

5. Diskussion

Seit mehr als 50 Jahren wird die Niere als Modellsystem für Untersuchungen von Gewebe-Interaktionen und Organogenese in Vertebraten studiert. Obwohl die morphologischen Abläufe weitgehend aufgeklärt sind, wurden erst in den letzten Jahren wesentliche Fortschritte bei der Erforschung der molekularen Grundlagen gemacht. Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden, der *in situ* Hybridisierung und des „gene targetings“ führten zur Entdeckung einer Reihe von Molekülen, die an der Entwicklung der Niere beteiligt sind. Dabei zeigte sich nicht nur, daß die Regulation dieser Prozesse weitaus komplizierter ist als ursprünglich angenommen, sondern auch, daß dieselben Signalkaskaden bei der Entwicklung verschiedener anderer Gewebe mitwirken.

Strategie zur Isolierung transkriptionell regulierter Gene des metanephrogenen Mesenchyms

Die Induktionsprozesse im metanephrogenen Mesenchym und die Differenzierung in Stroma- oder Nephron-Zellen beinhalten ganz unterschiedliche zelluläre Funktionen wie Zell-Zell-Kontakt, Signalübertragung, Proliferation, Umbildung der Extrazellulärer Matrix und des Zytoskeletts. Das bedeutet auch grundlegende Veränderungen in der Genexpression. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Transfilter-Organkultur und der ddPCR eine Anzahl von bekannten sowie neuen Genen im Nierenmesenchym identifiziert und zum Teil näher charakterisiert, deren Expression durch Induktion beeinflusst wird.

Es sind bereits einige Ansätze beschrieben, die sich mit der Analyse differentiell exprimierter Gene in ganzen Nierenanlagen verschiedener Stadien oder postnatalen Nieren beschäftigen (Jansson *et al.*, 1997; Kretzler *et al.*, 1996; Rosenblum and Yager, 1997; Wada *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu diesen Versuchen wurde hier eine neue Strategie zur Identifizierung transkriptionell regulierter Gene des metanephrogenen Mesenchyms entwickelt. Die dazu verwendete Nieren-Organkultur reproduziert anerkanntermaßen die *in vivo* ablaufenden Entwicklungsprozesse (Saxen, 1987). Darüber hinaus wurde von Kretzler *et al.* (1996) eine weitgehende Übereinstimmung der Genexpression *in vivo* und *in vitro* gezeigt. Ein Vorteil der Transfilter-Mesenchyminduktion gegenüber der Analyse von Gesamt-Nierenanlagen ist die rein mesenchymale Zellpopulation. Sie ist weit weniger heterogen als die ganzer embryonaler Nieren, da die Zellen des Ureters fehlen und das Mesenchym auf dem heterologen Induktor ausgebreitet wird, wodurch es gleichmäßiger an mehr Stellen induziert wird als *in vivo*. Limitierend sind allerdings die geringen Mengen Gesamt-RNA, die aus den Kulturen gewonnen werden. Die ddPCR war deshalb besonders geeignet für diesen experimentellen Ansatz: sie benötigt nur geringe Mengen Gesamt-RNA, sie liefert schnell Ergebnisse, sie kann seltene Transkripte detektieren und sie ermöglicht die Identifizierung sowohl induzierter als auch reprimierter Gene (Guimaraes *et al.*, 1995; Liang and Pardee, 1992; Wan *et al.*, 1996). Nachteile dieser Methode sind allerdings die hohe Rate falsch positiver PCR-Produkte und der damit verbundene Zeit- und RNA-aufwendige Prozeß der Verifizierung. Darüber hinaus produziert die ddPCR meist nicht-codierende und damit weniger informative Sequenzen vom 3'-Ende der entsprechenden mRNAs, was eine anschließende Isolierung der kompletten cDNAs erforderlich macht.

Die verschiedenen Primerkombinationen für die ddPCR wurden ausgehend von der Annahme entwickelt, daß höhere Organismen etwa 100.000 verschiedene Gene besitzen und nur etwa 15% - also 15.000 - davon in individuellen Zellen exprimiert werden (Liang and Pardee, 1992). Jedes Primerpaar

sollte etwa 50-100 mRNAs amplifizieren, da diese Anzahl optimal auf einem Sequenzgel aufgetrennt werden kann. In dieser Arbeit wurden ebenfalls im Durchschnitt 60 ddPCR-Produkte pro Spur gezählt, was bei insgesamt 240 verschiedenen verfügbaren Primerkombinationen - 12 verschiedene oligo-dT-Primer und 20 arbitrary-5'-Primer - zu 14.400 und damit in etwa der gewünschten Anzahl von ddPCR-Produkten/mRNAs führt. Allerdings wurde eine Redundanz von rund 30% beobachtet, d.h. nur 10.000 unterschiedliche Genen können repräsentiert sein. Darüber hinaus wurden mit einzelnen oligo-dT-Primern unterschiedlich viele differenzielle Banden beobachtet. Entsprechend den von Linskens *et al.* (1995) beschriebenen Verteilungen, wurde zum Beispiel mit dem oligo-dT-Primer, der die Basen A und T als Anker besitzt, keine differenziell exprimierte Bande gefunden. Dagegen produzieren die Primer mit G und C als Anker die meisten Unterschiede. Die postulierte komplette Abdeckung aller in einer Zelle exprimierten Gene wird demnach nicht erreicht. Dennoch wurde die ddPCR von Wan *et al.* (1996) im Vergleich zu anderen Methoden wie Subtraktive Hybridisierung oder Elektronische Subtraktion untersucht und als geeigneter befunden, differentiell exprimierte Gene aufzuspüren. Es wurde versucht einige der bisher beschriebenen Optimierungsmöglichkeiten gegenüber dem Originalprotokoll von Liang und Pardee zu berücksichtigen: Mehrfachansätze für cDNA-Synthese und PCR unabhängiger RNA-Präparationen, weniger PCR-Zyklen, längere 5'-Primer zur direkten Sequenzierung und Klonierung (Guimaraes *et al.*, 1995; Linskens *et al.*, 1995). Die direkte Sequenzierung sollte bei mehreren PCR-Produkten gleicher Größe in einer ddPCR-Bande gewährleisten, daß nur das häufigste PCR-Produkt sequenziert wird. Bei Klonierung der PCR-Produkte müßte das erst noch, z.B. mit Southern Blot Hybridisierung, getestet und außerdem mehrere Klone sequenziert werden.

