

4. Ergebnisse

Im folgenden sind zunächst der Versuchsansatz und die Ergebnisse der Differential Display PCR-Analyse (ddPCR) beschrieben (Kap. 4.1). Die bislang identifizierten bekannten und neuen Gene sind hier im Überblick dargestellt. Daran schließen sich erste Untersuchungen der ddPCR-Produkte C0-5, J6-3 und M2-4 an (Kap. 4.2). Das sFRP2-Gen und ein neues hairy-verwandtes Gen wurden genauer analysiert und diese Ergebnisse sind deshalb in den Kapiteln 4.3 und 4.4 ausführlicher beschrieben.

4.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene in der frühen Nierenentwicklung

4.1.1 ddPCR-Analyse von kultiviertem metanephrogenen Mesenchym

Zur Untersuchung der Genexpression während der Differenzierung des metanephrogenen Mesenchyms wurde das von Grobstein entwickelte Transfilterkultursystem verwendet (Grobstein, 1956). Mit diesem *in vitro* System war es möglich eine reine mesenchymale Zellpopulation - getrennt von Uretergewebe - zu kultivieren und zu analysieren. Als heterologer Induktor wurde dorsales Rückenmark verwendet. Nur dadurch war die effiziente Induktion einer großen Zellmenge möglich. Die Genexpression von induziertem und nicht-induziertem metanephrogenen Mesenchym wurde dann mit ddPCR verglichen (Abb. 3).

Die Nierenanlagen wurden zum Zeitpunkt E11 aus Mausembryonen isoliert. In diesem Stadium ist die Ureterknospe noch nicht verzweigt und das metanephrogene Mesenchym noch nicht induziert. Der Ureter wurde vom Mesenchym entfernt und dieses über einen Filter getrennt auf dorsalem Rückenmark ein bis drei Tage inkubiert. Unter diesen Bedingungen waren erste kondensierte Bereiche bereits nach 16 Stunden sichtbar. Nach 72 Stunden bestanden die Kulturen im wesentlichen aus Zellaggregaten der unterschiedlichsten Entwicklungsstadien, umgeben von Resten von nicht-kondensiertem Mesenchym. Induzierte Mesenchymkulturen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h für die RNA-Präparation verwendet. Nicht-induzierte Nierenmesenchyme konnten allerdings nicht parallel ohne Induktor kultiviert werden, sondern mußten frisch präpariert eingesetzt werden. Wie von Koseki *et al.* (1992) beschrieben und auch selbst beobachtet wurde, gehen mesenchymale Zellen ohne Kontakt zu Induktorgewebe nach wenigen Stunden in die Apoptose. Aus kultiviertem oder nicht-kultiviertem Mesenchymgewebe von einem Wurf konnten im Durchschnitt 2 bis 2,5 µg Gesamt-RNA isoliert werden.

Für die ddPCR-Analyse wurden Doppelansätze unabhängiger Präparationen von nicht-induziertem Mesenchym, sowie Dreifachansätze (24 h, 48 h, 72 h kultiviert) von induziertem Mesenchym eingesetzt. Da die ddPCR-Analyse für ihre hohe Fehlerrate bekannt ist, sollte durch den Vergleich dieser Mehrfachansätze die Isolierung von Kultur- oder PCR-Artefakten vermieden werden.

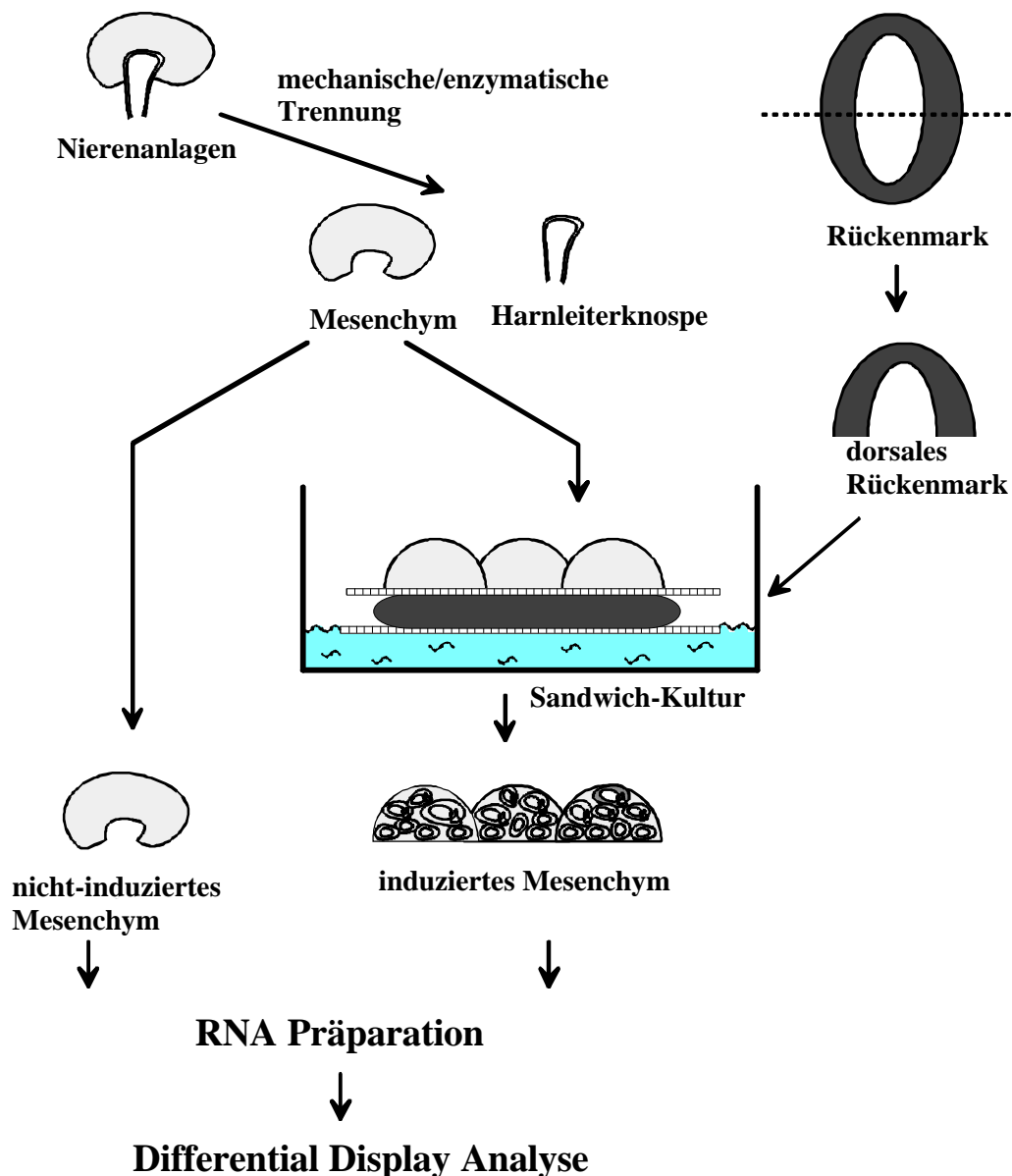


Abb. 3: Experimenteller Ansatz zur Identifizierung differenziell im metanephrogenen Mesenchym exprimierter Gene. Nierenanlagen wurden aus 11 Tage alten Mausembryonen präpariert und die unverzweigte Ureterknospe durch enzymatische und mechanische Behandlung entfernt. Die Mesenchyme wurden entweder direkt zur RNA-Präparation verwendet oder wie gezeigt auf dorsalem Rückenmark für 1, 2 oder 3 Tage kultiviert. Beide Gewebe sind in diesen „Sandwich-Kulturen“ durch Polykarbonatfilter getrennt.

Mit 220 der von Linskens *et al.* (1995) beschriebenen Primer-Kombinationen wurde ddPCR durchgeführt. Davon wurden 80 PCR-Reaktionen wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster zu überprüfen. Im Durchschnitt wurden 60 Banden/PCR-Produkte pro Spur beobachtet, die zwischen 50 und 600 bp lang waren. Einige Ausschnitte von ddPCR-Autoradiogrammen sind in den Abb. 4 und 6 zu sehen. Viele Unterschiede im Bandenmuster zwischen nicht-induziertem und induziertem Mesenchym waren allerdings nur quantitativ, was zum Teil auf Reste nicht-induzierten Mesenchyms in den Kulturen zurückzuführen sein könnte. Andererseits könnten verschiedene PCR-Fragmente gleicher Größe oder tatsächliche graduelle Unterschiede die Ursache sein. Insgesamt wurden 308 differenziell erscheinende PCR-Produkte isoliert, ein Drittel aus nicht-induziertem und zwei Drittel aus induziertem Nierenmesenchym. 145 dieser PCR-Produkte wurden

reamplifiziert und mit den 5'-Primern direkt sequenziert. Davon ergaben 26 keine lesbare Sequenz, was auf ein Gemisch von PCR-Fragmenten gleicher Größe zurückzuführen sein könnte. Darüber hinaus entstanden nachweislich einige ddPCR-Fragmente durch Amplifikation mit nur einem Primer, also entweder ausschließlich arbitrary-Primer oder oligo-dT-Primer. Letztere Produkte sind ebenfalls nicht auf die beschriebene Weise (mit dem 5'-arbitrary-Primer) sequenzierbar. 119 Sequenzen wurden unter Benutzung des BLAST-Programms (GCG program package) mit Sequenzen der GenBank- und EMBL-Datenbanken verglichen. Es wurden 27 Übereinstimmungen mit bekannten Genen und 22 mit „Expressed Sequence Tags“ (ESTs) gefunden. 35 PCR-Produkte zeigten keine signifikante Homologie zu Datenbank-Sequenzen und weitere 35 Sequenzen wurden mehr als einmal identifiziert, was eine 29%ige Redundanz ergibt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammenfassung der ddPCR-Ergebnisse

	Anzahl	Prozent
Isolierte ddPCR-Fragmente	308	
Reamplifiziert und sequenziert	145	
Lesbare Sequenz	119	82%
Ähnlichkeit mit bekannten Genen	27	23%
Ähnlichkeit mit ESTs	22	18%
Keine Ähnlichkeit	35	29%
Mehrfach isoliert	35	29%

4.1.2 Identifizierung bekannter Gene

Wie bereits erwähnt, wurden Sequenzen von 27 bekannten Genen identifiziert. Darunter befanden sich auch das Integrin- α_6 -Gen und das Gen für die Untereinheit A der Laktatdehydrogenase (LDH-A). Von beiden war bereits bekannt, daß ihre Expression während der Nierenentwicklung reguliert wird, was ein Indiz für die Tauglichkeit der Methode und der gewählten Bedingungen ist. Das Integrin- α_6 -Protein ist erst nach der Induktion im kondensierenden Mesenchym und in Komma-förmigen Nephronvorläufern nachweisbar (Sorokin *et al.*, 1990). Dagegen dominiert im nicht-induzierten metanephrogenen Mesenchym die LDH-A Isoform, die nach der Induktion von der LDH-B Isoform verdrängt wird (Koskimies and Saxen, 1966). Das spricht dafür, daß mit dem beschriebenen Versuchsansatz sowohl induzierte, als auch reprimierte Gene isoliert werden können.

Des weiteren wurden Gene identifiziert, deren Expression in der späteren embryonalen Niere bereits beschrieben war, wie z.B. das Gen der ufo-Tyrosinkinase oder des Prion-Proteins (Faust *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1992). Andere, wie z.B. sFRP2 oder Sam68, waren vorher nicht in diesem Zusammenhang untersucht worden. Die transkriptionelle Regulation einiger dieser Gene durch Induktion des metanephrogenen Mesenchyms wurde mit Northern Blot Analysen überprüft (Abb. 4B, Tabelle 3).

Dazu wurde ebenfalls Gesamt-RNA von nicht-induziertem und induziertem Mesenchym verwendet. Da die verfügbare Menge an RNA aus Organkulturen begrenzt war, wurden nur zwischen 0,5 und 1 μ g RNA je Spur eingesetzt. Es konnten also nur stark exprimierte Transkripte detektiert werden. Die

Hybridisierungsproben für die entsprechenden Gene wurden ausgehend von I.M.A.G.E.-cDNA-Klonen hergestellt (IDs siehe Tabelle 3). Die ursprünglich identifizierten ddPCR Produkte sind nur kurze 3'-DNA-Fragmente, und außerdem zum Teil Mischpopulationen verschiedener PCR-Produkte gleicher Größe. I.M.A.G.E.-Klone enthalten dagegen nur eine cDNA, die bereits kloniert und meist länger ist als die ddPCR-Produkte.

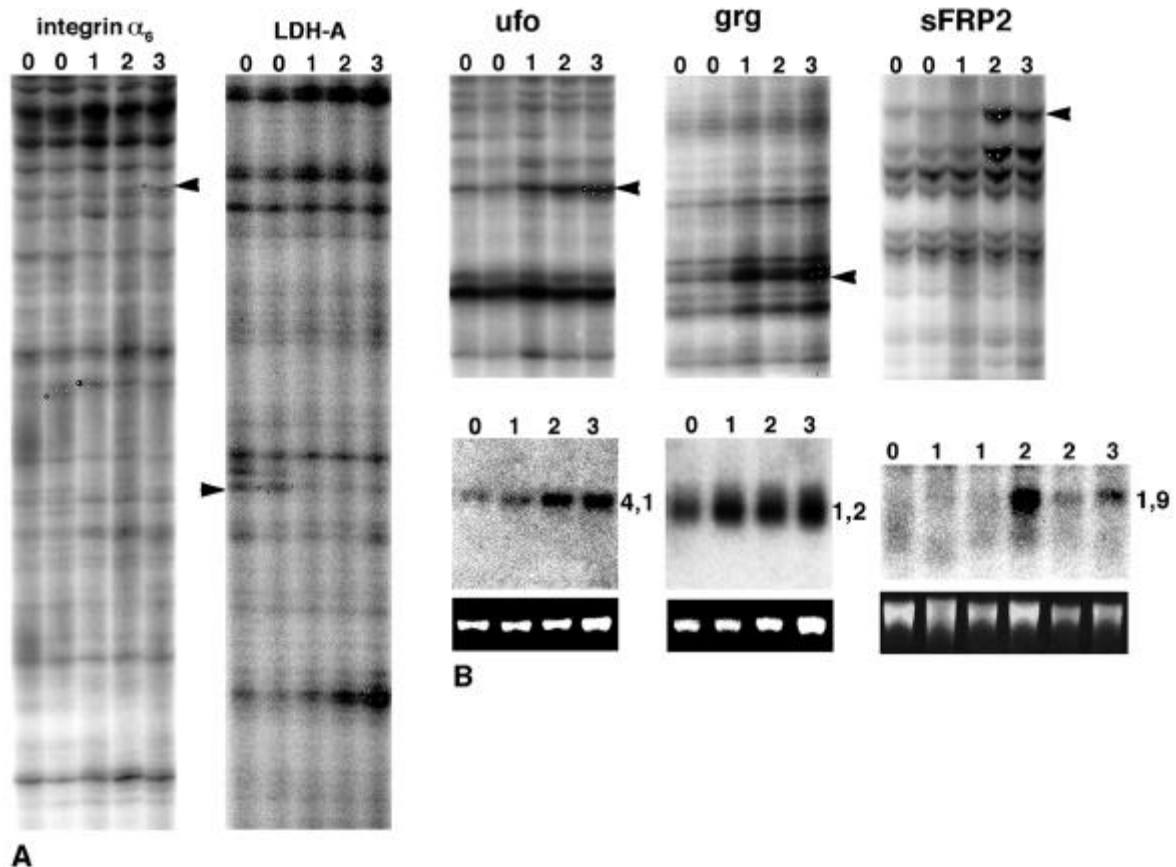


Abb. 4: Identifizierung bekannter Gene mit ddPCR. (A) ddPCR-Analyse von induziertem *versus* nicht-induziertem metanephrogenen Mesenchym führte zur Identifizierung von Integrin- α_6 und LDH-A (Pfeilspitzen), deren Regulation während der frühen Nierenentwicklung bereits bekannt war. Gezeigt sind Ausschnitte aus ddPCR-Autoradiogrammen, wobei die beiden ersten Spuren nicht-induziertes Mesenchym (0), die drei folgenden Spuren induziertes und für 1 bis 3 Tage kultiviertes Mesenchym (1, 2, 3) enthalten. (B) ddPCR-Ergebnisse (obere Reihe) und Northern Blot Analysen (untere Reihe) der ufo-, grg- und sFRP2-Gene. Unterhalb der Northern Blot Autoradiogramme ist zum Vergleich der aufgetragenen RNA-Menge die Ethidiumbromid-Färbung der 28S-rRNA der entsprechenden Gele gezeigt. Die PCR-Fragmente aller drei Gene wurden aus induziertem Nierenmesenchym (1, 2, 3) isoliert.

So wurde die ufo-Kinase im ddPCR-Experiment als nach der Induktion stärker exprimiertes Gen identifiziert, was durch Northern Blot Analyse bestätigt wurde. Aus der Literatur war bereits bekannt, daß die ufo-Kinase in Strukturen mesenchymalen Ursprungs und später in den Glomeruli adulter Nieren exprimiert ist. Das groucho related gene (grg) ist schon im nicht-induzierten Mesenchym nachweisbar, wird aber nach Induktion deutlich stärker transkribiert. Das sFRP2-Gen ist dagegen erst nach 2 Tagen *in vitro* Transfilter-Kultur im metanephrogenen Mesenchym detektierbar. Dieses Gen war durch seine Verbindung zum Wnt-Signaltransduktionsweg besonders interessant und wurde daher genauer untersucht (Kap. 4.3).

Tabelle 3: Expression bekannter Gene im metanephrogenen Mesenchym

Gen	I.M.A.G.E. IDs	ddPCR*	Expressionsanalyse [§]
Integrin- α_6		+	↑ (Sorokin <i>et al.</i> , 1990)
LDH-A		-	↓ (Koskimies and Saxen, 1966)
sFRP2, SDF5	536398	+	↑ (Leimeister <i>et al.</i> , 1998)
ufo	401608	+	↑
AES-1, groucho related gene (<i>grg</i>)	670040	+	↑
Casein Kinase I δ (human)	349683	-	→
valosin-containing protein (VCP)	374517	-	→
Chaperonin enthaltendes TCP zeta	421880	-	→
p62 ras-GAP assoziiertes Gen (Sam68)	656826	+	→
RNPS, RNA/DNA bindendes Protein	402689	+	→
Thymosin- β 10	661575	+	→ (Rosenblum and Yager, 1997)
Prion Protein	335371	+	Δ (Manson <i>et al.</i> , 1992)
MEMD Protein (human)	931427	+	Δ
IQGAP1, ras GTPase-activating-like protein	367281	+	Δ
protein regulating cytogenesis 1 (PRC1, human)		-	Nicht untersucht
Topoisomerase I		+	Nicht untersucht
NASP, Histone bindendes Protein		+	Nicht untersucht
α Enolase		-	Nicht untersucht
Glutathion Peroxidase (mGSHPx)		-	Nicht untersucht
Sha1-related K ⁺ channel, Kv4.3 (rat)		-	Nicht untersucht

* von ddPCR-Gelen aus induziertem (+) oder nicht-induziertem (-) Mesenchym isoliert

[§] Referenzen von Studien, die die Expression der Gene in der embryonale Niere beschreiben

↑ induziert; → konstante Expression; ↓ reprimiert; Δ nicht detektierbar

Die ddPCR-Ergebnisse für die Gene der Casein Kinase I δ , des valosin-containing protein (VCP) und der chaperonin-containing TCP zeta Untereinheit, die aus dem nicht-induzierten Mesenchym isoliert worden waren, konnten nicht verifiziert werden. Ebenso wurden die Sam68- und RNPS-Gene, die als potentiell induzierte Gene isoliert worden waren, im Northern Blot als konstant exprimiert nachgewiesen. Das Thymosin- β 10-Gen ist ebenfalls in gleichen Mengen in nicht-induziertem und induziertem Mesenchym exprimiert, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rosenblum und Yager (1997) steht. Diese Autoren isolierten Thymosin- β 10 durch mRNA ddPCR-Analyse aus E13-Nierenanlagen und beschrieben es als erst nach Induktion exprimiert. Das Prion Protein-Gen, das MEMD-Gen und das IQGAP1-Gen konnten mit Northern Blot Analyse nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist von ersterem bekannt, daß es in der embryonalen Niere exprimiert ist, was insbesondere wegen seiner Induzierbarkeit durch NGF (nerve growth factor), einem ebenfalls in der sich entwickelnden Niere exprimierten Faktor, interessant ist (Manson *et al.*, 1992).

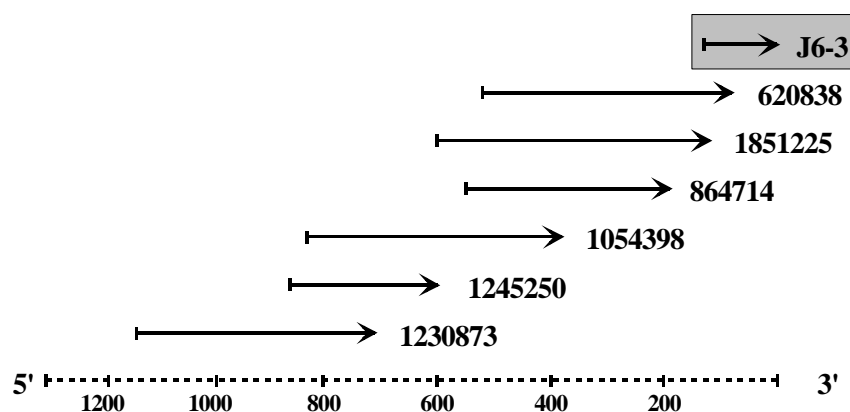
Insgesamt konnte die Expression von fünf der elf auswertbaren ddPCR-Kandidatengene durch Northern Blot Hybridisierung bestätigt werden.

In Tabelle 3 sind Literaturdaten und eigene Untersuchungen zur Expression der mit ddPCR identifizierten bekannten Gene im Nierenmesenchym zusammengefaßt. Außer den hier aufgeführten Genen wurden Sequenz-Homologien zu mitochondrialen oder repetitiven DNA-Sequenzen gefunden, die jedoch nicht weiter untersucht wurden.

4.1.3 Identifizierung neuer Gene

Mit dem beschriebenen Versuchsansatz sollten insbesondere neue Gene identifiziert und charakterisiert werden, die während der Entwicklung des metanephrogenen Mesenchyms exprimiert werden. Dazu wurden zunächst ddPCR-Produkte untersucht, die Ähnlichkeit zu EST-Sequenzen zeigten. Die entsprechenden I.M.A.G.E.-Klone wurden vom Ressourcen-Zentrum in Berlin zur Verfügung gestellt und sie enthalten cDNA-Fragmente, die meist länger sind als die ursprünglich isolierten ddPCR-Fragmente. In einigen Fällen konnten durch wiederholte BLAST Datenbank-Suche mit den EST-Sequenzen cDNA-Klone gefunden werden, die noch weitere 5'-Sequenzen enthielten (Abb. 5). Bei den zur weiteren Analyse verwendeten Klone wurde durch Sequenzierung überprüft, ob sie die richtigen cDNA-Sequenzen enthalten.

Abb. 5: Beispiel J6-3. Die Sequenz des ddPCR-Produkts J6-3 wurde mit der EST-Datenbank verglichen und hatte Ähnlichkeit mit dem Klon 620838. Über erneute Suche mit diesem Klon konnten weiter 5'-liegende Sequenzen/Klone identifiziert werden. Pfeile stellen die Sequenzen des ddPCR-Produkts bzw. der EST-Klone dar. Die Zahlen rechts daneben geben die Klonnummern an.



Die I.M.A.G.E.-cDNA-Klone

sind meist länger als gezeigt. Die Datenbank enthält jedoch nur die Sequenz einer einzigen Sequenzreaktion von der 5'-Seite.

Acht Sequenzen mit Ähnlichkeit zu ESTs wurden durch Northern Blot Hybridisierung untersucht. Davon waren drei auf den verwendeten Filtern nicht nachweisbar. Während die Induktion der den ddPCR-Fragmenten C0-5, J6-1 und J6-3 entsprechenden Gene eindeutig bestätigt werden konnte, sind die Ergebnisse für die Fragmente F6-3 und B1-4 weniger deutlich. F6-3 zeigt ein stärkeres Signal im nicht induzierten Nierenmesenchym, was unter Berücksichtigung von ungleicher Beladung der Northern Blots mit RNA bestätigt werden konnte. B1-4 war nur im induzierten Mesenchym nachweisbar, wobei unklar bleibt, ob es tatsächlich nach einem Tag in Organkultur am stärksten exprimiert ist.

