

Aus dem

Max Planck Institut für Molekulare Genetik  
Forschungsgruppe Development and Disease,  
und dem CharitéCentrum 17  
für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit Perinatalzentrum und Humangenetik  
Institut für Medizinische Genetik  
Direktor: Professor Dr. Stefan Mundlos

## **Habilitationsschrift**

# **Molekulargenetik und funktionelle Analyse embryonaler Extremitätenfehlbildungen**

Zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach „Experimentelle Humangenetik“

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Von

Dr. rer. nat. Sigmar Stricker  
Geb. 12.12.1971 in Schwäbisch Gmünd

Eingereicht:	8. März 2010
Dekanin:	Professor Dr. A. Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. G. Rappold
2. Gutachter:	Prof. Dr. A. Winterpacht

**“Nature is nowhere accustomed more openly  
to display her secret mysteries  
than in cases where she shows traces  
of her workings apart from the beaten path”**

*William Harvey (1578 – 1657)*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Entwicklung der Extremität.....	5
1.1.1 Musterbildung in der frühen Extremität.....	6
1.1.2 Die Formation und Differenzierung des Extremitätenskeletts.....	9
1.2 Genetische Entwicklungsstörungen des Extremitätenskeletts.....	11
1.3 Brachydaktylien.....	12
1.4 Signalkaskaden in der Extremitätenentwicklung.....	14
1.4.1 Der Hedgehog Signalweg.....	14
1.4.2 Der Fgf Signalweg.....	14
1.4.3 Der Wnt Signalweg.....	15
1.4.4 Der BMP Signalweg.....	16
1.5 Die Rezeptor-Tyrosinkinase ROR2.....	16
1.5.1 Humangenetik.....	16
1.5.2 Biochemie.....	17
<b>2. Originalarbeiten.....</b>	<b>19</b>
2.1 Mutationen in <i>WNT7A</i> verursachen eine Reihe von Extremitäten-Fehlbildungen, unter anderem das Fuhrmann Syndrom und das Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel Phocomelia Syndrom.....	19
2.2 Eine umfassende Expressionsanalyse aller Wnt Gene und ihrer wichtigsten sekretierten Antagonisten während der Extremitätenentwicklung und der Knorpeldifferenzierung der Maus.....	22
2.3 Das LIM-Domänen Protein Wtip interagiert mit Ror2 und inhibiert den kanonischen Wnt Signalweg.....	24
2.4 Graduelle Proteinstabilität und Membran-Lokalisierung von ROR2 sind verantwortlich für die Ausbildung von Brachydaktylie Typ B oder Robinow Syndrom Phänotypen.....	26

2.5 Klonierung und Expressionsmuster von <i>Ror2</i> im Huhn sowie funktionelle Charakterisierung von trunkierenden Mutationen in der Brachydaktylie Typ B und im Robinow Syndrom.....	29
2.6 Die Mutation ROR2 <sup>W749X</sup> , assoziiert mit humaner BDB1, ist eine rezessive Mutation in der Maus, verursacht Brachydaktylie, ist beteiligt an der Gelenksentwicklung und ist ein weiteres Modell für das rezessive Robinow Syndrom.....	31
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>33</b>
3.1 Die Besondere Bedeutung von WNT7A in der Extremitäten-Entwicklung des Menschen.....	33
3.2 Komponenten des Wnt-Signalweges in der Extremitäten-Entwicklung.....	35
3.3 Genotyp-Phänotyp Korrelationen bei Mutationen in ROR2, ursächlich für Brachydaktylie Typ B1 und rezessives Robinow Syndrom.....	36
3.4 Interaktionspartner und intrazelluläre Signalwege von Ror2.....	39
3.5 Die Pathogenese der BDB1 im Tiermodell.....	40
3.6 Ausblick auf eine übergreifende Erklärung der Brachydaktylien als molekulare Krankheitsfamilie.....	42
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>45</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>47</b>
<b>Abkürzungen.....</b>	<b>53</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>54</b>
<b>Erklärung nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité.....</b>	<b>55</b>

# 1. Einleitung

Angeborene Fehlbildungen treten beim Menschen mit einer Häufigkeit von ca. 3% bei lebend Geborenen auf. Am prominentesten vertreten in dieser Gruppe sind Fehlbildungen des zentralen Nervensystems mit ca. 1% sowie angeborene Herzfehler mit ca. 0,8%. Skeletale Syndrome sind zwar rare Erkrankungen in ihrem individuellen Auftreten, zusammen genommen stellen sie jedoch eine hohe klinische Relevanz dar. Insgesamt treten Fehlbildungen, die speziell das Extremitätenskelett betreffen, bei Neugeborenen mit einer Häufigkeit von ca. 0,1% auf (1).

In dieser Habilitationsschrift werden Arbeiten vorgestellt, die neue Mutationen in angeborenen skeletalen Syndromen der Extremität beschreiben. Außerdem werden Studien vorgestellt, die solche Mutationen in Handfehlbildungen aus der Familie der Brachydaktylien in Bezug auf Genotyp-Phänotyp Korrelationen untersuchen sowie ihre embryonale Pathogenese aufklären.

## 1.1 Entwicklung der Extremität

Während der frühesten Embryonalentwicklung der Wirbeltiere bilden sich drei Keimblätter, das Ektoderm, das Endoderm und das Mesoderm. Während aus dem Ektoderm die Epidermis, das zentrale Nervensystem sowie Teile des Schädels entstehen, bilden sich aus dem Endoderm der Darm und dessen Derivate wie z.B. die Lunge oder die Schilddrüse. Das Mesoderm bildet den kompletten Stütz- und Bewegungsapparat, also alle Muskeln und Sehnen sowie das Skelett. Das Mesoderm gliedert sich in das paraxiale- (PM), das intermediäre- (IM) sowie das Seitenplattenmesoderm (SPM) (2).

Das paraxiale Mesoderm erstreckt sich in zwei Streifen entlang der Körperlängsachse seitlich der Chorda dorsalis bzw. des Neuralrohrs. Es gliedert sich in das posterior gelegene, noch undifferenzierte und unsegmentierte präsomitische Mesoderm (PSM) und die segmental angeordneten Somiten, die sich in einer definierten zeitlichen Sequenz aus dem PSM abschnüren. Die Somiten sind zunächst undifferenzierte Zellpakete, die jedoch kurz nach ihrer Abschnürung vom PSM beginnen, sich in Sklerotom, Myotom und Dermatome zu differenzieren. Das Sklerotom bildet das gesamte axiale Skelett (Wirbelsäule,

Rippen), das Myotom die gesamte Muskulatur des Rumpfes und der Extremitäten. Das Dermatome schließlich bildet das dorsale Unterhautgewebe.

Während aus dem intermediären Mesoderm vor allem die Nieren- und die Genitalanlagen hervorgehen, bildet das Seitenplattenmesoderm eine Vielzahl an Geweben des somatischen und des splanchnischen Mesoderms. Zu ersteren zählen die Pleura, das Perikard und das Peritoneum, zu letzteren das Bindegewebe, die glatte Muskulatur der Eingeweide und Blutgefäße, das Endothel der Blutgefäße, die blutbildenden Gewebe oder auch das Myocard. Besonders entstehen aber aus dem Seitenplattenmesoderm die Gliedmaßen (2).

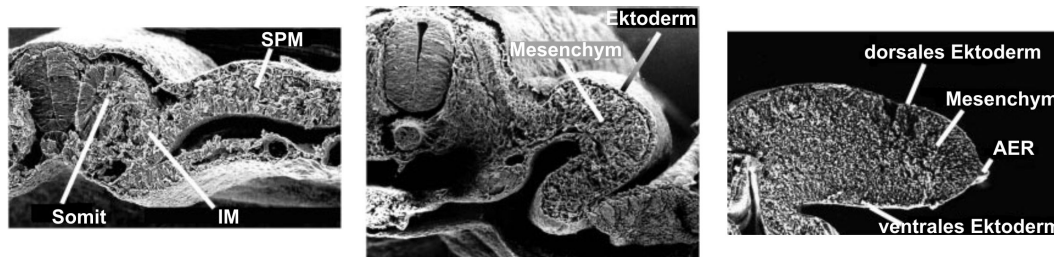


Abbildung 1: Entwicklung der Extremität im Hühnerembryo, Stadien (nach Hamburger und Hamilton (3)) von links nach rechts: 13, 16, 22. Gezeigt sind Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten. Bei Stadium 13 (ca. 36 Stunden) sind ein Somite, das intermediäre Mesoderm (IM) und das Seitenplattenmesoderm (SPM) gekennzeichnet. Bei Stadium 16 (ca. 51-56 Stunden) ist schon die Extremitätenknospe zu erkennen, bei Stadium 22 (ca. 3,5 Tage) ist die Extremitätenknospe voll ausgebildet und wächst distal, angetrieben durch Signale aus der apikalen ektodermalen Randleiste (apical ectodermal ridge, AER). Modifiziert nach (4).

Die Entwicklung der Gliedmaßen bzw. deren Musterbildung vollzieht sich bei der Maus ca. zwischen den Embryonaltagen 9 und 14, beim Menschen zwischen der vierten und siebten Schwangerschaftswoche. In dieser Periode entstehen die Extremitätenanlagen, wachsen zu Extremitätenknospen, die drei räumlichen Achsen werden angelegt (Musterbildung) und die verschiedenen Gewebetypen formieren sich (Differenzierung). Zum Abschluß dieser Periode ist das Extremitätenskelett und der muskuläre Apparat ausgebildet und wächst in der Folge weiter.

### 1.1.1 Musterbildung in der frühen Extremität

Vor der eigentlichen Induktion der Extremitäten werden im Seitenplattenmesoderm zunächst die Positionen der späteren Extremitätenknospen angelegt. Dies geschieht vermutlich durch das Zusammenspiel der entlang der Körperachse gestaffelt exprimierten Homeobox (Hox) Gene (4). Über die darauf folgende Induktion der Extremitätenanlage gaben vor allem Studien in Hühnerembryo Aufschluß. So wurde bereits früh gezeigt, daß das intermediäre

Mesoderm bzw. der daraus entstehende Mesonephros für die Initiation der Extremität gebraucht wird (5). Spätere Studien legten nahe, daß das IM dabei Fgf8 produziert, welches in das SPM diffundiert (6). Fgf8 induziert im SPM wiederum das Signalmolekül Fgf10, welches autokrin die Zellteilung anregt, so daß es zur Ausbildung einer Extremitätenknospe kommt (4). In diese Induktion sind auch Signalfaktoren aus der Wnt Familie beteiligt, Wnt2b ist im Bereich der Vorderextremität exprimiert, Wnt8c im Bereich der Hinterextremität (7). Beide Faktoren benutzen den  $\beta$ -catenin Signalweg (s.u.). Kawakami et al. (7) konnten zeigen, daß dieser Signalweg hinreichend und notwendig für die Induktion der Extremitäten ist. Durch die Aktivität des Wnt /  $\beta$ -catenin Signalweges kommt es zur Etablierung einer speziellen Struktur am distalen Ende der frühen Extremitätenknospe, der apikalen ektodermalen Randleiste (apical ectodermal ridge, AER) (8, 9). Dabei handelt es sich um eine ektodermale Verdickung, die entlang der antero-posterioren Achse der Extremität läuft und dabei die Extremitätenknospe in einen dorsalen und ventralen Bereich trennt.

Die daraus entstehende frühe Extremitätenknospe besteht aus mesodermalen undifferenzierten Zellen, die von einer einschichtigen Epidermis umgeben sind. Bereits in der frühesten Phase werden die drei Hauptachsen proximal-distal (PD), anterior-posterior (AP) und dorsal-ventral (DV) festgelegt.

An der Etablierung der PD Achse bzw. dem Längenwachstum der Extremität sind Mitglieder der Fibroblast growth factor (Fgf) Familie maßgeblich beteiligt, die in der AER exprimiert werden. Die Signalmoleküle Fgf4, Fgf8, Fgf9 und Fgf17 diffundieren aus dem Ektoderm der AER in das darunterliegende Mesoderm und halten die dort lokalisierten Zellen undifferenziert und regen die permanente Zellteilung an (10). Dadurch behält die auswachsende Extremität jederzeit einen Pool an undifferenzierten Zellen (die sogenannte „progress zone“), der sukzessive von proximal nach distal in die Skelettelemente bzw. andere Gewebe der Gliedmaße differenzieren. Die Fgfs der AER, vor allem Fgf8, steuern in den distalen Mesenchymzellen außerdem die Expression von Fgf10, das wiederum in die AER diffundiert und zu deren Erhalt beiträgt. Fgf8 und Fgf10 zeigen somit einen positiven Feedback loop (10).

Die AP Achse wird maßgeblich von einer Gruppe von Zellen am posterioren Ende der Knospe gesteuert, der „zone of polarizing activity“ (ZPA) (11), die das morphogen Sonic hedgehog (Shh) produzieren (12). Shh bildet einen Gradienten entlang der AP Achse und induziert dabei einerseits sekundäre Botenstoffe wie das Bone morphogenetic protein 2 (BMP2), die wiederum an der Bildung des Skeletts beteiligt sind (10). Shh ist essentiell für die Ausbildung des Extremitätenskeletts, Inaktivierung des *Shh* Gens in der Maus resultiert in einer trunkierten Extremität (13). Der hauptsächliche Wirkmechanismus von Shh

besteht in einem Antagonismus mit dem Transkriptionsfaktor Gli3. Das Gli3 Protein wird, in Abwesenheit von Hedgehog, konstitutiv proteolytisch gespalten, was es in einen transkriptionellen Repressor konvertiert. Ist jedoch in der Zelle der Sonic hedgehog Signalweg aktiv, so wird die Spaltung verhindert und Gli3 fungiert als transkriptioneller Aktivator. In der Extremitätenknospe ist Gli3 vor allem im anterioren Bereich exprimiert, der Shh Gradient induziert somit einen reversen Gradienten an Gli3-Repressor (14). Dieses geregelte Zusammenspiel ist essentiell, da Defekte in Shh oder Gli3 zu Mißbildungen sowohl im Menschen als auch in der Maus führen (13, 15-19). Außerdem sorgt Shh für die Etablierung der sogenannten reversen Kolinearität der 5' *Hox* Gene (*Hox-d11*, *-d12*, *-d13* und *Hox-a13*), was für die Musterbildung in der Hand essentiell ist (20).

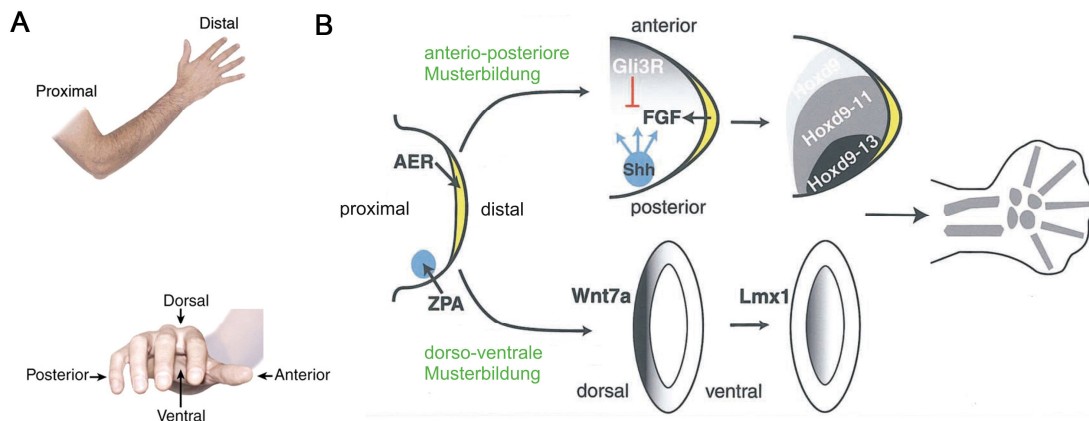


Abbildung 2: Musterbildung in der Extremitätenentwicklung. A) Die räumlichen Achsen der Extremität. B) Faktoren der Musterbildung. Die apical ectodermal ridge (AER) ist für das distale Wachstum verantwortlich, sie produziert dazu Fibroblast growth factors (FGF), die in das Mesenchym diffundieren. Die antero-posteriore Musterbildung wird gesteuert durch die Zone polarisierender Aktivität (ZPA), die das Morphogen Sonic hedgehog (Shh) produziert. Dieses wirkt antagonistisch mit dem anterior exprimierten Gli3-Repressor (Gli3R) und induziert die revers-kolineare Expression der 5' *Hox* Gene. Für das dorso-ventrale Patterning ist *Wnt7a* zuständig, das im dorsalen Ektoderm produziert wird, ins dorsale Mesenchym diffundiert und dort die Expression des Transkriptionsfaktors *Lmx1* steuert. Modifiziert nach (21, 22).

