

Die Funktion des Homeobox-Gens *Uncx* in der Entwicklung der murinen Niere

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades:

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Anne-Kathrin Schäfer,

geboren am 15.12.1984 in Mainz

2016

Diese Arbeit wurde im Zeitraum vom 1.10.2012 bis zum 29.02.2016 im Labor von Prof. Dr. Andreas Kispert am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kispert

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Stephanie Schubert

Tag der Promotion: 20. September 2016

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die mich während der Zeit meiner Promotion auf die ein oder auch andere Weise unterstützt haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Andreas Kispert für die gute fachliche Betreuung, die Geduld und natürlich das Projekt.

Ich danke PD Dr. Stephanie Schubert für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Ich danke all denen, die zu den verwendeten transgenen Mauslinien beigetragen haben und denen, die mit Materialien sowie Ratschlägen zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke natürlich ganz besonders meinen Kollegen aus der AG Kispert und dem Institut für Molekularbiologie. Insbesondere gilt mein Dank Nurullah, der mir in den vergangenen Monaten ein lieber Freund war. Danke auch an Reginaldo, Tamrat, Rui und Fran für all den Spaß beim Mittagessen!

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Familie für die emotionale Unterstützung und konstruktiven Gespräche der letzten Jahre.

Danke für alles!!!

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Die bilateral angelegten Nieren der Säugetiere dienen der Reinigung des Blutes von Stoffwechselendprodukten und der Aufrechterhaltung einer Flüssigkeitshomöostase im Organismus. Die Nierenfunktion ist eng mit ihrem strukturellen Aufbau verknüpft und die Entwicklung dieser komplexen Architektur setzt präzise aufeinander abgestimmte Entwicklungsvorgänge voraus. Nephrone, die Filtereinheiten der Niere, entstehen aus einer *de novo* Induktion nephrogener Vorläuferzellen. Dabei nimmt der Differenzierungsstatus einer Subpopulation proliferativer Nephronvorläuferzellen zu, was zu einer mesenchymal-epithelialen Transition führt. Das dadurch entstandene renale Vesikel ist das erste epitheliale Körperchen des entstehenden Nephrons. Es durchläuft während seiner Ausreifung zum Nephron verschiedene Entwicklungsstadien.

Eine iterative Abfolge der Nephroninduktion setzt eine wechselseitige Interaktion der Ureterknospe mit dem als Kappenmesenchym bezeichneten nephrogenen Vorläuferkompartiment voraus. Die präzise aufeinander abgestimmte Interaktion der Ureterknospe mit dem sie umgebenden Kappenmesenchym ist entscheidend für die finale Anzahl der Nephrone und somit der Nierenfunktion. Kleine Störungen dieser Interaktion führen zu Dysbalancen zwischen proliferierenden und differenzierenden Kappenmesenchymzellen, mit oftmals weitreichenden Auswirkungen auf die Nierenentwicklung.

Das Homöobox-Gen *Uncx* wird während der gesamten Entwicklung der murinen Niere, sowohl in multipotenten Nephronvorläuferzellen, als auch in tubulären nephrogenen Körperchen des entstehenden Nephrons exprimiert. Mäuse in denen *Uncx* homozygot deletiert wurde, entwickeln hypoplastische Nieren mit einer verminderten Anzahl an Nephronen. Sowohl Veränderungen in Proliferation und Apoptose nephrogener Vorläuferzellen, als auch Musterungsdefekte innerhalb nephrogener Körperchen, konnten als Ursachen für die Entstehung des Phänotyps ausgeschlossen werden. Durch quantitative Analysen wurde gezeigt, dass die Reduktion an Nephronen in dieser Mutante, auf eine Verzögerung der Nephroninduktion zurückzuführen ist. Das legt eine zellautonome Funktion von *Uncx* innerhalb nephrogener Vorläuferzellen nahe. Mittels einer Transkriptomanalyse und anschließender Validierung durch RNA *in situ* Hybridisierung (ISH), wurden Gene gefunden deren Expression in *Uncx*-mutanten Nieren reduziert ist. Dabei führt der Verlust von *Uncx* zu einer Reduktion des im Kappenmesenchym exprimierten Transkriptionsfaktors *Wt1*. Eine Funktion für *Wt1* in der Differenzierung nephrogener Vorläufer wurde bereits beschrieben, weshalb *Wt1* die Rolle eines potentiellen Kandidaten in der Vermittlung der epithelialen Konversion als *Uncx*-Zielgen zukommt.

Sekundär führt der Verlust von *Uncx* zu einer gesteigerten Verzweigungsmorphogenese. Transkriptom und ISH Analysen zeigten eine Hochregulation von *Gdnf* im Kappenmesenchym der *Uncx*-Mutante. *Gdnf*

gilt als Regulator der Verzweigungsmorphogenese und folglich könnte eine erhöhte *Gdnf*-Expression zu einer Stimulation der Verzweigungsmorphogenese in der *Uncx*-Mutante führen. Dies legt eine nicht-zellautonome Regulation der Verzweigungsmorphogenese durch *Uncx* nahe.

Diese Arbeit trägt zum Verständnis der molekularen Zusammenhänge in der zeitlichen Abfolge der Nephroninduktion bei. Dabei wird deutlich, dass der Verlust von *Uncx* zu einer Verringerung der Nephroninduktionsfrequenz, unabhängig von der gesteigerten Dynamik der Verzweigungsmorphogenese, führt.

Schlagworte: Mausentwicklung, Nephrogenese, *Uncx*

Summary

Mammalian kidneys are excretory organs that filter the blood to eliminate metabolic products and to maintain homeostasis of body fluids. The function of the kidney is primarily linked with its structural composition. Development of the kidneys complex architecture requires tightly regulated tissue interactions. Nephrons are the filtering units of the kidneys. Nephron induction is synchronized with the branching morphogenesis of the ureteric bud. Mutual interactions of the epithelial ureteric bud with the surrounding mesenchyme are required for the differentiation of a subset of mesenchymal cells. A critical balance of proliferation versus epithelialization within the nephron progenitor compartment plays a crucial role for proper nephron induction. The final number of nephrons that directly impacts kidney function depends on the temporally and spatially controlled reiterative process of nephron induction. The influence of differential gene expression on the precise orchestration of tissue interactions remains poorly understood.

The homeobox gene *Uncx* is expressed in nephrogenic progenitors and its derivatives, the epithelial tubules of the developing nephron. Homozygous deletion of *Uncx* leads to renal hypoplasia with reduced number of nephrons. Neither alterations in proliferation nor apoptosis of the nephron progenitor cell population are pivotal for the phenotype. The same is true for patterning defects of the developing nephron. Whereas the total number of nephrons is reduced in the absence of *Uncx*, the segmentation of present nephrons remains intact. Quantitative analysis of *Uncx* deficient kidneys suggests an insufficient mechanism of nephron induction and thus a cell-autonomous role of *Uncx* in the nephron progenitor pool. Transcriptome analysis and ISH data indicate a subset of genes that are dysregulated in the kidney of the *Uncx*-mutant. Among other, the transcription factor *Wt1* and its target *Rspo1* are reduced in expression. A function for *Wt1* in epithelialization of nephron progenitor has already been described. These data argue for a role of *Wt1* in epithelial conversion of nephron progenitors downstream of *Uncx*. Indirectly, the loss of *Uncx* leads to an increased branching morphogenesis of the ureteric bud. Evidences presented in this work suggest a major role for one of key the regulators of branching morphogenesis, the chemo attractant *Gdnf*. *Gdnf* expression is upregulated in nephron progenitor compartment of *Uncx* mutants and is thus likely to mediate the non-cell autonomous function of *Uncx* in regulating branching morphogenesis.

This work sheds light on sustainable consequences evolved from defects in the orchestration of nephron development. In this context *Uncx* is required to control proper nephron induction within the nephron progenitor compartment.

Key words: Mouse development, Nephrogenesis, *Unc*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen und Symbole	V
1. Einleitung	1
1.1 Die strukturelle Organisation der Niere	1
1.2 Die physiologische Funktion der Niere als harnbildendes und ableitendes Organ.....	2
1.2.1 Die physiologische Funktion der Nephrone	2
1.3 Die Entwicklung der murinen Niere	3
1.3.1 Molekulare Steuerung der Nierenentwicklung	5
1.3.1.1 Spezifizierung des renalen Schicksals.....	6
1.3.1.2 Das Eindringen der Ureterknospe in das umgebende metanephrische Mesenchym initiiert die renale Entwicklung	6
1.3.1.3 Die Verzweigungsmorphogenese wird durch mesenchymale Signale gesteuert.....	8
1.3.1.4 Der Erhalt des Kappenmesenchym und die Nephrogenese erfordern Signale aus benachbarten Geweben.....	9
1.3.1.4.1 Wnt9b, ein epitheliales Signal mit variablen Effekten auf die Zellen des Kappenmesenchym.....	10
1.3.1.4.2 Epitheliale und mesenchymale Faktoren sichern den Erhalt der Kappenmesenchym Zellen	12
1.3.1.4.3 Signale aus dem Stroma tragen zur Steuerung der Nephrogenese bei	13
1.4 Der Homöobox Transkriptionsfaktor Uncx	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	16
2.1.1 Laborgeräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.2 Chemikalien.....	18
2.3 Gebrauchsfertige Lösungen	19
2.4 Enzyme.....	20
2.5 Antikörper	20

2.5.1	Primäre Antikörper	20
2.5.2	Sekundäre Antikörper	21
2.6	Versuchstiere	21
2.7	RNA-Hybridisierungssonden	21
2.7.1	RNA-Hybridisierungssonden aus linearisierten Plasmidkonstrukten	21
2.7.2	RNA-Hybridisierungssonden aus genomischer DNA.....	22
2.7.3	RNA-Hybridisierungssonden aus cDNA.....	23
2.8	Molekularbiologische Methoden	24
2.8.1	Lösungen	24
2.8.2	DNA Präparation	25
2.8.3	Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.8.4	DNA-Gelelektrophorese	27
2.8.5	Herstellung von RNA-Hybridisierungssonden	27
2.8.6	RNA Isolierung für RNA-Microarray.....	27
2.8.7	Synthese von cDNA.....	28
2.9	Mausmethoden.....	28
2.9.1	Lösungen	28
2.9.2	Versuchstiere und Verpaarungsstrategien.....	28
2.9.3	Präparation, Fixierung und Dehydrierung isolierter Gewebe für histologische Analysen..	29
2.9.4	Genotypisierung der Embryonen.....	29
2.9.5	Organkultur	29
2.9.5.1	Induktion isolierter Kappenmesenchyme	30
2.9.6	RNA ISH auf Gewebe.....	30
2.10	Histologische Methoden.....	31
2.10.1	Lösungen	31
2.10.2	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	32
2.10.3	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	32
2.10.4	Immunfluoreszenzfärbung	33
2.10.4.1	Immunfluoreszenzfärbung mit zwei Primärantikörpern derselben Spezies	33
2.10.5	Nachweis apoptotischer Körperchen mittels TUNEL-Assay	33
2.10.6	BrdU-Inkorporationsassay.....	34
2.10.7	RNA ISH auf Paraffinschnitten	34

2.10.8	Dokumentation.....	35
3	Ergebnisse	36
3.1	<i>Uncx</i> wird im Kappenmesenchym und nephrogenen Körperchen exprimiert	36
3.2	<i>Uncx</i> -mutante Nieren sind kleiner und unterscheiden sich histologisch von wildtypischen Nieren bei E18.5	37
3.3	Der Verlust von <i>Uncx</i> führt nicht zu Veränderungen der Gewebestruktur der Niere.....	41
3.4	<i>Uncx</i> -mutante Nieren weisen weniger reife Nephrone auf	45
3.4.1	P14 <i>Six2</i> ^{cre/+} ; <i>Uncx</i> ^{flox/flox} Nieren besitzen weniger Nephrone, welche zudem qualitativ beeinträchtigt sind.....	49
3.5	Nephrogene Strukturen zeigen einen normalen Musterungsphänotyp in <i>Uncx</i> -Verlustmutanten	51
3.6	In <i>Uncx</i> -mutanten Nieren werden weniger Nephrone induziert.....	52
3.7	<i>Uncx</i> hat keinen Einfluss auf die Zellteilung des Kappenmesenchyms	53
3.8	<i>Uncx</i> beeinflusst die Zellteilung der epithelialen Ureterknospe.....	55
3.9	<i>Uncx</i> -mutantes Kappenmesenchym zeigt ein geringeres Potential zur Nephroneinduktion.....	56
3.10	<i>Uncx</i> hat keinen Einfluss auf die Expression bekannter Wnt9b, Wt1 und Yap Zielgene.....	57
3.11	Über eine Transkriptomanalyse <i>Uncx</i> -mutanter Nieren können potentielle Zielgene von <i>Uncx</i> detektiert werden	59
3.11.1	Durch die Mikroarray Analyse können Gene ermittelt werden, welche durch den Verlust von <i>Uncx</i> eine höhere Expression aufweisen.....	60
3.11.2	Einige der durch die Mikroarray Analyse ermittelten Gene, welche in <i>Uncx</i> -mutanten Nieren herunter reguliert sind, werden innerhalb nephrogener Strukturen und dem Kappenmesenchym exprimiert	64
3.12	Wt1 zeigt geringere Proteinkonzentrationen im Kappenmesenchym <i>Uncx</i> -mutanter Nieren ..	68
3.13	Zellen <i>Uncx</i> -mutanter Kappenmesenchyme zeigen erhöhte Apoptose.....	69
3.14	<i>Uncx</i> ist nicht hinreichend um die Expression von <i>Wt1</i> zu induzieren.....	70
3.15	Die Deletion eines <i>Wt1</i> -Allels im <i>Uncx</i> -mutanten Hintergrund resultiert in einer Verstärkung des <i>Uncx</i> -Phänotypen.....	72
3.16	Fehlexpressionsmutanten die <i>Uncx</i> ektopisch in nephrogenen Vorläufern und ihren Derivaten exprimieren, entwickeln hypoplastische Nieren mit weniger Nephrone.....	77
4	Diskussion	80
4.1	In <i>Uncx</i> -mutanten Nieren werden weniger Nephrone induziert.....	80
4.2	Wt1 ist ein funktionelles <i>Uncx</i> -Zielgen.....	83
4.3	<i>Uncx</i> reguliert nicht-zellautonom die Verzweigungsmorphogenese	85

4.4	Werden stromal exprimierte Gene durch Uncx reguliert?	87
4.5	Nephrene <i>Uncx</i> -mutanter Nieren weisen strukturelle Anomalien auf	88
5	Referenzen	89
6	Lebenslauf	100
7	Erklärung zur Dissertation	102
8	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	103
9	Anhang	104

Abkürzungen und Symbole

Abb. Abbildung

ATP Adenosintri-phosphat

B Base(n)

Bp Basenpaar(e)

bzw. beziehungsweise

cDNA komplementäre DNA

CO₂ Kohlendioxid

Cre 'cyclization recombinase'

d Tage

d.h. das heißt

dATP Desoxyadenosintri-phosphat

dCTP Desoxycytidintri-phosphat

dGTP Desoxyguanosintri-phosphat

dTTP Desoxythymidintri-phosphat

DAPI 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol

DIG Digoxigenin

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DNase Desoxyribonuklease

dNTPs Desoxyribonukleosidtriphosphate

dsDNA Doppelstrang-DNA

E Embryonaltag

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

FCS Fötale Kälberserum

g Gramm

g (Erdbeschleunigung)

GFP/Gfp green-fluorescent-protein

GTP Guanosinriphosphat

h Stunden

HCl Salzsäure

H₂O Wasser

H₂O₂ Wasserstoffperoxid

Ig Immunglobulin

ISH *in situ* Hybridisierung

k kilo

KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat

KCl Kaliumchlorid

l Liter

LacZ β-Galaktosidase

LB Luria-Bertani-Medium

LiCl Lithiumchlorid

m milli

M Mol pro Liter

μ mikro

Mg Magnesium

MgCl₂ Magnesiumchlorid

MgSO₄ Magnesiumsulfat

MQ-H₂O Millipore-Wasser

min Minuten

mRNA Boten-RNA

n nano

Na Natrium

NaAc Natriumacetat

NaCl Natriumchlorid

NaH₂PO₄ Natriumdihydrogenphosphat

Na₂HPO₄ Dinatriumhydrogenphosphat

NaOH Natriumhydroxid

p pico

P postnataler Tag

PBS Phosphat gepufferte Salzlösung

PCR Polymerasekettenreaktion

PFA Paraformaldehyd

Pi Phosphat

RNA Ribonukleinsäure

RNase Ribonuklease

RNasin RNase Inhibitor

RT Raumtemperatur

SDS Dodecylsulfatnatriumsalz

Sec Sekunden

TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated UTP nick end labeling

U Units (Einheiten)

ü.N. über Nacht

Upm Umdrehungen pro Minute

UV ultraviolettes Licht

V Volt

Vol Volumenanteile

WT Wildtyp

x -fach

z.B. zum Beispiel

°C Grad Celsius

% Prozent

1. Einleitung

Die Nieren der Vertebraten reinigen das Blut von stickstoffhaltigen Endprodukten des Metabolismus und führen diese als Harn aus dem Körper ab. Angeborene Fehlbildungen der Niere haben nicht selten weitreichende Folgen für den gesamten Organismus, was die Niere zu einem pathophysiologisch und zunehmend entwicklungsbiologisch, umfangreich untersuchten Organ macht. Wie sich die Niere aus dem komplexen Wechselspiel molekularer Interaktionen verschiedener Gewebe entwickelt, ist seit Mitte des letzten Jahrhunderts Gegenstand intensiver Studien (Grobstein, 1956). In diesem Zusammenhang gilt die Niere als Modellsystem für die Entwicklung von Organen, welche aus der Interaktion zwischen mesenchymalen und epithelialen Geweben hervorgehen.

1.1 Die strukturelle Organisation der Niere

Die bilateral angelegten murinen Nieren liegen retroperitoneal zu beiden Seiten der Wirbelsäule und nehmen 0,5-0,8% des Körpergewichts ein (Kriz and Koepsell, 1974). Ein fibröses Interstitium bildet das strukturelle Gerüst der Niere in das harnbildende und ableitende Tubuli, die Nephrone eingebettet sind (Lemley and Kriz, 1991). Nephrone sind segmentierte Strukturen mit einer proximal-distalen Orientierung. Das am proximalen Pol gelegene Nierenkörperchen mit dem glomerulären Bündel und der Bowmans Kapsel setzt sich in folgende tubuläre Segmente fort: den proximalen Tubulus, der Henle Schleife und den distalen Tubulus. Die Sammelrohre sind exkretorische Einheiten, die sich an die distalen Tubuli anschließen und in der Papilla zusammenlaufen. Dem Nierenbecken (Pelvis) schließt sich der Ureter an, der die Niere mit der Blase verbindet (Kretchmer and Bernstein, 1974). Die midsagittale Aufsicht zeigt die makroskopische Strukturierung der einzelnen Gewebsregionen der murinen Niere (Abbildung 1.1). Histologisch unterscheiden sich der äußere Kortex, die innere Medulla und die Papilla deutlich voneinander. Die Nierenkörperchen sowie die proximalen und distalen Tubuli sind im äußeren Nierenkortex lokalisiert. Eingebettet in das medulläre Interstitium befinden sich die Henle Schleifen und die Sammelrohre. Umschlossen werden die Nieren von einer fibrösen Schicht, der renalen Kapsel (Kriz and Koepsell, 1974; Liebelt, 1998).

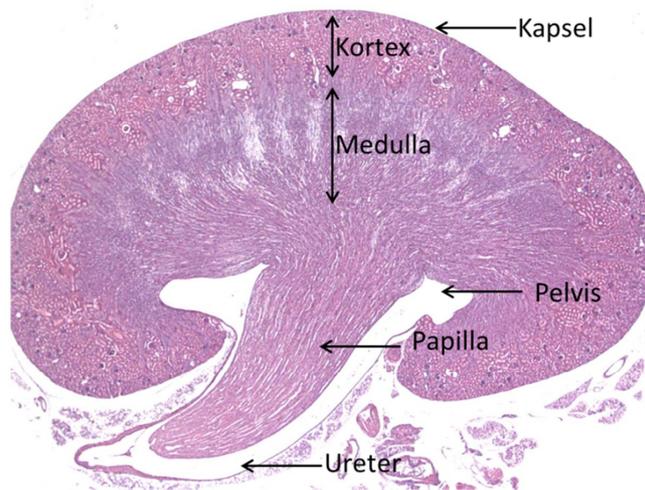


Abbildung 1.1: Die strukturelle Organisation der Niere. Die Gewebe der murinen Niere sind in strukturelle Einheiten unterteilt.

1.2 Die physiologische Funktion der Niere als harnbildendes und ableitendes Organ

Die Evolution der Niere reflektiert die Notwendigkeit der Wasserkonservation terrestrischer Vertebraten. Bei den paarig angelegten Nieren der Säugetiere handelt es sich um hochspezialisierte Organe, die ein breites Spektrum, überwiegend lebenswichtiger Funktionen ausüben. Neben endokrinen Funktionen und der Exkretion von Fremdstoffen gehört die Osmoregulation des Körpers dabei zu ihren wichtigsten Aufgaben. Die erstaunliche Leistung der Niere besteht in ihrer Fähigkeit metabolische Abbauprodukte und Fremdstoffe aus dem Blut zu filtrieren und einen hypertonen Urin durch Resorption von Wasser zu bilden. Der Hauptbestandteil des Urins sind Stickstoffverbindungen. Hierzu gehören der im Proteinmetabolismus entstehende Harnstoff und die durch den Abbau von Nukleinsäuren entstehende Harnsäure (Eaton and Pooler, 2009). Der finale Harn entsteht mittels Primärfiltration des Blutes durch die Nierenkörperchen und anschließende Modifikation des Filtrates durch tubuläre Resorptionsvorgänge (Davis et al., 1996; Murdaugh et al., 1958).

1.2.1 Die physiologische Funktion der Nephrone

Die für die Filtration und anschließende Modifikation des Urins verantwortlichen Funktionseinheiten der Niere sind die Nephrone. Es handelt sich dabei um hoch organisierte, segmentierte Strukturen deren einzelne Segmente auf ihre jeweilige physiologische Funktion spezialisiert sind. Die Zellen der einzelnen Segmente weisen eine charakteristische Ausstattung an Ionen Transportern auf, welche die Osmolarität des Urins und damit die Wasserabgabe des Organismus steuern.

Das Nierenkörperchen am vorderen Ende des Nephrons ist eine (in der Maus) etwa 70µm große, kugelförmige Struktur die sowohl aus Epithelien, als auch aus endothelialen Gefäßen besteht (Treuting and Dintzis, 2012; Yamada, 1955). Die epitheliale Bowman-Kapsel umgibt ein Kapillarknäuel, den Glomerulus der kontinuierlich von der Vas afferens mit Blut versorgt wird. Die Kapillaren sind mit einem, der Basalmembran aufliegenden, porösen Endothel ausgekleidet (Yamada, 1955). Zusammen mit den miteinander verzahnten Fortsätzen der Podozyten der Bowman-Kapsel funktionieren diese als Ultrafilter für Moleküle größer als 4nm im Durchmesser (10 kD). Diese so genannte Ultrafiltration ist unselektiv bezüglich der Molekülart und das durch die Filtration entstandene Primärfiltrat ist isotonisch gegenüber dem Blutplasma (Kardasz, 2009; Purves et al., 2010). Es gelangt vom Nierenkörperchen in die nachfolgenden Nephronsegmente: den proximalen Tubulus, der Henle-Schleife und den distalen Tubulus, welcher in das Sammelrohr mündet. Die Tubulusepithelien bestehen aus einem einschichtigen Epithel, das einer Basalmembran aufliegt. Tight junctions zwischen Epithelzellen bilden eine Barriere zwischen der luminalen Apikalmembran und der Basalmembran (Gattineni and Baum, 2015). Die Epithelzellen einzelner tubulärer Segmente unterscheiden sich sowohl strukturell als auch zytochemisch voneinander (Eaton and Pooler, 2009).