Zwei Drittel der mit ddPCR-Analyse identifizierten Sequenzen zeigten keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen. Wiederum ein Drittel davon war identisch zu EST-Sequenzen. Vermutlich besitzen einige dieser ddPCR-Produkte keine Homologie zu bekannten Proteinen, weil sie meist kurz sind und vom untranslatierten 3'-Ende der mRNAs abstammen. Darüber hinaus enthält die EST-Datenbank der Maus bislang nur 5'-Sequenzen und die 3'-Bereiche von Genen sind damit unter-repräsentiert. Humane EST-Datenbanken enthalten zwar zusätzlich 3'-Sequenzen, die aber wiederum aufgrund geringer Homologie zwischen Mensch und Maus im untranslatierten Bereich häufig nicht weiterhelfen.

Für fünf von acht untersuchten neuen Genen mit Ähnlichkeit zu EST-Sequenzen konnte die differentielle Expression im Nierenmesenchym durch Northern Blot Hybridisierung bestätigt werden. Die übrigen ergaben kein Hybridisierungssignal. Von den identifizierten bekannten Genen wurden vierzehn auf differentielle Expression untersucht, drei ergaben kein Signal und nur fünf wurden verifiziert. Das entspricht der in der Literatur beschriebenen hohen Fehlerrate der ddPCR-Analyse von etwa 50% (Linskens *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 1996). Allerdings ist die Bewertung der hier beschriebenen Reproduzierbarkeit der ddPCR-Ergebnisse durch die große Anzahl nicht detektierbarer Transkripte in der Northern Blot Analyse beeinflusst. Diese schwach exprimierte Transkripte könnten in Zukunft durch semi-quantitative RT-PCR auf differentielle Expression getestet werden. Durch *in situ* Hybridisierung von Gewebeschnitten oder ganzen Nierenanlagen können diese Gene zwar nicht auf Induktion aber zumindest auf Expression in den entsprechenden Zellen überprüft werden, wie zum Beispiel am ddPCR-Produkt M2-4 gezeigt. Damit wird gleichzeitig ihre räumliche und zeitliche Verteilung während der Entwicklung der Niere und anderer Gewebe analysiert.

Der überwiegende Teil regulierter Gene wurde aus dem induzierten Nierenmesenchym isoliert. Bis jetzt sind die LDH-A und das dem ddPCR-Produkt F6-3 entsprechende Gen die einzigen verifizierten

reprimierten Kandidaten. Es ist durchaus möglich, daß durch die Induktion und damit beginnende Differenzierung im metanephrogenen Mesenchym mehr Gene an- als abgeschaltet werden. Andererseits könnten die in den induzierten Kulturen noch vorhandenen nicht-induzierten Zellen eine reduzierte Expression verdecken.

Identifizierung bereits bekannter Gene

Ein Hinweis auf die Tauglichkeit des Versuchsansatzes und der gewählten Bedingungen war die Identifizierung der Integrin- α_6 -Untereinheit und der LDH-A, deren differentielle Expression in induziertem *versus* nicht-induziertem Nierenmesenchym in der Literatur bereits beschrieben war. Es wurden außerdem noch einige andere bekannte Gene identifiziert, die vermutlich bei der Signalübertragung oder der transkriptionellen Regulation eine Rolle spielen. Die differentielle Expression des ufo-Kinase-Gens, des grg-Gens und des sFRP2-Gens wurde mit Northern Blot Hybridisierung verifiziert. Die Rezeptor-Tyrosinkinase ufo (auch bekannt unter axl, ark oder tyro7) gehört zu einer Unterfamilie von Rezeptoren, die durch zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen und zwei Fibronectin-III-Repeats in ihrer extrazellulären Domäne charakterisiert sind. Diese Kombination von Proteinmotiven kommt auch in einigen Zell-Adhäsionsmolekülen und in Phosphatasen vor. Ufo-Transkripte wurden in mesenchymalen Zellen einiger Gewebe nachgewiesen, die sich durch mesenchymale-epitheliale Wechselwirkungen entwickeln, sowie in den Glomeruli der adulten Niere (Faust *et al.*, 1992). Durch Northern Blot Hybridisierung wurde gezeigt, daß die Expression des ufo-Gens nach zwei Tagen *in vitro* Entwicklung im metanephrogenen Mesenchym ansteigt. Die ufo-Kinase könnte also für Zell-Adhäsion oder Zell-Zellkommunikation bei mesenchymalen-epithelialen Interaktionen eine Rolle spielen. Ihre beschriebenen anti-apoptotischen Eigenschaften haben eine potentielle Bedeutung für die Regulation der physiologischen Apoptose in der frühen Nierenentwicklung oder der massiven Apoptose in WT1-Knockout-Mäusen (Bellosta *et al.*, 1997; Koseki *et al.*, 1992; Kreidberg *et al.*, 1993).

Das grg-Gen ist bereits im nicht-induzierten Nierenmesenchym exprimiert mit ansteigender Expression im induzierten Mesenchym. Damit übereinstimmend ist grg als ab dem Stadium E10,5 ubiquitär transkribiertes Gen beschrieben, wobei die mRNA-Level in bestimmten Zellen bei der Entwicklung einiger Organe ansteigen. Aufgrund dieses Expressionsmusters und der Homologie zu dem *Drosophila* groucho-Protein wurde eine Rolle bei der Bildung und/oder der Erhaltung eines differenzierten Zellstatus postuliert (Mallo *et al.*, 1994). Allerdings entwickeln sich grg-Knockout-Mäuse normal und zeigen erst nach der Geburt Wachstumsverzögerungen, so daß dieses Gen keinen für die Nephrogenese entscheidenden Faktor darstellen kann.

