

Molekulare Analyse der Ureterentwicklung in der Maus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Univ. Anna Barbara Foik
Geboren am 27. August 1980 in Essen

2011

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kispert
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ernst Ungewickell
Tag der Promotion: 28. Juli 2011



Medizinische Hochschule
Hannover



Diese Arbeit wurde angefertigt
am
Institut für Molekularbiologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
unter der Betreuung von
Prof. Dr. Andreas Kispert

Meiner Mutter
Meinem Vater

1.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	III
1.1.	ABBILDUNGEN IN DER EINLEITUNG	III
1.2.	ABBILDUNGEN IM ERGEBNISTEIL	III
1.3.	ABBILDUNGEN IM DISKUSSIONSTEIL	VII
1.4.	TABELLENVERZEICHNIS	VII
2.	ABKÜRZUNGEN	IX
3.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
	ABSTRACT	2
4.	EINLEITUNG	3
4.1.	DER URETER IST TEIL DES UROGENITALSYSTEMS.....	3
4.2.	ENTWICKLUNG DES URETERS	5
4.3.	FEHLBILDUNGEN DES URETERS.....	6
4.3.1.	<i>Physikalische Obstruktion</i>	<i>7</i>
4.3.2.	<i>Funktionelle Obstruktion</i>	<i>8</i>
4.4.	REGULATION DER URETERENTWICKLUNG	9
4.4.1.	<i>Molekulare Mechanismen der Ureterknospenbildung.....</i>	<i>9</i>
4.4.2.	<i>Molekulare Mechanismen der Ureterdifferenzierung.....</i>	<i>11</i>
4.5.	REGULATION DER DIFFERENZIERUNG VON GLATTER MUSKULATUR	13
4.6.	BEDEUTUNG VON BMP4 FÜR DIE ENTWICKLUNG DER URETEREN UND DER NIEREN	14
4.7.	BMP4-MUTATIONEN IM MENSCHEN	17
4.8.	ZIELSETZUNG	18
5.	MATERIALIEN UND METHODEN	19
5.1.	VERWENDETE GERÄTE	19
5.2.	SUBSTANZEN	19
5.2.1.	<i>Lösungen.....</i>	<i>20</i>
5.3.	KLONIEREN	21
5.3.1.	<i>Verwendete Bakterienstämme.....</i>	<i>21</i>
5.3.2.	<i>Ligation.....</i>	<i>21</i>
5.3.3.	<i>Transformation.....</i>	<i>21</i>
5.3.3.1.	<i>Elektroporation.....</i>	<i>21</i>
5.3.3.2.	<i>Transformation mit chemisch-kompetenten Zellen.....</i>	<i>22</i>
5.3.4.	<i>Darstellung von Plasmid-DNS.....</i>	<i>22</i>
5.4.	Verwendete Mäusestämme	22
5.4.1.	<i>Bmp4^{fl}-Allel.....</i>	<i>22</i>
5.4.2.	<i>Smad4^{fl}-Allel.....</i>	<i>22</i>
5.4.3.	<i>Smd^{fl}-Allel.....</i>	<i>23</i>
5.4.4.	<i>Tbx18^{re}-Allel.....</i>	<i>23</i>
5.5.	Embryonen.....	25
5.5.1.	<i>Tinteninjektion.....</i>	<i>25</i>
5.5.2.	<i>Anfertigung von Gewebedünnschnitten.....</i>	<i>25</i>
5.5.3.	<i>Hämatoxylin- Eosin-Färbungen</i>	<i>25</i>
5.5.4.	<i>RNS-Sondensynthese.....</i>	<i>25</i>
5.5.5.	<i>RNS-in situ Hybridisierungsfärbungen auf Gewebeschnitten</i>	<i>27</i>
5.5.6.	<i>Antikörperfärbung auf Gewebeschnitten.....</i>	<i>28</i>
5.5.7.	<i>Nachweis von proliferierenden Zellen mittels BrdU.....</i>	<i>28</i>
5.5.8.	<i>Nachweis von apoptotischen Zellen mittels TUNEL.....</i>	<i>28</i>
5.5.9.	<i>RNS-in situ Hybridisierungsfärbung auf Organen oder Organismen.....</i>	<i>29</i>
5.5.10.	<i>Vergleich von Transkriptomen zweier Zellpopulationen mittels der Microrarray-Technologie</i>	<i>29</i>
6.	ERGEBNIS.....	30
6.1.	DIE DELETION VON BMP4 IM URETERMESENCHYM.....	30
6.1.1.	<i>Bmp4-mutante Embryonen waren im erwarteten Verhältnis nachweisbar.....</i>	<i>30</i>
6.1.2.	<i>Der Bmp4-Verlust im Uretermesenchym führte zu bilateralen Hydroureteren.....</i>	<i>31</i>

6.1.3.	<i>Der Verlust von Bmp4 im Uretermesenenchym führte schon am E16,5 zum Auftreten von Hydroureteren</i>	34
6.1.4.	<i>Am E12,5 und E14,5 wiesen Bmp4-mutante Individuen keine histologischen Unterschiede zum Wildtyp auf.</i>	36
6.1.5.	<i>Bmp4 regulierte weder direkt noch indirekt die Expression von Gata2, Sox9, Tbx18 und Tsbz3</i>	37
6.1.6.	<i>Der Bmp4-Verlust veränderte weder die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs noch die des kanonischen Hb-Signalwegs</i>	38
6.1.7.	<i>Der Verlust von Bmp4 im Uretermesenenchym ging mit geringerer Proliferation des Epithels am E14,5 einher</i>	39
6.1.8.	<i>In Bmp4-mutanten Individuen mündete der Ureter in die Blase</i>	41
6.1.9.	<i>In Bmp4-mutanten Individuen ließ sich keine Myocd-Expression nachweisen</i>	42
6.2.	DIE DELETION VON SMAD4 IM URETERMESENCHYM	43
6.2.1.	<i>Die Deletion von Smad4 im Uretermesenenchym führte zu uni- oder bilateral auftretenden Hydroureteren</i>	43
6.2.2.	<i>Der Smad4-Verlust im Uretermesenenchym führte nicht zu Hydroureteren am E16,5</i>	46
6.2.3.	<i>Am E12,5 und E14,5 waren keine histologischen Unterschiede in den Ureteren der Smad4-mutanten Individuen nachweisbar</i>	48
6.2.4.	<i>Die Expression von Gata2, Sox9, Tbx18 und Tsbz3 wurde nicht Smad4-abhängig reguliert</i>	49
6.2.5.	<i>Die Deletion von Smad4 beeinflusste weder die Aktivität des Wnt-Signalwegs noch die des Hb-Signalwegs</i>	51
6.2.6.	<i>Smad4-mutante Individuen wiesen eine verspätete Expression von Myocd auf</i>	53
6.3.	DIE DELETION VON SMOOTHENED IM URETERMESENCHYM	54
6.3.1.	<i>Die Deletion von Smo im Uretermesenenchym führte zu bilateral auftretenden Hydroureteren</i>	55
6.3.2.	<i>Der Smo-Verlust im Uretermesenenchym führte bereits am E16,5 zu Hydroureteren</i>	57
6.3.3.	<i>Nicht am E12,5 sondern am E14,5 waren histologische Unterschiede zwischen Wildtyp und Smo-mutanten Individuen nachweisbar</i>	59
6.3.4.	<i>Die Deletion von Smo beeinflusste die Aktivität des Bmp4-Signalwegs beim E14,5</i>	60
6.3.5.	<i>Die Deletion von Smo im Uretermesenenchym führte zu einem Verlust der Gata2-Expression</i>	61
6.4.	WEITERE MARKERGENE FÜR DIE URETERENTWICKLUNG	63
6.4.1.	<i>Gene mit Expressionsdomäne im nicht-differenzierten Ureterepithel</i>	66
6.4.2.	<i>Gene mit Expressionsdomäne im Uretermesenenchym</i>	68
7.	DISKUSSION	75
7.1.	ANALYSEN ZUM ZUSAMMENSPIEL SMO-BMP4-SMAD4 IM URETERMESENCHYM	75
7.2.	DER VERLUST VON BMP4 IM URETERMESENCHYM FÜHRTE ZUM VERLUST DER GLATTEN MUSKULATUR DES URETERS	75
7.3.	BMP4-ABHÄNGIGE MUSKELDIFFERENZIERUNG WURDE NICHT AUSSCHLIEßLICH ÜBER DIE SMAD4-ABHÄNGIGE SIGNALKASKADE VERMITTELT	77
7.4.	DIE DELETION VON BMP4 IM URETERMESENCHYM FÜHRTE ZUM VERLUST DER MYOCD-EXPRESSION IM URETER	81
7.5.	BMP4 REGULIERTE SMAD4-ABHÄNGIG DIE ID2-EXPRESSION IM URETER-MESENCHYM	82
7.6.	DER HH-SIGNALWEG INDUZIERT DIE BMP4-EXPRESSION IM URETER-MESENCHYM	84
7.7.	29 GENE WURDEN SPEZIFISCH IM URETER EXPRIMIERT	85
7.8.	MOLEKULARE NETZWERK DER URETERDIFFERENZIERUNG	86
8.	LITERATUR	89
9.	LEBENS LAUF	95
10.	ICH MÖCHTE DANKE SAGEN	96
11.	ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	97
12.	ANHANG	98

1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1.1. Abbildungen in der Einleitung

<i>Abbildung 4.1.1A:</i>	03
Schematische Darstellung des weiblichen Urogenitalsystems der Maus, entnommen aus Cook (1965)	
<i>Abbildung 4.1.1B:</i>	03
Hämatoxylin- Eosin Färbung eines transversalen Ureterschnitts einer adulten Maus	
<i>Abbildung 4.2.1:</i>	05
Schema der Nierenentwicklung in der Maus, entnommen aus Lechner und Dressler (1997)	
<i>Abbildung 4.3.1:</i>	08
Schematische Darstellung des Modells von Mackie und Stephens (1975)	
<i>Abbildung 4.4.1:</i>	10
Schema des Zusammenspiels verschiedener Faktoren für die Bestimmung der Ureterknospenposition, entnommen aus Costantini und Shakya (2006)	
<i>Abbildung 4.4.2:</i>	12
Schematische Zusammenfassung der für die Ureterentwicklung bekannten Faktoren und Daten	
<i>Abbildung 4.6.1:</i>	15
Schema des kanonischen Tgf β -Signalwegs, entnommen aus von Bubnoff und Cho (2001)	
<i>Abbildung 4.6.2:</i>	16
Zusammenfassung der für Bmp4 im Uretermesenchym beschriebenen Funktionen, entnommen aus Miyazaki et al. (2000)	

1.2. Abbildungen im Ergebnisteil

<i>Abbildung 6.1.2.1:</i>	31
Morphologie der $Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}$ Urogenitalsysteme am E18,5	
<i>Abbildung 6.1.2.2:</i>	32
Histologische Schnitte von Nieren und Ureteren von Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}$ Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.1.2.3:</i>	32
Antikörperfärbungen gegen Marker der glatten Muskulatur in Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}$ Individuen vom E18,5	

<i>Abbildung 6.1.2.4:</i>	33
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Expression von <i>Upk1b</i> und <i>Upk3b</i> in Wildtyp- und in <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.1.3.1:</i>	34
Morphologie-Bilder von Urogenitalsystemen sowie mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Ureterschnitte von Wildtyp und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen vom E16,5	
<i>Abbildung 6.1.3.2:</i>	35
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis von <i>Tagln</i> , <i>Myb11</i> , <i>Tnnt2</i> und <i>Upk3b</i> in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen am E16,5	
<i>Abbildung 6.1.4.1:</i>	36
Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von Nieren- und Ureterschnitten von Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen vom E12,5 und E14,5	
<i>Abbildung 6.1.5.1:</i>	37
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Gata2</i> , <i>Sox9</i> , <i>Tbx18</i> und <i>Tshz3</i> am E12,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.1.5.2:</i>	37
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Gata2</i> , <i>Sox9</i> , <i>Tbx18</i> und <i>Tshz3</i> am E14,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.1.6.1:</i>	38
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Axin2</i> , <i>Id2</i> und <i>Ptch1</i> am E14,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.1.7.1:</i>	39
TUNEL- Analysen in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen am E12,5 und E14,5	
<i>Abbildung 6.1.7.2:</i>	40
Darstellung der Proliferationsdaten von Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen am E12,5 und E14,5	
<i>Abbildung 6.1.8.1:</i>	41
Tinten-Injektionen in Nierenbecken im Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuum am E18,5	
<i>Abbildung 6.1.9.1:</i>	42
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen gegen <i>Myocd</i> in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}</i> Individuen am E12,5, E14,5 und E15,5	
<i>Abbildung 6.2.1.1:</i>	44
Morphologie der <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Urogenitalsysteme vom E18,5	

<i>Abbildung 6.2.1.2:</i>	44
Histologische Schnitte von Nieren und Ureteren von Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.2.1.3:</i>	45
Antikörperfärbungen gegen Marker der glatten Muskulatur in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.2.1.4:</i>	46
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Expression von <i>Upk1b</i> und <i>Upk3b</i> in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.2.2.1:</i>	47
Morphologie der <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Urogenitalsysteme sowie sagittale Nieren- und transversale Ureterschnitte am E16,5	
<i>Abbildung 6.2.2.2:</i>	48
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis von <i>Tagln</i> , <i>Myb11</i> und <i>Upk3b</i> in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen am E16,5	
<i>Abbildung 6.2.3.1:</i>	49
Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von transversalen Ureterschnitten von Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen am E12,5 und E14,5	
<i>Abbildung 6.2.4.1:</i>	50
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Gata2</i> , <i>Sox9</i> , <i>Tbx18</i> und <i>Tsbz3</i> am E12,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.2.4.2:</i>	50
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Gata2</i> , <i>Sox9</i> , <i>Tbx18</i> und <i>Tsbz3</i> am E14,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.2.5.1:</i>	51
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Ptch1</i> , <i>Axin2</i> und <i>Id2</i> am E12,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.2.5.2:</i>	52
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Ptch1</i> , <i>Axin2</i> und <i>Id2</i> am E14,5 in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 6.2.6.1:</i>	53
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen gegen <i>Myocd</i> in Wildtyp- und <i>Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}</i> Individuen am E14,5, E15,5 und E16,5	

<i>Abbildung 6.3.1:</i>	54
Schematische Darstellung des Hh-Signalwegs, entnommen aus Ingham und McMahon (2001)	
<i>Abbildung 6.3.1.1:</i>	55
Histologische Schnitte von Nieren und Ureteren von Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.3.1.2:</i>	55
Antikörperfärbungen gegen Marker der glatten Muskulatur in Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.3.1.3:</i>	56
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Expression von $Upk1b$ und $Upk3b$ in Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen vom E18,5	
<i>Abbildung 6.3.2.1:</i>	57
Morphologie-Bilder von Urogenitalsystemen sowie mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Ureterschnitte von Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen vom E16,5	
<i>Abbildung 6.3.2.2:</i>	58
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis von $Myb11$, $Tagln$, $Tnnt2$ und $Upk1b$ in Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen am E16,5	
<i>Abbildung 6.3.3.1:</i>	59
Hämatoxylin- Eosin-Färbungen von transversalen Ureterschnitten der Stadien E12,5 und E14,5 von Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen	
<i>Abbildung 6.3.4.1:</i>	60
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von $Axin2$, $Bmp4$, $Id2$, und $Ptch1$ am E14,5 in Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen	
<i>Abbildung 6.3.5.1:</i>	61
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von $Gata2$, $Sox9$, $Tbx18$ und $Tshz3$ am E14,5 in Wildtyp- und $Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}$ Individuen	
<i>Abbildung 6.4.1.1:</i>	66
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von $Catna1$ und $Cdb16$ der Stadien E12,5, E14,5 und E16,5	
<i>Abbildung 6.4.1.2:</i>	67
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von $Dusp10$, $Cldn6$, $Gata3$, $Kif12$ und $Vil2$ der Stadien E12,5, E14,5 und E16,5	

<i>Abbildung 6.4.2.1:</i>	69
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Tbbs1</i> , <i>Sulf1</i> , <i>Bmper</i> , <i>Sparc</i> , <i>Lgals1</i> und <i>Masp1</i> der Stadien E12,5, E14,5 und E16,5	
<i>Abbildung 6.4.2.2:</i>	71
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Pdgfra</i> , <i>Cxcl12</i> , <i>Plxnd3</i> , <i>Car3</i> , <i>Dact1</i> und <i>Epha7</i> der Stadien E12,5, E14,5 und E16,5	
<i>Abbildung 6.4.2.3:</i>	72
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Cldn11</i> , <i>Dpysl3</i> , <i>Kit</i> und <i>Serpinh1</i> der Stadien E12,5, E14,5 und E16,5	
<i>Abbildung 6.4.2.4:</i>	73
RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von <i>Foxc2</i> , <i>Dach2</i> , <i>Hmga2</i> , <i>Nr2f1</i> , <i>Zcchc12</i> und <i>Zfp536</i> der Stadien E12,5 und E14,5	

1.3. Abbildungen im Diskussionsteil

<i>Abbildung 7.3.1:</i>	77
Stapeldiagramm mit der prozentualen Verteilung der Phänotypen der Entwicklungsstadien E16,5 und E18,5 von <i>Tbx18^{cre/+}</i> ; <i>Bmp4^{fl/fl}</i> und <i>Tbx18^{cre/+}</i> ; <i>Smad4^{fl/fl}</i> Individuen	
<i>Abbildung 7.3.2:</i>	80
Schema des Tgf β -Signalwegs über Smad und MAPK; entnommen aus Oxburgh et al., 2011	
<i>Abbildung 7.8.1:</i>	87
Schematische Zusammenfassung der für die Ureterentwicklung bekannten Faktoren und die hier erhaltenen Daten	

1.4. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 5.3.1:</i>	21
Zusammenstellung der verwendeten <i>E.coli</i> -Stämme und ihres Genotyps	
<i>Tabelle 5.4.1:</i>	24
Zusammenfassung der PCR-Bedingungen	
<i>Tabelle 5.5.4:</i>	26
Auflistung der verwendeten Sonden für die RNS- <i>in situ</i> Hybridisierungsanalysen	
<i>Tabelle 5.5.6:</i>	28
Aufstellung der verwendeten Antikörper	

<i>Tabelle 6.1.1:</i>	31
Auflistung der Verteilung der Individuen aus Verpaarung <i>Tbx18^{cre/+}</i> ; <i>Bmp4^{fl/+}</i> mit <i>Bmp4^{fl/+}</i>	
<i>Tabelle 6.2.1:</i>	43
Auflistung der Verteilung der Individuen aus Verpaarung <i>Tbx18^{cre/+}</i> ; <i>Smad4^{fl/+}</i> mit <i>Smad4^{fl/Δ}</i>	
<i>Tabelle 6.4.1:</i>	65
Auflistung von spezifisch im Ureter exprimierten Genen, deren Annotation in Online-Datenbanken sowie mithilfe von Microarrays ermittelte Expressionsniveaus	
<i>Tabelle 12.1:</i>	98
Auflistung der Gene aus der Microarray- Analyse, die die Expressionsniveaus von Ureteren des Stadiums E18,5 mit denen des Stadiums E13,5 vergleicht	
<i>Tabelle 12.2:</i>	101
Auflistung der Gene aus der Microarray- Analyse, die die Expressionsniveaus von <i>Tbx18^{+/-}</i> -Ureteren des Stadiums E13,5 mit denen von <i>Tbx18^{-/-}</i> -Ureteren desselben Stadiums vergleicht.	
<i>Tabelle 12.3:</i>	104
Auflistung der getesteten Gene aus der Microarray- Analyse, die die Expressionsniveaus von <i>Tbx18^{+/-}</i> -Ureteren des Stadiums E13,5 mit denen von <i>Tbx18^{-/-}</i> -Ureteren desselben Stadiums vergleicht mit einem Verhältnis von 0,5 bis 0,6.	
<i>Tabelle 12.4:</i>	106
Liste der 68 Gene, die aufgrund ihrer Annotation in den Datenbanken genepaint.org und eurexpress.org auf ihre spezifische Expression im Ureter hin untersucht wurden.	

2. Abkürzungen

Diese Liste enthält eine alphabetische Auflistung der verwendeten Abkürzungen.

Acta2	Actin, alpha 2 , smooth muscle, aorta; ehemals α Sma
Alk3	Activin like kinase 3
Atf2	Activating transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BASM	Bovine aortic smooth muscle myosin
bHLH	basische Helix-Schleife-Helix (basic helix-loop-helix)
Bmp	Bone morphogenetic protein
Bmper	Bmp-binding endothelial regulator
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRE	Bmp responsive element
C57BL6/J	C57 black 6 / Jackson – Mausstamm
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAKUT	angeborene Anomalien der Niere und des Urogenitaltrakts (congenital anomalies of kidney and urinary tract)
Car3	Carbonic anhydrase 3
Catna1	Catenin α 1
Cdh16	Cadherin 16
Cldn11	Claudin 11
CND	Common nephric duct
Cnn1	Calponin 1
cre	Rekombinase cre
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Δ	Deletion
Dach2	Dachshund 2 (<i>Drosophila</i>)
Dact1	Dapper homolog 1 , antagonist of beta-catenin
DAPI	4',6- Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
Dlg1	Discs, large homolog 1 (<i>Drosophila</i>); früheres Gensymbol Dlgh1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
dpp	Decapentaplegic (<i>Drosophila</i>)
Dpysl3	Dihydropyrimidinase-like 3
DTT	Dithiothreitol
Dusp10	Dual specificity phosphatase 10
E12,5	12,5. Tag der embryonalen Entwicklung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Emx2	Empty spiracles homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
Epha7	Eph receptor A7
Erk	Extracellular signal regulated kinase
EtOH	Ethanol
Ets1	E26 avian leukemia oncogene 1 , 5' domain
Eya1	Eyes absent 1 homolog (<i>Drosophila</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

fl	von loxP-Sequenzen fl ankierter Abschnitt
Foxc	F orkhead box C
Gata2	GATA binding protein 2
Gdnf	G lial cell line d erived n eurotrophic factor
Grem1	G remlin 1
HCl	Salzsäure
Hes1	H airy and e nhancer of s plit 1 (<i>Drosophila</i>)
HFL	H uman f etal l ung f ibroblasts
Hh	H edgehog
Hmga2	H igh m obility g roup A T-hook 2
Hox11	Synonym zu Tlx1 (T-cell leukemia, homeobox 1)
Id2	I nhibitor of D N A binding 2
Jnk	J un N -terminale K inase
Jun	J un oncogene
kb	K ilo- B asenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kif12	K inesin family member 12
Kit	K it oncogene
LB-Medium	komplexes Vollmedium zur Kultivierung von <i>E. coli</i>
Lgals1	L ectin g alactose binding soluble 1
LiCl	Lithiumchlorid
MAPK	M itogen-activated protein kinases
Masp1	M annan-binding lectin serine peptidase 1
Mef2	M yocyte enhancer factor 2
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
miR21	m icro R NS- 21
Msx	homeobox, msh -like
Mw	M ittelwert
Myh11	M yosin, heavy polypeptide 11 , smooth muscle
Myocd	M yo c ardin
MyoD	M yo g enic d ifferentiation
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NMRI	N aval M edical R esearch I nstitute – Mausstamm
Notch3	N otch gene homolog 3 (<i>Drosophila</i>)
Nr2f1	N uclear receptor subfamily 2 , group F , member 1
Odd1	Synonym zu Osr1 (O dd-skipped related 1 (<i>Drosophila</i>))
P0	P ostnataler Tag 0
p38	p38 -mitogenaktivierte Proteinkinase
Pax2	P aired box gene 2
PBS	Phosphat gepufferte Saline (p hosphate buffered s alines)
PCR	P olymerase chain reaction
Pdcd4	P rogrammed cell death 4
Pdgf	P latelet d erived g rowth factor
Pdgfra	P latelet d erived g rowth factor receptor, α polypeptide
PFA	P araformaldehyd
pH	p otentia H ydrogenii
PKD	Zystennieren (p olycystic k idney d isease)
PEG	P olyethylenglykol

Plcxd3	Phosphatidylinositol-specific p hospholipase C, X domain containing 3
Pod1	Synonym zu Tcf21
ProtK	P roteinase K aus <i>Tritirachium album</i>
Ptch1	P atched homolog 1
Ptpr	P rotein tyrosine p hosphatase, receptor
Ret	R et proto-oncogene
RNS	R ibonukleinsäure
Robo2	R oundabout homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
RT-PCR	R everse t ranskriptase- p olymerase c hain r eaction
Sall1	S al-like 1 (<i>Drosophila</i>)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (S odium D odecylsulfat)
Serpinh1	S erine (or cysteine) p eptidase i nhibitor, clade H , member 1
Shh	S onic h edgehog
Six	S ine oculis-related homeobox homolog (<i>Drosophila</i>)
Slit2	S lit homolog 2 (<i>Drosophila</i>)
Smad	MAD Homolog (<i>Drosophila</i>) - S mall (<i>C. elegans</i>) m others a gainst d ecapentaplegic homolog (<i>Drosophila melanogaster</i>)
Smo	S moothened homolog (<i>Drosophila</i>)
Sox9	S RY (sex determining region Y)- b ox containing gene 9
Sparc	S ecreted p rotein a cidic and r ich in c ysteine
Srf	Serum induzierter Faktor; S erum r esponse f actor
SSC	Natriumzitat basierter Puffer (S odium chloride, s odium c itrate)
Stf	S tandardfehler
Sulf1	S ulfatase 1
Tab	T GF β a ctivated kinase 1/MAP3K7 b inding protein
Tagln	T ransgelin
Tak	T GF β a ctivated k inase
Taq	Taq-Polymerase (<i>Thermus aquaticus</i>)
Tbx18	T - b ox 18
Tcf21	T ranscription f actor 21
Tead	T EA d omain family
Tgf β	T ransforming g rowth f actor β
Thbs1	T hrombospondin 1
Tnnt2	T roponin T2 , cardiac
Tshz3	T eashirt z inc f inger family member 3
Tris	T ris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	T dT-mediated dUTP-biotin n ick e nd l abeling
Upk	U roplakin
Vil2	Synonym von ezrin
VUR	Vesikoureteraler Urinrückfluss (v esicoureteral r eflux)
Wnt	W ingless related
wt	W ildtyp
Xiap	X -linked i nhibitor of a ptosis
Zcchc12	Z inc f inger, C CHC domain containing 12
Zfp536	Z inc f inger p rotein 536

3. Zusammenfassung

Angeborene Fehlbildungen des Urogenitaltrakts (CAKUT) stehen als Oberbegriff für Dysplasien der Nieren, der Blase, der Urethra (der Harnröhre) sowie der Ureteren (der Harnleiter). Sie gelten als Hauptursache für Nierenversagen bei Kindern und entstehen durch Abweichungen innerhalb des eng regulierten Signalnetzwerks zwischen Mesenchym und Epithel während des Anlegens und Differenzierens dieses Organsystems. Fehlentwicklungen und Differenzierungsstörungen des Ureters, eines schlauchförmigen, kontraktiven Organs, das die Niere mit der Blase verbindet und im Wesentlichen aus glatter Muskulatur und einem hoch spezialisierten Epithel besteht, führen durch Rückfluss von Urin in die Niere zur Schädigung dieser.

In den letzten zehn Jahren sind einige Mausmutanten als Beispiele für Ureterdysplasien analysiert worden, dabei handelt es sich zum einen um Mutanten von Transkriptionsfaktoren (Caubit et al., 2008; Airik et al., 2006; Airik et al., 2010 und Hoshino et al., 2008) und zum anderen um Mutanten von Signalwegen (Yu et al., 2002 und Miyazaki et al., 2000). Weitgehend ungeklärt blieb bisher die Interaktion dieser Faktoren für die Ureterentwicklung. Das Signalmolekül *Bmp4* (Bone morphogenetic protein 4) ist besonders interessant, weil schon der Verlust eines Gens bei etwa 50 % der getesteten Mäuse zu den Ureter betreffenden CAKUT führt. Bisher konnte der vollständige *Bmp4*-Verlust im Uretermesenchym, das zur glatten Muskulatur differenziert, noch nicht *in vivo* analysiert werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse von Mausedembryonen, bei denen unter Zuhilfenahme eines cre-loxP-Systems *Bmp4* im Uretermesenchym deletiert wurde, führten auch *in vivo* zum Verlust der glatten Muskulatur. Darüber hinaus konnte dieser mit dem Verlust der *Myocd*-Expression (*Myocardin*) korreliert werden, einem Schlüsselgen der glatten Muskeldifferenzierung. Mithilfe einer weiteren Mausmutante, die die *Smad4*-Expression (Small mothers against decapentaplegic homolog 4) im Uretermesenchym verliert, konnte gezeigt werden, dass die *Bmp4*-vermittelte Differenzierung des Mesenchyms zur glatten Muskulatur nicht ausschließlich *Smad4*-abhängig reguliert wird. Durch Deletion des Co-Rezeptors *Smo* (*Smoothened* homolog) im Uretermesenchym wurde die *Bmp4*-Regulation durch den Hh-Signalweg (Hedgehog) bestätigt, aber die präsentierten Ergebnisse sprechen gegen *Shh* (Sonic hedgehog) als einzigen Hh-Liganden während der Ureterentwicklung. Diese Arbeit trägt dazu bei, das Zusammenspiel von Hh, *Bmp4* und *Smad4* für die Muskeldifferenzierung genauer zu untersuchen und durch das Einführen von neuen Expressionsmarkern die Unterschiede in Zukunft besser herausstellen und beschreiben zu können.

Schlüsselbegriffe: Ureterentwicklung, *Bmp4*, *Smad4*, *Smo*, *Myocd*, Uretermesenchym, glatte Muskulatur

Abstract

Congenital anomalies of kidney and urinary tract (CAKUT) are a collective term including dysplasia of kidney, bladder, urethra and ureter. They are known as the major cause for kidney failure during childhood. The reason for CAKUT is founded in the irregularity of a tightly regulated signal network between mesenchyme and epithelium during the process of onset and differentiation of this organ system. The ureter is a tubular organ that connects kidney and bladder and consists mainly of smooth muscle layers and a highly specialized epithelium. Its dysplasia and differentiation problems lead to urinary reflux into the kidney which causes destruction of renal parenchyma and leads to renal failure as a consequence. Over the last decade some mouse models for ureter development have been described in the literature. These mouse models can be classified into two groups: In the first group the loss of transcription factors like *Tshz3*, *Gata2*, *Tbx18* and *Sox9* is analysed during ureter development; in the second group the loss of signal pathways like Bmp4 and Hh is characterized. The interaction of these factors during ureter development has not been studied in detail.

The signal molecule Bmp4 plays an important role during ureter and kidney development because the loss of one allele already leads to ureter dysplasia in nearly 50 % of cases. Until now no possibility has existed to analyse the complete loss of *Bmp4* in the ureteric mesenchyme, which is the progenitor tissue of ureter smooth muscle cells, *in vivo*.

To delete *Bmp4* in the ureteric mesenchyme a cre-loxP system is used, and the analysis of ureters of these murine embryos is presented here. It can be shown that the deletion of *Bmp4* in this domain leads to the loss of smooth muscle cells *in vivo*. This is combined with a dramatic *Myocd* down regulation which is one of the key genes regulating smooth muscle differentiation. By taking advantage of another mouse model which represents a model for the loss of *Smad4* signalling in the ureteric mesenchyme some evidence was found for the fact that Bmp4 stimulated differentiation is not only mediated in a Smad4 dependent manner. In a third mouse model the co-receptor of Hh signalling (Smo) is deleted in the ureteric mesenchyme. Using this mouse model it was confirmed that *Bmp4* expression depends on Hh signalling but the severity of ureter dysplasia in this mouse model argues against the hypothesis that only Shh is important for ureter development and argues for the presence of at least a second ligand in this tissue.

The results presented here enlighten the interaction of Hh, Bmp4 and Smad4 during ureter smooth muscle development and by inducing some more genes, which are expressed during ureter development, it will be possible to describe the differences of these mouse models more precisely.

Key words: ureter development, Bmp4, Smad4, Smo, Myocd, Uretermesenchym, smooth muscle

4. Einleitung

4.1. Der Ureter ist Teil des Urogenitalsystems

Das Urogenitalsystem der Säuger im Allgemeinen und der Maus hier im Speziellen setzt sich aus den Genitalien und den Harnorganen zusammen. Die Harnorgane bestehen aus den Nieren, den Harnleitern (Ureteren), der Blase und der Harnröhre (Urethra) (*Abbildung 4.1.1A*). Die Nieren wiederum bestehen aus mehreren tausend funktionellen Einheiten, den Nephronen, die sich im Wesentlichen aus der Filtereinheit (Glomerulus) und dem Tubulus zusammensetzen. Die Tubuli der Nephronen vereinigen sich in den Sammelrohren, die in die Nierenkelche münden. Diese werden im Nierenbecken zusammengeführt, in dem die Niere mit dem Ureter, einem kontraktilen, schlauchförmigen Organ, verbunden ist. Dieser wiederum mündet in die Harnblase, an die die Urethra angebunden ist, die den letzten und abschließenden Abschnitt der Harnorgane bildet.

Das Zusammenspiel dieser Organe sorgt dafür, dass die harnpflichtigen Stoffwechselprodukte der Purine (Harnsäure bei Hominiden; ansonsten bei Säugern Allantoin), der Pyrimidine und der Aminosäuren (Harnstoff) aus dem Körper ausgeschieden werden. Zusätzlich regulieren sie die Flüssigkeits- und die Elektrolyt-Homöostase des Organismus. Dazu wird zunächst das Blut in den Glomeruli der Nieren gefiltert und der sogenannte Primärharn gebildet, welcher in den Tubuli der Nephronen durch Rückresorption von

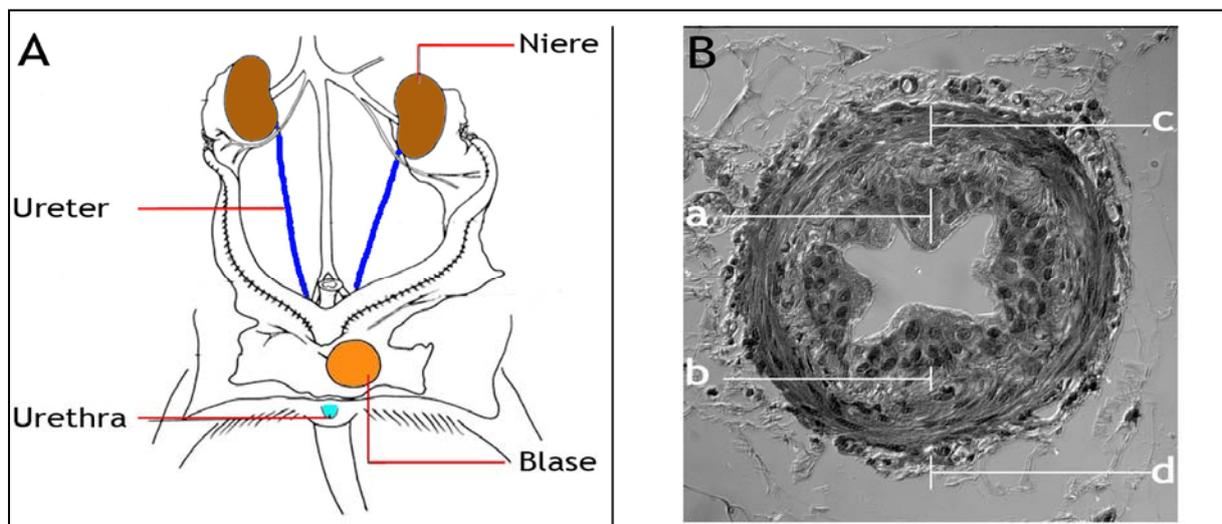


Abbildung 4.1.1:

In Grafik A ist ein Urogenitalsystem einer weiblichen Maus abgebildet. Eine Niere, ein Ureter, die Blase und die Urethra sind markiert. Die Abbildung ist verändert nach Cook, 1965. In Bild B ist der Ureter-Querschnitt einer adulten, weiblichen Maus dargestellt. Das Gewebe wurde mittels histologischer Verfahren angefärbt. Dabei ist mit a das Urothel markiert, mit b die Lamina propria, mit c die glatte Muskulatur und mit d die Tunica adventitia.

Wasser und Elektrolyten in seiner Zusammensetzung modifiziert wird. Der so gebildete Harn, der aus allen Nephronen einer Niere im Nierenbecken zusammenfließt, wird dann durch den Ureter mittels unidirektional gerichteter, peristaltischer Kontraktionswellen in die Harnblase transportiert. In dieser wird der Harn gesammelt und kann fortan willentlich abgegeben werden.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Entwicklung der Ureteren, deren innerste Gewebeschicht ein hoch spezialisiertes Übergangsepithel bildet, das sogenannte Urothel (*Abbildung 4.1.1B*). Die innerste Urothelschicht besteht aus relativ großen, polyploiden Zellen den sogenannten Schirm- oder Deckzellen, die von der Intermediärschicht umgeben sind (Lüllmann-Rauch, 2009). Den Urothelabschluss zum angrenzenden Fibroblastengewebe, der Lamina propria, bildet die Basalschicht mit ihren quaderförmigen Zellen. Die glatten Muskelzellen umschließen die Lamina propria, dabei weist die glatte Muskulatur zwei Orientierungen auf: Zum einen sind die langgestreckten und spindelförmigen Zellen dieses Gewebes, die im Gegensatz zur Skelettmuskulatur nur einen Nukleus pro Zelle aufweisen, zirkulär (um den Ureter), zum anderen longitudinal (entlang des Ureters) ausgerichtet (*Abbildung 4.1.1B*) (Ulfig, 2005; Huppelsberg, 2009). Auch die glatte Muskulatur ist ihrerseits von einem Fibroblastengewebe, das als Tunica adventitia bezeichnet wird, umgeben. Dieses verbindet den Ureter mit den umliegenden Organen und bettet Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven ein (Ulfig, 2005).

Das Urothel, das auch die Blase und die Urethra auskleidet, ist in hohem Maße undurchlässig gegenüber den toxischen Stoffwechselendprodukten, die im Urin enthalten sind. Dies ist wichtig für seine Funktion, das umgebende Gewebe vor diesen Substanzen zu schützen. Grundlage für diese Schutzfunktion sind die oben genannten Schirmzellen, welche sich durch besonders viele Zell-Zellkontakte, die sogenannten Tight junctions, auszeichnen (Lazzeri, 2006). Darüber hinaus ist das Urothel zum Lumen hin mit urothelialen Plaques ausgekleidet, die hoch konserviert sind und aus den Membranproteinen der Uroplakin (Upk)-Familie bestehen (Wu et al., 2009).

Wesentlich für die Funktionsfähigkeit eines Ureters ist seine glatte Muskulatur. Ihre neuronale Erregung sorgt für die Kontraktion, durch die der Harn aus dem Nierenbecken in die Harnblase transportiert wird. Wichtig für die glatten Muskelzellen wie auch für die Skelettmuskulatur sind die Myosin- und Aktinfilamente, durch deren Wechselwirkung und durch ATP-Hydrolyse es zur Muskelkontraktion kommt. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur, die auch als quer gestreifte Muskulatur bezeichnet wird, ist die Anordnung der Filamente weniger stringent und erscheint daher im Mikroskop als „glatt“. Die Proteine, die an der Bildung der Filamente und der Regulation der Muskelkontraktion beteiligt sind, unterscheiden sich je nach Muskeltyp. So ist Acta2 (**Actin, alpha 2**, glatte Muskulatur, Aorta) ein Bestandteil der Aktinfilamente der glatten Muskulatur, nicht aber der Skelettmuskulatur, und Myh11 (**Myosin, heavy polypeptide 11**, glatte Muskulatur) ein Bestandteil ihrer Myosinfilamente. Die Kontraktion der glatten Muskelzellen

wird unter anderem durch *Tagln* (**Transgelin**) und *Cnn1* (**Calponin 1**) reguliert. Die kombinierte Expression der Gene *Acta2*, *Myb11*, *Tagln* und *Cnn1* ist damit ein Merkmal für glatte Muskelzellen (Owens et al., 2004).

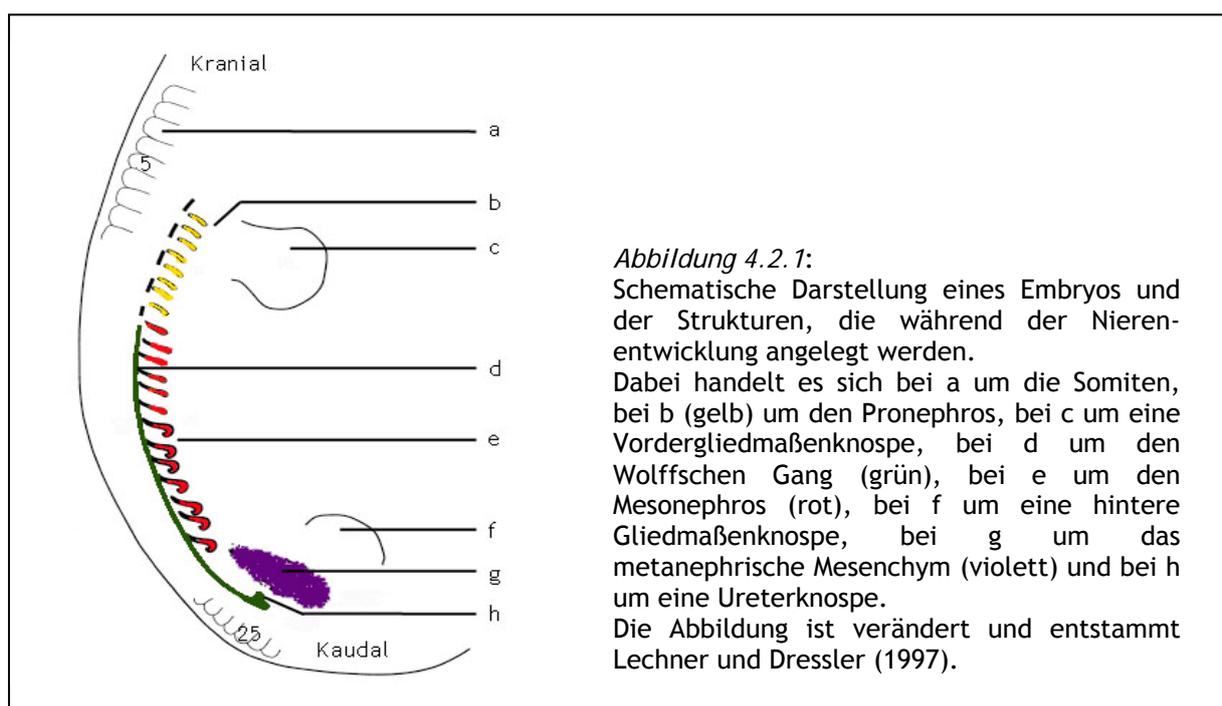
4.2. Entwicklung des Ureters

Die Ureterentwicklung ist eng mit der Nierenentwicklung verwoben, welche bei Säugern in drei Schritten verläuft. Zunächst werden Übergangsstrukturen angelegt: als erstes die pronephrischen Nephronen und dann, weiter kaudal der Mesonephros (Dressler, 2006; *Abbildung 4.2.1*). Danach wird der Metanephros, die permanente Niere, angelegt.

Wichtig für die gesamte Urogenitalentwicklung ist der pronephrische Gang, der auf Höhe der Vordergliedmaßenknospen angelegt wird. Er bildet sich im intermediären Mesoderm, das zwischen den Somiten und dem Seitenplattenmesoderm liegt, und induziert die Bildung von pronephrischen Nephronen, die in Säugern nicht funktionell sind. Der pronephrische Gang verlängert sich in kaudaler Richtung und wird nun als nephrischer oder Wolffscher Gang bezeichnet. Der kraniale Abschnitt des Gangs und ebenso die pronephrischen Nephronen degenerieren im Verlauf der weiteren Entwicklung (Davidson, 2008).

Der Wolffsche Gang wächst kaudal bis zur Kloake und induziert während seines Wachstums im benachbarten Mesoderm die Bildung der mesonephrischen Nephronen. Diese sind im weiblichen Organismus eine vorübergehende Struktur, im männlichen gehen aus einem Teil von ihnen die Ductuli efferentes hervor (Sadler und Langman, 2003).

Die Entwicklung des Metanephros wird auf Höhe der fünfundzwanzigsten Somiten durch



Signalmoleküle aus dem Mesenchym initiiert, die das Epithel des Wolffschen Gangs dazu befähigen, eine Knospe, den Ureter, zu bilden (Davidson, 2008).

Den Abschnitt des Wolffschen Gangs zwischen der Ureterknospe und der Kloake nennt man **CND** (**common nephric duct**, allgemeiner nephrischer Gang). Es handelt sich dabei um eine temporäre, embryonale Struktur, die im Gegensatz zu Wolffschem Gang und Ureter ein mehrschichtiges Epithel aufweist (Mendelsohn, 2009).

Dieser CND wächst weiter und sorgt dafür, dass sich der Abstand zwischen Uretermündung in die Blase und Wolffschem Gang vergrößert. Ab E14 (**14. Tag der embryonalen Entwicklung**) ist der CND nicht mehr nachweisbar, der Wolffsche Gang und der Ureter haben keine strukturelle Verbindung mehr. Entgegen der früheren Vorstellung, dass der CND zu einem Teil der Blase differenziert (Mackie und Stephens, 1975), konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, dass keine Zellen der Blase aus dem CND hervorgehen (Mendelsohn, 2009). Obwohl der Ureter zu diesem Zeitpunkt (E14) mit der Blase verbunden ist, ist die Uretermündung in die Blase noch verschlossen. Im Bereich des Verschlusses befindet sich am E14 eine Anhäufung von Zellen, die sich in der Apoptose befinden. Ab E15 ist die Uretermündung in die Blase geöffnet.

Die Ureterknospe wächst am E11 durch das Uretermesenchym in das metanephrische Mesenchym ein. Dabei handelt es sich um zwei mesenchymale Zellpopulationen mit unterschiedlichem Schicksal, das heißt, unter normalen Umständen differenzieren diese Populationen zu verschiedenen Zelltypen aus.

Auf der einen Seite verzweigt sich der proximale Ureter, der nun im metanephrischen Mesenchym liegt, immer weiter dichotom und bildet das Nierenbecken, die Nierenkelche, die Papillengänge und die Sammelrohre der Niere. Die Nephrone gehen aus mesenchymalen Zellaggregaten hervor, die sich an den Ureterspitzen bilden. In diesen findet eine mesenchymal-epitheliale Transition statt. Aus einem solchen Zellaggregat bildet sich zuerst ein Nierenbläschen, dann ein Komma-förmiges und schließlich ein S-förmiges Nierenkanälchen, bevor es zu einem vollständig differenzierten Nephron wird.

Auf der anderen Seite verzweigt sich der distale Abschnitt des Ureters, der sich zunächst außerhalb des metanephrischen Mesenchyms und später außerhalb der Niere befindet, nicht. Er differenziert ab E15,5 zu dem kontraktilen, impermeablen Schlauch, der für den unidirektionalen Transport des Urins sorgt, dessen Produktion ca. beim Stadium E16,5 beginnt (Airik und Kispert, 2007).

4.3. Fehlbildungen des Ureters

Fehlbildungen der Niere und der Harnwege treten bei einer von 500 Geburten auf (Schedl, 2007). Sie gelten als die häufigste Ursache für Nierenversagen bei Kleinkindern und Kindern.

Man fasst Fehlbildungen, die auf Störungen bei der Entwicklung der Niere und der Harnwege zurückzuführen sind, zu angeborenen Anomalien der Niere und der Harnwege (CAKUT, **congenital anomalies of kidney and urinary tract**) zusammen.

Dieser Begriff umfasst morphologisch sehr unterschiedliche Fehlbildungen der Blase, der Urethra, der Nieren und der Ureteren. So beinhalten CAKUT neben dem Auftreten einer ektopischen Blase und einer falsch lokalisierten Urethraöffnung auch den vesikoureteralen Rückfluss; neben Anlage- und Differenzierungsstörungen der Nieren wie dem Fehlen einer Niere (Nierenagenesie), verkleinerten Nieren (Nierenhypoplasie) und zystischen Nieren auch die Lage- und Formanomalien der Niere wie die Becken- oder Hufeisenniere; neben Ureterstenose oder Ureteratresie, der Verengung oder des Verschlusses des Ureters, auch Verdopplungen der Niere, wie die vollständige Verdopplung einer Niere (Ren duplex) und die vollständige oder die proximale Verdopplung eines Harnleiters mit zwei Nierenbecken (Ureter duplex und Ureter fissus). Obwohl die Zystennieren (PKD, **polycystic kidney disease**) ebenfalls angeboren sind, zählen sie nicht zu den CAKUT, denn hierbei handelt es sich um eine Fehlbildung in den primären Zilien (Schedl, 2007).

Häufig tritt eine Kombination aus Fehlbildungen auf: So wurde beispielsweise das gemeinsame Auftreten von Nierenhypoplasie und vesikoureteralem Rückfluss beschrieben (Najmaldin et al., 1990). Dies deutet die Vielzahl von Wechselwirkungen der Gewebe und Organe während ihrer Entwicklung und bei ihrer Funktion an.

Ein besonderes Augenmerk soll in dieser Doktorarbeit auf die CAKUT gelegt werden, die den Ureter betreffen. Diese kann man in physikalische und funktionelle Obstruktionen, die Behinderungen des Urinabflusses, klassifizieren.

4.3.1. Physikalische Obstruktion

Von einer physikalischen oder anatomischen Obstruktion spricht man, wenn der Urintransport von der Niere zur Blase durch ein Hindernis gestört ist.

Zum Beispiel ist ein falsch positionierter Übergang vom Ureter zur Blase nur eingeschränkt funktionsfähig, da dieser Übergang den Verschlussmechanismus der Blase zum Ureter hin darstellt. Mit Beginn der Urinproduktion führt dies zur Beeinträchtigung des Urinabflusses, da es zum Rückfluss des Urins in den Ureter kommt. Man spricht von vesikoureteralem Urinrückfluss (VUR, **vesicoureteral reflux**). Dieser führt anfangs zur Schädigung der Niere, später zu verminderter Nierenfunktion bis hin zu deren vollständigem Funktionsverlust.