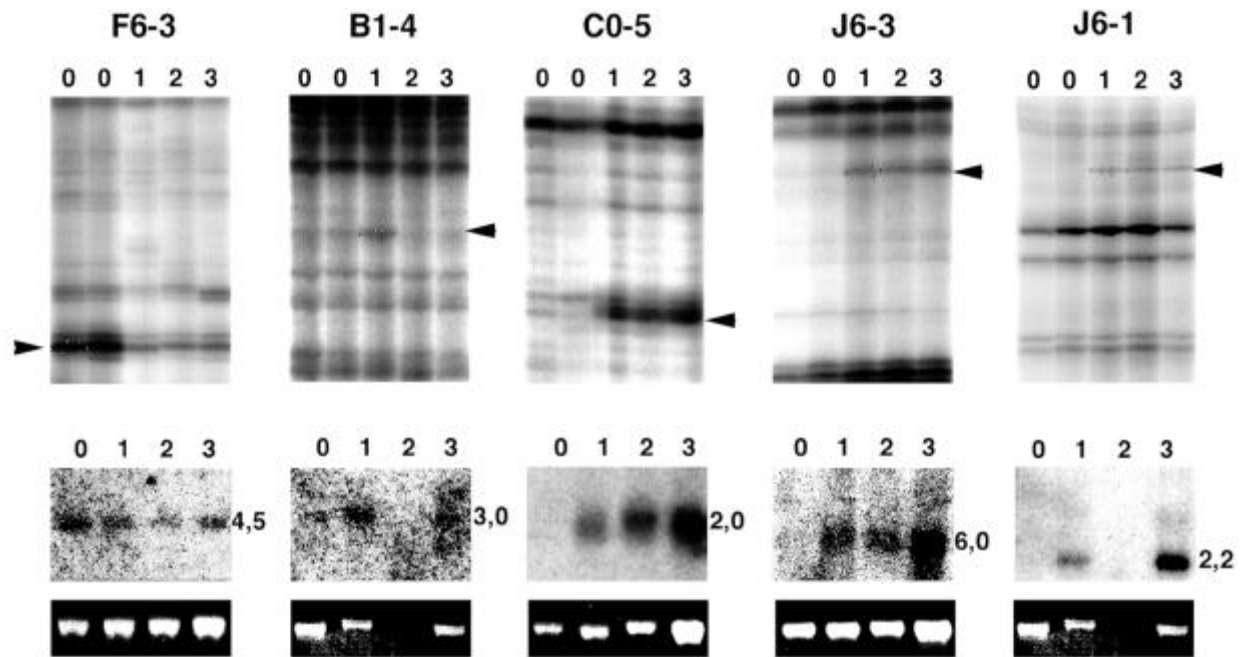


Abb. 6: ddPCR-Ergebnisse und Northern Blot Analysen neuer Gene. Für jedes dieser Gene sind die Ausschnitte der ddPCR-Autoradiogramme (obere Reihe), der Northern Blot Analyse (mittlere Reihe) und der entsprechenden Ethidiumbromid-Färbung der 28S-rRNA (untere Reihe) gezeigt. Die F6-3-mRNA ist im induzierten Nierenmesenchym reprimiert, wenn man berücksichtigt, daß weniger der nicht-induzierten RNA (0) aufgetragen wurde. Das B1-4-Transkript ist erst nach 1 Tag *in vitro* Entwicklung exprimiert. Ob es allerdings nach 3 Tagen in Kultur wieder reprimiert wird, ist aufgrund des schwachen Signals und des Hintergrunds in Spur 4 nicht eindeutig festzustellen. Die den ddPCR-Produkten C0-5, J6-1 und J6-3 entsprechenden Gene sind eindeutig induziert.

Wie erwartet waren nicht alle Transkripte mit Northern Blot Analyse nachweisbar. Eine potentielle Beteiligung dieser Gene bei der Nierenentwicklung sollte daher durch *in situ* Hybridisierung von Nieren-Paraffinschnitten geprüft werden, was im Fall des M2-4 Gens erfolgreich war (siehe Kap. 4.2.3). Auch einige der anderen hier aufgeführten Gene wurden mit *in situ* Hybridisierung, cDNA-Bank-Screening, Sequenzierung usw. weiter untersucht. Diese Analysen sind unterschiedlich weit fortgeschritten und in den angegebenen Kapiteln zu finden.

Tabelle 4: Zusammenfassung der bisher untersuchten ddPCR-Fragmente mit Ähnlichkeit zu EST-Sequenzen

ddPCR-Fragment	I.M.A.G.E. IDs	Northern blot	Transkriptgröße (ca.)	Weitere Analyse
B1-4	597392	induziert	3 kb	-
C0-5	402778	induziert	2 kb	Kap. 4.2.1
F6-3	539052	reprimiert	4,5 kb	-
J6-1	478014	induziert	2,2 kb	Kap 4.4
J6-3	1054398	induziert	6 kb	Kap 4.2.2
K8-3	368899	kein Signal	-	-
M10-3	791217	kein Signal	-	-
M2-4	777837	kein Signal	2 kb, 3,5 kb	Kap. 4.2.3

4.2 Untersuchungen zu den ddPCR-Produkten C0-5, J6-3 und M2-4

4.2.1 C0-5: Identifizierung eines neuen kollagenartigen Gens

Nachdem das Transkript des dem C0-5 ddPCR-Fragments entsprechenden Gens (im weiteren als C-Gen bezeichnet) durch Northern Blot Analyse als eindeutig induziert bestätigt werden konnte (Abb. 6), sollte die Struktur und die Expression dieses Gens untersucht werden.

4.2.1.1 Screening einer cDNA-Bank und Sequenzanalysen

In der Northern Blot Hybridisierung mesenchymaler Nieren-RNA wurde die Größe des C-Transkripts mit ca. 2 kb bestimmt. Zunächst wurde die embryonale Maus-E11-cDNA-Bank (Novagen) mit dem 400 bp langen, radioaktiv markierten Insert des I.M.A.G.E.-Klons 402778 gescreent. Es wurden zwei Klone identifiziert, die cDNA-Fragmente von 1,9 kb und 1,4 kb enthielten (Abb. 7). Die Nukleotidsequenz beider cDNAs wurden mit dem automatischen Sequenzer analysiert und verglichen. Dadurch wurde ersichtlich, daß sie in einem kurzen Abschnitt von 113 bp bzw. 90 bp nicht übereinstimmen, was auf verschiedene Splicevarianten schließen läßt. Eine erneute Datenbank-Suche mit den Sequenzen der beiden cDNA-Klone ergab keine Ähnlichkeit mit bekannten Genen. Geringe Übereinstimmungen mit verschiedenen Kollagen-Genen deuteten darauf hin, daß es sich um ein Kollagen-ähnliches Gen handelt.

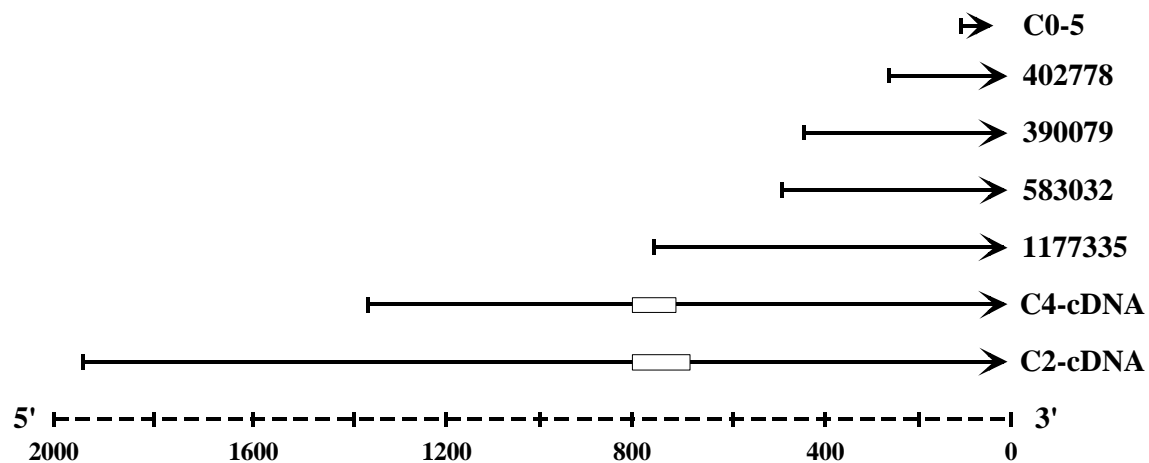


Abb. 7: Sequenzanalyse des C-Gens. Lage der Sequenzen des ddPCR-Produkts (C0-5), der verfügbaren EST-Sequenzen (IDs 402778 usw.) und der beiden cDNA-Klone C2 und C4. Die Pfeile kennzeichnen die Länge der analysierten Sequenzen. Die C2- und C4-cDNA-Klone unterscheiden sich in einem Exon (durch Kästchen dargestellt).

4.2.1.2 Computeranalyse des C-Gens und -Proteins

Ein Vergleich der Sequenzen der C2- und C4-Klone mit der HTGS-Datenbank zeigte, daß bereits humane (AL031186) und murine (AC005528) PAC-Sequenzen verfügbar sind. Die HTGS-Datenbank (Sektion von EMBL) enthält sogenannte „High Throughput Genome Sequences“, die von verschiedenen Genom-Sequenzierungsprojekten stammen. Diese Sequenzen sind nicht endgültig und können sich noch im Lauf der weiteren Sequenzierungsarbeiten verändern. Mit Hilfe des FASTA Programms (GCG program package) wurde ausgehend von der cDNA-Sequenz der Klone C2 und C4, sowie der genomischen Sequenz des PAC-Klons 493n6 (AC005528) die Exon-Intron-Struktur des murinen C-Gens bestimmt. Es zeigte sich, daß das alternative Exon des C2-Klons auf der genomischen PAC-Sequenz im Vergleich zum folgenden Exon auf dem Gegenstrang liegt. Da ein entsprechendes Exon in der humanen Sequenz nicht gefunden werden konnte, bleibt unklar, ob es sich hier tatsächlich um eine Splicevariante handelt (Abb. 8).

Ausgehend von der errechneten Aminosäuresequenz des C4-Klons wurden mit dem FRAMESEARCH Programm für das putative humane Gen cDNA-Sequenz, Aminosäuresequenz und genomische Struktur bestimmt (Abb. 8). Während im Fall des humanen Gens ein putatives Startcodon (ATG) vorhanden war, fehlte dieses an der entsprechenden Position im Mausgen. Deshalb wurden die genomischen Sequenzen mit dem NIX-Programm (Nucleotide Identify X, UK HGMP Resource Centre) auf potentielle weiter 5'-liegende Exons untersucht. Es konnte ein weiteres Exon identifiziert werden. Während dieses im Fall der humanen Sequenz wiederum ein mögliches Startcodon enthält, fehlt in der Maussequenz ein entsprechendes ATG. Somit bleibt die korrekte 5'-Sequenz des C-Gens und potentielle Splicevarianten vorerst unklar. Die in Abb. 8 gezeigte Exon-Intron-Struktur des C-Gens erstreckt sich über einen Bereich von ca. 30 kb.

Ein Vergleich der humanen Sequenz des C-Gens mit den GenBank-EMBL-Datenbanken ergab Sequenzübereinstimmung mit einem Cosmid-Contig aus der Region q12 des Chromosoms 22 (Y07847, Y07848). Danach liegt das humane C-Gen nur etwa 9 kb stromaufwärts des EWS-Gens (Ewing Sarcoma), das in einer Reihe von menschlichen Tumoren durch Chromosomen-Translokation verändert ist.

Mit dem TRANSLATE Programm wurden die Nukleotidsequenzen des humanen und murinen in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit dem BESTFIT Programm verglichen. Beide Proteine besitzen unterschiedlich lange Wiederholungen der Sequenz G-X-Y, sogenannte Kollagen-Repeats. Darüber hinaus besitzen sie einen nahezu identischen C-terminalen Bereich. Programme zur Vorhersage von bekannten Protein-Motiven gaben keine Hinweise auf die Natur des Carboxyterminus oder des Aminoterminus.

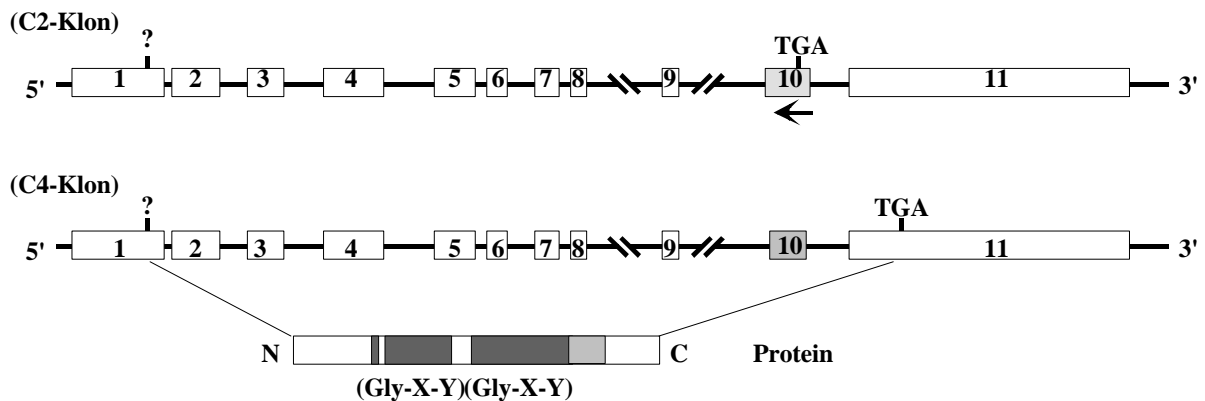
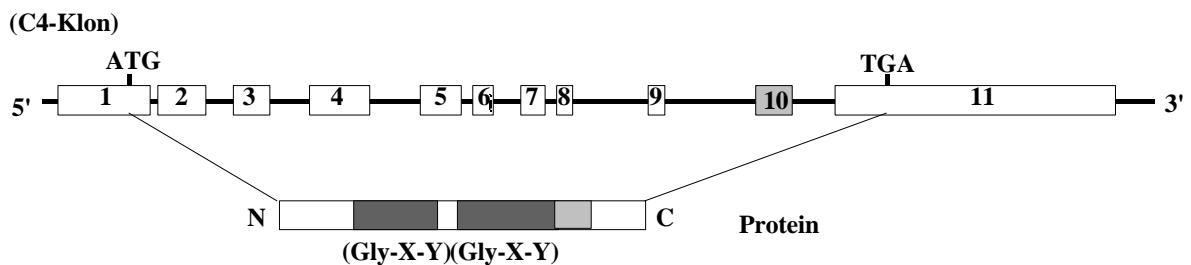
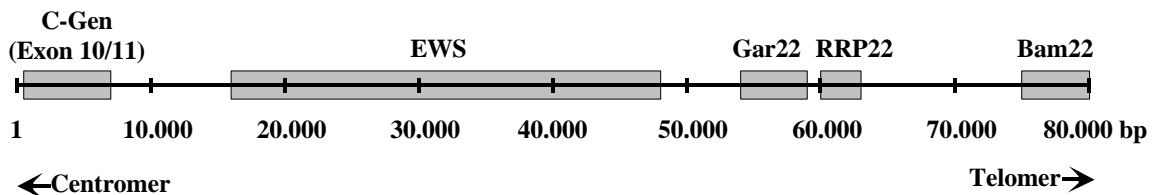
Maus PAC-Klon 493n6 (AC005528)**Mensch PAC-Klon hs984g1 (AL031186)****Cosmid-Contig der Region 22q12 (Y07847, Y07848)**

Abb. 8: Genomische Organisation und Lokalisation des C-Gens. Die Exon-Intron-Struktur des Maus-Gens wurde ausgehend von den Sequenzen der beiden cDNA-Klone C2 und C4 im Vergleich zu den Sequenzen des PAC-Klons 493n6 rekonstruiert. Da sich die beiden Klone nur in Exon 10 unterscheiden, ist nur die Exon-Intron-Struktur des humanen C-Gens ausgehend vom C4-Klon gezeigt. Aus den Nukleotidsequenzen wurde die Aminosäuresequenz und Proteinstruktur ermittelt. (Gly-X-Y) bezeichnet Kollagen-Repeats. Die von Exon 10 codierte Aminosäuresequenz ist stark konserviert zwischen Mensch und Maus (hellgraue Box). Das untere Schema stellt die Region 22q12 des menschlichen Genoms dar, in welcher auch das C-Gen lokalisiert ist. Die einzelnen Gene in dieser Region sind mit grauen Boxen gekennzeichnet, wobei die Exon-Intron-Strukturen hier nicht im einzelnen aufgeschlüsselt sind.

4.2.1.3 Expressionsanalyse des C-Gens

Die Gewebeverteilung des C-Gens während der murinen Embryonalentwicklung wurde mit *in situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen und Paraffinschnitten untersucht. Zur Herstellung von radioaktiv oder Digoxigenin-markierten Hybridisierungssonden für Northern Blots, sowie für ganze Mausembryonen und Paraffinschnitte, wurde der C4-Klon eingesetzt.

Mit *in situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen sind C-Transkripte bereits in den frühen Embryonalstadien E7,5 bis E9,5 in extraembryonalen Geweben sowie im Neuralrohr und Gehirnbälchen nachweisbar (nicht gezeigt). Zum Zeitpunkt E10,5 ist ein besonders starkes Signal im dorsalen Rückenmark, allen Gehirnabschnitten und dem Ohrbläschen zu beobachten (Abb. 9A). Darüber hinaus ist das C-Gen in den Epithelien des Nasenwulstes und der zweiten und dritten Kiemenspalte exprimiert. Das C-Gen ist bereits in den mesonephrischen Tubuli der Urniere zum Zeitpunkt E10,5 zu finden (Abb. 9A,B). In späteren Stadien sind der mesonephrische Gang (Wolffscher Gang) und der neu entstandene paramesonephrische Gang (Müllerscher Gang) gefärbt (Abb. 9E). Während der Entwicklung der Nachniere ist das C-Gen zunächst in dem sich verzweigenden Ureter der frühen Nierenanlagen (E11,5) exprimiert (Abb. 9C,D). Im Stadium E14,5 dagegen sind die vom Mesenchym abstammenden Komma- und S-förmigen Nephronvorläufer stark gefärbt, aber nicht die Zellen des sich verzweigenden Ureters (Abb. 9F). Bereits zum Zeitpunkt E15,5 und noch deutlicher E17,5 ist das C-Gen sowohl in den Nephronvorläufern als auch den Sammelrohren exprimiert (Abb. 9G). C-Transkripte sind nicht in den kondensierenden mesenchymalen Zellen des Metanephros zu finden, sondern erst nach deren Epithelialisierung. Darüber hinaus ist das C-Gen auch in epithelialen Strukturen verschiedener anderer Gewebe zu finden, wie zum Beispiel dem sich verzweigenden Epithel der Submandibulardrüse (Speicheldrüse), dem Epithel von Cochlea und Semizirkularkanal (Bogengänge) des Innenohrs und der Schilddrüse (Abb. 9H-J).

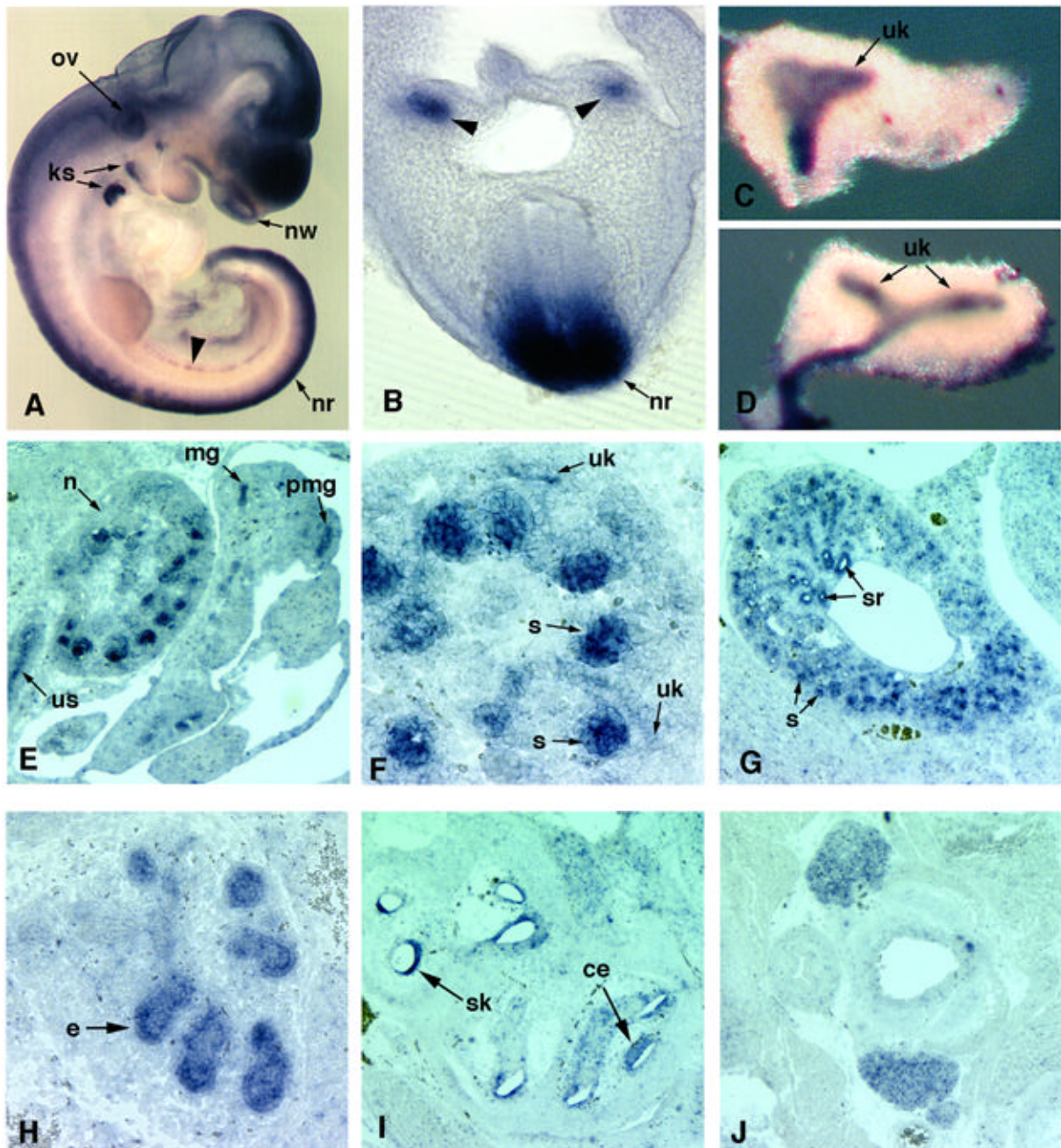
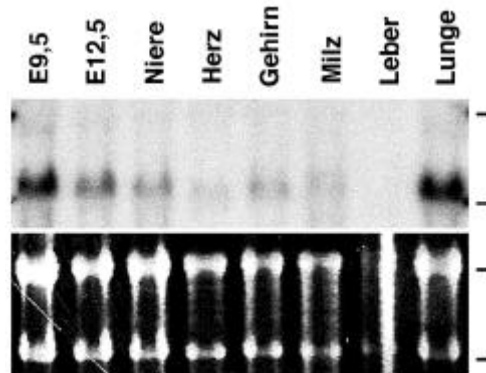


Abb. 9: (A-G) Expression des C-Gens während der Urogenitalentwicklung. (A) Im 10,5 Tage alten Embryo ist das C-Gen im dorsalen Neuralrohr (nr), in den Gehirnbläschen, im Ohrvesikel (ov), in den Epithelien der Kiemenspalten (ks) sowie der Nasenwülste (nw) und den mesonephrischen Tubuli (Pfeilspitze) exprimiert. (B) Vibratomschnitt (transvers) des E10,5-Embryos. (C, D) Während der Entwicklung des Metanephros ist das C-Gen zunächst im Ureter und der sich verzweigenden Ureterknospe (uk) von E11,5-Nierenanlagen exprimiert. (E, F) Im Stadium E14,5 ist die Färbung in den S-förmigen Nephronvorläufern und dem Ureterstamm (us), aber nicht in der sich verzweigenden Ureterknospe (uk) zu finden. Darüber hinaus sind Transkripte im mesonephrischen und paramesonephrischen Gang (mg, pmg) zu sehen (E). (G) Einen Tag später (E15,5) ist das C-Gen sowohl in den S-förmigen Nephronvorläufern (s) als auch dem vom Ureter abstammenden Sammelrohrsystem (sr) exprimiert. (H-J) Expression des C-Gens in anderen Geweben. (H) E14,5 sagittal: sich verzweigendes Epithel (e) der Speicheldrüse; (I) E15,5 sagittal: Epithel von Cochlea (ce) und Semizirkularkanal (sk); (J) E17,5 transvers: Schilddrüse.

