

Analyse der Ror2-Funktion *in vivo* und *in vitro*

Die Ror2^{W749X}-Maus als Modell für humane
Brachydaktylie Typ B

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

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

vorgelegt von
Diplom-Biologe Florian Witte
aus Rinteln



Februar 2009

Die Arbeit wurde von Januar 2005 bis Februar 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Mundlos und Dr. Sigmar Stricker am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik durchgeführt.

1.Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos
2.Gutachter: Prof Dr. Petra Knaus

Disputation am 18.05.2009

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinen Eltern, die in meiner Kindheit und Erziehung nicht nur den Grundstein für die alles hier gelegt haben, sondern mich auch immer auf jegliche Weise unterstützt und bestärkt haben. Diese Arbeit ist Euch gewidmet.

Dann bedanke ich mich bei Prof. Dr. Stefan Mundlos für die Bereitstellung des Themas, die perfekten Arbeitsbedingungen am MPI und die Diskussionen rund um Signalwege und Fingerentwicklung.

Prof. Dr. Petra Knaus gebührt Dank für die Vertretung der Arbeit vor dem Fachbereich der FU Berlin und vor allem für die immer interessanten Treffen im Rahmen unserer Ror2-Kooperation und die daraus resultierenden Anregungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Aris Economides (Regeneron Inc., Tarrytown, NY), Alexandra Schambony (Universität Erlangen-Nürnberg), Vitezlav Bryja (Universität Brno, Tschechische Republik) sowie Danny Chan (Universität Hong Kong) bedanken, die diese Arbeit mit Mauslinien und experimenteller Hilfe ermöglicht haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an meinen Betreuer Sigmar Stricker, der mich im wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben geführt hat und ein schier unerschöpfliches Lexikon darstellte. Unsere Diskussionen waren für mich immer eine Quelle von Motivation und Ideen, in meiner Zeit als Doktorand habe ich von ihm am Meisten lernen können. Auch die Lehrveranstaltungen in deutsch-schottische Völkerverständigung werden mir im Gedächtnis bleiben.

Innerhalb der Arbeitsgruppe Mundlos am MPI bedanke ich mich bei allen, die mich auf die verschiedensten Arten unterstütz haben. Die streng wissenschaftlichen Diskussionen mit Pia Kuss und Nadine „Herbal“ Kossler hoben stets meine Motivation und Arbeitsmoral. Britta Trepczik, Nicole Verhey van Wijk, Matheusz Kolanczyk und Jochen Hecht standen mit methodisch zur Seite. Ein großes Dankeschön geht auch an Janine Wetzel für die perfekte Mausearbeit im Tierhaus und an Kathrin Seidel für die Unterstützung im Labor. Bei meinen Diplomandinnen Franzi Neuendorf, Janine Dokas und Annika Mahl bedanke ich mich für die Unterstützung bei meinen „Hobby-Projekten“, die dann ja doch noch zum Erfolg führten.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine bessere Hälfte Katl, die mir immer den Rücken stärkt und in meinem Labor-freien Leben stets die Sonne scheinen läßt. Ohne die wohldosierte Mischung aus Unterstützung und den Ablenkung wäre die Arbeit in diesem Maß sicher nicht so gelungen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Skelett- und Extremitätenentwicklung der Vertebraten	1
1.1.1. Humane genetisch bedingte Fingerfehlbildung Brachydaktylie	1
1.1.2. Extremitätenentwicklung und Chondrogenese	2
1.1.3. Signalzentren der Extremitätenentwicklung	3
1.1.4. Signalwege der Extremitätenentwicklung	4
1.2. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 – Ror2	11
1.2.1. Klassifizierung und Konservierung von Ror2	11
1.2.2. Modularer Aufbau von Ror2	12
1.2.3. Die Rolle von Ror2 in der Skelettentwicklung und bei humanen genetisch bedingten Fehlbildungen	13
1.2.4. Interaktionspartner von Ror2 und Ror2-vermittelte Signaltransduktion	15
1.3. Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material	20
2.1. Geräte	20
2.2. Chemikalien	20
2.3. Molekularbiologische Reaktionssysteme/ Kits	20
2.4. Antikörper	21
2.5. Kulturzellen	22
2.6. Bakterienstämme	22
2.7. Tiere	22
2.8. Enzyme	23
2.9. Expressionskonstrukte und Vektoren	23
2.10. Software	24
2.11. Primer	24
3. Methoden	26
3.1. Molekularbiologische Methoden	26
3.1.1. DNA-Isolierung	26
3.1.2. RNA-Isolation	26
3.1.3. Herstellung von cDNA	27
3.1.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
3.1.5. DNA-Sequenzierungen	35
3.2. Proteinbiochemische Methoden	35

3.2.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.2.2.	SDS-PAGE nach Laemmli (1970)	35
3.2.3.	Western Blot.....	37
3.3.	Histologische Methoden	39
3.3.1.	Skelettpräparationen	39
3.3.2.	Paraffineinbettung und Schnittanfertigung	39
3.3.3.	Anfertigung von Vibratomschnitten	40
3.3.4.	Hämatoxylin/Eosin-Färbung (mit und ohne Alcian Blue Gegenfärbung)	40
3.3.5.	LacZ-Färbung von Embryonen und Schnittpräparaten.....	41
3.3.6.	Immunhistologie.....	42
3.3.7.	<i>In Situ</i> Hybridisierung (ISH)	43
3.3.8.	Proliferationsassay - BrdU-Inkorporation.....	47
3.4.	Zellbiologische Methoden	48
3.4.1.	Einfrieren von Zellen	48
3.4.2.	Auftauen von Zellen	48
3.4.3.	Splitten von Zellen.....	48
3.4.4.	Bestimmung der Zellzahl	49
3.4.5.	Transfektion von Zellen	49
3.4.6.	Immuncytologie.....	49
3.4.7.	Co-Immunopräzipitation (CoIP)	50
3.4.8.	Luziferase-Reporter-Assay	51
3.4.9.	Maus-Micromasskulturen (mMM)	52
3.4.10.	Alcian Blau-Färbung von Maus-Micromasskulturen	52
3.4.11.	LacZ-Färbung von Maus-Micromasskulturen.....	53
4.	Ergebnisse	54
4.1.	<i>in vivo</i> Analyse von Ror2 - die Ror2W759X-Maus als Modell für die humane Brachydaktylie Typ B1	54
4.1.1.	Expression von Ror2 während der Handentwicklung / Chondrogenese.....	54
4.1.2.	Phänotyp der Ror2W749X-Maus	56
4.1.3.	Veränderte Signalwegskaskaden in der Ror2W749X-Maus.....	63
4.2.	Expressionsanalyse aller Wnt-Gene und ihrer wichtigsten sezernierten Antagonisten während Extremitätenentwicklung und Chondrogenese der Maus	78
4.3.	<i>in vitro</i> Analyse von Ror2 - Identifikation neuer Interaktionspartner	82

4.3.1.	Ror2 und der Wnt-Signalweg: Dishevelled als intrazellulärer Interaktionspartner von Ror2	82
4.3.2.	Ror2 und der Bmp-Signalweg: Noggin als extrazellulärer Interaktionspartner von Ror2.....	91
5.	Diskussion	95
5.1.	<i>in vivo</i> Analyse von Ror2 - die Ror2W749X-Maus als Modell für humane BDB	95
5.1.1.	Pathomechanismus der Brachydaktylie in der Ror2W749X-Maus	96
5.1.2.	Mißregulierte Signalkaskaden resultieren über Proliferations- sowie Rekrutierungsdefekte im Phänotyp der Brachydaktylie.....	97
5.1.3.	Modell zur Fingerentwicklung und Etablierung der Brachydaktylie.....	101
5.1.4.	Abgleich der Ror2-Expression mit den Expressionsmustern der Wnt-Liganden	104
5.2.	<i>in vitro</i> Analse von Ror2 - Identifikation neuer Interaktionspartner.....	105
5.2.1.	Ror2 interagiert mit dem zentralen Mediator des Wnt-Signalwegs Dishevelled.	105
5.2.2.	Ror2 interagiert mit dem sezernierten Bmp-Antagonist Noggin	109
5.2.3.	Ror2 als Schaltstelle zwischen Wnt- und Bmp-Signaltransduktion.....	109
5.2.4.	Das Konzept der „ <i>Molecular Disease Family</i> “ der Brachydaktylien.....	111
6.	Zusammenfassung	114
7.	Summary	116
8.	Literatur.....	118
9.	Verzeichnisse.....	129
9.1.	Abbildungsverzeichnis	129
9.2.	Tabellenverzeichnis	130
9.3.	Abkürzungsverzeichnis	130
10.	Anhang.....	132
10.1.	Lebenslauf	132
10.2.	Veröffentlichungen	133
10.3.	Kongressteilnahmen mit Poster und/oder Vortrag.....	133
10.4.	Selbstständigkeitserklärung	134

1. Einleitung

1.1. Skelett- und Extremitätenentwicklung der Vertebraten

Bei den Wirbeltieren (Vertebraten), die oft auch als Schädeltiere (Craniaten) bezeichnet werden, stellt das Skelett das zentrale und daher namensgebende Organ dar (Cuvier, 1817). Dabei erfüllt das Skelett nicht nur Stütz- und Schutzfunktionen für innere Organe oder das Nervensystem, es dient auch als Speicher für Kalzium oder Phosphat und spielt als Quelle von Hormonen eine Rolle bei Stoffwechselprozessen wie der Blutzuckerregulation. Man unterscheidet das Skelett der Vertebraten in drei Bereiche. Das craniale Skelett der Schädelknochen geht aus Neuralleistenzellen hervor, das axiale Skelett wird aus dem axialen Mesoderm (Somiten) gebildet und stellt die Komponenten der Rippen, das Brustbein sowie die Wirbelsäule. Das appendikuläre Skelett (Extremitätenskelett) schließlich entwickelt sich aus dem Seitenplattenmesoderm und bildet die Extremitäten einschließlich Schulter und Becken.

1.1.1. Humane genetisch bedingte Fingerfehlbildung Brachydaktylie

Generell handelt es sich bei Brachydaktylien um kongenitale Fehlbildungen der Extremitäten, wie schon in der Namensgebung aus dem Griechischen erkennbar ist (brachy – kurz; dactylos – Finger). Dabei resultieren Fehler in der Entwicklung der Phalangen und/oder Metacarpalia (respektive Metatarsalia) in verschiedenen Ausmaßen von verkürzten Fingern (respektive Zehen). Brachydaktylien werden meist autosomal dominant vererbt (Schwabe and Mundlos, 2004), wurden initial in 5 Gruppen eingeteilt (Bell, 1951) und später in weitere Untergruppen klassifiziert (Schwabe and Mundlos, 2004; Temtamy and Aglan, 2008; Temtamy and McKusick, 1978). Eine schematische Übersicht der in den verschiedenen Typen in unterschiedlichem Ausmaß betroffenen Fingerelemente ist in Abbildung 1 zu sehen. Dabei sind hier zusätzlich zu der aktuellen Klassifizierung die bisher identifizierten verantwortlichen Gene angegeben (Gao et al., 2001; Hamamy et al., 2006; Johnson et al., 2003; Kirkpatrick et al., 2003; Kjaer et al., 2006; Lehmann et al., 2007; Lehmann et al., 2003; Oldridge et al., 2000; Polinkovsky et al., 1997; Schwabe et al., 2000; Schwabe et al., 2004; Yang et al., 2008; Zhao et al., 2007).

Zu beachten ist die starke phänotypische Überlappung der Typen A, B und C, was auf einen funktionellen Zusammenhang der beteiligten Gene schließen lässt und im Rahmen

dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Im Falle der Brachydaktylie Typ B (BDB) wurden außer Trunkationen von Ror2 kürzlich auch Mutationen im Bmp-Antagonisten NOGGIN als Verursacher identifiziert (Lehmann et al., 2007), wobei die Patienten zusätzlich Symphalangismus, Fusionen der Carpalia/Tarsalia und Syndaktylie aufweisen. Daher wurde eine weitere Unterteilung in BDB1 (ROR2) und BDB2 (NOGGIN) vorgeschlagen.

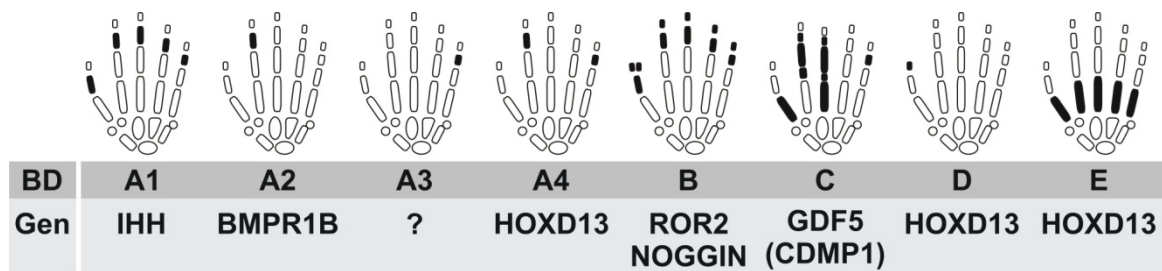


Abbildung 1: Klassifizierung der isolierten Brachydaktylien sowie betroffene Gene

Schematische Darstellung der menschlichen Hand mit Metacarpalia und den Phalangen. Die jeweils betroffenen Skelettelemente sind schwarz dargestellt. Die Klassifizierung der Brachydaktylien in Typ A-E sowie die bisher identifizierten, betroffenen Gene sind unter der jeweiligen Hand angegeben. Abbildung modifiziert nach Schwabe und Mundlos (2004) sowie Temtamy und Aglan (2008).

BD - Brachydaktylie; BMPR1B - Bmp Rezeptor 1B; GDF5 - Growth and Differentiation Factor 5 (CDMP1); HOXD13 - Homeobox Gene D13; IHH - Indian hedgehog; ROR2 - Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2

Die beteiligten Komponenten bilden zusammen eine sogenannte *“molecular disease family“*. Diesem Konzept liegt die Tatsache zugrunde, dass in Krankheiten mit überlappenden Phänotypen die beteiligten veränderten Komponenten oft auf molekularer Ebene funktional verknüpft sind (siehe auch 5.2.4).

1.1.2. Extremitätenentwicklung und Chondrogenese

Die Ausbildung des Extremitätenskeletts beginnt mit der Kondensation mesenchymaler Zellen zu knorpeligen Anlagen der Skelettelemente. Die differenzierenden Chondrozyten (Knorpelzellen) werden anschließend schrittweise in dem Prozess der endochondralen Ossifikation (Knochenbildung) durch Knochen ersetzt (zusammengefasst in Goldring et al., 2006). Somit ist der kritische Schritt bei der Pathogenese von Fingerfehlbildungen die korrekte Etablierung der initialen Kondensation aus dem frühen Mesenchym und deren Unterteilung in die einzelnen Elemente. Beim Prozess der Kondensation unterscheidet

man in verschiedene Phasen (zusammengefasst in Hall and Miyake, 2000). Den Anfang machen Zellproliferation und Zellmigration an Orten zukünftiger Skeletogenese. Wechselwirkungen zwischen Epithelien und Mesenchym führen dann zur Zellkondensation, aus welcher im anschließenden Prozess der Differenzierung zu Chondroblasten beziehungsweise Osteoblasten die finalen Skelettelemente ausgebildet werden. Dabei kann die Kondensation auf zellulärer Ebene durch die dichte Packung der Zellen, oder auf molekularer Ebene durch die Expression charakteristischer Gene definiert werden. Auf zellulärer Ebene wird die Kondensation vor allem durch Zell-Zell- sowie Zell-ECM (Extrazelluläre Matrix)-Wechselwirkungen reguliert. Eine wichtige Rolle kommt Adhäsionsmolekülen wie N-CAM und N-Cadherin zu; auf Seiten der ECM konnte bisher die Beteiligung von Komponenten wie beispielsweise Fibronectin, Proteoglycane, Tenascin, Elastin und Fibrillin gezeigt werden (zusammengefasst in Montero et al., 2008). Zu den wichtigsten primären chondrogenen Faktoren zählen die Mitglieder der TGF β -Superfamilie wie beispielsweise Tgf β , Activin, verschiedene Bmp-Liganden und Bmpr1b als wichtigster chondrogener Rezeptor. Diese sind an der Regulation des Transkriptionsfaktors Sox9 beteiligt, welcher in allen chondrogenen Vorläuferzellen exprimiert ist und als ein wichtiger Marker der frühen Chondrogenese gilt.

1.1.3. Signalzentren der Extremitätenentwicklung

Zusammen mit der eigentlichen Organogenese ist die Musterbildung der entscheidende Schritt zur korrekten Ausbildung der Extremität. Da sich diese Arbeit mit den gestörten Signalnetzwerken bei der Pathogenese der Brachydaktylie beschäftigt, wird im Folgenden kurz auf die wichtigsten Signalzentren der Handentwicklung sowie die beteiligten Signalkaskaden eingegangen.

Als erstes Anzeichen der Extremität ist eine Verdickung des Seitenplattenmesoderms zu erkennen, aus diesen Zellen bilden sich alle Strukturen mesenchymalen Ursprungs wie Knorpel und Sehnen. Die Muskeln, Nerven und Blutgefäße gehen aus einwandernden Zellen der Somiten hervor. Der grundlegende Vorgang bei der Etablierung der Extremität ist die Ausbildung der drei Primärachsen: anterior-posterior (Daumen - kleiner Finger), proximo-distal (Schulter - Finger) sowie dorsal-ventral (Handrücken - Handinnenfläche) (siehe Abbildung 2). Dabei sind die mesenchymalen Zellen der Zone der Polarisierenden Aktivität (ZPA) an der posterioren Seite für die anterior-posterior Achse verantwortlich und die apikale ektodermale Randleiste (AER) im distalen Ektoderm induziert das

proximo-distale Wachstum. Beide Signalzentren regulieren sich gegenseitig unter Beteiligung diverse Kaskaden, einzelne Komponenten sowie einige aus Störungen dieser resultierende Extremitätenfehlbildungen sind im Anschluss kurz aufgeführt

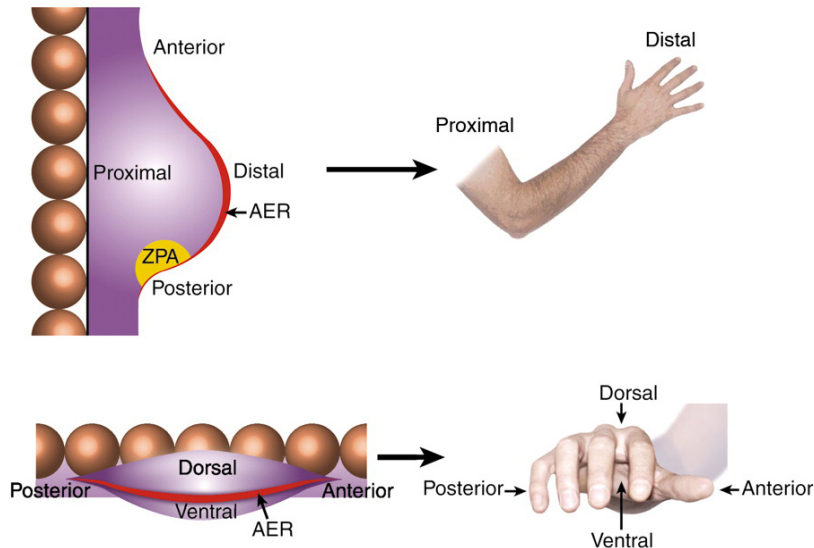


Abbildung 2: Primärachsen und Signalzentren der Extremitätenentwicklung

Die mesenchymalen Zellen der Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA) reguliert die anterior-posteriore Achse, die ektodermalen Zellen der apikalen ektodermalen Randleiste (AER) induzieren das proximo-distale Wachstum der induzierten Extremität. Die dorso-ventrale Identität positioniert indirekt die AER. Beteiligte Signalwegskomponenten im nachfolgenden Text beschrieben. Abbildung modifiziert nach Logan (2003)

1.1.4. Signalwege der Extremitätenentwicklung

Bei der Etablierung der Extremitätenidentität und Gliederung der einzelnen Elemente sind verschiedene Signalwegskaskaden beteiligt und sichern mit vielfachen Verknüpfungen untereinander das exakte Auswachsen der Extremität.

1.1.4.1. *Fibroblast Growth Factors* – der Fgf Signalweg

Die Mitglieder der Fgf-Familie sind charakteristische Komponenten der apikalen ektodermalen randleiste (AER). Fgf10 als mesenchymaler Faktor spielt eine essentielle Rolle bei der Initiation der Extremität und der Expression von Fgf8, dem Fgf10-KO (knock-out) fehlen komplett die Extremitäten (Min et al., 1998; Sekine et al., 1999). Von den 22 Mitgliedern der Fgf-Familie zeigen Fgf4, Fgf8, Fgf9 und Fgf17 eine starke Expression in der AER und nach einer Entfernung der AER kann der trunkierende Effekt

durch Applikation von Fgfs gerettet werden (Fallon et al., 1994; Niswander and Martin, 1993). Dabei gilt Fgf8 als der potenteste Ligand, da der KO als einziger einen Extremitätenphänotyp zeigt (Lewandoski et al., 1997; Moon and Capecchi, 2000). Die anderen, mehr posterior AER-exprimierten Fgfs haben zwar Fgf8-redundante Funktionen, als Hauptfunktion gilt jedoch der Rückkopplungsmechanismus mit der ZPA. Hierbei erhalten die Fgf-Liganden die Shh-Expression in der ZPA aufrecht (Chiang et al., 1996; Laufer et al., 1994), welche dann im Gegenzug über Gremlin den Bmp-Signalweg inhibiert und so die AER stabilisiert (Khokha et al., 2003; Zuniga et al., 1999). Kürzlich konnte eine Gewichtung der Signalpotenz Fgf8/Fgf4/Fgf9/Fgf17 gezeigt werden (Mariani et al., 2008). Dabei ist weniger die eigentliche Initiation der Extremität betroffen, vielmehr spielen die Fgfs eine wesentliche Rolle bei Sicherung des Überlebens der Zellen. So führt das Entfernen von Fgf4 und Fgf8 zu ektopter mesenchymaler Apoptose und resultiert im Fehlen der Extremitäten (Boulet et al., 2004). Diese Regulation der Zellproliferation und der Zellexistenz erfolgt in enger Zusammenarbeit mit dem Wnt-Signalweg und sichert so das proximo-distale Wachstum der Extremität (Ten Berge et al., 2008). Ergänzend zu Extremitätenfehlbildungen bei Mutationen in den Fgf-Liganden resultieren Veränderungen bei den Fgf-Rezeptoren in teils schweren Skelettfehlbildungen (Chen et al., 1999; Li et al., 1999; Xu et al., 1998; Zhou et al., 2000).

1.1.4.2. *Sonic und Indian Hedgehog* – der Hh Signalweg

Sonic Hedgehog (Shh) gilt als zentraler Marker der ZPA und reguliert über den Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie früh die anterior-posteriore Identität der Extremität und zusätzlich über den Bmp-Signalweg die Aufrechterhaltung AER (zusammengefasst in Robert and Lallemand, 2006). Eine Inversion im Shh-Lokus resultiert aufgrund mißregulierter Expression in einer Brachydaktylie (Niedermaier et al., 2005) und ektope Shh-Expression führt zu verschiedenen Formen der Polydaktylie (zusammengefasst in Hill et al., 2003).

Indian Hedgehog (Ihh) wird später im Laufe der Extremitätenentwicklung exprimiert und übernimmt wichtige Funktionen in der Regulation der Chondrozytendifferenzierung (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996). So induziert Ihh aus den prähypertrophen Chondrozyten die Expression von *Parathyroid Hormone related Protein* (PTHrP) im periartikulären Perichondrium, welches dann über den Rezeptor PTHR die Differenzierung der Chondrozyten sowie die Expression von *Ihh* selbst inhibiert. Mit diesem negativen Rückkopplungsmechanismus wird die Proliferation und

Differenzierung der Chondrozyten reguliert. Auch kontrolliert Ihh die Osteoblastendifferenzierung über den Transkriptionsfaktor Runx2 (St-Jacques et al., 1999) und es bestehen funktionelle Verknüpfungen sowohl mit dem Bmp- als auch dem Fgf- und Wnt-Signalweg (Mak et al., 2006; Minina et al., 2002).

Mutationen in IHH verursachen BDA1 (Gao et al., 2001) oder Acrocapitofemorale Dysplasie inklusive Brachydaktylie (Hellemans et al., 2003); im Ihh-KO resultieren Störungen in der Proliferation und Maturation der Chondrozyten in verkürzten und fusionierten Fingerelementen (St-Jacques et al., 1999). Ergänzend zu den Mutationen in den Hh-Liganden selber führen auch Mutationen in den Komponenten Smoothed und Patched-1 zu Störungen des Längenknochenwachstums (Long et al., 2001; Mak et al., 2006). Störungen bei den Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie äußern sich in vielen Variationen von Extremitätenfehlbildungen, speziell Polydaktylien (Park et al., 2000; Wang et al., 2007a; Wang et al., 2007b).

1.1.4.3. *Bone morphogenetic proteins* – der Bmp Signalweg

Bei Mitgliedern der Proteinfamilie *bone morphogenetic proteins* (BMP) handelt es sich um osteoinduktive Faktoren aus TGF β -Superfamilie. Zusätzlich zu der namensgebenden „knochen-gestaltenden“ Funktion erfüllen diese Proteine eine Vielzahl an Funktionen im Laufe der embryonalen Extremitätenentwicklung, wie beispielsweise bei der Chondrogenese, Etablierung der Fingeranzahl und Fingeridentität, interdigitalen Apoptose und Gelenkentwicklung (zusammengefasst in Robert, 2007; Wu et al., 2007). Nachdem die N-terminale Prodomäne vom Protein abgespalten wurde, binden Bmp-Liganden an Hetero- bzw. Homodimere aus drei hoch-affinen Typ1 Bmp-Rezeptoren (ALK2, ALK3, ALK6) und drei Typ2 Bmp-Rezeptor (BMPRII, ActRIIA, ActRIIB). Dies resultiert in der Transphosphorylierung des Typ1-Rezeptors durch den Typ2-Rezeptor und in der Signaltransduktion via Smad-Transkriptionsfaktoren (bei präformierten Rezeptorkomplexen) oder via MAPK (bei Liganden-induzierten Rezeptorkomplexen). An der Regulierung des Bmp-Signalweges sind eine Vielzahl an Antagonisten beteiligt (zusammengefasst in Gazzo and Canalis, 2006). Man unterscheidet hierbei in extrazelluläre Antagonisten (Noggin, Chordin-Familie, Twisted gastrulation, Dan-Familie), membranständige Pseudorezeptoren (Bambi), inhibitorische Smads (Smad 6 und 7) sowie weitere intrazelluläre Proteine (Ski, Top, Smurf).

Aufgrund der multiplen Funktionen der Bmp-Komponenten in Knochen/Knorpel- und Extremitätenentwicklung resultieren Mutationen in Liganden, Rezeptoren und

Antagonisten in einer Vielzahl an Phänotypen. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit erwähnenswert sind dabei vor allem die humanen Fehlbildungen BDA2 (Mutation in *BMPR1B*), BDB2 (Mutation in *NOGGIN*) und BDC (Mutation in *GDF5*) (siehe Abbildung 1). Über gemeinsam genutzte Komponenten, direkte Interaktionen der intrazellulären Effektormoleküle oder multiple Rückkopplungsmechanismen ist der Bmp-Signalweg eng mit der Fgf-, Hh- und Wnt-Signaltransduktion verknüpft. So kann beispielsweise Smad7 in verschiedenen Geweben durch direkte Bindung an β -Catenin dieses sowohl über Verdrängung der GSK3 stabilisieren (Tang et al., 2008), als auch mittels Rekrutierung der E3-Ligase degradieren (Han et al., 2006).

1.1.4.4. Kanonischer und nicht-kanonische Wnt Signalwege

Die nach ihren Gründungsmitgliedern *Wingless* (*Drosophila* Wnt1-Ortholog) und *Int-1* (Maus Wnt1) benannten, im Tierreich von Schwämmen bis zu den Vertebraten hoch konservierten Wnt-Liganden spielen eine essentielle Rolle in der Induktion und Musterbildung der Extremität. So regulieren sie Differenzierung mesenchymaler Zellen in Chondrozyten oder Osteoblasten und werden zur Aufrechterhaltung und eventuell Induktion der Gelenke benötigt (Hartmann and Tabin, 2001; Spater et al., 2006). Wnt-Liganden (Wnt2b, Wnt8c) aus dem intermediären und lateralen Mesoderm induzieren über die Transkriptionsfaktoren Tbx4/Tbx5 die Fgf-Expression und steuern so die Ausbildung der initialen Extremität. Die Fgf10-induzierte Expression von *Fgf8* wird von Wnt3 (Maus) beziehungsweise Wnt3a (Hühnchen) vermittelt und die von Engrailed-1 dorsal begrenzte Expression von *Wnt7a*, *Lmx1* und *Radical Fringe* erzeugt die dorso-ventrale Achse und positioniert so indirekt die AER (Johnson and Tabin, 1997; Loomis et al., 1996; Parr and McMahon, 1995).

Mutationen in *WNT3*, *WNT7A*, *WNT10A* und *WNT10B* resultieren in teils schweren Extremitätenfehlbildungen (Adaimy et al., 2007; Niemann et al., 2004; Ugur and Tolun, 2008; Woods et al., 2006; Yamaguchi et al., 1999); bei Wnt-Rezeptoren der LRP-Klasse (low density lipoprotein) äußern sich Mutationen vor allem in veränderter Knochendichte (Boyden et al., 2002; Gong et al., 2001; Little et al., 2002). Ebenso führt sowohl eine Überaktivierung als auch ein Entfernen des Wnt-Effektors β -Catenin zu Trunkationen der Extremitäten (Barrow et al., 2003; Hill et al., 2006; Soshnikova et al., 2003), was die immense Bedeutung dieses Signalwegs in der Extremitätenentwicklung nochmals verdeutlicht. Ein ausführlicher Überblick über Phänotypen der verschiedensten Wnt-

Mutanten und Manipulationen in Wnt-Signalwegs-Komponenten ist in mehreren Reviews gegeben (Grigoryan et al., 2008; Liu et al., 2008a; van Amerongen and Berns, 2006).

Die Mitglieder der Wnt-Familie wurden ursprünglich aufgrund ihres Potential zur Zelltransformation in Brustepithelzellen (Wong et al., 1994) und dem Potential zur Achseninduktion in *Xenopus* (McMahon and Moon, 1989) in kanonische oder nicht-kanonische Wnt-Liganden klassifiziert. In den letzten Jahren verwischte diese Unterteilung immer mehr und es konnten alternative Wnt-Rezeptoren (z.B. Ror2), die Abhängigkeit vom Rezeptorkontext, multiple Funktionen einzelner Wnt-Liganden oder die Beteiligung zusätzlicher Adaptoren gezeigt werden. Obwohl die Art der Signalantwort also mehr von anderen Faktoren als von der Klassifizierung der Liganden abhängt, wird immer noch die Bezeichnung *kanonisch* für β -Catenin-vermittelten und *nicht-kanonisch* für alle anderen, β -Catenin-unabhängigen Arten der Wnt-Signaltransduktion verwendet. Die am besten untersuchten Signalwege inklusive beteiligter Komponenten sind in Abbildung 3 dargestellt.

Bei dem bisher am ausführlichsten charakterisierten **kanonischen** Signalweg (Abbildung 3 B) induziert die Bindung des Wnt-Liganden an Rezeptoren der Fzd(Frizzled)- und LRP5/6(Low density lipoprotein)-Klasse die Rekrutierung der Komponenten Dishevelled und Axin an die Membran und resultiert in einer Phosphorylierung und Aktivierung von LRP6. Dies führt zur intrazellulären Stabilisierung und nukleären Translokation des Effektormoleküls β -Catenin, welches dann die Tcf/Lef-vermittelte Transkription induziert (zusammengefasst in Cadigan, 2008; Huang and He, 2008). Ohne Liganden-Stimulus wird β -Catenin im Komplex mit Dishevelled (Dvl), Axin und APC (adenomatous polyposis coli) durch die Kinasen GSK3 und CK1 α nahe dem N-Terminus phosphoryliert, somit für die Ubiquitin-E3-Ligase β -Trcp markiert und proteasomal degradiert (Abbildung 3 A). Eine essentielle Funktion bei der Signaltransduktion spielt dabei die Membranlokalisation der Komponenten Dvl und Axin. Diese Gerüstproteine können über Frizzled (Dvl) oder LRP (Axin) an die Membran lokalisieren und sind in verschiedensten Systemen im Zusammenhang mit Wnt-Aktivierung beschrieben.

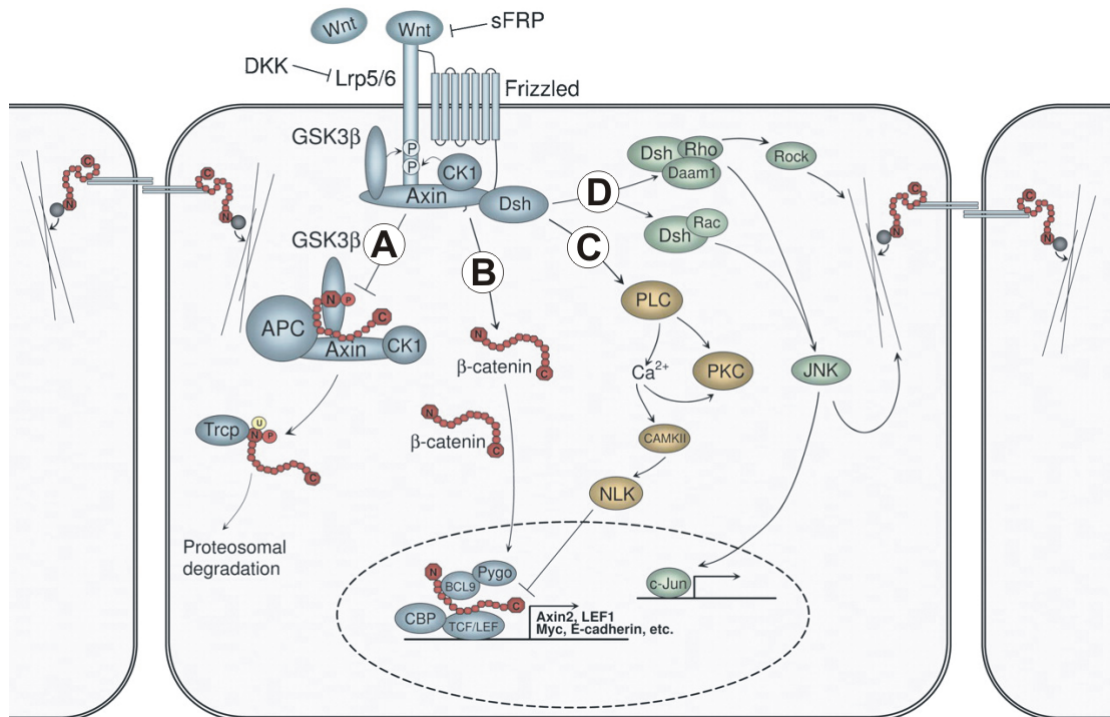


Abbildung 3: Übersicht über kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Signalwege

Wnt-Liganden binden an Rezeptoren der LRP (low density lipoprotein) und Frizzled-Klasse. Eine generelle Regulation der Wnt-Signaltransduktion erfolgt über sezernierte Antagonisten der Dkk-Familie und Sfrp-Familie. (A) Ohne Ligand wird β -Catenin im Abbaukomplex phosphoryliert und proteasomal degradiert (B) Beim kanonischen Wnt-Signalweg resultiert der Ligandenstimulus über Phosphorylierung von LRP und Rekrutierung von Axin und Dvl in der Stabilisierung und nukleärer Translokation von β -Catenin, gefolgt von einer Induktion der Tcf/Lef-vermittelten Transkription. (C, D) Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege verlaufen unabhängig von β -Catenin und unter Beteiligung der zentralen Komponente Dvl. Bisher gut charakterisiert sind (C) der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg sowie (D) der Wnt/PCP-Signalweg. Ausführliche Erklärung der einzelnen Kaskaden im Text. Abbildung modifiziert nach Grigoryan (2008).

Bei der **nicht-kanonischen**, β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signaltransduktion unterscheidet man unter anderem grob in Wnt/PCP-Signalweg (Abbildung 3 D) sowie Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg (Abbildung 3 C) (zusammengefasst in Semenov et al., 2007)). Beim in *Drosophila* entdeckten Vorgang der *planar cell polarity* (PCP) ordnen sich Zellen des Epithels rechtwinklig zur apikal-basalen Zellachse an. Vergleichbare Komponenten spielen in Vertebraten bei den gerichteten Zellbewegungen der Gastrulation eine essentielle Rolle; man spricht in diesem Fall von *convergent extension* (CE). Nach Ligandenbindung an Frizzled-Rezeptoren erfolgt beim Wnt/PCP-Signalweg die

Signaltransduktion über Dvl und kleine GTPasen (Rac und Rho) und resultiert unter anderem in der Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK). Beim Wnt/Ca²⁺-Signalweg wird über G-Proteine der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel angehoben, was in der Aktivierung der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) und der Proteinkinase C (PKC) resultiert. Als Effektoren sind hier unter anderem die *nemo-like kinase* (NLK) und die Transkriptionsfaktoren NF-AT oder ATF2 beschrieben. Generell erfolgt die nicht-kanonische Signaltransduktion also unabhängig von β -Catenin und LRP aber unter Beteiligung der zentrale Komponente Dvl. Viele der bisher analysierten Funktionen sind mit der Umbildung des Cytoskeletts und daraus resultierenden Zellpolaritäten oder Zellbewegungen verknüpft.

Zusätzlich zu Liganden und Rezeptoren wird eine weitere Stufe der Komplexität durch die Anwesenheit von Antagonisten und extrazellulären Adaptermolekülen hinzugefügt. So interagieren die sezernierten Antagonisten der Familie der *secreted frizzled-related proteins* (Sfrp) sowie *Wif1* direkt mit Wnt-Molekülen und inhibieren sowohl kanonisch als auch nicht-kanonische Signaltransduktion. Mitglieder der *Dickkopf* (Dkk)-Familie binden dagegen an die LRP-Rezeptoren und inhibieren so vor allem den kanonischen β -Catenin-Signalweg. Die Vielseitigkeit des Signalwegs sowie die immense Bedeutung des Rezeptorkontextes wird auch auf der Ebene der Antagonisten klar. So kann der Antagonist *Dkk2* zusammen mit LRP5/6 den Wnt-Signalweg auch aktivieren (Brott and Sokol, 2002; Li et al., 2002; Wu et al., 2000) ebenso wie *Sfrp1* zusammen mit Frizzled 2 (Uren et al., 2000). Auch bei den Antagonisten können Mutationen zu Fehlbildungen des Skelettapparates führen. So zeigt beispielsweise der *Sfrp2*-KO in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund Syndaktylie sowie präaxiale Synpolydaktylie (Ikegawa et al., 2008) oder Brachy-Syndaktylie mit verkürzten Fingerelementen (Morello et al., 2008). Im Doppel-KO *Sfrp1/Sfrp2* verstärkt sich dieser Phänotyp zu einer BD mit fehlenden Mittelphalangen (Satoh et al., 2006).

1.1.4.5. Dishevelled als zentrale Komponente des Wnt-Signalwegs

Ursprünglich in *Drosophila* identifiziert existieren in Vertebraten 3 Isoformen von Dishevelled (Dvl) mit teils redundanten Funktionen. Dvl ist in vielen Prozessen im Zusammenhang mit gerichteter Zellbewegung oder Orientierung beteiligt, wie beispielsweise gerichtete Zellteilung, Gastrulation und Neurulation. Das besondere Merkmal von Dvl ist die Beteiligung am kanonischen Wnt-Signalweg sowie dem PCP und Wnt/Ca²⁺-Signalweg (zusammengefasst in Wallingford and Habas, 2005). Somit

stellt Dvl eine zentrale Komponente und Schaltstelle zwischen den einzelnen Kaskaden dar. Strukturell unterscheidet man in eine N-terminale DIX-Domäne (Dishevelled/Axin), gefolgt von der PDZ-Domäne (PSD-95, DLG, ZO1) und einer DEP-Domäne (Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin). Während die DIX- und die PDZ-Domäne überwiegend mit dem kanonischen Wnt-Signalweg in Verbindung gebracht werden und die PDZ- und die DEP-Domäne für PCP- und Wnt/Ca²⁺-Signaltransduktion verantwortlich sind, ist eine Funktion des hoch konservierten C-Terminus von Dvl noch weitgehend unklar. Die Bedeutung von Dvl wird auch beim Blick auf die über 30 bisher identifizierten Interaktionspartner klar. Dies unterstreicht die Rolle von Dvl als Mediator zwischen verschiedenen Signalwegen.

1.2. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 – Ror2

1.2.1. Klassifizierung und Konservierung von Ror2

Bei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) handelt es sich um transmembrane Oberflächenrezeptoren, welche an der Regulation zellulärer Vorgänge wie Zellzyklus, Zellmigration, Apoptose, Differenzierung und Proliferation beteiligt sind. Dabei folgt einer extrazellulären Ligandenbindung in den meisten Fällen eine Dimerisierung und Autophosphorylierung der RTK (Schlessinger, 1988; Schlessinger, 2000). Durch Konformationsänderungen werden intrazelluläre Bindungsstellen für Adaptoren und Signalmoleküle zugänglich und es erfolgt Weiterleitung des Signals (Pawson and Schlessingert, 1993).

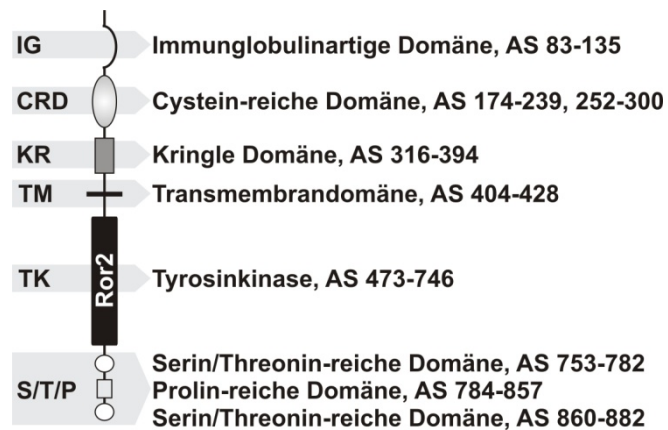
Die beiden Mitglieder der ROR-Familie, *ROR1* und *ROR2*, wurden in einer PCR-basierten Suche nach Trk-ähnlichen Kinasen in menschlichen Neuroblastom-Zellen identifiziert, woraus die initiale Bezeichnung *neurotrophic tyrosine kinase receptor* (NTRKR 1 und 2) resultierte. Aufgrund von Aminosäurehomologie und Vergleichen mit anderen RTK wurden Ror1 und Ror2 anschließend einer eigenen Proteinfamilie zugeordnet (Masiakowski and Carroll, 1992). Die Ror-Familie bildet somit mit der MuSK (*muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase*) und Nrk (*neuro-specific receptor kinase*)-Familie, der Ddr-Familie (*discoidin domain receptor*) und der Ntrk- oder Trk-Familie (*tropomyosin-related kinase*) die NTRK-Superfamilie (zusammengefasst in Green et al., 2008b). Die beiden Mitglieder Ror1 und Ror2 erfüllen dabei zumindest teilweise

redundante Funktionen, wie bei der Herz- und Skelettentwicklung der Maus gezeigt werden konnte (Nomi et al., 2001).

Ror2-Proteine sind im Tierreich hoch konserviert, Orthologe konnten bisher in verschiedenen Spezies identifiziert werden. So besitzen *Drosophila melanogaster* (Wilson et al., 1993), *Caenorhabditis elegans* (Forrester et al., 1999) und *Aplysia californica* (McKay et al., 2001b) jeweils nur ein Ror-Protein. Im Falle von *Drosophila* wird die RTK *Dnrk* mit Ähnlichkeiten zu Trk- und Ror-Kinasen neuerdings zu der Familie der MuSK gezählt (Sossin, 2006). In *Danio rerio* (Katoh, 2005; Katoh and Katoh, 2005), *Xenopus laevis* (Hikasa et al., 2002) und *Mus musculus* (Oishi et al., 1999) wurden beide Paraloge beschrieben.

1.2.2. Modularer Aufbau von Ror2

Ror2-Proteine sind wie andere RTK aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Dieser modulare Aufbau, die Lokalisation der einzelnen Domänen sowie die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen der Domänen sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Der extrazelluläre Teil von Ror2 setzt sich aus einer N-terminalen Immunglobulinartigen Domäne (IG), einer Cystein-reichen Domäne (CRD) und der membrannahen Kringle Domäne (KR) zusammen. Nach der Transmembran-Domäne (TM) folgt die intrazelluläre Tyrosinkinase (TK) sowie zwei Serin/Threonin-reiche Bereiche (S/T), getrennt von einer Prolin-reichen Domäne (P). Die IG weist Ähnlichkeiten mit den Immunglobulin-Domänen der FGF-Rezeptoren auf (Masiakowski and Carroll, 1992) und ist wahrscheinlich an Protein-Protein Interaktionen beteiligt (Wiesmann et al., 2000). Die CRD Domäne, welche aufgrund ihrer Homologie zu Frizzled-Rezeptoren auch als Frizzled-artige Domäne bezeichnet wird (Masiakowski and Yancopoulos, 1998; Rehn et al., 1998; Saldanha et al., 1998), wurde im Zusammenhang mit der Bindung von Wnt-Liganden und Rezeptor-Dimerisierung (Oishi et al., 2003) beschrieben. Die KR-Domäne vermittelt wahrscheinlich ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen (Patthy et al., 1984) und ist zusammen mit den C-terminalen S/T/P-reichen Domänen einzigartig für Ror-RTKs. Die S/T/P-Domänen von Ror2 stellen eine wichtige Bindungsplattform für intrazelluläre Effektorproteine und somit für die Signaltransduktion dar und stehen somit im Fokus dieser Arbeit (siehe Abbildung 6).

**Abbildung 4: Aufbau von Ror2**

Ror2 zeigt einen modularen Aufbau aus einzelnen Domänen. Die extrazellulären Domänen dienen vor allem der Interaktion mit Liganden und Rezeptoren. Neben der intrazellulären Kinase-Domäne ist der Serin/Threonin/Prolin-reiche C-Terminus charakteristisch für Ror2.

Dieser modulare Aufbau gilt für alle Ror-Proteine der Wirbeltiere. So fehlt in *C.elegans* dem orthologen Cam-1 die C-terminale Serin/Threonin-reiche Domäne sowie die Prolin-reiche Domäne (Forrester et al., 1999). Zusätzlich weist Cam-1 in Struktur und Funktion Ähnlichkeiten zu MuSK-Rezeptoren der Vertebraten auf, was eventuell auf eine Doppelfunktion von Cam-1 hindeutet. In *Drosophila* fehlt dem dRor sogar der komplette C-terminale Bereich (Wilson et al., 1993). Zusammengenommen unterstreicht dies nochmals die zentrale Bedeutung der C-terminalen Domänen im Ror2 der Vertebraten, welche im Fokus dieser Arbeit steht.

1.2.3. Die Rolle von Ror2 in der Skelettentwicklung und bei humanen genetisch bedingten Fehlbildungen

Ror2 spielt eine essentielle Rolle bei der Skelettentwicklung der Vertebraten, was sowohl im Mausmodell als auch am Menschen ersichtlich ist. So zeigen Ror2-defiziente Mäuse neben einer generell geringerer Körpergröße vor allem verkürzte Extremitäten, wobei die proximalen Elemente schwerer betroffen sind als die distalen (Takeuchi et al., 2000). Zusätzlich wurde eine Verkürzung des Schwanzes, Fehlbildungen im Gesichtsbereich sowie an Wirbelkörpern und Rippen nachgewiesen. Im homozygoten Fall werden die Tiere kurz nach der Geburt cyanotisch und versterben vermutlich aufgrund Alveolendefekten und Fehlern bei der Ausbildung des ventrikulären Septums. Dieser Phänotyp verstärkt sich nochmals bei einer Verkreuzung mit dem Ror1-Knockout, was die Redundanz der beiden Proteine verdeutlicht (Nomi et al., 2001).