1.3 Die Entwicklung der murinen Niere

Die überlebensnotwendige Funktion der Niere hängt unmittelbar mit ihrer Struktur zusammen. Die Entwicklung der hochspezialisierten Architektur der Niere setzt ein komplexes Netzwerk spezifisch aufeinander abgestimmte Morphogeneseprozesse und die Interaktion mehrerer involvierter Gewebe voraus.

Die als Metanephros bezeichnete dauerhafte Niere der Amnioten (Reptilien, Vögel und Säugetiere) ist die letzte von drei Nieren die während der embryonalen Entwicklung entlang der anteroposterioren Achse, in aufeinanderfolgenden zeitlichen Sequenzen induziert wird. Die ersten beiden Nieren repräsentieren den Pronephros, die permanente Niere der Amphibien und Fische und den Mesonephros, die Niere der aquatischen Vertebraten. In Säugetieren handelt es sich bei Pro- und Mesonephros um transiente evolutionäre Relikte mit keiner oder wenig Funktionalität (Dressler, 2006, 2009; Stewart and Bouchard, 2014). Teile des Pro- und Mesonephros tragen im Männchen zum Samenleiter sowie dem Nebenhoden bei. In Weibchen werden diese Strukturen vollständig degradiert (Stewart and Bouchard, 2014).

In dieser Arbeit soll ausschließlich auf die Entwicklung der permanenten murinen Niere eingegangen werden. Diese entwickelt sich (wie ihre transienten Vorläufer) aus dem, nach der Gastrulation gebildeten

intermediären Mesoderm, welches zwischen dem paraxialen Mesoderm und dem Seitenplattenmesoderm liegt (Saxen, 1987). Aus ihm differenziert am Embryonaltag (E) 8.0 der nephrogene Strang, eine Verdichtung mesodermalen Gewebes. Dieser wächst nach kaudal aus und bildet den Vorläufer für einen epithelialen Tubulus, den nephrischen Gang und das umgebende mesonephrische Mesenchym. Am Tag E10.5 wird der Metanephros durch das Eindringen einer aus dem nephrischen Gang ausknospenden Ureterspitze in das metanephrische Mesenchym initialisiert (Davidson, 2008; Dressler, 2006; Grobstein, 1956; Hoar, 1976). Reziproke Signalinteraktionen dieser beiden Linien bilden die Grundlage für die Entwicklung der Niere (Blake and Rosenblum, 2014; Dressler, 2006).

Die Ureterknospe beginnt sich unter dem Einfluss mesenchymaler Signale dichotom zu verzweigen und bildet das zukünftige Sammelrohrsystem der Niere. Die direkt an die Ureterspitzen angrenzende, dichte Zellpopulation wird als Kappenmesenchym bezeichnet und bildet den multipotenten Vorläufer für alle epithelialen Strukturen des zukünftigen Nephrons (Abbildung 1.2) (Rothenpieler and Dressler, 1993). Das Stroma, eine dem Kappenmesenchym kortikal anliegende lockere Domäne aus spindelförmigen Zellen, gilt als Vorläufer des kortikalen und medullären Interstitiums und der renalen Kapsel (Kobayashi et al., 2014; Li et al., 2014).

Die Nephrogenese beginnt ab E12.5 an der Spitze neu gebildeter Ureterknospen. Dabei kommt es zur Aggregation einiger Kappenmesenchym Zellen und daraufhin zur mesenchymalen-epithelialen Transition des Aggregates. Dieser Prozess beschreibt die Entstehung der ersten nephrogenen Struktur, des renalen Vesikels. Das renale Vesikel nimmt während seines Wachstums verschiedene Formen an, die als Kommakörperchen und S-Körperchen bezeichnet werden. Das distale Ende des S-Körperchens fusioniert mit dem Ureterepithel und verknüpft dadurch das spätere Nephron mit dem Sammelrohrsystem. Das proximale Ende des S-Körperchens tritt in engen Kontakt mit endothelialen Zellen und umschließt im zukünftigen Nephron als Bowman-Kapsel das glomeruläre Gefäßknäuel (siehe Abbildung 1.2). Während des radialen Wachstums der Niere werden in Abhängigkeit zur Verzweigungsmorphogenese der Ureterknospe kontinuierlich neue Nephrone an der Ureterspitze induziert. Beim Kappenmesenchym handelt es sich um eine sich selbst erneuernde Vorläufer Zellpopulation. Die nach der Nephroninduktion verbleibenden Zellen erneuern sich und stehen der folgenden Ureterknospe zur Verfügung. Die Induktion neuer Nephrone findet in der so genannten Nephrogenen Zone statt. Sukzessive Zyklen der Nephroninduktion führen, zusammen mit der simultanen Ureterverzweigung zum Auswachsen der Niere. Die Reife nephrogener Strukturen nimmt somit zur Medulla hin graduell zu (Bouchard, 2004;

Costantini, 2006; Costantini and Shakya, 2006; Dressler, 2006; Grobstein, 1956; Saxen, 1987; Schedl, 2007).

Der Prozess der Nephrogenese dauert bis zum postnatalen Tag (P) 3 an. Nephrogene Vorläuferzellen differenzieren während der finalen Runde der Nephrogenese vollständig in nephrogene Strukturen und Nephronen können zu einem späteren Zeitpunkt nicht nachgebildet werden (Hartman et al., 2007; Little and Bertram, 2009). Die finale Anzahl der Nephronen beträgt in der Maus im Durchschnitt 14.000 pro Niere (Treuting and Dintzis, 2012).

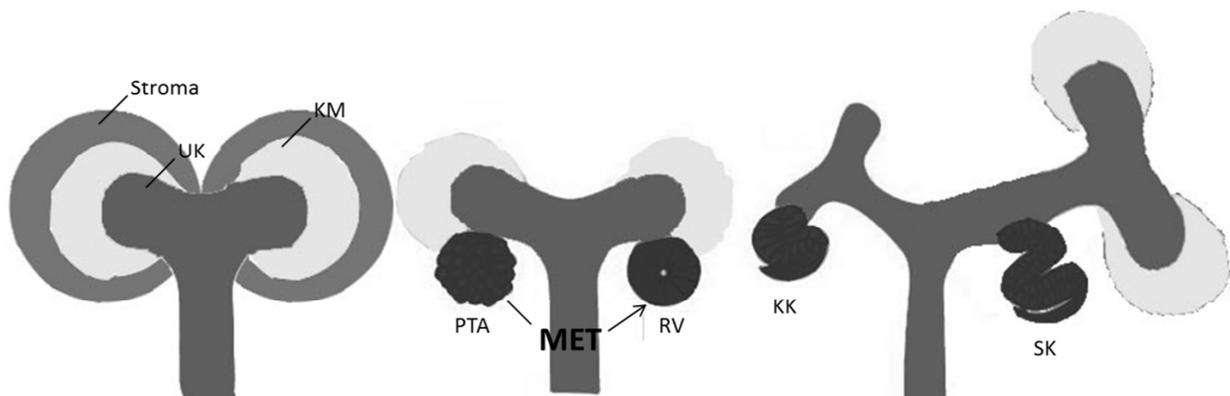


Abbildung 1.2: Die Entwicklung der metanephrischen Niere. Die Verzweigungsmorphogenese und die simultane Nephroninduktion. KK, Komma-Körperchen, KM, Kappenmesenchym, PTA, prä-tubuläres Aggregat, RV, renales Vesikel, SK, S-Körperchen, UK, Ureterknospe

1.3.1 Molekulare Steuerung der Nierenentwicklung

Die molekulare Steuerung der Nierenentwicklung basiert auf reziproken Wechselwirkungen zwischen der Ureterknospe und dem Kappenmesenchym. Diese regulieren das Auswachsen und die Verzweigungsmorphogenese der Ureterknospe einerseits sowie das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Kappenmesenchym Zellen andererseits. Dabei stimulieren Signale aus dem Kappenmesenchym und dem Stroma die Verzweigungsmorphogenese des Ureterepithels. Gleichzeitig wird die mesenchymale-epitheliale Transition durch Faktoren aus der Ureterknospe und dem Stroma induziert. Mit jedem Verzweigungsereignis kommt es zur Induktion neuer Nephronen (Carroll and Das, 2013; Carroll et al., 2005; Mugford et al., 2008).

Um die koordinierte Entwicklung spezifischer Zelltypen gewährleisten zu können, müssen die Vorläuferpopulationen zunächst molekular etabliert werden.

1.3.1.1 Spezifizierung des renalen Schicksals

Signale aus dem benachbarten axialen sowie dem lateralen Plattenmesoderm gelten als initiale Regulatoren für die Expression von Musterungsgenen des intermediären Mesoderms (James and Schultheiss, 2005; Kim and Dressler, 2005; Vigneau et al., 2007). Die überlappenden Expressionsdomänen des ersten bekannten intermediären Mesoderm-Markers *Osr1* sowie die für die epitheliale Transformation (zur Ausbildung des nephrischen Ganges) verantwortlichen *Pax2*, *Pax8*, und *Lhx1* gelten dabei als wichtigste Initiatoren der frühen Musterung des intermediären Mesoderms (James et al., 2006; Shawlot and Behringer, 1995), ihre epistatischen Beziehungen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Dressler, 2009).

Die *Osr1* Expression ist nach Ausbildung des metanephrischen Mesenchyms und des nephrischen Ganges auf den mesenchymalen Anteil begrenzt (James et al., 2006; Mugford et al., 2008). Hier ist *Osr1* entscheidend an der Aufrechterhaltung der mesenchymalen Linie, sowie an der Expression früher Schlüsselregulatoren des intermediären Mesoderms und metanephrischen Mesenchyms wie *Lhx1*, *Pax2*, *Wt1*, *Eya1*, *Six2* und *Gdnf* beteiligt (James et al., 2006; Wang et al., 2005).

Pax2 und *Pax8* werden ebenfalls bereits im intermediären Mesoderm exprimiert und wirken vermutlich in redundanter Weise, um die Expression von *Lhx1* ab E9.5 im nephrischen Gang aufrecht zu erhalten (Bouchard et al., 2002). *Lhx1* ist notwendig für die Musterung des nephrischen Ganges, sowie aller weiteren epithelialen Gewebe die während der metanephrischen Entwicklung gebildet werden (Kobayashi et al., 2005; Tsang et al., 2000). In Abwesenheit von *Lhx1* unterbleibt die Ausbildung des nephrischen Ganges und aller folgenden nephrischen Strukturen sowie der Gonaden (Shawlot and Behringer, 1995). Der ebenfalls durch *Pax2/8* kontrollierte Transkriptionsfaktor *Gata3* dient der Induktion der Rezeptor Tyrosin Kinase *Ret*, welches die spätere Invasion der Ureterknospe ins metanephrisches Mesenchym steuert (Grote et al., 2006).

1.3.1.2 Das Eindringen der Ureterknospe in das umgebende metanephrische Mesenchym initiiert die renale Entwicklung

Nach der Ausbildung des nephrischen Ganges migriert dieser nach kaudal und es kommt zu Ausstülpung der Ureterknospe, auf Höhe der Hintergliedmaßen in das metanephrische Mesenchym (siehe 1.3). Dabei spielt die exakte Position der Ureterknospe eine sehr wichtige Rolle und muss präzise reguliert werden. Fehler im Auswachsen der Ureterknospe führen zu einem blind endenden Ureter, renaler Agnese oder ektopischen Ureterknospen und daraus resultierenden Duplex Nieren (Mackie and Stephens, 1975; Uetani and Bouchard, 2009). Der *Gdnf/Ret* Signalweg gilt als wichtigster Regulator, sowohl für das initiale

Eindringen des Ureterknospe in das metanephrische Mesenchym als auch der späteren Verzweigungsmorphogenese. Der vom metanephrischen

Mesenchym sekretierte Ligand Gdnf aktiviert den von der Ureterknospe exprimierten Ret-GFRa1 Rezeptor Komplex und steuert dadurch das Auswachsen Ret positiver epithelialer Zellen in Richtung des mesenchymalen Gdnf-Signals. Das Fehlen einer jeder dieser Komponenten verhindert ein Auswachsen der Ureterknospe und führt zu renaler Agenese (Cacalano et al., 1998; Costantini and Shakya, 2006; Enomoto et al., 1998; Pichel et al., 1996; Sainio et al., 1997; Schuchardt et al., 1994).

Ein komplexes Netzwerk der Stimulation und Inhibition ist notwendig um die scharf umrissene Lokalisation des Gdnf Signals und somit die Position der Ureterknospe zu determinieren. Die Begrenzung der *Gdnf* Expressionsdomäne erfolgt durch lateral zum metanephrische Mesenchym exprimierten Repressoren. Es konnte gezeigt werden, dass die *Gdnf* Expression sowohl durch Transkriptionsfaktoren der Forkhead Familie (*Foxc1/2*) (Kume et al., 2000) als auch durch das Transmembranprotein Slit2 und seinen Rezeptor Robo2 anterior reprimiert wird (Grieshammer et al., 2004). Ein weiterer Regulator der Ureterknospen Positionierung ist das zur Tgf β Familie gehörende BMP4. Dieser wird in mesenchymalen Zellen, welche den nephrischen Gang und den Ureterstiel umgeben, exprimiert. Bmp4 beeinflusst nicht die Expression von Gdnf selbst, sondern wirkt auf das Epithel mittels negativer Regulation der Gdnf/Ret Signalkaskade (Miyazaki et al., 2000, 2003). Die Bmp4 Expression wird lokal durch den im metanephrischen Mesenchym exprimierten BMP Inhibitor Gremlin1 geblockt (Michos et al., 2007).

Die Induktion und Aufrechterhaltung von Gdnf innerhalb des metanephrische Mesenchym wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie Eya1, Pax2 und Hox11-Paraloge gesteuert (Brophy et al., 2001; Torres et al., 1995; Wellik et al., 2002; Xu et al., 1999). Das Fehlen eines jeden dieser Transkriptionsfaktoren resultiert in der Abwesenheit von Gdnf. Jedoch gibt es keinen Hinweis darauf, dass diese Faktoren sich wechselseitig regulieren (Bouchard, 2004). Für die Spezifikation des metanephrischen Mesenchyms tritt Eya1 in einen Komplex mit Six1 um möglicherweise die Expression von Grem1 und somit die Expression von Gdnf positiv zu regulieren (Nie et al., 2011; Xu et al., 1999). *In vitro* Experimente zeigten außerdem, dass die Koexpression von Six1 und Eya1 zu einem signifikanten Anstieg der Promotoraktivität des *Sall1* Promotors führt (Chai et al., 2006), ein Gen ohne das die Ureterknospen Invasion nur unvollständig abläuft (Nishinakamura et al., 2001). *Sall1* wurde erst kürzlich als ein Zielgen des im metanephrischen Mesenchym exprimierten Transkriptionsfaktors Wt1 entdeckt (Motamedi et al., 2014a). Wt1 gilt als ein vom Gdnf/Ret Signalweg unabhängiger Faktor. Embryonen mit einem homozygoten Verlust des Wt1 Allels (*Wt1*^{-/-}) zeigen zwar eine korrekte Spezifizierung des metanephrischen Mesenchyms, jedoch kein Auswachsen der Ureterknospe, obschon die Zellen weiterhin unverändert Gdnf exprimieren. Das metanephrische Mesenchym dieser Mäuse wird daraufhin

apoptotisch und die Nierenentwicklung unterbleibt. (Donovan et al., 1999; Kreidberg et al., 1993). Dass es sich um *Wt1* (und nicht um Signale aus der Ureterknospe) handelt, welches für das Überleben des metanephrischen Mesenchyms benötigt wird konnten Donovan und seine Kollegen zeigen indem sie explantiertes *Wt1*^{-/-} metanephrisches Mesenchym bei E10.5 mit wildtypischen Ureterknospen rekombinierten, ohne das Mesenchym dadurch retten zu können (Donovan et al., 1999).

1.3.1.3 Die Verzweigungsmorphogenese wird durch mesenchymale Signale gesteuert

Sobald die Ureterknospe durch das Eindringen in das umgebende metanephrische Mesenchym die Nierenentwicklung induziert hat, beginnt sie sich dichtom zu verzweigen. Das metanephrische Mesenchym wird in ein der Ureterknospe anliegendes *Six2* positives (*Six2*⁺) Kappenmesenchym und ein peripheres *Foxd1* positives (*Foxd1*⁺) Stroma unterteilt. Signale aus beiden mesenchymalen Untereinheiten wechselwirken sowohl miteinander als auch mit der Ureterknospe.

Der *Gdnf/Ret* Signalweg bleibt auch nach der Ausknospung des Ureters ein kritischer Regulator der Ureterverzweigung. *Gdnf* wird in den Zellen des Kappenmesenchyms durch das aus der Ureterknospe sekretierte *Wnt9b* aufrechterhalten. Durch die Aktivierung des epithelialen *Gfra/Ret* Rezeptor Tyrosin Kinase Komplexes wird eine Signalkaskade initiiert, die zu einer positiven Rückkopplungsschleife führt. Einerseits wird die Expression von *Ret* selbst und damit das Auswachsen der Ureterknospe reguliert. Andererseits wird die Expression von *Wnt11* im Epithel kontrolliert, welches wiederum auf das Kappenmesenchym wirkt und so die *Gdnf*-Expression aufrechterhält (siehe Abbildung 1.4) (Pepicelli et al., 1997a).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Retinsäure (RA) aus dem kortikalen Stroma wesentlich zur Verzweigungsmorphogenese beiträgt (Vilar et al., 1996). RA, ein starker transkriptioneller Aktivator, wird in den *Foxd1*⁺ Zellen mittels der Dehydrogenase *Aldh1a2* synthetisiert. Die parakrine RA Signalwirkung ist notwendig um die Expression von *Ret* in der Knospe aufrechtzuerhalten (Rosselot et al., 2010a).

Der RA Signalweg wirkt nicht nur auf benachbarte Gewebe, sondern steuert auch die Regulation von Zielgenen innerhalb des Stromas. Dabei wird über autokrine Signalübertragung *Ecm1* innerhalb des Stromas aktiviert. *Ecm1* fungiert als sekretierter Faktor auf die Begrenzung der *Ret* Expression auf die Ureterspitze und gewährleistet dadurch eine reguläre Verzweigungsmorphogenese (siehe Abbildung 1.4) (Paroly et al., 2013).

1.3.1.4 Der Erhalt des Kappenmesenchyms und die Nephrogenese erfordern Signale aus benachbarten Geweben

Durch das Eindringen der Ureterknospe wird das metanephrische Mesenchym in zwei Kompartimente unterteilt. Das um das Uretereepithel kondensierte Kappenmesenchym und das periphere Stroma (Little and McMahon, 2012). Es wird angenommen, dass permissive Signale aus dem Uretereepithel die Kondensation des metanephrischen Mesenchyms, die zur Bildung des Kappenmesenchyms führt, stimulieren. Um welche Signale es sich dabei handelt ist jedoch unklar.

Das Kappenmesenchym ist in Subkompartimente unterteilt, welche sich im Differenzierungsstatus der Zellen voneinander unterscheiden. Das $Cited1^+/Six2^+$ Kompartiment ist durch ein hohes proliferatives Potential charakterisiert. Hin zum $Six2^+$ Kompartiment in dem Zellen aggregieren und eine mesenchymale-epitheliale Transition durchlaufen nimmt das proliferative Potenzial zugunsten einer höheren Differenzierung der Zellen ab (Brown et al., 2013; Kobayashi et al., 2008; Mugford et al., 2008). Ein Gradient zwischen neu generierten Vorläuferzellen und differenzierten Zellen ist erforderlich und muss zeitlich sowie räumlich strikt kontrolliert werden (siehe Abbildung 1.3). Ein prominentes epitheliales Signal, welches im Verdacht steht sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation der Kappenmesenchym Zellen zu regulieren ist $Wnt9b$.

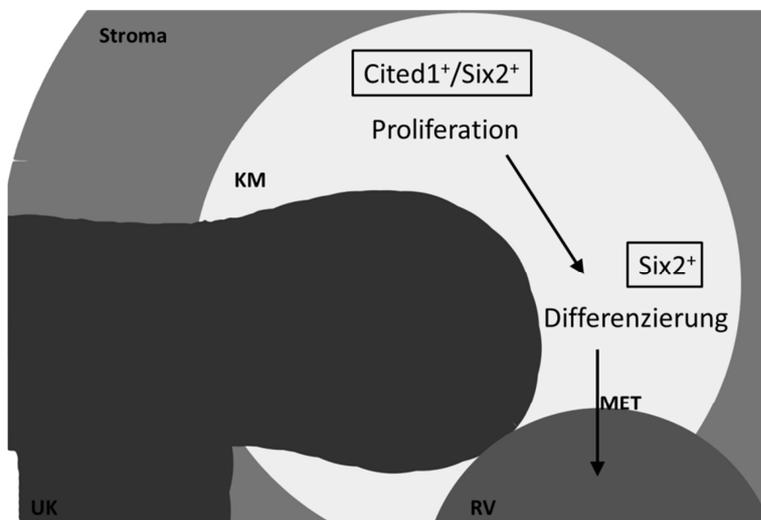


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Unterteilung des Kappenmesenchyms. Die Entwicklung der metanephrischen Niere setzt die Interaktion von drei involvierten Geweben voraus. Das Kappenmesenchym ist in ein oberes $Cited1^+/Six2^+$ und ein ventrales $Six2^+$ Subkompartiment unterteilt. KM, Kappenmesenchym, MET, Mesenchymale zu epitheliale Transition, RV, Renales Vesikel, UK, Ureterknospe

1.3.1.4.1 Wnt9b, ein epitheliales Signal mit variablen Effekten auf die Zellen des Kappenmesenchyms

Der kanonische Wnt Signalweg führt zur Stabilisierung zellulärer Level des transkriptionellen Koaktivators β -catenin. Die DNA-Bindung wird durch sequenz-spezifisch bindende Tcf/Lef Faktoren vermittelt. Diese werden in der Abwesenheit von β -catenin durch transkriptionelle Repressoren, den so genannten Groucho/TLE Faktoren gebunden, wodurch die Transkription von Wnt-Zielgenen inhibiert wird (Behrens et al., 1996; Daniels and Weis, 2005; Eastman and Grosschedl, 1999). In unstimulierten Zellen wird β -catenin durch den Axin/Gsk-3 β Komplex phosphoryliert und anschließend degradiert. Durch die Bindung eines Wnt-Proteins an seinen Frizzled (Fz) Rezeptor wird die Gsk-3 β Kinase Aktivität inhibiert. β -catenin kann im Zytoplasma sowie dem Nukleus akkumulieren und die Transkription von Wnt Zielgenen mittels der Bindung von Tcf Faktoren aktivieren (Willert et al., 1999).

Der Wachstumsfaktor Wnt9b wird von den Zellen der Ureterknospe sekretiert und induziert eine β -catenin vermittelte Genexpression in den Zellen des Kappenmesenchyms. Das Wnt9b-Signal ist notwendig und hinreichend um die Differenzierung von Kappenmesenchym Zellen am ventralen Pol der Ureterknospe zu induzieren. Dabei kommt es zur Induktion von Differenzierungsgenen wie *Wnt4*. Wnt4 wiederum steuert über autokrine Signalübertragung die mesenchymale-epitheliale Transition und damit die Epithelialisierung von prätubulären Aggregaten (siehe Abbildung 1.4) (Carroll et al., 2005; Kispert et al., 1998a; Stark et al., 1994a). Im Gegensatz dazu muss das Wnt9b/ β -catenin Differenzierungssignal in *Cited1*⁺ Zellen unterdrückt werden, um die Expansion der Vorläuferzellen im oberen Teil des Kappenmesenchyms zu gewährleisten. Es gibt Hinweise auf unterschiedliche Signalwirkung von Wnt9b in den jeweiligen Kappenmesenchym Subkompartimenten. So werden Zielgene der Klasse I (Differenzierungsgene) im ventralen Bereich von Zielgenen der Klasse II (Vorläufergene) im *Cited1*⁺ Bereich unterschieden (Karner et al., 2011). Demnach unterstützt Wnt9b im oberen *Cited1*⁺ Bereich die Proliferation nephrogener Vorläufer (siehe Abbildung 1.4). Wie das gleiche Molekül diese scheinbar gegensätzlichen Prozesse steuert ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Einige Modelle bieten jedoch Erklärungsansätze für die Wnt9b/ β -catenin vermittelte Signalübertragung im Kappenmesenchym.