Northern Blot Analyse von RNA adulter Organe und ganzer Embryonen der Stadien E9,5 und E12,5 zeigte, daß das C-Gen in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme der Leber exprimiert ist (Abb. 10). Eine besonders starke Expression wurde in der adulten Lunge und den 9,5 Tage alten Embryonen beobachtet.

Abb. 10: Northern Blot Analyse des C-Gens in ganzen Mausembryonen (Stadien E9,5 und E12,5) und adulten Organen. 10 µg Gesamt-RNA wurden mit der cDNA des C4-Klons hybridisiert (Bild oben). Zum Vergleich der aufgetragenen RNA-Mengen ist die Ethidiumbromid-Färbung der 18S- und 28S-rRNA gezeigt (Bild unten). Die Markierungen rechts geben die Lage der 18S- und 28S-rRNA an. Das C-Gen ist also besonders stark in E9,5-Embryonen und der adulten Lunge exprimiert.



4.2.2 J6-3: Identifizierung eines Gens, das in Stromazellen exprimiert ist

Wie bereits in Abb. 6 zu sehen, ist auch das dem J6-3 Fragment entsprechende Gen nur in induziertem Nierenmesenchym exprimiert. Bislang ist von der etwa 6 kb großen cDNA nur eine 1,1 kb lange Sequenz, die aus verschiedenen, zum Teil überlappenden I.M.A.G.E.-Klone ermittelt wurde, bekannt (siehe Abb. 5). Sie besitzt keine Ähnlichkeit zu Sequenzen in den Gen-Datenbanken.

4.2.2.1 Expression des J-Gens

Das Verteilungsmuster des J-Gens während der Embryogenese wurde mit *in situ* Hybridisierung von ganzen Mausembryonen und Paraffinschnitten untersucht. Zur Herstellung der RNA-Sonde wurde die ca. 800 bp lange cDNA des I.M.A.G.E.-Klons 1054398 verwendet.

Interessanterweise ist das J-Gen in den Stromazellen des Metanephros exprimiert, die ebenfalls aus dem metanephrogenen Mesenchym hervorgehen (Abb. 11A,B). Eine ähnliche Expression in interstitiellen Zellen ist auch in der Speicheldrüse und dem Innenohr zu sehen (Abb. 11C,D). Darüber hinaus sind J-Transkripte vor allem in der Nachbarschaft des sich entwickelnden Nervensystem zu finden. Sie markieren die Trennung der Hemisphären der beiden ersten Ventrikel (Abb. 9H) und sie umgeben sowohl einige Teile des Hinterhirns als auch das Rückenmark (Abb. 11D,G).

Die Färbungen an ganzen Embryonen der Stadien E10,5 bis E13,5 zeigen ebenfalls eine spezifische Expression des J-Gens (Abb. 11E-H). Die segmentartigen Signale und die starke Färbung entlang der Körperachse ließen sich im Vibratomschnitt keiner bestimmten Struktur zuordnen und markieren vermutlich Neuralleistenzellen, die zum einen dorsolateral entlang der Somiten wandern und zum anderen sich ventral angesiedelt haben. Besonders auffällig ist die Färbung in den Extremitätenknospen, die mit der Unterteilung der Fuß- bzw. Handflächen in einzelne Finger/Zehen einhergeht.

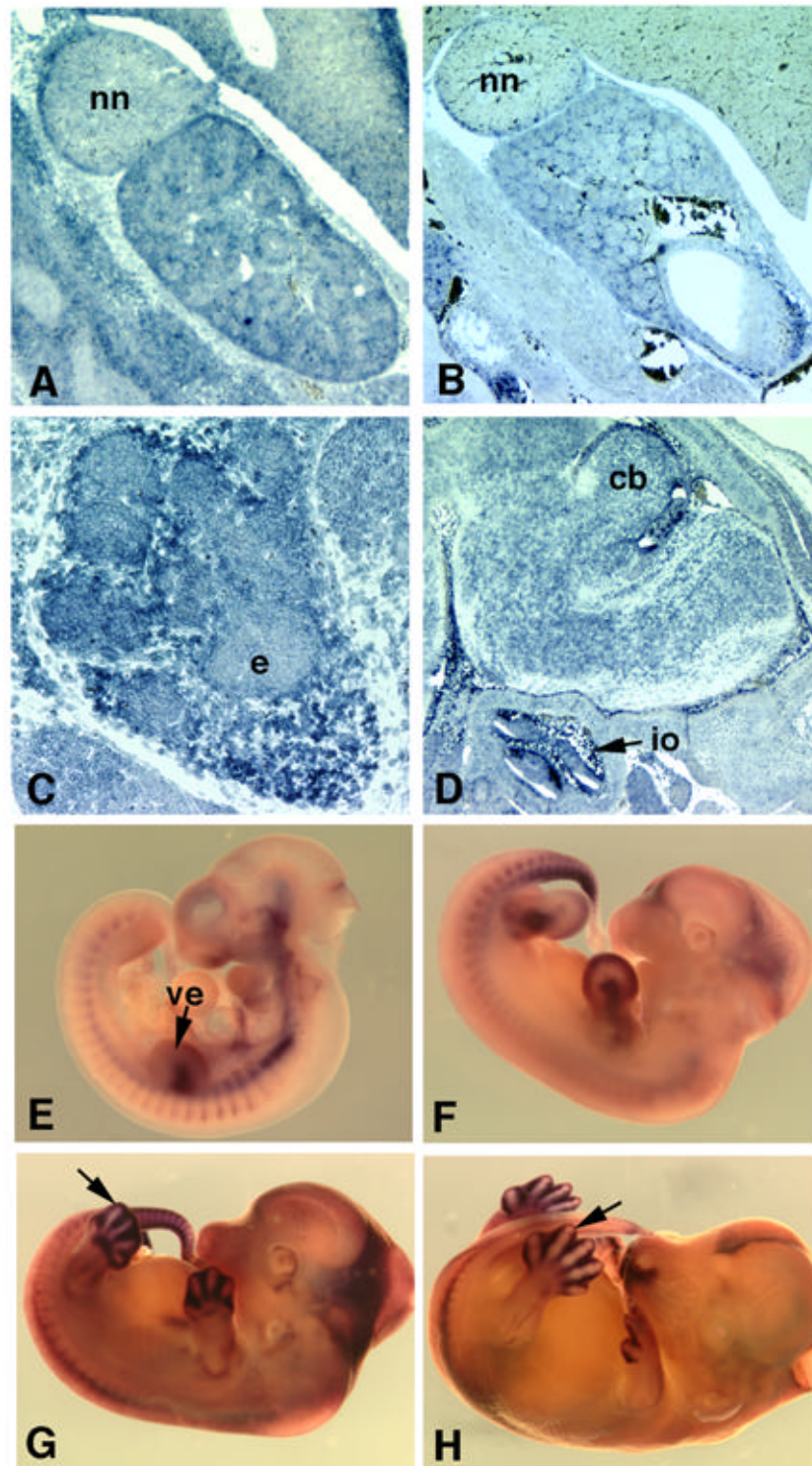


Abb. 11: Expressionsanalyse des J-Gens in Paraffinschnitten und ganzen Mausembryonen. **(A,B)** Expression des J-Gens in den Stromazellen der Niere und dem Cortex der Nebenniere (nn) in den Stadien E14,5 (A) und E16,5 (B). **(C,D)** Auch in der Speicheldrüse am Tag E14,5 und dem Innenohr (io) Tag E15,5 ist J in den interstitiellen Zellen exprimiert (e, Epithel). **(D)** E15,5; Ausschnitt, der das Hinterhirn und das Cerebellum (cb) zeigt: J-Transkripte umgeben das gesamte Gehirn und das Neuralrohr. **(E)** E10,5: Die J-Färbung markiert wahrscheinlich wandernde Neuralleistenzellen (ve, Vorderextremität). **(F-H)** E11,5, E12,5, E13,5: In den Extremitäten geht die J-Expression mit der Trennung der Hand- bzw Fußflächen in einzelne Finger/Zehen einher (Pfeile in G und H). Auch in ganzen Embryonen ist die Färbung, die an das Neuralrohr und einige Teile des Gehirns angrenzt, zu sehen.

4.2.3 M2-4: Identifizierung eines Gens mit mehreren Isoformen

Das Transkript, welches dem Gen des ddPCR-Produkts M2-4 entspricht, konnte im Organkultur-Nierenmesenchym nicht mit Northern Blot Hybridisierung detektiert werden. Da es im ddPCR-Autoradiogramm eine sehr deutliche Induktion zeigte, sollte das Gen in Gewebeschnitten auf Expression während der Nierenentwicklung getestet werden. Die Hybridisierungssonden für das M-Gen wurden ausgehend von verschiedenen I.M.A.G.E.-Klonen (IDs 777837, 889456, 891376; siehe Abb. 10) hergestellt.

4.2.3.1 Sequenzanalyse des M-Gens

Durch Screening der embryonalen Maus-E11-cDNA-Bank (Novagen) mit dem cDNA-Fragment des I.M.A.G.E.-Klons 777837 konnte nur ein Klon mit einem etwa 1 kb langen cDNA-Insert isoliert werden. Ausgehend von dieser Sequenz wurde erneut die GenBank Datenbank nach entsprechenden EST-Sequenzen durchsucht. So konnten weiter 5'-liegende EST-Sequenzen identifiziert und insgesamt ca. 1,8 kb der Nukleotidsequenz rekonstruiert werden. Sie enthält ein offenes Leseraster von 536 Aminosäuren, das am 5'-Ende beginnt. Allerdings konnten in der ermittelten Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit zu irgendwelchen bekannten Proteinen oder Proteinmotiven identifiziert werden.

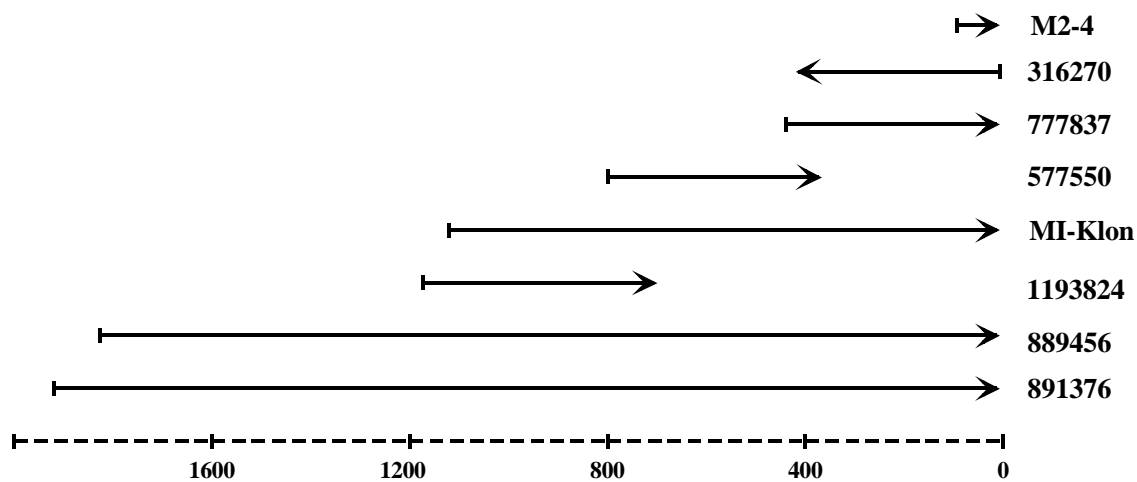


Abb. 12: Sequenzanalyse des M-Gens. Die Lage und Länge der analysierten Sequenzen (ddPCR-Produkt M2-4, cDNA-Bank-Klon MI und EST-Sequenzen mit den entsprechenden IDs) sind durch Pfeile dargestellt. Die I.M.A.G.E.-Klone 889456 und 891376 wurden komplett sequenziert, während die übrigen EST-Sequenzen der Datenbank entnommen sind.

4.2.3.1 Expression des M-Gens

Durch *in situ* Hybridisierung von Paraffinschnitten konnten Transkripte des M-Gens in der embryonalen Niere nachgewiesen werden. Es wird bereits im kondensierenden Mesenchym und anschließend in den Komma- und S-förmigen Nephronvorläufern exprimiert (Abb. 13). Im Gegensatz zur Expression des C-Gens ist also das M-Gen schon vor der Epithelialisierung in den mesenchymalen Zellen exprimiert, die den sich verzweigenden Ureter umgeben.

Das M-Gen ist, ähnlich wie das C-Gen, in anderen Geweben, die sich durch mesenchymale-epitheliale Interaktion entwickeln, nachweisbar: in dem sich verzweigenden Epithel der Submandibulardrüse, in der Lunge, dem Pankreas, den Zähnen und den Barthaarfollikeln (nicht gezeigt). Insgesamt war die Expression in diesen Geweben besonders schwach und deshalb nur nach längerem Färben nachweisbar. Dagegen wurde in älteren Stadien (E15,5 und E17,5) eine starke Expression des M-Gens in den Epithelien des Innenohrs und den damit verknüpften Ganglien, im Thymus und in den Mukosazellen des Darms beobachtet.

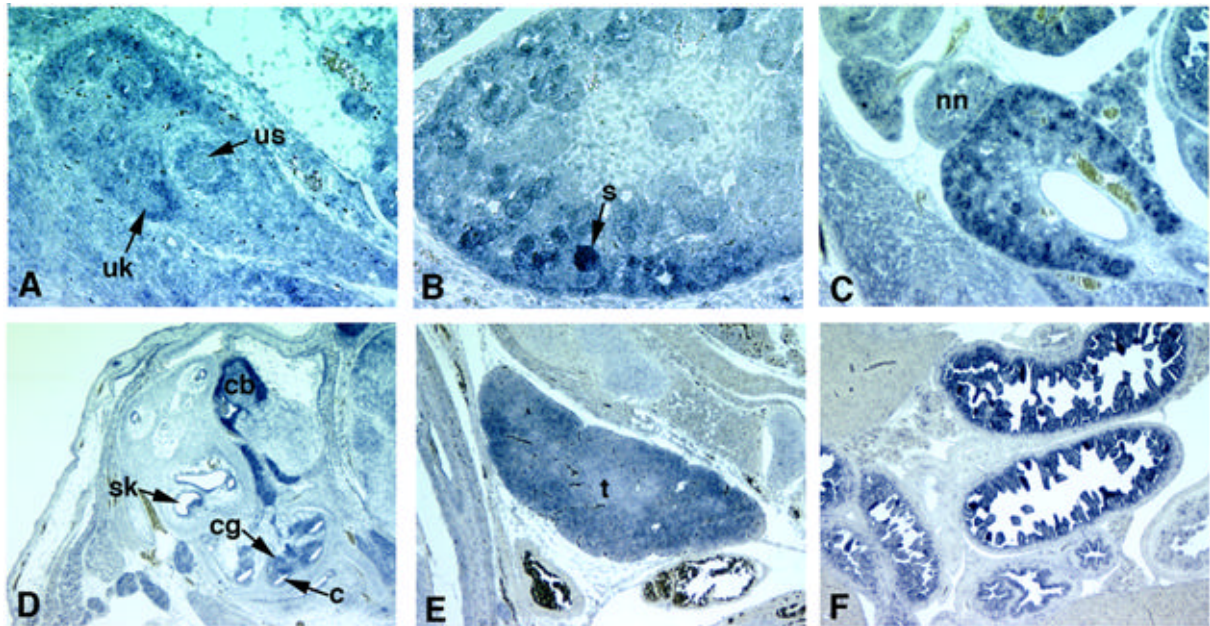
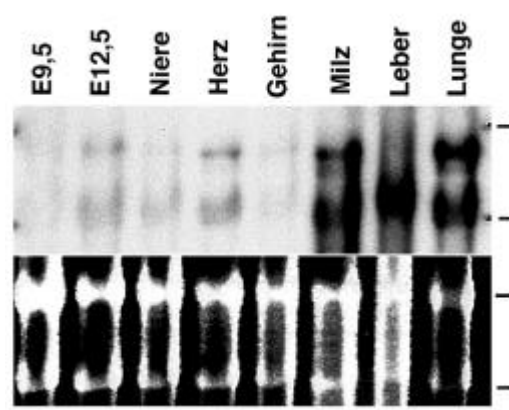


Abb. 13: Expression des M-Gens während der Entwicklung der Niere und verschiedener anderer Organe. (A-C) In Nierenanlagen der Stadien E12,5, E14,5 und E15,5 sind M-Transkripte bereits in kondensierenden Mesenchymzellen, die die Ureterknospen (uk) und den Ureterstamm (us) umgeben, zu finden. M ist auch in den daraus entstehenden Komma- und S-förmigen Nephronvorläufern (s) exprimiert (nn, Nebenniere). (D) E15,5, M-Expression im Innenohr: sowohl die Epithelien der Cochlea (c) und des Semizirkularkanals (sk), als auch die Nervenzellen des Cochlea-Ganglions (cg) und im Bereich des Cerebellums (cb) sind gefärbt. (E) E15,5: Expression des M-Gens im Thymus (t). (F) E17,5: Hybridisierungssignale in den Darmzotten.

Northern Blot Analyse von RNA ganzer Embryonen (E9,5 und E12,5) und adulter Organe zeigte, daß das M-Gen mindestens zwei verschiedene Transkripte von etwa 2 kb und 3,5 kb besitzt (Abb. 14). In allen Geweben ist die 2 kb-Bande breiter und es könnte sich hier um zwei verschiedene Transkripte handeln. Darüber hinaus ist in Herz, Milz und Lunge unterhalb der 3,5 kb-Bande noch ein schwächeres Transkript zu beobachten. Besonders stark werden alle mRNA-Transkripte in der adulten Milz und Lunge exprimiert. Nur eine mRNA des M-Gens von ca. 2,5 kb wird in großen Mengen in der Leber nachgewiesen, was vermutlich auf einen Laufartefakt der RNA zurückzuführen ist. Sehr viel schwächer ist das M-Gen in der adulten Niere, Herz und Gehirn exprimiert. In Mausembryonen Tag 9,5 ist es nicht nachweisbar und in E12,5 Embryonen ist es nur sehr schwach exprimiert.

Abb. 14: Northern Blot Analyse des M-Gens in ganzen Mausembryonen (Stadien E9,5 und E12,5) und adulten Organen. 10 µg Gesamt-RNA wurden mit der cDNA des MI-Klons hybridisiert (Bild oben). Zum Vergleich der aufgetragenen RNA-Mengen ist die Ethidiumbromid-Färbung der 18S- und 28S-rRNA gezeigt (Bild unten). Die Lage dieser rRNAs ist rechts außen markiert. Das M-Gen ist also besonders stark in Milz, Leber und Lunge exprimiert und besitzt mehrere Transkripte.



4.3 Expressionsanalyse von sFRP-Genen

1997 wurde in einer Reihe unabhängiger Untersuchungen und in verschiedenen Spezies die Familie der sFRP-Gene beschrieben, deren Genprodukte vermutlich an Wnt-Proteine binden und diese in ihrer Funktion beeinflussen. Zunächst waren vier Mitglieder dieser Genfamilie in der Maus bekannt (sFRP1-4), sFRP5 wurde erst kürzlich isoliert (Chang *et al.*, 1999; Finch *et al.*, 1997; Hoang *et al.*, 1996; Leyns *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Mayr *et al.*, 1997; Melkonyan *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997a). Zwei weitere Vertreter, crescent und sizzled, wurden bislang nur in Huhn bzw. *Xenopus* gefunden (Pfeffer *et al.*, 1997; Salic *et al.*, 1997).

Tabelle 4: Bislang bekannte Vertreter der sFRP-Genfamilie

sFRP-Gene der Maus	andere Bezeichnungen und Spezies [§]
sFRP1	FRP (h), frza (b), SARP2 (h)
sFRP2	SDF5 (m), SARP1 (h)
sFRP3	frzb (x), frezzled (h, m, x), Fritz (m, h)
sFRP4	frpap (r), frphe (h), DDC4 (h)
sFRP5	sFRP5 (h), SARP3 (h)
	crescent (c)
	sizzled (x)

[§] b, bovine (Rind); c, chicken (Huhn); h, human; m, Maus; r, Ratte; x, *Xenopus*;

Das sFRP2-Gen wurde als nach der Induktion im Nierenmesenchym angeschaltetes Gen identifiziert und mit Northern Blot Hybridisierung verifiziert (Kap 4.1.2). Da noch keine Expressionsanalyse dieses Gens vorlag, wurde die zeitliche und räumliche Verteilung des sFRP2-Gens während der Embryonalentwicklung genauer untersucht und mit der von sFRP1 und sFRP4 verglichen. Von sFRP3 gab es bereits eine genaue Untersuchung des Expressionsmusters während der Maus-Entwicklung (Mayr *et al.*, 1997), so daß dieses Gen nicht weiter analysiert wurde. Diese Expressionsstudien sollten als Basis für Untersuchungen zur Funktion dieser Gene im Wnt-Frizzled-Signaltransduktionsweg dienen.

4.3.1 Expression der sFRP-Gene während der Nierenentwicklung

Die Gewebe-Verteilung der sFRP-Gene wurde mit *in situ* Hybridisierung sowohl ganzer Mausembryonen als auch auf Paraffinschnitten untersucht. Die entsprechenden RNA-Sonden wurden von I.M.A.G.E.-Klonen transkribiert, die cDNA-Fragmente der Gene enthalten:

Tabelle 6: Zur Expressionsanalyse verwendete I.M.A.G.E.-Klone

Gen	I.M.A.G.E. IDs	Accession #	
sFRP1	575916	AA120044	ab nt 1534 der 2659 bp sFRP1-cDNA
sFRP2	536389	AA073862	ab nt 456 der 2028 bp sFRP2-cDNA
sFRP4	553533	AA087277	ab nt 28 der 1785 bp sFRP4-cDNA

Das sFRP2-Gen wurde schon im sich entwickelnden Mesonephros detektiert (Abb. 15A,B). In Mausembryonen im Stadium E9,5 ist sFRP2 zunächst in den zuerst entstehenden cranialen Tubuli zu finden (Abb. 16K). Die Entwicklung dieser Nephron-ähnlichen Strukturen schreitet von cranial nach caudal fort und parallel dazu sind auch sFRP2-Transkripte in den neu gebildeten Urnierentubuli zu beobachten. Im Wolffschen Gang dagegen ist sFRP2 nicht zu finden. Während der Entwicklung der Nachniere ist das sFRP2-Gen zunächst im kondensierenden Mesenchym exprimiert, aber besonders stark in den bereits epithelialen Komma- und S-förmigen Nephronvorläufern (Abb. 15C-E). Die Epithelzellen des sich verzweigenden Ureters sind nicht gefärbt. Entstehung und Entwicklung der Nephrone setzen sich radial nach außen hin fort, so daß in fortgeschrittenen Stadien (etwa ab E15,5) im zentralen Bereich der Niere (Medulla) bereits differenzierte Nephrone zu finden sind, während am Rand (Cortex) neue entstehen. Ab Tag 15.5 der Embryonalentwicklung ist sFRP2 weiterhin in den sich entwickelnden Nephronvorläufern im Cortex exprimiert, aber nicht in den reiferen Tubuli und Glomeruli der Medulla (Abb. 15F). Das weist darauf hin, daß sFRP2 nur für die frühe Entwicklung der Nephrone wichtig ist, aber nicht mehr für spätere Prozesse wie z.B. Längenwachstum der Nierenkanälchen oder Reifung der Podozyten. Damit übereinstimmend ist sFRP2 in der adulten Niere nur sehr schwach exprimiert, was durch Northern Blot Analyse von RNA adulter Organe gezeigt wurde (Rattner *et al.*, 1997 und eigene Beobachtungen). sFRP2 wurde außerdem noch in Zellen, die den Ureter-Stamm umgeben, detektiert.