Beim Menschen sind verschiedene Mutationen von *ROR2* im Zusammenhang mit den beiden genetisch bedingten Fehlbildungen Robinow Syndrome (RS; OMIM 268310; (Afzal et al., 2000; van Bokhoven et al., 2000) und Brachydactylie Typ B (BDB; OMIM 113000; (Oldridge et al., 2000; Schwabe et al., 2000) beschrieben. Die im

Folgenden diskutierten Mutationen mit ihrer Lage und Auswirkung auf den Rezeptor sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

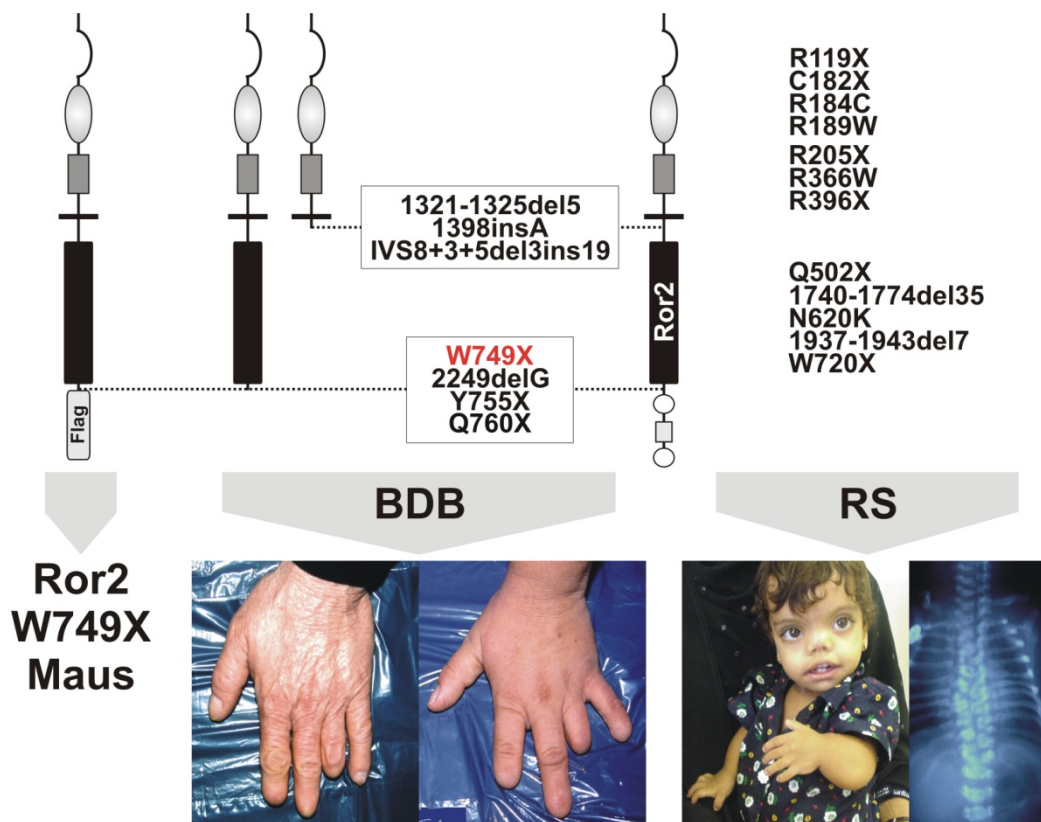


Abbildung 5: Mutationen in ROR2 verursachen rezessives Robinow Syndrom (RS) und dominante Brachydaktylie Typ B (BDB)

Schematische Darstellung der Position und Auswirkung von in RS und BDB resultierenden Mutationen in Ror2. Die RS-verursachenden Mutationen sind über die gesamte Proteinsequenz verstreut und führen zur Degradation des Proteins („loss-of-function“). Die BDB-verursachenden Mutationen konzentrieren sich auf zwei Bereiche und trunkieren das Protein entweder vor oder direkt nach der Tyrosinkinase. Für BDB wird ein Funktionsgewinn („gain-of-function“) von Ror2 vermutet. Für die distale Trunkation wurde mittels einer Flag-getaggten Isoform die Ror2W749X-Maus generiert und im Rahmen dieser Arbeit analysiert (siehe 4.1).

Beim rezessiv vererbten RS handelt es sich um eine variable Fehlbildung, bei der Kleinwuchs, Verkürzung der Gliedmaßen, Fusionen der Wirbelkörper, Brachydaktylie, urogenitale Fehlbildungen sowie charakteristische Malformationen im Gesichtsbereich („fetal face“) auftreten. Die verantwortlichen Mutationen im ROR2 sind über die gesamte Sequenz des Proteins verstreut und führen zu einer ER-vermittelten Degradation

des Proteins (Chen et al., 2005). Somit resultieren im RS Missense-, Nonsense- oder Frameshift-Mutationen in einem Funktionsverlust („*loss-of-function*“) des Proteins. Dagegen wird für die dominant vererbte BDB ein Funktionsgewinn („*gain-of-function*“) von ROR2 vermutet. BDB manifestiert sich im Fehlen bzw. Hypoplasie der distalen Phalangen in Kombination mit Nageldysplasie, Hypoplasie der mittleren Phalangen sowie in manchen Fällen Symphalangismus und Syndaktylie. Bei BDB führen Insertionen, Deletionen oder Nonsense-Mutationen zu einem vorzeitigen Stop-Codon und somit zu einer Trunkation des Rezeptors. Interessanterweise konzentrieren sich alle bisher gefundenen BDB-verursachenden Mutationen auf zwei Bereiche in *ROR2* und trunkieren das Protein entweder direkt vor der TK-Domäne oder direkt danach (Abbildung 5). Dabei resultiert die distale Trunkation in einer deutlich schwereren Ausprägung des Krankheitsbildes. Das im Rahmen dieser Arbeit analysierte Modell der *Ror2*^{W749X}-Maus spiegelt diese distale BDB-Trunkation wieder (siehe Abbildung 5).

1.2.4. Interaktionspartner von Ror2 und Ror2-vermittelte Signaltransduktion

Der Namenszusatz „*orphan*“ (engl.: herrenlos, verwaist) spiegelte ursprünglich das fehlende Wissen über Ror2-vermittelte Signaltransduktion wieder. In den letzten Jahren wurden vermehrt Bindungspartner von Ror2 identifiziert und auch Einblicke in Ror2-induzierte Signalweiterleitung gewonnen, jedoch liegen viele Aspekte noch immer im Dunkeln. Im Folgenden wird eine Übersicht über bisher identifizierte Interaktionspartner (Abbildung 6) und Ror2-beeinflußte Kaskaden (Abbildung 7) gegeben; mit Ausnahme des detailliert beschriebenen Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs sind die einzeln beteiligten Komponenten oder Mechanismen jedoch oft noch unklar.

Um zu Anfang einen Überblick über beteiligte Komponenten zu schaffen, sind in Abbildung 6 schematisch die bekannten Interaktionspartner von Ror2 dargestellt, welche zusammen mit den funktionellen Daten im nächsten Abschnitt genauer beschrieben werden. Generell ist hier folgende Situation rund um Ror2 zu erkennen: (I) Ror2 kann Liganden der Wnt-Familie und eventuell Gdf5 binden. (II) Ror2 kann als Corezeptor über die CRD-Domäne mit den Wnt-Rezeptoren der Frizzled-Klasse oder *Bmpr1b* agieren. (III) Die überwiegende Mehrheit der intrazellulären Bindungspartner interagieren mit Ror2 über die C-terminale S/T/P-reiche Domäne. Somit stellt sich Ror2 als potentielle Schnittstelle verschiedener Signalwegskaskaden dar, was auch bei der Betrachtung der bisher bekannten funktionellen Daten klar wird.

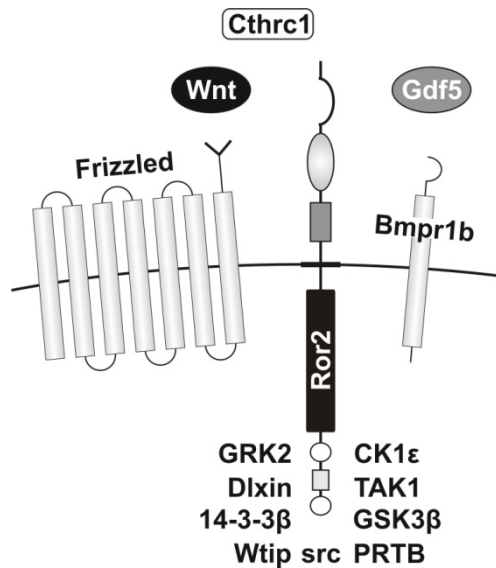


Abbildung 6: Ror2 als Schnittstelle zwischen verschiedenen Kaskaden

Übersicht über bisher beschriebene Interaktionspartner von Ror2. Ror2 kann Liganden der Wnt-Familie und eventuell Gdf5 binden sowie als Corezeptor mit Wnt-Rezeptoren der Frizzled-Klasse oder Bmpr1b agieren. Die intrazellulären Bindungspartner interagieren fast ausschließlich über die C-terminale S/T/P-reiche Domäne mit Ror2. Erklärung der einzelnen Komponenten im Text.

Die meisten der bisher beschriebenen Signalwege beziehen sich auf die Rolle von Ror2 als (Co)Rezeptor für Liganden der Wnt-Familie. So interagiert Ror2 in verschiedenen Systemen mit Wnt1, Wnt3, Wnt5a, Wnt8 und Wnt11 (Billiard et al., 2005; Hikasa et al., 2002; Oishi et al., 2003; Winkel et al., 2008) sowie den Wnt-Rezeptoren Frizzled2 (Li et al., 2008; Oishi et al., 2003) Frizzled7 (Hikasa et al., 2002). Die Literaturlage zu Signalwegen unter Beteiligung von Ror2 ist in Abbildung 7 schematisch zusammengefasst und im Folgenden kurz beschrieben.

Als einfachster vorstellbarer Ror2-vermittelter Mechanismus konnte ein Abfangen der Liganden in *C.elegans* (Green et al., 2007; Kim and Forrester, 2003) und menschlichen Osteoblasten (Billiard et al., 2005) gezeigt werden (Abbildung 7 A). Hierbei ist für den inhibitorischen Effekt von Ror2 nur der membranständige extrazelluläre Bereich (CRD-Domäne) zur Liganden-Interaktion notwendig. Beim in Zellbewegungen von *Xenopus* entdeckten und bisher am besten beschriebenen Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg (Abbildung 7 B) führt ein Wnt5a-Stimulus über Ror2 zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), Cell division cycle 42 (Cdc42) und c-Jun N-terminal kinase (JNK alias Mapk8) und über die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2 zur Expression von Paraxialem Protocadherin (XPAPC) (Schambony and Wedlich, 2007). Ein ebenfalls klar beschriebener Effekt ist die Inhibition des β -Catenin-vermittelten Wnt-Signalweg (Mikels and Nusse, 2006; Oishi et al., 2003). Nach Wnt5a-Stimulus kann Ror2 in Abhängigkeit vom Rezeptorkontext die Wnt3a-induzierte Wnt-Antwort inhibieren (Abbildung 7 C). Hierbei handelt es sich nicht um ein einfaches

Abfangen der Liganden, da intrazellulär trunkierte Formen von Ror2 ein leicht vermindertes inhibitorisches Potential aufweisen. Als einziger Effekt aus einer anderen Kaskade ist der inhibitorische Effekt von Ror2 auf Bmpr1b-vermittelte Smad-Signalweiterleitung beschrieben (Sammar et al., 2004). Hierbei lokalisiert Ror2 im Komplex mit Bmpr1b an der Membran in unlöslichen sogenannten Mikrodomänen (Sammar et al., 2009), wird dort von diesem transphosphoryliert und hemmt so die Gdf5-induzierte Smad1/5/8-vermittelte Chondrogenese (Abbildung 7 D). Des Weiteren ist Ror2 auch an der Ausbildung von Filopodien und somit an der Zellmigration beteiligt. (Abbildung 7 E). Eine einfache Überexpression von Ror2 resultiert in verschiedensten Zellen in einer starken Induktion der Filopodienformation (Akbarzadeh et al., 2008; Nishita et al., 2006) und nach Wnt5a-Stimulus unter Beteiligung von GSK-3-phosphoryliertem Ror2, JNK, PKC ζ , sowie Filamin-A zur Induktion der Zellmigration (Nishita et al., 2006; Nomachi et al., 2008; Yamamoto et al., 2007). Im Zuge des PCP-Signalwegs ist Ror2 an der Wnt-induzierten Etablierung der Zellpolarität beteiligt (Abbildung 7 F). So reguliert Ror2 im Innenohr von Vertebraten zusammen mit Frizzled-Rezeptoren und dem extrazellulären Adapterprotein Cthrc-1 die Orientierung der für die Hörleistung essentiellen sensorischen Haarzellen (Yamamoto et al., 2008). In *C.elegans* ist Cam-1 zusammen mit dem Transmembranprotein Van Gogh (ebenfalls eine Komponente des PCP-Signalwegs) an der Orientierung von Vulva-Vorläuferzellen beteiligt (Green et al., 2008a). Des Weiteren führt eine Wnt5a-induzierte Dimerisierung von Ror2 zur Autophosphorylierung und über die Inhibition des Gerüstproteins 14-3-3 β zur Aktivierung der Knochenbildung (Abbildung 7 G) (Liu et al., 2007; Liu et al., 2008b). Abschließend sind in Bezug auf Ror2-vermittelte Wnt-Signaltransduktion verschiedenste Auswirkungen beschrieben, verdeutlicht in Abbildung 7 H. So kann Ror2 neben der schon beschriebenen Inhibition des β -Catenin-abhängigen Signalwegs diesen auch als Antwort auf Wnt1 oder Wnt3a-Stimulus induzieren (Billiard et al., 2005; Li et al., 2008). Diese Komplexität wird auch beim intrazellulären Interaktionspartner TAK1 deutlich (Winkel et al., 2008). Hier stabilisiert die Bindung von Wnt3a oder Wnt5a die Interaktion von Ror2/TAK1 zusammen mit PRTB, was über Tyrosin- sowie Serin/Threonin-Phosphorylierungen der RTK zur Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs führt. Dagegen resultiert eine Bindung von Wnt1 an Ror2 in einer Verdrängung der Komponenten Tak1 und PRTB, verhindert die Phosphorylierungen und induziert so die β -Catenin-abhängige Signalantwort.

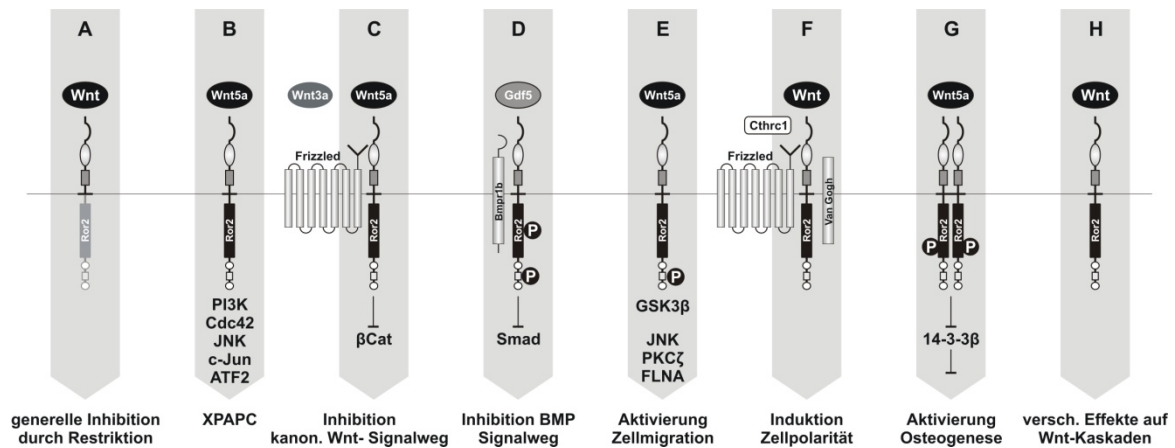


Abbildung 7: Ror2-vermittelte Signalwege

Schematische Übersicht über bisher beschriebene Signaltransduktionen unter Beteiligung von Ror2; detaillierte Erklärung der einzelnen Kaskaden und Komponenten im Text.

(A) Ror2 kann Wnt-Liganden abfangen und so die Weiterleitung inhibieren. (B) Wnt5a-Stimulus führt über Ror2 und die Komponenten PI3K, Cdc42, JNK, c-Jun und ATF2 zur Expression von XPAPC oder kann (C) in Abhängigkeit vom Rezeptorkontext die kanonische Wnt-Antwort inhibieren. (D) Ror2 hemmt im Komplex mit BmpR1b die Gdf5-induzierte Smad-Transduktion und ist (E) im Zusammenspiel mit weiteren Komponenten an der Wnt-induzierten Filopodienformation und Zellmigration beteiligt. (F) Ror2 reguliert in verschiedenen Systemen im PCP-Signalweg zusammen mit anderen Komponenten die Zellpolarität und kann (G) nach Wnt5a-induzierter Dimerisierung die Knochenbildung induzieren. (H) Desweiteren kann Ror2 verschiedene Wnt-Kaskaden sowohl positiv als auch negativ beeinflussen.

Neben den hier dargestellten Funktionen von Ror2 sind noch weitere Interaktionspartner und Ror2-vermittelte Effekte beschrieben, wobei die biologische Relevanz oft noch unklar ist. So binden die Casein-Kinase 1 ϵ (CK1 ϵ) an der S/T/P-reiche Domäne von Ror2 (Kani et al., 2004) und induziert Serin/Threonin-Phosphorylierung als auch Tyrosin-Autophosphorylierung der RTK, was anschließend in der Phosphorylierung des Ror2-Bindungspartners G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) resultiert. Auch kann Ror2 via die S/T/P-Domäne Dlxin-1 an die Membran rekrutieren (Matsuda et al., 2003) und interferiert so indirekt mit dem transkriptionellen Potential des Dlxin-interagierenden Msx2. Kürzlich konnte eine Interaktion der S/T/P-reichen Domäne von Ror2 mit der intrazellulären Src-Proteinkinase gezeigt werden (Akbarzadeh et al., 2008), welche nach der Wnt5a-induzierten Internalisierung des Rezeptors für die Aktivierung von Ror2 benötigt wird.

Generell bleibt hier anzumerken, dass das Wissen um Ror2-vermittelte Signaltransduktion vor allem im Detail noch große Lücken aufweist. So kristallisierte sich in der letzten Zeit zwar die immense Bedeutung des Rezeptorkontextes oder zusätzlicher extrazellulärer Komponenten heraus, Fragen wie Signalweiterleitung, Internalisierung und Proteinstabilität oder differentielle Aktivität von Ror2 bleiben bisher noch unzureichend beantwortet.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Pathogenese der Brachydaktylie Typ B (BDB) sowie die Beteiligung der Rezeptor-Tyrosinkinase Ror2 untersucht werden. Als zentraler Punkt sollte dabei der Extremitäten-Phänotyp der Ror2^{W749X}-Maus detailliert beschrieben und beteiligte Signalwege identifiziert werden. Ein daraus entwickeltes Modell zur Fingerentwicklung sollte zum Verständnis der humanen Brachydaktylien beitragen. Dazu wurden neben immunhistologischen Methoden und RNA in-situ Hybridisierungen auch verschiedene genetische Interaktionen mittels Verkreuzungsexperimenten analysiert.

Zum Verständnis eines solchen Modells sowie der genetischen Interaktionen auf molekularer Ebene sollten gezielt ausgewählte extra- und intrazelluläre Bindungspartner von Ror2 verifiziert und Auswirkungen der Interaktionen analysiert werden. Dieser Ansatz basierte vor allem auf der Methode der Co-Immunopräzipitation, sowie immuncytologischen Nachweisen und funktionellen Versuchsansätzen. Mit diesen Daten sollten neue Wege der Ror2-vermittelten Signaltransduktion sowie potentielle Auswirkungen der BDB-verursachenden Ror2-Trunkationen identifiziert werden.

Zusätzlich sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels RNA in-situ Hybridisierungen eine komplette Übersicht über die räumliche und zeitliche Expression aller Wnt-Liganden und derer Antagonisten in der Extremitätenentwicklung der Maus erstellt werden. Neben der Identifikation neuer Expressionsdomänen und dient eine solche Übersicht vor allem als Diskussionsplattform für Fragen zur Wnt-Aktivität in der Handentwicklung und ermöglicht so beispielsweise die schnelle Eingrenzung von Kandidatengen für bestimmte Phänotypen oder potentielle Interaktionen.

2. Material

2.1. Geräte

Alle verwendeten Gerätschaften sind den Diplomarbeiten von Janine Dokas (2007), Franziska Neuendorf (2008) und Annika Mahl (2009) zu entnehmen.

2.2. Chemikalien

Alle nicht im Text gesondert aufgeführten Chemikalien wurde über die Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3. Molekularbiologische Reaktionssysteme/ Kits

Bezeichnung	Hersteller
BigDye V3.1 Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems
BrDU Labelling and Detection II	Roche
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories
DIG- RNA- Labeling Kit	Roche
Dual-Glo [®] Luciferase Assay	Promega
ECL – Roti-Lumin	Carl Roth
Gel-out Gel extraction Kit	A & A Biotechnology
Invisorb Spin PCRapid PCR Purification	Invitek
Phusion Polymerase	Finnzymes
Plasmid DNA Mini Kit	A & A Biotechnology
Plasmid DNA Purification Kit Nucleobond [®] AX (Midi; Maxi)	Machery- Nagel
TSA Tyramide Signal Amplification	Perkin Elmer
TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit	Applied Biosystems
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories

2.4. Antikörper

Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper zur Verwendung in Immunzytologie und – histologie wurden über Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen; konjugierte Standardantikörper (anti-Flag, anti-HA) zur Verwendung in Proteinbiochemie von Sigma (Deisenhofen).

In der Tabelle sind die benutzten Konzentrationen für Immunhistologie, Immunzytologie und Western Blot aufgeführt, als Kommentar vor allem die verwendete Methode zum Antigen-Unmasking.

Bezeichnung	Hersteller, Cat.no.	Verwendung			Kommentar
		Histo	Cyto	Blot	
BrdU	Roche	1:20			Citrat
activated beta-Catenin (ABC)	Upstate #05-665	1:100			high pH, TSA
Casein Kinase ϵ	SantaCruz 25423		1:100		
Cyclin D1	LabVision RM-9104-R7	1:500			Citrat
Dishevelled 2	SantaCruz 13974		1:200	1:200	
Noggin	S&D AF719			1:500	
Ror2	R&D AF2064		1:500	1:1000	nicht strippbar
phospho Smad 1,5,8	CellSignaling 9511	1:200			high pH, TSA
phospho Serin	Zymed 61-8100			1:100	beide AK mixen
phospho Threonin	CellSignaling 9 381			1:500	
phospho Tyrosin	CellSignaling 9411			1:1000	
Sox9	SantaCruz 20095	1:50			Citrat
Tcf712	Upstate 05-511	1:100			Citrat oder high pH

2.5. Kulturzellen

Das FCS wurde nochmals hitzeinaktiviert (1h, 55°C).

Bezeichnung	Herkunft	Medium
HEK 293T	humane Nierenzelllinie	DMEM, high Glucose, 10% FCS; 2% L-Glutamin; 1% Pen/ Strep
Cos1	Nierenzelllinie Affe	DMEM, high Glucose, 5% FCS; 1% L-Glutamin; 1% Pen/ Strep

2.6. Bakterienstämme

Als Standard wurden durchgehend E.coli XL1 blue (Stratagene) verwendet.

2.7. Tiere

Die Züchtung und Verkreuzungsarbeit wurde im institutseigenen Tierhaus von Janine Wetzel unter Aufsicht von Ludger Hartmann vorgenommen.

- Conductin (Lustig et al., 2002): Wnt-Reporter-Maus, LacZ-knock in im Conductin(Axin2)-Lokus, bezogen über W. Birchmeier (MDC Berlin).
- Gdf5-KO (Storm et al., 1994; Takahara et al., 2004): Punktmutation in Gdf5, bezogen über Jackson Lab.
- Ihh-KO (St-Jacques et al., 1999): bezogen über AP McMahon (Harvard University, USA)
- IhhE95K(Gao et al., 2009): BDA1-Maus, Punktmutation in Ihh, bezogen über D. Chan (Hongkong)
- Noggin-KO (McMahon et al., 1998): LacZ-knock in im Noggin-Lokus, bezogen über P. Tylzanowski (Universiteit Leuven, Belgien).
- Ror2-W749X (Raz et al., 2008): distale BDB-Trunkation, generiert in Kooperation mit A. Economides und R. Raz (Regeneron Inc, Tarrytown, NY).
- Ror2LacZ-fus (DeChiara et al., 2000): proximale BDB-Trunkation, generiert von A. Economides (Regeneron Inc. Tarrytown, NY).
- Ror2-KO (Takeuchi et al., 2000): bezogen über Y. Minami (Kobe University, Japan).

- Topgal (DasGupta and Fuchs, 1999; Hens et al., 2005): Wnt-Reporter-Maus, LacZ unter Kontrolle von Tcf/Lef-Bindungsstellen, bezogen über Jackson Lab.
- Wnt5a-KO (Yamaguchi et al., 1999): bezogen über E. Arenas (Karolinska Institutet, Schweden).

2.8. Enzyme

Verwendeten Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligasen, Polymerasen etc.) wurden wenn nicht anders angegeben von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt a.M) bezogen.

2.9. Expressionskonstrukte und Vektoren

- Ror2-Flag in pcDNA, C-terminaler Flag-Tag (Prof. Y. Minami, Japan)
- Ror2 Δ IG, Ror2 Δ CRD, Ror2 Δ CRD,KR, Ror2 Δ 469, Ror2 Δ 745: alle mit C-terminalem Flag-Tag in pcDNA (Dr. S. Stricker, Berlin)
- Ror2-HA in pcDNA3, C-terminaler-HA-Tag (Dr. S. Stricker)
- humane Ror2-Konstrukte, kein Tag (W. Schwarzer, Berlin)
- cNoggin in pCS2 (Dr. P. Seemann, Berlin)
- Dvl2-HA (Dr. U. Steltzl, Berlin)
- Dvl3-Flag und XWnt8 (Dr. R.T. Moon, Seattle)
- In Kooperationsprojekten wurden Konstrukte von M. Taira (Tokyo University, Japan), S. Yanagawa (Kyoto University, Japan), R. J. Lefkowitz (HHMI, Durham, NC), J. M. Graff (University of Texas, Dallas, TX), I. Dominguez (Boston University, Boston) sowie O. Ossipova and S. Sokol (Mount Sinai School of Medicine, NY) verwendet
- pTA-GFP: Klonierungsvektor für Sonden (Dr. J. Hecht, Berlin)

2.10. Software

In der folgenden Auflistung befinden sich die für die Durchführung der Experimente verwendeten Computerprogramme. Datenbankrecherchen wurden bevorzugt über NCBI (www.ncbi.nlm.gov), Ensembl (www.ensembl.org), Genepaint (www.genepaint.org), und MGI (www.informatix.jax.org) vorgenommen.

Programm	Verwendung
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung
Axio Vision 4.6	Digitale Photographie
Chromas	Sequenzanalyse
CorelDraw12	Bildbearbeitung
DNA Star Seqman	Auswertung Sequenzen
EASY Win32	Geldokumentation
Microsoft Office	Auswertungen und Diagramme
Primer3	Primer Design
SDS2.1	Auswertung qPCR
Windows2000; XP	Betriebssystem

2.11. Primer

Alle Primer wurden über Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die Primer zur Sondengenerierung aller Wnt-Liganden und ihrer Antagonisten sind der Veröffentlichung zu entnehmen (Witte et al., 2009). Weitere verwendete Sonden: Bmp4 (Bitgood and McMahon, 1995), Collagen Typ2 alpha 1 (Mundlos, 2000), Gli1, Ihh und Patched1 (Vortkamp et al., 1996), Gdf5 und Runx2 (Stricker et al., 2002) sowie CyclinD1, Msx1 Msx2 und Tcf4 (Laboreigene Sondenbank).

Primer	Sequenz 5' => 3'
<i>Genotypisierung</i>	
mRor2_TK.fw	CTTCCCACAGCCTCAGTTCATC
mRor2_3UTR.rev	TCACCTGGAGCGTGTTCATTGTC
flag.fw	GACTACAAAGACGATGACGACAAGC
PGKprom4.rev	TGGATGTGGAATGTGTGCGAG
mRor2_5PCR	CCTTGCCAGCAACGATCCCAGCCA

mRor2_3PCR	TCATCGGTGCTGCCACATCGGAG
LacZ_5seq2.403	GCAACTGTTGGGAAGGGCGATC
wt210x211	GAGCAGCGAGCGCAGCAGCG
ko210x212	AAGGGCGATCGGTGCGGGCC
reverse	GCATGGAGCGCTGCCCCAGC
AS	AGTCCATCTTCATTCCGCCTAGC
NLS	TGGTAATGCTGCAGTGGCTTG
Ckoln4	AAGCTGCGTCGGATACTTGAGA
S1	CCCCGACTGCGGTTCTGTCTGTT
L2	TGGGCTGTGAGAAATGTTAGGC
Gdf5-BsaJ1-F	CGACAGGTCCACGAGAAAGC
Gdf5-BsaJ1-R	GGTGCGATGATCCAGTCGTC
Wnt5a-for	GACTTCCTGGTGAGGGTGCGTG
Wnt5a-rev	GGAGAATGGGCACACAGAATCAAC
KO-5a-for	GGGAGCCGGTTGGCGCTACCGGTGG
KO-5a-rev	siehe Wnt5a-rev
Ihh-5	AGG AGG CAG GGA CAT GGA TAG GGT G
pGKneofor-Ihh-KO	TAC CGG TGG ATG TGG AAT GTG TGC G
Ihh-ex1-geno-F1	GCC TCT TGC CTA CAA GCA GT
Ihh-ex1-geno-R2	TGT TCT CCT CGT CCT TGA AGA
<i>Sondenklonierung</i>	
ID1-for	TCCTGCAGCATGTAATCGAC
ID1-rev	AGAAATCCGAGAAGCACGAA
ID3-for	ACTCAGCTTAGCCAGGTGGA
ID3-rev	CATTCTCGGAAAAGCCAGTC
Lef1-for	TGAAGCCTCAACACGAACAG
Lef1-rev	TGGAGACAGTCTGGGGTTTC
Nmyc-for	CATCCATCAGCAGCACAAC
Nmyc-rev	AAATGTGCAAAGTGGCAGTG
<i>Standartprimer</i>	
Sp6	CATTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Alle hier nicht gesondert aufgeführten molekularbiologischen und mikrobiologischen Standardmethoden (Verarbeitung von Nucleinsäuren, Restriktionsverdau, Ligation und Transformation, Bakterienkultur etc) wurden nach Protokollen aus dem Handbuch *Molecular Cloning* (Sambrooke et al., 1989), *Cold Spring Harbour Protocols* (<http://cshprotocols.cshlp.org>) oder dem *Experimentator* (Spektrum) durchgeführt.

3.1.1. DNA-Isolierung

3.1.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das Plasmid DNA Mini Kit (A&A Biotechnology) gemäß dem Herstellerprotokoll eingesetzt, Isolationen im größeren Maßstab (Midi-Maxipräp) erfolgten mit den Kits Nucleobond PC100 bzw. PC500 (Macherey-Nagel).

3.1.1.2. Isolierung von genomischer DNA

Gewinnung genomischer DNA aus Biopsiematerial wie Schwanzspitzen, Amnien oder Milz war notwendig um die Genotypen der Tiere zu ermitteln. Das Gewebe wurde in bei 55°C in 0.5 ml SDS-Puffer mit ProteinaseK verdaut. Am nächsten Tag wurden 0.5 ml 5M NaCl zugegeben und für 10 min auf einer Wippe bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min auf Eis gestellt, bei 8000 rpm 10 min zentrifugiert und dann 0.5 ml vom Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 1 ml eiskaltes 100%iges EtOH vorgelegt war. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit 70%igem EtOH für 10 min bei 13000 rpm und 4°C gewaschen. Abschließend wurde das Sediment gründlich getrocknet und in 150 µl autoklaviertem H₂O aufgenommen.

SDS-Puffer: 0.85% SDS, 17 mM EDTA, 170 mM NaCl, 17 mM Tris/HCl; pH 7.5
+ 200 µg/ml Proteinase K

3.1.2. RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde mit peqGold TriFast (peqLab) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Hierfür wurde das Gewebe in zehnfachem Volumen TriFast mittels Aufziehen in

einer Spritze homogenisiert und nach erfolgter Chloroform-Extraktion durch Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Die präzipitierte RNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 50-100 μl DEPC- H_2O gelöst.

3.1.3. Herstellung von cDNA

cDNA für qRT-PCR wurde mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit nach Anleitung des Herstellers gewonnen, wobei jeweils 1 μg Gesamt-RNA in 100 μl Reaktionsvolumen eingesetzt wurden.

3.1.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.1.4.1. Standard-PCR

Für die Amplifikation wurden Taq- und Pfu-Polymerase verwendet, die am Institut selber hergestellt wurden. Taq-Polymerase hängt an die 3' Enden der Doppelseiten überhängen aus A-Nukleotiden, besitzt aber keine Fehlerkorrektur, diese wurde standardmäßig für Genotypisierungen oder zur Sondenklonierung verwendet. Pfu-Polymerase hingegen vervielfältigt DNA mit sehr hoher Genauigkeit durch 3'-5' Exonukleaseaktivität, hängt dafür allerdings keine A-Nukleotide an. Für schwierige PCR-Reaktionen wurde die Phusion-Polymerase verwendet.

Pipettierschema für PCR-Reaktion (50 μl Ansatz):

Menge	Reagenz
• 20-100 ng	DNA-Vorlage
• 5 μl	DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
• 1 μl	dNTPs (1.25 mM, Fermentas)
• 1 μl	5'-Primer
• 1 μl	3'-Primer
• 0.5-1 μl	DNA-Polymerase

→ add auf 50 μl mit H_2O bidest

Der Ansatz wurde in ein 0.5 ml PCR-Reaktionsgefäß gekühlt pipettiert, die Polymerase zum Schluss hinzugegeben und der Ansatz in einem Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert. Die Analyse der PCR erfolgte in 1% oder 3% Agarosegelen.

10x Taq-Polymerase-Puffer: 750 mM Tris HCl pH 8.8, 200 mM (NH₄) SO₄, 15 mM MgCl₂ mit H₂O auffüllen, steril filtrieren

Standard – Programm für Thermocycler bei einer PCR

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	4 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	25-35 Zyklen
Primer Annealing	je nach Primer	30 sec	
Elongation	72°C	Taq 1 min/1000 Basen Pfu 1 min/500 Basen +30 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Kühlung	4°C	∞	

3.1.4.2. Amplifikation von Sondensequenzen

Als Zielsequenz wurde meistens das 3-Ende der codierenden Kandidatensequenz inklusive der 3'-UTR gewählt. Um die Spezifität der Sonde zu gewährleisten wurde die zu amplifizierende Sequenz noch gegen das Mausgenom abgeglichen und bei Bedarf verändert. Mittels PCR auf Maus-cDNA wurde die Sequenz amplifiziert und in pTA-GFP kloniert. Die Selektion sowie Bestimmung der Orientierung erfolgte mittels Kolonie-PCR oder Sequenzierung.

3.1.4.3. Amplifikation von Kandidaten für Expressionsklone

Die codierende Sequenz des Kandidatengens wurde mittels mit Hilfe der Phusion-Polymerase (Finnzymes) aus Maus-cDNA amplifiziert, was eine geringe Fehlerquote sicherstellte. Dabei ist eine um 3°C höhere Schmelztemperatur der Primer sowie das Anfügen einer Kozak-Sequenz (GCCACC) im Forward(5')-Primer, falls erwünscht eines Stop-Codons im Reverse(3')-Primer sowie benötigten Restriktionssequenzen zu beachten. Nach der Zwischenklonierung in pTA-GFP und Verifikation durch Sequenzierung erfolgte die Umklonierung in den Zielvektor.

3.1.4.4. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Verifizierung der erhaltenen Klone auf erfolgreiche Insertion des amplifizierten Inserts und dessen Orientierung im Vektor. Dabei wurde anstatt isolierter DNA einfach Bakterienmaterial als Ausgangsmaterial für die PCR eingesetzt. Mit geeigneten Primern prüfte man das Vorhandensein im Vektor und gegebenenfalls die Orientierung. Verwendet wurde hier immer die selbsthergestellte Taq-Polymerase, außerdem meist Sp6/T7 Standardprimer, für die in den meisten Vektoren Bindungsstellen vorhanden sind.

Pipettierschema für eine Kolonie-PCR: (25 µl Ansatz)

Menge	Reagenz
• 2,5 µl	DNA-Polymerase 10x Reaction Buffer
• 0.5 µl	dNTPs (12.5 mM, Fermentas)
• 0.25 µl	5'-Primer
• 0.25 µl	3'-Primer
• 0.5 µl	DNA-Polymerase

→ add auf 24 µl mit H₂O bidest

Je nach Anzahl der zu testenden Klone wurde ein „Master-Mix“ für alle Ansätze gemeinsam hergestellt, der dann in 24 µl Aliquots auf die einzelnen PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Die zu testenden Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und das Bakterienmaterial erst auf eine Replika-Platte übertragen und anschließend der Rest an der Pipettenspitze mit dem PCR-Ansatz gut vermischt. Die Replika-Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, um gegebenenfalls von positiven Klonen ÜNKs anfertigen zu können.

3.1.4.5. Genotypisierungs-PCR

Für alle Genotypisierungs-PCRs wurde genomische DNA aus Schwanzspitzen, Amnien oder Milz gewonnen. Standardmäßig wurde die gefällte DNA in 150 µl H₂O aufgenommen und gegebenenfalls 1:10 oder 1:20 verdünnt. Im Folgenden sind alle PCR-Programme der verwendeten Mauslinien aufgeführt.

Ror2-brachy:

Reaktion	
Menge	Reagenz
• 1 µl	DNA
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)
• 1 µl	dNTPs (12,5 mM)
• 1 µl	je Primer (10 pmol)
• 16 µl	H ₂ O
• 0.5 µl	Taq-Polymerase

Programm		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	4 min	
95°C	45 sec	35
65°C	45 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Primer: mRor2_TK.fw
 mRor2_3UTR.rev
 flag.fw
 PGK_prom4.rev

Bande wt 419 bp
 mut 174

Analyse auf 1,5%igem Agarosegel

Ror2-reg (lacZ-fus):

Reaktion	
Menge	Reagenz
• 1 µl	DNA
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)
• 1 µl	dNTPs (12,5 mM)
• 1 µl	je Primer (10 pmol)
• 17 µl	H ₂ O
• 0.5 µl	Taq-Polymerase

Programm		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	4 min	
95°C	45 sec	25-30
62°C	45 sec	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Primer: mRor2_5PCR
 mRor2_3PCR
 LacZ_5seq2.403

Bande wt ~400 bp
 mut ~300 bp

Ror2-KO:

Reaktion		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
• 1 µl	DNA	95°C	4 min	35
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)	95°C	1 min	
• 1 µl	dNTPs (12,5 mM)	61°C	1 min	
• 1 µl	je Primer (10 pmol)	72°C	1 min	
• 17 µl	H ₂ O	72°C	10 min	
• 0.5 µl	Taq-Polymerase	4°C	∞	

Primer:	Ror2_neoko	Bande	wt	500 bp
	Ror2_ext4		mut	200 bp
	Ror2_wt			

Getrennte PCRs besser, Analyse auf 1,5%igem Agarosegel

Noggin-KO:

Reaktion		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
• 1 µl	DNA	95°C	2 min	32
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)	95°C	20 sec	
• 1 µl	dNTPs (12,5 mM)	72°C	1 min	
• 1 µl	je Primer (10 pmol)	72°C	3 min	
• 17 µl	H ₂ O	4°C	∞	
• 0.5 µl	Taq-Polymerase			

Primer:	wt210x211	Bande	wt	200 bp
	ko210x212		mut	170 bp
	reverse			

Analyse auf 2%igem Agarosegel

Gdf5-KO:

Reaktion	
Menge	Reagenz
• 1 µl	DNA
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)
• 2.5 µl	dNTPs (1.25 mM)
• 2.5 µl	je Primer (20 pmol)
• 3.5 µl	DMSO
• 10.2 µl	H ₂ O
• 0.3 µl	Taq-Polymerase

Programm		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	4 min	
95°C	20 sec	32
60°C	20 sec	
72°C	40 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Primer: Gdf5-BsaJ1-F
Gdf5-BsaJ1-R
flag.fw

Bande wt 165+345 bp
mut 21+144+345 bp
het 21+144+165+345bp

Analyse auf 3%igem Agarosegel

Wnt5a-KO:

Reaktion	
Menge	Reagenz
• 1 µl	DNA
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)
• 2.5 µl	dNTPs (1.25 mM)
• 2.5 µl	je Primer (20 pmol)
• 3.5 µl	DMSO
• 10.2 µl	H ₂ O
• 0.3 µl	Taq-Polymerase

Programm		
Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 sec	
95°C	30 sec	35
62°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	10 min	
4°C	∞	

Primer: Wnt5a-for
Wnt5a-rev
KO-5a-for
KO-5a-rev

Bande wt 360 bp
mut 240 bp

Getrennte PCRs

Conducin-LacZ:

Reaktion		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
• 1 µl	DNA	94°C	2 min	35-40
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)	96°C	6 sec	
• 1 µl	dNTPs (12.5 mM)	60°C	15 sec	
• 1 µl	je Primer (10 pmol)	72°C	90 sec	
• 1.5 µl	DMSO	72°C	10 min	
• 15.5 µl	H ₂ O	4°C	∞	
• 0.5 µl	Taq-Polymerase			

Primer: AS
NLS
Ckoln4

Bande wt >500
mut 400

IhhE95K (neolless):

Reaktion		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
• 1 µl	DNA	95°C	25min	10
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)	95°C	45 sec	
• 1 µl	dNTPs (12.5 mM)	63°C	45 sec	
• 1 µl	je Primer (10 pmol)	72°C	45 sec	
• 5 µl	Betaine 5M	95°C	45 sec	25
• 13 µl	H ₂ O	60°C	45 sec	
• 0.5 µl	Taq-Polymerase	72°C	45 sec	
		72°C	10 min	
		4°C	∞	

Primer: S1
L2

Bande wt 684 bp
mut 790 bp

Ihh-KO:

Reaktion		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
• 1 µl	DNA	95°C	5 min	35
• 2.5 µl	Puffer (15 mM MgCl ₂)	95°C	1 min	
• 2 µl	dNTPs (1.25 mM)	63°C	1 min	
• 1 µl	je Primer (10 pmol)	72°C	1 min	
• 2.5 µl	DMSO	72°C	10 min	
• 14.5 µl	H ₂ O	4°C	∞	
• 0.5 µl	Taq-Polymerase			

Primer:	Ihh_5	Bande	wt	155 bp
	pGKneofor-Ihh-KO		mut	307 bp
	Ihh-ex1-geno-F2			
	Ihhex1-geno-R2			

Getrennte PCR: Ihh-5 + pGKneofor-Ihh-KO für wt; Ihh-ex1-geno-F2 + R2 für ko

3.1.4.6. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die relative Quantifizierung von RNA erfolgte mit Hilfe von SYBR Green, das spezifisch an doppelsträngige DNA bindet. Während der PCR Reaktion wird die Zunahme der Fluoreszenz durch die Zunahme des amplifizierten Produkts in Echtzeit gemessen. Geeignete Primer wurden mit der Primer3 Software ermittelt und die Reaktion in 384 well Platten in einem 18 µl Ansatz durchgeführt.

Pipettierschema für einen qRT-PCR Ansatz:

Menge	Reagenz
• 9 µl	cDNA Verdünnung
• 3 µl	Primermix (4.5 pmol pro Primer)
• 9 µl	SYBR Green PCR Master Mix

Für die PCR wurden 6 ng cDNA verwendet und für die Standardkurve mit einer Verdünnung von 6 ng begonnen und dann in 1:2 Verdünnungen entsprechend weniger eingesetzt bis zu einer Verdünnung von 0,375 ng cDNA. Zum Abgleich der cDNA-Mengen wurde das Haushaltsgen GAPDH verwendet.

3.1.5. DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierungen wurden alle nach Ketten-Abbruch-Methode durchgeführt (Sanger et al., 1977) und an der Charite Berlin durchgeführt.

Pipettierschema für einen Sequenzierungsansatz 10 μ l:

Reaktion		Programm		
Menge	Reagenz	Temperatur	Zeit	Zyklen
• <100ng	Plasmid-DNA	96°C	1min	25
• 2 μ l	5x Sequenzier-Puffer	96°C	10 sec	
• 2 μ l	Primer	50°C	5 min	
• 1 μ l	BigDye V3.1	60°C	4 min	
→ add auf 10 μ l mit H ₂ O bidest		4°C	∞	

Direkt vor der Fällung wurde der Ansatz mit 1 μ l 2%igem SDS versehen und für 10 min bei 98°C inkubiert um eventuell entstandene Aggregate zu lösen. Gefällt wurde 1h lang mit 25 μ l 100% EtOH bei 4000 rpm und 4°C. Danach wurde mit 150 μ l 70% EtOH bei 4000 rpm für 30 min gewaschen. Abschließend wurde das Sediment kurz trockenzentrifugiert und war dann bereit für die Sequenzierreaktion, die an der Medizinischen Genetik, Charite durchgeführt wurden.

3.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte nach Anleitung des Herstellers (BCA Protein Assay Reagent Kit). Eine Eichgerade mit BSA diente der Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentrationen. Die Absorption bei 562 nm wurde mit einem ELISA-Reader gemessen.

3.2.2. SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Die Methode zur Auftrennung und zur Reinheitskontrolle der Proteine ist üblicherweise die der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Geschwindigkeit mit der Moleküle durch ein elektrische Feld wandern, hängt im Normalfall von drei Faktoren ab: ihrer Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Im Fall der SDS-PAGE ist

allerdings einzig die Masse des Moleküls für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Erreicht wird dies indem man sowohl dem Gel, als auch dem Laufpuffer SDS zugibt. Dieses Detergenz, mit stark amphipatischen Eigenschaften, denaturiert oligomere Proteine und zerlegt sie in ihre Untereinheiten. SDS-Moleküle binden an die entfalteten Peptide und versehen sie somit mit einer stark negativen Ladung, was bedeutet, dass sie im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode wandern. Um die Denaturierung zu vervollständigen werden den Proteinen im Probenpuffer Thiole zugegeben, welche die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine spalten. Für eine schärfere Proteinbande, wird das Gel in Sammel- und Trenngel unterteilt. Zur Auftrennung großer Proteine (z.B. Ror2, Dvl2) wurden 8%ige Gele verwendet, im Falle kleinerer Proteinmassen (z.B. Noggin) 12%ige Gele.

Pipettierschema für ein 12%iges Proteingel:

Sammelgel (5ml)		Trenngel	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
• 3.4 ml	H ₂ O	• 6.6 ml	H ₂ O
• 0,83 ml	30% Acrylamid-Mix	• 8 ml	30% Acrylamid-Mix
• 1.26 ml	0.5 M Tris, pH 6.8	• 5 ml	0.5 M Tris, pH 8.8
• 0.05 ml	10% SDS	• 0.2 ml	10% SDS
• 0.05 ml	APS	• 0.2 ml	APS
• 0.005 ml	TEMED	• 0.008 ml	TEMED

3.2.2.1. Gießen des Gels

Zunächst wurden saubere Glasplatten mit seitlich eingesetzten Spacern in der dafür vorgesehenen Gelgießvorrichtung eingesetzt und ein Kamm eingesetzt um die Gießhöhe des Trenngels zu markieren. Die Komponenten des Trenngels wurden gemischt, zuletzt zugegebenes APS und TEMED lösten die Polymerisation der Gelmatrix aus. Der Ansatz wurde knapp über die Markierung für das Trenngel in den Aufbau gegossen. Eine Überschichtung mit Isopropanol sicherte eine glatte Oberfläche und verbesserte durch Luftausschluss die Polymerisation. Insgesamt ließ man das Trenngel zwischen 45-60 min aushärten, anschließend konnte analog das Sammelgel pipettiert und der gewünschte Kamm möglichst luftblasenfrei eingesetzt werden. Nach mindestens 30 min Polymerisierungszeit konnte das Gel beladen werden. Vor dem Beladen wurden die Gele in eine Gelelektrophoreselaufkammer gesetzt, diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt, die

Kämme entfernt und die Taschen vorsichtig einmal mit SDS-Laufpuffer gespült um Luftblasen zu entfernen.

3.2.2.2. Vorbereitung der Proben

Die Proben für die Gele stammten entweder aus Zellkulturlinien oder aus Gewebematerial von Embryonen und wurden nach erfolgter Zelllyse mit Proteinprobenpuffer (denaturierend) versehen und vor dem Beladen für 5 min bei 95°C gekocht. Zusätzlich zu den zu analysierenden Proben wurde immer der Prestained Protein Marker (Fermentas, #1811) aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abzuschätzen.

