte gezeigt werden, daß Enigma mit seiner C-terminalen LIM Domäne an den Insulinrezeptor binden kann und dadurch vermutlich eine Rolle bei der Internalisierung des Rezeptors spielt. Dabei erkennt die LIM Domäne ein bestimmtes Aminosäure Motiv im InsR, welches als "Tyrosine Tight Turn" bezeichnet wird. Dieses Motiv wird auch in endocytotischen Sequenzen anderer RTK gefunden, jedoch erkennt Enigma nur die Sequenz im InsR. Diese Interaktion scheint also sehr spezifisch zu sein (Wu & Gill, 1994; Wu et al., 1996).

Interessanterweise führt die Überexpression von Wtip in HEK293 Zellen zu einer punktförmigen, vesikulären Verteilung des Proteins im Cytoplasma (Abb. 21), so daß auch für Wtip eine Funktion bei der Internalisierung von Ror2 nicht ausgeschlossen scheint. Leider konnte im Rahmen dieser Studie die Identität dieser Vesikel nicht eindeutig geklärt werden, so daß diese Vermutung noch weiterer Experimente bedarf.

Möglicherweise sind Tyrosin-Reste auch für die Wtip/Ror2 Interaktion von großer Bedeutung. In einem weiterführenden Experiment wäre es interessant zu klären, ob das Austauschen der Tyrosin-Reste im C-Terminus von Ror2 die Bindung von Wtip beeinflusst.

4.4 Andere potentielle Interaktionspartner von Ror2

Die weiteren in Tabelle 3 aufgelisteten Proteine, die durch das Yeast Three Hybrid-Experiment als potentielle Ror2 Interaktionspartner identifiziert wurden, konnten im Rahmen dieser Studie nicht weiter bearbeitet werden. Daher fällt es schwer, für einen Großteil dieser Proteine eine Aussage über eine mögliche Echtheit der Interaktion mit Ror2 zu treffen. Jedoch ist einer dieser potentiellen Ror2 Partner besonders interessant.

Dazap2 (*DAZ-associated protein 2*) /Brbp (*basic prolin-rich protein*) wurde im Rahmen einer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. G. Gross in Braunschweig ebenfalls in einem "Yeast Two Hybrid"-Experiment als Interaktionspartner von Ror2 gefunden (persönliche Kommunikation, Dr. A Winkel). Die Identifikation von Dazap2 in zwei unabhängigen Experimenten aus unterschiedlichen cDNA-Bibliotheken erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß diese Interaktion auch *in vivo* von Relevanz sein könnte. Im Rahmen seiner Doktorarbeit konnte A. Winkel zeigen, daß die Interaktion an den Serin/Threonin- und Prolin-reichen Domänen von Ror2 stattfindet, da Dazap2 in Co-Präzipitationsversuchen nur von dem "volle Länge" Ror2 präzipitiert wurde.

DAZAP2 wurde im Jahr 2000 als Interaktionspartner von DAZ (*deleted in azoospermia*) in einem "Yeast Two Hybrid"-Experiment identifiziert und beschrieben (Tsui et al., 2000). DAZAP2 scheint ubiquitär exprimiert zu werden, jedoch beruhen diese Ergebnisse auf Northern Blot Analysen menschlicher Gewebe. DAZAP2 verfügt über keine erkennbaren funktionellen Domänen, jedoch sind konservierte Prolin-reiche Sequenzen beschrieben, an die potentielle SH2 und SH3 Domänen Proteine binden könnten. Das Gen scheint eine Rolle in der Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark zu spielen, da gezeigt werden konnte, daß DAZAP2 in Patienten, die an Multiplem Myelom leiden, herunterreguliert ist (Shi et al., 2004). Das Multiple Myelom ist eine Krebserkrankung mit einer Vermehrung der Plasmazellen vor allem im Knochenmark.

Interessanterweise kann in der Genepaint Datenbank DAZAP2 Expression auf sagittalen Schnitten von E14,5 Maus-Embryonen in der Lunge, den Nieren und im Herzen gefunden werden, wobei das Expressionsmuster der Expression von Ror2 ähnelt (www.genepaint.org, Genepaint Set ID EH1386).

Dazap2 stellt also einen interessanten, potentiellen Interaktionspartner von Ror 2 dar. Die biologische Relevanz dieser Interaktion müßte jedoch in zusätzlichen Experimenten geklärt werden.