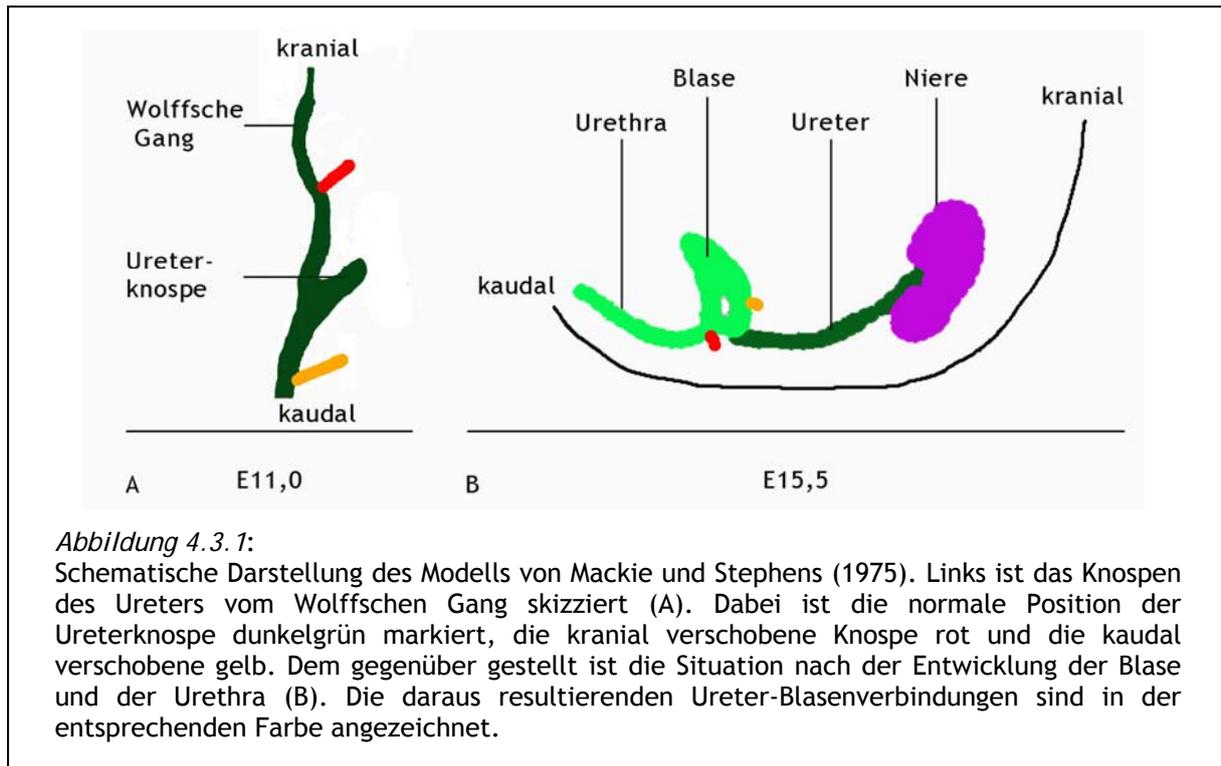


Abbildung 4.3.1:

Schematische Darstellung des Modells von Mackie und Stephens (1975). Links ist das Knospen des Ureters vom Wolffschen Gang skizziert (A). Dabei ist die normale Position der Ureterknospe dunkelgrün markiert, die kranial verschobene Knospe rot und die kaudal verschobene gelb. Dem gegenüber gestellt ist die Situation nach der Entwicklung der Blase und der Urethra (B). Die daraus resultierenden Ureter-Blasenverbindungen sind in der entsprechenden Farbe angezeichnet.

Einen Zusammenhang zwischen der Position der Ureterknospe vom Wolffschen Gang und der endgültigen Position des Ureter-Blasen-Übergangs postulierten Mackie und Stephens (1975). Demnach führt ein verfrühtes, kranial verschobenes Knospen des Ureters zu einer Einmündung des Ureters in die Blase, die verglichen mit der normalen Einmündung dichter an der Urethra liegt oder sogar direkt in die Urethra mündet. Dahingegen verursacht ein verspätetes, kaudal verschobenes Knospen - verglichen mit der normalen Situation - ein laterokaudal versetztes Einmünden des Ureters in die Blase (*Abbildung 4.3.1*).

Neben diesen angeborenen physikalischen Obstruktionen können auch Nierensteine, die durch das Überschreiten des Löslichkeitsprodukts der im Urin enthaltenen Salze entstehen, die abführenden Harnwege blockieren und den Urinabfluss behindern.

4.3.2. Funktionelle Obstruktion

Von einer funktionellen Obstruktion spricht man, wenn der Urintransport nicht aufgrund eines physikalischen Hindernisses, sondern aufgrund des Verlustes der aktiven Transportfunktion gestört ist. Es sind mehrere Mausmutanten beschrieben, bei denen der Urintransport aufgrund von funktionslosen bzw. fehlenden Muskelgewebsschichten des Nierenbeckens oder des Ureters gestört ist.

So beschrieben Chang et al. (2004) ein Mausmodell für funktionelle Obstruktion. Bei der Geburt wiesen die Nieren und die abführenden Harnwege noch keine auffälligen Veränderungen auf. Doch schon wenige Tage später (5. Postnaler Tag (P5) und P12) war eine Hydronephrose erkennbar. Die Peristaltik ist in den Mutanten gestört, es kommt zu keiner fortlaufenden

Kontraktionswelle, obwohl es *Acta2* exprimierende Zellen - demnach glatte Muskelzellen - des Ureters gibt. Mahoney et al. (2006) beschrieben ebenfalls ein Mausmodell für funktionelle Obstruktion, mit glatter Muskulatur, aber ohne Lamina propria. Auch in ihrem Mutanten ist die Peristaltik der Ureteren gestört. Als Begründung führten sie an, dass die Muskelkontraktion der Ureteren nur longitudinal erfolgt, es kommt zu einer Verkürzung des Ureters der Länge nach und nicht zu einer Reduktion des Durchmessers. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Muskelzellen in diesem Fall nur entlang des Ureters und nicht auch zirkulär um ihn herum ausgerichtet sind.

Neben den Mausmodellen, die zwar eine glatte Muskulatur aufweisen, die aber in ihrer Funktion eingeschränkt sind, gibt es auch Mausmodelle, die weniger oder gar keine glatten Muskelzellen um den Ureter aufweisen. Yu et al. (2002) beschrieben, dass der Verlust eines Signalmoleküls im sich entwickelnden Ureterepithel in ihrem Mausmodell zu verkleinerten Nieren und proximalen Hydroureteren führt. Sie zeigten, dass in diesen Mutanten die mesenchymalen Zellen verspätet zu Muskelzellen differenzieren. Damit einhergehend wurden gegen Ende der embryonalen Entwicklung auch weniger *Acta2* exprimierende Zellen am Ureter nachgewiesen. Auch die Gruppe Caubit et al. (2008) beschrieb ein Mausmodell für einen proximalen Hydroureter, der sich jedoch schon während der embryonalen Entwicklung manifestiert.

4.4. Regulation der Ureterentwicklung

Wie bereits in Abschnitt 4.2 erwähnt, ist das Zusammenspiel von Mesenchym und Epithel für die Ureterentwicklung unverzichtbar. Hier soll im Folgenden auf zwei Aspekte der molekularen Mechanismen der Ureterentwicklung näher eingegangen werden. Dabei werden im ersten Abschnitt die molekularen Mechanismen der Bestimmung der Position der Ureterknospe und im zweiten die Regulation der Ureterdifferenzierung beschrieben.

4.4.1. Molekulare Mechanismen der Ureterknospenbildung

Die Position der Ureterknospe wird durch ein Signalzentrum am kaudalen Ende des intermediären Mesoderms bestimmt. In diesem Signalzentrum des Mesenchyms wird *Gdnf* (Glial cell line derived neurotrophic factor) exprimiert, welches auf das Epithel des Wolffschen Gangs einwirkt. Die Bindung von *Gdnf* an die Rezeptortyrosinkinase Ret (**ret** proto-oncogene), die auf der Zelloberfläche der Zellen des Wolffschen Gangs exprimiert ist, befähigt den Wolffschen Gang dazu, eine Knospe, den Ureter, zu bilden. Mäuse, denen eine dieser Signalwegkomponenten fehlt, haben entweder blind endende Ureteren, eine Nierenagenesie oder eine Nierenhypoplasie (Costantini und Shakya, 2006). Lokale Applikation von *Gdnf* oder lokale Missexpression von *Gdnf* entlang des Wolffschen Gangs führt zu ektopischen Ureterknospen

(Costantini und Shakya, 2006). Daraus lässt sich ableiten, dass die Expression und der Wirkungsbereich von *Gdnf* genau definiert sein müssen (Airik und Kispert, 2007).

So konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Gdnf* durch verschiedene Transkriptionsfaktoren zeitlich und räumlich reguliert wird. Transkriptionsfaktoren, die die Expression von *Gdnf* positiv beeinflussen, sind *Odd1* (**O**dd-skipped related 1), *Eya1* (**E**yes absent 1 homolog), *Six1* (**S**ine oculis-related homeobox homolog), *Six4*, *Pax2* (**P**aired box gene 2) und die Paraloge von *Hox11*, wohingegen sie negativ durch die Transkriptionsfaktoren *Foxc1* (**F**orkhead box **C**) und *Foxc2* beeinflusst wird (Davidson, 2008; Dressler, 2002; Kume et al., 2000). Daneben wird die Expression von *Gdnf* auch durch Signalwege lokal begrenzt. So beschrieben Grieshammer et al. (2004) den Verlust von *Robo2* (**R**oundabout homolog 2) und *Slit2* (**S**lit homolog 2) in Mäusen und die dadurch verursachten Fehlbildungen. Der jeweilige Verlust von *Robo2* oder *Slit2* führt zur vermehrten Initiation von Ureterknospen entlang des Wolffschen Gangs, weil es jeweils zu einer Ausbreitung der *Gdnf*- Expressionsdomäne kommt. Eine weitere Komponente des Kontrollsystems, das die Ureterknospenposition bestimmt, ist *Bmp4* im Zusammenspiel mit seinem Antagonisten *Grem1* (**G**remlin 1). Der Verlust eines funktionellen *Bmp4*-Allels führt in etwa der Hälfte der Fälle zu einer kranial verschobenen Ureterknospe (Miyazaki et al., 2000). Für den Fall des Verlusts von *Grem1* wurde berichtet, dass

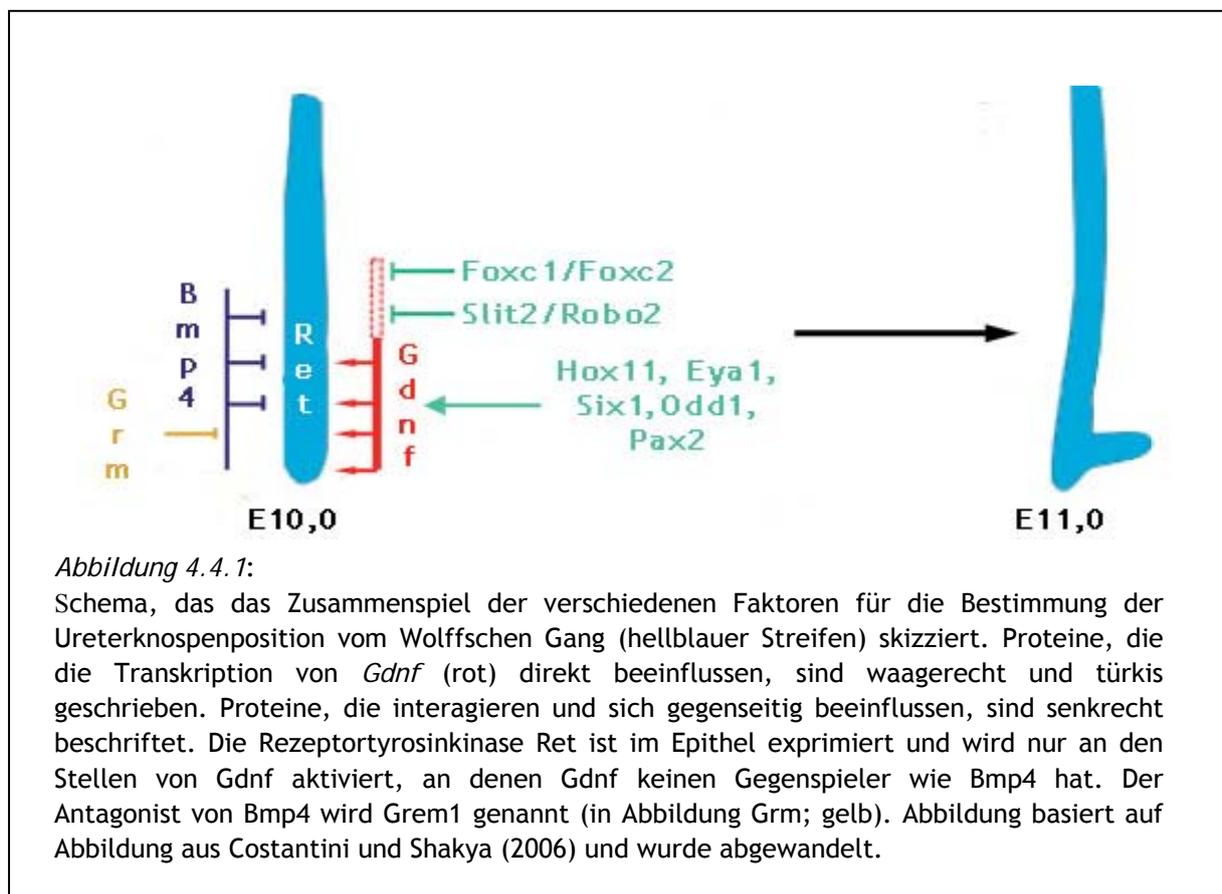


Abbildung 4.4.1:

Schema, das das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren für die Bestimmung der Ureterknospenposition vom Wolffschen Gang (hellblauer Streifen) skizziert. Proteine, die die Transkription von *Gdnf* (rot) direkt beeinflussen, sind waagerecht und türkis geschrieben. Proteine, die interagieren und sich gegenseitig beeinflussen, sind senkrecht beschriftet. Die Rezeptortyrosinkinase *Ret* ist im Epithel exprimiert und wird nur an den Stellen von *Gdnf* aktiviert, an denen *Gdnf* keinen Gegenspieler wie *Bmp4* hat. Der Antagonist von *Bmp4* wird *Grem1* genannt (in Abbildung *Grm*; gelb). Abbildung basiert auf Abbildung aus Costantini und Shakya (2006) und wurde abgewandelt.

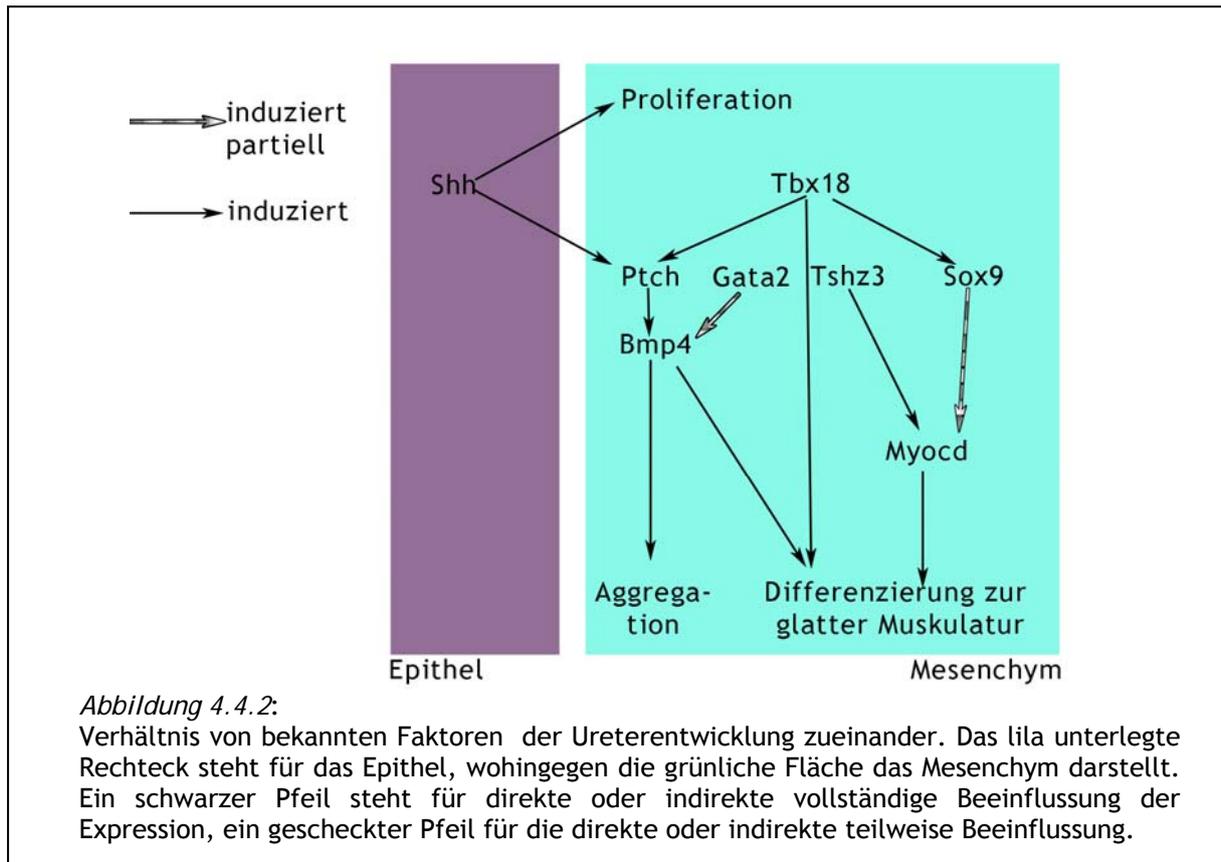
die Nierenentwicklung auf der Entwicklungsstufe der Ureterknospe unterbrochen und beendet wird und dass *Grem1*-Applikation ins Medium solcher Nierenkulturen bzw. das Reduzieren der Gendosis von *Bmp4* in *Grem1*-Mutanten den Phänotyp rettet, weil das Knospen des Ureters und im weiteren Verlauf die Verzweigungsmorphogenese zugelassen wird (Michos et al., 2004; Michos et al., 2007). Die hier beschriebenen Mechanismen werden in *Abbildung 4.4.1* vereinfacht veranschaulicht.

An der Position, die durch das Zusammenspiel dieser Faktoren bestimmt wird, wächst die Ureterknospe ins Mesenchym ein, wobei sich die Ureterspitze verdickt und einen ampullenförmigen Umriss annimmt. Ohne die Bildung dieser Verdickung, die beispielsweise in *Sall1*-Mutanten (**Sal-like 1**) oder *Emx2*-Mutanten (**Empty spiracles homolog 2**) nicht vorkommt, können die dichotomen Verzweigungszyklen der Ureterspitzen nicht stattfinden (Dressler, 2002). Die Regulation der dichotomen Verzweigung soll an dieser Stelle nicht näher beschrieben werden. Es sei nur erwähnt, dass auch für diesen Prozess eine genau definierte mesenchymale Zellpopulation *Gdnf* sezerniert, dass dieses mit epithelial exponiertem Ret zusammenspielt und dass dadurch die Verzweigungsmorphogenese maßgeblich beeinflusst wird (Costantini und Kopan, 2010).

4.4.2. Molekulare Mechanismen der Ureterdifferenzierung

Im distalen Ureterbereich wird im Gegensatz zu den Ureterspitzen die Verzweigung des Ureters unterdrückt. Wie bereits bei der Bestimmung der Ureterknospenposition am Wolffschen Gang werden *Bmp4* und *Gdnf* als Gegenspieler diskutiert: Der eine soll das Knospen des Ureterstammes inhibieren und der andere soll die Verzweigung fördern. Vergleichbar mit der Kondensation des metanephrischen Mesenchyms an den Ureterspitzen kondensiert das Uretermesenchym, das durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx18* (**T-box18**) definiert werden kann, um das Epithel des Ureterstammes (Airik et al., 2006).

Durch den Verlust von *Tbx18* kommt es zum Auftreten von stark verkürzten Ureteren an einer gedrehten Niere. Das Nierenbecken ist stark aufgeweitet, ebenso wie die Ureteren, die weder die Marker des Urothels noch der glatten Muskulatur aufweisen (Airik et al., 2006). Airik und Kollegen konnten zeigen, dass die Zellen des Uretermesenchyms nicht mehr exklusiv um den Ureterstamm nachzuweisen sind, sondern vermehrt auch auf der ventralen Oberfläche der Niere lokalisiert sind.



Der Shh-Signalweg konnte bereits im Jahr 2002 von Yu et al. als wichtiger Signalweg für die Proliferation der Vorläuferzellpopulation und für die Differenzierung der glatten Muskulatur des Ureters identifiziert werden. Als Folge des von ihnen beschriebenen konditionellen Verlusts von *Shh* im Ureterepithel fanden sie bei neugeborenen Mäusen einen Hydroureter. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass es durch den Verlust von *Shh* zu einer verspäteten Muskeldifferenzierung kommt (Yu et al., 2002). Des Weiteren zeigten ihre Analysen, dass durch den Verlust von *Shh* im Epithel die Expressionen von *Ptch1* (**P**atched homolog 1) und *Bmp4* im Mesenchym unterbunden werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der Ligand *Shh* normal in der *Tbx18*-Verlustmutante exprimiert wird, dass jedoch die *Ptch1*-Expression in diesen Mutanten unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Dies galt auch für die *Bmp4*-Expression am E12,5, hingegen war dessen Expression am E11,5 unverändert (Airik et al., 2006; Airik und Kispert, 2007).

Bmp4, dessen Transkripte während der Ureterentwicklung mesenchymal detektierbar sind, wurde in der Literatur als auslösendes Signal für den Kondensationsprozess des Mesenchyms um das Ureterepithel beschrieben (Miyazaki et al., 2003; Airik und Kispert, 2007). Neben *Bmp4* regulieren noch weitere Faktoren die Differenzierung des Uretermesenchyms zur glatten Muskulatur. So wird der Verlust von *Tshz3* (**T**eashirt zinc finger family member 3) (Caubit et al., 2008) und *Sox9* (**S**RY-**box** containing gene 9) (Airik et al., 2010), die im Mesenchym exprimiert

werden, mit dem Verlust von glatter Muskulatur in Verbindung gebracht. Der Verlust von *Gata2* (**GATA binding protein 2**) führt zu bilateralen oder unilateralen Megaureteren und zur Hydronephrose. Es liegt nahe, dass es auch hier zu keiner Differenzierung der glatten Muskulatur kommt, was aber noch nicht explizit gezeigt wurde (Hoishino et al., 2008; Zhou et al., 1998). Interessanterweise wirkt sich nicht nur der Verlust von Signalmolekülen wie *Bmp4* oder *Shh* oder der Verlust von Transkriptionsfaktoren wie *Tshz3*, *Sox9*, *Tbx18* oder *Gata2* negativ auf die Differenzierung der glatten Muskulatur aus, sondern auch der Verlust von *Dlg1* (**D**iscs, **l**arge homolog **1**), das für ein Gerüstprotein (Scaffold protein) kodiert. Der Verlust dieses Gens, das vorwiegend im Ureterepithel transkribiert und translatiert wird, führt unter anderem dazu, dass es nicht zur Etablierung der beiden Orientierungen der glatten Muskulatur kommt, sondern nur zur Ausbildung von Muskelzellen, die parallel zum Ureter verlaufen (Mahoney et al., 2006).

Die in der Literatur diskutierten Mechanismen der Ureterentwicklung und Differenzierung lassen sich vereinfacht zu dem Schema in *Abbildung 4.4.2* zusammenfassen.

4.5. Regulation der Differenzierung von glatter Muskulatur

Glatte Muskulatur differenziert aus mesenchymalen Vorläuferpopulationen. Dabei kommt es zur gezielten Expression von Genen, die für Muskelproteine kodieren. Diese Induktion der Expression der Markergene für glatte Muskulatur (*Myh11*, *Acta2*, *Tagln* und *Cnn1*) muss in diesen Zellen gezielt hervorgerufen werden. Ihre Transkription wird über cis-regulatorische Elemente, die DNS-Sequenzmotive CArG, gesteuert. An diese CArG-Sequenzen bindet das ubiquitär exprimierte DNS-bindende Protein Srf (**S**erum response factor, Serum induzierter Faktor). Da neben den Genen der glatten Muskulatur auch die Gene der Skelett- und der Herzmuskulatur zum Teil CArG-Motive in ihren Kontrollregionen aufweisen, wird die Spezifität der Zelltyp-entsprechenden Gene dadurch erreicht, dass Srf in unterschiedlichen Geweben mit verschiedenen Co-Faktoren assoziiert. So führt eine Assoziation von Srf mit MyoD (**M**yogenic differentiation) zur Expression von Genen, die spezifisch in der Skelettmuskulatur abgelesen werden. Eine Assoziation von Srf mit Myocd, das nur in Vorläuferzellen der Kardiomyozyten und der glatten Muskulatur exprimiert wird, führt zur Expression von Genen, die spezifisch in Zellen der Herzmuskeln oder der glatten Muskeln transkribiert werden (Du et al., 2003). Allerdings werden in diesen beiden Zelltypen unterschiedliche Spleißvarianten von Myocd exprimiert, wodurch sich erklären lassen könnte, dass unterschiedliche Sätze an Genen reguliert werden (Creemers et al., 2006).

Neben dieser allgemeinen Regulation bestimmen lokale Signale die Differenzierung des Mesenchyms zur glatten Muskulatur, indem sie die Expression von *Myocd* oder die Interaktion von *Myocd* mit Srf beeinflussen. Diese Signale, die vor allem für die vaskuläre, glatte Muskulatur

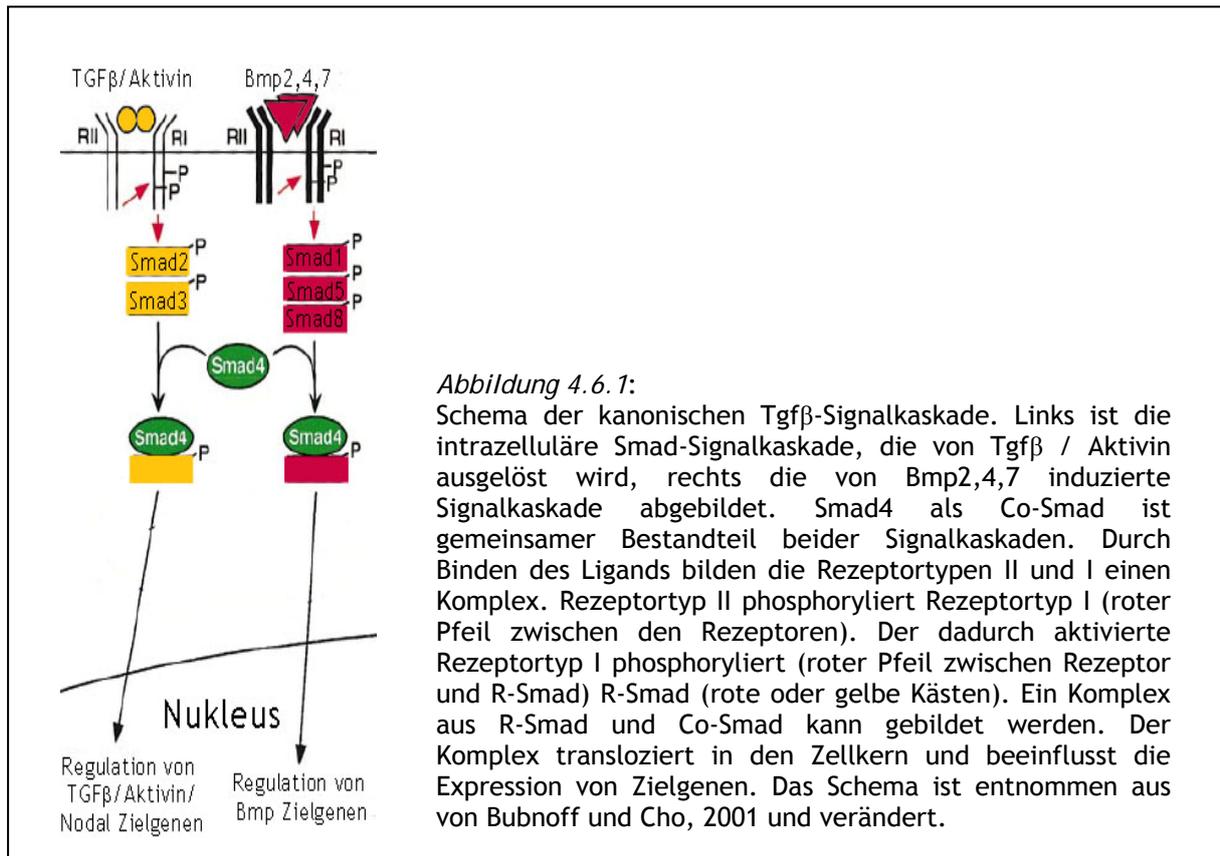
beschrieben wurden, bewirken Differenzierung, Migration oder Proliferation, je nachdem aus welchen Vorläuferzellen sich die glatten Muskelzellen entwickeln. So führt der Verlust von *Notch3* (**Notch** gene homolog **3**) dazu, dass in Arterien diejenigen Gene weniger stark exprimiert werden, die typisch für glatte Muskulatur sind. Notch3 beeinflusst also die Differenzierung dieser glatten Muskelzellen als eine Komponente eines Signalnetzwerkes positiv, wohingegen sein Zielgen *Hes1* (**H**airy and **e**nhancer of **s**plit **1**), das vom Notch- Signalweg „angeschaltet“ wird, in Zellkulturexperimenten die Expression von Markergenen für glatte Muskulatur inhibiert (Morrow et al., 2008). Auch die Signalmoleküle Tgf β - Familie (**T**ransforming **g**rowth factor **β**) sind als Teil solcher Signalnetzwerke beschrieben. Je nach Umgebung fördern sie die Expression von beispielsweise *Tagln* oder inhibieren die Differenzierung von glatten Muskelzellen (Goumans et al., 2009; Morrisey und Hogan, 2010). Von diesen lokal und zeitlich beschränkten Signalnetzwerken hängt die Differenzierung der Muskelvorläuferzellen zu glatten Muskelzellen ab. Weitere Komponenten dieser Signalnetzwerke sind der Hedgehog-Signalweg und der Pdgf-Signalweg (**P**latelet **d**erived **g**rowth factor) (Weaver et al., 2003; Miller et al., 2004; Yu et al., 2002; Wang et al., 2004). Für den Verlust des Hedgehog-Signalwegs wurde im Zusammenhang mit der Lungen- und Harnleiterentwicklung gezeigt, dass es zu einem Verlust bzw. zu einer verspäteten Differenzierung von glatten Muskelzellen kommt (Weaver et al., 2003; Miller et al., 2004; Yu et al., 2002).

4.6. Bedeutung von Bmp4 für die Entwicklung der Ureteren und der Nieren

Bmp4 gehört neben 32 weiteren Signalpeptiden der Tgf β -Familie an. Diese ist an einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen beteiligt, wie beispielsweise der Entwicklung des Mesoderms und der Entwicklung von Blutgefäßen (Hogan, 1996; Goumans et al., 2009). Ein Schema der kanonischen Tgf β -Signalkaskade ist in *Abbildung 4.6.1* skizziert. Die Zytokine der Tgf β -Superfamilie binden dabei an Serin/Threonin-Kinaserezeptoren des Typs I und des Typs II. Durch die Bindung der Zytokine an die Rezeptoren wird ein Heterotetramer gebildet, das aus jeweils zwei Rezeptortypen I und zwei Rezeptortypen II zusammengesetzt ist. Die räumliche Nähe der Rezeptortypen sorgt dafür, dass der konstitutiv aktive Rezeptortyp II den Rezeptortyp I phosphoryliert und damit aktiviert (Hogan, 1996; Miyazawa et al., 2002).

Intrazellulär wird das Tgf β -Signal über Proteine der Smad-Familie vermittelt. Es gibt drei Smad-Subklassen: Die Rezeptor- Smads (R-Smad; Smad1,2,3,5,8), die Inhibitor- Smads (I-Smad; Smad6,7) und die allgemeinen Smads (Co-Smad; Smad4). Die R-Smads binden dabei an den aktivierten Rezeptortyp I und werden durch diesen phosphoryliert.

Die Phosphorylierung der R-Smads ermöglicht durch eine Konformationsänderung die Bildung eines Komplexes mit dem Co-Smad. Dieser ternäre Komplex kann nun in den Zellkern



translozieren und die Transkription von Zielgenen stimulieren oder inhibieren (Miyazawa et al., 2002).

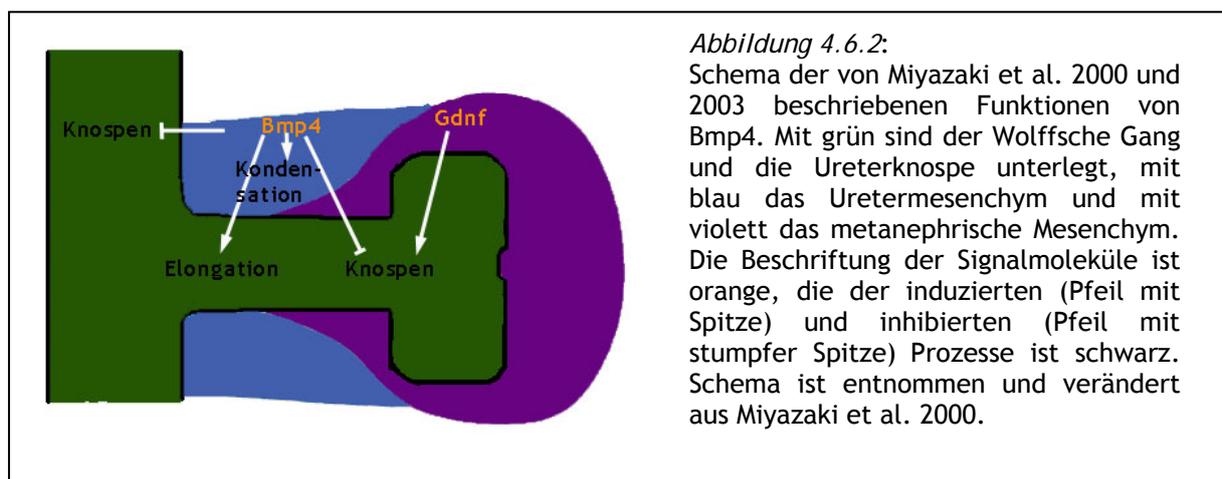
Eine Differenzierung des Signals kommt durch die Bindung der Zytokine an unterschiedliche Rezeptoren zustande. Diese assoziieren mit unterschiedlichen R-Smads. So wird die durch Tgfβ hervorgerufene intrazelluläre Signalkaskade durch die R-Smads Smad2 und Smad3 vermittelt, wohingegen die durch Bmp aktivierte, intrazelluläre Signalkaskade durch die R-Smads Smad1, Smad5 und Smad8 weitergeleitet wird (von Bubnoff und Cho, 2001).

Mausembryonen, die einen vollständigen Verlust des Signalmoleküls Bmp4 aufweisen, sterben während der Gastrulation (Dunn et al., 1997). Darüber hinaus beschrieben Dunn et al. (1997), dass der Verlust von einem funktionellen *Bmp4*-Allel eine Vielzahl von Fehlentwicklungen zur Folge haben kann, die sich in ihrer Häufigkeit und Schwere unterscheiden. So erhielten sie bei der Verpaarung von *Bmp4^{tm1/+}* mit C57BL/6-Mäusen weniger *Bmp4*-heterozygote Nachkommen als nach der Mendel zu erwarten ist. *Bmp4*-heterozygote Mäuse haben z. T. mehr als fünf Zehen am rechten Hinterlauf, einen verkürzten Nasenknochen oder Fehlentwicklungen der Augen wie Mikrophthalmie und Anophthalmie. Die Ergebnisse von Dunn et al. (1997) und Miyazaki et al. (2000) legen nahe, dass auch Bmp4 während der Nierenentwicklung wichtig ist, da neben den oben genannten Defekten im *Bmp4*-heterozygoten Fall vermehrt zystische Nieren auftreten (Dunn et al., 1997).

Die Folgen des Verlusts eines *Bmp4*-Allels auf die Nierenentwicklung wurden von Miyazaki et al. im Jahr 2000 näher beschrieben und charakterisiert. Sie berichteten, dass 53 % der untersuchten neugeborenen *Bmp4*^{+/-} Mäuse eine auffällige Fehlbildung des Urogenitalsystems aufweisen. Diese Fehlbildungen, die in 38 % der Fälle bilateral manifestiert sind, können den Kategorien verkleinerte bzw. dysplastische Niere, Hydroureter mit Hydronephrose und Ureter fissus zugeordnet werden: In 60 % der auffälligen Urogenitalsysteme finden sich deutlich verkleinerte oder dysplastische Nieren, in 32 % der Fälle ein Hydroureter und Hydronephrose aufgrund einer fehlerhaften Position des Ureters an der bzw. in die Blase und in 8 % der Fälle eine duplizierte Niere mit verdoppeltem Ureter. Allerdings ist auch gezeigt worden, dass der Verlust eines *Bmp4*-Allels je nach verwendetem Mausstamm zu einer unterschiedlichen Frequenz von CAKUT führt (Dunn et al., 1997; Miyazaki et al., 2000; Cain und Bertram, 2006). Dies könnte durch die Expression eines weiteren Bmp-Liganden wie Bmp5 erklärt werden, der, abhängig vom verwendeten Mausstamm, unterschiedlich stark exprimiert wird (King et al., 1994).

In weiterführenden Untersuchungen mit *Bmp4*^{+/-} Embryonen zeigten Miyazaki et al. (2000), dass deren Nieren bereits am E14,5 signifikant kleiner als die von Wildtyp-Embryonen sind. Sie wiesen darauf hin, dass die Nierenentwicklung schon vom E12,5 an beeinträchtigt ist, da bereits in diesem Stadium weniger mesenchymale Zellen pro Niere kondensieren. Neben diesen Ergebnissen, die die Niere per se betreffen, kann die teilweise beobachtete Verdopplung des Ureters nicht auf eine zusätzlichen Ureterknospe des Wolffschen Gangs zurückgeführt werden, sondern scheint durch ein zusätzliches Knospen des Ureterstamms begründet zu sein, da in 2 von 19 Fällen ein Knospen des Ureterstamms nachgewiesen wurde.

Ebenso ist in einem erheblichen Anteil der *Bmp4*^{+/-} Embryonen am E11 (3 von 5) die Position der Ureterknospe kranial verschoben (siehe Abschnitt 4.4.1). Dies kann als Grund für den verlängerten CND gelten, der am E12,5 in *Bmp4*^{+/-} Embryonen nachgewiesen werden kann. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass der Ureter in *Bmp4*^{+/-} Embryonen beim E13,5 noch mit



dem Wolffschen Gang verbunden bleibt, wohingegen er im Wildtyp in diesem Stadium schon mit der embryonalen Kloake fusioniert ist. Die falsche Position der Ureterknospe spiegelt sich auch in einem verkürzten Abstand zwischen der Ureteröffnung und dem Urethraursprung in der Blase wider.

In einer späteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *Bmp4*^{+/-} Embryonen, bevor es zu einem morphologisch ausgeprägten Hydroureter (ab ca. E16,5) und damit zu einem vergrößerten Ureterquerschnitt kommt, die Anzahl an glatten Muskelzellen um das Ureterepithel, verglichen mit der in der Wildtypsituation, signifikant verringert ist (Miyazaki et al., 2003). Allerdings konnte im Umkehrschluss nicht gezeigt werden, dass exogenes Bmp4 im Medium von Nierenkulturen, die von Embryonen des E12 stammen, zu einer gesteigerten Anzahl von glatten Muskelzellen (*Acta2* exprimierenden Zellen) führt. Jedoch konnte in einem vergleichbaren Versuchsansatz bewiesen werden, dass eine zusätzliche lokale Bmp4-Quelle in Nierenkulturen zwar nicht zu einer gesteigerten Zahl von Acta2-positiven Zellen oder zur Beeinflussung der Proliferation oder der Apoptose führt, aber zu einer Akkumulation von mehreren mesenchymalen Zellschichten um die exogene Bmp4-Quelle (Miyazaki et al., 2003). Die Ergebnisse der Arbeiten von Miyazaki et al. 2000 und 2003 lassen sich zu dem Schema in *Abbildung 4.6.2* zusammenfassen.

Um den Einfluss des vollständigen *Bmp4*-Verlusts auf die Ureterentwicklung untersuchen zu können, bedienten sich Brenner-Anantharam et al. (2007) Nierenkulturen von Mäusen, die zwei gefloxe *Bmp4*-Allele und eine ubiquitär exprimierte und induzierbare Rekombinase cre (cre/estrogen receptor α 1) haben. So kann der Verlust von *Bmp4* zu einem beliebigen Entwicklungsstadium hervorgerufen werden. In diesem Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Bmp4 zu einem späteren Entwicklungsstadium als E12,5 keinen negativen Effekt auf die Ureterdifferenzierung hat.

Dahingegen führt der vollständige *Bmp4*-Verlust vor E12,5 dazu, dass weder die Differenzierung des Mesenchyms zu glatten Muskelzellen des Ureters noch die Differenzierung des Epithels zum Urothel stattfindet (Brenner-Anantharam et al., 2007). Auch kann in diesem Versuchsansatz gezeigt werden, dass der Verlust von einem *Bmp4*-Allel schon eine verringerte Dicke der glatten Muskelschicht um das Urothel hervorruft (Wang et al., 2009).

4.7. BMP4-Mutationen im Menschen

Bei CAKUT-Patienten konnten einige Mutationen im *BMP4*-Gen nachgewiesen werden (Tabatabaeifar et al., 2009; Schild, 2009; Weber et al., 2008). Weitere Analysen dieser Mutationen zeigten, dass dabei zum Teil nur die DNS-Sequenz, nicht aber die Aminosäuresequenz betroffen war (stille Mutationen), zum Teil die Mutation in der DNS-Sequenz auch zum Austausch einer Aminosäure führte. Ein Test der Mutationen der letzten Kategorie in Zebrafischembryonen

zeigte, dass die analysierten Proteinvarianten eine eingeschränkte Funktionalität besitzen (Weber et al., 2008). Da die meisten CAKUT durch das Anhäufen von verschiedenen Mutationen in Genen der Ureter- und Nierenentwicklung entstehen (Ichikawa et al., 2002) und da in den Arbeiten von Tabatabaeifar und Kollegen (2009), Weber und Kollegen (2008) und Schild (2009) die Mutationen meistens nur heterozygot auftraten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei den Patienten ein weiteres Gen, das an der Regulation des Urogenitalsystems beteiligt ist, mutiert vorliegt bzw. dass es in unterschiedlichem Ausmaß zur Expression von Proteinen mit redundanter Funktion kommt.

4.8. Zielsetzung

Bisher konnte aufgrund der frühen embryonalen Letalität und des Fehlens einer geeigneten cre-Linie für den gewebespezifischen Verlust noch nicht *in vivo* gezeigt werden, welche Auswirkungen der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenchym auf die Entwicklung des Ureters und die Differenzierung seiner Gewebe hat. Dies soll hier mithilfe der Kreuzung der *Tbx18^{cre}*- und der *Bmp4^{fl}*-Mauslinien analysiert werden. Dadurch wird unter anderem in den Zellen des Uretermesenchyms cre- Rekombinase- abhängig das mit loxP- Sequenzen flankierte (fl) *Bmp4*- Allel (*Bmp4^{fl}*) deletiert.

Ferner ist noch nicht nachgewiesen, ob das Bmp4- Signal Smad4- abhängig vermittelt wird oder über eine andere intrazelluläre Signalkaskade die Ureterentwicklung und -differenzierung gesteuert wird. Diese Frage soll durch die Kreuzung der *Tbx18^{cre}*-Linie mit einer Mauslinie, die ein mit loxP- Sequenzen flankiertes *Smad4*-Allel (*Smad4^{fl}*) trägt, geklärt werden.

Bisher blieb in der Literatur das Dilemma unbeantwortet, wie auf der einen Seite durch die konditionelle *Shh*-Deletion im Epithel der „vollständige“ Verlust von *Bmp4* hervorgerufen wurde, dies auf der anderen Seite aber nur einen abgeschwächten Phänotyp bedingte, verglichen mit dem von *Bmp4^{+/-}* beschriebenen. Diesem soll mittels des vollständigen Verlusts des Hh-Signalwegs im Uretermesenchym nachgegangen werden. Dieser kann durch die Kreuzung der *Tbx18^{cre}*-Linie mit einer Linie, die ein mit loxP- Sequenzen umgebenes *Smo*-Allel (*Smo^{fl}*) trägt, erreicht und dann mittels histologischer Methoden und Expressionsanalysen charakterisiert werden.

Ziel der Arbeit ist es, die Interaktion zwischen Hh-Signalweg einerseits und Bmp4-Signalkaskade andererseits besser beschreiben zu können. Des Weiteren soll geklärt werden, ob die Differenzierung des Mesenchyms durch das Bmp4-Signal von Smad4 vermittelt wird.

5. Materialien und Methoden

5.1. Verwendete Geräte

Dieser Abschnitt enthält eine alphabetische Liste mit den verwendeten Geräten und deren Herstellern.

Binokular	MZ75, Leica
Computer	Apple iMac, PC mit MS-Windows Software: Office:mac v.X.; Office 2003 (Microsoft), MacVector 10.5.2 (Accelrys); Filemaker pro 9.0 (Filemaker); Photoshop CS (Adobe)
Elektroporationsküvetten	Biorad
Geldokumentation	Biorad, Sony Thermodrucker UP890CE
Gelelektrophoresezubehör	Eigenbau
Heizplatte	Schott
Hybridisierungsöfen	Amersham, Biometra
Inkubatoren	GfL, Infors HT, Memmert
Makroskop	Leica M420 mit der Kamera Fujix digital HC-300Z
Mikroliterpipetten	Rotilabo [®] -Mikroliterpipetten Proline [®] , variabel der Firma CarlRoth
Mikroskop	Mikroskop Leica Axioplan 5000 B mit der Kamera DFC300 FX Leica MZ75
Mikrotom	RM2155, Leica
Mikrowellenofen	LG
Netzteil	Biorad Powerpack
Objektträger	Superfrost Plus, Menzel
PCR-Maschinen	peqStar der Firma peqlab
pH-Meter	WTW
Photometer	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetus Hirschmann Laborgeräte
Plastikwaren	Greiner, Sarstedt, Falcon, Sigma
Präparierbesteck	Fine Science Tools
Schüttler /Rührer	Heidolph, Assistent, IKA, Stuart, GFL
Thermomixer	Eppendorf 5436, HLC
Trockenplatte	Medax
Waagen	Kern
Zentrifugenzubehör	Beckman
Zentrifugen	Eppendorftischzentrifuge 5415D, Beckman Model J6B mit den Rotoren JA-10, JA-20; Heraeus Biofuge 13 und Biofuge15

5.2. Substanzen

Dieser Abschnitt enthält eine alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien, Enzyme und Nachweissysteme sowie deren Hersteller.

Ampicillin	Roth
BrdU	Roche
CaCl ₂	Appllichem
DAPI	Roth
DEPC	Appllichem
DIG-Reaktionsmix	Roche

DMSO	Applichem
DNase	10 U/ μ l Roche
DNS-Längenstandard	Invitrogen
DTT	Roth
EDTA	Applichem
Eosin Y	Sigma-Aldrich
Ethanol (EtOH)	Baker
Gill's Hematoxylin No3	Sigma-Aldrich
Glyzerin	Applichem
Hefeextrakt	Applichem
ImmEdgePen	H 4000, Vector
KCl	Applichem
KH_2PO_4	Applichem
LiCl	Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH)	Merck
MgCl_2	Applichem
Microarray	Agilent
Mowiol	Calbiochem
NaCl	Applichem
NaH_2PO_4	Applichem
Na_2HPO_4	Applichem
Natriumazetat	Applichem
Natriumzitat	Applichem
Nucleobond AX	Macherey & Nagel
NucleoSpin	Macherey & Nagel
Paraformaldehyd	Applichem
PEG4000	Fermentas
Permout	Fisher Scientific
ProtK	Applichem
Restriktionsenzyme	NEB
RNAlater	Ambion
RNasin	Promegan
Roti-Histol	Roth
SDS	Applichem
SP6-Polymerase	NEB
T3-Polymerase	Roche
T4-Ligase	NEB
T4-Ligasepuffer (10fach)	NEB
T7-Polymerase	NEB
Tinte	Pelikan
Tris-Base	Applichem
Trypton	Applichem
TUNEL	Chemicon

5.2.1. Lösungen

Dieser Abschnitt enthält eine alphabetische Liste der verwendeten Lösungen. Anbei ist ihre Zusammensetzung für die einfache Konzentration beschrieben.

5xKCM	500 mM KCl, 150 mM CaCl_2 , 250 mM MgCl_2
LB-Medium	Pro Liter 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, den pH-Wert auf 7 einstellen

Mowiol	2,4 g Mowiol4-88, 6 g Glycerin, 6 ml H ₂ O, 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH-Wert 8,5
PBS	140 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,45 mM KH ₂ PO ₄ , pH-Wert 7,4
4 % PFA	40 g Paraformaldehyd in 1 l PBS pH-Wert 6 bis 7
ProtK-Puffer	100 mM Tris-HCl pH-Wert 8,0; 5 mM EDTA pH-Wert 8,0; 200 mM NaCl, 0,2 % SDS
SSC	150 mM NaCl, 15 mM Natriumzitat, pH-Wert 7

5.3. Klonieren

5.3.1. Verwendete Bakterienstämme

Der gewählten Transformationsform entsprechend wurden die *E.coli*-Stämme verwendet. Die verwendeten *E.coli*-Stämme sind in *Tabelle 5.3.1* zusammengefasst.

Tabelle 5.3.1:

Zusammenstellung der verwendeten *E.coli*-Stämme und ihres Genotyps

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]
<i>E. coli</i> XL10 gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'</i> [<i>proAB lacI^fZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)</i>]

5.3.2. Ligation

Für die Ligation wurden etwa 100 ng des linearisierten und dephosphorylierten Vektors und die dreifache Menge an geschnittenem Insert eingesetzt, die Konzentrationsabschätzung erfolgte im Gelbild auf Grundlage eines DNS-Standards mit bekannter Konzentration der Banden. Darüber hinaus enthielt der 20 µl Ansatz 2 µl 10fach T4-Ligasepuffer, 2 µl PEG4000 und 1µl T4-Ligase. Für die Ligation mit „klebenden Enden“ wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde inkubiert, für die Ligation mit glatten Enden wurde über Nacht bei 4 bis 8 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz mittels chemischer Transformation den *E. coli* XL10 gold eingebracht.