Die DV Achse schließlich wird durch die Expression von *Wnt7a* im dorsalen Ektoderm reguliert. *Wnt7a* induziert im dorsalen Mesenchym den transkriptionsfaktor *Lmx1* (23). Im ventralen Ektoderm wird die Expression von *Wnt7a* durch *Engrailed-1* (*En1*) negativ reguliert. Wird *En1* in der Maus inaktiviert, kommt es zur Ausbildung von doppelt-dorsalen Extremitäten (24).

Diese Signalzentren sind vielfach miteinander verwoben. Shh induziert im Mesenchym den BMP-Antagonisten Gremlin, der wiederum die Aufrechterhaltung der AER gewährleistet (25-27). Außerdem stimuliert Shh die Expression von *Fgf4* in der AER (25, 26). Shh selbst wird wiederum von *Wnt7a*



positiv reguliert (28), das somit neben seiner Hauptrolle in der DV Musterbildung auch das PD und AP Patterning beeinflusst. Schließlich positioniert Wnt7a im Zusammenspiel mit radical fringe die AER an der DV-Grenze (4, 10, 29-31).

### 1.1.2 Die Formation und Differenzierung des Extremitätenskeletts

Während des Auswachsens der Extremitätenknospe beginnt das noch undifferenzierte Mesenchym entlang der proximo-distalen Achse mit der Differenzierung in verschiedene Gewebetypen wie Muskel, Sehnen und Knorpel. Dabei entstehen die proximalen Strukturen zuerst, die distaleren Strukturen später. Generell gliedert sich die Extremität in drei Abschnitte: den Stylopod: (Humerus / Femur), den Zeugopod: (Radius/Ulna / Tibia/Fibula) und den Autopod: (Hand / Fuß). Wie bereits erwähnt, sorgen Fgf Faktoren aus der AER für die konstante Proliferation eines Zellpools direkt unterhalb der AER, der sogenannten Progress Zone. Wenn diese Zellen dann eine kritische Distanz zur AER überschreiten, somit aus der Reichweite des Fgf Signals gelangen, beginnen sie (unter Einfluß anderer Signalmechanismen) zu differenzieren. Es wurde postuliert, daß die Zellen dabei ihre Verweildauer in der Progress Zone messen und daher in zeitlicher Sequenz zu den verschiedenen Abschnitten der Extremität differenzieren (Progress Zone Model) (32).

Dieses Modell wurde jedoch in den vergangenen Jahren in Frage gestellt, neuere Studien im Hühnerembryo als auch in der Maus legten nahe, daß die drei Abschnitte der Extremität bereits in der frühen Extremitätenknospe festgelegt sind und in der weiteren Entwicklung separat expandieren (early specification model) (33, 34); dies ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

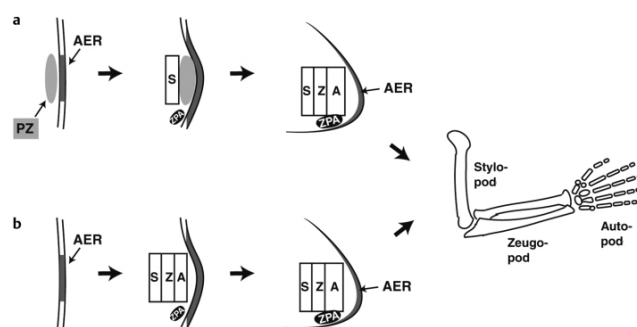


Abbildung 3: Verschiedene Modelle der proximo-distalen Differenzierung. Im klassischen progress zone model (a) messen die unter Einfluß der AER proliferierenden Zellen ihre Verweildauer in der progress zone (PZ) und differenzieren beim Austritt aus der PZ zu der drei Segmenten der Extremität. Im early specification model (b) sind bereits in der frühen Extremitätenknospe die drei Segmente angelegt, diese expandieren im Verlauf des weiteren Wachstums. Abbildung aus (35).

Während der Spezifikation der einzelnen Abschnitte der Extremität entsteht der Knorpel zunächst als kontinuierliche Anlage, der nach distal auswächst und erst später durch Gelenke in seine einzelnen Elemente segmentiert wird. Die Entstehung des Knorpels wird durch verschiedene Signalsysteme reguliert. Vor

allem Signalmoleküle der Bone morphogenetic protein (BMP) Familie sind essentiell für die Knorpelentstehung (Chondrogenese) (36, 37). Negativ reguliert wird die Chondrogenese vor allem durch Faktoren aus der Wnt Familie, die im Ektoderm exprimiert werden und von dort in das Mesenchym diffundieren. Während die Extremitätenknospe wächst und an Volumen zunimmt, kommen daher die Zellen im Zentrum der Knospe aus der Reichweite des Wnt Signals und erhalten dadurch vermutlich die Kompetenz, zu Chondrozyten differenzieren zu können (38, 39).

Die Gelenke entstehen durch De-Differenzierung von Knorpelzellen. Vermutlich unter Einfluß des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalwegs (s.u.) werden Knorpelzellen, die als Leitgen *Collagen2a1* (*Col2a1*) exprimieren, veranlaßt, zu Gelenkzellen zu differenzieren, die als Marker den *Growth differentiation factor 5* (*Gdf5*) exprimieren (40, 41). Im Huhn entsteht dabei eine Anlage aus drei Zellschichten, die sogenannte Interzone. Die beiden äußeren Schichten bilden die spätere Gelenkoberfläche, die mittlere Schicht wird apoptotisch und bildet den Gelenkspalt (42).

Die Skelettelemente des Autopoden entstehen zuletzt, ihre Regulation ist besonders komplex. Die Autopoden aller tetrapoden Tiere und auch des Menschen besitzen fünf Zehen / Finger. Jeder dieser Zehen / Finger besitzt eine eigene Identität, die sich aus der Zahl der Glieder (Phalangen), deren Form sowie der Position des Zehs / Fingers ergibt. Die Identität der Zehen / Finger wird über die antero-posteriore Musterbildung gesteuert. Das posterior exprimierte Sonic hedgehog (Shh) verleiht dabei den Fingern posteriore Identität, der einzige Finger, der sich ohne den Einfluß von Shh entwickelt ist der Daumen (43). Shh hat jedoch noch eine weitere Rolle: als Mitogen sorgt Shh für eine starke Proliferation des Mesenchyms und damit für die Expansion der Extremitätenknospe, Shh koordiniert somit Musterbildung und Wachstum (44, 45). Wie Shh die Identität der Zehen / Finger steuert ist noch ungeklärt. Einerseits scheint dabei die Räumliche Expansion früherer ZPA Zellen und ihr Beitrag zu den einzelnen Skelettelementen eine Rolle zu spielen (46), andererseits induziert Shh wiederum weitere antero-posteriore Gradienten, z.B. von BMP2, die an diesem Prozeß beteiligt sein könnten (47). Transplantationsexperimente haben gezeigt, daß den mesenchymalen Fingerzwischenräumen eine zentrale Rolle bei der Differenzierung der Zehen / Finger zukommt. So konnten Dahn und Fallon im Huhn zeigen, daß die Identität eines Zehs vom jeweils posterior davon liegenden interdigitalen Mesenchym gesteuert wird, und daß dies vermutlich über BMP Signale geschieht (48). Die Intensität des BMP-Signalweges in einer Population von Zellen direkt distal der wachsenden Kondensation (die sogenannte „phalanx forming region“, PFR) wiederum bestimmt die Rate an Knorpelzell-

Differenzierung und damit die spätere Länge (bzw. Anzahl der Glieder) der einzelnen Zehen (49).

Das Skelett der Extremität entsteht, wie auch das axiale Skelett, durch den Prozeß der enchondralen Ossifikation (Abbildung 4). Dabei aggregieren mesenchymale Vorläuferzellen und formen eine sogenannte Kondensation. Diese prä-chondrogene Kondensation differenziert weiter, Zellen in ihrem Kern werden zu Knorpelzellen (Chondrozyten), Zellen an der Peripherie differenzieren zur Knorpelhaut, dem Perichondrium. Die Knorpelzellen durchlaufen dann eine Reihe von Differenzierungsschritten und bilden dabei die sogenannte Wachstumsfuge. In diesem Bereich proliferieren die Chondrozyten stark, hier findet das Längenwachstum des Skeletts statt. Als letzten Differenzierungsschritt werden die Chondrozyten hypertroph, d.h. sie vervielfachen ihre Größe, produzieren eine bestimmte extrazelluläre Matrix und produzieren Botenstoffe, die Blutgefäße und Knorpel/Knochen abbauende Zellen (Osteoklasten) anlocken. Schließlich werden die hypertrophen Chondrozyten apoptotisch, Blutgefäße invadieren den Knorpel, die Knochenmarkshöhle entsteht. Zellen im Perichondrium beginnen zu Osteoblasten zu differenzieren und formen das Periosteum, hier wird der cortikale Knochen gebildet (50).

## 1.2 Genetische Entwicklungsstörungen des Extremitätenskeletts

Klassisch werden die Skeletterkrankungen in zwei Gruppen unterteilt, die Dysostosen (Malformationen einzelner Knochen oder Gruppen von Knochen) und Osteochondrodysplasien (Entwicklungsstörungen des Knorpel/Knochengewebes). Das wachsende Wissen über die molekularen Ursachen dieser Syndrome sowie ihrer embryonalen Pathogenese verlangt jedoch nach einer Klassifizierung, die Entwicklungsvorgänge mit einbezieht. Kornak und Mundlos (21) schlugen vor, Skeletale Syndrome in vier Kategorien einzuteilen: Syndrome, welche i) die Musterbildung, ii) die Entstehung von Vorläuferzellen (Kondensation / Differenzierung), iii) das Wachstum der Skelettelemente, oder iv) deren Homöostase betreffen.

Ein Beispiel für Musterbildungsdefekte sind die Polydaktylien, bei der zusätzliche Finger anterior des Daumens (präaxiale P.) oder posterior des kleinen Fingers (postaxiale P.) entstehen. Die Ursache dafür ist in vielen Fällen eine Deregulation oder ektopische Aktivierung des Hedgehog Signalwegs (18, 51-53).

Ein klassisches Beispiel für einen Differenzierungsdefekt ist die campomele Dysplasie (MIM #114290). Dabei handelt es sich um eine dominant vererbte

Erkrankung, bei der zahlreiche Knochen hypoplastisch angelegt sind oder Malformationen aufweisen. Verursacht wird das Syndrom durch Mutationen in *SOX9* (54). Sox9 ist ein Transkriptionsfaktor der high mobility group (HMG) Familie, der unter anderem in allen Knorpel-Vorläuferzellen exprimiert wird. Inaktivierung von Sox9 in der Maus zeigte, daß der Faktor essentiell für die Differenzierung von Chondrozyten ist (55).

Das prominenteste Beispiel eines Defekts im Wachstum des Skeletts ist die Achondroplasie (MIM #100800). Diese wird hervorgerufen durch Mutationen in *FGFR3*, das für den Fibroblast growth factor-Rezeptor 3 (Fgfr3) kodiert (56, 57). Dieser Rezeptor ist in den Chondrozyten der Wachstumsfuge exprimiert, besonders im Bereich der proliferierenden Zellen. Dort ist er ein negativer Regulator der Proliferation (58). Die Mutationen in der Achondroplasie aktivieren den Rezeptor Liganden-unabhängig, führen also zu einer konstitutiven Aktivierung und damit zu einer starken Suppression der Proliferation in der Wachstumsfuge und hemmen somit das Wachstum des Skeletts (59).

Die Homöostase des Knochens wird gesteuert durch das Gegenspiel von Knochen aufbauenden Osteoblasten und Knochen abbauenden Osteoklasten. Diese beiden Zelltypen regulieren sich gegenseitig durch parakrine Mechanismen und halten somit permanent eine Balance zwischen Knochenauf- und abbau (60). Kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts, resultiert dies in einer Akkumulation von Knochen (Osteopetrose) oder einer überproportionalen Abnahme der Knochenmasse (Osteoporose).

### 1.3 Die Brachydaktylien

Brachydaktylien (BD) sind angeborene Syndrome, bei denen eine Verkürzung der Finger und Zehen auftritt (Griech. brachy = kurz, dactylos = Finger). Dies kann hervorgerufen werden durch eine Verkürzung oder ein Fehlen einzelner oder mehrerer Phalangen und/oder Metacarpale / Metatarsale. Brachydaktylie Phänotypen können als isolierte Erkrankungen oder als Teil eines komplexen Syndroms auftreten, z.B. in der cleidocranialen Dysplasie (hervorgerufen durch heterozygote Mutationen in *RUNX2* (61), MIM #119600) eine verkürzte mittlere Phalanx des fünften Fingers, oder in der Grebe-Chondrodysplasie (hervorgerufen durch homozygote Mutationen in *CDMP1/GDF5* (62), MIM #200700), mit schweren Reduktionen in allen Fingern / Zehen.

Die isolierten Brachydaktylien werden in fünf Typen unterteilt, Typ A-E, wobei Typ A drei Untergruppen (A1-A3; MIM #112500, #112600, #112700) und Typ B zwei Untergruppen (B1, B2, MIM #11300, #611377) besitzt.

Brachydaktylien vom A-Typ sind durch eine Hypoplasie / Aplasie der mittleren Phalangen gekennzeichnet, Typ B zeigt Hypoplasie / Aplasie der mittleren und distalen Phalangen. Typ C (MIM #113100) zeigt einen komplexen Phänotyp mit Verkürzungen von Phalangen und Metacarpale in verschiedenen Fingern. Typ D (MIM #113200) ist gekennzeichnet durch eine verkürzte distale Phalanx des Daumens, Typ E (MIM #113300) zeigt verkürzte Metacarpale / Metatarsale (63). Abbildung 5 zeigt schematisch und an Beispielen die Fehlbildungen in den Brachydaktylien Typ A1, A2, B1, B2, C und E.

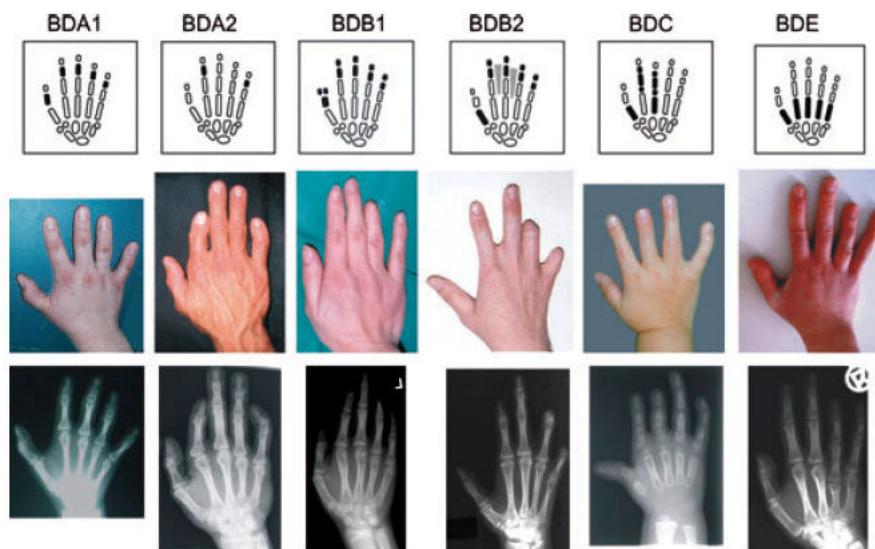


Abbildung 5: Schematische Darstellung der betroffenen Skelettelemente in verschiedenen Brachydaktylien (oben; betroffene Elemente sind schwarz). Unten Beispiele für die einzelnen Brachydaktylien. Abbildung aus (63).

In den vergangenen Jahren wurden die genetische Ursachen für die meisten Brachydaktylien aufgeklärt. BDA1 wird durch Mutationen in *Indian hedgehog* (*IHH*) verursacht (64), BDA2 durch Mutationen im Gen des BMP-receptor type 1b (*BMPR1B*) (65), sowie in dessen Liganden, *GDF5* (66-69). Außerdem kann die BDA2 durch eine Duplikation in der regulatorischen Region von *BMP2* hervorgerufen werden (70). Brachydaktylie Typ B kann verursacht werden durch Mutationen in *ROR2* (BDB1) (71, 72), sowie durch Mutationen im BMP-Antagonisten *NOGGIN* (BDB2) (73). BDC wird hervorgerufen durch dominante Mutationen in *CDMP1/GDF5* (74, 75), es wurde jedoch auch eine rezessive Mutation in *GDF5* beschrieben (76). In den Brachydaktylien D und E wurden Mutationen in *HOXD13* beschrieben, jedoch in beiden Fällen nur in einzelnen Individuen (77).