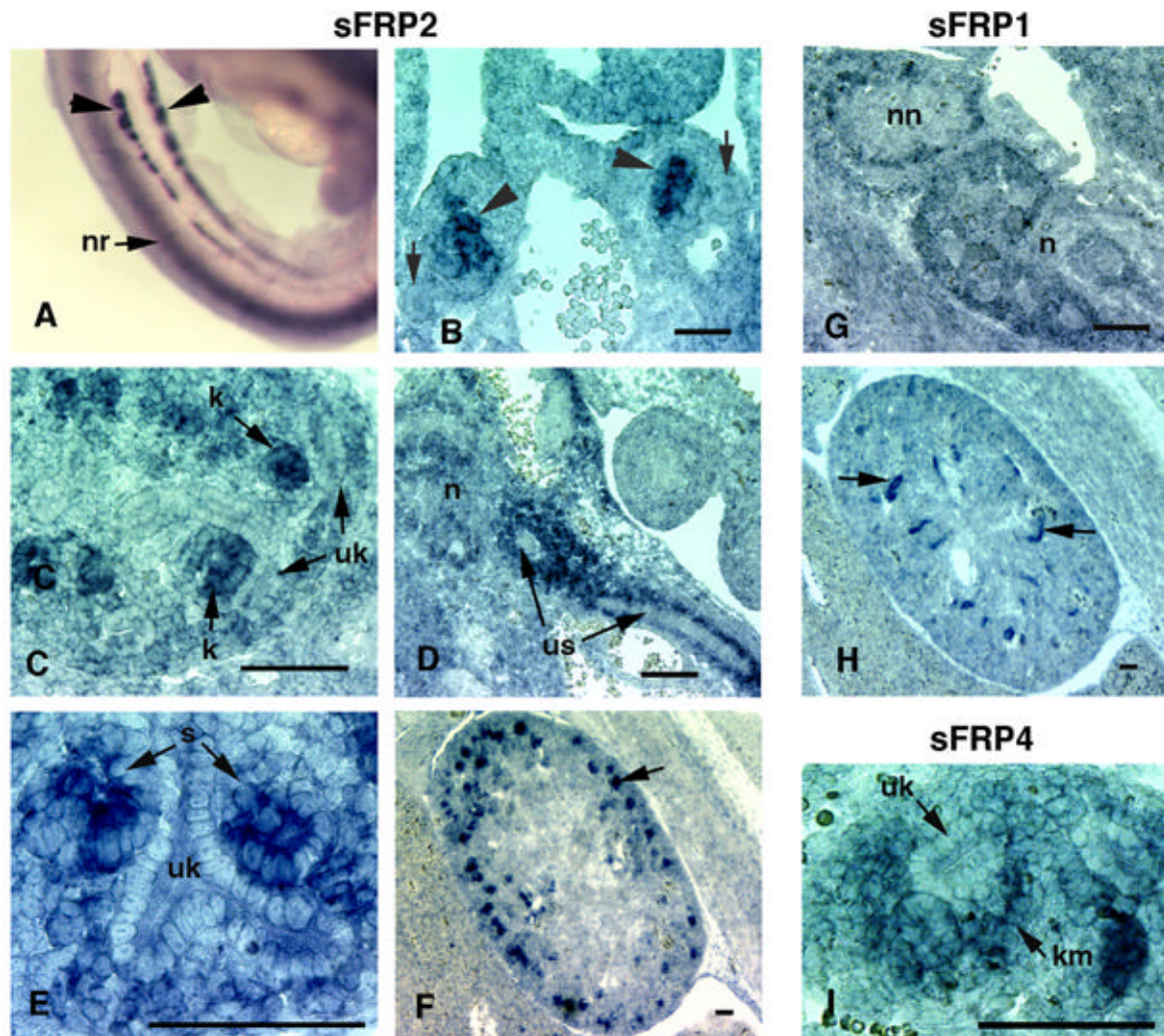


Abb. 15: Expression von sFRP-Genen während der Urogenitalentwicklung. (A,B) *In situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen und transversaler Paraffinschnitte zeigt die sFRP2-Genexpression in den mesonephrischen Tubuli (Pfeilspitzen); der Wolffsche Gang ist nicht gefärbt (Pfeile in B). (C,D) Metanephros E12,5: sFRP2 ist in den Komma-förmigen Strukturen und um den Ureterstamm exprimiert. Das Epithel der sich verzweigenden Ureterknospe dagegen ist nicht gefärbt. (E) Ausschnitt aus einer Nierenanlage im Stadium E14,5, der eine Expression des sFRP2-Gens in den S-förmigen Nephronvorläufern zeigt. (F) E15,5: Die Färbung ist auf sich entwickelnde Nephrene in der Peripherie der Nierenanlage beschränkt (Pfeil). (G,H) sFRP1 ist zunächst in Stromazellen (G, E13,5) und später in den Henleschen Schleifen der Nephrene (H, E15,5, Pfeile) exprimiert. (I) sFRP4 Transkripte werden sowohl im kondensierenden als auch im epithelialisierten Mesenchym detektiert. **Abkürzungen:** k, Komma-Form; km, kondensiertes Mesenchym; n, Niere; nn, Nebenniere; nr, Neuralrohr; s, S-Form; uk, Ureterknospe; us, Ureterstamm. Größenbalken 100 μ m.

Northern Blot und RNase Protektions-Analysen von Rattner *et al.* (1997) hatten gezeigt, daß alle anderen bisher in der Maus bekannten sFRP-Gene in der adulten Niere stark exprimiert sind. Von sFRP3 ist außerdem bereits beschrieben, daß es sowohl im Mesenchym, das den mesonephrischen Gang umgibt als auch in den primitiven Glomeruli und Nierentubuli des Metanephros exprimiert ist (Mayr *et al.*, 1997). Die Expression von sFRP1 und sFRP4 während der Nierenentwicklung war noch nicht bekannt und sollte deshalb untersucht und mit der des sFRP2-Gens verglichen werden. sFRP1 ist zwischen E13,5 und E14,5 in der Peripherie der Nierenanlagen und in Zellen, die sowohl die Uretertubuli als auch die nephrogenen Tubuli umgeben, exprimiert (Abb. 15G). Ein ähnliches

Muster ist von dem Winged-Helix Transkriptionsfaktor BF-2 und Tenascin bekannt, die als Marker für Stromazellen gelten. Allerdings ist sFRP2 nur kurzfristig in dieser Zellpopulation exprimiert, ab E15,5 ist es dagegen in den zukünftigen Henleschen Schleifen der Nephrone zu finden (Abb. 15H). sFRP4 ist sehr schwach exprimiert und war deshalb nur nach längerem Färben im kondensierenden metanephrogenen Mesenchym detektierbar (Abb. 15I). Alle in der Maus bekannten Mitglieder der sFRP-Genfamilie sind somit während der Nierenentwicklung in zum Teil überlappenden Bereichen exprimiert. Nur sFRP1 und sFRP2 zeigen ein weitgehend komplementäres Expressionsmuster.

4.3.2 Expression von sFRP-Genen im Zentralen Nervensystem

Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) wurde ein unterschiedliches Expressionsmuster von sFRP1 und sFRP2 beobachtet. In ganzen Mausembryonen ist sFRP1 zum Zeitpunkt E8,0 zunächst sehr stark im zukünftigen Vorderhirn und der ventralen Hälfte des späteren Rautenhirns (Rhombencephalon) exprimiert (Abb. 16A). Nach 8,5 Tagen ist die sFRP1-Färbung besonders deutlich in Rhombomer 4 des Rautenhirns. Im Vorderhirn ist sFRP1 zunächst im Prosencephalon (E8,0 bis E9,5) und anschließend im Telencephalon exprimiert (Abb. 16B-D). In späten Entwicklungsstadien sind Transkripte im gesamten Gehirn und den Spinalganglien zu finden, wobei das gesprenkelt wirkende Expressionsmuster darauf hinweist, daß sFRP1 nur in bestimmten Zelltypen exprimiert wird (Abb. 19A). Zwischen E9,5 und E10,5 ist sFRP1 außerdem in den beiden Nasenplakoden und den epibranchialen Plakoden zu finden (Abb. 16C,E). In späteren Stadien werden Transkripte in daraus entstehenden Strukturen - Riechepithel und craniale Ganglien – detektiert.

Im Vergleich zu sFRP1 ist sFRP2 im Rautenhirn dorsal und ventral exprimiert (Abb. 16I-N). Es ist besonders stark in den geradzahigen Rhombomeren vertreten. Zum Zeitpunkt E10,5 ist sFRP2 in zwei Längsstreifen sowohl in der Basalplatte als auch in der Flügelplatte des Rautenhirns exprimiert, was besonders in der Flachpräparation deutlich wird (Abb. 16M,N). Dieses Muster ist in E11,5 und E12,5 noch zu beobachten. Später sind sFRP2-Transkripte auf Zellen an der Grenze zwischen Metencephalon (Nachhirn) und Myelencephalon (Markhirn) begrenzt (Abb. 19B). Ähnlich wie im Rhombencephalon ist sFRP2 auch im Vorderhirn segmentartig exprimiert. Nach dem Neuromeren-Modell von Rubenstein und Puelles (Rubenstein *et al.*, 1995), welches auch das Vorderhirn in Segmente (Prosomere) einteilt, ist die sFRP2-Expression den ersten beiden Prosomeren zuzuordnen (Abb. 16M,N). Im Gegensatz zu sFRP1 ist sFRP2 in späteren Stadien nur noch schwach im Gehirn exprimiert und ist im adulten Gehirn mit Northern Blot Analyse nicht mehr detektierbar. Weiter caudal ist sFRP2 im Neuralrohr und später im Rückenmark exprimiert (Abb. 16Q,R). Zwischen E8,0 und E11,5 ist es zunächst in der ventralen Hälfte des Neuralrohrs zu finden. Später konzentriert sich die sFRP2-Expression auf das ventrale Ependym des Rückenmarks. In dieser Zellschicht befinden sich noch teilungsfähige Zellen, so daß sFRP2-Transkripte wie in Niere oder Gehirn auch hier vorwiegend auf proliferierende Zellen bzw. frühe Differenzierungsstadien beschränkt sind.

sFRP4 konnte mit *in situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen und auf Schnitten neuronaler Gewebe nicht detektiert werden.

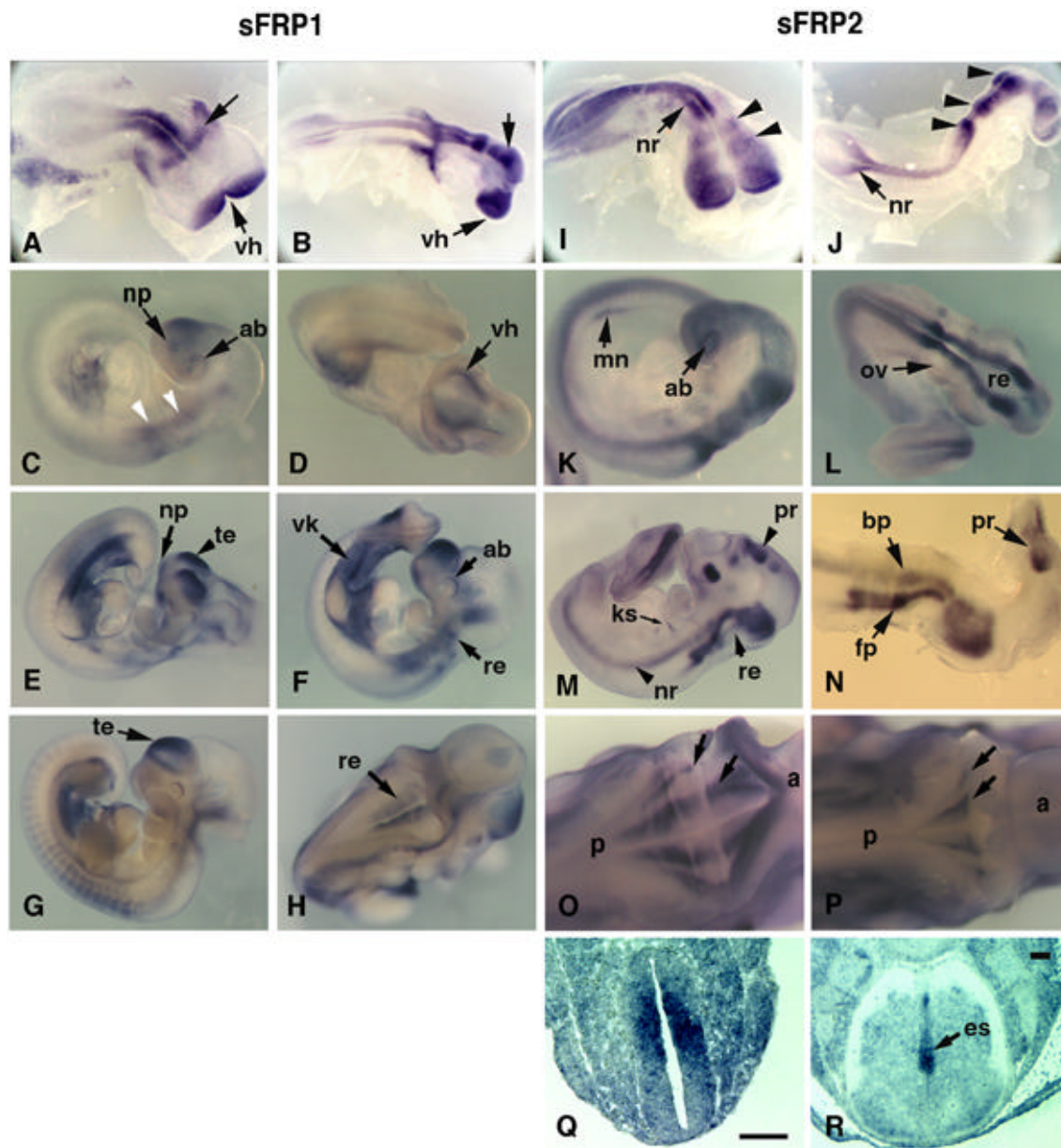


Abb. 16: Expression von sFRP1 (A-H) und sFRP2 (I-R) während der Entwicklung des Nervensystems. (A) Dorsale Ansicht der Neuralplatte im Stadium E8,0; sFRP1 ist im zukünftigen Vorder- und im Hinterhirn exprimiert. Der Pfeil in (A) und (B) markiert die Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze. (B) Die laterale Ansicht in E8,5 zeigt sFRP1-Expression im Vorderhirn, posterior zur Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze und in Rhombomer 4. (C,D) sFRP1-Färbung in E9,5 im Vorderhirn, Hinterhirn, Nasenplakoden, epibranchialen Plakoden (weiße Pfeilspitzen) und dorsal um das Augenbläschen. (E,F) Im Stadium E10,5 ist sFRP1 im Telencephalon, Rhombencephalon, den Nasenplakoden und der ventralen Körperseite exprimiert. (G,H) E11,5, laterale bzw. dorsale Ansicht. (G) sFRP1-Expression im ventralen Rhombencephalon. (I) sFRP2 ist ab E8,0 im zukünftigen Hinterhirn und dem ventralen Neuralrohr exprimiert. (J) E8,5. Die Pfeilspitzen in (I) und (J) deuten auf die stärkere sFRP2-Expression in geradzahligen Rhombomeren hin. (K,L) E9,5: sFRP2 ist auch im Mesonephros und im Augenbläschen exprimiert. (M) E10,5: sFRP2-Expression in der 2. und 3. Kiemenspalte, im Auge, im ventralen Neuralrohr und in bestimmten Rhombomeren und Prosomeren. (N) Präparation der rechten Gehirnhälfte des mit sFRP2 gefärbten E10,5-Mausembryos zeigt die Expressionsdomänen in Boden- und Flügelplatte des Rhombencephalons. (O,P) Dorsale Ansicht der sFRP2-Expression im Rhombencephalon in E11,5 und E12,5; die Pfeile kennzeichnen die beiden Signal in der linken Hälfte des Rautenhirns. (Q,R) Querschnitte des Neuralrohrs in den Stadien E10,5 und E14,5.

Abkürzungen: a, anterior; ab, Augenbläschen; bp, Bodenplatte; fp, Flügelplatte; ks, Kiemenspalte; mn, Mesonephros; np, Nasenplakode; nr, Neuralrohr; ov, Ohrvesikel; p, posterior; pr, Prosomere; re, Rhombencephalon; te, Telencephalon; vh, Vorderhirn; vk, ventrale Körperwand. Größenbalken 100 μ m.

4.3.3 Expression von sFRP-Genen während der Augenentwicklung

Wie durch *in situ* Hybridisierung ganzer Embryonen bereits ersichtlich war, sind sFRP1 und sFRP2 auch während der Augenentwicklung exprimiert (Abb. 17). In der Maus beginnt dieser Prozeß etwa zum Zeitpunkt E9,0 mit der Ausstülpung der beiden Augenbläschen vom Diencephalon. Diese stülpen sich später ein und bilden doppelwandige Augenbecher (E10,5), deren innere Schicht die neuronale und deren äußere Schicht die pigmentierte Retina bilden. Die Linse entsteht aus sich zu einer Plakode verdickenden Kopfektoderm, das sich einstülpt und zunächst ein Linsenbläschen bildet. Die Zellen an dessen Hinterwand verlängern sich und wandeln sich in Linsenfasern um, die das Lumen des Bläschens ausfüllen. Während das anteriore Linsenepithel zunächst bestehen bleibt und die Zellen sich weiter teilen, degenerieren die Kerne der Faserzellen.

sFRP2 ist bereits in der Augenplakode (E9,0) und anschließend in den Augenbläschen (E9,5) exprimiert (Abb.16 K). Nach 10,5 Tagen ist sFRP2 in der inneren Zellschicht der Augenbecher und in den Linsenbläschen, sFRP1 dagegen in ektodermalen Zellen über den Augenbläschen zu finden (Abb. 17A,E). Auch in späteren Stadien sind beide Gene in unterschiedlichen Zellen exprimiert. Während sFRP2-Transkripte auf Zellen der neuronalen Retina beschränkt sind, wird sFRP1 ausschließlich in der pigmentierten Retina exprimiert. Zum Zeitpunkt E14.5 ist sFRP2 besonders stark im anterioren Linsenepithel, sFRP1 dagegen in den benachbarten Linsenfasern transkribiert. Einen Tag später geht die sFRP2- Expression im anterioren Linsenepithel zurück, während die des sFRP1-Gens ansteigt. Somit zeigen sFRP1 und sFRP2 auch in der Augenentwicklung eine teilweise komplementäre Expression. Ab Stadium E15,5 vermindert sich die sFRP2-Expression in den medialen Zellen der neuronalen Retina, was wiederum darauf hinweist, daß sFRP2 während der terminalen Differenzierung von Zellen abgeschaltet wird. sFRP4 war nur nach langem Färben detektierbar und zeigte in späten Stadien ein dem sFRP2-Gen entsprechendes Expressionsmuster.

4.3.4 Expression von sFRP2 bei der Gelenkentwicklung

Besonders starke Hybridisierungssignale der sFRP2-Probe wurden in den sich entwickelnden Extremitäten beobachtet (Abb. 18). Die Knochen der Vorder- und Hinterbeine entstehen durch Kondensieren von Mesenchymzellen, wobei sich zunächst eine Verdichtung bildet, die wächst, sich verzweigt und unterteilt. Die Entwicklung der Vorderextremitäten beginnt dabei etwa einen halben Tag vor der der Hinterextremitäten.

sFRP2 ist zunächst am Tag 11,5 an beiden Enden und flankierend zur mesenchymalen Kondensation der Vorderextremität exprimiert (Abb. 18A). E12,5 werden bereits die Zellkondensate der entstehenden Finger sichtbar. sFRP2 ist zunächst im Bereich der entstehenden Fuß- und Handwurzelknochen exprimiert, und das Signal scheint entlang der Fingerstrahlen nach distal zu wandern (Abb. 18B). Mit der Unterteilung der Finger in Phalangen ist die sFRP2-Expression jeweils vorübergehend an den Teilungsstellen zu finden und wird danach vermindert (Abb. 18C-E,G). Außerdem wurden sFRP2-Transkripte in der sich entwickelnden Schulter und in Zellen, die die Carpalen und Metacarpalen umgeben, detektiert (nicht gezeigt). Ein ähnliches sFRP2-Expressionsmuster wurde auch zwischen den Rippen und Brustwirbeln, in den späteren sternocostalen Gelenken und zwischen Rippen und Brustbein nachgewiesen (Abb. 18F). Die sFRP2-Expression begleitet also die Segmentierung der Extremitätenknochen und geht der Bildung von Gelenken voraus.

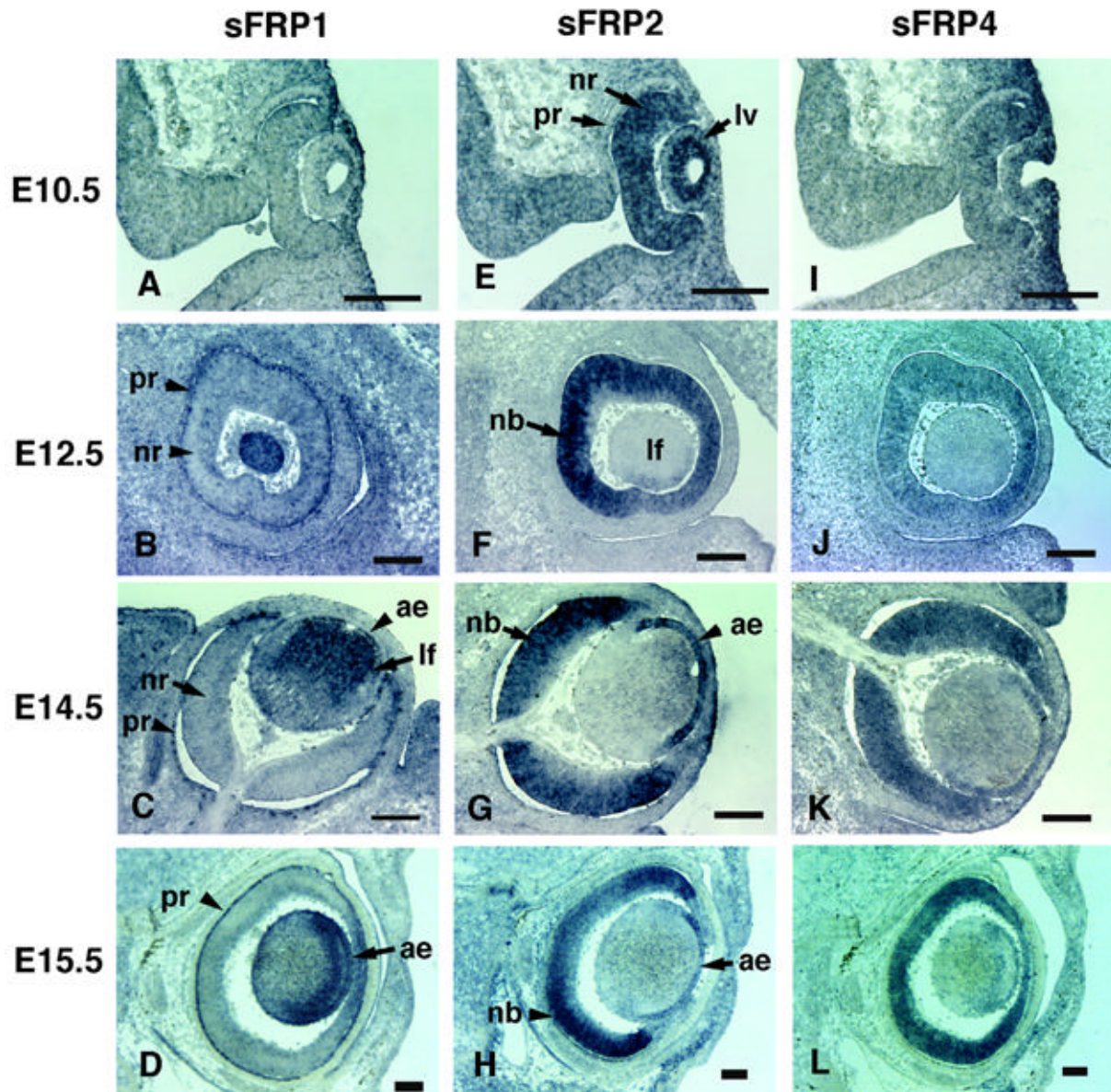


Abb. 17: Expression von sFRP-Genen während der Augenentwicklung. Verteilung von sFRP1, sFRP2 und sFRP4 in den Stadien E10,5 (A,E,I, transversal), E12,5 (B,F,J, sagittal), E14,5 (C,G,K, transversal) und E15,5 (D,H,L, sagittal). **(B-D)** sFRP1 ist in der pigmentierten Retina und den Linsenfäsern ab E12,5 exprimiert. **(D)** Im Stadium E15,5 bleibt das sFRP1-Signal im anterioren Teil der von posterior nach anterior degenerierenden Linsenfäsern. **(E-H)** sFRP2 ist während der gesamten Entwicklung der neuronalen Retina exprimiert, wo es später auf die äußere Zellschicht der Neuroblasten begrenzt ist. sFRP2 ist zunächst im Linsenvesikel (E, E10,5) und später im anterioren Linsenepithel zu finden (G, E14,5). In letzterem wird die Expression ab E15,5 vermindert (H). **(I-L)** Die Expression des sFRP4-Gens gleicht der von sFRP2, außer daß es in der gesamten neuronalen Retina verteilt ist.

