

## 1. Einleitung

Die Niere ist ein lebenswichtiges Organ, deren wesentliche Funktion in der Kontrolle der Salz- und Wasserausscheidung des Körpers liegt. Zusätzlich hat sie die Aufgabe Endprodukte des Stoffwechsels und Fremdstoffe wie z.B. Harnstoff bzw. Medikamente zu eliminieren und gleichzeitig wertvolle Blutbestandteile wie z.B. Glukose zu konservieren. Die funktionelle Einheit dieses komplexen Organs ist das Nephron, welches in Glomerulus und Bowmanscher Kapsel das Blut filtert und über das Harnkanälchen - bestehend aus proximalem Tubulus, Henlescher Schleife und distalem Tubulus - in die Sammelrohre leitet. Während dieser Passage werden viele lösliche Stoffe des Filtrats über die Tubuluswand zurück ins Blut transportiert und nur der Rest über den Harnleiter mit dem Urin ausgeschieden. Die menschliche Niere besteht aus etwa 1,2 Millionen Nephrone, die über Sammelrohre mit Nierenbecken und Ureter sowie über ein Netzwerk von Kapillaren mit dem Blutgefäßsystem verknüpft sind.

### 1.1 Entwicklung der Niere

Der Einsatz exkretorischer Tubuli als Ausscheidungsorgane ist ein phylogenetisch alter Mechanismus und Nephron-ähnliche Strukturen werden auch in primitiveren Organismen verwendet (Vize *et al.*, 1997). Der einfachste dieser Nierentypen, der Pronephros (Vorniere), existiert nur in einigen der niedersten Fischarten als funktionelles exkretorisches Organ. In allen höheren Fischarten und den Amphibien übernimmt der Mesonephros (Urnier), der caudal zum Pronephros entsteht, diese Funktion. Der Metanephros, oder die definitive Niere, entwickelt sich wiederum caudal zum Mesonephros und ist das Harnorgan der Reptilien, Vögel und Säugetiere.

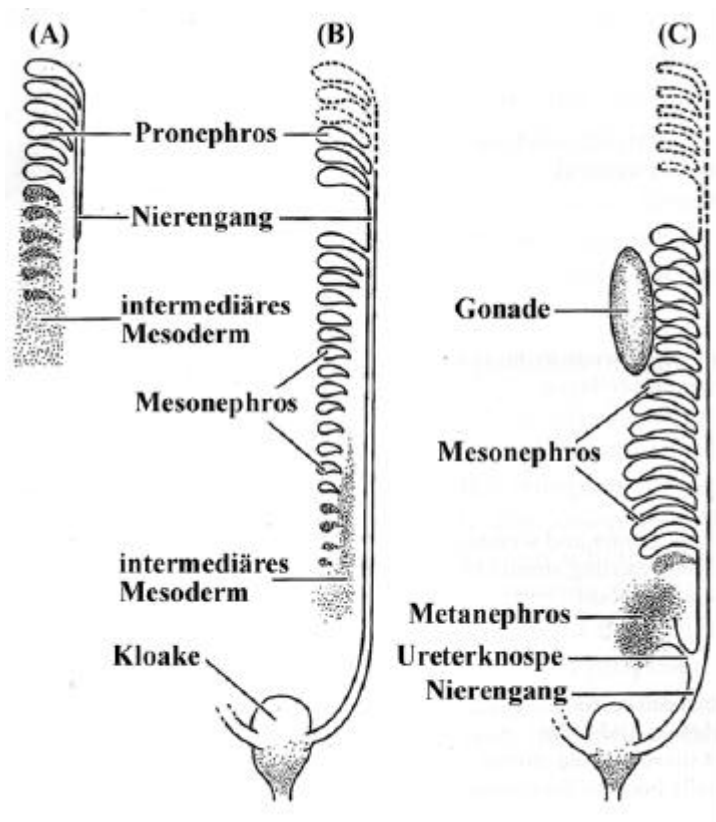
Interessanterweise wird diese phylogenetische Entwicklung von einfachen zu komplexeren Nierensystemen während der Embryonalentwicklung der Vertebraten wiederholt. Es entstehen von cranial nach caudal fortschreitend alle drei sich zeitlich etwas überlappende Nierensysteme: die Vorniere, die Urnieren und die Nachnieren.

**Tabelle 1:** Zeitplan (in Tagen) der Nierenentwicklung in einigen Vertebraten (nach Saxén, 1987)

	Pronephros	Mesonephros	Metanephros
Mensch	22	24	35-37
Maus	8	9,5	11
Ratte	10	11,5	12,5
Huhn	1,5	2,3	6

Die exkretorischen Nierenkanälchen aller dieser Systeme entwickeln sich aus einer paarigen mesodermalen Leiste (intermediäres Mesoderm) auf beiden Seiten des Körpers an der hinteren Wand der Bauchhöhle. Aus dieser mesodermalen Leiste entstehen in unmittelbarer Nachbarschaft zur Urnieren die Gonaden, weshalb sie auch als Urogenitaleiste bezeichnet wird. Sie grenzt an den Urnierengang (Wolffscher Gang), der einerseits als abführender Kanal von Vornieren und Urnieren (soweit funktionell) dient, andererseits eine induktive Rolle bei der Entwicklung von Urnieren und definitiver Niere spielt.