Charakterisierung einiger neuer Gene

Vier der potentiell induzierten neuen Gene, die den ddPCR-Produkten C0-5, J6-1, J6-3 und M2-4 entsprechen, wurden näher charakterisiert. Während erstere eindeutig mit Northern Blot Hybridisierung als *de novo* im induzierten Mesenchym exprimiert bestätigt werden konnten, war M2-4 nur mit *in situ* Hybridisierung auf Paraffinschnitte im metanephrogenen Mesenchym nachweisbar. Für M2-4 kann also nicht ausgeschlossen werden, daß es bereits im nicht-induzierten Mesenchym

exprimiert ist. Interessanterweise unterscheiden sich alle untersuchten neuen Gene hinsichtlich ihrer Expressionsmuster sowohl in der Niere als auch in anderen Geweben. Während M2-4 bereits im kondensierenden Mesenchym, das die Ureterknospen umgibt, exprimiert ist, sind C0-5 und J6-1 (Hey1) erst in den epithelialen Nephronvorläufern nachweisbar. Letztere sind darüber hinaus bereits in den mesonephrischen Tubuli exprimiert, die sich wie die Nephrone des Metanephros durch Induktion aus dem intermediären Mesenchym bilden. J6-3 hingegen markiert Stromazellen, die Ureter- und nephrogene Tubuli umgeben.

Das C-Gen (C0-5) ist dynamisch zunächst im sich verzweigenden Ureter, dann ausschließlich in den epithelialen Nephronvorläufern und schließlich wieder zusätzlich in den vom Ureter abstammenden Sammelrohren exprimiert. Aufgrund seines Expressionsmusters wäre das C-Gen also in einem ddPCR-Ansatz, der nur frühe und späte Nierenanlagen vergleicht, nicht entdeckt worden.

Bemerkenswert ist auch, daß BMP7 und Pax2 - deren Bedeutung für die Nierenentwicklung durch Knockout-Studien erwiesen ist - ebenfalls dynamisch in beiden Kompartimenten exprimiert sind (Dressler *et al.*, 1990; Lyons *et al.*, 1995). Das C-Gen ist insbesondere in Epithelzellen weiterer Gewebe zu finden, die sich durch epitheliale-mesenchymale Wechselwirkungen entwickeln. Erste Hinweise auf eine mögliche Funktion und auf Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen gibt die ermittelte Aminosäuresequenz des C-Gens, die ein kollagenartiges Protein codiert. Kollagen-Domänen dienen häufig der Multimerisierung von Proteinen oder auch als Erkennungsstelle für Liganden oder Zellen. Somit könnte das C-Protein ähnliche Aufgaben ausüben wie zum Beispiel das Surfactant-Protein in der Lunge oder das EDA-Gen bei der Entwicklung der Haare, Zähne und Schweißdrüsen (Ezer *et al.*, 1997; Scavo *et al.*, 1998). Deletionsmutationen in Kollagen-Repeats des EDA-Gens (Anhidrotic Ectodermal Dysplasia) führen zu Mißbildungen in den genannten Strukturen und das EDA-Protein ist als membranverankertes Protein vermutlich für Zell-Matrix-Interaktionen von Bedeutung. Da die Sequenz des Aminoterminus des C-Gens noch nicht vollständig aufgeklärt ist, bleibt allerdings unklar ob es sich um ein sezerniertes oder ein membranständiges Protein handelt. Das dem J6-3 ddPCR-Produkt entsprechende Gen wurde in interstitiellen Zellen der Niere detektiert. Über diese Stromazellen, die ebenfalls vom induzierten metanephrogenen Mesenchym abstammen, war lange Zeit wenig bekannt. Erst in neueren Studien wurden neben Tenascin weitere im Stroma exprimierte Gene entdeckt und Knockout-Studien in Mäusen zeigten ihre Bedeutung für die Entwicklung von Ureter und Nephrone (Aufderheide *et al.*, 1987; Hatini *et al.*, 1996; Mendelsohn *et al.*, 1999). Außerhalb der Niere zeigt das J-Gen ebenfalls ein interessantes Expressionsmuster im sich entwickelnden Nervensystem, in den Extremitäten und in interstitiellen Zellen der Speicheldrüse sowie des Innenohrs. Gerade die Expression in Zellen, die die entstehenden Finger bzw. Zehen umgeben, könnte auch auf eine Beteiligung an apoptotischem Zelltod hinweisen. Die Entschlüsselung der kompletten Nukleotidsequenz des J-Gens und damit die Natur des codierten Proteins könnte auch hier wichtige Hinweise zur Erforschung seiner Funktion geben.

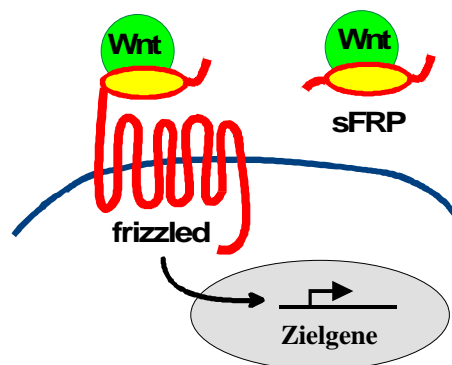
Zusammen mit dem J6-1 ddPCR-Produkt, welches zur Identifizierung einer neuen Klasse von hairy-verwandten Transkriptionsfaktoren führte, wurden bisher also vier ganz unterschiedliche und für die Nierenentwicklung interessante neue Gene isoliert. Neben der Untersuchung der Funktion jener Gene, steht die Analyse weiterer 18 ddPCR-Produkte mit Ähnlichkeit zu EST-Sequenzen und von 37 Fragmenten ohne Ähnlichkeit zu bekannten DNA-Sequenzen noch aus. Diese Auswahl von mehr als 50 neuen Kandidaten für Gene, die in dem beschriebenen *in vitro* System transkriptionell reguliert werden, sind ein guter Ausgangspunkt zur weiteren Erforschung der molekularen Grundlagen der Nierenentwicklung. Es wurde gezeigt, daß die Transfilter-Organkultur in Kombination mit ddPCR

eine geeignete Methode zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene ist, was auch für die Untersuchung anderer in Organkultur rekonstruierbarer Entwicklungsabläufe nützlich sein dürfte.