5.3.3. Transformation

5.3.3.1. Elektroporation

Die 50 µl-Aliquot der elektrokompenten *E. coli* XL1 blue wurden auf Eis aufgetaut. Die Elektroporationsküvetten wurden im Eisbad gekühlt. Die *E. colis* mit der Plasmid- DNS oder dem Ligationsansatz wurden zusammen auf den Boden der Küvette pipettiert und auf Eis für eine Minute inkubiert. Dann wurde ein Elektropuls von 2,5 kV, 25 mF und 200 Ω an die Küvetten mit einem Abstand von 2 mm anlegt. Für Küvetten mit einem Abstand von 1 mm wurden entsprechend 1,25 kV, 25 mF und 200 Ω anlegt. Die *E. coli*-Bakterien wurden in 200 µl

LB-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine LB- Agar- Platte, die den entsprechenden Selektionsmarker enthielt, aufgebracht und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5.3.3.2. Transformation mit chemisch-kompetenten Zellen

Ein Aliquot der chemisch-kompetenten *E. coli* XL10 gold wurde auf Eis aufgetaut. Bevor 100 µl der Bakterien zum Transformationsansatz hinzupipettiert wurden, wurden in einem 100 µl Reaktionsvolumen der Ligationsansatz (10 bis 20 µl) bzw. 100 ng Plasmid- DNS, 20 µl der 5-fach KCM- Lösung mit Wasser vereinigt. Diese Suspension aus Bakterien, Puffer und DNS wurde für 20 min auf Eis, dann für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 1 ml LB-Medium dazugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium reduziert, indem die Bakterien pelletiert und dann nur noch in 200 µl LB-Medium aufgenommen wurden. Diese Zellsuspension wurde auf die LB-Platte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.3.4. Darstellung von Plasmid-DNS

Für die Darstellung von Plasmid- DNS wurden die Systeme von Macherey & Nagel verwendet. Je nach Bedarf wurde dazu eine Mini (5 ml)- oder eine Midi (100 ml)- Bakterienkultur angeimpft und mit dem entsprechenden System Nucleobond AX bzw. NucleoSpin (Macherey & Nagel) aufgearbeitet. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

5.4. Verwendete Mausstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Allele wurden alle in einem gemischten genetischen Hintergrund (C57BL6/J und NMRI) gehalten.

5.4.1. *Bmp4^{fl}*-Allel

Das hier verwendete *Bmp4^{fl}*-Allel wurde erstmals 2002 von Kulesa und Hogan beschrieben. Das mutierte Allel wurde mittels PCR nachgewiesen. Die Primer und die weiteren PCR-Bedingungen für die Genotypisierung sind in *Tabelle 5.4.1* aufgeführt.

5.4.2. *Smad4^{fl}*-Allel

Das hier verwendete *Smad4^{fl}*-Allel wurde erstmals 2004 von Chu et al. beschrieben. Das mutierte Allel wurde mittels PCR nachgewiesen. Die Primer und die weiteren PCR-Bedingungen für die Genotypisierung sind in *Tabelle 5.4.1* aufgeführt.

5.4.3. *Smo^{fl}*-Allel

Das hier verwendete *Smo^{fl}*-Allel wurde erstmals 2001 von Long et al. beschrieben. Das mutierte Allel wurde mittels PCR nachgewiesen. Die Primer und die weiteren PCR-Bedingungen für die Genotypisierung sind in *Tabelle 5.4.1* aufgeführt.

5.4.4. *Tbx18^{cre}*-Allel

Das hier verwendete *Tbx18^{cre}*-Allel wurde erstmals 2010 von Trowe et al. beschrieben. Das mutierte Allel wurde mittels PCR nachgewiesen. Die Primer und die weiteren PCR-Bedingungen für die Genotypisierung sind in *Tabelle 5.4.1* aufgeführt.

Tabelle 5.4.1:

Zusammenfassung der PCR-Bedingungen. Die für die jeweilige PCR spezifischen Parameter sind in dieser Tabelle zusammengefasst. Das Standard-PCR-Ansatzvolumen beträgt 50 µl. Ein Ansatz enthält 1 µl DNS-Stock, 10 mM Tris-HCl pH-Wert 8,5, 50 mM KCl, 1 mM dNTPs und 1 µl Taq. Ein Standard-PCR-Programm besteht aus folgenden Schritten: Denaturieren der DNS bei 94 °C für 3 min. Danach wird eine Abfolge aus Denaturieren (94 °C für 30 s), Anlagern (Temperatur siehe Tabelle für 45 s) und DNS-Strangverlängern (1 min bei 72 °C pro kb zu amplifizierendem DNS-Stück) entsprechend der in der Tabelle angegebenen Zyklenzahl wiederholt. Anschließend folgt ein zehnminütiger 72 °C-Schritt.

Allel	Primer 1 µM	Anlagerungs- temperatur in °C	Zyklus- zahl	MgCl ₂ [mM]	DMSO [Vol-%]	erwartetes Fragment Größe in bp
<i>Bmp4^{fl}</i>	5' gTgTgTgTAgggTgTgAgggAgAAA 5'CCCggTCTCAGgTATCAAACTAgCA 5'CCCCAgTCACgACgTTgTAAAAACgAC	58	35	1	0	fl 400 wt 300 Δ 500
<i>Smad4^{fl}</i>	5'CTTTTATTTTCAGATTCAggggTTC 5'AAAAATgggAAAACCAACgAg 5'TACAAgTgCTATgTCTTCAGCg	54	35	2	5	fl 675 wt 625 Δ 512
<i>Smc1^{fl}</i>	5'CTTgggTggAgAggCTATTTC 5'AggTgAgATgACAggAGATC	65	35	2	5	280
<i>Smo^{wt}</i>	5'CCACTgCgAgCCCTTgCgCTAC 5'CCCATCACCTCCgCgTCgCA	65	35	2	5	160
<i>Sp1-Sex</i>	5'CATggAgggCCATgTCAAAGCg 5'TgTTgAgggCAACTgCAggCTgT	63	32	2	5	Männlich 290
<i>Tbx18^{Cre}</i>	5'TTAgTCCCTCgggCTCATCAgTC 5'gCATAAACCAGTgAAACAgCATTgC	59	35	2	5	790

5.5. Embryonen

Die trächtige Maus wurde mittels Genickbruch getötet. Die Embryonen wurden im Uterus aus der Maus entnommen und in PBS unter dem Binokular präpariert. Die Embryonen wurden in 4 % PFA über Nacht fixiert. Am darauf folgenden Tag wurden sie schrittweise in Methanol überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Embryonen bzw. die embryonalen Gewebe in Methanol bei -20 °C gelagert.

5.5.1. Tinteninjektion

Zum Testen, ob ein Hydroureter durch das Auftreten von physikalischen Obstruktionen entstanden ist, wurde Tinte durch eine ausgezogene Glas-Kapillare ins Nierenbecken von frisch isolierten Urogenitalsystemen des E18,5 injiziert und durch die Harnleiter gedrückt. Sie gelangt gegebenenfalls in die Blase. Das Ergebnis wurde dokumentiert am Makroskop.

5.5.2. Anfertigung von Gewebedünnschnitten

In MeOH gelagertes Gewebe wurde über EtOH in Isopropanol überführt und auf 65 °C erwärmt. Anschließend wurde das Gewebe schrittweise in Paraffin überführt und in Formen entsprechend der gewünschten Schnittebene ausgerichtet.

Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden am Mikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug je nach geplantem Verwendungszweck 5 oder 10 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 42 °C getrocknet. Die Schnitte wurden bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

5.5.3. Hämatoxylin- Eosin-Färbungen

Hämatoxylin- Eosin- Färbung wurde auf 5 µm dicken Gewebeschnitten durchgeführt. Das Gewebe wurde mittels Roti- Histol deparaffiniert und in einer absteigenden EtOH-Verdünnungsreihe rehydriert. Das rehydrierte Gewebe wurde für etwa 45 s in Hämatoxylinlauge gefärbt, anschließend wurden die Gewebeschnitte gründlich mit Wasser gespült und für 1 min in 0,5 % Natriumacetat inkubiert. Bevor und nachdem sie für 90 s mit Eosin Y gefärbt wurden, wurden die Schnitte jeweils mit Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal für zwei bis drei Minuten in EtOH dehydriert, bevor sie in Roti- Histol (zweimal für 10 min) überführt und mit Permout eingedeckelt wurden.

5.5.4. RNS-Sondensynthese

RNS- Sonden zum Nachweis der in *Tabelle 5.5.4* aufgeführten Gene wurden wie folgt hergestellt. Es wurde das entsprechende Plasmid, das in *Tabelle 5.5.4* angegeben ist, verwendet. Das entsprechende Restriktionsenzym für die Linearisierung des Plasmids und die verwendete RNS-

Polymerase sind ebenfalls angegeben. Jeder *in vitro* Transkriptionansatz hat ein Volumen von 10 μ l. Eingesetzt wurden 1 μ l des linearisierten Plasmids (Ausgangskonzentration 500 ng/ μ l), 1 μ l eines zehnfachen Transkriptionspuffer, 1 μ l eines zehnfachen DIG- Reaktionsmix, 1 μ l 0,1 mM DTT, 0,3 μ l RNasin und 0,5 μ l Polymerase. Das restliche Probenvolumen wurde mit Wasser aufgefüllt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNS- Matrize mittels eines DNase- Verdaus abgebaut (5 U). Anschließend wurde die RNS- Sonde mittels einer LiCl/EtOH-Fällung aufgereinigt und in 60 μ l einer Mischung aus Hybridisierungspuffer/DEPC-H₂O (1:1) gelöst. Der Hybridisierungspuffer wurde von Moorman et al. (2001) beschrieben.

Tabelle 5.5.4:

Auflistung der verwendeten Sonden. Die Tabelle enthält neben der Bezeichnung für das Gen, die Bezeichnung für das verwendete Plasmid, das verwendete Restriktionsenzym für die Linearisierung des Plasmids und die für die RNS-Probensynthese verwendete RNS- Polymerase.

Gensymbol	Plasmid	Restriktions- enzym	RNS- Poly- merase
<i>Axin2</i>	pSVSport1.Axin2	<i>EcoRI</i>	T7
<i>Bmper</i>	pmodSK.Bmper	<i>EcoRI</i>	T3
<i>Bmp4</i>	pSP72.Bmp4	<i>EcoRI</i>	Sp6
<i>Car3</i>	pmodSK.Car3	<i>NcoI</i>	T7
<i>Catna1</i>	pmodSK.Catna1	<i>BamHI</i>	T7
<i>Cdh16</i>	pFLCI.Cdh16	<i>EcoRI</i>	T3
<i>Cldn6</i>	Pmodsk.Cldn6	<i>EcoRV</i>	T3
<i>Cldn11</i>	pmodSK.Cldn11	<i>NcoI</i>	T3
<i>Cxcl12</i>	pFLCI.Cxcl12	<i>NcoI</i>	T3
<i>Dach2</i>	pFLCI.Dach2	<i>HindIII</i>	T3
<i>Dact1</i>	pFLCI.Dact1	<i>NcoI</i>	T3
<i>Dpysl3</i>	pFLCI.Dpysl3	<i>EcoRV</i>	T3
<i>Dusp10</i>	pmodSK.Dusp10	<i>XhoI</i>	T3
<i>Foxc2</i>	pBS.Foxc2(3.0)	<i>BamHI</i>	T7
<i>Gata2</i>	pmodSK.Gata2	<i>BamHI</i>	T7
<i>Gata3</i>	pFLCI.Gata3	<i>HindIII</i>	T3
<i>Hmga2</i>	pFLCI.Hmga2	<i>PstI</i>	T3
<i>Id2</i>	pSK.Id2	<i>HindIII</i>	T3
<i>Kif12</i>	pFLCI.Kif12	<i>EcoRI</i>	T3
<i>Kit</i>	pFLCI.Kit	<i>NbeI</i>	T3

<i>LacZ</i>	pKS.lacZ.ClaI-XbaI(3.0)	<i>ClaI</i>	T7
<i>Lgals1</i>	pmodSK.Lgals1	<i>SacI</i>	T7
<i>Masp1</i>	pFLCI.Masp1	<i>XbaI</i>	T3
<i>Myb11</i>	pFLCI.Myh11	<i>EagI</i>	T3
<i>Myocd</i>	pFLCI.Myocd	<i>ClaI</i>	T3
<i>Nr2f1</i>	pmodSK.Nr2f1	<i>SphI</i>	T3
<i>Pdgfra</i>	pFLCI.Pdgfra	<i>HindIII</i>	T3
<i>Plexd3</i>	pFLCI.Plexd3	<i>PvuII</i>	T3
<i>Pod1</i>	pSK.epicardin(1,2)	<i>EcoRI</i>	T7
<i>Serpinh1</i>	pFLCI.Cbp1	<i>XhoI</i>	T3
<i>Sox9</i>	pSox9.5	<i>HindIII</i>	T7
<i>Sparc</i>	pmodSK.Sparc	<i>EcoRI</i>	T3
<i>Sulf1</i>	pFLCI.Sulf	<i>XhoI</i>	T3
<i>Tagln</i>	pKS.Sm22a (pKS.Tagln)	<i>EcoRI</i>	T7
<i>Tbx18</i>	pKS.tbx18.cDNA(2.0)	<i>HindIII</i>	T7
<i>Thbs1</i>	pFLCI.Thbs1	<i>EcoRI</i>	T3
<i>Tnnt2</i>	pSVSport.Tnnt2	<i>Sall</i>	T7
<i>Tshz3</i>	pSK.Tsh3	<i>HindIII</i>	T3
<i>Upk1b</i>	pFLCI.Upk1b	<i>EcoRI</i>	T3
<i>Upk3b</i>	pFLCI.Upk3b	<i>XbaI</i>	T3
<i>Vil2</i>	pFLCI.Vil2	<i>XhoI</i>	T3
<i>Zcchc12</i>	pmodSK.Zcchc12	<i>PvuII</i>	T3
<i>Zfp536</i>	pFLCI.Zfp536	<i>SacII</i>	T3

5.5.5. RNS-*in situ* Hybridisierungsfärbungen auf Gewebeschnitten

RNS-*in situ* Hybridisierungsfärbungen wurden im Wesentlichen nach den Angaben von Moorman et al. (2001) durchgeführt. Es werden im Folgenden nur die Abweichungen zu dem dort veröffentlichten Protokoll angegeben.

Nach dem Entwachsen der Schnitte wurde das Gewebe in PBS rehydriert. Der proteolytische Verdau wurde für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Es wurde ein Puffer verwendet, der aus 0,1 M Tris mit dem pH-Wert 7,5 bestand und die verwendete Konzentration von ProtK betrug 10 mg/l.

Zum Minimieren des zu verwendenden Sondenvolumens und zur Färbung von mehreren Sonden pro Objektträger wurden die einzelnen Gewebe vor der Prähybridisierung mit dem Stift ImmEdge Pen umrandet. Der verwendete zweifache SSC- Puffer war pH- neutral (pH-Wert 7) im Gegensatz zum verwendeten SSC- Puffer bei Moorman et al. (2001). Die Objekte wurden mit Mowiol eingedeckelt und am Mikroskop Leica Axioplan 5000 B mit der Kamera DFC300 FX dokumentiert. Die digitalen Bilder wurden mit dem Programm Photoshop CS nachbearbeitet.

5.5.6. Antikörperfärbung auf Gewebeschnitten

Die Antikörperfärbungen auf Gewebeschnitten wurden im Wesentlichen so durchgeführt, wie es bei Airik et al. (2010) beschrieben wurde. Es wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte hierfür ausgesucht. Die zur Anwendung gekommenen Antikörper mit ihren Quellen und den verwendeten Verdünnungen sind in *Tabelle 5.5.6* aufgeführt.

Die Objekte wurden mit DAPI gegengefärbt und mit Mowiol eingedeckelt. Bis zu ihrer Dokumentation am Mikroskop Leica Axioplan 5000 B mit der Kamera DFC300 FX wurden die Färbungen kühl und dunkel gelagert. Die digitalen Bilder wurden mit dem Programm Photoshop CS nachbearbeitet.

Tabelle 5.5.6:

Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Die Bezugsquelle und die Verdünnung, in der die Antikörper eingesetzt wurden, sind ebenfalls angegeben.

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Polyklonales Kaninchenantiserum gegen Myh11	R. Adelstein, Bethesda, USA	1:200
Monoklonaler Mausantikörper gegen Acta2 (Klone 1A4) direkt FITC-markiert	Sigma	1:200
Rhodamin gekoppelt an IgG(H+L) aus der Ziege gegen Kaninchen	Dianova	1:200

5.5.7. Nachweis von proliferierenden Zellen mittels BrdU

Dazu wurde wie bei Airik et al. (2010) und Bussen et al. (2004) beschrieben vorgegangen. Die Statistische Auswertung wurde mittels Microsoft Excel durchgeführt, der T-Test wurde auf graphpad.com durchgeführt.

5.5.8. Nachweis von apoptotischen Zellen mittels TUNEL

Wie es bei Airik et al. (2010) beschrieben wurde, wurde hier zum Visualisieren von apoptotischen Zellen auf 5 µm dicken Gewebeschnitten der TUNEL- Nachweis genutzt. Das Nachweissystem wurde von der Firma Chemicon gekauft und nach Herstellerangaben verwendet.

5.5.9. RNS-*in situ* Hybridisierungsfärbung auf Organen oder Organismen

Für die RNS-*in situ* Hybridisierungsfärbung auf Organen oder Embryonen wurde vorgegangen wie bei Wilkinson (1992). Es wurden die in MeOH gelagerten Gewebe verwendet, die wie in Abschnitt 5.5 beschrieben behandelt wurden.

Im Anschluss an die Färbungsreaktion und die nachfolgende Postfixierung wurden die Embryonen oder Gewebe schrittweise in 80 % Glycerin/PBS überführt und am Mikroskop Leica M420 mit der Kamera Fujix digital HC-300Z dokumentiert.

5.5.10. Vergleich von Transkriptomen zweier Zellpopulationen mittels der Microrarray-Technologie

Unter Zuhilfenahme der DNS-Microarray Technologie wurden die Transkriptome (Genexpressionsprofile) von zwei Zellpopulationen miteinander verglichen. Die jeweilige Zellpopulation, in diesem Fall Ureteren eines einheitlichen Genotyps, wurde isoliert und in RNAlater bei 4 °C bis zur RNS-Extraktion gelagert. Die RNS-Extraktion, das anschließende Umschreiben in cDNS mit Cy3-Markierung für RNS der ersten Zellpopulation und Cy5-Markierung für die der zweiten Zellpopulation, die Hybridisierung, das Auslesen des Microarrays und die Auswertung der Fluoreszenzsignale (ImaGene 4.2 Software, Biodiscovery) wurden nach Herstellerangaben in Kollaboration mit Herrn Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

6. Ergebnis

6.1. Die Deletion von *Bmp4* im Uretermesenchym

Bmp4 ist im Mesenchym um den Wolffschen Gang am E10,5 exprimiert (Miyazaki et al., 2000). Während der folgenden Ureter- und Nierenentwicklung wird die *Bmp4*-Expression im Uretermesenchym um den Ureterstiel aufrecht erhalten (Miyazaki et al., 2000). Eine weitere Expressionsdomäne von *Bmp4* befindet sich im benachbarten Nierenmesenchym. Dort ist es nicht ubiquitär exprimiert, sondern seine Transkripte sind im Mesenchym um die Ureteräste nachweisbar, nicht jedoch im peripheren metanephrischen Mesenchym. Um nun spezifisch die Funktion von *Bmp4* im Uretermesenchym zu untersuchen, wurde die *Tbx18^{cre}*-Linie verwendet, die eine cre-Rekombinase spezifisch im Uretermesenchym exprimiert. Durch Kreuzungen dieser Mauslinie mit der Mauslinie, deren *Bmp4*-Allel mit loxP- Signalsequenzen flankiert ist, kommt es zur gewebespezifischen Rekombination an den loxP- Sequenzen des *Bmp4*-Allels und damit zur *Bmp4*- Deletion im Uretermesenchym (Kulesa und Hogan, 2002; Airik et al., 2010; Trowe et al., 2010). Die daraus resultierenden *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}* Embryonen werden im folgenden Text als *Bmp4*-mutante Embryonen bezeichnet.

6.1.1. *Bmp4*-mutante Embryonen waren im erwarteten Verhältnis nachweisbar

Es wurden 200 Embryonen der Verpaarungen von *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/+}* Männchen mit *Bmp4^{fl/+}* Weibchen isoliert und mittels PCR ihr Genotyp bestimmt. Statt der zu erwartenden 25 Embryonen konnten 23 Embryonen als *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}* identifiziert werden (Tabelle 6.1.1). Dies bewies, dass die *Bmp4*-mutanten Embryonen nicht während der frühen embryonalen Entwicklung aufgrund schwerwiegender Fehlbildungen des Herzens sterben, in dem *Bmp4* ebenfalls in den *Tbx18*-Expressionsdomänen wie dem Septum transversum, dem proepikardialen Organ und dem Epikard deletiert wird (Kraus et al., 2001). In diesen *Bmp4*-Mutanten kann also die komplette Ureterentwicklung analysiert werden. Sie liefern also erstmals die Möglichkeit, die Auswirkungen des vollständigen *Bmp4*-Verlusts auf die Ureterentwicklung *in vivo* zu analysieren.

Tabelle 6.1.1:

Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen und der tatsächlich mittels PCR bestimmten Anzahl. Insgesamt wurden 200 Embryonen des Stadiums E18,5 in diese Statistik aufgenommen.

Genotyp	<i>Tbx18^{cre/+}</i> <i>Bmp4^{+/+}</i>	<i>Tbx18^{cre/+}</i> <i>Bmp4^{fl/+}</i>	<i>Tbx18^{cre/+}</i> <i>Bmp4^{fl/fl}</i>	<i>Tbx18^{+/+}</i> <i>Bmp4^{+/+}</i>	<i>Tbx18^{+/+}</i> <i>Bmp4^{fl/+}</i>	<i>Tbx18^{+/+}</i> <i>Bmp4^{fl/fl}</i>
Theoretische Anzahl	25	50	25	25	50	25
Tatsächliche Anzahl	14	57	23	28	49	29

6.1.2. Der *Bmp4*-Verlust im Uretermesenchym führte zu bilateralen Hydroureteren

Urogenitalsysteme von *Bmp4*-mutanten Embryonen wurden am Ende der embryonalen Entwicklung (E18,5) isoliert und dokumentiert (Abbildung 6.1.2.1). Die Ureteren in Urogenitalsystemen aus Wildtyp-Embryonen verbanden die Nierenbecken, die sich hier auf medialer Höhe der Niere befanden, mit der Blase; sie waren schlank und an einem kleinen Durchmesser zu erkennen (Abbildung 6.1.2.1A und C). Dahingegen waren Ureteren aller isolierten *Bmp4*-mutanten Individuen auf der kompletten Länge durchscheinend, geweitet und mit Urin gefüllt (Hydroureter) (Abbildung 6.1.2.1B und D). Es gab keine Unterschiede in der Ausprägung der Hydroureteren in Männchen und Weibchen, weswegen diese nicht separat voneinander analysiert wurden.

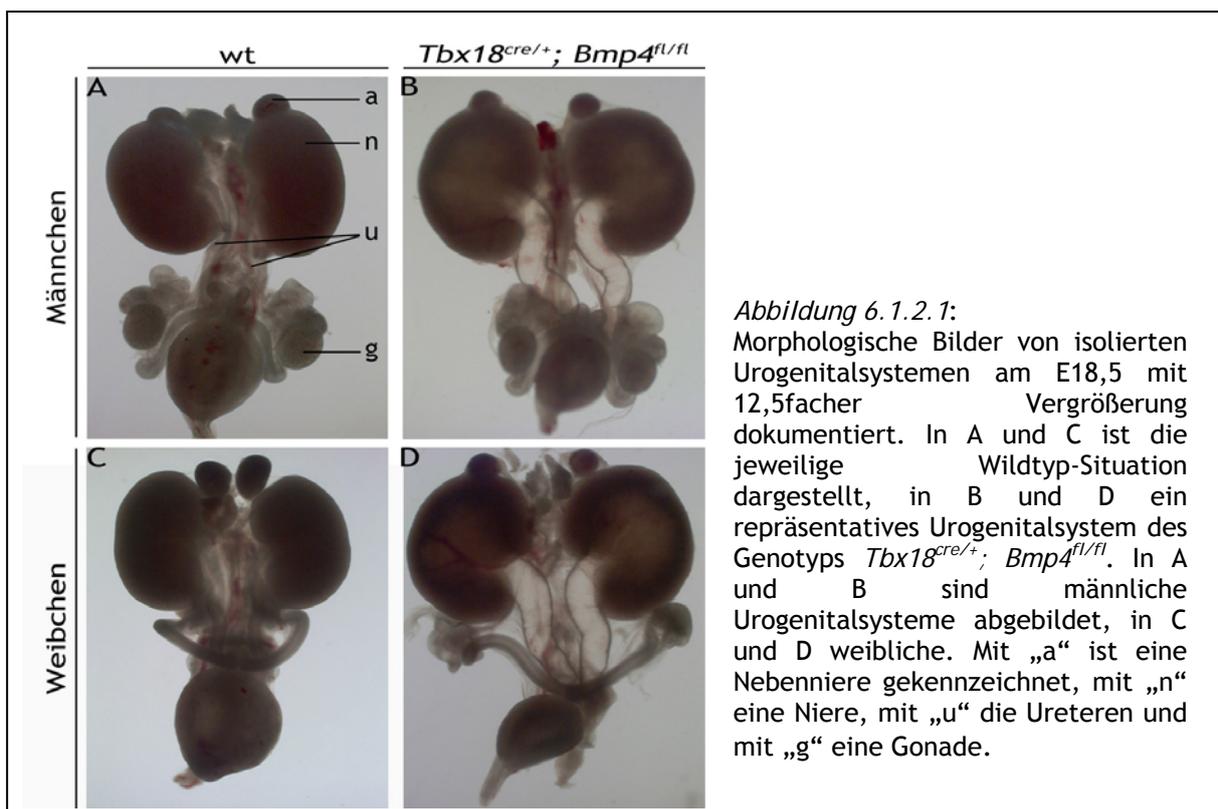


Abbildung 6.1.2.1: Morphologische Bilder von isolierten Urogenitalsystemen am E18,5 mit 12,5facher Vergrößerung dokumentiert. In A und C ist die jeweilige Wildtyp-Situation dargestellt, in B und D ein repräsentatives Urogenitalsystem des Genotyps *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}*. In A und B sind männliche Urogenitalsysteme abgebildet, in C und D weibliche. Mit „a“ ist eine Nebenniere gekennzeichnet, mit „n“ eine Niere, mit „u“ die Ureteren und mit „g“ eine Gonade.

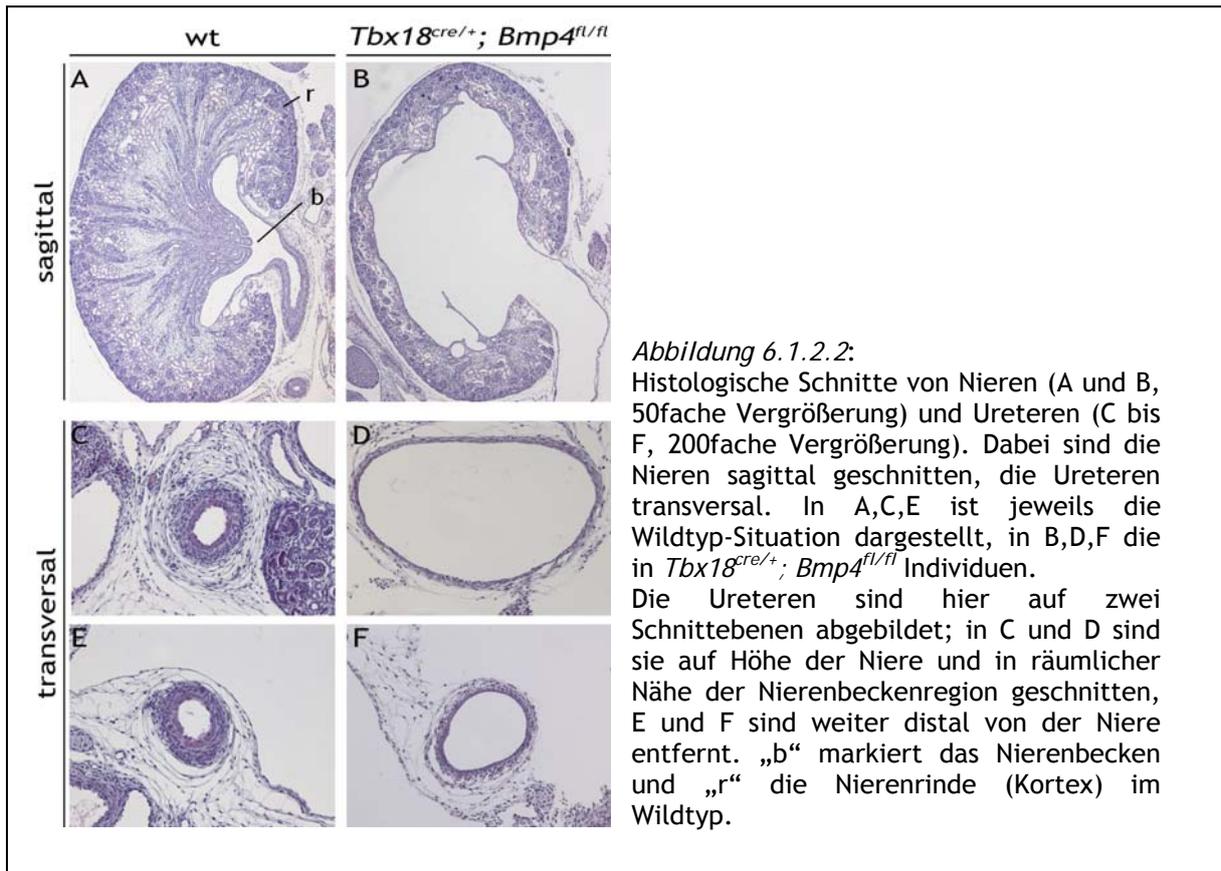


Abbildung 6.1.2.2:

Histologische Schnitte von Nieren (A und B, 50fache Vergrößerung) und Ureteren (C bis F, 200fache Vergrößerung). Dabei sind die Nieren sagittal geschnitten, die Ureteren transversal. In A,C,E ist jeweils die Wildtyp-Situation dargestellt, in B,D,F die in *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}* Individuen.

Die Ureteren sind hier auf zwei Schnittebenen abgebildet; in C und D sind sie auf Höhe der Niere und in räumlicher Nähe der Nierenbeckenregion geschnitten, E und F sind weiter distal von der Niere entfernt. „b“ markiert das Nierenbecken und „r“ die Nierenrinde (Kortex) im Wildtyp.

Für eine genauere Beschreibung und Beurteilung des Phänotyps wurden histologische Schnitte von Urogenitalsystemen dieses Entwicklungsstadiums (E18,5) in zwei Orientierungen angefertigt

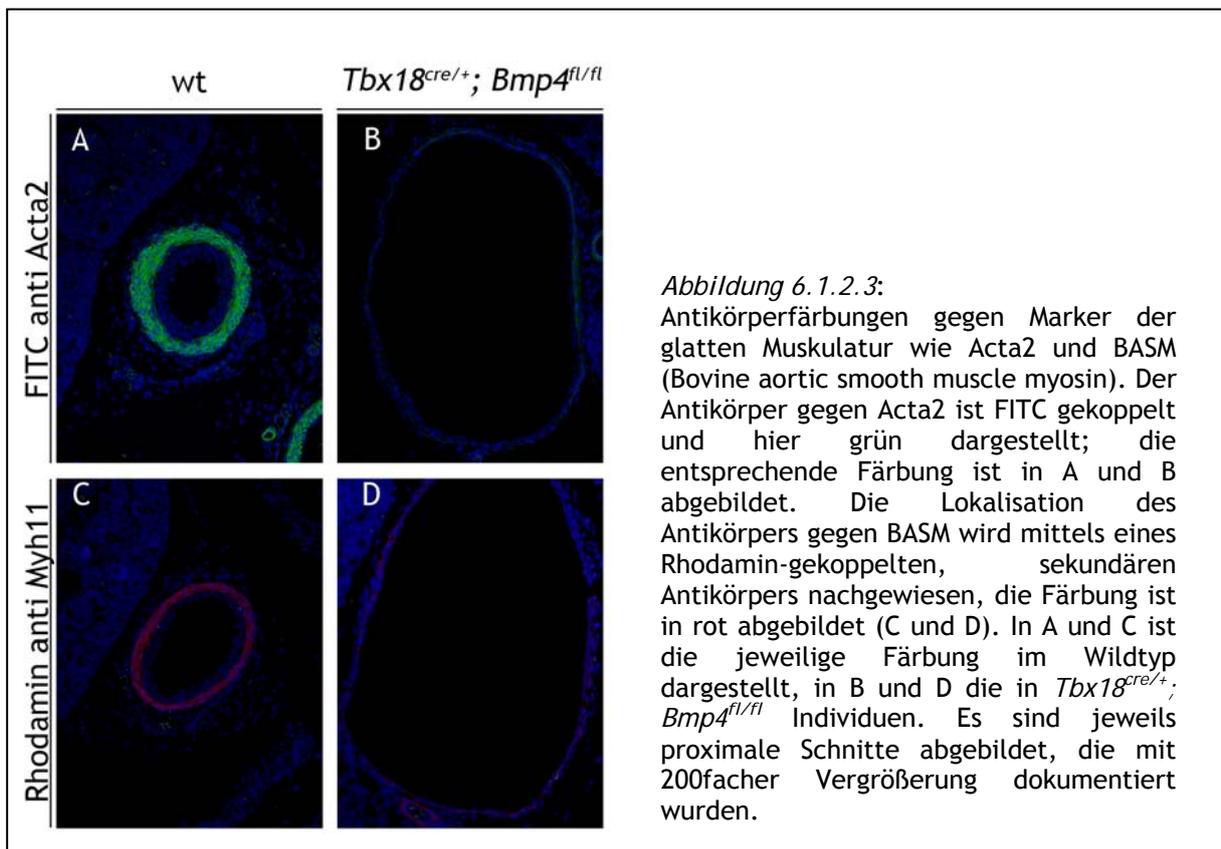


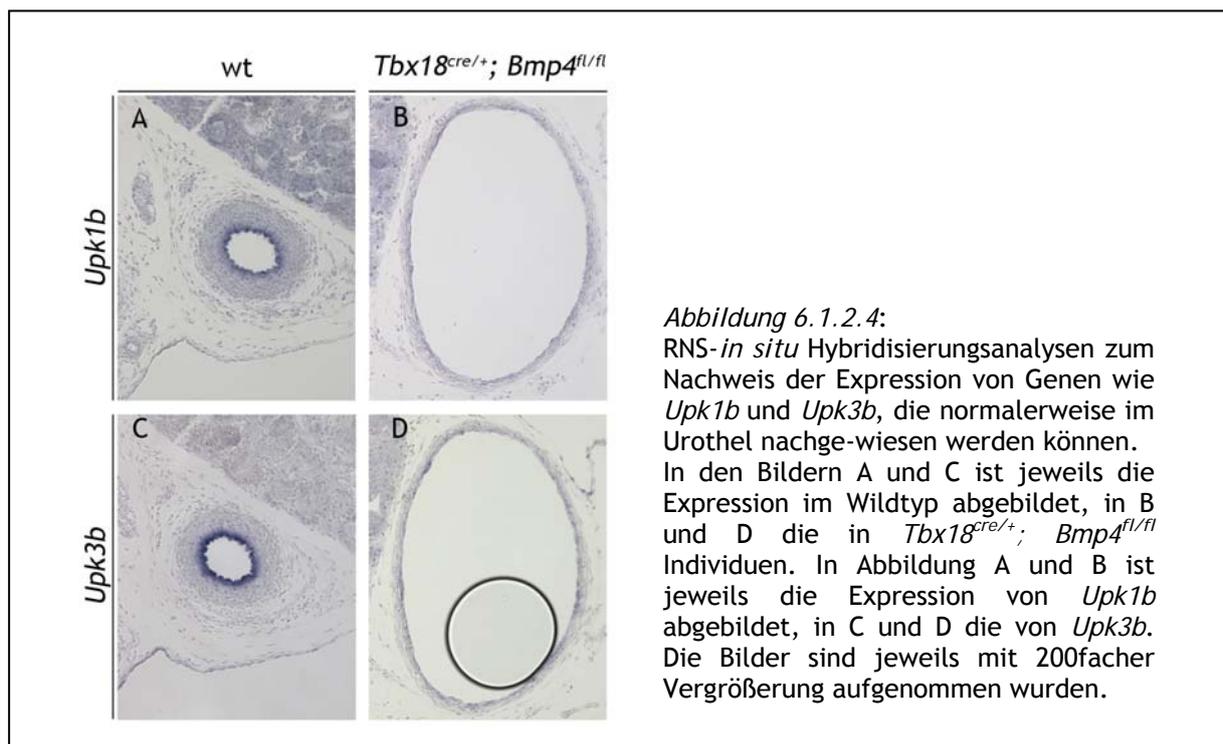
Abbildung 6.1.2.3:

Antikörperfärbungen gegen Marker der glatten Muskulatur wie Acta2 und BASM (Bovine aortic smooth muscle myosin). Der Antikörper gegen Acta2 ist FITC gekoppelt und hier grün dargestellt; die entsprechende Färbung ist in A und B abgebildet. Die Lokalisation des Antikörpers gegen BASM wird mittels eines Rhodamin-gekoppelten, sekundären Antikörpers nachgewiesen, die Färbung ist in rot abgebildet (C und D). In A und C ist die jeweilige Färbung im Wildtyp dargestellt, in B und D die in *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}* Individuen. Es sind jeweils proximale Schnitte abgebildet, die mit 200facher Vergrößerung dokumentiert wurden.

und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Dabei war deutlich zu erkennen, dass bei *Bmp4*-mutanten Individuen das Nierenbecken als Struktur nicht mehr vorhanden war (Abbildung 6.1.2.2A und B). Die Nierenstrukturen beschränkten sich auf kortikale Komponenten (Abbildung 6.1.2.2A und B). Zusätzlich zu den Hydroureteren, die schon auf den morphologischen Bildern zu erkennen waren, litten *Bmp4*-mutante Individuen an Hydronephrosen (Abbildung 6.1.2.2A und B). Dabei handelt es sich um Nieren, die mit nicht abgeführtem Urin gefüllt sind.

Auf den transversalen Ureterschnitten auf Höhe der Niere (Abbildung 6.1.2.2C und D, proximaler Ureter) und auf Schnitten zur Blase hin (Abbildung 6.1.2.2E und F, distaler Ureter) konnte die für den Hydroureter typische Aufweitung des Ureterlumens nachgewiesen werden. Die Struktur des Epithels in *Bmp4*-mutanten Individuen wich deutlich von der in Wildtyp-Individuen ab und war nur von wenigen Zellen mesenchymalen Ursprungs umgeben.

Um zu testen, ob das Uretermesenchym zur glatten Muskulatur differenziert war, wurden Antikörperfärbungen durchgeführt. Dazu wurden Antikörper gegen Proteine, die vorwiegend in glatten Muskelzellen gebildet werden, wie Acta2 (Abbildung 6.1.2.3A und B) und Myosin der glatten Muskulatur, verwendet. Letzteres wurde hier mittels eines Antikörpers gegen Rinder-Myosin der glatten Muskulatur (BASM, **B**ovine **a**ortic **s**mooth **m**uscle **m**ysin) nachgewiesen (Abbildung 6.1.2.3C und D). In der Wildtyp-Situation ist ein Ring mit Acta2- bzw. Myosin (der glatten Muskulatur)-positiven Zellen um das Epithel zu erkennen (Abbildung 6.1.2.3A und C), in *Bmp4*-mutanten Individuen exprimierten nur noch vereinzelte Zellen Acta2 bzw. Myosin der glatten Muskulatur und der mehrschichtige Ring aus glatten Muskelzellen fehlte (Abbildung



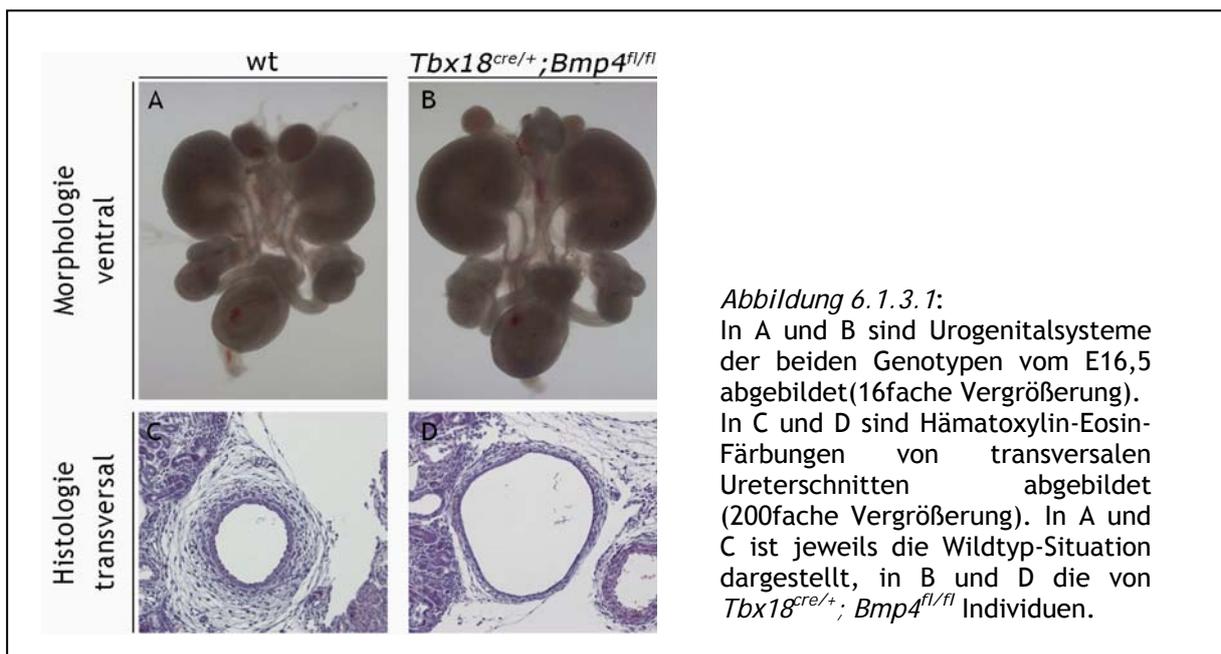
6.1.2.3B und D). Ureteren *Bmp4*-mutanter Individuen wiesen am E18,5 keine durchgehende glatte Muskulatur auf. Dasselbe Ergebnis konnte auch auf RNS-Ebene mittels einer RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse bestätigt werden (Daten nicht abgebildet).

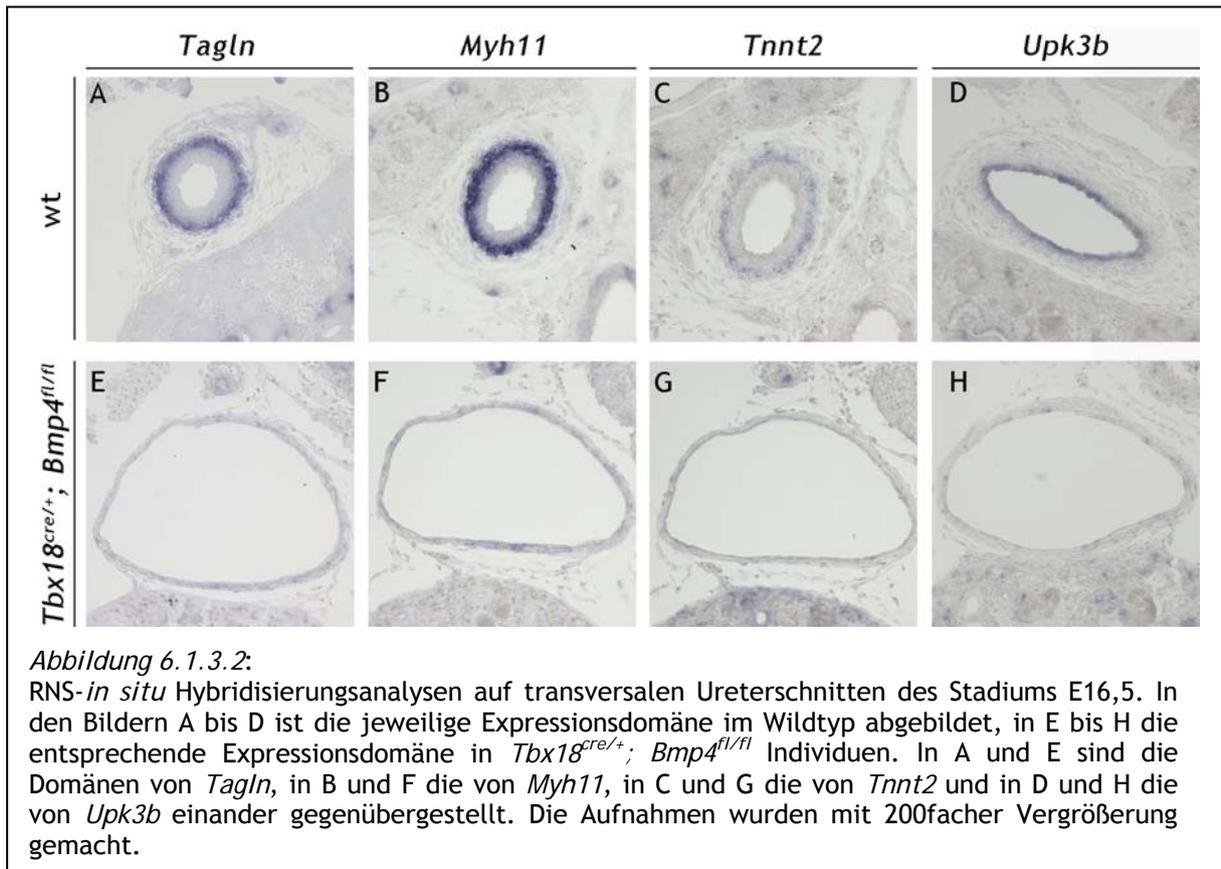
Um zu analysieren, ob in diesen Mutanten die Differenzierung des Epithels zum Urothel stattfand, wurde die Expression von *Upk1b* und *Upk3b*, zwei Uroplakinen mit beschriebener Expressionsdomäne im Urothel, mittels einer RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse überprüft (Abbildung 6.1.2.4; Deng et al., 2002). In Schnitten von Wildtyp-Individuen konnte die Expression von *Upk1b* und *Upk3b* im Urothel am E18,5 nachgewiesen werden, im Epithel der *Bmp4*-mutanten Individuen fand sich dagegen kein Beleg für die Expression dieser Gene und damit für die Differenzierung zum Urothel.

6.1.3. Der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenenchym führte schon am E16,5 zum Auftreten von Hydroureteren

Nachdem festgestellt wurde, dass am E18,5 in *Bmp4*-mutanten Individuen bilateral Hydroureteren ohne glatte Muskulatur und ohne differenziertes Epithel auftraten, wurden *Bmp4*-mutante Individuen am E16,5 analysiert, um zu klären, ob in *Bmp4*-Mutanten Hydroureteren bereits in diesem Entwicklungsstadium auftreten.

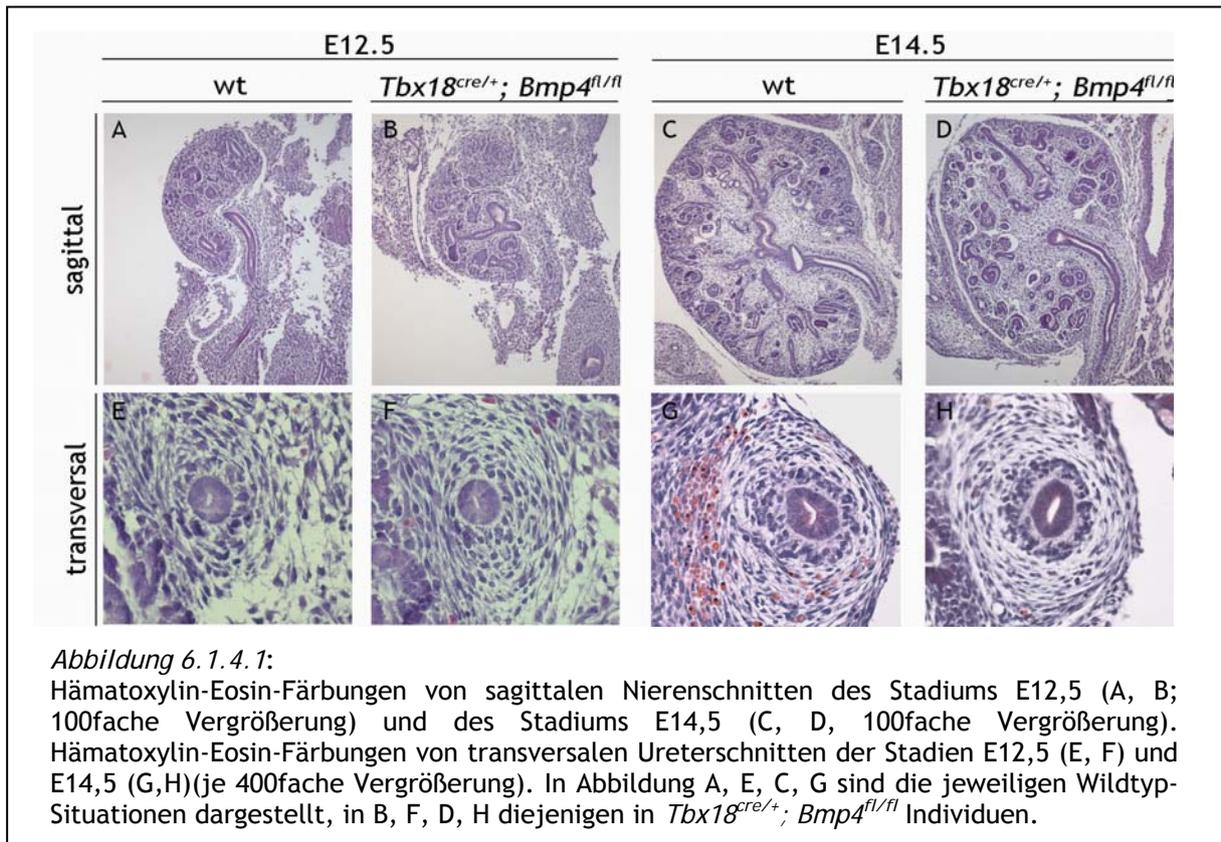
Vergleicht man Urogenitalsysteme vom E16,5 von Wildtyp- und *Bmp4*-mutanten Individuen, so nimmt man auch hier Veränderungen - im Vergleich mit der Wildtyp-Situation - wahr: In den Mutanten konnte man in den meisten Fällen (8 von 12) bilateral einen proximal ausgeprägten Hydroureter erkennen (Abbildung 6.1.3.1A und B), bei den anderen Individuen trat der Hydroureter unilateral auf. Diese Beobachtung wurde durch Schnittpräparate und deren





Färbung ergänzt. Auch in diesem Stadium ließ sich der geweitete Querschnitt eines Hydroureters in *Bmp4*-Mutanten in den Hämatoxylin- Eosin- Färbungen erkennen (*Abbildung 6.1.3.1C* und *D*). Neben einem geweiteten Ureterlumen war die Organisation des Mesenchyms gestört, da die beiden mesenchymalen Zellpopulationen nicht unterschieden werden konnten. Mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen gegen die Transkripte von *Tagln*, *Tnnt2* (**Troponin T2**) und *Myh11* als Marker für glatte Muskulatur und von *Upk3b* als Marker für das Urothel wurde untersucht, ob die Differenzierung des Ureters in diesem Stadium bei *Bmp4*-mutaten Individuen beginnt. An diesem Punkt der Entwicklung war die Differenzierung des Mesenchyms zur glatten Muskulatur und des Epithels zum Urothel im Wildtyp bereits initialisiert (*Abbildung 6.1.3.2A* bis *D*). Weder die Expression von Markergenen für die glatte Muskulatur noch die für das Urothel konnten in *Bmp4*-mutanten Individuen in diesem Stadium nachgewiesen werden (*Abbildung 6.1.3.2 E, F, G, H*).