Die Vorniere besteht aus wenigen rudimentären, nicht funktionellen Paaren von Kanälchen, die am cranialen Ende des Urnierengangs aus dem benachbarten intermediären Mesenchym gebildet werden. Bevor die letzten Kanälchen entstanden sind, bilden sich bereits die ersten cranialen wieder zurück. Auch die Urnierenkanälchen werden nach diesem Schema gebildet und wieder abgebaut (etwa 20 bis 30 Paare). Sie entwickeln sich aus mesenchymalen Kondensaten, die in epitheliale Kanälchen umgeformt werden und sich S-förmig krümmen. Sie bilden an ihrem distalen Ende einen Glomerulus, münden am entgegengesetzten Ende in den Urnierengang und ähneln damit in Entwicklung und Struktur sehr stark den Nephronen des Metanephros. Während mesonephrische Tubuli beim Menschen vorübergehend Harn ausscheiden, sind sie in der Maus wahrscheinlich nicht funktionsfähig (Kaufmann and Bard, 1999). In weiblichen Embryonen bildet sich der Mesonephros komplett zurück, während im männlichen Embryo der Urnierengang sowie einige der caudalen Kanälchen erhalten bleiben und Teile der männlichen Genitalwege (Ductus deferens und Ductuli efferentes) bilden. Während der Degeneration der mesonephrischen Tubuli sproßt am caudalen Ende des Urnierengangs die sogenannte Ureterknospe. Dieser blind endende Epithelschlauch wächst in eine Gruppe mesenchymaler Zellen ein, die als metanephrogenes Blastem oder Mesenchym bezeichnet wird. Anschließend beginnt sich die Ureterknospe dichotom zu verzweigen. Aus ihr entsteht das gesamte ableitende System des Metanephros aus Sammelrohren, Nierenkelchen und Nierenbecken. Die Ausscheidungskanalchen oder Nephronen dagegen entwickeln sich aus dem metanephrogenen Mesenchym.

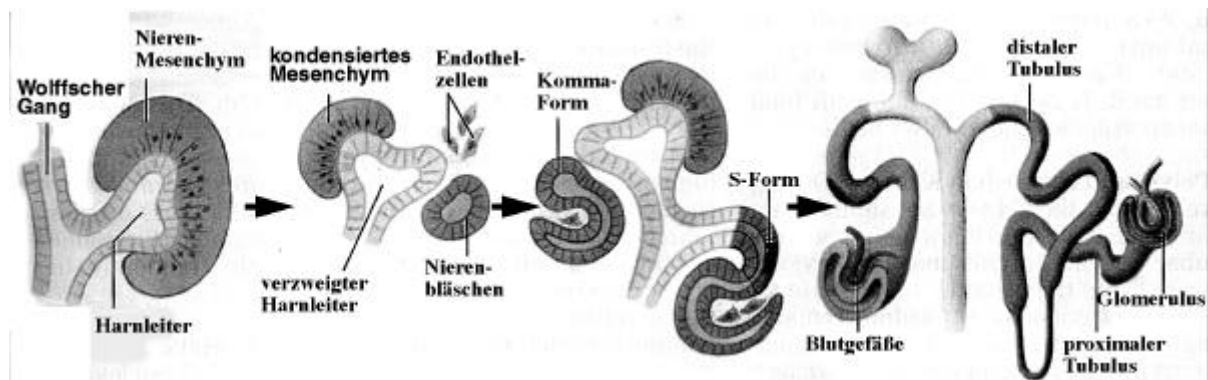


**Abb. 1:** Schematischer Überblick der Nierenentwicklung (nach Saxén 1987). (A) Die pronephrischen Tubuli werden im intermediären Mesenchym vom Nierengang induziert während dieser caudal auswächst. (B) Der Pronephros degeneriert und mesonephrische Tubuli bilden sich. (C) Die definitive Niere, der Metanephros, entsteht am caudalen Ende des Nierengangs durch Auswachsen der Ureterknospe.

## 1.2 Entwicklung der Nephrone

Die Verzweigung der Ureterknospe wird vom metanephrogenen Mesenchym induziert. An den Spitzen dieser Verzweigungen induziert wiederum der Ureter die Bildung von Nephrone im metanephrogenen Blastem. Es handelt sich hier also um eine klassische epitheliale-mesenchymale Interaktion und eine reziproke Induktion.

Induzierte mesenchymale Zellen, die die Ureterspitzen umgeben, beginnen sich zu teilen und zu differenzieren. Dabei werden sie zuerst in Stammzellen umgeformt, aus welchen zum einen die Nephrone, zum andern aber Stromazellen entstehen. Die Zellen der nephrogenen Linie kondensieren zunächst zu Aggregaten, die sich in Epithelzellen umformen. Diese Epithelzellen bilden kugelförmige Nierenbläschen, die sich zu einer Komma-förmigen Struktur verlängern und dann zu einem S-förmigen Kanälchen krümmen. Die Zellen des Kanälchens differenzieren in die regional unterschiedlichen Zelltypen der Nephrone wie z.B. die Zellen der Bowmannschen Kapsel, die Podozyten, die distalen und proximalen Tubuluszellen. Gleichzeitig entsteht eine Verbindung zwischen Nephron und ableitendem System. An jeder neuen Verzweigungsstelle des Ureters werden neue Nephrone induziert, so daß die sich entwickelnde Niere in späteren Entwicklungsstadien unterschiedlich weit differenzierte Nephrone besitzt. Die marknahen Nephrone sind die zuerst gebildeten und damit am weitesten differenzierten, während die Nephrone im Cortex jünger sind und an der Peripherie fortlaufend neue gebildet werden. In der Maus setzt sich die Nephrogenese noch etwa sieben bis zehn Tage nach der Geburt fort, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Niere bereits ihre Funktion aufgenommen hat.