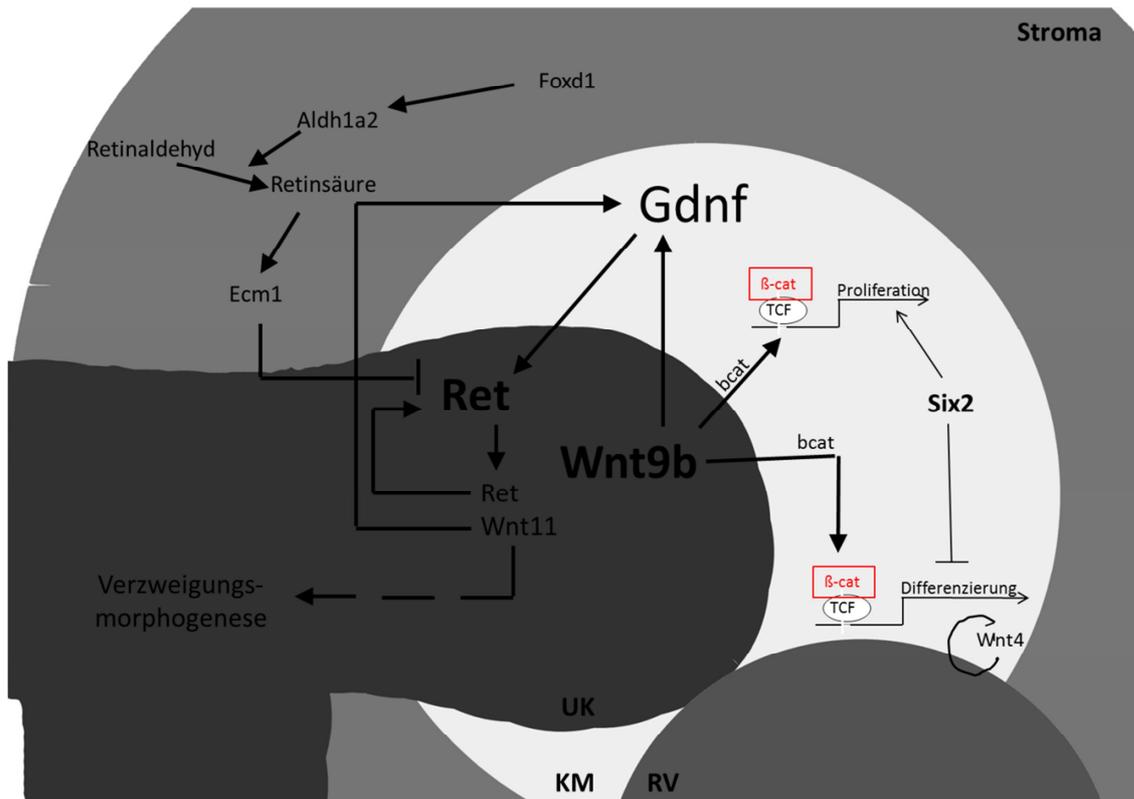


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der molekularen Steuerung der Nierenentwicklung einiger prominenter Signalkaskaden Der epithelial exprimierte, β -catenin vermittelte Wnt9b-Signalweg beeinflusst sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation der Kappenmesenchymzellen. Die Aktivierung des epithelialen Gfra/Ret Rezeptor Tyrosin Kinase Komplexes wird durch Wnt9b induziertes Gdnf gesteuert. Das Retinsäure Zielgen Ecm1 führt zur Begrenzung der Ret Expression auf die Ureterspitze. KM, Kappenmesenchym, RV, Renales Vesikel, UK, Ureterknospe

Zwei Modelle gehen von einer Rolle des im Kappenmesenchym exprimierten Transkriptionsfaktors Six2 aus. Demnach ist dieser für die Aufrechterhaltung des nephrogenen Vorläuferstatus verantwortlich indem er Differenzierungsgene im oberen Cited1⁺ Teil des Kappenmesenchyms unterdrückt. Wie β -catenin ist auch Six2 in der Lage an Tcf/Lef Faktoren zu binden und dadurch zur Steuerung der Genexpression beizutragen (Park et al., 2012).

Die Gruppe um Park (Park et al., 2012) geht von Unterschieden in den Proteinkonzentrationen von Six2 und nuklearem β -catenin innerhalb des Kappenmesenchym aus. Demnach ist die Expression von Six2 im Cited1⁺ Bereich sehr stark und nimmt mit dem zunehmenden Differenzierungsstatus der Zellen im ventralen Kappenmesenchym ab. Andererseits ist die Wnt vermittelte Stabilisierung von β -catenin im ventralen Teil des Kappenmesenchyms stärker als in den oberen Cited1⁺ Zellen. Dies wird auf die Wnt9b

vermittelte Wnt4 Aktivierung zurückgeführt, welche in einem sich selbst verstärkenden Mechanismus zusätzlich die Konzentration nuklearen β -catenin erhöht (Park et al., 2012).

Darauf aufbauend wurde das bereits im intermediären Mesoderm exprimierte *Osr1* als weiterer Faktor beschrieben, welcher zusammen mit *Six2* einen starken transkriptionellen Repressor-Komplex bildet. Zusammen mit Groucho Korepressoren bindet dieser an Tcf/Lef Faktoren und inhibiert so die β -catenin vermittelte Genexpression (siehe Abbildung 1.3). Die *Osr1* Expression nimmt innerhalb des Kappenmesenchyms nach ventral hin ab. Der Schwellenwert für eine Verdrängung des Repressor-Komplexes an Tcf-Faktoren durch β -catenin an Tcf wird unterschritten und *Wnt9b* Zielgene können exprimiert werden (Xu et al., 2014).

Für beide Modelle spricht, dass die funktionelle Inaktivierung sowohl von *Six2* als auch von *Osr1* zur einer vorzeitigen und ektopischen Differenzierung des gesamten Kappenmesenchyms in epitheliale nephrogene Strukturen führt (Self et al., 2006; Xu et al., 2014).

Da *Six1* nach der Initiation der Verzweigungsmorphogenese herunterreguliert wird, ist es wahrscheinlich *Six2*, welches für die nukleare Translokation von dem im Kappenmesenchym exprimierten Transkriptionsfaktor *Eya1* verantwortlich ist (siehe 1.3.1.2). Es wird angenommen dass *Eya1* und *Six2* kooperativ an der Aufrechterhaltung des Vorläuferstatus der *Cited1*⁺ Zellen im Kappenmesenchym verantwortlich sind. *Eya1* wird wiederum durch *Wnt9b* positiv reguliert was auf eine Mitwirkung von *Wnt9b* auf die Proliferation der Kappenmesenchym Zellen hindeutet (Nie et al., 2011; Park et al., 2012).

Ein weiteres Modell geht davon aus, dass die obere *Cited1*⁺/*Six2*⁺ Vorläuferpopulation zunächst refraktär gegenüber *Wnt9b* Differenzierungssignalen aus der Ureterknospe ist. Diese muss zunächst einen Prozess durchlaufen, der die Zellen sensibilisiert, um induzierbar für *Wnt9b* zu werden. pSmad vermittelte *Bmp7* Signaltransduktion ist demnach notwendig für die Transition proliferativer *Cited1*⁺ Zellen in ein Kompartiment, welches sensibel für die Induktion durch das epitheliale Differenzierungssignal ist (Brown et al., 2013).

1.3.1.4.2 Epitheliale und mesenchymale Faktoren sichern den Erhalt der Kappenmesenchym Zellen

Wie Explantationsexperimente, in denen die Ureterknospe mechanisch vom Kappenmesenchym abgetrennt wird zeigen, stirbt isoliertes Kappenmesenchym apoptotisch (Koseki et al., 1992). *Fgf20* gilt als wichtigster Faktor der dem Absterben von Kappenmesenchym Zellen entgegenwirkt und für die Aufrechterhaltung der adäquaten Zellzahl verantwortlich ist (Barak et al., 2012). Dieser wird von Zellen

des Kappenmesenchyms exprimiert. Gesteuert wird seine Expression vermutlich von den in der Ureterknospe exprimierten Faktoren *Fgf2* und *9* (Brown et al., 2011).

Ein weiterer Faktor, welcher die Expression von *Fgf20* im Kappenmesenchym positiv reguliert ist *Wt1*. *Wt1* ist im gesamten Kappenmesenchym, sowie im proximalen Teil des sich entwickelnden Nephrons exprimiert. Seine Expression wird in reifen Podocyten aufrechterhalten. In der frühen renalen Entwicklung trägt *Wt1* als Anti-apoptotischer Faktor (siehe 1.3.1.1) zum Erhalt des metanephrischen Mesenchyms bei, indem er im metanephrischen Mesenchym verschiedene *Fgf*'s positiv reguliert. Diese *Fgfs* wiederum reprimieren das pro-apoptotische pSmad vermittelte *Bmp4* Signal im metanephrischen Mesenchym (Motamedi et al., 2014a).

Nach E13 wird die *Bmp4* Expression herunterreguliert und *Bmp7* übernimmt die Rolle der pSmad vermittelten Signalübertragung. Zu diesem Zeitpunkt vermittelt *Bmp7/pSmad* jedoch nicht Apoptose in mesenchymalen Zellen, sondern fördert die Differenzierung der Kappenmesenchym Zellen (siehe 1.3.1.4.1) (Brown et al., 2013). Auch *Wt1* reguliert zu einem späteren Zeitpunkt der Nierenentwicklung die Differenzierung der Kappenmesenchym Zellen durch die Kontrolle von Differenzierungsgenen wie *Wnt4* (Essafi et al., 2011a; Sim et al., 2002).

1.3.1.4.3 Signale aus dem Stroma tragen zur Steuerung der Nephrogenese bei

Beim Hippo Signalweg handelt es sich um eine hochkonservierte Kinase Kaskade die das Gewebewachstum über die subzelluläre Lokalisation von Yap kontrolliert. Ist der Signalweg aktiv, wird Yap phosphoryliert und liegt zytoplasmatisch vor. Die Deaktivierung des Hippo Signalwegs führt zur nuklearen Translokation von Yap und in der Folge zu erhöhter Proliferation. Im speziellen Fall der Nephrogenese ist die nukleare Lokalisation von Yap jedoch offensichtlich an der Differenzierung der Kappenmesenchym Zellen und der Nephron Induktion beteiligt (Reginensi et al., 2013). Die Gruppe um Das (Das et al., 2013) postuliert eine mögliche Rolle des im Stroma lokalisierten *Fat4*, bei der nuklearen Lokalisation von Yap in den Kappenmesenchym Zellen. Sie propagieren eine direkte Verbindung zwischen nuklearem Yap und dem von *Wnt9b* vorangetriebenen Differenzierungsprozess. Eine andere Hypothese widerspricht jedoch einer Interaktion von *Fat4* und Yap. *Fat4* hemmt demnach den Selbsterneuerungsprozess der Kappenmesenchym Zellen und unterstützt den Differenzierungsprozess unabhängig von Yap (Bagherie-Lachidan et al., 2015).

Wie Genmutationen zu schwerwiegenden Defekten, den so genannten angeborenen Fehlbildungen der Nieren und ableitenden Harnwege führen, ist Gegenstand intensiver Forschung. Dabei resultieren molekulare Dysbalancen in einem breiten Spektrum renaler Misbildungen sowie Fehlfunktionen und reichen von einer verminderten Anzahl an Nephronen und hypoblastischen Nieren bis hin zur Ausbildung von Vorläuferzelltumoren (Wilms' Tumor), Hydronephrose, sowie Hydro,- und Megaureter (Airik and Kispert, 2007; Dressler, 2006; Haber et al., 1990; Palacios Loro et al., 2015; Sharma et al., 2015).

1.4 Der Homöodomänen Transkriptionsfaktor Uncx

Der Homeodomänen Transkriptionsfaktor Uncx ist während der gesamten Entwicklung der Niere in Zellen des Kappenmesenchyms sowie den Nephronvorläufern exprimiert. Uncx wurde erstmals 1997 kloniert und charakterisiert (Rovescalli et al., 1996). Er weist eine 88%ige Sequenzidentität zu der Unc-4 Homöodomäne von *C. elegans* auf (Rovescalli et al., 1996). Der Verlust von *Unc-4* führt bei *C. elegans* zu einer Beeinträchtigung des Bewegungsapparates da Mutationen im *Unc-4* Gen zu einer gestörten Rückwärtsbewegung führen (Winnier et al., 1999).

In der Maus wird Uncx während der embryonalen Entwicklung im ersten Branchialbogen, dem Meso und Metanephros, im ersten Finger der Vordergliedmaßen und neuroektodermalem Gewebe wie Rückenmark, Ohrplakode, Mittel- und Hinterhirn exprimiert. Dieses breit gefächerte Expressionsspektrum deutet auf eine mannigfaltige Rolle von Uncx während der murinen Embryogenese hin (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Die murine Funktion von Uncx wurde erstmals für die Entwicklung der Somiten beschrieben. Ab E9.5 wird *Uncx* in der gesamten posterioren Hälfte neu gebildeter Somiten exprimiert und anschließend im kaudalen Sklerotom sowie dessen Derivaten aufrechterhalten, welche zu Teilen der Wirbelsäule differenzieren (Mansouri et al., 1997; Neidhardt et al., 1997). Mäuse, welche homozygot mutant für *Uncx* sind, sterben bereits kurz nach der Geburt aufgrund schwerwiegender Missbildungen des axialen Skelets und daraus resultierenden Störungen der Atmungsfunktion. Ihnen fehlen Wirbelelemente die aus dem posterioren lateralen Sklerotom hervorgehen, Pedikel und proximale Rippen (Leitges et al., 2000; Mansouri et al., 2000). Dieser Phänotyp resultiert aus einer Anteriorisierung der Somiten in Abwesenheit der kaudalen *Uncx* Expression. Dll1, der Aktivator des Notch Signalwegs ist für die Initiation der *Uncx* Expression in der kaudalen Hälfte der Somiten verantwortlich. Uncx reguliert wiederum die kaudale Expression von *Dll1* und dadurch den Notch Signalweg in einer positiven Rückkopplungsschleife. In der *Uncx*-Mutante können posteriore Charakteristika der Somiten nicht länger aufrechterhalten werden und es kommt zu einer Anteriorisierung der Somiten (Barrantes et al., 1999; Mansouri et al., 2000). Dazu gehört auch die Ausweitung des in der anterioren Somitenhälfte exprimierten Tbox Transkriptionsfaktors Tbx18. Als

Gegenspieler von *Uncx* führt dessen Abwesenheit zu einer Ausweitung der *Uncx* Expression nach anterior und einer Posteriorisierung der Somiten (Bussen et al., 2004; Schmidt, 2011).

Während der Entwicklung des murinen Metanephros wird *Uncx* in den Zellen des Kappenmesenchyms und den sich entwickelnden Nephronen exprimiert. Die Expression wird in diesen Strukturen bis E18.5 aufrechterhalten. Es gibt Hinweise auf eine Regulation von *Uncx* durch die in der metanephrischen Entwicklung involvierten Gewebe. Das epitheliale Wnt9b Signal, der in den Kappenmesenchym Zellen exprimierte Transkriptionsfaktor Wt1 sowie der Hippo Signalweg wurden als positive Regulatoren der *Uncx* Expression in den Zellen des Kappenmesenchyms beschrieben (Karner et al., 2011; Motamedi et al., 2014a; Reginensi et al., 2013).

Homozygote *Uncx*-mutante Nieren sind deutlich verkleinert und weisen weniger Nephrone auf. Welche Rolle *Uncx* während der embryonalen Entwicklung der murinen Niere spielt ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Obgleich die Rolle einiger Schlüsselregulatoren der metanephrischen Entwicklung bisher charakterisiert werden konnte, gibt es eine Vielzahl unbekannter Faktoren, die wesentlich auf die Feinregulation wechselseitiger Signalkaskaden einwirken. Die Frage, inwiefern kleine Veränderungen der kritischen Balance zwischen proliferierenden und differenzierenden Zellen des Kappenmesenchyms die Nierenentwicklung nachhaltig beeinflussen, soll im Folgenden adressiert werden. Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation soll die bislang unbekannt Rolle des Homeobox-Gens *Uncx* in der Entwicklung der murinen Niere analysiert werden. Dabei soll untersucht werden auf welchen Prozess der Entstehung und/oder Reifung von Nephronen *Uncx* einwirkt und welche Gene und Signalwege durch diesen Transkriptionsfaktor gesteuert werden.

Zu diesem Zweck sollten *Uncx* Funktionsverlust- und Funktionsgewinnmutanten phänotypisch charakterisiert werden, um anschließend die molekulare Rolle von *Uncx* während der Entwicklung des Metanephros funktionell zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1 Laborgeräte

Materialbezeichnung	Firma
Analysenwaage	Kern, Balingen, Deutschland
Computer Apple Macintosh iMac	Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Feinwaage GJ	Kern, Balingen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C, Liebherr Comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C, SANYO Ultra Low	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Gelddokumentationskammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelelektrophoresekammer SUB CELL GT mit Zubehör	Bio-Rad, München, Deutschland
Heizplatte	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Heizplatte MEDAX	Landgraf Laborsysteme, Langenhagen, Deutschland
Heizschüttler HLC	Landgraf Laborsysteme, Langenhagen, Deutschland
Hybridisierungs-ofen HB-1000 Hybridizer mit Kippschüttler	Ultra-Violet Products LTD., Cambridge, Großbritannien)
Inkubator, SANYO CO ₂ Incubator	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Ionenaustauscher	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Kippschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Kippschüttler see-saw rocker SSL4	Stuart, Stone, Großbritannien
Kreisschüttler MS1 Minishaker	IKA Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborflaschen (100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL)	DURAN, Wertheim/Main, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Makroskop Leica M420 mit Fujux Digital Camera HC-300Z	Leica, Wetzlar, Deutschland Fujifilm, Minato, Japan
Messzylinder (100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Metallgefäße	Werkstatt der Medizinischen Hochschule Hannover, Hannover, Deutschland
Mikropipetten (0.5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop Leica DM 5000 B mit - UV-Lampe - Digitalkamera Leica DFC300 FX	Leica, Wetzlar, Deutschland

Mikroskop Leica DMI 6000 B mit - Lampe Leica CTR 6000 - Digitalkamera Leica DFC350 FX	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DM LB	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Jung RM2035	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Mikrotom Leica RM2155	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Mikrowellenofen MW7839	Severin, Sundern, Deutschland
pH-Meter inoLab pH Level 2	WILDTPW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe, Eppendorf Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Rollschüttler Cat RM5	Schröder & Henke, Wiesloch, Deutschland
Rotationsschüttler Rotator SB2 und SB3	Stuart, Staffordshire, Großbritannien
Schütteltisch 3015	GfL, Burgwedel, Deutschland
Software Adobe Photoshop CS4 Extended, Version 11.0	Adobe Systems, San José, Kalifornien, USA
Software Leica Application Suite (LAS)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Software Leica Firecam, Version 1.9.1	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Software MacVector, Version 13.0.7	MacVector, Inc., Cary, North Carolina, USA
Software Microsoft Office for Mac 2011, Version 14.4.4	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Stereomikroskop MZ 7.5	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir HA 2448 GS	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermoblock Eppendorf ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermocycler peqSTAR 96	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad 1052	GfL, Burgwedel, Deutschland
Wasserbad 1083	GfL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Firma
Aluminiumfolie	Novelis Deutschland GmbH - Ohler Verpackungen, Plettenberg, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Handschuhe, puderfreie Nitriluntersuchungshandschuhe STERLING	Kimberly-Clark, Roswell, Georgia, USA
Handschuhe, puderfreie Untersuchungshandschuhe PURPLE NITRILE	Kimberly-Clark, Roswell, Georgia, USA
Handschuhe, weiße Nitriluntersuchungshandschuhe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Klarsichtfolie	Ecopla Benelux, Belgien

Labortücher	Kimberly-Clark Europe Limited / Professional Sector, Reigate, Großbritannien
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, Deutschland R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Parafilm	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
PCR-Reaktionsgefäße (200 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen, TipOne Filterspitzen (0.5-10 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (0.5-10 µL)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (10-200 µL, 100-1000 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1.5 mL, 2 mL)	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (5 mL)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipetten (3.5 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transwellplatten, 6, 12 und 24 Wells, mit Filtereinsätzen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Wachsstift ImmEdge Pen	Vector Laboratories LTD., Petersborough Großbritannien

2.2 Chemikalien

Alle Reagenzien wurden nach Herstellerangaben gelagert

Chemikalie	Firma
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Chloroform	J.T.Baker Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande
Deoxycholate	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Diethylidicarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	J.T.Baker Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Formamid	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
Glutamax	Gibco Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heparin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lithiumchlorid (LiCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T.Baker Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande
Mowiol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Nonidet P-40 (NP40)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Phenol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.3 Gebrauchsfertige Lösungen

Primer	Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
Block-Reagenz	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
BMPurple Alkalische Phosphatase Substrat	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Digoxigenin-Markierungsmix (DIG, 10x)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega Cooperation, Madison, Wisconsin, USA
Transkriptionspuffer (10x)	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
tRNS (10 µg / µL in DEPC-Wasser)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland

Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
Davina Eindeckmedium	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
primäre Antikörper	Abcam, Cambridge, Großbritannien
	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
sekundäre Antikörper (Fluorophor-gekoppelt)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Eosin Y-Färbelösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hämatoxylin-Färbelösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Permout	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

2.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
Proteinase K	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Taq DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SP6 RNA-Polymerase	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
T3 RNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
T7 RNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
DNase I	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Proteinase K	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
RNase A	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
(10 µg/µL in 1 M Natriumacetat, pH 5.2)	
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Fab	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

2.5 Antikörper

2.5.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Kaninchen-anti-Pax2	
Maus-anti-E-Cadherin	von Rolf Kemler's Labor
Rabbit-anti-Sox9	Millipore Chemicon
Kaninchen-anti-Six2	Proteintech
Maus-anti-NCAM(5B8)	DSHB
Kaninchen-anti-collagen, type IV	Millipore
Maus-anti-Jagged1	DSHB
Kaninchen-anti-uncx4.1	Gundula Griesel
Kaninchen-anti-AQP2	Andre Brändli

Fluorescein Lotus tetragonolobus Lectin (LTL)	
Fluorescein Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA)	
Kaninchen-anti-Wilm's Tumor Protein Rabbit pAB	Calbiochem
Maus-anti-Bromodeoxyuridine (BrdU)	Roche
2.5.2 Sekundäre Antikörper	
Antikörper	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa-555 konjugiert	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Biotin-Sp konjugiert	Dianova
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa-555 konjugiert	Invitrogen
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Biotin-SP konjugiertes Fab Fragment	Jackson ImmunoResearch
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa-488 konjugiert	Molecular Probes, Invitrogen
Ziege-anti-Maus-IgG, Biotin konjugiert	Jackson ImmunoResearch

2.6 Versuchstiere

Alle verwendeten Mäuse besaßen den genetischen NMRI Hintergrund. Folgende rekombinanten Allele fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Uncx^{LacZ}: beschrieben in Mansouri *et al.*, 2000 Development.