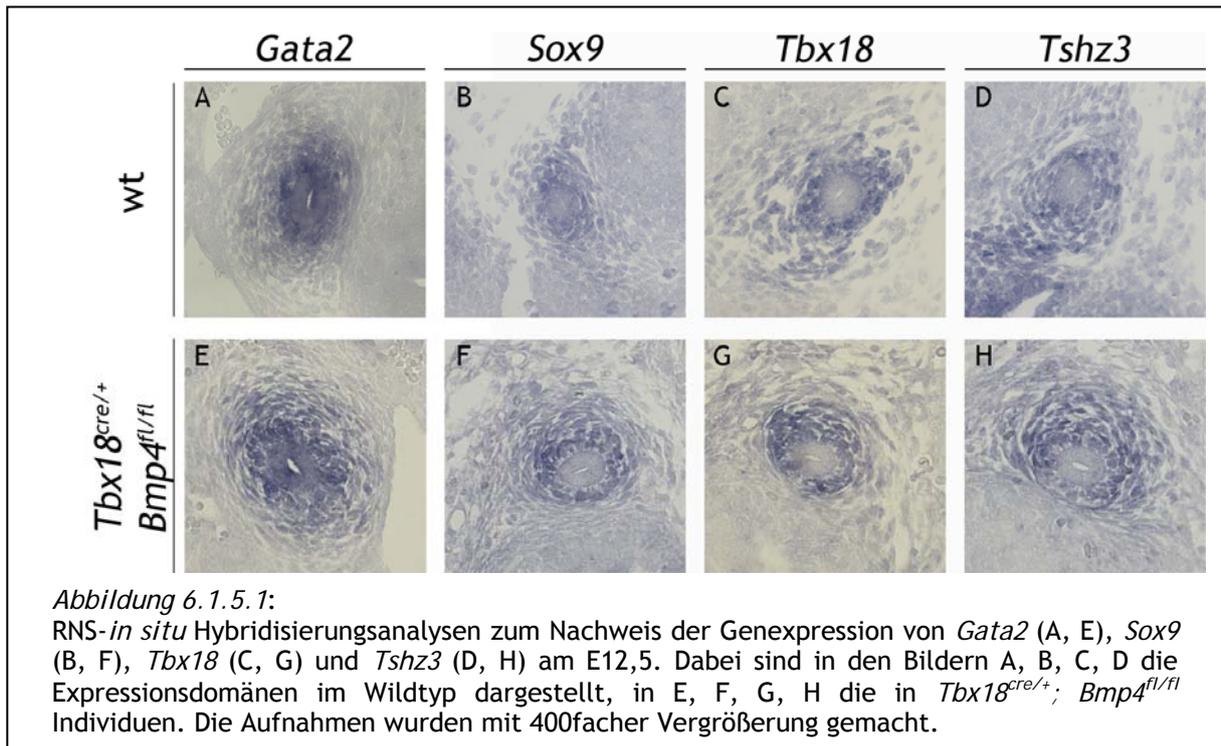
Das Fehlen der Expression von Markern für die differenzierten Gewebe am E16,5 und E18,5 auf der einen Seite und das Auftreten von histologisch erkennbaren Unterschieden zwischen Wildtyp und *Bmp4*-mutanten Individuen auf der anderen Seite deuteten auf Störungen molekularer Regulationsnetzwerke hin, die während der früheren Entwicklung des Ureters stattfinden.



6.1.4. Am E12,5 und E14,5 wiesen *Bmp4*-mutante Individuen keine histologischen Unterschiede zum Wildtyp auf

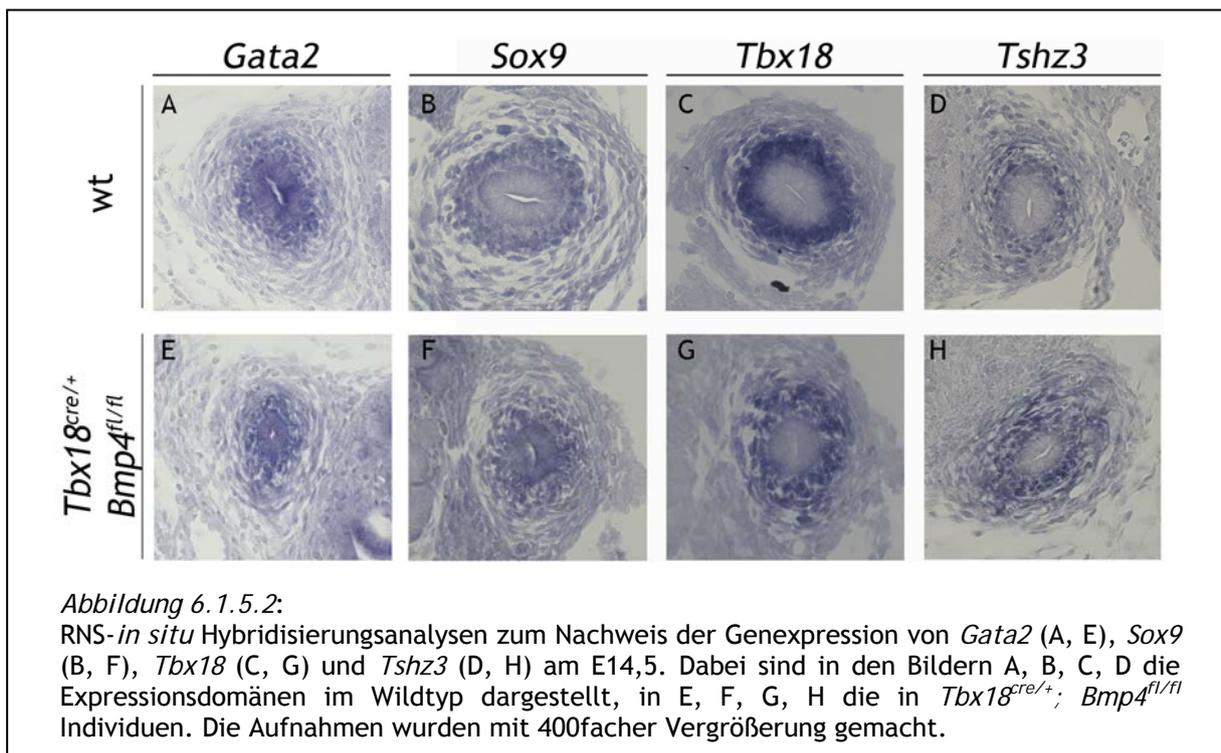
Um zu bestimmen, wann die ersten Unterschiede in der Entwicklung des Ureters zwischen Wildtyp und *Bmp4*-mutanten Individuen auftreten, wurden die Urogenitalsysteme von jüngeren Embryonen analysiert. Dazu wurden von diesen Stadien transversale und sagittale Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt (*Abbildung 6.1.4.1*). In diesen Entwicklungsstadien (E12,5 und E14,5) waren noch keine histologisch auffälligen Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen: Die Nieren wiesen keine offensichtliche Beeinträchtigung in ihrer Entwicklung auf (*Abbildung 6.1.4.1A, B, C, D*).

Auch auf den transversalen Ureterschnitten ließen sich zu diesen Zeitpunkten noch keine histologisch manifestierten Unterschiede zwischen Ureteren aus Wildtyp- und *Bmp4*-mutanten Individuen erkennen (*Abbildung 6.1.4.1E, F, G, H*). Das Mesenchym war um das Epithel kondensiert und beim E14,5 ließen sich auch die beiden mesenchymalen Zellpopulationen, der innere Ring und der äußere Ring, unterscheiden, die im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt auftreten und die sich durch ihre unterschiedliche Orientierung auszeichnen. Am E12,5 und E14,5 ging der *Bmp4*-Verlust *in vivo* mit keinen morphologischen Veränderungen der mesenchymalen oder epithelialen Zellen des Ureters einher.



6.1.5. Bmp4 regulierte weder direkt noch indirekt die Expression von *Gata2*, *Sox9*, *Tbx18* und *Tshz3*

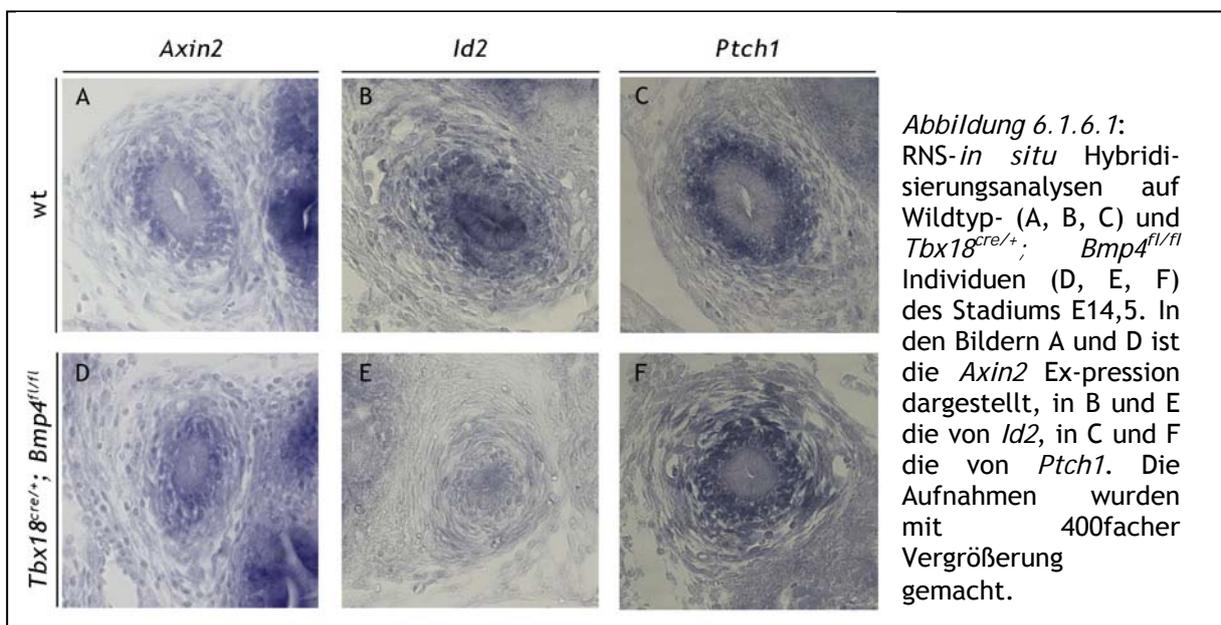
Wie bereits im Abschnitt 4.4.2 beschrieben, wurden in der Literatur einige Transkriptionsfaktoren benannt, deren Verlust mit dem Auftreten von Hydroureteren einhergeht. Um zu testen, ob die Expression von *Sox9*, *Tshz3*, *Tbx18* bzw. *Gata2*, deren Verlust



mit einer drastischen oder einer vollständigen Reduktion der glatten Muskulatur einhergeht, vom *Bmp4*-Signalweg reguliert wird, wurde ihre Expression in den Stadien E12,5 und E14,5 auf transversalen Ureterschnitten *Bmp4*-mutanter Individuen mittels der RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse untersucht (Abbildung 6.1.5.1 und Abbildung 6.1.5.2). Die Expression dieser Gene wurde durch den Verlust von *Bmp4* nicht in ihrer Ausprägung verändert. Die Transkripte von *Gata2* (Abbildung 6.1.5.1A, E und Abbildung 6.1.5.2A, E), *Tshz3* (Abbildung 6.1.5.1D, H und Abbildung 6.1.5.2D, H) und *Tbx18* (Abbildung 6.1.5.1C, G und Abbildung 6.1.5.2C, G) waren in ihrer Ausprägung vergleichbar auf Ureterschnitten von Wildtyp- und *Bmp4*-mutanten Individuen. Dies galt für beide untersuchten Stadien (E12,5 und E14,5). Für *Sox9* war am E12,5 kein Unterschied in der Ausprägung der Expressionsdomäne in den beiden Genotypen zu erkennen (Abbildung 6.1.5.1B, F). Am E14,5 wurde keine ektopische Expression von *Sox9* durch den Verlust von *Bmp4* hervorgerufen (Abbildung 6.1.5.2B, F). Das Auftreten des Hydroureters in *Bmp4*-mutanten Individuen konnte also nicht durch den Verlust der Expression eines dieser Gene erklärt werden.

6.1.6. Der *Bmp4*-Verlust veränderte weder die Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs noch die des kanonischen Hh-Signalwegs

In der Literatur werden das Zusammenspiel und die Wechselwirkungen der *Bmp*-, *Hh*- und *Wnt*- (**W**ingless related-) Signalwege für die Entwicklung des Ureters und der Niere beschrieben (Hu et al., 2003; Yu et al., 2002). Um zu analysieren, ob der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenchym zu einer Einwirkung auf die anderen beiden Signalwege führt, wurde deren Aktivität in diesem Gewebe getestet. Aktive Signalwege modifizieren das Transkriptom der Zelle, an die sie binden. Es werden neben gewebespezifischen Zielgenen auch allgemeinere



Zielgene der Signalwege angeschaltet: Zielgene des Hh-Signalwegs sind *Ptch1* und *Bmp4*, des Wnt-Signalwegs *Axin2* und als Zielgene des Bmp-Signalwegs gelten *Id*- (Inhibitor of DNA binding) und *Msx*- (homeobox, **msh**-like) Gene. Wenn man Transkripte dieser Zielgene in der Mutante nachweisen kann, gilt dies als Nachweis für die Aktivität des Signalwegs. Die Expression von *Ptch1*, *Id2* und *Axin2* wurde auf Ureterschnitten von Wildtypen und *Bmp4*-mutanten Individuen des Stadiums E14,5 mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen getestet. In *Bmp4*-mutanten Individuen wurde die Aktivierung der Zielgene des Wnt-Signalwegs und des Hh-Signalwegs nicht beeinflusst (*Abbildung 6.1.6.1A* und *D, C* und *F*). Die *Id2*-Expression war in *Bmp4*-mutanten Individuen nicht mehr detektierbar. Demnach wird die *Id2*-Expression im Uretermesenenchym durch den Bmp4-Signalweg reguliert.

6.1.7. Der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenenchym ging mit geringerer Proliferation des Epithels am E14,5 einher

Proteine der TGF β -Familie beeinflussen die Proliferation und Apoptose ihrer Umgebung (Miyazaki et al., 2000; Abe, 2006). Um zu überprüfen, ob Bmp4 die Apoptose im Ureter unterdrückt, also anti-apoptotisch wirkt, wurden apoptotische Zellen mittels der TUNEL-Analyse visualisiert. Am E12,5 fand weder in Wildtyp- noch in *Bmp4*-mutanten Individuen in nennenswertem Umfang Apoptose statt (*Abbildung 6.1.7.1A* und *C*). Dasselbe galt für Individuen vom E14,5, auch in diesem Stadium trat in beiden Genotypen keine Apoptose in nennenswertem Umfang auf (*Abbildung 6.1.7.1B* und *D*). Demzufolge wirkte Bmp4 im Uretermesenenchym am E12,5 und am E14,5 nicht anti-apoptotisch.

Inwieweit die Proliferation des sich entwickelnden Ureters durch den Verlust von *Bmp4* im Uretermesenenchym beeinflusst wurde, wurde mittels BrdU-Inkorporationsanalysen und den

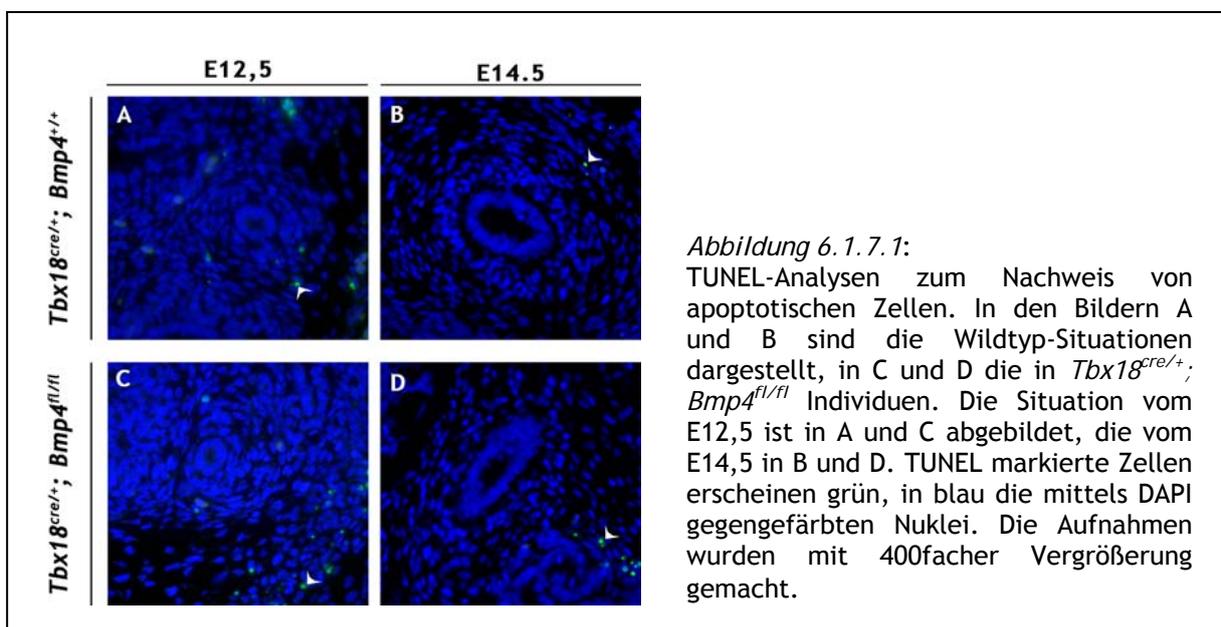
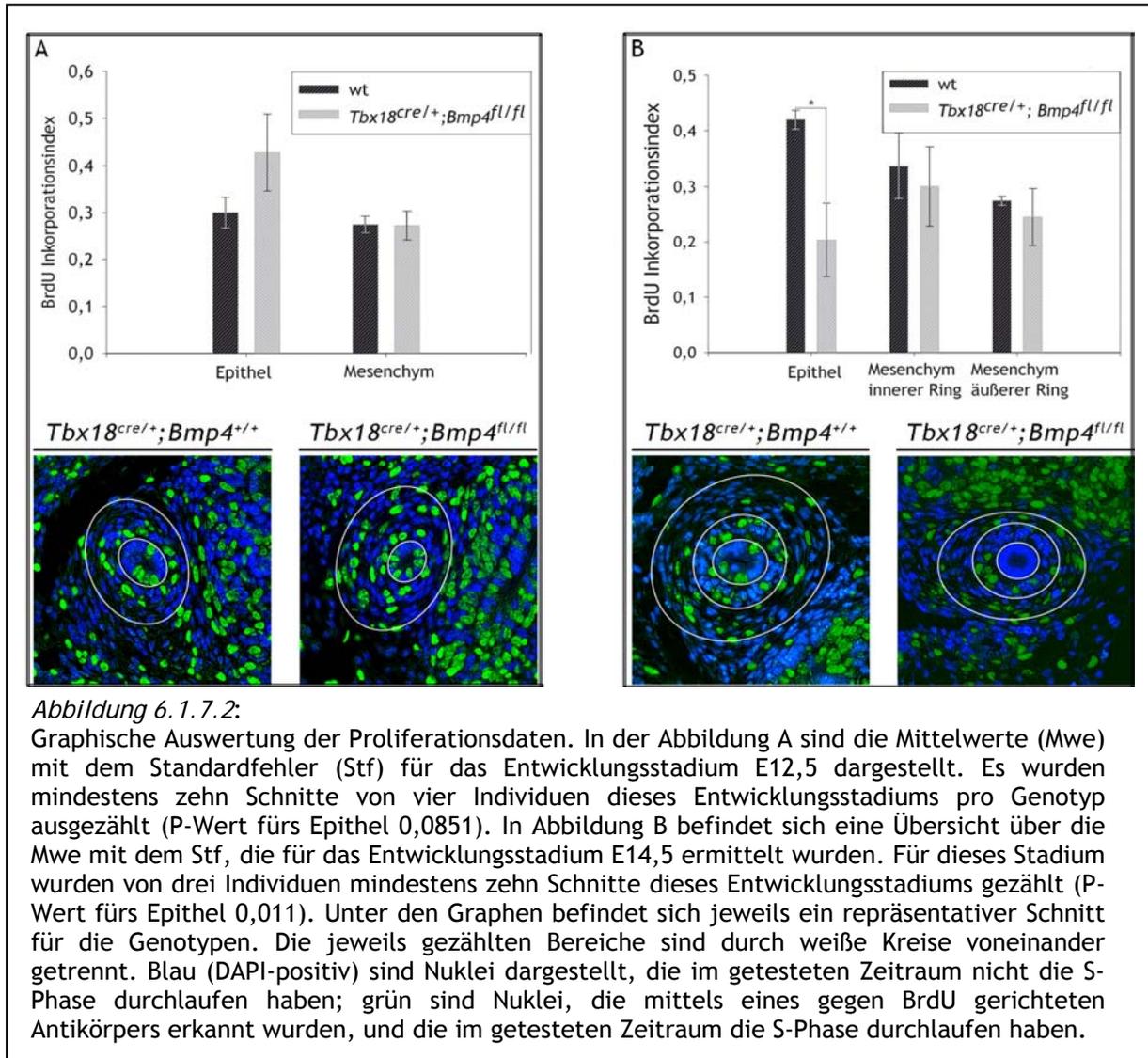


Abbildung 6.1.7.1: TUNEL-Analysen zum Nachweis von apoptotischen Zellen. In den Bildern A und B sind die Wildtyp-Situationen dargestellt, in C und D die in *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}* Individuen. Die Situation vom E12,5 ist in A und C abgebildet, die vom E14,5 in B und D. TUNEL markierte Zellen erscheinen grün, in blau die mittels DAPI gegengefärbten Nuklei. Die Aufnahmen wurden mit 400facher Vergrößerung gemacht.

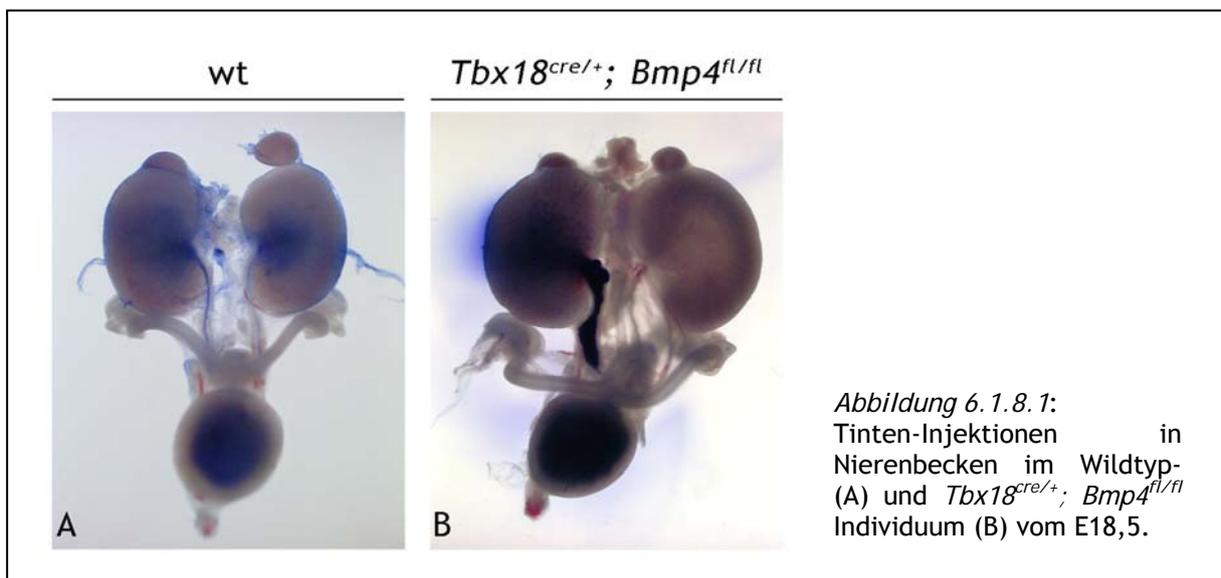


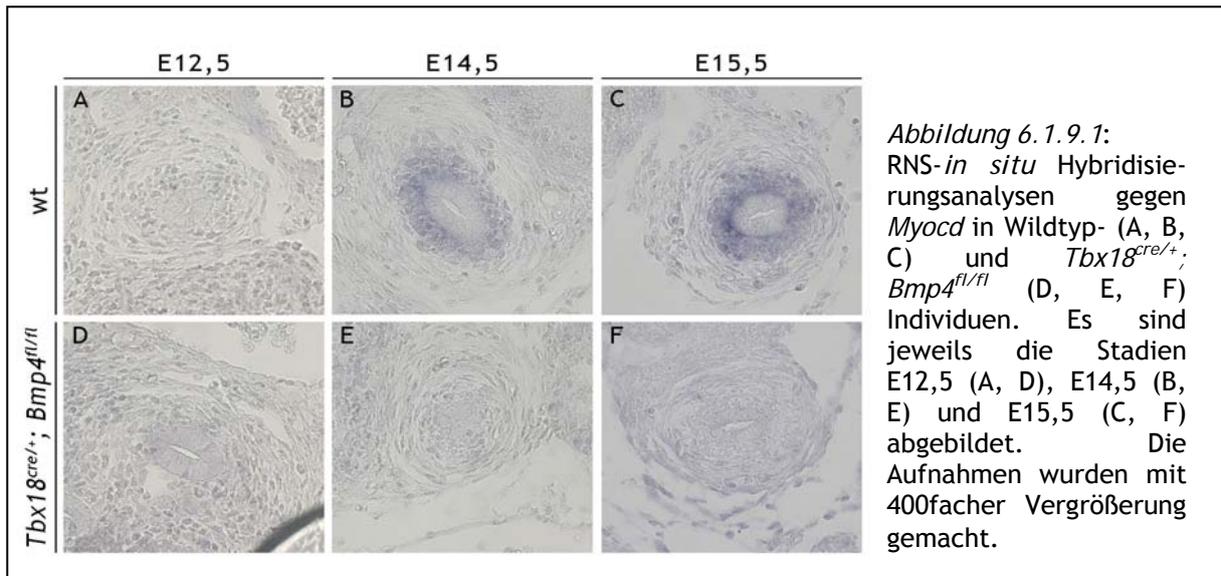
daraus ermittelten BrdU-Inkorporationsindizes, den Verhältnissen von BrdU-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl des Gewebes, untersucht. In *Abbildung 6.1.7.2* wurden die Ergebnisse der BrdU-Inkorporationsanalysen zusammengefasst. Am E12,5 wurde die Proliferation des Mesenchyms durch den Verlust von *Bmp4* nicht beeinflusst ($Mw_{wt} \pm Stf = 0,282 \pm 0,036$; $Mw_{Mt} \pm Stf = 0,286 \pm 0,032$). Auch die BrdU-Inkorporationsindizes der epithelialen Gewebe von Wildtyp- und *Bmp4*-mutanten Individuen am E12,5 unterschieden sich nicht eindeutig ($Mw_{wt} \pm Stf = 0,312 \pm 0,067$; $Mw_{Mt} \pm Stf = 0,429 \pm 0,12$, P-Wert=0.0851; N=4) (*Abbildung 6.1.7.2A*). Am E14,5 wirkte sich der *Bmp4*-Verlust ebenfalls nicht auf die Proliferation des Mesenchyms aus, die BrdU-Inkorporationsindizes des Mesenchyms unterschieden sich nicht ($Mw_{wt,innen} \pm Stf = 0,337 \pm 0,058$; $Mw_{wt,außen} \pm Stf = 0,275 \pm 0,008$; $Mw_{Mt,innen} \pm Stf = 0,301 \pm 0,072$; $Mw_{Mt,außen} \pm Stf = 0,245 \pm 0,052$). Hingegen war die Proliferation des Epithels beim E14,5 in *Bmp4*-mutanten Individuen signifikant reduziert ($Mw_{wt} \pm Stf = 0,42 \pm 0,017$; $Mw_{Mt} \pm Stf = 0,204 \pm 0,067$; P-Wert=0.011; N=3) (*Abbildung 6.1.7.2B*).

Das im Mesenchym exprimierte *Bmp4* wirkte weder anti-apoptotisch auf die Uretergewebe, noch wurden die Proliferationseigenschaften des Mesenchyms durch den Verlust von *Bmp4* messbar beeinflusst. Allerdings beeinflusste *Bmp4* die Proliferation des Epithels am E14,5 deutlich, der BrdU-Inkorporationsindex des Epithels war in *Bmp4*-mutanten Individuen - verglichen mit dem von Wildtyp-Individuen - um etwa 50 % reduziert.

6.1.8. In *Bmp4*-mutanten Individuen mündete der Ureter in die Blase

Da bereits in der Literatur beschrieben wurde, dass Variationen der *Bmp4*-Expression und -Aktivität kritisch für die Etablierung der Ureterknospen-Position entlang des Wolffschen Gangs und damit auch kritisch für die Position der Uretereinmündung in die Blase sind, sollte nun getestet werden, ob in *Bmp4*-mutanten Individuen der Ureter am E18,5 in die Blase mündet oder ob dieser Übergang in diesen Individuen durch eine physikalische Obstruktion, z.B. eine Ureterstenose, blockiert wird. Um dies zu überprüfen, wurde Tinte in das Nierenbecken injiziert. In beiden Genotypen floss die injizierte Tinte in die Blase (*Abbildung 6.1.8.1*). Der Ureter war in *Bmp4*-mutanten Individuen also mit der Blase verbunden, er wurde durch keine physikalische Obstruktion verschlossen. Inwieweit der Übergang von Ureter und Blase bei *Bmp4*-Mutanten dem von Wildtypen entspricht, ließ sich aus diesem Versuch nicht ableiten.





6.1.9. In *Bmp4*-mutanten Individuen ließ sich keine *Myocd*-Expression nachweisen

Wie in Abschnitt 6.1.2 und Abschnitt 6.1.3 bereits beschrieben wurde, findet in *Bmp4*-mutanten Individuen keine Differenzierung zur glatten Muskulatur statt. Ein Co-Faktor, der im Zusammenspiel mit *Srf* die Expression von Genen der glatten Muskulatur steuert, ist *Myocd*. Als ein Gen, das zu Beginn der Differenzierung zur glatten Muskulatur im Mesenchym exprimiert wird, dient die *Myocd*-Expression als guter Anhaltspunkt, um zu testen, ob das genetische Programm für die Muskeldifferenzierung initiiert wird. Deshalb wurde die Dynamik der *Myocd*-Expression während der Ureterentwicklung mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen im Wildtyp ermittelt und mit der in *Bmp4*-mutanten Individuen verglichen. Die *Myocd*-Expression war im Mesenchym des Wildtyps um das Ureterepithel ab E14,5 nachweisbar (Abbildung 6.1.9.1A, B, C). Im Mesenchym von *Bmp4*-mutanten Individuen war das *Myocd*-Transkript in keinem der getesteten Entwicklungsstadien nachweisbar (Abbildung 6.1.9.1D, E, F). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass in den Mutanten die Muskeldifferenzierung im Mesenchym des Ureters nicht initiiert wurde. Am E14,5 waren noch keine morphologischen, schon aber molekulare Unterschiede zwischen den Ureteren von Wildtyp- und *Bmp4*-mutanten Individuen nachzuweisen.

6.2. Die Deletion von *Smad4* im Uretermesenchym

Der kanonische Bmp4-Signalweg wird, wie in Abschnitt 4.6 beschrieben, intrazellulär über Smad-Proteine vermittelt. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass Mäuse, bei denen der kanonische Bmp4-Signalweg im Uretermesenchym durch *Smad4*-Deletion unterbrochen wird, einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie *Bmp4*-mutante Mäuse. Im Gegensatz zur Deletion von *Bmp4*, dessen Genprodukt als Signalpeptid auch benachbarte Zellen beeinflusst, wirkt sich der *Smad4*-Verlust nur auf die jeweils betroffene Zelle aus (zellautonom). Für den *Smad4*-Verlust im Epithel konnte bereits gezeigt werden, dass keine Konsequenzen für die Nieren- oder die Ureterentwicklung nachweisbar sind (Oxburgh et al., 2004). Um nun zu klären, ob der Effekt von Bmp4 auf das Uretermesenchym über den kanonischen Bmp4-Signalweg umgesetzt wird, wurden *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/+}* Böcke mit *Smad4^{fl/fl}* Weibchen gekreuzt und die Ureterentwicklung und -differenzierung von *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}* Embryonen wurde analysierte. Individuen des Genotyps *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}* werden nachfolgend als *Smad4*-mutante Individuen bezeichnet.

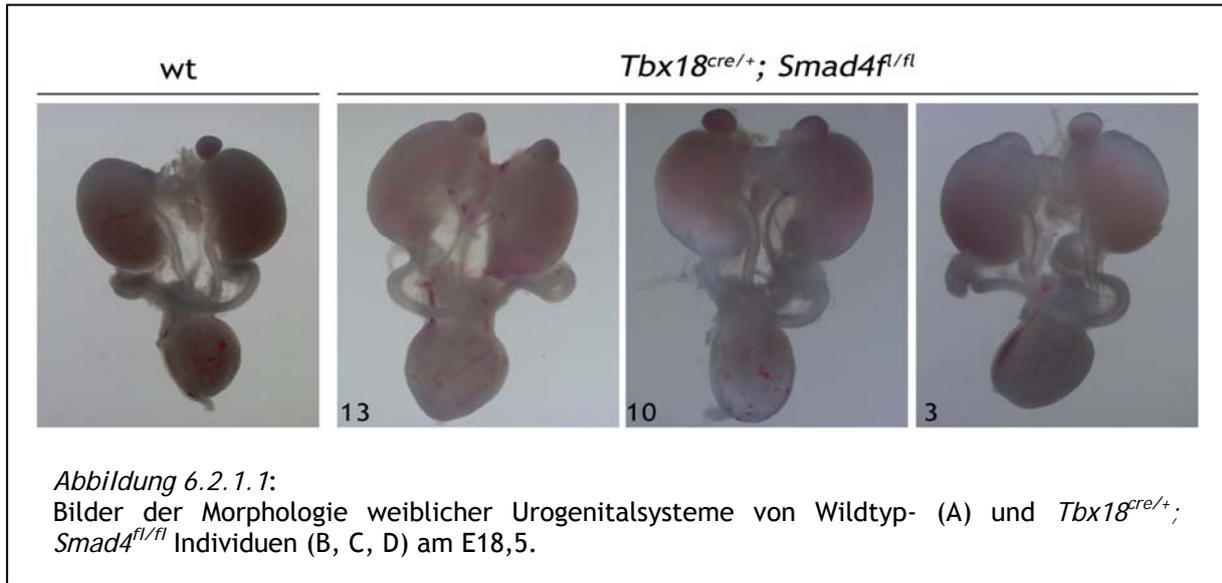
6.2.1. Die Deletion von *Smad4* im Uretermesenchym führte zu uni- oder bilateral auftretenden Hydroureteren

Es wurden 115 Embryonen des Stadiums E18,5 der oben angegebenen Verpaarung isoliert und ihre Genotypen mittels PCR bestimmt. Dabei wurden 26 *Smad4*-mutante Embryonen isoliert, was in etwa den erwarteten 28,75 Embryonen entsprach (Tabelle 6.2.1).

Tabelle 6.2.1:

Gegenüberstellung der nach der Mendelschen Erbverteilung zu erwartenden Anzahl an Embryonen und der tatsächlich mittels PCR bestimmten Anzahl. Insgesamt wurden 115 Embryonen des Stadiums E18,5 in diese Statistik aufgenommen.

<i>Genotyp</i>	<i>Tbx18^{cre/+} Smad4^{fl/+}</i>	<i>Tbx18^{+/+} Smad4^{fl/fl}</i>	<i>Tbx18^{+/+} Smad4^{fl/+}</i>	<i>Tbx18^{cre/+} Smad4^{fl/fl}</i>
Theoretische Anzahl	28,75	28,75	28,75	28,75
Tatsächliche Anzahl	25	32	32	26



Smad4-mutante Embryonen wiesen demnach keine Störung in der Entwicklung des Herzens oder des vaskulären Systems auf, die zu einer frühen embryonalen Letalität geführt hätte. Demnach war es möglich, *Smad4*-mutante Embryonen für die Analyse der Smad4-abhängigen Signaltransduktion im Uretermesenchym zu nutzen.

Die 26 Urogenitalsysteme der *Smad4*-mutanten Individuen wiesen keinen einheitlichen Phänotyp auf. Die Ausprägung und Schwere der Hydroureteren variierte: Es wurden 13 Individuen dieses

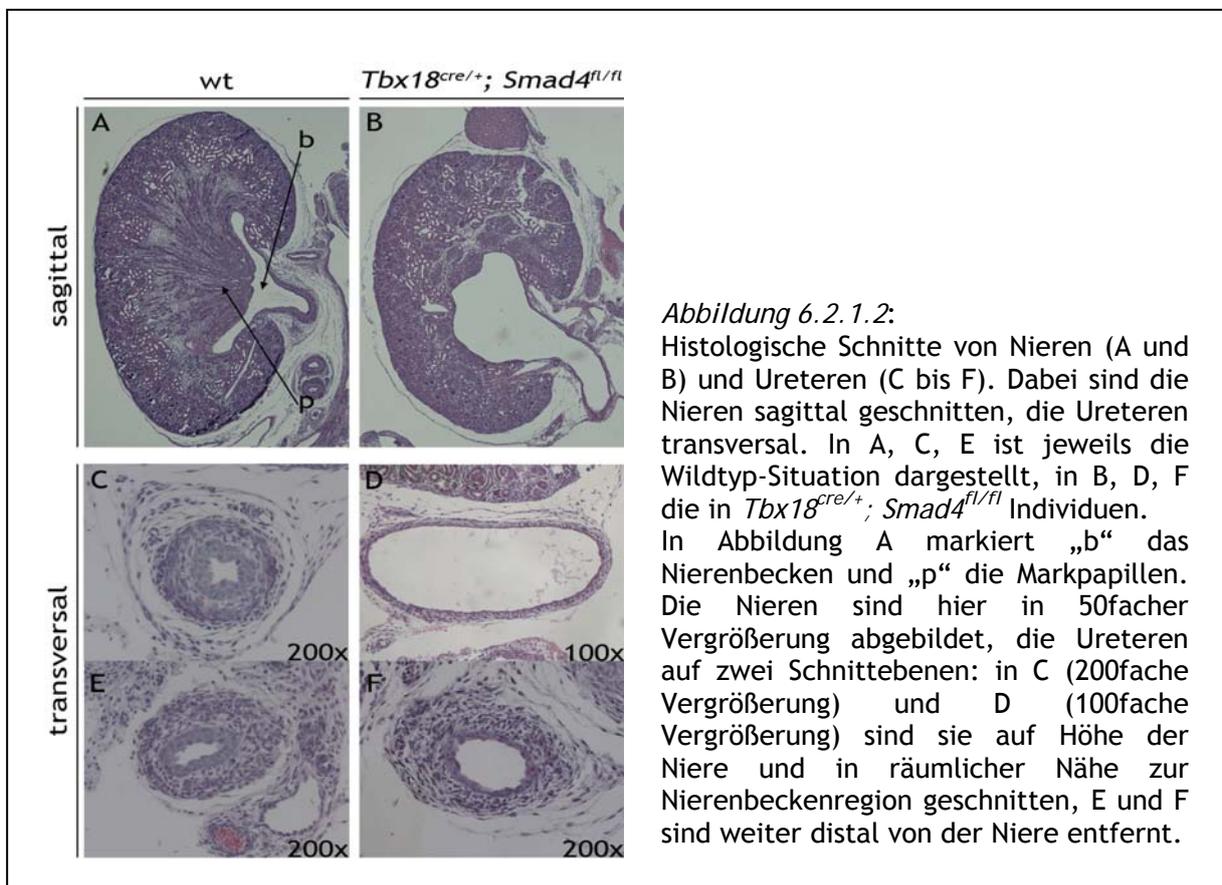


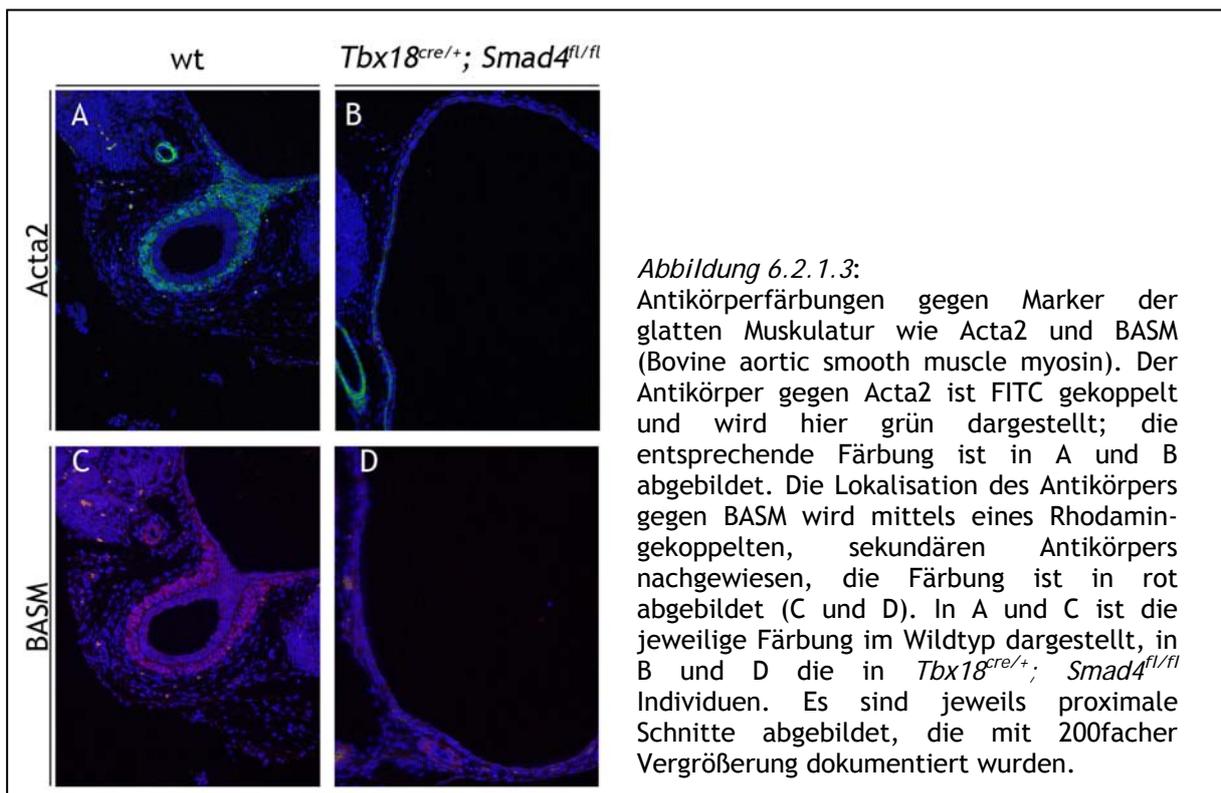
Abbildung 6.2.1.2: Histologische Schnitte von Nieren (A und B) und Ureteren (C bis F). Dabei sind die Nieren sagittal geschnitten, die Ureteren transversal. In A, C, E ist jeweils die Wildtyp-Situation dargestellt, in B, D, F die in *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}* Individuen. In Abbildung A markiert „b“ das Nierenbecken und „p“ die Markpapillen. Die Nieren sind hier in 50facher Vergrößerung abgebildet, die Ureteren auf zwei Schnittebenen: in C (200fache Vergrößerung) und D (100fache Vergrößerung) sind sie auf Höhe der Niere und in räumlicher Nähe zur Nierenbeckenregion geschnitten, E und F sind weiter distal von der Niere entfernt.

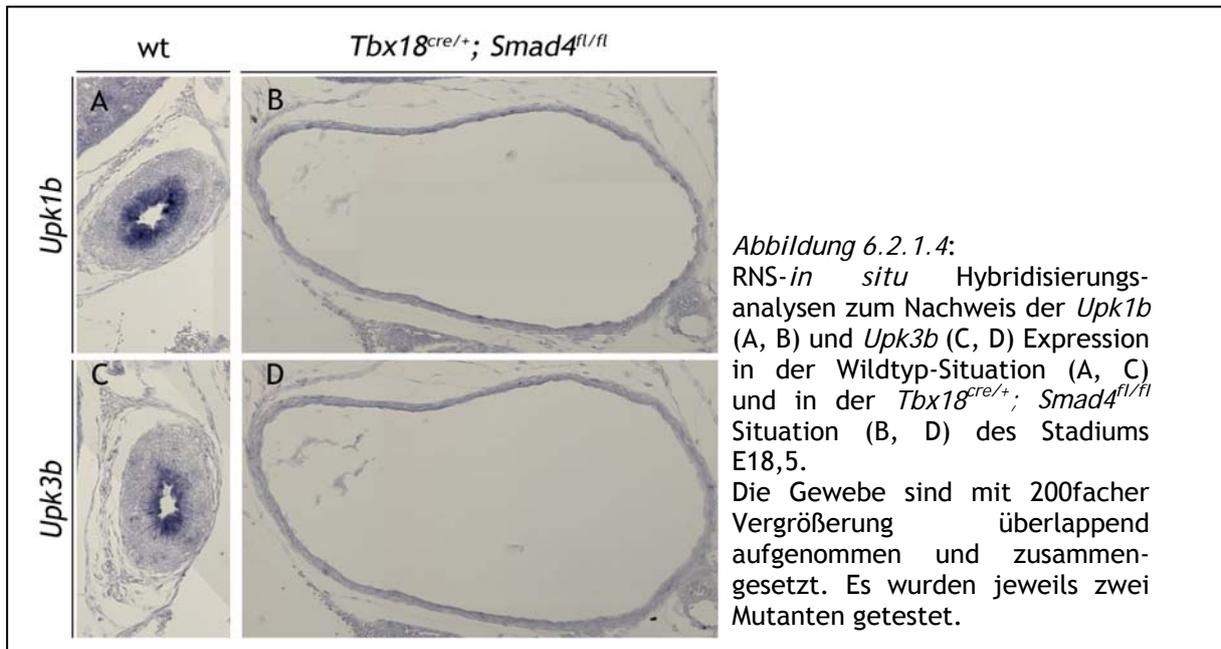
Genotyps mit bilateral auftretenden Hydroureteren gefunden (9 Individuen mit bilateral proximalen Hydroureteren, 4 Individuen mit bilateralen Hydroureteren), zehn mit unilateral proximalen Hydroureter und drei Individuen mit keinem morphologisch erkennbaren Phänotyp (*Abbildung 6.2.1.1*). Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Hydroureters und dem Geschlecht wurde nicht gefunden.

Zur genaueren Beschreibung der Phänotypen wurden sagittale Nierenschnitte und transversale Ureterschnitte der Urogenitalsysteme von *Smad4*-mutanten Individuen vom E18,5 angefertigt und diese mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die Nierenbeckenregion von *Smad4*-Mutanten war missgestaltet und die Markpapillen fehlten, die kortikalen Strukturen der Nieren wurden dem Anschein nach gebildet (*Abbildung 6.2.1.2A, B*).

Auf den transversalen, den Nieren nahen Ureterschnitten von *Smad4*-mutanten Individuen war die Aufweitung des Ureterquerschnitts verglichen mit der Wildtyp-Situation deutlich zu erkennen (*Abbildung 6.2.1.2C, D*). Hingegen war das Lumen der *Smad4*-Mutanten auf distalen Schnitten verglichen mit der Wildtyp-Situation kaum noch vergrößert (*Abbildung 6.2.1.2E und F*).