Lysispuffer: 50 mM NaCl, 50mM HEPES, 10mM EDTA, 10%Glycerol, 1% Triton-X100; Inhibitoren: 50µl 200mM PMSF, 10µl 1mg/ml Aprotinin, 10µl 1mg/ml Pepstatin, 10µl 1mg/ml Leupeptin, 50µl 200mM aktiviertes Na₃VO₄, 50µl 200mM NaF

4x Probenpuffer: 2ml 1M Tris, 4ml Glycerin, 2ml 20% (w/v) SDS, 400µl 1% Bromphenolblau, 600µl H₂O, 1ml 40x Reduktionsmittel (z.B. β-Mercaptoethanol); pH 7.5

3.2.2.3. Elektrophorese

Die Gele wurden bei einer konstanten Spannung von 90V gefahren. Wenn das Bromphenolblau des Markers die untere Kante des Gelaufbaus erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, zur Auftrennung großer Proteine konnte die Laufzeit auch noch verlängert werden.

5x Laufpuffer: 25mM Tris, 250mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

3.2.3. Western Blot

Mit der Methode des Western Blottings ist es möglich, über die Detektion mit poly- und monoklonalen Antikörpern Proteine aus Kulturzellen oder Zellfraktionen nachzuweisen. Dafür müssen die Proteine erst über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und schließlich mit Antikörpern detektiert werden. Dabei ist ein sekundärer Antikörper gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichtet und weiterhin an das Enzym Peroxidase gekoppelt, d.h. er kann durch ECL sichtbar gemacht werden.

3.2.3.1. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Zuerst wurde ein dem Gel entsprechend großes Stück Nitrozellulosemembran für 2-3 min in MetOH aktiviert. Danach wurden sowohl die Membran, als auch das Gel 15-30 min in Transferpuffer äquilibriert. Um die Proteine auf die Membran zu transferieren wurde mit dem semi-dry-Verfahren in einer dafür vorgesehenen Kammer gearbeitet. Bei dem schichtweisen Aufbau laut Herstellerangaben ist vorallem die Transferrichtung (von negativ nach positiv) zu beachten. Eventuell entstandene Luftblasen wurden durch sanftes Rollen mit einem Glasröhrchen entfernt. Geblottet wurde für 30 min bei 20 V, anschließend wurden die Markerbanden nachgezeichnet und die Membran im Western Blot eingesetzt werden.

10x Transferpuffer: 29g Glycin; 58g Tris Base; 40ml 10% (w/v) SDS

3.2.3.2. Detektion der Proteine mittels Antikörper

Nach erfolgtem Blot wurde die Membran zunächst in TBST 5 min gewaschen und dann für mindestens 1h (besser >2h) mit 5% Milch in TBST blockiert um unspezifische Bindungen abzudecken. Bei phospho-spezifischen Antikörpern erfolgte das Blocken in 3-5% BSA in TBST, da die Phospho-Proteine der Milch das Ergebnis extrem stören. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min in TBST gewaschen und ün bei 4°C in einem 50 ml Falcon auf dem Rollator mit dem gewünschten Primär-Antikörper inkubiert. Eine Tabelle der verwendeten Antikörper und entsprechenden Verdünnungen findet sich bei den Materialien. Nach der Inkubation wurde dreimal gründlich mit TBST bei RT gewaschen und schließlich mit dem Peroxidase-gekoppeltem sekundär AK inkubiert. Nach letztmaligem gründlichem Waschen ist es möglich über eine enzymatische Reaktion die Proteine auf der Membran zu visualisieren.

10x TBS: 300 ml 5M NaCl, 100ml 1M Tris → auf 1l mit H₂O-DEPC; pH 7.4

TBST: 0,01% Tween20 pro 1000 ml TBS

3.2.3.3. Visualisierung mit ECL (enhanced chemiluminescence)

Die Detektion der Sekundär-AK und somit der Proteine erfolgte mittels *enhanced* chemiluminescence (ECL) laut Herstellerprotokoll und via Belichtung eines Röntgenfilms. Die Filme wurden anschließend eingescannt.

3.2.3.4. „Strippen“ eines Western Blots und wiederholte Antikörperinkubation

Es ist möglich einen Western Blot für mehrfache Antikörperinkubationen zu verwenden, da die Proteine fest an die Nitrozellulosemembran gebunden bleiben. Um weitere Proteine auf der gleichen Membran nachzuweisen, mussten die gebundenen Antikörper zunächst entfernt werden. Hierfür wurde die Membran dreimal in TBST gewaschen und zwei Mal für 10 min in Stripping-Puffer bei RT inkubiert. Nun konnten erneut ein Blocken der Membran und eine weitere Antikörper-Detektion erfolgen. Diese *Strippen* eines Western Blots konnte maximal 2-3 mal wiederholt werden, wobei das Signal bei jedem Vorgang deutlich abgeschwächt wird.

Stripping-Puffer: 0,15M Glycin pH 2,5; 0,4% SDS

3.3. Histologische Methoden

3.3.1. Skelettpräparationen

Zur Anfertigung von Skelettpräparationen wurden Neugeborene und andere erforderliche Tiere gehäutet, ausgenommen und das Präparat in 100%igem EtOH üN bei 4°C gelagert. Zwei Tage lang wurde mit Alcian Blau gefärbt, danach einen Tag lang mit 50%igem EtOH gewaschen und anschließend mit Alizarin Rot für zwei weitere Tage gefärbt. Alcian Blau färbt die Polysaccharide im Knorpel blau, wohingegen Alizarin Rot kalifizierete extrazelluläre Matrix (also Knochen) rot färbt. Die Tiere wurden mit 1%iger KOH Lösung verdaut und in aufsteigender Weise in 80%iges Glycerin überführt und darin langfristig gelagert. Die photographische Analyse erfolgte mit einem Binokular, CCD-Kamera und AxioVision Software.

10x PBS: 0g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂PO₄, 2.4g KH₂PO₄

→ auffüllen auf 1l mit H₂O-DEPC; pH 7.4

Alcian Blau: 500 mg Alcian Blau; 800 ml EtOH 100%, 200 ml Eisessig

Alizarin Rot: 50 mg Alizarin Rot in 1% KOH

3.3.2. Paraffineinbettung und Schnitthanfertigung

Um Extremitäten für die Paraffineinbettung vorzubereiten, wurden die Arme der gewünschten Stadien abpräpariert und direkt über Nacht in 4% PFA/PBS bei 4°C fixiert. Bei postnatale Stadien handelte wurde mit 4%PFA/EDTA/PBS inkubiert um die Knochen

zu dekalzifizieren Am darauf folgenden Tag wurden die Präparate 2 mal 5 min in PBS gewaschen, danach für mindestens 1 h in 50% EtOH bei RT inkubiert und anschließend mindestens 2 h in 70% EtOH dehydriert. Die weiteren notwendigen Entwässerungsschritte und die Überführung in Paraffin geschahen mit Hilfe des Entwässerungsautomaten, mit dem beschriebenen Programm:

3 h 90% EtOH, 3 h 95% EtOH, 2 h mit Vakuum 100% EtOH, 2 h mit Vakuum 100% EtOH, 2 h mit Vakuum 100% EtOH, 15 min mit Vakuum UC, 15 min mit Vakuum UC, 30 min mit Vakuum UC, 3 h mit Vakuum UC/Paraffin, 3 h mit Vakuum Paraffin.

Die dann im flüssigen Paraffin befindlichen Präparate wurden an der Einbettstation in Paraffin in der gewünschten Position eingebettet. Wenn die Blöckchen ausgehärtet waren konnten die Extremitäten am Paraffin-Mikrotom (Mikrom) geschnitten werden. Üblicherweise wurden für *in situ* Hybridisierungen und Immunhistologien 7 µm dicke Schnitte angefertigt, die entweder seriell auf den Objektträger gezogen wurden oder auf 3 Objektträger verteilt wurden. Nach dem Schneiden wurden die Objektträger bei 40°C gründlich getrocknet und zusätzlich über Nacht bei 37°C in einem Trockenofen gelagert. Eine Lagerung der Schnitte war bei 4°C über mehrere Wochen möglich.

3.3.3. Anfertigung von Vibratomschnitten

Bei schon gefärbten Embryonen oder Extremitäten konnten zur weiteren Analyse Vibratomschnitte angefertigt werden. Dazu wurden die Präparate in PBS gewaschen und bei 4°C jeweils 1 h in 5%, 15% und 30% Sucrose in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Überführung in 0,5% Gelatine / 30% Albumin (BSA) / 20% Sucrose in PBS, worin die Präparate auch geringe Zeit bei 4°C gelagert werden konnten. Die Einbettung erfolgte in 1ml derselben Lösung unter Zugabe von 100 µl 25% Glutaraldehyd, wobei die Aushärtung durch Kühlung verlangsamt werden konnte. Schliesslich wurden am Vibratom (Mikrom) 10-30 µm dicke Schnitte angefertigt und in Hydromatrix eingebettet. Die Analyse erfolgte unter dem Mikroskop.

3.3.4. Hämatoxylin/Eosin – Färbung (mit und ohne Alcian Blue Gegenfärbung)

Hierbei handelt es sich um eine histologische, weit verbreitete Färbemethode zur Untersuchung der Morphologie von Gewebe auf Paraffinschnitten. Die Färbung setzt sich aus zwei Einzelfärbungen zusammen. Hämatoxylin, ein natürlicher Farbstoff, färbt saure Strukturen, wie z.B. Zellkerne mit DNA und das endoplasmatische Reticulum. Eosin, ein

synthetischer Farbstoff, färbt basische Strukturen, vor allem das Cytoplasma. Zur Vorbereitung wurden die Paraffinschnitte erst 2 x 15 min in UC entwacht dann 3-5 min in 100% EtOH, 3-5 min in 90% EtOH, 3-5 min in 70% EtOH, 3-5 min in 50% EtOH rehydriert und dann 5 min in H₂O gewaschen. Nach 3-7 min Hämatoxylin-Färbung wurde kurz in H₂O gespült und dann 10 min lang Leitungswasser über die Schnitte laufen gelassen. Dieser Schritt verändert den pH Wert dahingehend das das rötliche Hämatoxylin seinen typischen Blauton annimmt. Danach wurde 1 min lang mit Eosin gefärbt, gründlich mit H₂O 3 x 5 min gewaschen und mit einer aufsteigenden EtOH Reihe bis 100% EtOH dehydriert. Zuletzt wurde 3-5 min in UC geklärt und das Präparat in Entelan eingedeckelt. Auf diese Weise präparierte Schnitte können monatelang aufbewahrt und analysiert werden.

Optional konnte eine Gegenfärbung mit Alcian Blau eingefügt werden, die die knorpeligen Strukturen im Gewebe färbt und so eine Orientierung in frühen Stadien der Entwicklung vereinfacht. Hierfür wurden nach der Rehydrierung die Schnitte für 30 min in einer wässrigen 1% Alcian Blue Lösung gefärbt, danach gründlich in H₂O gewaschen und im Anschluss erst die HE Färbung angefertigt.

3.3.5. LacZ-Färbung von Embryonen und Schnittpräparaten

Bei der Färbung mittels des im LacZ-Gen codierten Enzyms β -Galactosidase setzt dieses das chromogene Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D.galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl um, welches nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung eine tiefblaue Färbung zeigt. In dieser Arbeit wurden Färbungen an kompletten Embryonen gefolgt von Paraffinschnitten oder direkte Färbungen auf Cryoschnitten durchgeführt.

Embryonen oder Extremitäten wurden in PBS gewaschen und bei 4°C für 30 min fixiert, wobei diese Zeit bei grösseren Embryonen verlängert wurde. Nach 3x 5 min waschen in Waschpuffer erfolgte die Färbung üN bei 30-37°C unter Lichtabschluss. Die Präparate wurden nach kurzem Waschen sofort mit einem Binokular fotografiert, da die Gefahr einer Nachdunkelung besteht. Generell bleibt hier auch anzumerken, dass die Färbung am gesamten Präparat aufgrund Penetrationsprobleme der Färbelösung immer ein ungenaues Bild produziert. Daher wurden alle Färbungen auf Schnitten verifiziert.

Dazu wurden die Extremitäten nach der Präparation bei 4°C für 30 min in 2% PFA / 0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert, mehrmals in PBS gewaschen und in 2 üN-Schritten bei 4°C in 15% und 30% Sucrose in PBS überführt. Nach einer mehrstündigen Inkubation in

Einbettmedium (TissueTec) erfolgte die Einbettung und die Anfertigung von 10µm Cryoschnitten laut Standardprotokollen. Die Schnitte wurden 10 min in 0,2% Glutaraldehyd in PBS fixiert, 3x 5 min in Waschpuffer gewaschen und 4h-üN gefärbt. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte die Dehydrierung mit einer Ethanol-Reihe und die Einbettung in Entellan. Nach der Dokumentation waren die Präparate sind so langfristig lagerbar.

Fixierungslösung: 0,2% Glutaraldehyd, 2mM MgCl₂, 5 mM EGTA, in PBS

Waschpuffer: 2mM MgCl₂, 0,01% Sodiumdesoxycholat, 0,02% Nonident P40 in PBS

Färbelösung: 1mg/ml X-Gal, 5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 2mM MgCl₂, in PBS, Eisenlösungen zuletzt

3.3.6. Immunhistologie

Als Immunhistologie bezeichnet man die Detektion von Proteinen in Geweben mit Hilfe von Antikörpern. So kann man Aussagen darüber treffen in welchem Gewebe sich ein Protein befindet oder ob es innerhalb der Zelle auf ein bestimmtes Kompartiment beschränkt vorkommt. In dieser Arbeit wurden alle immunhistologischen Untersuchungen auf 7µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt und in direkt fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verwendet.

Die Gewebeschnitte wurden erst in folgender Lösungsreihe deparaffinisiert und rehydriert: 30-40 min in UC, 2 min in 100% EtOH, 2 min in UC, 2 min in 100% EtOH, 2 min in UC, 5 min in 100% EtOH, 5 min in 90% EtOH, 5 min in 70% EtOH, 5-15 min in H₂O bidest. Anschließend erfolgte zur besseren Antigenerkennung das sogenannte antigenretrieval entweder in Citratpuffer oder high pH Puffer (DAKO). Dazu wurden die Objektträger in einer Plastikbox 1x 3 min bei voller Stärke in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, 5 min inkubiert und nochmals 1x 3 min in der Mikrowelle bei mittlerer Intensität gekocht. Anschließend ließ man die Proben in dem heißen Puffer 30 min auf RT abkühlen. Nach 5 min waschen in PBS wurde mit 0,2% TritonX in PBS für 15 min bei RT permeabilisiert, erneut gewaschen, und dann unspezifische Bindungsstellen mit 5% NGS/0,2% Tween in PBS für mindestens 1 h bei RT in einer Feuchtkammer blockiert. Direkt im Anschluss folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper üN bei 4°C im Blockierungspuffer in einer Feuchtkammer (Verdünnungen siehe 3.2.3.2). Am nächsten Tag wurde dreimal bei RT in PBS für mindestens 5 min gewaschen und für 1-2h bei RT in einer Feuchtkammer mit dem fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper

inkubiert. Bei dieser Inkubation wurde DAPI in einer Verdünnung von 1:750 zugegeben um Zellkerne sichtbar zu machen. Nach gründlichem Waschen wurden die Gewebeschnitte mit Fluoromount G eingedeckelt, wenn es sich um fluoreszierende Sekundärantikörper handelte.

Wenn das so detektierte Signal nicht zufrieden stellend war, konnte ein verstärkender Schritt über Biotinyl-Tyramid durchgeführt werden (Tyramid Signal Amplification, TSA). Diese Methode wurde vor allem zur Detektion von phospho-Smad1/5/8 verwendet, dabei erfolgte ein zusätzlicher Nachweis von Tcf4. Hierzu wurden vor dem Blockierungsschritt die endogenen Peroxidasen mit einer 10 minütigen Inkubation in 0,75% H_2O_2 in Methanol inaktiviert. Nach erneutem Waschen und dem Blockierungsschritt wurde als Sekundärantikörper ein HRP-Conjugat in der Verdünnung 1:200 für 30 min inkubiert und diese Peroxidase nach erneutem ausgiebigem Waschen laut TSA-Herstellerangaben detektiert. Dabei wird der Verstärkungspuffer von dem Enzym zur Produktion von Biotin verwendet, welches anschließend mittels Streptavidin-gekoppeltem Fluoreszenz-Tertiärantikörper detektiert werden konnte.

Als alternative Nachweismethode der Peroxidase wurde seltener auch die Präzipitat-basierte Methode des DAB Peroxidase Substrate Kits laut Herstellerangaben verwendet.

Citratpuffer: 2,94g Natriumcitrat-Dihydrat auf 1 l H_2O ; pH 6

High pH Puffer: 1,12g Tris-Base, 0,37g EDTA auf 1l H_2O ; pH9

Zugabe von 0,5ml Tween20

Beide Puffer als 10x Stock auch käuflich (DAKO)

3.3.7. *In Situ* Hybridisierung (ISH)

Die *in situ* Hybridisierung stellt eine Nachweismethode für mRNA direkt in einzelnen Zellen, Geweben und intakten Embryonen dar. Dabei wird mit einer synthetisierten Sonde am Ort der Expression die gesuchte mRNA sichtbar gemacht, indem die antisense Sonde und komplementäre mRNA hybridisieren. Die Hybriden werden mit einem gegen Digoxigenin (DIG) gerichteten Antikörper, der an alkalische Phosphatase gekoppelt ist, detektiert und daraufhin durch eine enzymatische Reaktion farblich sichtbar gemacht. Auf diese Weise lassen sich auch der Expressionslevel und das Expressionsmuster des jeweiligen Gens gewebespezifisch und im Laufe der embryonalen Entwicklung untersuchen.

3.3.7.1. Herstellung von DIG-markierten Sonden

Üblicherweise wurden Sonden in der Größe ~500 bp gewählt (Primerauflistung siehe 24). Für die Transkription wurde das Eluat einer Sp6/T7 PCR, aufgereinigt und als Vorlage eingesetzt. Je nach Orientierung des Fragments wurde Sp6- oder T7-RNA Polymerase für die Transkription gewählt. Die *in vitro* Sonden-Transkription und Markierung mit DIG erfolgte mit dem DIG RNA Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde die erhaltene RNA gefällt indem das Volumen auf 100 µl mit H₂O DEPC aufgefüllt wurde, der Ansatz mit 10 µl LiCl und 300 µl eiskaltem EtOH 100% versehen wurde und der Ansatz mind. 1 h bei -80°C inkubiert wurde. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 13 000 rpm bei 4°C wurde 2 mal mit 70% EtOH gewaschen und das finale RNA Sediment in RNase freiem Wasser in 100 µl aufgenommen. Nach der Kontrolle der Sonde auf einem Agarosegel war eine Lagerung der Sonden bei -80°C stabil möglich.

3.3.7.2. Wohle mount *in situ* Hybridisierung (WM-ISH)

Für eine WM-ISH wurden Embryonen der Stadien E9.5 –E13.5 in PBS/DEPC präpariert und üN in 4% PFA/PBS fixiert. Am folgenden Tag wurden die Embryonen 2 x 15 min in PBST gewaschen, 2 x 15 min in 50% MetOH und zuletzt in 100% für mind. 15 min inkubiert. Nach einem Wechsel des 100% MetOH war eine Lagerung der Embryonen bei -20°C über mehrere Wochen möglich.

Zur Hybridisierung wurden die Embryonen in einer absteigenden MetOH Reihe rehydriert, mit PBST zweimal gewaschen und in 6% Wasserstoffperoxid in PBST für 1 h bei 4°C gebleicht. Je nach Entwicklungsstadium schloss sich ein 3-8 minütiger Verdau mit Proteinase K bei RT an, der die Embryonen für die Sonde besser zugänglich macht. Die Stadien E9,5 –E11,5 werden mit 10 µg/ml Proteinase K für 3min, E12,5 mit 20 µg/ml für 5 min und E13.5 mit 20 µg/ml für 8 min verdaut. Nach gründlichem Waschen mit PBST, PBST/Glycin (2 mg/ml) und RIPA-Puffer wurden die Embryonen für 20min in 4%PFA/0,2% Glutaraldehyd fixiert und wieder mehrfach in PBST, PBST/Hybridisierungspuffer und Hybridisierungspuffer gewaschen. Nach der Prähybridisierung bei 65°C für mindestens 3 h wurden die Embryonen üN mit der gewünschten Sonde bei ebenfalls 65°C inkubiert. Für die Herstellung des Sondenmixes wurden Hybridisierungspuffer und tRNA (100µg/ml) 100:1 gemischt und je 1ml davon mit 10µl Sonde (Endkonzentration 0,25µg/ml) vereint. Dieser Mix wurde 5min bei 80°C

inkubiert, um die Sonde zu denaturieren, und im Anschluss zu den Embryonen gegeben. Überschüssige Sonde wurde am nächsten Tag entfernt indem zweimal 30 min bei 65°C mit frischem Hybridisierungspuffer gewaschen wurde. Nachdem die Embryonen auf RT abgekühlt waren, folgte ein RNaseA-Verdau bei 37°C. Anschließend wurde mehrfach mit Formamid-Puffer bei 65°C gewaschen, zunächst 1:1 verdünnt mit RNase-Lösung und später verdünnt mit MABT (1:1) gefolgt von zwei Waschschritten mit MABT. Zur Absättigung unspezifischer RNAs wurden die Präparate in Blockierlösung 1 h vorbehandelt und anschließend in 4°C mit Anti-DIG-Fab Antikörper (1:5000) in 1% BBR/MABT rotierend inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde während 1-tägigem Waschen mit PBST/Tetramisol (500 mg/1l) unter mehrfachem Lösungswechsel entfernt. Zur Detektion des Antikörpersignals wurden die Embryonen zunächst 3x für 20 min in ALP-Puffer äquilibriert und anschließend mit BM Purple AP Substrat versehen und bei RT inkubiert bis ein deutlich sichtbares Signal zu erkennen war. Zur Konservierung der Signale wurden die Präparate letztlich 3x mit ALP-Puffer gewaschen und in 4%PFA/PBS fixiert. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit dem Binokular und der AxioVision software. Eine Lagerung der gefärbten Embryonen war bei 4°C möglich.

ALP-Puffer: 12 ml 5M NaCl, 30 ml 1M MgCl₂, 6 ml 10% Tween20, 60 ml 1M Tris pH9.5, 300 mg Tetramisol → auffüllen auf 600 ml mit H₂O

Hybridisierungspuffer: 25 ml Formamid, 12.5 ml 20x SSC, 25 µl Heparin, 500µl 10% Tween20 → auffüllen auf 50 µl mit H₂O-DEPC

RIPA-Puffer: 2.5ml SDS 10%, 15ml NaCl (5M), 5ml NP 40, 2,5g Deoxycholat, 1 ml EDTA (0.5M), 25 ml Tris (1M, pH 8) → 500 ml H₂O-DEPC

RNaseA: 50ml RNase-Lösung, 500µl 10mg/ml RNase-stock

ProteinaseK: 1 ml Tris pH 7, 0,1 ml EDTA (0.5 M) → add 500 ml H₂O- DEPC

PBST: PBS, 0.1% Tween20

SSC/FA/T: 100 ml SSC (20x), 500 ml Formamid, 10 ml Tween20 (10%)
→ auffüllen auf 1 l with H₂O

3.3.7.3. Schnitt *in situ* Hybridisierung (Schnitt ISH)

Für eine *in situ* Hybridisierung auf 5-7µm dicken Paraffin-Gewebeschnitten wurden diese erst entparaffinisiert und rehydriert. Dazu wurde 2 x 15min in UC, 2x 10 min in 100%EtOH, 5 min in 65% EtOH, 5 min in 50% EtOH/PBS, 5min in 25% EtOH/PBS und dann 2x 5 min in PBS inkubiert. Fixiert wurde 10 min in 4%PFA/PBS, danach 3 x mit PBST gewaschen und in Proteinase K Lösung verdaut 10 min lang verdaut. Hierbei war

die Konzentration der Proteinase K abhängig davon wie alt die Embryonen bei der Präparation waren. Für E12,5 und E13,5 wurden 15 µl, für E14,5 100 µl und für E16,5 sowie alle älteren Stadien 200µl eingesetzt. Bei Stadien älter als E16,5 verlängerte sich der Verdau auf 20-30 min. Nach der Proteinase K Behandlung wurde erneut 3 x in PBST gewaschen, wiederum für 5 min in 4% PFA/PBS fixiert, 3 x gewaschen mit PBST und dann Acetyliert. Hierfür wurde frische Acetylierungslösung angesetzt und 10 min inkubiert. Nach finalem dreimaligen PBST waschen wurde für mind. 4 h mit vorgewärmtem Hybridisierungsbuffer bei 65°C in einer Feuchtkammer, die mit 5xSSC/50% Formamid versehen war, vorhybridisiert um unspezifische Bindungen abzudecken. Die eigentliche Sondenhybridisierung fand üN bei 65°C ebenfalls in einer Feuchtkammer statt. Die Sonde wurde in einer Konzentration von 1 µl auf 100µl Hybridisierungspuffer eingesetzt und vor der Verwendung bei 85°C für 5 min denaturiert. Am folgenden Tag wurde nach einem kurzen Waschschrift in 5x SSC und anschließendem Waschen 1xSSC/50% Formamid die überschüssige Sonde entfernt. Hierfür wurde erst 10 min bei 37°C in RNase Waschpuffer inkubiert, dann 30 min bei 37°C in RNase Waschpuffer mit 400µl/200ml RNase A die Restsonde beseitigt. Es folgten ein finales Waschen in RNase Waschpuffer und weitere Waschschriffe. Erst für 20 min bei 65°C in 2x SSC, dann 2 x 20 min bei 65°C in 0,2x SSC. Hiernach wurden die Objektträger vorbereitet für die Antikörperinkubation. Nach zweimaligem Waschen in MABT bei RT wurde über mind. 2 h mit 20% HISS/MABT in einer Feuchtkammer bei RT geblockt um unspezifische Wechselwirkungen mit dem Antikörper zu vermeiden. Während des Blockierens wurde der Antikörper anti-DIP-AP in 5% HISS/MABT bei 4°C in einer Verdünnung von 1: 2500 vorinkubiert und schließlich wurde üN in einer Feuchtkammer bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert. Zur Detektion des Antikörpers wurden die Schnitte 3 x in MABT gewaschen, 10 min in ALP-Puffer gewaschen und letztlich die enzymatische Reaktion mit Hilfe von NBT/BCIP in ALP-Puffer bei RT herbeigeführt. Die Schnitte wurden lichtgeschützt so lange inkubiert, was häufig auch über mehrere Tage bei 4°C stattfand, bis ein deutlich dunkles spezifisches Signal sichtbar war. Zum Beenden der Reaktion wurden die Präparate 10 min in ALP-Puffer gewaschen, 2 x in PBS gewaschen, 30 min bei RT in 4%PFA/PBS fixiert, abschließend 2 x in PBS gewaschen und dann mit HydroMatrix eingedeckelt. Die photographische Auswertung erfolgte mit einem Mikroskop und AxioVision software. Eine Lagerung der Präparate ist über sehr langen Zeitraum möglich.

Acetylierungslösung:	0.1 M TEA, 500 µl Essigsäureanhydrid auf 200 ml
ALP-Puffer:	16 ml NaCl, 80 ml 1M Tris pH 9.5, 40 ml 1M Mg ₂ Cl, 4 ml 10%Tween20
Blocking-Puffer:	10% BBR in 1x MABT
Hybridisierungspuffer:	1 ml 1M Tris, 12 ml 5M NaCl, 200 µl 0.5M EDTA, 1,25 ml 20% SDS, 25 ml 40% Dextran Sulfat, 2ml Denhardt's, 2 ml tRNA, 50 ml Formamid; → auffüllen auf 100 µl mit H ₂ O-DEPC
H ₂ O-DEPC:	0.1% (v/v) DEPC, üN 37°C → autoklavieren
5x MABT:	100 ml 1M Maleinsäure, 30 ml 5M NaCl, 10 ml 10%Tween20 → auffüllen auf 200 ml H ₂ O-DEPC
10x RNase Waschpuffer:	800 ml 5M NaCl, 100 ml 1M Tris, 100 ml 0.5M EDTA
20x SSC:	175.3g NaCl, 88.2g Na-Citrat / 1l H ₂ O-DEPC; pH 7.0

3.3.8. Proliferationsassay - BrdU-Inkorporation

Um die Proliferationsrate in der auswachsenden Extremität zu bestimmen wurde der BrdU-Inkorporations-Assay (Roche) verwendet. Dabei wird 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) dem Muttertier peritoneal injiziert (1ml 10 mM BrdU / 100g Körpergewicht), welches bei der Transkription in naszierende RNA eingebaut wird. Dieses markierte Transkript in sich teilenden Zellen lässt sich dann mit anti-BrdU-Antikörpern immunhistologisch detektieren.

Die Muttertiere wurde zu den gewünschten Stadien injiziert und die Embryonen 1h später präpariert. Nach der Paraffineinbettung, Schnittanfertigung und Detektion erfolgte die Auszählung der positiven Zellen und durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl die Berechnung der Proliferationsrate.

Als Variation dieses Ansatzes wurde ein sogenannter *pulse-chase assay* durchgeführt, bei dem die BrdU-Inkorporation durch zeitverzögerte Injektion von Thymidin kompetitiv geblockt wird. Dies erlaubt indirekte Aussagen über Zellwanderungen (*fate mapping*), da die zum Zeitpunkt der Injektion markierten Zellen erst 10-12 h später detektiert werden. Dazu wurde eine Stunde nach der BrdU-Injektion die 30fache Menge an Thymidin injiziert und die Embryonen 12 h später prozessiert. Die Auswertung erfolgte wie beschrieben.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer mittleren Kulturflasche wurden mit 10 ml vorgewärmtem DPBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin versehen und für maximal 3 min im Brutschrank inkubiert. Durch zusätzliches Klopfen mit der Kulturflasche konnte man die Zellen vollständig vom Flaschenboden lösen. Dann 10 ml vorgewärmtes Medium hinzugeben und 5 min bei 800 rpm zentrifugieren. Das Sediment einer mittleren Flasche in 3 ml vorgekühltem Einfriermedium aufnehmen und je 1 ml in Kryoröhrchen pipettieren. In einer Einfrierbox wurden die Zellen bei -80°C weggefroren und schließlich im Stickstofftank lagern. Es ist auf eine deutliche Beschriftung der Röhrchen mit Datum, Zelllinie Passage und Namen bzw. Initialen des Einfrieres zu achten.

Einfriermedium: 3,5 ml Medium, 0,5 ml DMSO 10%, 1 ml FCS → in dieser Reihenfolge pipettieren, da FCS, immer frisch ansetzen, vorkühlen

3.4.2. Auftauen von Zellen

Die gewünschten Zellen wurden im Wasserbad schnell bei 37°C kurz aufgetaut und sofort in ein Falcon überführt in dem bereits 10-15 ml Medium vorgelegt waren, um schädliche Rückstände des Einfriermediums zu neutralisieren. Die Suspension wurde 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Der gesamte Ansatz konnte nun in Zellkulturflaschen überführt werden, durch kreisende Bewegungen der Flasche eine gleichmäßige Verteilung der Zellen erreicht werden, und diese dann bei 37°C und 5% CO_2 -Sättigung und regelmäßigem Medienwechsel im Brutschrank kultiviert werden.

3.4.3. Splitten von Zellen

Wenn Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten wurden sie geteilt. Die Zellen in der Kulturflasche wurden mit 10 ml vorgewärmtem DPBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin versehen und für maximal 3 min im Brutschrank inkubiert. Durch zusätzliches Klopfen mit der Kulturflasche konnte man die Zellen vollständig vom Flaschenboden lösen. Sobald die Zellen sich vollständig abgelöst hatten wurden 10 ml vorgewärmtes Medium zugegeben um den schädlichen Effekt von Trypsin gering zu halten. Die Suspension wurde 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert und die Zellen danach in frischem

Medium sorgfältig resuspendiert. Nach Auszählung der Zellzahl könnte die gewünschte Zellmenge entweder in Kulturplatten, -schalen oder -Flaschen ausgesät werden.

3.4.4. Bestimmung der Zellzahl

Um eine bestimmte Zellzahl zu definieren wurde die Anzahl der Zellen in einer Lösung gezählt. Dazu wurden 20 µl deiner Zelllösung in eine Neubauer-Zellkammer pipettiert und die 4 Quadrate jeweils ausgezählt. So ließ sich ein Mittelwert bestimmen, der die Zellzahl $\cdot 10^4$ angab.

3.4.5. Transfektion von Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von fremder DNA in Zellkulturzellen. Man kann unterscheiden zwischen transienter Transfektion, dem vorübergehenden Einbringen des Plasmids, und stabiler Transfektion, dem dauerhaften Einbau in das Genom der Kulturzelle. Zur Transfektion wurde ExGen500 oder Superfect (beides Fermentas) den Angaben im Herstellerprotokoll gemäß verwendet.

3.4.6. Immuncytologie

Mittels dieser Methode wurde die subzelluläre Lokalisation von Proteinen mit spezifischen Antikörpern analysiert. Dabei wird ein spezifischer Primärantikörper durch einen Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Hierbei kann man sowohl endogenes als auch durch Transfektion überexprimiertes Protein nachweisen.

Die Zellen, die auf Deckgläschen ausgesät und 24 h zuvor mit dem gewünschten DNA-Konstrukt transfiziert worden waren, wurden 2 mal mit PBS gewaschen und dann 20 min mit MetOH bei -20°C für 10 min fixiert und permeabilisiert. Internalisierte Fluorophore, wie Tryptophan oder Phenylalanin, wurden mit einer Inkubation für 10 min in 50 mM NH_4Cl in PBS abgefangen. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden unspezifische Bindungen mit 10% FCS in PBS bei RT mindestens 30 min (besser 2h) in einer Feuchtkammer abgesättigt und danach mit dem Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung inkubiert. 50 µl der AK-Lösung wurden in der Feuchtkammer vorgelegt und dann das Deckgläschen über Kopf darauf platziert, so konnte das Austrocknen uN bei 4°C verhindert werden. Am folgenden Tag wurde dreimal in PBS gewaschen und mit dem passenden Sekundärantikörper in Blockierungslösung für 1 h bei RT inkubiert. Zu dieser Inkubationslösung wurde ebenfalls DAPI (1:750) hinzugefügt, was die Orientierung innerhalb der Zelle erleichtert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit

PBS wurde in Fluoromount G eingedeckelt. Bei Lagerung bei 4°C und lichtgeschützt konnten die Objekte auch nach mehreren Wochen noch analysiert werden. Die jeweiligen Verdünnungen der Antikörper sind in der Tabelle bei Materialien ersichtlich.

3.4.7. Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde die Methode der Co-Immunopräzipitation (CoIP) aus eukaryotischen Zellen angewandt. Dabei wird ein mit einem artifiziellen Anhang (Tag) versehenes Köderprotein mit Hilfe von Sepharosegekoppelten Antikörpern präzipitiert und potentielle Interaktionspartner detektiert.

6*10⁵ Zellen wurden in 3cm-Schalen ausgesäht und nach 24 h mit den jeweiligen Konstrukten mit ExGene500 (Fermentas) laut Herstellerprotokoll transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen und in 500 µl Lysispuffer inklusive Inhibitoren für 30min auf der Wippe lysiert. Um Proteindegradation zu verhindern wurden alle Schritte der CoIP auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Anschließend wurde aus dem Lysat der Zelldebris durch Zentrifugation bei 4°C, 13 000 rpm für 15 min pelletiert und vom Überstand 5 µl zur Konzentrationsbestimmung und 50 µl zur Expressionskontrolle (Lysatprobe) verwendet. Für die eigentliche CoIP-Reaktion wurden 1000-1500 µg Gesamtprotein eingesetzt. 20 µl der Flag-beads (Sigma) wurden für 1 h bei 4°C mit 3% BSA in Lysispuffer vorblockiert, was unspezifische Bindungen an die Sepharose reduzierte. Für alle anschließenden Waschschrte wurden die beads durch 10 sec und 10 000 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen, 500 µl jeweiliger neuer Puffer zugegeben und durch Antippen vermischt. Die beads wurden so 3x mit Lysispuffer gewaschen und 2 h bei 4°C auf dem Drehrad mit dem Gesamtlusat inkubiert. Danach wurden die beads wiederum 5-7x mit Lysispuffer gewaschen und direkt in Probenpuffer denaturiert. Für starke Interaktionen oder bei unspezifischem Hintergrund wurde 3x unter Hochsalzbedingungen gewaschen (350 mM NaCl Lysispuffer) und noch 3x mit normalem Lysispuffer (50 mM NaCl). Bei dieser höhere Stringenz konnten jedoch schwache Interaktionspartner verloren gehen. Nach erfolgter CoIP wurden die Lysat- und CoIP-Proben denaturiert und per SDS-PAGE analysiert. Hierbei ist zu beachten, dass bei der direkten Denaturierung in Probenpuffer die Antikörperfragmente der beads abgelöst werden und bei der Verwendung von Maus-spezifischen Primärantikörpern Hintergrundbanden (25 kDa und 50 kDa, leichte und schwere Kette) produzieren.

Lysispuffer: 50 (350)mM NaCl, 50mM HEPES, 10mM EDTA, 10%Glycerol, 1% Triton-X100; Inhibitoren: 50µl 200mM PMSF, 10µl 1mg/ml Aprotinin, 10µl 1mg/ml Pepstatin, 10µl 1mg/ml Leupeptin, 50µl 200mM aktiviertes Na₃VO₄, 50µl 200mM NaF

3.4.8. Luziferase-Reporter-Assay

In dieser Arbeit wurde mit dem Topflash-Assay ein Luziferase-basiertes Reporterkonstrukt in eukaryotischen Zellen verwendet. Dabei wurde neben dem eigentlichen Reporter (Firefly Luziferase) zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eine weitere Luziferase exprimiert. Die Normalisierung gegen eine interne Kontrolle minimiert die experimentelle Variabilität durch Zellunterschiede und Transfektionseffizienzen. Das Dual-Glo[®] Luziferase Reporter System bietet eine Möglichkeit die Aktivität von *Firefly* Luziferase (*Photinus pyralis*) und *Renilla* Luziferase (*Renilla reniformis*) hintereinander im gleichen Ansatz zu messen. *Firefly* und *Renilla* Luziferase haben unterschiedliche Strukturen, da sie aus verschiedenen Organismen stammen, und benötigen daher auch unterschiedliche Substrate. Dies ermöglicht eine selektive Unterscheidung ihrer biolumineszenten Reaktion. Im Dual-Glo[®] System wird die Lumineszenz der *Firefly* Luziferase gestoppt und zeitgleich wird die Reaktion der *Renilla* Luziferase aktiviert. Die *Firefly* Luziferase ist ein ungefähr 60 kDA großes Protein, dass keinerlei Modifizierung mehr benötigt um enzymatisch aktiv zu sein. Luziferin wird in einer ATP, Mg²⁺ und O₂ abhängigen Reaktion oxidiert und dies erzeugt schnell nach der Substratzugabe eine Lichtreaktion. Verstärken kann man diese Reaktion durch die Zugabe von CoA, was auch die Lumineszenz stabilisiert. *Renilla* Luziferase ist ein ungefähr 35 kDA großes Protein was ebenfalls nicht modifiziert werden muss, ebenso sofort biolumineszent aktiv ist, aber ein anderes Substrat benötigt als *Firefly*.

Alle Luziferase-Reporter-Assays wurden in 24-Loch Platten durchgeführt. Für alle Versuche wurden 1*10⁵ Zellen ausgesät und nach 24 h mit ExGen500 laut Herstelleranweisungen transfiziert. Pro Loch wurden mit 150 ng Reporterkonstrukt, 10 ng Normalisierungskonstrukt und die jeweils erwünschten Testkonstrukte eingesetzt. Die Gesamt-DNA-Menge wurde mit Leervektor auf die vom Hersteller empfohlene Menge aufgefüllt. Wichtig war in jedem Versuch eine Leervektorkontrolle und eine untransfizierte Kontrolle durchzuführen, um jeden Versuch in sich normalisieren und auswerten zu können. Alle Versuche wurden 3x in Duplikaten durchgeführt. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und in 100 µl Lysispuffer

(Promega) lysiert. Die Proben konnten bis zur Messung bei -80°C gelagert werden. $25\ \mu\text{l}$ dieses Lysats wurden mit $25\ \mu\text{l}$ Dual-Glo[®] versehen, gründlich geschwenkt und dann im Luminometer mit 10 min Zeitverzögerung gemessen. Im Anschluss wurde Dual-Stop and Glo[®] mit Substrat (1:100) versetzt, von diesem Gemisch $25\ \mu\text{l}$ zu dem bereits gemessenen Luciferaseansatz gegeben und erneut gemessen.

3.4.9. Maus-Micromasskulturen (mMM)

Micromasskulturen ermöglichen die Analyse aller Stadien der Knorpeldifferenzierung. Die Präparation und Kultivierung der Zellen ist im Falle des Hühnchens detailliert beschrieben (DeLise et al., 2000; Seemann et al., 2005). Für Mäuse erfolgte ein leicht variiertes Protokoll. Die Embryonen (E12.5) wurden präpariert und in PBS überführt. Die abgetrennten Extremitäten wurden in HBSS gesammelt und bei 37°C mit Dispase (3 mg/ml in HBSS) für ca. 15 min verdaut bis sich das Ektoderm ablöst. Nach mehrfachem Waschen mit HBSS wurde der Zellverband mit 0.1% Collagenase Typ Ia; 0.1% Trypsin; 5% FCS in PBS ohne Ca/Mg in einem Wasserbad bei 37°C aufgelöst, dann 1 ml vorgewärmtes mMM Medium dazugegeben, die Zellen vereinzelt, danach durch ein Zellsieb filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und anschließend so aufgenommen, dass die Zellzahl $3,6 \cdot 10^7$ Zellen/ml beträgt. Pro angelegte Kultur wurden $10\ \mu\text{l}$ zentral in der Platte durch Auftropfen ausgesät. Die Kulturen wurden 2 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert damit die Zellen sich absetzen können und danach mit 1 ml mMM-Medium versorgt. Das Medium sollte alle 2-3 Tage gewechselt.

mMM-Medium: DMEM:F12; 10% FCS; 1% L-Glutamin; 1% Pen/Strep

3.4.10. Alcian Blau-Färbung von Maus-Micromasskulturen

Zu den gewünschten Zeitpunkten wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 1x mit DPBS gewaschen. Unter dem Abzug wurden die Kulturen für 15 min bei RT fixiert und danach dreimal mit PBS gewaschen. Zur Färbung der differenzierenden Zellen wurden $300\ \mu\text{l}$ Alcian Blau Färbelösung zu den Zellen gegeben und üN bei RT auf der Wippe gefärbt. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung mit voll entsalztem Wasser gespült, bis sich kein Farbstoff mehr löste. Die Kulturen wurden in den Zellkulturplatten getrocknet und abschließend fotografisch ausgewertet. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte photometrisch nach Herauslösen mit 6M Guanidin-HCl bei 595nm im Elisa-Reader.

Kahles Fixativ: 144.5 ml EtOH, 5 ml Formaldehyd, 19.5 ml Essigsäure
→ add 500 ml H₂O

Alcian Blau: 10g AB + 100ml 1N HCl + 900ml H₂O

3.4.11. LacZ-Färbung von Maus-Micromasskulturen

Zur Anfärbung der β -Galactosidase-Aktivität in Maus-Mikromasskulturen wurde analog der LacZ-Färbung in Embryonen vorgegangen (siehe 3.3.5). Nach vorsichtigem Waschen mit PBS wurden die Kulturen 30 min bei 4°C in Fixierungslösung fixiert, 3x 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 4h-üN bei 30°C gefärbt. Nach kurzem Waschen mit PBS wurden die Kulturen getrocknet und mittels eines Binokulars analysiert. Die Quantifizierung erfolgte semiquantitativ mittel des Zeiss-Softwaremoduls Axiovision AutMess.

4. Ergebnisse

4.1. *in vivo* Analyse von Ror2 - die Ror2^{W759X}-Maus als Modell für die humane Brachydaktylie Typ B1

Der zentrale Punkt dieser Arbeit ist die *in vivo* Analyse der Ror2 Funktion im Laufe der Extremitätenentwicklung. Ziel war eine detaillierte Beschreibung der Rolle von Ror2 bei der embryonalen Fingerentwicklung, insbesondere die Beteiligung von Ror2 bei der Pathogenese der BDB. Als Basis für diese Studien diente vor allem die Ror2^{W749X}-Maus, welche in Kooperation mit A. Economides und R. Raz (Regeneron Inc., Tarrytown, NY) generiert und initial charakterisiert wurde (Raz et al., 2008). Zusammen mit anderen Mauslinien wurde ein Modell zur Pathogenese von Brachydaktylien entwickelt und beteiligte Signalwegskomponenten identifiziert.

4.1.1. Expression von Ror2 während der Handentwicklung und Chondrogenese

Als Basiswissen für die Analyse der Ror2-Funktion in der Fingerentwicklung und im Hinblick auf den ebenfalls durchgeführten Wnt-Screen wurde die Expression von *Ror2* in der embryonalen Extremitätenentwicklung untersucht. Dabei wurden bestehende Literaturdaten verifiziert und neue Domänen identifiziert. Da eine Detektion von Ror2 mittels Antikörper oder RNA-Sonde nicht die erwünschte Auflösung und Qualität erbrachte, wurde die Mauslinie Ror2-LacZ-fus (DeChiara et al., 2000) verwendet. In dieser Maus ist der intrazelluläre Bereich von Ror2 durch LacZ(β -Galactosidase) ersetzt (Abbildung 8 A), was eine indirekte Detektion mittels LacZ-Färbung ermöglicht. Während die Maus im homozygoten Fall in einigen Aspekten dem Ror2-KO ähnelt und eine zusätzliche Brachydaktylie aufweist, ist der heterozygote Genotyp phänotypisch normal. Mit Hilfe der enzymatischen Verstärkung des Signals bei der Färbereaktion konnte eine exakte Lokalisierung von Ror2 erfolgen.

In der frühen Extremitätenentwicklung konnte Ror2 bei E11.5 in der Haut, der initialen Kondensation, sowie im Mesenchym detektiert werden (Abbildung 8 B). Die Färbung zeigte auch eine bisher unbeschriebene Expression von Ror2 in der AER (Stern*) in Abbildung 8 B und C), dem wichtigste Signalzentrum für das proximo-distale Wachstum der Extremität. Eine unspezifische Färbung konnte ausgeschlossen werden, da die Kontrollen auch nach mehrtägiger Färbung keinerlei Hintergrund zeigten (Daten nicht

gezeigt). Dieses Expressionsmuster persistiert in den Stadien E12.5 und E13.5 (Abbildung 8 C), die Expression in den Knorpelanlagen wird dabei deutlicher. Während Ror2 in der initialen Kondensation bei E12.5 stark exprimiert ist, zeigen die Gelenke bei E13.5 kein Signal (Abbildung 8 C). Für die späteren Experimente und Aussagen ist hier die Expression von Ror2 in der distalen Zellpopulation der zukünftigen Phalangen 2 und 3 (p2/3) zu beachten. Hier findet bei E13.5 die Rekrutierung der mesenchymalen Zellen in die auswachsende Kondensation und somit das eigentliche Längenwachstum statt (siehe 4.1.2.2 und 4.1.2.3). In der Wachstumsfuge zeigt Ror2 die schon beschriebene Expression im Perichondrium sowie in allen Stadien der Chondrozytendifferenzierung außer in hypertrophen Chondrozyten (Abbildung 8 D) (DeChiara et al., 2000).