**Abb. 2:** Entwicklung der Nephrone (nach Drews, 1995). An den Spitzen der einwachsenden und sich baumartig verzweigenden Ureterknospe kondensieren die Mesenchymzellen. Nach einer Reihe von Differenzierungsschritten bildet sich schließlich das Nephron.

Diese kurze Zusammenfassung der Nierenentwicklung beschreibt eine Vielzahl von Mechanismen, die auch bei der Entwicklung anderer Organe eine Rolle spielen: Sprossung einer epithelialen Struktur, gerichtetes Auswachsen in Richtung Mesenchym, mesenchymale-epitheliale Interaktion, Induktion, mesenchymale-epitheliale Umformung, epitheliale Morphogenese und Fusion, terminale Differenzierung. Ein Grund für das Studium der Nierenentwicklung ist also ihre Modellfunktion für andere Organe. Darüber hinaus ist ihre Morphogenese gut untersucht und in einem relativ einfachen Kultursystem nachvollziehbar (Grobstein, 1956). In solchen Organkulturen können

Ureterverzweigung, Nephronbildung und Differenzierung der Niere beobachtet und analysiert werden. Die Nierenanlage wird dadurch zugänglich für äußere Behandlung z.B. mit Antikörpern, Oligonukleotiden oder LiCl. Somit können Entwicklungsmechanismen und congenitale Nierenfunktionsstörungen des Menschen an der Niere der Maus oder an Mausmodellen untersucht werden (Überblick der Nierenentwicklung in Davies and Bard, 1998).

### 1.3 Congenitale Nierenfehlbildungen

Es gibt eine ganze Reihe von Nierenerkrankungen, die auf eine fehlerhafte Entwicklung der Niere zurückzuführen sind. So kann z.B. eine frühzeitige Aufspaltung der Ureterknospe zu einer Verdopplung des Ureters führen. Die sogenannte Hufeisenniere entsteht durch Verwachsung beider Nieren am unteren Pol zu einer. Viele Fehlbildungen der Niere führen zu einer Zystenbildung in den epithelialen Strukturen sowohl der Nephrone als auch des Ableitungssystems. In anderen Fällen fehlt die Niere ganz (Aplasie), ist mißgebildet (Dysplasie) oder es entwickeln sich bereits im Embryo oder Kleinkind Nierentumore (Wilms' Tumor).

In einigen Fällen sind bereits Kandidatengene oder zumindest die chromosomale Region bekannt, die zu der Erkrankung führen. So wurden Mutationen in drei Genen gefunden, die bei Ausbildung der Autosomalen Dominanten Polyzystischen Nierenerkrankung beteiligt sind. Das erste dieser Gene Polycystin (PKD1) ist ein Transmembranprotein, das in der embryonalen Niere stark, in der adulten Niere aber nur schwach exprimiert ist und vermutlich eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt (Palsson *et al.*, 1996). Das zweite dieser Gene, PKD2, ist ebenfalls ein Membranprotein und verwandt mit der Familie der Spannungs-aktivierten Kalziumkanäle (Mochizuki *et al.*, 1994). Es gibt Hinweise auf ein drittes Gen, ADPKD, das aber noch nicht kloniert ist (Daoust *et al.*, 1995). Ein Kandidatengen für die autosomal rezessiv vererbte Nephronophthisis, die sehr früh zur Zystenbildung und schließlich zu einem kompletten Nierenversagen führt, wurde in der chromosomalen Region 2q13 lokalisiert (Hildebrandt *et al.*, 1996).

Neben den polyzystischen Nieren ist der Wilms' Tumor eine häufig auftretende Fehlentwicklung (1 in 10.000). Dieser Tumor, der der häufigste solide Tumor bei Kindern ist, zeigt typischerweise eine große Anzahl proliferierender Blastemzellen mit kleinen Inseln differenzierter Epithel- oder Stromazellen. Genetische Studien führten zur Identifizierung des Tumorsuppressorgens WT1 in der Region 11p13, das allerdings nur in 15% der Fälle mutiert ist (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990). Auch das Denys-Drash- und das Frasier-Syndrom werden durch Mutationen im WT1-Locus ausgelöst und führen unter anderem durch mesangiale Sklerose bzw. glomeruläre Sklerose zu Nierenversagen (Klamt *et al.*, 1998; Pelletier *et al.*, 1991). Darüber hinaus ist das Denys-Drash-Syndrom durch eine Prädisposition für Wilms'-Tumor gekennzeichnet. Bei Patienten mit Alport-Syndrom, ist die Basalmembran der Glomeruli zerstört, was auf eine Mutation in einem Gen, das für die Kollagen-Kette  $\alpha 5$  der Basalmembran codiert, zurückzuführen ist (Zhou *et al.*, 1991).

Die genetische Analyse der Nierenfehlbildungen zeigt also, daß ganz unterschiedliche Genklassen betroffen sind für die korrekte Entwicklung der Niere essentiell sind. Das wird auch durch das Studium der Nierenentwicklung in der Maus klar, die ein gut untersuchtes und damit ideales Modellsystem der Säugetier-Embryogenese ist. Es gibt inzwischen eine ganze Reihe von Mausmutanten mit Deletionen in Genen, die während der Nierenentwicklung exprimiert werden. Einige, aber nicht alle, zeigten

tatsächlich Nierendefekte, wie z.B. polyzystische Nieren (bcl2) oder Nierenaplasie (c-ret, GDNF, WT1).