Abkürzungen: ae, anteriores Epithel; lf, Linsenfaserzellen; lv, Linsenvesikel; nb, Neuroblasten-Zellschicht; nr, neuronale Retina; pr, pigmentierte Retina. Größenbalken 100 µm.

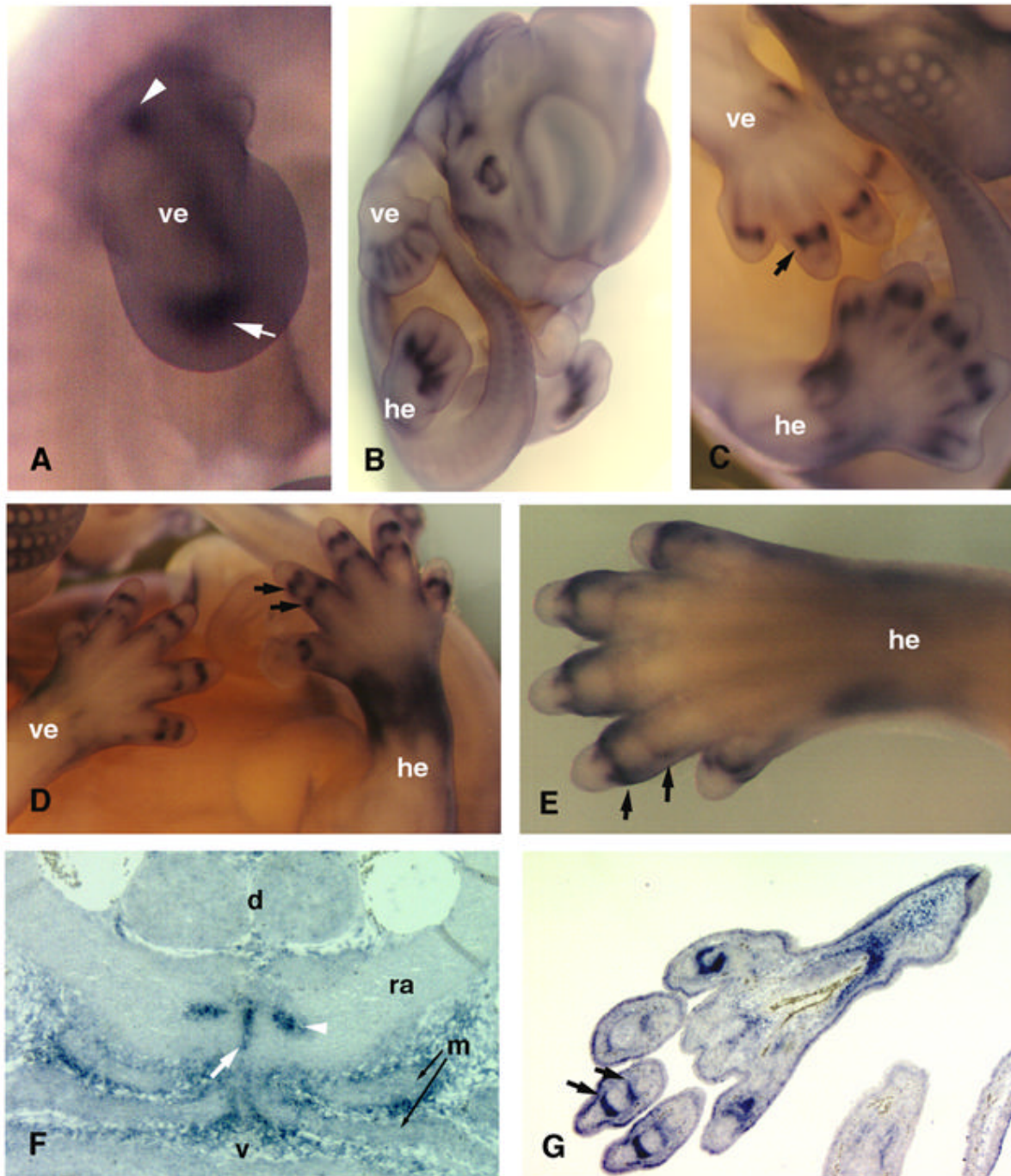


Abb. 18: sFRP2-Expression während der Gelenkentwicklung. **(A)** Vorderextremität E11,5: sFRP2-Expression an der Schulter (Pfeilspitze) und dem distalen Ende Knorpelanlage (Pfeil). **(B)** sFRP2-Färbung im Stadium E12,5 entlang der Fingerstahlen. **(C,D)** In E13,5- und E14,5-Embryonen wird ein starkes Signal in Vorder- und Hinterextremität beobachtet, wo sich Gelenke zwischen Phalangen bilden. **(E,G)** Ganze Hinterextremität bzw. Längsschnitt E15,5: die sFRP2-Expression wird in den proximalen Gelenken wieder vermindert. **(F)** E14,5, transversal Schnitt: sFRP2 wird auch zwischen beiden Bändern des Brustbeins (Pfeil) und an den Kontaktstellen zwischen Sternum und Rippen (Pfeilspitze) exprimiert.

Abkürzungen: d, dorsal; he, Hinterextremität; m, Muskeln; ra, Rippenanlage; v, ventral; ve, Vorderextremität.

4.3.5 sFRP-Genexpression an anderen Stellen mesenchymaler-epithelialer Interaktionen

Abb. 19 zeigt eine Übersicht der Expression von sFRP1 und sFRP2 nach 15,5 Tagen und von sFRP4 nach 14,5 Tagen Embryonalentwicklung. Besonders auffällig war die komplementäre Verteilung von sFRP1- und sFRP2-Transkripten im Bereich des Riechepithels (Abb. 19D,E). Während sFRP1 in der basalen Zellschicht des Riechepithels exprimiert ist, ist sFRP2 in den benachbarten Mesenchymzellen zu finden. Außer in diesen ist sFRP2 in allen mesenchymalen Zellen zwischen Epithelien und Knorpelstrukturen des Kopfes exprimiert. Diese Expression des sFRP2-Gens im pharyngealen Mesenchym wurde schon in früheren Entwicklungsstadien beobachtet (nicht gezeigt). sFRP1 ist bereits in den Nasenplakoden exprimiert, aus welchen sich das Riechepithel entwickelt (Abb. 16C). sFRP1- und sFRP2-Transkripte wurden in weiteren Geweben detektiert, die sich durch Wechselwirkung epithelialer und mesenchymaler Zellschichten entwickeln. Beide Gene sind während der Zahnentwicklung, aber nur sFRP1 im sich verzweigenden Epithel der Speicheldrüse und dem Epithel der Cochlea exprimiert (Abb. 19G,H). Außerdem wurde sFRP1 noch in der Nebennierenrinde detektiert. sFRP2 ist im Epithel der zweiten und dritten Kiemenspalte und zusammen mit sFRP4 im exokrinen Pankreas und den Hodensträngen exprimiert (nicht gezeigt). Obwohl die Expression von sFRP4 in vielen Geweben so schwach ist, daß sie schwer nachzuweisen war, wurde ein sehr starkes Signal in mesenchymalen Zellen gefunden, die die Zahnanlagen umgeben (Abb. 19C,F). Außerdem ist sFRP4 wie sFRP1 im sich verzweigenden Speicheldrüsenepithel exprimiert (Abb. 19I).

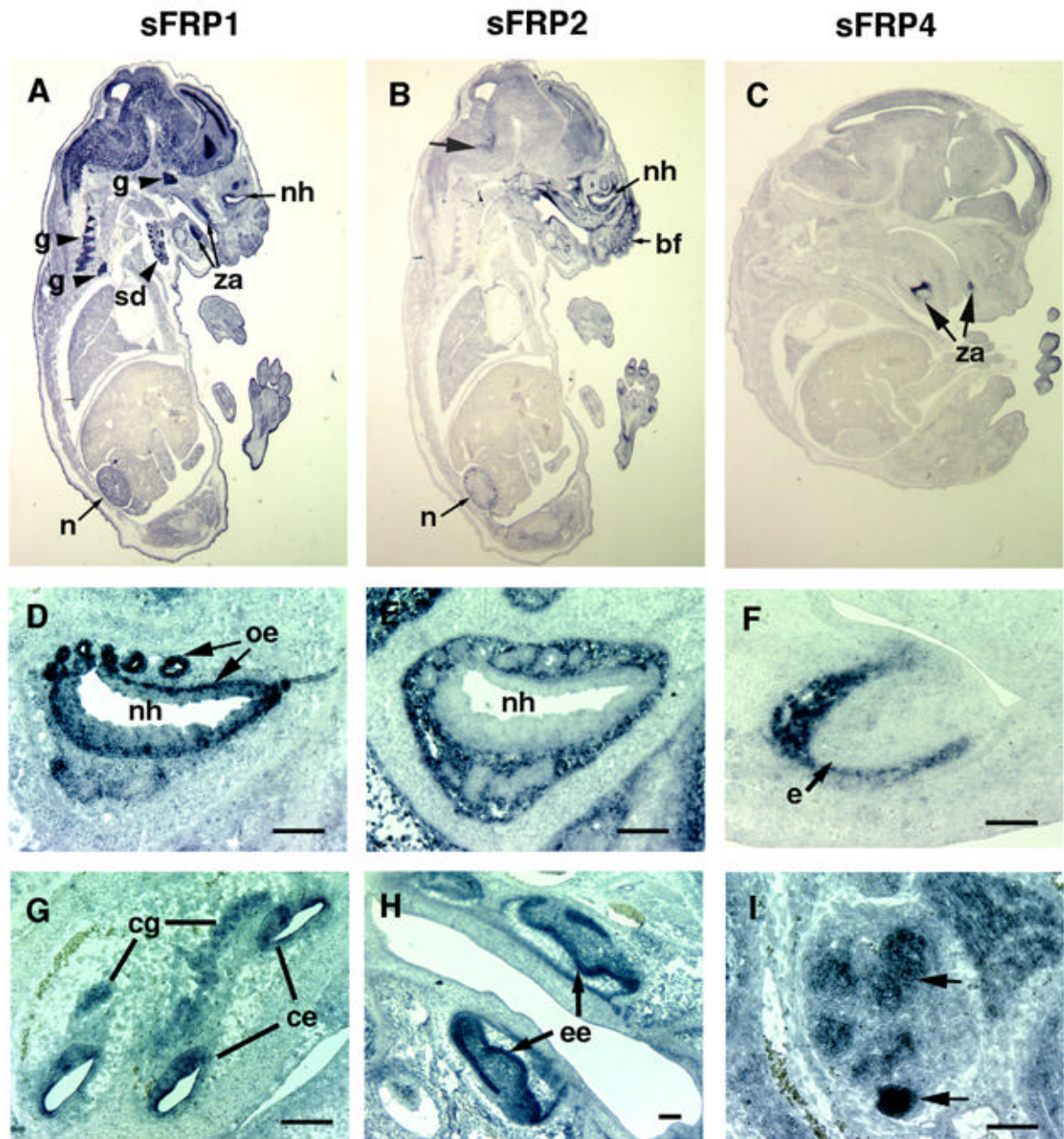


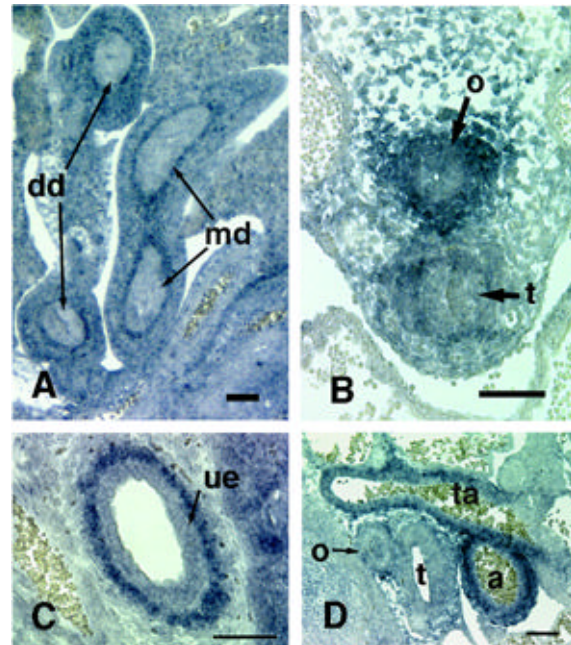
Abb. 19: Übersicht der sFRP1-, sFRP2- und sFRP4-Expressionsmuster an Längsschnitten. (A) sFRP1, E15,5: starke Signale sind im gesamten Gehirn, den Ganglien, der Speicheldrüse, den Zahnanlagen und dem Riechepithel zu sehen. (B) sFRP2, E15,5: sFRP2 ist in mesenchymalen Zellen zwischen Knorpel- und epithelialen Strukturen des Schädels exprimiert. (D,E) Komplementäre Expression von sFRP1 (D) und sFRP2 (E) im Bereich des olfaktorischen Epithels. (G) Expression von sFRP1 im Cochlea-Epithel und -Ganglion im Stadium E15,5. (H) Expression von sFRP2 im Epithel der Zahnanlagen in E16,5-Embryonen. (C,F) E14,5: sFRP4 zeigt eine starke Expression im Mesenchym, das die Zahnanlage umgibt. (I) E14,5: sFRP4-Expression im sich verzweigenden Epithel der Speicheldrüse.

Abkürzungen: bf, Barthaarfollikel; ce, Cochlea-Epithel; cg, Cochlea-Ganglion; e, Epithel; ee, Enamelepithel (Zahnschmelz); g, Ganglion; he, Hinterextremität; n, Niere; nh, Nasenhöhle; oe, olfaktorisches Epithel; sd, Speicheldrüse; za, Zahnanlage. Größenbalken 100 μ m.

Interessanterweise wurden sFRP2-Transkripte auch in der äußeren Wand der großen Arterien, der Speiseröhre und im den Ureter umgebenden Mesenchym nachgewiesen (Abb. 20). sFRP1 ist dagegen in Zellen, die den Darm umgeben, exprimiert. In allen Fällen handelt es sich um Orte, an welchen glatte Muskulatur gebildet wird.

Abb. 20: Expression von sFRP1 und sFRP2 während der Entwicklung glatter Muskulatur. (A) sFRP1-Expression in der glatten Muskulatur des Darms. (B-D) sFRP2-Expression um den Oesophagus (B, E11,5 transversal), den Ureterstamm (C, E15,5 sagittal), die Aorta und den Truncus arteriosus (D, E14,5 transversal).

Abkürzungen: a, Aorta; da, Truncus arteriosus; dd, Duodenum; md, Mitteldarm; o, Oesophagus; t, Trachea; ue, Ureterepithel. Größenbalken 100 µm.



4.4 Identifizierung einer neuen Genfamilie von hairy- und Enhancer of split- verwandten Genen

Hairy- und Enhancer of split (E(spl))-verwandte Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die eine basische Domäne zur DNA-Bindung, eine Helix-Loop-Helix-Domäne zur Protein-Dimerisierung, eine Orange-Domäne zur Spezifität und ein C-terminales WRPW-Motiv für die Bindung groucho-verwandter Proteine besitzen. Sie sind transkriptionelle Repressoren, die entweder unabhängig (hairy) oder als Effektoren des Delta-Notch-Signaltransduktionswegs (E(spl)) agieren. Proteine der Hes-Genfamilie sind die einzigen bisher bekannten Homologe in Säugetieren.

4.4.1 Screening embryonaler cDNA-Banken und Sequenzanalyse

Nachdem die differentielle Expression des J6-1 entsprechenden Gens im nicht-induzierten *versus* induzierten Nierenmesenchym durch Northern Blot Hybridisierung bewiesen werden konnte (Kap.

4.1.3, Abb. 6), sollte dieses Gen näher untersucht werden. Eine embryonale E8.5-Maus-cDNA-Bank (Brigid Hogan) wurde zunächst mit dem 600 bp-cDNA-Fragment des I.M.A.G.E.-Klons 478014 durchsucht. Es konnten neun Klone isoliert werden, deren Inserts allerdings bestenfalls 1 kb lang waren. Nach Screening der embryonalen E11-Maus-cDNA-Bank (Novagen) konnte ein Klon, der vermutlich die gesamte cDNA von 2,2 kb enthält, isoliert werden. Parallel wurden weitere, kürzere Klone isoliert, die zur Ermittlung der kompletten cDNA-Sequenz benutzt wurden. Die Nukleotid-Sequenz von 2174 bp enthält ein Startcodon an Position 117 gefolgt von einem offenen Leseraster von 897 bp für ein Protein mit 299 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 32,1 kDa. Ein Vergleich mit bekannten Genen zeigte, daß Hey1 Sequenzähnlichkeit zu den *Drosophila* hairy- und E(spl)-Proteinen bzw. den Säuger-Homologen der Hes-Proteinfamilie besitzt. Das Hey1-Protein enthält eine basische Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH), eine Orange-Domäne und ein C-terminales YRPW-Motiv. Aufgrund der Sequenzhomologie und des charakteristischen Tetrapeptids am Carboxyterminus wurde dieses Gen Hey1 genannt (hairy- und E(spl)-verwandt mit YRPW-Motiv). Darüber hinaus unterscheidet sich Hey1 noch in zwei weiteren Sequenzeigenschaften von hairy/E(spl)/Hes-Proteinen. Zum einen besitzt Hey1 einen Glycinrest anstatt des charakteristischen Prolinrests in der basischen Domäne. Dieser Prolinrest ist für die DNA-Bindungsspezifität der hairy-verwandten Gene für N-Box- anstelle von E-Box-Sequenzen verantwortlich. Zum anderen besitzt Hey1 C-terminal zum YRPW-Motiv weitere 7 Aminosäuren.

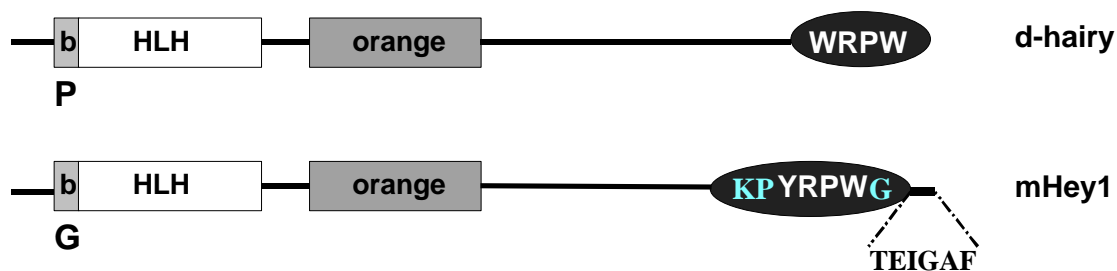


Abb. 21: Schematische Darstellung der *Drosophila* hairy- und Maus Hey1-Proteine. Hey1 besitzt alle für hairy charakteristischen Domänen allerdings mit einigen wesentlichen Unterschieden: einem Glycinrest (G) anstelle des für die hairy-DNA-Bindung entscheidenden Prolinrests (P) in der basischen Domäne (b); ein YRPW-Motiv statt WRPW und zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus.

4.4.2 Expression von Hey1 in der Niere und anderen Geweben mesenchymaler-epithelialer Wechselwirkungen

Obwohl nur sehr schwach, ist Hey1 bereits am Tag E10,5 in den mesonephrogenen Tubuli der Urniere exprimiert (nicht gezeigt). In der Nachniere ist Hey1 in den epithelialen Komma- und S-förmigen Nephronvorläufern zu finden (Abb. 22A). In späteren Stadien (ab E15,5) ist die Hey1-Expression auf den äußeren Bereich der Niere begrenzt, wo Nephrogenese stattfindet (Abb. 22B). Hey1 ist also wie das sFRP2-Gen nur in undifferenzierten Nephronvorläufern und nicht mehr in reifen Nierenkanälchen zu finden. Mit Northern Blot Analyse adulter Gewebe sind Hey1-Transkripte daher in der Niere kaum noch nachweisbar (Abb. 28).

Zum Zeitpunkt E14,5 ist Hey1 außerdem im Cortex des Thymus exprimiert (Abb. 22C). Dieser Bereich des Thymus entsteht aus den Epithelien der zweiten und dritten Kiemenspalte, in welchen

Hey1 ebenfalls exprimiert ist (Abb. 29C,D). Der zweite Kiemenbogen wächst über die kleineren dritten und vierten Kiemenbögen, bildet den cervikalen Sinus und schließlich den Thymuscortex, der in der Selektion der T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt.

Des Weiteren wurde Hey1 in den sich entwickelnden Zähnen, den Barthaarfollikeln und der Speicheldrüse nachgewiesen (Abb. 22D-F). Während der Zahnentwicklung ist die Hey1-Expression nach E14,5 Tagen (Kappenstadium) auf die mesenchymalen Zellen der Zahnpapille begrenzt. Im Glockenstadium (E17,5) sind Hey1-Transkripte außerdem im Odontoblasten und den knochenbildenden Zellen in der Umgebung der Zahnanlage nachweisbar. Während der Entwicklung der Barthaarfollikel ist Hey1 zunächst in den Mesenchymzellen, die an die sich einstülpenden Follikelplakoden angrenzen (nicht gezeigt), und später in Zellen der inneren Wurzelschicht exprimiert. In der Speicheldrüse ist Hey1 dagegen im sich verzweigenden Epithel zu finden. Hey1 ist in diesen Geweben also sowohl in Zellen mesenchymalen als auch epithelialen Ursprungs exprimiert.

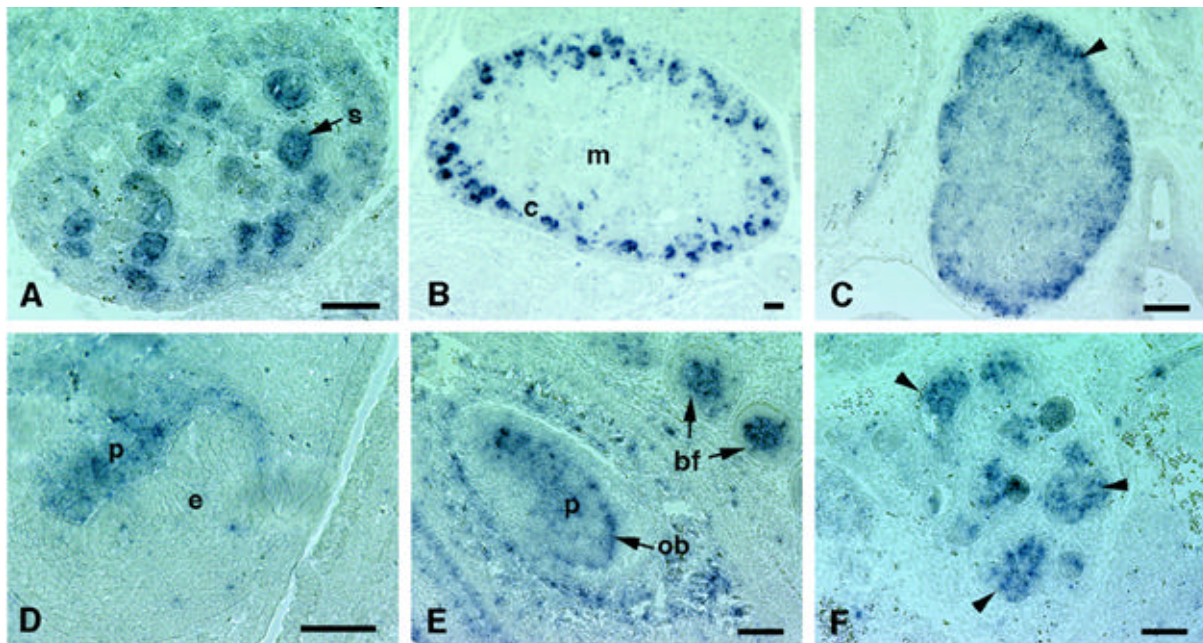


Abb. 22: Expression von Hey1 in Geweben mesenchymaler-epithelialer Interaktionen. (A,B) Querschnitte durch E14,5 und E17,5 Nierenanlagen. Hey1 ist in den epithelialen Nephronvorläufern exprimiert. (B) Im Stadium E17,5 ist die Expression auf diese unreifen Strukturen im corticalen Bereich beschränkt und fehlt in den reifen Nephronen. (C) Längsschnitt E14,5: Hey1 ist im Cortex des Thymus exprimiert (Pfeilspitze). (D) Während der Zahnentwicklung ist Hey1 im kondensierten Mesenchym der Zahnpapille des frühen Kappenstadium (E14,5) exprimiert. (E) Später (E17,5) ist Hey1 in der Papille und dem Odontoblast der Zahnanlage, sowie in den inneren Wurzelzellen der Barthaarfollikel zu finden. (F) Expression des Hey1-Gens im Epithel der Speicheldrüse (Pfeilspitze).