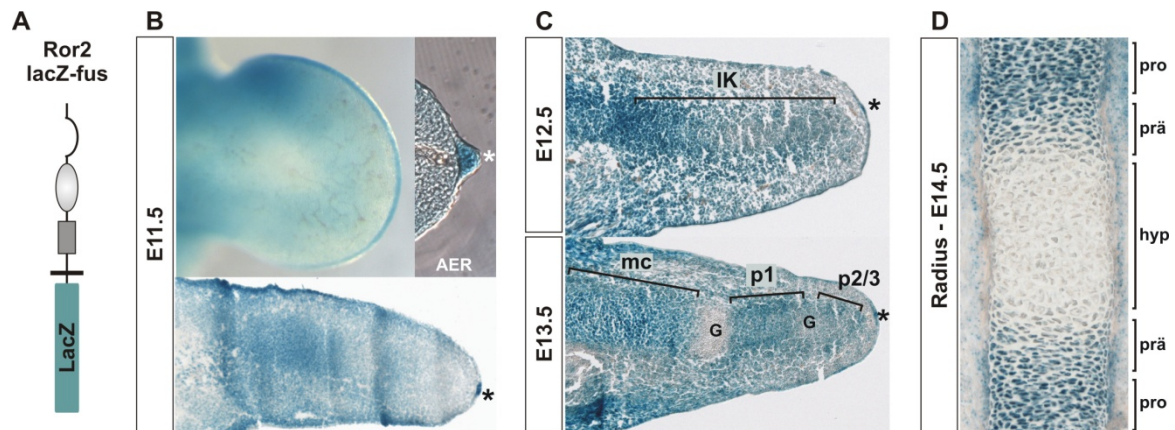


Abbildung 8: Lokalisation von Ror2 in Ror2-LacZ-fus-Mäusen

Whole mount und Cryoschnitt-LacZ-Färbungen von heterozygoten Ror2-LacZ-fus Präparaten; embryonale Stadien wie angegeben. (A) Ror2- β -Galactosidase(LacZ)-Fusionsprotein. (B) Expression von Ror2 in Haut, Mesenchym, initialen Kondensation und AER (*) bei E11.5. (C) Ror2-Signal in Mesenchym, AER (*) und Chondrozyten bei E12.5 und E13.5, Gelenke ausgespart. (D) Wachstumsfuge vom Radius bei E14.5; Ror2-Expression in allen Stadien der Chondrozytendifferenzierung ausgenommen Hypertrophie sowie im Perichondrium.

Abkürzungen: AER - apikale ektodermale Randleiste; Chondrozytenstadien: pro - proliferierend, prä - prähypertroph; hyp - hypertroph; G - Gelenk; IK - initiale Kondensation; mc - Metacarpalia; p1 - Phalange 1; p2/3 – Zellpopulation der Phalangen 2/3.

4.1.2. Phänotyp der Ror2W749X-Maus

4.1.2.1. Generelle Beschreibung der rezessiven Brachydaktylie (BD) in der Ror2W749X-Maus

Die zentrale Mauslinie dieser Arbeit ist die Ror2W749X-Maus (Raz et al., 2008), welche die distale Trunkation im Falle der humanen BDB widerspiegelt. Hierbei ist die C-terminale S/T/P-Domäne durch einen Flag-Tag ersetzt und Ror2 somit nach der Kinase trunziert (Abbildung 9 A). Dies resultiert neben im homozygoten Genotyp neben partiellen Robinow-Symptomen vor allem in einer vollständig penetranten Brachydaktylie (BD); den homozygoten Tieren fehlen alle mittleren Phalangen (p2) der Vorder- als auch der Hinterextremität (Abbildung 9 B und C) (Raz et al., 2008).

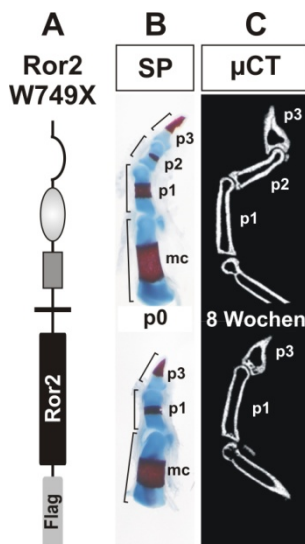


Abbildung 9: Phänotyp der Ror2W749X-Maus

(A) Trunkation der Ror2W749X-Maus; ein Flag-Tag ersetzt die S/T/P-Domäne und trunziert somit Ror2 intrazellulär analog der humanen BDB. Dies resultiert im homozygoten Fall in dem Verlust der mittleren Phalangen (p2), hier gezeigt in Skelettpräparationen Neugeborener (B) und µCT-Scans adulter Tiere (C).

Abkürzungen: mc - Metacarpalia; p1-3 - Phalangen 1-3; SP - Skelettpräparation; µCT – Mikrofokus-Computertomographie

Während Robinow-verursachende Mutationen im Funktionsverlust (*loss-of-function*) von ROR2 führen, wird für die BDB ein Funktionsgewinn des Proteins (*gain-of-function*) vermutet (siehe Einleitung). Um einen neomorphen Effekt des Flag-getaggten Ror2W749X-Allels zu zeigen, wurden Verkreuzungen mit Ror2^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Nach einer Elimination des möglicherweise dominanten Wildtyp-Ror2-Allels im phänotypisch unauffälligen heterozygoten Fall ist nur noch ein Ror2W749X-Allel vorhanden, ein *gain-of-function* Effekt sollte sich zeigen. Während die beiden jeweiligen heterozygoten Genotypen keinerlei Auffälligkeiten zeigen (a1, a2), ist in den Fingern der Ror2^{-W749X}-Maus eine Verkürzung der mittleren Phalangen zu erkennen (Abbildung 10 a3 sowie Abbildung 10B), welche eindeutig stärker ausgeprägt ist als die Verkürzung im Ror2-null Genotyp (Abbildung 10 a4). Somit ist dieser Effekt dem trunzierten Ror2-Allel zuzuordnen.

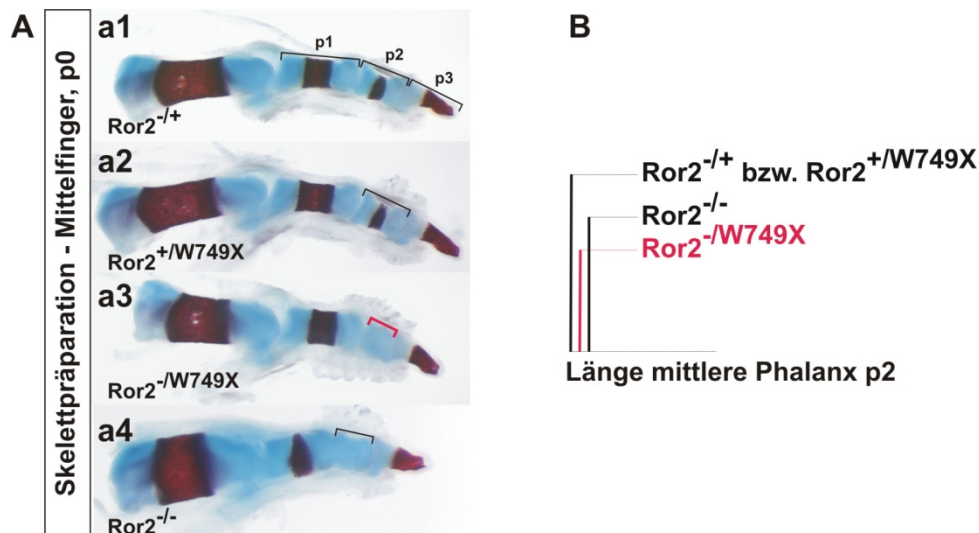


Abbildung 10: Neomorpher Effekt des Ror2W749X-Allels

(A) Skelettpräparationen von Mittelfingern und (B) Längenvergleich der mittleren Phalangen (p2) bei einer Verkreuzung der Ror2W749X-Maus mit dem Ror2-KO. Im jeweils heterozygoten Fall (a1, a2) sind keinerlei Effekte zu erkennen. Der neomorphe Effekt des Ror2W749X-Allels ist in Form einer zusätzlichen Verkürzung der mittleren Phalanx im Genotyp $Ror2^{-/W749X}$ (a3) zu erkennen, welche deutlich stärker ausgeprägt ist als die Verkürzung im $Ror2^{-/-}$ (a4).

Die BD im Fall $Ror2^{-/W749X}$ ist jedoch schwächer ausgeprägt als bei $Ror2^{W749X/W749X}$, was für einen Dosiseffekt spricht. Dies kann durch verringerten Proteinstabilität und Lokalisierung des artifiziellen Ror2-Konstruktes erklärt werden (siehe 5.1), weiterführende Experimente (Oberflächen-Biotinylierungsassays) sind in Arbeit.

4.1.2.2. Fehlende Ausbildung der Zellpopulation p2/3 als entwicklungsbiologische Ursache der Brachydaktylie

Um die Entstehung des BD-Phänotyps der Ror2W749X-Maus räumlich und zeitlich einzugrenzen, wurde die Fingerentwicklung mit Hilfe der Markergene *Collagen 2* (Abbildung 11 A) und *Sox9* (Abbildung 11 B) sowie HE/AlcianBlau-Färbungen (Abbildung 11 C) von E12.5 bis E14.5 verfolgt. Dabei zeigte sich, dass die initiale Kondensation (IK) bei E12.5 im homozygoten Ror2W749X-Fall kürzer und breiter ist und zellmorphologisch einen mesenchymaleren Charakter aufweist als im Wildtyp (Klammern IK in Abbildung 11 A, B, C). Dies spiegelt einen Differenzierungsdefekt der Chondrozyten wieder, wie schon im Fall der Ror2-KO oder Ror2-LacZ-fus-Mauslinien beschrieben (DeChiara et al., 2000; Takeuchi et al., 2000) und erkennbar auch an den

verkürzten und dickeren Skelettelementen im adulten Ror2W749X-Tier (Raz et al., 2008). Der entscheidende Schritt in der Entwicklung der BD konnte zeitlich auf E13.5 und räumlich auf die Region der Fingerspitze festgelegt werden. Im Wildtyp findet dort zu diesem Zeitpunkt die Ausbildung der Zellpopulation statt, die später die Phalangen 2 und 3 ausbilden wird. Diese im Folgenden und in den Abbildungen als p2/3 bezeichnete Zellpopulation ist morphologisch durch hoch-kondensierte Zellen und eine charakteristische Dreiecksform zu erkennen. In diesem Sox9-positiven Bereich findet die Elongation des auswachsenden Fingers statt. Bei E14.5 ist im Wildtyp mit der Ausbildung des letzten Gelenks und der Degradation der AER die Musterbildung des Fingers und die Unterteilung in die drei Phalangen beendet. In der Ror2W749X-Maus ist bei E13.5 die Ausbildung eben dieser Zellpopulation p2/3 schwer gestört. Sie wird nur rudimentär angelegt und ist morphologisch schwer zu erkennen (siehe HE-Färbung Abbildung 11). Es findet fast keine Zellkondensation und ebenso kein Längenwachstum statt. Bei E14.5 wird nach der Degradation der AER aus dem verbleibenden Zellmaterial ein intaktes distales Element produziert. Als Resultat fehlen der homozygoten Ror2W749X-Maus final alle mittleren Phalangen (p2).

Abbildung 11 nächste Seite: Etablierung des Brachydaktylie-Phänotyps im Laufe der Fingerentwicklung

Vergleiche der Vorderextremitäten von Wildtyp-Mäusen mit homozygoten Ror2W749X-Mäusen Stadium E12.5 bis E14.5 mittels (A) Collagen Typ 2 alpha 1 whole mount und Schnitt ISH; (B) Sox9 Immunhistologie sowie (C) HE/AlcianBlau-Färbung. Embryonale Stadien wie angegeben; Elemente der Fingerentwicklung mit Klammern gekennzeichnet. In allen Ansätzen ist in der Ror2W749X-Maus bei E12.5 die kürzere und breitere initiale Kondensation sowie bei E13.5 die nur rudimentär angelegte Zellpopulation p2/3 zu erkennen. Bei E14.5 ist die Unterteilung in die einzelnen Fingerelemente abgeschlossen und im Genotyp Ror2^{W749X/W749X} fehlen die mittleren Phalangen. Detaillierte Beschreibung im Text

Abkürzungen: IK - initiale Kondensation; p1-3 - Phalangen 1-3.

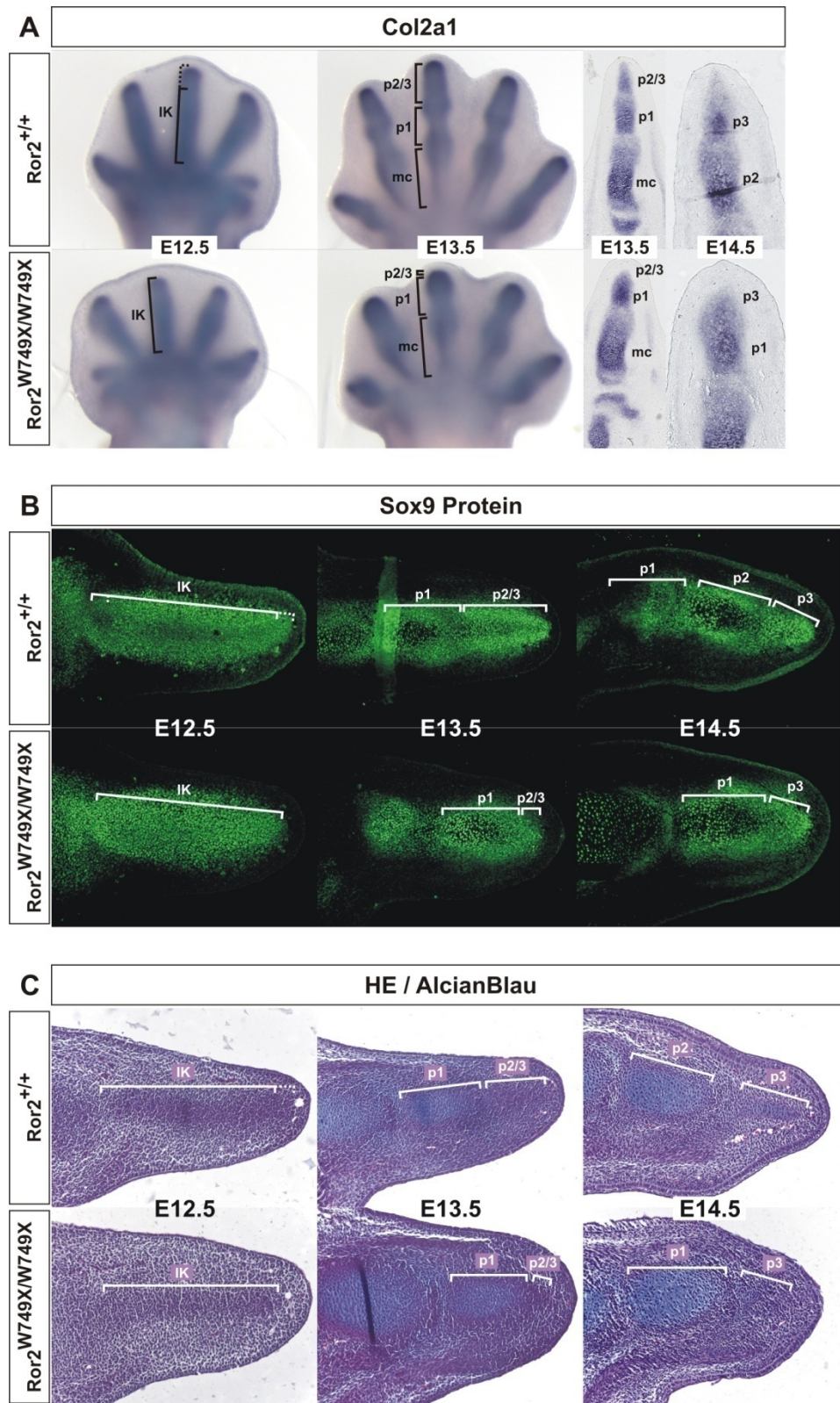


Abbildung 11: Etablierung des Brachydaktylie-Phänotyps im Laufe der Fingerentwicklung

Beschriftung siehe vorherige Seite

Daß es sich bei der BD der Ror2W749X-Maus nicht wie anfangs vermutet um einen Defekt in der Gelenkentwicklung handelt, wird bei einer Analyse des Gelenkmarkers Gdf5 deutlich (Abbildung 12). So sieht es bei einem Whole mount ISH basierten Vergleich der einfachen Fingerlänge zwischen Ror2^{+/+} (normal gegliederte Finger), Ror2^{-/-} (normal gegliederte Finger) und Ror2^{W749X/W749X} (fehlende mittlere Phalangen) noch nach einem graduellen Modell aus, bei dem der Ror2-KO zwar stark verkürzte Finger aufweist, aber anscheinend noch die zur Gelenkbildung erforderliche Mindestlänge erreicht. Im Falle der homozygoten Ror2W749X-Maus dagegen scheint die Fingerlänge und damit die Gelenkbildung schwerer betroffen zu sein (Abbildung 12 A).

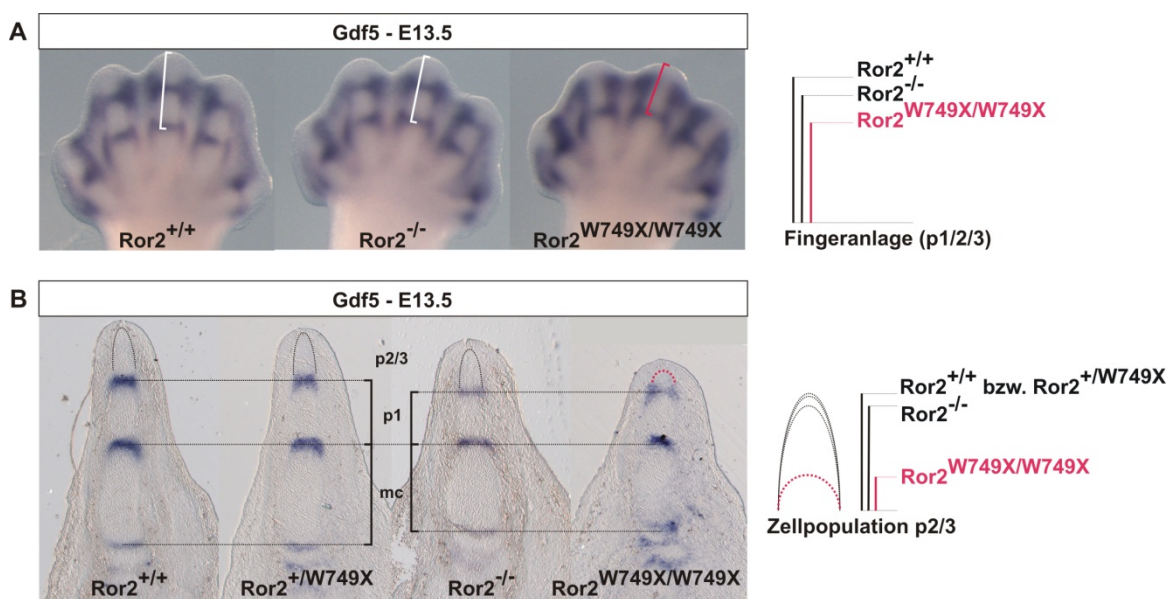


Abbildung 12: Rudimentär angelegte Zellpopulation p2/3 als Ursache der BD

Whole mount (A) und Schnitt (B) ISH für den Gelenkmarker Gdf5 bei E13.5 sowie schematische Verdeutlichungen der Fingerlänge p1/2/3 und der Zellpopulation p2/3 jeweils daneben. Vergleich der phänotypisch normalen Fälle Ror2^{+/+}, Ror2^{+/W749X} und Ror2^{-/-} mit dem BDB-Modell Ror2^{W749X/W749X}. Fingerelemente in den Bildern gekennzeichnet; Genotypen wie angegeben. Nicht die Veränderung der gesamten Fingerlänge oder der Gelenkinitiation sondern die gestörte Ausbildung der p2/3 ist verantwortlich für die Ausbildung der BD.

In Schnitt-ISH stellt sich die Situation jedoch diffiziler dar. So resultiert die Verkürzung der Finger im Ror2-KO vor allem aus den sehr viel kürzeren Metacarpalia und ersten Phalangen, was vermutlich auf die bekannten Differenzierungsdefekte der Wachstumsfugen der Ror2-KO-Maus zurückzuführen ist. Als eigentlicher Grund für die Trunkation der Ror2W749X-Maus konnte die nur rudimentär angelegte Zellpopulation

p2/3 verifiziert werden. In allen BD-negativen Genotypen ($Ror2^{+/+}$, $Ror2^{+/W749X}$ und $Ror2^{-/-}$) ist diese in vergleichbarem Ausmaß vorhanden, nur in der an BD leidenden $Ror2^{W749X/W749X}$ -Maus ist die p2/3 sehr viel kleiner (Schema in Abbildung 12 B). Zu beachten ist auch, dass das Gelenk zwischen p1 und p2/3 in der $Ror2^{W749X}$ -Maus klar vorhanden ist, der Phänotyp also nicht mit gestörter Gelenkinduktion zu erklären ist.

4.1.2.3. Verminderte Proliferation und Rekrutierung im distalen Mesenchym als Grund für die gestörte Ausbildung der p2/3

Als Grund für das Fehlen der distalen Kondensation kommen generelle Prozesse wie erhöhte Apoptose, verminderte Proliferation und verringerte Chondrogenese in Betracht. Nachdem ektopes Apoptose in verschiedenen Ansätzen als Ursache der BD ausgeschlossen werden konnte (TUNEL und aktive Caspase-3-Nachweis, Daten nicht gezeigt), wurde die Zellproliferation in der distalen Fingerregion näher analysiert. Dazu wurde der BrdU-Inkorporationsassay verwendet und die relativen Proliferationsraten zwischen Wildtyp und homozygoten $Ror2^{W749X}$ -Mäusen verglichen. Bei E12.5 konnte in der Kondensation selbst kein signifikanter Unterschied detektiert werden (Daten nicht gezeigt und Raz et al., 2008). Bei E13.5 zeigt die $Ror2$ -Mutante jedoch eine stark verringerte Proliferationsrate in dem p2/3-flankierenden Mesenchym (Abbildung 13 A, Meßbereich weiß umrandet). Entgegen des ersten Eindruckes konnte keine abweichende Proliferationsrate in der p2/3 detektiert werden; die starke Färbung korreliert hier mit einer erhöhten Zelldichte. Um die Rekrutierung von mesenchymalen Zellen in die Kondensation zu untersuchen wurde der sogenannte *pulse-chase* Assay verwendet. Es wurden die Zellen bei E13.5 mit BrdU für eine Stunde markiert und anschließend die weitere BrdU-Inkorporation durch Gabe von unmarkiertem Uridin im Überschuß blockiert. Schließlich wurde bei E14.5 das eingebaute BrdU in der distalen Kondensation detektiert (weiß umrandeter Meßbereich in Abbildung 13 B). Somit wurden die Zellen gezählt, welche im kritischen Zeitraum in das distale Element rekrutiert wurden. Bei einer „normalen“ BrdU-Markierung ist der umrandete Bereich praktisch negativ für Proliferation (Daten nicht gezeigt und Gao et al., 2009). Zusätzlich zum mesenchymalen Proliferationsdefekt konnte hierbei in der $Ror2^{W749X}$ -Maus eine drastisch verringerte Rekrutierungsrate der flankierenden Zellen in die p2/3 detektiert werden (Abbildung 13 B; Meßbereich weiß umrandet). Die ebenfalls ermittelte Proliferationsrate der Kondensationen selbst zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht

gezeigt und Raz et al., 2008). Somit resultiert die rudimentär angelegte Kondensation p2/3 und final der Verlust der mittleren Phalangen aus einer verringerten mesenchymalen Zellproliferation zusammen mit der fast nicht vorhandenen Zellrekrutierung. Korrelierend dazu konnte zusätzlich in Maus-Mikromass-Kulturen als *in vitro* Testsystem zur Knorpelentwicklung eine verminderte Chondrogenese in der Ror2W749X-Maus nachgewiesen werden (Abbildung 13 C).

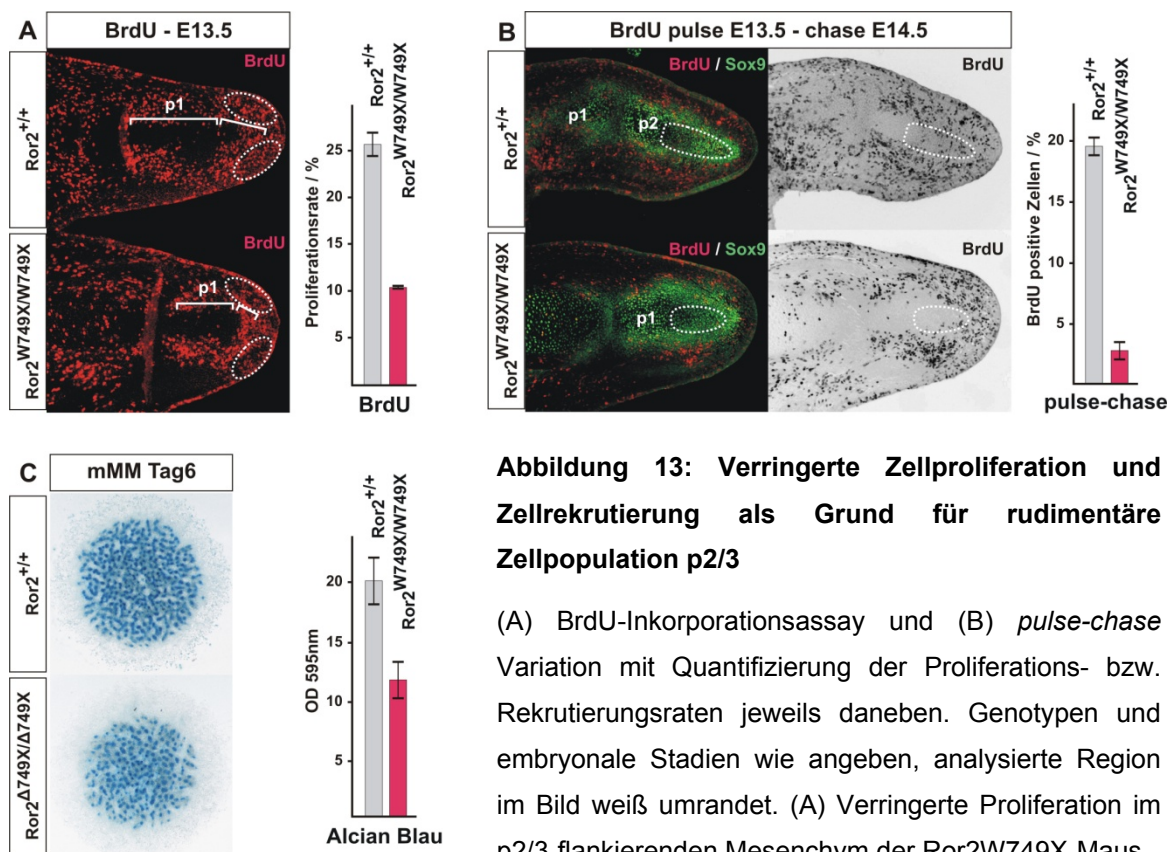


Abbildung 13: Verringerte Zellproliferation und Zellrekrutierung als Grund für rudimentäre Zellpopulation p2/3

(A) BrdU-Inkorporationsassay und (B) *pulse-chase* Variation mit Quantifizierung der Proliferations- bzw. Rekrutierungsrate jeweils daneben. Genotypen und embryonale Stadien wie angegeben, analysierte Region im Bild weiß umrandet. (A) Verringerte Proliferation im p2/3-flankierenden Mesenchym der Ror2W749X-Maus.

(B) Zusätzlich reduzierte Zellrekrutierung in die distale Zellpopulation bei der Ror2W749X-Maus. Co-Färbung mit Chondrozytenmarker Sox9 und Auswertung mittels invertierter BrdU-Aufnahme. (C) Korrelierende verminderte Chondrogenese der Ror2W749X-Maus in Maus-Mikromass-Kulturen E12.5. Alcianblau-Färbung Tag6 und photometrische Quantifizierung daneben.

Diese Defekte spiegeln sich zusätzlich in der Expression des Proliferationsmarkers *CyclinD1* wieder. So konnte in der Ror2W749X-Maus mittels RNA-ISH (Abbildung 14 A) und Immunhistologie (Abbildung 14 B) eine verringerte mesenchymale Expression von *CyclinD1* gezeigt werden (Abbildung 14 schwarz umrandete Flächen in A; Vergrößerungen in B). Im BD-negativen Fall der Ror2-KO-Maus hingegen ist diese

Expression vergleichbar mit dem Wildtyp. Auch die im Falle der BD betroffene distale Zellpopulation ist zu erkennen. So ist die p2/3 der Ror2W749X-Maus eindeutig CyclinD1-negativ, während im phänotypisch normalen Fall des Wildtyps oder Ror2-KO die p2/3 durch starke CyclinD1-Färbung gekennzeichnet ist (Abbildung 14 B). Zusammengenommen verifizieren die CyclinD1-Nachweise somit die detektierten Proliferationsdefekte der homozygoten Ror2W749X-Maus.

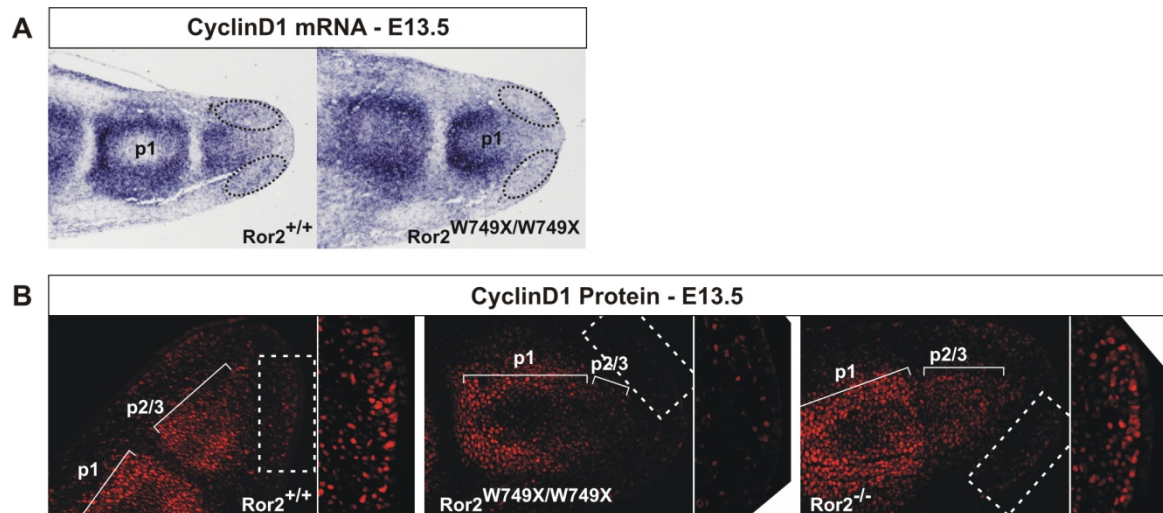


Abbildung 14: Expression des Proliferationsmarkers CyclinD1

Detektion des Proliferationsmarkers CyclinD1 bei E13.5 mittels (A) RNA-ISH und (B) Immunhistochemie. In der homozygoten Ror2W749X-Maus zeigt sich verringerte Expression von *CyclinD1* in der p2/3 selbst sowie im flankierenden Mesenchym. Im normalgliedrigen Ror2-KO ist die Cyclin-Expression unverändert. Vergrößerte Ausschnitte im Originalbild weiss gekennzeichnet; Fingerelemente gekennzeichnet; Genotypen wie angegeben.

4.1.3. Veränderte Signalwegskaskaden in der Ror2W749X-Maus

Nach der detaillierten Beschreibung des Phänotyps und Aufklärung der entwicklungsbiologischen Ursache der BD stellte sich die Frage nach beteiligten und möglicherweise veränderten Signalwegskaskaden in der Ror2W749X-Maus. Daher wurden die alle für die Fingerentwicklung essentiellen und einleitend schon im Zusammenhang mit Ror2 oder BD beschriebenen Kandidaten analysiert. Im Folgenden sind diese in die wichtigsten Komponenten aufgeschlüsselt: *Fgf*-, *Ihh*-, *Bmp*- und *Wnt*-Signaltransduktion.

4.1.3.1. Fgf-Signaltransduktion

Die Familie der *Fibroblast Growth Factors* (Fgfs) spielt eine essentielle Rolle bei dem Auswachsen der Extremität (siehe 1.1.4.1) und Fgfs werden als klassische Marker einer intakten AER verwendet. In RNA-ISH konnte eine vorzeitige Degradation der AER als Ursache der BD ausgeschlossen werden. Im homozygoten Ror2W749X-Fall ist die Expression von *Fgf8* vergleichsweise normal detektierbar (Daten nicht gezeigt und Raz et al., 2008) und die AER der auswachsenden Extremität somit intakt. Die Analyse der Fgf-regulierten Gene *Sprouty1*, *Sprouty4* und *Dusp6* ergab keine durchgängig signifikanten Expressionsunterschiede. Somit erscheint die Fgf-vermittelte Signaltransduktion in der Ror2W749X-Maus unverändert.

4.1.3.2. Veränderungen und Interaktionen mit dem Indian Hedgehog (Ihh)-Signalweg

Der Ihh/PTHrP-Signalweg reguliert nicht nur die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten (Lanske et al., 1996; Vortkamp et al., 1996), Mutationen in IHH resultieren in BDA1 (Gao et al., 2001) und zeigen eine Überlappung mit dem BDB-Phänotyp von ROR2-Mutationen. Um potentielle Veränderungen in der Ihh-Signaltransduktion in der Ror2W749X-Maus zu analysieren wurden Komponenten des Signalwegs per RNA-ISH analysiert und Verkreuzungen mit dem BDA1-Mausmodell *Ihh-E95K* (Gao et al., 2009) vorgenommen.

Im Wildtyp ist *Ihh* beim kritischen Stadium E13.5 in den Fingerelementen selber sowie stark in der distalen Fingerspitze exprimiert. Hier ist das zweigeteilte Signal zu beachten, einmal in den proximal differenzierenden Chondrozyten der p2/3 sowie einmal in der distalen Fingerspitze (Kreis in Abbildung 15 A). Die Ror2W749X-Maus zeigt eine deutlich verringerte Expressionsstärke von *Ihh* generell und die distale Expressionsdomäne fehlt fast völlig (Abbildung 15 A). Dies wird zusätzlich bei der Analyse der Ihh-regulierten Gene *Gli1* und *Patched* (*Ptc*) deutlich (Abbildung 15 C). Während beide Gene im Wildtyp eine starke Expression im p2/3-flankierenden Mesenchym zeigen, ist dieses in der Ror2W749X-Maus nicht zu detektieren. Ebenso fehlt im Falle von *Ptc1* die Expression in der Zellpopulation p2/3 selber. Zusätzlich ist eine deutlich schwächere Expression von *Runx2* im Mesenchym der distalen Fingerspitze zu erkennen (Abbildung 15 B). *Runx2* kann sowohl direkt *Ihh* regulieren (Yoshida et al., 2004) als auch von *Ihh* selber induziert werden (Shimoyama et al., 2007). Da *Runx2* bei E13.5 ausschließlich im distalen Mesenchym und nicht in der distalen Kondensation

exprimiert ist (Abbildung 15 B, $Ror2^{+/+}$), korreliert die schwächere Expression in der $Ror2^{W749X}$ -Maus mit der verringerten *Ihh*-Signaltransduktion in diesem Bereich, *Runx2* wird in diesem Fall also sehr wahrscheinlich von *Ihh* reguliert. Bei E14.5 ist die distale Expression von *Ihh* in der Mutante dann wieder in vergleichbarem Ausmaß detektierbar (Abbildung 15 A), was mit der zu diesem Zeitpunkt stattfindenden und in der $Ror2^{W749X}$ -Maus unveränderten Differenzierung des letzten Fingerelementes korreliert. Zusammengefasst zeigt die $Ror2^{W749X}$ -Maus also bei E13.5 eine vor allem distal stark verringerte *Ihh*-Expression und *Ihh*-vermittelte Signaltransduktion in dem für die Ausprägung der BD als kritisch identifizierten Mesenchym der Fingerspitze.

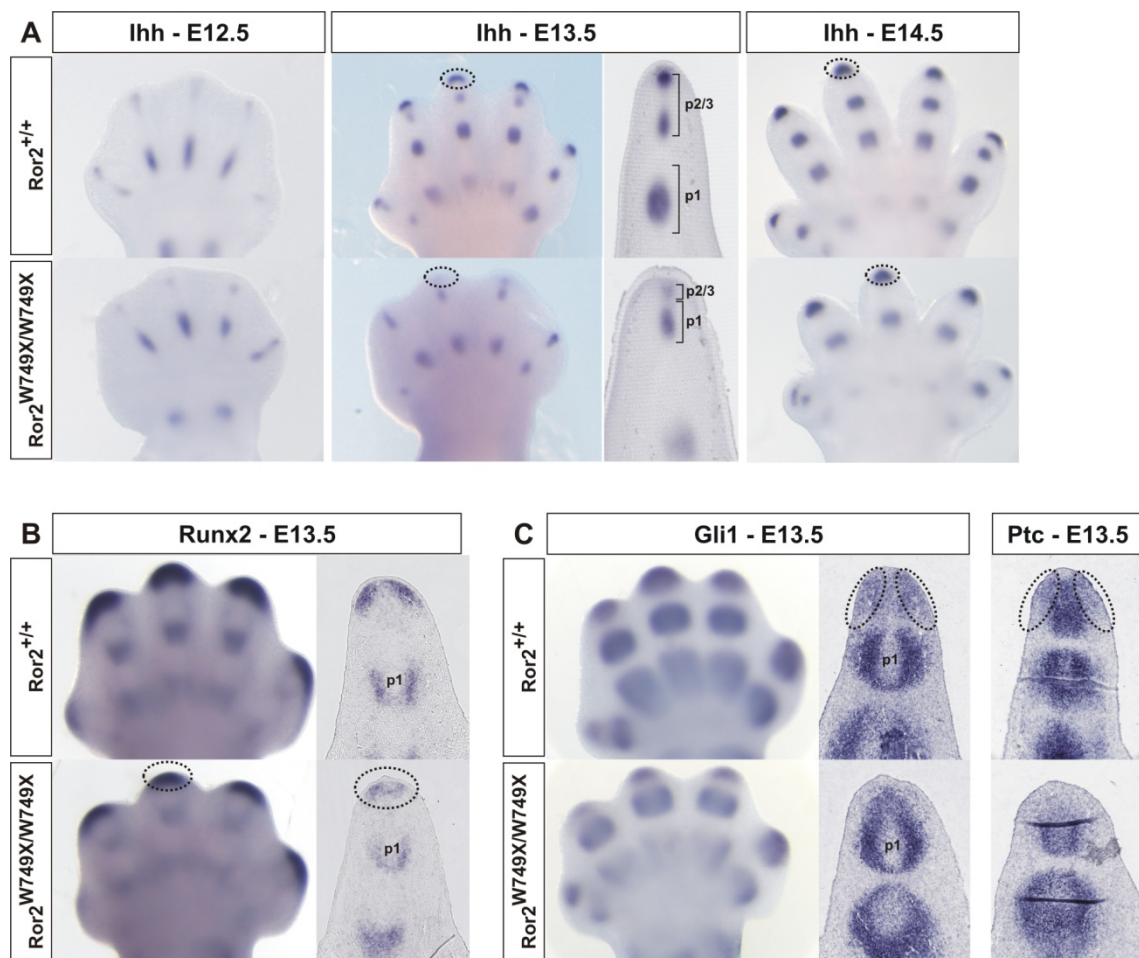


Abbildung 15: Mißregulation des *Ihh*-Signalweges in der $Ror2^{W749X}$ -Maus

Analyse von (A) *Ihh* und (B) *Runx2* sowie den (C) *Ihh*-regulierten Kandidaten *Gli1* und *Ptc* mittels Whole-mount und Schnitt ISH. Genotypen und embryonale Stadien wie angegeben. (A) Die $Ror2^{W749X}$ -Maus zeigt bei E13.5 eine deutlich reduzierte Expression von *Ihh* in Fingerelementen und einen kompletten Verlust der distalen Expressionsdomäne. (B) verringerte mesenchymale Expression von *Runx2* sowie (C) reduzierte Expression der regulierten Kandidaten im p2/3-flankierenden Mesenchym sowie der p2/3 selber (C).

Um die genetische Interaktion des Ror2-vermittelten Signalwegs und der *Ihh*-Signaltransduktion zu zeigen, wurde die BDB-Maus Ror2W749X mit der BDA1-Maus *Ihh*E95K verkreuzt und die Neugeborenen mittels Skelettpräparationen analysiert. Bei der *Ihh*E95K-Maus handelt es sich um eine Punktmutation im *Ihh*, welche über veränderte Rezeptoraffinitäten die Signalreichweite von *Ihh* beeinflusst und so über eine Hochregulierung von *Pthrp* zu einer Feedback-Inhibition der Expression von *Ihh* selbst führt (Gao et al., 2009). Da der Zeigefinger in der *Ihh*E95K-Maus schon im heterozygoten Fall betroffen ist, wurde dieser als sensitivster Finger zur Analyse verwendet und die Länge der Phalanx 2 (p2) untersucht. Während der heterozygote Ror2W749X-Fall phänotypisch normal ist (Abbildung 16 a2), zeigt sich im heterozygoten *Ihh*E95K-Finger der neomorphe Effekt der Punktmutation in Form einer leichten Verkürzung der p2 (Abbildung 16 a3). Im für genetische Interaktionen aussagekräftigsten doppelt-heterozygoten Fall ($Ror2^{+/W749X}, Ihh^{+/E95K}$) ist als völlig neuer Phänotyp deutlich eine starke Verkürzung der p2 sowie eine Verschmelzung der distalen Fingerelemente p2 und p3 zu erkennen (Abbildung 16 a4). Dieser Effekt der Interaktion Ror2/*Ihh* verstärkt sich, wenn man in den homozygoten *Ihh*E95K-Hintergrund (Abbildung 16 a5) ein Allel des trunkierten Ror2W749X einkreuzt. Hier erreicht man im Genotyp $Ror2^{+/W749X}, Ihh^{E95K/E95K}$ einen Phänotyp, welcher exakt der BDB der homozygoten Ror2W749X-Maus entspricht (Abbildung 16 a6).

Selbige Analyse wurde auch im homozygoten Ror2W749X-Hintergrund durchgeführt (Abbildung 16 B). Da die p2 im Ausgangsfall schon nicht vorhanden ist, zeigt sich vor allem eine Auswirkung auf die Differenzierung des distalen Fingerelementes. Interessanterweise erhält man in dieser Allelkombination einen der menschlichen BDB erstaunlich ähnlichen Phänotyp, bei dem erstmalig im Mausmodell die distale Phalanx stark betroffen ist (Abbildung 16 b2). Die Spezifität des detektierten Effektes für das Ror2W749X-Allel konnte mittels einer Verkreuzung der *Ihh*E95K-Linie mit dem Ror2-KO gezeigt werden (Abbildung 16 C). Hier tritt im doppelt-heterozygoten Fall nur die *Ihh*E95K-spezifische leichte Verkürzung der p2 auf. Es sind keine Anzeichen einer Verschmelzung der Elemente p2 und p3 zu erkennen (Abbildung 16 c2). Ein etwas schwächer ausgeprägter, dafür aber komplett neu auftretender Phänotyp konnte im Mittelfinger gezeigt werden (Abbildung 16 D). Bei diesem, im *Ihh*E95K-heterozygoten Fall nicht betroffenen Finger (Abbildung 16 d1) führt die zusätzliche Expression von einem Allel Ror2W749X zu einer deutlichen und spezifischen Verkürzung der mittleren Phalanx (Abbildung 16 d2). Im homozygoten *Ihh*E95K-Hintergrund durchgeführt,

verstärkt dies den homozygoten *Ihh*E95K-Effekt (Abbildung 16 d3) zu einem kompletten Fehlen der p2 (Abbildung 16 d4).

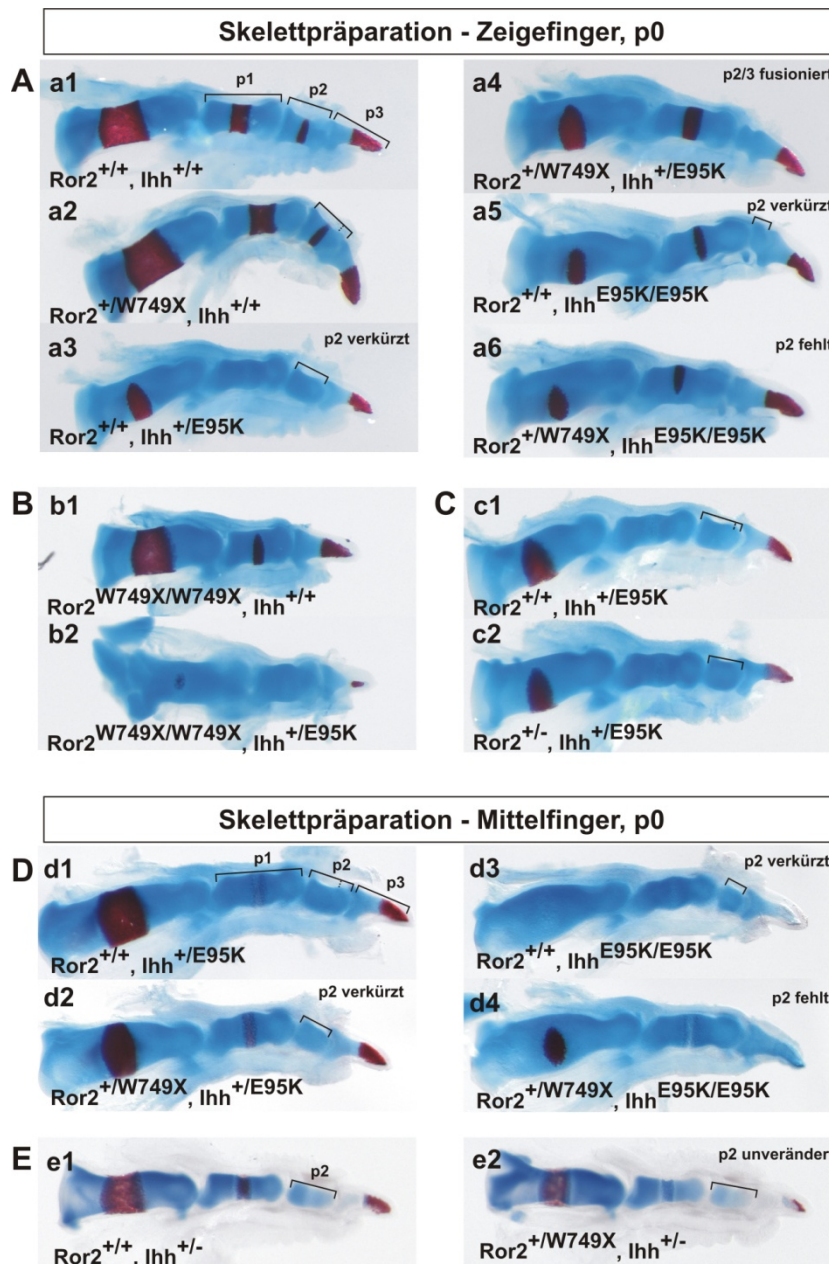


Abbildung 16: Genetische Interaktion der Ror2- und Ihh-vermittelten Signaltransduktion

Zeigefinger (A-C) sowie Mittelfinger (D, E) der Verkreuzung *Ror2*W749X bzw. *Ror2*-KO mit *Ihh*E95K bzw. *Ihh*-KO. Analyse von Neugeborenen (p0) mittels Skelettpräparationen. Fingerelemente und Genotypen wie angegeben; kritische Phalanx p2 gekennzeichnet. (A) Im doppelt-heterozygoten Genotyp tritt als neuer Phänotyp eine Verkürzung der p2 sowie eine Verschmelzung der Fingerelemente p2 und p3 auf. Im homozygoten *Ihh*E95K-Hintergrund verstärkt sich dieser Effekt zum kompletten Verlust der p2. (Weiterführung nächste Seite)

(B) Im homozygoten Ror2W749X-Hintergrund zeigt sich die Interaktion in einer gestörten Differenzierung der Chondrozyten und betrifft vor allem die distale Phalanx. (C) Der Effekt ist spezifisch für Ror2W749X, da in einer Verkreuzung IhhE95K mit dem Ror2-KO keine Anzeichen einer Interaktion zu erkennen sind. (D) Im Mittelfinger tritt als neuer Phänotyp im doppelt-heterozygoten Fall eine spezifische Verkürzung der p2 auf, welche sich im homozygoten IhhE95K-Hintergrund zur Ror2W749X-vergleichbaren BD verstärkt. (E) Diese Effekte sind spezifisch für das Allel Ror2W749X, da bei einer Verkreuzung mit dem Ror2-KO die Länge der p2 unverändert bleibt.

Bei der Verkreuzung der Ror2W749X-Maus mit dem Ihh-KO (St-Jacques et al., 1999) konnten ebenfalls keine Anzeichen einer genetischen Interaktion detektiert werden (Abbildung 16 E). Das Entfernen eines Allels Ihh im heterozygoten Ror2W749X-Hintergrund hat keine Auswirkung auf den Phänotyp. Die genetische Interaktion beschränkt sich also auf beiden Seiten auf das jeweils den humanen Mutationen entsprechende Allel, was die neomorphe Funktion beider Isoformen im Vergleich zum KO nochmals betont.