## 1.4 Molekulare Mechanismen der Nierenentwicklung

Das Verständnis der morphologischen Grundlagen der Nierenentwicklung bildet die Basis für die Untersuchungen der molekularen Prinzipien. Viele der morphogenetischen Abläufe wurden mit Hilfe der Organkultur von Maus-Nierenanlagen studiert. Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden führte dann zu einer explosionsartigen Vermehrung der Zahl neu entdeckter Gene, die während der Nierenentwicklung in den verschiedenen Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert sind. Insbesondere die Entwicklung der *in situ* Hybridisierung ermöglichte die genaue Lokalisation dieser Gene oder Genprodukte. Das sogenannte „Gene targeting“ - also die gezielte Veränderung von Genen und Erzeugung genetisch veränderter Mäuse - schaffte eine wesentliche Voraussetzung zur Untersuchung der Funktion dieser Gene. Die Organkultur blieb ebenfalls ein wichtiges Werkzeug für funktionelle Studien. Mit ihrer Hilfe können die Ursachen für einen bestimmten mutanten Nierenphänotyp im Detail untersucht werden. Darüber hinaus kann die Behandlung normaler Nierenanlagen mit antisense Oligonukleotiden oder Antikörpern Hinweise auf die Funktion der entsprechenden Gene/Proteine geben.

### Reziproke Induktion

Die weitaus größte Aufmerksamkeit wurde dem Prozeß der reziproken Induktion geschenkt. Schon vor mehr als 40 Jahren postulierte Grobstein, daß es ein vom Mesenchym ausgesandtes induktives Signal für das gerichtete Auswachsen der Ureterknospe und ein vom Ureter ausgesandtes Signal für die Differenzierung des Mesenchyms geben muß. Mittlerweile ist klar, daß diese Prozesse komplexer sind und viele Signale mit entsprechenden Rezeptoren zur Zellkommunikation bei den frühen Induktionsvorgängen beitragen.

Die Suche nach Molekülen, die das Auswachsen der Ureterknospe und ihre Morphogenese regulieren, führte zur Identifizierung eines Signalkomplexes aus der epithelialen Rezeptor-Tyrosinkinase c-ret, dem Corezeptor GDNFR- $\alpha$  und dem mesenchymalen Liganden GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor). Der Rezeptor c-ret ist in der Maus zwischen den Tagen 8 und 11,5 der Embryonalentwicklung (E8 - E11,5) im Wolffschen Gang und der auswachsenden Ureterknospe exprimiert (Pachnis *et al.*, 1993). Später (E13,5 - E17,5) ist die Expression auf die Spitzen des sich verzweigenden Ureters beschränkt. Gezieltes Ausschalten des c-ret-Gens in Mäusen führte zu Nierenaplasie und Hypodysplasie (Schuchardt *et al.*, 1994). Der eigentliche Defekt in der Nierenentwicklung homozygoter c-ret-Knockout-Mäuse besteht darin, daß die Ureterknospe nicht auswächst und nicht auf Signale des metanephrogenen Mesenchyms reagieren kann (Schuchardt *et al.*, 1996). Während Uretergewebe von c-ret-Mutanten *in vitro* auch nicht auf Wildtyp-Nierenmesenchym reagieren kann, wird mutantes Mesenchym in Kultur von Wildtyp-Uretergewebe induziert Nephronen zu bilden. Somit ist nur die Entwicklung der Ureterknospe in c-ret-defizienten Nierenanlagen gestört. Das sezernierte Glykoprotein GDNF ist ab E11,5 im metanephrogenen Mesenchym und später in den Nephronvorläufern exprimiert (Hellmich *et al.*, 1996). Mausmutanten, welchen GDNF fehlt, zeigen

einen den c-ret-Mutanten sehr ähnlichen Phänotyp: mesonephrische Tubuli und der Wolffsche Gang entwickeln sich normal, aber es wächst keine Ureterknospe aus (Moore *et al.*, 1996; Pichel *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1996). Das metanephrogene Blastem wird zwar gebildet, aber wegen ausbleibender Induktion durch Apoptose abgebaut. Mit rekombinantem GDNF getränkte Kügelchen können ein Auswachsen des Ureters in GDNF- aber nicht in c-ret-defizienten Nierenanlagen induzieren (Durbec *et al.*, 1996; Pichel *et al.*, 1996). Diese Knockout- und Kulturexperimente deuten darauf hin, daß der vom Mesenchym sezernierte Faktor GDNF an den c-ret-Rezeptor des Ureterepithels bindet und das Auswachsen sowie die Morphogenese der Ureterknospe reguliert. Für eine stabile Bindung ist zusätzlich der Corezeptor GDNFR- $\alpha$  erforderlich (Treanor *et al.*, 1996). Der Phänotyp der c-ret- und GDNF-Mutanten ist sehr variabel und es entwickeln sich in den c-ret-Mutanten doch einige Ureterknospen, die sich *in vitro* verzweigen können (Schuchardt *et al.*, 1994; Schuchardt *et al.*, 1996). Das deutet darauf hin, daß noch andere Signalkomplexe neben c-ret/GDNFR- $\alpha$ /GDNF für das Auswachsen der Ureterknospe eine Rolle spielen. c-ros und c-met sind ebenfalls Rezeptoren, die im Ureterepithel exprimiert sind, aber sie zeigen keinen Nierenphänotyp im Knockout-Experiment. Ebenso konnten *in vitro* Experimente mit Antikörpern gegen den c-met Liganden HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), die zur Hemmung der Ureterentwicklung führten, *in vivo* nicht bestätigt werden (Schmidt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995; Woolf *et al.*, 1995).