## 1.4 Signalkaskaden in der Extremitäten-Entwicklung

Wie aus dem vorhergehenden Text ersichtlich, spielen die Hedgehog, Fgf, Wnt und BMP Signalwege wichtige Rollen in der Musterbildung und der Differenzierung des Extremitätenskeletts. Daher werden im Folgenden die Schlüsselkomponenten dieser Signalwege vorgestellt.

### 1.4.1 Der Hedgehog Signalweg

Die Familie der Hedgehog-Signalmoleküle umfaßt drei Mitglieder, Sonic, Indian und Desert hedgehog (Shh, Ihh, Dhh). Shh spielt zentrale Rollen in der Musterbildung der Extremität (s.o.) und des zentralen Nervensystems, Ihh koordiniert das Knorpelwachstum und die enchondrale Ossifikation und Dhh spielt eine Rolle in der Spermio-genese (78). Alle Hedgehog (HH) Moleküle binden an die Rezeptoren Patched-1 und Patched-2 (Ptc1 und Ptc2). Diese interagieren mit einem Membranprotein mit sieben Transmembran Domänen, Smoothened (Smo), das in seiner Struktur an G-Protein gekoppelte Rezeptoren erinnert. Smo ist der eigentliche Effektor: ohne HH Liganden wird Smo durch Ptc konstitutiv inhibiert, durch Ligandenbindung an Ptc wird die Inhibition aufgehoben und Smo induziert die Transkription von Zielgenen über die Aktivierung der Gli Transkriptionsfaktoren Gli1-3. Die Gli Faktoren werden in Abwesenheit eines HH Signals proteolytisch gespalten, dabei entsteht ein transkriptioneller Repressor. Das HH Signal verhindert die Spaltung, dies führt bei aktivem HH Signaling zur Stabilisierung der volle-Länge Form des Proteins, dieses fungiert als transkriptioneller Aktivator. Sowohl Ptc1 als auch Gli1 und Gli2 sind selbst transkriptionelle Zielgene des HH Signalweges (78, 79).

### 1.4.2 Der Fgf Signalweg

Der Mensch besitzt 22 Gene, die für Signalmoleküle aus der Familie der Fibroblast growth factors (Fgfs) codieren. Diese binden an vier verschiedene FGF Rezeptoren (Fgfrs). Bindung von Fgfs an ihre Rezeptoren führt zu deren homo-Dimerisierung und zur Aktivierung ihrer Tyrosin-Kinasen mit anschließender trans-Phosphorylierung. Dies führt dann zur Aktivierung einer klassischen MAPK Kaskade, die Adaptorproteine wie Grb und Sos, GTPasen wie Ras und schließlich MAP-Kinasen wie MEK und ERK1/2 involviert. Dies führt zur Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Aktivierung von Zielgenen. FGFs sind Induktoren der Zellproliferation, dies geschieht hauptsächlich über Aktivierung von STAT Faktoren, die wiederum Zellzyklusfaktoren wie p21 aktivieren. Des Weiteren benutzen FGF Rezeptoren

noch alternative Signalwege wie die Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) über Phospholipase gamma (PLC $\gamma$ ) und Diacylglycerol (80-82).

### 1.4.3 Der Wnt Signalweg

Der Mensch besitzt 19 Wnt Gene und 10 Gene, die für deren Rezeptoren (Frizzled, Fz) codieren. Klassisch werden die Wnt Moleküle in kanonische Wnts und nicht-kanonische Wnts eingeteilt. Ursprünglich wurde diese Unterteilung vorgenommen nach der Fähigkeit der kanonischen Wnts, Brustdrüsen-Epithelzellen neoplastisch zu transformieren und in *Xenopus laevis* Oocyten eine sekundäre Körperachse zu induzieren. Kanonische Wnts bedienen einen Signalweg, der als zentrale Komponente  $\beta$ -catenin enthält, dieser wird im Folgenden beschrieben.

Beta-catenin erfüllt eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion. Im „Aus“-Zustand liegt  $\beta$ -catenin im Komplex mit dem Gerüstprotein Axin und dem Protein adenoma polyposis coli (APC) vor. Dieser Komplex rekrutiert zwei serin-threonin Kinasen, Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und Casein Kinase 1  $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ). Diese phosphorylieren  $\beta$ -catenin, was zur Bindung eines Komplexes aus  $\beta$ -Trcp und einer Ubiquitin-Ligase führt, welche  $\beta$ -catenin für die proteasomale Degradation markiert. Durch diesen Mechanismus wird der zelluläre Level an  $\beta$ -catenin niedrig gehalten. In diesem Zustand fungieren die nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren aus der Tcf/Lef Familie als Repressoren durch die Rekrutierung von Co-Repressoren und Histon-Deacetylasen. Die Besonderheit der Wnt Moleküle ist, daß sie zur Aktivierung ihrer Rezeptoren Co-Rezeptoren benötigen. Im Falle der kanonischen Wnts sind dies Transmembranproteine aus der low density lipoprotein (Lrp) Familie, Lrp5 und Lrp6. Wnts binden beide Rezeptoren und aktivieren dadurch die intrazelluläre Signalweiterleitung. Diese geschieht durch Phosphorylierung von Lrp durch die Casein Kinase 1 gamma (CK1 $\gamma$ ), was zur Rekrutierung von Komplexen aus dem Gerüstprotein Dishevelled (Dvl) und Axin an die Membran führt. Dies führt wiederum zum Zerfall des oben beschriebenen  $\beta$ -catenin-Zerstörungskomplexes. Daraufhin akkumuliert  $\beta$ -catenin in der Zelle, transloziert in den Nucleus, bindet an Tcf Faktoren und konvertiert diese in transkriptionelle Aktivatoren (83-85).

Neben dem kanonischen Signalweg gibt es eine wachsende Anzahl von alternativen („nicht-kanonischen“) Signalwegen, die vor allem in der Zellpolarität und der Zellmigration eine Rolle spielen (86-88).

#### 1.4.4 Der BMP Signalweg

Die Aktivität der Bone morphogenetic proteins (BMPs) wurden in den 1960er Jahren zuerst beschrieben aufgrund der Fähigkeit von demineralisierter Knochenmatrix, die in Kaninchenmuskeln transplantiert wurde, ektope Knochenbildung zu induzieren (89). Später wurden die verantwortlichen Proteine aufgereinigt und charakterisiert (90). BMPs gehören zusammen mit den nahe verwandten Growth differentiation factors (GDFs) zur Transforming growth factor beta (Tgf $\beta$ ) Superfamilie. BMPs binden an einen heteromeren Komplex aus zwei verschiedene Serin/Threonin Kinase Rezeptoren, die BMP Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 (BmpR1a oder BmpR1b und BmpR2). BMP Liganden können auf zwei verschiedene Arten an die Rezeptorkomplexe binden: die Bindung von Liganden an den Typ 1 Rezeptor kann die Assoziierung des Komplexes erst auslösen (binding induced signaling complex, BISC), oder BMPs können an bereits präformierte Komplexe aus Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren binden (pre-formed complex, PFC). Nach Ligandenbindung transphosphoryliert in beiden Fällen der Typ 2 Rezeptor den Typ 1 Rezeptor und aktiviert ihn dadurch. Im Falle der BISC Signaltransduktion führt dies zur Aktivierung der Tgf $\beta$ -aktivierten Kinase 1 (TAK1), die dann über MAP Kinasen und p38 zur Transkription von Zielgenen wie der alkalischen Phosphatase (*ALP*) führt. Beim PFC- vermittelten Signalweg führt die Phosphorylierung von BmpR1 zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren der Smad Familie, im Falle der BMPs und GDFs von Smads 1, 5 und 8. Durch Phosphorylierung werden die Smads aktiviert, sie assoziieren mit dem (Co)Smad4, translozieren in den Nucleus und aktivieren über die Bindung an Smad-responsive elements auf der DNA die Transkription von Zielgenen wie *Id1* (91).

### 1.5 Die Rezeptor-Tyrosinkinase ROR2

#### 1.5.1 Humangenetik

Mutationen in *ROR2* verursachen, wie bereits erwähnt, die Brachydaktylie Typ B1 (BDB1) (71, 72). Alle BDB1-verursachenden Mutationen, die bis dato gefunden wurden, sind Nonsense oder Frame-shift Mutationen, die zur Expression von trunkierten Proteinen führen (Abbildung 6).

Eine andere Gruppe von Mutationen, die sich über das gesamte Protein verteilen, verursachen jedoch ein phänotypisch distinktes Syndrom, das rezessive Robinow Syndrom (RRS, MIM #268310) (92, 93). Das RRS ist gekennzeichnet durch



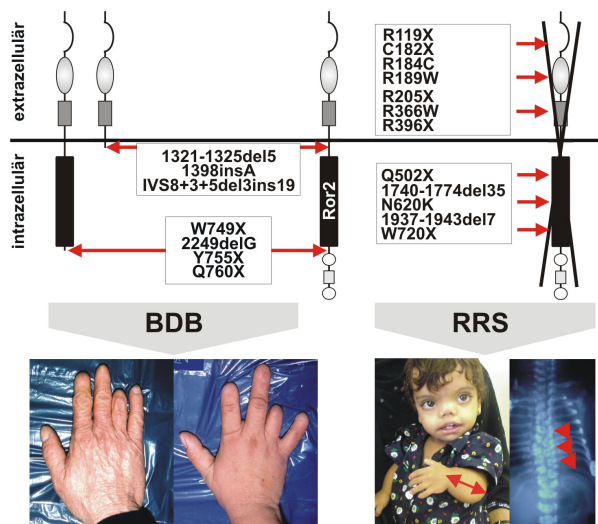


Abbildung 6: Mutationen in ROR2 und die daraus resultierenden Phänotypen. Trunkierende Mutationen N-terminal und C-terminal der Tyrosinkinase führen zur BDB1, Mutationen, die das Protein extrazellulär oder innerhalb der Tyrosinkinase trunkieren sowie Missense Mutationen führen zum RRS. BDB1 Mutationen führen vermutlich zu einem Funktionsgewinn, RRS Mutationen zu einem Funktionsverlust.

craniofaziale Auffälligkeiten (Hypertelorismus, frontale Ausbuchtung der Stirn, breite Nase, Gaumenspalte, Ankyloglossie), Malformationen der Wirbelkörper (Hemivertebrae), Mesomelie, genitale Hypoplasie und eine milde Brachydaktylie mit verkürzten Terminalphalangen, Nageldysplasie und Clinodaktylie des fünften Fingers (63). Es wurde vermutet, daß die Mutationen in der BDB1 zu einem Funktionsgewinn, die Mutationen im RRS zu einem Funktionsverlust des Proteins führen (94).

### 1.5.2 Biochemie

ROR2 ist eine membranständige Tyrosinkinase mit einem Molekulargewicht von ca. 110 KD (Kilodalton). Sie besitzt im extrazellulären Bereich eine immunoglobulin-artige Domäne, eine Cystein-reiche Domäne und eine Kringle Domäne, die vermutlich Funktionen in der Protein-Protein Interaktion bzw. der Ligandenbindung besitzen. Intrazellulär besitzt ROR2 eine Tyrosin Kinase Domäne mit hoher Ähnlichkeit zu anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie einen Prolin/Serin/Threonin-reichen C-Terminus, der einzigartig für ROR2 und das

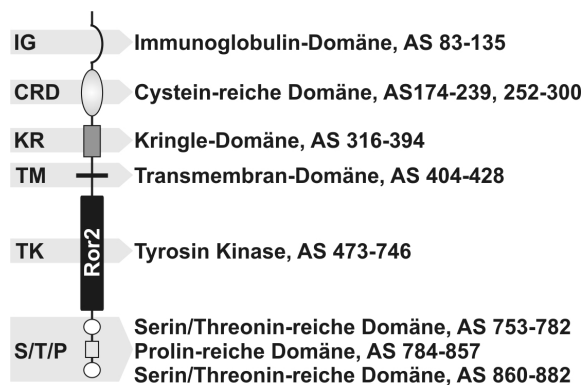


Abbildung 7: Domänenstruktur von ROR2

nahe verwandte Paralog ROR1 ist (95) (Abbildung 7). Die Cystein-reiche Domäne von ROR2 besitzt Ähnlichkeit zu Frizzled Proteinen, den Rezeptoren für die Wnt Faktoren (s.o.). In der Tat bindet ROR2 verschiedene Wnt Moleküle und ist an deren Signaltransduktion beteiligt (96-98). Die Bindung zwischen ROR2 und Wnt

Molekülen wird durch die Anwesenheit eines extrazellulären Glycoproteins, Cthrc1, verstärkt (99). ROR2 kann auf verschiedenste Weise auf Wnt Signalwege einwirken. Wnt5a kann via ROR2 den kanonischen Signalweg hemmen (100), kann aber auch via Ror2 nicht-kanonische Signalwege aktivieren. So führt Bindung von Wnt5a an ROR2 zur Aktivierung der cJun-N-terminalen Kinase (JNK) (97), in *Xenopus* aktiviert Wnt5a via Ror2 einen Pathway, der JNK und den Transkriptionsfaktor ATF2 einschließt und der die Expression von Paraxialem Protocadherin (PAPC) auslöst, das wiederum die convergent extension (CE) Bewegungen des Mesoderms während der Gastrulation steuert (101). In Säugerzellen aktiviert Wnt5a via ROR2 die Filopodienbildung und die Zellmigration über einen JNK-abhängigen Mechanismus (102, 103). ROR2 bindet jedoch auch kanonische Wnts und ist in der Lage, je nach Zellkontext, den kanonischen Signalweg zu aktivieren (96, 98).

Abgesehen vom Wnt5a/JNK/ATF2 Signalweg in *Xenopus* ist bisher wenig über die intrazelluläre Signalweiterleitung von ROR2 bekannt und nur wenige intrazelluläre Interaktionspartner wurden bisher identifiziert. Dazu gehören Filamin A, Dlxin-1, die Serin/Threonin Kinasen Src, CK1 $\epsilon$  und GSK3 $\beta$  und das Gerüstprotein 14-3-3 $\beta$  (102, 104-107). Des Weiteren interagiert ROR2 mit dem BmpR1b und ist in der Lage das BMP/SMAD Signaling zu inhibieren (108).

## 2. Originalarbeiten

### 2.1 Mutationen in *WNT7A* verursachen eine Reihe von Extremitäten-Fehlbildungen, unter anderem das Fuhrmann Syndrom und das Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzler Phocomelia Syndrom.

C.G. Woods\*, S. Stricker\*, P. Seemann, P. Stern, J. Cox, E. Sherridan, E. Roberts, K. Springell, S. Scott, G. Karbani, S. M. Sharif, C. Toomes, J. Bond, D. Kumar, L. Al-Gazali und S. Mundlos. (\*geteilte Erstautorenschaft)

**American Journal of Human Genetics 2006, 79(2):402-408.**

Der Wnt Signalweg ist von großer Bedeutung in der Embryonalentwicklung, außerdem ist er maßgeblich an der Ausbildung der Extremität beteiligt. Überraschenderweise konnten jedoch bisher erst Mutationen in einem der 19 humanen *WNT* Gene in einer Extremitätenfehlbildung identifiziert werden (109). In dieser Arbeit untersuchten wir in Kollaboration mit C. Geoff Woods (Cambridge) zwei Familien mit schweren Missbildungen der Extremitäten. Geoff Woods steuerte die Familien bei und führte die Mutationsanalyse durch, wir unternahmen die funktionelle Analyse der Mutationen. In Familie 1 handelte es sich um ein rezessives Syndrom mit verkürzten Gliedmaßen und Dysplasie von Fibulae und Ulnae, was als Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzler Phocomelia Syndrom (MIM 276820) klassifiziert wurde. In zwei Fällen traten dabei schwere Missbildungen der Hand auf, in einem Fall waren die Beine praktisch vollständig reduziert. In der zweiten Familie trat ein weniger schwerer Phänotyp auf, gekennzeichnet durch fehlende Ulnae, Nagelhypoplasie, gebogenen Femur, fehlende Kniescheiben bzw. teilweise fusionierte Kniegelenke und fehlende Zehen. Es wurde das Fuhrmann Syndrom (MIM 228930) diagnostiziert.

Es konnten in beiden Familien Mutationen in *WNT7A* identifiziert werden, in Familie 1 die Mutation c.1179C>T; p.R292C, in Familie 2 die Mutation c.630G>A; p.A109T. Da beide betroffene Aminosäuren in *WNT7A* in zahlreichen Spezies von *Drosophila melanogaster* bis zum Menschen konserviert sind, vermuteten wir, daß der Austausch an dieser Stelle zu einem (teilweisen) Funktionsverlust des Proteins führt.