4.1.3.3. Veränderungen und Interaktionen mit dem Bone Morphogenetic Protein (Bmp)-Signalweg

Da BMP-vermittelte Signaltransduktion bei der Extremitätenentwicklung eine entscheidende Rolle spielt, verschiedene Komponenten im Zusammenhang mit Brachydaktylie beschrieben sind und auch die Interaktion von Ror2 mit der Bmpr1b-vermittelten Signaltransduktion bekannt ist (siehe 1.1.4.3 und 1.2.4), wurde diese Kaskade ausführlich auf Veränderungen in der Ror2W749X-Maus untersucht.

Mutationen sowohl in GDF5 (Polinkovsky et al., 1997; Schwabe et al., 2004; Yang et al., 2008) als auch NOGGIN (Lehmann et al., 2007) resultieren beim Menschen in BDC beziehungsweise BDB2. Im Falle von Gdf5 wurde die Gdf5-Brachypodism-Maus mit der Ror2W749X-Maus verkreuzt, für Noggin wurde die KO-Maus verwendet, da bisher keine Mauslinie mit einer Kopie des Noggin-BDB2-Allels existiert. Beide Verkreuzungen wurden auf genetische Interaktion mit dem Ror2-vermittelten Signalweg analysiert (Abbildung 17).

Bei der Gdf5-Brachypodism-Maus ($Gdf5^{bp/J}$) (Storm et al., 1994; Takahara et al., 2004) handelt es sich um eine spontane Punktmutation im *Gdf5*, welche zum Funktionsverlust des Proteins und über ektope Apoptose zur BD führt. Hier bleibt allerdings anzumerken,

dass keinerlei Experimente zu Zellrekrutierung oder ähnlichem durchgeführt wurden und der heterozygote Fall phänotypisch völlig normal ist. Bei einer Verkreuzung mit der Ror2W749X-Maus ist im doppelt-heterozygoten Fall eine verzögerte Chondrozytendifferenzierung zu erkennen, welche am deutlichsten an der leicht verkürzte mittleren Phalanx zu erkennen ist (Abbildung 17 a2, a4, Klammern in a1). Bei einer Verkreuzung der Ror2W749X-Maus mit der Noggin-KO-Maus (Brunet et al., 1998) tritt der gegenläufige Effekt ein. Im doppelt-heterozygoten Fall ist eine deutliche Verdickung der Kondensationen zu erkennen (Klammern in Abbildung 17 b2). Am deutlichsten wird dies im Ror2W749X-homozygoten Genotyp (Abbildung 17 b3), bei dem ein stark verdickter Finger beobachtet werden konnte. Jedoch tritt keine Veränderung des BD-Phänotyps auf und der Effekt scheint nicht spezifisch für die mittlere Phalanx oder das trunkierte Ror2 zu sein, da eine Verkreuzung des Noggin-KO mit dem Ror2-KO ein vergleichbares Ergebnis lieferte (Abbildung 17 b5).

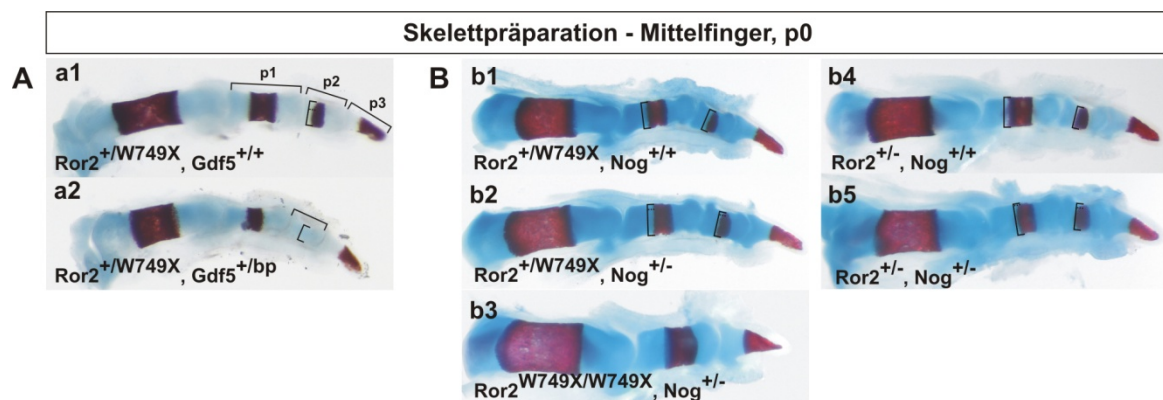


Abbildung 17: Genetische Interaktion der Ror2W749X-Maus mit der Gdf5-Brachypodism-Maus sowie dem Noggin-KO

Mittelfinger der Verkreuzung Ror2W749X bzw. Ror2-KO mit Gdf5-Brachypodism bzw. Noggin-KO. Analyse von Neugeborenen (p0) mittels Skelettpräparationen. Fingerelemente und Genotypen wie angegeben. p2 und Durchmesser mit Klammern gekennzeichnet, zu vergleichender Durchmesser als gestrichelte Klammer zusätzlich kenntlich gemacht (a1,b2,b5). Bei Verkreuzung mit dem mutierten Liganden Gdf5 tritt im doppelt-heterozygoten Fall eine verzögerte Chondrozytendifferenzierung auf (vgl. a1 mit a2). Bei einer Verkreuzung mit dem Noggin-KO ist eine Verdickung aller Fingerelemente zu erkennen (vgl. b1 mit b2), am deutlichsten erkennbar im Ror2W749X-homozygoten Hintergrund (b3). Dieser Effekt ist unabhängig vom Ror2W749X-Allel, da die Verkreuzung Ror2-KO mit Noggin-KO ein vergleichbares Ergebnis liefert (vgl. b4 mit b5).

Dennoch konnte bei diesem Versuchsansatz die genetische Interaktion von Ror2-vermittelter Signaltransduktion mit dem Bmp-Signalweg sowohl auf der Ebene des Liganden Gdf5 als auch auf der Ebene des Antagonisten Noggin gezeigt werden. Alle aufgezeigten Phänotypen betreffen die Kondensation oder die Differenzierung der Chondrozyten und deuten somit auf eine enge Interaktion von Ror2 und Bmp-Signaltransduktion bei der Regulierung dieser Prozesse hin.

In der anschließenden Analyse der Bmp-vermittelten Signaltransduktion mittels ISH und Immunhistologie konnten in der Ror2W749X-Maus schwerwiegende Defekte detektiert werden. So zeigt der Ligand *Bmp4* bei E13.5 eine deutlich reduzierte Expression im subektodermalen Mesenchym der distalen Fingerspitze (Abbildung 18 A). Die verminderte Bmp-Signaltransduktion konnte zusätzlich anhand der Bmp-regulierten Gene *Msx1*, *Msx2*, *ID1* und *ID3* (*Inhibitor of DNA binding*) nachgewiesen werden (Abbildung 18 A). Dabei ist zu beachten, dass in allen Fällen das distale Mesenchym des Fingers bei E13.5 betroffen ist. Als deutlichster Effekt ist bei ID3 im Wildtyp eine starke Expressionsdomäne in der distalen Fingerspitze zu erkennen, welche bei der Ror2W749X-Mutante nicht detektiert werden konnte.

Auch die immunhistologische Analyse des Bmp-regulierten Chondrozyten-Markers Sox9 zusammen mit Tcf7l2 (*transcription factor 7-like 2*, Bezeichnung nach MGI, in der Literatur fälschlicherweise oft als Tcf4 deklariert) als Marker für spezifizierte Chondrozyten bestätigte die gestörte Bmp-Signaltransduktion. So ist im Wildtyp eine distale Sox9-positive und Tcf7l2-negative Zellpopulation zu erkennen, welche in der Ror2W749X-Maus komplett fehlt (Abbildung 18 B, Pfeilspitzen). Auch ist die Sox9-Domäne in der Ror2W749X-Maus nach proximal verschoben (Abbildung 18 B, Strich), die Distanz zur distalen Fingerspitze ist in der Ror2-Mutante deutlich größer. Dies bestätigt die schon auf RNA-Ebene detektierte Mißregulation der Bmp-Signaltransduktion und bildete mit den ISH-Daten (via ID3) die Grundlage für die weiterführenden Experimente zur Analyse der verminderten Bmp-Signalweiterleitung in der Ror2W749X-Maus.

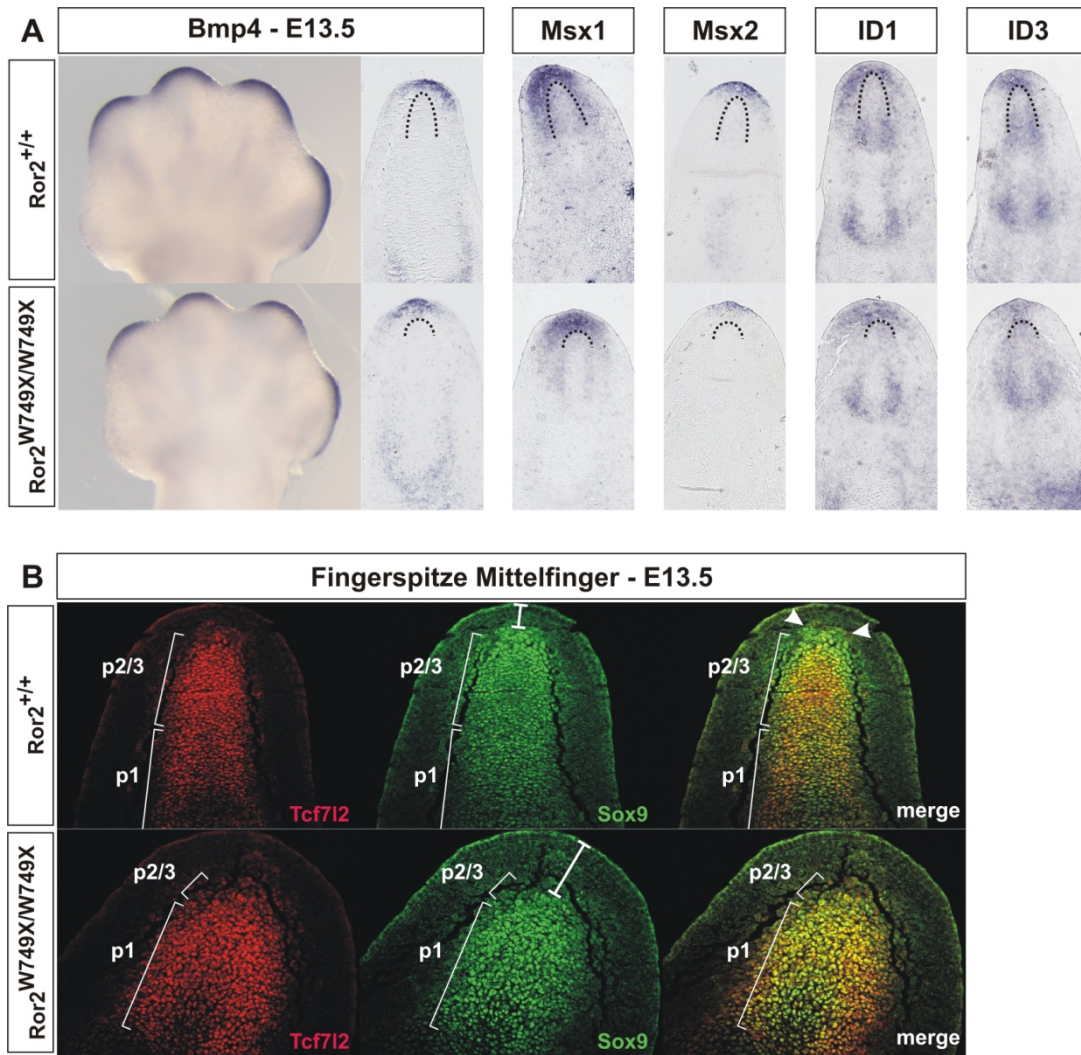


Abbildung 18: Mißregulierte Bmp Signaltransduktion in der Ror2W749X-Maus

Analyse der Bmp-vermittelten Signaltransduktion bei E13.5 mittels (A) Schnitt ISH sowie (B) Immunhistologie. Fingerelemente gekennzeichnet. (A) Sowohl *Bmp4* als auch die Bmp-regulierten Gene *Msx1*, *Msx2*, *ID1* und *ID3* zeigen eine verminderte Expression in der distalen Fingerspitze der Ror2W749X-Maus. Zellpopulation p2/3 durch gestrichelte Linie gekennzeichnet. (B) Die distale Sox9-positive Tcf712-negative Zellpopulation (Pfeilspitzen) fehlt in der Ror2W749X-Maus, die Sox9-Expression ist nach proximal verschoben (Balken). Tcf712 als Marker spezifizierter Chondrozyten.

Zwei kürzlich erschienene Arbeiten zur Bmp-Signalaktivität im auswachsenden Finger des Hühnchenembryos beschreiben eine Region in der distalen Fingerspitze unter der Bezeichnung „*phalanx forming region (PFR)*“ (Suzuki et al., 2008) beziehungsweise „*digit crescent (DC)*“ (Montero et al., 2008); im Folgenden wird der Begriff PFR verwendet. Dabei handelt es sich um eine Sox9-, Bmpr1b- und phospho-Smad1/5/8-

positive Zellpopulation 100-200 μ m unterhalb der AER, welcher mit ihrer hohen Bmp-Signalstärke eine essentielle Rolle beim proximo-distalen Fingerwachstum zukommt (siehe auch 5.1.2). In dieser Arbeit konnte nicht nur die PFR erstmals in der Maus detektiert werden, zusätzlich zeigten sich schwere Defekte in Ror2-mutanten Mäusen (Abbildung 19). So ist im Wildtyp bei E12.5 ein diffuses distales phospho-Smad1/5/8-Signal zu erkennen, in diesem Stadium scheint sich die PFR gerade zu etablieren (Abbildung 19 A, Kreis). Dieses Signal ist in der Ror2W749X-Maus etwas schwächer ausgeprägt, was entweder mit einer schon gestörten Etablierung dieser Region oder aber mit einer leichten zeitlichen Verzögerung in der Ror2-Mutante zu erklären ist. Im für die BD als kritisch identifizierten Stadium E13.5 ist die PFR im Wildtyp dann als klares distales Signal zu erkennen, in der Ror2W749X-Maus fehlt dieses Signal jetzt fast völlig (Kreise in Abbildung 19 B). Zusätzlich erkennt man in beiden Fällen das starke phospho-Smad1/5/8-Signal in den spezifizierten Chondrozyten der p1 und im Wildtyp ebenso in der Zellpopulation p2/3, welche in der Ror2W749X-Maus ja nur rudimentär etabliert ist. Dieser Effekt ist spezifisch für die BDB-Trunkationen von Ror2, da die PFR im normal-gegliederten Ror2-KO klar detektierbar ist (Abbildung 19 C), aber in der an BD leidenden homozygoten Ror2-LacZ-Maus wiederum nicht nachweisbar ist (Abbildung 19 D). Somit erscheint die PFR in der Maus essentiell für das proximo-distale Wachstum der Knorpelkondensation bei E13.5. Intrazelluläre Trunkationen von Ror2 interferieren mit der Aufrechterhaltung und eventuell auch schon der Etablierung der PFR, was final im Phänotyp der BD resultiert.

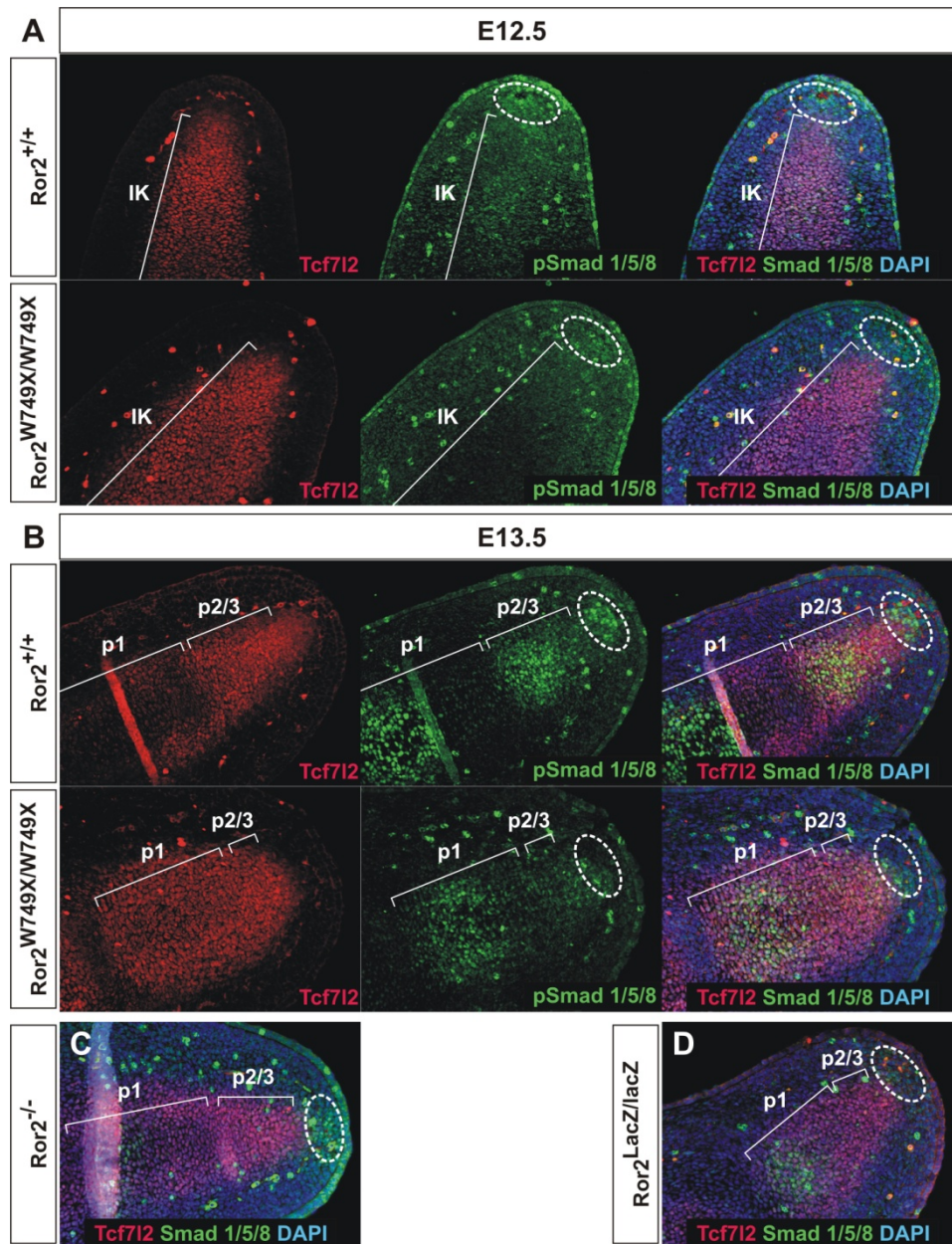


Abbildung 19: Gestörte Etablierung der Phalanx Forming Region (PFR) als Grund der BD in der *Ror2*^{W749X}-Maus

Detektion von phospho-Smad1/5/8 (PFR) und Tcf712 (spezifizierte Chondrozyten) mittels Immunhistologie. (A) Bei E12.5 ist die PFR distal der initialen Kondensation (IK) noch im Aufbau und in der *Ror2*-Mutante etwas schwächer ausgeprägt (Kreise). (B) Bei E13.5 ist die distale PFR im Wildtyp klar zu erkennen, wogegen sie in der *Ror2*^{W749X}-Maus fehlt (Kreise). Auch sind Signale in den differenzierenden Chondrozyten zu erkennen. Der Effekt ist spezifisch für BDB, da (C) im *Ror2*-KO die PFR detektierbar ist und (D) in der BDB-Trunkation *Ror2*-LacZ wie in der BDB-Trunkation *Ror2*^{W749X} fehlt.

4.1.3.4. Veränderungen und Interaktionen mit dem Wnt-Signalweg

Ror2 ist neben der Wnt5a/Ror2/ATF2-Kaskade in den meisten Fällen als Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs beschrieben, intrazelluläre Ror2-Trunkationen zeigen dieses inhibitorische Potential nur noch abgeschwächt (siehe 4.3.1.3) (Mikels and Nusse, 2006; Winkel et al., 2008) und Bmp- und Wnt-Signalwegskaskaden sind in verschiedenen Systemen eng verknüpft und balanciert reguliert. Zusammen mit der Störung der PFR und den bisher erlangten Daten wurde daher in der Ror2W749X-Maus gezielt nach einer Mißregulation des β -Catenin-abhängigen kanonischen Wnt-Signalwegs gesucht.

Ein erster Hinweis auf die distale Störungen des kanonischen Signalweges konnte mit Hilfe verschiedener ISH erlangt werden. So zeigen die klassischen β -Catenin-regulierten Gene *Lef1*, *Itf2* und *Nmyc* (Ten Berge et al., 2008) in der Ror2W749X-Maus eine deutlich stärkere Expression in der distalen Fingerspitze (Abbildung 20 A). Um diese Mißregulation zu bestätigen, wurden Verkreuzungen der Ror2W749X -Maus mit den verfügbaren LacZ-basierten Wnt-Reporter-Mauslinien Topgal (DasGupta and Fuchs, 1999; Hens et al., 2005) sowie Conductin-LacZ (Lustig et al., 2002) vorgenommen. Die Topgal-Mauslinie erwies sich als zu unempfindlich für die Fragestellung der BDB, da ausschließlich Wnt-Aktivität in der Haut inklusive AER sowie späteren Stadien der Chondrogenese detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Für eine mesenchymale Detektion der kanonischen Wnt-Antwort kristallisierte sich die Conductin-Reportermaus als das geeignetere *in vivo* Reportersystem heraus. Dabei handelt es sich um einen LacZ-Knock-In im Conductin(Axin2)-Lokus, was die β -Galaktosidase unter Kontrolle des endogenen Tcf/Lef-responsiblen Conductin-Promotors stellt. Dies ermöglichte eine sensitive Visualisierung der Wnt-Aktivität mittels enzymatischer Färbung. Bei der Verkreuzung mit der Ror2W749X-Maus konnte die Hochregulierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade im Mesenchym der distalen Fingerspitze verifiziert werden. Die LacZ-Färbung ist nicht nur im subektodermalen Mesenchym deutlich intensiver (Abbildung 20 B), vor allem in der distalen Zellpopulation p2/3 zeigt sich im Vergleich mit dem Wildtyp eine klare Hochregulierung des β -Catenin-vermittelten Wnt-Signalwegs (Markierung Paraffinschnitt in Abbildung 20 B). Diese Lokalisierung korreliert mit allen bisher detektierten Störungen in der Ror2W749X-Maus und exakt mit der Region der gestörten PFR.

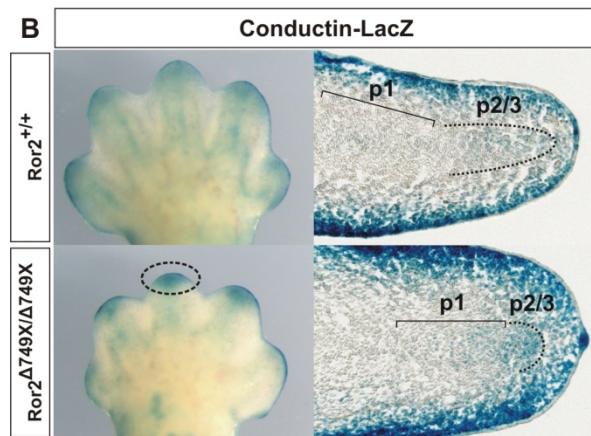
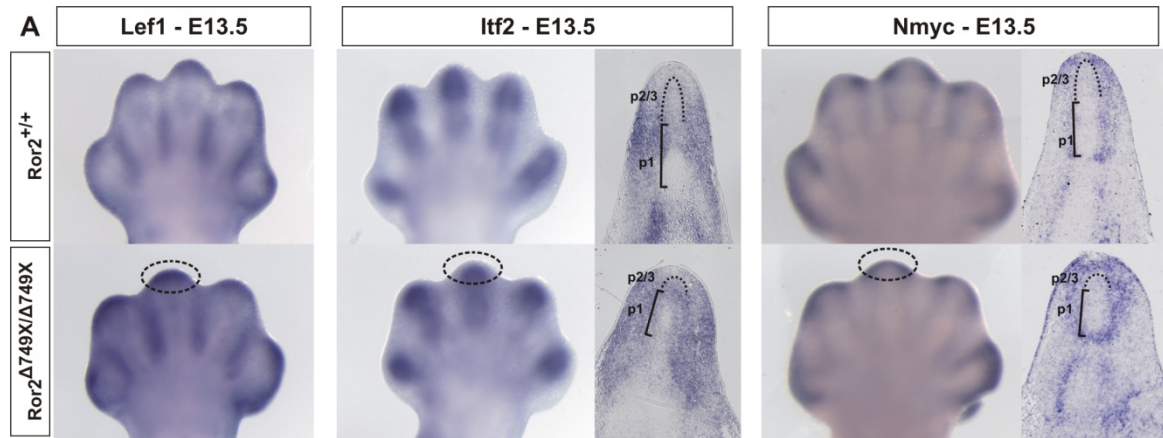
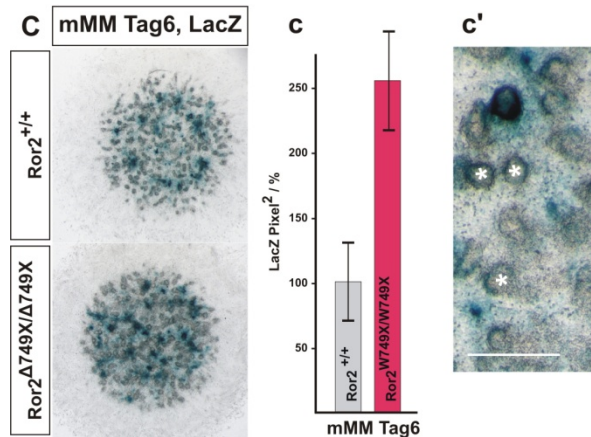


Abbildung 20: Hochregulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der distalen Fingerspitze der *Ror2*^{W749X}-Maus

Analyse des β -Catenin-vermittelten Wnt-Signalwegs bei E13.5 mittels (A) Whole-mount und Schnitt ISH und (B-D) einer Verkreuzung der *Conductin*-Wnt-Reporter-Maus mit der *Ror2*^{W749X}-Maus. Fingerelemente gekennzeichnet. (A) Die klassischen Wnt-regulierten Gene *Lef1*, *Itf2* und *Nmyc* zeigen eine verstärkte Expression in der distalen Fingerspitze der *Ror2*^{W749X}-Maus. (B) Verkreuzung *Ror2*^{W749X} mit der Wnt-Reporter-Maus *Conductin-LacZ*. In der *Ror2*^{W749X}-Maus zeigt sich in der whole mount Färbung ein deutlich intensiveres Signal in der distalen Fingerspitze (Kreis). Im Paraffinschnitt kann in der *Ror2*^{W749X}-



Maus neben dem stärkeren subektodermalen Signal vor allem eine starke Färbung in der p2/3 nachgewiesen werden. (C) Eine LacZ-Färbung der Maus-Mikromass (mMM, E12.5) sowie (c) die semiquantitative Vermessung (Axiovision AutMess) verifizieren die Hochregulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs. (c') Ausschnittsvergrößerung einer LacZ-gefärbten mMM. Eichstrich 5mm, Stern (*) kennzeichnet Knorpelkondensation.

Weiterhin wurden als *in vitro* Test-System für Chondrogenese Maus-Mikromass-Kulturen (mMM) aus den Händen einzelner Embryonen bei E12.5 angefertigt (siehe 3.4.9). Damit

ließ sich die Hochregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs nochmals in der LacZ-Färbung bestätigen (Abbildung 20 C) und mittels Axiovision Software quantifizieren (Abbildung 20 c). In einer Ausschnittsvergrößerung (Abbildung 20 c') erkennt man zusätzlich die Lokalisierung der Wnt-Aktivität. So sind die Knorpelkondensationen (Stern (*) in Abbildung 20 c') selbst nicht gefärbt, aber von einer Region LacZ-positiver Zellen umgeben, was mit der Beteiligung des kanonischen Wnt-Signalwegs an der initialen Chondrogenese zu erklären ist. Den größten Anteil an gefärbten Zellen stellen wahrscheinlich die Zellen des Mesenchyms und der Haut, was durch die Schittfärbung unterstützt wird.

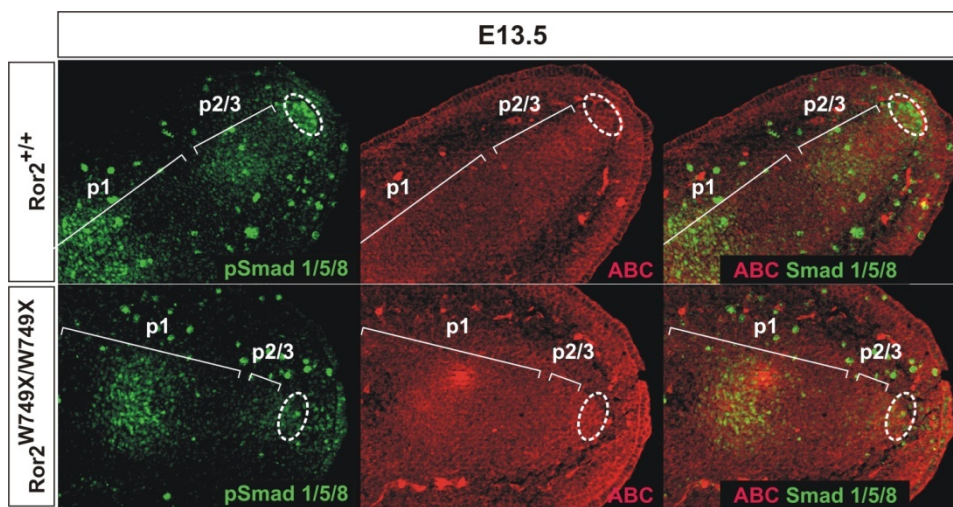


Abbildung 21: Die Hochregulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Ror2W749X-Maus korreliert mit der fehlerhaften Etablierung der PFR

Immunhistologische Analyse der Fingerspitze bei E13.5 mittels Antikörpern gegen phospho-Smad1/5/8 (PFR) sowie aktiviertes β -Catenin (ACB, aktiver kanonischer Wnt-Signalweg). Fingerelemente mit Klammern und Bereich der PFR mit Kreis gekennzeichnet. In der Ror2W749X-Maus ist ein stärkeres subektodermales Wnt-Signal sowie eine intensivere Färbung im Bereich der gestörten PFR zu erkennen.

Auch ein immunhistologischer Nachweis der dephosphorylierten und somit aktivierten Form des β -Catenins (activated beta-catenin, ABC) resultiert in der Ror2W749X-Maus neben einem stärkeren subektodermalem Signal vor allem in einer intensiveren Färbung überlappend mit dem Bereich der gestörten PFR (Abbildung 21 Kreis). Diese Ergebnisse verifizieren die schon im Conductin-Mausmodell und den Wnt-regulierten Genen detektierte distale Hochregulation des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Ror2W749X-

Maus. Zusammengenommen deutet also alles auf eine funktionelle Interaktion von Wnt- und Bmp-vermittelter Signaltransduktion bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der PFR hin. Ein antagonistischer Zusammenhang beider Kaskaden ist in vielen Systemen inklusive der Chondrogenese schon bekannt (Fischer et al., 2002; Jin et al., 2006; Stott et al., 1999). Als eine Hypothese könnte Ror2 als Inhibitor des β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs indirekt die PFR positiv regulieren. Die Trunkation von Ror2 und ein damit verknüpfter Verlust des inhibitorischen Potentials könnte somit verantwortlich für die Hochregulation des Wnt-Signalwegs sein und mit dem Bmp-Signal der PFR interferieren (siehe 5.2.3).

Als potentielle Kandidaten im Zusammenhang mit dieser Hypothese konnten in der ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalyse aller Wnt-Liganden (siehe 4.2) ausschließlich *Wnt5a* und *Wnt5b* identifiziert werden. Nur diese beiden Mitglieder der Wnt-Familie zeigen bei E13.5 eine Expression im für die BD der Ror2W749X-Maus wichtigen Mesenchym der Fingerspitze (Abbildung 22 und Tabelle 1).

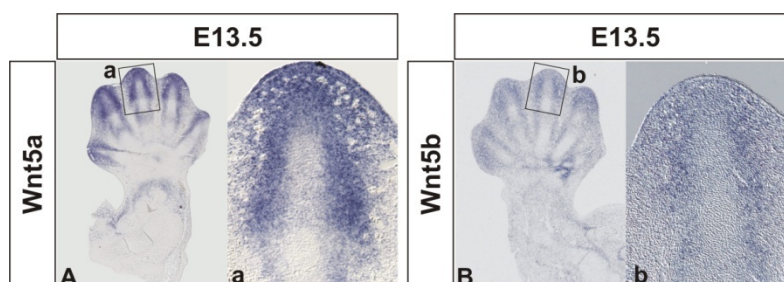


Abbildung 22: Expression von *Wnt5a* und *Wnt5b* als potentielle Ror2-Liganden im Hinblick auf die Brachydaktylie

Paraffin-Schnitt ISH auf E13.5 Vorderextremitäten. Vergrößerte Bereiche (a,b) im Originalbild eingerahmt. (A) Starke Expression von *Wnt5a* im distalen Mesenchym flankierend zur Kondensation sowie um distalen Bereich zwischen AER und Kondensation. (B) Überlappende aber deutlich schwächere Expression von *Wnt5b* im distalen Mesenchym. Somit sind beide Wnt-Gene potentielle Kandidaten im Zusammenhang mit der Ror2-vermittelten Brachydaktylie.

So ist die *Wnt5a*/Ror2-vermittelte Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs bereits beschrieben (Mikels and Nusse, 2006) und in dieser Veröffentlichung bereits ein leicht vermindertes inhibitorisches Potential einer intrazellulären Trunkation von Ror2 gezeigt (allerdings keine exakte Kopie einer BDB-Mutation). Im Falle der BDB-Trunkationen von Ror2 könnte ein solcher Effekt in den beschriebenen Veränderungen des Wnt/Bmp-Signalnetzwerkes führen und in der Trunkation des Fingers resultieren (siehe 5.1.3).

4.2. Expressionsanalyse aller Wnt-Gene und ihrer wichtigsten sezernierten Antagonisten während Extremitätenentwicklung und Chondrogenese der Maus

Neben den schon aufgeführten Kandidaten *Wnt5a* und *Wnt5b* galt das Interesse auch der Identifizierung potentiell neuer Interaktionspartner von Ror2. Es konnte schon gezeigt werden, dass Ror2 je nach Zellkontext auch als Interaktionspartner für andere Mitglieder der Wnt-Familie fungieren kann (Billiard et al., 2005; Mikels and Nusse, 2006; Winkel et al., 2008; Yamamoto et al., 2008). Zum Vergleich mit der Expression von Ror2 (siehe 4.1.1) sowie zum allgemeinen Verständnis der verschiedenen Wnt-Signalwege im Laufe der Handentwicklung und Chondrogenese ist eine komplette Übersicht über die zeitliche und räumliche Expression sowohl der Liganden selber als auch ihrer Antagonisten erforderlich. Dies ermöglicht einen Abgleich der Wnt-Komponenten mit anderen Expressionsmustern und somit erste Voraussagen zu potentiellen Interaktionen und Signalwegsaktivitäten. Dazu wurden Sonden für alle 19 murinen Wnt-Gene sowie für die Antagonisten der Secreted frizzled related protein (*Sfrp1-5*) Familie, der Dickkopf (*Dkk1-4*) Familie, der Wnt1 inducible signalling proteins (*Wisp1-3*) Familie sowie für Wnt inhibitory factor 1 (*Wif1*) kloniert und die Expressionsmuster beginnend mit dem Embryonalstadium E9.5 bis einschließlich E15.5 mittels in situ Hybridisierung (ISH) analysiert. Die Durchführung erfolgte im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Neuendorf 2007; Dokas 2008). Wegen der großen Menge der Daten werden im Folgenden nur die erstellten tabellarischen Übersichten gezeigt. Der komplette Datensatz inklusive der dort im *Supplementary Material* bereitgestellten Rohdaten sind der Veröffentlichung zu entnehmen (Witte et al., 2009).

In dem großangelegten Versuchsansatz konnten komplett unbekannte Lokalisationen identifiziert werden oder aber teilweise und in anderen Spezies beschriebene Expressionsdomänen verifiziert, und der Zeitverlauf für die gesamte Handentwicklung komplettiert werden. Für die beiden bisher im Bezug auf Extremitätenentwicklung unbeschriebenen Kandidaten *Wisp1* und *Wif1* wurden vollkommen neue Expressionsmuster aufgezeigt.

Um aus dem gewonnenen Datensatz die gewünschte Übersicht über alle Kandidaten während der Extremitätenentwicklung gewinnen wurde einerseits eine Aufschlüsselung nach den wichtigsten Strukturen der Extremität vorgenommen (Tabelle 1), andererseits die Expressionsmuster unter Einbezug der embryonalen Stadien zu einer zeitlichen

Übersicht zusammengefasst (Tabelle 2). Diese beiden Tabellen sind bei Fragestellungen zur Wnt-Signalaktivität in der Handentwicklung und Chondrogenese äußerst hilfreich und ermöglichen beispielsweise eine schnelle Eingrenzung potentieller Kandidaten für Interaktionen oder spezifische Defekte.

Gen	ektodermal	dermal	mesenchymal	DTM	ID	Gelenk	AER	P / Po	Chondrocyten	Muskel Sehnen
Wnt1*										
Wnt2			●							●
Wnt2b			●		●					
Wnt3	●									
Wnt3a*										
Wnt4	●		●		●	●				
Wnt5a			●	●			●	●	prä	
Wnt5b			●	●				●	prä,hyp	
Wnt6	●						●			
Wnt7a	●									
Wnt7b	●							●		
Wnt8a*										
Wnt8b*										
Wnt9a			●			●				●
Wnt9b	●									
Wnt10a	●						●			
Wnt10b	●						●			
Wnt11		●	●			●	●		prä	
Wnt16	●					●		●		
Sfrp1			●						pro,prä	●
Sfrp2		●	●			●				
Sfrp3/Frzb			●					●	pre,hyp	
Sfrp4			●							
Sfrp5									pro,prä	
Wif1		●	●	●	●	●			●	●
Wisp1			●	●	●	●		●		
Wisp2*										
Wisp3*										
Dkk1		●	●	●	●		●	●		
Dkk2		●	●		●					
Dkk3			●			●		●		
Dkk4*										

Tabelle 1: Übersicht der Expression aller Maus-Wnt-Gene und der wichtigsten sezernierten Antagonisten aufgeschlüsselt nach Strukturen der Extremität

Basierend auf dem gesamten Datensatz wurde eine Aufschlüsselung der Expressionsmuster nach wichtigen Strukturen der Extremität vorgenommen. Grau hinterlegtes Oval kennzeichnet detektierte Expression des jeweiligen Kandidaten; Stern (*) nicht detektierte Kandidaten. Abkürzungen: AER – apikale ektodermale Randleiste; Chondrozyten: hyp - hypertroph, prä - prähypertroph, pro - proliferierend; DTM - distales Tip Mesenchym; ID - interdigital; P - Perichondrium; Po - Periosteum.

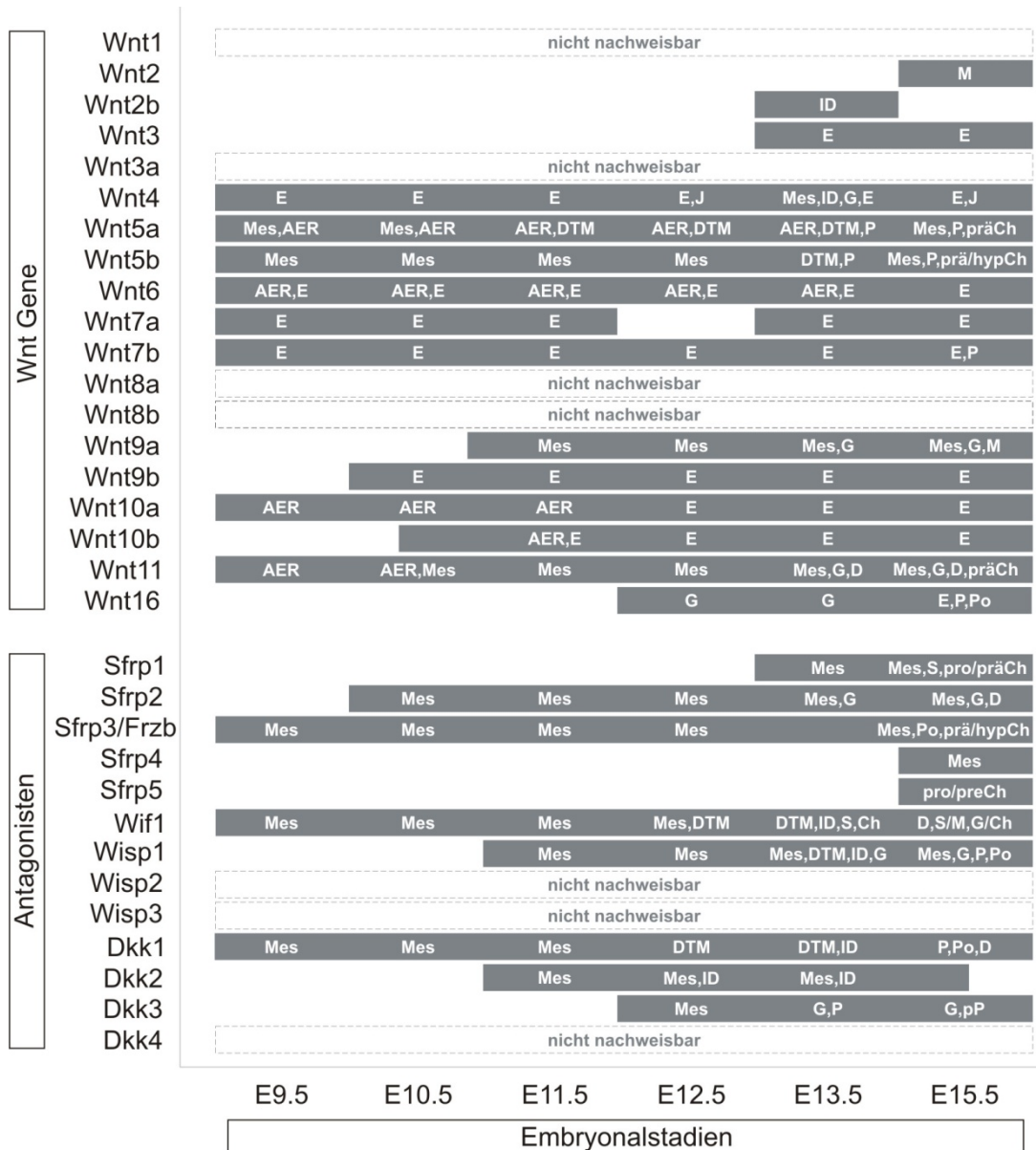


Tabelle 2: Zeitliche Übersicht der Expression aller Wnt-Gene und der wichtigsten sezernierten Antagonisten im Laufe der Extremitätenentwicklung E9.5 bis E15.5

Basierend auf dem gesamten Datensatz wurde eine Aufschlüsselung der Expressionsmuster unter Einbezug der embryonalen Stadien E9.5 bis E15.5 vorgenommen. Grau ausgefüllte Balken kennzeichnen detektierte Expression des jeweiligen Kandidaten zum jeweiligen Zeitpunkt; grau gestrichelte Balken kennzeichnen nicht detektierten Kandidaten. Detaillierte Lokalisierung der Expression innerhalb der Balken mit Abkürzungen eingetragen.

Abkürzungen: AER – apikale ektodermale Randleiste; Chondrozyten: hyp - hypertroph, prä - prähypertroph, pro - proliferierend; D - Dermis; DTM - distales Tip Mesenchym; E - Ektoderm; G - Gelenk; ID - interdigital; M - Muskel; Mes - Mesenchym; P - Perichondrium; Po - Periosteum; pP - periartikuläres Perichondrium; S - Sehne.

So sind in der frühen Extremitätenentwicklung viele der analysierten Wnt-Liganden (*Wnt5a*, *Wnt6*, *Wnt10a*, *Wnt10b*, *Wnt11*) in der AER als regulatorische Region exprimiert, was die wichtige Rolle der Wnt-Signaltransduktion beim proximo-distalen Wachstum unterstreicht. Im Zusammenhang mit der Etablierung der Kondensationen sind erstaunlich wenige Kandidaten stark exprimiert. So konnten bei E13.5 nur *Wnt5a* und *Wnt5b* flankierend zu den distalen Phalangen detektiert werden, *Wnt9a* sowie *Wnt11* zeigen eine mesenchymale Expression dorso-ventral flankierend zu den Knorpelanlagen. Auch einige der Antagonisten (*Sfrp2*, *Sfrp3*, *Wisp1*, *Dkk1*, *Dkk2*, *Wif1*) konnten im Mesenchym der auswachsenden Extremität detektiert werden. In späteren Stadien zeigen nur einige wenige Kandidaten der Liganden (*Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11*) sowie der Antagonisten (*Sfrp1*, *Sfrp3*/*Frzb*, *Sfrp5*) eine spezifische Expression in den verschiedenen Differenzierungsstadien der Chondrozyten. Dagegen konnten bei der Ausbildung der Gelenke *Wnt11* zu den bisher bekannten Gelenk-exprimierten Wnt-Molekülen *Wnt4*, *Wnt9a* und *Wnt16* hinzugefügt und ebenso einige der Antagonisten (*Wif1*, *Wisp1*, *Dkk3*) erstmalig in dieser Region detektiert werden.

Viele der Wnt-Liganden (*Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt9b*, *Wnt10a*, *Wnt10b*, *Wnt16*) zeigen eine starke Expression in der Epidermis (Oberhaut) und lokalisieren mit Ausnahme von *Wnt9b* in der tief gelegenen Keimschicht (stratum germinativum). Von dieser Schicht ausgehend werden die äußeren Schichten ständig erneuert und mißreguliertes Wnt-Aktivität und damit einhergehende entartete Zellproliferation stehen im engen Zusammenhang mit der Entstehung von Hautkrebs (Taipale and Beachy, 2001). Von den Antagonisten dagegen sind einige Kandidaten (*Sfrp1*, *Sfrp2*, *Wif1*, *Dkk1*, *Dkk2*) in der direkt unterhalb dieser Zellschicht liegenden Dermis (Lederhaut) exprimiert und beschränken somit die Reichweite des aktivierten Wnt-Signalwegs.

Zusammengenommen konnten viele neue Expressionsdomänen der Wnt-Liganden selber und ihrer sezernierten Antagonisten detektiert und eine komplette zeitliche und räumliche Übersicht der Expressionsmuster erstellt werden. Somit steht für weiterführende Fragen zur Wnt-Aktivität ein vollständiger Datensatz zur Verfügung. Als Kandidaten für den inhibitorischen Effekt auf den kanonischen Wnt-Signalweg und somit für die Pathogenese des Ror2^{W749X}-Phänotyps kommen ausschließlich *Wnt5a* und *Wnt5b* in Frage.

4.3. *in vitro* Analyse von Ror2 - Identifikation neuer Interaktionspartner

Neben der *in vivo* Analyse von Ror2 am Mausmodell sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Ror2-vermittelte Signaltransduktion sowie die Interaktion mit anderen Signalwegen detaillierter untersucht werden. So tragen sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Interaktionspartner von Ror2 viel zu einem solchen Verständnis bei. Während sich Studien zu extrazellulären Liganden zum Großteil auf wenige Mitglieder der Wnt-Moleküle beschränken, wurden in der Vergangenheit schon verschiedenste intrazelluläre Interaktionspartner identifiziert (siehe 1.2.4). Dabei basieren viele Ansätze auf der Yeast-to-Hybrid-Methode oder anderweitigen Screens mit Ror2-Fragmenten. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit wie im Folgenden beschrieben durch Literaturrecherche, Mausphänotypen, Abgleich von Expressionsmustern oder humanmedizinische Zusammenhänge die potentiellen Kandidaten ausgewählt, und per Co-Immunoprecipitation (CoIP) bestätigt. Mit so gewonnenen Daten sollten die Erkenntnisse aus der Ror2^{W74X}-Maus und das so entwickelte Modell zur Fingerentwicklung und der Pathogenese der Brachydaktylien auf molekularer Ebene untermauert werden.

4.3.1. Ror2 und der Wnt-Signalweg: Dishevelled als intrazellulärer Interaktionspartner von Ror2

Ror2 wurde in der Vergangenheit vor allem im Zusammenhang mit dem kanonischen als auch nicht-kanonischen Wnt-Signalweg beschrieben, wobei die detaillierte intrazelluläre Signalweiterleitung oft unklar ist. Da Dishevelled (Dvl) als zentrale intrazelluläre Komponente an allen klassischen Wnt-Kaskaden partizipiert und das Expressionsmuster in der Extremität ebenfalls mit dem von Ror2 überlappt (Daten nicht gezeigt), wurde Dvl als potentieller Kandidat ausgewählt.