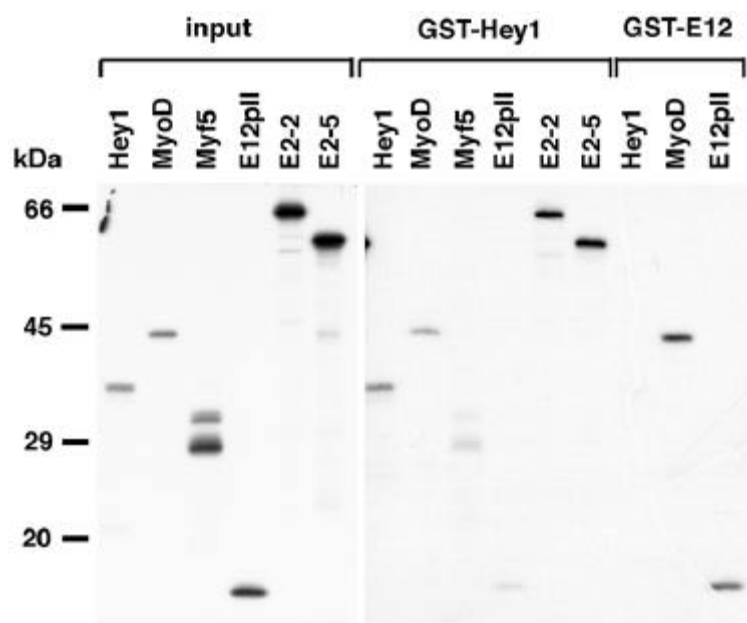
Abkürzungen: bf, Barthaarfollikel; c, Cortex; e, Epithel; m, Medulla; ob, Odontoblast; p, Papille. Größenbalken 100 μ m.

4.4.3 DNA- und Proteinbindung von Hey1

Hairy/E(spl)-verwandte Proteine sind transkriptionelle Repressoren, die diese Funktion durch zwei unterschiedliche Mechanismen ausüben: durch Heterodimerisierung mit gewebsspezifisch exprimierten bHLH-Proteinen über eine funktionelle Hemmung des komplexierten Bindungspartners oder durch sequenzspezifische Bindung an Promotorsequenzen und Hemmung der Transkription. bHLH-Proteine binden als Homodimere oder Heterodimere mit ubiquitär exprimierten bHLH-Proteinen an DNA. Während aktivierende, gewebsspezifisch exprimierte bHLH-Transkriptionsfaktoren an E-Box-DNA-Motive (CANNTG) binden, besitzen hairy- oder Hes-Proteine eine höhere Affinität für N-Box-Sequenzen (CACNAG) (Akazawa *et al.*, 1992, Ohsako *et al.*, 1994). Für diese veränderte DNA-Bindungsspezifität ist der charakteristische Prolinrest in der basischen Domäne verantwortlich.

Um einen Einblick in die Funktion der Hey-Proteine zu bekommen, wurden zunächst die Dimerisierungseigenschaften des Hey1-Proteins *in vitro* untersucht. Dazu wurde ein GST-Fusionsprotein von Hey1, welches die bHLH- und Orange-Domänen (Aminosäuren 50 – 200) enthält, hergestellt und die Bindung ³⁵S-markierter *in vitro*-translatierter Proteinen in pulldown-Experimenten getestet. Parallel dazu wurde die Bindung eines GST-Fusionsproteins von E12 an ³⁵S-markiertes E12 oder MyoD als Positivkontrolle verwendet. Wie in Abb. 21 zu sehen, bildet Hey1 Homodimere und Heterodimere mit E2-2 und E2-5. Diese Bindung ist so effektiv wie die in der Literatur beschriebene E12-Bindung an E12 oder MyoD. Weniger effizient interagiert Hey1 mit MyoD und sehr schlecht mit E12 oder Myf5. Hey1 bindet nicht an GST allein (nicht gezeigt).

Abb. 21: *In vitro* Analyse der Hey1-Dimerisierung mit anderen bHLH-Proteinen im GST-pulldown-Assay. Linke Spalte: 1 µl unprozessierte ³⁵S-markierte Proteine wurden als Input-Kontrolle aufgetragen. 5 µl ³⁵S-markierte Proteine wurden mit den angegebenen GST-Fusionsproteinen und Glutathion-Sepharose-Kügelchen inkubiert. An GST-Fusionsproteine gebundene Proteine wurden mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (rechte Spalte). Die gebundenen Proteine wurden sieben mal länger exponiert als die eingesetzten Proteine. Die Größen der Markerbanden in kDa sind auf der linken Seite angegeben. GST-Hey1 homodimerisiert und heterodimerisiert mit MyoD und den ubiquitären E2-2- und E2-5-Proteinen. Die Bindungseffizienz ist vergleichbar mit der von GST-E12 an E12 oder MyoD.



Zur Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von Hey1 wurden „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) mit *in vitro* translatierten Proteinen und radioaktiv markierten E- oder N-Box-Sequenzen durchgeführt. Obwohl Hey1 effektiv mit sich selbst oder E2-2 und E2-5 dimerisiert, bindet keiner dieser Komplexe an die getesteten E-Box und N-Box Sequenzen (Abb. 22). (Der Myosin-

Phosphocreatinkinase-Enhancer (MCK) und der Immunglobulin-Enhancer μ E5 enthalten E-Box-Sequenzen.) Kontrollexperimente mit bekannten Bindungspartnern (E12 und MyoD) und der entsprechenden Bindungssequenz (MCK-Enhancer) zeigten die erwarteten Protein-DNA-Komplexe.

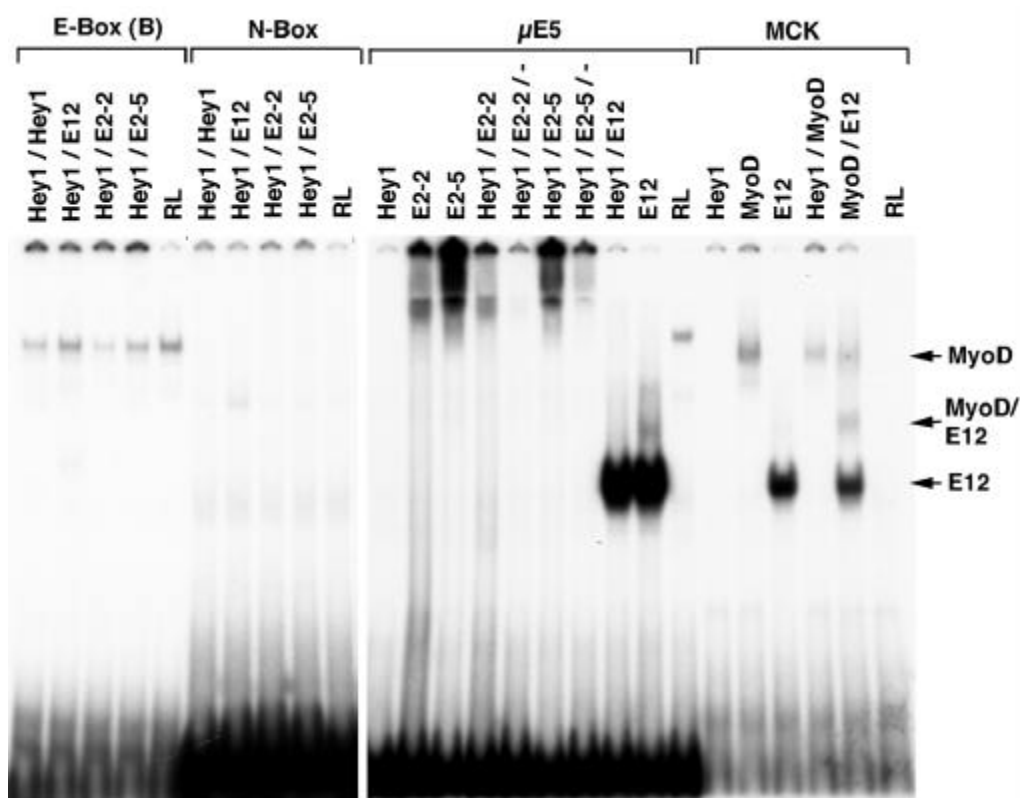
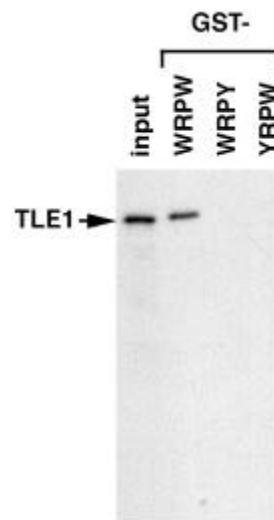


Abb. 22: DNA-Bindungsstudien des Hey1-Proteins. Oligonukleotide entsprechend publizierter E- bzw. N-Box-Motive (E-Box (B), N-Box, μ E5 und MCK) wurden zusammen mit verschiedenen *in vitro* translatierten Proteinen im EMSA untersucht. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde Retikulozytenlysate (RL) eingesetzt. In zwei Fällen wurde die Kompetierbarkeit der Bindungen durch 100-fachen Überschuß unmarkierter Oligonukleotide (-) getestet. Es konnten nur Protein-DNA-Komplexe von E12, MyoD, E2-2 und E2-5 beobachtet werden.

Hairy-verwandte Proteine rekrutieren groucho als Corepressor über die Bindung an das C-terminale WRPW-Motiv. Groucho oder seine Säugerhomologe TLE1-4/Grg1-4 können nicht selbst an DNA binden, sondern hemmen die Transkription durch Interaktion mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren. Auch Transkriptionsfaktoren der Runt-Familie rekrutieren groucho, allerdings über ein C-terminales VWRPY-Motiv (Aronson *et al.*, 1997). Um die groucho-Bindung des YRPW-Motivs von Hey1 zu untersuchen, wurden GST-Fusionsproteine mit den C-Terminus von Hey1 hergestellt (KPYRPWGTEIGAF). Zum Vergleich wurde YRPW gegen WRPW (hairy) oder WRPY (runt) ausgetauscht, die sich somit im Hey1-Kontext befinden. Die Bindungseigenschaften dieser Motive zu den humanen groucho-Homologen TLE1 und TLE2 wurden mit GST-pulldown-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß das WRPW-Motiv im Hey1-Kontext etwa 20% des 35 S-markierten TLE1 bindet. Die WRPY oder YRPW enthaltenden Peptide dagegen interagieren nicht mit TLE1. Ähnliche Ergebnisse wurden mit TLE2 erzielt, wobei die Bindung insgesamt weniger effektiv war (nicht gezeigt). Das YRPW-Motiv scheint also nicht für eine Bindung von groucho-verwandten

Corepressoren genutzt zu werden. Die fehlende Bindung von WRPY mag am stark veränderten Sequenz-Kontext liegen.

Abb. 23: GST-pulldown-Analyse der Interaktionen zwischen TLE1 und dem WRPW-Motiv im Hey1-Kontext. GST-Fusionen mit dem Hey1-C-Terminus (KPYRPWGTEIGAF) oder Peptiden, in welchen das YRPW in WRPW oder WRPY verändert wurde (GST-YRPW, -WRPW, -WRPY), wurden mit 5 μ l 35 S-markiertem TLE1 und Glutathion-Sepharose-Kügelchen inkubiert. Die Menge gebundenes TLE1 wurde mit 1 μ l 35 S-markiertem, unprozessiertem TLE1 (Input 20%) verglichen. Während ca. 20% TLE1 von GST-WRPW gebunden wird, interagieren GST-YRPW oder -WRPY nicht mit TLE1.



4.4.4 Genomische Lokalisierung bei Mensch und Maus

Die Lage eines Gens im menschlichen Genom kann ein Hinweis darauf sein, ob dieses Gen bei der Entstehung bestimmter Krankheiten oder Fehlbildungen eine Rolle spielt. Ebenso können durch Lokalisierung des Gens im Maus-Genom eventuell bekannte Mausmutanten aufgespürt werden. Zur Kartierung von Hey1 im menschlichen Genom wurde das Genebridge 4 Radiation Hybrid DNA Panel benutzt, das durch Fusion bestrahlter diploider menschlicher Fibroblasten mit Hamster Empfänger-Zellen hergestellt wurde (Gyapay *et al.*, 1996).

Ausgehend von der humanen Hey1-Nukleotidsequenz wurden Primer zur Amplifizierung eines 3'-gelegenen, 200 bp langen Hey1-DNA-Fragments hergestellt. Mit diesen Primern wurden alle Zellhybrid-DNAs des G4 Panels amplifiziert und die Ergebnisse mit Hilfe eines www-Servers des Whitehead/MIT Center for Genome Research (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) ausgewertet. Die PCR-Reaktionen wurden einmal wiederholt. In beiden Fällen wurde das menschliche Hey1-Gen auf Chromosom 8 im Abstand von 5.02 cR vom Marker GATA-P17889 lokalisiert, was der cytogenetischen Position 8q21.3 entspricht. In dieser Region sind bislang keine Krankheiten oder Fehlbildungen lokalisiert. Ein Hinweis auf Beteiligung des Hey1-Gens am Klippel-Feil-Syndrom konnte nicht bestätigt werden.

Der Bereich 8q21 im menschlichen Genom kann nicht eindeutig einer bestimmten Region im Mausgenom zugeordnet werden. Gene, die beim Menschen auf 8q21-22 lokalisiert sind, wurden bei der Maus auf den Chromosomen 3, 4 und 15 detektiert. Deshalb mußte mit Hilfe des EUCIB Maus „backcross“-Panels die genaue Position des murinen Hey1-Gens bestimmt werden. Diese Experimente wurden von Barbara Klamt durchgeführt, die das Maus Hey1-Gen auf Chromosom 3 zwischen den Markern D3Mit277 und D3Mit278 lokalisierte. Das Hey1-Gen liegt somit nahe des Centromers des murinen Chromosom 3. In dieser Region sind bislang keine Mausmutanten bekannt.

4.4.5 Identifizierung von zwei weiteren verwandten Genen

Durch Vergleich von Genbank-Sequenzen mit den einzelnen Protein-Domänen des Hey1-Gens wurden zwei verwandte Gene – Hey2 und HeyL (Hey like) – entdeckt. In beiden Fällen wurden Übereinstimmungen mit menschlichen BAC- oder PAC-Klon-Endsequenzen oder EST-Sequenzen gefunden. So konnten für Hey2 die Mensch I.M.A.G.E.-Klone 531909 (AA116067) und 279176 (N46845) sowie der Maus Klon 1261317 (AA855956) erworben und sequenziert werden. Bisher konnte so die gesamte codierende Region des menschlichen Hey2-Gens sequenziert werden, die eine starke Ähnlichkeit zu Hey1 und eine konservierte Struktur aufweist. Fast die gesamte codierende Region des murinen Hey2-Gens (mHey2) wurde mit degenerierten 5'-Primern, die mit dem CODEHOP Algorithmus erstellt wurden (Rose *et al.*, 1998), und einem aus EST-Sequenzen abgeleiteten 3'-Primer isoliert. Im Falle des HeyL-Gens gab es nur zwei humane EST- und genomische Sequenzen, die die bHLH- und Orange-Domänen umfaßten. Die Sequenz des entsprechenden Maus HeyL-Gens ist bislang nur ansatzweise ermittelt. Darüber hinaus gibt es keine Hinweise auf weitere eng mit Hey1, Hey2 oder HeyL verwandte Gene in den Datenbanken. Allerdings konnte in genomischen *Drosophila* DNA-Sequenzen ein verwandtes Gen (dHey) identifiziert werden. Unter Verwendung verschiedener Exon-Vorhersage-Programme und Sequenzvergleiche konnte in dem *Drosophila* P1 Klon DS06886 (AC00548) ein Gen mit drei Exons gefunden werden, das große Ähnlichkeit zu den Sequenzen der Hey1, Hey2 und HeyL Proteine aufweist und nahe legt, daß alle diese Gene von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen (Abb. 26). Die Aminosäure-Sequenzen der einzelnen Proteine sind am Aminoterminus sehr unterschiedlich. Dann folgt der hochkonservierte Bereich der bHLH und Orange Domänen, dem sich ein Abschnitt geringer Homologie anschließt. Alle Mitglieder der Hey-Genfamilie besitzen den charakteristischen Austausch des hairy/E(spl)/Hes-spezifischen Prolinrests gegen Glycin. Der Carboxyterminus ist ebenfalls konserviert. Interessanterweise ist das YRPW-Motiv im Maus-Hey2-Gen in YQPW umgewandelt und es fehlt vollständig in HeyL. Im Gegensatz zu dem WRPW-Motiv von hairy oder E(spl) sind auch flankierende Sequenzen konserviert, so daß man von einem KPYRPWG-Motiv sprechen müßte. Daran schließt sich eine bislang unbekannte, stark konservierte, TEIGAF oder TEVGAF Sequenz an, die aber nur in den Säugergenen vorkommt.

Sequenz- und phylogenetische Vergleiche der Hey-Proteine mit anderen bHLH-Proteinen gruppieren die Hey-Proteine in eine neue Unterfamilie, die zwar mit den bekannten hairy-/E(spl) und Hes-Proteinen verwandt ist, sich aber deutlich von ihnen unterscheidet (Abb. 27).

Die Computeranalysen der Hey-Gene wurden von Manfred Gessler, die PCR-Reaktionen von Barabara Klamt durchgeführt.

```

dHey      MDHNMHVNAPSLHHWGYAAGPGVVMFGATATTPQSHWVPP

mHey1     -----MKRAHPDYSSSDSELDETIEVEKESA-----DENGK
hHeyL     -----MKRPPK-EPSSGSDGESDGPIDVGQE-----GQ
dHey      PQSHHSAHSNHSHGHSQGHSHGIGSLKRTLSESDCDLYS

                                basic
mHey1     LSSALCSMSP--TSSQVLARKRRRGIIEKRRRDRINNSL
hHeyL     LSQMARPLST--PSSSQMQRKRRRGIIEKRRRDRINSSL
dHey      EESSKEQISESEFGSCQLMSRKKRRGVIEKRRRDRINSSL

                                helix-loop-helix
mHey1     SELRRLVPSAFEKQGS AKLEKAEILQMTVDHLKMLHTAGG
mHey2     -----KAEILQMTVDHLKMLQATGG
hHeyL     SELRRLVPTAFEKQGS SKLEKAEVLQMTVDHLKMLHATGG
dHey      TELKRLVPSAYEKQGS AKLEKAEILQLTVEHLKSLQSKTL

                                orange
mHey1     KGY-FDAHALAMDYRSLGFRECLAEVARYLSIIEG-LDAS
mHey2     KGY-FDAHALATDFMSIGFRECLTEVARYLSSVEG-LDPS
hHeyL     TGF-FDARALAVDFRSIGFRECLTEVIRYLGVLEGPSSRA
dHey      DSLSYDPQQRVAMDYHIIGFRECAAEVARYLVITIEG-MDIQ

                                orange
mHey1     DPLRVRLVSHLNNYASQREAAASGA-----HGGLGHIPWG
mHey2     DPLRVRLVSHLSTCASQREAAVMTSSMAHHHPPLPHPHWA
hHeyL     DPVRI RLLSHLNSYAAEMEPSPTP-----TGPLAFPAMP
dHey      DPLRLRLMSHLQYFVQRELSAKS-----CASP GGWSPAA

mHey1     -SAFGHHP-----HIAHPLLLPQNGHGNAGTAASP----
mHey2     -AAFHHLP-----TALIQPNGLHTSESTPCRLSTSSE---
hHeyL     WSLFHSCDGLPALSNQLAILGRVPSVPLPGVSSPAYP---
dHey      PSSSGYQP-----NCAAAPYQSYAAPANPGAYVSSYPTLS

mHey1     -TEPHHQGRILASAH----PEAPALR-APPSGGIG-----
mHey2     -VPSAHGSALLTATF---AHADSALRMPSSGGTVAPCVPP
hHeyL     -IPALRTAPLRRATG---IILPARNVLP SRGASSTRRAR
dHey      ASPSQQAQQLGGRISVSR TSGSAVTESLPSHDLHSDSSSQ

mHey1     -----PVLVP-----V
mHey2     STSL-----LSLSAT-----V
hHeyL     PLER-----PATPVP-----V
dHey      QQQQQQQQQQQQQQHQQQQHQQQQQRTQTTPQPTQQQHYT

mHey1     TSASKLS-----PPLLSSVASLSAFPFSF-SSFHLLSP--
mHey2     HAAAAAATAAAHSFPLSFAGAFPMLPSNAAAAA VAAAT-
hHeyL     APSSRAARSTHIAPLIQSSSPTPPGPTG--SAAYVAVPT-
dHey      HDHSAVHSEQQVPTYIELTNSNRPA AIGSDSLSYSAAPQY

                                'YRPW'  TEIGAF
mHey1     -----STPTQ AANLG--KPYRPWG--TEIGAF
mHey2     AIS-PPLSVSAASSPQQTSTGTNNKPYQPWG--TEVGAF
hHeyL     PNS-----SSPGPAGRPAGAMLYHSWVSEITEIGAF
dHey      PVSGLPGQDYNNSVLYQYATPNGAKPYRPWG--AEMAY

```

Abb. 26: Vergleich der Hey1-, Hey2-, HeyL- und dHey-Proteinsequenzen. Gemeinsame Sequenzabschnitte sind mit schwarzen Boxen gekennzeichnet. Der charakteristische Glycinrest in der basischen Domäne ist mit einem Stern markiert. Der Aminoterminus der murinen Hey2-Sequenz wurde noch nicht ermittelt.

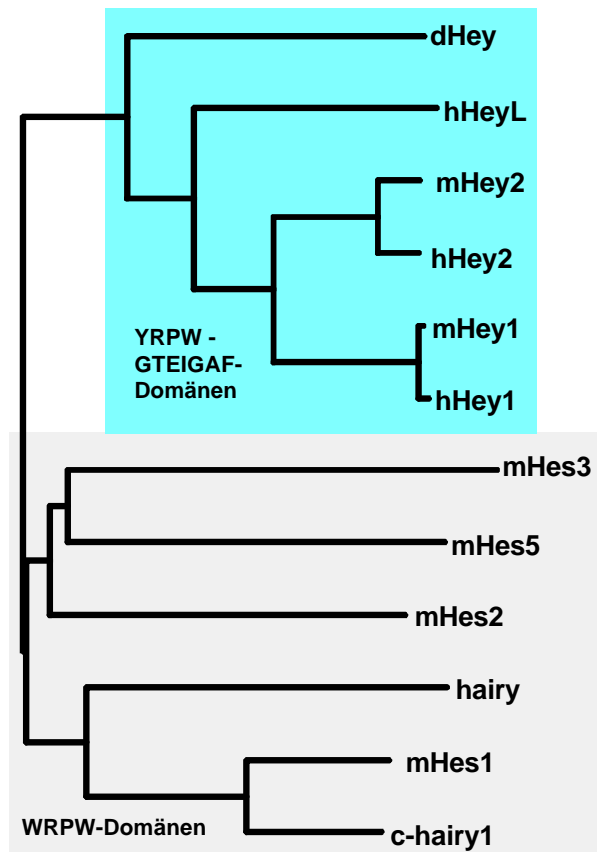


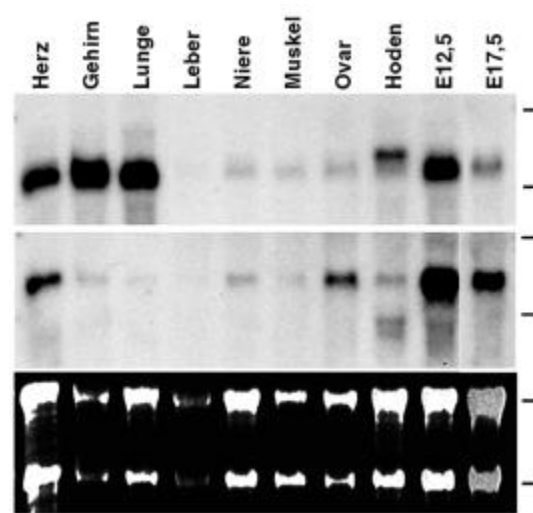
Abb. 27: Phylogenetischer Vergleich von Hey- und hairy-verwandten Genen. Der Baum wurde mit dem ClustalX-Programm konstruiert. Die Hey-Gene bilden eindeutig eine neue Unterfamilie von Genen, die zwar den hairy/E(spl)/Hes-Genen am ähnlichsten sind, sich aber deutlich von ihnen unterscheiden. Andere Programme wie z.B. Phylip oder Puzzle konstruierten ähnliche Bäume.