Unser Ansatz war, sowohl das wt WNT7A als auch die beiden pathogenen Mutationen in der Extremität des Hühnerembryos mittels eines retroviralen Systems (RCAS System) zur Expression zu bringen. Das zu exprimierende Gen wird dazu in einen retroviralen Vektor kloniert, dieser wird in Hühnerfibroblasten transfiziert, welche dann infektiöse Virionen bilden. Diese werden ins rechte Seitenplattenmesoderm eines 1,5 Tage alten Hühnerembryos injiziert. Dadurch wird die rechte Extremität in hoher Dichte mit dem Virus infiziert, der dort das Zielgen zur Expression bringt, während die linke Extremität als Kontrolle dient. Wir fanden, daß die Überexpression von wt WNT7A zu schweren Knorpeldefekten führte, teilweise zum kompletten Fehlen einzelner Skelettelemente, teilweise zu einer starken Reduktion. Die Überexpression von WNT7A<sup>A109T</sup> zeigte einen deutlich schwächer ausgeprägten Phänotyp. Es wurden ebenfalls vereinzelt fehlende Skelettelemente beobachtet, in den meisten Fällen zeigte sich jedoch nur eine Hypoplasie der Carpalia. Die Mutation WNT7A<sup>R292C</sup> schließlich zeigte keinerlei Effekt, Dies wurde durch Überexpression der WNT7A Varianten in embryonalen Hühner-Primärzellkulturen bestätigt (sog. Micromass Kulturen), wo WNT7a die Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Knorpelzellen hemmte, WNT7A<sup>A109T</sup> und WNT7A<sup>R292C</sup> dies jedoch nur geschwächt bzw. gar nicht vermochten.

Zusammengefaßt legt dies nahe, daß das mildere Fuhrmann Syndrom durch eine Mutation (WNT7A<sup>A109T</sup>) hervorgerufen wird, die zwar einen partiellen Funktionsverlust aufweist, jedoch noch eine Restaktivität besitzt. Die Mutation WNT7A<sup>R292C</sup>, verantwortlich für das phänotypisch schwerere Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel Phocomelia Syndrom, scheint dagegen ein kompletter Funktionsverlust zu sein. Diese Studie zeigt auch die herausgehobene Funktion von WNT7A in der Entwicklung der menschlichen Extremität auf: während die Inaktivierung von Wnt7a in der Maus nur einen milden Phänotyp aufweist, der durch dorso-ventrale Fehlbildungen am Autopoden gekennzeichnet ist (110), führt der Funktionsverlust beim Menschen zu einer dramatischen Reduktion der Extremität, vermutlich ausgelöst durch einen kompletten Zusammenbruch der eingangs erwähnten Rückkopplungsmechanismen zwischen WNT7A und SHH bzw. SHH und FGF4/8. Es handelt sich also hier um einen klassischen Musterbildungsdefekt.

**Mutations in WNT7A Cause a Range of Limb Malformations, Including Fuhrmann Syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild /Schinzel Phocomelia Syndrome**

**C.G. Woods<sup>\*</sup>, S. Stricker<sup>\*</sup>, P. Seemann, P. Stern, J. Cox, E. Sherridan, E. Roberts, K. Springell, S. Scott, G. Karbani, S. M. Sharif, C. Toomes, J. Bond, D. Kumar, L. Al-Gazali and S. Mundlos. (\*shared first authorship)**

**American Journal of Human Genetics 2006, 79(2):402-408.**

<http://dx.doi.org/10.1086/506332>

## **2.2 Eine umfassende Expressionsanalyse aller Wnt Gene und ihrer wichtigsten sekretierten Antagonisten während der Extremitätenentwicklung und der Knorpeldifferenzierung der Maus.**

**Florian Witte, Janine Dokas, Franziska Neuendorf, Stefan Mundlos und Sigmar Stricker**

**Gene Expression Patterns 2009, 9:215-223**

Durch den Befund, daß durch Mutationen in einem Wnt Liganden spezifische Fehlbildungen des Extremitätenskeletts entstehen können, wurde klar, daß Mitglieder der Wnt Familie bzw. deren Interaktionspartner potentielle Kandidaten für embryonale Skelettale Syndrome sein können. Daher haben wir beschlossen, die Expression aller Wnt Gene und ihrer wichtigsten Interaktionspartner, den sekretierten Antagonisten der Secreted frizzled-like protein (Sfrp), Dickkopf (Dkk) und Wnt inducible signaling pathway (Wisp) Klassen während der frühen Extremitätenentwicklung sowie während der Chondrogenese und des Knorpelwachstums im Mausembryo zu untersuchen.

Wir konnten dabei für Gene, deren Expression bereits in einzelnen Stadien bzw. in anderen Organismen beschrieben war, das Expressionsmuster vervollständigen. Für zahlreiche Wnt Gene (Wnt2, Wnt2b, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b, Wnt9a, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16) sowie Antagonisten Gene (Sfrp1, Sfrp3, Sfrp5, Dkk2, Dkk3) konnten wir neue Expressionsdomänen aufzeigen. Für den putativen WNT Antagonisten Wif1, der zu keiner der oben genannten Familien gehört, konnten wir erstmals ein vollständiges Expressionsmuster zeigen.

Zusammengefaßt stellen wir in dieser Arbeit das erste umfassende Expressionsmuster extrazellulärer Wnt Signalwegs-Faktoren in der Extremität vor, was eine wertvolle Ressource darstellt, um potentielle Kandidatengene aus diesen Familien für Fehlbildungssyndrome der Extremität zu validieren.

**Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation.**

**Florian Witte, Janine Dokas, Franziska Neuendorf, Stefan Mundlos and Sigmar Stricker**

**Gene Expression Patterns 2009, 9:215-223**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gep.2008.12.009>

### **2.3 Das LIM-Domänen Protein *Wtip* interagiert mit *Ror2* und inhibiert den kanonischen Wnt Signalweg.**

**Nicole Verhey van Wijk, Florian Witte, Ann-Carolin Feike, Alexandra Schambony, Walter Birchmeier, Stefan Mundlos und Sigmar Stricker.**

**Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009, 390:211-216**

Die Brachydaktylie Typ B1 (BDB1, MIM 113000) wird durch Mutationen in *ROR2* hervorgerufen (72). *ROR2* kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, für die bislang kein intrazellulärer Signalmechanismus bekannt war. Um einen Ansatz zur Aufklärung potentieller intrazellulärer Signalwege von *ROR2* und des Pathomechanismus der BDB1 zu erhalten, führten wir in Kollaboration mit dem Labor von Walter Birchmeier (MDC, Berlin) einen Yeast-two-hybrid screen mit dem intrazellulären Bereich von Maus-Ror2 durch. In diesem Screen konnte das LIM Domänen Protein *Wtip* als Interaktionspartner für *Ror2* identifiziert werden. *Wtip* interagiert mit *Ror2* via dessen C-terminaler Region, die in allen BDB1 Mutationen deletiert ist. Auf zellulärer Ebene ist *Ror2* in der Lage, *Wtip* an die Zellmembran zu rekrutieren, eine BDB1-Variante von *Ror2* kann dies nicht. Als weiteren Hinweis auf eine funktionelle Kooperation beider Proteine in vivo zeigen wir in dieser Publikation ein vergleichendes Expressionsmuster der *Ror2* und *Wtip* mRNA durch in-situ Hybridisierung auf Maus Embryonen und embryonale Schnitte und demonstrieren eine weitreichende Ko-Expression. Des weiteren zeigen wir eine Ko-Lokalisation der *Ror2* und *Wtip* Proteine in Knorpel, Lunge, Niere und Darm durch Immunfärbungen auf embryonale Schnitte. Da sowohl *Ror2* als auch das mit *Wtip* nahe verwandte Protein *Ajuba* kürzlich in die Regulation des kanonischen Wnt Signalwegs involviert wurden (96, 98, 100, 111), testeten wir schließlich, ob auch *Wtip* in der Lage ist das Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling zu modulieren. Durch den sog. TOPFLASH Reporter Assay konnten wir zeigen, daß *Wtip* den kanonischen Wnt Signalweg in vitro inhibiert. In Kooperation mit Alexandra Schambony (Erlangen) konnten wir mit Hilfe des *Xenopus*-Secondary-Axis-Assays zeigen, daß diese funktionelle Beziehung auch in vivo existiert.



**The LIM-Domain protein Wtip interacts with the receptor tyrosine kinase Ror2 and inhibits canonical Wnt signalling.**

**Nicole Verhey van Wijk, Florian Witte, Ann-Carolin Feike, Alexandra Schambony, Walter Birchmeier, Stefan Mundlos and Sigmar Stricker.**

**Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009, 390:211-216**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.086>

## **2.4 Graduelle Proteinstabilität und Membran-Lokalisierung von ROR2 sind verantwortlich für die Ausbildung von Brachydaktylie Typ B oder Robinow Syndrom Phänotypen.**

**Wibke Schwarzer, Florian Witte, Anna Rajab, Stefan Mundlos und Sigmar Stricker.**

**Human Molecular Genetics 2009, 18(21):4013-4021**

Bestimmte Mutationen im Gen für die Rezeptor-Tyrosinkinase ROR2 verursachen die dominante Brachydaktylie Typ B1 (BDB1, MIM 113000), eine andere Gruppe von Mutationen verursacht jedoch das rezessive Robinow Syndrom (RRS, MIM 268310) (71, 72, 92, 93). Es wurde bereits früh vermutet, daß BDB1 Mutationen zu einem Funktionsgewinn, RRS Mutationen aber zu einem Funktionsverlust führen (94). Dies wird unterstützt durch die Position der Mutationen im Protein: während RRS Mutationen das Protein an diversen Stellen trunkieren (auch extrazellulär), oder Missense-Mutationen in konservierten Bereichen sein können, befinden sich alle bis dato bekannten BDB1 Mutationen in zwei „hot spots“: sie trunkieren das ROR2 Protein entweder direkt vor der Tyrosinkinase („proximale Trunkationen“) oder direkt danach („distale Trunkationen“). Dabei rufen die distalen Trunkationen einen schwereren Phänotyp hervor als die proximalen (72), der Grund dafür war unklar. Es wurde von anderen gezeigt, daß verschiedene RRS-assoziierte Missense-Mutationen sowie extrazelluläre Trunkationen zu einem Funktionsverlust des Proteins durch Retention im endoplasmatischen Reticulum (ER) führen (112). Es blieb jedoch vollständig unbekannt, wie die intrazellulären Trunkationen, deren Position in der Aminosäuresequenz in einem Fall nur 29 Positionen entfernt voneinander sind, einerseits zum RRS, andererseits zur BDB1 führen können. Wir stellen in dieser Publikation einen neuen Fall vor, der eine schwere rezessive Brachydaktylie sowie rezessiv vererbte Phänotypen des Robinow Syndroms aufweist. Die Mutation in diesem Patienten (c.1324C>T; p.R441X) befand sich interessanterweise an derselben Position wie eine früher publizierte BDB1 Mutation (72) (c.1321-25\_del5/p.R441fsX15), mit dem Unterschied, daß die BDB1 Mutation durch einen Frame-shift eine Verlängerung der Polypeptidkette um 15 Aminosäuren nach der Position 441 hervorrief, während die neue Mutation das ROR2 Protein an der Position 441 beendet.

Um diese offensichtliche Diskrepanz zu untersuchen, haben wir die kodierende Sequenz des humanen ROR2 aus HEK293 Zellen amplifiziert und auf dieser

Basis die humanen Mutationen exakt nachgebaut. Mit diesen Konstrukten wurden stabil transfizierte Zelllinien hergestellt, welche die mutanten ROR2 Proteine ca. 20-fach überexprimierten. Immunfärbungen zeigten, daß sowohl das WT Ror2 als auch die BDB1 Mutationen an die Zellmembran lokalisierten. Die klassischen RRS Mutationen lokalisierten intrazellulär, prädominant im ER, womit dies zum ersten Mal für intrazelluläre Trunkationen gezeigt wurde. Die neue Mutation p.R441X zeigte erstaunlicherweise eine intermediäre Verteilung. Es war sowohl ein klares Membransignal zu erkennen als auch eine deutliche intrazelluläre Färbung. Wir quantifizierten zunächst die steady-state Proteinmenge für alle ROR2 Varianten und bestimmten im Anschluß die relative Membranlokalisierung per „Surface biotinylation Assay“. Diese beiden Größen wurden miteinander verrechnet, so daß sich im Endeffekt für jedes ROR2 Protein die exakte, miteinander vergleichbare, an der Membran lokalisierte Proteinmenge ergab.

Dadurch konnten wir erstmals zeigen, daß es eine klare Korrelation zwischen der exakten Menge an membranständigem trunkiertem ROR2 Protein und der Ausbildung von BDB1- oder RRS Phänotypen besteht. Wird zuviel Protein intrazellulär festgehalten und abgebaut, kommt es zur Ausbildung des RRS, jedoch zu keiner Brachydaktylie, da die Menge an trunkiertem Protein an der Membran dafür nicht ausreicht. Ist jedoch eine bestimmte Menge trunkiertes Protein an der Membran vorhanden, entwickelt sich eine dominante BDB1. Es zeigen sich aber keine Symptome des RRS, was darauf hindeutet, daß das trunkierte ROR2 noch eine Rest-Funktion besitzt. Dazwischen befindet sich ein Bereich, in dem überlappende Phänotypen auftauchen können. Dieses graduelle Modell wurde auch in der Maus durch Verkreuzen zweier Mausmodelle für RRS und BDB1 bestätigt.

**A gradient of ROR2 protein stability and membrane localization confers brachydactyly type B or Robinow syndrome phenotypes.**

**Wibke Schwarzer, Florian Witte, Anna Rajab, Stefan Mundlos and Sigmar Stricker.**

**Human Molecular Genetics 2009, 18(21):4013-4021**

<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp345>

## **2.5 Klonierung und Expressionsmuster von *Ror2* im Huhn sowie funktionelle Charakterisierung von trunkierenden Mutationen in der Brachydaktylie Typ B und im Robinow Syndrom.**

**Sigmar Stricker, Nicole Verhey van Wijk, Florian Witte, Norbert Brieske, Kathrin Seidel und Stefan Mundlos.**

**Developmental Dynamics 2006, 235(12):3456-3465**

Unser Ziel war es, die Konsequenz verschiedener Mutationen, die zur BDB1 oder zum RRS führen, in einem Tiermodell funktionell zu untersuchen. Der Hühnerembryo ist ein klassisches Modellsystem in der Extremitätenentwicklung, zahlreiche der bahnbrechenden Erkenntnisse über die Musterbildung und das Knorpelwachstum wurden in diesem System gewonnen. Unser Ansatz war, trunkierte *Ror2* Proteine (mit BDB1 oder RRS Mutationen) in der Extremität des Hühnerembryos mittels des RCAS Systems (siehe Abschnitt 2.1) zur Expression zu bringen.

Dazu wurde zunächst das *Ror2* Gen aus dem Huhn durch eine Kombination von RACE-PCR und genomic-walking-PCR kloniert. Um die Tauglichkeit des Hühnerembryos für die geplanten funktionellen Analysen zu validieren, wurde ein komplettes Expressionsmuster für *Ror2* auf mRNA und auch auf Proteinebene erstellt. Dabei zeigte sich, daß *Ror2* im Huhn weitgehend überlappend mit seinem orthologen Gen der Maus (113) exprimiert ist.

Zur funktionellen Analyse wurden Konstrukte zur Expression gebracht, die Kopien von drei humanen Mutationen darstellen: p. R441fsX15, p.Q467fsX57 (BDB1) und p.Q502X (RRS). Die Überexpression aller drei Proteine rief eine starke Verkürzung der langen Knochen hervor, es konnte jedoch kein Brachydaktylie Phänotyp erzeugt werden. Die Verkürzung der Skelettelemente wurde verursacht durch eine Differenzierungsstörung des Knorpels. Eine Störung der Proliferationsrate im Knorpel wurde ausgeschlossen, was sich mit Ergebnissen aus *Ror2* defizienten Mäusen deckte (114). Diese Ergebnisse legten nahe, daß die Überexpression von trunkierten *ROR2* proteinen im Huhn mit der Funktion des endogenen *Ror2* interferiert (dominant-negativer Effekt).