Uncx^{flox}: Michael Leitges, Ahmed Mansouri (Mansouri *et al.*, 2000 Development)

Hprt^{CAG::uncx}: Martina Schmidt (Dissertation, 2011)

Six2^{cre/+}: MGI: *Six2^{tm1(tTa,tetO-EGFP/cre)Amc}*, Kobayashi *et al.*, 2008

2.7 RNA-Hybridisierungssonden

2.7.1 RNA-Hybridisierungssonden aus linearisierten Plasmidkonstrukten

RNA-Hybridisierungssonden wurden aus folgenden linearisierten Plasmiden hergestellt:

Symbol	Gen-Name	Lin.-Nr.	Pol.
Aqp2	aquaporin 2	L0875	T7
Aldh1a2	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A2	L0177	T7
Alx1	ALX homeobox 1	L1389	T7
Axin2	axin2	L0926	T7
Cdh4	cadherin 4	L1809	T7
Cited1	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1	L0107	T7
Dll1	delta-like 1 (Drosophila)	L0086	T3
Ecm1	extracellular matrix protein 1	L1020	T7
Etv4	ets variant 4	L0339	T3
Etv5	ets variant 5	L1028	Sp6

Eya1	eyes absent 1 homolog (Drosophila)	L1170	SP6
Fgf10	fibroblast growth factor 10	L0301	T3
Fgf9	fibroblast growth factor 9	L0392	SP6
FoxD1	forkhead box D1	L0437	T7
Gata6	GATA binding protein 6	L0460	T7
Gdnf	glial cell line derived neurotrophic factor	L0185	SP6
Hes1	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)	L0112	T7
Hey1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	L0291	SP6
Id1	inhibitor of DNA binding 1	L0659	T3
Id2	inhibitor of DNA binding 2	L0515	T3
Lhx1	LIM homeobox protein 1	L0351	T7
Meox2	mesenchyme homeobox 2	L0557	T3
Notch1	notch 1	L0097	T7
Notch2	notch2	L0098	T7
Nphs2	nephrosis 2, podocin	L0660	T7
Pax8	paired box 8	L0482	T3
Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	L1291	T3
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	L1353	T7
Pou3f3	POU domain, class 3, transcription factor 3	L0267	T7
Ret	ret proto-oncogene	L0187	T3
sFRP1	secreted frizzled-related protein 1	L0377	T7
SLC12a1	solute carrier family 12, member 1	L0320	T7
SLC12a3	solute carrier family 12, member 3	L0417	T7
SLC5a1	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	L0412	T7
Sp5	trans-acting transcription factor 5	L1412	T3
Uncx	UNC homeobox	L0083	T7
Wnt11	wingless-type MMTV integration site family, member 11	L0767	T3
Wnt4	wingless-type MMTV integration site family, member 4	L0153	T7
WT1	Wilms tumor 1 homolog	L0065	T3
Die angegebenen Nummern beziehen sich auf eine laborinterne Datenbank. Lin-Nr., Linearisierungs-Nummer, Pol, Polymerase			

2.7.2 RNA-Hybridisierungssonden aus genomischer DNA

DNA Oligonukleotide wurden von der Firma Integrated DNA Technologies bezogen. RNA-Hybridisierungssonden wurden mittels in vitro Transkription mit einer T7 RNA-Polymerase synthetisiert. Die spezifische Sequenz für den T7 Promotor wurde an das 5' Ende des Fwd Primers gehängt (TAATTACGACTCACTATAGGGAGA)

Gensymbol	Primer 1	Primer 2	Länge
Fam19a5	TTGCTCCCTGGAGTTGGAGG	CCATCCCTGCTGTCTTTGCC	1134
Itga8	CACATGGTTTGGCATTAGGGC	CCCAGAGGCTGGTGTGTGAC	1118
Slc12a2	AGGCCAGACCAACTTTCGG	ATCCGCGCAGCACAAGTACC	1080
Tfr	TGCAGTGAGTTGTGGCCAAG	TGGAATCCCATTATGCACGG	964
C1ql1	CAGCGTGATCCTGCATCTGG	ATAGCTTTGGTCAGACCGGGTG	572

Adamts16	ACCTGGTACCTCAGCACGGC	CCAATGCAGAGGGAGATGGG	1031
Dmrt3	AGGTCCTGCTGTCCAGTCGC	GCGATACGCCTCATGCAGTTC	1181
Hs3st3a1	GTGGTCCGGAAAGCACAAGG	CTGGCTCTGGACACCAAGGG	1132
Nefh	CTGCCAAGGAGAAGGCCAAG	GTGTACTGGGCAAGGGCCTG	1160
Nrsn1	CAGTGGGCTTTCTTGTC	TTCACATGGCAAAGGTAAGTGGC	1032
Nxph1	TGCATCTGAAGGAAGCAAGGG	CAGCCACCAAGGAAAGGCAG	1141
Olfm4	GATGAGCAAGCACTGTGGGC	CTTATGGTTGCCCTGGGACC	1083
Sel1l3	AGTGGCTCCTCTCCAGCACC	CTGCGTATTCCATTGCTGCC	854
Unc5a	TCCTCAACCTATGGGAGGCG	AGGATCAGGGAGGAGCCGTC	882
Vstm2l	TCCCACAAGCTTCGGCTGTC	TGGCCAGAGGTTTGAGCCAG	719
Crb2	TAGGAACCAAGGAGCGGCTG	ACCAGCCATCCTGCAGAAGC	1091
Lamc2	CTGAGATCCGCGCTGACAAG	GGATTGGGCTTGCAAAGGTG	1129
Etv1	CTAATGCTTCCGCTGCTGTC	TGCTTCCCTGGGTTTATTTG	674
Eva1a	CAGGGAGATCTGGATGAACG	TTCATGAATGAGGTGGGACC	686
She	TGTCCCTTCCGGTTACTGAG	AAGGCACCTGCATTACAACC	999
Mrvi1	CCTCTTCTCACCGCTCTTG	TTGTCTCGGACGTGCTTATG	755
Tnfrsf19	TGAGCAGTCTGGTGTCTGG	AAACTGGGTCAACCATGCTC	934
Etv1	CTAATGCTTCCGCTGCTGTC	TGCTTCCCTGGGTTTATTTG	674
Eya2	CCATGAGGGCCCTAGACACC	TGGAAGCCTAAACAACGGGC	504
Gfra1	GATGGTGTTACCGCTCTGG	GATGAGACATGGGCTGGCTG	1054
Alk	GGAGGAGAAAGTGCCCATGC	TGTCCATCTCCCTCTGGGTG	697
Cldn3	CAAGGCCAAGATCACCATCG	CAGCCCAGTTCTTGGGAAGG	580
Olfm4	GGGAAGGCAACCTAGGCATC	CTTATGGTTGCCCTGGGACC	857
Vav3	GAGCCTGCCATCTGGGAAAG	GGCCAATGAAATGCAACAGG	1392
Tor3a	TAGGGACCACCTAGCCCAGC	GGGGCTGGGCATCAGTAAAG	962
Igdcc3	GCCTGTGCTGCTACTGGACC	AGTCAGGCCAAAGAGGCTGC	974
Hpgd	AAGATCACGGCATCGAAAGG	ACATTCCCACCCATCAGACG	637
Cldn3	TTGTACGTGGGCTGGGCTG	ATGGCCCCTTTCATGGTTTG	507
Pcdh8	GGGCGTGTACTGCTGAGTGC	TCCCAATGAGCAATCCAACAC	786
Gabra3	AACCTTGCGGTGTGAGGTC	CCAACAATGGCAGGAAGCAG	1417
Gbx2	GTGTCAAGGCAGGCAACGC	AACGGAGACGTGCTTCCGAC	704
Lhfpl1	ACCTGTAGACTCGGCTGGGC	GCCCTCATCACTGGGAGTTCATG	965
Zswim4	ACCAGCCACTCTCGCTCAC	CAGGAAGGCTGTGAGCAGC	995
Zmat4	TGCAATCACACACAGCAGC	GCTCACTGGCTGTCCACGAC	991
Canx	TGGCCACACCTTTCTAGGG	AGACCCACGGAACCTTGAC	1106
Eaf1	GGACAGCCAGGGCCATACAG	CTCACTCCAGCACGTCACCG	1079
Eif2s1	TGTGCTGCTGCTTTGATGGAG	ATCCAGGGCCTTGACTTGC	1173

Länge: Fragmentlänge in bp

2.7.3 RNA-Hybridisierungssonden aus cDNA

DNA Oligonukleotide wurden von der Firma Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgien) bezogen. RNA-Hybridisierungssonden wurden mittels in vitro Transkription mit einer T7 RNA-Polymerase synthetisiert. Die spezifische Sequenz für den T7 Promotor wurde an das 5' Ende des Primer1 gehängt (TAATTACGACTCACTATAGGGAGA). Um ein für die in vitro Translation geeignetes DNA Template aus cDNA herzustellen musste zunächst cDNA aus mRNA synthetisiert werden (vgl. 2.8.7)

Gensymbol	Primer 1	Primer 2	Länge
Asgr1	TTTCCAGCACCTGGACAATG	TTTGTCTCACAGACCCAGCG	816
Ctnnd2	CAACATCGTCGTGTCCTCGG	ACTCCTGTGACCAGCTCCCG	1029
Reps1	AAAGCCTGATGCCCAAGCTG	TGGAGCCAGAGGTGTTGTGC	917
Saa2	TTCCAAGGTAAGCTGAGAAGGC	CACTGAGCGTCTCCATGCC	344
Tmem45b	ACTTCAAGGGCCATGCTCTCC	CACTCCTCATCCGAGCCACTC	829
Trim65	TCCCGCAACGTGAAGATGAG	GGTCCACGGCCGATGTTATC	1085
Nell1	CAGCAGAAGCCGTCCACCTC	AGCCTGGCTGGCAGGTACAG	1243
Epcam	CGCGGCTCAGAGAGACTGTG	GATCGGTAATGCCGGTGTCC	1083
Efcab12	GACATCATCATCTACCTCGG	CATCATAATAGGCATGGGTC	973
Nrxn3	CTCCTTCTCCTCCTGAATC	GTAGAACAGTCACAGGTGGG	1033
Rspo3	CATCCTTCAGCCAAGGGTAA	ACGGTTCTGGAAAGCACAAG	967

Länge: Fragmentlänge in bp

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Lösungen

Prozentangaben beziehen sich bei Lösungen von Feststoffen auf eine Gewichtseinheit pro Volumen, bei Flüssigkeiten auf eine Volumeneinheit pro Volumen. Alle Reagenzien wurden nach Herstellerangaben gelagert.

Alkalische Phosphatase-Puffer	4 mM NaCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.1% (v/v) Tween-20, 0.1 M Tris (pH 9.5)
Block-Lösung	2% Blocking Reagenz (Boehringer) in MAB
DEPC-H ₂ O	100µl/L DEPC in VE-Wasser
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Hybridisierungspuffer	50% Formamid, 5x SSC pH 7,0, 1x Denhardt's-Lösung, 0,1% Tween-20, 0,1mg/ml tRNA, 1x Heparin, in DEPC-H ₂ O
Ladepuffer (6x)	1x TAE, 60 mM EDTA, 50% (w/v) Glycerin, 0.25% (w/v) Xylencyanol
PBST, 1x, pH 7.2	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.7 mM KH ₂ PO ₄ , 0.1% (v/v) Tween-20
PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
Phenol-Chloroform	1 Vol. geschmolzenes Phenol, 1 Vol. Chloroform, ½ Vol. TE-Puffer
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 1x, pH 7.2	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.7 mM KH ₂ PO ₄

Proteinase-K-Puffer	100 mM TRIS HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 10% (w/v) SDS, 5 M NaCl
SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
TAE-Puffer (50x, pH 8.0)	2 M Trisbase, 2 M Essigsäure, 50 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM TRIS HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA
Mowiol	14.4g Mowiol, 29.28mL Glycerol, 36mL Wasser, 72mL 0.2 M Tris-HCl pH 8.5

2.8.2 DNA Präparation

Zur Präparation genomischer DNA dienten entweder Schwanzspitzenbiopsien oder Gewebe isolierter Embryonen. Das jeweilige Gewebe wurde in 300µl Proteinase-K-Lösung (vgl) inkubiert (56°C, ü.N.) und nach Zugabe von 300µl Phenol Chloroform gevortext und zentrifugiert (10 min, 13200 Upm). Der wässrige Überstand, welcher die auf gereinigte DNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in 600µl Ethanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13200 Upm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100µl TE-Puffer gelöst.

2.8.3 Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion diente hier der Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus genomischer DNA. Der Standardreaktionsansatz enthielt ca. 500ng genomische DNA, 10pmol der spezifischen Primer, 10nmol dNTPs und 1,5 U Tag-Polymerase (Sigma) und wurden anschließen mit Millipore-H₂O auf 50µl aufgefüllt. Folgende PCR-Protokolle wurden zur Genotypisierung durchgeführt:

Cre-PCR

PCR-Produkt: 726

bp

PCR-Ansatz:	1µl DNA (500 ng pro µl)	Programm:	95°C	5min
	10pmol Primer: GCC TGC ATT ACC GGT CGA TGC AAC GA		[95°C	45 sec
	10pmol Primer: GTGGCAGATGGCGCGGCAACACCATT		[63°C	45 sec
	10nmol dNTPs	35 Zyklen[[72°C	1min
	1µl Puffer (100mM TRIS HCl, pH 8,5; 10mM MgCl ₂ ; 500mM KCl; in 50% DMSO)		72°C	8min
	1µl Tag-Polµmerase		8°C	∞
	40µl Millipore-H ₂ O			

Hprt^{Uncx}-PCR

PCR-Produkt: 500 bp

PCR-Ansatz:	1µl DNA (500 ng pro µl)	Programm:	94°C	4min
	10pmol Primer: CTGCTTCCTTCACGACATTCAAC	[95°C	1 min
	10pmol Primer: TTCTTGCTCTACCCCATCACGC	35 Zyklen[63°C	1 min
	10nmol dNTPs	[72°C	1min
	5µl Puffer (100mM TRIS HCl, pH 8,5; 10mM MgCl ₂ ; 500mM KCl; in 35% DMSO)		72°C	10 min
	1µl Tag-Polymerase		8°C	∞
	40µl Millipore-H ₂ O			

Uncx^{Flox}-PCR

Mutantes Allel: 420 bp

Wildtyp-Allel: 310 bp

PCR-Ansatz:	1µl DNA (500 ng pro µl)	Programm:	94°C	4min
	10pmol Primer: TAG AAG CGA GGC CCG ATT GTA GT	[95°C	1 min
	10pmol Primer: CAG AAG GAA GCC TGA TCA TCA CAA C	35 Zyklen[65°C	1 min
	10pmol Primer: AAT TAG CAG AAG GCG CCA GTG TG	[72°C	1min
	10nmol dNTPs		72°C	10 min
	5µl Puffer (100mM TRIS HCl, pH 8,5; 20mM MgCl ₂ ; 500mM KCl; in 50% DMSO)		8°C	∞
	1µl Tag-Polymerase			
	40µl Millipore-H ₂ O			

Uncx^{LacZ}-PCR

Mutantes Allel: 1049 bp

Wildtyp-Allel: 744 bp

PCR-Ansatz:	1µl DNA (500 ng pro µl)	Programm:	95°C	5min
	10pmol Primer: TGACGTCAGAGCCGATTAGC	[95°C	45 sec
	10pmol Primer: ATAACTGCCGTCACTCCAGC	35 Zyklen[58°C	45 sec
	10pmol Primer: CATTGAACGCCTTCTCCAGC	[72°C	75 sec
	10nmol dNTPs		72°C	5 min
	5µl Puffer (100mM TRIS HCl, pH 8,5; 10mM MgCl ₂ ; 500mM KCl; in 50% DMSO)		8°C	∞
	1µl Tag-Polymerase			

40µl Millipore-H₂O

SRY-PCR

PCR-Produkt: 290
bp

PCR-Ansatz:	1µl DNA (500 ng pro µl)	Programm:	94°C	4min
	10pmol Primer: CAT GGA GGG CCA TGT CAA GCG		[94°C	30 sec
	10pmol Primer: TGT TGA GGC AAC TGC AGG CTG T	35 Zyklen[63°C	45 sec
	10nmol dNTPs		[72°C	1min
	5µl Puffer (100mM TRIS HCl, pH 8,5; 10mM MgCl ₂ ; 500mM KCl; in 50% DMSO)		72°C	10 min
	1µl Tag-Polmerase		8°C	∞
	40µl Millipore-H ₂ O			

2.8.4 DNA-Gelelektrophorese

Der PCR Ansatz wurde mit 10x Ladepuffer versetzt und in die Taschen eines 0,8% oder 1,5% Agarosegels gegeben. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wurde die DNA abhängig von ihrer Größe im Agarosegel aufgetrennt.

2.8.5 Herstellung von RNA-Hybridisierungs sonden

Die Hybridisierung endogener RNA erfolgte mittels Digoxigenin markierter RNA Sonden. Der Standardansatz für die in vitro Transkription enthielt 1µl DNA-Template (500ng/µl), 1µl 10x Transkriptionspuffer, 1µl 10x DIG Reaktions-Gemisch, 1µl 0,1 M DTT, 0,5µl RNAsin, 0,5 µl DNA abhängige RNA-Polmerase und 5µl Milipore H₂O. Nach einer zwei stündigen Inkubation (37°C) wurde das DNA Template mittels DNaseA verdaut (17 min, 37°C) und durch Zugabe von 300µl Ethanol, 100µl Milipore H₂O und 10µl 4 M Lithium-Chlorid gefällt (1 Std, -80°C). Nach der Zentrifugation (10 min, 4°C, 13200 Upm) folgte zweimaliges Waschen des Präzipitates mit 70% Ethanol/Milipore-H₂O und die anschließende Resuspension in 50% Formamid/ Milipore-H₂O. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.8.6 RNA Isolierung für RNA-Microarray

Das direkt nach der Isolation auf -80°C gelagerte Gewebe wurde in 200µl PeqGOLD-RNAPure™ (Peqlab) durch auf und ab pipettieren homogenisiert und nach Zugabe von 40µl Chloroform 15 sec geschüttelt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation (5 min, 12000 x g, 4°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol in diesem inkubiert (10 min, 4°C) und präzipitiert (5 min, 12000 x g, 4°C). Die RNA wurde

anschließend in 75% Ethanol gewaschen (5 min, 12000 x g, 4°C) und in 11µl DEPC H₂O resuspendiert. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C.

2.8.7 Synthese von cDNA

1µg der wie unter 2.8.7 isolierten RNA wurde zusammen mit 10pmol Primer gegen das Oligo-dT Ende der mRNA und einer entsprechenden Menge Millipore-H₂O denaturiert (10 min, 56°C) und anschließend nach Zugabe von 20 nmol dNTPs, 4µl 5x Reverse Transkriptase-Puffer (Thermo scientific), 0.5µl RNasin und 1µl des Enzyms Reverse Transkriptase (Thermo scientific) in cDNA umgeschrieben (90 min, 45°C). Die Reverse Transkriptase wurde anschließend denaturiert (10 min, 70°C)

2.9 Mausmethoden

2.9.1 Lösungen

Organkulturmedium	5 mL FCS, 0.5 mL Pyruvat, 0.5 mL Penicillin/Streptomycin, 0.5 mL Glutamax, 0.5 mL NEAA, mit DMEM/F-12 auf 50 mL auffüllen
Hybridisierungspuffer für Gesamtpräparate	50% Formamid, 5x SSC pH 4,5, 1% SDS, 50µl/ml Hefe-tRNA, 50µl/ml Heparin, in DEPC-H ₂ O
Maleinsäure-Puffer (MAB)	0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl, pH7,5
MAB-Tween	MAB + 0.1% (v/v) Tween-20
Block-Lösung	2% Blocking Reagenz (Boehringer) in MAB
Alkalische Phosphatase-Puffer	4 mM NaCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.1% (v/v) Tween-20, 0.1 M Tris (pH 9.5)
20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
2x SSC/Formamid-Lösung	50% Formamid, 10% 20x SSC
RIPA-Puffer	0.05% (w/v) SDS, 4.5 mM NaCl, 1% (v/v) NP40, 0.5% (w/v) Deoxycholate, 0.002 mM EDTA, 2.5 mM TRIS, pH 8.0
TBST (10x)	1.37 M NaCl, 26.82 mM KCl, 62.5 mM Tris (pH 7.5), 10% (v/v) Tween-20
PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
Tyrodes Lösung	8g NaCl, 200mg KCl, 50mg NaHPO ₄ .H ₂ O, 1g Glucose, 1g NaHCO ₃ auf 1l, pH7,2

2.9.2 Versuchstiere und Verpaarungsstrategien

Zur Gewinnung homozygoter Embryonen des Genotyps *Uncx*^{LacZ/LacZ} wurden heterozygote Männchen des Genotyps *Uncx*^{LacZ/+} mit heterozygoten Weibchen des Genotyps *Uncx*^{LacZ/+} verpaart.

Zur Gewinnung von Embryonen des Genotyps $Six2^{cre/+}; Uncx^{flox/flox}$ wurden heterozygote Männchen des Genotyps $Six2^{cre/+}; Uncx^{flox/+}$ mit Weibchen verpaart die homozygot für das Flox Allel im Uncx Locus ($Uncx^{flox/flox}$) waren.

Zur Gewinnung von Embryonen des Genotyps $Six2^{cre/+}; Hprt^{CAG::uncx}$ wurden heterozygote Männchen des Genotyps $Six2^{cre/+}$ mit Weibchen des Genotyps $Hprt^{CAG::uncx}$ verpaart. Da der Hprt-Locus auf dem X-Chromosom liegt, gingen aus dieser Verpaarung heterozygote ($Six2^{cre/+}; Hprt^{CAG::uncx/+}$) Weibchen und hemizygoten Männchen ($Six2^{cre/+}; Hprt^{CAG::uncx/y}$) hervor.

Um die Trächtigkeitsperiode der Mäuse bestimmen zu können wurden diese nach der Verpaarung auf die Anwesenheit eines vaginalen Plugs untersucht. Zur Bestimmung des Embryonalaltages (E) wurde der Tag an dem ein gallerartiger vaginaler Pfropfen detektiert werden konnte als E0.5 definiert. In dieser Arbeit wurden E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E16.5 und E18.5 Embryonen verwendet.

Der Tag der Geburt ist als Tag P1 (postnatal) definiert. In dieser Arbeit wurden P7 und P14 Embryonen verwendet.

Zur Isolation von embryonalem Gewebe wurde das trüchtige Weibchen zunächst mittels zervikaler Dislokation getötet, die Bauchdecke eröffnet und die beiden Uteri in PBS überführt. Die Embryonen wurden mithilfe eines Stereomikroskops frei präpariert.

2.9.3 Präparation, Fixierung und Dehydrierung isolierter Gewebe für histologische Analysen

Die Embryonen der Stadien E11.5, E12.5, E13.5, E14.5 wurden anschließend in PFA über Nacht bei 4°C fixiert. Um eine vollständige Penetration des Fixativs zu gewährleisten, wurde den Stadien E16.5, E18.5 die Niere entnommen und diese über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS fixiert. Im Laufe des darauf folgenden Tages wurden die Gewebe schrittweise in 25%, 50% und 75% Methanol/PBS dehydriert und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 100% Methanol gelagert.

2.9.4 Genotypisierung der Embryonen

Embryonen des Genotyps $Six2^{cre/+}; Hprt^{CAG::Uncx}$ konnten aufgrund des rekombinierten eGFP im HPRT Locus eindeutig anhand von Unterschieden in der von Fluoreszenzintensität genotypisiert werden (Leica MZFLIII).

Alle anderen Embryonen wurden mittels PCR genotypisiert (vgl. 2.8.3)

2.9.5 Organkultur

Lösungen: Medium, Tyrodes-Solution, PBS Gebrauchsfertige Lösungen: Leibovitz Medium, pancreatin, trypsin

Embryonale Nieren wurden am Tag E11.5 mithilfe von Nadeln (G20 gauge) in L-15 Leibovitz Medium (Firma) freipräpariert und zwei Tage in einem Transwellfilter-System () kultiviert. In diesem System liegt eine feinporige (0,4 µm) Polycarbonatmembran (30 mm) einem Organkultur-Nährmedium (vgl.) auf. Aufgrund der kurzen Inkubationsdauer fand kein Mediumwechsel statt. Die Kulturen wurden in einem Gewebe-Inkubator (Thermo scientific) bei 37°C und 5%CO₂ zwei Tage kultiviert und täglich mithilfe des DM 6000 B dokumentiert. Zur Fixierung der Gewebe auf dem Transwellfilter wurde diese in kaltes (-20°C) Methanol getaucht und anschließend in PFA fixiert (4°C, ü.N.). Im Laufe des darauf folgenden Tages wurden die Gewebe schrittweise in 25%, 50% und 75% Methanol/PBS dehydriert und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 100% Methanol gelagert.