Für die Induktion des metanephrogenen Mesenchyms an den Spitzen der Ureterverzweigungen konnte bislang kein entsprechender Signalkomplex identifiziert werden. Wnt-Proteine - sezernierte Glykoproteine, die bei verschiedenen Musterbildungsprozessen während der Vertebraten Morphogenese eine Rolle spielen - sind derzeit die besten Kandidaten als Induktoren des Nierenblastems. Die Wnt-Gene der Vertebraten sind Homologe des *Drosophila* wingless-Proteins, das für die korrekte Ausbildung der Flügel verantwortlich ist. *In vitro* Experimente zeigten, daß Wnt1 exprimierende Zellen die Nephronbildung in isoliertem metanephrogenen Mesenchym induzieren können (Herzlinger *et al.*, 1994). Allerdings ist Wnt1 nicht im Ureter exprimiert, so daß wahrscheinlich andere Vertreter dieser mittlerweile fast zwanzig Mitglieder umfassenden Genfamilie die Induktions-Funktion in der Niere übernehmen. Interessanterweise wird Wnt1 im dorsalen Rückenmark transkribiert, das als effektivster heterologer Induktor des Nierenmesenchyms anstelle der Ureterknospe in Kultur verwendet wird. In der Niere sind Wnt11, Wnt7b und Wnt4 exprimiert. Während Wnt7b im gesamten Sammelrohr-System zu finden ist, markiert Wnt11 nur die Spitzen des sich verzweigenden Ureters, also die für die Mesenchyminduktion entscheidende Stelle (Kispert *et al.*, 1996). In Organkultur wurde jedoch gezeigt, daß Wnt11 exprimierende Zellen die Nephronbildung nicht induzieren können (Kispert *et al.*, 1998). Wnt4, welches während der normalen Entwicklung im kondensierenden metanephrogenen Mesenchym und in den daraus entstehenden Nephronvorläufern exprimiert ist, kann dagegen die Nephrogenese in isoliertem Mesenchym induzieren und vorantreiben. Knockout-Studien in Mäusen zeigten, daß Wnt4 essentiell für die Nierenentwicklung ist: homozygote Wnt4-Knockout-Mäuse sterben bei Geburt an Nierenaplasie (Stark *et al.*, 1994). Obwohl eine Kondensation des Mesenchyms stattfindet, bleibt eine weitere Differenzierung aus. Überraschenderweise kann die Nephrogenese in Mesenchym von Wnt4-Knockout-Mäusen durch dorsales Rückenmark ausgelöst werden, was dafür spricht, daß dieser heterologe Induktor die Funktion von Wnt4 und nicht eines anderen vom Ureter ausgehenden Signals ersetzt. Wnt4 ist demnach ein entscheidender Autoregulator der Mesenchym-Induktion und der mesenchymalen-epithelialen Umformung. Allerdings bleibt unklar, welches vom Ureter sezernierte Molekül die

Expression von Wnt4 auslöst. Ein weiteres Indiz für die Beteiligung eines Wnt-Moleküls am Induktionsprozeß, ist die Funktion von Lithiumchlorid als Induktor der Nephrogenese *in vitro*. Es konnte gezeigt werden, daß Lithium die Glykogen-Synthase- Kinase 3 (GSK3) inhibiert, die auch ein Zielmolekül des Wnt-Signaltransduktionsweges ist (Klein and Melton, 1996).

Homologe des *Drosophila* frizzled (fz) Proteins fungieren wahrscheinlich als Rezeptoren der Wnt-Signalmoleküle. Es sind Membranproteine mit sieben Transmembrandomänen und einer extrazellulären Cystein-reichen Domäne (CRD), die für die Bindung der Wnt-Liganden verantwortlich ist (Bhanot *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Yang-Snyder *et al.*, 1996). Bislang wurden acht fz-Rezeptoren in Säugetieren identifiziert, über deren Expression und Funktion in der Niere allerdings wenig bekannt ist. Darüber hinaus wurde vor kurzem eine Klasse von Proteinen entdeckt, die zwar die CRD aber nicht die Transmembrandomänen der fz-Rezeptoren besitzen: die sFRPs (secreted frizzled related proteins) (Finch *et al.*, 1997; Leyns *et al.*, 1997; Rattner *et al.*, 1997; Shirozu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997a). Obwohl in einigen Fällen eine Bindung von sFRP-Molekülen an wingless oder Wnts und in *Xenopus* eine antagonistische Wirkung von frz-b durch Bindung an XWnt-8 gezeigt wurde, ist die Funktion dieser potentiellen Wnt-Modulatoren noch unklar.