**Cloning and expression pattern of chicken Ror2 and functional characterization of truncating mutations in Brachydactyly type B and Robinow syndrome.**

**Sigmar Stricker, Nicole Verhey van Wijk, Florian Witte, Norbert Brieske, Kathrin Seidel and Stefan Mundlos.**

**Developmental Dynamics 2006, 235(12):3456-3465**

<http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.20993>

## **2.6 Die Mutation ROR2<sup>W749X</sup>, assoziiert mit humaner BDB1, ist eine rezessive Mutation in der Maus, verursacht Brachydaktylie, ist beteiligt an der Gelenksentwicklung und ist ein weiteres Modell für das rezessive Robinow Syndrom.**

**Regina Raz, Sigmar Stricker, Elizabetta Gazzo, Julie L. Clor, Florian Witte, Harakiran Nistala, Stefanie Zabski, Reneta C. Pereira, Lisa Stadmeier, Xiangmin Wang, Lori Gowen, Mark W. Sleeman, George D. Yancopoulos, Ernesto Canalis, Stefan Mundlos, David M. Valenzuela und Aris N. Economides**

**Development 2008, 253:1713-1723**

Da die Überexpression trunkierter Ror2 Proteine im Hühnerembryo keinen Brachydaktylie Phänotyp erzeugte, haben wir in Zusammenarbeit mit Aris N. Economides (Regeneron Inc. Tarrytown, USA) eine Maus mit einer gerichteten Insertionsmutation (knock-in) einer humanen BDB1 Mutation (p.W749X) in den Maus Ror2-Locus hergestellt. In dieser Studie wurde diese Maus initial charakterisiert, wobei von uns die Untersuchung des Brachydaktylie Phänotyps vorgenommen wurde. Die Ror2<sup>W749X</sup> Maus weist einen rezessiven BDB1 Phänotyp auf, bei dem die mittleren Phalangen (p2) aller Finger und Zehen fehlen. Interessanterweise zeigt eine Ror2<sup>-/-</sup> Maus nicht diesen Phänotyp. Diese Maus besitzt alle drei Fingerglieder, welche in Folge allerdings durch eine gestörte Differenzierung der Knorpelzellen in der Wachstumsfuge zu klein bleiben. Dies zeigt, daß das ROR2<sup>W749X</sup> Protein als Funktionsgewinn-Allel fungiert. Wir konnten zeigen, daß der Brachydaktylie Phänotyp nicht auf eine Störung der frühen Musterbildung zurückgeht, da sowohl die Gene des 5' Hoxd clusters (*Hoxd11*, *Hoxd12*, *Hoxd13*) als auch das Schlüsselmolekül *Shh* normal exprimiert werden. Ein weiterer Grund für den Verlust von Knorpel-elementen in der proximo-distalen Richtung ist häufig ein Defekt der AER, was im darunterliegenden Gewebe Apoptose auslöst und so zu Trunkationen führt. Wir fanden, daß das Leitmolekül der AER, *Fgf8*, in der ROR2<sup>W749X</sup> Mäusen normal exprimiert wird, was einen Defekt der AER unwahrscheinlich macht. Wir konnten schließlich zeigen, daß in der Ror2<sup>W749X</sup> Maus die Spezifikation des distalen Gelenks gestört ist, was zum Phänotyp der Brachydaktylie führen könnte.

**The mutation *ROR2*<sup>W749X</sup>, linked to human BDB, is a recessive mutation in the mouse, causing brachydactyly, mediating patterning of joints and modeling recessive Robinow syndrome**

**Regina Raz, Sigmar Stricker, Elizabetta Gazzo, Julie L. Clor, Florian Witte, Harakiran Nistala, Stefanie Zabski, Reneta C. Pereira, Lisa Stadmeier, Xiangmin Wang, Lori Gowen, Mark W. Sleeman, George D. Yancopoulos, Ernesto Canalis, Stefan Mundlos, David M. Valenzuela and Aris N. Economides**

**Development 2008, 253:1713-1723**

<http://dx.doi.org/10.1242/dev.015149>



## 3. Diskussion

### 3.1 Die Besondere Bedeutung von WNT7A in der Extremitäten-Entwicklung des Menschen

Wir konnten in unserer Studie zwei verschiedene Mutationen in WNT7A identifizieren: p.A109T und p.R292C. Beide Mutation führten zu schweren Missbildungen der Extremitäten. Im ersten Fall war die Diagnose Fuhrmann Syndrom (MIM #228930), im zweiten Fall Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia Syndrom (MIM #276820). Das Fuhrmann Syndrom ist unter anderem charakterisiert durch Aplasie oder Hypoplasie der Fibula, gebogenen Femur, sowie Poly-, Syn- oder Oligodaktylie. In den von uns beschriebenen Fällen trat zusätzlich noch eine Hypoplasie des fünften Fingers sowie eine Nagelhypoplasie auf. Das Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia Syndrom zeigt einen deutlich schwereren Phänotyp. Hier ist ein komplettes Fehlen von Ulna und Fibula charakteristisch sowie variable schwere distale Hypoplasie. In den von uns beschriebenen Patienten traten in den Armen fehlende Ulnae, Ectrodaktylie mit Nageldysplasie oder auch eine Reduktion der Hand aus einen verbleibenden Finger auf. In den Beinen zeigte sich eine schwere, amputationsartige Reduktion.

Wir haben beide Mutationen durch Misexpression in Hühner-Primärzellen („Micromass Kulturen“) sowie in Hühner-Extremitäten *in vivo* funktionell charakterisiert. WNT7A ist im Micromass System wie auch *in vivo* in der Lage, die Knorpelkondensation und die Chondrozyten-Differenzierung zu supprimieren (115). Expression von WNT7A<sup>A109T</sup> führte sowohl im Micromass System als auch *in vivo* zu einer sichtbaren Suppression von Chondrogenese und Differenzierung, die jedoch deutlich schwächer war als beim wt WNT7A. WNT7A<sup>R292C</sup> zeigte *in vitro* noch eine leichte Aktivität, während es *in vivo* keinen Effekt mehr zeigte. Dies legte nahe, daß beide Mutationen zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, jedoch ist das Protein WNT7A<sup>A109T</sup> noch teilweise funktionsfähig, das Protein WNT7A<sup>R292C</sup> ist jedoch praktisch funktionslos. Dies korreliert mit den klinische Phänotypen, da die Mutation p.R292C einen schwereren Phänotyp hervorruft als die Mutation p.A109T.

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde durch Studien im Hühnerembryo festgestellt, daß Wnt7a maßgeblich an der Ausbildung der dorso-ventralen Achse der Extremität beteiligt ist (8). Wnt7a induziert im dorsalen Ektoderm die Expression des Transkriptionsfaktors Lmx1 (23, 116). Interessanterweise führen

beim Menschen Mutationen in *LMX1* zum Nail-Patella Syndrom (MIM #161200), das durch eine Nageldysplasie gekennzeichnet ist, wie sie auch in unseren Patienten auftrat. Nägel sind dorsale Strukturen, sie stehen unter Kontrolle von Signalen aus dem dorsalen Ektoderm. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, daß auch beim Menschen die Nägel durch eine Kaskade *WNT7A/LMX1* induziert werden.

In Mäusen führt die Inaktivierung von *Wnt7a* zu einem milden Phänotyp. Die Tiere zeigen ventralisierte Extremitäten mit rudimentären Nägeln sowie ein Fehlen der Ulna und des fünften Fingers (110), was dem Phänotyp der humanen Mutation p.A109T entspricht. Der Phänotyp der Mutation p.R292C, die ja ebenfalls einen Funktionsverlust darstellt, ist wesentlich schwerer. *Wnt7a* ist nicht nur für die DV-Polarität der Extremität zuständig, sondern ist auch mit den anderen Signalzentren verknüpft. Im Hühnerembryo wird das dorsale Ektoderm auch für die Induktion und Aufrechterhaltung der ZPA (und damit der Expression von *Shh*) benötigt. Yang und Niswander (28) konnten zeigen, dass *Wnt7a* für diese Funktion verantwortlich ist. In der *Wnt7a*<sup>-/-</sup> Maus kommt es, wie erwähnt, zum Fehlen des fünften (posterioren) Fingers. Dies wurde auch in den Patienten mit der Mutation p.A109T beobachtet. Dieser Phänotyp kann als ein milder Posteriorisierungsdefekt und somit als ein Defekt der ZPA gedeutet werden. Bei der humanen Mutation p.R292C jedoch überlappt der humane Phänotyp eher mit dem von Mäusen mit einer kompletten Inaktivierung von *Shh* (13). Diese zeigen Trunkationen der hinteren Extremitäten, in der Vorderextremität sind Radius und Ulna durch ein einzelnes Skelettelement ersetzt, die Hand ist auf einen einzelnen Finger reduziert. Der selbe Phänotyp wird auch in Mäusen beobachtet, bei denen die *Shh* Expression in der Extremität durch eine Inversion dereguliert ist (17). Des weiteren tritt beim Menschen ein ähnlicher Phänotyp bei der Acheiopodie (MIM #200500) auf. Diese wird verursacht durch Deletionen in *LMBR1*, einem Nachbarn von *SHH* (117). Das Intron 5 von *LMBR1* besitzt ein Kontrollelement für *SHH*, die „ZPA activity-regulating sequence“ (ZRS) Punktmutationen in der ZRS sowie deren Duplikation führen zu präaxialer Polydaktylie durch anteriore Misexpression von *SHH* (51, 52).

Zusammengenommen deutet dies darauf hin, daß der Defekt in den von uns beschriebenen Mutationen in einem Zusammenbruch der ZPA und darauffolgend einem Zusammenbruch der AER (und damit der Expression von *Fgf* Signalmolekülen) liegt. Dies führt vermutlich zu verminderter Proliferation und massiver Apoptose im Mesenchym der Extremität (118) und damit zu amputationsartigen Phänotypen. Es scheint, daß *Wnt7a* in der Maus zwar an der Induktion und Aufrechterhaltung der ZPA beteiligt ist, eine Defizienz jedoch von anderen Faktoren, vermutlich anderen *Wnt* Signalmolekülen, gerettet werden

kann. Im Menschen scheint es eine solche Redundanz nicht zu geben, hier ist WNT7A absolut notwendig.

### 3.2 Komponenten des Wnt-Signalweges in der Extremitäten-Entwicklung

Der Wnt Signalweg hat eine herausgehobene Bedeutung in der Extremitätenentwicklung. Zahlreiche Mausmodelle mit Mutationen in Wnt Faktoren oder Komponenten des Signalweges zeigen Extremitätenfehlbildungen (119). Im Menschen verursachen Mutationen in WNT7A und WNT3 schwere Fehlbildungen (109, 120). Bisher waren die Informationen zur Expression von Wnts als auch ihrer sekretierten Antagonisten lückenhaft, weil meistens auf ein bestimmtes Stadium beschränkt. Unsere Studie stellte daher erstmals eine umfassende Expressionsanalyse aller Wnts und ihrer sekretierten Antagonisten dar; die Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 8 aufgeführt

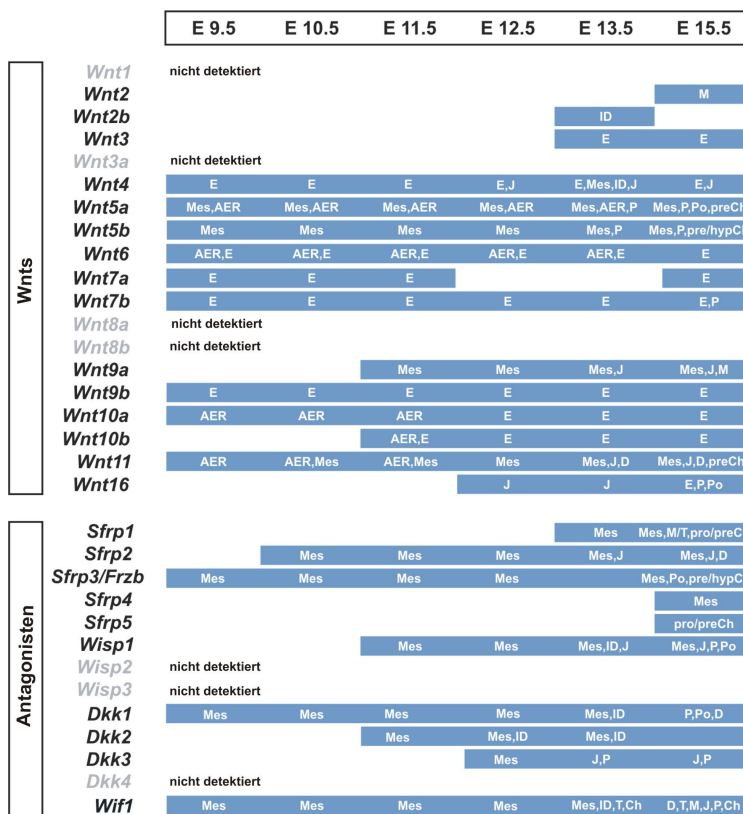


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expression aller Wnt Gene und der sekretierten Antagonisten von E9.5 bis E15.5. Blaue Balken bedeuten positives Signal in der in-situ Hybridisierung.

Abkürzungen: AER: apical ectodermal ridge, Ch: Chondrozyten, proCh: proliferierende Chondrozyten, hypCh: hypertrophe Chondrozyten, D: Dermis, E: Ektoderm, ID: interdigitales Mesenchym, J: Gelenk (joint), M: Muskel, Mes: Mesenchym, P: Perichondrium, Po: Periosteum, T: Sehnen (tendon).

Unsere Studie ergab, daß während der frühen Extremitäten-Entwicklung die Wnt Gene vor allem in der Epidermis exprimiert sind, mit Ausnahme der nicht-kanonischen Wnts Wnt5a und Wnt5b. Untersuchungen an späteren

Entwicklungsstadien haben gezeigt, daß diese ektodermale Expression sich in der mehrschichtigen Epidermis auf das Stratum Germinativum beschränkt, die Schicht aus welcher sich die Haut permanent erneuert. In dieser Zellschicht entstehen beim Menschen Basalzellkarzinome. Interessanterweise wurde gezeigt, daß dabei eine Deregulation des Wnt Signalweges eine Rolle spielen kann (121, 122).

Die Wnt Antagonisten waren demgegenüber bevorzugt in der Dermis exprimiert, wo sie vermutlich die Reichweite der ektodermalen Wnts im Mesenchym kontrollieren. Man geht davon aus, daß die ektodermalen kanonischen Wnts die Kondensation von Knorpel inhibieren, weshalb der Knorpel im Zentrum der Extremität entsteht (38, 39). Die Expression der Wnt Antagonisten im äußeren Mesenchym der Extremität könnte diesen Prozess mit regulieren.

Während der Knorpel-Kondensationsphase fanden wir mit Wnt5a, Wnt5b, Sfrp2, Sfrp3, Wisp1, Dkk1, Dkk2 und Wif1 überraschend wenige Wnts, jedoch zahlreiche Antagonisten exprimiert, was darauf hindeutet, daß in dieser Phase der Wnt Signalweg einer genauen Kontrolle unterliegt. Da zahlreiche Wnt-Antagonisten Zielgene des Wnt Signalweges selbst sind, scheint dies eine negative Feedback Kontrolle zu sein.

In der Wachstumsfuge des Knorpels konnten wir Expression von Wnt5a, Wnt5b und Wnt11 nachweisen, bei den Antagonisten fanden wir Sfrp1, Sfrp3 und Sfrp5 exprimiert. Während der Skelettentwicklung wurde die Aktivität des kanonischen Wnt Signalweges vor allem mit der Entstehung der synovialen Gelenke in Verbindung gebracht (40, 41). Wir konnten mit Wnt11, Wif1, Wisp1 und Dkk3 vier neue Kandidaten für diesen Prozeß hinzufügen.

### **3.3 Genotyp-Phänotyp Korrelationen bei Mutationen in ROR2, ursächlich für Brachydaktylie Typ B1 und rezessives Robinow Syndrom**

Mutationen in ROR2 verursachen zwei Syndrome, die zwar eine gewisse phänotypische Überlappung zeigen, jedoch generell distinkte Eigenschaften aufweisen. Die Brachydaktylie Typ B1 (BDB) zeigt Hypoplasie und Aplasie der distalen Phalangen, Nageldysplasie und gelegentlich proximalen Symphalangismus. Das rezessive Robinow Syndrom (RRS) zeigt ebenfalls eine leicht Brachydaktylie, jedoch nur mit verkürzten, nicht mit fehlenden Phalangen.

Ansonsten kennzeichnet das RRS eine Vielzahl an Phänotypen, die in der Einleitung aufgeführt sind.

Es wurde bereits früh vermutet, daß die rezessiven RRS Mutationen zu einem Funktionsverlust, die dominanten BDB1 Mutationen zu einem Funktionsgewinn des Proteins führen (94). Für einige Missense Mutationen sowie extrazellulär trunkierende Mutationen konnte gezeigt werden, daß die betroffenen Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und vermutlich über das Proteasom abgebaut werden (112). Es blieb jedoch rätselhaft, warum intrazelluläre Trunkationen, die zum Teil nur 29 Aminosäuren voneinander entfernt liegen, zu unterschiedlichen Syndromen führen.