sFRP-Gene und die Wnt-Frizzled-Signalkaskade

Von den mit ddPCR identifizierten bekannten Genen erschien das sFRP2-Gen durch seine Verbindung zum Wnt-Signaltransduktionsweg besonders interessant. Wnt-Moleküle spielen bei einer Reihe von Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle, wie zum Beispiel der Neurogenese (Wnt1), der Somitogenese (Wnt3a), der Extremitätenbildung (Wnt7a) und der Nierenentwicklung (Wnt4) (siehe Wnt gene homepage: <http://www.ana.ed.ac.uk/rnusse/wntwindow.html>). Die Entdeckung der sFRP-Gene führte zu einer wesentlichen Veränderung im Verständnis der Wnt-Signalkaskade. Kurz zuvor waren erst die frizzled-Proteine als Rezeptoren der Wnt-Signalmoleküle identifiziert worden. Die vorliegende Expressionsanalyse der bis dahin bekannten sFRP-Gene sollte als Grundlage für ihre weitere Erforschung dienen und zur Aufklärung ihrer Funktion im Wnt-Signaltransduktionsweg beitragen. Für die Interpretation der Ergebnisse ist deshalb der Vergleich mit den Expressionsmustern verschiedener Wnt- und frizzled-Gene wichtig. In Säugetieren sind bislang acht Vertreter der frizzled-Rezeptor-Familie bekannt, wobei nur wenige Informationen über ihre Expression während der Maus-Embryonalentwicklung verfügbar sind (Wang *et al.*, 1997c; Wang *et al.*, 1999). Die embryonalen Expressionsmuster der Wnt-Gene sind zwar im einzelnen besser untersucht, bei mehr als sechzehn verschiedenen Vertretern aber dennoch unvollständig.

Abb. 36: sFRP-Proteine können im Extrazellularraum an Wnt-Signalmoleküle binden. Dadurch hemmen sie deren Bindung an frizzled-Rezeptoren und die durch Wnt/Frizzled vermittelte Signalübertragung an Zielzellen.



Während der Nierenentwicklung ist Wnt4 in den Nephronvorläufern, Wnt7b im Ureterstamm und Wnt11 an den Spitzen der sich verzweigenden Ureterknospe exprimiert. sFRP2 ist nicht nur in den metanephrischen sondern auch in den mesonephrischen Tubuli mit Wnt4 colokalisiert. Inzwischen wurde auch die physikalische Interaktion von Wnt4 und sFRP2, sowie die Regulation von sFRP2 durch Wnt4 beschrieben (Lescher *et al.*, 1998). Allerdings sind beide Gene in anderen Geweben wie zum Beispiel im Neuralrohr komplementär exprimiert. In letzterem ist Wnt4 dorsal und in der Bodenplatte, sFRP2 dagegen ventral zu finden (Stark *et al.*, 1994). Eine ähnliche komplementäre Expression ist mit Wnt7b im Ureterstamm und sFRP2 in den umgebenden Mesenchymzellen zu beobachten (Kispert *et al.*, 1996). sFRP1 wurde zunächst in Stromazellen und später in Zellen der Henleschen Schleife detektiert. Bislang ist kein vergleichbares Expressionsmuster für einen Vertreter der Wnt- oder der frizzled-Genfamilie beschrieben. Dagegen überlappen sFRP1- und Wnt4-Transkripte im Cortex der Nebenniere. sFRP3 und sFRP4 sind ebenfalls in Mesenchymderivaten der sich entwickelnden Niere zum Teil überlappend mit sFRP2 exprimiert. Die Expressionsmuster bestimmter sFRP- und Wnt-Gene sind also in einzelnen Geweben aber nicht insgesamt überlappend

oder komplementär. Überraschend ist auch, daß so viele verschiedene sFRP-Gene im metanephrogenen Mesenchym exprimiert sind. Möglicherweise sind ihre Genprodukte für eine Feinabstimmung der Wnt-frizzled regulierten Vorgänge verantwortlich. Andererseits deutet es auch auf eine mögliche Redundanz der sFRP-Gene hin. Keines der untersuchten sFRP-Gene ist allerdings im Ureter oder seinen Verzweigungen lokalisiert, wobei bislang keine Daten über das kürzlich identifizierte sFRP5-Gen verfügbar sind. Die einzige Information (Chang *et al.*, 1999) über die Expression eines frizzled-Rezeptors im embryonalen Urogenitalsystem stammt aus Untersuchungen des Williams Syndroms, welches in 18% der Betroffenen einen Nierenphänotyp zeigt (Wang *et al.*, 1999). Die Autoren beschreiben Fzd9-Expression im Teilerstadium 17 (etwa E10,5) im caudalen Wolffschen Gang, in welchem bislang kein Wnt- oder sFRP-Gen lokalisiert wurde.

Auch in der Augenentwicklung sind alle bisher identifizierten sFRP-Gene exprimiert. sFRP2 ist schon sehr früh in der Linsenplakode und der neuronalen Retina, sFRP4 erst später in der neuronalen Retina zu finden. Im anterioren Linsenepithel sind zunächst sFRP2 und sFRP4 exprimiert, später sFRP1. Letzteres zeigt zusätzlich ein sehr starkes Signal in den Linsenfibrillen und in der pigmentierten Retina. sFRP5 ist ebenfalls in der pigmentierten Retina, sFRP3 im anterioren Linsenepithel und im Ciliarkörper exprimiert (Chang *et al.*, 1999; Mayr *et al.*, 1997). Die zum Teil überlappenden, zum Teil komplementären und auch zeitlich regulierten Expressionsmuster deuten wiederum auf eine Funktion der sFRP-Gene in der Feinregulation der Wnt-Signale bei der Augenentwicklung hin. Hier wurde Wnt7b ähnlich wie sFRP1 zunächst dorsal im Augenbläschen und später in den Linsenfibrillen beobachtet (Parr *et al.*, 1993).