4.4.6 Vergleichende Expressionsanalyse der murinen Hey1- und Hey2-Gene

4.4.6.1 Northern Blot Analyse der Hey1- und Hey2-Expression

Die gewebespezifische Verteilung der Hey1- und Hey2-Gene wurde mit Northern Blot Analyse von Gesamt-RNA aus ganzen Maus-Embryonen (E12,5 und E17,5) oder adulten Maus-Organen untersucht (Abb. 28). Das Hey1-Gen ist besonders stark im E12,5-Embryo, sowie im adulten Gehirn, Lunge und Herz exprimiert. Deutlich geringere Transkriptmengen sind im E17,5-Embryo und der adulten Niere, Muskel, Ovar und Hoden nachweisbar. Im Hoden ist außerdem ein zusätzliches längeres Transkript zu beobachten. Im Vergleich dazu, ist das Hey2-Gen im E12,5- und E17,5-Embryo sowie im adulten Herz am stärksten exprimiert. Dagegen wurden nur geringe Mengen im adulten Gehirn, Lunge, Niere, Muskel und Hoden detektiert. Das Hey2-Gen besitzt zwei weitere kleinere Transkripte im adulten Hoden. Hey1 und Hey2 werden nicht in der adulten Leber exprimiert, was durch Hybridisierung eines weiteren Northern Blots geprüft wurde, der größere Mengen Leber-RNA enthielt (nicht gezeigt). Demzufolge sind beide Gene in etwa den gleichen Geweben exprimiert, aber zum Teil in sehr unterschiedlichen Mengen.

Abb. 28: Northern Blot Analyse der Hey1- und Hey2-Expression in ganzen Embryonen und adulten Organen. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurde mit der Hey1-cDNA hybridisiert (obere Reihe). Derselbe Blot wurde mit einer 3'-Probe von Hey2 hybridisiert (mittlere Reihe). Zur Dokumentierung von Beladungsdifferenzen ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel darunter gezeigt. Beide Gene sind in E12,5-Embryonen stärker exprimiert als in E17,5-Embryonen. Hey1 ist besonders stark in adultem Gehirn und Lunge vertreten, wo Hey2 kaum detektierbar ist. Beide Gene zeigen eine starke Expression im adulten Herzen und geringe Expression in Niere und Muskel. Hey1 ist stärker im Hoden, Hey2 im Ovar exprimiert, wobei beide Gene zusätzliche Transkripte im Hoden besitzen.



4.4.6.2 Expressionsmuster von Hey1 und Hey2 während der frühen Maus-Embryogenese

Das Expressionsmuster von Hey1 und Hey2 während der Maus-Embryogenese zwischen den Stadien E8,5 und E12,5 wurde mit RNA *in situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen untersucht (Abb. 29). Beide Gene zeigten ein breites aber spezifisches und dynamisches Verteilungsmuster während der Segmentierung, der neuronalen Entwicklung und der Organogenese.

In allen hier analysierten Stadien waren beide Gene in den Somiten und dem Herz zu finden (siehe Kap. 4.4.6.3 und 4.4.6.5). Zwischen E8,5 und E9,0 ist Hey1 zusätzlich in der Allantois, der noch paarigen dorsalen Aorta und der ersten Kiemenspalte exprimiert. Einen Tag später wurden Transkripte auch in der neu gebildeten zweiten Kiemenspalte, den Nasenplakoden, den Ohrbläschen, der Basalplatte des Neuralrohrs, dem Vorderhirn und dem Septum transversum nachgewiesen. Im Stadium E10,5 ist Hey1 am auffälligsten in den Kiemenspalten, dem Telencephalon, dem sich einstülpenden Nasenepithel und den Extremitätenknospen exprimiert. Die Hey1-Expression ist einen Tag später weiterhin in der Wachstumszone der Extremitäten, den beiden lateralen Ventrikeln (Telencephalon) und den Kiemenspalten zu beobachten. In diesem Stadium ist Hey1 auch in Muskelvorläufern, den Spinalnerven und der Gesichtsregion exprimiert. In E12,5-Embryonen ist ein starkes Hey1-Signal in den Barthaarfollikeln, dem Telencephalon, der oberen Rautenhirn-Lippe und den Extremitäten zu beobachten.

Hey2 ist zwischen E8,5 und E10,5 mit Hey1 in den sich bildenden Somiten und den Ohrbläschen coexprimiert. Hey2 wurde zusätzlich im distalen Bereich des ersten Kiemenbogens und der Genitalpapille detektiert. Ab Tag 10,5 und besonders deutlich in den beiden folgenden Tagen, ist Hey2 Transkription in den Spinalnerven, den cranialen Ganglien und dem Telencephalon zu beobachten. Im Stadium E11,5 zeigt Hey2 ein besonders auffälliges Expressionsmuster in der Gesichtsregion. Hier ist der distale Bereich des Maxillaanteils des ersten Kiemenbogens, eine Linie entlang des Mandibularbogens und der Bereich um die laterale Nasenwulst gefärbt. Außerdem wird Hey2 in diesem Stadium an der Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze beobachtet. In den Extremitäten ist Hey2 nur auf einen kleinen Bereich am posterioren Ende der Hand- bzw. Fußfläche konzentriert. Am Tag 12,5 schließlich ist Hey2 in den Spinalnerven, dem Telencephalon und in der Gesichtsregion exprimiert. In letzterer ist die Hey2-Färbung, die die Barthaarfollikel ausspart, exakt komplementär zu der des Hey1-Gens.

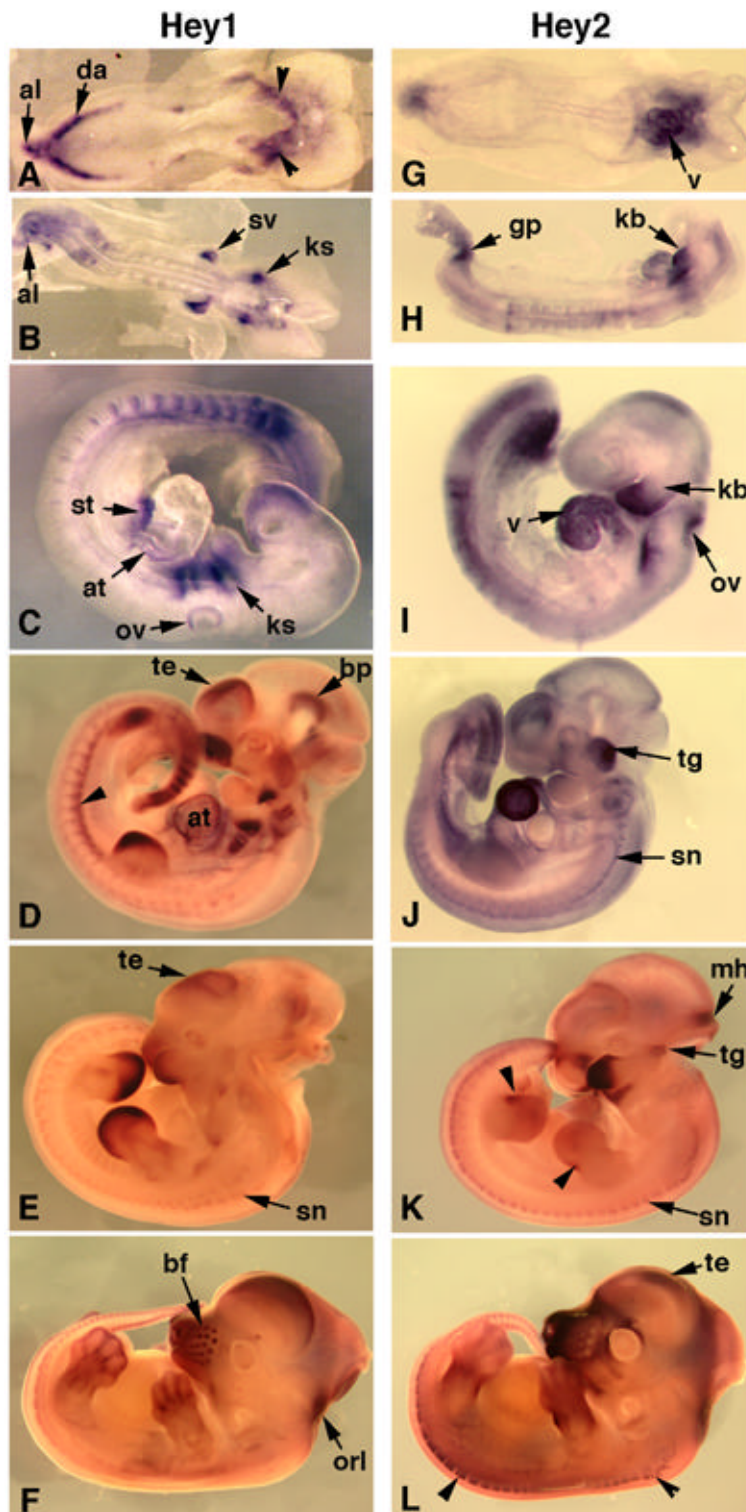


Abb. 29: Expression von Hey1 und Hey2 in ganzen Mausembryonen zwischen E8,5 und E12,5. **(A-F)** Hey1-Expression. **(A)** E8,5: Expression in der Allantois (al), der dorsalen Aorta (da) und den Herz-Vorläufern (Pfeilspitzen). **(B)** E9,0: Signale im Sinus venosus (sv) des sich entwickelnden Herzens und den Epithelien der ersten Kiemenspalte (ks). **(C)** E9,5: Hey1 ist stark exprimiert in den Kiemenspalten (ks), dem Ohrvesikel (ov), dem Septum transversum (st), dem Atrium (at) und den Somiten. **(D)** E10,5: Hey1-Färbung im Telencephalon (te), den sich einstülpenden Nasengruben, der Bodenplatte des Mesencephalons (bp), den Kiemenspalten, dem Atrium (at) und der Wachstumszone der Extremitätenknospen. **(E)** E11,5: Expression in der Gesichtregion, dem Telencephalon (te), den Spinalnerven (sn), den

differenzierenden Somiten und den Extremitäten. **(F)** E12,5: Hey1 ist zusätzlich in den Barthaarfollikeln (bf) und der oberen Rautenhirn-Lippe (orl) exprimiert. **(G-L)** Hey2-Expression. **(G)** E8,5: starke Hey2-Expression im Ventrikel des Herzens (v). **(H)** E9,0: Hey2 ist ebenfalls in den Somiten und dem ersten Kiemenspalte (kb). **(I)** E9,5: Hey2 ist zusätzlich im Ohrvesikel (ov) zu finden. **(J)** E10,5: Hey2 ist besonders stark im Trigemininalganglion (tg) und den Spinalnerven (sn) des PNS exprimiert. **(K)** E11,5: zusätzlich zu diesen Strukturen wird Hey2 an der Mittelhirn/Hinterhirn-Grenze (mh) und in den Extremitäten beobachtet. In der Gesichtregion ist es distal im Maxillarbogen, entlang des Mandibularbogens und lateral zu den Nasenwülsten exprimiert. **(L)** E12,5: starke Hey2-Expression um die Barthaarfollikel, in den Spinalnerven (Pfeilspitzen), dem Telencephalon, Teilen des Mittelhirns und rostralen Hinterhirns sowie den Extremitäten.

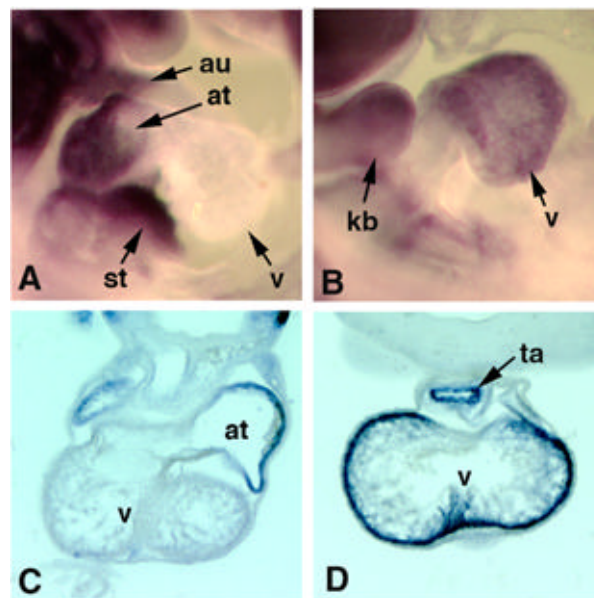
4.4.6.3 Komplementäre Expression von Hey1 und Hey2 während der Herzentwicklung

Das erste in Vertebraten gebildete Organ ist das Herz. Cardiogene Vorläuferzellen entstehen beiderseits des Embryos im viszeralem Mesoderm und bilden einen hufeisenförmigen Plexus. Sie wandern zur ventralen Mittellinie und es entsteht zunächst ein Herzschlauch, der sich verlängert, zur Herzschleife krümmt und schließlich ein Herz mit zwei Vorhöfen sowie zwei Kammern (Ventrikel) bildet.

Hey1 und Hey2 sind bereits am Tag E8,5 – dem ersten analysierten Zeitpunkt – in den cardiogenen Vorläuferzellen komplementär exprimiert (Abb. 29A,G). Die Hey1 Expression ist auf den sich entwickelnden Einfluß- und Ausflußtrakt, sowie die Vorhof-Vorläuferzellen begrenzt (Abb. 30A).

Hey2 dagegen ist im Ventrikel exprimiert (Abb. 30B). An Vibratomschnitten, die von den gefärbten Embryonen angefertigt wurden, konnte die Expression beider Gene in der jeweiligen Myokard-Schicht gezeigt werden (Abb. 30C,D). Hey1 und Hey2 sind nicht nur während der gesamten Herzentwicklung sondern auch im adulten Herz (Kap. 4.4.6.1) stark exprimiert.

Abb. 30: Komplementäre Expression von Hey1 und Hey2 im embryonalen Herz. (A,B) Hybridisierung ganzer E9,5-Embryonen, rechte Seite. (A) Hey1 ist im Atrium (at) und dem Ausflußtrakt des Herzens exprimiert, wohingegen (B) Hey2 im Ventrikel (v) zu finden ist (kb, Kiemenbogen; st, Septum transversum). (C,D) Vibratom-Querschnitte von E10,5-Embryonen nach Hybridisierung mit Hey1 oder Hey2. (C) Hey1 ist im Myokard des Atriums, (D) Hey2 des Ventrikels exprimiert (ta, Truncus arteriosus).



4.4.6.4 Expression von Hey1 und Hey2 in der Neurogenese

Hairy- und E(spl)-verwandte bHLH-Proteine spielen bei der Zell-Determinierung im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) eine wichtige Rolle. Sie hemmen die Neurogenese indem sie die Expression der proneuralen bHLH-Gene der achaete-scute- oder atonal-Familie unterdrücken. Die Hes-Gene sind während der Entwicklung des Nervensystems spezifisch exprimiert und sie kontrollieren den zeitlichen Ablauf der Neurogenese, was durch gezieltes Ausschalten des Hes1-Gens gezeigt wurde (Ishibashi *et al.*, 1995). Wie die Hes-Gene, so zeigen auch Hey1 und Hey2 spezifische Expressionsmuster im zentralen und peripheren Nervensystem (Abb. 31). Im Allgemeinen ist Hey1 stärker im ZNS, Hey2 stärker im PNS exprimiert.

Hey1 ist in der Bodenplatte des Neuralrohrs zwischen E9,5 und E12,5 nachweisbar. Die Expression erstreckt sich von der Schwanzspitze bis zur Grenze zwischen Mittelhirn und Vorderhirn. Sie beschränkt sich in späteren Stadien auf noch teilungsfähige Zellen in der Ependymschicht (nicht gezeigt). Durch Hybridisierung von Paraffinschnitten und Schneiden gefärbter Embryonen wurde festgestellt, daß das Hey1-Signal in der Gehirnregion zu beiden Seiten der Bodenplatte lokalisiert ist. Hey1 ist außerdem im dorsalen Bereich des Telencephalons exprimiert. Mit der Entstehung verschiedener Zellschichten wird die Hey1-Expression hier auf die ventrikuläre Schicht proliferierender Zellen begrenzt. Darüber hinaus ist Hey1 zunächst in der oberen Rautenhirn-Lippe und später im daraus entstehenden Cerebellum (Kleinhirn) exprimiert. Auch hier ist es zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt (E15.5) in der proliferierenden äußeren Zellschicht zu finden. Im Gegensatz zu Hey2 ist Hey1 besonders stark im adulten Gehirn exprimiert.

Hey2 wird wie Hey1 zunächst im Telencephalon detektiert, wo es aber später in der äußeren Matrixschicht der Großhirnrinde dominiert. Zum Zeitpunkt E11,5 ist Hey2 an der Mittelhirn-Rautenhirn-Grenze exprimiert und einen Tag später in Teilen des Mittelhirns und dem anterioren Rautenhirn. Danach nimmt die Expression von Hey2 im Gehirn ab. Im PNS zeigt Hey2 dagegen ein ganz auffälliges Expressionsmuster in den Spinalnerven und in den cranialen Ganglien während der gesamten Entwicklung. Weiterhin wurden Hey2-Transkripte im sympathischen Grenzstrang, in den sympathischen Ganglien und den Ganglien, die sensorische Organe innervieren, gefunden. Nach längerem Färben konnte auch eine schwache Expression von Hey1 in einigen dieser Strukturen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zusätzlich wurden Hey1- und Hey2-mRNAs in sensorischen Organen detektiert. Hey1 ist bereits in den Nasenplakoden und im einwandernden Nasenepithel exprimiert. Entsprechend ist es später im Riechepithel und dem Epithel des vomeronasalen Organs (VNO) zu finden. Hey2 wird erst im bestehenden Riechepithel und VNO exprimiert. Das VNO oder Jakobsons Organ entsteht wie das Riechepithel aus dem einwandernden Nasenepithel, allerdings aus dem medialen Anteil. Es ist ein chemosensorisches Organ für Pheromone, die den Reproduktionsstatus und das Sexualverhalten regulieren. Während Hey1 in der äußeren nicht-neuronalen Stüttschicht beider Epithelien zu finden ist, ist Hey2 im intermediären Bereich lokalisiert, wo sich differenzierte Neuronen und auch Stützzellen befinden. Keines der Gene ist in der basalen Zellschicht exprimiert, die aus teilungsfähigen Zellen besteht und der ständigen Erneuerung des Epithels dient.

Beide Gene sind im Ohrbläschen und später im Cochlea-Epithel, aber nur Hey2 zusätzlich im Cochlea-Ganglion, zu finden. In der neuronalen Retina und den Linsenfaserzellen sind Hey1 und Hey2 allerdings erst in späteren Entwicklungsstadien, nicht aber in optischer Plakode oder Vesikel nachweisbar.

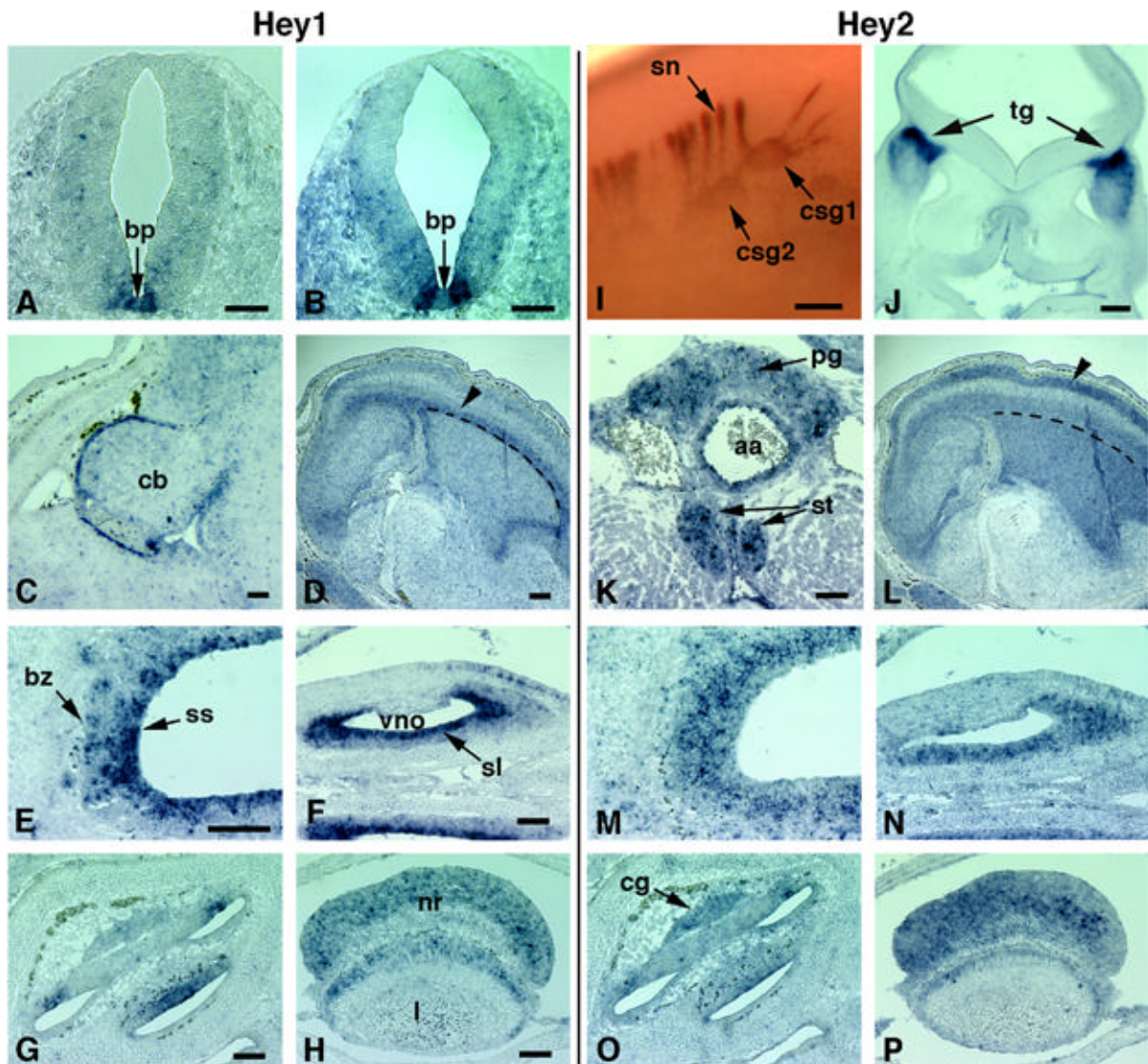


Abb. 31: Vergleich der Expression von Hey1 und Hey2 in der Neurogenese. (A) E10,5: im caudalen Neuralrohr ist Hey1 in der Bodenplatte (bp), (B) in rostralen Schnitten zu beiden Seiten des Neuralrohrs exprimiert. (C,D) E15,5: im sich entwickelnden Gehirn ist Hey1 auf die ventrikuläre Zone des Cerebellums (C, cb) und des cerebralen Cortex (D, Pfeilspitze) begrenzt. (L) Analyse eines benachbarten Schnittes zeigt, daß Hey2 stärker in der äußeren Matrixzone des cerebralen Cortex exprimiert ist. Die gestrichelten Linien in D und L markieren die kollabierten Ventrikel. (I) Vergrößererte Ansicht der Expression von Hey2 in den Spinalnerven und Ganglien zum Zeitpunkt E12,5 (csg1 und 2, cervikale Ganglien). (J) Coronaler Vibratomeschnitt eines mit Hey2 hybridisierten E10,5-Embryos zeigt die starke Expression in den Trigeminalganglien (tg). (K) E17,5, Querschnitt: Hey2 ist auch im sympathischen Strang (st), der abdominalen Aorta (aa) und dem präaortischen Abdominalganglion exprimiert (pg). Im Riechepithel (E,M) und dem Vomeronasalen Organ (vno, F,N) zeigen Hey1 und Hey2 im Stadium E17,5 eine komplementäre Expression. Hey1 ist in der Stüttschicht (ss) und Hey2 in differenzierenden Neuronen zwischen Stüttschicht und basaler Zellschicht (bz) exprimiert. (G,O) Hey1 und Hey2 sind im Cochlea-Epithel, aber nur Hey2 im Cochlea-Ganglion (cg) des Innenohrs zu finden. (H,P) Im Auge sind beide Gene in der neuralen Retina (nr) und den degenerierenden Linsenfibrillen (l) exprimiert. Größenbalken in A,B,E-H,K 100 µm; in C,D,I,J 200 µm.