2.9.5.1 Induktion isolierter Kappenmesenchyme

Embryonale Nieren wurden am Tag E11.5 mithilfe von Nadeln (G20 gauge) in L-15 Leibovitz Medium (Firma) freipräpariert. Nieren verschiedener Individuen wurden bis zur vollständigen Präparation des Wurfes getrennt in Leibovitz Medium bei RT gelagert und einzeln in 10µl Trypsin-Pankreatin in Tyrodes-Lösung inkubiert (1min, RT). Der enzymatische Verdau wurde durch die Überführung des Gewebes in Organkultur-Medium abgestoppt und dort 30 min inkubiert. Der mesenchymale Anteil der Niere wurde mechanisch mithilfe von Nadeln (G26 gauge) vom Epithel, mithilfe eine Stereomikroskops abgetrennt und auf einen Transwellfilter übertragen. Das dorsale Rückenmark wurde im Bereich des Nackens freipräpariert und in kleine, wurstförmige Stücke aufgeteilt. Drei dieser Stücke wurden um ein einzelnes Kappenmesenchym auf dem Transfilter mithilfe eines Stereomikroskopes positioniert. Die Kulturen wurden in einem Gewebe-Inkubator bei 37°C und 5%CO₂ zwei bzw. vier Tage kultiviert und täglich mithilfe des DMI 6000 B dokumentiert. Der Mediumwechsel erfolgte im Abstand von zwei Tagen. Zur Fixierung der Gewebe auf dem Transwellfilter wurde diese in kaltes (-20°C) Methanol getaucht und anschließend in PFA fixiert (4°C, ü.N.). Im Laufe des darauf folgenden Tages wurden die Gewebe schrittweise in 25%, 50% und 75% Methanol/PBS dehydriert und schließlich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C in 100% Methanol gelagert.

2.9.6 RNA ISH auf Gewebe

Diese Methode diente der Detektion von *Pax8* mRNA auf zuvor kultivierten E11.5 Nieren oder zusammen mit Rückenmark kultivierten Kappenmesenchymen (vgl. 2.9.5). Zunächst wurden die auf einem Transwellfilter in Methanol gelagerten Gewebe in Methanol mithilfe einer Schere ausgeschnitten und zusammen mit einem ca. 3mm² großen Stück Transwellfilter, nach ihrem jeweiligen Genotyp in 2ml Reaktionsgefäße sortiert. Am ersten Tag verbleiben alle Gewebe in diesen 2ml Reaktionsgefäßen. Sofern

nicht anders angegeben erfolgen alle Inkubationsschritte auf einem Kippschüttler bei Raumtemperatur. Alle am ersten Tag eingesetzten Lösungen wurden, soweit möglich, autoklaviert und mit DEPC versetztem Millipore-H₂O frisch angesetzt.

Zunächst werden die Gewebe schrittweise in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50% und 25% Methanol/H₂O) rehydriert (10 min, RT), in PBST gewaschen (2x 10 min) und in eine Stunde in 6% H₂O₂/PBST gebleicht. Nach mehreren Waschschritten in PBST (3x 10 min), RIPA-Puffer (3x 5 min), PBST (3x 5 min) folgte die Fixierung des Gewebes in 4% PFA/PBST + 0,2% Glutaraldehyd. Das Fixativ wurde in einem nachfolgenden Waschschriff mit PBST (3x 5 min) entfernt und die Gewebe in Hybridisierungspuffer auf 70°C erhitzt und dort zwei Stunden prähybridisiert. Die Pax8-Sonde wurde in einer Verdünnung von 1:100 in Hybridisierungspuffer gegeben und dieser auf 95°C erhitzt um eventuell gebildete Sekundärstrukturen der RNA-Sonden zu lösen. Die Inkubation mit den RNA-Sonden in Hybridisierungspuffer erfolgte ü.N. bei 70°C. Die Gewebe wurden am nächsten Morgen in 12 Well-Platten mit Siebeinsätzen überführt. Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten durch Umsetzen der Siebeinsätze. Die Gewebe wurden in Hybridisierungspuffer gewaschen (2x 30 min, 65°C) und nicht hybridisierte RNA-Sonden durch RNaseA (100µl RNase in 1ml PBST, 2x 30 min, 37°C) verdaut. Zum Entfernen unspezifisch gebundener RNA-Sonden wurden die Gewebe in einer SSC/Formamid-Lösung gewaschen (3x 5 min, 2x 10 min, 8x 20 min, 65°C). Im Anschluss wurden die Gewebe zunächst in TBST (2x 10 min) und MABT (2x 10 min) gewaschen und eine Stunde in 5% Blockreagenz geblockt. Der alkalische-Phosphatase-konjugierte anti-DIG-Antikörper wurde in einer 1:5000 in 1% Blockreagenz/PBST gelöst und die Gewebe darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Antikörper wurden die Gewebe in TBST gewaschen (3x 5 min und 8x 1 Std). Um eine optimale Reaktion der alkalischen Phosphatase zu gewährleisten wurden die Gewebe durch Waschen in alkalische Phosphatase-Puffer in den alkalischen Bereich überführt (3x 20 min) und anschließend in 24-Well Platten überführt um die Menge an eingesetztem BM-Purple auf 500µl verringern zu können. Nach ca. 3 Stunden war die Farbreaktion abgeschlossen und die Gewebe wurden in 4%PFA/PBS (4°C, ü.N.) fixiert und schrittweise in 25%, 50% und letztendlich 80% Glycerin/PBS überführt.

2.10 Histologische Methoden

2.10.1 Lösungen

Acetat-Lösung	0,5% Natriumacetat
Alkalische Phosphatase-Puffer	4 mM NaCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.1% (v/v) Tween-20, 0.1 M Tris (pH 9.5)

Block-Lösung	2% Blocking Reagenz (Boehringer) in MAB
BrdU-Lösung	10mg/ml 5-Bromo-2'-Deoxy-Uridin (BrdU) in 0,9% NaCl/0,007 N NaOH in ddH ₂ O, Lagerung bei -20°C
DAPI	0,5mg/l in PBS, Lagerung bei -20°C
DEPC-H ₂ O	100µl/L DEPC in VE-Wasser
Hybridisierungspuffer	50% Formamid, 5x SSC pH 7,0, 1x Denhardt's-Lösung, 0,1% Tween-20, 0,1mg/ml tRNA, 1x Heparin, in DEPC-H ₂ O
Mowiol	14.4g Mowiol, 29.28 mL Glycerol, 36mL Wasser, 72 mL 0.2 M Tris-HCl pH 8.5
PFA	4% Paraformaldehyd in PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 1x, pH 7.2	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.7 mM KH ₂ PO ₄
SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
TRIS-Natrium-Puffer (TNB)	0.1 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.5% (w/v) Blocking-Puder

2.10.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Vollständig dehydrierte Embryonen/Nieren wurden zunächst nach Genotypen sortiert und in Szinti-Vials gesammelt. Anschließend wurden die Gewebe schrittweise in 50% Methanol/Ethanol, Ethanol, 50% Ethanol/Isopropanol und letztendlich in Isopropanol überführt (1-2 Std pro Schritt) und über Nacht in Isopropanol inkubiert. Am nächsten Tag folgte die langsame Erwärmung der Gewebe auf 65°C und die schrittweise Überführung in 25%, 50%, 75% und 100% Paraffin/Isopropanol. Nach einem erneuten Austausch des 100% Paraffins, wurden die Gewebe über Nacht gelagert und am nächsten Morgen vereinzelt in Blockformen überführt und anschließend durch Abkühlen ausgehärtet.

Mithilfe eines Mikrotoms (Leica, RM2155) wurden 5µm und 10µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, auf beschichtete Objektträger (SuperfrostPlus, Menzel) aufgezogen und über Nacht auf einer Wärmeplatte bei 42°C inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.10.3 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

5µm dicke Paraffinschnitte wurden zunächst in Rotihistol deparaffiniert (1x 10 min, 1x 5 min) und schrittweise in 100%, 70% und 50% Ethanol/H₂O rehydriert. Die erste Färbung erfolgte für 45 sec in einer Hämatoxilin-Lösung. Anschließend wurden die Gewebe unter kontinuierlichem Austausch von Leitungswasser gewaschen, in einer Natriumacetat-Lösung (0,5%, 1 min) inkubiert. Der weiteren Eosin-Färbung (1% alkalische Eosin-Lösung, 1min) schloss sich ein weiterer Waschschrift unter kontinuierlichem Austausch von VE-Wasser an. Nach einer erneuten Dehydrierung (100% Ethanol, 2x 2

min) folgte eine Klärung in Roti-Histol (2x 10 min) und die fertigen Schnitte wurden mit Permount eingedeckt.

2.10.4 Immunfluoreszenzfärbung

5µm Paraffinschnitte wurden zunächst in Rotihistol deparaffiniert (1x 10 min, 1x 5 min) und schrittweise in 2x 100% Ethanol und jeweils 1x 70% Ethanol/H₂O rehydriert. Durch das Umranden der einzelnen Schnitte mit einem Fettring (ImmEdgePen) wurde ein Austausch der verschiedenen Lösungen, mit denen die jeweiligen Schnitte auf einem Objektträger inkubiert wurden verhindert. Die Epitopdemaskierung erfolgte unter Verwendung der Vectastain Unmasking Solution (100°C, 15min). Nach zweimaligen waschen in PBST (5min) wurden die Schnitte in einem Blockpuffer (TNB, 1 Std) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe 2.5.1) in TNB erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach weiteren Waschschritten in PBST (3x, 5min) erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers (1 Std, RT). Die sich daran anschließenden Waschschrritte (5x 5 min, RT) beinhalteten eine Inkubation in DAPI-Lösung (10 min, RT, 1:30000 in PBST). Das Eindecken der Schnitte erfolgte in ProLong Gold Eindeckmedium (Invitrogen).

2.10.4.1 Immunfluoreszenzfärbung mit zwei Primärantikörpern derselben Spezies

Eine Co-Färbung mit zwei Primärantikörpern derselben Spezies (in diesem Fall Kaninchen) bedingt eine Anlagerung von FAB Fragmenten an die Epitope des zuerst aufgetragenen primären Antikörpers. Dieser Blockschrift ist dann notwendig wenn es sich bei den beiden primären Antikörpern, welche man benutzen möchte um Immunglobuline sowohl derselben Spezies als auch derselben Klasse (in diesem Fall IgG) handelt. Bis zur Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte die Färbung gemäß der Immunfluoreszenzfärbung (vgl. 2.10.4). Nach dem Waschen in PBST (3x 5 min) erfolgte ein Blockschrift mit einem FAB Ziege-Anti-Kaninchen Block (1 Std, RT). Nach erneutem Waschen in PBST (3x 5 min) wurden die Schnitte mit dem zweiten primären Kaninchen Antikörper inkubiert (ü.N., 4°C). Danach wurden die Schnitte in PBST gewaschen (3x 5 min) und mit sekundären Antikörpern gegen Kaninchen und gegen FAB-Fragmente (vgl. 2.5.2) inkubiert (1 Std, RT). Die sich daran anschließenden Waschschrritte (5x 5 min, RT) beinhalteten eine Inkubation in DAPI-Lösung (10 min, RT, 1:30000 in PBST). Das Eindecken der Schnitte erfolgte in ProLong Gold Eindeckmedium (Invitrogen).

2.10.5 Nachweis apoptotischer Körperchen mittels TUNEL-Assay

Der Nachweis apoptotischer Körperchen erfolgte auf 5µm Paraffinschnitten unter Verwendung des ApopTag Plus Fluorescein *In situ* Apoptosis Detection Kit (Chemicon International). Das Prinzip dabei

ist folgendes: Freie DNA-Enden, wie sie nach DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellen entstehen, werden durch die Terminale desoxynukleotidyl Transferase (TdT Enzym) erkannt und Nucleotid Digoxigenin markierte Desoxyribonukleintriphosphate an das 3'OH Ende der DNA angefügt. Diese mit Digoxigenin markierten Desoxyribonukleintriphosphate wurden nun durch einen Fluoreszin gekoppelten Anti-Digoxigenin Antikörper detektiert werden.

2.10.6 BrdU-Inkorporationsassay

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Basenanalogen, welches anstelle von Thymin in neu synthetisierte DNA eingebaut werden kann. Das BrdU-Inkorporationsassay wird zur Markierung proliferierender Zellen benutzt. Schwangeren Mäusen wurden hierfür 100µl BrdU-Lösung (siehe) pro 10g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach einer einstündigen Inkubationsdauer wurden die Embryonen entnommen, fixiert und in Methanol dehydriert (vgl. 2.9.3) und 5µm Paraffinschnitte angefertigt (vgl. 2.10.2). In die DNA inkorporiertes Bromodesoxyuridin wurde mittels Antikörperfärbung detektiert. Der BrdU-Markierungsindex ergab sich aus dem Quotienten der BrdU-positiven Zellkerne und der Gesamtkernzahl eines definierten Bereiches.

2.10.7 RNA ISH auf Paraffinschnitten

Diese Methode diente dem Nachweis des RNA-Expressionsortes auf Gewebsschnitten. Das hierfür verwendete Protokoll stammt aus Moorman *et al.*, 2001.

Alle Waschschritte erfolgten auf sterilisierten Glasobjektträgern in Metallküvetten. Zur Herstellung der Lösungen wurde autoklaviertes, mit DEPC versetztes Wasser und PBS verwendet. Alle Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Für Hybridisierungs-, und Antikörperinkubationsschritte wurden in wurden die Objektträger in flache Kunststoff-Inkubationskammern gelegt, welche wiederum in eine größere Kammer gestellt wurde. Um Verdunstungsvorgänge zu vermeiden wurde diese Kammer mit der entsprechenden Puffer-Lösung befeuchtet und in Frischhaltefolie gewickelt.

10µm Paraffinschnitte wurden zunächst in Rotihistol deparaffiniert (3x 10 min) und anschließend schrittweise in Rotihistol/Ethanol 50%:50%, 2x 100% Ethanol, 90%, 70% und 50% Ethanol/PBS rehydriert. Nach dem Waschen in PBS (2x 5min) wurden die Schnitte in einer Proteinase K-Lösung inkubiert (10 min, 37°C) und die enzymatische Reaktion durch 5 minütige Inkubation in einer Glycin-Lösung (vgl.) abgestoppt. Die Schnitte wurden in PFA/Glutaraldehyd (vgl) für 20 min fixiert, in PBS gewaschen (2x 5 min), einzelne Schnitte mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vektor) umrandet und PBS auf die Schnitte gegeben um diese vor Austrocknung zu schützen. Für die Prähybridisierung wurden 20µl

Hybridisierungspuffer auf die Schnitte gegeben und diese in flachen Schalen in einer befeuchteten Kammer bei 70°C inkubiert. Nach einer Stunde wurde die Flüssigkeit von den Objektträgern abgeklopft und neuer Hybridisierungspuffer (7µl pro Schnitt) aufgetragen, welcher die RNA-Sonden in der jeweiligen Konzentration enthielt und bei 70°C über Nacht inkubiert. Zum Entfernen unspezifisch gebundener RNA-Sonden wurden die Schnitte nach kurzem eintauchen in 65°C warme SSC Lösung wieder in die Metallboxen gestellt und mit SSC-Formamid-Lösung gewaschen (vgl) (2x 30 min, 65°C). Schnitte wurden anschließend in PBST gewaschen (3x 5min) in Plastikschaalen gelegt, 30 min mit B-Block-Lösung und danach 2 Stunden mit alkalische-Phosphatase-konjugiertem anti-DIG-Antikörper inkubiert. Dem anschließenden Waschen in PBST (2x 5min) folgte ein weiterer Waschgang in alkalischer Phosphatase-Lösung. Die anschließende Farbreaktion, während der das Substrat BM-Purple durch alkalische Phosphatase zu einem blauen Präzipitat umgesetzt wird, kann je nach RNA-Sonde, einige Minuten bis mehrere Tage dauern. Bei einem ausreichend starken Signal wurde die Farbreaktion durch Austausch des BM-Purpels gegen PBS abgestoppt und die Schnitte anschließend mit Mowiol eingedeckt.

2.10.8 Dokumentation

Eingedeckte Schnittpräparate wurden mit einem Axioplan (Zeiss) oder DM5000 (Leica) Stereomikroskop dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 *Uncx* wird im Kappenmesenchym und nephrogenen Körperchen exprimiert

In dieser Arbeit wurden umfangreiche *Uncx* Expressionsanalysen für verschiedene Stadien der Nierenentwicklung durchgeführt. Die Expression von *Uncx* wurde dafür durch eine *in situ* Hybridisierung (ISH) auf Paraffinschnitten der Niere bei E11.5, E12.5, E14.5 und E18.5 untersucht und zu allen untersuchten Stadien im Kappenmesenchym detektiert (Abbildung 3.1A-D). Ab E12.5 wurde *Uncx* zudem in nephrogenen Körperchen exprimiert und bei E18.5 innerhalb der in die Medulla hineinziehenden, Henleschen Schleifen (Abbildung 3.1B-D).

Um die Expression von *Uncx* innerhalb nephrogener Körperchen höher aufzulösen wurde *Uncx*-Protein mittels Immunfluoreszenzfärbung innerhalb des renalen Vesikels, des Komma- sowie des S-Körperchens detektiert. Zur besseren Identifikation der jeweiligen nephrogenen Struktur wurde gegen das in der Basallamina von Epithelien vorhandene Collagen IV kofärbt (Abbildung 3.1F-G). *Uncx*-Protein war ausschließlich im Nukleus lokalisiert. Im Kappenmesenchym wurde ein Expressionsgradient des *Uncx*-Proteins hin zu differenzierten Vorläuferzellen detektiert (Abbildung 3.1E). Im renalen Vesikel war *Uncx*-Protein im distalen Anteil lokalisiert (Abbildung 3.1F) und wurde mit fortschreitender Reifung des nephrogenen Körperchens auf den medialen, als auch auf den proximalen Anteil des Komma- und S-Körperchens begrenzt (Abbildung 3.1G,H). Zur genauen Charakterisierung der *Uncx* positiven Domänen im S-Körperchen diente eine Kofärbung von *Uncx* mit regionsspezifischen Markern. Eine starke Expressionsdomäne hatte das *Uncx*-Protein im medialen Aspekt (*Cdh1*⁺, *Sox9*⁺, *Jag1*⁺) des S-Körperchens (Abbildung 3.1I,J,K). Eine schwächere Expressionsdomäne des *Uncx*-Proteins wurde im proximalen Anteil des S-Körperchens (*Wt1*⁺) detektiert (Abbildung 3.1L).

Nukleares *Uncx*-Protein konnte demnach in Zellen der Nephronvorläufer als auch innerhalb der sich entwickelnden Nephrone nachgewiesen werden. In Abhängigkeit der Stadien dieser Körperchen zeigte das *Uncx*-Protein ein dynamisches Expressionsmuster mit zunächst distaler Expressionsdomäne im renalen Vesikel sowie medialer und schwach proximaler Expression im S-Körperchen. Diese Ergebnisse deuten auf eine potentielle molekulare Funktion von *Uncx*, sowohl innerhalb der nephrogenen Vorläufer, als auch während der Nephrogenese hin.

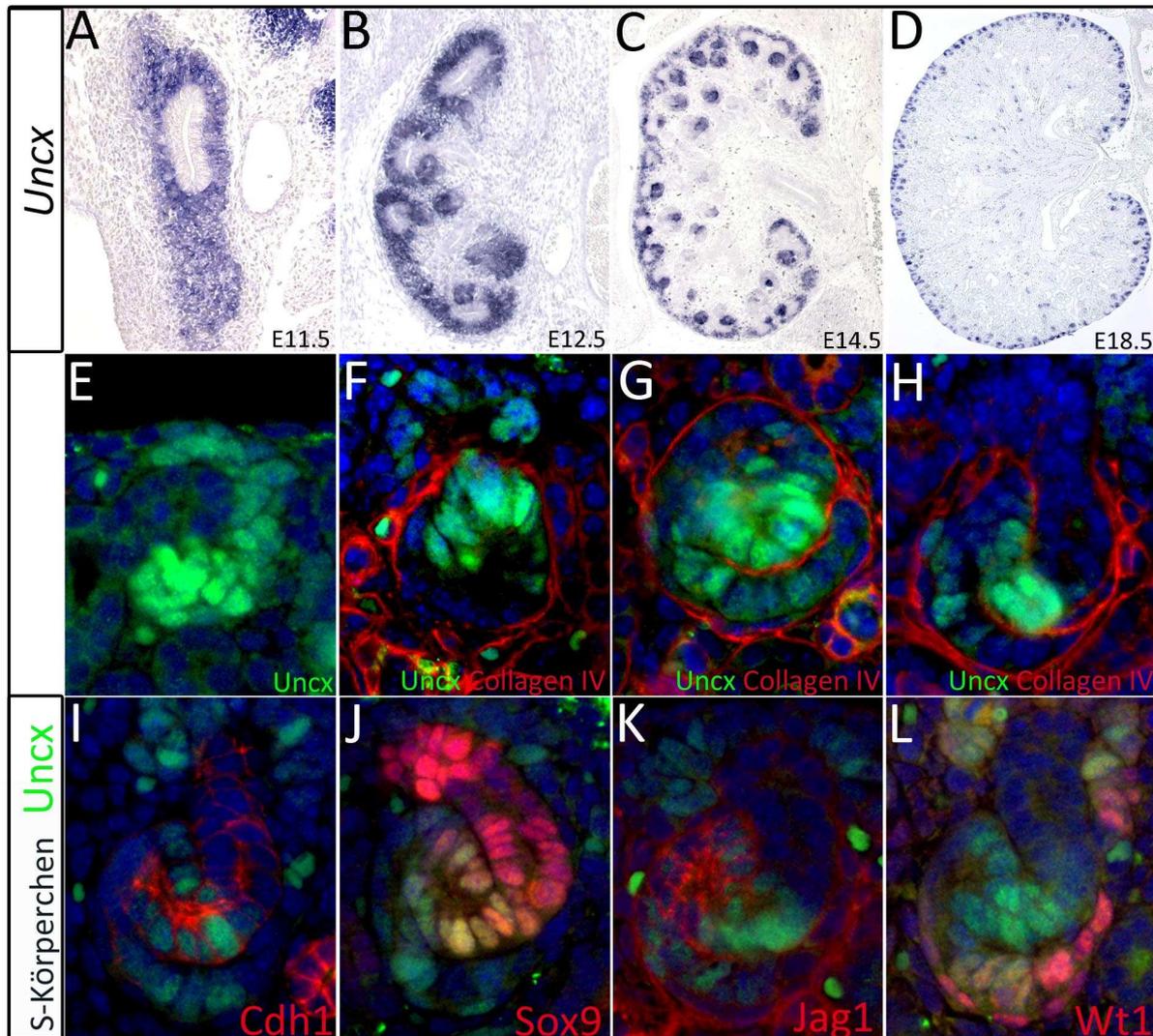


Abbildung 3.1 Uncx Expressionsanalyse. (A-D) RNA-ISH von *Uncx*. Die Expression von *Uncx* ist während der Entwicklung der Niere auf die nephrogene Zone beschränkt. (E-F) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Uncx*/Dapi in Kapillarmesenchymzellen sowie *Uncx*/Dapi/Collagen IV Färbung in renalen Vesikeln, Komma- und S-Körperchen zeigt eine dynamische *Uncx* Expression innerhalb des nephrogenen Körperchens. (I-J) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *Uncx* Protein zusammen mit verschiedenen Markern des nephrogenen Körperchens. (I) *Uncx*/Cdh1/Dapi Färbung im S-Körperchen. Cdh1 markiert den distalen und medialen Teil des S-Körperchens. Nukleares *Uncx* ist im Cdh1⁺ Aspekt des S-Körperchens exprimiert. (J) *Uncx*/Sox9/Dapi Färbung im S-Körperchen. Nukleares Sox9 markiert den distalen und medialen Teil des S-Körperchens. Nukleares *Uncx* ist mit Sox9 medial koexprimiert. (K) *Uncx*/Jag1/Dapi Färbung im S-Körperchen. Jag1 markiert den medialen Teil des S-Körperchens. (L) *Uncx*/Wt1/Dapi Färbung im S-Körperchen. Nukleares Wt1 markiert den proximalen Teil des S-Körperchens. Nukleares *Uncx* ist mit Wt1 teilweise koexprimiert. Immunfluoreszenzen zeigen Vergrößerungen (40x) von E18.5 Nierenschnitten (n=3).