Der Prozeß der mesenchymalen Induktion erhält weitere Komplexität durch die die Entdeckung, daß sulfatierte Glykosaminoglykane (S-GAG) die Bindung von Wnt-Molekülen und anderen Wachstumsfaktoren an die entsprechenden Rezeptoren regulieren bzw. ermöglichen. In *Drosophila* wurde gezeigt, daß Heparin-ähnliche Glykosaminoglykane die wingless Signalübertragung beeinflussen (Binari *et al.*, 1997; Hacker *et al.*, 1997; Haerry *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde in früheren *in vitro* Analysen der Nierenentwicklung demonstriert, daß die Hemmung der *de novo* Sulfatierung von Glykosaminoglykanen durch Chlorat Wachstum und Verzweigung des Ureters aber nicht die Nephrogenese reversibel hemmt (Davies *et al.*, 1995). Hemmung der Proteoglykansynthese führt auch zu einem Verlust der Wnt11-Expression an den Spitzen des Ureters (Kispert *et al.*, 1996). Weitere Hinweise für die Bedeutung der Glykosaminoglykane in der Nierenentwicklung ergab die Untersuchung von Mäusen mit einer „gene trap“-Mutation in der Heparansulfat-2-Sulfotransferase (Hs2st), einem für die Synthese der Heparansulfate benötigten Enzym (Bullock *et al.*, 1998). In Hs2st Knockout-Mäusen wächst die Ureterknospe zwar vom Wolffschen Gang aus, aber verzweigt sich nicht. Dadurch bleibt auch die Kondensation von metanephrogenem Mesenchym um die Ureterknospe aus. Neben den Wnt-Proteinen binden Wachstumsfaktoren der FGF-Familie (fibroblast growth factor) an Heparansulfat-Proteoglykane. FGF2 wurde als das Molekül eines Hypophysenextrakts identifiziert, das die Kondensation des metanephrogenen Mesenchyms in Kultur induzieren kann (Perantoni *et al.*, 1995). Allerdings zeigen FGF2-Knockout-Mäuse keinen Nierenphänotyp, was vermutlich mit der Expression weiterer FGF-Mitglieder in der sich entwickelnden Niere zu erklären ist (Finch *et al.*, 1995).

### Weitere Signalmoleküle

Neben Wnt-4 und GDNF ist auch Shh (sonic hedgehog) ein Faktor, der im Knockout-Experiment zum Verlust der Nieren führt (Chiang *et al.*, 1996). Allerdings kann das Fehlen der Nieren auch ein sekundärer Effekt sein, der durch die ebenfalls gestörte Entwicklung der Körperachse und damit des intermediären Mesoderms hervorgerufen wird.

Die Faktoren BMP7 (bone morphogenic protein 7) und PDGF-B (platelet-derived growth factor-B) sind für die spätere Entwicklung der Niere essentiell. In der normalen Entwicklung ist das BMP7-Gen sowohl im Ureter als auch im metanephrogenen Mesenchym und den daraus entstehenden Tubuli exprimiert. BMP7-defiziente Nierenanlagen zeigen weniger Verzweigungen des Ureters und zusätzlich ein Absterben des metanephrogenen Blastems durch Apoptose (Dudley *et al.*, 1995; Dudley and Robertson, 1997; Luo *et al.*, 1995). Dieser Wachstumsfaktor scheint also für kontinuierliches Wachstum in der späteren Entwicklung essentiell zu sein. PDGF-B und der entsprechende Rezeptor PDGF-R $\beta$  sind für die Bildung von Mesangiumzellen im Glomerulus verantwortlich, da diese Zellpopulation in Mausmutanten, welchen eines dieser Gene fehlt, nicht vorhanden ist (Leveen *et al.*, 1994; Soriano, 1994).

### Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren koordinieren die Expression aller an der Nierenentwicklung beteiligter Gene und regulieren damit nicht nur die Induktion, sondern auch die Differenzierung in verschiedene Zellpopulationen.

Pax-Gene codieren für Transkriptionsfaktoren mit einer charakteristischen „Paired-Box“ als DNA-Bindungsdomäne. Mutationen in Pax-Genen beim Menschen und der Maus verdeutlichen die entwicklungsbiologische Relevanz dieser Genfamilie für die Morphogenese des Skeletts (Pax1), von Auge und Nase (Pax6), der Schilddrüse (Pax8), der Kiementaschen-Derivate und Zähne (Pax9), der Wanderung von Neuralleistenzellen und Prä-Myoblasten (Pax3), der Entwicklung von B-Zellen und Mittelhirn (Pax5), sowie der Entwicklung der Niere (Pax2) (Mansouri *et al.*, 1999). In der sich entwickelnden Niere ist zunächst Pax2 und später auch Pax8 exprimiert. Pax2 ist schon sehr früh während der Urogenitalentwicklung im Wolffschen Gang, den mesonephrischen Tubuli und später im kondensierenden metanephrogenen Mesenchym und in Komma-förmigen Strukturen zu finden. Die Expression wird allerdings schon in den S-förmigen Nephronvorläufern gedrosselt und ist im reifen Nephron nicht mehr nachweisbar (Dressler *et al.*, 1990). Der Verlust des Pax2-Gens führt zur Degeneration von Wolffschem und Müllerschem Gang. Es werden weder mesonephrische Tubuli gebildet, noch wächst die Ureterknospe aus, wodurch die Induktion des Mesenchyms ausbleibt und es apoptotisch degradiert. In Pax2-Mutanten ist also die Entwicklung des gesamten intermediären Mesenchyms gestört. Pax8 ist etwas später als Pax2 in Nierenvesikeln exprimiert und es ist auch in späteren Differenzierungsstadien zu finden. Von Pax8-Knockout-Mäusen wird kein Nierendefekt berichtet (Mansouri *et al.*, 1998).