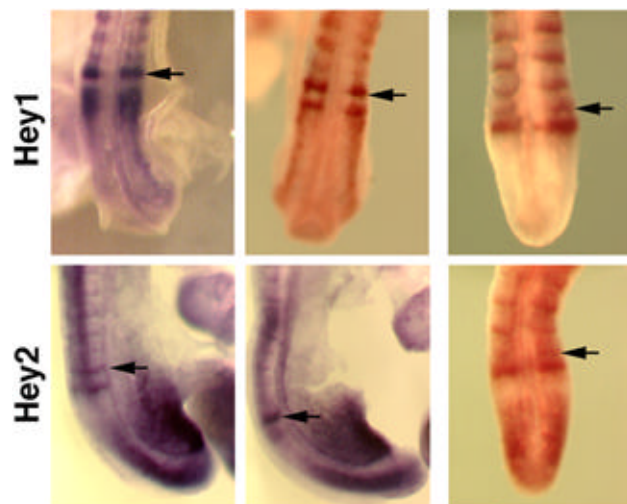
4.4.6.5 Hey1 und Hey2 Expression während der Somitogenese

Somiten werden vom präsomitischen Mesoderm (PSM) auf beiden Seiten des Neuralrohrs gebildet, indem zunächst Zellkondensate entstehen, die sich dann abgrenzen und vorübergehend einen epithelialen Zellverband bilden. Ähnlich wie in der Nephrogenese findet hier also Zellkondensation und mesenchymale-epitheliale Umformung statt. Sowohl epithelialisierte Somiten als auch kondensierte Somitomeren kurz vor der Segmentierung besitzen eine Unterteilung in eine anteriore (rostrale) und eine posteriore (caudale) Hälfte, die sich in Genexpression und Zelleigenschaften unterscheiden.

4.4.6.5.1 Expression während der Somitogenese in der Maus

Die Expression von Hey1 und Hey2 während der murinen Somitogenese wurden durch RNA *in situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen untersucht (Abb. 32). Transkripte beider Gene wurden im PSM und der posterioren Hälfte neu gebildeter Somiten lokalisiert. Im PSM ist Hey1 nur in der anterioren Region in Form eines Bands zu beiden Seiten des Neuralrohrs zu beobachten. Dieses Band ist entweder breit oder auf die Größe eines Halb-Segments kondensiert, was auf eine dynamische Expression von Hey1 in diesem Bereich hinweist. In den Somiten ist Hey1 in der caudalen Hälfte exprimiert, wobei das Signal am stärksten in den zuletzt gebildeten Somiten ist. Die Hey2-Expression überlappt mit Hey1 in den Somiten und zum Teil auch im PSM. In letzterem ist Hey2 allerdings auch in der caudalen Hälfte zu finden.

Abb. 32: Expression von Hey1 und Hey2 in der murinen Somitogenese. *In situ* Hybridisierung von Mausembryonen E9,5 (A,B,D,E) und E12,5 (C,F). Die caudale Grenze des zuletzt gebildeten Somiten ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (A,B, dorsal) Hey1 ist in der caudalen Hälfte der Somiten, besonders stark aber im gerade entstehenden Somiten exprimiert. Im rostralen PSM sind zwei Stadien zu beobachten: (A) ein breites Expressionsband, das kondensiert (B) bevor sich ein neuer Somit bildet. (D,E, lateral) Hey2 ist zusätzlich in der im caudalen PSM exprimiert. (C,F) Die Expression von Hey1 und Hey2 ist auch in entsprechenden Dorsalansichten von E12,5-Embryonen zu beobachten.

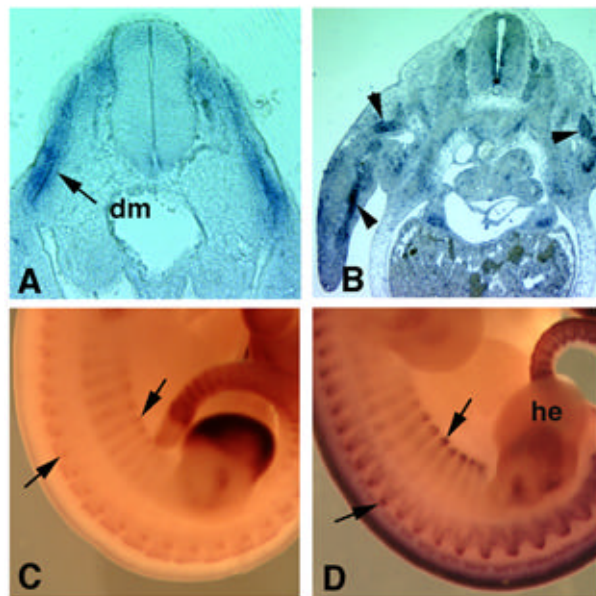


4.4.6.5.2 Expression von Hey1 in Skelettmuskelvorläufern

Kurz nach der Bildung der Somiten wird der epitheliale Zellverband im ventralen Bereich zu einem netzartigen mesenchymalen Gewebeverband umgeformt, der als Sklerotom bezeichnet wird und später die Wirbelsäule bildet. Das dorsale Dermomyotom dagegen bleibt zunächst epithelial und enthält das

Ausgangsmaterial für Dermis und Myotom. Der dorsomediale Bereich des Myotoms bildet dann die epaxiale Muskulatur (dorsale Rückenmuskulatur), der ventrolaterale Anteil die hypaxiale (ventrale Leibeswand) und die Extremitäten-Muskulatur. Hey1-Transkripte werden zum Zeitpunkt E10,5 im Dermomyotom und ab E11,5 in den davon abwandernden Extremitäten-Muskelvorläuferzellen detektiert (Abb. 33). Im Dermomyotom am Tag 11,5 ist Hey1 hauptsächlich in der ventrolateralen Hälfte exprimiert. Im dorsomedialen Bereich ist Hey1 nur am äußersten Ende nachweisbar. Zum Vergleich wurden Mausembryonen mit einer Pax3-Probe hybridisiert, einem Marker für Dermomyotom und Extremitäten-Muskelvorläufer. Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Expressionsmuster von Hey1 und Pax3 in diesen Zellpopulationen überlappen.

Abb. 33: Expression von Hey1 im Dermomyotom und der Extremitäten-Muskulatur. (A) Vibratonschnitt von E10,5-Embryonen hybridisiert mit Hey1 zeigt eine Färbung im Epithel des Dermomyotoms (dm). (B) E11,5: die Pfeilspitze zeigt die Expression von Hey1 in Muskelvorläufern der Extremitäten. (C,D) E11,5: posteriore Hälfte von Embryonen hybridisiert mit Hey1 bzw. Pax3. Beide Gene sind besonders stark in der ventrolateralen Hälfte der Somiten exprimiert, die zur hypaxialen Muskulatur differenziert, und in den Extremitäten-Muskelvorläufern.



4.4.6.5.3 Expression während der Somitogenese im Hühnchen

Auf die Frage, wie Zellen im PSM in Segmenteinheiten unterteilt werden, wurde 1997 mit der Entdeckung eines dynamischen Expressionsmusters des hairy-verwandten *c-hairy1* Gens im Huhn ein entscheidender Hinweis gegeben (Palmeirim *et al.*, 1997). Die Expression von *c-hairy1* im PSM ist zyklisch mit einer Periodizität entsprechend der Bildung eines neuen Somitenpaares (90 min im Huhn, 2 h in der Maus) und verläuft wie eine Welle von caudal nach rostral. Das deutet auf ein intrinsisches Uhrwerk im PSM hin, das die Segmentierung kontrolliert. Kürzlich wurde auch für das Lunatic fringe-Gen ein solches dynamisches Expressionsmuster in Huhn und Maus nachgewiesen.

Da sowohl Hey1 als auch Hey2 im PSM der Maus exprimiert sind, sollte untersucht werden, ob die Expression zum einen dynamisch und zum anderen ähnlich der des *c-hairy1* Gens ist. Dazu wurden zunächst Teile der entsprechenden Huhngene *c-Hey1* und *c-Hey2* mit RT-PCR aus embryonaler Huhn mRNA amplifiziert, in den pBluescript KS-Vektor kloniert (wurde von Barbara Klamt und Manfred Gessler durchgeführt) und für die Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Proben verwendet. Die Expression beider Gene in der Somitogenese wurde jeweils in einer großen Anzahl (ca. 60) Hühnerembryonen der Stadien HH12 bis HH15 (nach Hamburger-Hamilton) untersucht. Zum Vergleich wurden auch Embryonen mit einer *c-hairy1*-Probe hybridisiert.

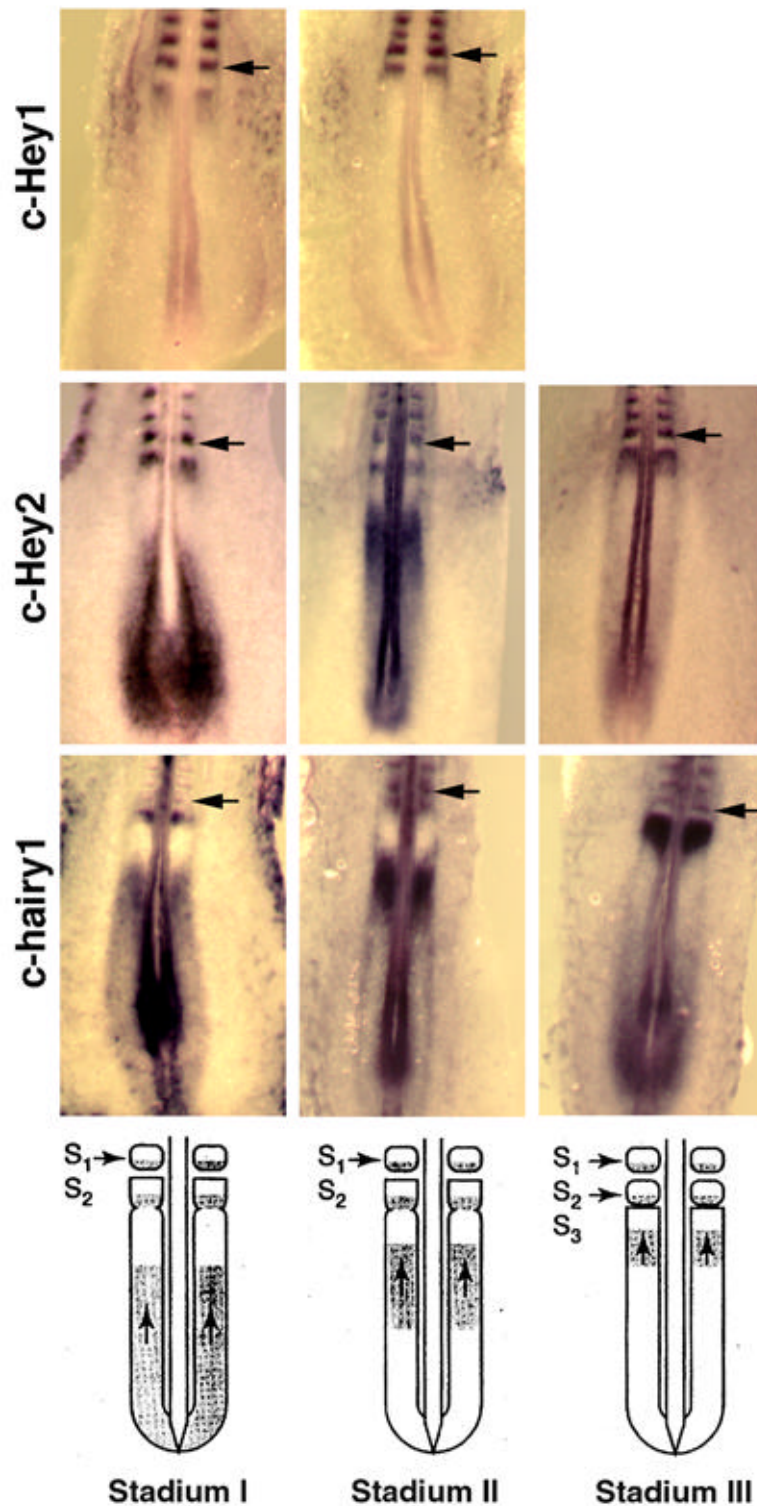


Abb. 34: Expression von c-Hey1 (A, B) und c-Hey2 (C-E) im Vergleich zu c-hairy1 (F-H) während der Huhn-Somitogenese. (A, B) Wie in Mausembryonen ist c-Hey1 nur im rostralen PSM in zwei Phasen exprimiert. (C-E) c-Hey2 zeigt dagegen eine dynamische Expression im PSM, die ebenso wie die c-hairy1 Expression (F-H) in drei Stadien eingeteilt werden kann. **Stadium I:** eine große caudale Expressionsdomäne im PSM; das rostrale Signal entspricht der restlichen Expression der vorhergehenden „Welle“. **Stadium II:** das caudale Signal ist zu einem breiten, mittleren Band verschoben, während das rostrale Signal verschwunden ist. **Stadium III:** im rostralen PSM wird der nächste Somite gebildet. Eine neue caudale Expression erscheint und das vorhergehende Signal ist im rostralen PSM kondensiert worden. **Unterste Reihe:** Schematische Darstellung der drei Stadien der c-hairy1-Expression.

Wie in Abb. 34 zu sehen, konnte für *c-hairy1* das beschriebene Expressionsmuster beobachtet werden. Darüber hinaus wurden auch für *c-Hey2* alle drei Stadien der Expression im PSM gefunden. Eine große caudale Expressionsdomäne im PSM wird nach rostral verlagert und wird dabei schmaler, während im äußersten rostralen Bereich das nächste Somitenpaar gebildet wird. Sobald das vorhergehende caudale Expressionsband zu einem rostralen Streifen kondensiert ist, erscheint eine neue caudale Expressionsdomäne. Dabei fiel auf, daß sich der größte Teil der untersuchten Embryonen in Stadium II befinden und nur ein viel geringerer Teil in den Stadien I und III. Diese Verteilung wurde kürzlich auch von Aulehla und Johnson (1999) für die Lunatic fringe-Expression beobachtet, die ein Verhältnis von 50 : 25 : 25 der einzelnen Stadien beschrieben. *C-Hey1* ist dagegen nur im rostralen PSM exprimiert, wo es ebenfalls in variablen Expressionsdomänen beobachtet wird. Wie in der Maus ist entweder ein breites Band oder ein auf die Größe eines Halb-Segments kondensiertes Band gefärbt. *c-Hey1* ist jedoch nicht im caudalen PSM exprimiert.

4.4.7 Untersuchung der Expression von Hey1 und Hey2 in Dll1-Mausmutanten

Genetische Studien in der Maus weisen auf eine entscheidende Rolle des Delta-Notch-Signaltransduktionswegs bei der Somitogenese hin. Mutationen in daran beteiligten Genen wie *Notch1*, *Dll1* (Delta-like1), *Dll3* (Delta-like3), *RBP-Jκ* (recombination signal sequence binding protein for *Jκ* genes), *Presenilin-1* und *L-fng* (Lunatic fringe) beeinflussen die Somitenbildung (Barrantes *et al.*, 1999). Von diesen ist nur *Dll1* wie *Hey1* und *Hey2* in der caudalen Hälfte der Somiten exprimiert. *Dll1*-Transkripte sind ebenfalls in sich aktuell bildenden Somiten und im gesamten PSM vorhanden (Bettenhausen *et al.*, 1995). Hier überlappen auch einige andere der oben erwähnten im Delta-Notch-Signalweg agierenden Gene mit *Hey1* oder *Hey2*. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit der *Hey*-Gene zu *E(spl)*- oder den *Hes*-Genen könnten sie wie *Hes1* und *Hes5* über den Delta und Notch reguliert werden. Daher sollte die Expression von *Hey1* und *Hey2* in Mausembryonen, welchen das *Dll1*-Gen fehlt (*Dll1*^{-/-}), untersucht werden. Diese Mutanten bilden keine Somiten im Schwanz und die Segmente im Rumpf haben eine ungeordnete Gestalt. Daraus abgeleitete Strukturen wie Myotom und Sklerotom verlieren ebenfalls ihre segmentartige Anordnung. Spinalnerven und Ganglien fusionieren dadurch und verlaufen ungeordnet. Die Embryonen sterben etwa zum Zeitpunkt E12,5 *in utero* durch starke Hämorrhagie (Hrabe de Angelis *et al.*, 1887). Deshalb wurde die Expression von *Hey1* und *Hey2* in *Dll1*^{-/-} Embryonen der Stadien E9,5 bis E11,5 untersucht und mit der in normalen *Dll1*^{+/+} Embryonen verglichen.

Bereits bei E9,5-Embryonen wird deutlich, daß die Expression von *Hey1* und *Hey2* in den Somiten und im PSM der *Dll1*^{-/-} Mutanten betroffen ist. Andere Gewebe wie Herz, Kiemenspalten oder -bögen, Neuralrohr und Ohrbläschen zeigen jedoch das für das entsprechende Gen typische Expressionsmuster (nicht gezeigt). In späteren Stadien ist auch die Expression von *Hey1* und *Hey2* in den Spinalnerven gestört. Wie in Abb. 35 für das Stadium E11,5 gezeigt, scheint die Expression von *Hey1* in allen Geweben außer den Somiten und den Spinalnerven unverändert zu sein. Im Schwanz ist keine Färbung zu sehen (Abb. 35C). In den differenzierteren Somiten des Rumpfes kann allerdings nicht eindeutig festgestellt werden, ob die *Hey1*-Expression fehlt oder auf die ungeordnet verlaufenden Somiten verteilt und damit nicht abgrenzbar ist. Das dorsal verlaufende *Hey1*-Signal in der caudalen Körperhälfte könnte wie auch bei *Hey2* (Abb. 35D) die Spinalnerven markieren, welche nicht mehr segmentartig angeordnet sind. Im Gegensatz zu *Hey1* zeigt *Hey2* allerdings ein Signal im caudalen

PSM. Es konnte damit gezeigt werden, daß Hey1 wie Hes5 im PSM und eventuell auch den Somiten nicht exprimiert, d.h. direkt oder indirekt von Dll1 abhängig ist. Hey2 dagegen ist zumindest im PSM unabhängig von Dll1 exprimiert. Darüber hinaus ist die Expression von Hey1 im Neuralrohr und im Telencephalon der Dll1^{-/-} Mutanten nicht verändert. Dll1 ist normalerweise im gesamten ZNS exprimiert, was auf eine von Dll1 unabhängige Regulation von Hey1 in diesen Geweben schließen läßt.

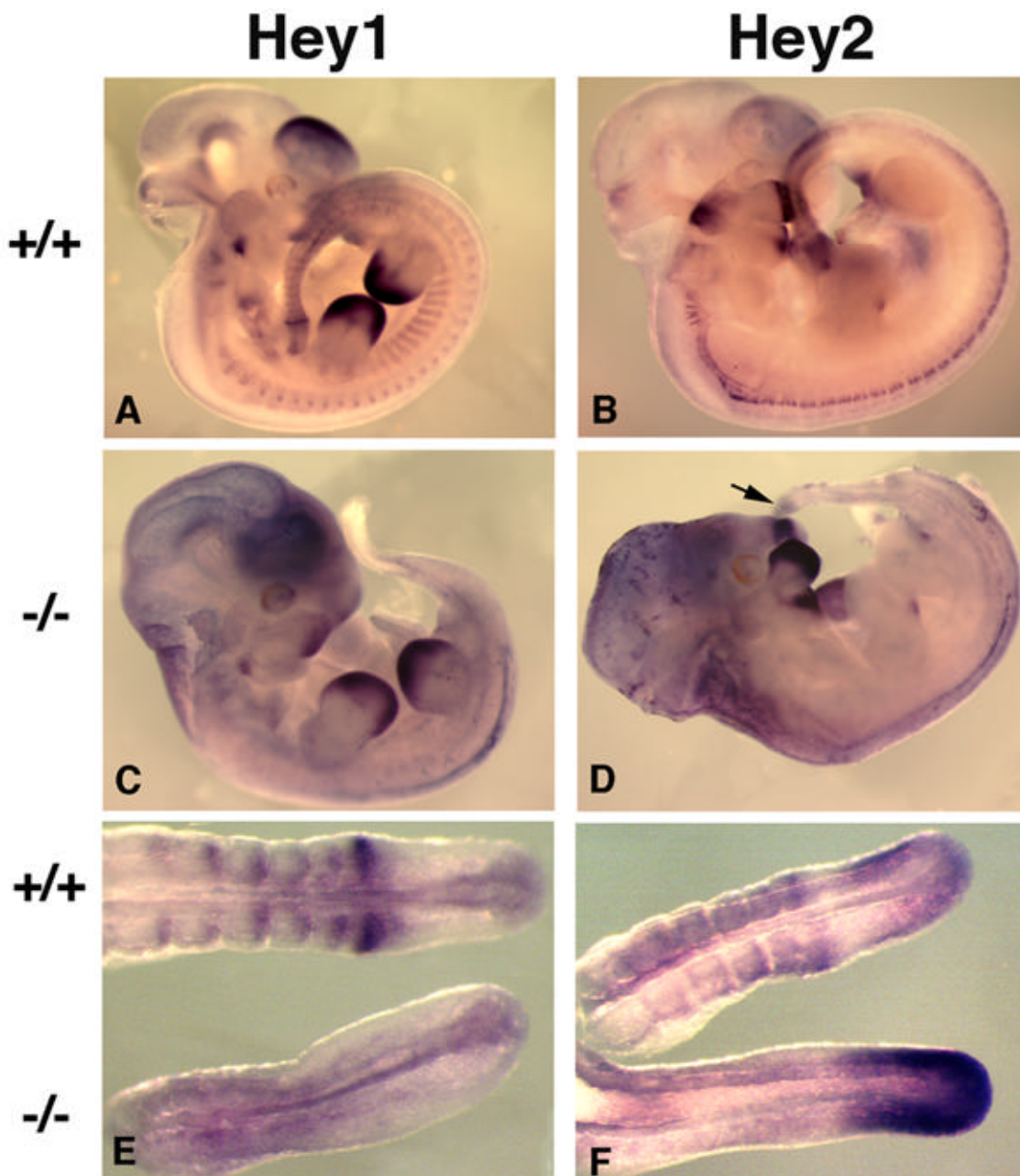


Abb. 35: Expression von Hey1 und Hey2 in Dll1^{-/-} Mutanten. (A,B) Hey1- und Hey2-Expression in Wildtyp-CD1-Mäusen im Stadium E11,5. (C,D) Dll1^{-/-} Mutanten im Stadium E11,5 hybridisiert mit Hey1 bzw. Hey2. Der Pfeil in (D) weist auf die Expression von Hey2 in der Schwanzspitze hin. (E,F) Direkter Vergleich der Hey1- und Hey2-Expression in den Somiten bzw. dem PSM von E10,5-Embryonen in Dll1^{-/-} (unten) und Wildtyp-Mäusen (+/+, oben). Während die Expression beider Gene in der posterioren Hälfte der Somiten in den Dll1^{-/-} Schwänzen aufgehoben ist, wird nur Hey1 nicht mehr im PSM exprimiert.