3.2 *Uncx*-mutante Nieren sind kleiner und unterscheiden sich histologisch von wildtypischen Nieren bei E18.5

Um die Funktion von *Uncx* während der Entwicklung der Niere zu analysieren, wurden verschiedene transgene Mausmodelle generiert, in denen die *Uncx*-Expression per „*Knock-out*“ eliminiert wurde. Die

konstitutive *Uncx*-Nullmutante (*Uncx*^{LacZ/LacZ}) besitzt eine globale Deletion des *Uncx*-Allels. Aufgrund von Fehlbildungen im axialen Skelett und darauf basierender respiratorischer Insuffizienz, sterben diese Mäuse kurz nach ihrer Geburt (Mansouri et al., 2000). Um diese perinatale Sterblichkeit zu überwinden und eine spätere Funktion von *Uncx* in der postnatalen Niere zu untersuchen, wurde *Uncx* in einer konditionellen Verlustmutante mithilfe des Cre/loxP Systems in Zellen der nephrogenen Vorläufer, unter der Kontrolle von *Six2* ausgeschaltet (*Six2*^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox}).

Six2^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox} Mäuse wurden am Tag E18.5 in einem korrekten Mendelschen Verhältnis isoliert, was darauf hindeutet, dass diese Embryonen keine pränatale Letalität aufweisen. E18.5 *Six2*^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox} Mäuse zeigten eine Größenreduktion der Nieren, wiesen darüber hinaus jedoch keine phänotypischen Besonderheiten im Urogenitalsystems auf (Abbildung 3.2A,B). Auf histologischen Schnitten zeigte sich eine korrekte Zonierung der Wildtyp als auch *Uncx*-mutanten Nieren in einen äußeren Kortex, eine Medulla und eine Papilla (Abbildung 3.2C,D). Im Wildtyp nahmen labyrinthartige Strukturen der Nierenkanälchen einen prominenten Teil im kortikalen Bereich der Niere ein (Abbildung 3.2C'; Abbildung 3.3C'). In *Six2*^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox} Nieren waren diese Strukturen massiv reduziert (Abb. Abbildung 3.2D'; Abbildung 3.3D'). Durch eine morphometrische Berechnung midsagitaler Nierenschnitte ergab sich im Durchschnitt eine Fläche von 4,5mm² für wildtypische Nieren. Nierenschnitte der *Six2*^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox} Mutante waren mit durchschnittlich 2mm² signifikant kleiner (Abbildung 3.3D). Zur Bestimmung des glomerulären Index wurde eine Podocin Färbung per *In-situ-Hybridisierung* (ISH) auf jeweils 2 Schnitten eines Individuums (n=3) durchgeführt und glomeruläre Strukturen pro Schnitt ausgezählt. Mit durchschnittlich nur 24,4% hatten midsagitale Schnitte der *Six2*^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox} Niere signifikant weniger glomeruläre Strukturen als der Wildtyp. Die hohe Standardabweichung ($\sigma = 20,97$) deutet eine gewisse Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps der *Six2*^{cre/+}; *Uncx*^{flox/flox} Niere an (Abbildung 3.3F).

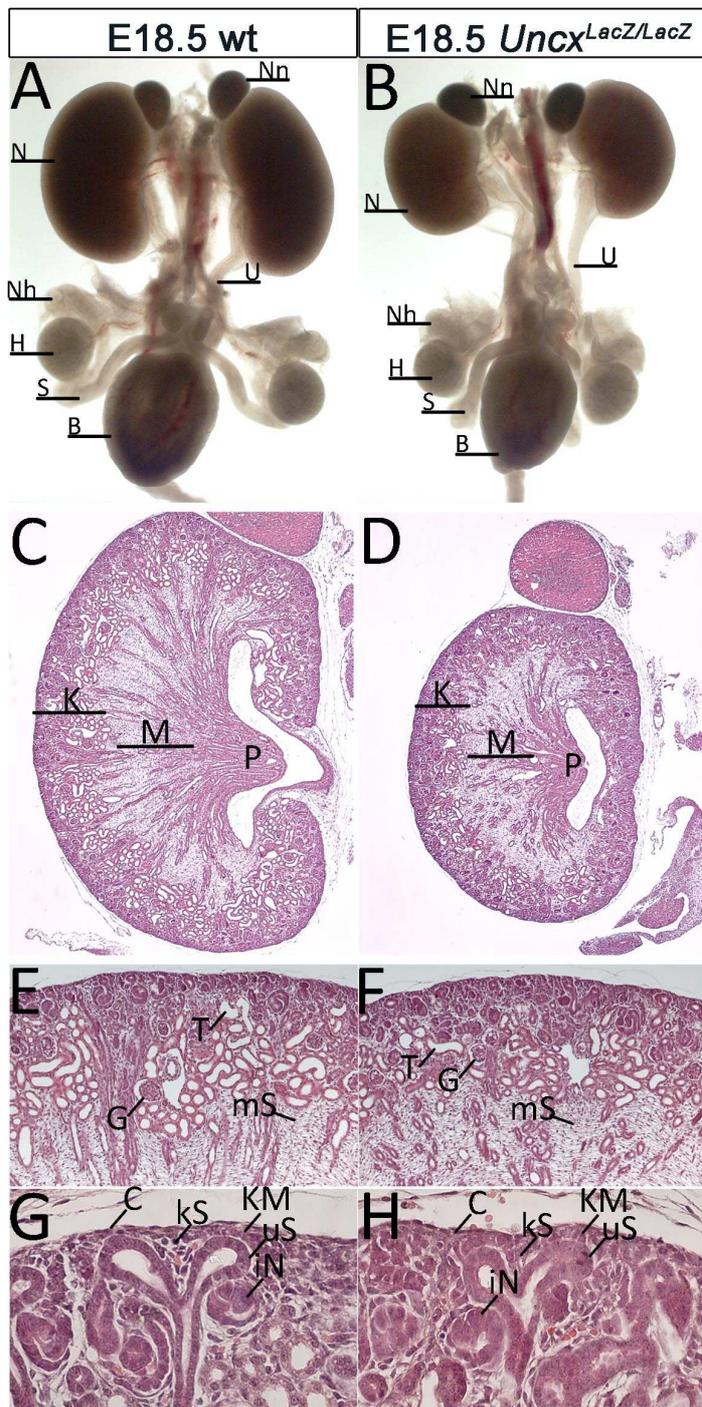


Abbildung 3.2: Morphologische und histologische Analyse konstitutiver *Uncx*-mutanter Nieren. (A-D) *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nieren variierten morphologisch und histologisch von Wildtyp Nieren bei E18.5. (A,B) Makroskopische Aufnahme von E18.5 Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Urogenitalsystemen. Mutante Nieren weisen im Vergleich zum Wildtyp eine bilaterale Reduktion ihrer Größe auf. (C,D) HE Färbung repräsentativer midsagittaler E18.5 Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitte (E,F) Weniger luminal Tubulstrukturen in *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nieren (20x) (G,H) Vergrößerung der nephrogenen Zone zeigt die Präsenz von Kappenmesenchym Zellen (40x). B, Blase; C, Kapsel, KM, Kappenmesenchym, G, Glomerulus, H, Hoden; iN, induziertes Nephron, kS, kortikales Stroma, M, Medulla, mS, medulläres Stroma, N, Niere; NN, Nh, Nebenhoden, Nebenniere; P, Pelvis; S, Samenleiter, T, tubuläre Gänge, U, Ureter, uS, Ureterspitze

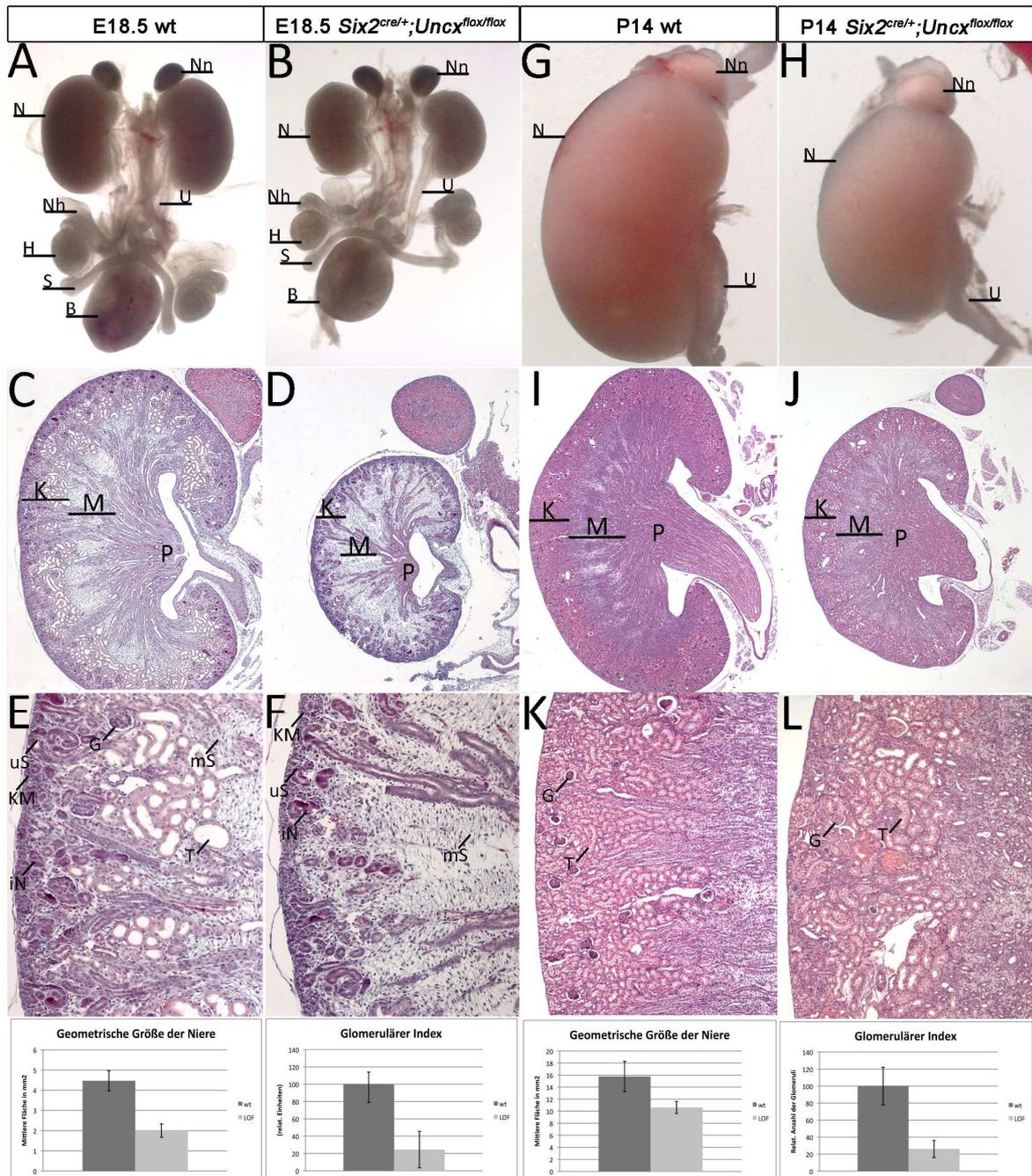


Abbildung 3.3: Morphologische, histologische und morphometrische Analyse konditioneller *Uncx*-mutanter Nieren. (A-L) *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}* variierten morphologisch und histologisch von Wildtyp Nieren bei E18.5 und P14. Mutante Nieren weisen im Vergleich zum Wildtyp eine bilaterale Reduktion ihrer Größe auf. (A,B,G,H) Makroskopische Aufnahme von E18.5 und P14 Wildtyp und *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}* Urogenitalsystemen. E18.5 *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}* Nieren (2mm²) sind kleiner im Vergleich zum Wildtyp (4,4mm²) (p=0,002). P14 *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}* Nieren (10,62mm²) sind kleiner im Vergleich zum Wildtyp (15,77mm²) (p=0,008). (C-F;I-L) HE Färbung repräsentativer midsagitaler E18.5 (C-F) und P14 (I-L) Wildtyp und *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}* Nierenschnitte. E18.5 Nierenschnitte der *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}*-Mutante besitzen mit 24,4% weniger Glomeruli als der Wildtyp (100%). P14 Nierenschnitte der *Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}*-Mutante besitzen mit 26,1% weniger Glomeruli als der Wildtyp (100%) (p=0,003). (I-J'). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte (n=3). B, Blase; KM, Kappenmesenchym, G, Glomerulus, H, Hoden; iN, induziertes Nephron, M, Medulla, mS, medulläres Stroma, N, Niere; NN, Nh, Nebenhoden, Nebenniere; P, Pelvis; S, Samenleiter, T, tubuläre Gänge, U, Ureter, uS, Ureterspitze

Die Nieren der konditionellen $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Mutante wurden postnatal (P) am Tag 14 analysiert. Nur 12,1% der Mäuse dieses Genotyps überlebte bis P14. Der Verlust von *Uncx* unter der Kontrolle von *Six2* führte demnach zu einer postnatalen Letalität. Morphologisch ist die Größenreduktion der $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Niere am Tag P14 offensichtlich (Abb. 3.3I,J). Im Durchschnitt betrug die Fläche eines midsagitalen P14 Wildtyp Nierenschnittes $15,8\text{mm}^2$. Mit einer durchschnittlichen Fläche von $10,6\text{mm}^2$ waren $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nieren signifikant kleiner (Abbildung 3.3O), zeigten aber darüber hinaus keine weiteren morphologischen Auffälligkeiten. Histologisch wurde der Kortex der wildtypischen Niere von gewundenen tubulären Strukturen und Glomeruli dominiert. Auch $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nieren wiesen tubuläre Strukturen im kortikalen Bereich auf, jedoch wichen diese Strukturen in ihrer Form und Größe von denen des Wildtyp ab (Abb. 3.3M,N). Im Durchschnitt besaßen P14 $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nieren mit nur 26,1% der wildtypischen Anzahl, signifikant weniger Glomeruli als der entsprechende Wildtyp (Abbildung 3.3P).

Die konstitutive $Uncx^{LacZ/LacZ}$ Mutante zeigte bei E18.5 einen mit der konditionellen *Uncx*-Mutante vergleichbaren Phänotyp. Im Hinblick auf labyrinthartige, luminal Strukturen im äußeren Kortex zeigten $Uncx^{LacZ/LacZ}$ mutante Nieren einen schwächeren Phänotyp verglichen mit $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nieren bei E18.5 (Abbildung 3.2D'; Abbildung 3.3D'). Die morphometrische Analyse der Nierengröße und die Analyse der Anzahl glomerulärer Strukturen wurden in dieser Arbeit nur an der konditionellen Mutante durchgeführt. Entsprechende Berechnungen für die konstitutive *Uncx*-Nullmutation waren bereits Gegenstand einer früheren Arbeit (Farin, 2005).

Zusammenfassend führte der Verlust von *Uncx* in der Niere zu einer postnatalen, nicht jedoch zu einer pränatalen Letalität der konditionellen, homozygoten *Uncx*-Verlustmutante. Morphologisch zeigten beide *Uncx*-Mutanten verkleinerte Nieren. Der Verlust von *Uncx* führt außerdem zu einer Reduktion an reifen Nephronstrukturen mit variabler phänotypischer Penetranz.

3.3 Der Verlust von *Uncx* führt nicht zu Veränderungen der Gewebestruktur der Niere

Die Entwicklung der Niere setzt die wechselseitige Interaktion des Ureterepithels, des Kappenmesenchyms und des Stromas voraus. Eine Analyse gewebespezifischer Marker auf Nierenschnitten von *Uncx*-Verlustmutanten, sollte zeigen, ob die jeweiligen Gewebe in *Uncx*-Verlustmutanten etabliert wurden.

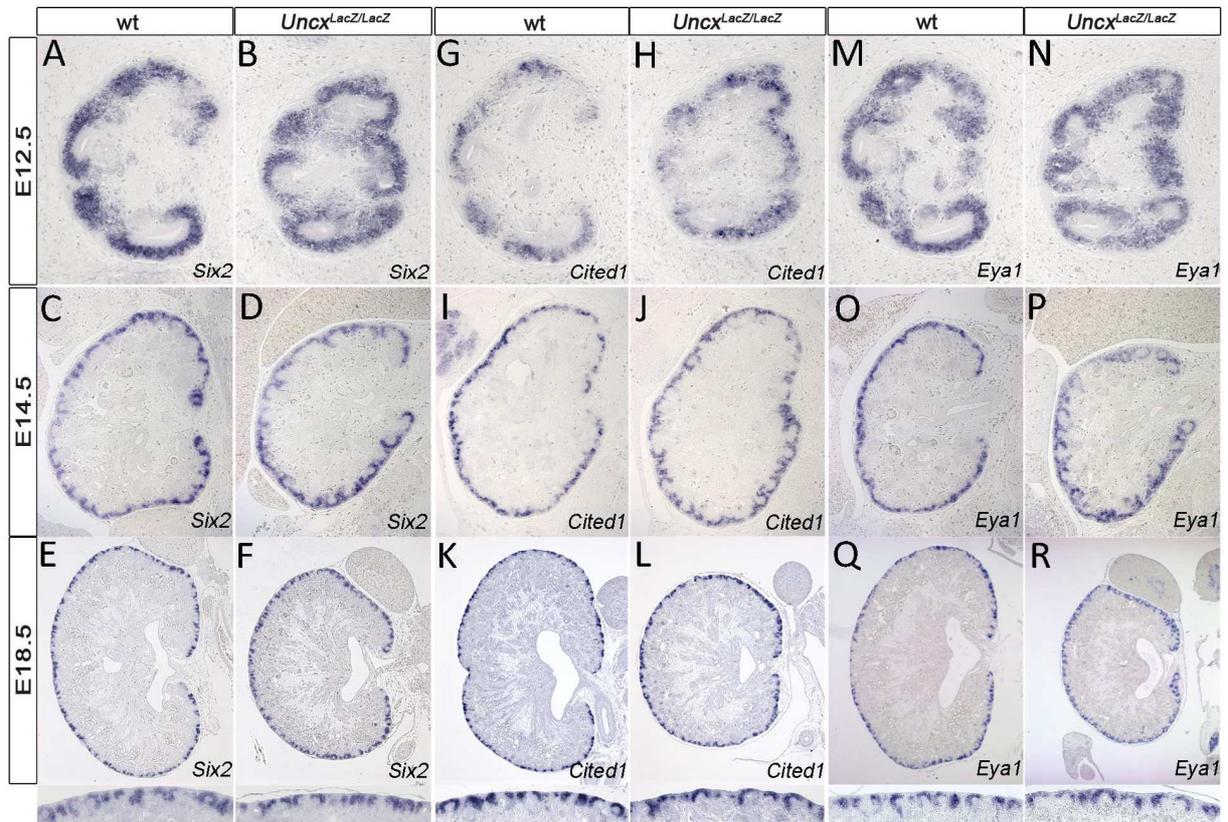


Abbildung 3.4 Das Kappenmesenchym wird in *Uncx*-mutanten Nieren etabliert. (A-R) ISH prominenter Marker des Kappenmesenchyms. (A-F) *Six2* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 im Kappenmesenchym exprimiert. (G-L) *Cited1* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 im Kappenmesenchym exprimiert. (M-R) *Eya1* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 im Kappenmesenchym exprimiert. *Uncx*-mutante Nieren zeigen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Muster der in nephrogenen Vorläuferzellen exprimierten Marker *Six2*, *Cited1* und *Eya1*.

Six2, *Eya1* und *Cited1* gelten als prominente Marker des Kappenmesenchyms (Brown et al., 2013; Reidy and Rosenblum, 2009; Xu et al., 2014). Während *Six2* und *Eya1* im gesamten Kappenmesenchym exprimiert sind, ist die *Cited1* Expression auf den oberen hochproliferativen Bereich des Kappenmesenchyms begrenzt und nimmt mit zunehmendem Differenzierungsstatus der Kappenmesenchymzellen ab (Brown et al., 2013). In *Uncx*-mutanten Nieren waren sowohl *Six2*, *Eya1* als auch *Cited1* in einem mit dem Wildtyp vergleichbaren Muster exprimiert (Abbildung 3.4 A-R). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass beide Subkompartimente des Kappenmesenchyms in *Uncx*-Verlustmutanten etabliert wurden.

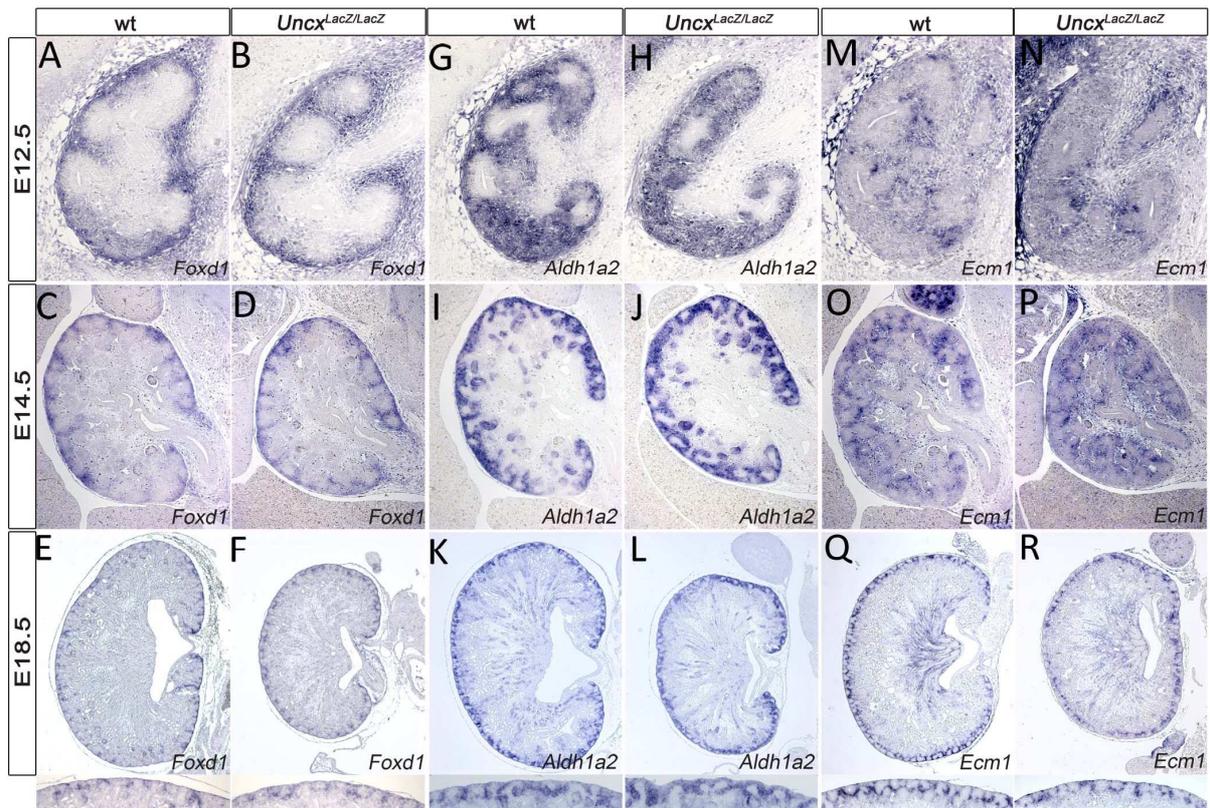


Abbildung 3.5: Kortikales Stroma wird in *Uncx*-mutanten Nieren etabliert. (A-R) ISH prominenter Marker des kortikalen Stromas. (A-F) *Foxd1* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 im äußersten kortikalen Stroma exprimiert. (G-L) *Aldh1a2* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 im gesamten kortikalen Stroma exprimiert. (M-R) *Ecm1* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 in dem von Kappenmesenchym durchsetzten kortikalen Stroma exprimiert. *Uncx*-mutante Nieren zeigen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Muster der im kortikalen Stroma exprimierten Marker *Foxd1*, *Aldh1a2* und *Ecm1*.