Um zu untersuchen, ob die mesenchymalen, proximalen Zellen muskelspezifische Gene exprimieren, wurde die Expression von glatten Muskelmarkern mittels einer Immunofluoreszenz-Analyse getestet (*Abbildung 6.2.1.3*). In der Wildtyp-Situation ließ sich ein geschlossener Ring von Acta2- und BASM-positiven Zellen um das epitheliale Gewebe





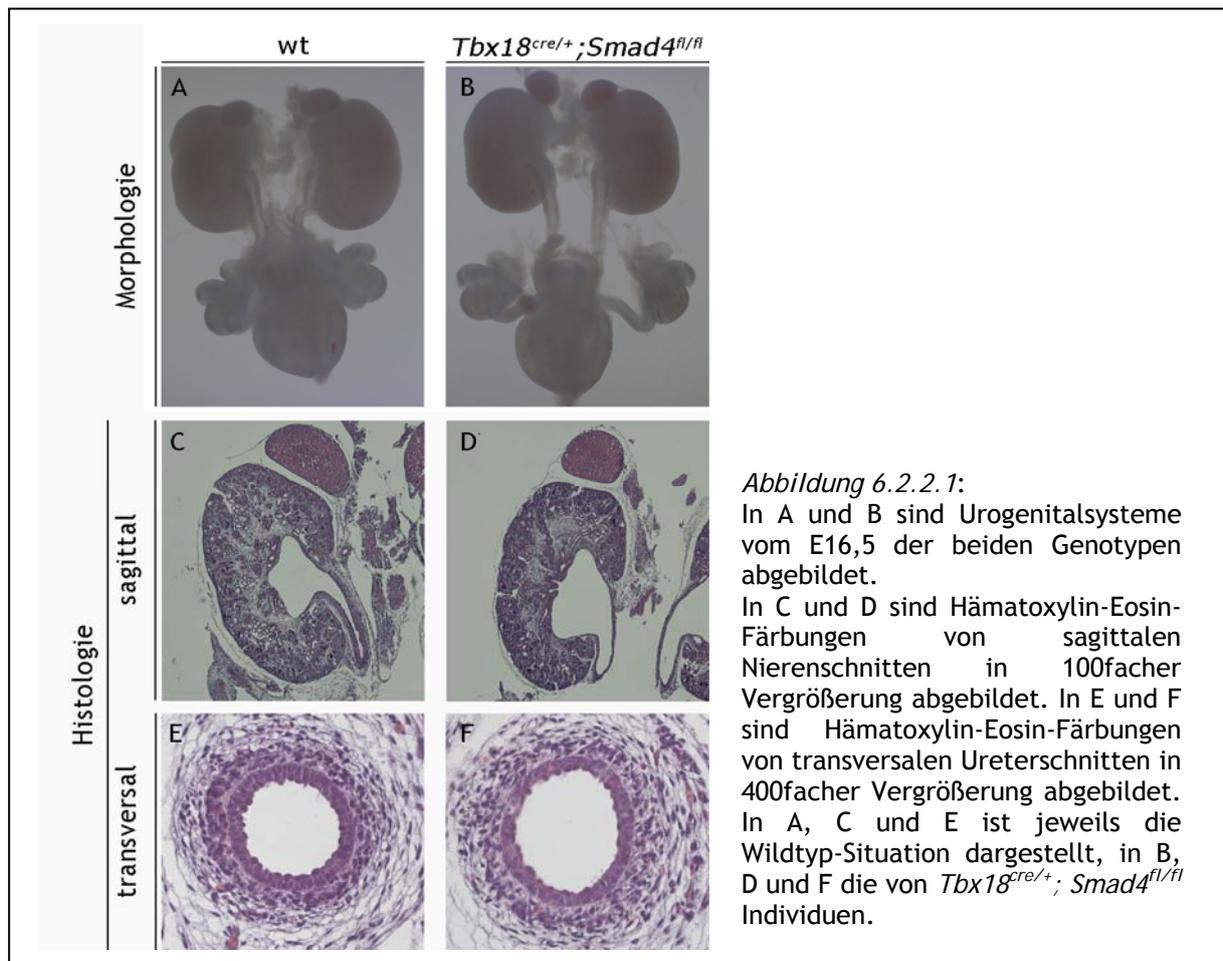
nachweisen (Abbildung 6.2.1.3A und C). In *Smad4*-mutanten Individuen wurden am Ureter nur noch vereinzelt Acta2- bzw. BASM-positive Zellen nachgewiesen, die keinen durchgehenden, für die Funktionalität des Ureters notwendigen, Ring von glatten Muskelzellen um das epitheliale Gewebe bildeten (Abbildung 6.2.1.3B und D).

Um zu klären, ob die Differenzierung des Urothels in *Smad4*-mutanten Individuen gestört war, wurde die Expression der Urothelmarker *Upk1b* und *Upk3b* mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf transversalen Ureterschnitten durchgeführt. Im Wildtyp ließ sich in diesem Stadium eine deutliche Expression von *Upk1b* und *Upk3b* im Urothel nachweisen (Abbildung 6.2.1.4A und C). Dagegen war in *Smad4*-mutanten Individuen weder die Expression von *Upk1b* noch die von *Upk3b* detektierbar (Abbildung 6.2.1.4B und D).

Smad4-mutante Individuen wiesen hauptsächlich proximal manifestierte Hydroureteren auf, bei denen weder Differenzierungsmarker für das Urothel noch Marker für die glatte Muskulatur visualisiert werden konnten.

6.2.2. Der *Smad4*-Verlust im Uretermesenchym führte nicht zu Hydroureteren am E16,5

Smad4-mutante Individuen wiesen eine deutliche Reduktion der Expression von glatten Muskel- und Urothelmarkergenen beim E18,5 auf und besaßen keinen durchgehenden Ring aus glatten Muskelzellen. Um zu untersuchen, in welchem Entwicklungsstadium des Ureters es zu Abweichungen bei *Smad4*-mutanten Individuen kommt, wurden die Urogenitalsysteme von *Smad4*-mutanten Individuen vom E16,5 genauer untersucht.



Es wurden 75 Embryonen dieses Stadiums und der unter 6.2 beschriebenen Verpaarung isoliert und mittels PCR genotypisiert. 15 Embryonen des Genotyps *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}* wurden identifiziert, von denen die meisten (13 von 15) keine morphologischen Veränderungen aufwiesen (*Abbildung 6.2.2.1A* und *B*). In zwei Fällen konnte bilateral ein proximal auftretender Hydroureter erkannt werden.

Zur genaueren Beschreibung wurden sagittale Nierenschnitte und transversale Ureterschnitte mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. In der Hämatoxylin- Eosin- Analyse konnten keine offensichtlichen Unterschiede in *Smad4*-mutanten Embryonen erkannt werden (*Abbildung 6.2.2.1C* und *D*). Auch der Ureter-Durchmesser von *Smad4*-mutanten Individuen wich nicht offensichtlich von dem der Wildtyp-Individuen ab (*Abbildung 6.2.2.1E* und *F*). Das Mesenchym um das Epithel aggregierte in der Mutante weniger stark.

Um festzustellen, ob dieses Mesenchym zur glatten Muskulatur differenzierte, wurde die Expression von glatten Muskelmarkergenen auf transversalen Schnitten vom E16,5 in einer RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse beschrieben. Die Differenzierungsmarkergene der glatten Muskulatur waren im Wildtyp am E16,5 in einer ringförmigen Domäne um das Epithel exprimiert (*Abbildung 6.2.2.2A* und *B*). Diese Expressionsdomäne, wenn auch weniger

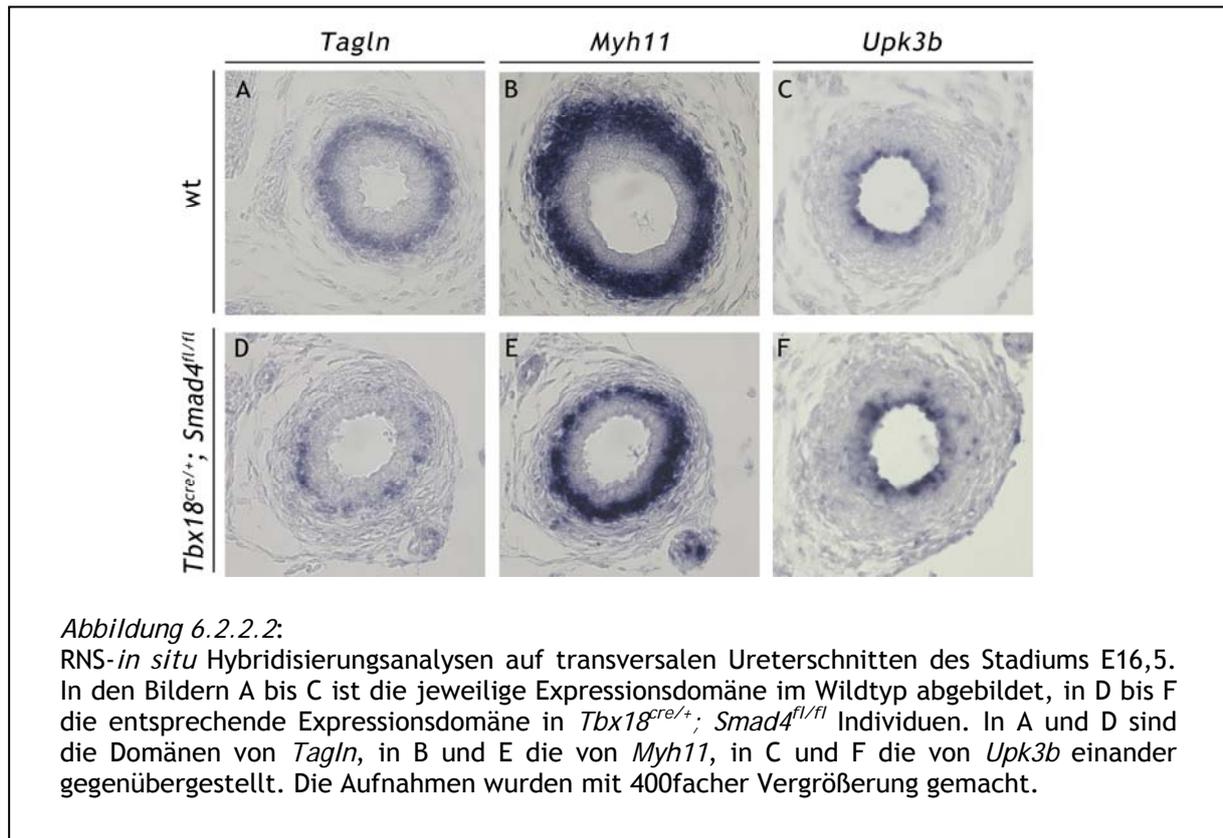


Abbildung 6.2.2.2:

RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf transversalen Ureterschnitten des Stadiums E16,5. In den Bildern A bis C ist die jeweilige Expressionsdomäne im Wildtyp abgebildet, in D bis F die entsprechende Expressionsdomäne in *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}* Individuen. In A und D sind die Domänen von *Tagln*, in B und E die von *Myh11*, in C und F die von *Upk3b* einander gegenübergestellt. Die Aufnahmen wurden mit 400facher Vergrößerung gemacht.

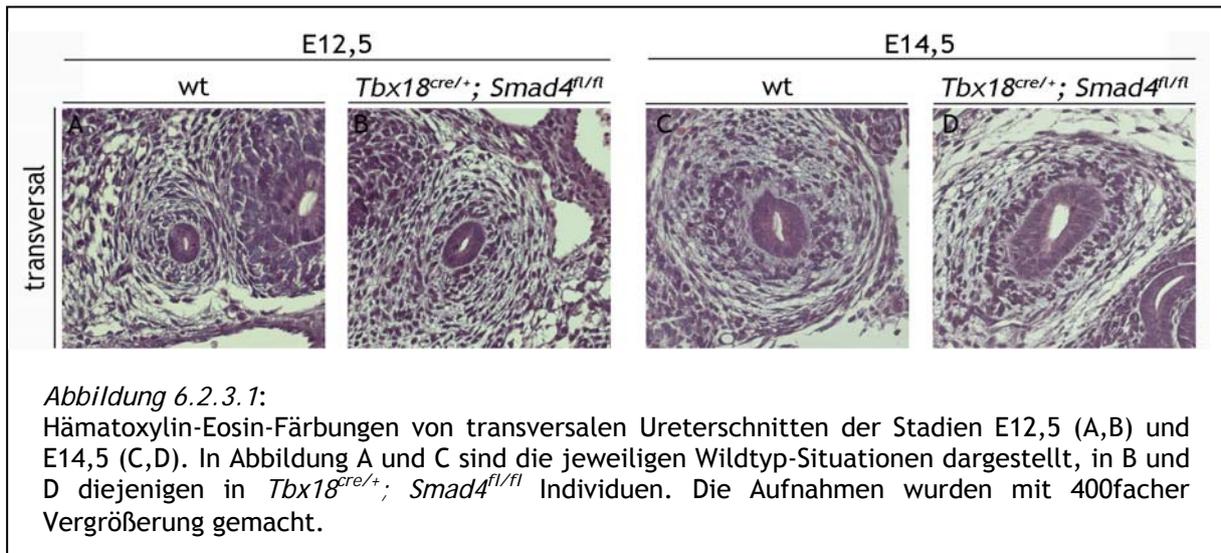
ausgeprägt, war auch in den *Smad4*-mutanten Individuen nachweisbar (Abbildung 6.2.2.2D und E).

Da die Urinproduktion um E16,5 der embryonalen Entwicklung beginnt, ist das Epithel zu diesem Zeitpunkt schon zum Urothel differenziert. Zum Testen der Differenzierung des Epithels in der *Smad4*-mutanten Individuen wurde die Expression von *Upk3b* in einer RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse untersucht. Sowohl in Wildtyp- als auch in *Smad4*-mutanten Individuen ließ sich *Upk3b*-Expression im Epithel nachweisen (Abbildung 6.2.2.2C und F).

Im Gegensatz zur Situation in Urogenitalsystemen von *Smad4*-mutanten Individuen vom E18,5 trat meistens kein Hydroureter auf und es ließen sich die Differenzierungsmarker der glatten Muskulatur und des Urothels in diesem Stadium nachweisen.

6.2.3. Am E12,5 und E14,5 waren keine histologischen Unterschiede in den Ureteren der *Smad4*-mutanten Individuen nachweisbar

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Expression von Genen der glatten Muskulatur trotz des Verlusts von *Smad4* im Uretermesenchym nachweisbar war, jedoch kondensierte das Uretermesenchym in den *Smad4*-Mutanten weniger stark. Um zu analysieren, ob eine weniger starke Kondensation schon zu einem früheren Entwicklungsstadium auftrat, wurden transversale Ureterschnitte der Stadien E12,5 und E14,5 angefertigt und mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Am E14,5 konnten sowohl in Wildtyp- als auch in *Smad4*-

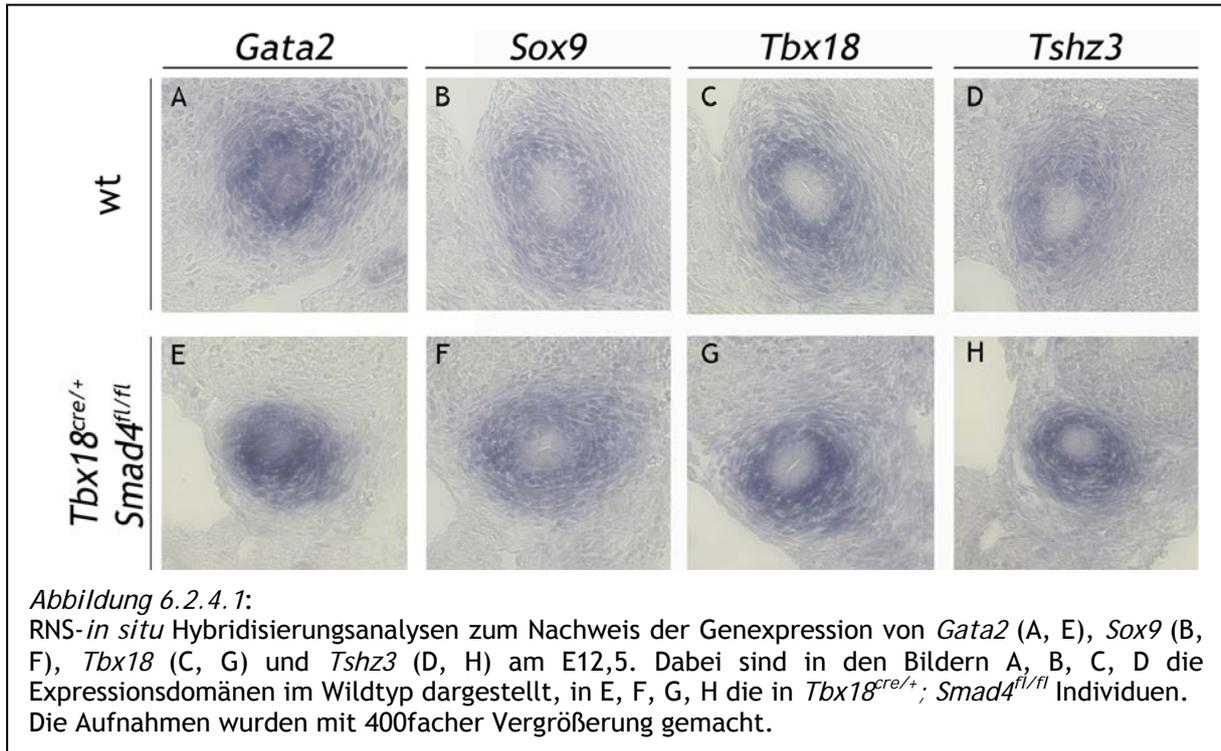


mutanten Individuen zwei mesenchymale Zellpopulationen unterschieden werden (*Abbildung 6.2.3.1C* und *D*). Die unterschiedliche Form des Ureterepithels der abgebildeten *Smad4*-Mutante war auf eine leicht verschobene Schnittebene zurückzuführen.

Am E12,5 waren keine Unterschiede in den Hämatoxylin- Eosin- Färbungen zu erkennen: Das Epithel war vergleichbar groß und von mesenchymalen Zellen umgeben (*Abbildung 6.2.3.1A* und *B*).

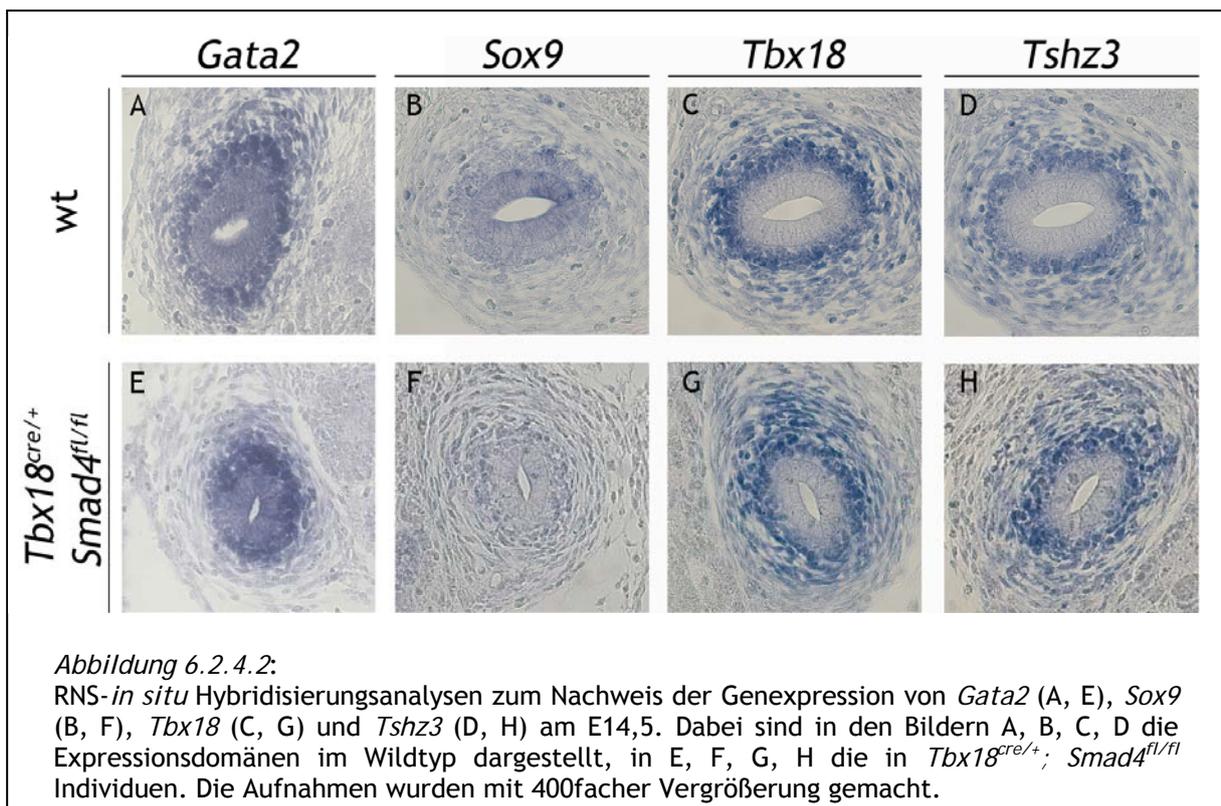
6.2.4. Die Expression von *Gata2*, *Sox9*, *Tbx18* und *Tshz3* wurde nicht *Smad4*-abhängig reguliert

Um auszuschließen, dass nicht schon zu einem früheren Zeitpunkt molekulare Veränderungen der Ureterentwicklung in *Smad4*-mutanten Embryonen auftreten, wurde zunächst die Expression der Transkriptionsfaktoren *Gata2*, *Sox9*, *Tbx18* und *Tshz3*, deren Verlust, wie bereits gezeigt wurde, zu einem Hydroureter führt (s. Abschnitt 4.4.2 und Abschnitt 6.1.5), mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf transversalen Ureterschnitten von *Smad4*-mutanten Embryonen der Stadien E12,5 und E14,5 getestet.



Die Expression dieser Transkriptionsfaktoren am E12,5 wurde durch den Verlust von *Smad4* im Uretermesenenchym nicht negativ beeinflusst, da die Transkripte der vier genannten Gene sich in Wildtyp- und *Smad4*-mutanten Individuen in der gleichen Domäne nachweisen ließen (Abbildung 6.2.4.1A bis H).

Diese Aussage stimmt auch für Individuen vom E14,5, die Expression in *Smad4*-mutanten



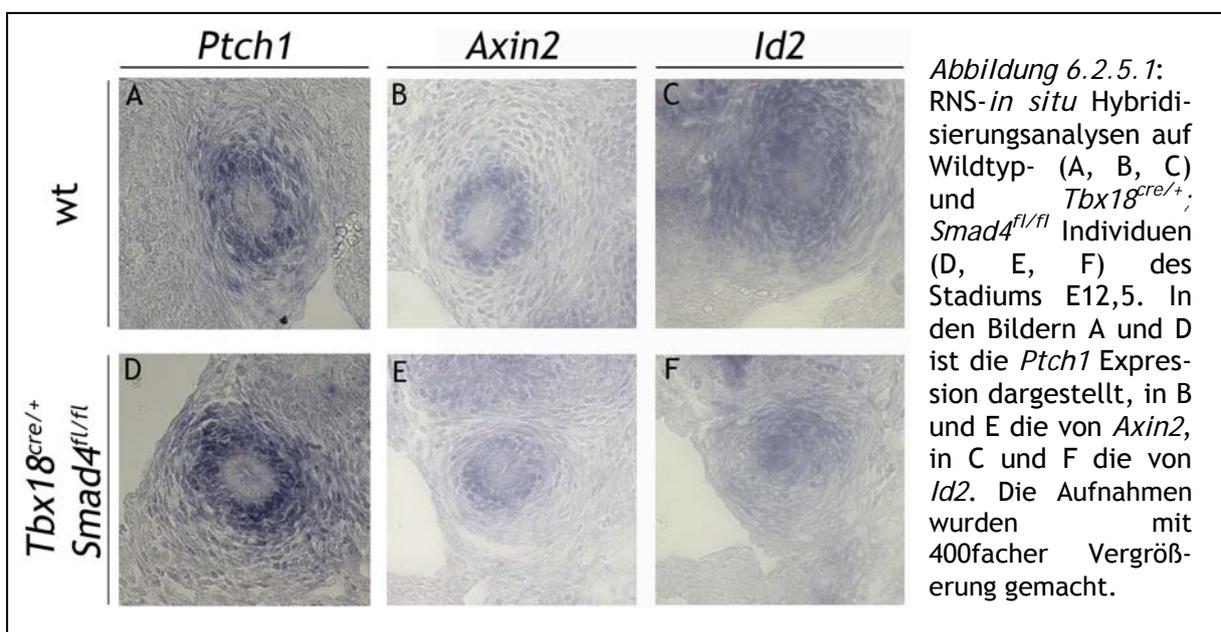
Individuen war nicht von der in Wildtyp-Individuen zu unterscheiden (Abbildung 6.2.4.2A bis H). Die Expression von *Gata2*, *Tbx18* und *Tshz3* wurde durch den Verlust von *Smad4* im Uretermesenchym nicht in erkennbarem Maß negativ beeinflusst (Abbildung 6.2.4.2A und E, C und G, D und H). Die *Sox9*-Expression wurde um E14,5 in Wildtypmäusen herabreguliert (Abbildung 6.2.4.2B), ebenso konnte keine ektope *Sox9*-Expression im Uretermesenchym von *Smad4*-Mutanten beobachtet werden (Abbildung 6.2.4.2F).

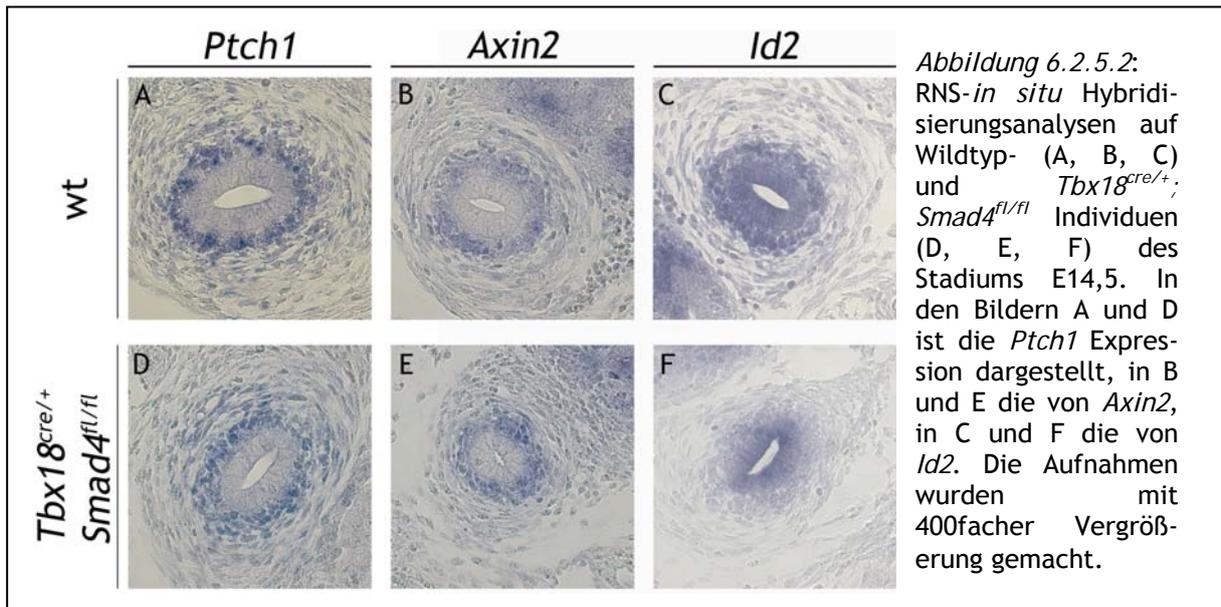
Der Verlust von *Smad4* im Uretermesenchym wirkte sich nicht auf die Expressionsdomänen der Transkriptionsfaktoren *Gata2*, *Tbx18*, *Tshz3* und *Sox9* aus. Diese Aussage traf auf die beiden untersuchten Stadien (E12,5 und E14,5) zu.

6.2.5. Die Deletion von *Smad4* beeinflusste weder die Aktivität des Wnt-Signalwegs noch die des Hh-Signalwegs

Um das Signal, das durch das Binden eines Liganden wie Bmp4 an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche hervorgerufen wird, in eine Beeinflussung des Transkriptom und des Proteoms umzusetzen, bedienen sich Zellen intrazellulärer Signalkaskaden, die je nach Signalweg initiiert werden. Allerdings sind gegenseitige Verflechtungen und Beeinflussungen solcher intrazellulärer Signalkaskaden – sogenannte cross talks – beschrieben.

Um zu analysieren, ob der beobachtete partielle Hydroureter in *Smad4*-mutanten Individuen auf die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs oder auf die des Hh-Signalwegs zurückzuführen ist, wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen die Expression der universellen Zielgene dieser beiden Signalwege getestet. Die Aktivierung des Hh-Signalwegs führt zur Expression von



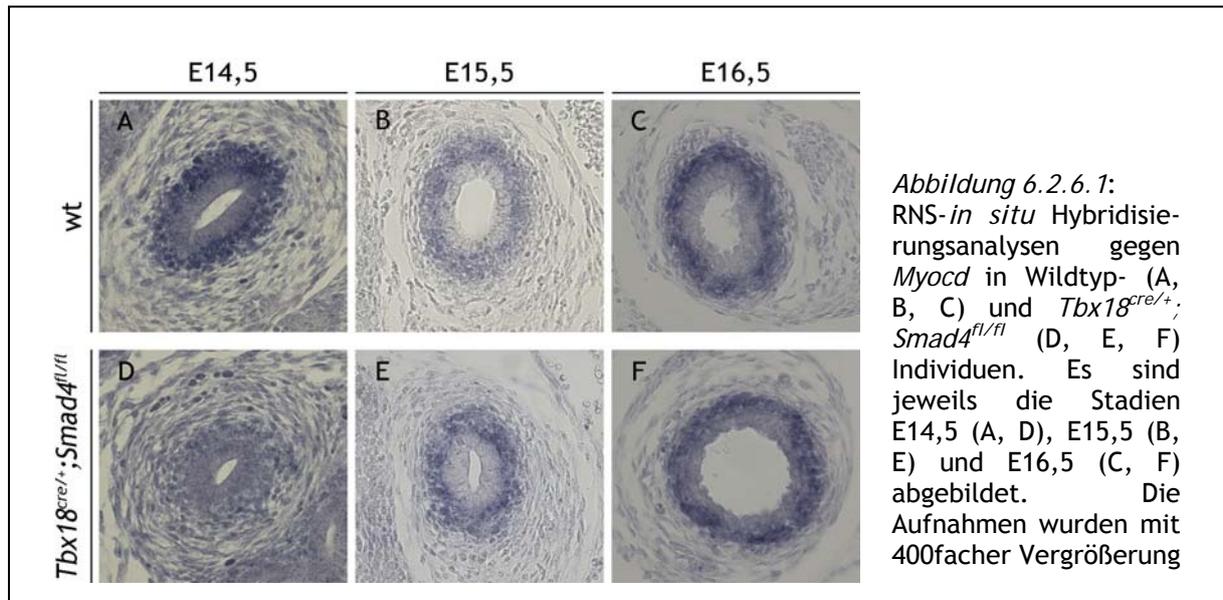


Ptch1, der Wnt-Signalweg aktiviert im Zielgewebe die Expression von *Axin2*, Bmp4 ist notwendig für die *Id2*-Expression im sich entwickelnden Ureter (Abschnitt 6.1.6).

Um festzustellen, ob sich der *Smad4*-Verlust auf die Expression von *Axin2*, *Ptch1* und *Id2* auswirkt, wurden RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf transversalen Ureterschnitten von Wildtyp- und *Smad4*-mutanten Individuen der Entwicklungsstadien E12,5 und E14,5 durchgeführt.

Die Aktivität des Hh-Signalwegs war am E12,5 sowohl in Wildtyp- als auch in *Smad4*-mutanten Individuen nachweisbar (Abbildung 6.2.5.1A und D). Dasselbe galt für den Wnt-Signalweg, sowohl in der Wildtyp- als auch in der Mutanten-Situation war *Axin2*-Expression am E12,5 nachzuweisen (Abbildung 6.2.5.1B und E). Durch die Deletion von *Smad4* im Uretermesenchym wurde der Verlust der *Id2*-Expression, des Zielgens des Bmp4-Signalwegs, im Uretermesenchym hervorgerufen (Abbildung 6.2.5.1C und F).

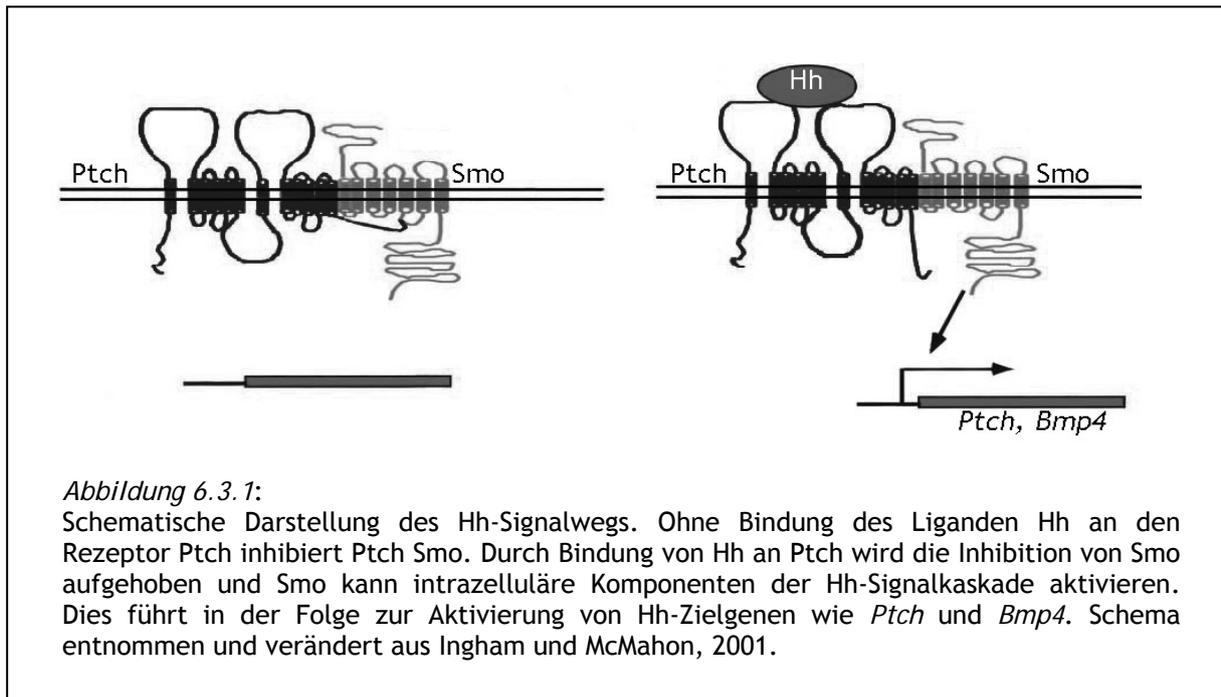
Die Situation stellte sich in Individuen vom E14,5 genauso dar (Abbildung 6.2.5.2). Am E14,5 war weder die Aktivität des Hh-Signalwegs noch die des Wnt-Signalwegs durch den Verlust von *Smad4* in nachweisbarem Rahmen beeinflusst worden (Abbildung 6.2.5.2A und D, B und E). Entsprechend der verwendeten *Tbx18^{cre}*-Mauslinie, die nur zu einer Rekombination des verwendeten *Smad4^{fl}*-Allels im Uretermesenchym führt (Chu et al., 2004; Airik et al., 2010), wurde die Expression von *Id2* im Ureterepithel nicht beeinflusst (Abbildung 6.2.5.2C und F). Durch den mesenchymalen *Smad4*-Verlust im Uretermesenchym, der nur zellautonom wirkte, wurde die *Id2*-Expression nur im Uretermesenchym unterdrückt.



6.2.6. *Smad4*-mutante Individuen wiesen eine verspätete Expression von *Myocd* auf

In Abschnitt 6.1.9 konnte gezeigt werden, dass in *Bmp4*-mutanten Individuen die Initiierung der glatten Muskulatur mit dem Verlust der *Myocd*-Expression einherging. Um zu klären, ob der Verlust der Expression von *Myocd* auch durch den Verlust von *Smad4* im Uretermesenchym hervorgerufen wird, wurden die Expressionsdomänen von *Myocd* in Wildtyp- und *Smad4*-mutanten Individuen am E14,5, E15,5 und E16,5 mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen untersucht (Abbildung 6.2.6.1). Wie bereits in Abschnitt 6.1.9 beschrieben wurde, war die Expression von *Myocd* ab E14,5 im Wildtyp nachweisbar (Abbildung 6.2.6.1A, B, C).

Im Gegensatz dazu wurde *Myocd* in *Smad4*-mutanten Individuen erst ab E15,5 exprimiert (Abbildung 6.2.6.1D, E, F). *Smad4*-mutante Individuen wiesen keinen vollständigen Verlust der *Myocd*-Expression während der Ureterentwicklung auf, sondern die *Myocd*-Expression wurde einen Embryonaltag verspätet initialisiert.



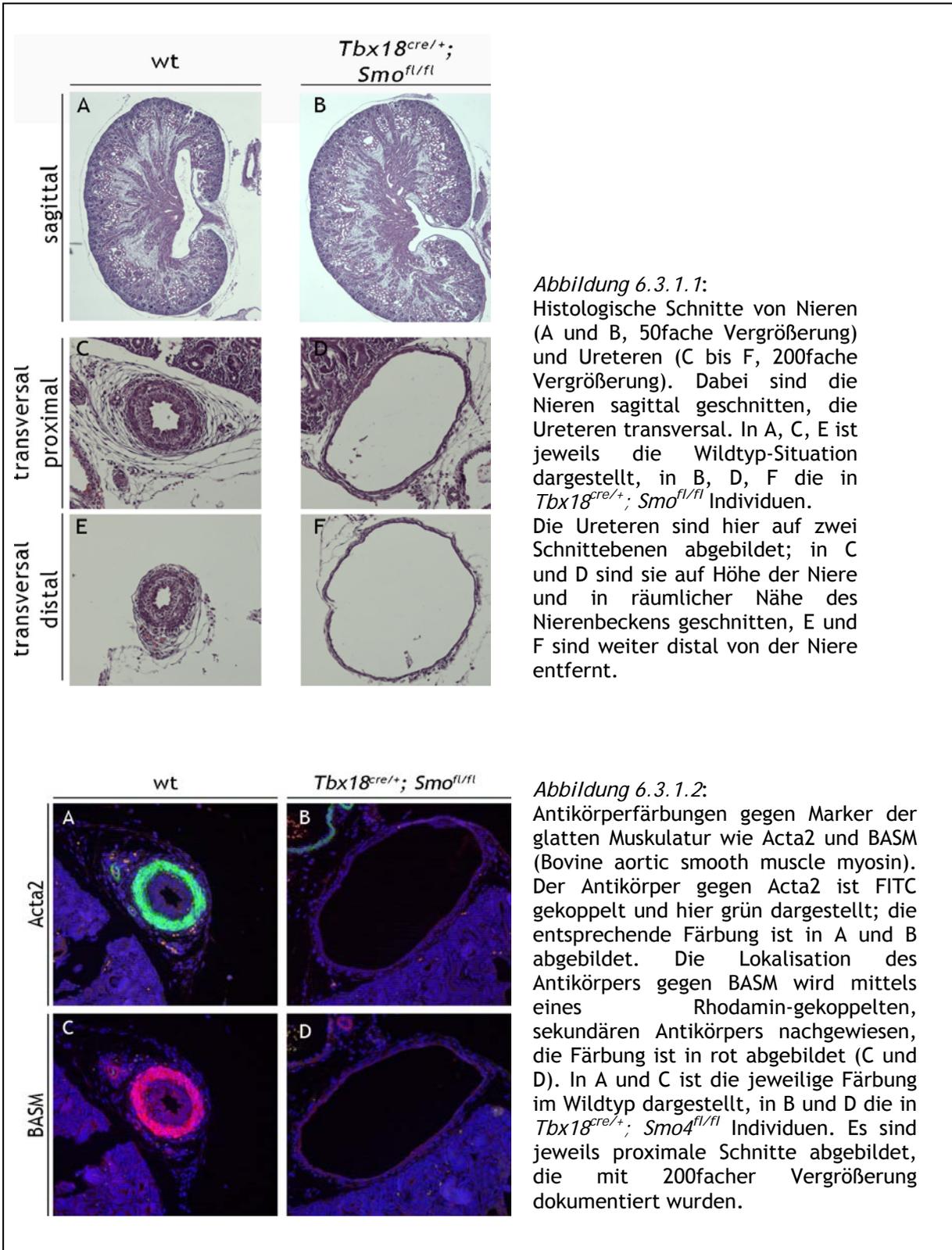
6.3. Die Deletion von *Smoothened* im Uretermesenchym

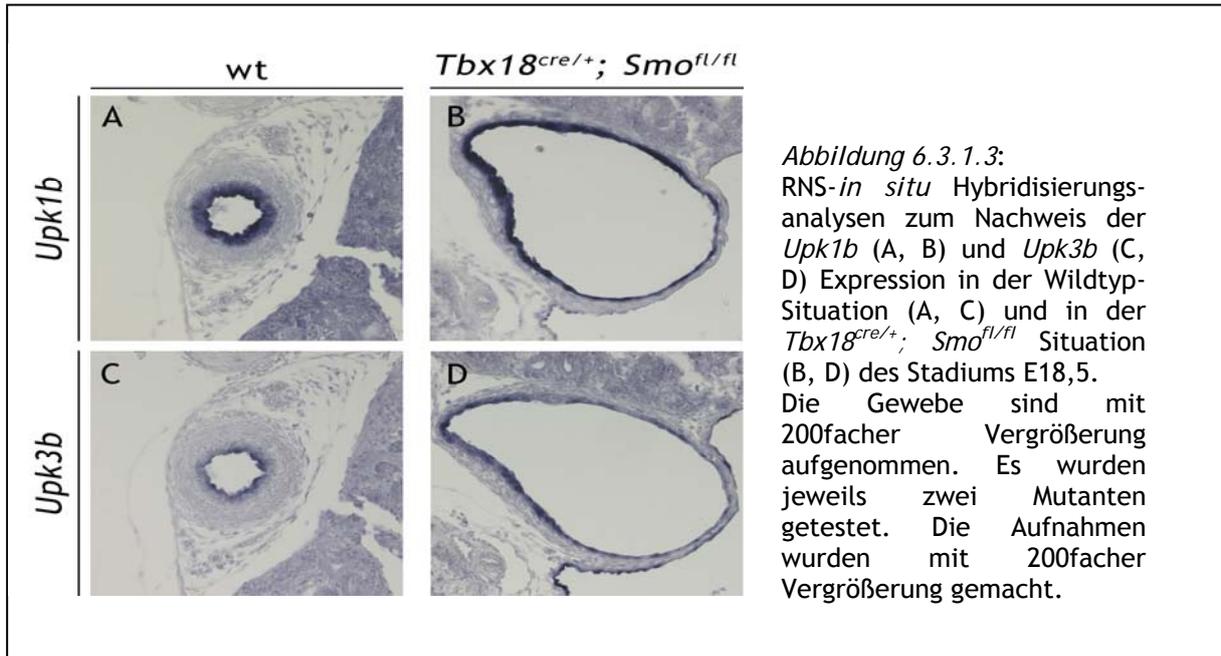
Das Auftreten von bilateralen Hydroureteren und Hydronephrosen wurde durch den Verlust von *Bmp4* im Uretermesenchym am E18,5 hervorgerufen. In der Annahme, dass ein aktiver Hh-Signalweg, bei dem durch Smo-Aktivität die Expression der Zielgene stimuliert wird, die Voraussetzung für die Initiation der *Bmp4*-Expression ist (Abbildung 6.3.1), sollte der Verlust des aktiven Hh-Signalwegs zu morphologischen Veränderungen führen, die in ihrer Schwere und Ausprägtheit mindestens denen entsprechen, die durch *Bmp4*-Verlust hervorgerufen werden. Aus diesem Grund wurde der Verlust sämtlicher Hh-Aktivität in der *Tbx18*-Domäne analysiert. Dieser Verlust des Hh-Signalwegs kann durch den Verlust des Co-Rezeptor Smo herbeigeführt werden.

Für diese Analyse wurden *Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/+}* Männchen mit *Smo^{fl/fl}* Weibchen verpaart (Trowe et al., 2010; Long et al., 2001; Airik et al., 2010). Individuen des Genotyps *Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}* werden nachfolgend als *Smo*-mutante Individuen bezeichnet.

6.3.1. Die Deletion von *Smo* im Uretermesenchym führte zu bilateral auftretenden Hydroureteren

Der Verlust von *Smo* im Uretermesenchym führte zu bilateralen Hydroureteren bei beiden Geschlechtern. Das Ureterlumen von *Smo*-mutanten Individuen war verglichen mit der Wildtyp-





Situation sowohl auf Schnitten in Höhe der Niere als auch auf Schnitten zwischen Niere und Blase vergrößert (*Abbildung 6.3.1.1C, D, E, F*). Das Nierenbecken hingegen war nicht geweitet, es lag also keine Hydronephrose vor (*Abbildung 6.3.1.1A, B*). Die Niere von *Smo*-mutanten Individuen erschien in der Hämatoxylin- Eosin- Analyse vergrößert, dieser Eindruck wurde noch nicht quantifiziert (*Abbildung 6.3.1.1A* und *B*).

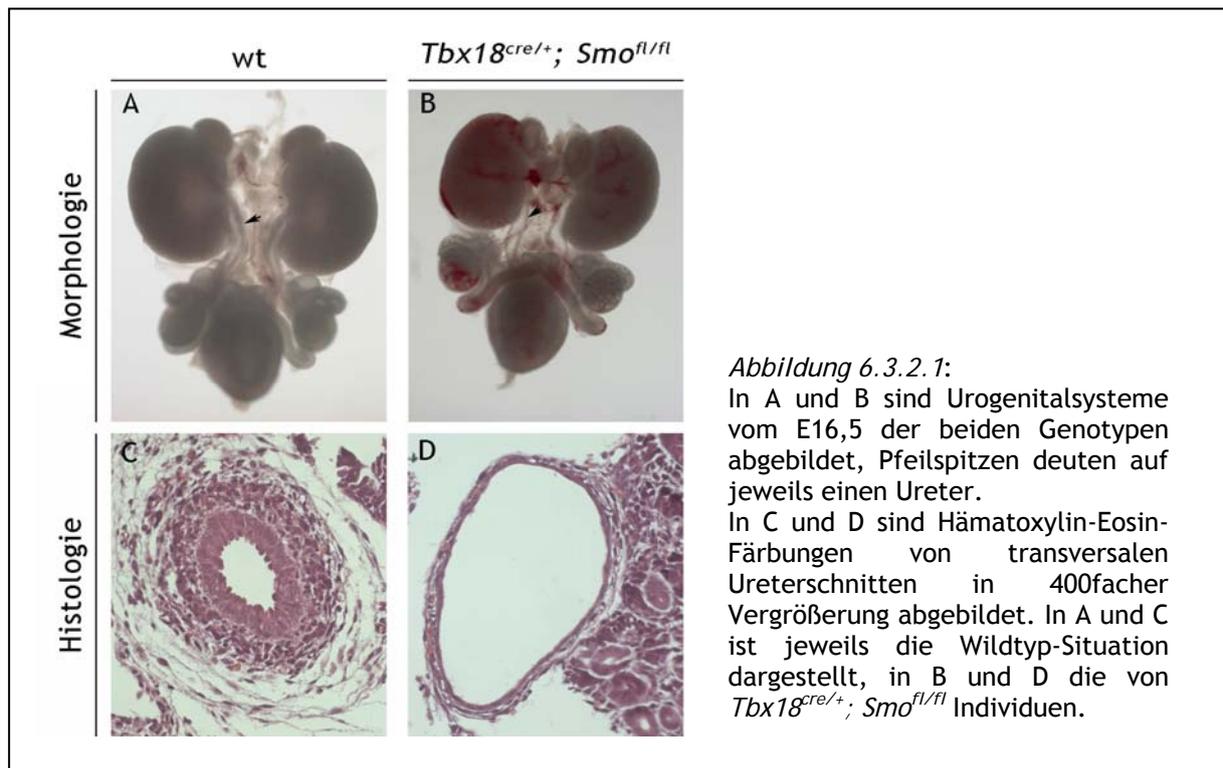
Das epitheliale Gewebe war sowohl auf proximalen als auch auf distalen Ureterschnitten von sehr wenigen mesenchymalen Zellen umschlossen. Eine Unterscheidung in Lamina propria und glatte Muskulatur war nicht möglich.

Um zu überprüfen, ob in *Smo*-mutanten Individuen das Mesenchym am Ureter zu glatter Muskulatur differenziert, wurde die Expression von Acta2 und Myosin der glatten Muskulatur mittels einer Antikörperfärbung gegen diese Proteine analysiert (*Abbildung 6.3.1.2*). Im Gegensatz zu der Wildtyp-Situation ließen sich in *Smo*-mutanten Individuen am E18,5 weder Acta2 noch die schwere Kette von Myosin der glatten Muskulatur (BASM) nachweisen (*Abbildung 6.3.1.2*). Dasselbe Ergebnis lieferte die RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse (Daten nicht abgebildet).

In *Smo*-mutanten Individuen fand keine Differenzierung des Mesenchyms zu glatter Muskulatur statt.

Zur Analyse der Differenzierung des epithelialen Gewebes zum Urothel wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen die Expression von *Upk1b* und *Upk3b* überprüft. Ebenso wie in Wildtyp-Individuen wurden *Upk1b* und *Upk3b* in *Smo*-mutanten Individuen transkribiert (*Abbildung 6.3.1.3*).

Smo-mutante Individuen wiesen am E18,5 Hydroureteren auf, die zwar ein differenziertes Urothel besaßen, aber keine glatte Muskulatur.



6.3.2. Der *Smo*-Verlust im Uretermesenchym führte bereits am E16,5 zu Hydroureteren

Wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben, wiesen die meisten *Bmp4*-mutanten Individuen am E16,5 bilaterale, partielle Hydroureteren ohne glatte Muskulatur auf. Daher wurde auch in *Smo*-mutanten Individuen untersucht, ob sie am E16,5 Hydroureteren aufweisen. Zunächst wurde ein Wurf dieses Stadiums analysiert. Die drei *Smo*-mutanten Individuen dieses Wurfs wiesen alle einen bilateralen Hydroureter auf (*Abbildung 6.3.2.1A* und *B*).

Für die genauere Beschreibung des Ureters wurden histologische, transversale Schnitte von Ureteren angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. In diesen Präparaten ließ sich deutlich erkennen, dass bereits in diesem Stadium das Ureterlumen vergrößert war (*Abbildung 6.3.2.1C* und *D*). Ebenso wie bei *Smo*-mutanten Individuen vom E18,5 ließen sich auch in diesem Stadium nur wenige mesenchymale Zellen um das einschichtige Epithel in Hämatoxylin-Eosin-Färbungen erkennen.