Eine komplementäre Expression von sFRP1 und sFRP2 wie in der Augenentwicklung ist auch in anderen Geweben wie zum Beispiel im Riechepithel und während der Entwicklung des Nervensystems zu beobachten. Das läßt gerade für diese beiden sFRPs distinkte Funktionen vermuten. Dafür spricht auch, daß sie Zellen unterschiedliche apoptotische Eigenschaften verleihen: stabil mit *sarp1* (secreted apoptosis related protein 1, entspricht sFRP2) transfizierte MCF7-Zellen sind resistenter, mit *sarp2* (entspricht sFRP1) transfizierte Zellen werden dagegen sensitiver für verschiedene proapoptotische Stimuli (Melkonyan *et al.*, 1997). In der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose eine große Rolle, indem gezielt Zellen in einem homogen erscheinenden Gewebe absterben. Dadurch werden Strukturen wie zum Beispiel die Finger gebildet oder einzelne Zellen für die Reifung selektioniert wie die T-Zellen im Thymus. In der Nierenentwicklung sterben nicht induzierte Mesenchymzellen apoptotisch ab, während induzierte überleben und zu proliferierenden Stammzellen werden (Koseki *et al.*, 1992). In eben diesen induzierten Nieren-Mesenchymzellen und Nephronvorläufern ist sFRP2 exprimiert und seine anti-apoptotische Wirkung könnte für das Überleben dieser Zellen mitverantwortlich sein. Im sich entwickelnden Nervensystem, wo ebenfalls massive Apoptose stattfindet, ist sFRP2 in aktiv proliferierenden und damit nicht-apoptotischen Zellen zu finden. Darüber hinaus ist sFRP2 in den Extremitätenknospen entlang der Fingerstrahlen exprimiert und damit exakt benachbart den apoptotisch entstehenden Einkerbungen in Fuß- bzw. Handflächen, die einzelne Finger voneinander trennen. sFRP2 schützt also möglicherweise bestimmte Zellen vor dem apoptotischen Zelltod, wie zum Beispiel auch durch seine Expression an Orten der Gelenkbildung zwischen den Phalangen und zwischen Rippen und Wirbel sowie Brustbein. Andererseits ist sFRP1 jedoch nicht offensichtlich an Orten erhöhter Apoptose exprimiert, so daß sich keine direkten Schlüsse über seine Funktion ziehen lassen.

sFRP4 fällt durch schwache Expression in vielen Geweben und ein überraschend starkes Signal in der Zahnanlage auf. Eine ähnlich schwache Expression in vielen Geweben wurde schon von Rattner *et al.*

(1997) berichtet und es sind auch nur wenige sFRP4-Klone in den EST-Datenbanken vertreten. Diese cDNA-Klone stammen im wesentlichen aus Cochlea-, Prostata oder Endometrium-cDNA-Banken. Kürzlich wurde auch die differentielle Expression des humanen sFRP4-Homologs frpHE im Stroma des proliferierenden Endometriums, nicht aber des sekretorischen oder menstrualen Endometriums beschrieben, was auf eine hormonelle Regulation hinweist (Abu-Jawdeh *et al.*, 1999). Zusätzlich ist die frpHE-Expression in Endometrium- und Brust-Karzinomen erhöht. Die hochspezifische und regulierte Expression von sFRP4 könnte auf spezialisierte und nicht-redundante Funktionen hindeuten. In den ersten funktionellen Untersuchungen der sFRP-Proteine schienen sie hinsichtlich ihrer Spezifität für verschiedene Wnt-Proteine und ihrer inhibitorischen Wirkung sehr ähnlich zu sein. sFRP1, sFRP2 und sFRP3 binden alle an Wnt1, Wnt8 oder wingless (Leyns *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997a). Für sFRP3 und sFRP1 wurde gezeigt, daß sie die gebundenen Wnt-Moleküle in ihrer Funktion hemmen (Finch *et al.*, 1997; Leyns *et al.*, 1997; Mayr *et al.*, 1997; Rattner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997a). Allerdings inhibieren dieselben sFRPs nicht die Aktivität von Wnt3a, Wnt5a oder Wnt11, was auf eine teilweise Spezifität der sFRPs für bestimmte Wnts hindeutet (Wang *et al.*, 1997b). Es wurde auch in einigen anderen Untersuchungen gezeigt, daß sFRP-Bindung nicht in jedem Fall den Funktionsverlust des gebundenen Wnt-Moleküls bedeuten muß (Leyns *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997). Die Spezifität der Wnt-sFRP-Interaktionen und die physiologische Bedeutung der sFRP-Moleküle ist damit noch nicht geklärt. Ebenso ist nicht ausgeschlossen, daß sFRPs eine positive Wirkung auf die Wnt-Signalkaskade haben, indem sie zum Beispiel als Co-Rezeptor wirken. Die Kenntnis der einzelnen Expressionsmuster kann aber bei der Erstellung experimenteller Ansätze zur Überprüfung von Hypothesen hinsichtlich ihrer Funktion in Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung oder maligner Transformation und ihrer Bindung an bestimmte Wnt-Proteine helfen.

Hey-Gene: eine neue Familie hairy/E(spl)/Hes-verwandter Gene

Ausgehend vom ddPCR-Produkt J6-1 wurden drei Gene mit Sequenzhomologie zu den transkriptionellen Repressoren hairy und E(spl) von *Drosophila* bzw. zu deren Vertebraten-Homologen der Hes-Genfamilie und c-hairy1 isoliert. Die drei Säugetiergene Hey1, Hey2 und HeyL sowie ein potientes *Drosophila*-Homolog stellen eindeutig eine neue Unterfamilie hairy-verwandter bHLH-Proteine dar. Sie besitzen die größte Ähnlichkeit untereinander und zu hairy/E(spl)/Hes in der bHLH- und der Orange-Domäne. Die restlichen Aminosäuresequenzen sind sehr unterschiedlich mit Ausnahme des C-terminalen YRPW-Motifs, welches allerdings in HeyL fehlt und nur im murinen Hey2 zu YQPW verändert ist. Verglichen mit hairy/E(spl)/Hes besitzen diese neuen Proteine zwei entscheidende Unterschiede in der basischen Domäne und im Carboxyterminus, die zu funktionellen Veränderungen führen. Der charakteristische Prolinrest in der basischen Domäne der hairy/E(spl)/Hes-Proteine, der für ihre DNA-Bindungsspezifität für N-Box-Sequenzen verantwortlich ist, ist in allen Hey-Proteinen durch Glycin ersetzt (Akazawa *et al.*, 1992; Ohsako *et al.*, 1994). Ein solcher Glycinrest fehlt auch in allen bHLH-Proteinen mit Präferenzen für E-Box-Sequenzen. Das deutet auf eine geänderte DNA-Bindungsspezifität der Hey-Proteine hin, die möglicherweise andere E- oder N-Box-ähnliche Motive binden. Dem entsprechend konnte gezeigt werden, daß Hey1 weder mit bekannten E-Box-Sequenzen noch mit der für Hes1 beschriebenen N-Box interagiert. Da bHLH-Proteine als Dimere an DNA binden, wurden die Protein-Bindungseigenschaften von Hey1 in pulldown-Analysen untersucht. Obwohl Hey1 mit sich selbst, mit MyoD und mit den ubiquitär