Foxd1, *Aldh1a2* und *Ecm1* sind Marker der stromalen Zelllinie (Hatini et al., 1996; Paroly et al., 2013) und wiesen variable Expressionsdomänen innerhalb der kortikalen Stromaregion auf (Abbildung 3.5). Die Expression von *Foxd1* und *Ecm1* mRNA war auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten zu allen untersuchten Stadien vergleichbar mit der des Wildtypen (Abbildung 3.5A-L).

Im Wildtyp war die *Aldh1a2* Expression auf das kortikale Stroma außerhalb der Kappenmesenchymzellen begrenzt (Abbildung 3.6A). Auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten dagegen, war der Ausschluss der *Aldh1a2* Expression aus Kappenmesenchym Zellen weniger deutlich (Abbildung 3.6A). Vereinzelt waren Kappenmesenchymzellen in direkter Nachbarschaft zur Ureterknospe *Aldh1a2* positiv, das äußerste kortikale Stroma hingegen *Aldh1a2* negativ (Pfeile).

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass das kortikale Stroma in *Uncx*-mutanten Nieren etabliert wurde.

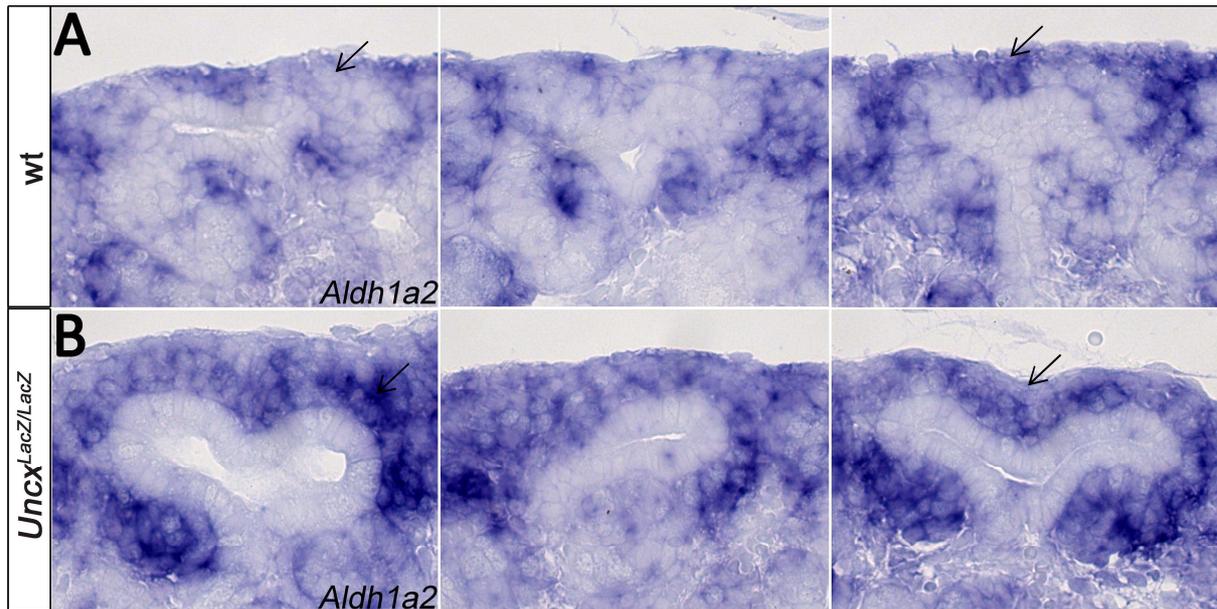


Abbildung 3.6: Das Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Nieren ist positiv für *Aldh1a2*. ISH des kortikalen Stromamarkers *Aldh1a2* in der Nephrogenen Zone von E18.5 Wildtyp und *UncxLacZ/LacZ* Nieren. (A-B) Wildtyp Kappenmesenchym ist negativ für die *Aldh1a2* RNA. (D-E) *Uncx^{LacZ/LacZ}* Kappenmesenchym ist teilweise positiv für *Aldh1a2*

Kortikale Stromazellen der Nierenkapsel exprimieren *Sfrp1* (Levinson et al., 2005; Yoshino et al., 2001). Ab E14.5 wird *Sfrp1* außerdem in Henleschleifen und später in dem sie umgebenden medullären Stroma exprimiert (Kühl, 2003; Leimeister et al., 1998). Im Wildtyp sowie in *Uncx*-mutanten Nieren konnten alle drei Expressionsdomänen durch den Nachweis der *Sfrp1* mRNA detektiert werden (Abbildung 3.7A-F).

Die Expression von *Ret* in Ureterknospen (Costantini and Shakya, 2006) war in *Uncx*-mutanten Nieren zu allen untersuchten Stadien vergleichbar mit der des Wildtypen (Abbildung 3.7G-L).

Wnt4 wird sowohl in nephrogenen Körperchen (Kopan et al., 2007; Stark et al., 1994), als auch im medullären Stroma (Itäranta et al., 2006) exprimiert. Die Expression von *Wnt4* war sowohl in nephrogenen Strukturen als auch in Bereichen des medullären Stromas, auf Nierenschnitten der *Uncx*-Mutanten vergleichbar mit der des Wildtyps (Abbildung 3.7M-R).

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten renalen Gewebemarker waren in *Uncx*-mutanten Nieren auf ihre entsprechende Expressionsdomäne begrenzt (mit Ausnahme von *Aldh1a2*). Dieses Ergebnis legte die Schlussfolgerung nahe, dass alle für die Verzweigungsmorphogenese sowie die Nephroninduktion notwendigen Gewebe in *Uncx*-mutanten Nieren früh etabliert wurden und ihre jeweilige, spezifische Markerexpression bis E18.5 aufrechterhalten blieb.

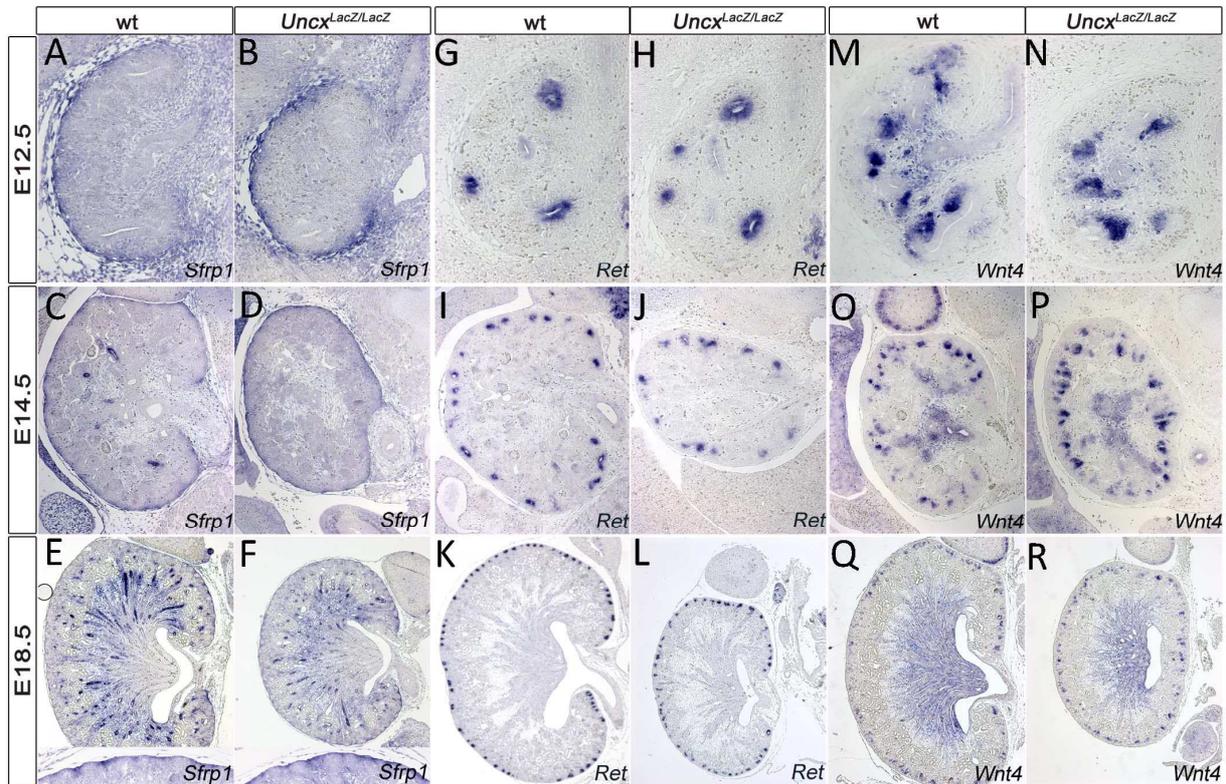


Abbildung 3.7: Prominente Marker der Kapsel, Ureterspitzen und induzierter Nephrone werden in *Uncx*-mutanten Nieren exprimiert. (A-F) *Sfrp1* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 in der renalen Kapsel sowie dem kortikomedullären Stroma exprimiert. (G-L) *Ret* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 in Ureterknospen exprimiert. (M-R) *Wnt4* wird auf repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E12.5, E14.5 und E18.5 in nephrogenen Körperchen sowie dem medullären Stroma exprimiert.

3.4 *Uncx*-mutante Nieren weisen weniger reife Nephrone auf

Nephrone besitzen einen charakteristischen segmentalen Aufbau, wobei sich einzelne Segmente durch die Expression charakteristischer Transportkanäle unterscheiden (Eaton and Pooler, 2009). Über den Nachweis bestimmter Transportkanäle konnten Rückschlüsse auf die Präsenz des jeweiligen Segments gezogen werden. Eine ISH etablierter Nephronegmentmarker diente der quantitativen sowie qualitativen Charakterisierung der in *Uncx*-Funktionsverlustmutanten gebildeten Nephrone.

Spezifische Marker der Nierenkörperchen (*Podocin*) (Roselli et al., 2002), Abschnitte S1-S3 des proximalen Tubulussegments (S1: *Slc5a2* (Vallon, 2011; Wright et al., 2007), S2, S3: *Slc5a1* (Vallon, 2011), S1-S3: *Slc34a1* (Biber et al., 2009; Lapointe et al., 2006; Madjdpour et al., 2004)), der Henleschleife (*Slc12a1*) (Féraille and Doucet, 2001), des distalen Tubulus (*Slc12a3*) (Ko et al., 2012) sowie der Sammelrohre (*Aqp2*) (Nielsen and Agre, 1995) wurden auf wildtypischen sowie konditionellen *Uncx*-mutanten E18.5 Nierenschnitten nachgewiesen (Abbildung 3.8C-H). Die Anzahl der Nierenkörperchen

war auf Nierenschnitten der $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Mutante, im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (siehe 3.2). Alle proximalen Tubulusabschnitte waren, verglichen mit dem Wildtyp, auf $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nierenschnitten in ihrer Anzahl reduziert, wobei die Anzahl des S1-Abschnitts eine drastischere Reduktion auf $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nierenschnitten aufwies als die Abschnitte S2 und S3 (Abbildung 3.8E,F; Abbildung 3.9E,F). Die Henleschleife, distale Tubuli sowie Sammelrohre wurden auf $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Nierenschnitten detektiert, waren jedoch im Vergleich zum Wildtyp in ihrer Anzahl reduziert. Auch auf konstitutiven $Uncx^{LacZ/LacZ}$ -mutanten Nierenschnitte waren alle Nephronsegmente in ihrer Anzahl reduziert, im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.9).

Zusammenfassend deutet die Analyse der Nephronsegmentmarker darauf hin, dass sowohl in konditionellen als auch konstitutiven $Uncx$ -mutanten Nieren alle Segmente des reifen Nephrons etabliert wurden. Auf Nierenschnitten der $Uncx$ -Mutante war die Anzahl der durch die jeweiligen Nephronsegmentmarker nachgewiesenen Strukturen jedoch reduziert. $Uncx^{LacZ/LacZ}$ mutante Nieren zeigten phänotypische Variabilitäten hinsichtlich der Anzahl von Nephronsegmenten, verlichen mit dem Phänotyp der $Six2^{cre/+};Uncx^{flox/flox}$ Mutante. Schlussfolgernd wurde die Hypothese propagiert, dass $Uncx$ -mutante Nieren hinsichtlich der Anzahl ihrer Nephrone beeinträchtigt sind.

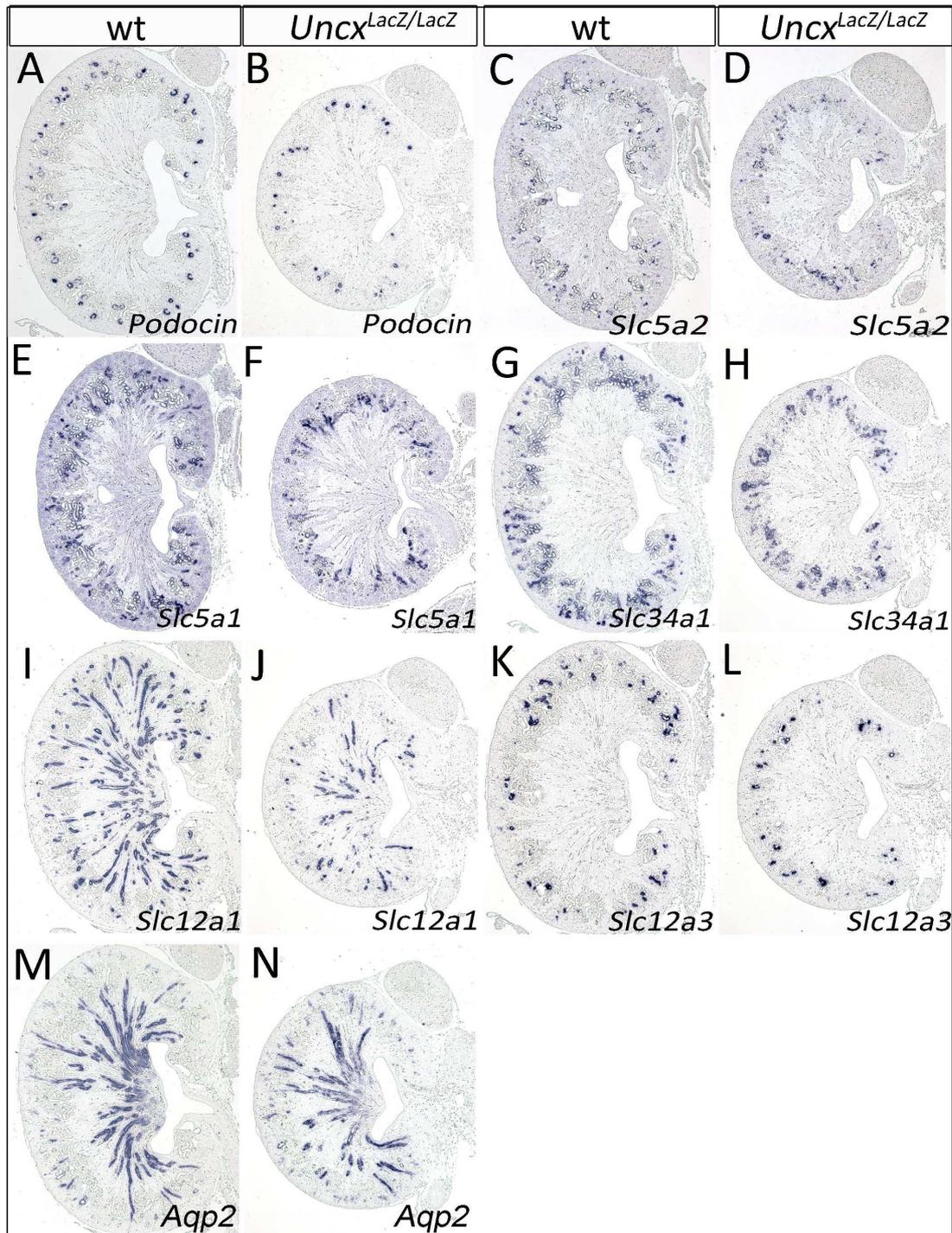


Abbildung 3.8 Nephronen der *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mutante sind korrekt segmentiert jedoch in ihrer Anzahl reduziert. ISH von Nephronsegmentmarkern auf repräsentativen midsagitalen E18.5 Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten. Nierenkörperchen (*Podocin*, A,B), proximale Tubuli (*Slc5a2*, C,D; *Slc5a1*, E,F; *Slc34a1*, G,H), Henle Schleifen (*Slc12a1*, I,J), distale Tubuli (*Slc12a3*, K,L), Sammelrohre (*Aqp2*, M,N). E18.5 *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nieren weisen weniger Strukturen auf die positiv für Nephronsegmentmarker sind, verglichen mit dem Wildtyp (n=3).

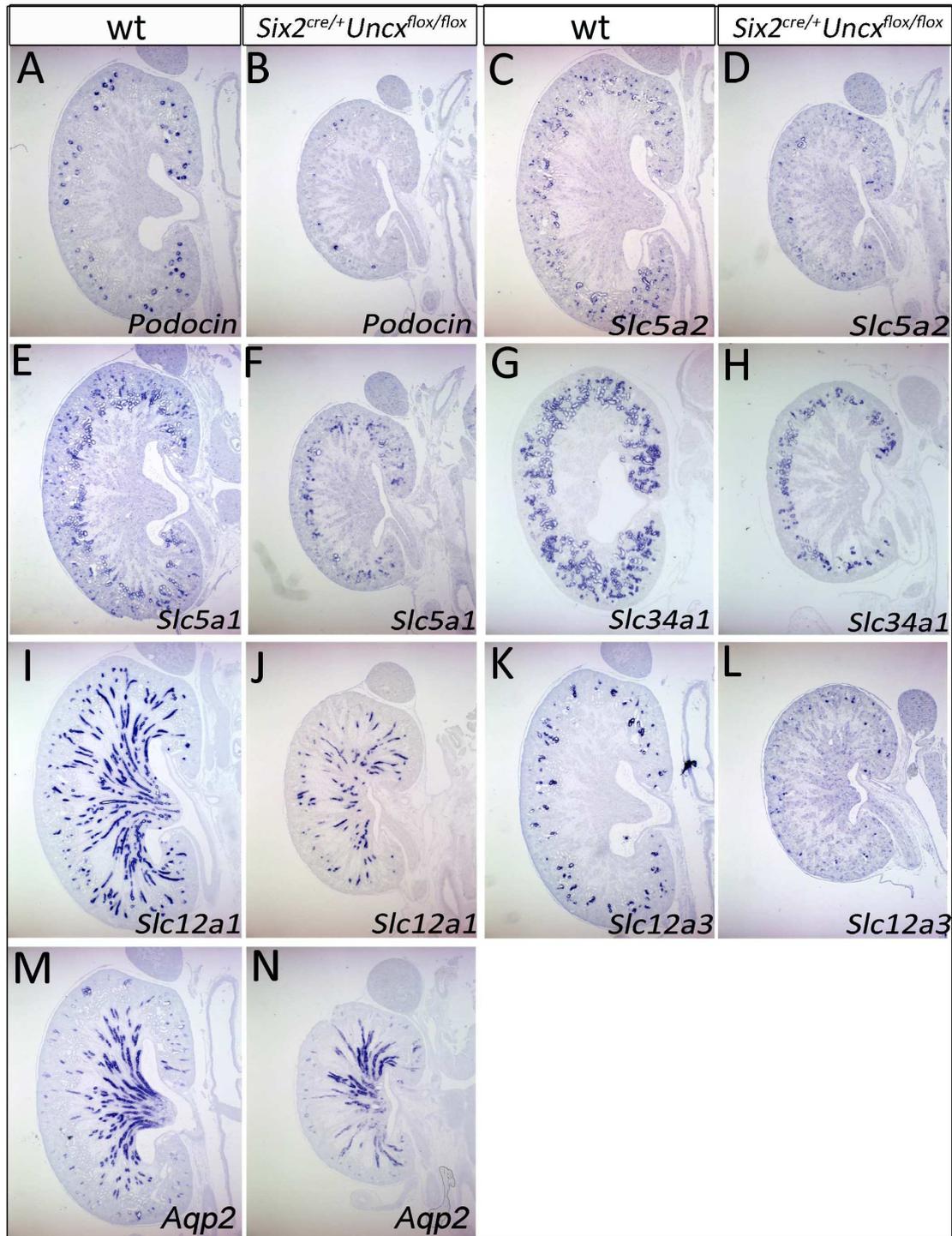


Abbildung 3.9 Nephronen der *Six2*^{cre/+}*Uncx*^{flox/flox}-Mutante sind korrekt segmentiert jedoch in ihrer Anzahl reduziert. ISH von Nephronsegmentmarkern auf repräsentativen midsagitalen E18.5 Wildtyp und *Six2*^{cre/+}*Uncx*^{flox/flox} Nierenschnitten. Nierenkörperchen (*Podocin*, A,B), Proximale Tubuli (*Slc5a2*, C,D; *Slc5a1*, E,F; *Slc34a1*, G,H), Henle Schleifen (*Slc12a1*, I,J), Distale Tubuli (*Slc12a3*, K,L), Sammelrohre (*Aqp2*, M,N). E18.5 *Six2*^{cre/+}*Uncx*^{flox/flox} Nieren weisen weniger Strukturen auf die positiv für Nephronsegmentmarker sind, verglichen mit dem Wildtyp (n=3).

3.4.1 P14 *Six2*^{cre/+};*Uncx*^{flox/flox} Nieren besitzen weniger Nephrone, welche zudem qualitativ beeinträchtigt sind

Am Tag P14 besitzen nur 12,1% von den zu erwartenden 25% der Nachkommen den *Six2*^{cre/+};*Uncx*^{flox/flox} Genotyp. Folglich stirbt diese Mutante in einem Zeitfenster von wenigen Wochen nach der Geburt. Um strukturelle Defekte der Niere bezüglich der Anzahl und der Segmentierung von Nephrone nachweisen zu können, wurde eine Nephronsegmentmarker Analyse auf RNA sowie Proteinebene auf Nierenschnitten der konditionellen *Uncx*-Mutante bei P14 durchgeführt.

Spezifische Marker der Nierenkörperchen (*Podocin*) (Roselli et al., 2002), Abschnitte S1-S3 des proximalen Tubulussegments (S1: *Slc5a2* (Vallon, 2011; Wright et al., 2007), S2, S3: *Slc5a1* (Vallon, 2011), S1-S3: *Slc34a1* (Biber et al., 2009; Lapointe et al., 2006; Madjdpour et al., 2004) und LTL (Lotus Tetragonolobus Lectin) (Kusaba et al., 2014)), der Henleschleife (*Slc12a1*) (Féaille and Doucet, 2001), des distalen Tubulus (*Slc12a3*) (Ko et al., 2012) sowie der Sammelrohre (*Aqp2*) (Nielsen and Agre, 1995) wurden auf wildtypischen sowie *Uncx*-mutanten P14 Nierenschnitten nachgewiesen.