4.5 Potentielle Interaktionspartner von Wtip aus dem automatisierten "Yeast Two Hybrid"-Screen

Im Rahmen einer Kooperation innerhalb des SFB 577 (Molekulare Grundlagen klinischer Variabilität monogen bedingter Krankheiten, Charité Berlin) bot sich die Möglichkeit, verschiedene Wtip Konstrukte, die im Rahmen dieser Studie kloniert wurden, durch einen automatisierten "Yeast Two Hybrid"-Screen analysieren zu lassen. Dieser automatisierte Ansatz wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Wanker am Max-Delbrück Zentrum in Berlin durchgeführt. Dabei konnten 19 potentielle Interaktionspartner von Wtip identifiziert und in Rückkreuzungsexperimenten bestätigt werden (siehe Tabelle 4). Eine weitergehende Bestätigung in einem unabhängigen System steht jedoch noch aus, so daß die Beurteilung dieser potentiellen Interaktionspartner von Wtip etwas schwierig ist. Dies trifft natürlich besonders für die hypothetischen, bzw. nicht weiter beschriebenen Proteine, wie z.B. das FALZ Protein oder KIAA1377, zu. Mitochondrienproteine und Collagen-verwandte Proteine werden in "Yeast Two Hybrid"-Analysen oft als falsch-positive Proteine identifiziert (van Criekinge & Beyaert, 1999), so daß diese Interaktionen einer weiteren, sehr genauen Überprüfung bedürfen.

Ein identifizierter Kandidat ist jedoch von besonderem Interesse. Der *Retinoid X receptor α* (RXR α) ist ein nucleärer Rezeptor der Retinolsäure. Bisher sind zwei Familien von Retinolsäure Rezeptoren beschrieben, die *Retinoic Acid Receptors* (RARs) und die *Retinoic X Receptors* (RXRs), die verschiedene Vitamin A Derivate binden können und durch diese Liganden als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren fungieren. Dabei bilden RARs und RXRs sowohl Homo- als auch Heterodimere, wodurch sich die Vielfalt der möglichen Liganden erhöht (Lee et al., 2004). Für die RARs ist sogar eine ligandenunabhängige Repressorfunktion gezeigt worden (Weston et al., 2003). Während der Embryogenese führt zu viel, genau wie zu wenig Retinolsäure zu Defekten in der Entwicklung verschiedener Organe, z.B. zu Defekten in Augen, Nieren, Lunge und Herz. Zu viel Retinolsäure führt z.B. zu einer Verkürzung der Röhrenknochen und der Finger- bzw. Zehenglieder in den Extremitäten (zur Übersicht: Lee et al., 2004). Interessanterweise zeigen RXR α -defiziente Mäuse eine Resistenz gegen durch Retinolsäure vermittelte Extremitätendefekte (Sucov et al., 1995), so daß von einer Funktion von RXR α in der Gliedmaßenentwicklung ausgegangen werden kann. Es wäre denkbar, daß die Interaktion von RXR α und Wtip hier von Bedeutung sein könnte und möglicherweise sogar Ror2 in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt. Dies ließe z.B.

folgende Spekulation zu: Es wäre möglich, daß ein Funktionsverlust von Ror2 dazu führen würde, daß Wtip nicht mehr an Ror2 binden kann, daraufhin in den Kern gelangt und dort die Aktivität des RXR α moduliert, wodurch z.B. Verkürzungen der Extremitäten, bzw. Finger/Zehen entstehen könnten.

RXR α zeigt während der Embryogenese in der Maus ein diffuses, nahezu ubiquitäres Expressionsmuster (Lee et al., 2004). Mäuse, in denen nur noch ein RXR α Allel vorhanden ist, zeigen ein verzögertes Wachstum und sind auch als adulte Tiere noch kleiner als vergleichbare Wildtypen. Das Ausschalten beider RXR α Allele führt hingegen zu Defekten in der Herz- und Augenentwicklung. Homozygote Tiere sterben *in utero*, wobei der Zeitpunkt des Todes dabei variabel zu sein scheint. Interessanterweise erinnert der Herzphänotyp an die Herzdefekte, die durch WT-1 Depletion in Maus-Embryonen entstehen (Kreidberg et al., 1993), so daß eine Verbindung zwischen RXR α und Wtip auch in diesem Zusammenhang durchaus in Betracht kommt, da Wtip ursprünglich als WT-1 Bindungspartner identifiziert wurde (Srichai et al., 2004). Es wäre dabei von Bedeutung, in weiterführenden Experimenten zu überprüfen, ob Wtip in der Lage ist, RXR α vermittelte transkriptionelle Aktivität zu modulieren.