exprimierten E2-2- und E2-5-Proteinen dimerisiert, konnte keine DNA-Bindung für diese Komplexe gezeigt werden. Die direkte Bindung solcher Dimere an DNA-Sequenzen in Promotoren von Zielgenen ist allerdings nur eine Möglichkeit wie hairy-verwandte Proteine ihre transkriptionelle Repressor-Funktion ausüben. Alternativ können sie über die HLH-Domäne mit transkriptionellen Aktivatoren interagieren, um inaktive und stabile Heterodimere zu bilden. Hes1, zum Beispiel, bindet mit hoher Affinität an E47 und könnte die Funktion von MyoD und Mash1 negativ regulieren, indem es die Bildung funktioneller/aktivierender Komplexe zwischen E47 und MyoD bzw. Mash1 verhindert (Sasai *et al.*, 1992). Dasselbe gilt für die Id-Proteine, die keine basische Domäne aber eine HLH-Domäne besitzen und mit anderen bHLH-Proteinen interagieren (Benzra *et al.*, 1990). Da Hey1 Dimere mit MyoD, E2-2 und E2-5 bildet, aber keiner dieser Komplexe an die getesteten DNA-Sequenzen bindet, könnte Hey1 ebenfalls eine Repression durch Heterodimer-Bildung vermitteln. Hey1 ist in embryonalen Muskelvorläufern stark, im adulten Muskel aber nur schwach nachweisbar und ist also ähnlich wie Hes1 mit MyoD während der Myogenese coexprimiert. Die im pulldown-Experiment beobachtete Interaktion zwischen Hey1 und MyoD könnte also eine Bedeutung für die Muskelentwicklung haben. So wurde für Hes1 gezeigt, daß es die durch MyoD induzierbare Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen in Muskelzellen hemmen kann (Sasai *et al.*, 1992). Analog dazu könnte auch die potentielle inhibitorische Wirkung von Hey1 auf MyoD getestet werden. Ob Hey-Proteine durch direkte DNA-Bindung oder durch Beeinträchtigung anderer Transkriptionsfaktoren agieren muß ebenfalls noch untersucht werden. Da mit Sequenzen aus der Literatur keine DNA-Bindung erzielt wurde, könnte zum Beispiel mit degenerierten Oligonukleotiden die Hey-Bindungssequenz selektioniert werden.

Das zweite strukturelle Charakteristikum der Hey-Proteine ist das C-terminale YRPW-Motif anstelle von WRPW in hairy/E(spl)/Hes. WRPW oder auch das VWRPY-Peptid in Runt-Proteinen interagieren mit dem Co-Repressor groucho bzw. den entsprechenden Säugerhomologen TLE1-4/Grg1-4 (Aronson *et al.*, 1997; Fisher and Caudy, 1998; Paroush *et al.*, 1994). Mit pulldown-Analyse konnte gezeigt werden, daß das Hey-spezifische YRPW-Motif nicht mit TLE1 und TLE2 interagieren kann. Um den möglichen Einfluß der flankierenden Aminosäuren zu testen, wurde die TLE-Bindung von WRPW und WRPY im Hey1-Sequenzkontext untersucht. Während WRPW unter diesen Bedingungen an TLE1 und TLE2 bindet, ist das für WRPY nicht der Fall. Der konservierte Valinrest der Runt-Proteine scheint also für eine effiziente Bindung essentiell zu sein. Da auch das YRPW- bzw. YQPW-Motiv in Hey1, Hey2 oder dHey von drei konservierten Resten flankiert ist (KPYR**Y**RPWG), könnte dieses größere Peptid eine neue Bindungsstelle für bislang unbekannt Proteine darstellen. Noch eine Besonderheit der Säuger-Hey-Proteine, aber nicht des *Drosophila* Hey-Proteins, sind weitere sechs Aminosäuren am C-Terminus. Dieses TEIGAF- oder TEVGAF-Motif ist auch in HeyL vertreten, obwohl es kein YRPW-Peptid besitzt. Eine Protein-bindende Funktion dieser beiden C-terminalen konservierten Motive - KPYR**Y**RPWG und TEIGAF/TEVGAF - könnte im sogenannten „yeast two hybrid“-System untersucht und die entsprechenden Bindungspartner identifiziert werden. Diese vorläufige strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Hey-Proteine und der Vergleich mit anderen hairy-verwandten Proteinen zeigt, daß sie ähnliche aber dennoch andere Mechanismen benutzen, um ihre noch ungeklärten Funktionen auszuüben. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Hey-Proteine divergieren zwischen Orange- und YRPW-Domäne zum Teil sehr stark, indem einige poly-Alanin- andere poly-Glutamin-Trakte besitzen, was auf individuelle und nicht-redundante Rollen hindeutet. Wahrscheinlich codieren die Hey-Gene für Transkriptionsfaktoren, aber ob sie ebenfalls als

Repressoren agieren, ob durch DNA-Bindung oder durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, muß noch im Detail analysiert werden.

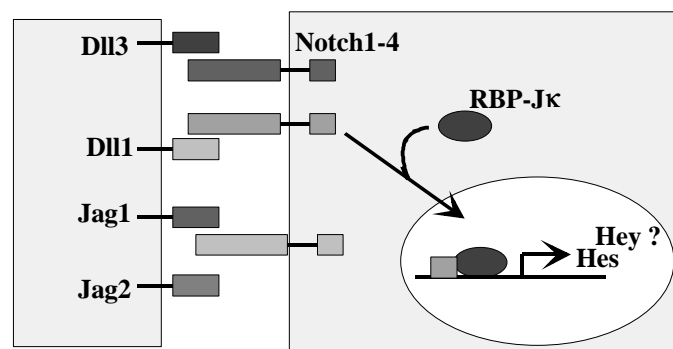
Das *Drosophila* hairy-Gen wurde ursprünglich in Mutanten mit zusätzlichen sensorischen Haaren identifiziert (Rushlow *et al.*, 1989) und gehört zur Klasse der sogenannten Paarregelgene, die für die Segmentierung verantwortlich sind (Ish-Horowicz *et al.*, 1985). Es agiert als Repressor aktivierender bHLH-Gene, wie die der achaete-scute- oder der atonal-Familie während der Neurogenese und von fushi tarazu während der Segmentierung (Botas *et al.*, 1982; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). In der *Drosophila* Neurogenese ist hairy unabhängig von Delta/Notch für die frühe Musterbildung verantwortlich, während die verwandten E(spl)-Proteine später in der sogenannten „lateralen Inhibition“ als Effektoren des Delta-Notch-Signalwegs fungieren. Dadurch wird das Schicksal ektodermaler Zellen als Epidermiszelle oder neuronale Zelle festgelegt. Das aktuelle Modell für die Funktion der entsprechenden Säugergene postuliert die Aktivierung von Hes1/Hes5 durch die Delta-Notch-Signalkaskade, indem nach Delta-Notch-Bindung der intrazelluläre Teil von Notch abgespalten und durch Bindung an RBP-J κ in den Zellkern transportiert wird. Dieser Komplex bindet an den Promotor von Hes1/Hes5 und aktiviert ihre Transkription. Hes1/Hes5 hemmen schließlich die neuronalen Aktivatoren Mash/Cash/Xash (achaete-scute-Homologe) oder Math/neurogenin/NeuroD (atonal-Homologe) (de la Pompa *et al.*, 1997; Kageyama and Nakanishi, 1997). Für andere Vertreter der Hes-Genfamilie (Hes2 und Hes3) wird eine Delta/Notch-unabhängige Funktion angenommen (Nishimura *et al.*, 1998).

Wie das *Drosophila* hairy-Gen oder das Säugerhomolog Hes1, zeigen Hey1 und Hey2 komplexe und dynamische Expressionsmuster. Beide Gene sind während der Neurogenese, der Somitogenese und an Orten mesenchymaler-epithelialer Wechselwirkungen exprimiert, wo sie ähnlich wie hairy/E(spl)/Hes an der Bildung von Zellgrenzen oder bei der Bestimmung von Zellschicksalen beteiligt sein könnten. Im Vergleich zu den Expressionsmustern der Hes-Gene oder den vorgeschalteten Notch-Rezeptoren (Notch1-4) bzw. Notch-Liganden (Dll1, Dll3, Jag1, Jag2) überlappt die Hey1- oder Hey2-Expression zwar zum Teil, ist aber nicht identisch mit der eines bestimmten Gens. In neuronalen Zellen ist Hey1-Expression mehr im ZNS, Hey2 dagegen mehr im PNS vertreten. Hey1 ist zunächst sehr früh während der Neurogenese in der Nasenplakode, zu beiden Seiten der Bodenplatte des Neuralrohrs und im Cerebellum zu finden. Dagegen ist es später auf die nicht-neuronalen Stützzellen des Riechepithels begrenzt, was mit einer potentiellen Rolle als neuronaler Repressor übereinstimmen würde. Im Riechepithel ist Hey2-Expression dagegen auf die differenzierenden Neuronalzellen beschränkt, wo es mit Notch2 und Notch3 überlappt (Lindsell *et al.*, 1996). Hey2 ist außerdem auffällig stark in den Spinalnerven und -ganglien sowie den Trigeminalganglien exprimiert und hier also mit Notch1 colokalisiert (Mitsiadis *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1995). So wie die Expressionsmuster der Hey1- und Hey2-Gene nicht mit denen eines einzelnen Notch-Gens übereinstimmen, sind auch bestimmte Notch-Rezeptoren nicht überall mit bestimmten Liganden coexprimiert. Darüber hinaus sind oft mehrere Rezeptoren und Liganden in einem bestimmten Gewebe exprimiert, was auf ein komplexes Netzwerk verschiedener Rezeptor-Liganden- bzw. Rezeptor-Effektoren-Kombinationen in Vertebraten hinweist (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

Besonders deutlich wird das beim Vergleich ihrer Expression während der Somitogenese. Im PSM und zumindest im zuletzt gebildeten Somiten sind Notch1-3, Dll1, Dll3 und Jag1 zum Teil überlappend und zum Teil komplementär exprimiert (Barrantes *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1995). So ist zum Beispiel Dll1 im gesamten PSM und der posterioren Hälfte der Somiten, besonders stark aber

im sich aktuell bildenden Somiten transkribiert. In letzterem sind Dll3, Notch1 und Notch2 zusätzlich in der anterioren Hälfte zu finden, wobei Notch1 ein stärkeres Signal in der posterioren Hälfte, Notch2 und Dll3 dagegen in der anterioren Hälfte zeigen. Als einziges der bisher bekannten Hes-Gene ist Hes5 im caudalen PSM und der posterioren Hälfte des gerade entstehenden Somiten zu finden. Die Funktion dieser Beteiligten am Delta-Notch-Signalübertragungsweg in der Somitogenese wird aktuell an den entsprechenden Knockout-Mäusen untersucht (Barrantes *et al.*, 1999; de la Pompa *et al.*, 1997; Hrabe de Angelis *et al.*, 1997). Während Dll1-, Dll3- und Notch1-Mutanten deutliche Defekte bei der Bildung der Somiten zeigen, sind Jag-1 und Notch2-4 für die Entwicklung anderer Gewebe essentiell (Gridley, 1997; Xue *et al.*, 1999). In den zuerst erwähnten Mutanten werden keine epithelialen Somiten gebildet, was insbesondere in Dll1-Knockout-Mäusen auf die Zerstörung der anterioren-posterioren Polarität der Somiten zurückzuführen ist (Hrabe de Angelis *et al.*, 1997). In Dll1-Mutanten ist die Expression der übrigen am Delta-Notch-Signalweg beteiligten Gene ebenfalls betroffen. Während Hes5 in PSM und im entstehenden Somit nicht mehr exprimiert ist, ist die Dll3-Expression stärker und die Notch1/2-Expression kaum verändert. In Notch1-Mutanten sind die Effekte auf die Genexpression anderer am Signalweg Beteiligter weniger deutlich, was auf eine Redundanz mit Notch2 zurückzuführen sein könnte (Barrantes *et al.*, 1999).