Eine klare Korrelation zwischen Position der Mutation und der Schwere des Phänotyps wurde bereits von Schwabe et al. (72) für die BDB1 beschrieben: die „distalen“ Trunkationen (C-Terminal der Tyrosinkinase) wiesen alle einen schwereren Phänotyp auf als die „proximalen“ Trunkationen (zwischen Transmembrandomäne und Tyrosinkinase). Zudem wurde bereits in dieser Publikation ein Patient beschrieben, der homozygot für eine proximale BDB1 Trunkation war (p.R441fsX15). Dieser Patient hatte eine sehr schwere Brachydaktylie mit z. T. vollständig reduzierten Fingern, aber auch einige Symptome des Robinow Syndroms wie z. B. Hemivertebrae und einen Septumsdefekt im Herz. Der von uns neu beschriebene Patient (Mutation p.R441X) weist ebenfalls eine schwere Brachydaktylie auf und zeigt RS-Symptome. Dennoch verursacht die Mutation pR441X im Gegensatz zur Mutation p.R441fsX15 keine dominante BDB1.

Die phänotypische Überlappungen zwischen den beiden Syndromen und vor allem das Auftreten gemischter Phänotypen in einzelnen Patienten deuten an, daß der Brachydaktylie Phänotyp zu einem Teil durch Funktionsverlust, zum anderen Teil jedoch durch eine aberrante Funktion des trunkierten Proteins hervorgerufen werden könnte. Die Schwere des RRS Phänotyps auf der anderen Seite könnte durch den Grad an Funktionsverlust bestimmt werden. Dies impliziert jedoch auch, daß verschieden schwere Brachydaktylie Phänotypen durch graduelle Unterschiede in Funktionsgewinn/Verlust hervorgerufen werden könnten. Durch die Benutzung von stabil transfizierten Zelllinien und einer exakten Proteinquantifizierung konnten wir beide Vermutungen bestätigen. Wir konnten zeigen, daß korrelierend mit der Menge an trunkiertem ROR2 Protein an der Zellmembran die Schwere des BDB1 Phänotyps zu-, die Schwere des RS Phänotyps jedoch abnimmt. Dies ist schematisch in Abbildung 9 gezeigt.

Wie kommt es nun zu diesen Verschiebungen der Proteinmengen an der Zellmembran? Membranständige Proteine werden, genau wie sekretierte Proteine, über einen komplexen Prozeß in das raue ER (rER) translatiert, wo ihre korrekte

Faltung stattfindet und über Chaperon Proteine überprüft wird. Danach werden die Proteine im Golgi Apparat modifiziert (z. B. durch Glycosylierung) und schließlich über ein Vesikuläres Transportsystem zur Zellmembran verbracht. Fehler in der Proteinfaltung führen häufig zu einer Retention des Proteins im ER und zur anschließenden Degradation.

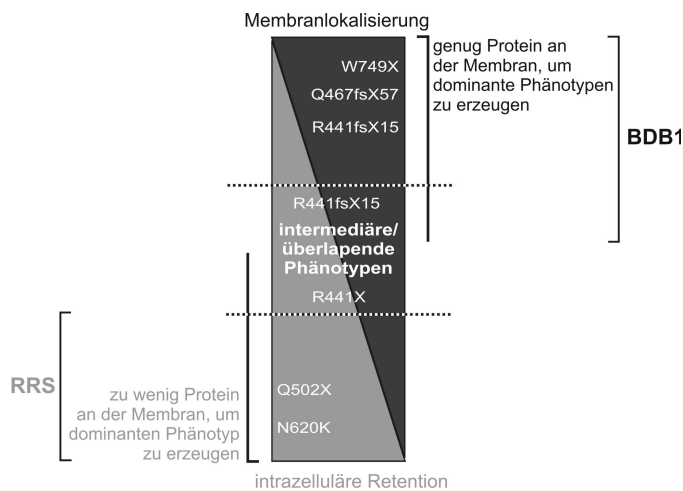


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Menge verschiedener mutanter ROR2 Proteine an der Zell-Oberfläche und ihr Einfluß auf den Phänotyp.

Proteine sind modular aufgebaut, d. h. sie bestehen aus individuellen Domänen, die oft eine komplexe Faltung aufweisen und dazwischen liegenden ungefalteten „Loops“. Generell wirken sich bei Proteinen Mutationen in konservierten und komplex gefalteten Regionen stärker auf die Struktur aus, als Mutationen in Loop-Regionen. Alle BDB1 Mutationen, die bis dato identifiziert wurden liegen in solchen Loop-Regionen, während die intrazellulären RRS Mutationen sich alle in der hochkonservierten Tyrosinkinase Domäne befinden. Dies könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Proteine sein. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum sich die Mutationen p.R441X und p.R441fsX15 phänotypisch unterscheiden, da von beiden die ROR2 Polypeptidkette an identischer Position unterbrochen wird. Wir konnten feststellen, daß die relative Membranfraktion beider Proteine identisch war, die Mutation p.R441X jedoch eine geringere Protein Gesamtmenge aufwies. Dies deutet darauf hin, daß die zusätzlichen Aminosäuren, die durch den Frame-Shift generiert wurden, eine stabilisierende Funktion für das Protein haben und es auf unbekannte Weise vor der Degradation schützen. Interessanterweise sind alle „proximalen“ Mutationen, die BDB1 erzeugen, Frame-Shift Mutationen. Die distalen Trunkationen scheinen in jedem Fall stabiler zu sein, da hier sowohl Frame-Shift als auch Nonsense Mutationen auftreten. Wir fanden, daß die distal trunkierten Proteine stärker an der Membran lokalisieren als die proximal trunkierten, wodurch wir auch die oben beschriebene Genotyp-Phänotyp Korrelation in der BDB1 erklären können.

Zusammengefasst bieten wir mit dieser Studie eine exakte biochemisch-quantitative Erklärung für das Auftreten von zwei distinkten Syndromen durch Mutationen im selben Gen / Protein, aber auch für das Auftreten von überlappenden Phänotypen.

### 3.4 Interaktionspartner und intrazelluläre Signalwege von Ror2

Wie in der Einleitung erwähnt, wurde ROR2 mit verschiedenen Wnt Signalwegen als auch mit dem Gdf5/BmpR1b Signalweg in Verbindung gebracht. Der einzige Signalweg, der bis heute im Detail beschrieben werden konnte, wurde in der Gastrulation von *Xenopus laevis* analysiert (101). In keinem Fall ist bisher klar, über welche intrazellulären Interaktionspartner die Signalweiterleitung direkt vermittelt wird.

Durch einen Yeast-two-Hybrid Screen konnten wir das LIM-Domänen Protein Wtip als intrazellulären Interaktionspartner von ROR2 identifizieren. Wir konnten dies biochemisch durch Co-Immunoprecipitation und Zelllokalisationsstudien zeigen. Weiterhin konnten wir zeigen, daß trunkiertes ROR2 (BDB1-Mutation) nicht mit Wtip interagiert. Dies läßt vermuten, daß die fehlende Interaktion zwischen mutantem ROR2 und Wtip einen Teil zur Pathogenese der BDB1 beiträgt.

LIM Domänen vermitteln häufig Protein-Protein Interaktionen, auch im Fall der Interaktion mit ROR2 waren die LIM Domänen essentiell für die Interaktion. ROR2 ist dabei in der Lage, Wtip von Cytoplasma an die Membran zu rekrutieren. LIM Proteine haben die Fähigkeit zu dimerisieren bzw. zu multimerisieren (123). Dies könnte bedeuten, daß Wtip eine Plattform für weitere Protein-Protein Interaktionen an Ror2 an der Membran bereitstellen könnte und somit zur Aktivierung eines Signalweges beitragen könnte. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für das kanonische Wnt Signaling beschrieben. Hier interagieren Axin und Dishevelled mit dem Frizzled/Lrp Rezeptorkomplex. Bei Aktivierung des Signalweges durch Bindung von Wnt Liganden multimerisieren Axin/Dvl und bilden eine sogenannte „Signalosomen“, die das Wnt Signal amplifizieren (124).

Wir fanden, daß Wtip den kanonische Wnt Signalweg hemmt. Kanonische und nicht-kanonische Wnt Signalwege hemmen sich oft gegenseitig, auch ROR2, das ein nicht-kanonischer Wnt Rezeptor ist, hemmt das kanonische Signaling. Die Vermutung liegt also nahe, daß Ror2/Wtip an einer nicht-kanonischen Kaskade beteiligt sind, die unter anderem den kanonischen Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg hemmt.

Wtip wurde erstmals als Interaktionspartner von Wt1 beschrieben (125). Es wurde gezeigt, daß Wtip zwischen Zell-Matrix Anheftungsstellen und dem Zellkern pendelt. Die Autoren vermuteten, daß Wtip in den Podocyten der Niere die Integrität der Membran und der glomerulären Filtrationsbarriere, die von den Podocyten gebildet wird, zu überwachen. Kommt es zu Verletzungen, wandert Wtip in den Zellkern und steuert dort die Transkription bestimmter Zielgene. Auch Ror2 wurde mit Zelladhäsion in Verbindung gebracht und lokalisiert in Filopodien und fokalen Adhäsionen (102). Es wäre also möglich, daß Ror2 / Wtip zur Funktion von Zell-Zell Kontakten bzw. Zell-Matrix Kontakten beitragen.

RRS Patienten zeigen craniofaziale Auffälligkeiten, genau wie Ror2<sup>-/-</sup> Mäuse. Das craniofaziale Skelett wird größtenteils aus Derivaten der Neuralleiste gebildet. Langer und Kollegen (126) konnten kürzlich zeigen, daß in Xenopus zwei LIM Proteine der Ajuba Familie, XWtip und XLimd1, in der Neuralleisten-Entwicklung eine Rolle spielen. Dabei fungieren sie als transkriptionelle Corepressoren zusammen mit Snail Transkriptionsfaktoren und unterdrücken in Neuralleistenzellen die Expression von E-Cadherin. Dadurch wird die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) dieser Zellen induziert und damit die Entwicklung der Neuralleiste gefördert. Durch Morpholino Knockdown von XWtip oder XLimd1 wurde die EMT verhindert und die weitere Entwicklung der Neuralleiste unterbrochen. Es liegt also nahe zu vermuten, daß die Interaktion von ROR2 und Wtip in der Maus und im Menschen an der Pathogenese der craniofazialen Phänotypen beteiligt ist.

### **3.5 Die Pathogenese der BDB1 im Tiermodell**

Wir versuchten zunächst, den Hühnerembryo als Modell für die BDB1 zu etablieren. Dazu wurden verschiedene trunkierte ROR2 Moleküle mittels eines retroviralen Systems (RCAS) in der Extremität von Hühnerembryonen überexprimiert. Das RCAS System ist gut etabliert und findet in der entwicklungsbiologischen Forschung breite Anwendung (127). Es basiert auf dem Rous Sarcoma Virus, welches ein proto-Oncogen (v-src) in sein Genom aufgenommen hat und dieses in infizierten Zellen unter Kontrolle der viralen Promotorelemente exprimiert. Das v-src Gen kann durch eine beliebige cDNA ersetzt werden, die dann ebenfalls in infizierten Zellen exprimiert wird. Infektion einer Zelle mit dem RCAS Virus führt zur stabilen Integration einer Kopie des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Dies führt zu einer moderaten Überexpression der integrierten cDNA. Eine Limitierung dieses Systems ist, daß



das virale Genom cDNAs nur bis zu einer Größe von ca. 2.2 kb aufnehmen kann, so daß in unserem Fall das volle Länge ROR2 nicht benutzt werden konnte.

Wir benutzten sowohl BDB1 Trunkationen als auch RRS Trunkationen als Kontrolle und konnten mit allen Konstrukten einen Phänotyp in der Knorpel-Wachstumsfuge der langen Knochen erzeugen, der dem humanen RRS Phänotyp glich. Außerdem war dieser Phänotyp überlappend mit dem Phänotyp der *Ror2*<sup>-/-</sup> Maus. Dies legt nahe, daß im Huhn alle Konstrukte zumindest im Knorpel dominant-negativ über das endogene cRor2 waren, somit einen *Ror2*-null Phänotyp produzierten. Ein BDB1-ähnlicher Phänotyp konnte dadurch jedoch nicht generiert werden. Die Stärke und Penetranz eines durch RCAS-Überexpression im Huhn erzeugten Phänotyps hängt immer mit der Effizienz der Infektion zusammen. Generell bekommt man bei der hier verwendeten Infektion des frühen Seitenplattenmesoderm eine sehr gute Infektion des Mesenchyms der Extremität, jedoch sind nie alle Zellen infiziert. Es bildet sich eher ein mosaikartiges Muster einzelner Gruppen infizierter und nicht infizierter Zellen. Eine mögliche Erklärung für den fehlenden BDB1 Phänotyp könnte sein, daß *Ror2* im Rahmen der Fingerentwicklung Zell-autonom agiert, somit müßte, um einen Phänotyp zu erzeugen, jede Zelle der beginnenden Kondensation infiziert sein, was technisch nicht möglich ist. Dem Ausbleiben eines BDB1 Phänotyps könnten aber auch Spezies-spezifische Unterschiede in der Fingerentwicklung zu Grunde liegen.

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, haben wir in Kollaboration mit Aris Economides (Regeneron Inc. Tarrytown, New York, USA) ein Mausmodell für die BDB1 entwickelt. Dieses durch knock-in erzeugte Modell trägt eine exakte Kopie einer humanen Mutation (p.W749X) im endogenen *Ror2* Locus. Die Mutation p.W749X ist in der Maus, im Gegensatz zum Menschen, rezessiv, was bei solchen Mausmodellen häufig auftritt und auf Spezies-spezifische Unterschiede in der Embryonalentwicklung für bestimmte Mutationen hindeutet (128).

Dieses Modell zeigt eine fehlende mittlere Phalanx (p2) in allen Fingern der Hände und Füße und rekapituliert damit einige Aspekte der BDB1. Im Unterschied zum Menschen sind jedoch die terminalen Phalangen normal. Die Erklärung dafür könnte das hohe Regenerationspotential der terminalen Phalangen in der Maus sein (129, 130). In der hier vorgestellten Publikation konnten wir zeigen, daß die BDB1 nicht durch einen Defekt in der frühen Musterbildung zustande kommt. Die Expression von Schlüsselfaktoren der Musterbildung in der Hand war normal, sowohl für *Shh* und die 5' *Hox* Gene *Hoxd11*, *Hoxd12* und *Hoxd13*. Ein Defekt der AER konnte durch den Nachweis der normalen Expression von *Fgf8* ausgeschlossen werden. Außerdem schlossen

wir einen Defekt der Proliferation der frühen Kondensationen aus. Vielmehr scheint der Defekt in einer verminderten Größe der initialen Kondensation zu liegen, die während der weiteren Entwicklung nicht aufgeholt wird. Man geht davon aus, daß die Knorpelagen der Extremität als kontinuierliche Kondensation entstehen, die später durch die Formation von Gelenken unterteilt wird (131). Gelenke sind Signalzentren, die sowohl den angrenzenden Knorpel beeinflussen als auch die Bildung weiterer Gelenke in der Umgebung. So scheinen die Gelenke der Finger selbst über Botenstoffe die Formierung weiterer Gelenke zu unterdrücken, was den Abstand zwischen den einzelnen Gelenken reguliert (41, 132). Somit muß eine Kondensation, um durch eine bestimmte Anzahl an Gelenke unterteilt zu werden, eine Mindestgröße aufweisen. Diese wird offenbar in der *Ror2*<sup>W749X/W749X</sup> Maus unterschritten, so daß kein distales Gelenk gebildet werden kann. Das Resultat ist eine fehlende mittlere Phalanx, somit eine Brachydaktylie.

### **3.6 Ausblick auf eine übergreifende molekulare Pathogenese der Brachydaktylien**

Die Brachydaktylien sind eine Gruppe von Erkrankungen, deren Phänotypen zwar individuell distinkt sind, die jedoch in einzelnen Eigenschaften überlappen. So weisen die Brachydaktylien A1 und A2 beide Verkürzungen der mittleren Fingerglieder auf, jedoch sind verschiedene Finger betroffen. Die BDB1 hat einen variablen Phänotyp, sie betrifft vor Allem distale Strukturen, jedoch ist eine Verkürzung oder sogar ein Fehlen der mittleren Fingerglieder ebenfalls häufig. Für solche Gruppen von Syndromen, die eine klare phänotypische Überlappung zeigen, und aus diesem Grund möglicherweise auch eine gemeinsame genetische Ursache haben, prägte Spranger (133) den Begriff „Krankheitsfamilien“.