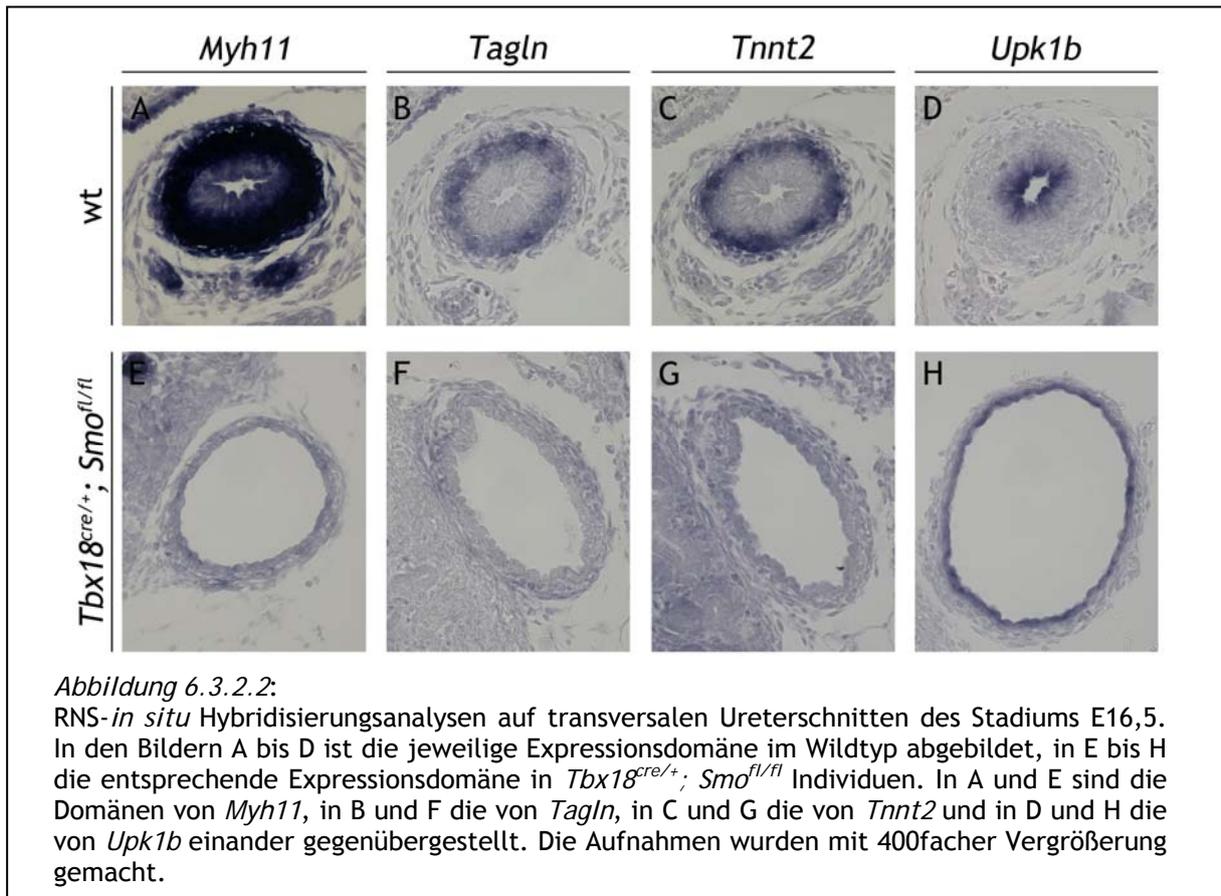


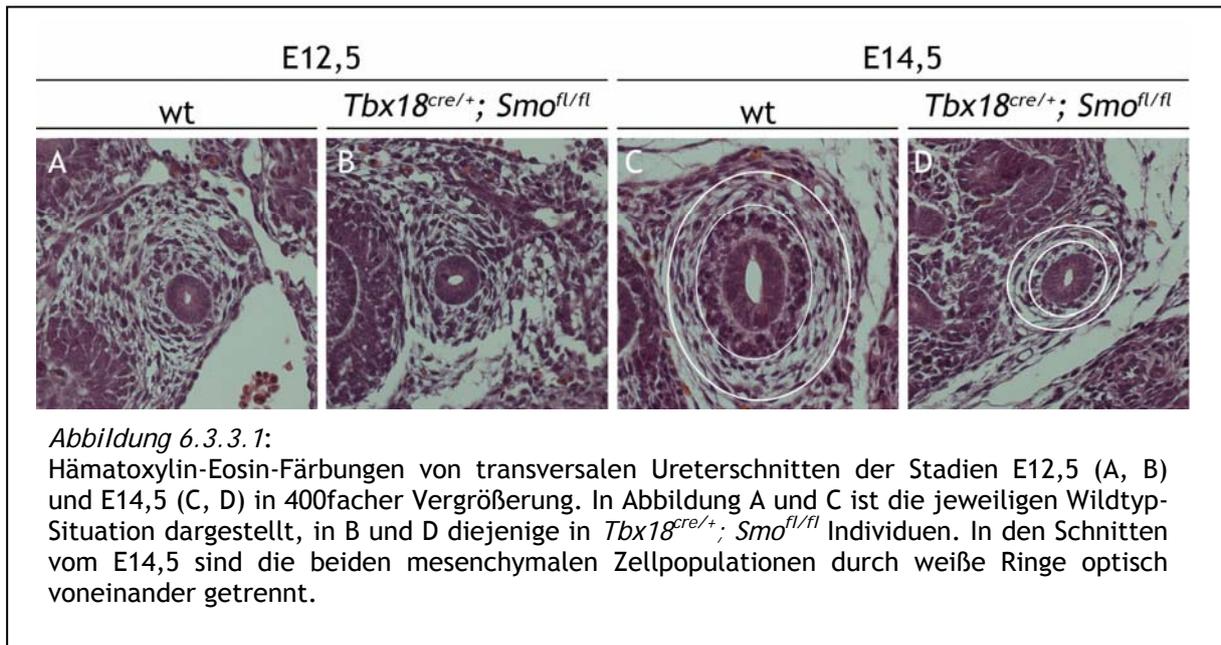
Abbildung 6.3.2.2:

RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf transversalen Ureterschnitten des Stadiums E16,5. In den Bildern A bis D ist die jeweilige Expressionsdomäne im Wildtyp abgebildet, in E bis H die entsprechende Expressionsdomäne in *Tbx18^{cre/+}; Smo^{fl/fl}* Individuen. In A und E sind die Domänen von *Myh11*, in B und F die von *Tagln*, in C und G die von *Tnnt2* und in D und H die von *Upk1b* einander gegenübergestellt. Die Aufnahmen wurden mit 400facher Vergrößerung gemacht.

In *Bmp4*-mutanten Individuen wurden am E16,5 *Tagln*, *Myh11* und *Tnnt2* nicht transkribiert. Da *Bmp4* für die Muskeldifferenzierung notwendig war und wenn die *Bmp4*-Synthese vom aktiven Hh-Signalweg abhängig reguliert würde, ergibt sich daraus die Hypothese, dass auch bei *Smo*-mutanten Individuen die Muskeldifferenzierung in diesem Entwicklungsstadium nicht nachweisbar sein sollte. Zur Klärung dieser Hypothese wurde die Expression der zuvor benannten Muskelgene mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen getestet (Abbildung 6.3.2.2).

In Wildtyp-Individuen wurden *Myh11*, *Tagln* und *Tnnt2* am E16,5 exprimiert, dahingegen war ihre Expression in *Smo*-mutanten Individuen zu diesem Zeitpunkt der Ureterentwicklung nicht zu detektieren (Abbildung 6.3.2.2A und E, B und F, C und G). Wie schon am E18,5 war auch am E16,5 die Differenzierung des Epithels zum Urothel in *Smo*-mutanten Individuen mittels der RNS-*in situ* Hybridisierungsmethode gegen *Upk1b* nachweisbar (Abbildung 6.3.2.2D und H).

Es wurde festgestellt, dass es in *Smo*-mutanten Individuen am E16,5 zum Auftreten von bilateralen Hydroureteren kam und dass dies mit dem Verlust der Expression an Genen einherging, die in glatten Muskelzellen des Wildtyps synthetisiert wurden.



6.3.3. Nicht am E12,5 sondern am E14,5 waren histologische Unterschiede zwischen Wildtyp und *Smo*-mutanten Individuen nachweisbar

Da in *Smo*-mutanten Individuen am E16,5 und E18,5 morphologische Abweichungen zur Wildtypsituation festzustellen waren und diese sich auch auf molekularer Ebene nachweisen ließen, wurden nachfolgend jüngere Stadien auf morphologische und molekulare Abweichungen zwischen Wildtyp- und *Smo*-mutanten Individuen analysiert. Dazu wurden zunächst transversale Ureterschnitte von Individuen früherer embryonaler Stadien mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt. In diesen Färbungen waren weder im Epithel noch im Mesenchym von *Smo*-mutanten Individuen vom E12,5 Unterschiede zum Wildtyp zu erkennen. Das Epithel wies in etwa die gleiche Größe und die gleiche Struktur in beiden Genotypen auf (*Abbildung 6.3.3.1A* und *B*).

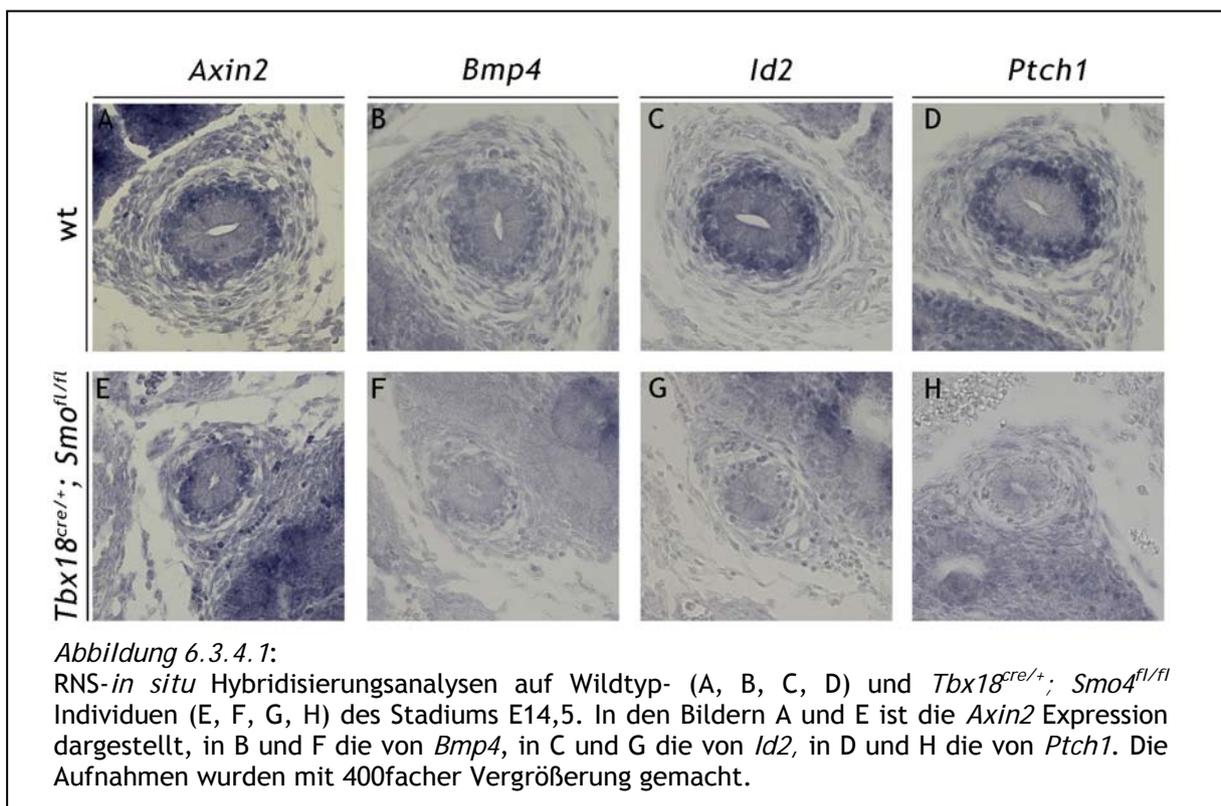
Im Gegensatz dazu unterschieden sich Ureterschnitte von *Smo*-mutanten Individuen des E14,5 deutlich von denen von Wildtyp-Embryonen (*Abbildung 6.3.3.1C* und *D*): Das Epithel war in *Smo*-mutanten Embryonen vom E14,5 in der Gestalt und Größe dem vom Wildtyp-Individuen vom E12,5 ähnlich (*Abbildung 6.3.3.1A* und *D*). Darüber hinaus war verglichen mit der Wildtyp-Situation auch die Zahl der mesenchymalen Zellen in *Smo*-mutanten Individuen deutlich reduziert. Trotz der verringerten Menge an mesenchymalen Zellen ließen sich in *Smo*-mutanten Individuen die beiden mesenchymalen Zellpopulationen um das Epithel erkennen, auch wenn diese in der Mutante nur aus ein bis zwei Zellschichten bestanden.

Der Verlust von *Smo* im Uretermesenchym führte schon am E14,5 zu deutlich erkennbaren Abweichungen in der Ureterentwicklung.

6.3.4. Die Deletion von *Smo* beeinflusste die Aktivität des Bmp4-Signalwegs beim E14,5

Da sich schon am E14,5 die Ureteren von *Smo*-mutanten Embryonen von denen von Wildtyp-Embryonen unterschieden, wurde nun die molekulare Ursache für die morphologische Veränderung untersucht. Bereits in einer früheren Veröffentlichung wurde auf die Abhängigkeit des Bmp-Signalwegs vom Hh-Signalweg in diesem Gewebe hingewiesen (Yu et al., 2002), deshalb wurden die Aktivität des Bmp4-Signalwegs, des Hh-Signalwegs und des Wnt-Signalwegs in *Smo*-mutanten Individuen am E14,5 analysiert.

Als Nachweis für einen aktiven Signalweg dient die Expression eines Gens, welches abhängig von einem der genannten Signalwege exprimiert wird. Die Aktivität der Signalwege wurde mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen bestimmt, dabei gilt als Nachweis für einen aktivierten Wnt-Signalweg die Expression von *Axin2*, für einen aktivierten Bmp4-Signalweg *Id2* und für einen aktivierten Hh-Signalweg *Ptch1*. Alle drei Signalwege waren im Wildtyp in diesem Entwicklungsstadium aktiv, die Expression ihrer Zielgene war im Uretermesenchym (*Axin2*, *Bmp4*, *Ptch1*) bzw. in Uretermesenchym und -epithel (*Id2*) zu detektieren (Abbildung 6.3.4.1A, B, C, D). Dagegen ließ sich in *Smo*-mutanten Individuen zu diesem Zeitpunkt nur ein aktivierter Wnt-Signalweg nachweisen (Abbildung 6.3.4.1E). Durch die Deletion des Co-Rezeptors *Smo* im Uretermesenchym kam es zum Verlust des aktivierten Hh-Signalwegs, da keine *Ptch1*-Expression in *Smo*-mutanten Individuen am E14,5 mehr nachgewiesen werden konnte (Abbildung 6.3.4.1H).



Wie bereits von Yu et al. (2002) dargestellt wurde, führte der Verlust des Hh-Signalwegs auch zum Verlust der *Bmp4*-Expression und damit auch zum Verlust des aktivierten Bmp4-Signalwegs, was hier durch den Verlust der *Id2*- und *Bmp4*-Expression in *Smo*-mutanten Individuen nachgewiesen wurde (Abbildung 6.3.4.1F und G).

Die Deletion von *Smo* im Uretermesenenchym führte neben dem Verlust des Hh-Signalwegs auch zum Verlust des Bmp4-Signalwegs, dagegen blieb der Wnt-Signalweg unbeeinflusst.

6.3.5. Die Deletion von *Smo* im Uretermesenenchym führte zu einem Verlust der *Gata2*-Expression

Tbx18, *Gata2*, *Tshz3* und *Sox9* sind Transkriptionsfaktoren, deren Verlust in der Literatur mit dem Auftreten von Hydroureteren und wenig bzw. keiner glatten Muskulatur assoziiert wird. Da in *Smo*-mutanten Individuen schon am E14,5 morphologische Abweichungen von der Wildtyp-Situation festzustellen waren, sollte überprüft werden, ob es in diesen Mutanten neben dem Verlust des Bmp4-Signalwegs auch zu einem Verlust einer dieser Faktoren kommt. Dazu wurde die Expression von *Gata2*, *Tbx18*, *Sox9* und *Tshz3* in *Smo*-mutanten Individuen mittels der RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse mit der in Wildtypen am E14,5 verglichen (Abbildung 6.3.5.1). In der Wildtyp-Situation war die Expression von *Gata2*, *Tbx18* und *Tshz3* am E14,5 nachweisbar, wohingegen *Sox9* in diesem Entwicklungsstadium im Uretermesenenchym nicht mehr exprimiert wurde (Abbildung 6.3.5.1A, B, C, D). Durch die Deletion von *Smo* im Uretermesenenchym wurde

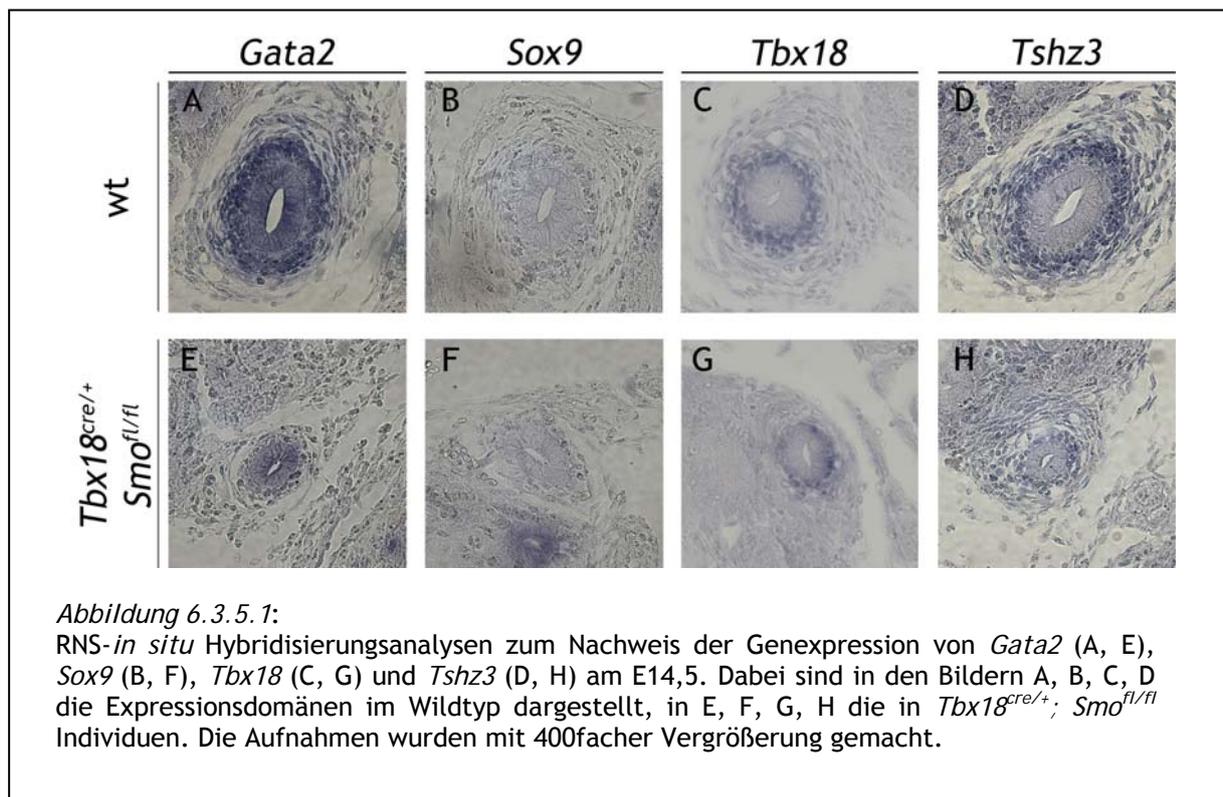


Abbildung 6.3.5.1: RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen zum Nachweis der Genexpression von *Gata2* (A, E), *Sox9* (B, F), *Tbx18* (C, G) und *Tshz3* (D, H) am E14,5. Dabei sind in den Bildern A, B, C, D die Expressionsdomänen im Wildtyp dargestellt, in E, F, G, H die in *Tbx18*^{cre/+}; *Smo*^{fl/fl} Individuen. Die Aufnahmen wurden mit 400facher Vergrößerung gemacht.

keine ektopische *Sax9*-Expression hervorgerufen (Abbildung 6.3.5.1F). Die Expression von *Tbx18* wurde ebenfalls nicht durch den *Smo*-Verlust beeinflusst, die Expression erscheint jedoch durch die verringerte Zahl an mesenchymalen Zellen abgeschwächt (Abbildung 6.3.5.1G). Es blieb unklar, in welchem Umfang die *Tshz3*-Expression durch die *Smo*-Deletion betroffen wurde (Abbildung 6.3.5.1H).

Allerdings wurde durch die *Smo*-Deletion im Uretermesenchym in dieser Domäne ein Verlust der *Gata2*-Expression hervorgerufen, wohingegen die *Gata2*-Expression im Uretereithel, das von dieser Deletion durch die verwendete *Tbx18^{ox}*-Mauslinie nicht betroffen war (Airik et al., 2010), erhalten blieb (Abbildung 6.3.5.1E).

Die Deletion von *Smo* im Uretermesenchym führte neben dem Verlust der *Bmp4*-Expression auch zum Verlust der *Gata2*-Expression in dieser Domäne.

6.4. Weitere Markergene für die Ureterentwicklung

Um die Ureterentwicklung genauer beschreiben zu können, ist es notwendig, Gene zu identifizieren, die während der Ureterentwicklung exprimiert werden. Bisher war nur eine sehr beschränkte Anzahl an Genen bekannt, die an der Ureterentwicklung beteiligt sind.

Die Notwendigkeit der Identifizierung solcher zusätzlicher Markergene wird auch dadurch verdeutlicht, dass sich die Unterschiede in den hier analysierten Mutanten durch die bisher beschriebenen Markergene kaum auf molekularer Ebene voneinander abgrenzen lassen. Daher wurde versucht, mithilfe zweier durchgeführter Microarrays die zur Verfügung stehende Anzahl an Markergenen zu vergrößern.

In einem ersten Microarray wurde das Transkriptom von Ureteren vom E13,5 mit dem von Ureteren vom E18,5 verglichen. Ziel war es, Gene zu identifizieren, die im nicht-differenzierten Ureter exprimiert werden. Es wurden 254 Gene ausgewiesen, die ein um den Faktor drei erhöhtes Expressionsniveau in nicht-differenzierten Ureteren bezogen auf differenzierte Ureteren aufwiesen. 23 Gene waren nicht annotiert und wurden deshalb nicht untersucht. Weitere 61 Gene wurden nicht mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf eine spezifische Expressionsdomäne hin untersucht, weil die angegebenen Expressionsniveaus als zu gering angesehen wurden oder weil kein geeignetes Plasmid für die Sondensynthese zur Verfügung stand. Die restlichen 170 Gene sind im Anhang in *Tabelle 12.1* aufgeführt. Von diesen wurden 39 im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Dennis Rataj und Annika Nolte auf spezifische Expression im Ureter hin untersucht. Weitere 60 wurden mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen auf Schnitten getestet. Von diesen 60 waren 16 im Ureter exprimiert (*Tabelle 12.1*); die *Cldn3*-Expression war mit der von *Cldn6* vergleichbar und ist daher nicht in *Tabelle 6.4.1* und *Abbildung 6.4.1.2* aufgeführt.

Da es in *Tbx18*-mutanten Embryonen zum Verlust von *Bmp4* (Airik et al., 2006) und *Ptc1* ab E12,5 kam, sollte es möglich sein, durch einen zweiten Microarray basierend auf den Ureteren von *Tbx18*-mutanten Embryonen und denen von *Tbx18*-heterozygoten Embryonen des E13,5 *Bmp4*- und *Hh*- Zielgene zu identifizieren. Dabei wiesen 122 Gene ein Verhältnis der Expressionsniveaus von *Tbx18*-homozygoten Mutanten zu *Tbx18*-heterozygoten Mutanten auf, das kleiner als 0,5 war. Nach Abzug von Genen, für die mehr als einmal diese Bedingung erfüllt war und von denen, für die kein geeignetes Plasmid für die Sondensynthese zur Verfügung stand, blieben noch 84 Gene, deren Expressionsdomänen mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen zu untersuchen waren. Es wurden von 59 dieser Gene die Expressionsdomänen untersucht (*Tabelle 12.2*). In diesem Regulationsbereich befanden sich auch

die schon bekannten von *Tbx18* abhängigen Gene, das *Tbx18*-Gen selbst und weitere 6 Gene mit spezifischer Expression im Ureter (*Tabelle 6.4.1*). Darüber hinaus wurden Expressionsanalysen von weiteren 96 Genen, deren Verhältnis der Expressionsniveaus von *Tbx18*-homozygoten Ureteren zu *Tbx18*-heterozygoten Ureteren bei 0,5 bis 0,6 lag, durchgeführt (*Tabelle 12.3*). Von diesen getesteten 96 Genen wiesen 59 eine unspezifische Expression und drei eine spezifische Expression im Ureter auf (*Tabelle 12.3* und *Tabelle 6.4.1*).

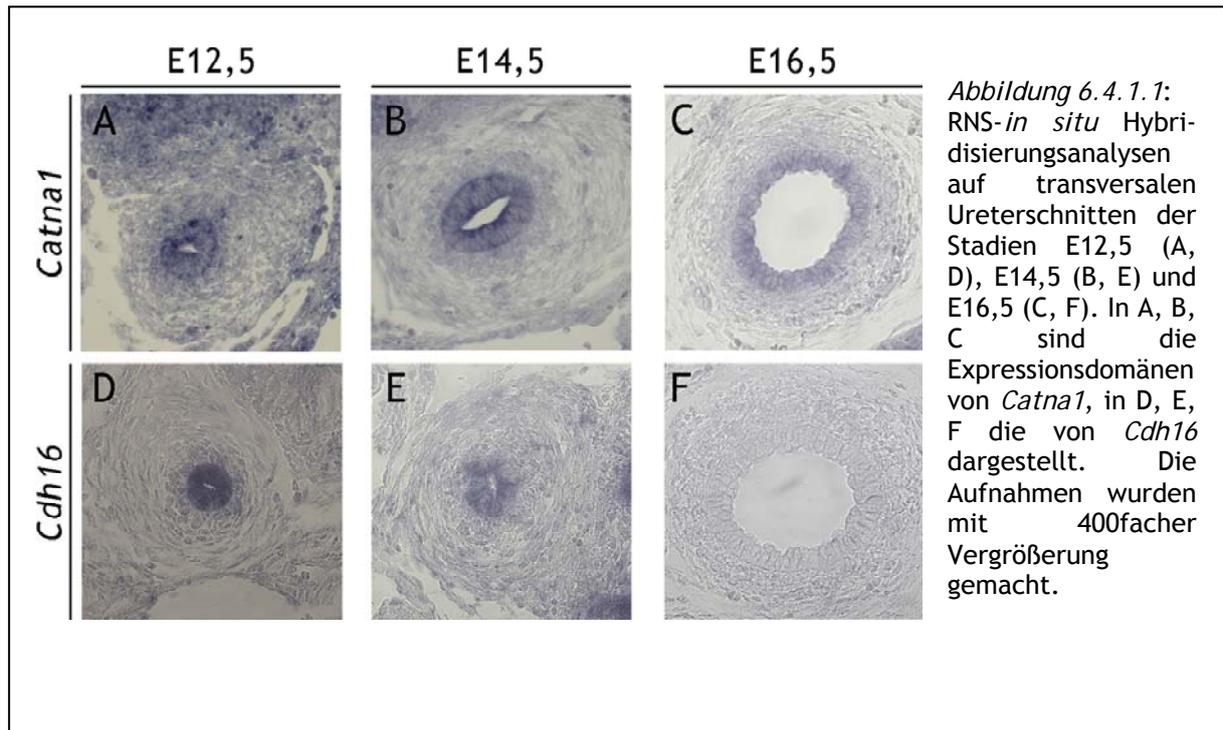
Eine weitere Datenquelle für die Identifizierung neuer Marker für den Ureter lieferten die online-Expressionsdatenbanken wie genepaint.org (Visel, 2004), gudmap.org (Brunskill et al., 2008) oder eurexpress.org (Diez-Roux et al., 2011). Im Mai 2011 umfasste die Liste der Gene, die bei genepaint.org als „stark“ oder „mittelstark“ spezifisch im Ureter exprimiert annotiert waren, 108 Einträge. Im Mai 2011 wurden bei eurexpress.org 42 Gene für diese Expressionsdomäne aufgelistet. Daraus ergab sich eine Liste von 148 verschiedenen Genen. *Tabelle 12.4* enthält die Zusammenstellung der 68 Gene, die auf dieser Grundlage bisher analysiert wurden.

Die identifizierten Gene mit spezifischer Expression im Ureter sind in *Tabelle 6.4.1* zusammengestellt. Neben den Gensymbolen ist angegeben, in welchen Datenbanken sie annotiert sind sowie die Verhältnisse der Expressionsniveaus, die mithilfe der Microarray-Analyse ermittelt wurden.

Tabelle 6.4.1:

Tabelle enthält für alle im Abschnitt 6.4 aufgeführten Gene die Informationen, ob sie in den Datenbanken genepaint.org, eurexpress.org oder gudmap.org als spezifisch im Ureter exprimiertes Gen annotiert wurden. In den hinteren beiden Spalten sind die Verhältnisse der Genexpressionsniveaus, die aus den Microarray-Analysen abgeleitet wurden, aufgelistet. Dabei wurde im Microarray 1 das Transkriptom von Ureteren des Stadiums E18,5 mit dem des Stadiums E13,5 verglichen. Im Microarray 2 wurde das Transkriptom von Ureteren des Stadiums E13,5 von Tbx18-homozygoten mit Tbx18-heterozygoten Individuen verglichen. Grau unterlegt sind Felder mit Informationen, aufgrund derer die RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen durchgeführt wurde

Gen-symbol	Genepaint	Eurexpress	GUDMAP	Microarray 1	Microarray 2
Bmper	Nein	Nein	Nein	0,2	0,4
Car3	Ja	Nein	Nein	0,4	0,1
Catna1	Ja	Nein	Nein	0,7	1,1
Cdh16	Nein	Nein	Nein	0,1	1,5
Cldn6	Nein	Nein	Nein	0,2	1,5
Cldn11	Nein	Ja	Nein	0,6	0,4
Cxcl12	Nein	Nein	Nein	0,2	0,4
Dach2	Nein	Nein	Nein	0,2	1,6
Dact1	Nein	Nein	Nein	0,3	0,8
Dpysl3	Nein	Nein	Nein	1,4	-
Dusp10	Ja	Nein	Nein	1,5	0,5
Epha7	Nein	Ja	Nein	0,3	0,5
Foxc2	Nein	Nein	Nein	0,2	0,6
Gata3	Ja	Nein	Nein	1,8	1,4
Hmga2	Nein	Nein	Nein	0,1	1,0
Kif12	Nein	Nein	Nein	0,1	1,1
Kit	Nein	Ja	Nein	0,4	0,8
Lgals1	Nein	Nein	Ja	0,5	-
Masp1	Nein	Nein	Nein	0,2	0,3
Nr2f1	Nein	Nein	Nein	0,2	0,6
Pdgfra	Ja	Nein	Ja	0,7	0,8
Plcx3	Nein	Nein	Nein	0,1	0,5
Serpinh1	Ja	Nein	Nein	0,8	0,9
Sparc	Nein	Nein	Ja	1,4	0,6
Sulf1	Nein	Nein	Nein	0,4	0,5
Thbs1	Nein	Nein	Nein	0,4 bis 0,5	0,4 bis 0,5
Vil2	Ja	Nein	Nein	1,4	1,1
Zcchc12	Nein	Nein	Nein	0,1	0,6
Zfp536	Nein	Nein	Nein	0,1	0,6

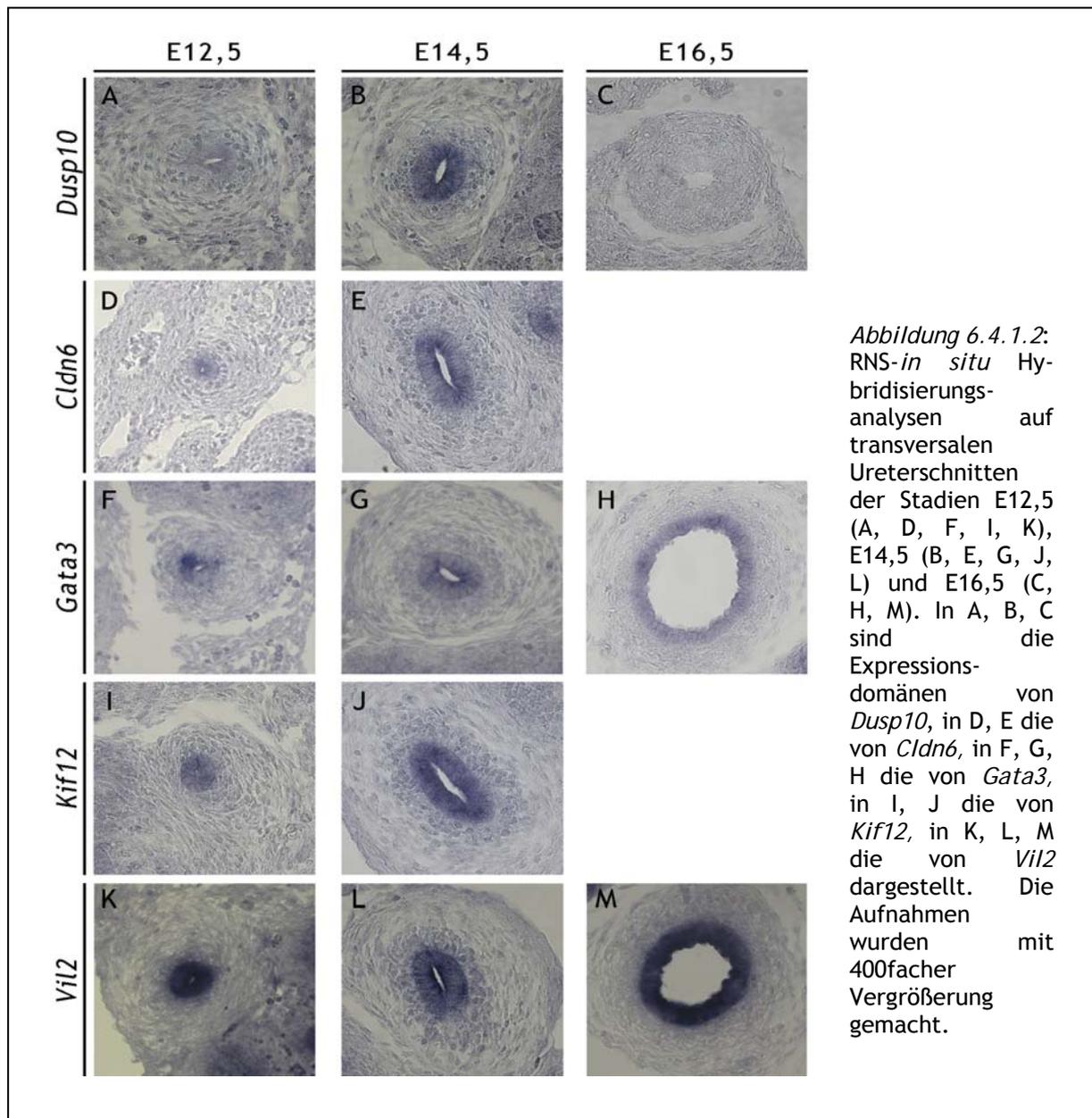


6.4.1. Gene mit Expressionsdomäne im nicht-differenzierten Ureterepithel

Bei der Analyse der Expressionsdomäne in den Entwicklungsstadien E12,5 bis E16,5 wurden zwei Gene identifiziert, die im nicht-differenzierten Ureterepithel stark exprimiert waren. Zum einen handelte es sich dabei um *Catna1* (**Catenin α 1**), zum anderen um *Cdh16* (**Cadherin 16**). *Catna1* war stark im Ureterepithel am E12,5 und E14,5 exprimiert und abgeschwächt am E16,5. In der hier ausgewerteten Microarray-Analyse war das Expressionsniveau zwischen *Tbx18*-mutanten und *Tbx18*-heterozygoten Individuen am E13,5 nahezu unverändert; im undifferenzierten Ureter etwas höher als im differenzierten, was sich in den Bildern widerspiegelt (*Abbildung 6.4.1.1A, B und C*). *Catna1* wurde in der Datenbank genepaint.org als spezifisch im Ureter exprimiert angeführt, nicht aber in der Datenbank eurexpress.org.

Das Expressionsniveau von *Cdh16* war im differenzierten Ureter deutlich niedriger als im nicht-differenzierten (*Abbildung 6.4.1.1D, E und F*). Es lag am E18,5 bei etwa 10 % des Niveaus vom E13,5. In *Tbx18*-mutanten und *Tbx18*-heterozygoten Ureteren unterschieden sich die Expressionsniveaus nicht deutlich (*Tabelle 6.4.1*). *Cdh16*-Expression wurde in der Datenbank eurexpress.org als spezifisch im Ureter exprimiert aufgeführt, nicht jedoch in der Datenbank genepaint.org.

Bei der Microarray-Analyse und beim Validieren der in den online-Datenbanken annotierten Genen wurden fünf weitere Gene gefunden, die im Epithel des Ureters exprimiert wurden. Das Transkript von *Dusp10* (**Dual specificity phosphatase 10**) wurde nur am E14,5 nachgewiesen,



nicht jedoch am E12,5 und E16,5 (Abbildung 6.4.1.2A, B, C). *Cldn6*-Expression konnte in beiden hier getesteten Stadien nachgewiesen werden (Abbildung 6.4.1.2D, E). *Gata3* und *Vil2* (Synonym von *ezrin*) wurden vom E12,5 bis E16,5 im Epithel exprimiert (Abbildung 6.4.1.2F, G, H, K, L, M). *Kif12* (**K**inesin **f**amily **m**ember **12**) wurde am E12,5 und E14,5 transkribiert (Abbildung 6.4.1.2I, J). Von diesen fünf Genen wiesen *Cldn6* und *Kif12* ein deutlich höheres Expressionsniveau am E13,5 als am E18,5 auf (mindestens Faktor 5; Tabelle 6.4.1). *Dusp10* ist als einziges dieser fünf Gene in den Ureteren von Wildtyp-Individuen verglichen mit denen von *Tbx18*-Verlustmutanten erhöht nachzuweisen (Unterschied in den Expressionsniveaus Faktor 2; Tabelle 6.4.1). genepaint.org annotierte *Gata3*, *Dusp10* und *Vil2* als Gene mit spezifischer Expressionsdomäne im Ureter. Keines dieser fünf Gene wurde von eurexpress.org als Gen mit spezifischer Expressionsdomäne im Ureter benannt (Tabelle 6.4.1).

6.4.2. Gene mit Expressionsdomäne im Uretermesenchym

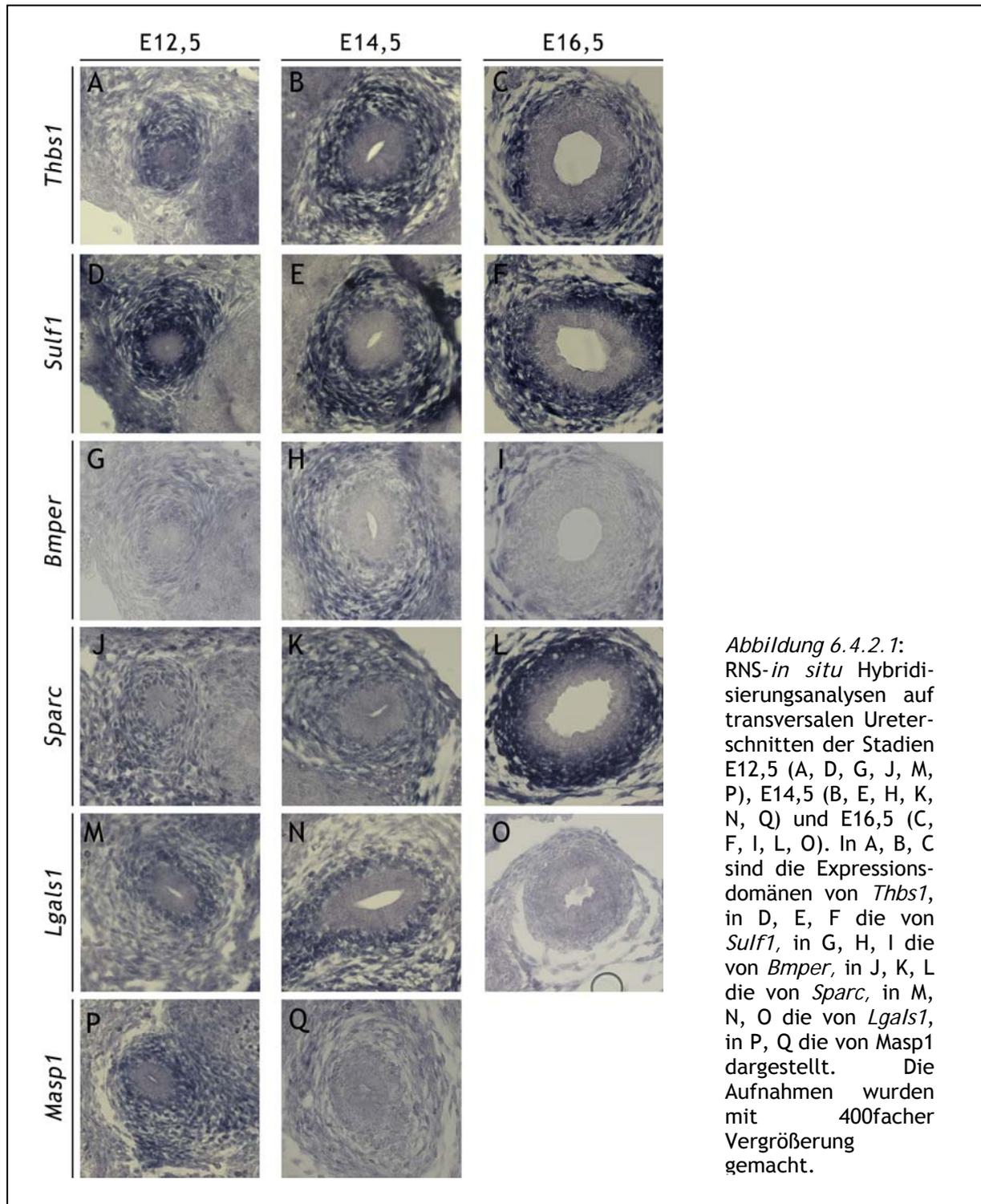
Bei den hier durchgeführten RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen verschiedener Sonden wurden 22 Gene identifiziert, die im Uretermesenchym während der Entwicklung exprimiert wurden. Dabei handelt es sich zum Teil um Proteine des extrazellulären Raums wie *Thbs1* (**T**hrombospondin **1**), *Sulf1* (**S**ulfatase **1**), *Bmper* (**B**MP-binding endothelial **r**egulator), *Sparc* (**S**ecreted **p**rotein **a**cidic and **r**ich in **c**ysteine), *Lgals1* (**L**ectin **g**alactose binding **s**oluble **1**) sowie *Masp1* (**M**annan-binding lectin **s**erine **p**eptidase **1**) (*Abbildung 6.4.2.1*).

Thbs1 wurde in den hier verwendeten Stadien ab E12,5 im Uretermesenchym exprimiert, jedoch war die Expression ab E16,5 nicht mehr gleichmäßig stark im gesamten Mesenchym um den Ureter verteilt, sondern ließ regionale Unterschiede zwischen dem äußeren und dem inneren Ring erkennen (*Abbildung 6.4.2.1A, B, C*). So war die stärkste Expression am E16,5 in den Fibroblasten zu erkennen (*Abbildung 6.4.2.1 C*).

Sulf1-Transkript war ebenfalls mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen ab E12,5 konstant nachweisbar (*Abbildung 6.4.2.1D, E, F*). Die *Bmper*-Expression war schwach ab E12,5 im Mesenchym um das Ureterepithel detektierbar. Bereits ab E14,5 konnte eine regional unterschiedliche Expression innerhalb des Uretermesenchyms beobachtet werden. So wurde *Bmper* am E14,5 im äußeren Mesenchym exprimiert, am E16,5 blieb die Expression im äußeren Ring, den späteren Fibroblasten, erhalten (*Abbildung 6.4.2.1G, H, I*).

Wie *Thbs1*, *Sulf1* und *Bmper* wurde *Sparc* im Uretermesenchym ab E12,5 transkribiert. Seine Transkripte waren bis E16,5 nachweisbar (*Abbildung 6.4.2.1J, K, L*). *Lgals1*-Expression war mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen bis E14,5 detektierbar, aber nicht mehr am E16,5 (*Abbildung 6.4.2.1M, N, O*). *Masp1*-Expression war am E12,5 im Uretermesenchym zu detektieren, am E14,5 war diese Expression nur noch auf sehr wenige äußere Zellen beschränkt (*Abbildung 6.4.2.1P, Q*).

Obwohl *Thbs1*, *Sulf1*, *Bmper*, *Lgals1* und *Masp1* in der Microarray-Analyse, die das Expressionsniveau der Gene am E13,5 mit dem an E18,5 verglich, eine Veränderung des Expressionsniveaus um mindestens den Faktor 2 aufwies, konnte nicht immer eine deutlich abgeschwächte Expression in den älteren Stadien detektiert werden (*Abbildung 6.4.2.1A und C; D und F; G und I, M und O, P und Q*). Um mindestens diesen Faktor 2 unterschieden sich auch die Verhältnisse der Expressionsniveaus von *Thbs1*, *Sulf1*, *Masp1* und *Bmper* in *Tbx18*-homozygoten und *Tbx18*-heterozygoten Ureteren (*Tabelle 6.4.1*).



Die *Sparc*-Expression war in Ureteren von *Tbx18*-heterozygoten Individuen nur um den Faktor 1,67 erhöht verglichen mit der von *Tbx18*-homozygoten Individuen (*Tabelle 6.4.1*).

In den Datenbanken für Expressionsdomänen im ganzen Embryo wie genepaint.org oder eurexpress.org wurde keins der in diesem Abschnitt genannten Gene als Gen mit spezifischer Expression im Ureter benannt (*Tabelle 6.4.1*). Dagegen wurden in gudmap.org *Lgals1* und *Sparc*

als mögliche Kandidaten für Gene benannt, die im Urogenitalsystem exprimiert werden sollten (Tabelle 6.4.1).

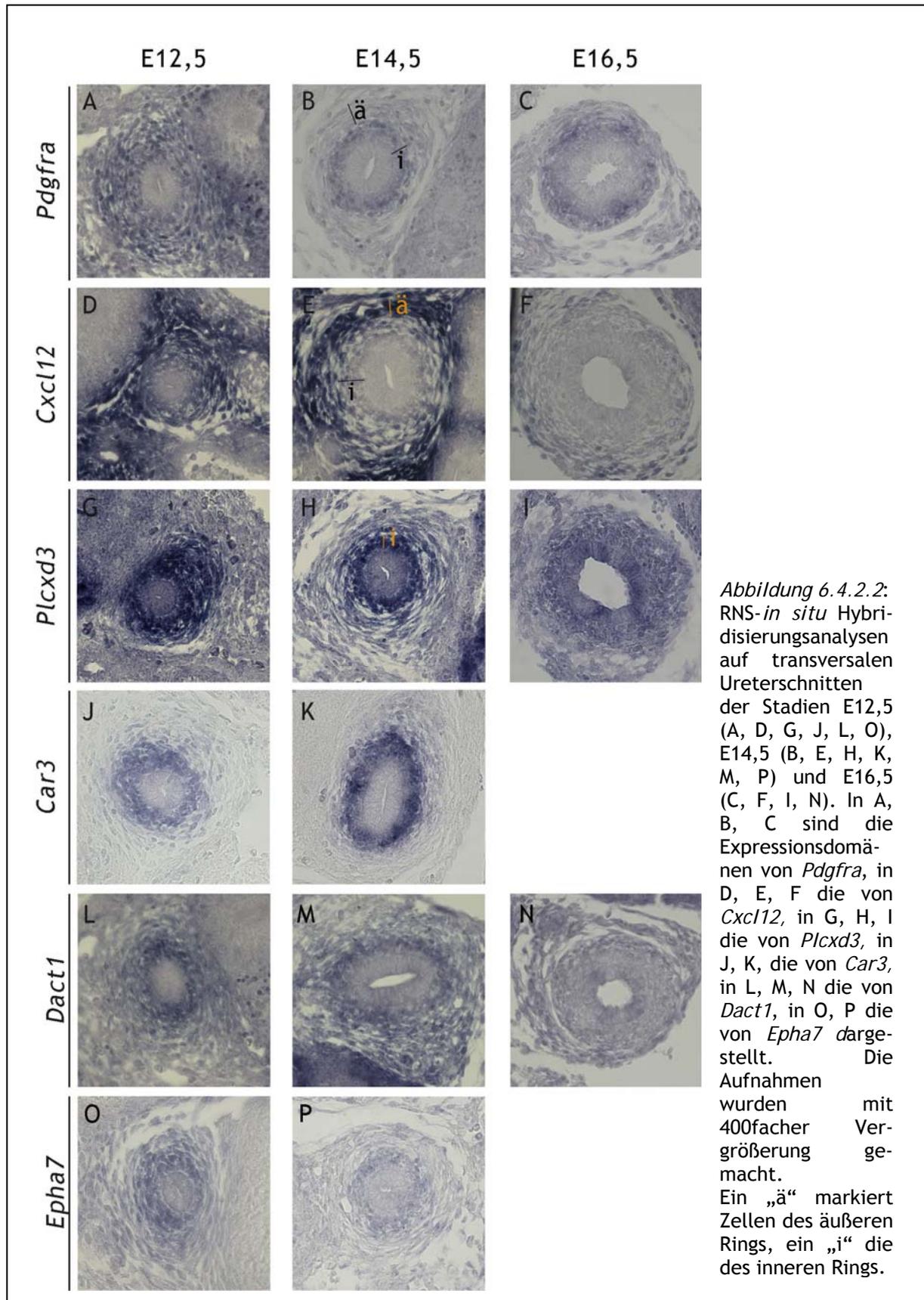
Die Expression von Genen, die für intrazelluläre Proteine wie *Car3* (**C**arbonic anhydrase **3**), *Plcx3* (phosphatidylinositol-specific **p**hospholipase **C**, **X** domain containing **3**) oder *Dact1* (**D**apper homolog **1**, antagonist of beta-catenin) kodieren, und von Genen, die für Proteine kodieren, die an der interzellulären Kommunikation beteiligt sind, wie *Epha7* (**E**ph receptor **A7**), *Pdgfra* (**P**latelet **d**erived **g**rowth **f**actor **r**eceptor, **α** polypeptide) und *Cxcl12* (chemokine (**C-X-C** motif) ligand **12**) wird in *Abbildung 6.4.2.2* dargestellt.