4.3.1.1. Ror2 interagiert über den distalen Bereich mit dem CK1e phosphorylierten Dishevelled (ps-Dvl)

In den CoIP-Experimenten wurden verschiedene Ror2-Trunkationen benutzt (Abbildung 23 A), um die Interaktion der beiden Proteine zu kartieren. Dabei sind bei der Isoform Ror2 Δ CRD,KR die beiden hauptsächlich für Rezeptorinteraktion verantwortlichen Domänen deletiert; bei den Versionen Ror2 Δ 745 und Ror2 Δ 469 handelt es sich um die

intrazellulären Trunkationen der BDB. In CoIP-Experimenten konnte eine spezifische Interaktion von Maus-Dvl2 sowohl mit volle-Länge Ror2, als auch mit der extrazellulär deletierten Version nachgewiesen werden (Abbildung 23 B). Eine Beteiligung von Frizzled-Rezeptoren an der Ror2/Dvl-Interaktion ist somit unwahrscheinlich, da diese bevorzugt über die CRD-Domänen interagieren (Oishi et al., 2003). Als verantwortliche Domäne von Ror2 konnte die intrazelluläre S/T/P-Domäne identifiziert werden, da bei der Verwendung der BDB-verursachenden Konstrukte kein Dvl mehr nachzuweisen war (Abbildung 23 B). Die Interaktion ist beidseitig nachweisbar, bei einer Präzipitation von Dvl ist Ror2 als Bindungspartner detektierbar (Abbildung 23 C).

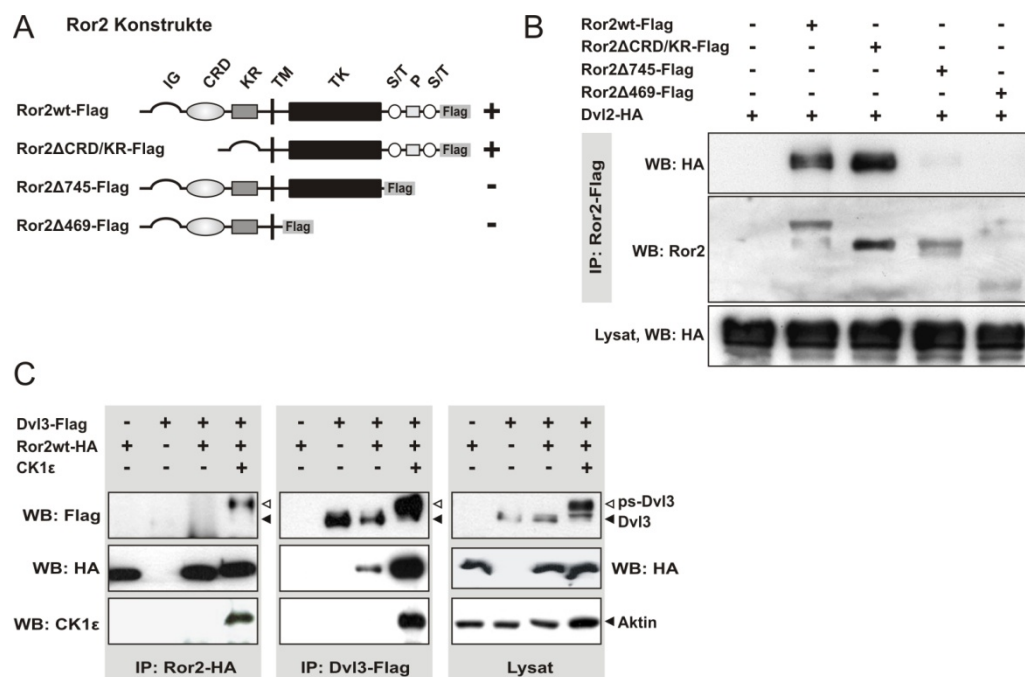


Abbildung 23: Ror2 interagiert über S/T/P-Domäne mit CK1-phosphoryliertem Dvl

(A) Verwendete mRor2-Konstrukte mit Flag-Tag; + kennzeichnet detektierte Interaktion. Domänenstruktur von Ror2: IG - Immunglobulinartig, CRD - Cystein-reich, KR - Kringle, TM - Transmembran, TK - Tyrosinkinase, S/T - Serin/Threonin-reich, P - Prolin-reich. (B) Kartierung der Interaktion: Dvl2 interagiert mit volle-Länge Ror2 und Ror2ΔCRD/KR, nicht aber mit den beiden BDB-Trunkationen Ror2Δ745 und Ror2Δ469. (C) Phosphospezifität der Interaktion (Kooperation Dr. V. Bryja): Interaktion Ror2/Dvl in beidseitiger CoIP. Coexpression von CK1ε resultiert in einer verstärkten Interaktion Ror2/ps-Dvl, erkennbar am Größenunterschied von Dvl; schwarzer Pfeil = unphosphoryliertes Dvl, weißer Pfeil = phosphoryliertes Dvl.

Dvl wird in verschiedenen Wnt-Signalwegen phosphoryliert, was durch die Veränderung des Molekulargewichtes in einem charakteristischen „Shift“ in der SDS-Gelelektrophorese resultiert. Da das schwerere, phosphorylierte und daher aktivierte Dvl (ps-Dvl) in manchen der initialen CoIP-Experimenten als angereichert erkennbar war, wurde Auswirkungen des Phosphorylierungsstatus auf die gefundene Ror2/Dvl-Interaktion untersucht.

Diese Experimente wurden von Dr. Vitezslav Bryja (Universität Brno) durchgeführt und werden zur allgemeinen Verständlichkeit hier kurz erläutert. Dabei wurde neben Ror2 und Dvl auch CK1 ϵ als eine der hauptsächlichen Dvl-phosphorylierenden Kinasen (Bryja et al., 2007; Cong et al., 2004a; Kishida et al., 2001; McKay et al., 2001a; Peters et al., 1999; Swiatek et al., 2004) exprimiert, anschließend Ror2 oder Dvl immunopräzipitiert und der jeweilige Bindungspartner detektiert. Während ohne CK1 ϵ die Ror2/Dvl-Interaktion in diesem Versuchsansatz nur schwach zu erkennen ist, resultiert die Expression der Kinase in einer Verstärkung der Bindung von Ror2 an ps-Dvl, erkennbar an dem charakteristischen Shift (Abbildung 23 C, weißer Pfeil) und der Anreicherung von ps-Dvl bei der Präzipitation von Ror2 beziehungsweise Ror2 bei dem reversen Ansatz. Zusammenfassend interagiert Ror2 also über die intrazelluläre P/S/T-Domäne hochaffin mit CK1 ϵ -phosphoryliertem Dvl. Zusätzlich konnten durch die Verwendung von verschiedenen Dvl-Trunkationen (Angers et al., 2006) zwei putative Bindungsstellen auf Seiten von Dvl identifiziert werden. So interagiert Ror2 mit geringer Affinität mit voller Länge Dvl, bindet jedoch mit hoher Affinität an den isolierten C-Terminus von Dvl. Im Zuge dieser Experimente wurde zusätzlich CK1 ϵ als einzige Interaktions-induzierende Kinase identifiziert; alle anderen getesteten Dvl-phosphorylierenden Kinasen (z.B. CK2, PAR1) konnten die Ror2/ps-Dvl-Bindung nicht induzieren (Witte et al., 2009, eingereicht). Ebenfalls von V. Bryja durchgeführten Experimente stützen die Vorstellung, dass eine Phosphorylierungs-induzierte Konformationsänderung von Dvl die Zugänglichkeit des C-Terminus erhöht und somit die Interaktion mit Ror2 verstärkt.

4.3.1.2. Wnt5a induziert die CK1-abhängige Interaktion Ror2/ps-Dvl an der Zellmembran

Ein extrazellulärer Stimulus, der zur Phosphorylierung und Aktivierung von Dvl durch CK1 ϵ führt, ist *Wnt5a* (Bryja et al., 2007; Schulte et al., 2005). Daher wurde der Einfluss

von rekombinantem Wnt5a auf die Interaktion Ror2/ps-Dvl analysiert. In einem CoIP-Ansatz, bei dem endogenes Ror2 präzipitiert wurde, resultiert ein Stimulus mit rekombinantem Wnt5a in einer deutlich verstärkten Präzipitation von transfiziertem Dvl (Abbildung 24 A). Somit kann *Wnt5a* als Ligand die neu gefundene Interaktion Ror2/ps-Dvl direkt oder indirekt induzieren.

Um die generelle Interaktion Ror2/ps-Dvl in einen zellulären Kontext zu übertragen, und um den Einfluss der Wnt5a-Stimulation sowie der CK1-Abhängigkeit zu visualisieren, wurden Cos1-Zellen mittels immunocytoologischen Methoden analysiert. Dabei stellte sich als kritischer Punkt für Lokalisationsstudien die intrazelluläre Konzentration von Dvl heraus. In einer Überexpressionsituation lokalisiert Dvl in sogenannten *Puncta*, welche schon als DIX-Domäne-vermittelte Aggregationszustände von Dvl beschrieben wurden (Schwarz-Romond et al., 2005) und deren Signalkompetenz oder -relevanz bisher unklar ist. Die großen, vesikelförmigen Aggregate (Abbildung 24 B, (*) Stern) reflektieren eine „*multi-copy*“ Transfektion mit sehr hohem Expressionslevel, eine uniformere Verteilung von Dvl (Abbildung 24 B, (#) Raute) eher eine „*low-copy*“ Transfektion und ein geringere Expressionstärke. Das endogene Dvl-Signal ist unter diesen Belichtungszeiten nicht zu beobachten (Abbildung 24 B, Pfeil). Da diese Bedingungen für Lokalisationsstudien als äußerst artifiziell erschienen, wurde in allen weiteren Ansätzen unter Zuhilfenahme der Apotome-Technik (Zeiss, Germany) die Verteilung des endogenen Dvl analysiert. Um sich gleichzeitig möglichst nahe an der humanen Situation im Hinblick auf BDB zu bewegen, wurden neben dem humanen volle-Länge Ror2 auch die exakte distale BDB-Mutation Ror2 Δ 749 verwendet; alle verwendeten Konstrukte besitzen im Gegensatz zu den für die CoIPs benutzten Maus-Ror2-Varianten keinen zusätzlichen Flag/HA-Tag (Konstrukte von W. Schwarzer, Berlin).

Im unstimulierten Zustand lokalisiert endogenes Dvl in einem granulären Muster im Cytoplasma der Zelle und Ror2 an der Zellmembran (Abbildung 24 C). Nach einem Stimulus mit Wnt5a relokalisiert eine Subpopulation des endogenen Dvl an der Membran in kleinen Punkten und colokalisiert dort mit dem transfizierten Ror2 (Pfeile in Abbildung 24 D). Dies ist ausschließlich in Ror2-transfizierten Zellen zu beobachten, die flankierende untransfizierte Zelle zeigt keine solche Membranlokalisation von Dvl. Ebenso lässt sich die Colokalisation nicht in Gegenwart der humanen BDB-Isoform von Ror2 induzieren, da hier ja die Dvl-interagierende Region von Ror2 deletiert ist (Abbildung 24 E).

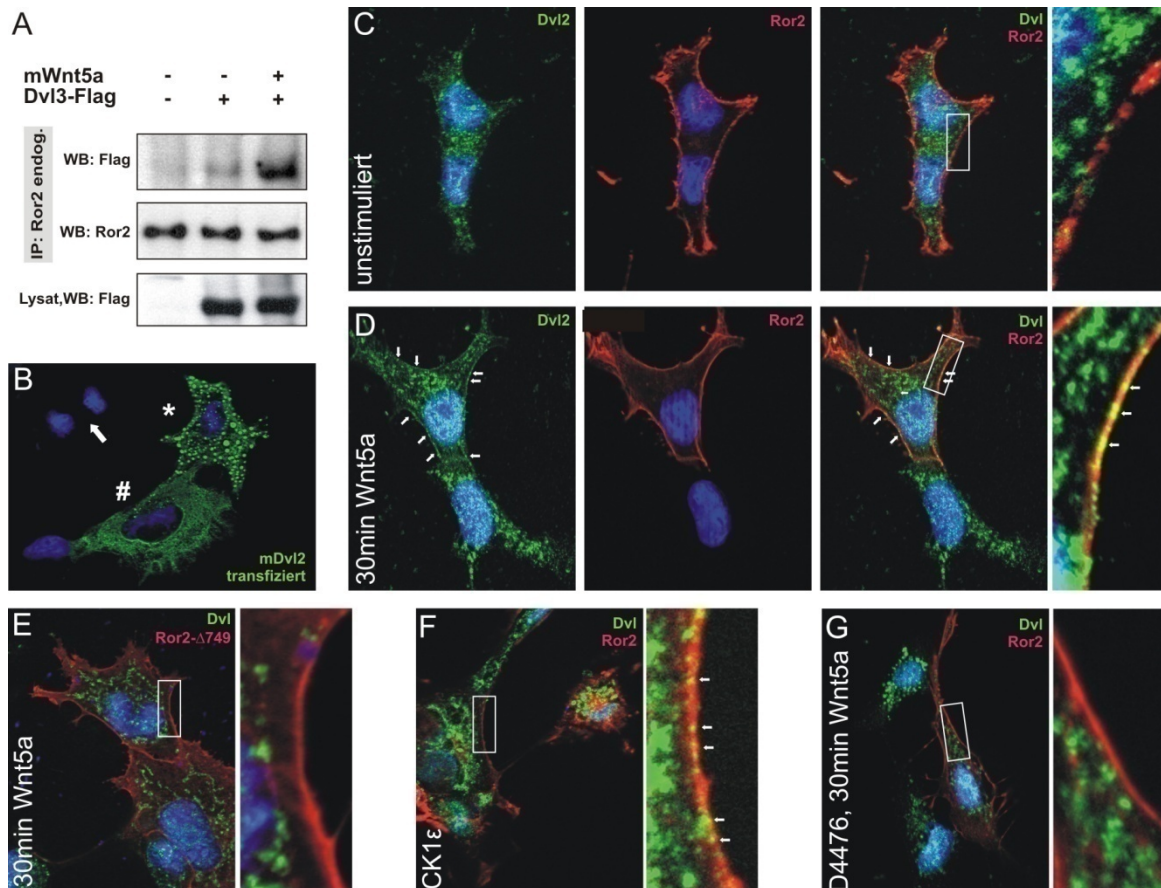


Abbildung 24: Wnt5a induzierte Ror2/ps-Dvl-Interaktion an der Zellmembran

(A) IP von endogenem Ror2 und Detektion von transfiziertem Dvl in Abhängigkeit von Wnt5a-Stimulus. Wnt5a induziert Interaktion Ror2/ps-Dvl. (B) Graduelle Expressionsstärke von transfiziertem Dvl. Stern (*) - hohes Expressionslevel, Raute (#) - niedriges Expressionslevel, Pfeil - endogenes Dvl2-Signal bei kurzer Belichtungszeit. (C) Granuläres zytoplasmatisches Verteilungsmuster von endogenem Dvl (grün) und Membranlokalisierung von transfiziertem Ror2 (rot). (D) Wnt5a-Stimulus induziert Colokalisation Ror2/ps-Dvl an der Membran (Pfeile). (E) Keine Colokalisation bei Verwendung von BDB-Ror2. (F) Expression von CK1 ϵ induziert Ror2/ps-Dvl-Interaktion an der Membran, (G) CK1-Inhibitor D4476 verhindert Membranlokalisierung trotz Wnt5a-Stimulus.

Die Formation der Membranpunkte ist zusätzlich abhängig von der Zeit. Während nach 5 Minuten noch keine Punkte zu erkennen waren, erschienen diese nach 15-minütigem Stimulus mit Wnt5a und waren am deutlichsten nach den hier dargestellten 30 Minuten; nach 120 Minuten war eine Colokalisation dann wieder selten zu beobachten. Es bleibt anzumerken, dass es sich hierbei um eine qualitative Beobachtung handelt die jedoch von

späteren Experimenten gestützt wird (siehe Abbildung 26); eine Quantifizierung des Membransignals stellte sich bisher als nicht praktikabel heraus, wird aber weiter verfolgt. In diesem Zellsystem konnte ebenso die vorher schon biochemisch gezeigte Relevanz der CK1 nachgewiesen werden. So lässt sich die Colokalisation Ror2/ps-Dvl an der Membran wenn auch mit geringerer Intensität in Abwesenheit von Wnt5a durch einfache Expression der CK1 ϵ induzieren (Abbildung 24 F). Dementsprechend verhindert eine Vorbehandlung mit dem CK1-Inhibitor D4476 die Wnt5a-induzierte Membran-Colokalisation Ror2/ps-Dvl (Abbildung 24 G). Somit interagiert Ror2 nach Wnt5a-Stimulus und in Abhängigkeit von CK1 mit ps-Dvl, was in der Ausbildung von membrannahen Ror2/ps-Dvl-Colokalisations-Punkten resultiert.

4.3.1.3. Ror2 inhibiert den kanonischen Wnt-Signalweg *in vivo* und *in vitro*

Nachdem die Interaktion im Zellsystem nachgestellt und visualisiert wurde, stellte sich als nächstes die Frage der funktionellen Relevanz. Als bisher am ausführlichsten beschriebener und am besten analysierbarer Signalweg bot sich der kanonische (β -Catenin-abhängige) Wnt-Signalweg an. Eine Wnt5a-induzierte und Ror2-abhängige Inhibition der kanonischen Signaltransduktion ist hierbei schon bekannt (Mikels and Nusse, 2006; Oishi et al., 2003), wobei über den Mechanismus noch Unklarheit herrscht. Mit Dvl als Bindungspartner von Ror2 und der bekannten Bedeutung der subzellulären Dvl-Lokalisation bei den verschiedenen Wnt-Signalkaskaden wurde eine Auswirkung der Interaktion Ror2/ps-Dvl auf die Wnt-Signaltransduktion vermutet. Zur Analyse kamen zwei klassische Reportersystem für kanonischen Wnt-Signalweg zum Einsatz: der *Xenopus*-Achseninduktionsassay zur *in vivo* Analyse in Embryonen, sowie der Topflash-Assay zur *in vitro* Analyse in Kulturzellen.

In *Xenopus* wurden die sekundären Achsen mittels ventraler RNA-Injektion von XWnt8, Dvl oder β -Catenin induziert und die Auswirkung von Ror2 und der interaktions-deletierten Variante Ror2 Δ 745 analysiert (Kooperation mit Dr. Alexandra Schambony, Universität Erlangen-Nürnberg). In diesem System inhibiert volle-Länge-Ror2 sowohl die XWnt8- als auch die Dvl-induzierte kanonische Achseninduktion, nicht aber die β -Catenin-induzierte Wnt-Antwort. Dieser inhibitorische Effekt ist nicht oder nur abgeschwächt sichtbar bei der Verwendung von Ror2 Δ 745 (Abbildung 25 A). Die Expression der Ror2-Varianten alleine induzierte keine Achsenentwicklung, hat wie erwartet also keine stimulierende Wirkung auf den kanonischen Signalweg.

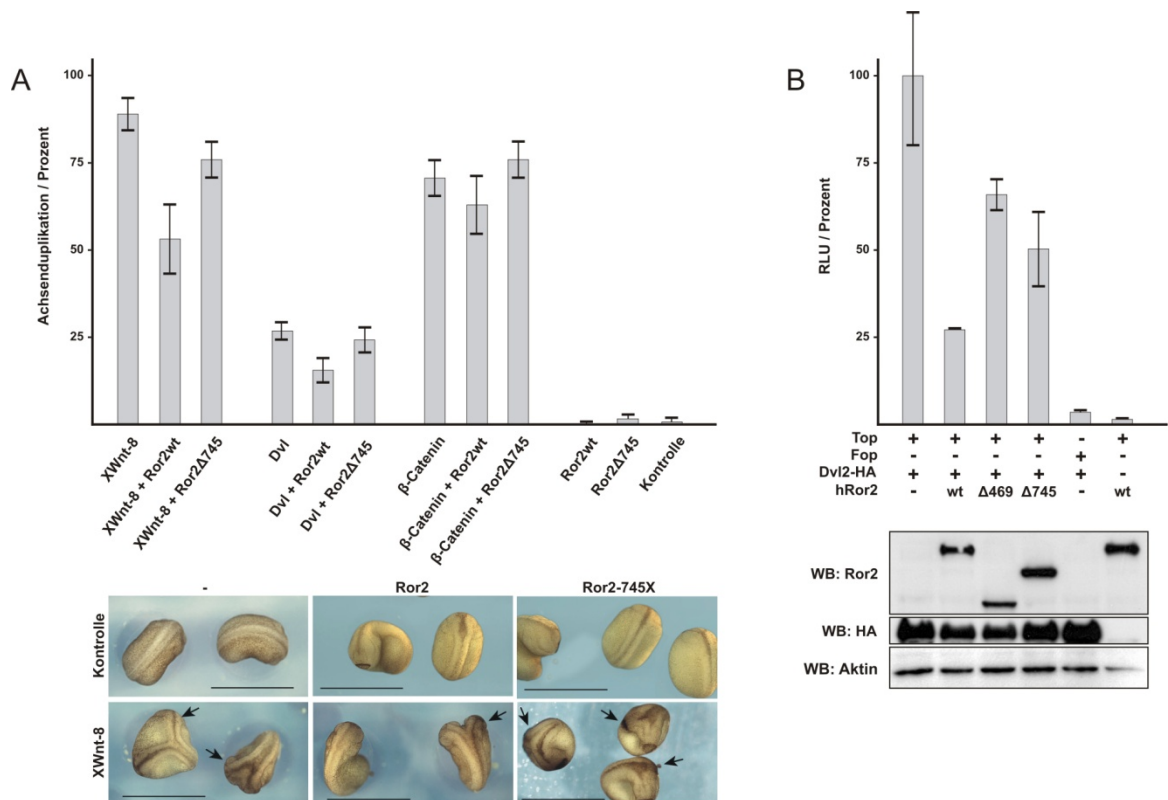


Abbildung 25: Ror2 inhibiert kanonischen Wnt-Signalweg *in vivo* und *in vitro*

(A) Achseninduktion in Xenopus (Kooperation mit Dr. A. Schambony): Ror2 inhibiert Wnt- und Dvl-induzierte, nicht aber β -Catenin-induzierte Achsen. Verringerte Inhibition bei Verwendung von BDB-Ror2 Δ 745. Exemplarische Aufnahmen von Xenopusembryonen nach Achseninduktion. (B) Topflash-Assay: Ror2 inhibiert Dvl-induzierte Luziferaseaktivität, Verwendung der BDB-Varianten Ror2 Δ 469 und Ror2 Δ 745 zeigt verringerte Inhibition. Expression verifiziert mittels Western Blot.

Die Inhibition findet oberhalb von β -Catenin statt und benötigt die S/T/P-Domäne von Ror2 und somit potentiell die Interaktion Ror2/ps-Dvl. Zusätzlich zu den bisherigen biochemischen Daten zeigt dies eine funktionelle Relevanz der gefundenen Ror2/ps-Dvl-Interaktion *in vivo* auf. Vergleichbare Ergebnisse konnten *in vitro* mit Hilfe des Luziferase-basierten Topflash-Assays erlangt werden. Auch hier inhibiert volle-Länge-Ror2 die kanonische Dvl-induzierte Wnt-Antwort, während beide humanen BDB-Konstrukte dieses Potential nur abgeschwächt zeigen. (Abbildung 25 B). Ein positiver Effekt von Ror2 alleine ist hier ebenfalls nicht zu beobachten.

4.3.1.4. Analyse von Ror2 und Dvl im Xenopus-System (Kooperationsprojekt)

Im Rahmen der Kooperation mit Dr. Alexandra Schambony (Universität Erlangen-Nürnberg) wurden zusätzliche Experimente im Xenopus-System durchgeführt, deren Resultate zur Verständlichkeit der Arbeit hier kurz ohne Abbildungen aufgeführt werden (Witte et al., 2009, eingereicht).

So wurde in sogenannten Xenopus animalen Kappen (animal cap explants, AC) ein antagonistischer Effekt von Ror2 und Dvl nachgewiesen. Während beide Komponenten alleine die Elongations- und Konstriktionsbewegungen der Convergent Extension (CE) inhibieren, hebt sich diese Wirkung bei simultaner Expression von Ror2 und Dvl wieder auf. Anschließend wurde in XPAPC als Aktivitätsindex für den Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg analysiert (Schambony and Wedlich, 2007). Sowohl XWnt5a als auch XRor2 induzieren die Transkription von XPAPC. Der Signalweg ist unabhängig von XDvl oder CK1, da sowohl ein knock-down von XDvl (via Morpholino) als auch die Inhibition der CK1 (via D4476) keine Auswirkung auf die XPAPC-Expression zeigen. Im Gegensatz dazu führt sowohl die Überexpression der CK1 ϵ (Aktivierung von ps-Dvl) als auch des C-Terminus von Dvl3 (hochaffine Bindung an Ror2) zur kompletten Blockade der Wnt5a/Ror2/ATF2-vermittelten XPAPC-Transkription.

Es konnte somit die funktionelle Relevanz der Interaktion *in vivo* untermauert werden. In Xenopus interferiert die Interaktion von Ror2 und CK1 ϵ -phosphoryliertem Dvl mit den Zellbewegungen der CE und inhibiert die Expression von XPAPC. Demnach könnte die Ror2/ps-Dvl-Interaktion eine Rolle bei der negativen Regulation des Wnt5a/Ror2/XPAPC-Signalwegs spielen, was im Anschluß detaillierter analysiert wurde.

4.3.1.5. Die Interaktion Ror2/psDvl ist an der negativen Regulierung des Wnt5a/Ror2/ATF2 Signalwegs beteiligt

Neben der Auswirkung auf den kanonischen Wnt-Signalweg ist der PI3K/JNK/ATF2-Signalweg die einzige im Zusammenhang mit Wnt5a und Ror2 detailliert beschriebene Signaltransduktion (Schambony and Wedlich, 2007). Bisher ausschließlich in Xenopus beschrieben, reguliert darin der Wnt5a-Stimulus via Ror2 die Transkription von XPAPC und damit die CE-Bewegungen der Gastrulation. In Anbetracht der offensichtlichen Überlappung der beteiligten Komponenten und der initialen Experimente in Xenopus (siehe 4.3.1.4) wurde die funktionelle Bedeutung der Ror2/ps-Dvl-Interaktion im Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg näher analysiert.

Mit einer Zeitreihe an Wnt5a-Stimulation gefolgt von der Analyse der Effektorgene pAKT (PI3K Target), pJNK (beteiligte Kinase) und pATF2 (Transkriptionsfaktor) konnten dieser Signalweg in Cos1-Zellen und damit für Säugetiere rekonstruiert werden (Abbildung 26 A). Der Stimulus führt innerhalb von kürzester Zeit (5-15min) zur Phosphorylierung und somit Aktivierung der Komponenten AKT, JNK und ATF2. Nach 30 Minuten erfolgt eine Herabregulierung der Signalaktivität und nach zwei Stunden ist der Signalweg wieder völlig ausgeschaltet.

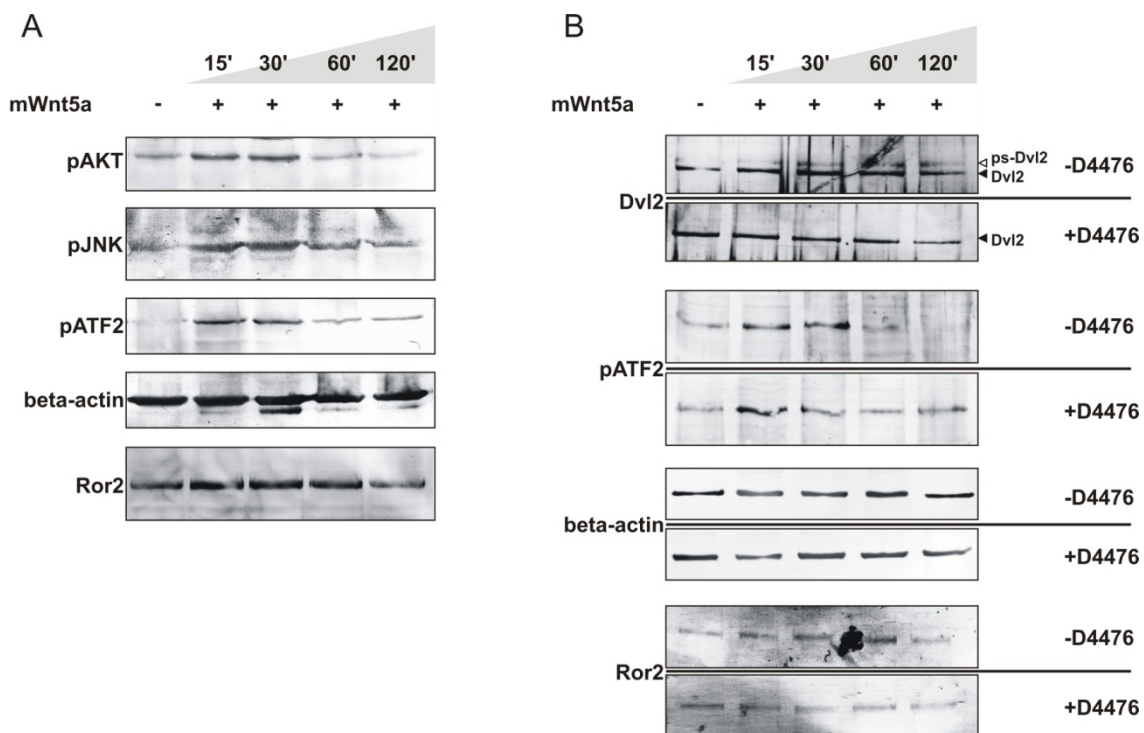


Abbildung 26: Interaktion Ror2/ps-Dvl reguliert Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg

Zeitreihe Wnt5a-Stimulus gefolgt von der Analyse der Effektorgene des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs. Beta-Aktin und Ror2 als Ladekontrollen. (A) Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg in Säugerzellen. Schnelle Phosphorylierung der beteiligten Komponenten AKT, JNK und ATF2 nach Wnt5a-Stimulus sowie Termination nach 1-2 Stunden. (B) Termination des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs korreliert mit dem Erscheinen von ps-Dvl (weißer Pfeil). Verwendung des CK1-Inhibitors D4476 und Verhinderung der Aktivierung von Dvl (schwarzer Pfeil) führt zu verlängertem Wnt5a/Ror2/ATF2-Signal, erkennbar an dem Nachweis von pATF2 noch nach zwei Stunden.

Diese negative Regulation korreliert auffälliger Weise zeitlich mit dem Erscheinen von ps-Dvl (Bryja et al., 2007) (Abbildung 26 B, weißer Pfeil). Zusammen mit den *in vivo*

Experimenten stellte sich die Frage einer Beteiligung der Ror2/ps-Dvl-Interaktion an der Herabregulierung des Wnt5a/Ror2/AFT2-Signalwegs. Um dies zu untersuchen, wurde die Wnt5a-Stimulations-Zeitreihe einmal ohne und einmal mit CK1-Inhibitor D4476 auf die Effektorgene des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs hin analysiert (Abbildung 26 B). Die Zugabe des Inhibitors blockt hierbei die Phosphorylierung von Dvl und somit die Interaktion Ror2/ps-Dvl. Während ohne Inhibitor (Abbildung 26 B; -D4476, jeweils der obere Blot) ein zeitverzögertes Signal von ps-Dvl und ein schnelles, transientes Signal von phospho-ATF2 zu detektieren ist, resultiert die Inhibition von ps-Dvl (Abbildung 26 B; +D4476, jeweils der unterer Blot) in einem deutlich verlängerten Phosphorylierungsstatus von ATF2. Nach zwei Stunden ist der Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg unter Zugabe von D4476 noch immer zu detektieren. Auf die schnelle Aktivierung von ATF2 hat der Inhibitor und somit CK1 keinerlei Auswirkung.

Zusammenfassend führt Wnt5a-Stimulation also zu einer schnellen und CK1/Dvl-unabhängigen Aktivierung des PI3K/JNK/ATF2-Signalwegs via Ror2 in Säugerzellen. Zeitversetzt resultiert Wnt5a wahrscheinlich via Frizzled/CK1 in der Bildung von ps-Dvl und ermöglicht so die Interaktion Ror2/ps-Dvl an der Zellmembran. Dies scheint die Termination des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs zu induzieren und stellt somit einen möglichen regulatorischen Rückkopplungsmechanismus dar.

4.3.2. Ror2 und der Bmp-Signalweg: Noggin als extrazellulärer Interaktionspartner von Ror2

Neben intrazellulären Interaktionspartnern von Ror2 wurde ebenso über potentielle neue extrazelluläre Bindungspartner spekuliert. Die meisten Versuchsansätze konzentrieren sich wie schon beschrieben vor allem auf die Familie der Wnt-Liganden. Die Interaktion von Ror2 mit dem BMP-vermittelten Signalweg wurde auf Seite der Liganden nur für den Fall von GDF5 analysiert (Sammar et al., 2004). Kürzlich wurden Punktmutationen im BMP-Antagonisten NOGGIN identifiziert, die in einem Subtypen der BDB resultieren (Lehmann et al., 2007). Dabei zeigt diese BDB2 starke phänotypische Überlappungen mit der ROR2-verursachten BDB1, ROR2 und NOGGIN sind Mitglieder der sogenannten „*molecular disease family*“ der Brachydaktylien (siehe 1.1.1). Zusammen mit der nachgewiesenen genetischen Interaktion beider Komponenten im Ror2W749X-Mausmodell (siehe 4.1.3.3) und den teils überlappenden Expressionsmustern (Daten nicht

gezeigt), wurde der Antagonist als potentieller Interaktionspartner von Ror2 ausgewählt und mittels Co-Immunopräzipitation (CoIP) bestätigt.

4.3.2.1. Ror2 interagiert über die CRD-Domäne mit Noggin

Ausgehend von Gesamtembryo-cDNA wurde Maus-Noggin kloniert und mit Flag- als auch HA-Tag versehen. Zusätzlich stand Hühnchen-Noggin als ungetaggttes Expressionskonstrukt zur Verfügung. Die Expression von cNoggin resultierte im Western-Blot in zwei spezifischen Banden (21kDa und 25kDa, Abbildung 27 A), wobei die schwerere Bande dem Noggin-Monomer entspricht. Die Identität der leichteren Banden konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, eventuell handelt es sich hierbei um ein Abbauprodukt des volle-Länge Noggin. Eine solche Inaktivierung durch proteolytischen Abbau wurde schon Falle des BMP-Antagonisten Chordin gezeigt (Piccolo et al., 1997), für Noggin fehlen bisher aber noch Daten zur Prozessierung oder Aktivierung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion Ror2/Noggin identifiziert und kartiert, sowie die initialen Versuche zur Phosphorylierung durchgeführt werden. Die detaillierte Analyse dieser Interaktion sowie die Optimierung der CoIP-Experimente wurde dann zusammen mit einer Diplomarbeit (Mahl 2009) realisiert und ist auch Thema eines weiterführenden Projekts.

So bindet in der Coexpression-Situation sowohl cNoggin (Abbildung 27 A) als auch mNoggin (Abbildung 27 B) an volle-Länge mRor2, wobei im Falle des cNoggin beide schon angesprochenen Banden aufkonzentriert werden. Dabei wurde für cNoggin das Ror2 präzipitiert und anschließend cNoggin nachgewiesen, bei mNoggin erfolgte der reverse Ansatz. Der Nachweis der Interaktion ist also unabhängig von der angewendeten Präzipitationsorientierung. Auch ist in keinem der beiden Fälle eine unspezifische Bindung an die verwendete Sepharose zu beobachten. Um die Überexpressionsartefakte aus dem Coexpressions-Lysat zu minimieren, wurde zusätzlich ein *in vitro* Bindungsassay etabliert (Abbildung 27 C). Dabei wird die Präzipitation aus einfach Ror2-exprimierenden Zellen vorgenommen, und diese Matrix nach mehrmaligem Waschen mit einem Noggin-Lysat inkubiert. Die dadurch stattfindende Bindung wird anschließend im Blot nachgewiesen. Auch hier konnte die Interaktion Ror2/Noggin bestätigt werden. Ein weiterer Nachweis mit rekombinantem Noggin scheiterte an der unspezifischen Bindung des Proteins an die Sepharose. Als verantwortliche Domäne innerhalb von Ror2 konnte die Cystein-reiche Domäne (CRD) identifiziert werden. So bindet Noggin zwar an volle-

Länge Ror2, aber nicht mehr an die deletierten Varianten Ror2 Δ CRD bzw. Ror2 Δ CRD/KR (Abbildung 27 D). Da diese Domänen neben der Ligandeninteraktion (Wnt) auch eine Rolle bei der Rezeptorinteraktion (Frizzled, Bmpr1b) spielen, kann eine Beteiligung von Corezeptoren nicht ausgeschlossen werden. Der Nachweis der direkten Interaktion Ror2/Noggin mittels rekombinanter, sezernierter Varianten von Ror2 und Biacore-Bindungsassays ist in Arbeit.

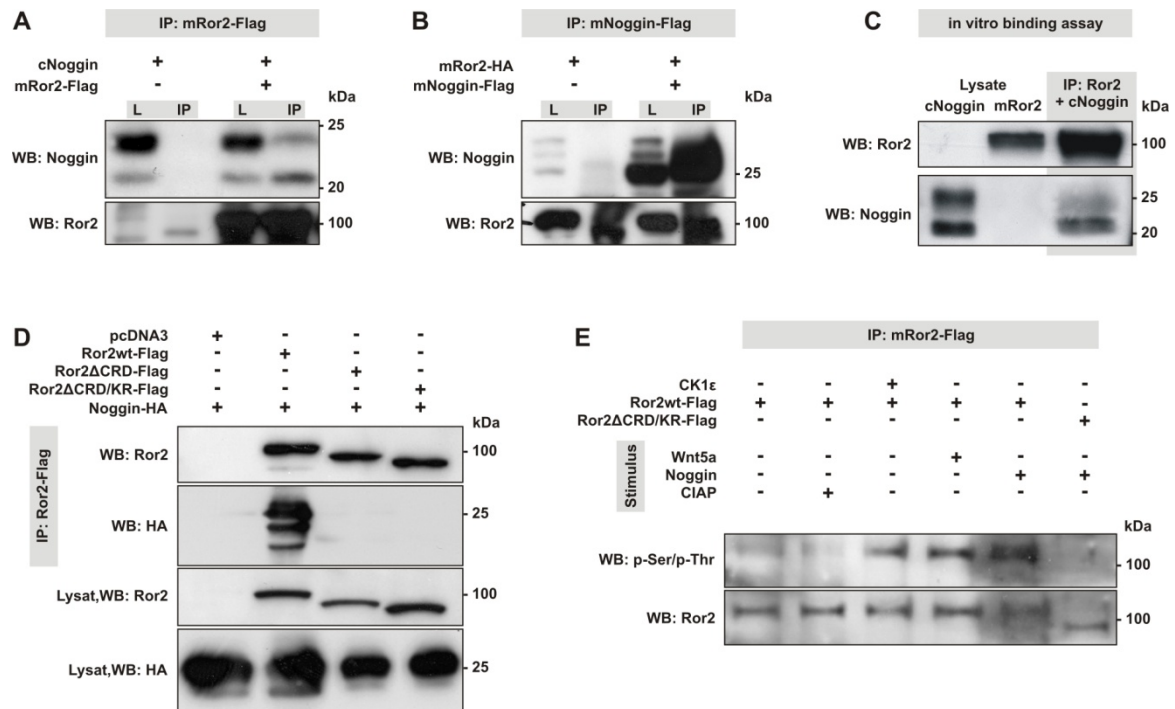


Abbildung 27: Ror2 interagiert mit Noggin über die CRD

CoIP-Experimente zur Interaktion Ror2/Noggin. Sowohl (A) cNoggin als auch (B) mNoggin binden an Ror2. (C) In vitro Bindung von cNoggin an präzipitiertes Ror2 zur Minimierung von Lysat-Artefakten. (D) Die Ror2/Noggin-Interaktion erfolgt über die Cystein-reiche Domäne (CRD) von Ror2. Nur volle-Länge Ror2 und keine der Trunkationen zeigt einen Pulldown von Noggin. (E) Die Bindung von Noggin induziert Serin/Threonin-Phosphorylierung von Ror2. Unstimuliertes und in vitro dephosphoryliertes (CIAP) Ror2 sowie Ror2 Δ CRD,KR zeigt kein Signal (Negativkontrollen), während nach CK1-Expression und Wnt5a-Stimulus (Positivkontrollen) sowie nach Noggin-Stimulus eine Serin/Threonin-Phosphorylierung am präzipitierten Ror2 zu erkennen ist.

Die Funktionelle Relevanz der Interaktion wird jedoch durch die Serin/Threonin-Phosphorylierung von Ror2 gestützt, welche nach Stimulation mit rekombinantem Noggin detektiert werden konnte (Abbildung 27 E). So führt die Transfektion mit CK1 ϵ

und der Stimulus mit Wnt5a wie schon mehrfach gezeigt zur Serin/Threonin-Phosphorylierung von Ror2 (Positivkontrolle) während im unstimulierten Zustand oder nach *in vitro* Dephosphorylierung kein Signal am präzipitierten Ror2 zu erkennen ist (Negativkontrolle). Nach der Stimulierung mit rekombinatem Noggin konnte eine starke Serin/Threonin-Phosphorylierung von volle-Länge Ror2 nachgewiesen werden. Diese fehlen jedoch bei der Deletionsvariante. Ror2 Δ CRD/KR, bei der die Bindung von Noggin an Ror2 ja nicht mehr möglich ist (siehe Abbildung 27 D). Bei der Phosphorylierung muss es sich zwar nicht über einen direkten Effekt der Interaktion handeln, wie schon beschrieben kann eine Beteiligung weiterer Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden, jedoch zeigt die Phosphorylierung deutlich eine intrazelluläre Aktivierung von Ror2.

Somit konnte in diesem Ansatz ein bisher völlig unbekannter Zusammenhang von Ror2 mit dem Bmp-vermittelten Signalweg über die Interaktion mit dem sezernierten Bmp-Antagonisten Noggin gezeigt werden, was die Komplexität der Ror2-beeinflußten Signaltransduktion nochmals erhöht.

5. Diskussion

Die hoch konservierte Rezeptor-Tyrosinkinase Ror2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung des Extremitätenskeletts. Beim Menschen resultieren Mutationen in ROR2 in den genetisch bedingten Erkrankungen Robinow Syndrom (RS) sowie Brachydaktylie Typ B (BDB). Während für das rezessive RS eine ER-vermittelte Degradation von Ror2 als Ursache identifiziert werden konnte, wird bei BDB aufgrund der dominanten Vererbung ein Funktionsgewinn des Proteins vermutet. Seit Beginn dieser Arbeit wurden auf dem Gebiet der Ror2-vermittelten Signaltransduktion einige Fortschritte erzielt, jedoch sind außer im Falle des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs in *Xenopus* wenige Details über beteiligte Komponenten bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher die ursächliche Aufklärung der Brachydaktylie im Mausmodell sowie die Identifikation weiterer Interaktionspartner und damit die Integration von Ror2 in die relevanten Signalwege der Extremitätenentwicklung.

5.1. *in vivo* Analyse von Ror2 - die Ror2W749X-Maus als Modell für humane BDB

Zusammen mit A. Economides und R. Raz (Regeneron Inc., Tarrytown, NY) wurde die Ror2W749X-Maus generiert und initial charakterisiert (Raz et al., 2008). Neben den in dieser Veröffentlichung beschriebenen Korrelationen zum RS ist die penetrante Brachydaktylie (BD) der deutlichste Phänotyp dieser Mauslinie und Fokus dieser Arbeit. Die Ror2W749X-Maus spiegelt mit der Ror2-Flag-Isoform die der menschlichen BDB korrelierende distale Trunkation der RTK wieder. Im Vergleich zum menschlichen Krankheitsbild ähnelt die distale Ror2W749X-Trunkation im Mausmodell jedoch eher der membran-nahen menschlichen ROR2-Trunkation mit schwächer betroffenen distalen Fingerelementen (siehe 1.2.3). Im Gegensatz zur dominanten Vererbung beim Menschen zeigt die BD der Ror2W749X-Maus auch ein rezessives Vererbungsmuster, die heterozygoten Tiere sind phänotypisch komplett normal (μ CT-Daten nicht gezeigt). Ein solches Phänomen tritt bei der Generation von Mauslinien häufiger auf und kann auf verschiedene Weisen erklärt werden. Erstens handelt es sich bei der Fingerentwicklung der Maus um ein stabileres System als beim Menschen. So besitzen beispielsweise die Fingerspitzen der Maus im Gegensatz zu humanen Fingerspitzen ein relativ großes Regenerationspotential nach einer Amputation (Neufeld and Zhao, 1995; Zhao and Neufeld, 1995), was auch der Grund für die fehlende Nageldysplasie im Mausmodell sein

könnte. Ein zweiter Grund neben speziesbedingten Unterschieden könnte eine veränderte Proteinlokalisierung und eventuell Proteinstabilität sein. So konnte in Zellkultur öfter beobachtet werden, daß Flag-getaggte Ror2-Konstrukte vermehrt im ER anstatt an der Zellmembran lokalisierten (Daten nicht gezeigt), weshalb für die Lokalisationsstudien im Zusammenhang mit der *in vitro* Analyse auch die ungetaggtten humanen Ror2-Konstrukte verwendet wurden. Auch zeigte sich in einer weiteren, in unserem Labor durchgeführten Studie (Promotionsarbeit von W. Schwarzer), dass die Menge von ROR2-Protein, welches die Membran erreicht, entscheidend für die Ausprägung des BDB-Phänotyps ist. Die distale BDB-verursachende ROR2-Trunkation zeigt dabei eine stärkere Membranlokalisierung als die proximale Trunkation, was den schwereren humanen Phänotyp erklärt. Zusammengenommen könnte in der Ror2W749X-Maus also ein geringeres Level an Membran-lokalisiertem, trunkierten Ror2 die rezessive BD in Gegenwart des wildtypischen Allels sowie den im Vergleich zum Menschen schwächeren Phänotyp der Ror2W749X-Maus erklären.

5.1.1. Pathomechanismus der Brachydaktylie in der Ror2W749X-Maus

Im Verlauf der Fingerentwicklung konnte die Etablierung des BD-Phänotyps zeitlich auf das embryonale Stadium E13.5 und räumlich auf die sich zu diesem Zeitpunkt bildende Kondensation der zukünftigen Phalangen 2 und 3 (p2/3) festgelegt werden. Ursache für diese nur rudimentär angelegte Zellpopulation ist eine gestörte mesenchymale Proliferationsrate und vor allem eine stark verringerte Rekrutierung der Zellen aus dem umliegenden distalen Mesenchym in die wachsende Kondensation p2/3. Der neomorphe Effekt der trunkierten Ror2-isoform zeigt sich ausschließlich in der Elongation der Phalangen der an BD leidenden Ror2W749X-Maus. Beim Ror2-KO, welcher ja eine normale Anzahl an Fingerelementen aufweist, verhält sich die p2/3 äquivalent dem Wildtyp. Die Entwicklung der Gelenke, insbesondere des zum kritischen Zeitpunkt E13.5 etablierten Gelenks zwischen p1 und p2/3, findet in der Ror2W749X-Maus unbeeinflusst statt. Durch den Rekrutierungsdefekt erreicht die Kondensation p2/3 jedoch nicht die kritische Länge, um ein weiteres Gelenk auszubilden, was das Fehlen einer Phalanx zur Folge hat. Damit wurde auch geklärt, daß es sich bei der primären Ursache der BD nicht wie ursprünglich vermutet um einen Defekt in der Gelenkentwicklung, sondern um einen Chondrogenesedefekt handelt.

Bei E14.5 wird aus dem distal verbleibenden Zellmaterial das letzte Fingerelement generiert. Die zu diesem Zeitpunkt stattfindende Degradation der AER ist dabei

verantwortlich für die Termination des Phalangenwachstums und induziert wahrscheinlich die Bildung der Terminal-Phalanx p3 (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). In der Ror2W749X-Maus ist die Etablierung der p2/3 zwar schwer gestört, das Gelenk p1/2 (bzw. p1/3) wird jedoch angelegt und somit eine wenn auch kleine Zellpopulation distal davon definiert. Daher scheint mit dem Zusammenbruch der AER ausreichend Material für ein normal ausgebildetes distales Fingerelement vorhanden zu sein und der homozygoten Ror2W749X-Maus fehlen final die mittleren Phalangen.