Die genetische Ursache für verschiedene Brachydaktylien wurde in den vergangenen Jahren aufgeklärt und es zeigte sich, daß der BMP Signalweg besonders häufig betroffen ist. Andere Mutationen lassen sich mit dem BMP Signalweg assoziieren, da zumindest biochemisch Interaktionen gezeigt wurden, oder eine Kooperation des betreffenden Faktors mit der BMP Signalkaskade bekannt sind. IHH, das in der BDA1 betroffen ist, kann in der Wachstumsfuge des Knorpels die Expression von verschiedenen BMPs regulieren (134, 135). Wir konnten zeigen, daß *Ror2* in vitro mit dem BMP Rezeptor 1b (*BmpR1b*) interagiert und dadurch den *Gdf5/BmpR1b/Smad* Signalweg moduliert (108). Mutationen in *HOXD13* schließlich wurden in einzelnen Individuen mit BDD und BDE gefunden. Es wurde gezeigt, daß 5' Hox Proteine direkt die Expression von

*Bmps* regulieren können (136). 5' Hoxd Proteine interagiert aber auch direkt mit Smad Molekülen, beide modulieren dadurch gegenseitig ihre Aktivität (137, 138). Dies leitet zur Hypothese, daß Krankheitsfamilien wie die Brachydaktylien verknüpft sind durch ein molekulares Netzwerk, in dem die durch Mutation betroffenen Proteine Schlüsselpositionen einnehmen. Mutationen, die zu einer Funktionsänderung führen, verändern somit das Gleichgewicht in diesem Netzwerk und verursachen ein verändertes Endergebnis, also einen sichtbaren Phänotyp. Mundlos schlug zur Integration von überlappenden Phänotypen und Mutationen in Komponenten eines solchen Netzwerkes den Begriff „molekulare Krankheitsfamilien“ (molecular disease families) vor (63).

Damit ist es möglich, ein solches theoretisches Netzwerk für die Brachydaktylien aufzustellen, jedoch wurde dessen funktionelle Interaktion und die Relevanz für den Phänotyp bisher in keinem Krankheitsmodell bestätigt.

Wir haben daher fortführend zu den in der Originalarbeit 2.6 gezeigten Daten das Mausmodell für die BDB1 (*Ror2*<sup>W749X</sup>) weiter untersucht, und die Analyse auf ein Modell für die BDA1 ausgeweitet. Für die BDA1 wurde von Danny Chan (University of Hong Kong) eine Maus generiert, bei der eine humane BDA1 Mutation (IHH p.E95K) in den Maus *Ihh* Locus eingebracht wurde. In einer Kollaboration konnten wir feststellen, daß der BDA1 Phänotyp durch eine verminderte Rekrutierung von undifferenzierten Zellen aus dem distalen Mesenchym in die wachsende Kondensation der Finger hervorgerufen wird, es handelt sich also um einen Knorpel-Kondensationsdefekt (139).

In noch nicht veröffentlichten Untersuchungen zur *Ror2*<sup>W749</sup> Maus haben wir festgestellt, daß dem hier beobachteten Elongationsdefekt (siehe 2.6) ebenfalls ein Kondensationsdefekt zu Grunde liegt. Dies deutete in der Tat an, daß BDA1 und BDB1 weitgehend den selben Pathomechanismus besitzen könnten. Dies wurde substantiiert durch den Befund, daß *Ihh* sowie seine Zielgene *Ptc1* und *Gli1* in der BDB1 Maus drastisch herunterreguliert waren. Vor allem konnten in beiden Mausmodellen der Kondensationsdefekt auf einen Defekt des BMP/pSmad1/5/8 Signalwegs zurückführen. Durch Immunfärbung auf Schnitten fanden wir in der wt Maus bei E13.5 eine Population an Zellen direkt anterior der Fingerkondensation, die stark positiv für pSmad1/5/8 war. Diese Population fehlte in der BDB1 Maus, in der BDA1 Maus war die Signalintensität deutlich vermindert.

Eine solche Population an pSmad1/5/8 positiven Zellen wurde im Hühnerembryo beschrieben als „phalanx forming region“ (PFR) (49, siehe Einleitung Abschnitt 1.1.2). Wir können also erstmals zeigen, daß eine solche Region in der Maus existiert und wahrscheinlich in die Pathogenese der menschlichen Brachydaktylien involviert ist.

Ror2 wurde von uns und anderen Gruppen in vitro in die Regulation des Wnt Signalweges involviert (96, 98, 100). Wir fanden in der BDB1 Maus eine Hochregulation des “kanonischen“ Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweges im distalen Mesenchym der Extremität. Es ist bekannt, daß der Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg sowohl die Chondrogenese in verschiedenen Testsystemen in vitro und in vivo hemmt (38-41, 132, 140, 141). Außerdem ist bekannt, daß Wnt/ $\beta$ -catenin und BMP/Smad Signalwege in der Knorpelentwicklung und im Mesenchym der Extremität antagonistisch wirken (36, 142-144).

Zusammengenommen suggerieren diese Ergebnisse erstmals in vivo, in zwei Modellen für humane Brachydaktylien, ein zusammenhängendes Signalnetzwerk aus Ror2, Ihh, Wnt/ $\beta$ -catenin und BMP Signalwegen (Witte, Chan, Economides, Mundlos, Stricker, eingereicht zur Publikation). Dieses Signalnetzwerk reguliert die Elongation der Fingerkondensation, schematisch dargestellt in Abbildung 10.

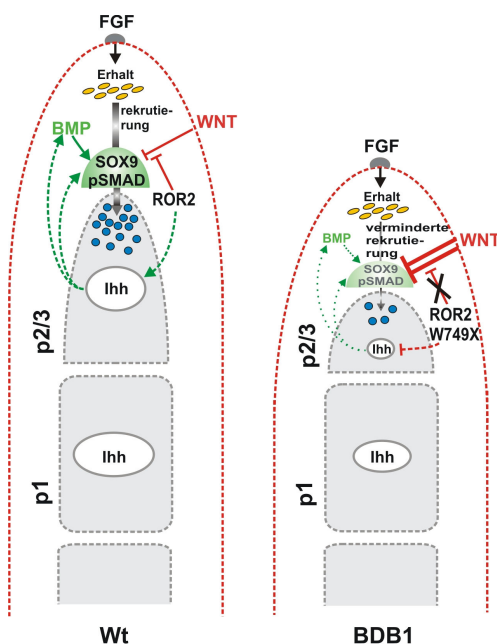


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Signalnetzwerkes, das die Elongation der Finger steuert. ROR2 inhibiert Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling und reguliert die Expression von *Ihh* positiv. *Ihh* reguliert die *Bmp* Expression im Mesenchym und beeinflusst eventuell über unbekannte Mechanismen das BMP Signaling in der PFR. BMPs wirken in der PFR über pSmad1/5/8 auf die Expression von Zielgenen wie *Sox9*. Wnt/ $\beta$ -catenin hemmt den BMP Signalweg. Dieses Zusammenspiel reguliert über die PFR die Rekrutierung von undifferenzierten, unter Kontrolle von Fgf Signalen proliferierenden Mesenchymzellen in die Kondensation. In der BDB1 inhibiert trunkiertes ROR2 die Expression von *Ihh*, hemmt aber nicht mehr den kanonischen Wnt Signalweg. Als Resultat wird der BMP Signalweg in der PFR inhibiert, die Rekrutierung von Zellen in die Kondensation ist vermindert.

Zusammengenommen zeigen wir damit erstmals in vivo ein molekulares Netzwerk, in dem die in den Brachydaktylien A-C betroffenen Signalwege integriert sind. Dieses Signalnetzwerk, das die Elongation der Fingerkondensationen steuert, wird durch Mutationen in einzelnen Komponenten verschoben, so daß sich sein Output (in diesem Fall die Knorpelkondensation) verändert. Es ist also vorauszusehen, daß Mutationen an verschiedenen Stellen dieses Netzwerkes dieses unterschiedlich stark beeinflussen, was sich in den unterschiedlichen Phänotypen der Brachydaktylien manifestiert.

## 4. Zusammenfassung

Angeborene skeletale Fehlbildungen treten beim Menschen häufig auf, Fehlbildungen des Extremitätenskeletts betreffen im Durchschnitt etwa eine(n) unter 1000 Neugeborenen. Diese Fehlbildungen manifestieren sich während der Embryonal- bzw. Fötalphase, sind also Entwicklungsdefekte.

Wir haben in den vergangenen Jahren verschiedene Formen der Extremitätenfehlbildungen untersucht. Wir konnten für zwei Syndrome, das Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel Phocomelia Syndrom und das Fuhrmann Syndrom die genetische Ursache herausfinden. Beide Syndrome werden durch Missense Mutationen im Signalmolekül WNT7A hervorgerufen. Wir konnten in funktionellen Untersuchungen zeigen, daß die Mutation im Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel Phocomelia Syndrom, das einen sehr schweren Phänotyp zeigt, zu einem totalen Funktionsverlust von WNT7A führt, während die Mutation im phänotypisch weniger schweren Fuhrmann Syndrom einen partiellen Funktionsverlust von WNT7A bewirkt. Dies ist erst die zweite Mutation, die in einem *WNT* Gen als Ursache für ein humanes Syndrom beschrieben wurde.

Um einen besseren Einblick in die potentiellen Funktionen der Wnt Faktoren während der Extremitäten-Entwicklung zu bekommen, haben wir erstmals eine vollständige Expressionsanalyse aller 19 Wnt Gene der Maus sowie der wichtigsten sekretierten Antagonisten während der Extremitäten-Entwicklung unternommen und konnten dabei zahlreiche neue Expressions-Domänen beschreiben.

Der Hauptfokus unserer Arbeit lag auf der Analyse der Pathogenese einer Gruppe von Handfehlbildungen, den Brachydaktylien. Der Ansatzpunkt zur Analyse dieser Krankheitsfamilie lag in der Untersuchung der Funktion von *ROR2*, welches in der phänotypisch schwersten Form, der Brachydaktylie Typ B1 (BDB1), Mutationen aufweist. Mutationen in *ROR2* verursachen jedoch nicht nur die dominante BDB1, sondern auch das phänotypisch distinkte rezessive Robinow Syndrom (RRS). Um aufzuklären, wie diese Mutationen zu verschiedenen Syndromen führen, stellten wir exakte Kopien humaner Mutationen her und exprimierten diese in einem definierten Zellsystem. Wir konnten zeigen, daß RRS Mutationen zu einer Retention des Proteins im endoplasmatischen Reticulum und zur Proteindegradation führen. BDB1 Mutationen jedoch sind stabil und gelangen an die Zellmembran, wo sie mit dem normalen Signaling interferieren können. Durch exakte Quantifizierung der Proteinmengen an der Membran konnten wir zeigen, daß die Schwere des BDB1

Phänotyps sowie das Auftreten überlappenden Phänotypen zwischen BDB1 und RRS mit der Menge an trunkiertem Protein an der Zellmembran korreliert.

Ror2 ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, für die zu Beginn unserer Arbeiten weder Ligand noch Signalweg bekannt waren. Um einen Einblick in diese Prozesse zu erhalten und intrazelluläre Interaktionspartner von Ror2 zu identifizieren, führten wir einen Yeast-two-Hybrid Screen mit der intrazellulären Domäne von Ror2 durch. Wir konnten zeigen, daß Ror2 mit einem LIM-Domänen Protein Wtip interagiert. Diese Interaktion ist lokalisiert auf den C-Terminus von Ror2, welcher in allen BDB1 Mutationen fehlt. Wir fanden, daß Ror2 in der Lage ist, Wtip an die Zellmembran zu rekrutieren, BDB1-Formen von Ror2 jedoch nicht. Schließlich fanden wir, daß Wtip ein neuer intrazellulärer Regulator des Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweges ist, in den Ror2 (unter anderem von uns) in den vergangenen Jahren involviert wurde.

BDB1 ist charakterisiert durch Hypoplasie / Aplasie der distalen Fingerglieder. Um die Pathogenese dieses Phänotyps zu untersuchen, haben wir sowohl das Huhn als auch die Maus als Modellorganismus verwendet. Im Huhn konnten wir mittels retroviraler Misexpression von trunkierten Konstrukten (analog zu humanen BDB1 oder RRS Mutationen) zeigen, daß diese als dominant-negative wirken, wobei korrelierend zu den Experimenten in Zellkultur die RRS Mutationen einen schwächeren Effekt hatten. Wir beschrieben in diesem System den Defekt in Wachstumsfugen langer Knochen und zeigten, daß dieser auf einen Differenzierungsdefekt, nicht auf einen Proliferationsdefekt zurückgeht. In diesem System konnten wir jedoch keinen BDB1-analogen Phänotyp erzeugen. Dies gelang jedoch in einem Mausmodell, bei welchem eine humane Mutation (p.W749X) durch knock-in in den endogenen Ror2-Locus eingebracht wurde. Wir konnten in diesem Modell, das eine aplastische mittlere Phalanx aufweist, zeigen, daß die BDB1 durch einen Elongationsdefekt der frühen Knorpelkondensation der Hand und einem damit einher gehenden Defekt in der Bildung des distalen Gelenks zustande kommt.

Unsere Ergebnisse liefern somit einen wichtigen Beitrag sowohl zur Erweiterung des Mutationsspektrums humaner Extremitäten-Fehlbildungen als auch zur funktionellen und molekularen Charakterisierung ihrer Pathogenese.

## Literaturverzeichnis

1. Connor JM & Ferguson-Smith MA (1987) *Essential Medical Genetics*. (Blackwell Scientific Publications., Oxford).
2. Gilbert SF (1994) *Developmental Biology* (Sinauer Associates, Sunderland).
3. Hamburger V & Hamilton HL (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol* 8:49-92.
4. Capdevila J & Izpisua Belmonte JC (2001) Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:87-132.
5. Gedespan JS & Solursh M (1992) A growth-promoting influence from the mesonephros during limb outgrowth. *Dev Biol* 151(1):242-250.
6. Crossley PH, Minowada G, MacArthur CA, & Martin GR (1996) Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development. *Cell* 84(1):127-136.
7. Kawakami Y, *et al.* (2001) WNT signals control FGF-dependent limb initiation and AER induction in the chick embryo. *Cell* 104(6):891-900.
8. Kengaku M, *et al.* (1998) Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science* 280(5367):1274-1277.
9. Barrow JR, *et al.* (2003) Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* 17(3):394-409.
10. Tickle C (2003) Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell* 4(4):449-458.
11. Saunders JW & Gasseling MT (1968) Ectodermal-mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *Epithelial-Mesenchymal Interactions*, eds Fleischmeyer R & Billingham RE (Williams & Wilkins, Baltimore), pp 78-97.
12. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, & Tabin C (1993) Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75(7):1401-1416.
13. Chiang C, *et al.* (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383(6599):407-413.
14. Wang B, Fallon JF, & Beachy PA (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100(4):423-434.
15. Litington Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, & Chiang C (2002) Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418(6901):979-983.
16. Vortkamp A, Gessler M, & Grzeschik KH (1991) GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352(6335):539-540.
17. Niedermaier M, *et al.* (2005) An inversion involving the mouse Shh locus results in brachydactyly through dysregulation of Shh expression. *J Clin Invest* 115(4):900-909.
18. Lettice LA, *et al.* (2002) Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(11):7548-7553.
19. Lettice LA, Hill AE, Devenney PS, & Hill RE (2008) Point mutations in a distant sonic hedgehog cis-regulator generate a variable regulatory output responsible for preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 17(7):978-985.
20. Zakany J, Kmita M, & Duboule D (2004) A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304(5677):1669-1672.
21. Kornak U & Mundlos S (2003) Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet* 73(3):447-474.
22. Logan M (2003) Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* 130(26):6401-6410.
23. Riddle RD, *et al.* (1995) Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT7a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. *Cell* 83(4):631-640.
24. Loomis CA, *et al.* (1996) The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* 382(6589):360-363.
25. Niswander L, Jeffrey S, Martin GR, & Tickle C (1994) A positive feedback loop coordinates growth and patterning in the vertebrate limb. *Nature* 371(6498):609-612.
26. Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, & Tabin C (1994) Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79(6):993-1003.