Pdgfra wurde ab E12,5 im Uretermesenenchym exprimiert. Ab E14,5 beschränkte sich seine Expression auf den inneren Ring, wo sie auch am E16,5 nachzuweisen war (*Abbildung 6.4.2.2A, B, C*). Die Expressionsdomäne von *Cxcl12* war ab E12,5 das Uretermesenenchym, allerdings war diese ab E14,5 auf den äußeren Ring restringiert. Am E16,5 war die Expression nur noch an einzelnen Fibroblasten zu detektieren (*Abbildung 6.4.2.2D, E, F*). Dahingegen wurden *Car3*-Transkripte, die ab E12,5 nachzuweisen waren, auch am E14,5 und E18,5 synthetisiert (*Abbildung 6.4.2.2J, K*, Daten vom E18,5 nicht gezeigt).

Die *Plcx3*-Expression war im Uretermesenenchym am E12,5 und am E14,5 nachzuweisen, allerdings am E14,5 nur noch im inneren Ring. Am E16,5 konnte ihre Expression nicht mehr dokumentiert werden (*Abbildung 6.4.2.2G, H, I*). Das Transkript von *Dact1* konnte am E12,5 und am E14,5 im Uretermesenenchym detektiert werden, jedoch nicht mehr am E16,5 (*Abbildung 6.4.2.2L, M, N*). *Epha7*-Expression war im Uretermesenenchym am E12,5 und E14,5 detektierbar, am E18,5 war keine Expression mehr im Uretermesenenchym nachzuweisen (*Abbildung 6.4.2.2O, P*, Daten vom E18,5 nicht gezeigt).

Obwohl *Epha7*, *Cxcl12*, *Car3*, *Plcx3* und *Dact1* in der Microarray-Analyse, die das Expressionsniveau der Gene am E13,5 mit dem am E18,5 verglich, eine Veränderung des Expressionsniveaus um mindestens den Faktor 2 aufwies, konnte nur für *Cxcl12*, *Plcx3* und *Dact1* eine deutlich abgeschwächte Expression am E16,5 erkannt werden (*Abbildung 6.4.2.2D* und *F; G* und *I*). Um mindestens diesen Faktor 2 unterschieden sich auch die Verhältnisse der Expressionsniveaus von *Cxcl12*, *Car3*, *Epha7* und *Plcx3* in *Tbx18*-homozygoten und *Tbx18*-heterozygoten Ureteren (Tabelle 6.4.1).

Aus dieser Gruppe der intrazellulären Komponenten und der interzellulären Kommunikation wurden nur *Car3* und *Pdgfra* als spezifisch im Ureter exprimierte Gene in der Online-Datenbank genepaint.org aufgeführt. In der Datenbank gudmap.org befand sich ein Eintrag, dass *Pdgfra* spezifisch im Ureter exprimiert ist. *Epha7* war als einziges Gen dieser Gruppe in eurexpress.org als Gen mit spezifischer Expression im Ureter annotiert.

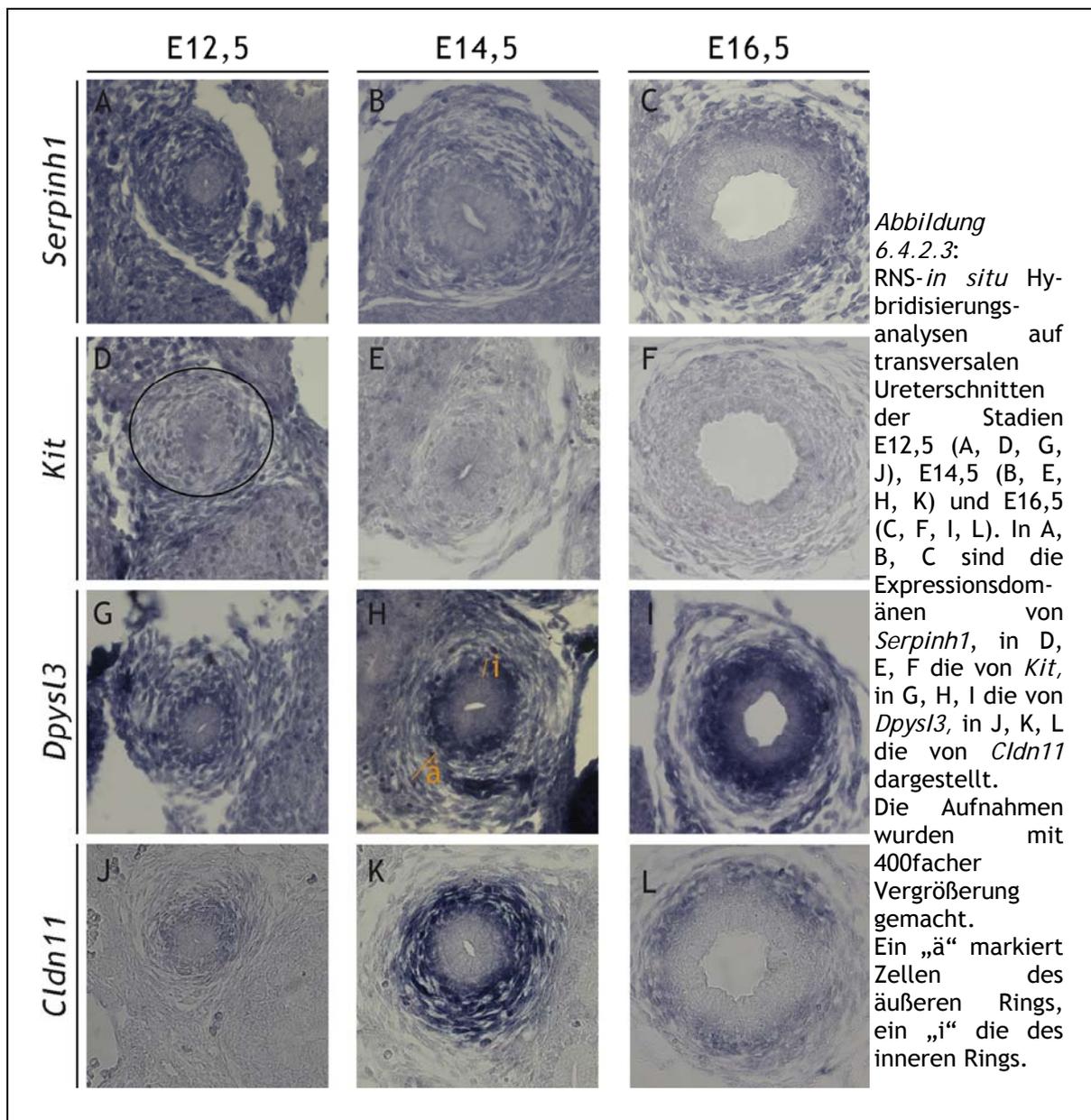


Eine weitere Gruppe von Genen kodiert für Proteine, die mit Membranen assoziiert sind, wie *Serpinb1* (**Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1**), *Kit* (**Kit oncogene**), *Dpysl3*

(Dihydropyrimidinase-like 3) und *Cldn11* (Claudin 11).

Beispielsweise wurde *Serpinh1* ab E12,5 im Uretermesenenchym exprimiert. Die Expression um das Ureterepithel war bis E16,5 nachweisbar (Abbildung 6.4.2.3A, B, C). Die Expressionsdomäne von *Kit* unterschied sich deutlich von der der anderen analysierten Gene. Seine Transkripte wurden mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen ab E12,5 im Mesenchym um das Uretermesenenchym nachgewiesen. In den Stadien E14,5 und E16,5 war keine Expression mehr zu erkennen (Abbildung 6.4.2.3D, E, F). *Dpysl3* wurde wie *Dpysl4* (Daten nicht gezeigt, Nolte, 2010) ab E12,5 im Uretermesenenchym exprimiert, seine Expression war ab E14,5 auf den inneren Ring des Mesenchyms restringiert (Abbildung 6.4.2.3G, H, I).

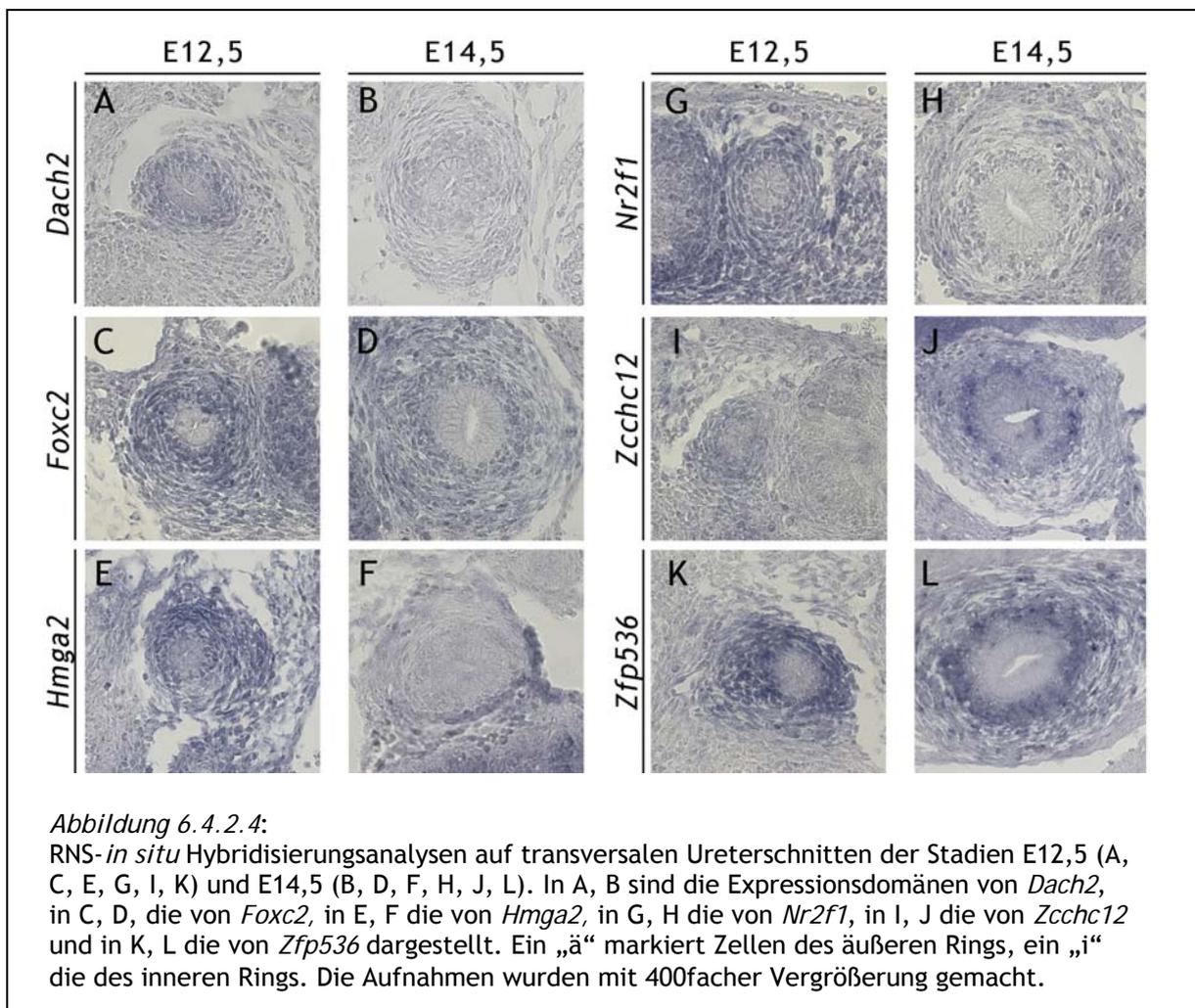
Ebenso war die *Cldn11*-Expression ab E12,5 im Mesenchym zu detektieren. Sie war am E14,5 und am E16,5 auf den inneren Ring begrenzt (Abbildung 6.4.2.3J, K, L). Die Expressionsniveaus



der Gene dieser Gruppe waren in den durchgeführten Microarray- Analysen nicht verändert. Lediglich die *Cldn11*-Expressionsniveaus unterschieden sich zum einen zwischen der Situation in *Tbx18*-homozygoten Mutanten und *Tbx18*-heterozygoten Mutanten und zum anderen zwischen der Situation im nicht-differenzierten Ureter und der im differenzierten Ureter (Tabelle 6.4.1).

In der Datenbank genepaint.org wird das Gen *Serpinh1* als ureterspezifisch exprimiertes Gen geführt. *Cldn11* und *Kit* sind in der Datenbank eurexpress.org in der Liste der ureterspezifisch exprimierten Gene annotiert (Tabelle 6.4.1).

Die letzte Gruppe von Genen, die eine spezifische Expression im Uretermesenchym aufwiesen, besteht aus Genen von Transkriptionsfaktoren wie *Dach2* (**D**achshund **2**), *Foxc2*, *Hmga2* (**H**igh mobility group **A**T-hook **2**) oder *Nr2f1* (**N**uclear receptor subfamily **2**, group **F**, member **1**) und Genen wie *Zcchc12* (**Z**inc finger, **C**CHC domain containing **12**) oder *Zfp536* (**Z**inc finger protein **536**), die für Proteine kodieren, die aufgrund ihrer Primärstruktur wahrscheinlich an die DNS binden. In den hier durchgeführten Untersuchungen war die Expression von *Dach2*, *Hmga2* und *Nr2f1* nur am E12,5 nachzuweisen (Abbildung 6.4.2.4A und B; E und F ;G und H). Dagegen war die Expression von *Foxc2*, *Zcchc12* und *Zfp536* sowohl am E12,5 als auch am E14,5 detektierbar



(Abbildung 6.4.2.4C und D; I und J; K und L).

Alle Gene dieser Transkriptionsfaktoren oder möglicher Transkriptionsfaktoren wiesen ein deutlich geringeres Expressionsniveau beim E18,5 als beim E13,5 auf. Das Verhältnis der beiden Niveaus unterschied sich für diese Gruppe mindestens um den Faktor 5. Nur für *Zfp536* zeigte die Microarray- Analyse, die die Expression am E13,5 in Ureteren von *Tbx18*-homozygoten Mutanten mit der von *Tbx18*-heterozygoten Mutanten verglich, ein um den Faktor 2 reduziertes Expressionsniveau (Tabelle 6.4.1). Keines der Gene, deren Expressionsdomäne im Ureter in *Abbildung 6.4.2.4* dargestellt ist, wurde in einer der Expressionsdomänen-Datenbanken als spezifisch im Ureter exprimiertes Gen annotiert.

7. Diskussion

7.1. Analysen zum Zusammenspiel Smo-Bmp4-Smad4 im Uretermesenenchym

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenenchym zur Manifestation von bilateralen Hydroureteren führte. Diese wurden nicht durch den Verschluss des Übergangs des Ureters zur Blase hervorgerufen, sondern beruhten auf dem Verlust der Differenzierung der glatten Muskulatur durch die Abwesenheit der *Myocd*-Expression. Ebenso wurde *Id2* als ein Zielgen von Bmp4 und der dadurch aktivierten Smad-Signalkaskade im Uretermesenenchym identifiziert.

Die Deletion von *Smad4* im Uretermesenenchym führte ebenfalls zum Auftreten von Hydroureteren, allerdings waren diese meistens nur auf den proximalen Ureter beschränkt. Im Gegensatz zu *Bmp4*-mutanten Individuen konnte in den *Smad4*-mutanten Individuen die Expression von Muskel-spezifischen Genen zunächst nachgewiesen werden, *Myocd* wurde jedoch erst verspätet exprimiert. *Id2*-Expression konnte im Gegensatz zu *Myocd*-Expression in *Smad4*-mutanten Individuen im Uretermesenenchym nicht mehr nachgewiesen werden. Dies spricht für mindestens eine weitere Signalkaskade, die im Uretermesenenchym durch Bmp4 aktiviert wird.

Ferner konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Smo* im Uretermesenenchym ebenfalls zum Verlust der glatten Muskulatur und zum Auftreten von Hydroureteren führte. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Hh- abhängig nicht nur die Expressionen von *Bmp4* und *Ptc1* reguliert werden, sondern auch die von *Gata2*.

7.2. Der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenenchym führte zum Verlust der glatten Muskulatur des Ureters

In der Literatur werden verschiedene Funktionen von Bmp4 während der Entwicklung des Ureters diskutiert. In Organkulturen ist Bmp4 für die Differenzierung der glatten Muskulatur notwendig bzw. diese wird durch Bmp4-Applikation in Organkulturen vom E11 verfrüht induziert (Raatikainen-Ahokas et al., 2000; Miyazaki et al., 2003; Brenner-Anantharam et al., 2007; Wang et al., 2009). Somit ist Bmp4 in Organkulturen für die Differenzierung des Mesenchyms zur glatten Muskulatur notwendig (Brenner-Anantharam et al., 2007). Als weitere Funktionen von Bmp4 während der Ureter- und Nierenentwicklung werden sein Einfluss auf die Position der Ureterknospe vom Wolffschen Gang, auf das Verzweigungsmuster der Ureterspitzen sowie auf das Aggregationsverhalten des Uretermesenenchyms um den Ureterstamm benannt (Miyazaki et al., 2000; Michos et al., 2004; Michos et al., 2007 und Miyazaki et al., 2003). Ferner soll Bmp4 das Knospen des Ureterstamms inhibieren und dessen Elongation positiv beeinflussen (Miyazaki et al., 2000; Miyazaki et al., 2003; *Abbildung 4.6.2*).

Der Verlust von *Bmp4* im Uretermesenchym führte bei dem hier verwendeten Mausstamm zum bilateralen Auftreten von Hydroureteren, deren Urothel nicht mit einem Ring aus glatten Muskelzellen umgeben war (Abschnitt 6.1.2). Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass der *Bmp4*-Verlust im Uretermesenchym nicht zu einem Verschluss des Ureters (Ureteratresie oder Ureterozele) führte, sondern dass das Ureterlumen in das der Blase überging. Das Auftreten der Hydroureteren in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym ging also nicht auf einen Verschluss des Ureters zurück, wie dies für den Verlust von *Ptprs* und *Ptprf* (**P**rotein **t**yrosine **p**hosphatase, **r**eceptor type **S** und type **F**) beschrieben wird (Uetani et al., 2009). Allerdings ist eine Abweichung des Ureter-Übergangs in die Blase im Gegensatz zu dem im Wildtyp nicht auszuschließen. Inwieweit die Position der Uretereinündung in die Blase von Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym von der im Wildtyp abweicht, müssen noch weitere Analysen den Ureter-Blasen-Übergang betreffend klären werden.

Fehlerhafte Positionen der Ureter-Insertion in die Blase werden nach dem Modell von Mackie und Stephens (1975) durch eine abweichende Lage der Ureterknospen vom Wolffschen Gang verursacht. In heterozygoten *Bmp4*-Mutanten konnte bereits gezeigt werden, dass die Ureterknospe in etwa der Hälfte der getesteten Embryonen kranial gegenüber der Wildtyp-Situation verschoben ist (Miyazaki et al., 2000). Beim Verlust des *Bmp4*-Antagonisten Gremlin kann keine Unterknospe gebildet werden (Michos et al., 2004). Die entsprechenden Ergebnisse für die Bestimmung der Ureterknospenposition für die *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym stehen noch aus. Aufgrund der Tatsache, dass der Phänotyp, der durch die *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym hervorgerufen wurde, einheitlich ist, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es in allen Individuen mit *Bmp4*-Verlust im Uretermesenchym zu einer kranialen Verschiebung der Ureterknospe kommt.

In der Annahme, dass *Bmp4* das Knospen des Ureterstamms unterdrücken und das Längenwachstum des Ureters stimulieren würde (Miyazaki et al., 2000), sollte in den Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym ein verkürzter Ureterstamm bzw. Ureter fissus nachzuweisen sein. In den hier durchgeführten Analysen konnte allerdings zu keinem Zeitpunkt der Ureterentwicklung eine deutliche Verkürzung des Ureterstamms oder das Auftreten eines Ureters fissus beobachtet werden. In ihrer Publikation aus dem Jahr 2003 vermuteten Miyazaki und seine Kollegen ferner, dass *Bmp4* die Aggregation des Mesenchyms zum Ureterstamm hin induziert. Die sich daraus ableitende Hypothese, dass in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym das Mesenchym nicht um den Ureterstamm kondensiert, konnte nicht bestätigt werden. Sowohl am E12,5 als auch am E14,5 konnten keine Unterschiede in den mesenchymalen Zellpopulationen zwischen transversalen Ureterschnitten vom Wildtyp und Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym nachgewiesen werden.

Bmp4 beeinflusst wahrscheinlich während der Ureterentwicklung die Position der Ureterknospen vom Wolffschen Gang und ist für die Initiierung der Muskeldifferenzierung notwendig. Der Verlust der Expression der Markergene für die glatte Muskulatur konnte mit dem Verlust der *Myocd*-Expression korreliert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die *Id2*-Expression in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym ab E12,5 deutlich reduziert war.

7.3. Bmp4-abhängige Muskeldifferenzierung wurde nicht ausschließlich über die Smad4-abhängige Signalkaskade vermittelt

In der hier vorgelegten Arbeit konnten die *in vitro* Daten, die von Brenner-Anantharam et al. (2007) und Wang et al. (2009) vorgelegt wurden, auch hier für die Situation *in vivo* bestätigt werden: Bmp4 ist für die Differenzierung des Uretermesenchyms zur glatten Muskulatur notwendig. Die von Wang et al. (2009) präsentierten Daten, die zum einen auf dem *Bmp4*-Verlust durch eine ubiquitär exprimierte, Östrogen-induzierbare cre-Rekombinase und zum anderen auf der reduzierten Bmp4-Aktivität durch die Applikation des Bmp4-Inhibitors Noggin beruhen, zeigten, dass dies in ihrem System ein reduziertes Niveau von phosphorylierten R-Smads (Smad1,

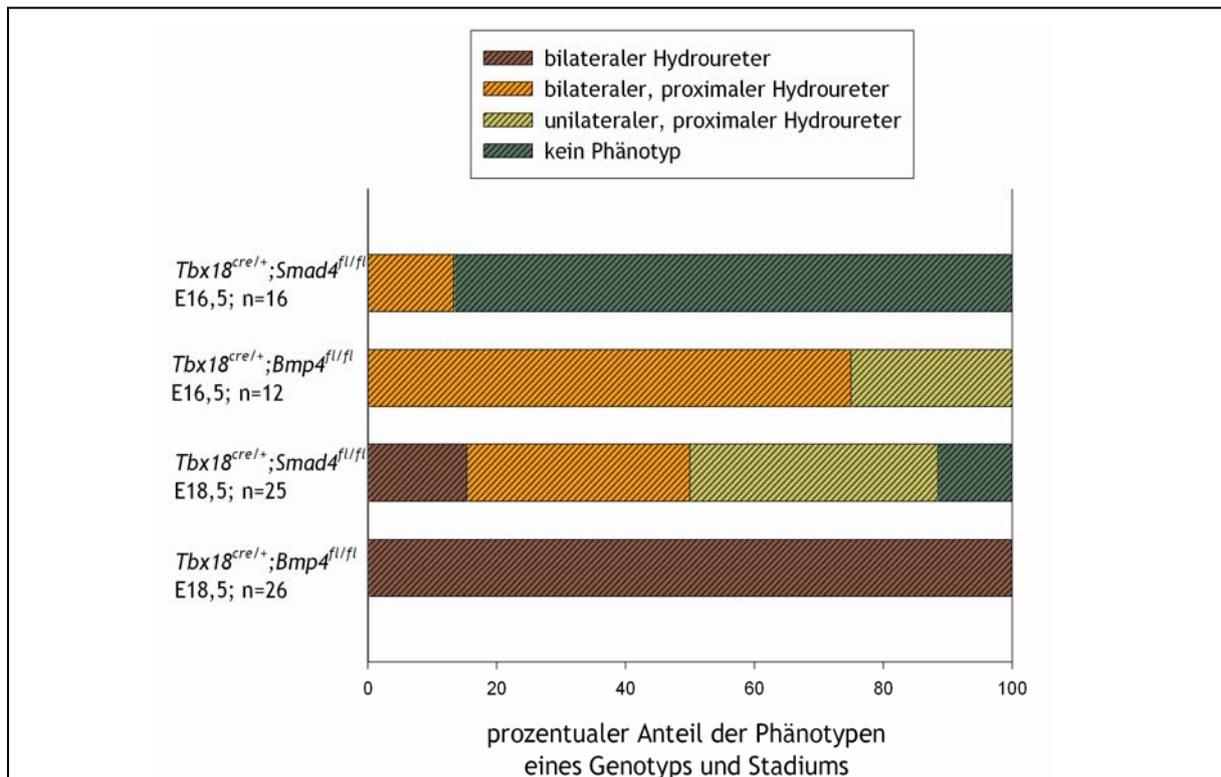


Abbildung 7.3.1:

In dem hier abgebildeten Stapeldiagramm sind die auftretenden Phänotypen den Kategorien bilateraler Hydroureter (braun), bilateraler, proximaler Hydroureter (orange), unilateraler, proximaler Hydroureter (hellgrün) und ohne morphologische Abweichungen (dunkelgrün) zugeordnet. Der prozentuale Anteil einer jeden Kategorie der Entwicklungsstadien E16,5 und E18,5 und der Genotypen *Tbx18^{cre/+}; Bmp4^{fl/fl}* und *Tbx18^{cre/+}; Smad4^{fl/fl}* ist hier dargestellt.

5, 8) bedingt. Daraus schlossen sie, dass die Bmp4-abhängige Muskeldifferenzierung von aktivierten R-Smads abhängig ist (Wang et al., 2009).

Durch gezielte Deletion des Co-Smad *Smad4* im Uretermesenchym können aktivierte R-Smads nicht mehr im Zellkern lokalisiert werden und die Signalkaskade ist unterbrochen. Zum Testen der These, dass die Bmp4-vermittelte Differenzierung des Mesenchyms zur glatten Muskulatur über die Smad-Kaskade verläuft, wurden Individuen mit *Smad4*-Verlust im Uretermesenchym analysiert. Wie in Abschnitt 6.2 dargestellt, wiesen Individuen mit *Smad4*-Verlust im Uretermesenchym zwar einen Hydroureter auf, doch waren die morphologischen Veränderungen nicht einheitlich und weniger stark als durch den Verlust von *Bmp4* (*Abbildung 7.3.1*). Ein einheitlicher Phänotyp (bilateral auftretende Hydroureteren) wäre zu erwarten, wenn die Bmp4-induzierte Muskeldifferenzierung einzig über die Smad4-abhängige Kaskade vermittelt würde. Der Vergleich der Häufigkeit der verschiedenen Ausprägungen der Hydroureteren in Individuen mit *Bmp4*- bzw. *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym am E16,5 und E18,5 ergab, dass sowohl am E18,5 als auch am E16,5 in Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym keine einheitlichen, morphologischen Veränderungen auftraten (*Abbildung 7.3.1*). Ferner wurde deutlich, dass die Veränderungen in Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym im Gegensatz zu denen mit *Bmp4*-Deletion erst am E18,5 und kaum am E16,5 nachweisbar waren (*Abbildung 7.3.1*). Daraus lässt sich ableiten, dass nur ein Teil der Bmp4-Funktion Smad4-abhängig vermittelt wird. Da hier kein einheitliches Spektrum von Phänotypen zwischen den beiden Genotypen auftrat und da Smad4 auch Teil der Tgf β -induzierten Smad-Signalkaskade ist (*Abbildung 4.6.1*; Goumans et al., 2009), kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym ein späterer Tgf β -induzierter Prozess gestört wird. Um dies zu klären, müssen in zukünftigen Organkultur-Experimenten Tgf β -induzierte Prozesse durch Applikation eines Inhibitors unterdrückt und mit Kulturen von *Smad4*-mutanten Individuen verglichen werden.

Bereits im Vorfeld wurde gezeigt, dass die Deletion von *Smad4* im Epithel zu keinerlei morphologischen Veränderungen führt (Oxburgh et al., 2004). Darüber hinaus wirkt sich der Verlust des Bmp4-Rezeptors *Alk3* (Activin like kinase, BmpR-Typ I) im Ureterepithel auf die Verzweigungsmorphogenese der Ureterspitzen aus, jedoch wurden keine Auffälligkeiten bezogen auf den Ureterstamm beschrieben (Hartwig et al., 2008). Selbst die Expression einer konstitutiv aktiven Rezeptorvariante von *Alk3* im Ureterepithel führt zu keinen morphologischen Veränderungen des Ureterstamms (Hu et al., 2003).

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Deletion von *Bmp4* im Uretermesenchym der Proliferationsindex des Epithels in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym auf die Hälfte des Wildtypwerts reduziert war (Abschnitt 6.1.8). Auf dieses

Ergebnis wird in Abschnitt 7.6 noch einmal eingegangen werden. Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass trotz der Daten von Hu et al. (2003) und Hartwig et al. (2008) doch ein Bmp4-Signal direkt oder indirekt aufs Epithel wirkt.

Neben dem kanonischen, Smad-abhängigen Bmp-Signalweg gibt es auch den MAPK (**Mitogen-activated protein kinases**)-abhängigen Bmp-Signalweg (*Abbildung 7.3.2*). Hierbei aktiviert das Tetramer aus BmpRI und BmpRII einen Komplex aus Xiap (**X**-linked inhibitor of **apoptosis**), Tab (**TGF β activated kinase 1/MAP3K7 binding protein**) und Tak (**Tgf β activated kinase**). Dieser wiederum phosphoryliert und aktiviert damit auf der einen Seite p38 (**p38**-mitogenaktivierte Proteinkinase) und auf der anderen Seite Jnk (**J**un **N**-terminale **K**inase). Diese beiden Kinasen (MAPK) sorgen für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Ets1 (**E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain**), Jun (**J**un oncogene) und Atf2 (**A**ctivating **t**ranscription **f**actor **2**). Vermutungen über das Kappen-Mesenchym der Niere besagen, dass sowohl die Smad-Kaskade als auch die MAPK-Kaskade aktiv ist, jedoch durch die beiden Kaskaden jeweils unterschiedliche, biologische Funktionen vermittelt werden (Oxburgh et al., 2011). In der Literatur wird beschrieben, dass für die Vermittlung der Tgf β -Funktion während der Zahn- und der Gaumenentwicklung sowohl die Smad4-abhängige Signalkaskade als auch die p38-MAPK-Kaskade notwendig sind und bei diesem Entwicklungsvorgang redundante Funktionen haben (Xu et al., 2008). Ob p38 für die Differenzierung des Uretermesenchyms zur glatten Muskulatur notwendig ist, werden zukünftige Nierenkulturexperimente aus Wildtyp-Individuen (Bmp4-Funktion nur über p38) bzw. aus Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym (p38 und Smad-Signalkaskade redundant) mit dem p38-Inhibitor SB203580 zeigen können.

Für die Differenzierung des Lungenmesenchyms zur glatten Muskulatur wird Bmp4 ebenfalls als auslösendes Signal diskutiert (Morrisey und Hogan, 2010), da durch die epitheliale *Bmp4*-Überexpression die Differenzierung des Mesenchyms induziert wird (Mailleux et al., 2005). Über welche intrazelluläre Signalkaskade dies vermittelt wird, bleibt noch zu klären. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang auch ein Zusammenspiel der Smad-abhängigen und der Jnk-abhängigen Kaskade (Jeffery et al., 2005). Die Stimulation von HFL-Zellen (**H**uman **f**etal **l**ung **f**ibroblasts) mit Bmp4 induziert die Expression von *Acta2* und *Myb11* und inhibiert gleichzeitig die Zellproliferation (Jeffery et al., 2005). Es konnten gezeigt werden, dass nach Bmp4-Stimulation die phosphorylierten Formen von Smad-, p38-, Erk1/2- (**E**xtracellular signal **r**egulated **k**inase **1/2**) und Jnk-Proteinen nachzuweisen sind. Allerdings hat nur die Inhibitionen der Smad-abhängigen und der Jnk-abhängigen Kaskade Auswirkung auf das Expressionsniveau von *Acta2* (Jeffery et al., 2005). Auch der Einfluss der Bmp4-stimulierten Jnk-vermittelten Kaskade auf die

Differenzierung des Uretermesenchyms muss in nachfolgenden Organkultur-Experimenten analysiert werden.

Neben den zusätzlichen, durch Bmp4 stimulierten Signalkaskaden wie der p38-Mapk- oder Jnk-Kaskade gibt es Anhaltspunkte für eine Smad-abhängige, nicht kanonische Signalkaskade, deren Beteiligung an der Differenzierung der glatten Muskulatur in Zellkulturen gezeigt werden konnte (Davis et al., 2008). Davis und Kollegen konnten einen Zusammenhang von Bmp, R-Smad und Muskeldifferenzierung auf der einen Seite und der Reifung der miR21 (**microRNS-21**) auf der anderen Seite herstellen. Dabei wird durch miR21 die Translation von *Pdcd4* (**P**rogrammed **c**ell **d**eath **4**), einem Inhibitor der Muskeldifferenzierung, reduziert (Davis et al, 2008). An der Reifung von prä-miR21 zu miR21 sind die RNS-Helikase p68, eine Komponente des DICERs, und phosphoryliertes R-Smad beteiligt. Durch Bmp- Stimulation bildet sich der Komplex für das Spleißen der prä-miR21 zu miR21. Dieser Schritt der Muskelinitiierung ist von der RNS-Polymerase II und damit der Transkription unabhängig und bedarf nicht der Beteiligung von Smad4 (Davis et al., 2008).

Inwieweit dieser Mechanismus für die Bmp4-abhängige Differenzierung des Uretermesenchyms zur glatten Muskulatur relevant ist, muss in nachfolgenden Untersuchungen bestimmt werden. Als Anhaltspunkte könnten das mittels RT-PCR ermittelte Expressionsniveau und die

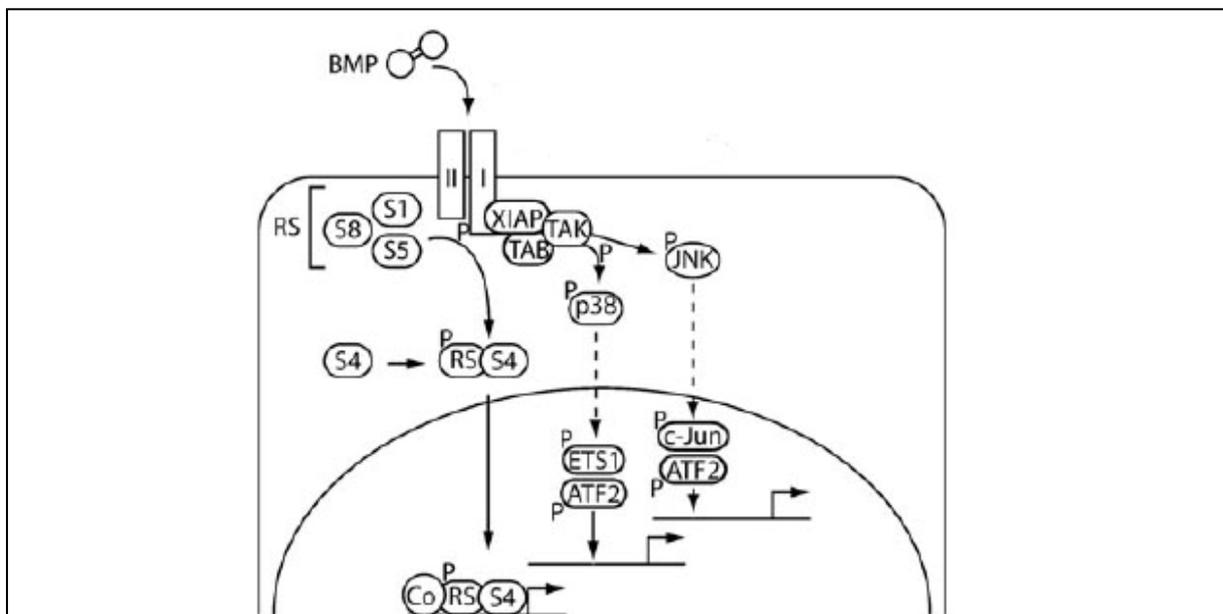


Abbildung 7.3.2:

Bmp bindet als Dimer an die BmpRI und II (I und II). BmpRII wird phosphoryliert von BmpRII, dadurch werden zwei Signalkaskaden aktiviert. Zum einen werden R-Smads (Smad1, 5, 8, hier RS) phosphoryliert, die mit Smad4 (S4) assoziieren; dieser Komplex transloziert in den Nucleus und stimuliert mit Co-Faktoren die Expression von Zielgenen. Zum anderen wird der Komplex aus TAK, TAB und XIAP aktiviert. Dieser sorgt auf der einen Seite für die Phosphorylierung von p38 und auf der anderen für die von Jnk. Diese wiederum aktivieren die Transkriptionsfaktoren (ETS1 oder c-Jun). Schema entnommen aus Oxburgh et al., 2011.

Expressionsdynamik von *Pdcd4* im Wildtyp und in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym dienen.

Zum derzeitigen Stand der Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, dass die *Bmp4*-induzierte Muskeldifferenzierung ausschließlich über die kanonische Smad-Kaskade verläuft. Weitere Analysen sind notwendig, um die molekularen Mechanismen und Kaskaden für die Differenzierung des Uretermesenchyms zur glatten Muskulatur im Detail zu verstehen.

7.4. Die Deletion von *Bmp4* im Uretermesenchym führte zum Verlust der *Myocd*-Expression im Ureter

In den hier vorgestellten Daten konnte der Verlust der glatten Muskulatur in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym in Korrelation zu der bis an die Nachweisgrenze reichenden Reduktion der *Myocd*-Expression gesetzt werden. *Myocd* ist als Schlüsselgen der Differenzierung der glatten Muskulatur und der Herzmuskulatur beschrieben. Die ektopische *Myocd*-Expression induziert die Expression von Genen der glatten Muskulatur (Chen et al., 2002; Small et al., 2004). Die Deletion von *Myocd* bedingt frühe, embryonale Letalität aufgrund fehlender glatter Muskulatur der Blutgefäße am E10,5 (Li et al., 2003). Die Funktion von *Myocd* im Uretermesenchym für die Differenzierung der glatten Muskulatur des Ureters ist zwar noch nicht als solche analysiert, doch legen die Ergebnisse von Li et al. (2003) und Chen et al. (2002) auf der einen Seite und die *Myocd*-Expression im Uretermesenchym auf der anderen Seite nahe, dass *Myocd* auch im Ureter als Schlüsselgen die Differenzierung der glatten Muskulatur steuert.

Myocd bindet als Komplex mit *Srf* an die CArG- Motive, durch die die Expressionen der meisten Gene der glatten Muskulatur reguliert werden, und sorgt damit für ihre Expression. *Myocd*-Expression gilt als ein früher Marker für glatte Muskelzellen und für Herzmuskulatur, der notwendig und ausreichend für deren Differenzierung ist (Li et al., 2003; Small et al., 2004).

Deshalb wurde untersucht, wie die *Myocd*-Expression selbst reguliert wird. Dazu wurde in der genomischen *Myocd*- Sequenz nach cis- regulatorischen Elementen in einer Region gesucht, die 70 kb vor und nach 20 kb nach dem Startkodon liegt (Creemers et al., 2006). Dabei wurde ein 0,35 kb umfassender DNS-Bereich identifiziert, der für die *Myocd*-Expression nur in den Herzmuskelzellen und den glatten Muskelzellen der dorsalen Aorta und der Blutgefäßen zum Kopf ausreichend ist. Der Bereich, der für die *Myocd*-Expression im Uretermesenchym notwendig ist, wurde nicht identifiziert (Creemers et al., 2006). Darüber hinaus wurde die Aktivierung des *Myocd*- Promotors durch die Transkriptionsfaktoren Mef2 (**M**yocyte **e**nhancer **f**actor **2**), Tead (**T**EA **d**omain family) und Foxo gezeigt (Creemers et al., 2006). Die Regulation der *Myocd*-Expression im Uretermesenchym ist demnach unabhängig von den cis- regulatorischen Elementen der *Myocd*-Expression der Kardiomyozyten und der glatten Muskulatur der dorsalen Aorta. Es kann daher sein, dass die Faktoren, die durch die *Bmp*- induzierte Kaskade aktiviert

werden, an ein davon unabhängiges Enhancer- Element des *Myocd*- Gens binden und dieses maßgeblich beeinflussen.

Für die *Myocd*- abhängige Regulation der Expression von Genen der glatten Muskulatur werden neben der Interaktion von *Myocd* und *Srf* noch andere Regulationsmechanismen diskutiert. So ist eine Interaktion von *Myocd* mit Tgf β - aktiviertem Smad3 bereits für den *Tagln*- Promotor nachgewiesen (Qiu et al., 2005). In ihrer Arbeit präsentierten Qiu und Kollegen Daten, die für eine direkte Interaktion von *Myocd* und Smad3 sprechen, die den *Tagln*-Promotor synergetisch unabhängig von der CArG- Sequenz aktivieren. Des Weiteren ist die synergetische, CArG-abhängige Aktivierung des *Anf*- Promotors durch Smad1 und *Myocd* in Kardiomyozyten beschrieben, ebenso wie die gesteigerte Expression von *Myocd* und *Mef2* in Kardiomyozyten nach Bmp2-Stimulation (Callis et al., 2005). Ob die durch Bmp2 stimulierte *Myocd*-Expression direkt durch eine Bmp- Signalkaskade gesteuert wird oder ob durch Bmp- Stimulation die *Mef2*-Expression angeregt wird und dies zur *Myocd*-Expression führt, wurde nicht geklärt.

Über die Interaktion von *Myocd* mit Smad- Proteinen konnten in dieser Arbeit keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, jedoch konnte die Abhängigkeit der *Myocd*- Expression von Bmp durch die hier gezeigten *in vivo* gewonnenen Daten untermauert werden. Es bleibt allerdings ungeklärt und bedarf weiterer Analysen, ob im Uretermesenchym die Bmp4-induzierte Signalkaskade zu einer direkten Regulation des *Myocd*- Enhancers führen oder ob dies im Ureter über einen Zwischenschritt, die Regulation eines zusätzlichen Transkriptionsfaktors, erfolgt. Da es zu einer Verzögerung der *Myocd*-Expression in den Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym kommt und nicht zu einem Verlust dieser, scheint die kanonische Smad-Kaskade die Initiation der *Myocd*-Expression – direkt oder indirekt – zu unterstützen, ist jedoch für diese nicht notwendig.

7.5. Bmp4 regulierte Smad4-abhängig die *Id2*-Expression im Uretermesenchym

Id-Gene kodieren für Proteine mit bHLH- Motiv (**basic helix-loop-helix**) jedoch ohne DNA-Bindedomäne. Sie interagieren mit bHLH- Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise MyoD oder Tcf21 (**T**ranscription **f**actor **21**) und verhindern durch Wechselwirkung mit ihnen deren Bindung an die DNA. Dies führte zu der Bezeichnung **I**nhibitor der **D**NA-Bindung bzw. **I**nhibitor der **D**ifferenzierung. Neben den *Msx*-Genen gelten die *Id*-Gene als Zielgene des aktiven Bmp-Signalwegs.

Während der Ureterentwicklung war *Id2*-Expression ab E12,5 nachzuweisen. Wie in den Abschnitten 6.1.6 gezeigt wurde, war in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym am E14,5 die Expression von *Id2* im Uretermesenchym und Epithel auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau reduziert. BRE- Sequenzen (**B**mp **r**esponsive **e**lement) für dieses Gen

konnten von Nakahiro und Kollegen (2010) identifiziert werden. Sie konnten außerdem nachweisen, dass Smad- Proteine nach Stimulation des Signalwegs durch Bmp6 an diese Sequenzmotive des *Id2*-Gens in C2C12-Zellen binden. Diese Regulation des *Id2*-Gens durch Bmp ließ sich in den hier verwendeten Individuen mit *Bmp4*-Verlust im Uretermesenchym bestätigen. Durch den Verlust der *Id2*-Expression ausschließlich im Uretermesenchym von Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym wurde auch die Smad- abhängige Regulation dieser Genexpression verifiziert. Die zuvor *in vitro* gezeigte Regulation kann also auf den Ureter übertragen werden: *Id2*-Expression wird von Bmp4 über die Smad4-abhängige Signalkaskade nicht nur in C2C12 sondern auch im Uretermesenchym reguliert.

In Mäusen führt der Verlust von *Id2* zu meist unilateral manifesterter Hydronephrose (Aoki et al., 2004). Wie im Fall von *Bmp4* reicht für das Auftreten dieser der Verlust von nur einem Allel aus, allerdings ist dann die Frequenz verringert. Im Gegensatz zu den anderen bisher hier beschriebenen Mausmutanten für CAKUT tritt die Hydronephrose bei *Id2*^{+/-} bzw. *Id2*^{-/-} Weibchen seltener auf als bei Männchen des gleichen Genotyps. Ebenso wie bei Individuen mit *Bmp4*-Verlust im Uretermesenchym sind die ersten morphologischen Unterschiede von Wildtyp- und *Id2*-Verlustmutanten am E16,5 zu erkennen, allerdings handelt es sich hier um eine Vergrößerung des Nierenbeckens und der Übergang vom Nierenbecken zum Ureter erscheint gebogen. Als Grund für die Hydronephrose benennen die Autoren allerdings hypertrophe Strukturen der glatten Muskulatur und vermuten eine Bmp4 untergeordnete Funktion (Aoki et al., 2004).

Diese Vermutung konnte durch die hier gezeigten Ergebnisse bestätigt werden. Der von Aoki und Kollegen (2004) beschriebene Phänotyp ist jedoch nicht mit dem hier beschriebenen Phänotyp von Individuen mit *Bmp4*- oder *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym identisch: In *Id2*-Verlustmutanten konnte neben anderen Abweichungen auch der Nachweis von glatter Muskulatur erbracht werden. *Id2* reguliert also wahrscheinlich nur einen Teil der Bmp4-Funktion während der Nieren- und Ureterentwicklung. Falls Gene mit redundanter Funktion im Ureter exprimiert werden, könnte dies den abgemilderten Phänotyp in *Id2*-Verlustmutanten vermitteln. Geht man davon aus, dass andere *Id*-Gene wahrscheinlich auch von Bmp4-abhängig reguliert werden, sollten diese auch in Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym nicht im Ureter exprimiert werden. Dies könnte erklären, warum durch den Verlust von *Id2* und *Bmp4* abweichende morphologische Veränderungen verursacht werden.

Offen bleibt, mit welchen bHLH-Transkriptionsfaktoren *Id2* im Uretermesenchym interagiert und an welchen Bmp4-abhängigen Prozessen es beteiligt ist. Auszuschließen ist, dass *Id2* an der Regulation von *Myocd* in bedeutendem Umfang beteiligt ist, da in den Individuen mit *Smad4*-Deletion im Uretermesenchym zwar die *Id2*-Expression verloren geht, nicht aber die von *Myocd*

und da in *Id2^{-/-}* Individuen die Differenzierung des Mesenchyms zur glatten Muskulatur stattfindet.

7.6. Der Hh-Signalweg induzierte die *Bmp4*-Expression im Ureter-mesenchym

Wie auch schon aus Analysen von *Drosophila melanogaster* bekannt, reguliert die Hh-Signalkaskade neben der Proliferation vieler Vorläuferzellpopulationen auch die Expression von *dpp* (**D**ecapentap**l**egic), dem Homolog von *Bmp4* (Ingham und McMahon, 2001). Im Gegensatz zur Situation in *Drosophila melanogaster* existieren in der Maus nicht nur ein Hh-Ligand sondern drei (Ingham und McMahon, 2001). Für die Ureterentwicklung der Maus konnte bisher die Relevanz eines einzelnen Liganden, die von Shh, gezeigt werden (Yu et al., 2002). Nach Angaben von Yu und Kollegen (2002) wird Shh im Ureterstamm als einziger Ligand nachweisbar exprimiert. Sie beschreiben für die konditionelle Deletion von *Sbb* im Ureterepithel das Auftreten von Hydroureteren bei der Geburt. Zu diesem Zeitpunkt sind diese nicht mit dem Auftreten von Hydronephrosen assoziiert. Nach den Beschreibungen von Yu und Kollegen (2002) verzögert sich bei ihren Mutanten mit epithelialer *Sbb*- Deletion die Muskeldifferenzierung, sie ist aber am Ende der embryonalen Entwicklung nachweisbar.

Vergleicht man diesen Phänotyp mit den hier in Abschnitt 6.1 beschriebenen morphologischen und molekularen Veränderungen, so fällt auf, dass durch die Deletion von *Bmp4* im Uretermesenchym ein Verlust der molekularen Marker der glatten Muskulatur hervorgerufen wird. Es trat also eine stärkere Ausprägung des Phänotyps statt einer schwächeren auf, wie dies zu erwarten wäre, wenn ausschließlich Shh die *Bmp4*-Expression im Uretermesenchym regulierte. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung des Verlusts der kompletten Hh- Signalkaskade auf die Muskeldifferenzierung im Uretermesenchym analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass hierdurch ein Verlust der molekularen Marker der glatten Muskulatur am E16,5 und E18,5 verursacht wurde (Abschnitt 6.3). Der Vergleich der unterschiedlichen molekularen und morphologischen Veränderungen von Individuen mit *Bmp4*-Deletion bzw. *Smo*-Deletion im Uretermesenchym auf der einen Seite und dem epithelialen Verlust von *Sbb* auf der anderen Seite spricht dafür, dass die Hh- Signalkaskade die *Bmp4*-Expression steuert. Jedoch deuten die hier dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass es zu Beginn der Ureterentwicklung noch mindestens einen anderen Hh-Liganden bzw. eine andere Hh- Quelle geben muss, die die *Bmp4*-Expression kurzzeitig initialisiert. Denn mittels der zeitlich induzierbaren Deletion von *Bmp4* konnten Brenner-Anantharam und Kollegen (2007) zeigen, dass die Deletion von *Bmp4* nach E12,5 nicht mehr den Verlust der glatten Muskulatur des Ureters in Organkulturen verursacht.