Es gibt Hinweise auf die Aktivierung des WT1-Tumor-Suppressorgens durch Pax-Proteine (Dehbi *et al.*, 1996; Dehbi and Pelletier, 1996). Darüber hinaus wird für Pax2 und WT1 eine gegenseitige Regulierung postuliert, indem Pax2 die WT1-Expression aktiviert und anschließend WT1 die Pax2-Expression reprimiert. WT1 ist bereits im nicht-induzierten metanephrogenen Mesenchym exprimiert und wird nach Induktion verstärkt transkribiert. In WT1-Knockout-Mausmutanten wächst wie in Pax2-Mutanten die Ureterknospe nicht aus und das Mesenchym stirbt apoptotisch ab (Kreidberg *et al.*, 1993). Durch Verlust des WT1-Gens kann das Signal für das Auswachsen der Ureterknospe nicht gebildet werden und das metanephrogene Mesenchym reagiert *in vitro* nicht auf dorsales Rückenmark. Auch für einige Homeobox-Transkriptionsfaktoren - Proteine mit Homeo-DNA-Bindungsdomäne - konnte eine bedeutende Funktion in der Nierenentwicklung gezeigt werden. Lim1 ist schon für die



Entwicklung von Pronephros und Mesonephros verantwortlich. Da Mausmutanten bereits am Embryonaltag 10 sterben, kann die Funktion von Lim1 für die Entwicklung des Metanephros an diesem Modell nicht untersucht werden (Shawlot and Behringer, 1995). Expression in Wolffschem Gang und induzierten Nierentubuli lassen aber auf eine Bedeutung von Lim1 in der frühen Nierenentwicklung schließen. Emx2 ist wie Pax2 im Wolffschen Gang und in der Ureterknospe exprimiert. Im Nierenmesenchym ist es allerdings erst in den epithelialen Nephronvorläufern zu finden. In Emx2-Knockout-Mäusen fehlt wie in Pax2-Mutanten der Genitaltrakt und die Nieren (Miyamoto *et al.*, 1997). Die Ureterknospe wächst aus, aber verzweigt sich nicht, was auf eine dem Pax2-Gen nachgeschaltete Funktion des Emx2-Gens hinweist. Mutationen der klassischen Hox-Gene führen zu keinem Nieren-Phänotyp. Doppelmutanten der Hoxa11- und Hoxd11-Gene - beide normalerweise im metanephrogenen Mesenchym exprimiert - fehlen dagegen eine oder beide Nieren (Davis *et al.*, 1995).

Nach Induktion durch die Ureterknospe entstehen aus dem Nierenmesenchym nicht nur nephrogene, sondern auch interstitielle oder Stromazellen, die in der Peripherie der Niere und später zwischen Nephron- und Ureterzellen lokalisiert sind. Durch die gezielte Ausschaltung des in Stroma-Zellen exprimierten BF2-Winged-Helix-Transkriptionsfaktors in Mäusen, wurde eine Funktion des Stromas für die Morphogenese von Ureter und Mesenchym über eine reine Stützfunktion hinaus offenbar (Hatini *et al.*, 1996). In BF2-Knockout-Mäusen sind zwar Stromazellen vorhanden, aber die Entwicklung von Ureter und nephrogenem Mesenchym ist gestört. Die Mausmutanten sterben kurz nach der Geburt und haben kleine, fusionierte Nieren. Sie bilden weder Komma- noch S-förmige Nephronvorläufer.

Neben Transkriptionsfaktoren, die bei der reziproken Induktion oder der Entwicklung der verschiedenen Zellpopulationen mitwirken, kontrollieren andere die Zellproliferation (z.B. p53) oder den Zelltod (z.B. bcl2).

### **Adhäsionsmoleküle und Extrazelluläre Matrix Proteine**

Nach Induktion des metanephrogenen Mesenchyms spielen Zellaggregation, Zellwanderung und Polarisation der neu gebildeten Epithelzellen eine große Rolle. Das erfordert auch eine Umbildung der Extrazellulären Matrix (ECM) und der Zelladhäsionsmoleküle. Untersuchungen der Cadherin-Expression zeigten, daß unterschiedliche Vertreter dieser Genfamilie in Ureter und den verschiedenen Abschnitten des Nephrons exprimiert sind (Cho *et al.*, 1998). E-Cadherin wird in der Ureterknospe, den Sammelrohren und den reifen distalen Nierentubuli beobachtet. Cadherin-11 ist im nicht-induzierten Mesenchym, Cadherin-6 in den mesenchymalen Aggregaten, den Nierenbläschen und den proximalen Tubulusvorläuferzellen exprimiert. P-Cadherin schließlich markiert den Glomerulus und die Podozyten. Bereits im primitiven Nierenbläschen ist ein Teil dieses Musters festgelegt, indem die proximale Hälfte Cadherin-6 und die distale Hälfte E-Cadherin exprimiert. Anhand der Cadherin-Genexpression kann nicht nur die Entwicklung der einzelnen Zelltypen der Niere verfolgt werden; die Expression verschiedener Cadherinmoleküle mit unterschiedlicher Adhäsionsspezifität könnte auch einen wichtigen regulatorischen Mechanismus repräsentieren. Cadherine binden intrazellulär an Catenine, die eine Verbindung zum Aktinfilament-Netzwerk oder zu anderen Transmembran- und Cytoplasmaproteinen herstellen. So bildet z.B.  $\beta$ -Catenin intrazellulär einen Komplex mit APC (Adenomatous Poliposis Coli), und diese Bindung wird reguliert durch die GSK3 - einer Komponente

des Wnt-Signaltransduktionswegs. Damit bekommen die Cadherine über die reine Adhäsionsfunktion hinaus eine neue regulatorische Bedeutung in der Kontrolle der epithelialen Morphogenese, was auch im dominant-negativen Versuchsansatz oder in Knockout-Experimenten gezeigt wurde (Huber *et al.*, 1996). Laminine - extrazelluläre Adhäsions-Glykoproteine - sind für die Bildung der Basalmembran und damit für die epitheliale Entwicklung essentiell. Sie binden an Rezeptoren auf epithelialen oder mesenchymalen Oberflächen wie z.B. Integrine. Nieren-Organkultur Experimente gaben Hinweise auf die Bedeutung dieser Rezeptoren und ihrer Liganden für die mesenchymale-epitheliale Transformation des metanephrogenen Mesenchyms nach Induktion (Ekblom, 1996). Das wurde *in vivo* durch Zerstörung der Integrin- $\alpha_8$ -Untereinheit in Mäusen, in welchen Wachstum und Verzweigung des Ureters sowie die Nephrogenese gestört ist, bestätigt (Muller *et al.*, 1997).

### **Entscheidung zwischen nephrogener Linie und Stroma**

Die Induktion des metanephrogenen Mesenchyms führt zunächst zur Bildung von Stammzellen, die sich anschließend entweder zu nephrogenen Zellen oder zu Stromazellen differenzieren. Ein Mechanismus für die gegensätzliche Determinierung einzelner Zellschicksale wurde in Untersuchungen der Neurogenese in *Drosophila* beschrieben. Das System der sogenannten „lateralen Inhibition“, welches durch den Delta-Notch-Signaltransduktionsweg vermittelt wird, bestimmt in benachbarten ektodermalen Zellen die Entwicklung entweder zur Nervenzelle oder zur Epidermiszelle. Der Ligand Delta bindet an den Rezeptor Notch der Nachbarzelle, der das Signal an den Zellkern übermittelt. Dadurch werden Gene des Enhancer of Split-Komplexes angeschaltet, die als Repressoren neuronaler Gene fungieren und somit den neuronalen Phänotyp unterdrücken. Dieser Mechanismus spielt außerdem bei anderen Prozessen wie z.B. der Segmentierung eine Rolle und Homologe von Delta und Notch wurden auch in Vertebraten identifiziert (Fisher and Caudy, 1998). Ihre Funktion bei der Bestimmung von Zellschicksalen und Zellgrenzen wird derzeit intensiv untersucht. In der sich entwickelnden Niere der Maus sind Notch1 und Notch2, sowie Dll1 (Delta-like1) und Jag1 (Jagged1, ein weiterer Notch Ligand homolog zu *Drosophila serrate*) exprimiert und möglicherweise an der Entscheidung zwischen Stroma- und Nephronzelle beteiligt (Mitsiadis *et al.*, 1997; Weinmaster *et al.*, 1991; Weinmaster *et al.*, 1992). Allerdings sterben die entsprechenden Knockout-Mutanten zu früh um diese Beteiligung untersuchen zu können (Conlon *et al.*, 1995; Hrabe de Angelis *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 1999).

Die hier beschriebenen und auch die meisten bisher bekannten Gene, die während der Nierenentwicklung exprimiert sind, wurden in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren entdeckt. Eine Aufstellung dieser Gene, die ständig aktualisiert wird, ist in der „Kidney Development Database“ unter <http://www.ana.ed.ac.uk/anatomy/kidbase/kidhome.html> zu finden.

## 1.5 Zielsetzung

Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der Nephrogenese ist nicht nur für die Ursachenforschung von Fehlbildungen oder pathologischen Veränderungen der Niere von Bedeutung. Sie trägt auch zum Verständnis von allgemeinen Entwicklungsprozessen bei, wie z.B. Induktion, mesenchymale-epitheliale Transformation oder terminale Differenzierung, die in der Entwicklung anderer Gewebe ebenfalls eine Rolle spielen. Der derzeitige Kenntnisstand zeigt, daß noch viele Bestandteile der komplexen regulatorischen Netzwerke und deren Zielgene fehlen.

Zur Identifizierung von Genen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Nierenentwicklung exprimiert sind, bieten sich Methoden wie subtraktive Hybridisierung oder die sogenannte „Differential Display PCR“ an. Dabei wird beispielsweise die Genexpression von zwei Entwicklungsstadien verglichen und somit gezielt nach Veränderungen in einem Gewebe zu einer bestimmten Zeit gesucht.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, deren Transkription im metanephrogenen Mesenchym der Maus durch Induktion reguliert wird. Mit Hilfe der Transfilter-Organkultur sollte dieses Mesenchym getrennt von Uretergewebe kultiviert und induziert werden. Die Genexpression von induziertem *versus* nicht-induziertem metanephrogenem Blastem sollte mit Hilfe der Differential Display PCR verglichen und induzierte sowie reprimierte Gene identifiziert werden. Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen sollten durch Sequenzierung und anschließendem Vergleich mit Gen-Datenbanken überprüft werden. Da die Differential Display Methode auf der Amplifizierung von 3'-Enden aller in einem Gewebe exprimierter mRNAs beruht, mußten längere oder vollständige cDNAs neuer Gene ausgehend von diesen Gen-Endsequenzen erst isoliert werden. Diese sollten Auskunft über Art des Gens/Proteins und etwaige Sequenzhomologien geben. Anschließend sollte die Expression der isolierten Gene während der Embryonal- und insbesondere der Nierenentwicklung untersucht werden.