Abb. 37: Signalübertragung durch den Delta-Notch-Weg. Aktivierung von Notch (1-4) durch Ligandenbindung (Dll1/3, Jag1/2) führt zu proteolytischer Abspaltung der intrazellulären Domäne von Notch. RBP-J κ bildet einen Komplex mit der intrazellulären Notch-Domäne, der in den Zellkern wandert und die Transkription der Hes-Gene aktiviert. Transkriptionsfaktoren der Hes-Familie hemmen dann die Transkription Zell-Linien-spezifischer Gene und inhibieren dadurch zelluläre Differenzierung.



Interessanterweise sind auch Hey1 und Hey2 im PSM und den Somiten exprimiert. Während Hey1 in der caudalen Hälfte der Somiten und dem anterioren PSM mit Dll1 überlappt, ist es nicht im caudalen PSM zu finden. Hey2 dagegen ist auch im caudalen PSM exprimiert. Es zeigt im Hühnchen eine dynamische Expression im PSM und ein besonders starkes Signal im entstehenden Somiten, das zumindest schwach in der caudalen Hälfte der Somiten erhalten bleibt. Weder die Hey1- noch die Hey2-Expression überlappt also komplett mit Dll1 oder einem der anderen Gene des Delta-Notch-Signalwegs. In Dll1-Knockout-Mutanten ist die Hey1-Expression in PSM und den Somiten komplett gestört, während die Hey2-Expression zumindest im PSM nicht betroffen ist. Die fehlende Expression von Hey1 und Hey2 in einem der posterioren Somitenhälften entsprechenden Bereich ist vermutlich auf den Verlust der anterioren-posterioren Polarität in Dll1-Mutanten zurückzuführen. Da diese schon in den Somitomeren vor der Bildung der Somiten festgelegt wird, sind Hey1 und Hey2 auch nicht mehr im mutanten anterioren PSM exprimiert. Das könnte auf eine dem Dll1-Gen nachgeschaltete Funktion von Hey1/2 bei der Festlegung der anterioren-posterioren Identität hinweisen. Dagegen ist die Hey2-Expression im caudalen PSM nicht betroffen, was eine von Dll1 unabhängige Expression des Hey2-Gens bedeutet. Damit stellt sich aber auch die Frage, ob der Verlust der Hey2- und auch Hey1-Expression im anterioren PSM ein sekundärer Effekt ist. Die Präsenz zweier perfekter RBP-J κ -Bindungsstellen im Hey1-Promotor spricht allerdings für eine direkte Regulation des Hey1-Gens

durch den Delta-Notch-Signalweg (Manfred Maier, pers. Information). Für eine von Delta/Notch unabhängige Funktion des Hey2-Gens spricht seine dynamische Expression im PSM, die mit der von c-hairy1 vergleichbar ist. Untersuchungen der Somitogenese im Hühnchen deuten darauf hin, daß diese oszillierende c-hairy1 Expression als molekulares Uhrwerk eine temporale Periodizität festlegt, welche anschließend durch Zell-Zell-Kommunikation von der Delta-Notch-Kaskade in die räumliche Anordnung von Somitengrenzen „übersetzt“ wird (McGrew and Pourquie, 1998). Die Verknüpfung von c-hairy1 mit der Delta-Notch-Kaskade ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise ist also auch c-Hey2 an dieser molekularen Uhr beteiligt. L-fng - ein putativer Modulator des Delta-Notch-Signalwegs - zeigt eine ähnliche dynamische Expression, ist aber im Gegensatz zu c-hairy1 von neuer Proteinsynthese abhängig, also vermutlich c-hairy1 nachgeschaltet (Aulehla and Johnson, 1999; McGrew *et al.*, 1998). Zur Einordnung von c-Hey2 in diese regulatorischen Vorgänge bei der Segmentierung müßte jedoch noch die exakte temporale sowie räumliche Expression von c-Hey2 im Verhältnis zu c-hairy1 und L-fng sowie seine Abhängigkeit von *de novo* Proteinsynthese analysiert werden.

Eine potentielle Regulation der Nephrogenese durch Delta/Notch ist bislang wenig untersucht. Dll1, Notch1 und Notch2 sind im Metanephros exprimiert, allerdings sind die Expressionsmuster nicht im Detail dokumentiert (Weinmaster *et al.*, 1991; Weinmaster *et al.*, 1992). Jag1 ist in den mesonephrischen Tubuli und den Nephronvorläufern des Metanephros exprimiert (Mitsiadis *et al.*, 1997). Die entsprechenden Knockout-Mutanten sterben allerdings zu früh, als daß ein Effekt für die Nierenentwicklung beobachtet werden könnte. Die Funktion des Delta-Notch-Signalwegs - eventuell für die unterschiedliche Differenzierung in Stroma- oder nephrogene Zelllinie - und eine etwaige Beteiligung von Hey1 oder Hey2 müßte deshalb mit Organkultur-Experimenten oder in konditionellen Knockout-Mutanten untersucht werden.

Insgesamt zeigt die Analyse der Expressionsmuster von Hey1 und Hey2, daß sie häufig mit hairy-verwandten Genen oder Genen des Delta-Notch-Signalwegs colokalisiert sind und vermutlich ebenfalls eine Rolle bei der Zelldeterminierung und Ausbildung von Zellgrenzen spielen. Beide Gene sind dynamisch und spezifisch exprimiert, was gegen eine redundante Funktion spricht. Die Entdeckung der Hey-Gene wird vermutlich Auswirkungen für das Verständnis der Delta-Notch-Signalkaskade und der hairy-verwandten Gene haben, ähnlich wie sFRP für den Wnt-Signalweg. Somit wird die funktionelle Analyse der Hey-Gene neue Einblicke in die molekularen Grundlagen von Zellspezifikation und -differenzierung bei der Entwicklung der Niere und anderer Gewebe geben.