Neben der verspäteten Muskeldifferenzierung konnten Yu und Kollegen (2002) auch eine Reduktion der Proliferation im Ureter schon am E14,5 nachweisen. Zum jetzigen Zeitpunkt der

Analyse stehen die Proliferations- und Apoptosedaten aus Individuen mit *Smo*- Deletion im Uretermesenchym zwar noch nicht zur Verfügung, jedoch zeigten die Hämatoxylin- Eosin-Färbungen der transversalen Ureterschnitte am E14,5 der Individuen mit *Smo*- Deletion im Uretermesenchym die verminderten Zellzahlen des Mesenchyms und des Epithels. Daraus lässt sich ableiten, dass die Hh- Signalkaskade die Proliferation des Mesenchyms und des Epithels steuert (*Abbildung 6.3.3.1C* und *D*). Die proliferationsfördernde Eigenschaft der Hh-Signalkaskade wirkt sich scheinbar zwischen E12,5 und E14,5 am gravierendsten aus, da am E12,5 noch keine offensichtlichen Unterschiede in der Morphologie zwischen Wildtyp und Individuen mit *Smo*-Deletion im Uretermesenchym zu erkennen waren, am E14,5 jedoch sehr deutliche.

In Individuen mit *Bmp4*-Deletion im Uretermesenchym konnte am E14,5 eine reduzierte Proliferation des Epithels nachgewiesen werden (Abschnitt 6.1.7). Dies führt zu der Hypothese, dass Shh und evtl. ein weiterer Hh-Ligand aus dem Epithel die Proliferation des Mesenchyms steuern und *Bmp4* als direkte oder indirekte Rückkopplung die Proliferation des Epithels an die des Mesenchyms anpasst. Es müsste also analysiert werden, inwieweit sich in Individuen mit *Smo*-Deletion im Uretermesenchym die Proliferationseigenschaften des Epithels, das in diesen Mutanten am E14,5 stark verkleinert ist, durch *Bmp4*-Applikation beeinflussen ließe. Für die Entwicklung des kranialen embryonalen Kopfdarms und der Lungenknospe konnte bereits die Relevanz von *Bmp4* auf die Proliferation der Gewebe gezeigt werden (Li et al., 2008).

Die Hh-Signalkaskade scheint die *Bmp4*-Expression zu regulieren, jedoch fehlen noch die Analysen früherer Entwicklungsstadien. Zu klären bleibt unter anderem, ob *Bmp4* im Mesenchym, das den Wolffschen Gang direkt umgibt und in dem *Bmp4* die kranial verschobene Ausbildung einer Ureterknospe inhibiert, in den Individuen mit *Smo*-Deletion im Uretermesenchym am E11 exprimiert wird. Dies würde dann einen falsch positionierten Übergang des Ureters in das Blasenlumen zur Folge haben. Dies bleiben vorerst offene Fragen, die in zukünftigen Experimenten geklärt werden müssen.

7.7. 29 Gene wurden spezifisch im Ureter exprimiert

Durch Kombination der Microarray- Analyse, einer Methode, die die Expressionsniveaus in zwei Bedingungen miteinander vergleicht, und der RNS-*in situ* Hybridisierungsanalyse, einer Methode die die räumliche Expression beschreibt, konnten Gene identifiziert werden, die spezifisch im Uretermesenchym exprimiert werden. Zur Begrenzung der zu untersuchenden Anzahl an Genen, deren Expressionsdomänen mittels RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen untersucht wurden, war es von Vorteil zwei sich ergänzende Bedingungen zu definieren, die jeweils in einer Microarray-

Analyse behandelt werden konnten. In diesem Fall war die erste formulierte Bedingung ein erhöhtes Expressionsniveau in nicht-differenzierten Ureteren gegenüber dem von differenzierten Ureteren. Die zweite formulierte Bedingung war, dass das Expressionsniveau in Ureteren des Entwicklungsstadium E13,5 von Wildtyp-Individuen gegenüber dem von *Tbx18*-Verlustmutanten erhöht sein sollte.

Um zu klären, ob ein Effekt durch den Verlust eines Gens erklärt werden könnte, wurde die Expression von redundanten Faktoren zusätzlich analysiert. Dadurch wurden zum Teil weitere Gene einer Familie mit gleicher Expressionsdomäne identifiziert, die eventuell einer abweichenden Regulation unterliegen. Dies könnte durch den Vergleich der Expressionsdomänen in den verschiedenen hier beschriebenen Mausmutanten geklärt werden.

In zukünftigen Analysen kann die daraus resultierende Ergebnisse dazu dienen, die molekularen Abweichungen in den hier beschriebenen Mutanten genauer zu charakterisieren und beispielsweise auf die verminderte Adhäsion bzw. veränderte Komposition der Extrazellulärmatrix zurückzuführen.

7.8. Molekulare Netzwerk der Ureterdifferenzierung

Die hier erworbenen Erkenntnisse sind mit den aus der Literatur bekannten Faktoren und den bereits dort beschriebenen Interaktionen in *Abbildung 7.8.1* zusammengefasst und legen ein neues Modell für das molekulare Netzwerk der Ureterdifferenzierung nahe, das die zentrale Rolle von *Bmp4* weniger betont.

Bei *Tbx18*-heterozygoten Individuen konnte nie das Auftreten von CAKUT oder ein verändertes Expressionsniveau von *Bmp4* oder *Ptc1* beobachtet werden (Airik et al., 2006), weshalb es als sehr unwahrscheinlich angesehen werden kann, dass die hier beschriebenen Veränderungen auf genetische Interaktionen von *Tbx18* und *Bmp4* oder *Ptc1* zurückzuführen sind.

Die hier präsentierten Daten ergeben, dass *Bmp4* bei der Differenzierung des Uretermesenchyms zur glatten Muskulatur eine zentrale Rolle zukommt. Der direkte oder indirekte Ansatzpunkt der *Bmp4*-induzierten Signalkaskade ist die Regulation der *Myocd*-Transkription, die den Schlüssel zur Differenzierung der glatten Muskulatur darstellt. In den letzten Jahren gewann die Regulation der *Myocd*-Expression im Uretermesenchym zunehmend an Bedeutung, da in immer mehr Mausmutanten der Verlust der glatten Muskulatur am Ureter mit dem Verlust von *Myocd*-Transkripten assoziiert wurde.

Die *Myocd*-Expression wird von den Transkriptionsfaktoren *Tshz3*, *Sox9* oder *Gata2* reguliert (Caubit et al., 2008; Airik et al., 2010; Blank, 2009). Für die *Tbx18*-mutante Situation wurde die *Myocd*-Expressionsdynamik zwar noch nicht beschrieben, weil es aber in der *Tbx18*-Verlustmutante zu einem Verlust von *Ptc1*, *Bmp4* und *Sox9* kommt, die alle direkt oder indirekt

Uretermesenchym vollständig unterdrückt.

Auch die zentrale Rolle des Hh-Signalwegs bei der Muskeldifferenzierung und bei der Aufrechterhaltung der Proliferation des Vorläufergewebes konnte in Abschnitt 6.3 bestätigt werden. Dabei reguliert der Hh-Signalweg die Differenzierung der glatten Muskulatur nicht nur durch die Aktivierung der *Bmp4*-Expression sondern auch durch die von *Gata2*. Dagegen konnten keine Belege für die Regulationsschleife von *Gata2*-*Bmp4* gefunden werden, wie dies von Hoshino und Kollegen (2008) vorgeschlagen und diskutiert wurde (Blank, 2009; Abschnitt 6.1).

Mithilfe der neu identifizierten Markergene für das Uretermesenchym können die Prozesse, die während der Entwicklung und Differenzierung in dieser Domäne stattfinden, genauer beschrieben werden. Durch die Analyse ihrer Expression in den hier vorgestellten Mausmutanten mittels der RNS-*in situ* Hybridisierungstechnik oder mittels RT-PCR kann ihre Regulation in die Kategorien nur *Bmp4*-abhängig oder nur Hh-abhängig regulierte Gene gruppiert werden. Dadurch kann das hier aufgestellte Schema weiter ergänzt und die Ureterentwicklung präziser beschrieben werden.

In zukünftigen Experimenten sollten die Unterschiede im Zellschicksal des Uretermesenchyms analysiert werden, die durch die Deletion von *Bmp4*, *Smo* oder *Smad4* verursacht werden. Ferner blieb bisher ungeklärt, inwieweit *Bmp4* und Hh die Adhäsion statt der diskutierten Aggregation des Uretermesenchyms vermitteln (Miyazaki et al., 2003).

Darüber hinaus können zukünftige Microarray- Analysen dazu dienen, weitere *Smad4*-, *Bmp4*- und *Smo*-regulierte Gene zu identifizieren. Dadurch wird es ermöglicht werden, die Effekte der Signalwege genauer zu differenzieren und damit ihre jeweilige Funktion im Uretermesenchym genauer voneinander abzugrenzen.

8. Literatur

Abe J-I. Bone morphogenetic protein (BMP) family, SMAD signaling and Id helix-loop-helix proteins in the vasculature: the continuous mystery of BMPs pleiotropic effects. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006;41(1):4-7.

Airik R, Bussen M, Singh MK, Petry M, Kispert A. Tbx18 regulates the development of the ureteral mesenchyme. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(3):663-674.

Airik R, Kispert A. Down the tube of obstructive nephropathies: the importance of tissue interactions during ureter development. *Kidney Int.* 2007;72(12):1459-1467.

Airik R, Trowe M, Foik A, Farin H F, Petry M, Schuster-Gossler K, Schweizer M, Scherer G, Kist R, Kispert A. Hydrourerteronephrosis due to loss of Sox9-regulated smooth muscle cell differentiation of the ureteric mesenchyme. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(24):4918-4929.

Aoki Y, Mori S, Kitajima K, Yokoyama O, Kanamaru H, Okada K, Yokota Y. Id2 haploinsufficiency in mice leads to congenital hydronephrosis resembling that in humans. *Genes Cells.* 2004;9(12):1287-1296.

Blank, P. Funktionelle Analyse von Gata2 in der Ureterentwicklung der Maus (2009)

Brenner-Anantharam A, Cebrian C, Guillaume R, u. a. Tailbud-derived mesenchyme promotes urinary tract segmentation via BMP4 signaling. *Development.* 2007; 134(10):1967-1975.

Brunskill EW, Aronow BJ, Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Aronow J, Kaimal V, Jegga AG, Yu J, Grimmond S, McMahon AP, Patterson LT, Little MH, Potter SS. Atlas of gene expression in the developing kidney at microanatomic resolution. *Dev Cell.* 2008, 15(5):781-91.

von Bubnoff A, Cho KWY. Intracellular BMP Signaling Regulation in Vertebrates: Pathway or Network? *Developmental Biology.* 2001; 239(1):1-14.

Bussen M, Petry M, Schuster-Gossler K, u. a. The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev.* 2004; 18(10):1209-1221.

Caubit X, Lye CM, Martin E, u. a. Teashirt 3 is necessary for ureteral smooth muscle differentiation downstream of SHH and BMP4. *Development.* 2008; 135(19):3301-3310.

Chang C, McDill BW, Neilson JR, u. a. Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(7):1051-1058.

Chen J, Kitchen CM, Streb JW, Miano JM. Myocardin: a component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002;34(10):1345-1356.

Chu GC, Dunn NR, Anderson DC, Oxburgh L, Robertson EJ. Differential requirements for Smad4 in TGF β -dependent patterning of the early mouse embryo. *Development.* 2004; 131(15):3501-3512.

Cook MJ. *Anatomy of the Laboratory Mouse.* Academic P., U.S.; 1965.

- Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev. Cell.* 2010; 18(5):698-712.
- Costantini F, Shakya R. GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *Bioessays.* 2006;28(2):117-127.
- Creemers EE, Sutherland LB, McAnally J, Richardson JA, Olson EN. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development.* 2006; 133(21):4245 -4256.
- Davidson A. Mouse kidney development. *StemBook.* 2008. Available at: <http://www.stembook.org/node/532>
- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature.* 2008;454(7200):56-61.
- Deng, FM, Liang F-X, Tu L, Resing KA, Hu P, Supino M, Hu C-CA, Zhou G, Ding M, Kreibich G, Sun T-T. Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *J. Cell Biol* 159, 685-694 (2002).
- Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, Pagani M, Peluso I, Lin-Marq N, Koch M, Bilio M, Cantiello I, Verde R, De Masi C, Bianchi SA, Cicchini J, Perroud E, Mehmeti S, Dagand E, Schrunner S, Nürnberger A, Schmid K, Metz K, Zwingmann C, Brieske N, Springer C, Martinez Hernandez A, Herzog S, Grabbe F, Sieverding C, Fischer B, Schrader K, Brockmeyer M, Dettmer S, Helbig C, Alunni V, Battaini M-A, Mura C, Henrichsen CN, Garcia-Lopez R, Echevarria D, Puelles E, Garcia-Calero E, Kruse S, Uhr M, Kauck C, Feng G, Milyaev N, Ong C, Kumar L, Lam MS, Semple CA, Gyenesei A, Mundlos S, Radelof U, Lehrach H, Sarmientos P, Reymond A, Davidson DR, Dollé P, Antonarakis SA, Yaspo ML, Martinez S, Baldock RA, Eichele G, Ballabio A. A High-Resolution Anatomical Atlas of the Transcriptome in the Mouse Embryo. *PLoS Biol.* 2011;9(1):e1000582.
- Dressler G. Tubulogenesis in the developing mammalian kidney. *Trends Cell Biol.* 2002;12(8):390-395.
- Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006; 22:509-529.
- Du KL, Ip HS, Li J, u. a. Myocardin Is a Critical Serum Response Factor Cofactor in the Transcriptional Program Regulating Smooth Muscle Cell Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(7):2425-2437.
- Dunn NR, Winnier GE, Hargett LK, u. a. Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. *Dev. Biol.* 1997; 188(2):235-247.
- Goumans M, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* 2009; 19(1):116-127.
- Grieshammer U, Le Ma, Plump AS, u. a. SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev. Cell.* 2004; 6(5):709-717.

- Hartwig S, Bridgewater D, Di Giovanni V, Cain J, Mishina Y, Rosenblum ND. BMP Receptor ALK3 Controls Collecting System Development. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(1):117-124.
- Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996; 6(4):432-438.
- Hoshino T, Shimizu R, Ohmori S, Nagano M, Pan X, Ohneda O, Khandekar M, Yamamoto M, Lim K-C, Engel JD. Reduced BMP4 abundance in Gata2 hypomorphic mutant mice result in uropathies resembling human CAKUT. 2008; *Genes to Cells* 13, 159-170.
- Hu MC, Piscione TD, Rosenblum ND. Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in ALK3 transgenic mice. *Development*. 2003;130(12):2753-2766.
- Huppelsberg J, Walter K. *Kurzlehrbuch Physiologie*. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart; 2009.
- Ichikawa I, Kuwayama F, Pope JC, Stephens FD, Miyazaki Y. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney Int*. 2002;61(3):889-898.
- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*. 2001;15(23):3059-3087.
- Jeffery TK, Upton PD, Trembath RC, Morrell NW. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005;288(2):L370-378.
- King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev. Biol.* 1994;166(1):112-122.
- Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mechanisms of Development*. 2001; 100 (1): 83-86.
- Kulesa H, Hogan BLM. Generation of a loxP flanked bmp4loxP-lacZ allele marked by conditional lacZ expression. *Genesis*. 2002; 32(2):66-68.
- Kume T, Deng K, Hogan BL. Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development*. 2000; 127(7):1387-1395.
- Lazzeri M. The physiological function of the urothelium--more than a simple barrier. *Urol. Int*. 2006; 76(4):289-295.
- Lechner MS, Dressler GR. The molecular basis of embryonic kidney development. *Mechanisms of Development*. 1997;62(2):105-120.
- Li Y, Gordon J, Manley NR, Litingtung Y, Chiang C. Bmp4 is required for tracheal formation: a novel mouse model for tracheal agenesis. *Dev. Biol.* 2008;322(1):145-155.
- Li S, Wang D-Z, Wang Z, Richardson JA, Olson EN. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(16):9366-9370.

- Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*. 2001; 128(24):5099-5108.
- Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 3rd Aufl. Thieme, Stuttgart; 2009.
- Mackie GG, Stephens FD. Duplex kidneys: a correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. *J. Urol*. 1975; 114(2):274-280.
- Mahoney ZX, Sammut B, Xavier RJ, u. a. Discs-large homolog 1 regulates smooth muscle orientation in the mouse ureter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103(52):19872 - 19877.
- Mailleux AA, Kelly R, Veltmaat JM, de Langhe SP, Zaffran S, Thiery JP, Bellusci S. Fgf10 expression identifies parabronchial smooth muscle cell progenitors and is required for their entry into the smooth muscle cell lineage. *Development*. 2005;132(9):2157 -2166.
- Mendelsohn C. Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development. *Organogenesis*. 2009; 5(1):306-314.
- Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A. Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development*. 2004; 131(14):3401 -3410.
- Michos O, Gonçalves A, Lopez-Rios J, Tiecke E, Naillat F, Beier K, Galli A, Vainio S and Zeller R. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development*. 2007; 134(13):2397-2405.
- Miller LD, Wert SE, Clark JC, u. a. Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. *Dev. Dyn*. 2004;231(1):57-71.
- Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I. Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J. Clin. Invest*. 2000; 105(7):863-873.
- Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Ichikawa I. Evidence that bone morphogenetic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. *Kidney Int*. 2003; 63(3):835-844.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*. 2002; 7(12):1191-1204.
- Moorman AFM, Houweling AC, de Boer PAJ, Christoffels VM. Sensitive Nonradioactive Detection of mRNA in Tissue Sections: Novel Application of the Whole-mount *In situ* Hybridization Protocol. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001;49(1):1 -8.
- Morrissey EE, Hogan BLM. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev. Cell*. 2010;18(1):8-23.
- Morrow D, Guha S, Sweeney C, u. a. Notch and Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Circ Res*. 2008; 103(12):1370-1382.

- Najmaldin A, Burge DM, Atwell JD. Reflux nephropathy secondary to intrauterine vesicoureteric reflux. *J. Pediatr. Surg.* 1990; 25(4):387-390.
- Nakahiro T, Kurooka H, Mori K, Sano K, Yokota Y. Identification of BMP-responsive elements in the mouse *Id2* gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;399(3):416-421.
- Nolte A. (2010) Identifizierung und Charakterisierung von Markergenen im frühen Uretermesenchym der Maus
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews.* 2004; 84(3):767 -801.
- Oxburgh L, Brown AC, Fetting J, Hill B. BMP signaling in the nephron progenitor niche. *Pediatr Nephrol.* 2011. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21373777>.
- 1.
- Oxburgh, L., Chu, G.C., Michael, S.K. & Robertson, E.J. TGFbeta superfamily signals are required for morphogenesis of the kidney mesenchyme progenitor population. *Development.* 2004 131, 4593-4605.
- Qiu P, Ritchie RP, Fu Z, Cao D, Cumming J, Miano JM, Wang D-Z, Li HJ, Li L. Myocardin Enhances Smad3-Mediated Transforming Growth Factor- β 1 Signaling in a CArG Box-Independent Manner: Smad-Binding Element Is an Important cis Element for SM22 α Transcription In Vivo. *Circ Res.* 2005;97(10):983-991.
- Raatikainen-Ahokas A, Hytönen M, Tenhunen A, Sainio K, Sariola H. BMP-4 affects the differentiation of metanephric mesenchyme and reveals an early anterior-posterior axis of the embryonic kidney. *Dev. Dyn.* 2000;217(2):146-158.
- Sadler TW, Langman J. *Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen.* 10th Aufl. Thieme, Stuttgart; 2003.
- Schedl A. Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat. Rev. Genet.* 2007; 8(10):791-802.
- Schild R-S. BMP4-Mutationsanalyse in einer unselektierten Kohorte von 234 Kindern mit kongenitalen Anomalien der Nieren und ableitenden Harnwege (CAKUT). Available at: <http://www2.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2009/4399/>
- Small EM, Warkman AS, Wang D-Z, Sutherland LB, Olson EN, Krieg PA. Myocardin is sufficient and necessary for cardiac gene expression in *Xenopus*. *Development.* 2005;132(5):987-997.
- Tabatabaeifar M, Schlingmann K-P, Litwin M, Emre S, Bakkaloglu A, Mehls O, Antignac C, Schaefer F, Weber S. Functional analysis of BMP4 mutations identified in pediatric CAKUT patients. *Pediatr. Nephrol.* 2009;24(12):2361-2368.
- Trowe M, Shah S, Petry M, u. a. Loss of Sox9 in the periotic mesenchyme affects mesenchymal expansion and differentiation, and epithelial morphogenesis during cochlea development in the mouse. *Dev. Biol.* 2010; 342(1):51-62.

- Uetani N, Bertozzi K, Chagnon MJ, Hendriks W, Tremblay ML, Bouchard M. Maturation of ureter-bladder connection in mice is controlled by LAR family receptor protein tyrosine phosphatases. *J. Clin. Invest.* 2009;119(4):924-935.
- Ulfig N. *Kurzlehrbuch Histologie*. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart; 2005:53-61.
- Visel A. GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Research.* 2004;32(90001):552D-556.
- Wang GJ, Brenner-Anantharam A, Vaughan ED, Herzlinger D. Antagonism of BMP4 signaling disrupts smooth muscle investment of the ureter and ureteropelvic junction. *J. Urol.* 2009; 181(1):401-407.
- Wang Z, Wang D, Hockemeyer D, u. a. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature.* 2004; 428(6979):185-189.
- Weaver M, Batts L, Hogan BLM. Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. *Developmental Biology.* 2003;258(1):169-184.
- Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, Knuppel T, Zurowska AM, Caldas-Alfonso A, Litwin M, Emre S, Ghiggeri GM, Bakkaloglu A, Mehls O, Antignac C, Network E, Schaefer F, Burdine RD. SIX2 and BMP4 Mutations Associate With Anomalous Kidney Development. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2008;19(5):891 -903.
- Wilkinson, D.G. Whole mount *in situ* hybridization of vertebrate embryos, in *In situ hybridization: A Practical Approach* IRL Press, Oxford. (1992) (D.G. Wilkinson, ed) pp 75-83,
- Wu X, Kong X, Pellicer A, Kreibich G, Sun T. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney Int.* 2009; 75(11):1153-1165.
- Xu X, Han J, Ito Y, Bringas P, Deng C, Chai Y. Ectodermal Smad4 and p38 MAPK Are Functionally Redundant in Mediating TGF- β /BMP Signaling during Tooth and Palate Development. *Developmental Cell.* 2008;15(2):322-329.
- Yu J, Carroll TJ, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development.* 2002; 129(22):5301-5312.
- Zhou Y, Lim K-L, Onodera K, Takahashi S, Ohta J, Minegishi N, Tsai F-Y, Orkin SH, Yamamoto M, Engel JD. Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development. *EMBO J* 17, 6689-6700 (1998).

9. Lebenslauf

Anna Barbara Foik
Geboren am 27. 08. 1980 in Essen

Wohnhaft in 30165 Hannover
Familienstand ledig
Deutsche Staatsangehörigkeit

BILDUNGSWEG

SCHULISCHE LAUFBAHN

1987-1989	Grundschule Eckerkoppel in Hamburg
1989-1991	Grund- und Hauptschule Hoisbüttel in Schleswig-Holstein
1991-2000	Gymnasium Eckhorst in Schleswig-Holstein, abgeschlossen mit dem Abitur

HOCHSCHULBILDUNG

2000-2005	Studium der Biochemie an der Universität Bayreuth in Bayern
Aug. 2002	Vordiplom
Sept. 2004- März 2005	Diplomarbeit mit dem Titel „Funktion von Cyclin B3 bei der Transition von Meiose zur Mitose“ angefertigt bei Prof. Dr. Lehner
März 2005	Abschluss des Studiums mit dem Diplom
2005-2006	Promotionsstudium an der Freien Universität Berlin
Ab Okt. 2006	Promotionsstudium an der Leibniz Universität (Niedersachsen)

BERUFSWEG

Mai 2005- Sept. 2006	Wissenschaftliche Angestellte an der Charité am Institut für Pharmakologie
Ab Okt. 2006	Wissenschaftliche Angestellte an der Medizinischen Hochschule Hannover am Institut für Molekularbiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Kispert

PUBLIKATIONEN

- Jörs, S., Kazanski, V., Foik, A., Krautwurst, D., Harteneck, C. (2006) Receptor-induced activation of Drosophila TRP γ by polyunsaturated fatty acids, *JBC* 281, 29693-702
- Airik R, Trowe M, Foik A, Farin H F, Petry M, Schuster-Gossler K, Schweizer M, Scherer G, Kist R, Kispert A. (2010) Hydroureteronephrosis due to loss of Sox9-regulated smooth muscle cell differentiation of the ureteric mesenchyme, *HMG* 19(24):4918-4929.

BETREUUNG VON BACHELORARBEITEN

- Metzger A. (2008) Identifizierung und Charakterisierung neuer Differenzierungsmarker für das Ureterepithel der Maus
- Nolte A. (2010) Identifizierung und Charakterisierung von Markergenen im frühen Uretermesenchym der Maus
- Rataj D. (2010) Identifizierung und Charakterisierung neuer Differenzierungs- und Regionalisierungsmarker für das frühe Ureterepithel in der Maus

10. Ich möchte Danke sagen...

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Kispert für die Bereitstellung des Themas und die ständige Bereitschaft zur Diskussion bedanken. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst Ungewickell und Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen, für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bzw. des Amtes des Drittprüfers bedanken.

Ich möchte mich für die Bereitstellung der Mauslinien bei Prof. Andrew P. McMahon, Prof. Brigid L.M. Hogan und Prof. Elizabeth Robertson bedanken. Ich möchte mich besonders für die technische Unterstützung bedanken, die mir Marianne Petry und Arne Sölter zukommen ließen.

Ich möchte mich bei Herrn Rannar Airik PhD für die Einarbeitung in das Thema und bei Dr. Karin Schuster-Gossler für die Generierung der *Tbx18^{ox}*-Linie und die hier nicht näher erwähnte Zusammenarbeit im Feld der ES-Zellen bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Kollegen Marc-Jens Kleppa, Timo Lüdtke, Carsten Rudat, Patrick Blank, Eva Bettenhausen, Franziska Greulich, Julia Norden, Martina Schmidt und Anna-Carina Weiss für die kollegiale Zusammenarbeit, Unterstützung und Motivation bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Freunden Dr. Eva-Maria Krammer, Dr. Nina Link, Dr. Hanna Berkner und Dr. Tanja Dreja für das Voranschreiten auf dem Weg und gemeinsam verbrachte Wochenenden bedanken. Ich möchte mich bei Britta Marohn für gemeinsames Schwitzen nach Feierabend bedanken.

Ich möchte mich bei Stefan Wittern für sehr viel Verständnis, Geduld und Zuversicht und für einige Stunden auf der Suche nach Office-Funktionen bedanken.

Ich möchte mich bei meinen Brüdern Benedikt und Conrad Foik dafür bedanken, dass sie in mir noch immer ihre große Schwester sehen. Ich möchte mich bei meinen Eltern Dr. Georg und Eleonore Foik für die andauernde Motivation, viel entgegengebrachtes Verständnis und Vertrauen bedanken.

11. Erklärung zur Dissertation

Erklärung zur Dissertation gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Molekulare Analyse der Ureterentwicklung in der Maus“ selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

12. Anhang

Tabelle 12.1:

Auflistung der Gene aus der Microarray-Analyse, die die Expressionsniveaus von Ureteren des Stadiums E18,5 mit denen des Stadiums E13,5 vergleicht. Die Tabelle enthält 170 Gene, bei denen das Verhältnis der Expressionsniveaus von E18,5 zu E13,5 kleiner als 0,3 ist. Die Tabelle enthält neben dem Gennamen die Expressionsniveaus von E13,5 und E18,5 und das daraus resultierende Verhältnis. Daneben ist die Plasmidnummer angegeben, die Person, die die Expression in RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen getestet hat, sowie ob es spezifisch im Ureter exprimiert ist. (AF: Anna Foik; AM: Anna Metzger; AN: Annika Nolte; AS: Arne Sölter; DR: Dennis Rataj; OT: Dr. Oliver Trowe)

GeneName CD Version 4.000	Ureter vom E13.5	Ureteren vom E18.5	Ureter E18.5 / Ureter E13.5	Plasmid- No	Durch- geführt	Ureter- express- ion	Ubiquitär
1110020P09Rik	941	278	0,3	P02350	-		
1500031H04Rik	1946	508	0,3	P04406	DR		
1700011H14Rik	2805	288	0,1	P03474	AF	Epithel	
2010002N04Rik	9370	1669	0,2	P04395	DR		
2610200G18Rik	1047	259	0,2				
2610510H01Rik	28794	6426	0,2	P4392	AN		
2810003C17Rik	12131	2132	0,2	P04104	AF	Nein	Ja
2810031P15Rik	8546	2735	0,3				
2810409C01Rik	2503	741	0,3				
4930403J22Rik	2449	618	0,3	P04413	AN		
4931428F04Rik	1526	446	0,3	P04429	DR		
5031425E22Rik	899	212	0,2				
6330442E02Rik	462	139	0,3				
6430537F04	1632	356	0,2				
6720475J19Rik	1204	298	0,2	P03362	-		
8430438D04Rik	8082	2388	0,3	P04151	DR		
9430059P22Rik	3283	971	0,3	P02558	-		
A730054J21Rik	2236	407	0,2				
A730089K16Rik	98	27	0,3	P4411	DR		
Al593442	881	75	0,1	P02263	AS/AF	Nein	
Al851790	728	135	0,2	P04387	AN		
Aldh1a1	7959	1930	0,2	P01556	-		
Aldh1a2=Raldh2	24162	4813	0,2	P01555/P 01676	Airik et al.		
Aldh1a3	3060	385	0,1	P03465	AS/AF	Nein	
Amaco	517	103	0,2	P04389	AN		
Amph	1757	463	0,3	P4409	DR		
Arsb	1569	231	0,1	P04106	AF	Nein	Ja
Asb4	2164	693	0,3				
AW121567	1403	449	0,3	P04438	AN		
Axin2	1358	323	0,2	s.u.	OT	Ja	
B130052G07Rik	1807	543	0,3	P02794	AF	Nein	Ja
B3gnt5	5836	1474	0,3	P04414	AN		
Bai3	454	132	0,3				
BC016235	1368	148	0,1	P04398	DR		

BC030045	438	134	0,3				
Bcl11a	1626	254	0,2	P03334	AS/AF	Nein	Nein
Bex2	4707	1015	0,2				
Bmper	11310	2325	0,2	P02751	AS/AF		Ja
C530008M17Rik	2252	276	0,1	P03467	-		
C630041L24Rik	661	155	0,2	P03468	AF	Nein	Niere
Camta1	608	129	0,2	P03464	AF	Nein	
Cart1	1358	304	0,2				
Cbfa2t1h	9405	2634	0,3				
Cd1d1	4721	1493	0,3				
Cdh11	44951	13660	0,3	P02627	AN		
Cdh16	22104	1649	0,1	P00730	AF/AM	Ja	
Cdh2	3232	756	0,2	P02768	-		
Cdkal1	1736	418	0,2	P04412	AN		
Chc1l	2141	640	0,3				
Cldn3	2431	534	0,2	P03469	AF	Ja/Epi- thelial	
Cldn6	4333	700	0,2	P03470	AS/AF	Ja/Epi- thelial	Nein
Clstn2	1064	222	0,2	P02557	-		
Cmkor1	27690	8386	0,3	P03291	AF	Nein	
Cnih2	6193	1983	0,3				
Crym	5053	1048	0,2	P03210	AF	Nein	Niere
Cspg2	412	119	0,3	P02797	AF	Nein	Ja
Cxcl12	33231	6402	0,2	P02507	AS/AF	ja	
Dach2	423	134	0,3	P03472	AS/AF	Ja	
Dact1	11894	3760	0,3	L1279	AS/AF		
Ddx25	752	147	0,2	P04397	DR		
Dkk1	973	127	0,1	P01107/P 01950	-		
Dnmt3a	1164	246	0,2	P03473	AF	Nein	Nein
Dpysl4	7614	835	0,1	P03482	AM/AF		
Ecm1	9660	2880	0,3	P03580	DR		
Edil3	5868	466	0,1	P03483	AS/AF	Nein	
Efemp1	7633	1994	0,3	P04407	DR		
Elavl4	1072	272	0,3				
Emb	11350	2809	0,2	P03584	-		
Emid2	10954	2844	0,3	P03583	-		
Emx2	1140	281	0,2	P01356	Airik et al.		
Epha4	2978	851	0,3	P01561	AF	Ja	
Epha7	743	139	0,2	P02351	AF	Ja	
Exo1	6388	1990	0,3	P04436	AN		
Fkbp3	46067	14760	0,3				
Foxc1	17116	2153	0,1	P1524	-		
Foxc2	34472	5711	0,2	P01525	AS/AF	Ja	
Foxf2	496	86	0,2	P01669	-		
Foxp2	501	152	0,3	P03274	DR		
Fxyd4	3392	377	0,1	P03485	AS/AF	Nein	
Gap43	1675	376	0,2				
Glr3	1070	285	0,3	P03292	AS/AF	Nein	
Gm411	12839	3606	0,3				
Gpr73l1	2484	48	0,0	P03487	AF	Nein	Ja
Gria1	2303	326	0,1	P02508	AS/AF	Nein	
Gria2	636	138	0,2	P4391	AN		
Grik4	1426	340	0,2	P03488	AF	Nein	Ja

Gtl7	573	129	0,2	P03083	AF	Nein	Nein
Gyltl1b	854	272	0,3				
H2afy3	1119	335	0,3	P04431	DR		
Has2	5624	1460	0,3	P01983	-		
Hmga2	32757	4085	0,1	P03489	AS/AF	Ja	
Hnrpd1	18030	5766	0,3				
Hoxa13	427	127	0,3	P04010	AN		
Hoxd10	2191	615	0,3	P01814	-		
Hoxd11	1493	430	0,3	P01831	-		
Hoxd13	3626	409	0,1	P01817	-		
Hs3st3b1	5944	1872	0,3				
Igf2bp1	6310	1020	0,2	P04107	AF	Nein	Ja
ligp1	10265	1720	0,2	P03308	AF	Nein	
Irx3	15458	3050	0,2	P1822/P1855	AS/AF	Nein	
Isl1	1822	238	0,1	P01850	-		
Kcnd2	2082	564	0,3	P04410	DR		
Kcnj16=Kir5.1	156	31	0,2	P04386	AN		
Kcnk2	544	70	0,1	P02556	AF	Nein	
Kcnmb4	3775	762	0,2	P03490	AF	Nein	
Khdrbs2	779	123	0,2	P03139	AF	Nein	Ja
Kif12	1077	264	0,2	P03491	AF	Ja	Niere
Kif21b	2779	682	0,2	P03492	AF	Nein	Nein
Lix1	655	163	0,2	P03398	AF	Nein	Niere
Lrnf5	882	98	0,1	P04384	AN		
Mamdc2	1499	456	0,3				
Masp1	23068	3656	0,2	P02793	AF	Ja	
Mllt3	1617	434	0,3				
Mrg1: Meis2	45585	13771	0,3	P03674	DR		
Myrip	476	143	0,3				
Nasp	1056	179	0,2	P03494	AF	Nein	Ja
Negr1	7126	1666	0,2	P03079	AF	Nein	Nein
Nfat5	2987	351	0,1	P04112	AF	Nein	Ja
Nmyc1	5714	744	0,1	P02039	AF	Nein	
Nnat	9983	1277	0,1	P04287	AF	Nein	
Nr2f1	4218	618	0,1	P03495	AS/AF	Ja	
Nsq2	1746	403	0,2	P03496	AF	Nein	Nein
Ntng1	1727	279	0,2	P03254	AS/AF	Nein	Nein
Nudt11	1182	215	0,2	P03497	AF	Nein	Niere
Odz4	1221	292	0,2	P03498	AF	Nein	Niere
Otor	1603	177	0,1	P02267	-		
Padi2	445	140	0,3				
Pbx1	10750	1606	0,1	P04108	-		
Pcdh8	3245	241	0,1	P02509	Airik		
Pitx1	930	225	0,2	P01240	-		
Pitx2	67	14	0,2	P04248	-		
Plcx3	4926	638	0,1	P03252	AF/AS	Ja	
Pstpip2	3294	791	0,2	P03303	AF/AS	Nein	Ja
Rhcg	2392	584	0,2				
Rnaset2	568	129	0,2				
Robo1	3271	1019	0,3	P04350	DR		
Ror1	2311	672	0,3	P03404	-		
Rprm	5130	846	0,2	P04394	DR		

Rps6ka6	860	265	0,3	P04435	AN		
Rsb11	620	124	0,2	P04390	AN		
Scn8a	921	210	0,2				
Scube1	3818	930	0,2				
Sept3	674	135	0,2				
Set	3718	1000	0,3	P02277	-		
Slc16a9	1599	407	0,3	P03320	AF	Nein	Ja
Slc1a3	2893	547	0,2	P03447	AF	Nein	Nein
Slc2a5	279	64	0,2	P03025	-		
Slc6a15	420	107	0,3	P04416	AN		
Snap91	1717	448	0,3	R1195			
Sox11	7115	1287	0,2	P02512			
Sox9	3917	1224	0,3	P2279	Airik et al.	Ja	
Sp5	415	119	0,3	P03349	-		
Ssb4	2197	273	0,1				
Synpr	1225	254	0,2	P03174	-		
Tbx18	3405	1077	0,3		Airik et al.	Ja	
Tcfcp2l1	4675	870	0,2	P04396	DR		
Thsd2	480	87	0,2	P04109	AF	Nein	Ja
Tia1	9597	2962	0,3				
Tnpo1	13620	2603	0,2	P4388	AN		
Tnrc9	3630	550	0,2				
Tox	1038	178	0,2	P4385	AN		
Tpm1	12250	2513	0,2	P04296			
Tram111	3798	1170	0,3				
Twist1	3094	827	0,3	P1612	AF	Nein	
Wsb1	6859	2158	0,3				
Zcchc12	3340	426	0,1	P03298	AS/AF	Ja	
Zfp184	2035	532	0,3	P04408	DR		
Zfp334	797	192	0,2	P4393	AN		
Zfp536	797	107	0,1	P03279	AF	Ja	Nein
Zfp647	3855	1221	0,3	P04437	AN		

Tabelle 12.2:

Auflistung der Gene aus der Microarray-Analyse, die die Expressionsniveaus von *Tbx18*^{+/-}-Ureteren des Stadiums E13,5 mit denen von *Tbx18*^{-/-}-Ureteren desselben Stadiums vergleicht. Die Tabelle enthält 84 Gene, bei denen das Verhältnis der Expressionsniveaus von *Tbx18*^{-/-}-Ureteren zu *Tbx18*^{+/-}-Ureteren kleiner als 0,5 ist. Die Tabelle enthält neben dem Gennamen die Expressionsniveaus von *Tbx18*^{+/-}-Ureteren und *Tbx18*^{-/-}-Ureteren und das daraus resultierende Verhältnis. Daneben ist die Plasmidnummer angegeben, die Person, die die Expression in RNS-*in situ* Hybridisierungsanalysen getestet hat, sowie ob es spezifisch im Ureter oder der Niere exprimiert ist (1 für „ist dort spezifisch exprimiert“). (AF: Anna Foik; AN: Annika Nolte; Rannar Airik)

GeneName CD Version 4.000	Ureter E13.5 <i>Tbx18</i> ^{+/-}	Ureter E13.5 <i>Tbx18</i> ^{-/-}	<i>Tbx18</i> ^{-/-} / <i>Tbx18</i> ^{+/-}	Plasmid- nummer	Durch- geführt	Ureter- express- ion	Nieren- express- ion
0610006O14Rik	1243	535	0,4	P03081	AF		1
0610009B10Rik	3840	1717	0,4	P03146	AF		
1500015O10Rik	563	150	0,3	P02554	AF		
2210016H18Rik	2158	647	0,3	P02789	AF		
2810055G20Rik	670	293	0,4	P03087	AF		
4930573O21Rik	119	53	0,4	P03141	AF		

4930588G05Rik	881	388	0,4	P03089	AF		
7030402D04Rik	308	135	0,4	P03088	AF		
8030498J20Rik	456	175	0,4	P02829	AF		
9030611N15Rik	488	204	0,4	P03077	AF		
9430059P22Rik; Shisa2	1463	282	0,2	P02558	AN		
A430106J12Rik	1095	484	0,4	P02261			
Adh6a	984	439	0,4	P03142	AF		
Anxa2	813	340	0,4	P03078	AF		1
Aqp1	820	242	0,3	P02109			
Arcn1	643	223	0,3	P02795	AF		
Aspn	359	51	0,1	P02510	Airik		
B130052G07Rik	486	168	0,3	P02794	AF		
Bace2	912	335	0,4	P02798	AF		
Bmper	11475	4496	0,4	P02751	AF	1	
Car13	1707	542	0,3	P02750	AF		
Car3	13349	1341	0,1	P02158, P02560	AF	1	
Casp12	577	215	0,4	P02799	AF		
Chgb	2701	1205	0,4	P03145	AF		
Cldn11	13549	4862	0,4	P02513	AF	1	
Clstn2	1371	496	0,4	P02557			
Cntn6	446	175	0,4	P02880	AF		
Col9a1	3004	1237	0,4	P02705	Airik et al., 2010	1	
Crabp1	18764	7327	0,4				
Creb5	4308	1248	0,3	P02257			
Crym	4701	696	0,1	P3210	AF		1
Cspg2	444	160	0,4	P02797	AF		
Cxcl12	40738	13191	0,3	P02507	AF	1	
D17Ert663e	803	314	0,4	P02879	AF		
Dkk2	2537	544	0,2	P02006, P02022	AF		
Edg2	9255	3024	0,3	P02706	AF		
Egfr	2069	803	0,4				
Enpp2	3231	1032	0,3	P02703	AF		
Fap	1251	444	0,4	P02704	AF		
Fbln2	5154	2312	0,4	P03147			
Fbxl7	1923	717	0,4	P02800	AF		1
Fgf7	482	62	0,1	P02025	AF		
Foxc1	10670	4639	0,4				
Foxd1	17452	6967	0,4	P2110	Airik		1
Fus	1980	773	0,4	P02877	AF		1
Gpm6b	8207	3538	0,4	P03082	AF		1
Grb10	991	157	0,2	P02559	AF		1
Gria1	383	136	0,4	P02508	AF		
Gtl7	1027	443	0,4	P03083	AF		
Kcnk2	2460	520	0,2	P02556	AF		
Kcnq1ot1	2340	960	0,4	P03075	AF		
Khdrbs2	673	299	0,4	P03139	AF		
Krt1-23	268	119	0,4	P3140	AF		1
Lrrc17	6274	2531	0,4	P02365	AF		
Lum	38701	7472	0,2	P02352			
Maob	1842	720	0,4	P02878			
Masp1	11373	3698	0,3	P02793	AF	1	

Matn4	842	316	0,4	P02826	AF		
Mrg1	4210	1856	0,4	P01544, cited2,P0283 1	AF		1
Ngfb	266	108	0,4	P03072	AF		
Niban	243	104	0,4	P03080	AF		
Nov	217	94	0,4	P03084	AF		
Nrg1	779	296	0,4	P02827			
Nrk	952	414	0,4	P03086	AF		1
Ogn	4393	1853	0,4				
Pbx1	6466	2687	0,4				
Pcdh8	1225	161	0,1	P02509	Airik		
Postn	14741	5008	0,3	P02506			
Prelp	603	184	0,3	P02790	AF		
Ramp2	496	202	0,4	P03074	AF		
Rhot1	2424	405	0,2	P02561			
Sca10	362	115	0,3	P02791	AF		
Sfrp2		6087	0,2	P00405t	Airik et al., 2006	1	
Sgol2	305	88	0,3	P02553	AF		
Slc26a7	3891	1352	0,3	P02796	AF		
Snx7	337	129	0,4	P02828	AF		
Sox9	7764	2802	0,4	P00339	Airik et al., 2010	1	
Tbx18	7769	1296	0,2	P568	Airik et al., 2006	1	
Thbs1	513	208	0,4	P03073	AF	1	
Twist1	6885	1702	0,2				
Vcam1	2829	923	0,3	P02752	AF		
Zfhx1b	208	84	0,4	P03164	AF		
Zfp180	77	34	0,4	P03085	AF		
Zfp26	14192	5509	0,4	P02876	AF		

Tabelle 12.3: Auflistung der Gene aus der Microarray-Analyse, die die Expressionsniveaus von *Tbx18*^{+/-}-Ureteren des Stadiums E13,5 mit denen von *Tbx18*^{-/-}-Ureteren desselben Stadiums vergleicht. Die Tabelle enthält 96 Gene, bei denen das Verhältnis der Expressionsniveaus von *Tbx18*^{-/-}-Ureteren zu *Tbx18*^{+/-}-Ureteren zwischen 0,6 und 0,5 lag. Die Tabelle enthält neben dem Gennamen das Verhältnis des Expressionsniveaus von *Tbx18*^{-/-}-Ureteren zu *Tbx18*^{+/-}-Ureteren und das daraus resultierende Verhältnis, sowie ob es spezifisch im Ureter oder nicht spezifisch exprimiert ist (1 für „ist exprimiert“).

GeneName CD Version 4.000	<i>Tbx18</i> ^{-/-} / <i>Tbx18</i> ^{+/-}	unspezifisch im Ureter	spezifisch im Ureter
0610037P05Rik	0,6	1	
1110018J18Rik	0,6		
1190002H09Rik	0,5		
2010316F05Rik	0,6	1	
2610203C20Rik	0,6	1	
2810408B13Rik	0,6	1	
9030425E11Rik	0,6		
9030425E11Rik-2	0,6	1	
9130005N14Rik	0,6	1	
9230117N10Rik	0,5	1	
A630038E17Rik	0,6	1	
Actc1	0,5		
Acyp2	0,5		
Agtppb1	0,5	1	
Ahr	0,5	1	
Akap12	0,6	1	
Akap2	0,6	1	
Apba3	0,5		
Arid5b	0,6	1	
Asb3	0,5	1	
B130023L16Rik	0,5	1	
BC006662	0,6	1	
BC023928	0,6	1	
BC037112	0,6	1	
Bcl11a	0,6		
C76566	0,5	1	
C76566	0,5		
Calml4	0,5	1	
Ccnt2	0,6	1	
Chgb	0,5		
Ckap4	0,5	1	
Cmkor1	0,6		
Cntn6	0,5		
Col8a2	0,5		
Csrp2	0,5	1	
Ctdsp2	0,6		
D130038B21Rik	0,5	1	
D430038H04Rik	0,5		
Dbi	0,6	1	
Dclk1	0,6		
Ddx24	0,6	1	
Dnajc3a	0,6	1	
Fam18b	0,6	1	

Fbln5	0,5	1	
Fbn1	0,6		
Foxp2	0,6	1	
Gas5	0,6	1	
Gcnt1	0,6		
Glr1b	0,6		
Gpr48	0,6	1	
Gprc5b	0,6	1	
Gpx7	0,6	1	
Gria4	0,5	1	
Gulp1	0,6	1	
Hnrpa2b1	0,6	1	
Hod	0,5		
Iigp1	0,6		
Kctd12	0,5	1	
Kifap3	0,6	1	
Lgals1	0,5	1	1
Man1a	0,6	1	
Manea	0,6		
Metrn1	0,6		
Mmp16	0,6	1	
Mylip	0,6	1	
Negr1	0,5		
Nfib	0,6	1	
Ntrk2	0,5	1	
Plcx3	0,5		1
Pstpip2	0,6	1	
Rab5a	0,6	1	
Rbak	0,5	1	
Rbp1	0,6	1	
Rhoj	0,5	1	
Rnu22	0,6		
S100a10	0,6		
Sf3b3	0,6	1	
Sgcb	0,6		
Slc16a9	0,6		
Slc1a3	0,5		
Sned1	0,6	1	
Sobp	0,6		
Sphk1	0,5		
Spon2	0,5		
Ssbp2	0,5	1	
Sulf1	0,5		1
Tm4sf1	0,5		
Tmem158	0,6	1	
Tmem167	0,6		
Tra2a	0,6	1	
Tspan8	0,5		
Zcchc12	0,6	1	
Zfp273	0,6	1	
Zfp3611	0,6	1	
Zfp536	0,6		1
Zfp74	0,6	1	

Tabelle 12.4:

Liste der 68 Gene, die aufgrund ihrer Annotation in den Datenbanken genepaint.org und eurexpress.org auf ihre spezifische Expression im Ureter hin untersucht wurden. Für 53 dieser Gene war das der Grund sie zu testen. Die anderen 15 sind in Tabelle 12.1 und Tabelle 12.2 enthalten oder sind hinlänglich als Gene bekannt, die im Ureter exprimiert werden (Bmp4, Gata2). Alle Gene, die nicht ausdrücklich in eurexpress.org annotiert sind, sind in genepaint.org annotiert gewesen.

Gen-symbol	Spezifisch im Ureter	Annotation Grund für Expressionsanalyse	Eurexpress
BC030477		Ja	ja
Bmp4	spezifisch Mesenchym bekannt		
Btg3		Ja	
Car13			ja
Car3	Spezifisch Mesenchym		
Catna1	Spezifisch Epithel	Ja	
Cdh16	spezifisch Epithel		ja
Cdh3		Ja	
Cldn11	Spezifisch Mesenchym		ja
Cntn1		Ja	ja
Col18a1		Ja	
Cpb2; Serpinh1	Spezifisch Mesenchym	Ja	
Dach1		Ja	ja
Dusp10	Spezifisch Epithel	Ja	
Efnb1		Ja	
Enpp2			
Ets1		Ja	
Evi1		Ja	
Foxd1		Ja	
Fzd7		Ja	
Gata2	Spezifisch Mesenchym Epithel bekannt		
Gata3	spezifisch Epithel	Ja	
Glrp			
Gnai2		Ja	
Gpx6		Ja	
Gsta4		Ja	
Gsto1			
Gucy1a3		Ja	
Hdc		Ja	
ligp1			
Itga3	spezifisch Epithel	Ja	
Kit	Spezifisch Mesenchym	Ja	
Lap3		Ja	

Lef1			
Lhx1	(Niere)	Ja	
Lix1	(Niere)	Ja	
Mglap		Ja	
Mif		Ja	
Myip			
Negr1		Ja	
Ngfr		Ja	
Nrip1		Ja	
Pde5a		Ja	
Pde8b		Ja	
Pdgfra	Spezifisch Mesenchym	Ja	
Pfkl		Ja	
Pla2g4a		Ja	
Plcb3		Ja	
Psap		Ja	
Psat1		Ja	
Ptpd			
Rnase4		Ja	ja
Slc16a1		Ja	
Sor1			ja
Srebf1		Ja	
Syne2		Ja	
Tacstd2		Ja	ja
Tcf21/ pod1			ja
Tkt		Ja	
Tmod3		Ja	
Tnfrsf21		Ja	ja
Trim9		Ja	
Ube4b		Ja	
Uqcrh		Ja	
Vav3		Ja	ja
Vil2	spezifisch Epithel	Ja	
Vldlr		Ja	ja
Za20d2		Ja	