27. Zuniga A, Haramis AP, McMahon AP, & Zeller R (1999) Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* 401(6753):598-602.
28. Yang Y & Niswander L (1995) Interaction between the signaling molecules WNT7a and SHH during vertebrate limb development: dorsal signals regulate anteroposterior patterning. *Cell* 80(6):939-947.
29. Rodriguez-Esteban C, *et al.* (1997) Radical fringe positions the apical ectodermal ridge at the dorsoventral boundary of the vertebrate limb. *Nature* 386(6623):360-366.
30. Tickle C (2006) Making digit patterns in the vertebrate limb. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(1):45-53.
31. Laufer E, *et al.* (1997) Expression of Radical fringe in limb-bud ectoderm regulates apical ectodermal ridge formation. *Nature* 386(6623):366-373.
32. Summerbell D, Lewis JH, & Wolpert L (1973) Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 244(5417):492-496.
33. Dudley AT, Ros MA, & Tabin CJ (2002) A re-examination of proximodistal patterning during vertebrate limb development. *Nature* 418(6897):539-544.
34. Sun X, Mariani FV, & Martin GR (2002) Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature* 418(6897):501-508.
35. Schwabe GC & Mundlos S (2004) Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 36(2-3):85-97.
36. Hoffmann A & Gross G (2001) BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11(1-3):23-45.
37. Yoon BS, *et al.* (2005) *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(14):5062-5067.
38. Hill TP, Spater D, Taketo MM, Birchmeier W, & Hartmann C (2005) Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell* 8(5):727-738.
39. ten Berge D, Brugmann SA, Helms JA, & Nusse R (2008) Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development* 135(19):3247-3257.
40. Guo X, *et al.* (2004) Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev* 18(19):2404-2417.
41. Hartmann C & Tabin CJ (2001) Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* 104(3):341-351.
42. Archer CW, Dowthwaite GP, & Francis-West P (2003) Development of synovial joints. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69(2):144-155.
43. Chiang C, *et al.* (2001) Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol* 236(2):421-435.
44. Towers M, Mahood R, Yin Y, & Tickle C (2008) Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning. *Nature* 452(7189):882-886.
45. Zhu J, *et al.* (2008) Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell* 14(4):624-632.
46. Scherz PJ, McGlenn E, Nissim S, & Tabin CJ (2007) Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Dev Biol* 308(2):343-354.
47. Drossopoulou G, *et al.* (2000) A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range *Shh* signalling and *Bmp* signalling. *Development* 127(7):1337-1348.
48. Dahn RD & Fallon JF (2000) Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* 289(5478):438-441.
49. Suzuki T, Hasso SM, & Fallon JF (2008) Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11):4185-4190.
50. Karsenty G & Wagner EF (2002) Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2(4):389-406.
51. Lettice LA, *et al.* (2003) A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* 12(14):1725-1735.
52. Klopocki E, *et al.* (2008) A microduplication of the long range SHH limb regulator (ZRS) is associated with triphalangeal thumb-polysyndactyly syndrome. *J Med Genet* 45(6):370-375.



53. Horikoshi T, *et al.* (2003) Disruption of the *C7orf2/Lmbr1* genic region is associated with preaxial polydactyly in humans and mice. *J Bone Miner Metab* 21(1):1-4.
54. Wagner T, *et al.* (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *SOX9*. *Cell* 79(6):1111-1120.
55. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, & de Crombrughe B (1999) *Sox9* is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22(1):85-89.
56. Shiang R, *et al.* (1994) Mutations in the transmembrane domain of *FGFR3* cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78(2):335-342.
57. Rousseau F, *et al.* (1994) Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371(6494):252-254.
58. Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, & Ornitz DM (1996) Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12(4):390-397.
59. Naski MC, Wang Q, Xu J, & Ornitz DM (1996) Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet* 13(2):233-237.
60. Teitelbaum SL & Ross FP (2003) Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4(8):638-649.
61. Mundlos S, *et al.* (1997) Mutations involving the transcription factor *CBFA1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89(5):773-779.
62. Thomas JT, *et al.* (1997) Disruption of human limb morphogenesis by a dominant negative mutation in *CDMP1*. *Nat Genet* 17(1):58-64.
63. Mundlos S (2009) The brachydactylies: a molecular disease family. *Clin Genet* 76(2):123-136.
64. Gao B, *et al.* (2001) Mutations in *IHH*, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* 28(4):386-388.
65. Lehmann K, *et al.* (2003) Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12277-12282.
66. Kjaer KW, *et al.* (2006) A mutation in the receptor binding site of *GDF5* causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *J Med Genet* 43(3):225-231.
67. Lehmann K, *et al.* (2006) A novel R486Q mutation in *BMPR1B* resulting in either a brachydactyly type C/symphalangism-like phenotype or brachydactyly type A2. *Eur J Hum Genet* 14(12):1248-1254.
68. Seemann P, *et al.* (2005) Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of *GDF5* cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* 115(9):2373-2381.
69. Ploger F, *et al.* (2008) Brachydactyly type A2 associated with a defect in pro*GDF5* processing. *Hum Mol Genet* 17(9):1222-1233.
70. Dathe K, *et al.* (2009) Duplications involving a conserved regulatory element downstream of *BMP2* are associated with brachydactyly type A2. *Am J Hum Genet* 84(4):483-492.
71. Oldridge M, *et al.* (2000) Dominant mutations in *ROR2*, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet* 24(3):275-278.
72. Schwabe GC, *et al.* (2000) Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene *ROR2* cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet* 67(4):822-831.
73. Lehmann K, *et al.* (2007) A new subtype of brachydactyly type B caused by point mutations in the bone morphogenetic protein antagonist *NOGGIN*. *Am J Hum Genet* 81(2):388-396.
74. Polinkovsky A, *et al.* (1997) Mutations in *CDMP1* cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat Genet* 17(1):18-19.
75. Savarirayan R, *et al.* (2003) Broad phenotypic spectrum caused by an identical heterozygous *CDMP-1* mutation in three unrelated families. *Am J Med Genet A* 117A(2):136-142.
76. Schwabe GC, *et al.* (2004) Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of *CDMP1*. *Am J Med Genet A* 124(4):356-363.
77. Johnson D, *et al.* (2003) Missense mutations in the homeodomain of *HOXD13* are associated with brachydactyly types D and E. *Am J Hum Genet* 72(4):984-997.
78. Hammerschmidt M, Brook A, & McMahon AP (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet* 13(1):14-21.

79. Jenkins D (2009) Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal*.
80. Thisse B & Thisse C (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287(2):390-402.
81. Su N, Du X, & Chen L (2008) FGF signaling: its role in bone development and human skeleton diseases. *Front Biosci* 13:2842-2865.
82. Goldfarb M (2001) Signaling by fibroblast growth factors: the inside story. *Sci STKE* 2001(106):PE37.
83. Angers S & Moon RT (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7):468-477.
84. MacDonald BT, Semenov MV, & He X (2007) SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling. *Cell* 131(6):1204.
85. MacDonald BT, Tamai K, & He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17(1):9-26.
86. Semenov MV, Habas R, Macdonald BT, & He X (2007) SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* 131(7):1378.
87. Seifert JR & Mlodzik M (2007) Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 8(2):126-138.
88. Simons M & Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* 42:517-540.
89. Urist MR (1965) Bone: formation by autoinduction. *Science* 150(698):893-899.
90. Wozney JM, *et al.* (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242(4885):1528-1534.
91. Hartung A, Sieber C, & Knaus P (2006) Yin and Yang in BMP signaling: Impact on the pathology of diseases and potential for tissue regeneration. *Signal Transduction* 6:314-328.
92. Afzal AR, *et al.* (2000) Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet* 25(4):419-422.
93. van Bokhoven H, *et al.* (2000) Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet* 25(4):423-426.
94. Afzal AR & Jeffery S (2003) One gene, two phenotypes: ROR2 mutations in autosomal recessive Robinow syndrome and autosomal dominant brachydactyly type B. *Hum Mutat* 22(1):1-11.
95. Masiakowski P & Carroll RD (1992) A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* 267(36):26181-26190.
96. Billiard J, *et al.* (2005) The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 19(1):90-101.
97. Oishi I, *et al.* (2003) The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8(7):645-654.
98. Winkel A, *et al.* (2008) Wnt-ligand-dependent interaction of TAK1 (TGF-beta-activated kinase-1) with the receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt-signalling. *Cell Signal* 20(11):2134-2144.
99. Yamamoto S, *et al.* (2008) Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* 15(1):23-36.
100. Mikels AJ & Nusse R (2006) Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4(4):e115.
101. Schambony A & Wedlich D (2007) Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* 12(5):779-792.
102. Nishita M, *et al.* (2006) Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol* 175(4):555-562.
103. Nomachi A, *et al.* (2008) Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *J Biol Chem* 283(41):27973-27981.
104. Kani S, *et al.* (2004) The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with and is activated by casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* 279(48):50102-50109.
105. Liu Y, Ross JF, Bodine PV, & Billiard J (2007) Homodimerization of Ror2 tyrosine kinase receptor induces 14-3-3(beta) phosphorylation and promotes osteoblast differentiation and bone formation. *Mol Endocrinol* 21(12):3050-3061.

106. Matsuda T, *et al.* (2003) The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the melanoma-associated antigen (MAGE) family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *J Biol Chem* 278(31):29057-29064.
107. Yamamoto H, Yoo SK, Nishita M, Kikuchi A, & Minami Y (2007) Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells* 12(11):1215-1223.
108. Sammar M, *et al.* (2004) Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* 9(12):1227-1238.
109. Niemann S, *et al.* (2004) Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74(3):558-563.
110. Parr BA & McMahon AP (1995) Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374(6520):350-353.
111. Haraguchi K, *et al.* (2008) Ajuba negatively regulates the Wnt signaling pathway by promoting GSK-3beta-mediated phosphorylation of beta-catenin. *Oncogene* 27(3):274-284.
112. Chen Y, Bellamy WP, Seabra MC, Field MC, & Ali BR (2005) ER-associated protein degradation is a common mechanism underpinning numerous monogenic diseases including Robinow syndrome. *Hum Mol Genet* 14(17):2559-2569.
113. Matsuda T, *et al.* (2001) Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mech Dev* 105(1-2):153-156.
114. Schwabe GC, *et al.* (2004) Ror2 knockout mouse as a model for the developmental pathology of autosomal recessive Robinow syndrome. *Dev Dyn* 229(2):400-410.
115. Tufan AC & Tuan RS (2001) Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *Faseb J* 15(8):1436-1438.
116. Vogel A, Rodriguez C, Warnken W, & Izpisua Belmonte JC (1995) Dorsal cell fate specified by chick Lmx1 during vertebrate limb development. *Nature* 378(6558):716-720.
117. Ianakiev P, *et al.* (2001) Acheiropodia is caused by a genomic deletion in C7orf2, the human orthologue of the Lmbr1 gene. *Am J Hum Genet* 68(1):38-45.
118. Rowe DA, Cairns JM, & Fallon JF (1982) Spatial and temporal patterns of cell death in limb bud mesoderm after apical ectodermal ridge removal. *Dev Biol* 93(1):83-91.
119. Grigoryan T, Wend P, Klaus A, & Birchmeier W (2008) Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22(17):2308-2341.
120. Woods CG, *et al.* (2006) Mutations in WNT7A Cause a Range of Limb Malformations, Including Fuhrmann Syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzler Phocomelia Syndrome. *Am J Hum Genet* 79(2):402-408.
121. Rubin AI, Chen EH, & Ratner D (2005) Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 353(21):2262-2269.
122. Taipale J & Beachy PA (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411(6835):349-354.
123. Feuerstein R, Wang X, Song D, Cooke NE, & Liebhaber SA (1994) The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22):10655-10659.
124. Bilic J, *et al.* (2007) Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316(5831):1619-1622.
125. Srichai MB, *et al.* (2004) A WT1 co-regulator controls podocyte phenotype by shuttling between adhesion structures and nucleus. *J Biol Chem* 279(14):14398-14408.
126. Langer EM, *et al.* (2008) Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in Xenopus. *Dev Cell* 14(3):424-436.
127. Logan M & Tabin C (1998) Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods* 14(4):407-420.
128. Wilkie AO (2003) Why study human limb malformations? *J Anat* 202(1):27-35.
129. Neufeld DA & Zhao W (1995) Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen* 3(4):461-466.
130. Zhao W & Neufeld DA (1995) Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ. *J Exp Zool* 271(2):155-159.
131. Shubin NH & Alberch P (1986) A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. *Evolutionary Biology*, eds Hecht MK, Wallace B, & Prance GT (Plenum Press, New York), Vol 20, pp 319-387.

132. Hartmann C (2007) Skeletal development--Wnts are in control. *Mol Cells* 24(2):177-184.
133. Spranger J (1985) Pattern recognition in bone dysplasias. *Prog Clin Biol Res* 200:315-342.
134. Minina E, *et al.* (2001) BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128(22):4523-4534.
135. Pathi S, Rutenberg JB, Johnson RL, & Vortkamp A (1999) Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation. *Dev Biol* 209(2):239-253.
136. Knosp WM, Scott V, Bachinger HP, & Stadler HS (2004) HOXA13 regulates the expression of bone morphogenetic proteins 2 and 7 to control distal limb morphogenesis. *Development* 131(18):4581-4592.
137. Li X, Nie S, Chang C, Qiu T, & Cao X (2006) Smads oppose Hox transcriptional activities. *Exp Cell Res* 312(6):854-864.
138. Williams TM, Williams ME, Heaton JH, Gelehrter TD, & Innis JW (2005) Group 13 HOX proteins interact with the MH2 domain of R-Smads and modulate Smad transcriptional activation functions independent of HOX DNA-binding capability. *Nucleic Acids Res* 33(14):4475-4484.
139. Gao B, *et al.* (2009) A mutation in Ihh that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range. *Nature* 458(7242):1196-1200.
140. Rudnicki JA & Brown AM (1997) Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro. *Dev Biol* 185(1):104-118.
141. Church V, Nohno T, Linker C, Marcelle C, & Francis-West P (2002) Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J Cell Sci* 115(Pt 24):4809-4818.
142. Akiyama H, *et al.* (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18(9):1072-1087.
143. Fischer L, Boland G, & Tuan RS (2002) Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J Cell Biochem* 84(4):816-831.
144. Mukhopadhyay M, *et al.* (2001) Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* 1(3):423-434.

## **Abkürzungen**

AER: apikale ektodermale Randleiste (=apical ectodermal ridge)

Bp: Basenpaare

BD: Brachydaktylie

E: Embryonaltag der Maus

IM: intermediäres Mesoderm

ISH: In-situ Hybridisierung

Kb: kilobasen

PFR: Phalanx forming Region

SPM: Seitenplattenmesoderm

WT: Wildtyp

ZPA: Zone polarisierender Aktivität

## Danksagung

Der erste Dank gebührt meinen Eltern, deren Unterstützung, Wohlwollen und Geduld den Grundstein für jegliche Erfolge in Studium und wissenschaftlicher Arbeit legten.

Ich danke vor allem meinem langjährigen Mentor Prof. Stefan Mundlos, der mich in die Humangenetik genauso eingeführt hat wie in die Entwicklungsbiologie. Stefans unvergleichliche Auffassungsgabe und seine Begeisterungsfähigkeit waren mir immer Motivation und Vorbild zugleich. Für die jahrelange grenzenlose Unterstützung und die mir gewährte Freiheit zur Umsetzung eigener Ideen und Projekte möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt den Studenten, die ich während ihrer Dissertation im Labor betreuen durfte und ohne deren Arbeitseinsatz und Kreativität der erfolgreiche Abschluß dieser Projekte nicht möglich gewesen wäre. Florian Witte untersuchte die Pathogenese der BDB1 und den Wnt Signalweg, Wibke Schwarzer widmete sich der Genotyp-Phänotyp Korrelation bei Mutationen in ROR2 und Nicole Verhey van Wijk analysierte Interaktionspartner von ROR2. Sie alle waren innerhalb wie außerhalb der Labors gute Freunde für mich, ich werde unsere Zusammenarbeit, unsere Diskussionen aber auch die Verkostung von Spezialitäten aus Deutschlands Süden und Großbritanniens Norden nie vergessen.

Ich möchte mich auch bei den technischen Mitarbeitern Britta Hoffmann, Kathrin Seidel, Norbert Brieske und Asita Stiege bedanken, deren Expertise maßgeblich dazu beigetragen hat, die Projekte zu einem glücklichen Ende zu bringen.

Ich danke dem gesamten Labor der Arbeitsgruppe Mundlos für die nette Atmosphäre, viele anregende Diskussionen und den vielen Spaß im und außerhalb des Labors. Ein besonderer Dank geht an Dr. Georg Schwabe, der das Ror2 Projekt initiiert hat, Dr. Jochen Hecht für sein unermeßliches technisches know-how und die stetige Bereitschaft dies zu teilen, Dr. Kathrin Hoffmann für die anregende Zusammenarbeit über muskuläre Defekte, Dr. Petra Seemann für jahrelange gute Zusammenarbeit über die Signalwege der Extremitäten-Entwicklung und Dr. Mateusz Kolanczyk für die vielen, vielen Diskussionen, die nicht selten in neuen Ideen endeten.

Schließlich möchte ich mich bei den vielen Kollegen bedanken, die als Kooperationspartner zum Erfolg der Studien beitrugen, besonders Dr. Danny Chan, Dr. Aris N. Economides, Dr. Petra Knaus, Dr. Andrea Vortkamp, Dr. Gerhard Gross, Dr. Vitezslav Bryja, Dr. Alexandra Schambony, Dr. Geoff Woods und Dr. Anna Rajab. Unsere Zusammenarbeit war für mich immer Freude, Motivation und Privileg zugleich.

Der größte Dank gebührt aber meiner Familie, meiner lieben Frau Andrea und unserem kleinen David, die mir jeden Tag aufs Neue Kraft geben.

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift