

Identifizierung und Charakterisierung von Genen für die Entwicklung  
der Nieren und des Urogenitalsystems

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Comelia Leimeister  
aus  
Kreuzwertheim

Würzburg 1999

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung der Niere	1
1.2	Entwicklung der Nephrone	3
1.3	Congenitale Nierenfehlbildungen	4
1.4	Molekulare Mechanismen der Nierenentwicklung	5
1.5	Zielsetzung	11
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1	Tierstämme	12
2.2	Bakterienstämme	12
2.3	cDNA-Bibliotheken und Hybrid-DNA-Panel	12
2.4	Plasmidvektoren	12
2.5	I.M.A.G.E.-Klone	13
2.6	Oligonukleotide	13
2.7	Gewebekultur-Medien und Seren	15
2.8	Pufferlösungen	15
2.10	Chemikalien	15
2.11	Software	16
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	DNA-Präparationen	17
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach der Rapid-Boiling-Methode	17
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA durch Adsorption an Säulenmaterial	17
3.1.3	Isolierung von Lambda-DNA aus Phagen-Lysaten	17
3.2	Isolierung von RNA	18
3.2.1	RNA-Präparation nach der Single-Step-Methode	18
3.2.2	RNA-Präparation mit TRIzol-Reagens	19
3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
3.4	Gelelektrophoresen	19
3.4.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	19
3.4.2	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	19
3.4.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
3.5	Transfer von DNA und RNA	21
3.5.1	Southern-Blotting	21
3.5.2	Northern Blotting	21
3.6	Radioaktive Markierung von DNA und Filterhybridisierung	21
3.7	PCR-Methoden	23
3.7.1	Präparative PCR	23
3.7.2	Analytische PCR	23
3.7.3	Differential Display PCR-Analyse	23

3.8	DNA-Klonierungstechniken	25
3.8.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	25
3.8.2	Ligation von DNA	25
3.9	Transformation kompetenter Bakterien	26
3.9.1	Herstellung kompetenter Bakterien	26
3.9.2	Transformation	26
3.10	Sequenzierung	26
3.11	Screening von cDNA-Bibliotheken	27
3.11.1	Bestimmung des Phagen-Titers	27
3.11.2	Ausplattieren der DNA-Bibliotheken und Transfer auf Filtermembranen	27
3.11.3	Detektierung und Analyse rekombinanter Phagen	28
3.11.4	Cre-vermittelte <i>in vivo</i> Excision von Plasmiden	28
3.12	Protein-Expression	28
3.12.1	Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	28
3.12.2	<i>In vitro</i> Synthese von Proteinen durch Transkription/Translation von klonierten Genen	29
3.13	Protein-Analyse	29
3.13.1	Konzentrationsbestimmung	29
3.13.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.13.3	GST-pulldown-Assay	30
3.13.4	Elektrophoretic mobility shift assay (EMSA)	30
3.14	Gewebe-Präparationen und -Kulturen	32
3.14.1	Präparation gezielt angepaarter Mausembryonen	32
3.14.2	Präparation und Kultur von Maus-Nierenanlagen	32
3.14.3	Präparation von Hühnerembryonen	32
3.15	Einbett- und Schnitt-Techniken	32
3.15.1	Einbetten und Schnitte von Mausembryonen in Paraffin	32
3.15.2	Gelatine/Albumin-Einbettung von Embryonen und Vibratomschnitte	33
3.16	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung ganzer Embryonen oder Paraffinschnitte	33
3.16.1	Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Proben durch <i>in vitro</i> Transkription	33
3.16.2	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung ganzer Mausembryonen	34
3.16.3	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung von Hühnerembryonen	36
3.16.4	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung von Paraffinschnitten	36
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Identifizierung differentiell exprimierter Gene in der frühen Nierenentwicklung	37
4.1.1	ddPCR-Analyse von kultiviertem metanephrogenen Mesenchym	37
4.1.2	Identifizierung bekannter Gene	39
4.1.3	Identifizierung neuer Gene	42
4.2	Untersuchungen zu den ddPCR-Produkten C0-5, J6-3 und M2-4	44
4.2.1	C0-5: Identifizierung eines neuen kollagenartigen Gens	44
4.2.1.1	Screening einer cDNA-Bank und Sequenzanalysen	44

4.2.1.2	Computeranalyse des C-Gens	45
4.2.1.3	Expressionsanalyse des C-Gens	47
4.2.2	J6-3: Identifizierung eines Gens, das in Stromazellen exprimiert ist	49
4.2.2.1	Expression des J-Gens	49
4.2.3	M2-4: Identifizierung eines Gens mit mehreren Isoformen	51
4.2.3.1	Sequenzanalyse des M-Gens	51
4.2.3.2	Expression des M-Gens	51
4.3	Expressionsanalyse von sFRP-Genen	53
4.3.1	Expression der sFRP-Gene während der Nierenentwicklung	54
4.3.2	Expression von sFRP-Genen im Zentralen Nervensystem	56
4.3.3	Expression von sFRP-Genen während der Augenentwicklung	58
4.3.4	Expression von sFRP2 bei der Gelenkentwicklung	58
4.3.5	sFRP-Genexpression an anderen Stellen mesenchymaler-epithelialer Wechselwirkungen	61
4.4	Identifizierung einer neuen Genfamilie von hairy- und Enhancer of split-verwandten Genen	63
4.4.1	Screening embryonaler cDNA-Banken und Sequenzanalyse	63
4.4.2	Expression von Hey1 in der Niere und anderen Geweben mesenchymaler-epithelialer Wechselwirkungen	64
4.4.3	DNA- und Proteinbindung von Hey1	66
4.4.4	Genomische Lokalisierung von Hey1 in Mensch und Maus	68
4.4.5	Identifizierung von zwei weiteren bekannten Genen	69
4.4.6	Vergleichende Expressionsanalyse der murinen Hey1- und Hey2-Gene	71
4.4.6.1	Northern Blot Analyse der Hey1- und Hey2-Expression	71
4.4.6.2	Expressionsmuster von Hey1 und Hey2 während der frühen Maus-Embryogenese	72
4.4.6.3	Komplementäre Expression von Hey1 und Hey2 während der Herzentwicklung	74
4.4.6.4	Expression von Hey1 und Hey2 in der Neurogenese	76
4.4.6.5	Hey1- und Hey2-Expression während der Somitogenese	77
4.4.6.5.1	Expression während der Somitogenese in der Maus	77
4.4.6.5.2	Expression von Hey1 in Skelettmuskelvorläufern	77
4.4.6.5.3	Expression während der Somitogenese im Hühnchen	78
4.4.7	Untersuchung der Expression von Hey1 und Hey2 in Dll1-Mausmutanten	80
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>94</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>105</b>