5.1.2. Mißregulierte Signalkaskaden resultieren über Proliferations- sowie Rekrutierungsdefekte im Phänotyp der Brachydaktylie

Auf Seiten der Signalwege wurden die essentiellen Kaskaden der Extremitätenentwicklung Fgf, Ihh, Bmp sowie Wnt analysiert und teil schwere und untereinander verknüpfte Störungen detektiert. Die Fgf-Signalweiterleitung scheint dabei unverändert, ebenso wie die Expression der frühen Musterbildungsgene der Homeobox(Hox)-Familie (Daten nicht gezeigt und Raz et al., 2008), welche eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der anterior-posterioren Identität spielen. Es handelt sich bei der Ror2W749X-BDB also weder um eine AER-Degradations- noch um einen Musterbildungs-Defekt.

Der Ihh-Signalweg

Die Ihh-vermittelte Signaltransduktion ist bisher vor Allem im Zusammenhang mit verschiedenen Aspekten der Chondrozytendifferenzierung beschrieben (siehe 1.1.4.2). Bei der Analyse dieses Signalweges konnte eine Herabregulierung der distalen Expression von *Ihh* sowie der klassischen Ihh-regulierten Gene in der Ror2W749X-Maus zu exakt dem Zeitpunkt der Etablierung der p2/3 gezeigt werden. Einen Tag später ist diese Expressionsdomäne wieder vergleichbar dem Wildtyp detektierbar, was mit der auch in der Mutante stattfindenden Differenzierung des Elementes p3 korreliert. Die Störungen der Ihh-vermittelten Signaltransduktion könnten über die spezifisch in der Ror2W749X-Maus reduzierte Expression von *Cyclin D1* mit den beschriebenen Defekten in Zellproliferation und Zellrekrutierung korrelieren. Ein solcher Zusammenhang konnte äquivalent in den Wachstumsfugen Mäusen mit Chondrozyten-spezifischer Deletion von *Ihh* nachgewiesen werden (Long et al., 2001). Daten aus dem Hühnchen stützen die Verbindung Ihh/Ror2, hier konnte mittels Virus-induzierter Überexpression einer membrannah trunkierten Ror2-Version die Expression von *Ihh* komplett geblockt werden

(Stricker et al., 2006). Auf welchem Weg die trunkierten Ror2-Versionen die Expression von *Ihh* negativ beeinflussen bleibt unbekannt. Eine ektope Expression von *Pthrp* in der Ror2^{W749X}-Maus und eine daraus resultierende Inhibition von *Ihh* konnte jedoch durch ISH ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die Verknüpfung von Ror2- und *Ihh*-vermittelter Signalweiterleitung wird am deutlichsten bei der genetischen Interaktion der BDB-Maus Ror2^{W749X} und der BDA1-Maus *Ihh*^{E95K}. So lässt sich im Genotyp Ror2^{+/W749X} *Ihh*^{E95K/E95K} ein kompletter Verlust der mittleren Phalanx generieren; im Zeigefinger wird die mittlere Phalanx auch schon im doppelt-heterozygoten Genotyp nur rudimentär angelegt. Erwähnenswert ist auch der Phänotyp Ror2^{W749X/W749X} *Ihh*^{+/E95K}, bei dem ausgehend von dem BD-Phänotyp der Ror2^{W749X}-Maus ein Finger mit stark gestörtem distalen Element p3 gebildet wird. Dies ähnelt erstmals im Mausmodell stark dem Phänotyp der humanen BDB, zu deren Charakteristika ja Defekte der terminalen Phalangen und Nägel gehören. Wie bereits erwähnt sind die terminalen Phalangen der Maus ein robusteres System als beim Menschen, es besteht ein hohes Regenerationspotential auch bei adulten Tieren. Interessanterweise zeigen viele Mausmutanten trotz gestörter Fingerentwicklung eine intakte terminale Phalanx (Albrecht et al., 2002; Baur et al., 2000; Storm et al., 1994). Die Allelkombination Ror2^{W749X/W749X} *Ihh*^{+/E95K} ist das erste Mausmodell, bei dem eine Hypoplasie der Terminalphalanx und der Klaue generiert werden konnte.

Die Interaktion der beiden Mauslinien erklärt sich beim Blick auf die zugrundeliegenden Mechanismen. So resultiert die Punktmutation in der *Ihh*^{E95K}-Maus über den *Pthrp*-Rückkopplungsmechanismus in der Herabregulierung der distalen *Ihh*-Expression und damit final ebenfalls in einer verringerten Zellrekrutierung ins distale Fingerelement (Gao et al., 2009). Der zelluläre Mechanismus ähnelt somit sehr dem der Ror2^{W749X}-Maus, ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt und die p2/3 demnach nicht so stark betroffen. Dies erklärt den schwächeren Phänotyp im homozygoten *Ihh*^{E95K}-Tier. Anscheinend reicht die Elongation der p2/3 in der *Ihh*^{E95K}-Maus noch aus, um ein weiteres Gelenk zu bilden, während in der Ror2^{W749X}-Maus diese kritische Größe unterschritten wird. Somit deutet bei der Pathogenese der BD alles auf die Beteiligung weiterer Signalwege neben *Ihh* hin.

Der Bmp-Signalweg

Im der Extremitätenentwicklung sind *Bmps* in vielen Prozessen inklusive der Chondrozytendifferenzierung beteiligt (zusammengefasst in Robert, 2007; Wu et al.,

2007) (siehe 1.1.4.3). Neben den Störungen des Ihh-Signalweges zeigt die Ror2W749X-Maus zusätzlich deutliche Veränderungen in der Bmp-vermittelten Signaltransduktion. So konnten genetische Interaktionen der trunkierten Ror2-Isoform sowohl mit Gdf5 als auch mit Noggin nachgewiesen werden, die aufgezeigten Phänotypen betreffen die Kondensation oder die Differenzierung der Chondrozyten. Dass keine Trunkationen der Fingerelemente generiert werden konnten, könnte mit dem unterschiedlichen Zustandekommen der Phänotypen begründet werden. Im Gegensatz zu der IhhE95K-Mauslinie wurde bei der Gdf5-brachypodism-Maus ektope Apoptose innerhalb der Kondensation als Ursache der BD vermutet (Takahara et al., 2004). Bei der Noggin-KO-Maus (LacZ Insertion im Noggin-Lokus) ist die entwicklungsbiologische Ursache noch unklar (Brunet et al., 1998), die ektope Aktivierung des Bmp-Signalwegs durch den Wegfall des Antagonisten führt aber wahrscheinlich zur gesteigerten Chondrogenese auf Kosten anderer Gewebe. So zeigt sich die Proliferationsrate der Mäuse zwar unverändert, ein Nachweis zur veränderten Zellrekrutierung fehlt jedoch in dieser Veröffentlichung ebenso wie im Falle der Gdf5-brachypodism-Maus. Neben den detektierten Unterschieden in Bmp-regulierten Genen ist im Hinblick auf die BD die gestörte Etablierung der „*phalanx forming region*“ (PFR) die entscheidende Auswirkung der Ror2-Trunkation auf diesen Signalweg. So wurde die PFR im Hühnchen im Zusammenhang mit Fingeridentität und proximo-distalem Wachstum identifiziert (Montero et al., 2008; Suzuki et al., 2008) und ist charakterisiert durch Sox9-, Bmpr1b- und phospho-Smad 1/5/8-positive Zellen im etwa 100-200µm unterhalb der AER liegenden unkondensierten vaskularisierten Mesenchym. Diese Region liegt zwischen der kondensierten, nicht-vaskularisierten Knorpelanlage und dem direkt unterhalb der AER liegenden nicht-kondensierten, nicht-vaskularisierten Mesenchym. Exakt hier findet die Rekrutierung der Zellen in die chondrogene Linie statt und die PFR eines jeden Fingers besitzt in Korrelation zu der finalen Fingerlänge ein charakteristisches phospho-Smad-Profil (Suzuki et al., 2008). Die Ausbildung der PFR erfordert sowohl eine unbeschädigte AER und damit einhergehende Fgf-Signaltransduktion, als auch das interdigitale Fingermesenchym. Zusammen mit der synergistischen Wirkung von Bmp- und Aktivin/Tgfb-Signalkaskaden erfolgt in dieser Region dann die chondrogene Spezifizierung der mesenchymalen Zellen (Montero et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte die PFR nun erstmals im Maussystem detektiert und zusätzlich in den Zusammenhang mit Fingerfehlbildungen gebracht werden. So wird die PFR in den an BD leidenden Mäusen Ror2W749X sowie Ror2-LacZ-fus bei E13.5 nicht

korrekt etabliert. Dies ist spezifisch für die Ror2-Trunkationen und somit für den BDB-Phänotyp, da der normal-gegliederte Ror2-KO eine dem Wildtyp vergleichbare PFR zeigt.

Der Wnt-Signalweg

Wnt-induzierte Signalkaskaden sind in vielfältiger Weise an der Extremitätenentwicklung und Chondrogenese beteiligt und steuern Prozesse wie Zellproliferation und Zellkondensation, sowie Chondrozytendifferenzierung und Gelenkentwicklung (siehe 1.1.4.4, zusammengefasst in Chun et al., 2008; Hartmann, 2002). Die nachgewiesenen Störungen des Bmp-Signalweges in der Ror2^{W749X}-Maus werden komplettiert durch die Veränderungen im kanonischen, β -Catenin-vermittelten Wnt-Signalweg. So konnte in verschiedenen Ansätzen eine ektope Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im distalen Finger der Ror2^{W749X}-Maus gezeigt werden. Dies betrifft zum einen die distale Region der verringerten mesenchymalen Proliferation, vor allem aber die Region der PFR. Die Ror2-vermittelte Hochregulierung des Wnt-Signalwegs ist ein vielversprechender Kandidat für Mißregulation des Bmp-Signalwegs und somit für die in BD resultierende Störung der PFR. Ektope Wnt-Aktivität kann entweder durch ektope Expression des Liganden selber oder durch Wegfall von Antagonisten zustande kommen. Bei den Wnt-Antagonisten der Familie der *secreted frizzled related proteins* (Sfrp) konnte im Sfrp2-KO (Morello et al., 2008) sowie noch deutlicher im Sfrp1/Sfrp2-Doppel-KO (Satoh et al., 2006) ein hochreguliertes kanonisches Wnt-Signal bereits in Verbindung mit einem BD-Phänotyp gebracht werden. Ein verringertes inhibitorisches Potential von intrazellulär trunkierten Ror2-Versionen auf die kanonische Wnt-Signaltransduktion konnte in der Vergangenheit schon gezeigt werden (Mikels and Nusse, 2006; Winkel et al., 2008), ebenso wie der antagonistische Zusammenhang der beiden involvierten Signalkaskaden (Wnt/Bmp) auf verschiedenen Ebenen inklusive der Chondrogenese (Fischer et al., 2002; Jin et al., 2006; Stott et al., 1999). So können beispielsweise Antagonisten des jeweiligen gegenläufigen Signalwegs aktiviert werden (Grotewold and Ruther, 2002; Klapholz-Brown et al., 2007) und auch die direkten Interaktionen der zentralen Komponenten Smad und Dvl (Warner et al., 2005), Smad und Tcf (Nishita et al., 2000) oder β -Catenin und Sox9 (Akiyama et al., 2004) verdeutlichen diesen Zusammenhang.

Zusammenfassend resultiert die Trunkation von Ror2 in einer Störung des balancierten Wnt/Bmp-Signalnetzwerkes in der für das Fingerwachstum essentiellen PFR zum Zeitpunkt der Etablierung der mittleren Phalanx, und somit zum Phänotyp der BD.

5.1.3. Modell zur Fingerentwicklung und Etablierung der Brachydaktylie

Aus den in der Ror2W749X-Maus gewonnenen Daten zu beteiligten Signalwegen kann nun ein Modell zur allgemeinen Fingerentwicklung postuliert werden (Abbildung 28), welches das Zustandekommen der Fingertrunkation in der Ror2W749X-Maus erklären kann (Abbildung 29). Dabei handelt es sich um eine Synthese und Weiterentwicklung bestehender Modelle zur passiven und Wnt-abhängigen, frühen Extremitätenausbildung, sowie zum aktiven und Bmp-abhängigen, späten Fingerwachstum.

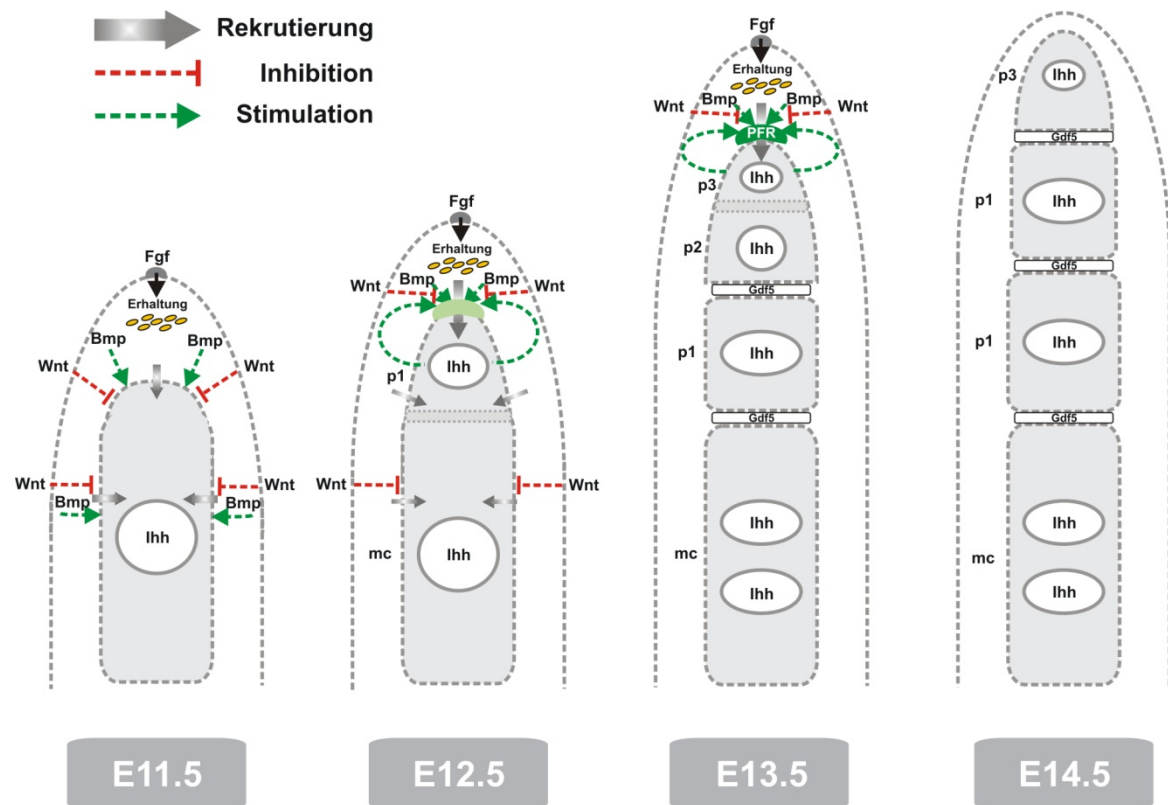


Abbildung 28: Modell zur Fingerentwicklung

Basierend auf den Daten der Ror2W749X-Maus wurden aktuelle Modellvorstellungen zur Fingerentwicklung (Montero et al., 2008; Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003; Suzuki et al., 2008; Ten Berge et al., 2008) zusammengeführt und weiterentwickelt. Dargestellt sind die beteiligten Signalkaskaden und Strukturen im Fingerquerschnitt E11.5-E14.5; Erklärung im Text.

Bis einschließlich E13.5 ist die AER an der distalen Fingerspitze intakt und sichert einerseits im darunterliegenden Mesenchym das Überleben und den proliferativen Charakter der Zellen, andererseits wird die Formation der Fingerspitze sowie die Ausbildung neuer Gelenke inhibiert (Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). Die Etablierung der initialen Kondensation bis etwa E11.5 läuft in einem eher passiven Prozess ab, wobei das ektodermale kanonische Wnt-Signal im darunterliegenden Mesenchym die Chondrogenese unterdrückt. Mit zunehmendem Abstand nimmt dieses Potenzial ab und die Zellen beginnen im zentralen Mesenchym zu kondensieren und zu differenzieren (Ten Berge et al., 2008). Dieses kürzlich publizierte Modell ist jedoch nur für die frühe Fingerentwicklung anwendbar. Beginnend mit E12.5 findet ein Umschalten in ein aktives proximo-distales Längenwachstum statt, wobei hier Bmp-vermittelte Signaltransduktion und die *phalanx forming region* (PFR) eine entscheidende Rolle spielen (Montero et al., 2008; Suzuki et al., 2008). In zeitlicher und eventuell auch funktioneller Korrelation mit der Etablierung des Gelenkes p1/2 wird zwischen E12.5 und E13.5 die distale Zellpopulation p2/3 definiert und es etabliert sich ein Signalnetzwerk an der distalen Fingerspitze. Während die AER-exprimierten Fgfs weiterhin den proliferativen Charakter im distalen Zellpool sichern, bildet sich durch das balancierte Zusammenwirken von ektodermalen Wnt-Signalen, mesenchymalem Bmp-Signalen und Ihh aus der distalen Kondensation die PFR aus.

Dabei kommt Ihh wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Induktion der PFR zu. So führt im Huhn die Applikation von Shh-Beads in interdigitalem Gewebe über die Hochregulation von Bmp-Aktivität zu verlängerten Fingern mit zusätzlichen Phalangen (Dahn and Fallon, 2000; Sanz-Ezquerro and Tickle, 2003). Diese Rolle könnte anhand der Expressionsdaten beim auswachsenden Finger der Maus von Ihh übernommen werden. In der ausgebildeten PFR erfolgt die chondrogene Definition der von distal kommenden Zellen und die Rekrutierung in die auswachsende Kondensation. Nachdem wahrscheinlich in Abhängigkeit der Länge der distalen Kondensation das Gelenk p2/3 ausgebildet wurde, bricht mit E14.5 die AER zusammen und das distale Fingerelement differenziert nach einem eigenen Programm (zusammengefasst in Casanova and Sanz-Ezquerro, 2007). Die Unterteilung des Fingers in seine 3 Phalangen endet somit bei E14.5. Die Differenzierung der Klaue ebenfalls unter Beteiligung von Bmp- und Wnt/R-Spondin-Signalen schließt sich etwa ab E17.5 an, wird aber in dieser Arbeit nicht behandelt.

5.1.4. Abgleich der Ror2-Expression mit den Expressionsmustern der Wnt-Liganden

Um Kandidaten für die Defekte der Ror2W749X-Maus und potentielle neue Ror2-Liganden zu identifizieren, wurden die Daten aus der Expressionsanalyse (4.2) mit der Ror2-Expression (4.1.1) abgeglichen.

Für den Phänotyp der Ror2W749X-Maus kommen nur wenige der Liganden in Frage. So zeigen beim kritischen Stadium E13.5 nur *Wnt5a* und *Wnt5b* eine mit Ror2 überlappende Expression im distalen Mesenchym der Fingerspitze. *Wnt5a* ist schon mehrfach im Zusammenhang mit Ror2-abhängiger Zellproliferation und Zellmigration beschrieben, der C-Terminus von Ror2 ist dabei von Bedeutung (He et al., 2008; Nishita et al., 2006; Nomachi et al., 2008) und die Phänotypen von *Wnt5a*-KO und Ror2-KO zeigen deutliche Übereinstimmungen (Oishi et al., 2003). Mit der Identifikation der *Wnt5a*-abhängigen Ror2/ps-Dvl-Interaktion konnte in dieser Arbeit auch gleich ein interessanter potentieller Kandidat für die Mißregulationen in der Ror2W749X-Maus identifiziert werden (siehe 5.2.3). Zusammen mit *Wnt5a* ist das hoch-homologe *Wnt5b* an der balancierten Regulation der Chondrozytendifferenzierung beteiligt (Yang et al., 2003). Bisher existieren noch keine Daten zu *Wnt5b* im Zusammenhang mit Ror2 oder ein *Wnt5b*-KO-Mausmodell. Allerdings ist die *Wnt5b* induzierte Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs schon gezeigt (Kanazawa et al., 2005), *Wnt5a* und *Wnt5b* könnten also redundante Funktionen zukommen.

Bezieht man die AER als essentielle regulatorische Ror2-exprimierende Region des proximo-distalen Wachstums mit ein, so zählen auch noch *Wnt10a*, *Wnt10b* und *Wnt11* zu den Kandidaten. Betrachtet man unabhängig vom Phänotyp der BDB die generelle Expression von Ror2 in Haut und Mesenchym, so zeigen sich partielle Überlappungen mit allen detektierten Liganden der Wnt-Familie. Erwähnenswert ist hier noch die Ror2-Coexpression von *Wnt5a*, *Wnt5b* und *Wnt11* in prähypertrophen Chondrozyten sowie von *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt7b* und *Wnt16* im Perichondrium. Somit könnte Ror2 ein genereller Rezeptor für annähernd alle Wnt-Liganden darstellen. Dies wird durch initiale CoIP-Experimente gestützt, bei denen Ror2 mit 10 verschiedenen, Flag-getaggten Wnt-Konstrukten mit jeweils unterschiedlich Affinitäten präzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt, Neuendorf 2007). Dieser Ansatz zeigt zusammen mit der aktuellen Literatur die Variabilität der Ror2/Wnt-Interaktion auf, bei der die RTK in Abhängigkeit

des Rezeptorkontextes sowie zusätzlicher Adaptermoleküle mit verschiedensten Wnt-Liganden interagieren kann (zusammengefasst in 1.2.4).

5.2. *in vitro* Analse von Ror2 - Identifikation neuer Interaktionspartner

5.2.1. Ror2 interagiert mit dem zentralen Mediator des Wnt-Signalwegs Dishevelled

In bisherigen Studien wurde das inhibitorische Potential von Ror2 auf den kanonischen, β -Catenin-vermittelten Wnt-Signalweg schon mehrfach beschrieben, teilweise auch schon eine verminderte Inhibition trunkierter Ror2-Versionen (Mikels and Nusse, 2006; Winkel et al., 2008). Dabei wurden intrazellulär beteiligte Komponenten jedoch nie identifiziert oder detailliert charakterisiert. Auch in der Ror2^{W749X}-Maus resultiert die Trunkation von Ror2 in einer Hochregulierung des kanonischen Wnt-Signalweges, was einer verminderten Inhibition gleichkommt. Die Identifikation der Ror2/ps-Dvl-Interaktion bietet nun Einblicke in die intrazelluläre Weiterleitung des Signals, Auswirkungen der BDB-Trunkationen von Ror2 sowie Querverbindungen zu Wnt-Signalwegen.

Im Rahmen der Arbeit konnte die Interaktion auf Seiten von Ror2 auf den Serin/Threonin/Prolin-reichen cytoplasmatischen C-Terminus von Ror2 kartiert werden. Diese Domäne ist einzigartig und charakteristisch für die Proteine der Ror-Familie und ihre Funktion noch nicht völlig klar. Da fast alle der bisher beschriebenen intrazellulären Interaktionspartner über diese Domäne an die RTK binden, handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Art Plattform für funktionelle Interaktionen mit Relevanz bei der Aktivierung von Ror2 oder andersweitiger Signalweiterleitung. Interessanterweise fehlt diese Domäne in den in BDB-resultierend Ror2-Trunkationen, womit die Ror2/Dvl-beeinflussten Signalkaskaden vielversprechende Kandidaten zur Erklärung dieser humanen Syndrome sind. Ebenso fehlt der C-terminale Bereich ganz oder teilweise in den Ror2-Orthologen von *Drosophila* sowie *C.elegans* und ist somit eine Art „Neuentwicklung“ der Wirbeltiere mit potentieller Bedeutung in der Entwicklung des Endoskeletts.

In den CoIP-Studien konnte eine schwache Interaktion von Ror2 mit volle-Länge Dvl nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte auch eine hoch-affine Bindung von Ror2 an den isolierten C-Terminus von Dvl nachgewiesen werden, erstmalig für diesen stark

konservierten Teil des Proteins. Die Interaktion von Ror2 mit volle-Länge-Dvl ist abhängig vom CK1 ϵ -kontrollierten Phosphorylierungsstatus von Dvl und induzierbar durch Wnt5a. Möglicherweise induziert die Phosphorylierung von Dvl eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch der C-Terminus für die Interaktion mit Ror2 exponiert wird. Nach Wnt5a-Stimulus und in Abhängigkeit von Ror2 zeigt endogenes Dvl eine CK1 ϵ -abhängige Relokalisation an die Membran und dort eine Colokalisation mit Ror2.

Somit sind bei der neu gefundenen Interaktion beide für Dvl-vermittelte Signaltransduktion essentiellen Begleitumstände involviert: der Phosphorylierungsstatus sowie die intrazelluläre Lokalisierung von Dvl. Der Phosphorylierungsstatus wird im Allgemeinen als Aktivitätsindex des Proteins interpretiert, obwohl die genaue Funktion noch unklar ist. Induziert wird die Phosphorylierung durch kanonische als auch nicht kanonische Wnt-Liganden und verschiedene Kinasen, im Falle der Interaktion Ror2/ps-Dvl ausschließlich durch die CK1 ϵ . Das zweite Kriterium der intrazellulären Lokalisierung von Dvl steht ebenfalls in engem Zusammenhang mit der funktionellen Aktivität. Eine Membranlokalisierung von Dvl ist sowohl in nicht-kanonischen (Wallingford and Habas, 2005) als auch im kanonischen (Bilic et al., 2007) Signalweg beschrieben und scheint mit dem Phosphorylierungsstatus des Proteins also ebenfalls ein Index für die generelle Aktivität des Proteins zu sein. Die beschriebene Lokalisierung von Dvl in sogenannten *Puncta* wird kontrovers diskutiert. Aufgrund einer Phospholipid-Bindungsstelle innerhalb der DIX-Domäne wurden die auch endogen vorkommenden Dvl-Punkte anfangs als potentielle Vesikel interpretiert (Capelluto et al., 2002). Mittlerweile geht man von dynamischen Aggregaten aus, die durch reversible Polymerisierung der DIX-Domänen von Dvl entstehen und mit der Signalkapazität von Dvl korrelieren (Schwarz-Romond et al., 2007a; Schwarz-Romond et al., 2007b). Demzufolge stellen die vor allem in Überexpressions-Experimenten auftretenden cytoplasmatischen Aggregate wohl eher ein Artefakt dar, weshalb in den Zellstudien in dieser Arbeit auch ausschließlich mit endogenem Dvl gearbeitet wurde.

Die in dieser Arbeit erstmalig charakterisierte Wnt5a/Ror2/CK1 ϵ -abhängige Membranlokalisierung von endogenem ps-Dvl hat somit Potential für wichtige funktionelle Auswirkungen. Zusammen mit der nachgewiesenen Ror2/ps-Dvl-abhängigen Termination des nicht-kanonischen Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweges sowie der Inhibition der kanonischen Wnt-Signaltransduktion können die in dieser Arbeit neu erlangten Daten zu einem Modell zusammengestellt werden (Abbildung 30).

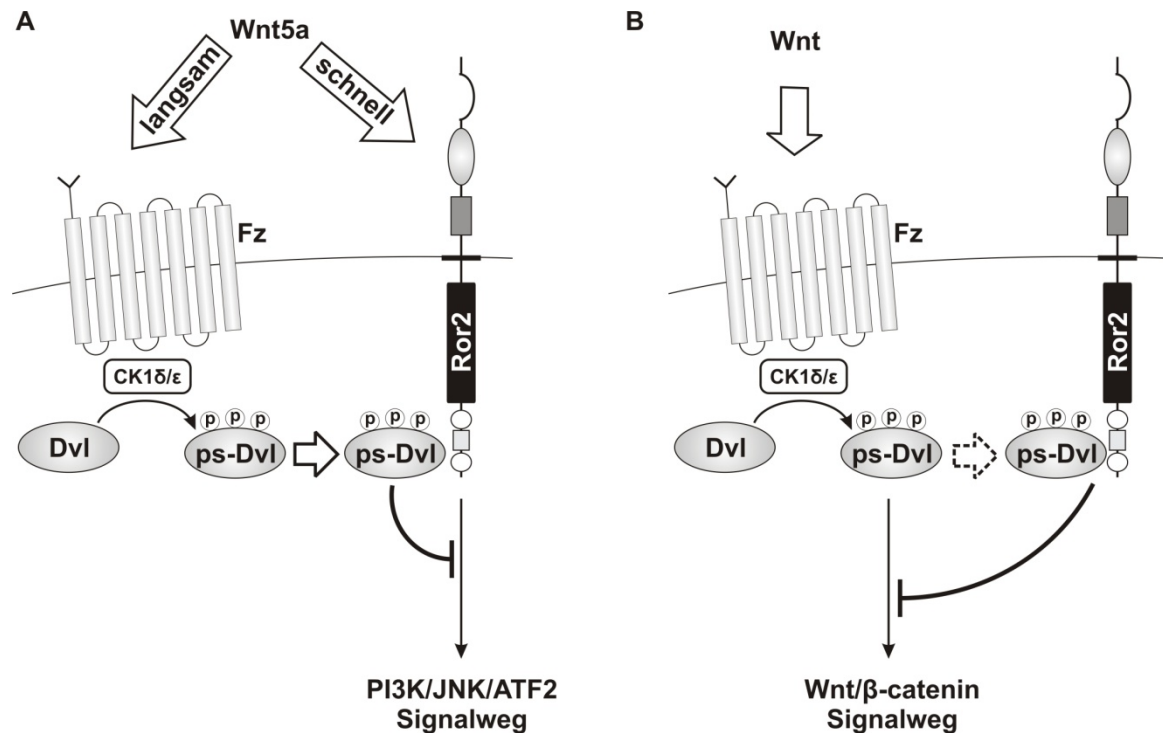


Abbildung 30: Modellvorstellung zu funktionellen Auswirkungen der Interaktion Ror2/ps-Dvl an der Zellmembran

(A) Wnt5a-Stimulus resultiert über Ror2 in einer schnellen Aktivierung von ATF2 und zeitversetzt vermutlich über Frizzled/CK1 in der Phosphorylierung von Dvl (ps-Dvl). Dieses ps-Dvl kann mit der P/S/T-reichen Domäne von Ror2 interagieren und ist so an der Termination des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs beteiligt. (B) Das nach Wnt-Stimulus generierte ps-Dvl kann durch die Interaktion mit Ror2 aus dem Signalweg entfernt werden, was in einer Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs resultiert.

So steuert Ror2 wie schon in *Xenopus* beschrieben (Schambony and Wedlich, 2007) auch in Säugerzellen nach Wnt5a-Stimulus über den schnell ablaufenden Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg unabhängig von Dvl oder CK1 die Aktivierung von ATF2. In einem zeitverzögert ablaufenden Signalweg rekrutiert Ror2 ps-Dvl und inhibiert so auf bisher unbekannte Art die Signaltransduktion via PI3K/JNK (Abbildung 30 A). Vermutlich wird ps-Dvl über den Wnt5a/Frizzled/CK1-Weg erzeugt (Bryja et al., 2007), was aber weiterer Klärung bedarf. Somit ist Ror2 und die spezifische Interaktion mit der aktivierten Form von Dvl an der zeitlich versetzten Termination des initialen Wnt5a-Signals beteiligt.

Eine Möglichkeit zur Erklärung der nachgewiesenen Inhibition des kanonischen Wnt-Signalweges ist die Restriktion der essentiellen Komponente ps-Dvl via Ror2 (Abbildung 30 B). Als Voraussetzung hierfür spielt Dvl eine entscheidende Rolle bei der Initiation

der kanonischen Wnt-Antwort (Bilic et al., 2007). Durch Wnt-induzierte Aggregation der Frizzled- und LRP-Rezeptoren bilden sich in Abhängigkeit von Dvl sogenannte „LRP6-Signalosome“ nahe der Zellmembran, in denen über Dvl-Polymere die Rekrutierung von Axin und eventuell GSK3 sowie APC und somit die kanonische Signalweiterleitung erfolgt. Durch die Bindung an den C-Terminus von Ror2 kann Dvl nicht mehr als Gerüstprotein an der Inhibition des β -Catenin-Abbaukomplexes teilnehmen, was in der Degradation und somit Herabregulierung des kanonischen Wnt-Signals resultiert. Da ps-Dvl generell nach Wnt-Stimulus zu beobachten ist, könnte ein solcher inhibitorischer Effekt auch bei anderen nicht-kanonischen Signalwegen eine Rolle spielen. Ebenso kann neben dieser eher passiven Funktion eine aktive Inhibition über einen bisher unbekanntem Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren besteht über die Polymerisierung von Dvl und weiteren so vermittelten Interaktionspartnern die Möglichkeit der Rekrutierung weiterer wichtiger Komponenten wie beispielsweise Axin oder GSK3 auf einer Art Ror2-abhängigen Interaktionsplattform. Ein solches Modell wurde schon im Falle von LRP und Dvl bei der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges vorgeschlagen (Bilic et al., 2007; Cong et al., 2004b; Huang and He, 2008). Beide in diesem Modell vorgeschlagenen Funktionen von Ror2 sind abhängig von der im Falle der BDB fehlenden C-terminalen Domäne und beide Signalwege somit potentielle Kandidaten zur Erklärung des Phänotyps. Dabei würde trotz Bindung des Liganden der intrazelluläre inhibitorische Effekt nicht mehr stattfinden können, was zur gezeigten Verlängerung des nicht-kanonischen Signalwegs über ATF2 beziehungsweise zur Hochregulierung der β -Catenin-vermittelten Signalkaskade führen könnte. Für den Transkriptionsfaktor ATF2 existieren bisher noch keinerlei Daten zu humanen Skelettfehlbildungen. Jedoch ist ATF2 in der frühen distalen Extremitätenknospe (Gray et al., 2004) sowie später in der Wachstumsfuge in ruhenden und proliferierenden Chondrozyten exprimiert und der ATF2-KO weist einen Chondrodysplasie-Phänotyp mit verkürzten Skelettelementen auf (Reimold et al., 1996). In Anbetracht des ATF-2 regulierten *Cyclin D1* (Beier et al., 1999) und der Coexpression mit Ror2 könnte dem Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalweg somit eine Rolle bei der Proliferationsregulation in der auswachsenden Extremität und in der Chondrogenese zukommen. Für mißregulierte Wnt-Signaltransduktion ist der Zusammenhang zu Extremitätenfehlbildungen inklusive Trunkationen der Finger sowohl im Menschen als auch in der Maus schon mehrfach gezeigt (siehe 1.1.4.4). Dies stützt einen Zusammenhang der Ror2-abhängige Mißregulation beider Kaskaden mit den im Mausmodell nachgewiesenen Defekten.

5.2.2. Ror2 interagiert mit dem sezernierten Bmp-Antagonist Noggin

Im Rahmen dieser Arbeit konnte als weitere interessante Interaktion die Bindung des Bmp-Antagonisten Noggin an Ror2 nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die erste Beschreibung der Bindung eines Bmp-Antagonisten an einen Rezeptor. Im Falle des Wnt-Signalweges und Dkk2/LRP sind solche Bindungen und deren aktivierende Eigenschaften schon beschrieben (Brott and Sokol, 2002; Li et al., 2002; Wu et al., 2000). Die Interaktion Ror2/Noggin erfolgt über die CRD-Domäne von Ror2 und resultiert in der Serin/Threonin-Phosphorylierung von Ror2. Eine mögliche Auto-Tyrosin-Phosphorylierung und somit Aktivierung von Ror2 konnte trotz Verwendung verschiedener Antikörper nicht untersucht werden, da diese entgegen bestehender Literaturdaten selbst in den Positivkontrollen (z.B. Antikörper-induzierte Dimerisierung) kein Phospho-Tyrosin-Signal zeigten (Daten nicht gezeigt). Die intrazellulär detektierte Serin/Threonin-Phosphorylierung von Ror2 deutet aber auf eine funktionelle Relevanz und einen aktiven Noggin-induzierten Ror2-Signalweg hin. Dabei kann noch keine Aussage über die Beteiligung weiterer Rezeptoren wie beispielsweise Bmpr1b gemacht werden und auch der direkte Charakter der Phosphorylierung ist noch unklar. Die initiale Charakterisierung der Interaktion wird jedoch durch verschiedene Daten untermauert. So konnte in der Maus eine genetische Interaktion von Ror2^{W749X} und Noggin nachgewiesen werden, die Expressionsdomänen der beiden Proteine in der Extremität überlappen größtenteils und beim Menschen resultiert eine Mutation im NOGGIN in BDB2. Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als Startpunkt für Studien zu funktionellen Auswirkungen und sind Thema weiterführender Projekte (Kooperation mit Prof. Petra Knaus, FU Berlin). Geplant sind beispielsweise die Generierung einer Mauslinie mit BDB2-mutiertem Noggin. Mögliche Konsequenzen der Ror2/Noggin-Interaktion im Ror2-vermittelten Signalnetzwerk werden im Folgenden diskutiert.

5.2.3. Ror2 als Schaltstelle zwischen Wnt- und Bmp-Signaltransduktion

Zusammen mit bestehender Literatur und den in dieser Arbeit neu generierten Daten lässt sich ein komplexes Signalnetzwerk rund um Ror2 generieren, welches die RTK an eine zentrale Schaltstelle zwischen Wnt- und Bmp-vermittelter Signaltransduktion positioniert. So ist Ror2 mehrfach als Corezeptor im Wnt-Signalweg beschrieben und die Interaktion sowohl mit den Liganden als auch mit den klassischen Wnt-Rezeptoren der Frizzled-Klasse findet teilweise unter Beteiligung zusätzlicher Adaptoren über die CRD-Domäne im Ror2 statt (Abbildung 31 1) (Referenzen siehe 1.2.4). Die Interaktion mit Noggin über

eben diese Domäne (Abbildung 31 2) stellt eine erste Quervernetzung dar. Initiale Experimente deuten auf eine kompetetive Bindung der beiden Liganden an Ror2 hin (Daten nicht gezeigt). Ganz abgesehen von einem eigenen Ror2/Noggin-Signalweg könnte der Bmp-Antagonist so jegliche Wnt-Signalweiterleitung via Ror2 blockieren, ebenso ist die reverse Situation denkbar. Dabei könnten unterschiedliche Bindungsaffinitäten eine entscheidende Rolle bei der balancierten Wnt/Noggin-Signaltransduktion via Ror2 spielen. Ebenso könnte die Bindung der verschiedenen Liganden Unterschiede in der Ror2-Dimerisierung oder Corezeptor-Rekrutierung beziehungsweise -Verdrängung nach sich ziehen, und so weitreichende Auswirkungen auf Signalkaskaden haben. Eine weitere Stufe der Komplexität wird durch die eigentliche Funktion des Bmp-Antagonisten hinzu gefügt. So könnte die Interaktion von Noggin mit Ror2 nicht nur kompetitiv die Wnt/Ror2-Signaltransduktion inhibieren, sondern zusätzlich durch den Wegfall der inhibitorischen Funktion von Noggin den Bmp-Signalweg potenzieren. In gleicher Weise könnte die Bindung von Wnt-Liganden an Ror2 die Bmp-Signaltransduktion über erhöhte Noggin-Konzentrationen inhibieren. Ein balancierter Zusammenhang der beiden Signalwege ist schon mehrfach beschrieben, jedoch bisher nicht auf extrazellulärer Ebene und ohne die Beteiligung von Ror2.

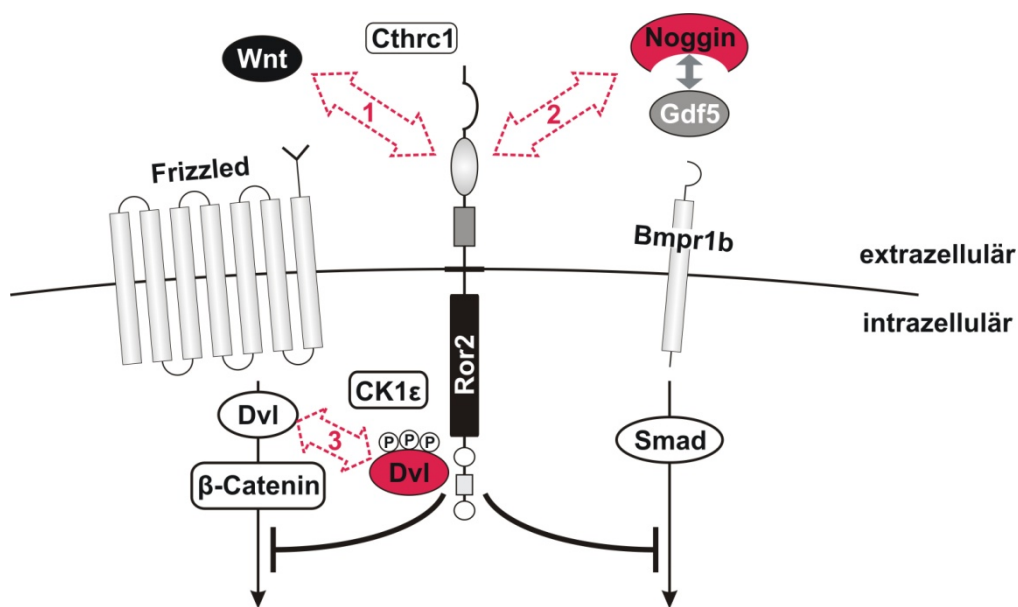


Abbildung 31: Ror2 als Schaltstelle zwischen Wnt- und Bmp-Signalwegen

Schematische Darstellung des Signalnetzwerkes an der Zellmembran um Ror2. Neu identifizierte Interaktionspartner Dishevelled (Dvl) und Noggin sind **rot** dargestellt. Mögliche Wechselwirkungen als **rote** nummerierte Pfeile gekennzeichnet und im Text diskutiert.

Des Weiteren könnte die intrazelluläre Signaltransduktion via Ror2 in verschiedenster Weise beeinflusst werden. Alleine die Verfügbarkeit von Ror2 für die Inhibition der beiden Kaskaden stellte eine kritische Größe dar. Der C-Terminus von Ror2 wird für die Inhibition der Wnt-Kaskaden als auch für die Hemmung der Gdf5-induzierten Bmpr1b/Smad-vermittelten Signalweiterleitung benötigt und die Interaktion mit Noggin induziert eben dort lokalisierte Phosphorylierungen. Auch auf dieser Ebene könnte die Noggin-Bindung also Einfluß auf die schon genannten Prozesse und eventuell auch auf die Interaktion mit Dvl nehmen (Abbildung 31-3). Dies wäre für einen Bmp-Antagonisten ein erstmals beschriebener, direkter Zusammenhang mit dem Wnt-Signalweg. Interessanterweise ist die reverse Verflechtung der Signalwege schon beschrieben. So inhibiert in *Xenopus* der sezernierte Wnt-Antagonist *Sizzled* die Metalloproteinase-induzierte Degradation von Chordin und damit die Freisetzung von komplexierten Bmps (Lee et al., 2006).

5.2.4. Das Konzept der „Molecular Disease Family“ der Brachydaktylien

Dieses Netzwerk aus Phänotypen, Mutationen und funktionellen Auswirkungen wird abschließend nochmals deutlich, wenn man die Komponenten aus einer humangenetischen Sichtweise zusammenfügt. Dem Konzept der „*molecular disease family*“ liegt die Tatsache zugrunde, dass in Syndrome mit überlappenden Phänotypen die beteiligten veränderten Komponenten oft auf molekularer Ebene funktional verknüpft sind. In Abbildung 32 sind nun die im Zusammenhang mit den untereinander überlappenden Brachydaktylien Typ A, B und C bisher bekannten Komponenten dargestellt und die Verbindung zu Ror2 durch Blockpfeile gekennzeichnet. Zugunsten der Übersichtlichkeit sind die Referenzen zu den humanen Fehlbildungen der Einleitung zu entnehmen.

Als Ausgangspunkt dieser Darstellung und der vorliegenden Arbeit resultieren ROR-Trunkationen in der Fingerfehlbildung BDB1. Mutationen im BMPR1B resultieren in BDA2 und BDC. Die Interaktion von Ror2 und Bmpr1b (Abbildung 32-1) konnte biochemisch schon gezeigt werden (Sammar et al., 2004). Verschiedene Mutationen in GDF5 verursachen BDA2 sowie BDC. Neben der schon bekannten Ror2-abhängigen Inhibition des Gdf5-induzierten Smad-Signalweiterleitung (Sammar et al., 2004) konnte mit der Ror2W749X-Maus auch eine genetische Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 32-2). Im Falle des BDB2-verursachenden Bmp-Antagonisten Noggin konnte die genetische sowie physikalische Interaktion mit Ror2 in der vorliegenden Arbeit

erstmals gezeigt werden (Abbildung 32-3), was die Komplexität der Wechselwirkung von Ror2 mit der Gdf5/Bmpr1b-Signaltransduktion nochmals erhöht. Insgesamt konnte eine klare und enge Verknüpfung von Ror2 mit dem Bmp-Signalweg nachgewiesen werden, was sich in der Ror2W749X-Maus vor allem in der gestörten phospho-Smad-positiven PFR äussert. Auf Seiten der Wnt-Signalwege konnten neben wenigen Mutationen mit Auswirkungen auf das Extremitätenskelett bisher noch keine Brachydaktylie- verursachenden Mutationen beim Menschen identifiziert werden. Aufgrund der vielseitigen Wechselwirkungen mit Ror2 (Abbildung 32-4), des BD-Phänotyps der Sfrp2-KO-Maus (Morello et al., 2008) oder der Sfrp1/2-Doppel-KO-Maus (Satoh et al., 2006) und vor allem den in der Ror2W749X-Maus beschriebenen Effekten ist dies aber durchaus wahrscheinlich. Letztendlich konnte in dieser Arbeit auch erstmalig die Interaktion von Ror2- und Ihh-vermittelter Signaltransduktion aufgezeigt werden (Abbildung 32-5), wobei Mutationen in IHH im Zusammenhang mit BDA1 beschrieben sind.

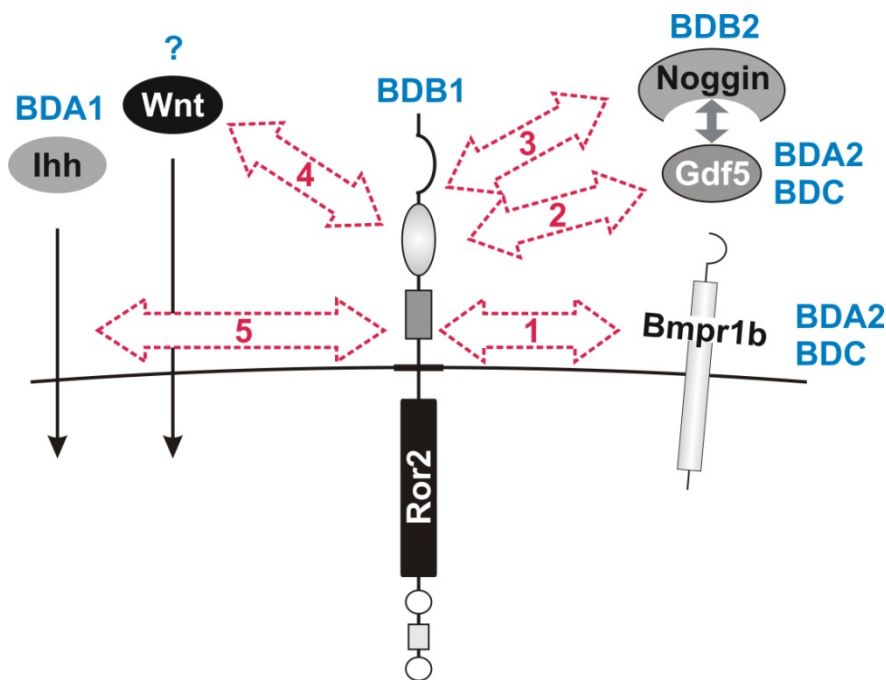


Abbildung 32: „Molecular Disease Family“ der Brachydaktylien

Konzept der „Molecular Disease Family“ : bei Krankheiten mit überlappenden Phänotypen zeigen die beteiligten Komponenten auf molekularer Ebene oft einen funktionellen Zusammenhang. Schematische Darstellung bisher identifizierter Komponenten, jeweilige Brachydaktylie in **blau** angegeben. Die **rot** gekennzeichneten Pfeile verdeutlichen die Funktionelle Verknüpfung mit Ror2, Erklärung der einzelnen Nummern im Text.

