



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6855

Charakterisierung des Transkriptionsfaktors SIX2 und seiner Bindungsstellen im GDNF- und Six2-Promotor

S. Brodbeck

Institut für Toxikologie und Genetik

März 2003

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6855

Charakterisierung des Transkriptionsfaktors SIX2 und seiner
Bindungsstellen im *GDNF*- und *Six2*-Promotor

Stephan Brodbeck

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH) genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2003

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

Charakterisierung des Transkriptionsfaktors SIX2 und seiner Bindungsstellen im *GDNF*- und *Six2*-Promotor

**Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte**

Dissertation

**von
Diplom-Biologe
Stephan Brodbeck**

aus

Pforzheim

Dekan: Prof. Dr. M. Metzler

1. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Englert

2. Gutachter: Prof. Dr. Doris Wedlich

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2002

Zusammenfassung

Die frühe Nierenentwicklung in Säugern stellt ein klassisches Modell der Organogenese dar. Obwohl viel über die morphogenetischen Prozesse während dieses Stadiums der Entwicklung bekannt ist, sind die molekularen Mechanismen der Nephrogenese noch weitestgehend unverstanden. Einer der Schlüsselfaktoren in der frühen Nierenentwicklung ist GDNF, das Protein des Genes *glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)*. Dieses Protein wird vom metanephrischen Mesenchym sekretiert und bindet an den Wolffschen Gang, wo es dessen Knospung und somit die weitere Nierenentwicklung induziert. Die Regulation der Expression von *GDNF* ist noch nicht bekannt. Knock-out Studien von Genen, die im metanephrischen Mesenchym während des gleichen Zeitraumes exprimiert werden wie *GDNF*, liefern zumindest Hinweise auf die Faktoren, die für die Regulation der Expression von *GDNF* notwendig sind. Zu diesen Faktoren gehören *Pax2*, *Six2* und *Eya1*. Die Beteiligung dieser Gene, bzw. ihrer Genprodukte, legt ein regulatorisches Netzwerk während der frühen Nierenentwicklung nahe, wie dies für Mitglieder dieser Genfamilien in der Entwicklung anderer Organe schon gezeigt wurde. Auch über die Regulation der Expression der Gene *Pax2*, *Six2* und *Eya1* ist nur wenig bekannt.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, die direkt an der Expression von *GDNF* beteiligt sind. Ein direkter Effekt der Proteine von *Pax2*, *Six2*, *Eya1* auf ein *GDNF*-Promotor-Fragment sollte mit Hilfe von transienten Transfektionen nachgewiesen werden. Da nur bei *SIX2* ein Effekt auf die Transaktivierung beobachtet wurde, erfolgte eine weitere Charakterisierung von zwei Bindungsstellen von *SIX2* im *GDNF*-Promotor durch Gelretardations- und Footprintanalysen. Aufgrund eines vermuteten regulatorischen Pax2-Eya1-Six2-GDNF Pfades sollte auch die Regulation der Expression von *Six2* untersucht werden. Da der murine *Six2*-Promotor noch nicht charakterisiert wurde, klonierte ich ein 920bp Fragment des Promotors aus einer cDNA-Bibliothek, welches anschließend auf eine Transaktivierung und Bindung durch genau die gleichen Gene untersucht wurde, wie sie beim *GDNF*-Promotor benutzt wurden. Dabei wurde festgestellt, dass *SIX2* seinen eigenen Promotor aktivieren kann und dies ähnlich wie beim *GDNF*-Promotor über zwei Bindungsstellen geschieht. Beide gefundenen Bindungsstellenpaare enthalten palindrome Sequenzen. Eine *in vivo* Aktivität der verwendeten Promotorfragmente konnte durch Herstellung transgener Mäuse nachgewiesen werden. Bei diesen Mäusen ist eine Expression eines Reporters, der unter der Kontrolle der jeweiligen Promotorfragmente steht, in den Geweben zu beobachten, in denen sich auch in Wildtyp-Mäusen eine Expression von *GDNF*, bzw. *Six2* findet.

Eine Funktion von SIX2 als Transkriptionsfaktor ist bisher noch nicht eindeutig belegt worden. In dieser Arbeit gelang es nachzuweisen, dass im C-Terminus des SIX2-Proteines eine Transaktivierungsdomäne lokalisiert ist. Auch konnte gezeigt werden, dass andere Six-Familienmitglieder dazu in der Lage sind, den *Six2*-Promotor zu aktivieren und eine Interaktion mit Pax-Familienmitgliedern wahrscheinlich ist.

Characterisation of the transcription factor SIX2 and his binding sites in the *GDNF*- and *Six2*-promoter

Abstract

Early kidney development in mammals is a classical model of organogenesis. Although morphogenetical processes are well characterised during this time, not much is known about the genetical mechanisms of nephrogenesis. One important factor involved in this process is the protein of *glial cell line derived neurotrophic factor* gene, (*GDNF*), which is secreted from the metanephric mesenchyme. *GDNF* binds to the nephric duct, where it initiates the formation of the uretric bud and kidney development can continue. Many of the factors that regulate the expression of *GDNF* are still unknown. Knock out experiments of genes, which are expressed in metanephric mesenchyme during the stages of development when *GDNF* is expressed give some hint in respect of the factors, that could be involved in regulation of *GDNF*. Some of this factors include *Pax2*, *Six2* and *Eya1*. The fact, that these genes are involved in regulation of *GDNF* leads to the establishment of a possible regulatory network during kidney development, since other members of these gene families are known to act in such way during development of other organs. The regulation of expression of *Pax2*, *Six2* and *Eya1* is also mostly unknown.

One aim of this work was to identify factors, that are directly involved in regulation of the expression of *GDNF*. Such a direct effect of PAX2, SIX2, EYA1 and WT1 on the *GDNF*-promoter can be characterised by transient transfection assays. Only SIX2 has shown an effect on the promoter fragment used and two binding sites of SIX2 have been identified by electromobility shift assays and footprint assays. In accordance with a regulatory model containing Pax2-Eya1-Six2-GDNF pathway, factors, that are necessary for expression of *Six2* were characterised. I cloned a 920 bp fragment of the murine *Six2*-promoter and examined possible transactivation effects and binding abilities with the same genes used in the *GDNF* promoter studies. I have found, that SIX2 activates its own promoter and similarly to the *GDNF*-promoter, there are two binding sites of SIX2 in the *Six2*-promoter. Both pairs of binding sites contain palindrome sequences. To show an *in vivo* activity of the used promoter fragments, transgenic mice were generated. Expression of a reporter gene, under the control of the *Six2*- or *GDNF* promoter fragments in transgenic mice, was found in tissues, where endogenous expression of *Six2* or *GDNF* in wildtype mice is also seen.

The function of SIX2 as transcription factor is not well characterised. In this study I demonstrate that the C-terminus of SIX2 contains a transactivation domain. I also showed, that SIX3 and SIX6

also have an effect on the *Six2*-promoter and that these members of the Six-family can interact with members of the Pax-gene family

Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	1
<i>Abstract</i>	3
<i>Abkürzungen</i>	9
<i>Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren</i>	10
1.EINLEITUNG	11
1.1 DIE FRÜHE NIERENENTWICKLUNG	13
1.2 GENE, DIE AN DER ORGANOGENESE DER NIERE BETEILIGT SIND	14
1.2.1 <i>PAX2</i>	15
1.2.2 <i>EYA1</i>	15
1.2.3 <i>Stx2</i>	16
1.2.4 <i>GLIAL CELL LINE DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (GDNF)</i>	17
1.2.5 <i>Wt1</i>	19
1.2.6 <i>HOX11</i>	20
1.2.7 EXPRESSION DER GENE IN VERSCHIEDENEN KNOCK-OUT STUDIEN.....	21
1.3 EIN REGULATORISCHES NETZWERK WÄHREND DER NIERENENTWICKLUNG?	21
1.4 FRAGESTELLUNG.....	24
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 MATERIAL.....	25
2.1.1 CHEMIKALIEN UND BEZUGSQUELLEN	25
2.1.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	27
2.1.3 ENZYME	28
2.1.4 PLASMIDE.....	28
2.1.5 OLIGONUKLEOTIDE	31
2.1.7 ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME.....	35
2.1.8 ANTIKÖRPER	35
2.2 METHODEN	36
2.2.1 ZELLKULTUR.....	36
2.2.1.1 PASSAGIEREN VON ZELLEN	36
2.2.1.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	36
2.2.1.3 TRANSFEKTION DURCH SUPERFECT	36

2.2.2 DNA-METHODEN	37
2.2.2.1 ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN.....	37
2.2.2.2 AGAROSE-GELELEKTOPHORESE.....	38
2.2.2.3 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	38
2.2.2.4 PLASMID DNA MINI-PRÄPARATION	38
2.2.2.5 PLASMID-DNA MAXI PRÄPARATION	39
2.2.3 KLONIERUNGSTECHNIKEN.....	39
2.2.3.1 SCHNEIDEN VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	39
2.2.3.2 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA	39
2.2.3.3 AUFFÜLLEN VON 5'-ÜBERHÄNGEN	40
2.2.3.4 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN.....	40
2.2.3.5 DELETION UND BASENPAARAUSTAUSCHE IN DNA-FRAGMENTEN.....	40
2.2.4 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER <i>E. COLI</i> BAKTERIEN.....	40
2.2.5 TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIEN.....	41
2.2.6 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (“POLYMERASE CHAIN REACTION”, PCR).....	41
2.2.7 SEQUENZIERUNG VON DNA MIT ³³ P MARKIERTEN DIDESOXY-NTPS	42
2.2.8 PROTEIN-METHODEN	42
2.2.8.1 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION MIT BIORAD-LÖSUNG	42
2.2.8.2 AUFTRENNUNG VON PROTEINEN IN SDS-POLYACRYLAMIDGELEN (SDS-PAGE)	42
2.2.8.3 IMMUNOBLOT-ANALYSE VON PROTEINEN (“WESTERN-BLOT”).....	43
2.2.8.4 PRÄPARATION VON PROTEINEN-EXTRAKTEN	44
2.2.8.6 PRODUKTION UND REINIGUNG VON GLUTATHION-S-TRANSFERASE FUSIONSPROTEINEN	44
2.2.8.7 COOMASSIE-BRILLIANT-BLAU-FÄRBUNG VON PROTEINEN NACH SDS-PAGE.....	45
2.2.9 PROTEIN-BINDUNGSANALYSEN.....	45
2.2.9.1 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	45
2.2.9.2 DNA-GELRETARDATIONSANALYSE	45
2.2.9.3 FOOTPRINT-ANALYSE	46
2.2.10 TRANSGENE MÄUSE: GENERIERUNG, FÄRBUNG, SCHNITTE	47
2.2.10.1 SUPEROVULATION	47
2.2.10.2 PRÄPARATION DER EIZELLEN.....	47
2.2.10.3 KULTIVIERUNG DER EIZELLEN	47
2.2.10.4 MIKROINJEKTION IN PRONUKLEI.....	47
2.2.10.5 EILEITER- ODER AMPULLENTANSFER.....	48

2.2.10.6 VASEKTOMIE.....	48
2.2.10.7 PRÄPARATION VON MÄUSE-EMBRYONEN	49
2.2.10.8 GEWINNUNG DER DNA AUS EMBRYONALEM GEWEBE ZUR GENOTYPISIERUNG	49
2.2.10.9 LACZ-FÄRBUNG VON TRANSGENEN EMBRYONEN.....	49
2.2.10.10 TRANSVERSALSCHNITTE VON GEFÄRBTEN EMBRYONEN.....	50
2.2.11 MESSUNG DER FIREFLY-LUZIFERASEAKTIVITÄT	50
2.2.12 MESSUNG DER SEAP-AKTIVITÄT	51
2.2.12 SOUTHERN-BLOT	51
2.2.13 SCREENEN EINER MURINEN cDNA-BIBLIOTHEK	51
3. ERGEBNISSE	53
3.1 ANALYSEN AM MURINEN <i>GDNF</i> -PROMOTOR.....	54
3.1.1 <i>IN VIVO</i> CHARAKTERISIERUNG DES <i>GDNF</i> -PROMOTORS	54
3.1.2 EIN 3,6KB GROSSES <i>GDNF</i> -PROMOTOR-FRAGMENT ZEIGT TRANSAKTIVIERUNG DURCH SIX2	58
3.1.3 MURINES SIX2 KANN AN DEN <i>GDNF</i> -PROMOTOR BINDEN	59
3.1.4 SIX2 AKTIVIERT DAS <i>GDNF</i> -PROMOTOR-FRAGMENT P12	62
3.1.5 SIX2 BESITZT ZWEI BINDUNGSSTELLEN IM <i>GDNF</i> -PROMOTOR.....	63
3.1.6 DIE BINDUNGSSTELLEN GDNFI UND GDNFII VON SIX2 IM MURINEN <i>GDNF</i> -PROMOTOR	65
3.1.7 EINZELNE BASENPAARE IN DEN BINDUNGSSTELLEN SIND WICHTIG FÜR DIE BINDUNG VON SIX2	65
3.1.8 MUTIERTE BINDUNGSSTELLEN IM <i>GDNF</i> -PROMOTOR ZEIGEN EIN REDUZIERUNG IN DER BINDEAFFINITÄT	67
3.1.9 BEIDE BINDUNGSSTELLEN VON SIX2 SIND WICHTIG FÜR DIE TRANSAKTIVIERUNG	69
3.2 PROMOTORANALYSEN AM MURINEN <i>Six2</i> -PROMOTOR	70
3.2.1 KLONIERUNG DES MURINEN <i>Six2</i> -PROMOTORS	70
3.2.2 <i>IN VIVO</i> CHARAKTERISIERUNG DES 920BP DES MURINEN <i>Six2</i> -PROMOTORS	75
3.2.3 DER <i>Six2</i> -PROMOTOR WIRD DURCH SIX2 AKTIVIERT.....	79
3.2.4 SIX2 BINDET AN SEINEN EIGENEN PROMOTOR	80
3.2.5 SIX2 BESITZT ZWEI BINDUNGSSTELLEN IM <i>Six2</i> -PROMOTOR.....	82
3.2.6 DIE SEQUENZEN DER BEIDEN BINDUNGSSTELLEN SP1 UND SP2 ZEIGEN ÜBEREINSTIMMUNGEN	84

3.2.7 FÜR DIE TRANSAKTIVIERUNG VON SPB SIND DIE BEIDEN BINDUNGSSTELLEN UND FLANKIERENDE SEQUENZEN NOTWENDIG.....	84
3.2.8 DIE DELETION DER BINDUNGSSTELLEN SP1 UND SP2 FÜHRT ZU EINER REDUKTION DER BINDEAFFINITÄT AN DEN MURINEN <i>Six2</i> -PROMOTOR.....	88
3.2.9 REPORTERKONSTRUKTE DES <i>Six2</i> -PROMOTORS, WELCHE NUR NOCH EINE ODER KEINE BINDUNGSSTELLE FÜR SIX2 BESITZEN, ZEIGEN EINE VERMINDERTE TRANSAKTIVIERUNG.....	90
3.3 mSIX2 ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR UND INTERAKTIONSPARTNER.....	91
3.3.1 SIX2 IST EIN TRANSKRIPTIONSFAKTOR.....	91
3.3.2 SIX2 ZEIGT DURCH INTERAKTION MIT ANDEREN PROTEINEN EINE VERÄNDERTE TRANSAKTIVIERUNG.....	95
4. DISKUSSION.....	99
4.1 GDNF.....	99
4.1.1 <i>IN VIVO</i> EXPRESSION DES <i>GDNF</i> -PROMOTOR-FRAGMENTES.....	100
4.1.2 SIX2 KANN DEN <i>GDNF</i> -PROMOTOR AKTIVIEREN.....	101
4.1.3 SIX2 TRANSAKTIVIERT DEN <i>GDNF</i> -PROMOTOR ÜBER EINE PALINDROME SEQUENZ.....	102
4.2 DER <i>Six2</i> -PROMOTOR.....	103
4.2.1 <i>IN VIVO</i> ANALYSE DER 920BP DES <i>Six2</i> -PROMOTORS.....	104
4.2.2 EINE AUTOREGULATION VON <i>Six2</i> ?.....	106
4.2.3 BINDUNGSSTELLEN IM <i>Six2</i> -PROMOTOR.....	107
4.2.4 DIE AKTIVIERUNG VON <i>Six2</i> DURCH SIX2 ZEIGT GEMEINSAMKEITEN MIT DEM <i>GDNF</i> -PROMOTOR.....	108
4.3 SIX2, EIN TRANSKRIPTIONSFAKTOR.....	109
4.4 INTERAKTION UND KOMPENSATION DER SIX-FAMILIEN-MITGLIEDER.....	109
4.5 EIN REGULATORISCHES NETZWERK IN DER NIERENENTWICKLUNG.....	111
5. LITERATUR.....	113

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaar
BSA	Rinder Serumalbumin (bovine serum albumine)
Bsp.	Beispiel
C-Terminus	Carboxyterminus
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute
cDNA	copy DNA
CIP	engl. calf intestinal phosphatase
DBD	DNA-Bindedomäne
ddNTP	Didesoxy-Nukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	engl. enhanced chemofluorescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetracetat
engl.	englisch
et al.	und andere (et alii)
FCS	engl. fetal calf serum
FZK	Forschungszentrum Karlsruhe
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	Glutathion
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-M'-2-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
m	Meter
M	molar
mA	Milliampere
min	Minute
mRNA	engl. messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid Gelelektrophorese
PBS	engl. phosphat buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction

pH	pH-Wert
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rev.	engl. reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RSV	Rous Sarcoma Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris buffered saline/Tween
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Apn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

1. Einleitung

Organe sind komplexe Strukturen, die sich aus mehreren Gewebearten entwickeln. Die Entstehung der Organe ist genau festgelegt und ein Defekt im strukturellen Aufbau führt immer zu einer Beeinträchtigung der Funktion. Die Verwirklichung dieses “Bauplans” von Organen wird meist durch eine Gruppe von bestimmten Zellen durchgeführt, die in der Lage sind, angrenzende Zellen in ihrer Entwicklung zu beeinflussen. Dies resultiert in einer geänderten Form, Mitoserate oder Differenzierung dieser Zellen. Diese Art der Interaktion zwischen räumlich nahe beieinander liegenden Zellen oder Geweben von unterschiedlicher Herkunft und Eigenschaften nennt man *Induktion*. Für jede induzierte Interaktion gibt es mindestens zwei Komponenten: ein Zellverband produziert ein Signal, das das zelluläre Verhalten von anderem Gewebe verändert, der zweite Bestandteil sind die Zellen, die das Signal empfangen und darauf reagieren können.

Zu den am besten untersuchten Induktionen gehören die, die zwischen epithelialen Zellen und angrenzenden mesenchymalen Zellen stattfindet. Alle Organe entstehen aus einem Epithelium, das aus Schichten oder Röhren zusammenhängender Zellen besteht und sich aus jedem der drei Keimblätter entwickeln kann, und einem angrenzenden Mesenchym, welches aus einem losen Verband unzusammenhängender Zellen besteht und sich aus dem Mesoderm oder der Neuralleiste entwickelt. So entwickeln sich zum Beispiel Federn und Haare aus der ektodermalen Epidermis und der mesodermalen Dermis. Die inneren Organe wie Leber, Lunge, Bauchspeicheldrüse und Thymus entwickeln sich aus einer endodermalen Epidermis und einem mesodermalem Mesenchym. Zähne entstehen aus dem ektodermalen Kieferepithelium und einem Mesenchym, das sich von der Neuralleiste ableitet.

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts zeigte Clifford Grobstein, dass embryonales Nierengewebe *in vitro* kultiviert werden kann und abgesehen von der Vaskularisierung die gleiche Entwicklung wie *in vivo* durchgeht. Wie alle Organe entsteht die Niere durch Interaktionen zwischen Zellen von epithelialem und mesenchymalem Ursprung. Auch für die Entwicklung der Niere sind diese zwei Gewebearten also notwendig, die beide aus dem intermediären Mesoderm entstehen: das metanephrische Mesenchym und der epitheliale

Wolffsche Gang. Diese beiden Gewebearten wurden von Grobstein als die identifiziert, die für eine *in vitro* Entwicklung der Niere notwendig sind.

Die Ausbildung von exkretorischen Organen ist bei Säugetieren nicht auf die Niere beschränkt. Tatsächlich entstehen während der embryonalen Entwicklung drei solcher Organe, die sich alle aus dem intermediären Mesoderm entwickeln. Diese drei Organe (Pronephros, Mesonephros und Metanephros) bilden sich aus dem pronephrischen Gang, der ventral der anterioren Somiten entsteht, sich kaudal verlängert und später zum Wolffschen Gang wird¹.

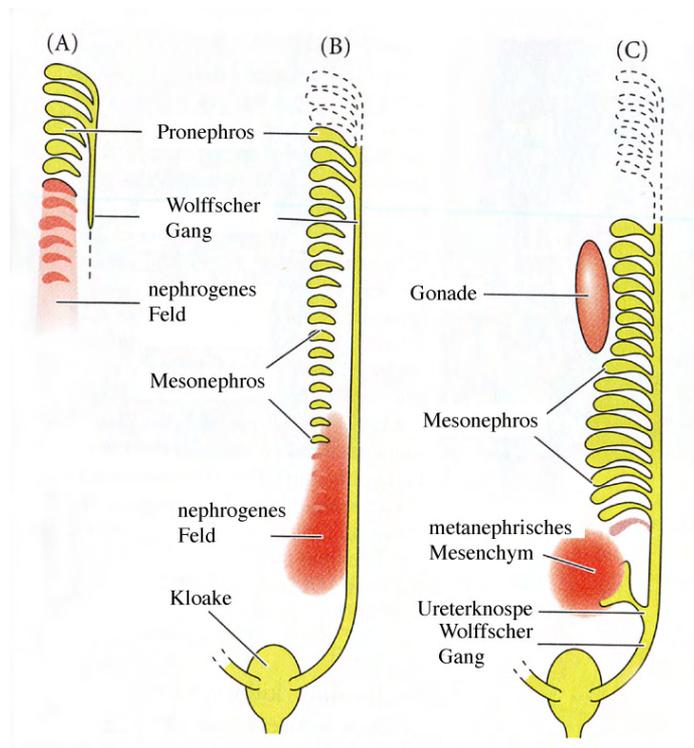


Abb.1: Schematische Darstellung der Nierenentwicklung in Vertebraten. (A) Der Pronephros und der sich kaudal verlängernde Wolffsche Gang. (B) Degeneration des Pronephros und Ausbildung der mesonephrischen Tubulae. (C) Der Metanephros entwickelt sich nach Eindringen der Ureterknospe zur permanenten Niere. Nach Gilbert "Developmental biology".

Der Pronephros als erstes dieser Organe scheint keine Funktion in Embryos von Mammaliern zu haben, er degeneriert während der Embryonalentwicklung. Der Mesonephros dient dem Embryo während seiner Entwicklung als exkretorisches Organ, er ist später an der Ausbildung der Gonaden beteiligt. Erst aus dem Metanephros entsteht die Niere als permanentes Organ. Diese drei Organe entwickeln sich alle in einer speziellen Reihen- und Zeitabfolge entlang der anterior-posterioren Achse des Mesoderms. Im Folgendem wird nur noch auf die Entwicklung der metanephrischen Niere eingegangen.

Die frühe Entwicklung der Niere bei Säugern besteht aus zwei wichtigen Prozessen, (a) der Bildung der Ureterknospe am Wolffschen Gang und (b) der Umwandlung des metanephrischen

Mesenchyms durch den einwachsenden Ureter². Obwohl viel über die morphogenetischen Prozesse während dieser Schritte bekannt ist, sind die genetischen Ursachen, die zu diesen Prozessen führen noch weitgehend unverstanden. Einige Gene, die dabei aktiv und notwendig sind, sind mittlerweile durch knock-out und transgene Studien identifiziert worden. Wie die Expression dieser Gene aber reguliert ist, oder in wieweit ihre Proteine interagieren, ist unbekannt.

1.1 Die frühe Nierenentwicklung

Die Entwicklung des Metanephros, welcher die permanente und funktionelle Niere in höheren Vertebraten bildet, beginnt in der Maus am Tag 10.5–11 post coitum. Vor diesem Zeitpunkt ist das metanephrische Mesenchym und der Wolffsche Gang noch getrennt vorhanden. Am Tag 10.5 – 11 p.c. kommt es zur Ausbildung der Ureterknospe am Wolffschen Gang. Dieser elongiert und dringt in das metanephrische Mesenchym ein.

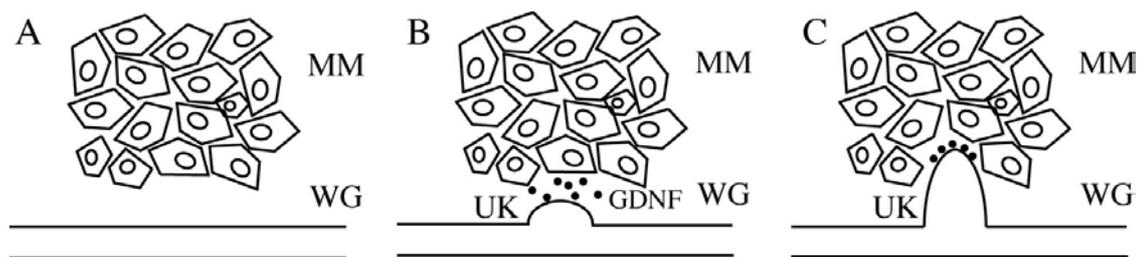


Abb.2: Schematische Darstellung der frühen Nierenentwicklung

(A) Das metanephrische Mesenchym (MM) und der Wolffsche Gang (WG) liegen am Anfang der Nierenentwicklung noch getrennt vor. (B) Nach Sekretion von GDNF durch das metanephrische Mesenchym und dessen Bindung an den WG, kommt es zur Bildung der Ureterknospe (UK). (C) Die Ureterknospe elongiert und dringt in das MM ein.

Das Induktionssignal, das zur Ausbildung der Ureterknospe führt, ist der glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF). *GDNF* wird im metanephrischen Mesenchym exprimiert, sekretiert und diffundiert dann an den Wolffschen Gang, wo es zusammen mit $GFR\alpha 1$ (GDNF-family receptor) an seinen Rezeptor RET bindet und die Knospung initiiert. Die Ausbildung der Knospe als Reaktion auf das GDNF-Signal des metanephrischen Mesenchyms erfolgt wie von Sainio et al (1997) beschrieben, nicht an einer willkürlichen Stelle des Wolffschen Ganges, sondern an der Stelle, an der das GDNF-Protein in höchster Konzentration an seinen Rezeptor RET an den Wolffschen Gang bindet³. GDNF wirkt dosisabhängig. Nach Ausbildung des GDNF- $GFR\alpha 1$ -RET-Komplexes, kommt es zur Aktivierung der Gene von Proteoglykanen (PG) und Wnt-11 im Wolffschen Gang und schließlich zur Bildung der Knospe. Die Ausbildung der Knospe ist kein primärer Effekt von GDNF auf die Zellzahl, es wirkt nicht mitogen, sondern es kommt zu einer gezielten Bewegung der Zellen in Richtung des GDNF-Signals³. Diese

Bewegung ist die Folge einer geänderten Morphologie der Zelle. Es kommt durch die Ausbildung und die Signalkaskade des GDNF-GFR α 1-RET-Komplexes unter anderem zu einer Reorganisation des Cytoskelettes in den Zellen des Wolffschen Ganges, welche für eine Zellbewegung wichtig ist⁴. Während der Ausbildung der Knospe wird die Expression des Ret-Rezeptors in den anderen Abschnitten des Wolffschen Ganges reduziert und *Ret* wird nur noch an der sich verlängernden Knospe exprimiert. GDNF kann während diesem und den nachfolgenden Stadien der Nierenentwicklung nur noch gebunden an der Spitze der Knospe nachgewiesen werden.

Wird eines dieser Gene aus dem GDNF-GFR α 1-RET-Komplex durch die Knock-out-Methode in Mäusen ausgeschaltet, so kommt es zu keiner Knospung des Ureters und das metanephrische Mesenchym degeneriert. Somit kommt es zu keiner Nierenentwicklung^{5, 6, 7, 8}. Nur eines dieser drei Gene wird exklusiv im metanephrischen Mesenchym exprimiert, *GDNF*. *Ret* und *GFR α 1* werden ausschließlich im Wolffschen Gang in der sich entwickelnden Niere exprimiert.

Wenn *GDNF* nur im metanephrischen Mesenchym exprimiert wird, welche Faktoren sind dann für seine Expression notwendig? Diese Frage ist noch nicht eindeutig geklärt. Einige knock-out Studien weisen aber zumindest auf mögliche Kandidaten hin. So zeigt der knock-out von *Pax2* und *Wtl* einen gleichen Phänotyp in Bezug zur Nierenentwicklung wie *GDNF*^{-/-}-Embryonen. Es wird keine Niere ausgebildet. Auch in Embryonen die eine homozygote Deletion von *Eya1* besitzen ist keine *GDNF*-Expression nachweisbar⁹. *Hox11*^{-/-} Tiere exprimieren ebenfalls kein *GDNF*¹⁰ und zeigen wie der *Eya1*^{-/-} Phänotyp keine Ausbildung von Nieren.

In all den genannten Fällen ist das Fehlen der Nierenentwicklung auf die gleiche Ursache zurückzuführen: das Eindringen des Ureters in das metanephrische Mesenchym bleibt aus. Bei den auf *GDNF*-Expression untersuchten knock-outs, wurde bei keinem eine *GDNF*-Expression in der sich entwickelnden Niere festgestellt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß sich die Gene, die zur Expression von *GDNF* führen, in einer hypothetischen genetischen Kaskade befinden.

1.2 Gene, die an der Organogenese der Niere beteiligt sind

Während der gesamten Nierenentwicklung ist eine Vielzahl von Genen aktiv. Im Nachfolgenden werden einige Gene beschrieben, die während der frühen Nierenentwicklung in der Maus zwischen Tag 9 und 11 p.c. im metanephrischen Mesenchym exprimiert werden und deren knock-out eine Fehlentwicklung, bzw. keine Entwicklung der Nieren aufweist.

1.2.1 *Pax2*

Die PAX-Proteine werden über das Vorhandensein einer 128 Aminosäuren langen DNA-Bindedomäne definiert, der *paired*-Domäne (PD). Es gibt neun verschiedene *Pax*-Gene, die sich aufgrund von Sequenzhomologien und Funktion in vier Untergruppen aufteilen lassen; *Pax1/9*, *Pax2/5/8*, *Pax4/6* und *Pax3/7*. Alle *Pax*-Gene spielen während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle.

Die *paired*-Domäne dieser Proteine stellt eine Besonderheit unter den DNA-Bindemotiven dar. Diese 128 Aminosäuren bilden zwei helix-turn-helix(HTH)-Motive, welche beide für die DNA-Bindung notwendig sind⁵⁶. Diese beiden Motive haben grosse Ähnlichkeit mit der klassischen Homeodomäne, welche aus 60 hoch konservierten Aminosäuren besteht und so kann die PD auch als ein Duplett aus zwei Homeodomänen angesehen werden, die durch ein paar wenige Aminosäuren kovalent verknüpft sind²⁵. Die PD ist für die DNA-Bindung notwendig, aber es wird vermutet, dass sie auch zur Protein-Protein Interaktion genutzt werden kann^{26,27}. Zusätzlich zu dieser *paired*-Domäne besitzen einige *Pax*-Proteine auch noch separate Homeodomänen (*Pax3*, 4, 6, 7). Die Bindung an DNA erfolgt oft als Dimer an palindromische TAAT-Motive des Typs 5'-TAAT(N)₂₋₃ATTA-3'²⁸. Als Transkriptionsfaktoren besitzen die Proteine der *Pax*-Familie auch eine Transaktivierungsdomäne, die im carboxy-terminalen Bereich lokalisiert ist²⁹. Diese Domäne kann sowohl reprimierend, als auch aktivierend wirken, was bei einigen *Pax*-Proteinen konzentrationsabhängig zu sein scheint.

Pax2 wird während der Embryonalentwicklung der Maus im optischen Stiel, der Mittel-/Vorderhirngrenze und dem Rückenmark exprimiert. Auch findet man eine Expression im caudalen mesonephrischen Gang, der Ureterknospe und im metanephrischen Mesenchym.

1.2.2 *Eya1*

Die *Eya*-Familie besteht aus vier Mitgliedern: *Eya1*, *Eya2*, *Eya3* und *Eya4*. Die Proteine dieser Gene bestehen aus zwei verschiedenen Domänen: einer nicht-konservierten N-terminalen Domäne, welche in der Länge in den verschiedenen EYA-Proteinen differiert und einer hochkonservierten 271 Aminosäuren langen carboxy-terminalen *Eya*-Domäne¹⁵. Die N-terminale Region der EYA Proteine besteht zu 35-40% aus Prolin, Serin und Threonin und stellt somit eine Prolin-Serin-Threonin (PST) Transaktivierungs-Domäne dar, wie sie auch in anderen Transkriptionsfaktoren gefunden wird³⁰. Eine spezifische DNA-Bindedomäne fehlt bei allen EYA-Proteinen. Die Expression von *Eya1* beginnt am Tag 8.5 p.c. im präsomitischen Mesoderm und im Mesenchym des Kopfes. Im Stadium E9.5 erscheint sie zusätzlich im Gehirn, der

pharyngalen Tasche, dem Rückenmark und in den Branchialbögen. *Eya1* wird in diesem Stadium auch im optischen Vesikel, der sich bildenden Linse, den Ohranlagen und Rathkes Tasche exprimiert. In späteren Stadien wird *Eya1* dann auch noch in verschiedenen Bereichen des Gehirnes, des Rückenmarkes, des Schnurrhaarfeldes, den Beinanlagen und ab Tag 10 p.c. in der sich entwickelnden Niere, speziell im metanephrischen Mesenchym, und im Mesonephros exprimiert.

Die einzig bisher bekannte Krankheit beim Menschen, die im Zusammenhang mit *Eya1* steht, ist das Branchio-Oto-Renal (BOR)-Syndrom. Das Erscheinungsbild dieses Syndroms ist nicht einheitlich. So kann es zu Fehlbildungen des Außenohres kommen, Stenosen des Gehörganges und verschiedenen Innenohrdefekten. Diese sind alle auf Fehlentwicklungen der Branchialbögen zurückzuführen. Die Mißbildungen in der Niere reichen von einer Fehlbildung der Harnleiter, über eine Dysplasie und einer Hypoplasie, bis zu einer unilateralen oder bilateralen Agnese.

1.2.3 *Six2*

Das erste *Six*-Gen, welches beschrieben wurde, war das *Drosophila* Gen *sine oculis*. Die murinen *Six*-Gene wurden über Sequenzhomologien zu diesem Gen identifiziert⁶². Die *Six*-Familie besteht aus sechs Mitgliedern, *Six1 – 6*, welche nur in mehrzelligen Organismen exprimiert werden. In Hefe lässt sich kein *Six*-Gen nachweisen. Die *Six*-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, welche eine Homeodomäne zur DNA-Bindung besitzen. Nur für SIX4 und SIX5 wurden bisher Domänen charakterisiert, die transaktivieren können^{17 und 30}.

Das SIX2-Protein besteht wie alle SIX-Familienmitglieder aus drei Komponenten. N-terminal liegt eine spezielle *Six*-spezifische Domäne, welche aus 110-115 Aminosäuren besteht. Danach folgt eine Homeodomäne mit 60 Aminosäuren. Der C-Terminus unterscheidet sich bei allen *Six*-Proteinen in der Länge und der Aminosäurezusammensetzung¹. Aufgrund von Ähnlichkeiten in der *Six*-Domäne (SD) und Homeodomäne (HD) lässt sich die *Six*-Familie in drei Subfamilien einteilen: *Six1/2*, *Six3/6* und *Six4/5*³¹. Die *Six*-Domäne ist für zwei Aufgaben verantwortlich. Sie ist wichtig für das Protein zur Erkennung spezifischer DNA-Bindesequenzen und ist wahrscheinlich auch für eine mögliche Interaktion des Proteins mit anderen Proteinen verantwortlich^{30,32,62}. Die Homeodomäne aller SIX-Proteine weist eine Besonderheit in der Aminosäuresequenz auf. Ihr fehlen zwei Aminosäuren (an Position 5 ein Arginin und in Position 12 ein Glutamin), die in den meisten Homeobox-Domänen für die Bindung an eine bestimmte DNA-Sequenz, dem TAAT-Motiv, notwendig sind. Dies könnte zu einer veränderten Bindespezifität in Bezug auf die DNA-Sequenz führen³².

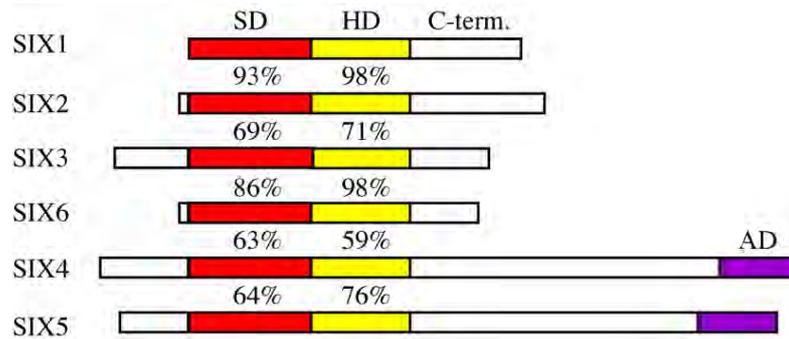


Abb.4: Vergleich der Protein-Struktur von SIX1-SIX6

Schematische Darstellung der murinen Six-Proteine und ihrer charakteristischen Domänen. Six-spezifische Domäne (SD), Homeodomäne (HD), C-Terminus (C-term.), Aktivierungsdomäne (AD). Die Angaben in Prozent entsprechen der Homologie zu den Domänen von Six1.

Eine Expression von *Six2* findet in dem sich entwickelnden Mausembryo erst ab Tag 8.5 p.c. statt. Hier findet man *Six2*-Expression im Kopfmesoderm und im Magen. Am Tag 9.5 p.c. weitet sich die Expression im Gehirn weiter aus, bleibt aber auf das Hinterhirn und den Ansatz des Rückenmarkes beschränkt. Zusätzlich findet nun auch eine Expression in den Branchialbögen und der ösophagialen Region statt. Diese Expressionsmuster bleiben am Tag 10.5 p.c. erhalten, aber auch eine weitere Expression im metanephrischen Blastem. Einen Tag später in der Mausentwicklung kann man eine Expression in den vorderen Beinanlagen beobachten, ebenso wie in den thorakalen Somiten. Die Expression in der Nierengegend weitet sich auf die Genitalleiste aus. Am Tag 12.5 p.c. steigert sich die Expression in den Beinanlagen. Alle anderen Expressionsorte sind noch erhalten, wobei sich die Expression in der Niere auf das Mesenchym beschränkt, das die Ureterknospen umgibt. Ab Tag 14 p.c. reduziert sich die Expression von *Six2* in den einzelnen Geweben und findet hier nur noch in einigen Kopfknochen und –muskeln statt. Die Expression im Ösophagus, dem Magen und der Niere ist am Tag 16 p.c. nicht mehr nachzuweisen.

Krankheiten, die durch Mutationen im *Six*-Gen verursacht werden, wurden bislang nicht charakterisiert.

1.2.4 Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)

GDNF gehört zu den Proteinen der TGF- β Großfamilie (transforming growth factor β). Diese transformierenden Wachstumsfaktoren stellen Proteine dar, die als lokale Mediatoren wirken und je nach Struktur verschiedene Funktionen ausüben. Neben einem Effekt auf die Regulation der Zellteilung und das Wachstum, besitzen sie noch eine Vielzahl weiterer Aufgaben: sie kontrollieren, in Abhängigkeit von der Zellumgebung, das Überleben, die Differenzierung, oder

auch Bewegung von Zellen. Die Wirkung ist konzentrationsabhängig: in einer bestimmten Konzentration verstärkt TGF- β die Proliferation, in einer anderen wird sie reprimiert.

Die TGF- β Faktoren werden als Vorläufermoleküle synthetisiert und als inaktive Proteine aus der Zelle ausgeschleust, die erst später durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Obwohl GDNF weniger als 20% Aminosäuresequenzhomologie mit den anderen Mitgliedern der TGF- β Familie teilt, wird GDNF zur TGF- β Großfamilie gezählt, aufgrund einer Gemeinsamkeit, die alle Mitglieder besitzen: ein Motiv aus sieben konservierten Cys-Wiederholungen.

Wegen seiner Rolle bei der Parkinsonschen Krankheit und dem daraus resultierendem klinischen Interesse, wurde *GDNF* aus der Rattenzelllinie B49 isoliert und charakterisiert³³. Wie die anderen Mitglieder der TGF- β Familie, wird GDNF als inaktives Vorläufermolekül synthetisiert, sekretiert und ist erst dann als ein Protein von 134 Aminosäuren aktiv.

Das murine *GDNF*-Gen besteht aus vier Exons und drei Introns³⁴. Weiterhin wurden für *GDNF* drei alternative Promotoren gefunden, die anscheinend alle durch die gleichen Faktoren stimuliert werden können. So liegt der erste Promotor vor Exon 1, der zweite vor Exon 2 und der dritte vor Exon 3. Jeder der Promotoren führt zur Expression von zwei verschiedenen Transkripten, welche durch unterschiedliches Spleißen des Exon 3 entstehen, so dass sich eine Gesamtzahl von sechs Transkripten ergibt. Nur der Promotor eins und drei enthält eine TATA-Box. Die kodierenden Sequenzen von *GDNF* sind in Exon 3 und Exon 4 lokalisiert. In welchem Verhältnis diese sechs Transkripte exprimiert werden, oder ob sie für unterschiedliche Aufgaben notwendig sind, ist nicht bekannt.

GDNF wird in verschiedenen Bereichen des Gehirns, sowie des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert^{6,35,36,37}. Hier spielt es eine wichtige Rolle bei der Erhaltung und vielleicht auch Differenzierung von dopaminergen, spinalen, cranialen, sympathischen, noradrenergen und Notoneuronen. Weiterhin findet man mRNA von *GDNF* im metanephrischen Mesenchym, wo es als wichtiges Signal für die sich entwickelnde Niere dient. Neben diesen Expressionsorten findet man weitere Gewebe und Organe, in denen *GDNF* exprimiert wird. Zu diesen gehören Magen, Darm, Pharynx, Branchialbögen, Ösophagus und den mesenchymalen Zellen, welche die Knorpelanlagen der Extremitäten umgeben. Eine Expression von *GDNF* wurde auch in der Nasengrube, in der sich die Schnurrhaare entwickeln, festgestellt³⁷.

GDNF spielt vor allem in der Parkinsonschen Krankheit eine Rolle. Kommt es zu einer Fehlfunktion in der GDNF-Synthese, so führt das zu einer Degeneration der dopaminergen Neuronen im Gehirn, was sich in unkontrollierten Bewegungen, starkem Tremor und Haltungstörungen äußert. Die Degeneration der Nerven resultiert aus einer verminderten

Dopamin-Aufnahme in die Nerven. Eine weitere Krankheit, welche mit GDNF assoziiert ist, ist die Lou Gehring'sche Krankheit. Bei ihr kommt es zu einem Absterben der motorischen Rückenmarksnerven.

GDNF spielt auch eine Rolle bei der Entwicklung verschiedener Organe. So resultiert die gezielte Deletion im *GDNF*-Gen in Mäusen in polymorphen Defekten. Es kommt zu einer renalen Dysgenese, einer abnormalen Entwicklung des Gastrointestinaltraktes und verschiedenen Defekten in der Entwicklung des Nervensystems^{6,36}.

1.2.5 *Wt1*

Wt1 wurde als Tumorsuppressorgen identifiziert³⁸, das bei der Ausbildung des Wilms Tumor, einem Nierentumor, beteiligt ist. WT1 ist auch ein Transkriptionsfaktor, der als DNA-Bindedomäne an seinem C-Terminus vier Zinkfinger des Typs Cys2-His2 (komplexieren ein Zink-Ion) besitzt. Am Aminoterminus von WT1 liegt eine Domäne, die zum einen eine reprimierende Funktion ausübt, aber auch eine aktivierende Wirkung haben kann, wie sich in Zellkultur-Versuchen mit dem *amphiregulin*-Promotor zeigte⁶⁵. Das Gen *Wt1* kodiert für mindestens vier verschiedene Isoformen. Diese entstehen durch alternatives Spleißen. Ein Unterschied in den Spleißformen liegt im Vorhandensein, bzw. Fehlen von drei Aminosäuren (KTS) zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger des WT1-Proteins, was eine verändertes Bindevermögen zur Folge hat (WT1A oder WT1(+KTS) und WT1C oder WT1(-KTS)). Alle Spleißvarianten werden in einem konstanten Verhältnis zueinander exprimiert^{30,57}.

Wt1 wird in der Niere exprimiert. Die Expression von *Wt1* ändert sich hier im Verlauf ihrer Entwicklung. Zu Beginn ist *Wt1* mRNA und das Protein nur in geringen Mengen in den uninduzierten mesenchymalen Stammzellen exprimiert. Die Expressionshöhe steigert sich, nachdem das metanephrische Mesenchym kondensiert ist und die Differenzierung zu Epithelzellen stattfindet. Nach der abgeschlossenen Differenzierung des Nephrons sind hohe mRNA Spiegel in der Niere nachweisbar, wobei die Expression sich auf die Podozytenschicht des Glomerulus beschränkt⁴¹. Mäuse, die für *Wt1* eine homozygote null Mutation besitzen, sterben noch während der Embryonalentwicklung⁴². Bei diesen Embryonen kommt es zu keiner Nierenentwicklung. Das metanephrische Mesenchym ist nicht in der Lage sich zu differenzieren und degeneriert durch Apoptose. Auch der Ureter entwickelt sich nicht und degeneriert schließlich. Weiterhin unterbleibt in *Wt1* knock-out Mäusen die Entwicklung der Gonaden und das Mesothel bildet sich nur unvollständig aus. Dieses Beispiel zeigt nicht nur deutlich die Rolle

von *WT1* bei der Nierenentwicklung, sondern auch, daß für die Entwicklung des Ureters die Anwesenheit des metanephrischen Mesenchyms notwendig ist.

Neben der Niere findet man Expression von *Wtl* während der Entwicklung der Gonaden, in den Sertolizellen des Hodens, den Granulosazellen der Ovarien, der Milz und in Mesothelzellen, welche als dünne Haut die inneren Organe wie das Herz umgeben und die Körperhöhlen auskleiden.

WT1 spielt nicht nur eine Rolle bei der Ausbildung des Wilms Tumors, sondern ist auch noch an der Entstehung anderer Krankheiten beteiligt. Dazu gehören das Denys-Drash- und das Frasier-Syndrom. In beiden findet man Punktmutationen von *WT1*. Das Krankheitsbild beider Syndrome äußert sich zudem in einer fortschreitenden Nierendegeneration.

1.2.6 *HOX11*

Ein Charakteristikum der *Hox*-Familien-Gene ist ihr Vorkommen in Gruppen. So sind die 39 Gene der *Hox*-Familie in vier Kluster, welche als *Hoxa*-, *Hoxb*-, *Hoxc*- und *Hoxd*-Kluster bezeichnet werden, auf vier verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Jedes dieser Kluster enthält zwischen neun und elf *Hox*-Gene. Diese vier Kluster sind durch zweimalige Duplikation einer "Ausgangs"-Gruppe entstanden. Aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs besitzen die Gene der verschiedenen Gruppen noch große Homologien untereinander, was eine weitere Einteilung in Subgruppen möglich macht, z.B. *Hoxa11*, *Hoxc11* und *Hoxd11*. Zwischen den homologen Genen in diesen Subgruppen besteht eine Redundanz in ihrer Wirkungsweise während der Entwicklung¹⁰. Das Vorhandensein einer Homeobox und ihre Fähigkeit, transaktivierend zu wirken, kennzeichnet die *Hox*-Proteine als Transkriptionsfaktoren⁴³.

Die homologen Gene der *Hox11*-Gruppe (a, c, d) werden alle im metanephrischen Mesenchym exprimiert. Eine Redundanz der einzelnen Mitglieder zeigt sich, wenn nur eines der Gene durch transgene Techniken inaktiviert wird. In diesem Fall kommt es zur Ausbildung eines hypomorphen Phänotyps. Erst die Inaktivierung aller drei Gene, zeigt einen deutlichen Phänotyp¹⁰.

Hox11-Expression findet man auch in den Branchialbögen, dem Hinterhirn, dem Rückenmark, dem späteren Pharynx, Herz, T-Zellen und in der Milz²³.

1.2.7 Expression der Gene in verschiedenen Knock-out Studien

Die nachfolgende Tabelle zeigt noch einmal alle Expressionsdaten der Gene aus 1.2 in den jeweiligen Knock-out Studien. So weißt der knock-out von z.B. *Eya1* Expression von *Pax2* und *Wt1* auf, aber keine von *GDNF* und *Six2*. Die Expression von *Hox11* wurde nicht untersucht.

	Gefundene Expression	GDNF	Eya1	Pax2	Wt1	Hox11	Six2
Knock-out							
GDNF		-	n.u	n.u	n.u	n.u	n.u
Eya1		-	-	+	+	n.u	-
Pax2		-	n.u	n.u	n.u	n.u	+
Wt1		+	n.u	n.u	n.u	n.u	n.u
Hox11		-	+	+	+	-	-

Eine Knock-out Studie von *Six2* ist bisher noch nicht veröffentlicht worden. - = keine Expression nachweisbar, + = wird exprimiert, n.u. = nicht untersucht

Alle diese Gene werden im metanephrischen Mesenchym exprimiert. Wie die Expression dieser Gene in der sich entwickelnden Niere reguliert wird, ist weitest gehend unbekannt.

1.3 Ein regulatorisches Netzwerk während der Nierenentwicklung?

Pax-, *Eya*- und *Six*-Familienmitglieder sind alles Homologe von Genen, die zuerst in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurden; *Pax6* ist das Homolog von *eyeless* (*ey*), *Eya1* das von *eyes absent* (*eya*) und *Six1/2* das von *sine oculis* (*so*). Diese Gene sind in *Drosophila melanogaster* wichtig für die Augenentwicklung^{11,12}. Dabei wurde gezeigt, daß das *eyeless*-Protein direkt an *sine oculis* binden kann und seine Transkription aktiviert¹³. *Sine oculis* und *eyes absent* bilden hingegen einen Komplex, der zur Expression von *eyeless* führt¹⁴. Zusammen mit einem anderen Gen, das für die Augenentwicklung notwendig ist, *dachshund* (*dach*), bilden diese Gene ein regulatorisches Netzwerk während der Augenentwicklung bei *Drosophila melanogaster*. Dieses Modell, das Zusammenwirken der Gene, bzw. der Proteine von *Pax*, *Six* und *Eya*, lässt sich auch auf die Entwicklung in Vertebraten übertragen. Für *Six3* wurde in Vertebraten gezeigt, dass eine Überexpression von *Six3* zu einer Expression von *Pax6* und *Pax2* führt^{15,16}. Die Expression von *Eya1* und *Eya2* ist hingegen von PAX6 abhängig¹⁵. EYA1 und SIX2 können direkt auf Proteinebene interagieren¹⁷. *Pax2*, *Six* (*Six2*, *Six4*) und *Eya1* werden im optischen Vesikel am

Tag 10.5 p.c. ko-exprimiert^{15,16,18}. Weiterhin findet man eine Ko-expression von *Six* (*Six1*, *Six2*, *Six4*), *Eya1* und *Pax2* in der sich entwickelnden Niere^{19,20,21}.

Am besten ist dieses mögliche regulatorische Netzwerk in Säugern bisher bei der Entwicklung der Somiten untersucht worden. Hier wurde gezeigt, dass PAX3, SIX1, EYA2 und DACH2 für die Myogenese notwendig sind. Die gleichzeitige Überexpression von *Dach2* mit *Eya2* oder *Eya2* mit *Six1* hat zur Folge, dass die Expression von *MyoD* stimuliert wird. Die alleinige Überexpression von *Dach2*, *Six1* oder *Eya2* hat keinen Effekt. Diese synergistische Regulation der Myogenese basiert auf Protein-Protein Interaktionen (Heanue 1999). Diese Gene sind aber nicht nur an der Myogenese beteiligt, sondern auch verantwortlich für die Expression der Gene untereinander. So führt die Überexpression von *Six1* zur Aktivierung von *Dach2* und *Eya2*. Die gleichzeitige Überexpression von *Six1*, *Eya2* oder *Dach2* hingegen führt zur Induktion der Expression von *Pax3*. Werden *Dach2* mit *Eya2* oder *Eya2* mit *Six1* zusammen überexprimiert, so wird die Expression von *Pax3* sehr stark aktiviert.

Die Expression, bzw. die Nicht-Expression einzelner Gene beim knock-out von *Pax2* und *Eya1* legt nahe, dass es ein regulatorisches Netzwerk dieser Gene, bzw. ihrer Proteine gibt. Wie schon erwähnt, findet man im *Eya1* knock-out keine *Six2*-Expression⁹. *Pax2*, *Six2*, *Eya1* und *GDNF* werden alle speziell im metanephrischen Mesenchym der sich entwickelnden Niere exprimiert. So ist es zumindest räumlich möglich, dass die Gene bzw. ihre Proteine in einer Interaktion stehen. Auch werden alle vier Gene vor dem Tag 10 p.c. der Embryonalentwicklung in der Maus exprimiert, somit ist eine Interaktion auch zeitlich gesehen möglich. Für SIX2 und EYA1 wurde bereits gezeigt, dass sie miteinander interagieren können¹⁷. Untersuchungen an *Eya1*^{-/-} Embryonen zeigten, dass *Pax2* exprimiert wird, aber keine Expression von *Six2* und *GDNF* nachzuweisen ist. Daraus kann man folgern, dass die Expression von *Eya1* nach *Pax2* erfolgt, aber vor der von *Six2* und *GDNF* bzw. dass EYA1 für die Expression von *Pax2* nicht unbedingt notwendig ist, aber im Zusammenhang mit der von *Six2* und *GDNF* steht. Ein weiteres Gen, das für die Nierenentwicklung notwendig ist, sind die drei paraloge Gene von *Hox11* (*Hoxa11*, *Hoxc11* und *Hoxd11*). Werden diese gleichzeitig inaktiviert, so erfolgt in den entsprechenden Embryonen keine Nierenentwicklung¹⁰. Desweiteren kann in den *-/-* Embryos *Pax2* und *Eya1*-Expression nachgewiesen werden, aber keine von *Six2* und *GDNF*.

Nur für PAX2 ist bisher eine funktionelle Bindestelle im *GDNF*-Promotor nachgewiesen worden²². PAX2 hat also direkt etwas mit der Expression von *GDNF* zu tun. Aus diesen Daten läßt sich, wie für die Augenentwicklung bei *Drosophila* und die Somitenentwicklung in der Maus, ein Modell für die Rolle von *Pax*, *Six*, *Eya* und *GDNF* in der Nierenentwicklung bei Säugern ableiten. Inwieweit das Wilms Tumor Gen *Wt1* in dieses Netzwerk involviert ist, oder

ob es überhaupt einen Effekt auf eines der anderen Gene besitzt ist unklar, da bisher keine Ergebnisse darüber gefunden wurden, dass WT1 mit *Eya1*, *Six2* oder *GDNF* interagiert. Nur für *Pax2* wurde bisher eine Regulation gefunden. So induziert PAX2 direkt die Expression von *Wt1* im metanephrischen Mesenchym und WT1 reprimiert dann während der späteren Phase der Nierenentwicklung *Pax2*². Während der Milzentwicklung kann HOX11 die Expression von *Wt1* steigern, wobei WT1 keinen Effekt auf die Expression von *Hox11* hat²³.

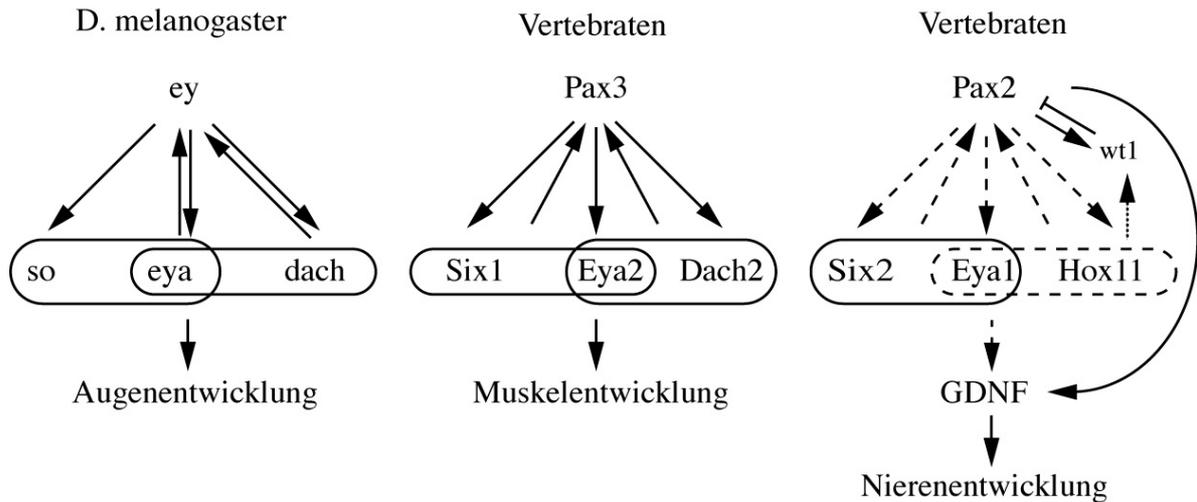


Abb.3: Modell möglicher regulatorischer Netzwerke in *Drosophila* und Säugern (A) ey-so-eya-dach-Netzwerk in der Augenentwicklung von *Drosophila*; (B) Pax3-Six1-Eya2-Dach2 Regulation in der Muskelentwicklung von Säugern; (C) Pax2-Six2-Eya1-Hox11 Verknüpfung in der Nierenentwicklung von Säugern; durchgezogene Pfeile zeigen bewiesene Interaktionen, gestrichelte Pfeile mögliche Interaktionen; gepunktete Linien zeigen Interaktionen in anderen Organen

Fasst man alle pulplizierten Daten für die genannten Gene zusammen, so läßt sich ähnlich wie bei der Augenentwicklung von *D. melanogaster* und bei der Muskelentwicklung in Vertebraten ein mögliches Modell für Interaktionen von Genen, bzw. ihren Genprodukten während der frühen Nierenentwicklung aufstellen. Inwieweit die beteiligten Faktoren miteinander interagieren muss aber noch aufgeklärt werden.

1.4 Fragestellung

1. Welche Faktoren sind an der Expression von *GDNF* während der Nierenentwicklung beteiligt?

Die Regulation der Expression von *GDNF* während der Nephrogenese ist noch weitestgehend unbekannt. Nur für PAX2 wurde bisher eine direkte Beteiligung nachgewiesen. Da PAX2 jedoch nicht alleine für die Regulation zuständig sein kann, muss es noch andere Faktoren geben, die daran beteiligt sind. Diese Faktoren und deren mögliche Bindung sollten unter Verwendung eines *GDNF*-Promotor-Fragmentes mittels transienter Transfektionen, Gelretardationsanalysen und Deletionsversuchen charakterisiert werden.

2. Welche Faktoren sind an der Expression von *Six2* beteiligt?

Sollte es einen regulatorischen Pax2-Eya1-Six2-GDNF-Pfad geben, welche Faktoren regulieren dann die Expression von *Six2*? Auch diese Frage sollte mittels transienter Transfektionen und Gelretardationsanalysen beantwortet werden. Da der murine *Six2*-Promotor nicht bekannt ist, sollte dieser kloniert werden. Eine *in vivo* Aktivität des Fragmentes sollte wie beim *GDNF*-Promotor-Fragment über die Generierung von transgenen Mäusen nachgewiesen werden.

3. Charakterisierung von SIX2

3.1 Ist SIX2 ein Transkriptionsfaktor?

Für SIX2 wurde bisher nur eine DNA-Bindedomäne charakterisiert. Als Transkriptionsfaktor muss es aber auch eine transaktivierende oder -reprimierende Domäne besitzen. Diese sollte mittels eines klassischen Domänenwechselexperimentes identifiziert werden.

3.2 Kann SIX2 mit anderen Proteinen einen Effekt auf die Transaktivierung haben?

SIX2 kann mit EYA1 den *myogenin*-Promotor aktivieren. Kann es auch mit anderen Proteinen den *Six2*-Promotor aktivieren? Ein transaktivierender Effekt auf die Expression von *Six2* und eine mögliche Interaktion mit anderen Proteinen, sollte mittels transienter Transfektion aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q Reinstwassersystem der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym Diagnostik, Hameln
Ammoniumperoxidisulfat	BioRad, München
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit
Bacto Trypton	Difco, Detroit
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
2'-Deoxynukleosid-5'Triphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxyd (DMSO)	Fluka, Buchs
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Gibco BRL, Eggenstein
DNA Purification Kit (Easy Pure)	Biozym Diagnostik, Hameln
DNA-Marker	New England Biolabs
DTT	Sigma, Deisenhofen
ECL TM <i>Western blotting detection reagents</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
96% Ethanol	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenguanintetraessigsäure (EGTA)	Serva, Heidelberg
FCS (fetal calf serum)	Bio Whittaker, Verviers
Filter 0,22 µm Millex-GV4	Millipore

Material und Methoden

Formaldehyd 37%	Merk, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glutathion	Fluka, Buchs
Glutathion-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycyl-Glycine	Roth, Karlsruhe
human chorionic Gonadotropin	Sigma, Deisenhofen
Hyaluronidase	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhexacyanoferrat (K3)	Merck Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat (K4)	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Roche Diagnostics, Mannheim
Luciferin	Biosynth AG
Magermilchpulver	Laliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulphat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxyd	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP-40)	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide (Primer)	MWG
Oligotex Direct mRNA Purification Kit	Qiagen, Heidelberg
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Heidelberg
PCR-ddH ₂ O, reinst	Bio Whittaker, Verviers
PCR-Reaktionsgefäße	Robbins Scientific Corp.
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen
Pregnant mare serum Gonadotropin	Sigma, Deisenhofen
Propanol-2	Merk, Darmstadt
Proteinase K	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf

RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
RNasin (40 U/ μ l)	Promega, München
RT-Superskript II mit Puffern	Gibco BRL
Spritzen 1 ml	B/Braun
SuperFect transfection reagent	Qiagen, Heidelberg
2,2,2 Tribromethanol	Sigma, Deisenhofen
Taq-Polymerase (5 U/ μ l) mit Puffern	Gibco, Eggenstein
Tris HCL, Tris Base	Roth, Karlsruhe; Sigma
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin, 0,25%	Gibco, Eggenstein
Tween20	Serva, Heidelberg
Wizard Plus Miniprep Kit	Promega, München
X-Gal	Sigma, Deisenhofen
Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, Plastik (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen

Alle übrigen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen. Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschränke	HT-Infors, Heraeus
Deckgläser Labonord	Surgipath, Richmond
EagleEye-Kamera und UV-Leuchte	Stratagene, Heidelberg
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven
Geltrockner	BioRad, München
Hyperfilm XR	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immu-Mount	Shandon, Pittsburgh
Injektionsgeräte:	
- Injektionsapparatur DM/IRB mit DIC Optik	Leika
- Manipulator	Naraskige
- Injektionskanüle Transjektör 4509	Eppendorf
PTC-200 Peltier Thermo Cycler	MJ Research

Objektträger Snowcoat X-tra	Surgipath, Richmond
Peltier Thermo Cycler PTC-200	MJ-Research
Photometer	Zeiss, Jena
Photoapparate KR10	Rico
Luminometer Lamat LB9501	Berthold, Wildbad
Nick™ Columns	Amersham Pharmacia Biotech AB Uppsala Schweden
Thermomixer 5436	Eppendorf,
Stereomikroskop MS5	Leitz
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
Vakuum-Konzentrator (speed-vac)	Savant, Farmingdale
3mm Whatman Papier	NeoLab, Heidelberg
Zellkulturartikel	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugen:	
- Biofuge Pico	Heraeus
- 233 MK	Hermle
- Centrikon H-401	Hermle
- Centrifuge 5417R	Eppendorf

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Boehringer (Mannheim), Promega (München), Gibco BRL (Eggenstein) oder United States Biochemicals (Cleveland) bezogen.

2.1.4 Plasmide

RC/CMV:	ein Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor
pcDNA 3.1-Flag:	ein Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor und einer Flag-Sequenz
pKSTNLSlacZ:	ein modifizierter Bluescript-Vektor, der eine NLS-Sequenz (nukleäres Lokalisationssignal) und ein <i>LacZ</i> -Gen besitzt
pKSTmGDNF:	ein pBluscript-Vektor mit einem 10,5 kb langen Fragment des mGDNF-Promotors
10,5 kb GDNF:	pKSTmGDNF, in den ein Linker und das NLSlacZ Insert von pKSTNLSlacZ inkloniert sind

Material und Methoden

3,6kb GDNF:	eine 7kb XhoI/EroRI deletierter pKSTmGDNF, in den ein Linker und das NLSlacZ Insert von pKSTNLSlacZ einkloniert sind
SPBLacZ:	Vektor pKSTNLSlacZ, in den 920bp des Six2-Promotors kloniert wurden
pGL3 Basic:	ein promotorloser Luciferase-Vektor
3,6kb luciGDNF:	ein pGL3-Vektor mit einem 3,6 kb langen Fragment des mGDNF-Promotors
P12:	ein pGL3-Vektor mit einem 438bp langen Fragment des mGDNF-Promotors
SeapBasic:	ein promotorloser Vektor, der eine sekretierende alkalierende Phosphatase als Reporter trägt
SPB:	der SeapBasic Vektor, in den 920bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden
SPB720:	der SeapBasic Vektor, in den 720bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden
SPB520:	der SeapBasic Vektor, in den 520bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden
SPB320:	der SeapBasic Vektor, in den 320bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden
SPB220:	der SeapBasic Vektor, in den 220bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden
SPB120:	der SeapBasic Vektor, in den 120bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden
SPB100+:	der SeapBasic Vektor, in den 100bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden; er enthält die Bindungsstellen SP1 und SP2 von SIX2
SPB200+:	der SeapBasic Vektor, in den 100bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden; er enthält die Bindungsstellen SP1 und SP2 von SIX2 und 100bp der 5' gelegenen Sequenzen
SPB100-:	der SeapBasic Vektor, in den 100bp des murinen Six2-Promotors kloniert wurden, er enthält die Bindungsstelle SP1 und 5' davon gelegene Sequenzen
SP30+:	die 30bp der Bindungsstelle SP1 wurden in den SeapBasic Vektor kloniert
320delI:	der Vektor SPB320 mit einer 30bp Deletion der Bindungsstelle SP1

Material und Methoden

320delII:	der Vektor SPB320 mit einer 50bp Deletion der Bindungsstelle SP2
320delIII:	der Vektor SPB320 mit einer Deletion der beiden Bindungsstellen SP1 und SP2
pfSix2:	ein CMV-Promotor tragender Vektor, in den die murine cDNA von Six2 kloniert wurde (BssHII/Sau3A)
pHM6Eya1:	ein CMV-Promotor tragender Vektor, in den die murine cDNA von Eya1 kloniert wurde (Srf2/Srf1)
pCMVPax2:	ein Vektor mit einem CMV-Promotor und der murinen Sequenz von Pax2
pCMVPax3:	ein Vektor mit einem CMV-Promotor und der murinen Sequenz von Pax3
CA, CC;	RC/CMV-Vektor in den die Spleißformen A oder C von Wt1 in die MCS-Site kloniert wurde
pGEX-KG:	ein Vektor, der die Glutathion-S-Transferase Sequenz enthält
GST-Six2:	in den Vektor pGEX-KG wurde die cDNA von mSix2 kloniert
GST-Wt1A	in den Vektor pGEX-KG wurde die cDNA der Spleißform A von Wt1 kloniert
GST-Wt1C	in den Vektor pGEX-KG wurde die cDNA der Spleißform C von Wt1 kloniert
pM+:	ein Vektor, der den SV40-Promotor und eine GAL4-Bindedomäne trägt
pM:	pM+, bei dem die Gal4-BD deletiert wurde
pM-Six2wt:	pM+ in den die cDNA von Six2 <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert wurde
pM-SD:	pM+ in den die cDNA der Six-Domäne von Six2 <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert wurde
pM-HD:	pM+ in den die cDNA der Homeodomäne von Six2 <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert wurde
pM-Cterm:	pM+ in den die cDNA des C-Terminus von Six2 <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert wurde
pM-SH:	pM+ in den die cDNA der Six-und Homeo-Domäne von Six2 <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert wurde
pM-HC:	pM+ in den die cDNA der Homeo-Domäne und der C-Terminus von Six2 <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert wurde
pM-HC285:	der Vektor HC mit einer 57bp Deletion des 3' Endes des C-Terminus
pM-HC228:	der Vektor HC mit einer 114bp Deletion des 3' Endes des C-Terminus

pM-HC171:	der Vektor HC mit einer 171bp Deletion des 3' Endes des C-Terminus
pM-HC114:	der Vektor HC mit einer 228bp Deletion des 3' Endes des C-Terminus
pM-HC57:	der Vektor HC mit einer 285bp Deletion des 3' Endes des C-Terminus

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Generierung der LacZ-Konstrukte, die den *GDNF*-Promotor beinhalten

Linker1L	5'-gatccgaggtgccgcccggacgggactctaccatggactgactgactggg
Linker2L	5'-ggccgccactcagtcagtcctatgtagagtcctccgcccggcgccacactcg

Generierung von *Six2*-Fragmenten zur Klonierung in pM+:

GAL/SD5	5'-atgcaattcatgtccatgctgccca
GAL/HD5	5'-atgcaattcggcgaggagaccagct
GAL/Cterm5	5'-atgcaattcgccaaggaaagggaga
GAL/SD3	5'-gcattctagatcagtcctcagatggagc
GAL/HD3	5'-gcattctagatcactcggcccagct
GAL/Cterm3	5'-gcattctagatctaggagcccaggtcc
HCI	5'-acgtaagcttcaagccagcgggtgtggctgc
HCII	5'-acgtaagcttcacgtcttctcatcctcggaact
HCIII	5'-acgtaagcttcacggcgggctgagcaacaacag
HCIV	5'-acgtaagcttcatgcgctcgggcccggagg
HCV	5'-acgtaagcttcagctgtggtgatgctgcagtgg

Generierung von *GDNF*-Promotor-Fragmenten für Gelretardations-Analysen:

Shift5.III	5'-ttgttttcgggctgcctagt
Shift3.III	5'-tgtgttctggaagaagctgagac
Shift5.IV	5'-acatactccccaacaactggatg
Shift3.IV	5'-agttccagcgagaggactca
Shift5.V	5'-actgcaccagtccttgcttag
Shift3.V	5'-acgctgcaagtggggatgcatt
Shift5.VI	5'-tcacgcagtgagagctctataa
Shift3.VI	5'-cgcgccggggctcgcgttt

Oligonukleotide für die Genotypisierung von transgenen Mäusen:

LacZfor 5'-atcagcgatttccatgttgcc
LacZrev 5'-agaccattttcaatccgcacc

Oligonukleotide für die Generierung von *Six2*-Promotorfragmenten zur Klonierung (*BglIII/EcoRI*) in SeapBasic:

SPB5/1 5'-aaaaagatctgtcccgggtttcttgcattggg
SPB5/2 5'-aaaaagatctcctcctgggtagtctctctg
SPB5/3 5'-aaaaagatctgcgacgcctcttatttaaaaaaaa
SPB5/4 5'-aaaaagatctttaaacggtcctccgccttcc
SPB5/5 5'-aaaaagatctcctcctcctctgctctttggg
SPB5/6 5'-aaaaagatctgctcccgtctcggccaacc
SPB5/7 5'-aaaaagatctgctcgggtaccggtgactga
SPB5/8 5'-aaaaagatctgggcgcgggcccgcgcg
SPB5/9 5'-acgtagatctgtctccatggcgaataatttg
SPB3/1 5'-acgtgaattccgcggcggcccgcg
SPB3/2 5'-acgtgaattctcagtcaccgtaaccc
SPB3/3 5'-gacttgaattccggcccgggcccgcgctc
SPB3/9 5'-ggtgggcgaattcgtcctccgc

Generierung von *Six2*-Promotorfragmenten für Gelretardations-Analysen:

SP5.I 5'-tccgggaagttgattctcagg
SP3.I 5'-aaagtgtgagacaccctccc
SP3.II 5'-agetccgctgacagatcgccc
SP3.III 5'-agcagcagcagcagcatggt
SP5.II 5'-ctgttgcgacgcctcttatttaa
SP5.III 5'-gctcccgtcgtcgccaacct
SP5.V 5'-cgcctcatgcccgttagaat
SP5.IV 5'-acagcgtctccatggcgaataa
SP3.IV 5'-ccatggagacgctgtcagtca
SP3.V 5'-attctaagcgggcatgaggcg

Herstellung eines *Six2*-Volllängenfragmentes für die Klonierung in pGEX-KG:

Six2Start 5'-acgtgaattctgccaccttcggcttcacgc
 Six2Stop 5'-actgctcgagctaggagcccaggtccacaag

Primer, die mutierte Bindungsstellen von SIX2 im *GDNF*-Promotor enthalten (Gelretardations-Analysen):

wt5 5'-ctaccccacgtctggattgtattacaacagcatg
 1/5 5'-ctaccccacgtctggattgtattaccacagcatg
 2/5 5'-ctaccccacgtctggattgtataaaacagcatg
 3/5 5'-ctaccccacgtctggattgtattccaacagcatg
 4/5 5'-ctaccccacgtctggattgtatgacaacagcatg
 5/5 5'-ctaccccacgtctggattgtatacaacagcatg
 6/5 5'-ctaccccacgtctggattgtagtacaacagcatg
 7/5 5'-ctaccccacgtctggattgtcttacaacagcatg
 8/5 5'-ctaccccacgtctggattttattacaacagcatg
 9/5 5'-ctaccccacgtctggatggattacaacagcatg
 10/5 5'-ctaccccacgtctgggattgtattacaacagcatg
 11/5 5'-ctaccccacgtcgggtattgtattacaacagcatg
 12/5 5'-ctaccccacttctggattgtattacaacagcatg
 13/5 5'-ctacccaacgtctggattgtattacaacagcatg
 wt3 5'-catgctgttgaataacaataccagacgtgggtag
 1/3 5'-catgctgtggaataacaataccagacgtgggtag
 2/3 5'-catgctgtttaaataacaataccagacgtgggtag
 3/3 5'-catgctgttgaataacaataccagacgtgggtag
 4/3 5'-catgctgttgatacaataccagacgtgggtag
 5/3 5'-catgctgtgtactacaataccagacgtgggtag
 6/3 5'-catgctgttgaagacaataccagacgtgggtag
 7/3 5'-catgctgttgaatccaataccagacgtgggtag
 8/3 5'-catgctgttgaataaaaataccagacgtgggtag
 9/3 5'-catgctgttgaataaccataccagacgtgggtag
 10/3 5'-catgctgttgaatacaatcccagacgtgggtag
 11/3 5'-catgctgttgaatacaatacccagacgtgggtag
 12/3 5'-catgctgttgaatacaataccagaagtgggtag
 13/3 5'-catgctgttgaatacaataccagacgtgggtag

wt2/5	5'-cttcattgccggccatgtaatacatgatatgcaaagcc
a/5	5'-cttcattgccggccaggtaatacatgatatgcaaagcc
b/5	5'-cttcattgccggccatttaatacatgatatgcaaagcc
c/5	5'-cttcattgccggccatggaatacatgatatgcaaagcc
d/5	5'-cttcattgccggccatgcatatacatgatatgcaaagcc
e/5	5'-cttcattgccggccatgtactacatgatatgcaaagcc
f/5	5'-cttcattgccggccatgtaagacatgatatgcaaagcc
g/5	5'-cttcattgccggccatgtaatccatgatatgcaaagcc
h/5	5'-cttcattgccggccatgtaataaatgatatgcaaagcc
i/5	5'-cttcattgccggccatgtaataacctgatatgcaaagcc
j/5	5'-cttcattgccggccatgtaatacattatgcaaagcc
k/5	5'-cttcattgccggccatgtaatacatgatctgcaaagcc
l/5	5'-cttcattgccggccatgtaatacatgatatgaaaagcc
wt2/3	5'-ggctttgcatatcatgtattacatggccggcaatgaag
a/3	5'-ggctttgcatatcatgtattacctggccggcaatgaag
b/3	5'-ggctttgcatatcatgtattaaatggccggcaatgaag
c/3	5'-ggctttgcatatcatgtattccatggccggcaatgaag
d/3	5'-ggctttgcatatcatgtatgacatggccggcaatgaag
e/3	5'-ggctttgcatatcatgtagtacatggccggcaatgaag
f/3	5'-ggctttgcatatcatgtcttacctggccggcaatgaag
g/3	5'-ggctttgcatatcatggattacatggccggcaatgaag
h/3	5'-ggctttgcatatcatttattacatggccggcaatgaag
i/3	5'-ggctttgcatatcaggtattacatggccggcaatgaag
j/3	5'-ggctttgcatataatgtattacatggccggcaatgaag
k/3	5'-ggctttgcagatcatgtattacatggccggcaatgaag
l/3	5'-ggcttttcatatcatgtattacatggccggcaatgaag

Generierung von Mutationen in der Bindungsstelle von SIX2 im *GDNF*-Promotor:

MutI/5	5'-ctaccccacgtctgtattgtagtaaaacagcatg
Muti/3	5'-catgctgttttactacaataaccagacgtgggtag
MutII/5	5'-cttcattgccggccatgtccgacatgatatgcaaagcc
MutII/3	5'-ggctttgcatatcatgtcggacatggccggcaatgaag

Generierung von Deletionen der Bindungsstellen im *Six2*-Promotor:

SixdelI3 5'-gcggctcccacccccg
SixdelI5 5'-cagcgtctccatggcgaata
SixdelIII3 5'-ccagacaatagtcgagtcaaa
SixdelIII5 5'-cctcatgcccgccttagaat

2.1.7 Zelllinien und Bakterienstämme

U2OS Zellen	menschliche Osteosarkom-Zellen
cos-7 Zellen	Grüne Meerkatzen Nierenzellen
M15 Zellen	mesonephrische Mäusezelle
DH5 α -Bakterien	Rekombinationsdefekter, suppressiver Stamm, Genotyp: (supE44lacU169 Δ 80lacZM15hsdR17recA1gyrA96thi-1ralA1)

2.1.8 Antikörper

Gal4-TA(C-10): monoklonaler Mausantikörper gegen die Transaktivierungsdomäne von Gal4; Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

anti-Maus HRP: Peroxidase konjugiertes Ziegen anti-Maus Immunoglobulin; DAKO (Hamburg)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 6% CO₂, 95% Luftfeuchte und 37°C in einem Brutschrank kultiviert. Sämtliche Manipulationen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Medien, Puffer und Glaswaren wurden vor Gebrauch sterilisiert. Alle verwendeten Zellen wurden in Dulbecco's MEM (DMEM) mit 10% FCS kultiviert.

2.2.1.1 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS (37°C vorgewärmt) gewaschen und für einige Sekunden mit Trypsin-Lösung (0,25%) gespült. Die Trypsin-Lösung wurde abgesaugt, erneut 1/10 des ursprünglichen Mediumvolumens Trypsin-Lösung zupipettiert und für einige Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung auf frische Zellkulturschalen verteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsinisiert, abzentrifugiert (300g, 3min) und in kaltem Einfriermedium aufgenommen. Nach 30 min auf Eis, wurden die Zellen auf -80°C abgekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden sie in 5 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert (300g, 3 min) und auf Zellkulturgefäße in geeigneter Verdünnung verteilt.

Einfriermedium: DMEM + 20%FCS + 10% DMSO

2.2.1.3 Transfektion durch SuperFect

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß sich das hochmolekulare SuperFect-Reagenz an die DNA anlagert und mit ihr einen sehr kompakten Komplex bildet. Dieser SuperFect-DNA Komplex besitzt eine positive Ladung mit dem er sich an negativ geladene Rezeptoren auf Eukaryoten Zellen anlagert. Durch Endocytose wird dieser Komplex in das Innere der Zellen eingeschleust, wo er schließlich in den Zellkern transportiert wird.

Am Tag vor der Transfektion werden die gewünschte Anzahl Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert.

Der Transfektionsmix wird folgendermaßen vorbereitet: in einem Eppendorfreaktionsgefäß werden die entsprechende Menge Expressionsvektor vorgelegt. Das Volumen des Expressionsvektors wird mit Medium ohne FCS auf 75 µl aufgefüllt und 3 µl SuperFect hinzupipetiert. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird die Lösung dann gemischt und anschließend bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird das Medium von den Zellen abgesaugt und diese 1x mit PBS gewaschen. Zu dem Transfektionsmix werden anschließend 350 µl Vollmedium zugegeben und durch pipettieren gemischt. Das gesamte Transfektionsmixvolumen wird sofort zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3h bei 37°C wird das komplexhaltige Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden dann in entsprechendem Volumen Vollmedium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C, 6% CO₂ inkubiert.

2.2.2 DNA-Methoden

2.2.2.1 Analyse von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch durch Messen der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durchgeführt. Eine OD₂₆₀=1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Ein Hinweis auf Verunreinigungen gibt die OD bei 280 nm (hier absorbieren Phenol, DNA und Proteine). Das Verhältnis OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ sollte im Idealfall 1,8:1 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

Phenol/Chloroform Extraktion

Zur Reinigung der Nukleinsäure-Lösung von Proteinen wurde die Probe mit Wasser auf mindestens 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des gleichen Volumens eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) wurde die Suspension gut durchmischt. Zur Phasentrennung wurde 3 min, 10000xg zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und noch einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform auf die gleiche Weise extrahiert.

Fällung von Nukleinsäuren

Die gelöste DNA wurde mit 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von

0,3 M gebracht und mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol gemischt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C oder 1h bei -80°C . Das Präzipitat wurde bei 13000xg, 20 min pelletiert, zur Entfernung von Salzresten mit 80% Ethanol gewaschen, noch mal zentrifugiert und anschließend im Vakuum 20 min oder an der Raumluft für 1h getrocknet.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 1-2% Agarose-Minigele mit einem Gelvolumen von 50 ml, Puffervolumen von 100 ml und Taschenvolumen von 25 μl verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 50 ml 1xTAE gegeben und im Mikrowellenherd aufgeköcht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 1 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Kammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Laufpuffer (1xTAE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Glycerin-Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 100 V. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

1xTAE: 40 mM Tris pH8,3; 40 mM NaAcetat; 2 mM EDTA pH8
Glycerin-Probenpuffer: 10 mM EDTA; 10% Glycerin; 0,1% SDS; 0,02% Bromphenolblau

2.2.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde die DNA-Lösung in einem Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetrennt. Die entsprechende Bande wurde am UV-Tisch ausgeschnitten und mit Hilfe des Easy-Pure Kits (Biozym, Hameln) nach Angaben des Herstellers isoliert. Pro 100 μg Gelstück wurden 300 μl Salt-Lösung und 5 μl Bind verwendet. Das isolierte Fragment wurde anschließend mit 20 μl Wasser eluiert und direkt für Ligationen oder andere Anwendungen eingesetzt.

2.2.2.4 Plasmid DNA Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurden 2 ml Nährmedium mit dem Antibiotikum Ampicilin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 4000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl Minilösung P1 resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl P2 und Mischen wurden 150 μl Lösung P3 zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienreste bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit 1 ml Ethanol präzipitiert (30 min bei -20°C) und durch 20 min

Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Plasmid-DNA im Vakuum getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

P1: 50 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

P2: 0,2 M NaOH; 1% SDS

P3: 3 M Kaliumacetat pH5,5

2.2.2.5 Plasmid-DNA Maxi Präparation

200 ml Selektionsmedium wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 3600xg sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysate wurde mit 10 ml P3 neutralisiert (10 min bei Raumtemperatur), bei 4°C und bei 10000xg 30 min lang zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip AX500.Säulen (Quiagen, Düsseldorf) laut Herstellerprotokoll.

Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und anschliessend im entsprechenden Volumen Wasser gelöst, so dass sich eine Endkonzentration von 1 µg/µl ergab.

P1: 50 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

P2: 0,2 M NaOH; 1% SDS

P3: 3 M Kaliumacetat pH5,5

2.2.3 Klonierungstechniken

2.2.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer/Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 2h.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit 1 µl alkalischer Phosphatase (2 U/µl) in einem Endvolumen von 50 µl CIP-Puffer versetzt. Die Abspaltung der Phosphatgruppe erfolgte bei 5'-überhängenden Enden durch 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde erneut 1 µl Enzym zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C dephosphoryliert.

Bei 3'-überhängenden und glatten Enden wurde 15 min bei 37°C und 15 min bei 56°C inkubiert (ebenfalls mit Zugabe von 1 µl Enzym nach den ersten 15 min).

In beiden Fällen wurde anschließend 42,5 µl Wasser, 10 µl TNE und 2,5 µl SDS zugegeben und 15 min bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Präzipitation der DNA.

CIP-Puffer: 50 mM Tris pH 9; 1 mM MgCl₂; 1 mM Spermidin
1x TNE: 100 mM NaCl; 10 mM Tris pH8; 1 mM EDTA pH 8

2.2.3.3 Auffüllen von 5'-Überhängen

Die DNA wurde mit 2 µl 10 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl E. coli Polymerase I (Klenow-Fragment 5U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl 1x Polymerase-Puffer versetzt. Nach 30 min Reaktion bei 30°C erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM Tris pH 7,5
1x Polymerase-Puffer: 7 mM Tris pH 7,5; 7 mM MgCl₂; 50 mM NaCl

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl) versetzt und in einem Endvolumen von 20 µl für 16h bei 15°C inkubiert. Für die Ligation inkompatibler Enden wurde ein dreifacher Überschuss an freien Enden des Inserts eingesetzt, für die Ligation von glatten Enden (blunt) wurden gleiche Mengen von Vektor und Insert verwendet.

Ligationspuffer: 50 mM Tris pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM ATP

2.2.3.5 Deletion und Basenpaaraustausche in DNA-Fragmenten

Die Deletion von 30-50 bp in DNA-Fragmenten erfolgte mittels ExSite PCR-based site directed mutagenesis kit (Stratagene) nach genauen Angaben des Herstellers. Die Austausche einzelner Basen wurde mit QuickChange PCR-based site directed mutagenesis kit (Stratagene) durchgeführt. Auch hier folgte der Versuchsablauf den Herstellerangaben.

2.2.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* XL1 blue wurde auf einer Agarplatte mit LB-Medium ohne Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16h inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 20 ml Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde unter

Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (meist 800 ml) im Verhältnis 1/100 angeimpft und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation wurden diese mit jeweils 10 ml pro 50 ml Originalkultur eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 1h auf Eis wurden die Bakterien erneut sedimentiert und in 1/30 bis 1/50 des Originalvolumens in 50 mM CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und in 200 µl Aliquots abgefüllt. Die schockgefrorenen Bakterien (2 min flüssiger Stickstoff) wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden 100 µl Bakteriensuspension verwendet.

CaCl₂-Lösung: aus 2,5 M Stocklösung verdünnt auf 50 mM, bei Bedarf Zugabe einer 50% Glycerinlösung bis zu einer Endkonzentration 15%

2.2.5 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl kompetenter Bakterien wurden mit Plasmid-DNA (1-100 ng) oder Ligationsansätzen vermischt und 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s und Inkubation für 5 min auf Eis, wurde 1 ml 1x LB zugegeben und die Kultur für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf einer Agarplatte ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (“polymerase chain reaction”, PCR)

In der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den Endbereichen der vorgelegten Matrizen-DNA sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Primer liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase kopiert und amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) 1/10 Volumen 10x PCR-Puffer, 10 mM dNTP-Lösung; je 1/10 10x Primer (2,5 mM), 1-2 U Taq-Polymerase und 10-500 ng matrizen-DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 1 min, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Primer optimalen Temperatur und die DNA-Synthese bei 72°C (als Faustregel gilt, dass die Taq-Polymerase pro Minute DNA-Fragmente von 1 kb synthetisieren kann). Die Amplifikationsprodukte wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung und Anfärben mit Ethidiumbromid kontrolliert.

10x PCR-Puffer: 500 mM KCl; 100 Tris pH 8,4; 15 mM MgCl₂

2.2.7 Sequenzierung von DNA mit ³³P markierten Didesoxy-NTPs

Gereinigte Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode mit Hilfe des “Thermo-Sequenase-Kits” der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) sequenziert. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. 1 µg Plasmid-DNA wurden mit 2 µl Reaktionspuffer, je 2 pmol Primer und 8 U Thermo Sequenase TM DNA-Polymerase und Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Jeweils 4,5 µl wurden in vier markierte PCR-Gefäße (ACGT) pipettiert und der Terminationsmix (je 0,5 µl einer Stocklösung von 0,3 µM [α -³³P]ddNTP, 1500 Ci/mmol und 2 µl 7,5 µM dNTP) den entsprechenden Ansätzen zugegeben. Die Proben wurden in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:

95°C, 30 s;

55°C, 30 s;

72°C, 1 min, 30 Zyklen.

Nach Abstoppen der Reaktion mit Formamid-Probenpuffer und 3 min erhitzen auf 95°C wurden die Proben auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamid/8,3 M Harnstoff-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Formamid-Probenpuffer: 20 mM EDTA pH 7,8; 95% Formamid; 0,03% Xylencyanol; 0,03% Bromphenolblau

2.2.8 Protein-Methoden

2.2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BioRad-Lösung

Je 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 795 µl Wasser versetzt und anschließend 200 µl BioRad-Lösung dazugegeben. Zur Quantifizierung wurden Eichlösungen mit bekannter Proteinkonzentration parallel dazu verarbeitet. Das Gesamtvolumen von 1 ml wurde in ein Messröhrchen überführt und in einem Extinktionsmessgerät gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

2.2.8.2 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-Page)

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Trenngel-Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei durch 1 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit

Isopropanol läßt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren. Nach erfolgter Polymerisation entfernt man das Isopropanol und gießt die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel. Nach Einsetzen eines Kammes läßt man das Sammelgel in vertikaler Lage polymerisieren. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Proben wurden mit einfachem Volumen 2x Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 3 min auf 72°C erhitzt und nach Entfernen des Kammes in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 30 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt, das Gel und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (Westernblot). Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker (SDS 7B, Sigma) mitgeführt.

Trenngel-Lösung: 6-12% Acrylamid, 0,16-0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% Temed
Sammelgel-Lösung: 4% Acrylamid, 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% Temed
Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 0,1% SDS
2x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 2% 2-β-Mercaptoethanol

2.2.8.3 Immunoblot-Analyse von Proteinen (“Western-Blot”)

Proteine, die in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt worden sind, wurden in einer Naßtransferzelle (Trans-Blot, BioRad, München) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran luftblasenfrei zwischen mehrere Lagen mit Transferpuffer getränktem 3MM Papier gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Die Zelle wurde mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 200 mA bei 4°C. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1h in 5% fettfreier Milch in TBST geschwenkt und anschließend 1h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in TBST gewaschen und danach 1 h mit dem Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in 5% fettfreier Milch in TBST (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Bei den hier verwendeten Antikörpern wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (2ml pro dm² Membranfläche, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) überschichtet.

Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm exponiert.

Transferpuffer: 20 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% Methanol
TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6
TBST: TBS + 0,05% Tween20

2.2.8.4 Präparation von Proteinen-Extrakten

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden 1×10^6 – 1×10^7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin gelöst (0,25%), sedimentiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl RIPA-Puffer lysiert. Der so erhaltene Zellextrakt wurde sonifiziert und der Proteingehalt bestimmt.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natrium Desoxycholate, 0,1% SDS

2.2.8.6 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen

Eukaryotische Proteine können durch Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* in großen Mengen und in löslicher Form in Bakterien exprimiert werden. Die Affinität von GST für Glutathion ermöglicht eine milde Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellen Rohlysaten mittels Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins wurde dazu in den Vektor pGEX-KG an das 3'-Ende des GST-Gens fusioniert.

Eine stationäre Kultur des entsprechend transformierten Bakterienstammes wurde 1:10 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 1h wurde die Expression des Fusionsproteins mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterien nach weiteren 2h durch Zentrifugation (3000xg, 10 min, 4°C) sedimentiert und in 400 µl Binding Puffer aufgenommen und lysiert. Die bakterielle DNA wurde mechanisch durch Ultraschall geschert. Anschließend wurden die unlöslichen Bakterienbestandteile durch Zentrifugation (10000xg, 20 min, 4°C) abgetrennt. Zur Kopplung des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit in PBS gequollener Glutathion-Agarose (die Menge ist für die jeweilige Anwendung empirisch zu ermitteln; theoretisch hat 1 ml gequollene Glutathion-Agarose die Bindungskapazität für 8 mg Fusionsprotein) für 1h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Lag die Glutathion-Agarose bereits vorgequollen in 20% Ethanol vor, so wurde von dieser 1:1 Lösung 1 ml verwendet und vor Gebrauch zweimal mit PBS gewaschen. Die Glutathion-Agarose wurde mit dem gebundenen Fusionsprotein in eine Säule transferiert und dreimal mit 1 ml Binding Puffer gewaschen. Das Fusionsprotein wurde durch 10 mM reduzierten Glutathion (in Elutionspuffer) in Fraktionen aus

der Säule eluiert. Die Anwesenheit von Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen wurde durch Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel geeigneter Konzentration mit anschließender Coomassie-Blau-Färbung überprüft und die Proteinkonzentration mit BioRad bestimmt. Die Lagerung des Fusionsproteins erfolgte bei -80°C .

Binding Puffer: 50 mM Tris pH8, 150 mM KCl, 5 mM DTT, 1% Triton X
Elutionspuffer: Binding Puffer + 10 mM reduziertes Glutathion

2.2.8.7 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteinen nach SDS-Page

Proteine, die in SDS-Page aufgetrennt worden sind, wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in $0,5\text{ ml/cm}^2$ Gelfläche Färbelösung und danach in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel im Wasserstrahlvakuum getrocknet.

Färbelösung: 0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250, 50% Methanol, 7,5% Essigsäure
Entfärbelösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure

2.2.9 Protein-Bindungsanalysen

2.2.9.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente für Gelretardations-Analyse und Footprint wurden 5'-phosphoryliert mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP. Das DNA-Fragment wurde mit 1/5 des Endvolumens Forward Buffer, 4 U T4-Kinase, $3\mu\text{l}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP und Wasser für 1h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der Probe erfolgte über NickTMColumns-Säulen. Diese wurden mit $800\mu\text{l}$ TE equilibriert. Anschliessend wurde die Probe aufgetragen, mit $400\mu\text{l}$ TE gewaschen und die Elution erfolgte mit $350\mu\text{l}$ TE. Die Aktivität der radioaktiven Probe wurde anschließend in einem Szintillationsgerät gemessen. Die radioaktive Markierung der Proben für SouthernBlots erfolgte durch $[\text{}^{32}\text{P}\text{-}\alpha\text{-CTP}]$ und den NEBBlotTMKit nach Angaben des Herstellers, die Aufreinigung über NickTMColumns.

2.2.9.2 DNA-Gelretardationsanalyse

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde ein 6 – 10%iges Acrylamidgel benutzt. Das noch flüssige Gel wurde zwischen zwei Glasplatten, die durch einen 1 mm dicken Abstandhalter getrennt waren, gegossen, ein Kamm eingesetzt und mit Klammern fixiert. Der Kamm wurde nach der Polymerisation entfernt, und das Gel in eine Gelapparatur eingespannt. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE. Der Bindungsreaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: $2\mu\text{g}$ Protein, 2000 cpm radioaktiv markierte Probe, 1/5 Endvolumen 5x bb+ Puffer. Zur Vermeidung von unspezifischen DNA-Bindungen wurde dIdC und dAdT zugegeben. Der

Reaktionsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte bei 150V für 1 – 2 h. Anschließend wurden die Glasplatten getrennt, das Gel für 10 min mit 50% Methanol/10% Essigsäure fixiert, getrocknet und ein Röntgenfilm exponiert.

5xbb+: 5xbb Puffer, 2% BSA, 100 mM DTT

5xbb: 500 mM KCl, 5 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Tris pH 7,5, 20% Glycerol, 0,5% Triton X, 5 µg BSA, 2,5 mM DTT

2.2.9.3 Footprint-Analyse

Mit [γ -³²P] dATP markierten Primern (entweder mit 5' oder 3' markiert) wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Die Aufreinigung des radioaktiven Fragmentes erfolgte zunächst über die Auftrennung in einem 6% Polyacrylamidgel. Nach Lokalisation des Fragmentes durch einen Röntgenfilm, wurde das Gelstück ausgeschnitten, welches die Probe enthielt, dabei diente der Röntgenfilm als Schablone. Das Gelstück wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit einer Kanüle manuell zerkleinert. Dann wurden 2 Volumen Elutionspuffer zugegeben und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Dieser Lösung wurde am nächsten Tag noch einmal 0,5 Volumina Elutionspuffer zugegeben, in eine Spritze, die mit Glaswolle versehen war, überführt und filtriert. Anschließend wurden zwei Volumen Ethanol zugegeben und die DNA auf Eis 30 min gefällt. Die Sedimentation erfolgte durch Zentrifugation bei 10000xg, 20 min. Das Pellet wurde in 200 µl Wasser aufgenommen, und nochmals mit 450 µl Ethanol gefällt und anschließend zentrifugiert (10000xg, 20 min). Das erhaltene Pellet wurde getrocknet, in 25 µl Wasser aufgenommen und die Aktivität in einem Szintillator bestimmt.

Der Bindungsreaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 80 µg Protein, 20000 cpm markierte Probe, 1/5 Endvolumen 5xbb+. Dieser Ansatz wurde bei 37°C 30 min inkubiert und anschließend sofort 5 U RQ1-DNase für 1-3 min zugegeben. Diese Reaktion wurde mit 90 µl Stopplösung unterbrochen. Die Aufreinigung der DNA erfolgte über eine Chloroform/Phenol-Extraktion. Anschließend wurde das Pellet in 7 µl Ladepuffer aufgenommen.

Parallel zu diesem Ansatz wurde das Ausgangs-DNA-Template mit nicht markierten Primern sequenziert. Sequenzierung und Footprint-Probe wurden über ein 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel anschließend getrocknet und ein Röntgenfilm exponiert.

Elutionspuffer: 0,5 M Ammoniumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA pH 8, 0,1% SDS

5xbb+: 5xbb Puffer, 2% BSA, 100 mM DTT

5xbb: 500 mM KCl, 5 mM Magnesiumchlorid, 50 mM Tris pH 7,5, 20% Glycerol, 0,5% Triton X, 5 µg BSA, 2,5 mM DTT

2.2.10 Transgene Mäuse: Generierung, Färbung, Schnitte

2.2.10.1 Superovulation

Durch dieses Verfahren versucht man mittels Hormongaben möglichst große Ausbeuten bei der Gewinnung von Eizellen zu erhalten. Die Ovulation bei Spenderweibchen wird durch i.P.-Injektion von je 5-10 IU PMS (Pregnat mare Serum Gonadotropin) bzw. HCG (human chorionic gonadotropin) im Abstand von 48 h induziert. Man erreicht damit, daß die weiblichen Tiere so in den Ovarialzyklus kommen, daß möglichst viele Eizellen in den Eileiter gelangen, um dann befruchtet zu werden. Durch diese so genannte Superovulation wird die Oozytenausbeute, abhängig vom verwendeten Stamm, auf ein Vielfaches der sonst üblichen Zahl gesteigert. Am Tag 1 nach der nächtlichen Begattung werden die Weibchen durch Cervikaldislokation getötet und die Zygoten aus den Eileitern präpariert. Die Begattung wurde anhand der Vaginalpfropfe makroskopisch, oder mit einer Sonde überprüft. Vaginalpfropfe sind koagulierte Proteine der männlichen Seminalflüssigkeit, sie sind etwa 12 h nach der Kopulation vorhanden.

2.2.10.2 Präparation der Eizellen

Die Bauchdecke wurde geöffnet und die die Eizellen enthaltenden Eileiter und Uteri präpariert. Ein Eileiter wurde in ein Schälchen mit M2-Medium mit 300 µg/ml Hyaluronidase Medium überführt. Die Ampulle wurde mit zwei spitzen Pinzetten aufgerissen und die Eizellen herausgedrückt. Die Hyaluronidase entfernt die die Eizelle umgebenden Cumuluszellen. Anschließend wurden die Eizellen in einem Schälchen M2-Medium ohne Hyaluronidase gewaschen und dann im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.10.3 Kultivierung der Eizellen

Zwei Tropfen a 50 µl M16-Medium wurden in eine 35 mm Petrischale pipettiert und mit 1 ml DC200 Öl überschichtet. Vor Zugabe der ersten Eizellen werden die Kulturschalen mindestens 15 min bei 37°C inkubiert. Die Eizellen wurden mit Hilfe einer Kapillare direkt in den Mediumstropfen pipettiert, wobei möglichst wenig Medium aus den anderen Gefäßen mittransferiert werden sollte.

2.2.10.4 Mikroinjektion in Pronuklei

20-40 Eizellen wurden aus der M16-Kultur in ein Schälchen mit M2-Medium transferiert. Hierzu wurde auf einem speziellen Objektträger (mit Vertiefung) 50 µl M2-Medium unter 480 µl DC200 Öl gegeben, in welchen dann die Eizellen ohne Luftblasen transferiert wurden.

Befruchtete Eizellen erkennt man am Vorhandensein von zwei Vorkernen und Polkörperchen. Die Eizellen lassen sich mit Hilfe der Haltepipette bewegen, während die DNA-Lösung mit Hilfe einer Injektionskapillare in die Vorkerne injiziert wird. Die Haltekapillare arbeitet mit Öl-Unterdruck und Überdruck (verstellbar durch eine Stellschraube), die Injektionskapillare mit Druckluft. Der Injektor wird nach entsprechender Druckvorwahl mit einem Pedal an- und ausgeschaltet.

Die Injektion erfolgte bei der größten Vergrößerung in den Vorkern, meist in den (größeren) männlichen Vorkern. Die Injektionskapillare wurde in die Ebene des Vorkerns fokussiert und dann durch die Zona pellicula und das Cytoplasma in den Vorkern gestochen. Die Zugabe der DNA-Lösung wurde beim Anschwellen des Vorkerns beendet, die Kapillare herausgezogen. Wichtig ist, die Nukleoli nicht zu berühren. Intakte Eizellen wurden nach der Injektion mit M2-Medium gewaschen, wieder in M16-Medium kultiviert und konnten dann am gleichen Tag als Einzeller, oder am folgenden Tag als Zweizeller in den Eileiter einer am Transfertag vaginalpfropf-positiven scheinchwangeren Maus transferiert werden.

2.2.10.5 Eileiter- oder Ampullentransfer

Eine scheinchwangere Maus wurde mit i.p. Injektion von Avertin (2,2,2 Tribromethanol in t-Amyl-Alkohol; jeweils 10 µl/g Körpergewicht) narkotisiert. Nach vollständiger Narkose wurde das Fell mit 70% Ethanol gereinigt, die Maus mit einem kleinen dorsalen Schnitt an der Seite geöffnet. Ovar, Eileiter und Uterus wurden vorsichtig herausgezogen und mit Hilfe einer Klemme, die am Fettpolster des Ovars befestigt wird, fixiert. Unter dem Stereomikroskop wurde die Haut über dem Eileiter aufgerissen und das Infundibulum in eine brauchbare Lage gebracht. Vorhandenes Blut etc. wurde mit einem Saugtupfer aufgesogen. Die Kapillare mit den Embryonen im M2-Medium wurde in die Ampulle eingeführt. Die Eizellen wurden soweit in die Eileiter transferiert, bis die erste Luftblase hinter den Eizellen im Eileiter sichtbar wurde. Jeweils 20 Embryonen (Zweizeller) wurden in die Ampulle eines Eileiters einer scheinchwangeren Maus transfiziert. Anschließend wurden die herausgezogenen Organe wieder in die Bauchhöhle gelegt, die Unterhaut vernäht, die Oberhaut geklammert und die Maus an einen warmen und ruhigen Ort zum Aufwachen gelegt.

2.2.10.6 Vasektomie

Um scheinchwangere Mäuse zu generieren, müssen Weibchen mit vasektomierten Männchen verpaart werden. Das sind Männchen, deren Samenleiter durchtrennt sind. Nach Narkose mit Avertin (siehe oben) und Desinfektion des Fells, wird die Bauchhöhle mit einem transversalen

Schnitt geöffnet. Ein Hoden wird aus dem Skrotum gezogen, das Vas deferens präpariert. Im Abstand von ca. 5 mm wird das Vas deferens zweimal abgebunden und das dazwischen liegende Stück herausgeschnitten. Der Hoden wird wieder in das Skrotum gesteckt und mit dem zweiten Hoden ebenso verfahren. Die Bauchdecke wird vernäht, das Fell geklammert und das Tier an einen ruhigen und warmen Ort zum Aufwachen gelegt. Nach ca. vier Wochen können vasktomierte Männchen zur Generierung von scheinchwangeren Weibchen herangezogen werden. Um nicht erfolgreich vasktomierte Männchen sofort entdecken zu können, werden vasktomierte Männchen und scheinchwangere Weibchen in einer anderen Fellfarbe gewählt, als die Farbe der Tiere, die ausgetragen werden sollen.

2.2.10.7 Präparation von Mäuse-Embryonen

Die schwangere Maus wird mittels Cervikaldislokation getötet. Die Bauchdecke wird mit Ethanol desinfiziert und anschließend durch einen medianen Schnitt zwischen Brustbein und Afteröffnung und einen sagittalen Schnitt in Höhe der Hinterbeine geöffnet. Das Entfernen des mit Embryonen gefüllten Uterus geschieht durch Durchtrennen der mit ihm verbundenen Mesenterien und des Gebärmutterhalses. Der Uterus wird dann in eine Schale mit PBS überführt. Hier wird er von noch anhängenden Geweberesten und Fettkörpern gesäubert und in eine frische Petrischale mit PBS überführt. Die Uteruswand wird mit einer Schere der Länge nach aufgeschnitten und die nun freiliegenden Embryonen mit den sie umgebenden Häuten werden erneut in eine frische Petrischale mit PBS gebracht. Hier werden die extraembryonalen Membranen vom Embryo entfernt. Der Embryo liegt nun frei.

2.2.10.8 Gewinnung der DNA aus embryonalem Gewebe zur Genotypisierung

Das embryonale Gewebe wird mit 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht auf einem Themoschüttler bei 55°C verdaut. Die Proteine werden durch Zugabe von 200 µl 5 M NaCl gefällt und die Suspension bei 10000xg, 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Nach Zentrifugation (10000xg, 15 min) wird der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut mit Ethanol gewaschen. Das resultierende Pellet wird in 25 µl Wasser aufgenommen. Die Typisierung erfolgt mittels PCR und Primern, die speziell in diesem Fall gegen das LacZ Gen gerichtet sind.

2.2.10.9 LacZ-Färbung von transgenen Embryonen

Die Embryonen werden mit PBS gewaschen. Unter dem Stereomikroskop wird den Embryonen

mit einer spitzen Pinzette die Bauchhöhle geöffnet, ohne dabei die inneren Organe zu beschädigen. Zusätzlich werden die Embryonen, zu einer besseren Aufnahme der Fixier- und Färbelösung, an Kopf und Rückenmark mit einer sehr feinen Pinzette perforiert. Die Embryonen werden dann abhängig von ihrem Alter für 30-90 min in Fixierlösung überführt. Anschließend werden die Embryonen dreimal mit PBS/0,02% NP-40 gewaschen. Die Färbung erfolgt anschließend in der Färbelösung, wobei die Färbezeit von 30 min bis über Nacht reicht, abhängig vom gewünschten Färbegrad. Die Embryonen werden dann 3x mit PBS gewaschen und für 30 min in 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Sie können dann in 80% Glycerol/PBS aufbewahrt werden. Für eine Reduzierung des Hintergrundes, bzw. "Durchsichtigmachung", können die Embryonen auch in 50% Formamid/50% Glycerol gebracht werden.

Fixierlösung: 1% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd, 2 mM Magnesiumchlorid, 5 mM EGTA, 0,02% NP-40

Färbelösung: 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM Magnesiumchlorid, 0,01% Natrium Deoxycholat, 0,02% NP-40, 1mg/ml X-Gal

2.2.10.10 Transversalschnitte von gefärbten Embryonen

Die Embryonen wurden mit PBS 4h lang gewaschen. Danach wurden sie in Einbett-Medium überführt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zwei Metallwinkel werden auf einer Glasplatte so fixiert, dass sich ein Rechteck ergibt. Zu 2 ml des Einbett-Mediums werden 140 μ l Glutaraldehyd gegeben, sofort verrührt und in das Rechteck eingegossen. Nach Polymerisation dieses Gemisches wird der Embryo darauf gebettet und mit weiteren 2 ml Einbett-Medium (mit 140 μ l Glutaraldehyd) überschichtet. Nach 10 min ergibt sich ein fester Block, bei dem mit einem Skalpell die überschüssige Masse entfernt wird, so dass der Embryo auf allen Seiten von ca. 5 mm polymerisiertem Medium umgeben ist. Dieser Block wurde in ein Vibratom (Leica, VT1000S) eingespannt und 30-70 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Objekträger überführt und eingebettet.

Einbett-Medium: 2,2g Gelantine, 135g Albumin, 90g Saccharose, 450 ml PBS

2.2.11 Messung der Firefly-Luziferaseaktivität

Die Zellen wurden 24-48h nach der Transfektion zweimal mit PBS (ohne Ca/Mg) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300 μ l Lysispuffer für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. 100 μ l wurden zur Bestimmung der Luziferaseaktivität verwendet. Die Messung der Enzymaktivität erfolgt in einem Luminometer (Berthold, Wildbad) unter Zugabe von autoinjizierter Luziferinlösung (100 μ l pro Ansatz, Endkonzentration Luziferin 40 μ M) und

Reaktionspuffer (350 µl pro Ansatz).

Lysispuffer: 25 mM Glycyl-Glycin pH 7,8, 15 mM Magnesiumsulphat, 15 mM Kaliumphosphat pH 7,8, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100
Reaktionspuffer: 25 mM Glycyl-Glycin pH 7,8, 15 mM Magnesiumsulphat, 15 mM Kaliumphosphat pH 7,8, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP
Luziferinlösung: 25 mM Glycyl-Glycin pH 7,8, 15 mM Magnesiumsulphat, 15 mM Kaliumphosphat pH 7,8, 4 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM ATP, 40 µM Luziferin

2.2.12 Messung der Seap-Aktivität

24-48h nach Transfektion der Zellen wurden 50 µl Medium abgenommen und mit ihm eine alkaline Phosphatase Bestimmung durchgeführt. Dies geschah nach Angaben des Herstellers.

2.2.12 Southern-Blot

Die zu untersuchende DNA wird mit dem entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut und über ein 1% Agarose Gel aufgetrennt. Der Laufpuffer ist 1x TBE. Nach der photographischen Dokumentation der durch Ethidiumbromid sichtbar gemachten Banden, wird die DNA in 0,5 M NaOH für 30 min denaturiert und anschließend mit 0,25 M HCl neutralisiert. Das Gel wurde anschließend in einer Kammer luftblasenfrei mit einer Nylon-Membran (Hybond N) bedeckt und mehrere Lagen Filterpapier aufgelegt. In der Kammer befindet sich 0.2 M HCl Lösung, die durch Filterpapier Kontakt mit dem Agarose-Gel hat. Über Nacht saugt sich nun diese Lösung durch das Gel und die Membran in das trockene Filterpapier. Die DNA wird dabei durch die Nylon-Membran zurückgehalten. Am nächsten Tag wird die Membran in 2x SSC gewaschen und anschließend die DNA durch UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Diese Membran wurde dann in eine verschließbare Glasröhre gebracht und mit 10 ml Church Puffer 30 min bei 65°C vorhybridisiert. Anschließend wurde eine radioaktiv markierte DNA-Probe zugegeben (1000000 cpm/ml Aktivität) und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die DNA-Probe, mit der die DNA hybridisiert wurde, wurde mit dem NEB Kit radioaktiv markiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit 2xSSC/0,1%SDS je 20 min, 65°C gewaschen und dann noch zweimal mit 0,1xSSC/0,1%SDS für je 10 min bei 65°C gewaschen.

Church Puffer: 1 mM EDTA, 0,25 M Phosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ mit H_3PO_4 auf pH 7,4 eingestellt) 7% SDS

2.2.13 Screenen einer murinen cDNA-Bibliothek

Die verwendete murine cDNA-Bibliothek besteht aus MboI verdauter DNA von 129/Ola Milzzellen, welche in den Cosmidvektor Lawrist 7 kloniert wurde. Diese DNA-Fragmente decken ungefähr viermal das murine Genom ab. Die Bibliothek wurde uns vom

RessourcenZentrum/PrimärDatenbank (RZPD) des Max Planck-Institutes für molekulare Genetik zur Verfügung gestellt. Die Lokalisation der verwendeten Cosmide erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Lokalisation der Cosmide auf den Filtern, wurden uns diese Klone vom RZPD zugesandt

3. Ergebnisse

Die frühe Nierenentwicklung und speziell das Auswachsen des Wolffschen Ganges in das metanephrische Mesenchym findet in der Maus am Tag 10-10.5 p.c. der Embryonalentwicklung statt. Während diesem Zeitraum werden im metanephrischen Mesenchym Gene exprimiert, die ihrerseits zur Aktivierung der Transkription von glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) führen. Das Protein GDNF wird sekretiert und stimuliert nach Bindung an seinen Rezeptor Ret am Wolffschen Gang dessen Knospung und Auswachsung. Fehlt dieses Gen, kommt es zu keiner Ausbildung einer Ureterknospe und somit auch nicht zur Entwicklung der Nieren. Welche Gene für die Aktivierung der Transkription von *GDNF* notwendig sind, ist weitest gehend unbekannt. Aus vielen Knock-out Experimenten sind einige Gene bekannt, die für die Nierenentwicklung notwendig sind, bzw. deren Nicht-Expression in genau dem gleichen Phänotyp resultiert, wie der *GDNF*^{-/-} Phänotyp. Um Aufschluss darüber zu erhalten, wie die Transkription dieser Gene, *GDNF* und *Six2*, reguliert wird, sind in der vorliegenden Arbeit Promotoranalysen durchgeführt worden. Sie sollen einen Einblick darüber verschaffen, ob es direkte regulatorische Mechanismen der vermuteten Gene (*Pax2*, *Six2*, *Eya1*, *Wt1* und *GDNF*) während dieser Phase der Nierenentwicklung gibt. Die Promotoranalysen wurden mit einem murinen *GDNF*-Promotor-Fragment und einem murinen *Six2*-Promotor-Fragment durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Expressions- und Promotorkonstrukte enthalten ausschließlich Mausequenzen.

3.1 Analysen am murinen *GDNF*-Promotor

GDNF stellt eines der Schlüsselgene in der embryonalen Entwicklung der Niere dar. Seine Expression ist für die Ausbildung der Nieren unbedingt notwendig, da nur *GDNF* die Fähigkeit besitzt, vom metanephrischen Mesenchym zum Wolffschen Gang zu diffundieren und dort die Knospung zu initiieren. Jedes Ereignis, das zu einer Nichtexpression von *GDNF* führt, endet darin, dass es zu keiner Entwicklung der Nieren kommt.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Promotorfragment von *GDNF* gewählt, welches die TATA-Box und den Translationsstartpunkt enthält. Abb.5 zeigt die relative Position des benutzten Fragmentes im *GDNF*-Locus. Während die nachfolgenden Experimente durchgeführt wurden, identifizierte die Arbeitsgruppe von Kiuchi, et al. zwei weitere alternative Promotoren im *GDNF*-Locus, die 5' des verwendeten Promotor-Fragmentes lokalisiert sind³⁴. Mit diesen beiden Promotoren wurden keine Experimente durchgeführt.

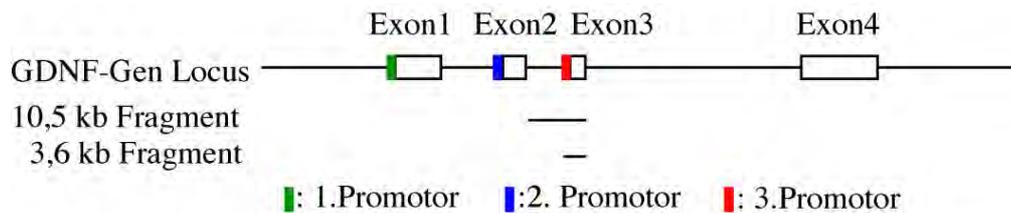


Abb.5: Position des verwendeten 10,5 und 3,6kb großen *GDNF*-Promotor Fragmentes

Das *GDNF*-Gen besteht aus vier Exons und drei Introns. Es gibt drei alternative Promotoren im *GDNF*-Locus, die zur Expression von sechs unterschiedlichen RNAs führen. Der Translationsstart liegt im Exon 3.

3.1.1 *In vivo* Charakterisierung des *GDNF*-Promotors

Die Fragestellung bei diesem Versuch war, ob das verwendete 10,5 kb lange *GDNF*-Promotorfragment und seine Subfragmente Sequenzen enthalten, die für die räumlich und zeitlich spezifische Expression von *GDNF* ausreichend bzw. notwendig sind. Im Speziellen sollte durch diesen Versuch das Element im *GDNF*-Promotor überprüft werden, das für die Expression im metanephrischen Mesenchym verantwortlich ist. Dies geschah durch Generierung von transient transgenen Mäusen mit drei verschiedenen Konstrukten des murinen *GDNF*-Promotors. Der Vorteil von hier verwendeten transient transgenen Mäusen gegenüber „stabilen“ Mäuselinien liegt in der schnellen Verfügbarkeit der zu untersuchenden Embryonen. Die Konstrukte enthalten noch zusätzlich ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) und das Reporter-Gen *LacZ*. Das Reporter-Gen *LacZ* kodiert für das Protein β -Galaktosidase, welches

nach Umsetzung eines bestimmten Substrates eine Blaufärbung hervorruft. Durch diese Blaufärbung kann die Expression des Gens und damit die Aktivität des Promotors nachgewiesen werden. Das erste Injektionskonstrukt, 10,5 kb GDNF, enthält ein 10,5 kb langes *mGDNF*-Promotorfragment. Das Zweite, 3,6kb GDNF, ein 3,6 kb langes Fragment und das Dritte, 0.9 kb GDNF, besteht aus 900 bp.

Nach Rücktransfer der injizierten Eier in scheinchwangere Mäuse wurden Embryonen verschiedener Stadien der Entwicklung präpariert. Nach Präparation der Embryonen wurden diese fixiert und anschliessend in eine Färbelösung überführt. Um zu bestimmen, welche der Embryonen transgen sind, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt, mit DNA, die aus Geweben der Embryonen gewonnen wurde und Oligonukleotiden, die speziell an das *LacZ*-Gen binden.

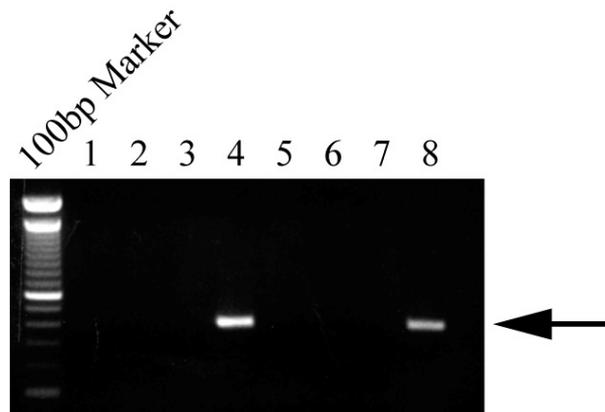


Abb.6: Beispiel einer Genotypisierungs PCR

Die Typisierung der transgenen Mäuse erfolgte durch eine PCR, bei der Oligonukleotide verwendet wurden, welche spezifisch an das *LacZ*-Gen binden. Es ergibt sich daraus eine Bande von 360 Basenpaaren, welche nach Auftrennung der PCR-Reaktion auf einem 2%-igen Agarose Gel, sichtbar wird. #1-7 zeigt die Genotypisierung von sieben Embryonen. #8 ist eine Positivkontrolle mit einem *LacZ*-tragenden Vektor. Nur Embryo #4 ist positiv für das Transgen.

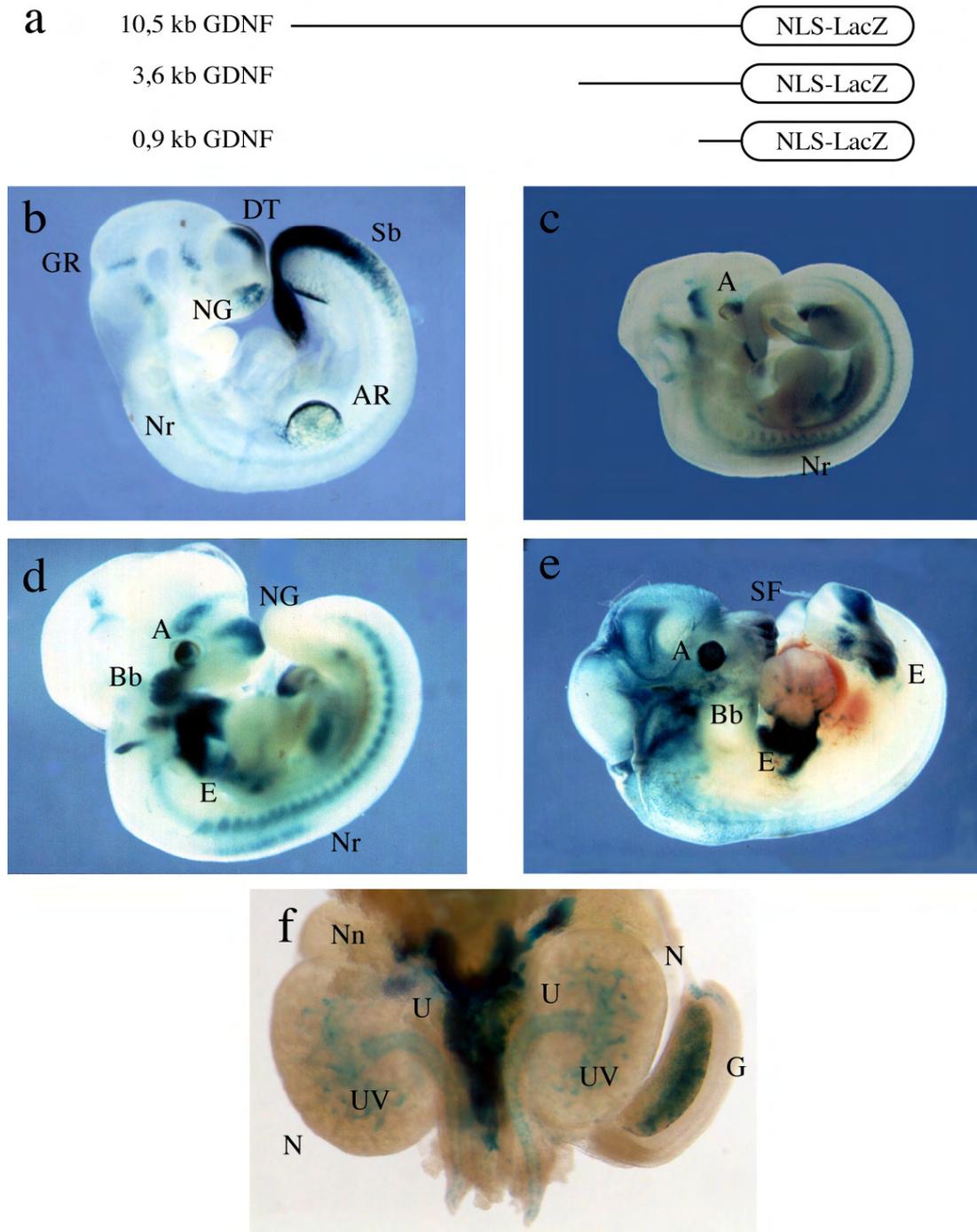


Abb.7: Transgene Embryonen zeigen eine Expression der verwendeten Konstrukte

Drei verschiedene Konstrukte wurden in Mäuseeier injiziert. Diese Konstrukte enthalten entweder ein 10,5kb langes, ein 3,6kb langes oder ein 900bp langes Fragment des *GDNF*-Promotors. Diese wurden in einen Vektor kloniert, der ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) und als Reporter ein *LacZ*-Gen enthält. (a) zeigt die relative Position der Fragmente. (b) der Embryo (Tag 10.5 p.c.) zeigt die Expression für das 10,5kb grosse *GDNF*-Fragment (c) transgener Embryo am Tag 11.5 für das 3,6kb-*GDNF*-Promotor-Fragment (d+e) diese Embryonen tragen das 900bp Fragment, Expression am Tag 11.5 p.c. (d) und 12.5 p.c. (e); (f) Niere eines 10,5 kb *GDNF* injizierten Embryos am Tag 12.5 p.c.; A Auge, AR apikale Randleiste, Bb Branchialbögen, DT Dach des Telencephalons, E Extremitäten, G Gonade, GR Grenze zum Rhombencephalon, N Niere, Nn Nebenniere, NG Nasengrube, Nr Neuralrohr, Sb Schwanzbereich, SF Schnurrhaarfeld, U Ureter, UV Ureterverzweigungen

Am Tag 10.5 p.c (Abb.7b) beobachtet man eine Expression von 10,5kb GDNF im Dach des Telencephalons, an der Grenze zum Rhombencephalon und im Rückenmark. Eine Expression erfolgt auch in den Extremitätenanlagen. Das scharf abgegrenzte, sichtbare blaue Band, welches sich über die vorderen und hinteren Beinknospen zieht, repräsentiert die apikale Randleiste. Weiterhin kommt es zu einer Blaufärbung im sich entwickelnden Schnurrharrfeld. Eine sehr deutliche Expression des injizierten Konstruktes findet sich auch im Schwanzbereich des Embryos, welche zum Schwanzende intensiver wird.

Am Tag 11.5 p.c wird das Konstrukt 3,6kb GDNF (Abb.7c) wie schon bei 10,5kb GDNF im Gehirn und im Neuralrohr exprimiert. Eine beginnende Expression ist im Auge und in den Somiten zu beobachten. Die Färbung in der apikalen Randleiste reduziert sich stark auf ein sehr schmales Band, welches nur noch sehr schwach an den Extremitätenanlagen zu beobachten ist.

Eine Expression in der Niere findet sich beim Konstrukt 10,5 kb GDNF und 3,6 kb GDNF. Als Beispiel wurde die Niere eines 10,5 kb GDNF-Fragmentes am Tag 12.5 p.c. (Abb.7f) dargestellt. Die Expression findet sich im Gewebe, das direkt die sich verzweigenden Ureteräste umgibt. Zu diesem Zeitpunkt kann auch eine Expression im Ureter selbst festgestellt werden. Weiterhin färben sich auch Teile der Gonade blau.

Die Expressionsorte der Transgene entsprechen publizierten Expressionsorten von *GDNF*. Die verwendeten Promotor-Fragmente enthalten somit Sequenzen, die für eine spezifische Expression von *GDNF* in einzelnen Geweben und Organen und in der Niere notwendig sind.

Bei der Expression der einzelnen Konstrukte in den transient transgenen Embryonen im gleichen Stadium kam es bei einzelnen Embryonen zu geringen Unterschieden betreffend dem Expressionsort und -stärke. Die Ursache dafür liegt zum einen in der Methode. Die Sichtbarmachung der Expression durch die Färbelösung ist unter anderem von der „Erreichbarkeit“ der Expressionsorte durch die Färbelösung abhängig. So kann es sein, daß durch geringfügige Unterschiede bei der Perforation der Embryonen manche Gewebe für die Färbelösung nicht mehr erreichbar sind und es deswegen in diesen Bereichen zu keiner oder geringeren Blaufärbung kam. Auch traten Unterschiede in der Größe der einzelnen Embryonen des gleichen Wurfes auf. Dies liegt daran, daß die Embryonen in ihrer Entwicklung um einige Stunden differieren und es deshalb zu einer unterschiedlichen Expression in den Embryonen kam. Weiterhin ist die Expression der Konstrukte auch vom Ort der Insertion des Transgens abhängig. Kommt es zur Insertion im Genom an einer Stelle, die endogen stark aktiviert ist, z.B. nach einem endogenen Promotor für ein Haushaltsgen, welches immer aktiv ist, können Positionseffekte und somit Blaufärbungen in Geweben auftreten, in denen der endogene *GDNF*-

Promotor nicht aktiv ist. Erfolgt die Insertion an einer Stelle die stark reprimiert wird, kann es zu keiner Blaufärbung in Geweben kommen, in denen der endogene *GDNF*-Promotor normalerweise aktiv ist. Daß die Unterschiede in Expressionsort und –stärke nicht z.B. durch Positionseffekte verursacht werden, läßt sich nur wie hier dargestellt, durch den Vergleich mehrerer Embryonen ausschließen.

3.1.2 Ein 3,6kb großes *GDNF*-Promotor-Fragment zeigt Transaktivierung durch SIX2

Das 3,6 kb Fragment sollte nun daraufhin überprüft werden, ob mögliche Kandidaten-Proteine in der Lage sind, dieses Fragment auch *in vitro* zu aktivieren. Die Transaktivierung von Genen kann in Zellkulturen relativ einfach durch ein geeignetes Reporterplasmid nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde ein 3.6kb großes *GDNF*-Promotor-Fragment in den *Luziferase*-Gen tragenden Vektor pGL3 kloniert. Dieses Konstrukt wurde mit verschiedenen Expressionsvektoren in Cos7-Zellen kotransfiziert. Cos7-Zellen sind Nierenzellen der grünen Meerkatze. Die verwendeten Expressionsvektoren kodieren für Gene (*Six2*, *Pax2*, *Eya1* und zwei Spleißformen von *Wt1*: *Wt1A*, *Wt1C*), die während der Nierenentwicklung ausschließlich im metanephrischen Mesenchym und im gleichen Zeitraum exprimiert werden wie *GDNF*.

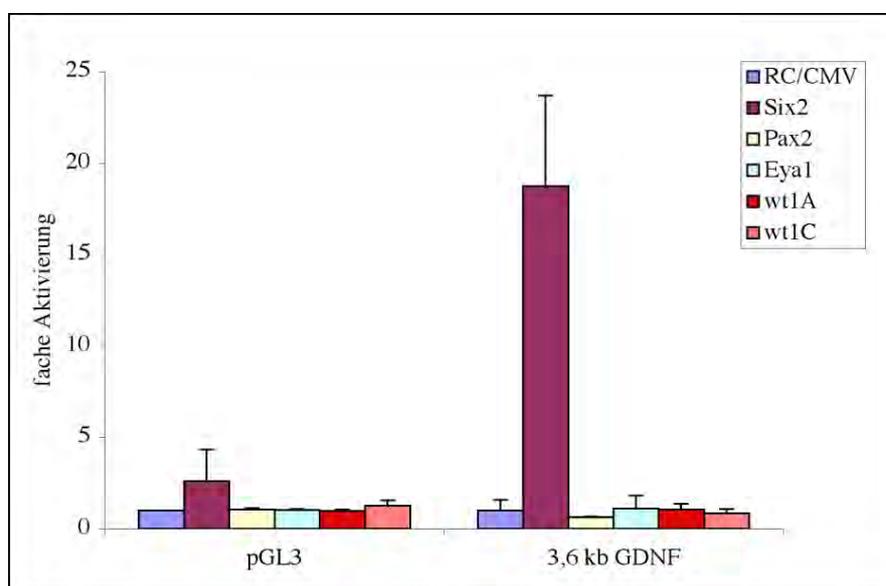


Abb.8: Tansaktivierung eines 3,6kb *GDNF*-Promotor-Fragments durch SIX2

$1 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende Cos7-Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Plasmid eines 3,6kb *GDNF*-Luziferasereporters und dem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden nach 24h geerntet und ein Luziferase-Assay durchgeführt. Als Kontrolle wurde das leere Reporterplasmid (pGL3) mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Um die Basisaktivität der Reporter zu bestimmen, wurde sowohl der pGL3-, als auch der 3,6 kb *GDNF*-Vektor mit einem leeren Plasmid (RC/CMV) kotransfiziert, diese wurde dann gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente sind als Balkendiagramm dargestellt.

Nach 24h Expression der Konstrukte wurden die Zellen lysiert und mit dem Gesamtzellextrakt ein Luziferase-Assay durchgeführt. Nur bei der Transfektion mit *Six2* wurde eine signifikante Erhöhung der Transaktivierung beobachtet. Relativ zur Basisaktivität des Reporterkonstruktes beträgt diese das 18-fache (Abb.8). Keines der anderen kotransfizierten Gene zeigt einen signifikanten Effekt auf das verwendete *GDNF*-Promotor-Fragment.

3.1.3 Murines SIX2 kann an den *GDNF*-Promotor binden

SIX2 besitzt als Homeobox-Protein eine DNA-bindende Domäne. Um zu überprüfen, ob SIX2 direkt an den *GDNF*-Promotor bindet, wurde die cDNA von *Six2* in den Vektor pGEX-KG kloniert. Das Konstrukt GST-Six2 exprimiert in Bakterien das Fusionsprotein GST-Six2, welches über GSH-Sepharose leicht aufgereinigt werden kann. Mit diesem Protein und radioaktiv markierten Fragmenten des *GDNF*-Promotors wurden Gelretardations-Assays durchgeführt. Die Fragmente wurden durch PCR-Amplifikation mit den entsprechenden Oligonukleotiden und dem 3,6kb-*GDNF* Promotor-Fragment als Template, erhalten. Abb.9A zeigt die relative Position der verwendeten Fragmente P1-P4.

Ergebnisse

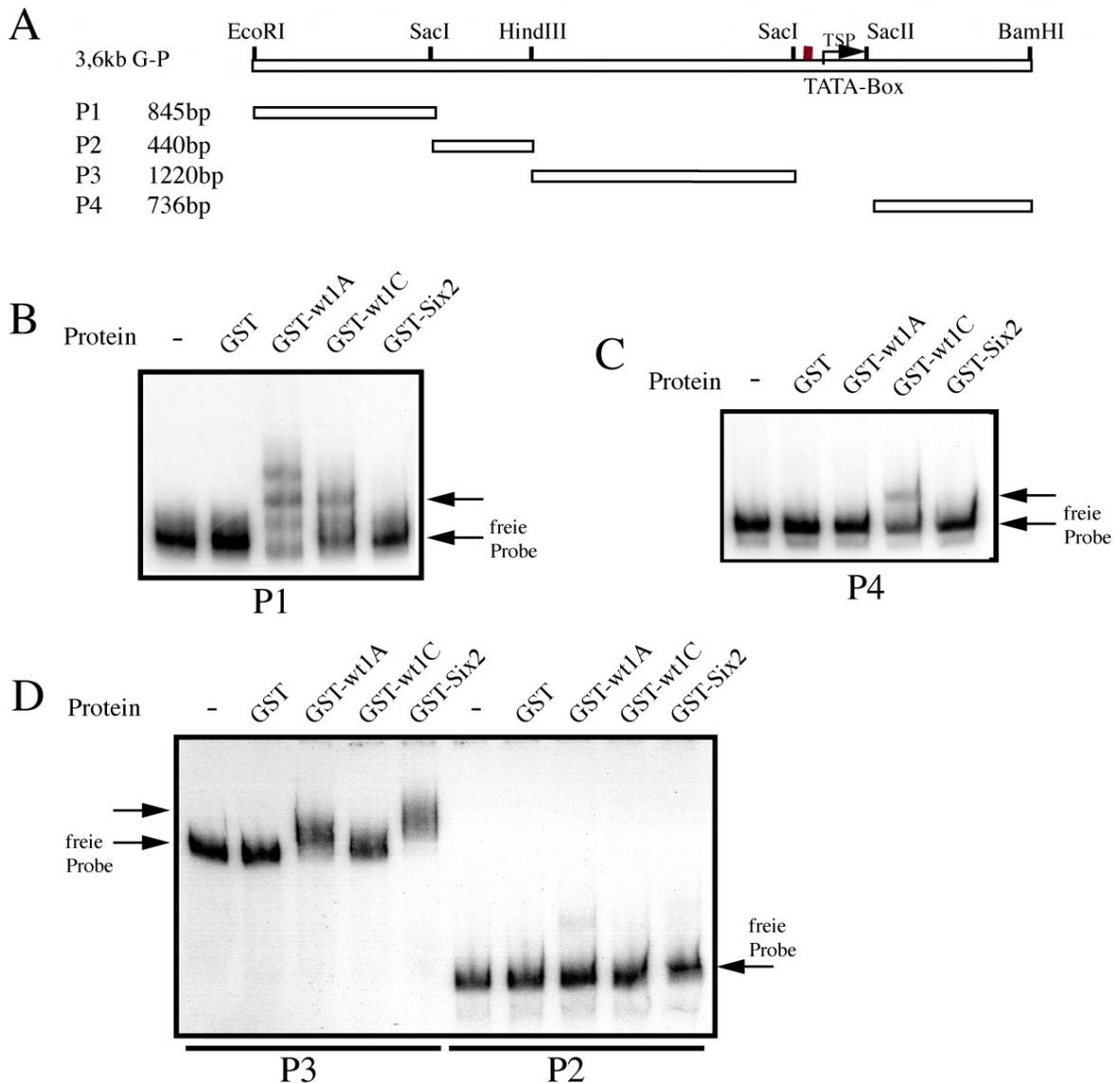


Abb.9: Schematische Darstellung der verwendeten *GDNF*-Promotor-Fragmente P1-P4 für die Gelretardationsanalyse; GST-Six2 bindet an das *GDNF*-Promotor-Fragment P3

- (A) Das 3,6kb-*GDNF*-Promotor-Fragment enthält eine TATA-Box und den Translationsstartpunkt (TSP). Mit den entsprechenden Oligonukleotiden wurden aus diesem Fragment mittels PCR vier verschiedene DNA-Fragmente (P1, P2; P3, P4) amplifiziert.
- (B) Gelretardationsassay. Das Fragment P1 wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ am 5'-Ende radioaktiv markiert. Für die Bindereaktion wurden 2000cpm Probe mit 50 ng GST-Six2-Protein bzw. GST-Wt1A oder GSTWt1C verwendet. Als Kontrolle wurde das markierte Fragment allein und mit GST-Protein inkubiert. Die Proben wurden nach 30 min Inkubationszeit auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit 30%Essigsäure/10%Methanol für 10 min fixiert, getrocknet und für die Autoradiographie über Nacht exponiert.
- (C) Gelretardationsanalyse mit dem Fragment P4 unter gleichen Bedingungen wie bei (B)
- (D) Gelretardationsanalyse der Fragmente P2 und P3 unter gleichen Bedingungen wie bei (B)

Eine Bindung von GST-Six2 ist nur im Fragment P3 zu entdecken. (Abb.9D). Eine Bindung von GST-Wt1(+KTS) ist bei den Fragmenten P1 und P2 und von GST-Wt1(-KTS) im P1 und P4-

Fragment zu beobachten. Da WT1 keinen Effekt auf die Aktivierung des verwendeten *GDNF*-Promotor-Fragmentes zeigte, wurde die Bindung von WT1 nicht weiter untersucht.

Um die Bindungsstelle im Promotor weiter einzugrenzen, wurde vom P3-Fragment ausgehend kleinere Fragmente (P10-P13 Abb.10A) mittels PCR generiert und auf die Bindung von GST-Six2 untersucht.

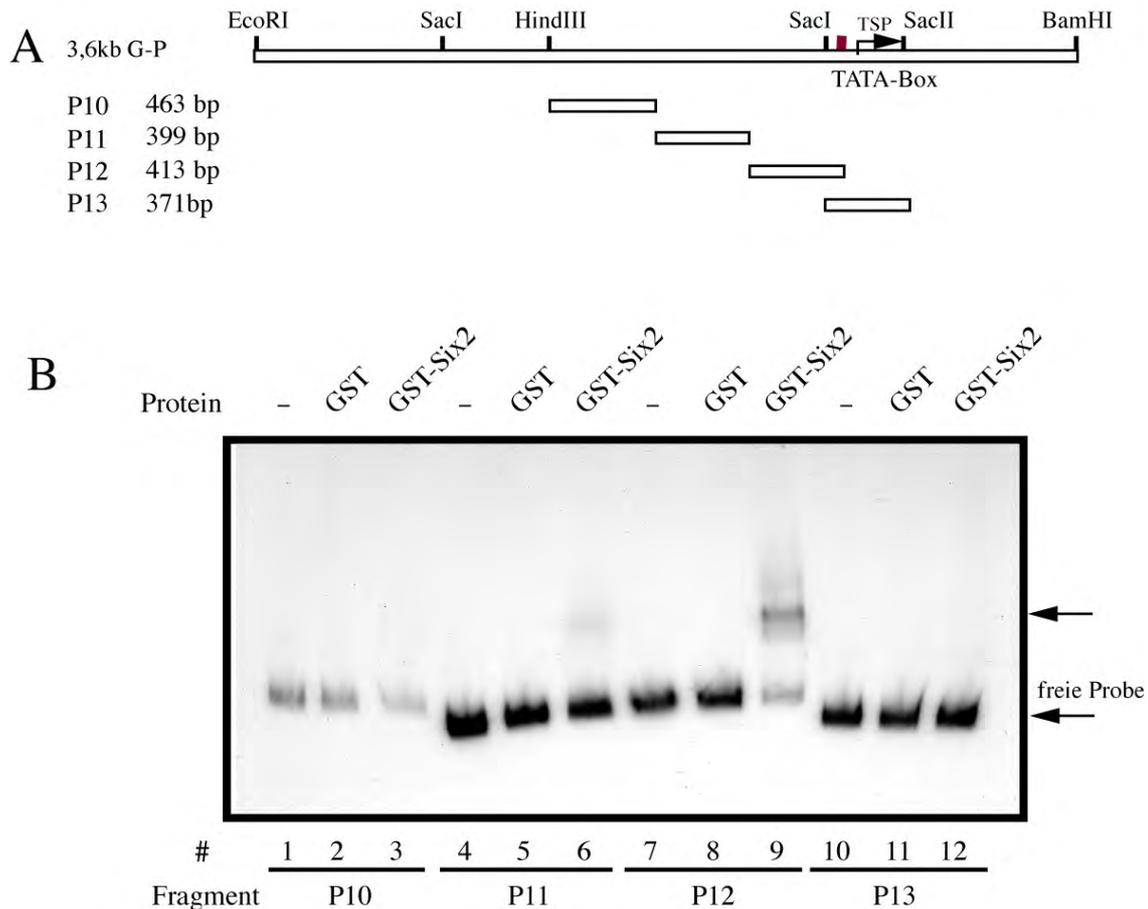


Abb.10: Schematische Darstellung der verwendeten *GDNF*-Promotor-Fragmente P10-P13 für die Gelretardationsanalyse; GST-Six2 bindet an das *GDNF*-Promotor-Fragment P12

- (A) Aus dem 3,6kb *GDNF*-Promotorfragment wurden mittels PCR und den entsprechenden Oligonukleotiden drei verschiedene DNA-Fragmente (P10, P11; P12) amplifiziert, die das Fragment P3 in ihrer Länge abdecken. Zusätzlich wurde noch ein Fragment generiert, das die TATA-Box und den Translationsstartpunkt abdecken, P13.
- (B) Gelretardationsassay. Die Fragmente P10 –P13 wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ am 5'-Ende radioaktiv markiert. Für die Bindereaktion wurden 2000cpm Probe mit 50 ng GST-Six2-Protein verwendet (3,6,9,12). Als Kontrolle wurde das markierte Fragment allein (1,4,7,10) und mit GST-Protein (2,5,8,11) inkubiert. Die Proben wurden nach 30 min Inkubationszeit auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit 30%Essigsäure/10%Methanol für 10 min fixiert, getrocknet und für die Autoradiographie über Nacht exponiert.

Eine Bindung von SIX2 ist nur in den Fragmenten P11 und P12 zu beobachten (Abb.10B). Die Bindung an das Fragment P12 ist relativ stärker, als an das Fragment P11. SIX2 kann also an den GDNF-Promotor binden.

3.1.4 SIX2 aktiviert das *GDNF*-Promotor-Fragment P12

Um den Sequenzbereich, der für eine Transaktivierung des *GDNF*-Promotors durch SIX2 notwendig ist, einzugrenzen, wurde das P12-Fragment in den Luziferase tragenden Vektor pGL3 kloniert. Das Fragment P12 wurde deshalb gewählt, weil an dieses Fragment eine starke Bindung von GST-Six2 zu beobachten ist (Abb.10B). Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Transaktivierung einer Konzentrationsabhängigkeit des verwendeten Expressionsvektors unterliegt. Dafür wurden 0,3µg des Konstruktes P12 mit einer ansteigenden Konzentration des Expressionsplasmides von *Six2* (0,1-0,5µg) in cos7-Zellen kotransfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert. Die Bestimmung der Basisaktivität der Reporterkonstrukte erfolgte durch Transfektion mit dem leeren Vektor RC/CMV. Als Kontrolle einer Aktivierung des Reportervektors durch SIX2 wurde der Vektor pGL3 mit den gleichen Mengen *Six2* transfiziert.

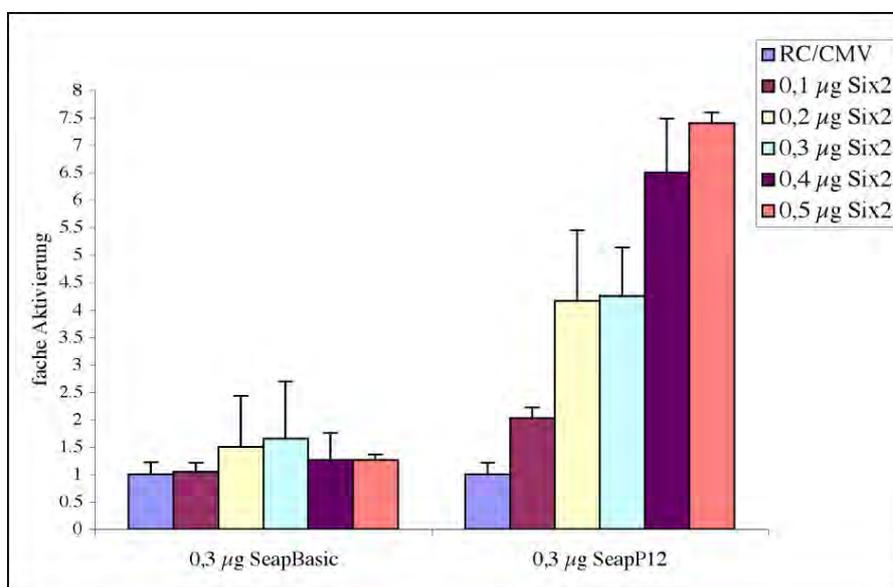


Abb.11: Transaktivierung von P12 durch SIX2

$1 \cdot 10^5$ logarithmisch wachsende cos7-Zellen wurden mit 0,3µg P12-Luziferasereporter und je 0,1µg-0,5µg *Six2*-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden nach 24h geerntet und ein Luziferaseassay durchgeführt. Als Kontrolle wurde 0,3µg leerer pGL3 Vektor mit den entsprechenden *Six2*-Expressionsvektormengen kotransfiziert. Um die Basisaktivität der Reporter zu bestimmen, wurden sowohl der pGL3-, als auch der P12-Vektor mit leerem Plasmid (RC/CMV) kotransfiziert und das Ergebnis gleich 1 gesetzt. Die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente sind als Balkendiagramm dargestellt.

Das Fragment P12 kann durch SIX2 aktiviert werden. Dieser Effekt zeigt auch eine Konzentrationsabhängigkeit von der verwendeten Expressionsvektormenge. So steigt die Aktivierung mit zunehmender Menge an transfizierter *Six2*-DNA und zeigt eine maximale Aktivierung bei einem Verhältnis von 1,6:1 Expressionsvektor zu Reporterplasmid.

3.1.5 SIX2 besitzt zwei Bindungsstellen im *GDNF*-Promotor

Da im Gelretardations-Assay mit SIX2 eine Bindung im *GDNF*-Promotor beobachtet wurde, sollte nun diese Bindungsstelle näher charakterisiert werden. Eine Methode um dieses zu tun stellt die Footprint-Analyse dar. Durch sie kann man eine Bindung nachweisen und zudem noch die Basenpaare bestimmen, die in der Bindungsstelle vorkommen. Bei diesem Versuch wurde sowohl die Bindung an den Sense-Strang von P12 als auch die Bindung an den Anti-sense-Strang untersucht. Dies erfolgte durch Generierung von 2 Proben. Bei der ersten Probe wurde das 5'-Ende des Sense-Stranges von P12 mit [γ -³²P]-ATP markiert (Sense), bei der zweiten Probe das 5'Ende des Anti-Sense-Stranges (Anti-Sense). Beide Proben wurden dann jeweils mit GST und GST-Six2 Protein inkubiert und für 90s mit *DNaseI* behandelt. Die Inkubation mit GST diente als Kontrolle, um eine etwaige Bindung von GST an P12 auszuschließen. Die unterschiedlichen Fragmentlängen in den beiden Proben (GST/GST-Six2) ergeben sich dadurch, daß die Endonuklease *DNaseI* keine DNA schneiden kann, die von Protein besetzt ist. Vergleicht man diese beiden Muster dann auf einem Gel, erkennt man eine Lücke im Bandenmuster, ein so genannter Footprint. Vergleicht man nun diesen Bedeckung mit einer parallel gelaufenen Sequenzierung der DNA, so kann man die Basenparsequenz dieses Footprintes ablesen.

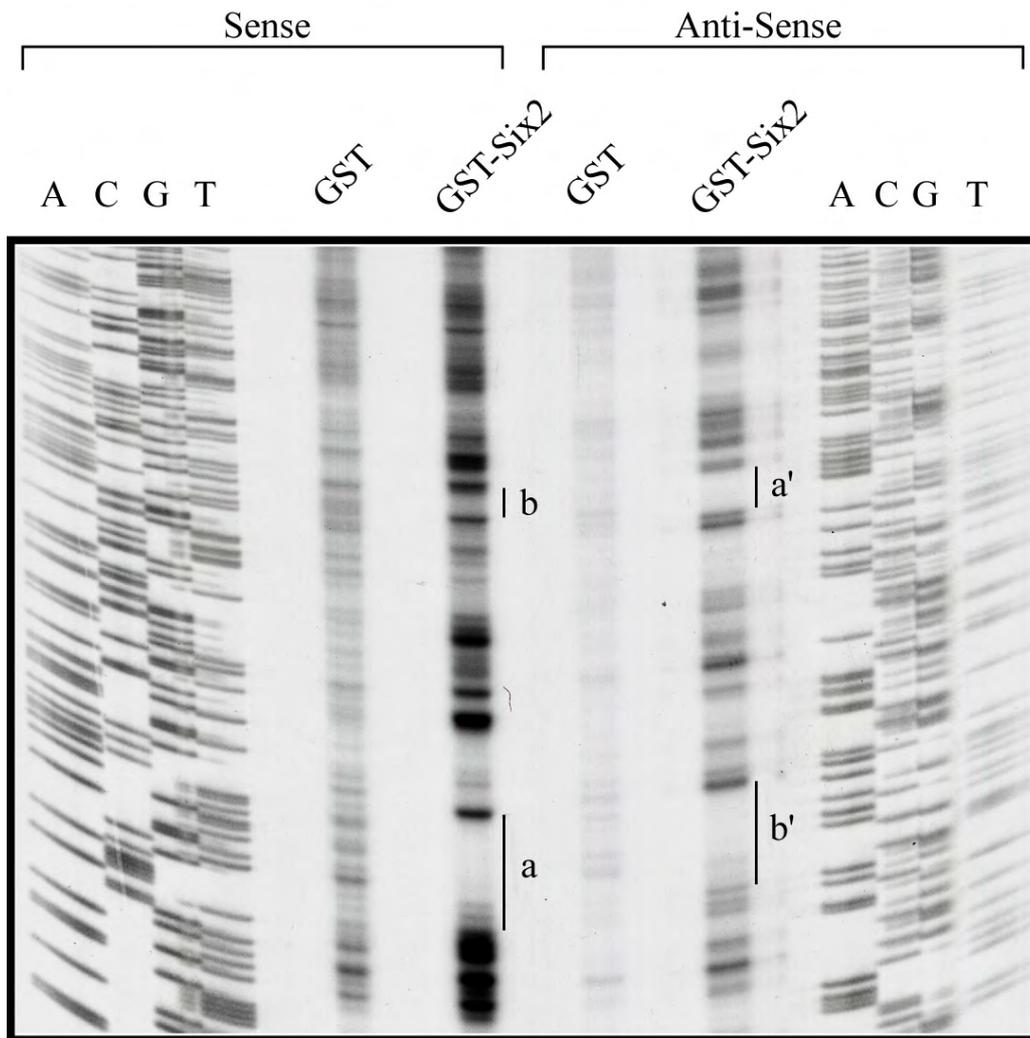


Abb.12: Footprintanalyse des P12-Fragmentes

Das P12 Fragment wurde aus dem 3,6kb *GDNF*-Promotor-Fragment mit Hilfe der PCR amplifiziert. Für die Analyse wurden zwei verschiedene Fragmente generiert. In Sense war dazu das verwendete Oligonukleotid Shift5.V [γ - 32 P]-ATP markiert, in Anti-Sense wurde das Oligonukleotid Shift3.V [γ - 32 P]-ATP radioaktiv markiert. Je 20000cpm der amplifizierten DNA-Fragmente wurden für 30 min mit 80 μ g GST-Six2-Protein inkubiert und dann für 90s mit *DNaseI* behandelt. Als Kontrolle wurden die radioaktiven Fragmente mit 80 μ g GST-Protein inkubiert und genauso behandelt wie die GST-Six2 inkubierten Fragmente. Die Sequenzierung von P12 erfolgte mit den unmarkierten Oligonukleotiden Shift5.V und Shift3.V. Die Proben wurden auf einem 6%-igem Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschliessend getrocknet und über Nacht ein Röntgenfilm zur Exposition aufgelegt. a und a' entsprechen der ersten Bindungsstelle im *GDNF*-Promotor (GDNFI). b und b' der zweiten (GDNFII).

Die GST-Six2 inkubierten Proben zeigen jeweils zwei solcher Bedeckungen. Das bedeutet, SIX2 besitzt zwei Bindungsstellen im P12-Fragment des *GDNF*-Promotors. a und a' zeigen die erste Bindungsstelle (GDNFI), b und b' die zweite (GDNFII).

3.1.6 Die Bindungsstellen GDNFI und GDNFII von SIX2 im murinen *GDNF*-Promotor

Aus dem Vergleich der Bedeckungen im Footprint und der Sequenzierung kann man die Basenpaarzusammensetzung der beiden Bindungsstellen ablesen.



Abb.13: Sequenzvergleich der beiden Bindungsstellen von SIX2 im *GDNF*-Promotor

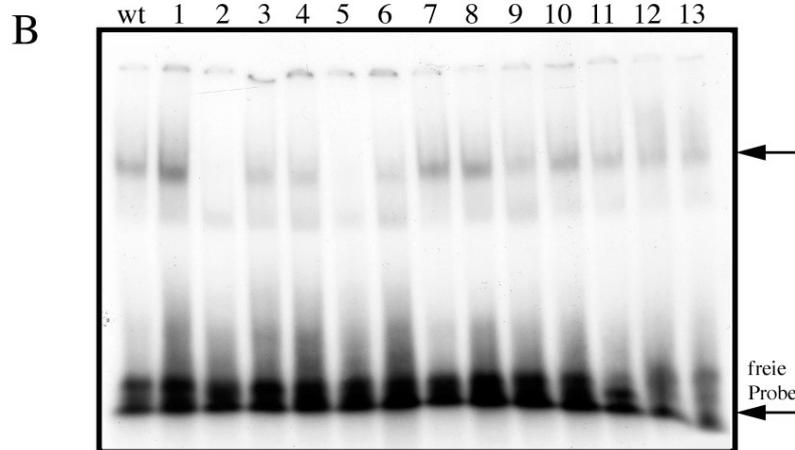
Die erste Bindungsstelle von SIX2 (GDNFI) im *GDNF*-Promotor umfasst 24 Basenpaare. Die zweite Bindungsstelle (GDNFII) hat eine Länge von 22 Basenpaaren. Der Abstand zwischen beiden Bindungsstellen im Promotor beträgt 54bp.

Der Vergleich der beiden Bindungsstellen zeigt eine Übereinstimmung in der Basenpaarsequenz von GDNFII mit der von GDNFI. In GDNFI lautet diese Sequenz 5'-TGTATTACA (rot). In GDNFII 5'-TGTAATACA (grün). Liest man die Sequenz von GDNFII im Antisense (rot), so lautet sie 5'-TGTATTACT und entspricht dem Sequenzausschnitt aus GDNFI. Sie stellt somit eine palindrome Sequenz dar.

3.1.7 Einzelne Basenpaare in den Bindungsstellen sind wichtig für die Bindung von SIX2

Die Bindung von SIX2 an den *GDNF*-Promotor erfolgt über zwei Bindungsstellen, die sich in ihrer Sequenz stark ähneln (3.1.6). Um nun herauszufinden, welche Basenpaare in diesen Sequenzabschnitten wichtig sind für die Bindung, wurden Oligonukleotide benutzt, die einen einzelnen Basenpaaraustausch enthalten. Diese Oligonukleotide bestehen aus der Sequenz der Bindungsstelle und zusätzlichen 7 Basen bei GDNFI, bzw. 8 Basen bei GDNFII 5' und 3' der Bindungsstelle. Somit ergibt sich eine Oligonukleotidlänge von 38 Basen. In diesen Oligonukleotiden wurden einzelne Basen gemäß dem Schema A -> C, C ->A, G ->T und T ->G ausgetauscht. Die Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert und ein Gelretardations-Assay durchgeführt. Als Kontrolle dienten Oligonukleotide, welche die Wildtyp-Sequenz von GDNFI bzw. GDNFII enthielten.

A wt-Sequenz 5' -CCCCACGTCTGGTATTGTATTACA - 3'
 mutierte Basen 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1



C wt-Sequenz 5' -ATGTAATACATGATATGCAAAG - 3'
 mutierte Basen a b c d e f g h i j k l

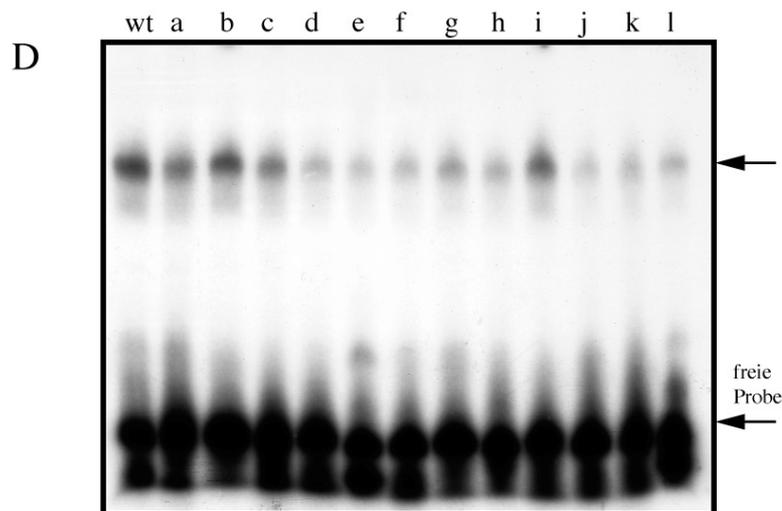


Abb.14: Bindung von GST-Six2 an Oligonukleotide, die einen Basenpaaraustausch in der Bindungsstelle GDNFI oder GDNFII aufweisen

38mer Oligonukleotide, welche einen einzelnen Basenpaaraustausch im Vergleich zur wt-Sequenz aufweisen, wurden mit GST-Six2 inkubiert.

(A+C) wt-Sequenz der Bindungsstelle GDNFI und GDNFII. Die Zahlen sowie Buchstaben unter den Basen entsprechen der Position des Basenpaaraustausches und der im Vergleich zur wt-Sequenz veränderten Base. Der Basenpaaraustausch erfolgte immer A > C, C > A, G > T und T > G.

(B+D) Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden mit ihrem entsprechendem komplementärem Oligonukleotid auf 95°C erhitzt und dann zum Annealing langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die so erhaltenen doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP markiert. Anschliessend wurde ein Gelretardations-Assay durchgeführt. Für die Bindereaktion wurden 2000cpm pro Probe eingesetzt und mit 50 ng GST-Six2 Protein 30 min inkubiert. Als Kontrolle dienten Oligonukleotide mit der wt-Sequenz. Anschliessend wurden die Proben auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde dann mit 30%Essigsäure/10%Methanol 10 min fixiert, getrocknet und ein Röntgenfilm zur Exposition über Nacht aufgelegt.

Werden in der Bindungsstelle GDNFI die Basen 2 oder 5 mutiert (Abb.14B: 2(C), 5(T)), ist eine starke Reduzierung in der Bindung zu beobachten. In der Bindungsstelle GDNFII sieht man in d, e, und f eine reduzierte Bindung (Abb.14D: d(A), e(A), f(T)). Die Position e in GDNFII entspricht der Position 5 in GDNFI. Die Mutation dieser fünf Basen führt in den vorgenommenen Experimenten zu einer Abnahme der Bindung von SIX2 an die DNA.

3.1.8 Mutierte Bindungsstellen im *GDNF*-Promotor zeigen ein Reduzierung in der Bindeaffinität

Da die einzelnen Basenpaaraustausche in den Oligonukleotiden eine Veränderung in der Bindeaffinität zeigen, wurde nun getestet, ob eine Reduzierung der Bindung auch im Kontext des 413bp großen P12 Fragmentes stattfindet. Dazu wurden die Basen, A und G in der Bindungsstelle GDNFI und in der Bindungsstelle GDNFII die Basen C, C und G (Abb.14A Nukleotid 2, 5 und Abb.14C Nukleotid d, e, f) im P12 Fragment ausgetauscht. Diese Basen wurden deshalb ausgewählt, weil sie alle in der palindromen Sequenz der Bindungsstellen liegen und bei allen eine Bindungsreduzierung beobachtet werden konnte, wenn sie mutiert werden. Für diesen Versuch wurden drei verschiedene Konstrukte hergestellt. P12mutI enthält die Basenpaaraustausche in der ersten Bindungsstelle, P12mutII die in der zweiten Bindungsstelle und im Konstrukt P12mutIII wurden beide Bindungsstellen verändert. Abb.11A zeigt Sequenzausschnitte aus P12, mit den veränderten Basen (rot). Die Bindungsstellen wurden gelb hinterlegt.

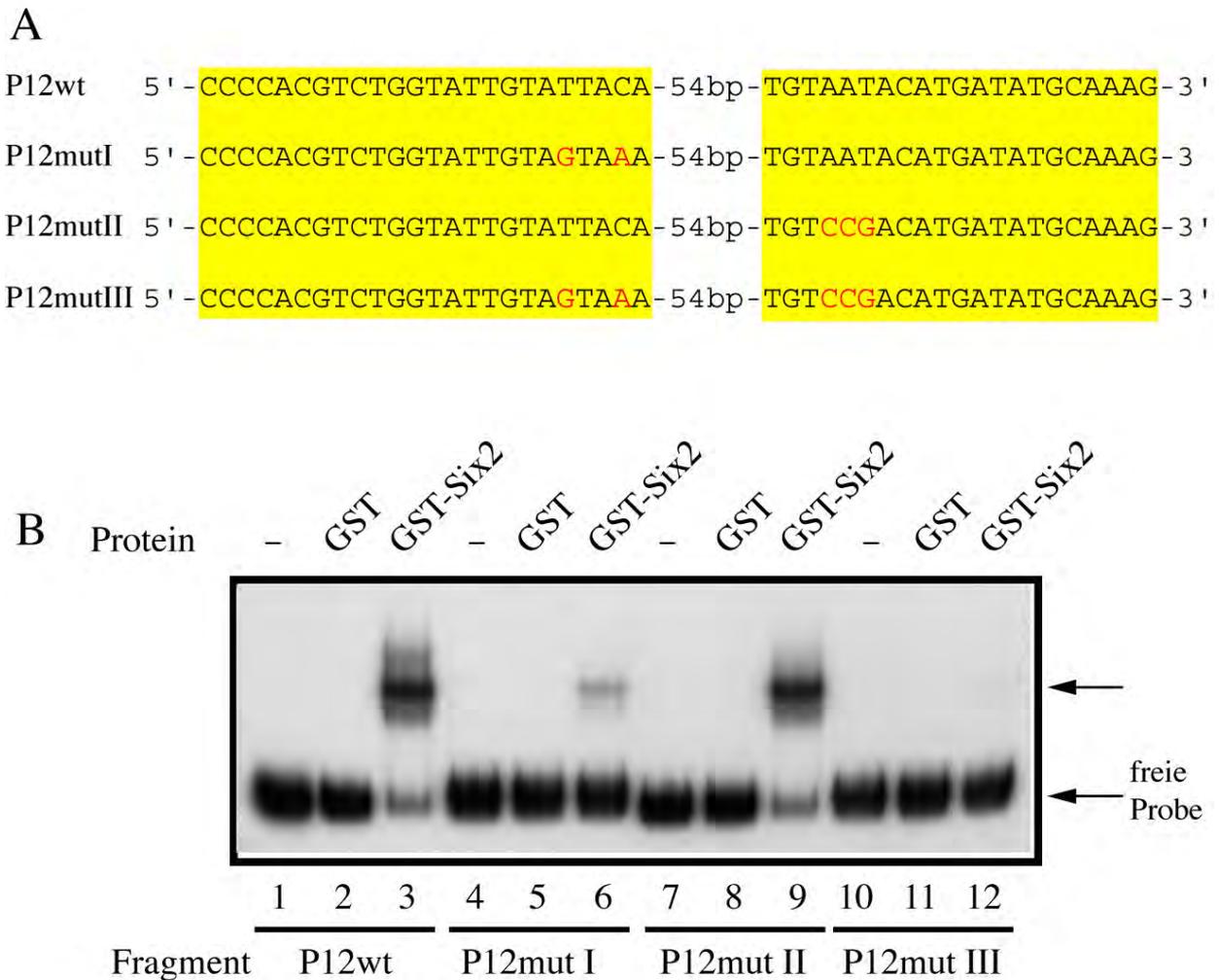


Abb.15: Bindung von GST-Six2 Protein an das P12-GDNF-Promotor Fragment und an P12 Fragmente, die Basenpaaraustausche in den Bindungsstellen GDNFI und GDNFII aufweisen

- (A) Sequenzausschnitt aus den verwendeten P12-Fragmenten. P12wt: Wildtyp-Sequenz von P12; P12mutI: in der Bindungsstelle GDNFI wurde zwei Basen ausgetauscht, die zweite Bindungsstelle bleibt unverändert; P12mutII: in der Bindungsstelle GDNFII wurden drei Basen ausgetauscht, die erste Bindungsstelle bleibt unverändert; P12mutIII enthält die Basenpaaraustausche von mutI und mutII, beide Bindungsstellen sind verändert. Die Basenpaaraustausche erfolgten mittels site directed mutagenesis kit von Stratagene. Die Basen wurden immer A > C, C > A, G > T und T > G ersetzt. Die Six2-Bindungsstellen sind gelb hinterlegt, mutierte Basen rot.
- (B) Die verwendeten Proben wurden mittels PCR und den Oligonukleotiden Shift5.V und Shift3.V aus dem 3,6kb *GDNF*-Fragment amplifiziert. Für den anschließenden Gelretardations-Assay wurden die Fragmente mit [γ - 32 P]-ATP markiert. 2000cpm pro Probe wurden mit 50ng GST-Six2 für 30 min inkubiert (3,6,9,12). Als Kontrolle dienten die freie Probe (1,4,7,9) und Proben, welche mit 50ng GST-Protein inkubiert wurden (2,5,8,11). Das Gel wurde nach der Elektrophorese 10 min mit 30%Essigsäure/10%Methanol fixiert, getrocknet und dann über Nacht ein Röntgenfilm zur Exposition aufgelegt.

Diese Konstrukte wurden mittels PCR amplifiziert, radioaktiv markiert und anschliessend ein Gelretardations-Assay durchgeführt. Als Kontrolle wurde die radioaktiv markierte Probe alleine aufgetragen und Probe, die nur mit GST inkubiert wurde, um eine Bindung die durch GST

hervorgerufen wird, zu erkennen. Das Fragment P12wt zeigt die normale Bindung von SIX2 an das Fragment. P12mutI weist eine 90%-ige Reduzierung in der Bindung auf. P12mutII zeigt eine fast vergleichbare Bindung wie das unveränderte P12wt. Werden beide Bindungsstellen mutiert, so kommt es zu keiner Bindung mehr an das P12mutIII-Fragment. (Abb.15B).

3.1.9 Beide Bindungsstellen von SIX2 sind wichtig für die Transaktivierung

Nachdem festgestellt wurde, dass es zwei Bindungsstellen für SIX2 im *GDNF*-Promotor gibt, wurde untersucht, ob eine Veränderung der Bindungsstellen auch eine Veränderung in der Transaktivierung zur Folge hat. Dafür wurden das Fragment P12, welches vor einem Luziferase-Gen kloniert wurde und seine Mutanten P12mutI, P12mutII und P12mutIII mit dem Expressionsvektor von *Six2* kotransfiziert.

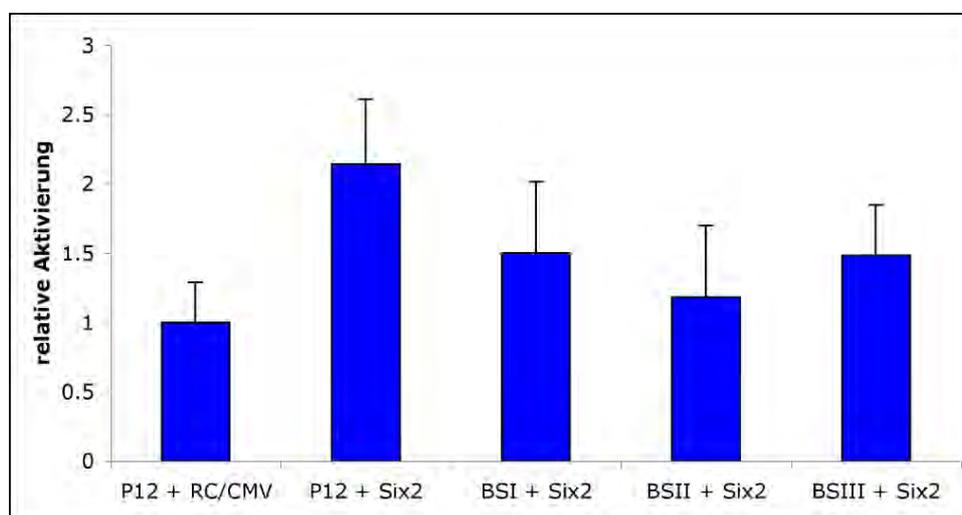


Abb.16: Transaktivierung des P12 Fragmentes und der P12-Fragmente mit Basenpaaraustauschen durch SIX2

$1 \cdot 10^5$ Cos7-Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids (P12, BSI, BSII, BSIII) und des Expressionsplasmides *Six2* transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und ein Luziferase-Assay durchgeführt. Als Kontrolle diente das Reporterplasmid, welches mit dem leerem Vektor (RC/CMV) kotransfiziert wurde. Die relative Aktivierung ergibt sich nach Dividieren der Ergebnisse von Reporterplasmid + Expressionsvektor mit den Ergebnissen leerer Reporter (SeapBasic) + Expressionsvektor. Das Schaubild zeigt die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche. Die Basisaktivität von 1 wurde durch die Transfektion der Reporterplasmide mit leerem Vektor (RC/CMV) erhalten.

Das P12 Fragment mit den unveränderten Bindestellen zeigt die höchste Aktivierung. Bei allen drei mutierten Fragmenten kommt es zu einer Reduzierung der Aktivierung. Diese Reduzierung zeigt unter den mutierten Fragmenten keinen signifikanten Unterschied.

Bei diesem Experiment konnte trotz mehrfacher Wiederholung und Abänderung der Versuchsbedingungen keine gleich hohe Aktivierung des P12-Fragmentes durch SIX2 erreicht werden, wie bei den Versuchen in 3.1.4 .

Der verwendete *GDNF*-Promotor kann nur durch SIX2 aktiviert werden. Die anderen verwendeten Expressionsplasmide von *Pax2*, *Eya1* und *GDNF* zeigen keinerlei Effekt auf die Transaktivierung. Wt1 zeigt zwar eine Bindung an den *GDNF*-Promotor, hat aber keinerlei Einfluss auf dessen Aktivierung. Die Aktivierung mit SIX2 erfolgt durch Bindung an zwei Bindungsstellen im Promotor, die eine hohe Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz besitzen. Beide Bindungsstellen sind für die Bindung und damit auch für die Transaktivierung erforderlich.

3.2 Promotoranalysen am murinen *Six2*-Promotor

Das regulatorische Netzwerk bei der Augenentwicklung von *D. melanogaster* wurde in der Literatur schon genauer charakterisiert. Die dabei beteiligten Gene sind *eyeless* (*ey*), *sine oculis* (*so*), *eyes absent* (*eya*) und *dachshund* (*dach*). Die menschlichen und murinen Homologe dieser Gene sind für *eyeless Pax*-, für *sine oculis Six*- und für *eyes absent Eya*-Familienmitglieder. Mitglieder dieser Genfamilie werden auch in der sich entwickelnden Niere noch vor der Knospung des Ureters in das metanephrische Mesenchym im metanephrischen Mesenchym selbst exprimiert. In knock-out Studien von *Pax2* und *Eya1* wurde keinerlei Ausbildung von Nieren festgestellt. Im *Eya1* knock-out wird kein *GDNF* exprimiert. Auch eine Expression von *Six2* ist nicht nachweisbar. Dies lässt vermuten, dass EYA1 an der Expression von *Six2* und *GDNF* direkt oder indirekt beteiligt ist. In 3.1 wurde gezeigt, daß EYA1 in Transaktivierungsanalysen im Gegensatz zu SIX2 keinen Effekt auf das verwendete *GDNF*-Promotor-Fragment hat. Sollte es einen regulatorischen Pax2-Eya1-Six2-GDNF-Pfad geben, reguliert EYA1 dann die Expression von *Six2*, oder sind andere Genprodukte dafür verantwortlich?

3.2.1 Klonierung des murinen *Six2*-Promotors

Die Sequenz des murinen *Six2*-Promotors ist bis jetzt nicht veröffentlicht. Um mit diesem Promotor arbeiten zu können, wurde ein Teilstück des Promotors aus einer murinen DNA-Bibliothek kloniert. Diese Bibliothek besteht aus DNA-Fragmenten, welche von murinen 129/ola Milz-Zellen stammen und in den Cosmid-Vektor Lawrist 7 ligiert wurden. Die verwendete Probe für den Southern-Blot war die cDNA der Six-Domäne von *Six2*. Diese Probe wurde radioaktiv markiert und mit den Filtern inkubiert. Aus dem entstehenden Muster der Signale, kann nun die

Position des Clones des Cosmides berechnet werden. Es wurden sechs mögliche Clone gefunden, die mit der Six2-Probe positiv waren. Nach der Aufreinigung der Cosmide aus *E. coli* wurden diese jeweils mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut und erneut mit der Six2-Probe getestet. Nur drei der sechs Clone (#2, 4, 5) erwiesen sich bei diesem Versuch als positiv (Abb.17) und enthalten somit Sequenzen des *Six2*-Gen Locus.

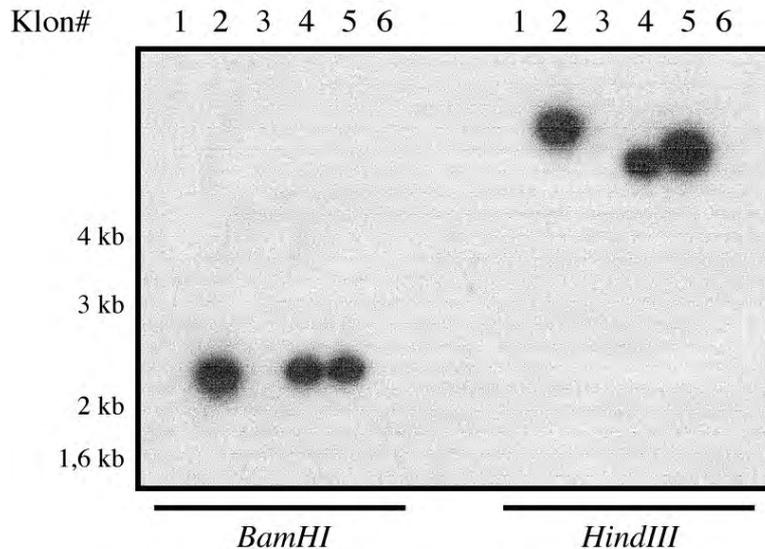


Abb.17: Drei der sechs Cosmid-Klone enthalten eine Six2-spezifische Sequenz

Die sechs Cosmid-Klone wurden jeweils mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Nach Auftrennung des Verdauungsproduktes über ein 1%-iges Agarose Gel, wurde ein Southern-Blot mit einer radioaktiven DNA-Probe, welche die Six-Domäne von *Six2* enthält, durchgeführt. Nach Waschen der Membran mit 2xSSC, wurde ein Film zur Autoradiographie über Nacht aufgelegt.

Um mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Fragment zu isolieren, das den Promotor von *Six2* enthält, muss ein Fragment gefunden werden, das möglichst nahe 5' am vermuteten Transkriptionsstartpunkt liegt. Dafür wurden die Cosmide erneut mit *Bam*HI bzw. *Hind*III verdaut. Dann wurden für die Hybridisierung 3 verschiedene cDNA-Proben generiert. Die erste Probe enthält Sequenzen der Six-Domäne von *Six2*, die Zweite die der Homeodomäne und die dritte Sequenzen den C-Terminus. Mit diesen Proben wurde erneut ein Southern-Blot durchgeführt.

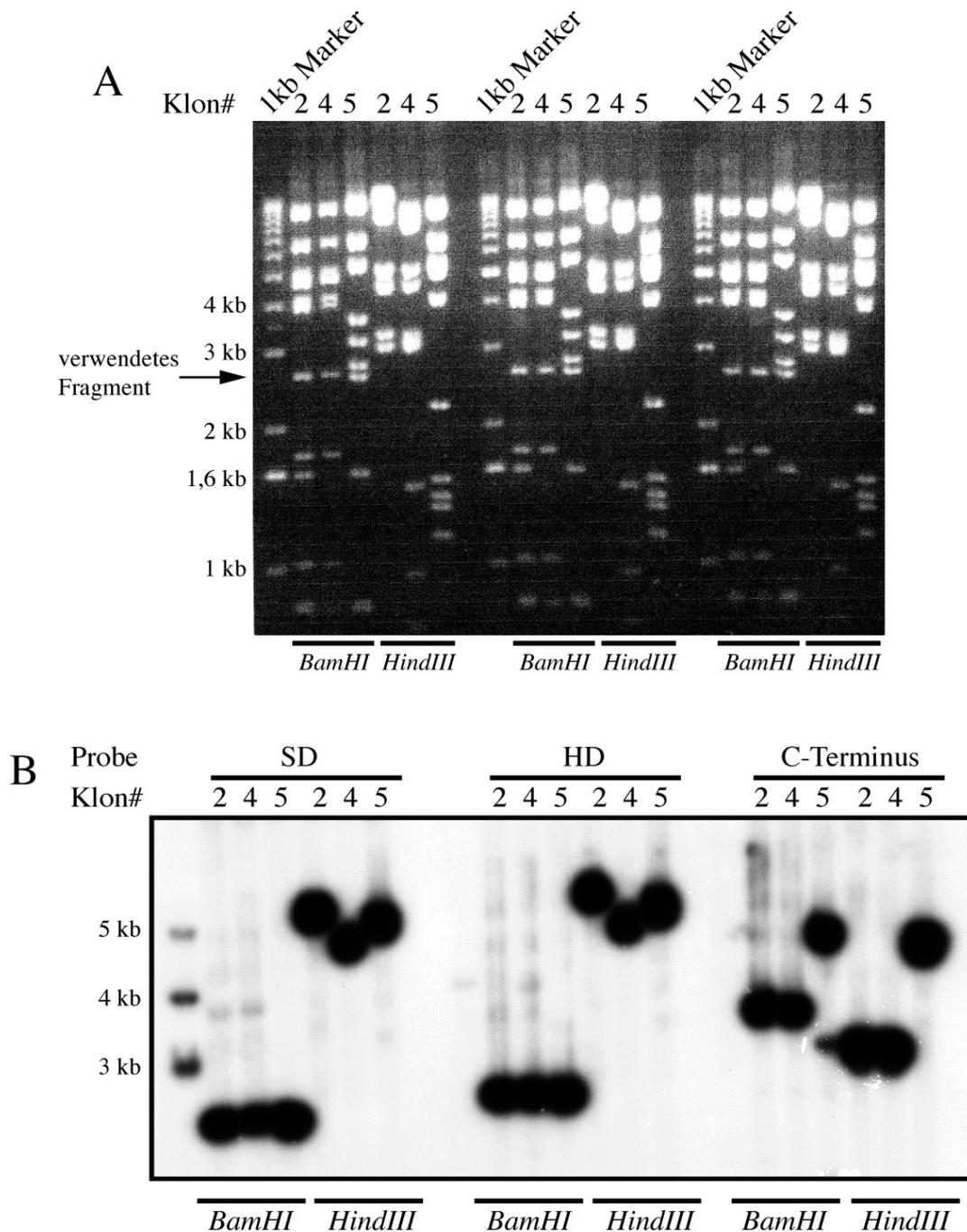


Abb.18: Lokalisation der drei verschiedenen Six2-Domänen auf verschiedenen DNA-Fragmenten der Cosmid-Klone

- (A) Die drei positiven Cosmid-Klone #2,4 und 5 wurden mit *BamHI* und *HindIII* verdaut und in einem 1%-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde durch Ethidium-Bromid sichtbar gemacht und photographiert.
- (B) Die DNA-Fragmente aus dem Verdau wurden dann auf eine Hybond-N+-Membran über Nacht geplottet. Diese Membran wurde mit drei verschiedenen radioaktiven DNA-Fragmenten hybridisiert. Diese Fragmente enthalten Sequenzen entweder für die Six-Domäne (SD), die Homeodomäne (HD) oder den C-Terminus von *Six2*. Nach Waschen der Membran mit 2xSSC wurde ein Röntgenfilm über Nacht auf die Membran zur Exposition gelegt.

In allen Cosmiden gibt es Fragmente, die für die Proben positiv sind (Abb.18B). Aus den für die Six-Domäne positiven Fragmenten wurde das Fragment des Verdauens mit *BamHI* des Cosmides 2 gewählt. Dieses Fragment besitzt eine Größe von 2,5 kb. Dieses Fragment wurde in den Vektor pBSKII über die Restriktionsschnittstelle *BamHI* kloniert. Nach Vergleich der bekannten Sequenzdaten, konnte das Startcodon lokalisiert werden. Für die Promotoranalysen von *Six2* wurden nur die Sequenzen, die sich 5' dieses ATG befinden, benötigt. Darum wurde das *Six2BamHI*-Konstrukt verdaut und das erhaltene Fragment in den SEAP tragenden Vektor SeapBasic kloniert.

Um sicher zu gehen, ob es sich bei dem erhaltenen Fragment um den Promotor von *Six2* handelt, wurde die Sequenz dieses Fragmentes mit der des publizierten menschlichen *Six2*-Promotors verglichen. Es ergibt sich eine Übereinstimmung der beiden Sequenzen von nahezu 80% (Abb.19).

Abb.19: Sequenzvergleich des klonierten murinen 920bp-Six2-Promotors mit dem menschlichen Six2-Promotor

Der Vergleich zwischen dem klonierten murinen *Six2*-Promotor-Fragment und dem menschlichen *Six2*-Promotor ergibt eine 78.11%ige Übereinstimmung. Die für den menschlichen Promotor vorhergesagten Transkriptionsstartpunkte (AG) sind fett hinterlegt.

Der *Six2*-Promotor enthält weder eine TATA-Box noch CAG-Sequenzen. Die Transkriptionsstartpunkt (AG) in der menschlichen Sequenz wurden mit dem Computerprogramm NIX gefunden.

3.2.2 In vivo Charakterisierung des 920bp des murinen Six2-Promotors

Wie beim *GDNF*-Promotor war hier die Frage, inwieweit das verwendete 920bp-*Six2*-Promotorfragment die Expression von *Six2 in vivo* regulieren kann. Dazu wurde das Fragment in einen Vektor kloniert der ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) und ein nachgeschaltetes *LacZ*-Gen trägt. Diese Konstrukt wurde in Mäuseeier injiziert und stabil transgene Mäuselinien etabliert.. Die Generierung und Färbung der transgenen Embryonen erfolgte wie bereits in 3.1.1 beschrieben. Von den Embryonen wurden zusätzlich noch Transversalschnitte angefertigt (Schnittdicke 30 µm), um die Expression im Embryo besser beschreiben zu können.

Eine Färbung tritt in den transgenen Embryonen am Tag 10.5 p.c. an mehreren Stellen auf (Abb.20a). So erkennt man am Embryo Blaufärbung in den Somiten, dem Neuralrohr und der ösophagialen Region. Während der Mausentwicklung gibt es vier Rhombomerpaare. Die ersten drei dieser Paare sind mit je einem Branchialbogen assoziiert, den sie innervieren. Die Färbung in diesem Bereich ist in diesen Nerven zu beobachten. Weiterhin zeigt sich Blaufärbung in verschiedenen Bereichen des Kopfes: der Rhombomergrenze und dem Trigeminale Nerv V.

In den Schnitten erkennt man (b-f), dass die Färbung im Gehirn auch im Boden des Telencephalons, des Trigeminus Nerves und dem unteren Teil des Magens und dessen dorsalem Mesenterium zu beobachten ist. Eine deutliche Färbung ist in der Urogenitalleiste zu erkennen. Abb.20 d und f zeigen Grossaufnahmen dieser Färbung.

Im Stadium E11.5 (Abb.21) reduziert sich die Blaufärbung im Gehirn auf die vorderen Bereiche. Zusätzlich ist eine neue *LacZ*-Färbung im Übergangsbereich vom Rückenmark ins Gehirn zu beobachten, sowie an der Basis der Extremitätenanlagen. Die Färbung an der ösophagialen Region bleibt erhalten, genauso wie die in den Somiten. In den Schnitten erkennt man, dass sich die Färbung im Gehirn (b und c) immer noch im Boden des Telencephalons und im Trigeminus Nerv findet. Zusätzlich kommt es zu einer Färbung im und am sich entwickelnden Auge. Die Färbung im metanephrischen Mesenchym kondensiert sich nun um die eingedrungene Ureterknospe (f)

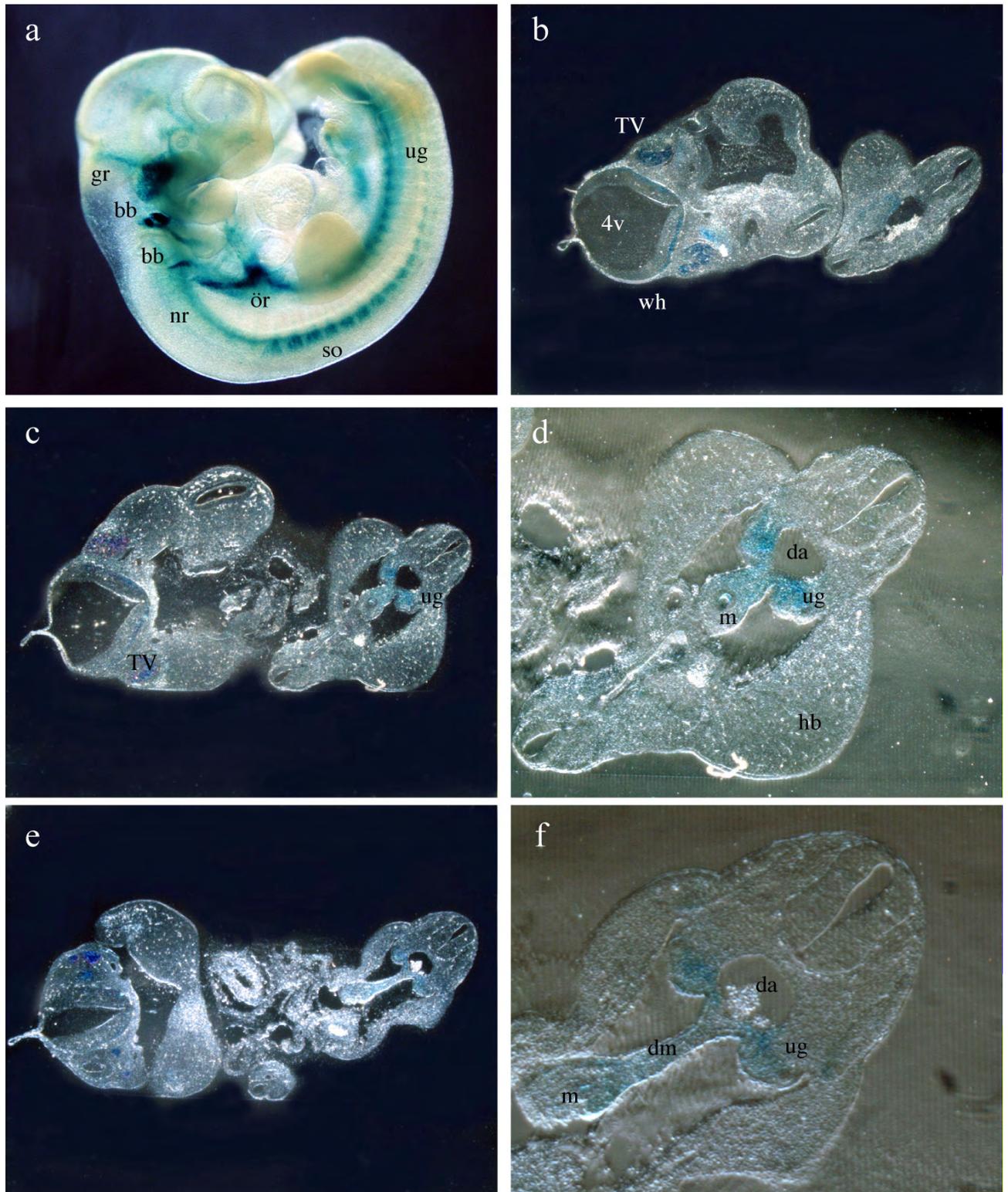


Abb.20: Expressionsmuster am Tag10.5 p.c. für das Konstrukt SPLacZ

(a) Expression von SPLacZ im Embryo im Stadium E10.5 (b) Transversalschnitt durch den Kopf und Schwanzbereich des Embryos (c) Sagittalschnitt durch den Brustbereich des Embryos (d) Vergrößerung des dorsalen Bereiches von (c). (e) Transversalschnitt durch den Rückenbereich des Embryos (f) Vergrößerung des dorsalen Bereiches von (e)

4v viertes Ventrikel, bb Branchialbögen, da dorsale Aorta, dm dorsales Mesenterium des Magens, gr Grenze zum Rhombencephalon, hb hintere Beinknospe, m Magen, nr Neuralrohr, ör ösophagiale Region, so Somiten, TV Trigeminus Nerv V, ug Urogenitaleiste, wh Wand des Hinterhirns,

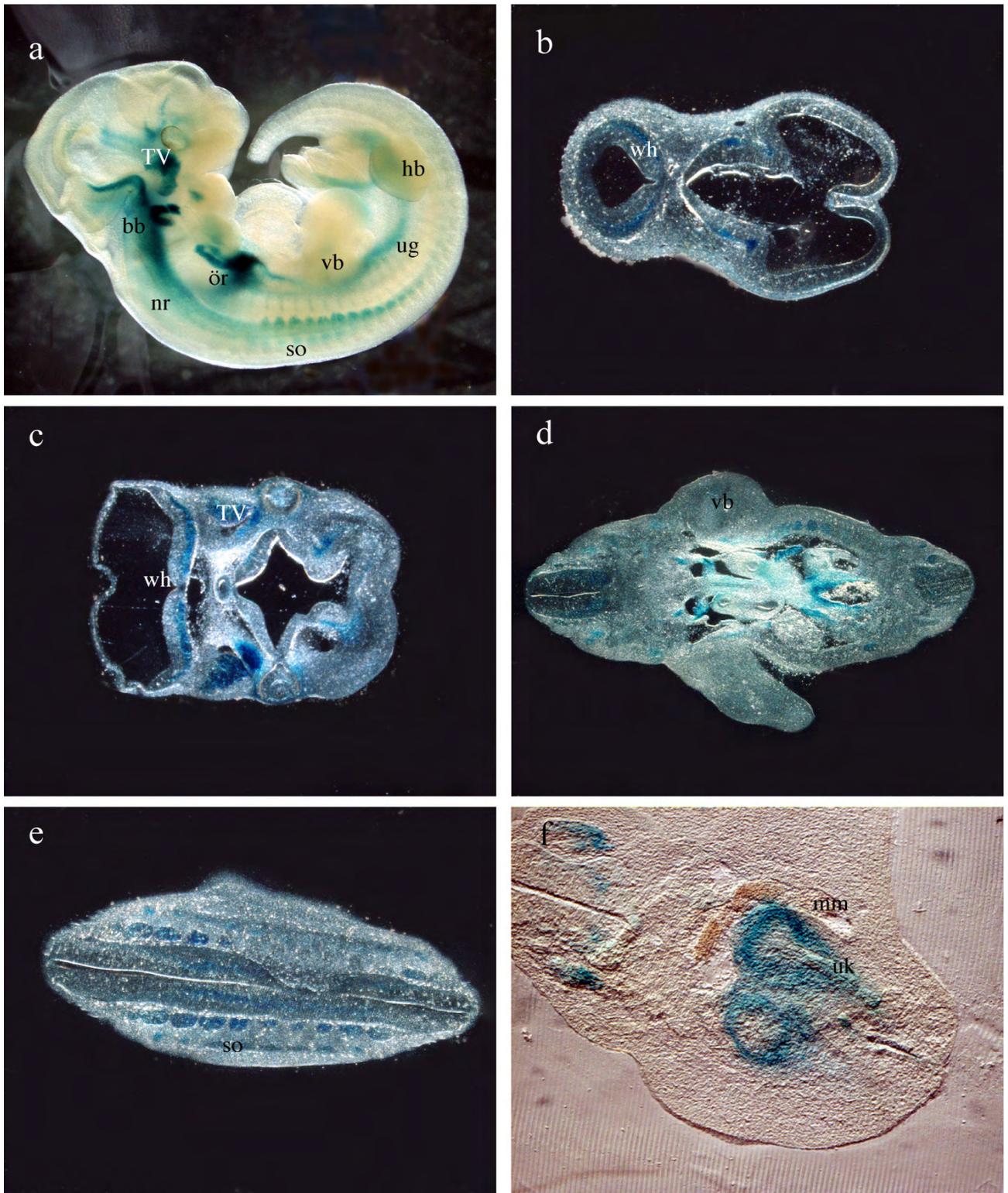


Abb.21: Expressionsmuster am Tag 11.5 p.c. für das Konstrukt SPLacZ

(a) Expression von SPLacZ am Tag 11.5 p.c. (b) Schnitt durch den oberen Kopfbereich (c) Transversalschnitt durch den Augenbereich des Embryos (d) Transversalschnitt durch den Brustbereich des Embryos (e) Transversalschnitt durch den Rückenbereich des Embryos (f) Schnitt durch den Nierenbereich des Embryos; 4v viertes Ventrikel, bb Branchialbögen, hb Hinterbein, gr Grenze zum Rhombencephalon, mm metanephrisches Mesenchym, nr Neuralrohr, ö ösophagiale Region, so Somiten, TV Trigeminus Nerv V, uk Ureterknospe, ug Urogenitalleiste, vb Vorderbein, wh Wand des Hinterhirns

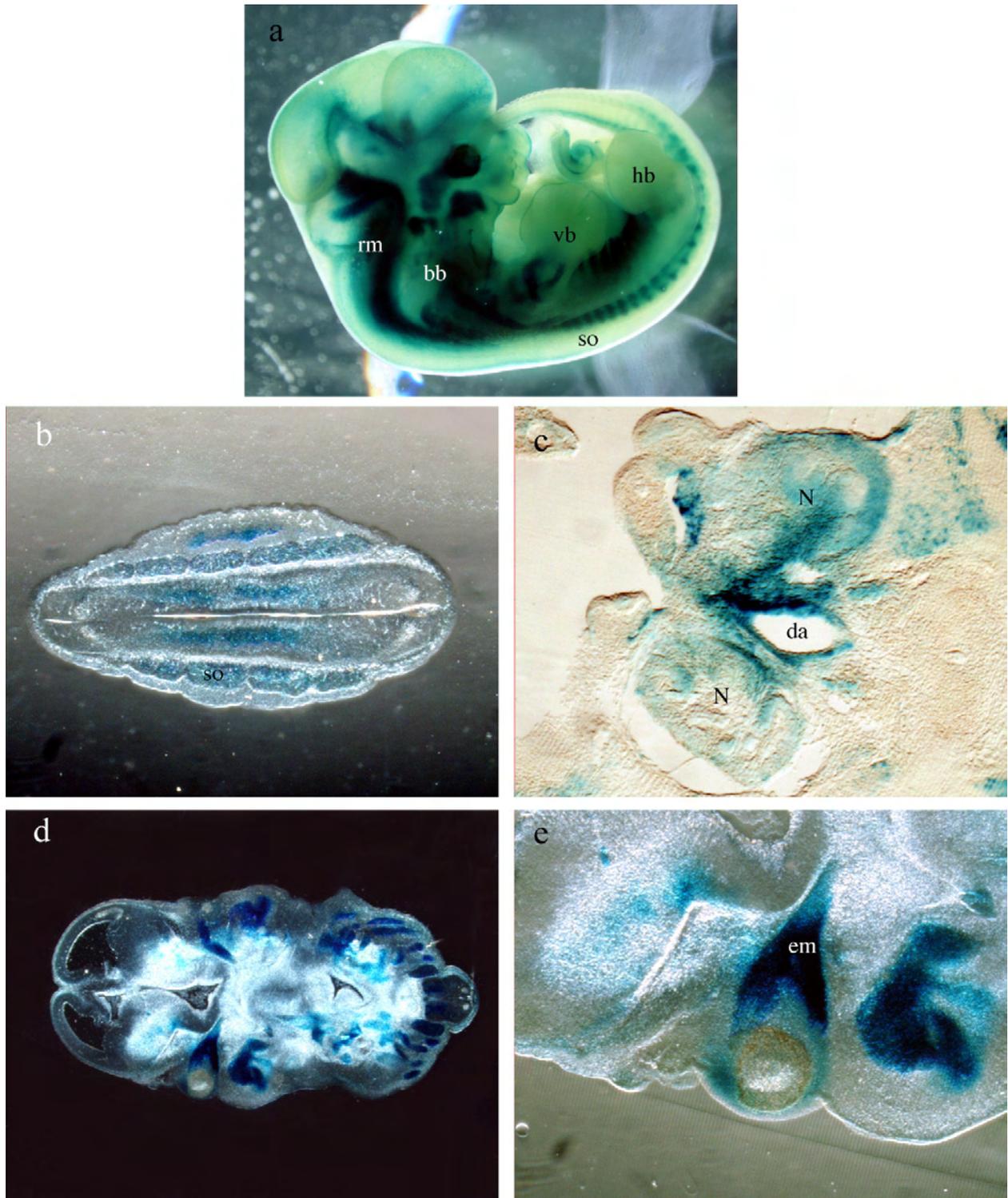


Abb.22: Expressionsmuster am Tag 12.5 p.c. für das Konstrukt SPLacZ

(a) Expression von SPLacZ am Tag 12.5 p.c. (b) Schnitt durch den Rückenbereich (c) Schnitt durch den Nierenbereich (d) Schnitt durch den Kopfbereich (e) Grossaufnahme Auge; bb Branchialbögen, da dorsale Aorta, em extra okulare Muskelvorläufermasse, hb Hinterbeine, N Niere, rm Rückenmarkansatz, so Somiten, vb Vorderbeine,

Im Vergleich zum Stadium E11.5 kommt es bei E12.5 zu einer Intensivierung aller bereits beobachteten Färbungen (Abb.22). Diese sind immer noch im Bereich des Gehirns, des

Rückenmarkes, der Branchialbögen, der Somiten und am Auge zu beobachten. Weiterhin erstreckt sich die Färbung jetzt auch auf die Rippen. Die Blaufärbung an den Extremitäten hat sich ausgedehnt und erscheint nun verzweigt an der Basis der Vorderbeine. In den Schnitten ist die Färbung am Auge in den extraokularen Vormuskelmasse lokalisiert. Die Färbung in der Niere reduziert sich nun auf einzelne Bereiche, die aber alle im metanephrischen Anteil der Niere liegen.

3.2.3 Der *Six2*-Promotor wird durch SIX2 aktiviert

Um zu untersuchen, ob Gene, welche während des gleichen Zeitraumes und im gleichen Gewebe wie *Six2* exprimiert werden, einen Einfluss auf die *Six2*-Expression während der Nierenentwicklung haben, wurde das 920pb-Fragment des *Six2*-Promotors in den Reportervektor Seap Basic kloniert. Das erhaltene Reporterkonstrukt (SPB) wurde dann transient mit verschiedenen Expressionvektoren von solchen möglichen Kandidatengenen kotransfiziert. Abb. 23 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

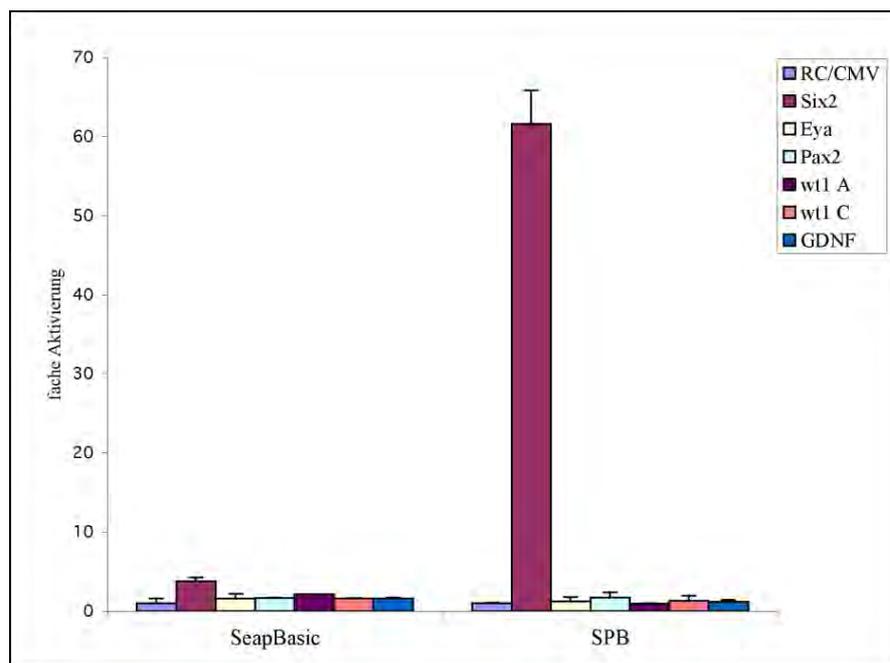


Abb.23: Transaktivierung des *Six2*-Promotors durch SIX2

$1 \cdot 10^5$ U2OS Zellen wurden mit je $1 \mu\text{g}$ Reporterkonstrukt (SPB) und dem entsprechenden Expressionskonstrukt transfiziert. Die Transfektion erfolgte durch Superfekt. Als Kontrolle diente der leere Reporter, welcher mit den Expressionsvektoren kotransfiziert wurde. Um die Basisaktivität der Reporterkonstrukte zu ermitteln, wurden diese mit einem leerem Vektor (RC/CMV) transfiziert, diese wurde dann gleich 1 gesetzt. Nach 24h Expression wurden $50 \mu\text{l}$ Medium abgenommen und ein SEAP-Assay durchgeführt.

Weder PAX2, noch EYA1 und WT1 zeigen einen signifikanten Effekt auf den *Six2*-Promotor. *GDNF*, das in der Regulationskaskade wahrscheinlich nach *Six2* exprimiert wird, wurde als Kontrolle transfiziert und zeigt keinen Effekt. Nur SIX2 selbst verursacht eine starke Transaktivierung, die das 60 fache in Bezug zur Basisaktivität (RC/CMV) des Reporterkonstruktes beträgt.

Um einen konzentrationsabhängigen Effekt des Expressionsplasmides auf SPB zu untersuchen, wurde das Expressionsplasmid von *Six2* in ansteigender Konzentration mit SPB kotransfiziert (Abb.24).

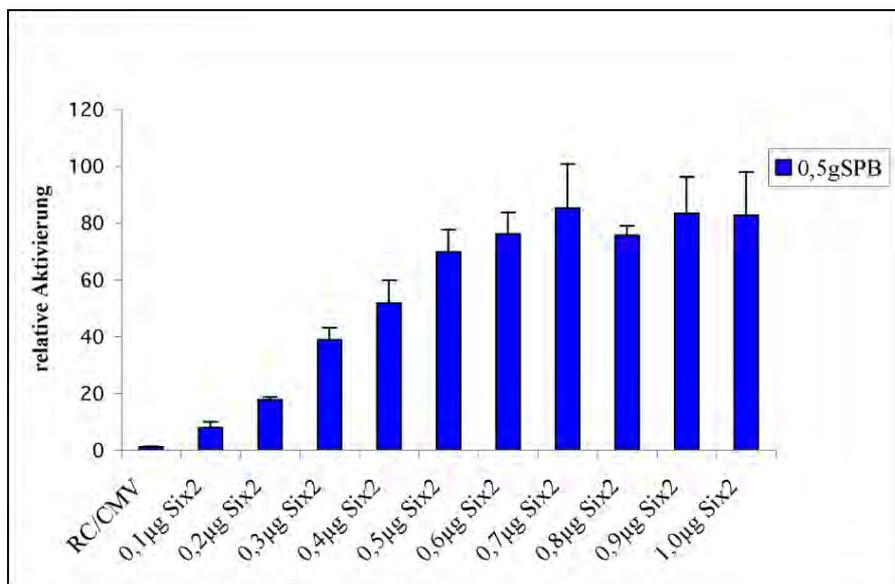


Abb.24: Die Transaktivierung von SPB durch SIX2 ist konzentrationsabhängig

$1 \cdot 10^5$ U2OS Zellen wurden mit jeweils $0,5 \mu\text{g}$ SPB-Reporterplasmid und mit der angegebenen Menge *Six2*-Expressionsplasmid transfiziert. Als Kontrolle wurde der leere Reporter (SeapBasic) mit den gleichen Mengen Expressionsplasmid cotransfiziert. Nach 48h Expression wurden $50 \mu\text{l}$ Medium abgenommen und ein SEAP-Assay durchgeführt. Um die Basisaktivität der Reporterkonstrukte zu ermitteln, wurden diese mit je $0,5 \mu\text{g}$ leerem Vektor (RC/CMV) transfiziert und dann gleich 1 gesetzt. Das Balkendiagramm zeigt die relative Aktivierung, welche durch Dividieren der Ergebnisse des SPB-Reporters mit den Ergebnisse des SeapBasic-Vektors ermittelt wurden. Das Ergebnis repräsentiert drei unabhängige Versuchsreihen.

Wird das Expressionsplasmid in der gleichen Menge wie das Reporterplasmid transfiziert, so ist eine maximale Transaktivierung zu beobachten, was die Spezifität der Aktivierung des *Six2*-Promotors durch SIX2 zeigt.

3.2.4 SIX2 bindet an seinen eigenen Promotor

Six2 besitzt als Homoeobox-Gen eine DNA-Bindedomäne. Das legt nahe, das SIX2, nachdem es eine transaktivierenden Effekt auf den Promotor hat, auch an diesen bindet. Um das zu

untersuchen, wurden verschiedene DNA-Fragmente aus dem 920bp-Promotor mittels PCR generiert (Abb25A). Diese Fragmente überlappen sich an ihren Enden jeweils um die Länge des verwendeten Oligonukleotides.

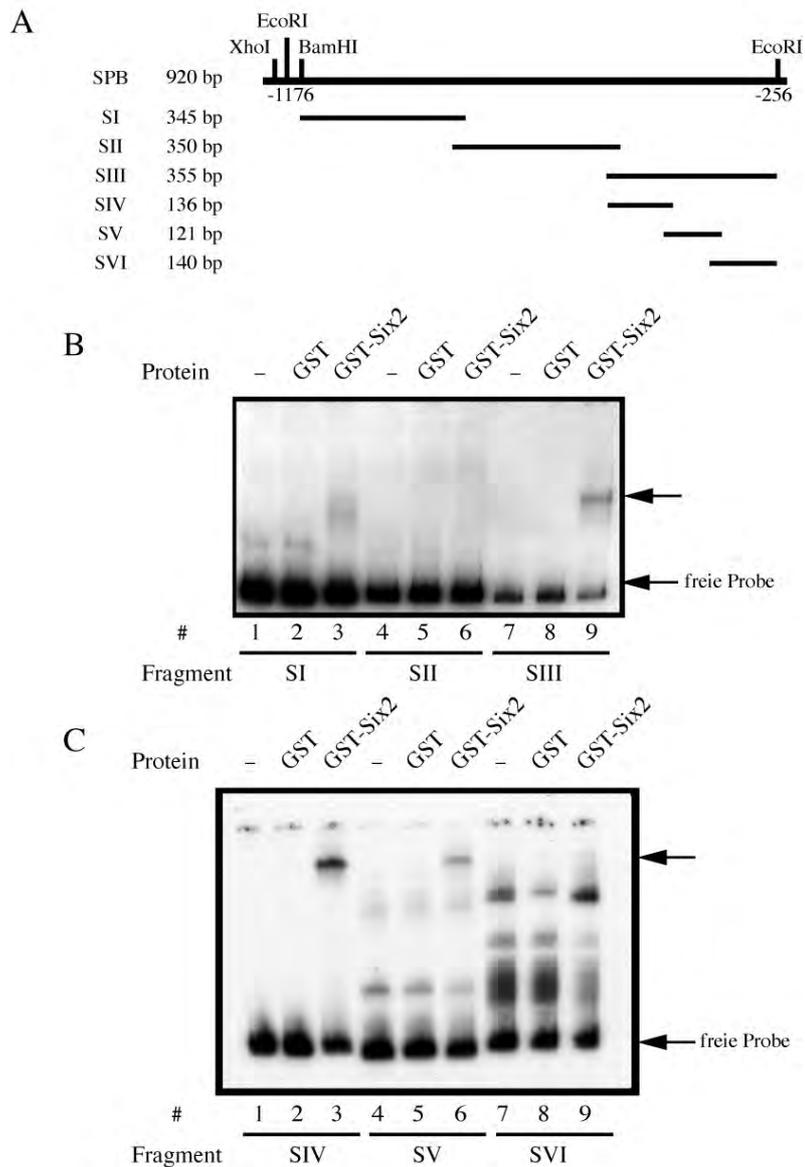


Abb.25: GST-Six2 bindet an den Six2-Promotor

- (A) Schematische Darstellung der verwendeten *Six2*-Promotor-Fragmente. Aus dem 920bp langen *Six2*-Promotor-Fragment wurden mittels PCR und den entsprechenden Oligonukleotiden sechs unterschiedliche DNA-Fragmente amplifiziert. SI, SII, SIII, SIV, SV und SVI. Diese Fragmente überlappen sich an ihrem 5'- und 3'-Ende jeweils um die Länge der Oligonukleotide.
- (B) Gelretardations-Assay: Die amplifizierten Fragmente SI-SIII wurden mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ am 5'-Ende radioaktiv markiert. Für den Versuch wurde 2000cpm pro Probe eingesetzt und mit 50ng GST-Six2-Protein für 30 min inkubiert. Als Kontrolle diente die freie Probe und Probe, welche mit GST-Protein allein inkubiert wurde. Die Proben wurden in einem 8%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel mit 30%Essigsäure/10%Methanol 10 min fixiert, getrocknet und dann ein Röntgenfilm zur Exposition über Nacht aufgelegt. Bindung an das Fragment SIII: Probe allein (1,4,7), Probe + GST (2,5,8), Probe + GST-Six2 (3,6,9)
- (C) Gelretardations-Assay mit den Proben SIV-SVI: Bindung an das Fragment SIV: Probe allein (1,4,7), Probe + GST (2,5,8), Probe + GST-Six2 (3,6,9)

Für die Gelretardationsanalyse wurden diese Fragmente mit [γ - 32 P]-ATP markiert und mit rekombinantem GST-Six2 Protein inkubiert (Abb.25B und C 3,6,9). Als Kontrolle für die Reinheit der Proben wurde das markierte Fragment alleine verwendet (Abb.25B und C 1,4,7) und um eine Bindung von GST auszuschliessen, wurden die Proben auch mit GST inkubiert (Abb.25B und C 2, 5, 8).

In Abb.25B ist bei den Fragmenten SI und SIII eine Bindung der Fragmente durch GST-Six2 zu beobachten, wobei die Bindung an das Fragment SI relativ schwach ist und die an SIII deutlich zu Tage tritt. Auch sind in den #1 und 2 leichte Banden oberhalb der freien Probe zu sehen, die aber als unspezifisch betrachtet werden können, da sie nicht auf Wechselwirkungen mit einem Protein zurückzuführen sind.

Um die Position der Bindungsstelle im Fragment SIII einzugrenzen, wurden weitere Fragmente generiert (SIV-SVI), die das Fragment SIII überspannen. Auch mit diesen Fragmenten wurde ein Gelretardations-Assay durchgeführt (Abb.25C). Eine Bindung von GST-Six2 ist hier bei den Fragmenten SIV und SV zu beobachten. Die Banden unterhalb der beobachteten Bindung in SVI sind unspezifisch, da sie auch in dem Versuchsansatz mit markierter Probe allein (Abb.25C #7) auftreten. Da sich die Fragmente SIV und SV um 21bp überlappen, ist aus diesem Ergebnis nicht zu sagen, ob es sich bei den Banden in #3 und 6 in Abb.25C um eine Bindungsstelle handelt, die im Überlappungsbereich der beiden Fragmente liegt, oder ob es zwei Bindungsstellen sind.

3.2.5 SIX2 besitzt zwei Bindungsstellen im *Six2*-Promotor

Um die Frage zu klären, ob SIX2 eine oder zwei Bindungsstellen im *Six2*-Promotor besitzt und die Sequenz dieser Bindungsstellen zu charakterisieren, wurde eine Footprint-Analyse des *Six2*-Promotor-Fragmentes SIII durchgeführt (Abb.26). Dafür wurde die Probe SIII jeweils am Sense-Strang und am Anti-Sense-Strang radioaktiv markiert, so dass sich zwei Proben ergeben, Sense (5' markiert) und Anti-Sense (3' markiert).

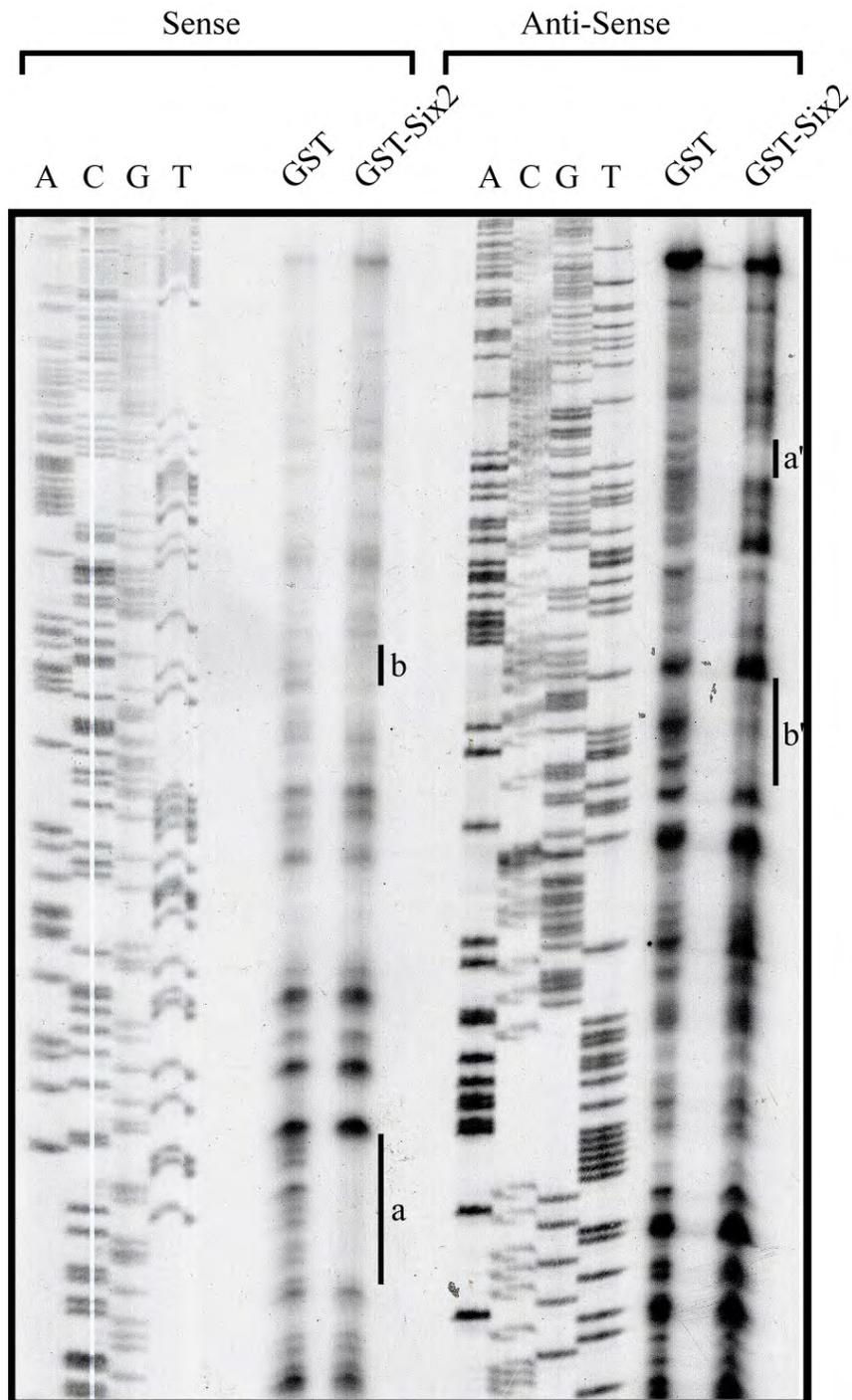


Abb. 26: Footprint-Analyse des *Six2*-Promotorfragmentes SIII

Das Fragment SIII wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden SP5.III und SP3.III aus dem 920bp-*Six2*-Promotor-Fragment amplifiziert. Bei der Probe 5'-Primer* war das Oligonukleotid SP5.III mit [γ - 32 P]-ATP markiert, bei der Probe 3'-Primer* der Primer SP3.III. 20000cpm pro Probe wurden mit jeweils 80 μ g GST-Protein (#5, 11) oder 80 μ g GST-*Six2*-Protein (#6, 12) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend 90s mit *DNaseI* behandelt. Die Sequenzierung von SIII erfolgte bei Sense mit dem unmodifizierten Oligonukleotid SP5.III, bei Anti-Sense mit dem Primer SP3.III. Die Proben wurden dann zusammen mit der Sequenzierung auf einem 6%-igem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschliessend getrocknet und über Nacht ein Röntgenfilm zur Exposition aufgelegt.

Im Fragment SIII des *Six2*-Promotors finden sich zwei Bindungsstellen, wobei die Bindungsstelle a in der Sense-Probe der Bindungsstelle a' in der Anti-Sense-Probe entspricht. Das gleiche gilt für die Bindungsstelle b und b'. Die Bindungsstelle a bzw. a' liegt auf dem Fragment SIV in Abb.25A und die Bindungsstelle b bzw. b' auf dem Fragment SV. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die erste Bindungsstelle (a, a') als SP1 und die zweite Bindungsstelle (b, b') als SP2 bezeichnet.

3.2.6 Die Sequenzen der beiden Bindungsstellen SP1 und SP2 zeigen Übereinstimmungen

Die Basenpaarabfolge der beiden Bindungsstellen kann aus dem Vergleich der Bedeckungen mit der Sequenzierung abgelesen werden.

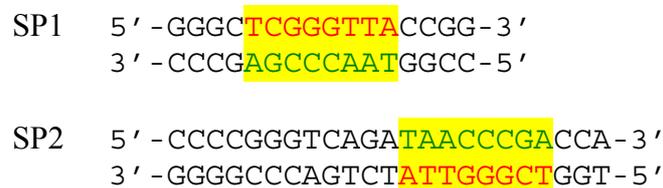


Abb.27: Sequenzvergleich der beiden Bindungsstellen von SIX2 im *Six2*-Promotor

Die Bindungsstelle SP1 enthält 16 Basenpaare. Die Bindungsstelle SP2 erstreckt sich über 23bp. Die beiden Bindungsstellen sind im *Six2*-Promotor 59bp voneinander entfernt.

Die beiden Bindungsstellen, welche in der Footprint-Analyse charakterisiert wurden, zeigen in ihrer Sequenz eine Übereinstimmung von acht Basenpaaren. Vergleicht man die Sequenz von SP1 5'-TCGGGTTA (rot) mit dem Antisense-Strang von SP2 (rot) und umgekehrt die Sequenz des Sense-Stranges von SP2 (grün) mit dem Antisense-Strang von SP1 (grün), so zeigt sich, daß diese acht Basen identisch sind. Es handelt sich, wie schon beim *GDNF*-Promotor, um palindrome Sequenzen in den Bindungsstellen von SIX2.

3.2.7 Für die Transaktivierung von SPB sind die beiden Bindungsstellen und flankierende Sequenzen notwendig

Nachdem die Bindungsstellen von SIX2 im *Six2*-Promotor charakterisiert worden sind, war die Frage, inwieweit diese und ihre flankierenden Sequenzen für die Transaktivierung notwendig sind. Für die Beantwortung dieser Frage wurde zunächst untersucht, ob die Deletionen eine Reduktion der Transaktivierung hervorruft. Dafür wurden vom 920bp Fragment jeweils in 200bp-Schritten Sequenzen vom 5'-Ende deletiert. Dies geschah durch Generierung neuer Fragmente mittels PCR und erneuter Klonierung in den Reportervektor SeapBasic. Die neugewonnenen Konstrukte SPB720, SPB520, SPB320 und SPB120 wurden anschliessend mit dem Expressionsplasmid von *Six2* kotransfiziert. Als Kontrolle für die normale Aktivierung

diente das Volllängen-Fragment SPB920 des *Six2*-Promotors. Abb.28A zeigt die schematische Darstellung der verwendeten Fragmente. Die Bindungsstellen SP1 und SP2 sind als rote Boxen dargestellt.

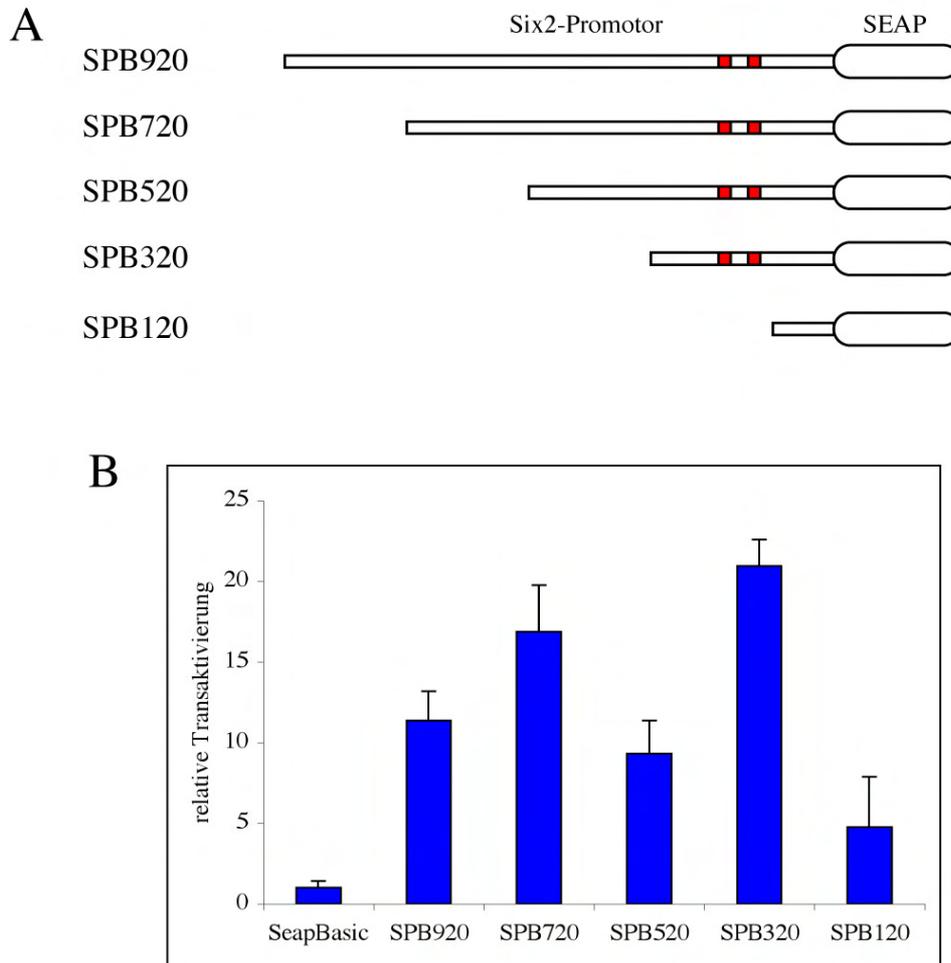


Abb.28: Reporterkonstrukte, die die beiden Bindungsstellen enthalten zeigen eine Transaktivierung

- (A) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte, welche verschieden lange *Six2*-Promotor-Fragmente enthalten. Die Promotorfragmente wurden mittels PCR aus dem 920bp Fragment amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BglII und EcoRI in das Reporterplasmid SeapBasic kloniert. rote Boxen: Bindungsstellen SP1 und SP2
- (B) $1 \cdot 10^5$ U2OS Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Reporterkonstrukt und $1 \mu\text{g}$ Expressionsplasmid *Six2* kotransfiziert. Als Kontrolle wurde die Reporterkonstrukte mit leerem Plasmid (RC/CMV) transfiziert. $50 \mu\text{l}$ Medium wurde nach 24h Expression abgenommen und ein SEAP-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse beider Messreihen wurden danach miteinander dividiert, so dass sich eine relative Transaktivierung ergibt. Die Basisaktivität wurde durch Transfektion des leeren Reporters (SeapBasic) mit RC/CMV oder dem Expressionsplasmid von *Six2* ermittelt und gleich 1 gesetzt. Das Balkendiagramm spiegelt die Resultate dreier unabhängiger Messreihen wieder.

Die Deletionen des 5'-Endes von SPB920 zeigen deutliche Unterschiede in der Transaktivierung durch SIX2 im Vergleich mit dem Volllängenkonstrukt (Abb.28B). Das Konstrukt SPB720

besitzt eine 49%-ige höhere Aktivierung, SPB520 eine 18% niedrigere, SPB320 eine 84% höhere und SPB120 eine 58% niederere relative Transaktivierung als das Kontrollkonstrukt SPB920. Das Konstrukt, bei dem keine der Bindungsstellen mehr vorhanden ist, zeigt die höchste Reduktion in der Transaktivierung.

Die beiden Bindungsstellen von SIX2 sind also notwendig für eine starke Aktivierung des *Six2*-Promotors. Die unterschiedlich starken Aktivierungen der drei anderen Deletionskonstrukte im Vergleich zur Aktivierung des Volllängenkonstruktes SPB920 weisen auf zusätzliche Sequenzen im *Six2*-Promotor hin, die für dessen Regulation notwendig sind.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die Transaktivierungsfähigkeit verändert, wenn *Six2*-Promotor-Konstrukte verwendet werden, die nur die Bindungsstellenregionen oder Bindungsstellen mit kurzen flankierenden Sequenzen enthalten. Auch diese Fragmente wurden mittels PCR aus dem 920bp Volllängenkonstrukt generiert und in den Seap Basic Vektor kloniert (Abb.29A).

SPB220 enthält beide Bindungsstellen, wobei die erste Bindungsstelle direkt an der 5'-Promotor-Sequenz liegt. Das Fragment SPB100+ hat eine Länge von 100bp und enthält beide Bindungsstellen für SIX2, wobei die erste auch am äußersten 5'-Ende liegt. Beim SPB200+-Fragment wurden die 3' gelegenen 120bp deletiert. SPB100- ist 80bp 3' kürzer als SPB200+ und enthält nur noch 1 Bindungsstelle für SIX2. Beim Fragment 30+ handelt es sich nur um ein Fragment von 30pb Länge, das die erste Bindungsstelle SP1 enthält.

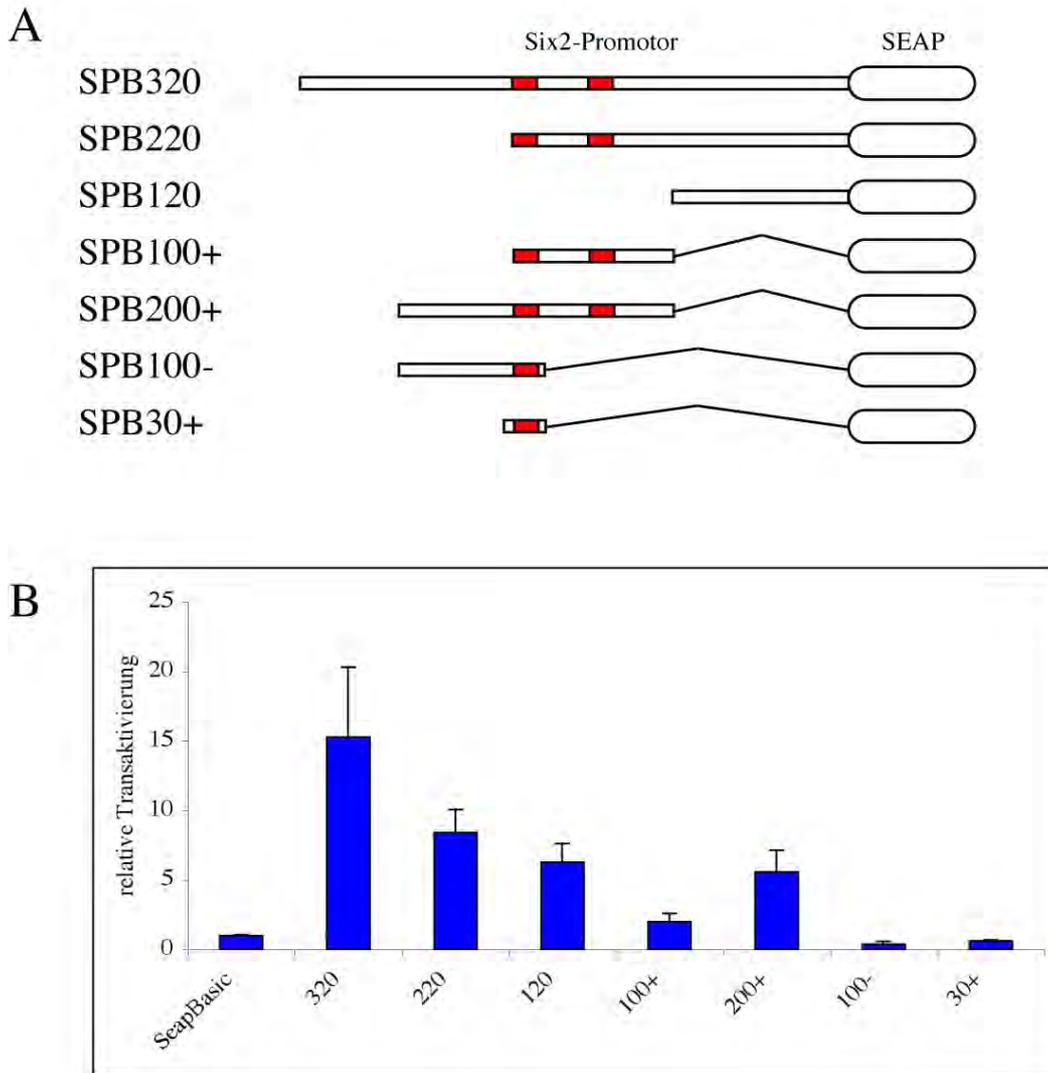


Abb.29: Transaktivierung der Six2-Reporterkonstrukte ist abhängig von den Bindungsstellen und den umgebenden Sequenzen

- (A) Schematische Darstellung der verwendeten *Six2*-Promotor-Fragmente. Die Fragmente wurden mit Hilfe der PCR und den notwendigen Primern aus dem SP320-Konstrukt amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen BglII und EcoRI in den Reportervektor SeapBasic kloniert. rote Boxen: Bindungsstellen SP1 und SP2
- (B) $1 \cdot 10^5$ U2OS Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Reporterkonstrukt und $1 \mu\text{g}$ *Six2*-Expressionsvektor transfiziert. Als Kontrolle wurden die Reporterkonstrukte mit RC/CMV kotransfiziert. Nach 24h wurden $50 \mu\text{l}$ Medium abgenommen und ein SEAP-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse beider Messreihen wurden danach miteinander dividiert, so dass sich eine relative Transaktivierung ergibt. Die Basisaktivität ist die Expression des leeren Reporters (SeapBasic) welcher mit leerem Vektor oder *Six2*-Expressionskonstrukt transfiziert wurde, diese wurde dann gleich eins gesetzt. Die relative Aktivierung ergibt sich nach Dividieren der Ergebnisse von +*Six2* durch +RC/CMV. Die Balkendiagramme zeigen das Ergebnis dreier unabhängiger Messreihen.

Der Standard für die normale Transaktivierung diente das Konstrukt SPB320, da es den verwendeten Konstrukten im Sequenzanteil am nächsten kommt.

Bei allen verwendeten Konstrukten kommt es zu einer Reduktion in der Transaktivierung im Vergleich mit dem Konstrukt SPB320. Die Verminderung der Aktivierung beträgt bei SPB220

44%, bei SPB120 59%, bei SPB100+ 87%, bei SPB200+ 63%, bei SPB100- 98% und bei SPB30+ 96%.

Bei den Konstrukten SPB220 und SPB100+ scheint die Ursache der Reduktion in der Aktivierung im Verlust der 5' gelegenen Sequenzen der Bindungsstelle zu liegen. Wobei die größere Reduktion bei SPB100+ mit den fehlenden 3' Sequenzen zusammenhängt, wie an der Aktivierung von SPB120 zu sehen ist. Das Konstrukt SPB200+ besitzt diese 5' Sequenzen noch, aber keine 3' Sequenzen mehr und zeigt die gleiche Aktivierung wie SPB120. Eine Bindungsstelle allein reicht nicht zur Aktivierung durch SIX2 aus (SPB100-, 30+). Für eine starke Aktivierung sind also beide Bindungsstellen und zumindest ein Teil ihrer flankierenden Sequenzen notwendig.

3.2.8 Die Deletion der Bindungsstellen SP1 und SP2 führt zu einer Reduktion der Bindeaffinität an den murinen *Six2*-Promotor

Wenn die beiden gefundenen Bindungsstellen von SIX2 alleine ausreichend sind, um die Bindung von SIX2 an seinen eigenen Promotor zu vermitteln, so sollte die Deletion der Bindungssequenzen dazu führen, dass keine Bindung mehr beobachtet werden kann. Zur Klärung dieser Frage wurden drei verschiedene Deletionskonstrukte des Fragmentes SPB320 hergestellt. Abb.30A zeigt eine schematische Darstellung. Das Konstrukt 320delI besitzt keine Bindungsstelle SP1 mehr. Beim Konstrukt 320delII wurde die zweite Bindungsstelle SP2 entfernt. 320delIII besitzt keine Bindungsstelle für SIX2 mehr. Mit diesen Konstrukten wurde ein Gelretardations-Assay durchgeführt (Abb.30B).

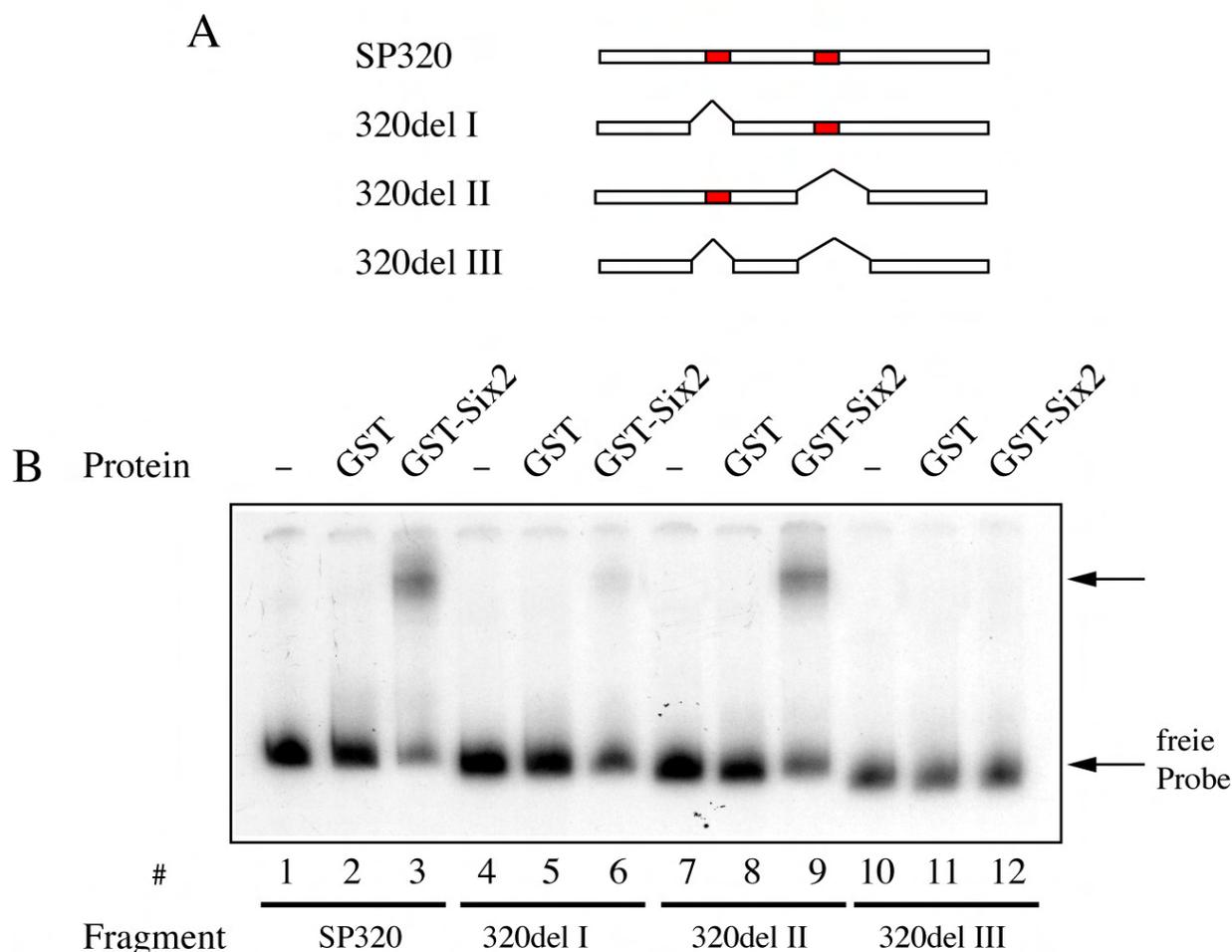


Abb.30: GST-Six2 zeigt eine reduzierte Bindung an Deletionsmutanten von SP320

- (A) Schematische Darstellung der verwendeten Fragmente. SP320 enthält eine 320bp lange wt-Sequenz. SP320delI besitzt eine 30bp lange Deletion der ersten Bindungsstelle SPI. Bei der Mutante SP320delII wurde die Bindungsstelle SPII deletiert. Diese Deletion ist 50bp groß. Bei dem Konstrukt SP320delIII wurden beide Bindungsstellen deletiert. rote Boxen: Bindungsstellen SP1 und SP2
- (B) Die Fragmente SP320, SP320delI, SP320 delII und SP320delIII wurden mittels PCR und den entsprechenden Oligonukleotiden aus ihren Vektoren amplifiziert und dann mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP radioaktiv markiert. Mit diesen Fragmenten wurde eine Gelretardations-Analyse durchgeführt. Jede Probe eines Fragmentes wurde entweder ohne Protein (1,4,7,10), mit 50ng GST-Protein (2,5,8,11) oder 50ng GST-Six2-Protein (3,6,9,12) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschliessend auf einem 8%-igem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die nachstehende Fixierung erfolgte für 10 min mit 30%Essigsäure/10%Methanol. Das Gel wurde getrocknet und dann über Nacht ein Röntgenfilm zur Exposition aufgelegt.

Als Kontrolle diente das Ausgangskonstrukt SPB320wt. Fehlen die 30bp der ersten Bindungsstelle, so reduziert sich die Bindung von Six2 an das Konstrukt 320delI um nahezu 90%. Deletiert man die zweite Bindungsstelle SP2, ist eine leichte Veränderung der Bindung im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz zu beobachten. Werden beide Bindungsstellen entfernt, kommt es zu keiner Bindung des rekombinanten GST-Six2 an das Fragment 320delIII.

Für die Bindung von SIX2 an seinen eigenen Promotor sind beide SIX2-Bindungsstellen notwendig. Ist eine von ihnen mutiert, kommt es zumindest zu einer Reduktion in der Bindeaffinität. Den größten Anteil an dieser Bindung wird von der ersten Bindungsstelle vermittelt, SP1.

3.2.9 Reporterkonstrukte des *Six2*-Promotors, welche nur noch eine oder keine Bindungsstelle für SIX2 besitzen, zeigen eine verminderte Transaktivierung

Da es zu einer Reduzierung der Bindungsaffinität von SIX2 an den murinen *Six2*-Promotor kommt, wenn eine oder beide Bindungsstellen deletiert werden, sollten diese Fragmente auch eine verminderte Transaktivierung durch SIX2 aufweisen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Konstrukte, welche schon in 3.2.8 verwendet werden und vor den Reporter *SeapBasic* kloniert sind, mit dem Expressionsplasmid von *Six2* kotransfiziert. Als Kontrolle diente das Wildtyp-Konstrukt SPB320.

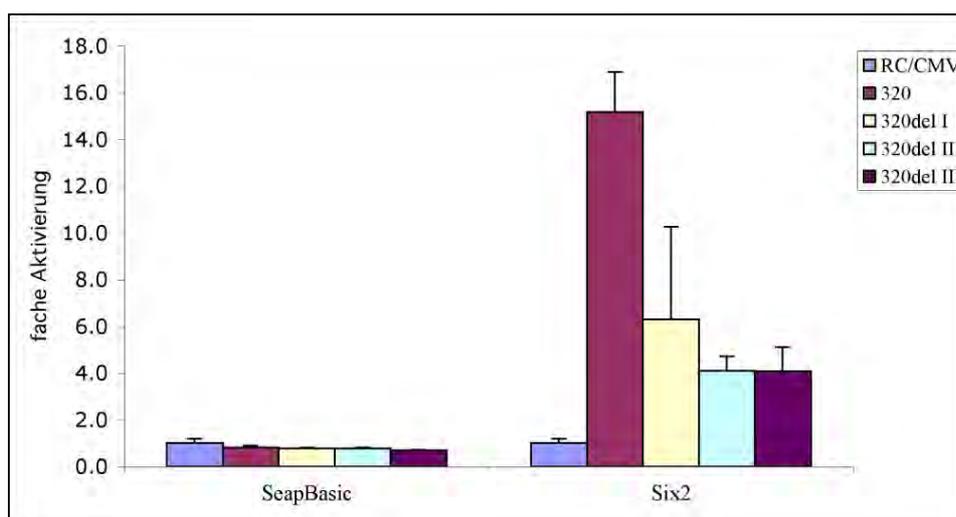


Abb.31: Deletion der Bindungsstellen SP1 und SP2 führen zu einer verminderten Transaktivierung
 $1 \cdot 10^5$ M15 Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Reporterplasmid (SP320, SP320delI, SP320delII und SP320delIII) und $1 \mu\text{g}$ Expressionsplasmid durch Superfekt transfiziert. Nach 24h wurden $50 \mu\text{l}$ Medium abgenommen und ein SEAP-Assay durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Reporterkonstrukte mit einem Vektor, der keine kodierende Sequenzen enthält, kotransfiziert. Die Basisaktivität wurde durch Transfektion des leeren Reporters mit RC/CMV und dem Expressionsvektor von *Six2* ermittelt und gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren 3 unabhängige Versuche.

Vergleicht man die Transaktivierung der Konstrukte 320del I, 320 del II und 320del III mit der des Wildtyp-Konstruktes, so lässt sich eine verminderte Aktivität aller Konstrukte feststellen. Diese Reduktion liegt für 320del I bei 57%, für 320del II bei 72% und für 320del III bei 69%.

Daraus kann man folgern, dass die Bindung von SIX2 an seinen Promotor an beide Bindungsstellen für eine Transaktivierung notwendig ist.

3.3 mSIX2 als Transkriptionsfaktor und Interaktionspartner

3.3.1 SIX2 ist ein Transkriptionsfaktor

Das klassische Modell eines Transkriptionsfaktors beinhaltet das Vorhandensein einer DNA-bindenden Domäne und einer Transaktivierungs-Domäne. Das murine SIX2-Protein besitzt als Homeobox-Protein eine DNA-Bindedomäne. Eine Transaktivierungs-Domäne wurde aber bisher für SIX2 nicht beschrieben. Die bekanntesten Transaktivierungs-Domänen sind saure Domänen (viele Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Reste), Glutamin-reiche Domänen, Prolin-reiche Domänen, Serin/Threonin-reiche Domänen und Alanin-reiche Domänen. Nur für SIX4 und SIX5 ist bisher eine Transaktivierungsdomäne beschrieben worden⁶². Das SIX2-Protein zeigte in den vorangegangenen Versuchen eine Transaktivierungsfähigkeit. Ob SIX2 eine transaktivierende Domäne besitzt und in welchem Abschnitt des Proteins diese lokalisiert ist, lässt sich mit Hilfe von Gal4DBD-Fusionsproteinen und deren Effekt auf ein Gal4-abhängiges Reportergen untersuchen. SIX2 und verschiedene Teilabschnitte des Proteins wurden hierfür an die DNA-Bindedomäne des Hefetranskriptionsfaktors Gal4 fusioniert und der Effekt der Fusionsproteine auf ein Reportergen analysiert, welches fünf Gal4-Bindestellen vor einem heterologen Thymidinkinase-Promotor (Position -109 bis +52) besitzt. Dieser Gal5-TK-Luziferasereporter besitzt bereits eine Basalaktivität, die durch Kotransfektion mit einem Vektor bestimmt wurde, der keine Gal4-Bindungsdomäne besitzt (Abb32). Besitzt SIX2 oder eines seiner Subfragmente eine Transaktivierungsfunktion, so wird die Expression des Reportergenes erhöht.

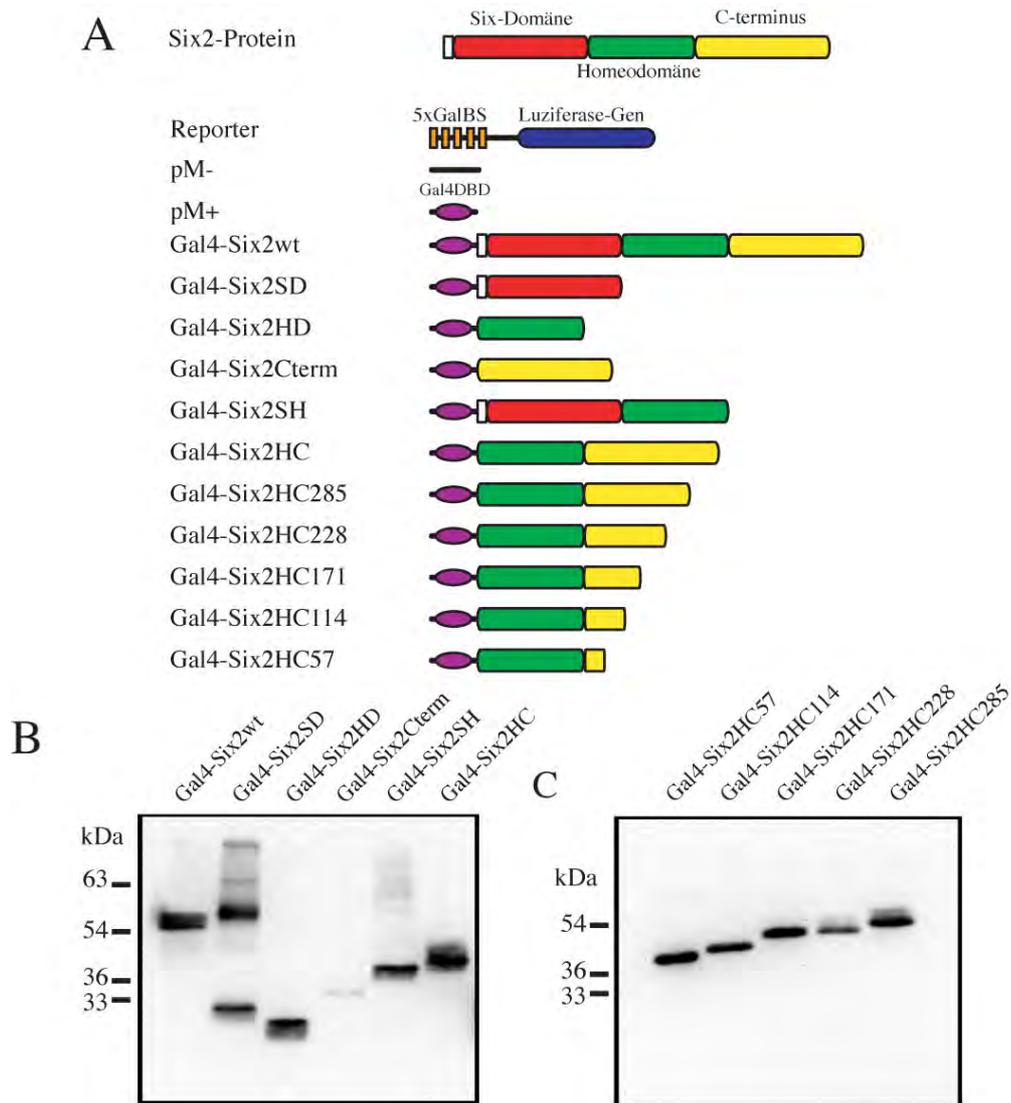


Abb.32: Klonierung von Gal4DBD-Konstrukten und Expressionsnachweis mittels Western-Blot

- (A) Schematische Darstellung der verwendeten und klonierten Konstrukte. Wt: Wildtyp Sequenz von *Six2*. SIX2 besteht aus einer Six-Familien spezifischen Domäne (Six-Domäne), einer Homeobox und einem C-Terminus. PM+: Der Gal4-Vektor besitzt eine Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4DBD). pM-: in diesem Vektor wurde die Gal4-DNA-Bindedomäne deletiert. Die Klonierung der kodierenden Sequenzen von *Six2* in den Vektor pM+ erfolgte durch Amplifikation der Sequenzen mittels PCR und anschließender Ligation der Fragmente in die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/XbaI*. Die Gal4-Six2 Konstrukte und ihr kloniertes *Six2*-Fragment: Gal4-Six2_{wt} Volllängensequenz; Gal4-Six2_{SD} nur der N-Terminus und die Sixdomäne (SD); Gal4-Six2_{HD} Homeodomäne (HD); Gal4-Six2_{C-term.} C-Terminus (Cterm); Gal4-Six2_{SH} N-Terminus, SD und HD; Gal4-Six2_{HC} HD und Cterm; Gal4-Six2_{HC285} HD und Cterm mit einer 57bp Deletion; Gal4-Six2_{HC228} HD und der Cterm mit einer 114bp Deletion; Gal4-Six2_{HC171} HD und Cterm mit einer 171bp Deletion; Gal4-Six2_{HC114} HD und der Cterm mit einer 228bp Deletion; Gal4-Six2_{HC57} HD und der Cterm mit einer 285bp Deletion; Der Reporter 5xTK besitzt fünf Bindungsstellen für die Gal4-DNA-Bindedomäne und ein *Luziferase*-Gen
- (B) Western-Blot der Konstrukte Gal4-Six2wt, SD, HD, C-term., SH, HC . 5µg der jeweiligen Konstrukte wurden in U2OS-Zellen transfiziert und nach 48h geerntet. Es wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Jeweils 50µg der Proteinextrakte wurden einer SDS-PAGE unterworfen und das jeweilige Fusionsprotein durch Western-Blotanalyse mit Hilfe eines Gal4DBD-Antikörpers detektiert.
- (C) Western-Blot der Konstrukte Gal4-Six2_{HC57}, _{HC114}, _{HC171}, _{HC228}, _{HC285}

Abb.32A zeigt die schematische Darstellung der generierten und verwendeten Konstrukte. Die Six-Domäne ist rot dargestellt, die Homeodomäne grün und der C-terminale Bereich gelb. Abb.29B zeigt zwei Western-Blots, die nachweisen, dass die generierten Fusionsproteine auch exprimiert werden. Die Banden entsprechen alle den errechneten Proteingrößen bis auf die Größe des Proteines-Gal4-Six2C-term. und Gal4-Six2HC. Diese Proteine sollten eine, laut Berechnung, Größe von ca. 29 kDa bzw. 35,5kDa haben und somit kleiner sein, als das ca. 30kD grosse Protein Gal4-Six2SD bzw. 36,4kDa des Proteines Gal4-Six2SH. Die Banden im Gel von Gal4-Six2Cterm/HC sind aber oberhalb der Banden von Gal4-Six2SD/SH lokalisiert. Dies kann durch z.B. post-translationelle Modifikation, wie z.B. Phosphorylierung des C-Terminus, oder durch ein geändertes Laufverhalten im Gel aufgrund der Aminosäurezusammensetzung, erklärt werden. Die Bande in GST-Six2SD welche zusätzlich zur erwarteten Bande auftritt, wurde in mehreren unabhängigen Western-Blots beobachtet. Obwohl die Sequenzierung des verwendeten Konstruktes keinerlei Fehler aufzeigte, wird zusätzlich zum gewünschten Fusionsprotein noch ein weiteres exprimiert. Warum das geschieht, oder aus was es zusammengesetzt ist, kann nicht erklärt werden.

Diese Konstrukte für die jeweiligen Fusionsproteine wurden mit dem Gal5-TK-Luziferasereporter in Cos-7 Zellen transfiziert und nach 24h die Luziferaseaktivität gemessen. Abb.33A und B zeigen die Ergebnisse des nach 24h durchgeführten Luziferase-Assays. Zur Bestimmung der Basisaktivität wurde der Reporter mit einem Vektor transfiziert, der keine Gal4-Bindedomäne besitzt.

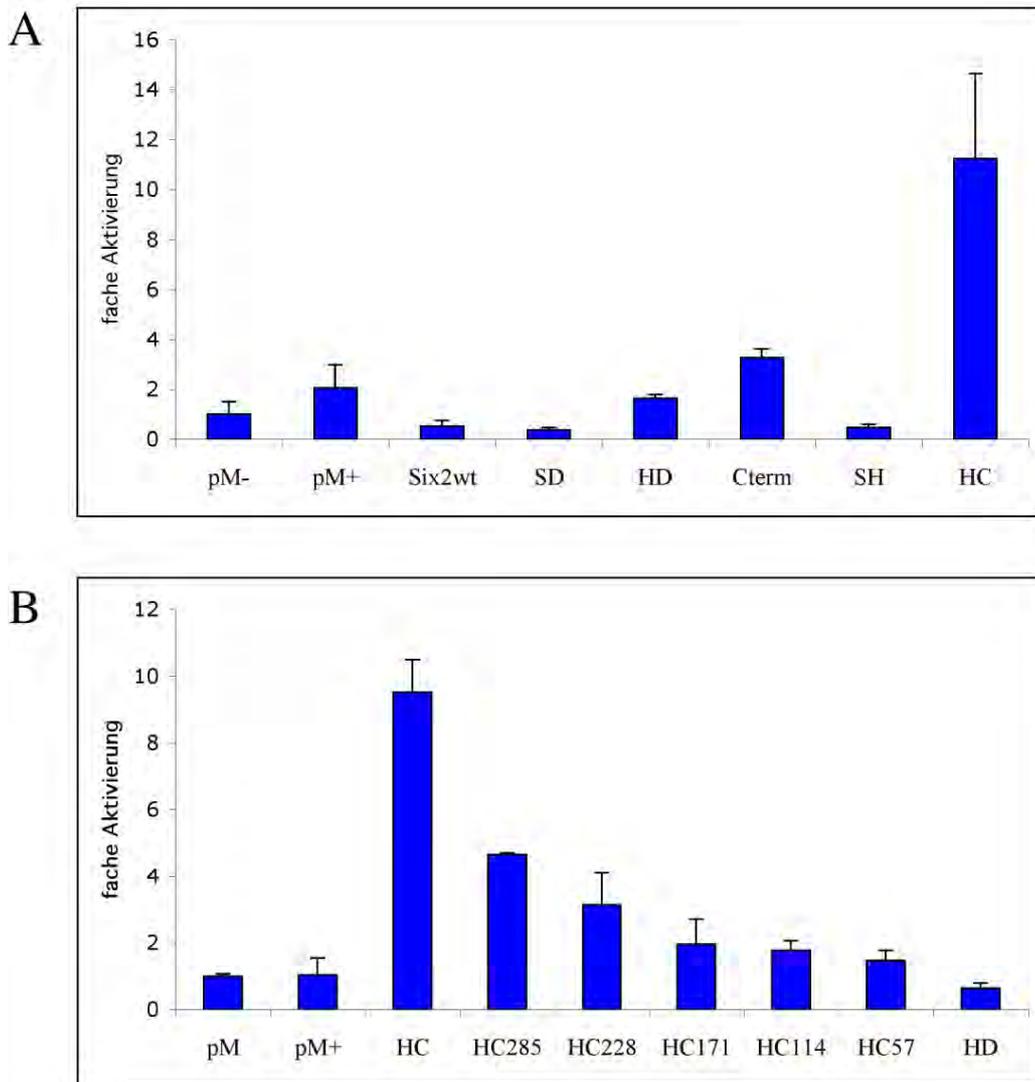


Abb.33: Für die Transaktivierungsfähigkeit des SIX2-Proteins ist der C-Terminus notwendig

$1 \cdot 10^5$ cos7-Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Reporterplasmid (5xTK) und $1 \mu\text{g}$ des jeweiligen Expressionskonstruktes transfiziert. Die Transfektion erfolgte durch Superfekt. Nach 48h Expression wurden die Zellen geerntet und mit dem Proteinextrakt die Luziferaseaktivität bestimmt. Die Aktivität des Konstruktes pM- wurde als Basisaktivität 1 festgelegt. Die Balkendiagramme sind Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

(A) Transaktivierung durch die Konstrukte Gal4-Six2_{wt, SD, HD, C-term., SH, HC}

(B) Transaktivierung durch die Konstrukte Gal4-Six2_{HC57, HC114, HC171, HC228, HC285}

Alle Fusionsproteine, welche die Six-Domäne tragen, reprimieren den Luziferasereporter um ca. 50%, unabhängig vom restlichen Proteinanteil (Abb.33A). Die Luziferaseaktivität bei der Kotransfektion mit dem Konstrukt Gal4-Six2HD entspricht in etwa der Basalaktivität des Reporters. Beinhaltet das Fusionsprotein den C-terminalen Anteil des Six2-Proteins, so ist bei beiden Fusionsproteinen, Gal4-Six2Cterm und Gal4-Six2HC, eine Aktivierung des Reportergenes zu beobachten. Diese beträgt ca. das 2-3fache bei Gal2Six2Cterm und das ca. 11-fache bei Gal4-Six2HC.

Der C-Terminus von SIX2 besitzt somit eine Transaktivierungsfunktion.

Um den Bereich im C-Terminus, der eine Transaktivierungsfunktion besitzt, weiter einzugrenzen, wurden Konstrukte hergestellt, die Deletionen vom C-Terminus des SIX2-Proteins aufweisen. Es wurden immer 57 Basenpaare des C-Terminus deletiert, was 19 Aminosäuren im Protein entspricht (Gal4-Six2HC285-HC57).

Werden die ersten 19 Aminosäuren vom C-Terminus deletiert, so zeigt das verbliebene Protein nur noch 48% der Aktivität des Kontrollproteines Gal4-Six2HC (Abb.33B). Werden weitere 19 Aminosäuren entfernt sinkt die Aktivität auf 32% ab. Die weiteren Deletionskonstrukte zeigen nur noch ca 17% Aktivität im Vergleich zum Kontrollprotein. Das bedeutet, dass die letzten 56 Aminosäuren im SIX2-Protein für fast 80% der Aktivierung verantwortlich sind. Diese 56 Aminosäuren lauten:

N' - PPPGLPSLHSLGHPPGPSA
 VPVPVPGGGGADPLQHHHS
 LQDSILNPMSANLVDLGS* -C'

Diese Sequenz enthält Abschnitte, die Prolin/Serin-reich sind und als klassische Transaktivierungsdomäne in Betracht gezogen werden können.

3.3.2 SIX2 zeigt durch Interaktion mit anderen Proteinen eine veränderte Transaktivierung

Eine Interaktion von SIX2 mit anderen Proteinen, wurde bisher nur für die Proteine der Eya-Familie beschrieben². SIX2 kann zusammen mit diesen Familienmitgliedern aktivierend auf den *Myogenin*-Promotor wirken. Auch wurde gezeigt, dass EYA1 direkt für die nukleare Translokation von SIX2 aus dem Cytoplasma in den Kern verantwortlich ist.

Da eine zusätzliche Interaktion der Proteine der Six-Familie, der Eya-Familie und Pax-Familie vermutet wird, soll in den folgenden Versuchen geklärt werden, ob die Proteine dieser Familien mit anderen Proteinen zusammen aktivierend auf den *Six2*-Promotor wirken können.

Dafür wurden U2OS Zellen mit dem Reporter SPB und zusätzlich mit den jeweiligen Expressionsplasmiden von *Six2*, *Six3* und *Six6*, sowie *Pax2* und *Pax3* transfiziert. Nach 24h wurde Medium abgenommen und die SEAP-Aktivität bestimmt. Zur Kontrolle der Basisaktivität der Reporter wurden diese mit RC/CMV kotransfiziert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abb.34 als Balkendiagramm dargestellt.

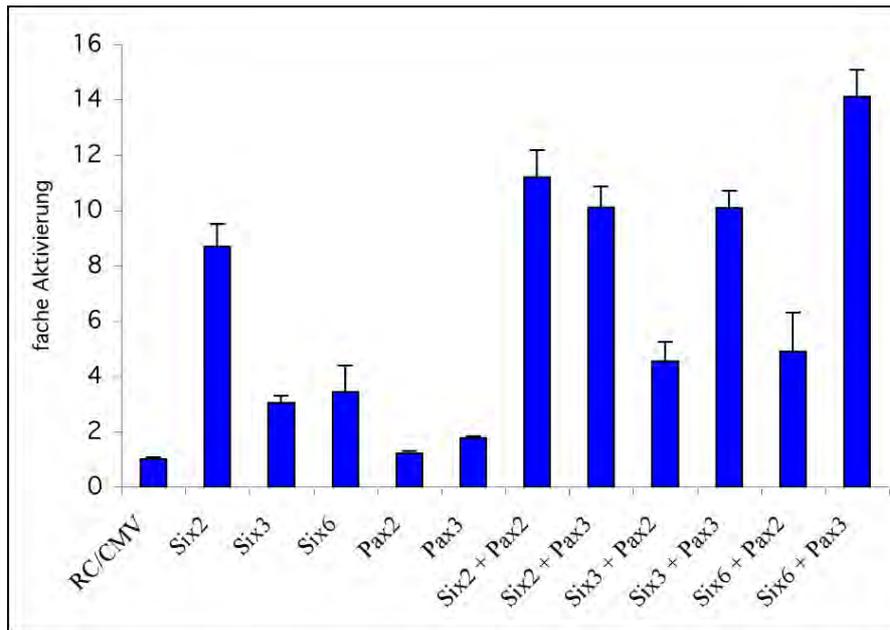


Abb.34: Six-Familien Mitglieder können zusammen mit Pax-Familienmitglieder die Transaktivierungsaktivität erhöhen

$1 \cdot 10^5$ cos7-Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Reporterplasmid (SeapBasic als Kontrolle, oder SPB) und $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden Expressionsplasmid mit Superfekt transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und ein Luziferase Assay durchgeführt. Zur Bestimmung der Basisaktivität wurden die Reporterplasmide mit leerem Vektor (RC/CMV) kotransfiziert. Die relative Aktivierung ergibt sich dadurch, dass die Ergebnisse der Transfektionen von SPB durch die Ergebnisse der Transfektion von SeapBasic dividiert wurden. Die Balkendiagramme repräsentieren drei unabhängige Experimente.

SIX2 alleine zeigt eine Aktivierung um das 8,5fache. SIX3 und SIX6 weisen eine Steigerung der Transaktivierung um das ca. 3fache auf. PAX2 und PAX3 zeigen keinen signifikanten Effekt. Die Kotransfektion von *Six2* mit *Pax2* oder 3 erhöhen die Aktivierung des verwendeten 920 bp *Six2*-Promotor-Fragmentes um ca. 20%, verglichen mit der Aktivität von SIX2 alleine. SIX3/PAX2 zeigen keinen signifikanten Unterschied verglichen mit dem Ergebnis von SIX3 alleine. *Six3* und *Pax3* kotransfiziert führen zu einer 233%igen Erhöhung der Aktivität, verglichen mit *Six3* alleine transfiziert. Bei der Kotransfektion von *Six6* mit *Pax2* kommt es zu einer 42%-igen Zunahme der gemessenen Werte verglichen mit *Six6* allein transfiziert. SIX6 und PAX3 zeigen ein Ergebnis, das einem 314%-igem Anstieg der Transaktivierung entspricht. Die untersuchten Six-Familienmitglieder können also zusammen mit verwendeten Pax-Familienmitgliedern die Transaktivierung steigern, wobei dieses am deutlichsten bei der Kotransfektion von *Six3/Pax3* und *Six6/Pax6* zu beobachten ist.

Ergebnisse

	RC/CMV	Six2	Six3	Six6	Pax2	Pax3
RC/CMV	1	8.7	3	3.4	1.2	1.7
Six2	8.7	-	-	-	11.2	10.1
Six3	3	-	-	-	4.5	10.1
Six6	3.4	-	-	-	4.9	14.1
Pax2	1.2	11.2	4.5	4.9	-	-
Pax3	1.7	10.1	10.1	14.1	-	-

Die Tabelle zeigt noch einmal die relativen Transaktivierungen in Bezug zur Basisaktivität des mit RC/CMV kotransfizierten Reporterkonstruktes.

Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, ob SIX2 zusammen mit Proteinen, die speziell im metanephrischen Mesenchym exprimiert werden, eine Steigerung der Transaktivierung des Reporterplasmides SPB verursachen können. Dafür wurden der Reporter SPB mit den jeweiligen Expressionsplasmiden kotransfiziert.

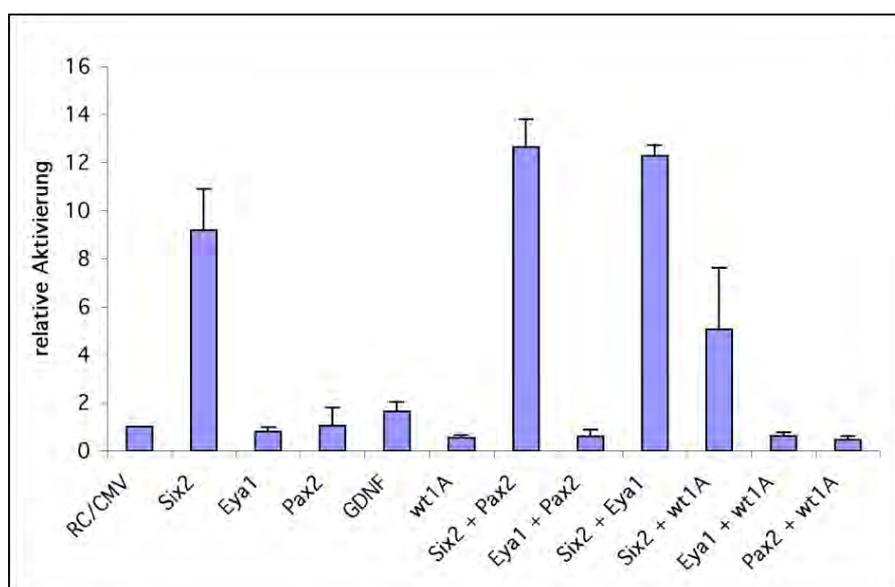


Abb35: Kotransfektion von *Six2* mit anderen nieren-spezifischen Genen

$1 \cdot 10^5$ cos7-Zellen wurden mit jeweils $1 \mu\text{g}$ Reporterplasmid (SeapBasic als Kontrolle, oder SPB (920 bp Fragment des *Six2*-Promotors vor einem SEAP-Reporter)) und $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden Expressionsplasmid mit Superfekt transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und die Luziferase-Aktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Basisaktivität wurden die Reporterplasmide mit leerem Vektor (RC/CMV) kotransfiziert. Die relative Aktivierung ergibt sich dadurch, dass die Ergebnisse der Transfektionen von SPB durch die Ergebnisse der Transfektion von SeapBasic dividiert wurden. Die Balkendiagramme repräsentieren drei unabhängige Experimente.

SIX2 zeigt alleine transfiziert den schon beobachteten Effekt auf die Transaktivierung von SPB. Keine der anderen Kotransfektionen, in denen die Expressionsvektoren von *Eya1*, *Pax2*, *GDNF* alleine mit SPB transfiziert wurden zeigen eine Veränderung in Bezug zur Basisaktivität des Reporters.

Ergebnisse

	RC/CMV	Six2	Eya1	Pax2	GDNF	Wt1A
RC/CMV	1	9.1	0.8	1	1.6	0.5
Six2	9.1	-	12.2	12.6	-	5
Eya1	0.8	12.2	-	0.6	-	0.6
Pax2	1	12.6	0.6	-	-	0.4
GDNF	-	-	-	-	-	-
Wt1(+KTS)	0.5	5	0.6	0.4	-	-

Die Tabelle zeigt nochmals die relativen Transaktivierungen in Bezug zur Basisaktivität, des mit RC/CMV kotransfizierten Reporterkonstruktes.

Nur WT1(+KTS) führt zu einer Repression von 50%. SIX2 zusammen mit PAX2 erhöht die Aktivierung im gleichen Maße wie in Abb.22. *Eya1* und *Pax2* haben kotransfiziert keinen Effekt auf SPB, genauso wie *Eya1/Wt1A* und *Pax2/Wt1A*. *Six2* zusammen mit *Eya1* transfiziert, erhöht die Transaktivierung verglichen mit der von *Six2* alleine um etwa 30%. *Six2/Wt1A* transfiziert, führt zu einer Aktivierung, die nur noch 50% der Aktivierung entspricht, wie sie *Six2* alleine transfiziert aufweist.

4. Diskussion

Die Nierenentwicklung in Säugern stellt ein klassisches Modell der Organogenese dar. Wie in den meisten Organen beruht die Entstehung der Niere auf Interaktion zweier Gewebe, welche hochgradig reguliert ist. Diese beiden wichtigen Gewebearten sind in der renalen Genese mesodermalen Ursprungs, das metanephrische Mesenchym und der epitheliale Wolffsche Gang. In den letzten Jahren wurde durch knock-out Studien und transgene Techniken versucht, Faktoren zu identifizieren, die unmittelbar an der Morphogenese und Interaktion dieser beiden Zellarten beteiligt sind. Bei der Nierenentwicklung wurde gezeigt, daß dieser Faktor der glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) ist³. GDNF wird sekretiert und diffundiert an den Wolffschen Gang. Die Tatsache, dass ein Signal gesendet wird, ist alleine nicht ausreichend für das angrenzende Gewebe darauf zu reagieren. Es muss auch dazu in der Lage sein, dieses Signal zu empfangen, also eine Kompetenz dafür besitzen. Diese Kompetenz wird dem Wolffschen Gang durch die Expression des Rezeptors *Ret* und des Co-Rezeptors *GFR α 1* vermittelt. Knock-out Studien dieser Gene^{6,44,45} zeigten, daß ohne das Signal (GDNF) vom metanephrischen Mesenchym oder die Expression der Rezeptoren (*Ret*, *GFR α 1*) im Wolffschen Gang, dieser erste wichtige Schritt der Knospenausbildung nicht stattfindet und eine weitere Nierenentwicklung nicht zustande kommt.

4.1 GDNF

Wenn das Signal GDNF so wichtig ist für die Nierenentwicklung, wie wird die Expression dieses Gens dann reguliert? *GDNF* Expression findet man ab Tag 9,5 p.c. in der sich entwickelnden Niere in der Maus. Es müssen also Proteine für die Regulation von *GDNF* verantwortlich sein, die zumindest zum gleichen Zeitraum im gleichen Gewebe translatiert werden. Einen ersten Hinweis auf die beteiligten Faktoren lieferte die Knock-out Studie von *Eya1*. In *Eya1*^{-/-} Embryonen, in denen keine Nierenentwicklung stattfindet, kann man keine Expression von *GDNF* und von *Six2* nachweisen. Dieser Umstand legt nahe, daß in der Nierenentwicklung ein ähnlicher regulatorischer Pax-Eya-Six-Pfad aktiv ist, wie man ihn in der Augenentwicklung von *D. melanogaster* und der Somitenentwicklung von Mammaliern findet.

Diese Annahme wird durch *Pax2*^{-/-}-Embryonen unterstützt, auch in ihnen findet keine Nierenentwicklung statt. Alle drei genannten Gene, *Pax2*, *Six2* und *Eya1* werden wie *GDNF* in der sich entwickelnden Niere im metanephrischen Mesenchym exprimiert.

Neben den Proteinen der Gene *Pax2*, *Six2* und *Eya1* kommt noch ein weiteres Protein für eine direkte oder indirekte Regulation der *GDNF*-Expression in Betracht, WT1. Zwar wurde in *Wt1* knock-out Embryonen eine *GDNF*-Expression nachgewiesen, aber die Entwicklung der Niere scheint zu genau dem gleichen Zeitpunkt abgebrochen zu werden, wie im *GDNF*-knock-out.

Um nun festzustellen, ob eines der Genprodukte von *Pax2*, *Six2* oder *Eya1* direkt an der Expression von *GDNF* beteiligt ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Promotoranalysen am *GDNF*-Promotor durchgeführt.

4.1.1 *In vivo* Expression des *GDNF*-Promotor-Fragmentes

Für eine spezifische Regulation der Expression eines Genes, muß dessen Promotor Sequenzen enthalten, an die Faktoren binden können, welche für ein spezifisches Expressionsmuster verantwortlich sind. Um zu bestimmen, ob daß von uns verwendete 10,5 kb Fragment des murinen *GDNF*-Promotors die entsprechenden Sequenzen enthält, wurde das 10,5 kb Fragment und zwei Subfragmente (3,6 kb und 0,9 kb) mit einem Reporter gen fusioniert und jeweils in Eizellen von Mäusen injiziert. Diese Konstrukte integrieren sich nun in das Genom der Eizelle. Enthalten die verwendeten Fragmente des murinen *GDNF*-Promotors Sequenzen, die für eine spezifische Regulation der Expression notwendig sind, muß es während der Entwicklung des Mäuseembryos zur Expression des Reporter genes in den Geweben und Organen kommen, in denen der endogene Promotor von *GDNF* aktiv ist.

Betrachtet man das Expressionsmuster der Transgene in den Mäuseembryos, so kommt es zu mehreren Übereinstimmungen der erhaltenen Ergebnissen mit den publizierten Daten aus den *in situ* Hybridisierungen in Wildtyp-Embryonen. So findet sich eine Expression der Transgene in Teilen des Gehirns und im Neuralrohr. *GDNF* ist ein wichtiger Überlebensfaktor für diese Zellen und Gewebe^{5,6}. Eine Blaufärbung findet sich bei allen Embryonen in der sich entwickelnden Nasengrube und dem Schnurrhaarfeld. *GDNF* ist hier an der Entwicklung der trigeminalen Ganglienneuronen beteiligt; auch für diese Neuronen spielt es eine Rolle als Überlebensfaktor³⁵. Eine weitere Übereinstimmung ergibt sich in der Expression in der apikalen Randleiste und später in weiteren Strukturen der Beinknospe. Für *GDNF* wurde gezeigt, dass es eine wichtige Rolle bei der Erhaltung von Motoneuronen spielt, welche Skelettmuskeln innervieren⁴⁶. Es kann auch bei der Formation von Knorpel beteiligt sein, dem Vorläufer von Knochen. Dies verbindet *GDNF* mit anderen TGF- β Proteinen, z.B. "bone morphogenetic proteins" (BMP)^{47,48}, die an der

Ausbildung von Knochen beteiligt sind. Zudem findet sich in Wildtyp-Embryonen Expression von *GDNF* in mesenchymalen Zellen, welche die Knorpelanlagen der Extremitäten umgeben³⁷. Auch im Auge ist eine Expression der Transgene zu beobachten. In *in situ* Hybridisierungen läßt sich *GDNF* mRNA in der Retina nachweisen⁶⁴.

Eine Expression im metanephrischen Mesenchym, bzw. die Ureterknospen umgebenden Gewebe und in späteren Stadien auch im Ureter, wurde mit den Konstrukten 10,5 kb *GDNF* und 3,6 kb *GDNF* beobachtet. Diese Fragmente enthalten somit Sequenzen, die für eine Expression in der Niere notwendig sind. In diesen beiden Fragmenten finden sich auch die beiden gefundenen SIX2-Bindungsstellen.

Ein weiterer Unterschied im Expressionsmuster der Transgene findet sich in den Branchialbögen. Nur das 0,9 kb Fragment zeigt hier eine sehr starke Blaufärbung. Dies weist auf negativ regulatorische Sequenzen hin, die auf den fehlenden 2,4 kb im Vergleich zum 3,6 kb Fragment liegen müssen.

Unterschiede im Expressionsmuster in gleichen Geweben, wie z.B. den Beinknospen, wurden bei allen drei Transgenen gefunden. Diese Unterschiede lassen sich damit erklären, dass die drei in ihrer Größe differierenden Promotor-Fragmente nicht alle Bindungsstellen für regulatorische Faktoren besitzen, die für eine korrekte Expression während der Entwicklung in den Geweben notwendig sind.

Eine Expression im Magen, Pharynx, Ösophagus und Darm wie sie in der Literatur für *GDNF* beschrieben wurde⁶⁴, ist nicht beobachtet worden.

4.1.2 SIX2 kann den *GDNF*-Promotor aktivieren

Bei den Versuchen der transienten Transfektionen wurde ein möglicher direkter Effekt von SIX2, PAX2, EYA1 und zwei Spleißformen von WT1 auf *GDNF* analysiert. Bisher wurde nur für PAX2 eine direkte Aktivierung des *GDNF*-Promotors nachgewiesen²². Der dafür notwendige Sequenzabschnitt liegt vor dem Exon 1 und ist nicht auf dem hier verwendeten Konstrukt enthalten. Für SIX2 alleine wurde bisher keine Funktion bei der Aktivierung eines Genes gezeigt. Nur zusammen mit Mitgliedern der Eya-Familie kann es den *Myogenin*-Promoter aktivieren¹⁷. Für WT1 wurden mehrere Zielgene beschrieben, zu ihnen gehören *Syndecan*, *p21*, *Dax1*, *Pax* und *Sfl*^{49, 50}.

Die Versuche der transienten Transfektionen zeigen, dass nur SIX2 einen direkten Einfluss auf die Expression des verwendeten *GDNF*-Promotors hat. Dabei zeigt sich auch eine Spezifität durch die ansteigende Transaktivierung bei zunehmender Menge SIX2.

EYA1 zeigt keinen Effekt. Bis jetzt konnte auch keine direkte DNA-Bindung für EYA1 nachgewiesen werden, sondern nur eine Funktion als Kofaktor. Das Ergebnis läßt keine Aussage darüber zu, ob EYA1 außerhalb des verwendeten Fragmentes eine Wirkung auf den *GDNF*-Promotor haben kann, der das Fehlen der *GDNF* Expression in *Eya1*^{-/-}-Embryonen erklären würde.

SIX2 kann an den *GDNF*-Promotor binden. Diese Bindungsstelle ist vor der TATA-Box und dem Translationsstartpunkt lokalisiert (Abb.10B). Die Bindungsstellen sind dabei nur auf den für die *in vivo* Analysen verwendeten Fragmenten 10,5 kb und 3,6 kb *GDNF* vorhanden. Das Fragment 0,9 kb *GDNF* enthält diese Bindungsstellen nicht. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass nur Tiere, die für das Konstrukt 10,5 kb und 3,6 kb transgen sind, eine Expression des Reporters in der Niere aufweisen.

4.1.3 SIX2 transaktiviert den *GDNF*-Promotor über eine palindrome Sequenz

Bisher wurde nur eine Basenpaarsequenz veröffentlicht, an die SIX2 binden kann. An diese können auch SIX1, SIX4 und SIX5 binden. Es handelt sich hierbei um die MEF3 (myogenic enhancing factor 3) Konsensussequenz 5'-TCAGGTT-3'⁵¹. Gelretardations- und Footprint-Analysen zeigen, dass es zwei Bindungsstellen im P12-Fragment des *GDNF*-Promotors gibt (Abb.12). Diese beiden Bindungsstellen (GDNFI und GDNFII) weisen keinerlei Übereinstimmung mit der beschriebenen MEF3-Bindungsstelle auf. Vergleicht man die beiden Bindungsstellen GDNFI und GDNFII miteinander, so zeigen diese eine Übereinstimmung von neun zusammenhängenden Basen. Diese Sequenzabschnitte lauten in GDNFI 5'-TGTATTACA und in GDNFII 5'-TGTAATACA (im Antisense-Strang 5'-TGTATTACA) und bilden damit eine palindrome Sequenz. Zudem kommt in beiden Sequenzen das TAAT bzw. ATTA-core-Motiv vor. Dieses Motiv stellt eine klassische Konsensus-Sequenz dar, an die Homeodomänen-Proteine binden. Dies war für eine Bindungsstelle von SIX2 nicht unbedingt zu erwarten. Die Homeodomäne von SIX-Proteinen unterscheidet sich von Homeodomänen anderer Proteine in ihrer Aminosäuresequenz⁶². Allen SIX-Familienproteinen ist gemein, dass ihnen zwei Aminosäuren fehlen, die für die Erkennung von TAAT-core-Motiven notwendig sind. Diese Aminosäuren sind ein Arginin an Position 5 und ein Glutamin an Position 12 in der ersten Helix. Aus diesem Grund wird vermutet, dass SIX-Proteine auch in der Lage sind von diesem TAAT-Motiv abweichende Sequenzen zu binden. Für SIX3 wurde aber kürzlich eine Bindestelle charakterisiert, die ein TAAT-core-Motiv enthält⁵².

Die Spezifität der Bindung von SIX2 an das *GDNF*-Promotor-Fragment wurde durch Mutationsanalysen bestätigt. Punktmutationen in der Bindungsstelle GDNFI und GDNFII,

führen zu einer starken Reduktion der Bindung von SIX2. Dieses Ergebnis wird auch noch einmal durch die Mutationsanalysen im Kontext des P12-Fragmentes bestätigt, welches beide Bindungsstellen trägt (Abb15). Auffallend dabei ist, dass vier von den fünf mutierten Basen, welche zu einer Reduktion in der Bindung von SIX2 führen, in den ATTA-, bzw. TAAT-Motiven der Bindungsstellen lokalisiert sind. SIX2 scheint somit genau wie SIX3 dazu in der Lage zu sein, diese Motive zu erkennen und zu binden.

Liegen die Mutationen nur in der ersten Bindungsstelle GDNFI, so reduziert sich die Bindung von SIX2 an das P12mutI Fragment um fast 90%. Die verbliebene Bindung kann entweder durch eine Restbindung von SIX2 an GDNFI und eine normale Bindung an GDNFII erklärt werden, oder die Bande entsteht durch alleinige Interaktion mit GDNFII. Die Bindung von SIX2 an P12mutII reduziert sich nur schwach. Die beobachtete starke Bindung entsteht entweder dadurch, dass die veränderten Basen in GDNFII nicht an der Bindung beteiligt sind, oder die beobachtete Bande resultiert alleine aus der Interaktion von SIX2 mit GDNFI. Werden beide Bindungsstellen in P12mutIII mutiert, so ist keine Bindung mehr zu beobachten. Das legt nahe, dass beide mutierte Bindungsstellen einen Effekt auf die Bindung durch SIX2 haben und die beobachteten Banden in P12mutI und P12mutII auf die Bindung von SIX2 an die jeweils unveränderte Bindungsstelle zurückzuführen sind. Die Bindung von SIX2 an den *GDNF*-Promotor scheint somit hauptsächlich durch die erste Bindungsstelle, GDNFI, vermittelt zu werden.

Die funktionelle Bedeutung der SIX2-Bindungsstellen im *GDNF*-Promotor wurden durch Reporteranalysen bestätigt. Sind eine oder beide Bindungsstellen im Promotor mutiert, so resultiert dies in einer verminderten Transaktivierung. Dieses Resultat zeigt deutlich, dass für die Bindung von SIX2 an den *GDNF*-Promotor nur eine Bindungsstelle erforderlich ist, wohingegen für eine Aktivierung beide Bindungsstellen notwendig sind.

4.2 Der *Six2*-Promotor

SIX2 ist bei der Expression von *GDNF* zumindest beteiligt. Daß es alleine für dessen Regulierung notwendig ist, ist unwahrscheinlich, da ja bereits gezeigt wurde, daß PAX2 ebenfalls zur Aktivierung von *GDNF* beitragen kann. Sollte es ein regulatorischen Pax2-Eya1-Six2-*GDNF* Pfad während der Nierenentwicklung geben, wie wird dann die Expression von *Six2* reguliert? In *Drosophila melanogaster* wurde von Gehring *et al.* (1999) gezeigt, daß *eyeless* an der Expression von *sine oculis* direkt beteiligt ist¹³. Wie auch beim *GDNF*-Promotor liefert die knock-out Studie von *Eya1* einen möglichen Kandidaten zur Regulierung von *Six2*, da in *Eya*^{-/-} Embryonen keine *Six2* Expression nachgewiesen werden kann. *Six2* wird also wahrscheinlich

vor *GDNF* exprimiert und nach *Eya1*. Da *Pax2* mRNA im *Eya*^{-/-} knock out nachweisbar ist, kann PAX2 in Säugern nicht alleine für eine *Six2* Expression verantwortlich sein. Um einen Einblick über die Regulation des murinen *Six2* zu erhalten wurde eine Promotor-Analyse am murinen *Six2*-Promotor durchgeführt.

4.2.1 *In vivo* Analyse der 920bp des *Six2*-Promotors

Da die Sequenz des murinen *Six2*-Promotors bisher nicht bekannt war, wurde mit Hilfe einer murinen cDNA-Bibliothek ein DNA-Fragment isoliert, welches 5' vom Startcodon lokalisiert ist. Der Vergleich der Sequenz des gefundenen 920 bp langen murinen Fragmentes mit der menschlichen *Six2*-Promotor Sequenz⁵⁴ ergab eine Übereinstimmung von ca. 80%. Das 3'-Ende des murinen Fragmentes liegt im Vergleich mit dem menschlichen Promotor an Position -256 vor dem Initiations-ATG. Wie der menschlich Promotor enthält auch das murine Fragment keine TATA-Box, jedoch CpG-Inseln im 3'-Bereich. Ein Transkriptionsstartpunkt (TSP) konnte für das murine Fragment trotz zahlreicher "primer-extension" Analysen nicht lokalisiert werden. Die TSP für den menschlichen Promotor wurden durch die Analyse eines Computerprogramms bestimmt.

Wie beim *GDNF*-Promotor sollte das Fragment auf eine *in vivo* Aktivität untersucht werden. Dafür wurde es vor ein *LacZ*-Gen kloniert und in Eizellen von Mäusen injiziert. Aus den erhalten transgenen Mäusen wurden 2 stabile Linien etabliert. Die Verwendung von stabil transgenen Mauslinien hat zwei wichtige Vorteile gegenüber den transient transgenen Mäusen, wie sie bei den *GDNF*-Promotor *in vivo* Analysen benutzt wurden: die Anzahl der zur Verfügung stehenden Embryonen ist viel größer, da sie durch einfache Verpaarung der transgenen Eltern mit Wildtyp-Mäusen gewonnen werden können und unerwünschte Nebeneffekte können besser ausgeschlossen werden (z.B. Variationen der Färbemuster). Linie 1 zeigte starke Positionseffekte nach der Färbung. So konnten die Expressionsorte durch eine starke Hintergrundfärbung, die in fast allen Geweben des gesamten Embryos auftrat, nicht sicher lokalisiert werden (Daten nicht gezeigt). Linie 2 wies keine unspezifischen Färbungen auf und die Expressionsorte konnten klar nachgewiesen werden. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob auch eine Expression in den inneren Organen stattfindet wurden zusätzlich noch Schnitte der für das *Six2*-Promotor-Fragment transgenen Embryonen angefertigt. Die Expression wurde in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung untersucht, um eine mögliche Veränderung in der Expression nachzuweisen.

Veröffentlichte Daten zeigen, dass *Six2* mRNA in Wildtyp-Embryonen ab Tag 8,5 p.c. nachweisbar ist¹⁹. Zu diesem Zeitpunkt findet man *Six2* Expression nur in einer begrenzten mesodermalen Zellpopulation im Hinterhirn. Diese Expression weitet sich am Tag 9.5 p.c. im Kopf aus, bleibt aber auf einzelne Bereiche beschränkt, die wahrscheinlich Neuralleistenderivate darstellen. Weiterhin findet man Expression auch im Ansatz des Rückenmarkes und in den Branchialbögen, dem pharyngialen/ösophagialen Mesenchym und im Bauchraum. Im Stadium E10.5 erscheint zusätzlich eine Expression in der Urogenitalleiste. Diese Expression verstärkt sich einen Tag später und ist jetzt im metanephrischen Mesenchym und der Genitalleiste zu erkennen. In diesem Stadium beginnt auch die Expression in den thorakalen Somiten und in der Vorderbeinanlage. Am Tag 12.5 p.c. reduziert sich die Expression in der ösophagialen Region auf die angrenzende glatte Muskulatur und Bindegewebe. Die Expression im Bauchraum lokalisiert sich jetzt im sich entwickelnden Magen und Duodenum. Die Expression im metanephrischen Mesenchym reduziert sich auf das Mesenchym, das die Ureterknospe umgibt. In späteren Stadien reduziert sich die Expression von *Six2* im Ösophagus, dem Magen und der Niere, bis sie am Tag 16 p.c. nicht mehr nachweisbar ist.

Vergleicht man nun diese Expressionsdaten mit der Expression in der vorliegenden transgenen Linie, so ergeben sich schon am Tag 10.5 p.c. grosse Übereinstimmungen. Eine Blaufärbung findet sich in den Embryonen in den Branchialbögen, Teilen des Kopfes, im Rückenmark, den thorakalen Somiten und in der Urogenitalleiste (Abb.20). Die Expression in den Branchialbögen scheint sich zu Beginn auf die Nerven zu beschränken, die von den Rhombomeren ausgehend, die Branchialbögen innervieren. Auch in der ösophagialen Region ist eine Expression des Fusionskonstruktes aus dem *Six2*-Promotor und dem LacZ-Gen zu erkennen. In den Schnitten ist klar zu erkennen, dass sich die Färbung in der Urogenitalleiste klar auf den mesenchymalen Anteil der sich entwickelnden Niere beschränkt (Abb.20d und f). Das Expressionsmuster am Tag 11.5 p.c. unterscheidet sich in der Ausdehnung der einzelnen Expressionsorte und zusätzlich ist eine beginnende Expression in den Beinanlagen zu erkennen. Die Expression in den Somiten und den mesenchymalen Anteilen des Ösophagus, welche später sich zur glatten Muskulatur entwickeln, und im späteren Kieferbereich, bestärkt die Vermutung, dass SIX2 auch bei der Muskelentwicklung eine Rolle spielt.

Die Expression im metanephrischen Mesenchym, beschränkt sich mit fortlaufender Entwicklung zusehends auf die Bereiche um die elongierende Ureterknospe (Abb.21f). Das *Six2*-Promotor-Fragment enthält also Sequenzen, die für eine Expression in der sich entwickelnden Niere wichtig sind.

Am Tag 12.5 p.c. in der embryonalen Entwicklung lässt sich die Expression des Transgens weiterhin im Kopfbereich, dem Rückenmark und dem Ösophagus beobachten. Die Expression in den vorderen Beinanlagen weitet sich aus. Ebenfalls ist eine Färbung in den sich entwickelnden Rippen zu beobachten.

Vergleicht man die Expressionsmuster von *Six2* und *GDNF* außerhalb der sich entwickelnden Niere, so kommt es auch hier zu Übereinstimmungen, wie z.B. in den Branchialbögen und Teilen des Gehirnes. Es ist also auch in diesen Geweben eine Regulation von *GDNF* durch SIX2 denkbar.

Die hohe Übereinstimmung mit dem endogenen *Six2*-Expressionsmuster deutet darauf hin, dass das verwendete *Six2*-Promotor-Fragment wichtige regulatorische Sequenzen enthält. Dass es zu Abweichungen in den einzelnen Expressionsorten kommt, liegt daran, dass nicht alle notwendigen Sequenzen auf dem 920 bp Fragment enthalten sind. Trotzdem stellt das 920 bp Fragment eine gute Grundlage dar, um weitere Promotoranalysen durchzuführen, um somit Aufschluss über mögliche Regulationen der Promotoraktivität zu erhalten.

4.2.2 Eine Autoregulation von *Six2*?

Für die direkte Regulation des *Six2*-Promotors kommen die gleichen Proteine in Betracht wie beim *GDNF*-Promotor, da SIX2 sich auch in dem vermuteten regulatorischen Netzwerk in der Nierenentwicklung befindet. Durch transiente Transfektionen sollte ein direkter Effekt der Proteine PAX2, EYA1, SIX2 und zwei Spleißformen von WT1 untersucht werden. Überraschenderweise hat nur SIX2 einen Effekt auf den *Six2*-Promotor (Abb.23), wobei die Aktivierung ca. das 60fache im Vergleich zur Basisaktivität beträgt. Dass PAX2 keinen Effekt hat, wie *eyeless* auf *sine oculis* in *Drosophila*, kann seine Ursache darin haben, dass das dafür notwendige regulatorische Element nicht auf dem verwendeten Fragment lokalisiert ist, oder dass PAX2 alleine nicht die Expression von *Six2* beeinflussen kann. Diese Tatsache wird von den knock-out Studien unterstützt: im *Pax2* knock-out wird *Six2* exprimiert, im *Eya1* und *Hox11* knock-out kann bei nachgewiesener *Pax2*-Expression keine *Six2*-Expression beobachtet werden^{9,10}. EYA1 allein hat wie beim *GDNF*-Promotor keinen Effekt auf die Transaktivierung des *Six2*-Promotor-Fragmentes, obwohl im *Eya1* knock-out keine *Six2*-Expression nachgewiesen werden kann. Dieses Ergebnis kann mit der zellularen Lokalisation von EYA1 erklärt werden. Kawakami *et al.* zeigte, dass wenn EYA1 alleine in Cos7 Zellen exprimiert wird, das Protein nur im Cytoplasma zu finden ist¹⁷. SIX2 findet sich hingegen bei so einem Versuch nur im Zellkern. Die verwendeten Zelllinien U2OS, M15 und Cos7 exprimieren kein SIX-Protein, welches für eine nukleare Translokation von EYA1 notwendig ist. Somit kann EYA1 keine aktivierende

Funktion ausüben. Hinzu kommt die Tatsache, daß im Hox11 knock-out Eya-Expression vorhanden ist, aber keine von Six2. Somit kann EYA1 nicht alleine für die Transaktivierung von Six2 verantwortlich sein. Die beiden knock-out Phänotypen von Eya1 und Hox11 legen ein Modell nahe, bei dem HOX11 und EYA-Proteine zusammen die Transaktivierung von Six2 induzieren¹⁰.

SIX2 unterliegt nach den hier erhobenen Daten zumindest einer Autoregulation. Dies wurde durch nochmalige Transfektion mit ansteigenden Konzentration von SIX2 bestätigt (Abb.20). Auch für ein anderes Mitglied der Six-Familie, für SIX352, wurde eine Autoregulation gefunden, wobei es sich aber um eine Repression handelt. SIX3 bindet an seinen eigenen Promotor. Die bevorzugte Bindungssequenz dabei ist ein TAAT-Motiv. Auf die Besonderheit dieses Motives für Homeodomänen-Proteine wurde schon eingegangen. SIX3 reprimiert dabei seinen eigenen Promotor nicht alleine, vielmehr ist es dabei auf einen Kofaktor angewiesen, GRG5. GRG5 gehört zur Familie der groucho-Proteine, die transkriptionelle Korepressoren stellt. Auch andere Six-Familienmitglieder interagieren mit groucho-Proteinen, SIX1 und SIX3. Für SIX2 und SIX4 wurde in Vertebraten keine Interaktion mit Mitgliedern der groucho-Familie nachgewiesen⁵². Wobei dieses Ergebnis nicht mit dem von Kobayashi et al. publizierten Daten übereinstimmt, der nachgewiesen hat, daß alle Mitglieder der Six-Familie im Zebrafisch mit GRG3 interagieren⁵³. SIX2 aktiviert aber in den vorliegenden Experimenten, was eine Interaktion mit GRG-Proteinen in diesem Fall unwahrscheinlich macht.

4.2.3 Bindungsstellen im Six2-Promotor

SIX2 bindet an seinen eigenen Promotor, genau wie das bei SIX3 der Fall ist (Abb.25). Durch eine Footprintanalyse wurde festgestellt, daß SIX2 zwei Bindungsstellen im Six2-Promotor besitzt. Vergleicht man diese mit den beiden Bindungsstellen im GDNF-Promotor, findet man eine hohe Übereinstimmung. In beiden Fällen bilden die Bindungsstellen eine palindrome Sequenz. Diese besteht im Six2-Promotor aus acht, im GDNF-Promotor aus neun Basenpaaren. Dabei entspricht die Sequenz SP1 5'-TCGGGTTA im Six2-Promotor der Sequenz SP2 5'-TAACCCGA (im Antisense-Strang 5'-TCGGGTTA). Diese Sequenz enthält im Gegensatz zu der aus dem GDNF-Promotor kein ATTA oder TAAT-Motiv. Eine Übereinstimmung ergibt sich auch in der Entfernung der beiden Bindungsstellen, sowohl im GDNF-, als auch im Six2-Promotor. Diese beträgt 54 bp bzw. 59 Basenpaare.

Interessant ist der Vergleich zwischen allen in dieser Arbeit gefundenen DNA-Bindungsmotive und den für die Six-Familie veröffentlichten:

GDNF:	5'- TGTATTACA
Six2:	5'- TCGGGTTA
Six3 ⁵² :	5'- NNNATTANN
Six2/Six4/Six5 ³⁰ :	5'- TCGAGCCGGTGTTCAGGTTGCTCC

Eine Übereinstimmung in den gefundenen und den veröffentlichten Bindungsstellen läßt sich nur zwischen der von GDNF und Six3 finden, das ATTA-Motiv. Mutationsanalysen im GDNF-Promotor in diesem Motiv beweisen seine Beteiligung an der Bindung durch SIX2. Die Bindungsstelle im Six2-Promotor enthält die Basenpaarabfolge TTA, welche zumindest 75% des ATTA-Motives stellt. Inwieweit dieses ausreicht um eine Bindung zu vermitteln, muß durch weitere Experimente noch belegt werden.

4.2.4 Die Aktivierung von Six2 durch SIX2 zeigt Gemeinsamkeiten mit dem GDNF-Promotor

Beim GDNF-Promotor zeigte sich, dass die Bindungsstellen von SIX2 für eine Transaktivierung notwendig sind. Deletionsversuche mit dem Six2-Promotor zeigen das gleiche Ergebnis für die Bindungsstellen des Six2-Promotors. Sind im Promotor nur noch eine oder keine Bindungsstellen vorhanden, sinkt die Transaktivierung deutlich ab. Die beobachtete Bindung entspricht dabei fast der, wie an den GDNF-Promotor. Die Bindung wird hauptsächlich durch die erste Bindungsstelle SP1 vermittelt. Erst wenn beide Bindungsstellen komplett fehlen, ist keine Bindung von SIX2 mehr nachzuweisen. Der alleinige Verlust der Bindungsstellen hat auch einen Effekt auf die Transaktivierung. Dabei spielt es anscheinend keine Rolle, welche der beiden Bindungsstellen deletiert ist. Sobald eine der beiden nicht mehr in einem funktionellen Zustand vorhanden ist, sinkt die Transaktivierung deutlich ab (Abb.31). Auch in diesem Transaktivierungsverhalten, ähneln sich der GDNF- und der Six2-Promotor. Das bedeutet, dass beide Bindungsstellen für die Transaktivierung des Six2-Promotors notwendig sind, aber für die Bindung nur eine benötigt wird. Eine weitere Aussage aus den Deletionsversuchen ist, daß auch die flankierenden Sequenzen, sowohl 5' als auch 3' gelegen, der beiden Bindungsstellen für eine vollständige Aktivierung notwendig sind.

4.3 SIX2, ein Transkriptionsfaktor

SIX2 wird in der Literatur als Transkriptionsfaktor beschrieben, eine transktivierende oder –reprimierende Domäne ist bislang aber nicht charakterisiert worden. Eine Transaktivierungsdomäne ist bisher nur für SIX4 und SIX5 beschrieben worden⁶². In den vorangegangenen Experimenten zeigte SIX2 aber eine Transaktivierungsfähigkeit, also muss SIX2 eine bisher unbeschriebene, aktivierende Domäne besitzen. Die Beantwortung dieser Fragestellung wurde mit einem klassischen Domänenwechsel-Experiment durchgeführt. Das SIX2-Protein hat eine Transaktivierungsdomäne. Diese ist im C-Terminus des Proteins lokalisiert. Solche aktivierenden Domänen können eine flexible und wenig definierte Sequenz in ihrer Aminosäurezusammensetzung aufweisen. Einige Aminosäuren sind dabei aber typisch für Transaktivierungsdomänen. So findet man z.B. Glutamin-reiche Domänen, Prolin- oder Alanin-reiche Domänen, Serin/Threonin-reiche Domänen in der Transaktivierungsdomäne. Nachfolgend ist die Aminosäuresequenz des C-Terminus von SIX2 aufgelistet:

```

N' -   1 AKERENSENSNSSSHNPLA
      20 SSLNGSGKSVLGSEDEKT
      39 PSGTPDHSSSSPALLLSPP
      58 PPPGLPSLHSLGHPPGPSA
      77 VPVVPGGGGADPLQHHS
      96 LQDSILNPMSANLVDLGS*   -C'
    
```

Die letzten 76 Aminosäuren enthalten einen hohen Anteil an Serin und Prolin. Werden diese deletiert, kommt es zu einer starken Reduktion in der Transaktivierung. Das Vorhandensein dieser Aminosäuren spricht dafür, dass es eine klassische Transaktivierungsdomäne im C-Terminus gibt. Diese muss aber durch weitere Deletionsexperimente (loss of function) und Versuche bei denen diese vermutete aktivierende Sequenz allein, oder amplifiziert benutzt werden (gain of function) noch besser eingeschränkt und charakterisiert werden. Die Repression bei den Konstrukten, welche die Six-Domäne enthalten, kann darauf zurückzuführen sein, dass die Six-Domäne durch die Klonierung unmittelbar nach der Gal-DBD-Domäne eine veränderte Struktur besitzt und somit eine verändertes Verhalten zeigt.

4.4 Interaktion und Kompensation der Six-Familien-Mitglieder

Die einzelnen Mitglieder in der Six-Familie weisen eine grosse Homologie zueinander auf. Dies kann auch zu Kompensationseffekten bei knock-out Experimenten bezüglich der Regulation von Zielgenen führen. Diese Vermutung wird durch die knock-out Phänotypen von *Six4* und *Six5* in der Maus unterstützt^{54,55}. Der Phänotyp von *Six4*^{-/-}-Embryonen z.B. weist keinerlei

Veränderungen im Vergleich zu einer Wildtyp-Maus auf. Hier wird vermutet, dass *Six1* und *Six5* den Ausfall von *Six4* kompensieren. Sollte auch bei *Six2* so ein Kompensationseffekt tatsächlich der Fall sein, so sollte eine Transaktivierung des Promotors auch durch andere Six-Mitglieder erfolgen. Eine Transaktivierung des *Six2*-Promotors konnte für SIX3 und SIX6 gezeigt werden (Abb.34). Es ist möglich, dass SIX3 und SIX6 eigene Bindungsstellen im *Six2*-Promotor besitzen, oder dass aufgrund der hohen Homologie diese die gleichen Bindungsstellen erkennen wie SIX2. *Six3* und *Six6* werden beide nicht in der sich entwickelnden Niere exprimiert. Ihr Expressionsmuster überlappt nur im Kopfbereich.

Für PAX2 wurde gezeigt, dass es alleine nicht die Expression von *Six2* aktivieren kann. Sollte es ein regulatorisches Netzwerk geben, so könnte es auch sein, daß PAX2 mit einem anderen Protein eine Transaktivierung hervorrufen kann. PAX2 kann als Homo- oder Heterodimer an seine Bindungsstellen binden und diese aktivieren, wobei die Dimerisierung über die Homeodomäne stattfindet. Da auch die Six-Mitglieder eine Homeodomäne besitzen, ist eine Interaktion der beiden Proteine möglich. SIX2 zeigt dabei mit PAX2 oder PAX3 zusammen nur einen geringfügigen Effekt auf die Steigerung der Transaktivierung des *Six2*-Promotors. SIX3 oder SIX6 mit PAX2 zeigen einen vergleichbaren Effekt auf die Transaktivierung. Erstaunlicherweise ist aber eine synergistische Steigerung in der Transaktivierung zu sehen, wenn SIX3 oder SIX6 mit PAX3 zusammen wirken können. Diese Steigerung beträgt mehr als 100%. Eine additive Wirkung der einzelnen Proteine ist dabei auszuschließen, da weder PAX2 noch PAX3 alleine einen Effekt auf den *Six2*-Promotor zeigen. Die Steigerungsrate muss also auf eine Interaktion der SIX- und PAX-Proteine zurückzuführen sein. Ein solcher Effekt wurde bisher noch nicht beschrieben.

Für SIX2 ist mit EYA1 eine Interaktion bereits beschrieben worden¹⁷, wobei diese auf eine direkte Bindung der Six- und Homeodomäne des SIX-Proteins an die Eya-spezifischen Domäne des EYA-Proteins beruht. Diese Interaktion wird unterstützt durch das Ergebnis, das SIX2 mit EYA1 einen leichten Effekt auf die Transaktivierung von *Six2* (Abb.35) hat. Da EYA1 alleine keinen Einfluss auf den verwendeten *Six2*-Promotor besitzt, beruht dieser Effekt wahrscheinlich auf einer nukleären Translokation von EYA1 durch SIX2. Dies deutet auf eine Rolle von EYA1 als Kofaktor bei der Genregulation hin. Ein solcher Effekt ist bei EYA1 mit PAX2 nicht zu beobachten, was auch auf die Spezifität der Interaktion von SIX2 mit EYA1 hinweist. Mit welcher Domäne die SIX-Proteine interagieren läßt sich durch diese Experimente nicht sagen. Für das *Xenopus leavis* SIX3 wurde gezeigt, dass die Six-Domäne mit dem Helix-loop-Helix-Motiv des Protein NEUROD interagieren kann⁶³.

WT1 scheint eher einen reprimierenden Effekt auf den *Six2*-Promotor zu besitzen. Diese Repression wird vor allem bei der Kotransfektion mit *Six2* deutlich. Dieser Effekt ist wahrscheinlich nicht durch Proteininteraktionen zu erklären. Eine direkte Interaktion mit dem Promotor selber muss noch geklärt werden.

4.5 Ein regulatorisches Netzwerk in der Nierenentwicklung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen gemeinsam mit den publizierten Daten, daß ein regulatorisches Netzwerk während der Nierenentwicklung durchaus möglich ist. Dabei aktiviert SIX2 den *GDNF*-Promotor und ist an seiner eigenen Expression beteiligt.

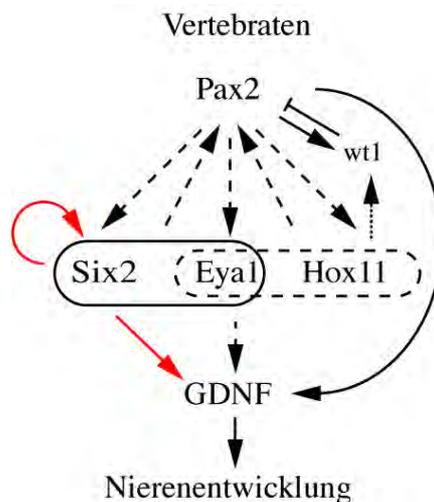


Abb.37: Modell eines regulatorischen Netzwerkes während der Nierenentwicklung in Säugern

Durchgezogene Pfeile zeigen bewiesene Interaktionen, gestrichelte Pfeile mögliche Interaktionen. Gepunktete Pfeile symbolisieren Interaktionen, die in anderen Geweben nachgewiesen wurden. Die roten Pfeile symbolisieren die in dieser Arbeit gefundenen Interaktionen.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass die meisten Proteine, die in diesem Zeitraum in der Nierenentwicklung aktiv sind, nicht alleine die Regulation eines anderen Genes kontrollieren. Vielmehr ist die Regulation dieser Gene von der Interaktion verschiedener Proteine abhängig, was auch die dramatischen Phänotypen erklärt, wenn eines dieser Gene inaktiviert wird. So sind auch für die Regulation von *GDNF* und *Six2* mehr als nur SIX2 verantwortlich, jedoch bleibt noch zu klären, welche Faktoren das sind.

5. Literatur

1. S. Kuure, R. Vuoltnaho, S. Vainio (2000), Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mechanisms of Development*, 92, 32-45
2. A. Schedl and N.D. Hastie (2000), Cross-talk in kidney development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10, 543-549
3. Sainio K, Sariola H, et al (1997), Glial cell line derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Development*, 124, 4077-4087
4. Dressler GR, Sanicola M, Worley D, Tang MJ, et al (1998), The Ret-Glial Cell derived Neurotrophic Factor (GDNF) Pathway Stimulates Migration and Chemoattraction of Epithelial Cells. *JBC*, 142, 1337-1345
5. Sanchez, Silos-Santiago, Fisen, He, Lira, Barbacid (1996), Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 382, 70-73
6. JG Pichel, L Shen, HZ Sheng, AC Granholm, J Drago, A Grinberg, EJ Lee, SP Huang, M Saarma, BJ Hoffer (1996), Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF, *Nature*, 382, 73-76
7. MW Moore, RD Klein, I Farinas, H Sauer, M Armanini, H Philips, LF Reichhardt, AM Ryan, K Rosenthal (1996), Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382, 76-79
8. Durbec, Marcos-Gutierrez, Kilkenny, Grigoriou, Wartiovaara, Suvanto, Smith, Ponder, Costantini, Saarma (1996), GDNF signaling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*, 381, 789-793
9. Pin-Xian Xu, Joe Adams, heiko Peters, M. Christian Brown, Shaun Heany & Richard Maas (1999), *Eya1*-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nature Genetics*, 23 113-117
10. Deneen M. Wellik, Patrick J. Hawkes, and Mario R. Capecchi (2002), *Hox11* paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes & Development*, 16, 1423-1432
11. Cheyette BNR, Green PJ, Martin K, Garren H, Hartenstein V, Zipursky SL (1994), The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron*, 12, 977-996
12. Serikaku MA, O'Tousa JE (1997), *Sine oculis* is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics*, 138, 1137-1150
13. Niimi T, Seimiya M, Kloter U, Flister S, Gehring WJ (1999), Direct regulatory interaction of the *eyeless* protein with an eye-specific enhancer in the *sine oculis* gene during eye induction in *Drosophila*. *Development*, 126, 2253-2260

14. Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL (1997), The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development. *Cell*, 91, 881-891
15. Xu PX, Woo I, Her H, Beier DR, Maas RL (1997), Mouse Eya homologues of the Drosophila eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development*, 124, 219-231
16. Koboyashi M, Toyama R, Takeda H, Dawid IB, Kawakami K (1998), Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene six3 induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development*, 125, 2973-2982
17. Hiromi Ohto, Sayaka Kamada, Kenji Tago, Shin Ichi tominaga, Hidenori Ozaki, Shigeru Sato Kiyashi Kawakami (1999), Cooperation of Six and Eya in Activation of their target genes through nuclear translocation of Eya. *Molecular and Cellular Biology*, 19,10, 6815-6824
18. Nornes HO, Dressler GR, Knapik EW, Deutsch U, Gruss P (1990), Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development*, 109, 797-809
19. Oliver G, Wehr R, Jenkins NA, Copeland NG, Cheyette BN, Harenstein V, Zipursky SL, Gruss P. (1995), Homeobox genes and connective tissue patterning. *Development*, 121, 693-705
20. Kalatzis B, Sahly I, El-Amraoui A, Petit C (1998), Eya1 expression in the developing ear and kidney: towards the understanding of the pathogenesis of Branchio-Oto- Renal (BOR) syndrome. *Dev Dyn*, 213, 486-499
21. Ohto H, Takizawa T, Saito T, Kobayashi M, Ikeda K, Kawakami K (1998), Tissue and developmental distribution of Six family gene products. *Int J Dev Biol.*, 42, 141-148
22. Patrick D. Brophy, Lance Ostrom, Katherine M. Lang and Gregory R. Dressler (2001), Regulation of uretric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derive neurotrophic factor gene. *Development*, 128, 4747-4756
23. Katja Koehler, Tanna Franz and Neil Dear (2000), Hox11 is required to maintain normal wt1 mRNA levels in the developing spleen. *Dev. Dyn.*, 218, 201-206
24. Czerny T. et al (1993), DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site, *Genes Dev.*, 7, 2048-2061
25. Xu, H.E. et al (1999), Crystal structure of the human Pax6 paired domain with a 26 base pair DNA: new perspectives on paired domain-DNA interactions. *Genes Dev.*, 13, 1263-1275
26. Underhill, D.A. and Gros, P (1997), the paired-domain regulates DNA binding by the homeodomain within the intact Pax3 protein, *JBC*, 272, 14175-14182
27. Plaza, S. et al (1991), Molecular basis for the inhibition of Drosophila eye development by Antennapedia. *EMBO*, 20, 802-811
28. Wilson K, et al. (1993), Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev.*, 7, 2120-2134

29. Glaser, T et al (1994), Pax6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat. Genet*, 7, 463-471
30. Kawakami K, Ohto H, Takizawa T, Saito T (1996), Structure, function and expression of a murine homeobox protein AREC3, a homologue of *Drosophila sine oculis* gene product, and implication in development. *Nucleic Acids Res.*, 24, 303-310
31. Seo HC, Curtiss J, Mlodzik M, Fjose A (1999), Six class homeobox genes in *Drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech Dev.*, 83, 127-139
32. Kawakami K, Ohto H, Takizawa T, Saito T (1996), Identification and expression of six family genes in mouse retina, *FEBS Lett.*, 393, 259-263
33. Leu-Fen H. Lin, Daniel H. Doherty, Jack D. Lile, Susan Bektesh, Frank Collins (1993), GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260, 1130
34. Mikeiei Tanaka, Sachiko Ito, Kazutoshi Kiuchi (2000), Novel alternative promoters of mouse glial cell line-derived neurotrophic factor gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1494,63-74
35. Trupp, Ryden, Jörnwall, Funakoshi, Timmusk, Arenas, and Ibanez (1995), Peripheral Expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons, *J. Cell. Biol.*, 130, 137-148
36. Sanchez, M.P., Silos Santiago I, Frisen J., He B., Lira S.A. and Barbacid M. (1996), Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF, *Nature*, 382, 70-73
37. Suvanto P., Hiltunen J.O., Arumäe U., Moshnyakov M., Sariola H., Sainio K., Saarma M. (1996) Localisation of glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic in situ hybridization. *Eur. J. Neurosci.*, 8, 816-822
38. Haber DA, Park S, Maheswaran S, Englert C, Re GG, et al (1993), WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 262, 2057-2059
39. Brenner B, et al. (1992), RNA polymerase chain reaction detects different levels of four alternatively splice WT1 transcripts in Wilms tumor. *Oncogene*, 7, 1431-33
40. Haber DA, et al. (1991), Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 9618-9622
41. Klamt B, Koziell F, Poulat P, Wieacker P, Scrambler P, Berta and M Gessler (1998), Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1+/-KTS splice isoforms. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 709-714
42. Kreidberg JS, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, et al (1993), WT1 is required for early kidney development. *Cell* 74, 679-691

43. Larry T. Patterson, Marina Pembauer and S. Steven Potter (2001), *Hoxa11* and *Hoxd11* regulate branching morphogenesis of the ureteric bud in the kidney development. *Development*, 128, 2153-2161
44. Hideki Enomoto, Toshiyuki Araki, Alana Jackman, Robert O. Heuckeroth, William D. Snider, Eugene M. Johnson and Jeffrey Milbrandt (1998), *GFR α 1*-Deficient Mice Have Deficits in the Enteric Nervous System and Kidneys. *Neuron*, 21, 317-324
45. Schuchardt A, D'Argati V, Larsson-Blomberg L, Constantini F and Pachnis V (1994), Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor *Ret*. *Nature*, 367, 380-383
46. Ebendal T, Tomac A, Hoffer BJ and Olsen I (1995), Glial cell line derived factor stimulates fiber formation and survival in cultured neurons from peripheral autonomic ganglia. *J. Neurosci. Res.*, 40, 276-284
47. Lyons KM, Pelton RM and Hogan BLM (1990), Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A. *Development*, 109, 833-844
48. Jones CM, Lyons KM and Hogan BLM (1991) Involvement of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and *Vgr-1* in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*, 111, 531-542
49. Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B and Pelletier J (1999), the Wilms Tumor Suppressor Gene (*wt1*) Product Regulates *Dax-1* Gene Expression during Gonadal Differentiation. *MCB*, 19, 2289-2299
50. Wilhelm D, Englert C (2002), The Wilms tumor suppressor *WT1* regulates early gonad development by activation of *Sfl*. *Genes Dev.*, 15;16(14), 1839-1851
51. Sarah Harris, Catherine L. Winchester and Keith J. Johnson (2000) Functional analysis of the homeodomain protein *SIX5*. *Nucleic Acids Research*, 28, 9, 1871-1878
52. Changqi Zhu, Michael Dyer, Masanori Uchikawa, Hisato Kondoh, Oleg Lagutin and Guillermo Oliver (2002), *Six3*-mediated auto repression and eye development requires its function with members of the Groucho-related family of co-repressors. *Development*, 129, 2835-2849
53. Kobayashi M, Nishikawa K, Suzuki T and Yamamoto M (2001), The homeobox protein *Six3* interacts with the Groucho corepressor and acts as a transcriptional repressor in eye and forebrain formation. *Dev. Biol.*, 232, 315-326
54. Kawakami K, et al. (2001), *Six4*, a Putative myogenin Gene Regulator, Is Not Essential for Mouse Embryonal Development. *MCB*, 21,10, 3343-3350
55. Klesert TR, Cho DH, Clark JI, Maylie J, Adelman J, Snider L, Yuen EC, Sarino P, Tapscott SJ (2000), Mice deficient in *Six5* develop cataracts: implications for myotonic dystrophy, *Nat. Gen.*, 25(1), 105-109

56. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R et al. (1996), GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*, 85, 1113-1124
57. Bonini, NM, Leiserson WM, and Benzer S (1993), The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell*, 72, 379-395
58. Rauscher III F:J: et al. (1990), Binding of the Wilms Tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus-sequence. *Science*, 250, 1259-1262
59. Drummond IA, et al. (1992), Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 257, 674-678
60. Pin-Xian Xu, Jane Cheng, Honathan A. Epstein and Richard L. Maas (1997), Mouse Eye genes are expressed during limb tendon development and encode a transcriptional activation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 11974-11979
61. Catherine A. Boucher, Catherine L. Winchester, Graham M. Hamilton, Alan D. Winter, Keith J. Johnson, Mark E.S. Bailey (2000), Structure, mapping and expression of the human gene encoding the homeodomain protein, SIX2. *Gene*, 247, 145-151
62. Kiyoshi Kawakami, Shigeru Sato, Hidenori Ozaki and Keiko Ikeda (2000) Six family genes – structure and function as transcription factors and their role in development. *BioEssays*, 22.7, 616-626
63. Kristin Tessmar, Felix Loosli, Joachim Wittbrodt (2002), A screen for co-factors of *Six3*. *Mechanisms of Development*, 117, 103-110
64. Judith Golden, Joseph DeMaro, Patricia Osborne, Jeffrey Milbrandt and Eugene M. Johnson (1999), Expression of Neurturin, GDNF, and GDNF Family Receptor mRNA in the Developing and Mature Mouse. *Experimental Neurology*, 158, 504-528
65. Sean Bong Lee, Karen Huang, Rachel Palmer, Vivi Truong, Doris Herzlinger, Kathryn Kolquist, Jenise Wong, Charles Paulding, Seung Kew Yoon, William Gerald, Jonathan D. Oliner, Daniel A. Haber (1999), The Wilms Tumor Suppressor WT1 Encodes a Transcriptional Activator of *amphiregulin*. *Cell*, 98(5), 663-673