Abkürzungen: BDA1 - Brachydaktylie TypA1; BDA2 - Brachydaktylie TypA2; BDB - Brachydaktylie TypB; BDC - Brachydaktylie TypC

Anhand dieses Schemas wird klar, wie die Mutationen in den verschiedenen Komponenten untereinander verknüpft sein könnten. Während BD-Mutationen in den Rezeptoren Ror2 und Bmpr1b die intrazelluläre Signalweiterleitung beeinflussen, könnten BD-Mutationen in den Liganden Gdf5 oder Noggin zu Veränderungen der Bindungsaffinitäten untereinander oder zu den jeweiligen Rezeptoren führen. Durch die vielfältigen Interaktionen der Komponenten Ror2/Noggin/Gdf5/Bmpr1b sind hierbei die verschiedensten Kombinationen denkbar. Dies könnte über eine Verschiebung des Wnt/Bmp-Signalnetzwerkes in der Ausbildung des ähnlichen Phänotyps resultieren. Bei den BDB-Mutationen von Noggin wurden sowohl veränderte Dimerisierungseigenschaften schon beschrieben, als auch veränderte Noggin/Gdf5-Affinitäten vorgeschlagen (Lehmann et al., 2007). Auch die Ihh-bedingten BDA1 im Mausmodell hat als Ursache eine veränderte Rezeptor-Bindungsaffinität des mutierten IhhE95K-Proteins und damit eine veränderte Signalreichweite (Gao et al., 2009).

Somit lassen sich die *in vivo* und *in vitro* nachgewiesenen Zusammenhänge der verschiedenen BDB-beteiligten Signalkaskaden auf humangenetischer Ebene nachvollziehen. Diese Darstellung verdeutlicht abschließend nochmals die zentrale Position von Ror2 bei der Fingerentwicklung und untermauert die schon ausgeführte Stellung von Ror2 als Schalter im Netzwerk der verschiedenen Signalkaskaden.

6. Zusammenfassung

Bei Ror2 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) handelt es sich um einen hochkonservierten Oberflächenrezeptor, welcher vor allem im Zusammenhang mit verschiedenen Wnt-Signalwegen sowie zellulären Vorgängen wie Zellpolarität und Zellmigration beschrieben ist. Beim Menschen resultieren Mutationen in ROR2 in zwei den Skeletapparat betreffenden genetisch bedingten Erkrankungen. Mutationen, die das rezessive Robinow Syndrom verursachen, führen vermutlich über eine ER-vermittelte Degradation zum Funktionsverlust des Proteins. Dagegen trunkieren Mutationen, die sich in dominanter Brachydaktylie Typ B (BDB) äußern, das Protein entweder direkt nach der Membran oder nach der Kinase-Domäne. In beiden Fällen wird der Ror-charakteristische Serin/Threonin/Prolin-reiche C-Terminus abgetrennt und ein Funktionsgewinn des trunkierten Proteins vermutet.

Basierend auf der Ror2W749X-Maus, welche die distale menschliche ROR2-Trunkation widerspiegelt, wurde die Pathogenese der Brachydaktylie (BD) eingehend analysiert. Die Entwicklung des Phänotyps konnte zeitlich auf E13.5 und räumlich auf die Etablierung der distalen Fingerspitze (Phalangen 2 und 3) festgelegt werden. In der Ror2W749X-Maus führen dort Defekte in der Zellproliferation und Zellrekrutierung zu einer nur rudimentär angelegten Knorpelkondensation, welche anschließend zum distalen Fingerelement differenziert. Somit fehlen der homozygoten Ror2W749X-Maus final alle mittleren Phalangen. Dabei resultiert die Trunkation von Ror2 in einem Zusammenbruch des Signalnetzwerkes an der sich entwickelnden Fingerspitze. Ausschlaggebend ist hierbei die lokale Inhibition des Bmp-Signalwegs in der für das proximo-distale Auswachsen essentiellen Region der *phalanx forming region* (PFR). Die zum Zeitpunkt der Entstehung der mittleren Phalangen blockierte PFR resultiert im Phänotyp der BD. Als wahrscheinliche Ursache konnte ein ektopes kanonisches Wnt-Signal in Kombination mit einer verminderten Ihh-vermittelten Signaltransduktion nachgewiesen werden. In einer ebenfalls durchgeführten Expressionsanalyse aller Wnt-Liganden und ihrer wichtigsten Antagonisten wurden *Wnt5a* und *Wnt5b* als potentiell verantwortliche Ror2-Liganden identifiziert. Zusammen mit weiteren *in vitro* Experimente wurde ein allgemeines Modell der Fingerentwicklung sowie der Ror2-vermittelter Signaltransduktion entwickelt. Neben der Interaktion von Ror2 mit dem Bmp-Antagonisten Noggin konnte die Interaktion von Ror2 mit der zentralen Komponente

aller Wnt Signalwege Dishevelled (Dvl) nachgewiesen werden. Dabei interagiert Ror2 in Abhängigkeit von Wnt5a mit der CK1 ϵ -phosphorylierten Form von Dvl (ps-Dvl) und lokalisiert in Punkten nahe der Zellmembran. Auch konnte die funktionelle Relevanz der Ror2/ps-Dvl-Interaktion gezeigt werden. Sie ist an der Termination des Wnt5a/Ror2/ATF2-Signalwegs beteiligt und spielt eine potentielle Rolle bei der Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs *in vivo* und *in vitro*. Da die Interaktion über die Serin/Threonin/Prolin-reiche Domäne von Ror2 stattfindet ist sie ein vielversprechender Kandidat zur Erklärung der BD in der Ror2W749X-Maus und im Menschen.

Die in dieser Arbeit erlangten Daten verdeutlichen die zentrale Position von Ror2 im Netzwerk verschiedener Signalkaskaden und unterstreichen vor allem die Rolle von Ror2 als Wnt-Corezeptor, Mediator zwischen Wnt- und Bmp-Signaltransduktion und bei der Extremitätenentwicklung.

7. Summary

Ror2 (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2) is a highly conserved transmembrane receptor which is implicated in a variety of cellular processes like cell polarity and cell migration. Ror2 also turned out to act as a coreceptor in different branches of the Wnt signaling cascade. Mutations in ROR2 lead to two inheritable human disorders. Recessive Robinow syndrome is caused by mutations that result in a loss of function of Ror2, probably mediated by proteasomal degradation. Mutations that truncate the protein either before or after the kinase domain result in dominant Brachydactyly type B (BDB). In both truncated isoforms, the Ror2 specific intracellular serine/threonine/proline-rich tail is lost and a gain of function effect of truncated Ror2 is assumed.

The Ror2^{W749X} mouse reflects the human distal BDB truncation of ROR2 and served as starting point for a detailed analysis of the pathogenesis of brachydactyly (BD). We defined the establishment of the phenotype temporally to E13.5 and spatially to the formation of the distal finger element (phalanges 2 and 3). In Ror2^{W749X} mice, local defects in cell proliferation and cell recruitment result in a disturbed distal cartilage condensation. This cell population does not reach the critical size to form a medial phalanx and later on gives rise only to the distal-most element of the digit. Thus, the homozygous Ror2^{W749X} mouse is completely lacking all medial phalanges. On signaling level, the phenotype is caused by severe disturbances in the signaling network at the distal tip of the growing digit. A locally restricted inhibition of Bmp signaling interferes with the *phalanx forming region* (PFR), which is essential for proximo-distal outgrowth. Blocking establishment of the PFR during formation of the medial phalanges results in the BD phenotype. Most likely, a combination of ectopic canonical Wnt signaling and reduced Ihh activity accounts for the defects in Ror2^{W749X} mice. In a comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists, *Wnt5a* and *Wnt5b* turned out to be the only possible Ror2 ligands for these effects. Together with several *in vitro* experiments, we developed a general model of digital outgrowth as well as a model of Ror2 mediated signaling network. We detected a specific interaction of Ror2 with the Bmp antagonist Noggin and additionally an interaction of Ror2 with the central mediator of Wnt signaling cascades, dishevelled (Dvl). After stimulus with Wnt5a, Ror2 specifically binds CK1 phosphorylated Dvl (ps-Dvl) and both

colocalize in puncta at the cell membrane. We were also able to show the functional relevance of this interaction. It is implicated in the termination of the Wnt5a/Ror2/ATF2 signal transduction as well as in the inhibition of canonical Wnt signal transduction *in vivo* and *in vitro*. The interaction Ror2/ps-Dvl takes place via the serine/threonine/proline-rich tail of Ror2 and is therefore a promising candidate for the explanation of the brachydactyly phenotype in the Ror2^{W749X} mouse model as well as in human.

This thesis emphasizes the central position of Ror2 within a complex network of diverse signaling cascades and especially points out the role of Ror2 as Wnt coreceptor, mediator between Wnt and Bmp signaling cascades as well as its implication in skeletal development.

8. Literatur

- Adaimy, L., Chouery, E., Megarbane, H., Mroueh, S., Delague, V., Nicolas, E., Belguith, H., de Mazancourt, P. and Megarbane, A.** (2007). Mutation in WNT10A is associated with an autosomal recessive ectodermal dysplasia: the odonto-onycho-dermal dysplasia. *Am J Hum Genet* **81**, 821-8.
- Afzal, A. R., Rajab, A., Fenske, C. D., Oldridge, M., Elanko, N., Ternes-Pereira, E., Tuysuz, B., Murday, V. A., Patton, M. A., Wilkie, A. O. et al.** (2000). Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nat Genet* **25**, 419-22.
- Akbarzadeh, S., Wheldon, L. M., Sweet, S. M., Talma, S., Mardakheh, F. K. and Heath, J. K.** (2008). The deleted in brachydactyly B domain of ROR2 is required for receptor activation by recruitment of Src. *PLoS ONE* **3**, e1873.
- Akiyama, H., Lyons, J. P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J. M., Taketo, M. M., Nakamura, T., Behringer, R. R. et al.** (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* **18**, 1072-87.
- Albrecht, A. N., Schwabe, G. C., Stricker, S., Boddlich, A., Wanker, E. E. and Mundlos, S.** (2002). The synpolydactyly homolog (spdh) mutation in the mouse -- a defect in patterning and growth of limb cartilage elements. *Mech Dev* **112**, 53-67.
- Angers, S., Thorpe, C. J., Biechele, T. L., Goldenberg, S. J., Zheng, N., MacCoss, M. J. and Moon, R. T.** (2006). The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol* **8**, 348-57.
- Barrow, J. R., Thomas, K. R., Boussadia-Zahui, O., Moore, R., Kemler, R., Capecchi, M. R. and McMahon, A. P.** (2003). Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge. *Genes Dev* **17**, 394-409.
- Baur, S. T., Mai, J. J. and Dymecki, S. M.** (2000). Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Development* **127**, 605-19.
- Beier, F., Lee, R. J., Taylor, A. C., Pestell, R. G. and LuValle, P.** (1999). Identification of the cyclin D1 gene as a target of activating transcription factor 2 in chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1433-8.
- Bell, J.** (1951). On brachydactyly and symphalangism. The treasury of human inheritance *Cambridge University Press, Cambridge* **5**, 1-31.
- Bilic, J., Huang, Y. L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C. M., Bienz, M. and Niehrs, C.** (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* **316**, 1619-22.
- Billiard, J., Way, D. S., Seestaller-Wehr, L. M., Moran, R. A., Mangine, A. and Bodine, P. V.** (2005). The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* **19**, 90-101.
- Bitgood, M. J. and McMahon, A. P.** (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* **172**, 126-38.
- Boulet, A. M., Moon, A. M., Arenkiel, B. R. and Capecchi, M. R.** (2004). The roles of Fgf4 and Fgf8 in limb bud initiation and outgrowth. *Dev Biol* **273**, 361-72.
- Boyden, L. M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M. A., Wu, D., Insogna, K. and Lifton, R. P.** (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* **346**, 1513-21.

- Brott, B. K. and Sokol, S. Y.** (2002). Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Mol Cell Biol* **22**, 6100-10.
- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Harland, R. M.** (1998). Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science* **280**, 1455-7.
- Bryja, V., Schulte, G., Rawal, N., Grahn, A. and Arenas, E.** (2007). Wnt-5a induces Dishevelled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1-dependent mechanism. *J Cell Sci* **120**, 586-95.
- Cadigan, K. M.** (2008). Wnt-beta-catenin signaling. *Curr Biol* **18**, R943-7.
- Capelluto, D. G., Kutateladze, T. G., Habas, R., Finkielstein, C. V., He, X. and Overduin, M.** (2002). The DIX domain targets dishevelled to actin stress fibres and vesicular membranes. *Nature* **419**, 726-9.
- Casanova, J. C. and Sanz-Ezquerro, J. J.** (2007). Digit morphogenesis: is the tip different? *Dev Growth Differ* **49**, 479-91.
- Chen, L., Adar, R., Yang, X., Monsonogo, E. O., Li, C., Hauschka, P. V., Yayon, A. and Deng, C. X.** (1999). Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest* **104**, 1517-25.
- Chen, Y., Bellamy, W. P., Seabra, M. C., Field, M. C. and Ali, B. R.** (2005). ER-associated protein degradation is a common mechanism underpinning numerous monogenic diseases including Robinow syndrome. *Hum Mol Genet* **14**, 2559-69.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-13.
- Chun, J. S., Oh, H., Yang, S. and Park, M.** (2008). Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep* **41**, 485-94.
- Cong, F., Schweizer, L. and Varmus, H.** (2004a). Casein kinase Iepsilon modulates the signaling specificities of dishevelled. *Mol Cell Biol* **24**, 2000-11.
- Cong, F., Schweizer, L. and Varmus, H.** (2004b). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* **131**, 5103-15.
- Cuvier, G.** (1817). Le règne animal; distribué d'après son organisation; pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée.
- Dahn, R. D. and Fallon, J. F.** (2000). Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science* **289**, 438-41.
- DasGupta, R. and Fuchs, E.** (1999). Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation. *Development* **126**, 4557-68.
- DeChiara, T. M., Kimble, R. B., Poueymirou, W. T., Rojas, J., Masiakowski, P., Valenzuela, D. M. and Yancopoulos, G. D.** (2000). Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nat Genet* **24**, 271-4.
- DeLise, A. M., Stringa, E., Woodward, W. A., Mello, M. A. and Tuan, R. S.** (2000). Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro model for chondrogenesis and cartilage maturation. *Methods Mol Biol* **137**, 359-75.
- Fallon, J. F., Lopez, A., Ros, M. A., Savage, M. P., Olwin, B. B. and Simandl, B. K.** (1994). FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science* **264**, 104-7.
- Fischer, L., Boland, G. and Tuan, R. S.** (2002). Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J Cell Biochem* **84**, 816-31.

- Forrester, W. C., Dell, M., Perens, E. and Garriga, G.** (1999). A *C. elegans* Ror receptor tyrosine kinase regulates cell motility and asymmetric cell division. *Nature* **400**, 881-5.
- Gao, B., Guo, J., She, C., Shu, A., Yang, M., Tan, Z., Yang, X., Guo, S., Feng, G. and He, L.** (2001). Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1. *Nat Genet* **28**, 386-8.
- Gao, B., Hu, J., Stricker, S., Cheung, M., Ma, G., Law, K. F., Witte, F., Briscoe, J., Mundlos, S., He, L. et al.** (2009). A mutation in *Ihh* that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range. *Nature*.
- Gazzerro, E. and Canalis, E.** (2006). Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 51-65.
- Goldring, M. B., Tsuchimochi, K. and Ijiri, K.** (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**, 33-44.
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A. M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F. H., Lev, D. et al.** (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**, 513-23.
- Gray, P. A., Fu, H., Luo, P., Zhao, Q., Yu, J., Ferrari, A., Tenzen, T., Yuk, D. I., Tsung, E. F., Cai, Z. et al.** (2004). Mouse brain organization revealed through direct genome-scale TF expression analysis. *Science* **306**, 2255-7.
- Green, J. L., Inoue, T. and Sternberg, P. W.** (2007). The *C. elegans* ROR receptor tyrosine kinase, CAM-1, non-autonomously inhibits the Wnt pathway. *Development* **134**, 4053-62.
- Green, J. L., Inoue, T. and Sternberg, P. W.** (2008a). Opposing Wnt pathways orient cell polarity during organogenesis. *Cell* **134**, 646-56.
- Green, J. L., Kuntz, S. G. and Sternberg, P. W.** (2008b). Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol* **18**, 536-44.
- Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. and 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**, 2308-41.
- Grotewold, L. and Ruther, U.** (2002). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J* **21**, 966-75.
- Hall, B. K. and Miyake, T.** (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* **22**, 138-47.
- Hamamy, H., Saleh, N., Oldridge, M., Al-Hadidy, A. and Ajlouni, K.** (2006). Brachydactyly type B1: report of a family with de novo ROR2 mutation. *Clin Genet* **70**, 538-40.
- Han, G., Li, A. G., Liang, Y. Y., Owens, P., He, W., Lu, S., Yoshimatsu, Y., Wang, D., Ten Dijke, P., Lin, X. et al.** (2006). Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development. *Dev Cell* **11**, 301-12.
- Hartmann, C.** (2002). Wnt-signaling and skeletogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **2**, 274-6.
- Hartmann, C. and Tabin, C. J.** (2001). Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton. *Cell* **104**, 341-51.
- He, F., Xiong, W., Yu, X., Espinoza-Lewis, R., Liu, C., Gu, S., Nishita, M., Suzuki, K., Yamada, G., Minami, Y. et al.** (2008). Wnt5a regulates directional cell migration and cell proliferation via Ror2-mediated noncanonical pathway in mammalian palate development. *Development* **135**, 3871-9.
- Hellemans, J., Coucke, P. J., Giedion, A., De Paepe, A., Kramer, P., Beemer, F. and Mortier, G. R.** (2003). Homozygous mutations in IHH cause acrocapitofemoral

- dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips. *Am J Hum Genet* **72**, 1040-6.
- Hens, J. R., Wilson, K. M., Dann, P., Chen, X., Horowitz, M. C. and Wysolmerski, J. J.** (2005). TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res* **20**, 1103-13.
- Hikasa, H., Shibata, M., Hiratani, I. and Taira, M.** (2002). The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling. *Development* **129**, 5227-39.
- Hill, R. E., Heaney, S. J. and Lettice, L. A.** (2003). Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies. *J Anat* **202**, 13-20.
- Hill, T. P., Taketo, M. M., Birchmeier, W. and Hartmann, C.** (2006). Multiple roles of mesenchymal beta-catenin during murine limb patterning. *Development* **133**, 1219-29.
- Huang, H. and He, X.** (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*.
- Ikegawa, M., Han, H., Okamoto, A., Matsui, R., Tanaka, M., Omi, N., Miyamae, M., Toguchida, J. and Tashiro, K.** (2008). Syndactyly and preaxial synpolydactyly in the single *Sfrp2* deleted mutant mice. *Dev Dyn* **237**, 2506-17.
- Jin, E. J., Lee, S. Y., Choi, Y. A., Jung, J. C., Bang, O. S. and Kang, S. S.** (2006). BMP-2-enhanced chondrogenesis involves p38 MAPK-mediated down-regulation of Wnt-7a pathway. *Mol Cells* **22**, 353-9.
- Johnson, D., Kan, S. H., Oldridge, M., Trembath, R. C., Roche, P., Esnouf, R. M., Giele, H. and Wilkie, A. O.** (2003). Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. *Am J Hum Genet* **72**, 984-97.
- Johnson, R. L. and Tabin, C. J.** (1997). Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* **90**, 979-90.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Kamiyama, M., Yanagimoto, T., Nakajima, M. and Maeda, S.** (2005). Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **330**, 505-10.
- Kani, S., Oishi, I., Yamamoto, H., Yoda, A., Suzuki, H., Nomachi, A., Iozumi, K., Nishita, M., Kikuchi, A., Takumi, T. et al.** (2004). The receptor tyrosine kinase *Ror2* associates with and is activated by casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **279**, 50102-9.
- Katoh, M.** (2005). Comparative genomics on ROR1 and ROR2 orthologs. *Oncol Rep* **14**, 1381-4.
- Katoh, M. and Katoh, M.** (2005). Identification and characterization of rat *Ror1* and *Ror2* genes in silico. *Int J Mol Med* **15**, 533-8.
- Khokha, M. K., Hsu, D., Brunet, L. J., Dionne, M. S. and Harland, R. M.** (2003). Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet* **34**, 303-7.
- Kim, C. and Forrester, W. C.** (2003). Functional analysis of the domains of the *C. elegans* Ror receptor tyrosine kinase CAM-1. *Dev Biol* **264**, 376-90.
- Kirkpatrick, T. J., Au, K. S., Mastrobattista, J. M., McCready, M. E., Bulman, D. E. and Northrup, H.** (2003). Identification of a mutation in the Indian Hedgehog (IHH) gene causing brachydactyly type A1 and evidence for a third locus. *J Med Genet* **40**, 42-4.
- Kishida, M., Hino, S., Michiue, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Fukui, A., Asashima, M. and Kikuchi, A.** (2001). Synergistic activation of the Wnt signaling pathway by Dvl and casein kinase Iepsilon. *J Biol Chem* **276**, 33147-55.

- Kjaer, K. W., Eiberg, H., Hansen, L., van der Hagen, C. B., Rosendahl, K., Tommerup, N. and Mundlos, S.** (2006). A mutation in the receptor binding site of GDF5 causes Mohr-Wriedt brachydactyly type A2. *J Med Genet* **43**, 225-31.
- Klapholz-Brown, Z., Walmsley, G. G., Nusse, Y. M., Nusse, R. and Brown, P. O.** (2007). Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests mechanisms for cell cooperativity in defining tissue microenvironments. *PLoS ONE* **2**, e945.
- Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C. et al.** (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* **273**, 663-6.
- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A. and 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**, 993-1003.
- Lee, H. X., Ambrosio, A. L., Reversade, B. and De Robertis, E. M.** (2006). Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cell* **124**, 147-59.
- Lehmann, K., Seemann, P., Silan, F., Goecke, T. O., Irgang, S., Kjaer, K. W., Kjaergaard, S., Mahoney, M. J., Morlot, S., Reissner, C. 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**, 388-96.
- Lehmann, K., Seemann, P., Stricker, S., Sammar, M., Meyer, B., Suring, K., Majewski, F., Tinschert, S., Grzeschik, K. H., Muller, D. et al.** (2003). Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12277-82.
- Lewandoski, M., Meyers, E. N. and Martin, G. R.** (1997). Analysis of Fgf8 gene function in vertebrate development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 159-68.
- Li, C., Chen, H., Hu, L., Xing, Y., Sasaki, T., Villosis, M. F., Li, J., Nishita, M., Minami, Y. and Minoo, P.** (2008). Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. *BMC Mol Biol* **9**, 11.
- Li, C., Chen, L., Iwata, T., Kitagawa, M., Fu, X. Y. and Deng, C. X.** (1999). A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors. *Hum Mol Genet* **8**, 35-44.
- Li, L., Mao, J., Sun, L., Liu, W. and Wu, D.** (2002). Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem* **277**, 5977-81.
- Little, R. D., Carulli, J. P., Del Mastro, R. G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S. P., Swain, P. M., Zhao, S. C., Eustace, B. et al.** (2002). A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* **70**, 11-9.
- Liu, F., Kohlmeier, S. and Wang, C. Y.** (2008a). Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* **20**, 999-1009.
- Liu, Y., Ross, J. F., Bodine, P. V. and 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**, 3050-61.
- Liu, Y., Rubin, B., Bodine, P. V. and Billiard, J.** (2008b). Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem* **105**, 497-502.
- Long, F., Zhang, X. M., Karp, S., Yang, Y. and McMahon, A. P.** (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* **128**, 5099-108.

- Loomis, C. A., Harris, E., Michaud, J., Wurst, W., Hanks, M. and Joyner, A. L.** (1996). The mouse Engrailed-1 gene and ventral limb patterning. *Nature* **382**, 360-3.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W. et al.** (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* **22**, 1184-93.
- Mak, K. K., Chen, M. H., Day, T. F., Chuang, P. T. and Yang, Y.** (2006). Wnt/beta-catenin signaling interacts differentially with Ihh signaling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* **133**, 3695-707.
- Mariani, F. V., Ahn, C. P. and Martin, G. R.** (2008). Genetic evidence that FGFs have an instructive role in limb proximal-distal patterning. *Nature* **453**, 401-5.
- Masiakowski, P. and Carroll, R. D.** (1992). A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* **267**, 26181-90.
- Masiakowski, P. and Yancopoulos, G. D.** (1998). The Wnt receptor CRD domain is also found in MuSK and related orphan receptor tyrosine kinases. *Curr Biol* **8**, R407.
- Matsuda, T., Suzuki, H., Oishi, I., Kani, S., Kuroda, Y., Komori, T., Sasaki, A., Watanabe, K. and Minami, Y.** (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**, 29057-64.
- McKay, R. M., Peters, J. M. and Graff, J. M.** (2001a). The casein kinase I family in Wnt signaling. *Dev Biol* **235**, 388-96.
- McKay, S. E., Hislop, J., Scott, D., Bulloch, A. G., Kaczmarek, L. K., Carew, T. J. and Sossin, W. S.** (2001b). Aplysia ror forms clusters on the surface of identified neuroendocrine cells. *Mol Cell Neurosci* **17**, 821-41.
- McMahon, A. P. and Moon, R. T.** (1989). Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58**, 1075-84.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M. and McMahon, A. P.** (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-52.
- Mikels, A. J. and Nusse, R.** (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* **4**, e115.
- Min, H., Danilenko, D. M., Scully, S. A., Bolon, B., Ring, B. D., Tarpley, J. E., DeRose, M. and Simonet, W. S.** (1998). Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev* **12**, 3156-61.
- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M. and Vortkamp, A.** (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* **3**, 439-49.
- Montero, J. A., Lorda-Diez, C. I., Ganan, Y., Macias, D. and Hurle, J. M.** (2008). Activin/TGFbeta and BMP crosstalk determines digit chondrogenesis. *Dev Biol* **321**, 343-56.
- Moon, A. M. and Capecchi, M. R.** (2000). Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nat Genet* **26**, 455-9.
- Morello, R., Bertin, T. K., Schlaubitz, S., Shaw, C. A., Kakuru, S., Munivez, E., Hermanns, P., Chen, Y., Zabel, B. and Lee, B.** (2008). Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *J Cell Physiol* **217**, 127-37.
- Mundlos, S.** (2000). Skeletal morphogenesis. *Methods Mol Biol* **136**, 61-70.
- Neufeld, D. A. and Zhao, W.** (1995). Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen* **3**, 461-6.

- Niedermaier, M., Schwabe, G. C., Fees, S., Helmrich, A., Brieske, N., Seemann, P., Hecht, J., Seitz, V., Stricker, S., Leschik, G. et al. (2005). An inversion involving the mouse *Shh* locus results in brachydactyly through dysregulation of *Shh* expression. *J Clin Invest* **115**, 900-9.
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J. L. and Muller, U. (2004). Homozygous *WNT3* mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* **74**, 558-63.
- Nishita, M., Hashimoto, M. K., Ogata, S., Laurent, M. N., Ueno, N., Shibuya, H. and Cho, K. W. (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* **403**, 781-5.
- Nishita, M., Yoo, S. K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A. and Minami, Y. (2006). Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase *Ror2* is required for *Wnt5a*-induced cell migration. *J Cell Biol* **175**, 555-62.
- Niswander, L. and Martin, G. R. (1993). FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* **361**, 68-71.
- Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M. and Minami, Y. (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*.
- Nomi, M., Oishi, I., Kani, S., Suzuki, H., Matsuda, T., Yoda, A., Kitamura, M., Itoh, K., Takeuchi, S., Takeda, K. et al. (2001). Loss of *mRor1* enhances the heart and skeletal abnormalities in *mRor2*-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of *mRor1* and *mRor2* receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **21**, 8329-35.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G. C. et al. (2003). The receptor tyrosine kinase *Ror2* is involved in non-canonical *Wnt5a*/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 645-54.
- Oishi, I., Takeuchi, S., Hashimoto, R., Nagabukuro, A., Ueda, T., Liu, Z. J., Hatta, T., Akira, S., Matsuda, Y., Yamamura, H. et al. (1999). Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, *mRor1*, *mRor2*, during mouse development: implications in development and function of the nervous system. *Genes Cells* **4**, 41-56.
- Oldridge, M., Fortuna, A. M., Maringa, M., Propping, P., Mansour, S., Pollitt, C., DeChiara, T. M., Kimble, R. B., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D. et al. (2000). Dominant mutations in *ROR2*, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nat Genet* **24**, 275-8.
- Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matise, M. P., Beeghly, A., Hui, C. C., Nakashima, M. and Joyner, A. L. (2000). Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* **127**, 1593-605.
- Parr, B. A. and McMahon, A. P. (1995). Dorsalizing signal *Wnt-7a* required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* **374**, 350-3.
- Patthy, L., Trexler, M., Vali, Z., Banyai, L. and Varadi, A. (1984). Kringles: modules specialized for protein binding. Homology of the gelatin-binding region of fibronectin with the kringle structures of proteases. *FEBS Lett* **171**, 131-6.
- Pawson, T. and Schlessingert, J. (1993). SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* **3**, 434-42.
- Peters, J. M., McKay, R. M., McKay, J. P. and Graff, J. M. (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* **401**, 345-50.
- Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L. and De Robertis, E. M. (1997). Cleavage of Chordin by Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* **91**, 407-16.
- Polinkovsky, A., Robin, N. H., Thomas, J. T., Irons, M., Lynn, A., Goodman, F. R., Reardon, W., Kant, S. G., Brunner, H. G., van der Burgt, I. et al. (1997). Mutations in *CDMP1* cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat Genet* **17**, 18-9.

- Raz, R., Stricker, S., Gazzero, E., Clor, J. L., Witte, F., Nistala, H., Zabski, S., Pereira, R. C., Stadmeier, L., Wang, X. et al.** (2008). The mutation ROR2W749X, linked to human BDB, is a recessive mutation in the mouse, causing brachydactyly, mediating patterning of joints and modeling recessive Robinow syndrome. *Development* **135**, 1713-23.
- Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Hofmann, K. and Bucher, P.** (1998). The frizzled motif: in how many different protein families does it occur? *Trends Biochem Sci* **23**, 415-7.
- Reimold, A. M., Grusby, M. J., Kosaras, B., Fries, J. W., Mori, R., Maniwa, S., Clauss, I. M., Collins, T., Sidman, R. L., Glimcher, M. J. et al.** (1996). Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature* **379**, 262-5.
- Robert, B.** (2007). Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev Growth Differ* **49**, 455-68.
- Robert, B. and Lallemand, Y.** (2006). Anteroposterior patterning in the limb and digit specification: contribution of mouse genetics. *Dev Dyn* **235**, 2337-52.
- Saldanha, J., Singh, J. and Mahadevan, D.** (1998). Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci* **7**, 1632-5.
- Sammar, M., Sieber, C. and Knaus, P.** (2009). Biochemical and functional characterization of the Ror2/BRIb receptor complex. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G. C., Sieber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W. et al.** (2004). Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells* **9**, 1227-38.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sanz-Ezquerro, J. J. and Tickle, C.** (2003). Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* **13**, 1830-6.
- Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S. and Shimono, A.** (2006). Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* **133**, 989-99.
- Schambony, A. and Wedlich, D.** (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* **12**, 779-92.
- Schlessinger, J.** (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* **13**, 443-7.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-25.
- Schulte, G., Bryja, V., Rawal, N., Castelo-Branco, G., Sousa, K. M. and Arenas, E.** (2005). Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and dishevelled phosphorylation. *J Neurochem* **92**, 1550-3.
- Schwabe, G. C. and Mundlos, S.** (2004). Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir* **36**, 85-97.
- Schwabe, G. C., Tinschert, S., Buschow, C., Meinecke, P., Wolff, G., Gillessen-Kaesbach, G., Oldridge, M., Wilkie, A. O., Komec, R. and Mundlos, S.** (2000). Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet* **67**, 822-31.
- Schwabe, G. C., Turkmen, S., Leschik, G., Palanduz, S., Stover, B., Goecke, T. O. and Mundlos, S.** (2004). Brachydactyly type C caused by a homozygous missense mutation in the prodomain of CDMP1. *Am J Med Genet A* **124**, 356-63.
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J., Kikuchi, A., Higuchi, Y. and Bienz, M.** (2007a). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 484-92.

- Schwarz-Romond, T., Merrifield, C., Nichols, B. J. and Bienz, M.** (2005). The Wnt signalling effector Dishevelled forms dynamic protein assemblies rather than stable associations with cytoplasmic vesicles. *J Cell Sci* **118**, 5269-77.
- Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C. and Bienz, M.** (2007b). Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* **120**, 2402-12.
- Seemann, P., Schwappacher, R., Kjaer, K. W., Krakow, D., Lehmann, K., Dawson, K., Stricker, S., Pohl, J., Ploger, F., Staub, E. et al.** (2005). Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J Clin Invest* **115**, 2373-2381.
- Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N. et al.** (1999). Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* **21**, 138-41.
- Semenov, M. V., Habas, R., Macdonald, B. T. and He, X.** (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* **131**, 1378.
- Shimoyama, A., Wada, M., Ikeda, F., Hata, K., Matsubara, T., Nifuji, A., Noda, M., Amano, K., Yamaguchi, A., Nishimura, R. et al.** (2007). Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Mol Biol Cell* **18**, 2411-8.
- Soshnikova, N., Zechner, D., Huelsken, J., Mishina, Y., Behringer, R. R., Taketo, M. M., Crenshaw, E. B., 3rd and Birchmeier, W.** (2003). Genetic interaction between Wnt/beta-catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes Dev* **17**, 1963-8.
- Sossin, W. S.** (2006). Tracing the evolution and function of the Trk superfamily of receptor tyrosine kinases. *Brain Behav Evol* **68**, 145-56.
- Spater, D., Hill, T. P., O'Sullivan R, J., Gruber, M., Conner, D. A. and Hartmann, C.** (2006). Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Development*.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. and McMahon, A. P.** (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* **13**, 2072-86.
- Storm, E. E., Huynh, T. V., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kingsley, D. M. and Lee, S. J.** (1994). Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* **368**, 639-43.
- Stott, N. S., Jiang, T. X. and Chuong, C. M.** (1999). Successive formative stages of precartilaginous mesenchymal condensations in vitro: modulation of cell adhesion by Wnt-7A and BMP-2. *J Cell Physiol* **180**, 314-24.
- Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A. and Mundlos, S.** (2002). Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* **245**, 95-108.
- Stricker, S., Verhey van Wijk, N., Witte, F., Brieske, N., Seidel, K. and Mundlos, S.** (2006). Cloning and expression pattern of chicken Ror2 and functional characterization of truncating mutations in Brachydactyly type B and Robinow syndrome. *Dev Dyn* **235**, 3456-65.
- Suzuki, T., Hasso, S. M. and Fallon, J. F.** (2008). Unique SMAD1/5/8 activity at the phalanx-forming region determines digit identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4185-90.
- Swiatek, W., Tsai, I. C., Klimowski, L., Pepler, A., Barnette, J., Yost, H. J. and Virshup, D. M.** (2004). Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling. *J Biol Chem* **279**, 13011-7.
- Taipale, J. and Beachy, P. A.** (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**, 349-54.

- Takahara, M., Harada, M., Guan, D., Otsuji, M., Naruse, T., Takagi, M. and Ogino, T.** (2004). Developmental failure of phalanges in the absence of growth/differentiation factor 5. *Bone* **35**, 1069-76.
- Takeuchi, S., Takeda, K., Oishi, I., Nomi, M., Ikeya, M., Itoh, K., Tamura, S., Ueda, T., Hatta, T., Otani, H. et al.** (2000). Mouse Ror2 receptor tyrosine kinase is required for the heart development and limb formation. *Genes Cells* **5**, 71-8.
- Tang, Y., Liu, Z., Zhao, L., Clemens, T. L. and Cao, X.** (2008). Smad7 stabilizes beta-catenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **283**, 23956-63.
- Temtamy, S. A. and Aglan, M. S.** (2008). Brachydactyly. *Orphanet J Rare Dis* **3**, 15.
- Temtamy, S. A. and McKusick, V. A.** (1978). The genetics of hand malformations. *Birth Defects Orig Artic Ser* **14**, i-xviii, 1-619.
- Ten Berge, D., Brugmann, S. A., Helms, J. A. and Nusse, R.** (2008). Wnt and FGF signals interact to coordinate growth with cell fate specification during limb development. *Development* **135**, 3247-57.
- Ugur, S. A. and Tolun, A.** (2008). Homozygous WNT10b mutation and complex inheritance in Split-Hand/Foot Malformation. *Hum Mol Genet* **17**, 2644-53.
- Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberledge, S. and Rubin, J. S.** (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* **275**, 4374-82.
- van Amerongen, R. and Berns, A.** (2006). Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet* **22**, 678-89.
- van Bokhoven, H., Celli, J., Kayserili, H., van Beusekom, E., Balci, S., Brussel, W., Skovby, F., Kerr, B., Percin, E. F., Akarsu, N. et al.** (2000). Mutation of the gene encoding the ROR2 tyrosine kinase causes autosomal recessive Robinow syndrome. *Nat Genet* **25**, 423-6.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. and Tabin, C. J.** (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* **273**, 613-22.
- Wallingford, J. B. and Habas, R.** (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**, 4421-36.
- Wang, C., Pan, Y. and Wang, B.** (2007a). A hypermorphic mouse Gli3 allele results in a polydactylous limb phenotype. *Dev Dyn* **236**, 769-76.
- Wang, C., Ruther, U. and Wang, B.** (2007b). The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol* **305**, 460-9.
- Warner, D. R., Greene, R. M. and Pisano, M. M.** (2005). Interaction between Smad 3 and Dishevelled in murine embryonic craniofacial mesenchymal cells. *Orthod Craniofac Res* **8**, 123-30.
- Wiesmann, C., Muller, Y. A. and de Vos, A. M.** (2000). Ligand-binding sites in Ig-like domains of receptor tyrosine kinases. *J Mol Med* **78**, 247-60.
- Wilson, C., Goberdhan, D. C. and Steller, H.** (1993). Dror, a potential neurotrophic receptor gene, encodes a Drosophila homolog of the vertebrate Ror family of Trk-related receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7109-13.
- Winkel, A., Stricker, S., Tylzanowski, P., Seiffart, V., Mundlos, S., Gross, G. and Hoffmann, A.** (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**, 2134-44.

- Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S. and Stricker, S.** (2009). Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expr Patterns*.
- Wong, G. T., Gavin, B. J. and McMahon, A. P.** (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* **14**, 6278-86.
- Woods, C. G., Stricker, S., Seemann, P., Stern, R., Cox, J., Sherridan, E., Roberts, E., Springell, K., Scott, S., Karbani, G. et al.** (2006). Mutations in WNT7A Cause a Range of Limb Malformations, Including Fuhrmann Syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel Phocomelia Syndrome. *Am J Hum Genet* **79**, 402-8.
- Wu, W., Glinka, A., Delius, H. and Niehrs, C.** (2000). Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/beta-catenin signalling. *Curr Biol* **10**, 1611-4.
- Wu, X., Shi, W. and Cao, X.** (2007). Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* **1116**, 29-49.
- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P. and Deng, C.** (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753-65.
- Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P. and Jones, S.** (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* **126**, 1211-23.
- Yamamoto, H., Yoo, S. K., Nishita, M., Kikuchi, A. and Minami, Y.** (2007). Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2. *Genes Cells* **12**, 1215-23.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H. and Sasaki, H.** (2008). Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell* **15**, 23-36.
- Yang, W., Cao, L., Liu, W., Jiang, L., Sun, M., Zhang, D., Wang, S., Lo, W. H., Luo, Y. and Zhang, X.** (2008). Novel point mutations in GDF5 associated with two distinct limb malformations in Chinese: brachydactyly type C and proximal symphalangism. *J Hum Genet* **53**, 368-74.
- Yang, Y., Topol, L., Lee, H. and Wu, J.** (2003). Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **130**, 1003-15.
- Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y. et al.** (2004). Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* **18**, 952-63.
- Zhao, W. and Neufeld, D. A.** (1995). Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ. *J Exp Zool* **271**, 155-9.
- Zhao, X., Sun, M., Zhao, J., Leyva, J. A., Zhu, H., Yang, W., Zeng, X., Ao, Y., Liu, Q., Liu, G. et al.** (2007). Mutations in HOXD13 underlie syndactyly type V and a novel brachydactyly-syndactyly syndrome. *Am J Hum Genet* **80**, 361-71.
- Zhou, Y. X., Xu, X., Chen, L., Li, C., Brodie, S. G. and Deng, C. X.** (2000). A Pro250Arg substitution in mouse Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Hum Mol Genet* **9**, 2001-8.
- Zuniga, A., Haramis, A. P., McMahon, A. P. and Zeller, R.** (1999). Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. *Nature* **401**, 598-602.

9. Verzeichnisse

9.1. Abbildungsverzeichnis

Rückseite des Einbands: Mosaikbild einer Vorderextremität E13.5, *Wnt5a* whole-mount in situ Hybridisierung. Rekonstruktion aus Whole-mount- und Schnitt-ISH Einzelbildern (Freeware Foto-Mosaik V4.1.0 Steffen Schirmer).

Abbildung 1: Klassifizierung der isolierten Brachydaktylien sowie betroffene Gene.....	2
Abbildung 2: Primärachsen und Signalzentren der Extremitätenentwicklung.....	4
Abbildung 3: Übersicht über kanonischen und nicht-kanonische Wnt-Signalwege	9
Abbildung 4: Aufbau von Ror2.....	13
Abbildung 5: Mutationen in ROR2 verursachen rezessives Robinow Syndrom (RS) und dominante Brachydaktylie Typ B (BDB).....	14
Abbildung 6: Ror2 als Schnittstelle zwischen verschiedenen Kaskaden	16
Abbildung 7: Ror2-vermittelte Signalwege	18
Abbildung 8: Lokalisation von Ror2 in Ror2-LacZ-fus-Mäusen.....	55
Abbildung 9: Phänotyp der Ror2W749X-Maus	56
Abbildung 10: Neomorpher Effekt des Ror2W749X-Allels.....	57
Abbildung 11: Etablierung des Brachydaktylie-Phänotyps im Laufe der Fingerentwicklung .	59
Abbildung 12: Rudimentär angelegte Zellpopulation p2/3 als Ursache der BD	60
Abbildung 13: Verringerte Zellproliferation und Zellrekrutierung als Grund für rudimentäre Zellpopulation p2/3	62
Abbildung 14: Expression des Proliferationsmarkers CyclinD1	63
Abbildung 15: Mißregulation des <i>Ihh</i> -Signalweges in der Ror2W749X-Maus	65
Abbildung 16: Genetische Interaktion der Ror2- und <i>Ihh</i> -vermittelten Signaltransduktion	67
Abbildung 17: Genetische Interaktion der Ror2W749X-Maus mit der <i>Gdf5</i> -Brachypodism-Maus sowie dem <i>Noggin</i> -KO.....	69
Abbildung 18: Mißregulierte <i>Bmp</i> Signaltransduktion in der Ror2W749X-Maus	71
Abbildung 19: Gestörte Etablierung der Phalanx Forming Region (PFR) als Grund der BD in der Ror2W749X-Maus	73
Abbildung 20: Hochregulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der distalen Fingerspitze der Ror2W749X-Maus	75
Abbildung 21: Die Hochregulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der Ror2W749X-Maus korreliert mit der fehlerhaften Etablierung der PFR.....	76
Abbildung 22: Expression von <i>Wnt5a</i> und <i>Wnt5b</i> als potentielle Ror2-Liganden im Hinblick auf die Brachydaktylie	77
Abbildung 23 Ror2 interagiert über S/T/P-Domäne mit CK1-phosphoryliertem Dvl	83

Abbildung 24: Wnt5a induzierte Ror2/ps-Dvl-Interaktion an der Zellmembran	86
Abbildung 25: Ror2 inhibiert kanonischen Wnt-Signalweg <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	88
Abbildung 26: Interaktion Ror2/ps-Dvl reguliert Wnt5a/Ror2/AFT2-Signalweg	90
Abbildung 27: Ror2 interagiert mit Noggin über die CRD	93
Abbildung 28: Modell zur Fingerentwicklung	101
Abbildung 29: Gestörtes Signalnetzwerk an der Fingerspitze resultiert in der BD der Ror2W749X-Maus	103
Abbildung 30: Modellvorstellung zu funktionellen Auswirkungen der Interaktion Ror2/ps-Dvl an der Zellmembran	107
Abbildung 31: Ror2 als Schaltstelle zwischen Wnt- und Bmp-Signalwegen	110
Abbildung 32: „ <i>Molecular Disease Family</i> “ der Brachydaktylien.....	112

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Expression aller Maus-Wnt-Gene und der wichtigsten sezernierten Antagonisten aufgeschlüsselt nach Strukturen der Extremität	79
Tabelle 2: Zeitliche Übersicht der Expression aller Wnt-Gene und der wichtigsten sezernierten Antagonisten im Laufe der Extremitätenentwicklung E9.5 bis E15.5	80

9.3. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	mM	millimolar
AER	apikale ektodermale Randleiste	ms	Millisekunden
AK	Antikörper	µg	Mikrogramm
BBR	Boehrings Blocking Reagent	µl	Mikroliter
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat	µm	Mikrometer
BD	Brachydaktylie	ng	Nanogramm
bidest	zweifach destilliert	NGS	normal goat serum
BMPs	bone morphogenetic proteins	nm	Nanometer
bp	Basenpaare	OMIM	online mendelian inheritance in man
CoIP	Coimmunopräzipitation	OD	optische Dichte
d	Tag	p	post / nach der Geburt
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PCR	Polymerasekettenreaktion
DIG	Digoxigenin	PBS	Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dubledecco's Modified Eagle Medium	PFA	Paraformaldehyd

DMF	Dimethylformamid	PFR	Phalanx forming region
DMSO	Dimethylsulfoxid	pH	potentium hydrogenii
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTPS	Didesoxynukleosid-Triphosphate	POD	Peroxidase
E	Embryonalstadium	qRT	quantitative Real-Time
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rpm	Runden pro Minute
ECL	enhanced chemiluminescence	RNA	Ribonucleinsäure
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
FGFs	fibroblast growth factors	RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
g	Gramm	sec	Sekunden
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
HBSS	Hanks Buffered Saline Solution	SSC	Standart Saline Citrate
HE	Hämatoxilin/Eosin	TEA	Triethanolamin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	Tm	Schmelztemperatur
HISS	Hi Sheep Serum	Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung	TSS	Transformation and Storage Solution
kDA	Kilodalton	UC	Ultraclear
KO	Knock-Out	üN	über Nacht
KOH	Kaliumhydroxid	ÜNK	Übernachkultur
M	molar	UV	ultraviolett
MetOH	Methanol	V	Volt
MG	Molekulargewicht	Vac	Vakuum
min	Minuten	WM- ISH	whole mount <i>in situ</i> Hybridisierung
mind	mindestens	WT	Wildtyp
ml	Milliliter	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Inolyl-D-Galaktopyranosid
		ZPA	Zone polarisierender Aktivität

10. Anhang

10.1. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

10.2. Veröffentlichungen

- Stricker S, Verhey van Wijk N, **Witte F**, Brieske N, Seidel K, Mundlos S. *Dev Dyn*. 2006 Dec; 235(12):3456-65
- Raz R, Stricker S, Gazzo E, Clor JL, **Witte F**, Nistala H, Zabski S, Pereira RC, Stadmeier L, Wang X, Gowen L, Sleeman MW, Yancopoulos GD, Canalis E, Mundlos S, Valenzuela DM, Economides AN. *Development*. 2008 May;135(9):1713-23.
- Kuss P, Villavicencio-Lorini P, **Witte F**, Klose J, Seemann P, Hecht J and Mundlos S. *J Clin Invest*. 2009 Jan; 119(1):146-56 (Cover-Design)
- **Witte F**, Dokas J, Neuendorf F, Mundlos S, Stricker S. *Gene Expr Patterns*. 2009 Jan 13; im Druck
- Gao B, Hu J, Stricker S, Cheung M, Ma G, Law KF, **Witte F**, Brisco J, Mundlos S, He L, Chea KSE and Chan D. *Nature* 2009 Mar 1; im Druck
- **Witte F**, Schambony A, Masek J, Krejci P, Mundlos S, Bryja V and Stricker S. 2009; eingereicht

Projektplanung und Betreuung von Diplomarbeiten:

- Neuendorf F. 2007 Sep; HU Berlin
- Dokas J. 2008 Aug; Universität Potsdam
- Mahl A. 2009; FU Berlin

10.3. Kongressteilnahmen mit Poster und/oder Vortrag

- jährliche Evaluation Sonderforschungsbereich (SFB)
- jährliche PhD-Tagung der STA (Student Association Max-Planck Institut Berlin)
- 28th Annual Meeting, German Society for Cell Biology; 2005, Heidelberg
- 3rd International PhD Student Symposium, Horizons in Molecular Biology; 2006, Göttingen
- International Symposium on Wnt Signaling in Development and Disease; 2007, Berlin
- 10th International Conference on Limb Development and Regeneration; 2008, Madrid

10.4. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen, als die angegebenen, Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, daß ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Berlin, den 20.04.2009

Florian Witte