Die Anzahl der Nierenkörperchen, welche durch den Nachweis von Podocin-mRNA sowie Podocin-Protein detektiert wurden, waren in Nieren der *Uncx*-Mutante bei P14 signifikant reduziert (Abbildung 3.10A,B; O-P') (vgl.3.2).

Die Abschnitte S1 bzw S2 des proximalen Segments konnten, im Gegensatz zum Wildtyp, auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten bei P14 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.10C-F). Überraschenderweise war die Anzahl weiter distal gelegener proximaler Tubulusabschnitte dagegen mit der des Wildtyps vergleichbar (Abbildung 3.10G,H; Q-R').

Henle Schleifen, distale Tubuli sowie Sammelrohre waren in P14 *Uncx*-mutanten Nieren präsent, die angefärbten Strukturen allerdings reduziert, verglichen mit dem Wildtyp (Abbildung 3.10M,N; U,V).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass vordere proximale Segmentstrukturen von E18.5 *Uncx*-mutanten Nieren bis P14 vollständig degradieren oder insofern degenerieren, als dass sie die für die Funktion der Niere essentiellen Ionenkanäle nicht länger exprimieren. Dieses Ergebnis legt die Hypothese nahe, dass *Six2*^{cre/+};*Uncx*^{flox/flox} Mäuse aufgrund struktureller und/oder funktioneller Nephrondefekte vorzeitig sterben.

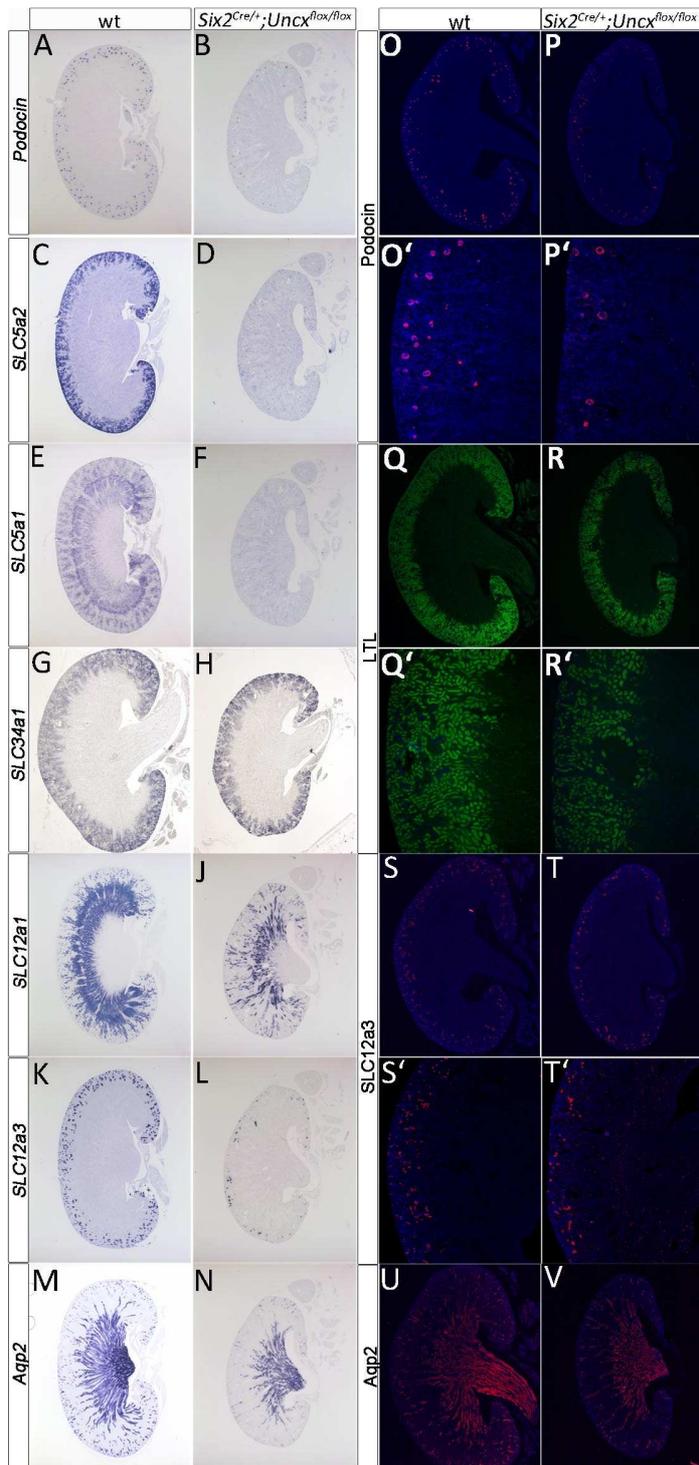


Abbildung 3.10 Nephronen der *Six2^{cre/+};Uncx^{flax/flax}*-Mutante sind bei P14 quantitativ und qualitativ beeinträchtigt. ISH und Immunfluoreszenz Färbung von Nephronsegmentmarkern auf repräsentativen midsagitalen P14 Wildtyp und *Six2^{cre/+};Uncx^{flax/flax}* Nierenschnitten. Nierenkörperchen (*Podocin*, A,B; O-P'), Proximale Tubuli (*Slc5a2*, C,D; *Slca1*, E,F; *Slc34a1*, G,H; LTL, Q-R'), Henle Schleifen (*Slc12a1*, I,J), Distale Tubuli (*Slc12a3*, K,L; S-T'), Sammelrohre (*Aqp2*, M,N; U,V). P14 *Six2^{cre/+};Uncx^{flax/flax}* Nieren weisen weniger Strukturen auf die positiv für Nephronsegmentmarker sind, verglichen mit dem Wildtyp.

3.5 Nephrogene Strukturen zeigen einen normalen Musterungsphänotyp in *Uncx*-Verlustmutanten

Durch die Analyse von Markern reifer Nephronsegmente konnte gezeigt werden, dass Nieren *Uncx*-mutanter Mäuse weniger Nephrone besitzen. Im Folgenden sollte untersucht werden inwiefern die Nephrogenese durch die Deletion von *Uncx* beeinträchtigt wurde. Die Analyse von Markern, welche auf charakteristische Regionen des reifenden Nephrons begrenzt sind, sollte Aufschluss über die Musterung nephrogener Körperchen geben. Dieser Untersuchung liegt die Hypothese zugrunde, dass die Ausreifung des Nephrons durch Musterungsdefekte innerhalb der nephrogenen Körperchen beeinträchtigt werden kann.

Durch die Detektion von Markern für den medial-distalen (Cdh1, Sox9) (Rumballe et al., 2011), sowie den proximalen (Wt1) (Yeager et al., 1996) Aspekt des Komma- und S-Körperchen konnten keine Abweichungen vom Wildtyp, in der Spezifikation regionaler Charakteristika nephrogener Strukturen der *Uncx*-Mutante nachgewiesen werden (Abbildung 3.11). Dies deutet auf eine normale Musterung des sich entwickelnden Nephrons hin. Es gab demnach keine Hinweise auf Musterungsdefekte der nephrogenen Körperchen in der *Uncx*-Mutante.

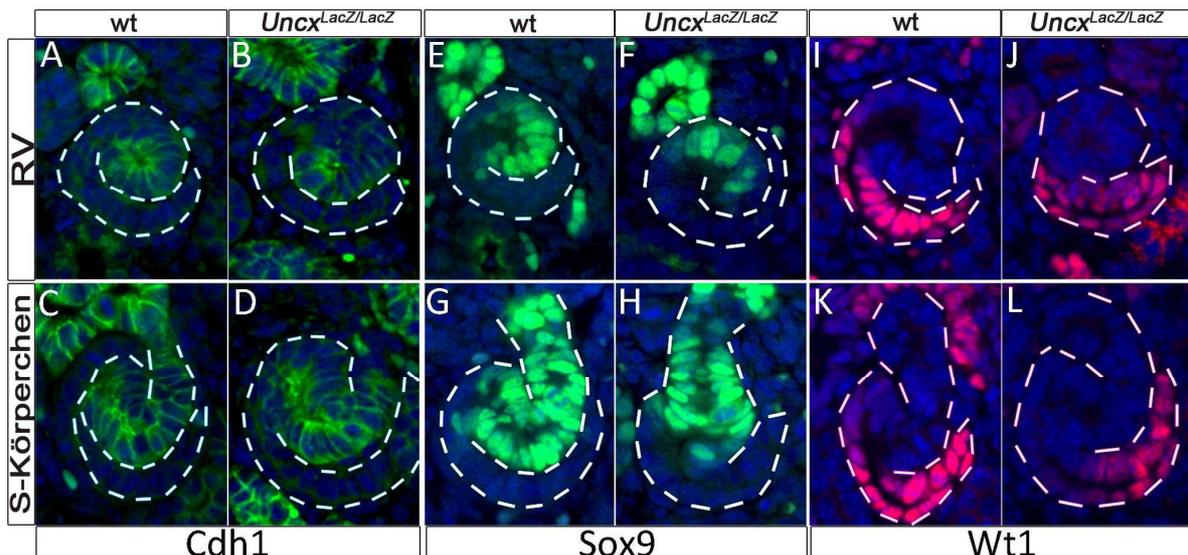


Abbildung 3.11: *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mäuse weisen eine normale Musterung von Komma-, und S-Körperchen auf. Immunfluoreszenzfärbungen für regional begrenzte Marker zeigen eine korrekte Musterung nephrogener Körperchen in Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nieren. Distale Region: Cdh1, (A-D); Sox9, (E-H). Proximale Region: (t1, (I,L). Immunfluoreszenzen wurden auf E18.5 Nierenschnitten durchgeführt. (RV: renlaes Vesikel) (n=3).

3.6 In *Uncx*-mutanten Nieren werden weniger Nephrone induziert

Die Analyse der Musterung nephrogener Körperchen gab keinen Hinweis auf einen Defekt der Nephrogenese in der *Uncx*-Mutante. Im Folgenden sollte die Frage adressiert werden, ob die reduzierte Anzahl von Nephronen in *Uncx*-mutanten Nieren aus einer Beeinträchtigung des Prozesses der Nephroninduktion resultiert. Dafür wurde sowohl die Anzahl nephrogener Strukturen als auch die der Ureterknospen quantitativ bestimmt. Der Quotient aus der Anzahl renaler Vesikel und der Anzahl an Ureterknospen definiert die Nephroninduktionsrate.

Das Zelloberflächenprotein Ncam wird in differenzierenden Zellen des Kappenmesenchyms exprimiert. Die Expression wird im gesamten Komma und S-Körperchen aufrechterhalten, jedoch mit der finalen Ausreifung der Nephrone herunterreguliert (Klein et al., 1988). Durch die Detektion von Ncam konnten somit ausschließlich heranreifende nephrogene Strukturen visualisiert werden (Abbildung 3.12 Pfeil). Eine CollagenIV Kofärbung trug zur besseren Identifizierung des entsprechenden Körperchens bei und diente der Zuordnung und Unterteilung relevanter Strukturen in die Kategorien: renale Vesikel, Komma- und S-Körperchen. Strukturen, welche aufgrund ihres Anschnittes keiner dieser Kategorien zugeordnet werden konnten, jedoch positiv für Ncam waren, wurden als „Unidentifiziert“ kategorisiert. Zur morphometrischen Analyse der Anzahl von Ureterknospen wurde eine ISH des im Ureterepithel exprimierten *Ret*, auf benachbarten Schnitten durchgeführt.

Im Durchschnitt war die absolute Anzahl aller nephrogenen Körperchen auf Nierenschnitten der *Uncx*-Mutante mit durchschnittlich 33 nephrogenen Körperchen pro Nierenschnitt deutlich reduziert gegenüber der Anzahl der Körperchen im Wildtyp (69 Körperchen pro Nierenschnitt) (Abbildung 3.12A). Die Anzahl epithelialer Knospen war mit einer absoluten Anzahl von durchschnittlich 43 *Ret* positiver Strukturen pro *Uncx*-mutantem Nierenschnitt leicht reduziert gegenüber dem Wildtyp (54 *Ret* positive Strukturen pro Wildtyp Nierenschnitt) (Abbildung 3.12A). Das Verhältnis neu gebildeter renaler Vesikel/Ureterknospe wurde durch die Quantifizierung *Wnt4*⁺-Strukturen, in unmittelbarer Nachbarschaft zu *Ret*⁺-Ureterknospen (Abbildung 3.12C Pfeil), ermittelt und war in Abwesenheit von *Uncx* signifikant reduziert (Abbildung 3.12C).

Dieses Ergebnis deutet auf eine verminderte Nephroninduktion durch den Verlust von *Uncx* hin.

Unter Berücksichtigung der Größenreduktion *Uncx*-mutanter Nieren, wurden die Anzahl der zu quantifizierenden Strukturen in Bezug zur Fläche gesetzt (X/mm^2). Die relative Verteilung nephrogener Körperchen wich in *Uncx*-mutanten Nieren nicht von der des Wildtypen ab. Dagegen war die relative Verteilung *Ret*⁺-Ureterknospen mit durchschnittlich 21 Ureterknospen/ mm^2 auf Nierenschnitten der *Uncx*-Mutante gegenüber 12 Ureterknospen/ mm^2 auf Wildtyp Nierenschnitten deutlich gesteigert (Abbildung 3.12B).

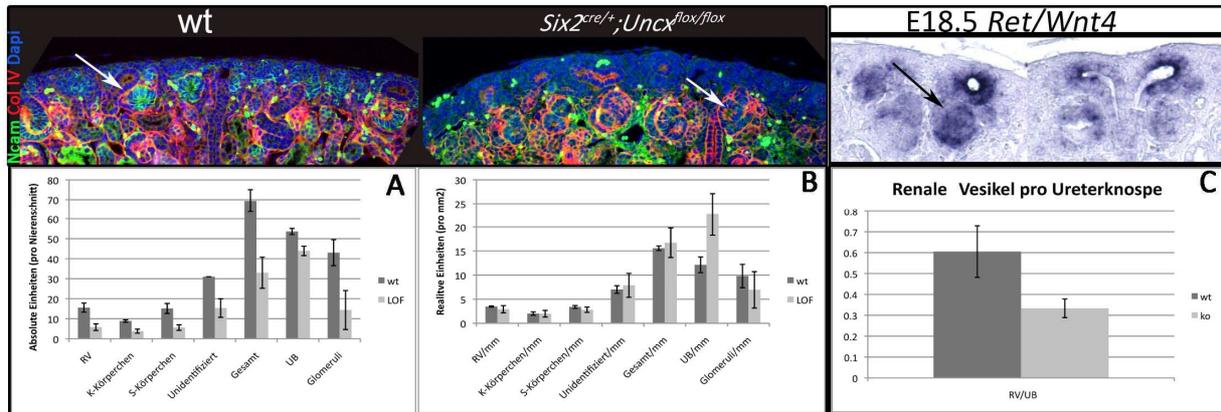


Abbildung 3.12: Die Nephroninduktionsrate ist reduziert in *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mäusen. (A-C) Quantifizierung früher nephrogener Strukturen (A) Immunfluoreszenzfärbung von Ncam/CollagenIV/Dapi zeigt eine signifikante Beeinträchtigung der Nephroninduktion, veranschaulicht durch die reduzierte absolute Anzahl Ncam positiver Strukturen auf *Six2*^{cre/+};*Uncx*^{flox/flox} Nierenschnitten im Vergleich zum Wildtyp (renalen Vesikel*: p=0,0038; Komma-Körperchen*: p=0,001679; S-Körperchen*: p=0,0044; Unidentifiziert: p=0,0042; Gesamt*: p=0,0028) (B) Relative Verteilung Ncam positiver Strukturen ist zwischen beiden Genotypen vergleichbar. Anzahl Ret positiver Strukturen ist erhöht auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten im Vergleich zum Wildtyp (UB/mm²*: p=0,0405) Anmerkung: *Six2*^{cre/+};*Uncx*^{flox/flox} Kappenmesenchym ist frei von Ncam Expression. (C) Ret und Wnt4 detektieren Ureterknospe sowie renales Vesikel. Wnt4 positive Strukturen wurde nur als solche gezählt wenn sie in direkter Nachbarschaft zu Ret positiven Strukturen lokalisiert waren (Pfeil). Mit durchschnittlich 0,37 renalen Vesikeln/Ureterknospe war das Verhältnis induzierter renaler Vesikel auf *Six2*^{cre/+};*Uncx*^{flox/flox} Nierenschnitten geringer als auf Wildtyp Nierenschnitten (0,61 renalen Vesikel/Ureterknospe) (renalen Vesikel/Ureterknospe* p=0,0085) (n=3). Immunfluoreszenzen sowie ISH wurden auf E18.5 Nierenschnitten durchgeführt. (K-Körperchen: Komma-Körperchen; RV: renale Vesikel, UK: Ureterknospen)

Zusammenfassend waren in Nieren der *Uncx*-Mutante bei E18.5 mehr Ureterknospen vorhanden, jedoch weniger nephrogene Strukturen. Außerdem war die Anzahl induzierter Nephrone pro Ureterknospe in *Uncx*-mutanten Nieren signifikant geringer, verglichen mit dem Wildtyp. Dieses Ergebnis impliziert eine Funktion von *Uncx* in der positiven Regulation der Nephroninduktion einerseits und eine Reprimierung der Verzweigungsmorphogenese andererseits.

3.7 *Uncx* hat keinen Einfluss auf die Zellteilung des Kappenmesenchyms

Eine sensible Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der Zellen des Kappenmesenchyms ist notwendig, um die Frequenz der Nephroninduktion und den Erhalt der Nephron Vorläuferpopulation zu gewährleisten (Mugford et al., 2009). In *Uncx*-Mutanten durchlaufen weniger Kappenmesenchymzellen eine MET die zur Induktion neuer Nephrone führt. Bei gleichbleibender Proliferation mesenchymaler Zellen führt dies unweigerlich zu einer Expansion der Zellzahl innerhalb des Kappenmesenchyms. Ein Unterschied bezüglich der Größe des Kappenmesenchyms *Uncx*-mutanter Nieren konnte auf histologischer Ebene allerdings nicht beobachtet werden (Abb.3.2G,H; 3.3E,F). Die daraus resultierende Frage, ob die Proliferationsrate der Zellen des Kappenmesenchyms durch die Abwesenheit von *Uncx* vermindert war, wurde mithilfe eines BrdU Proliferationsassays adressiert.

Six2^{cre/+};mTmG/+ und *Six2^{cre/+};mTmG/+;Uncx^{flox/flox}* Mäuse zeigten am Tag E13.5 eine Expression des GFP Reporters, sowohl in Zellen der nephrogenen Vorläuferpopulation als auch in deren Derivaten. Zur Bestimmung der Proliferation innerhalb des Kappenmesenchyms, wurden nur GFP⁺-Kappenmesenchymzellen ausgezählt. Der BrdU-Proliferationsindex definierte das Verhältnis zwischen proliferierenden, BrdU⁺-Zellen und der Gesamtzellzahl des Kappenmesenchyms.

Es konnte kein Unterschied der Proliferationsrate kappenmesenchymaler Zellen in *Uncx*-mutanten Nieren, im Vergleich zu Kontrollen, nachgewiesen werden (Abbildung 3.13). *Uncx* hatte demnach keinen Einfluss auf die Proliferation der Kappenmesenchymzellen.

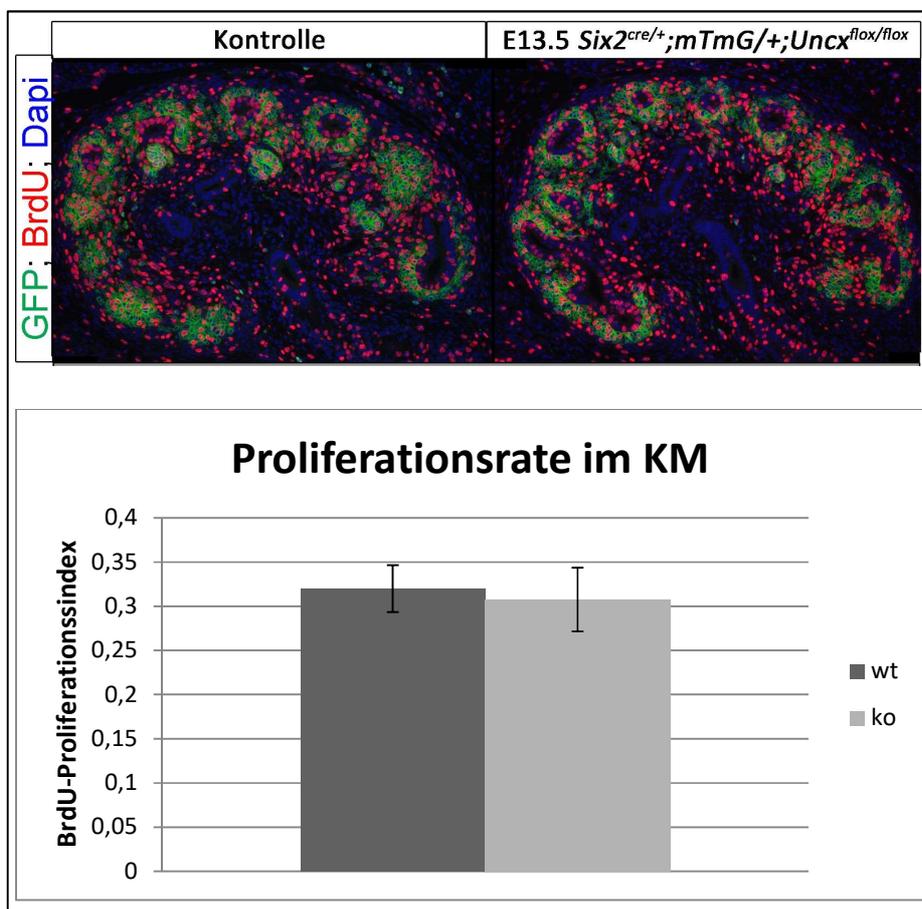


Abbildung 3.13 *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mäuse zeigen keine Veränderung der Proliferationsrate von Kappenmesenchymzellen. Immunfluoreszenzfärbung des *Six2^{cre}* gesteuerten GFP Reporters mit BrdU Inkorporationsassay auf E13.5 Wildtyp und *Six2^{cre/+};mTmG/+;Uncx^{flox/flox}* Nierenschnitten. BrdU-Proliferationsindex: Quotient aus proliferierenden BrdU⁺ Zellen zu GFP⁺ Kappenmesenchymzellen. Keine Abweichung der Proliferationsrate innerhalb *Six2^{cre/+};mTmG/+;Uncx^{flox/flox}* Kappenmesenchyms und Kontrollen. (n=3)

3.8 *Uncx* beeinflusst die Zellteilung der epithelialen Ureterknospe

In *Uncx*-mutanten Nieren war die Anzahl der Ureterknospen pro mm² signifikant höher als im Wildtyp. Daraus ergibt sich die Frage inwiefern *Uncx* die Proliferation der Ureterknospenzellen und damit die Verzweigungsmorphogenese beeinflusst. Zur Bestimmung der Proliferationsrate epithelialer Zellen wurde ein BrdU Proliferationsassay auf E13.5 Nierenschnitten durchgeführt. Die Zellen der Ureterknospe wiesen eine starke Expression von Pax2 (Narlis et al., 2007) auf (Abbildung 3.14). Der BrdU-Proliferationsindex wurde als Quotient zwischen proliferierenden, BrdU⁺-Zellen und Pax2⁺-Zellen der Ureterknospen definiert. Wohingegen auf wildtypischen Nierenschnitten im Mittel 41% der Pax2⁺-Zellen positiv für den Proliferationsmarker waren, waren es auf Nierenschnitten der *Uncx*-Mutante im Durchschnitt 59% (Abbildung 3.14). Diese signifikante Steigerung der epithelialen Proliferationsrate deutet auf einen reprimierenden Effekt von *Uncx* auf das Wachstum der Ureterknospe hin. Die *Uncx*-Expression ist von Zellen der Ureterknospe ausgeschlossen, was einen indirekten Mechanismus der Proliferationsregulation durch *Uncx* im Epithel nahelegt.

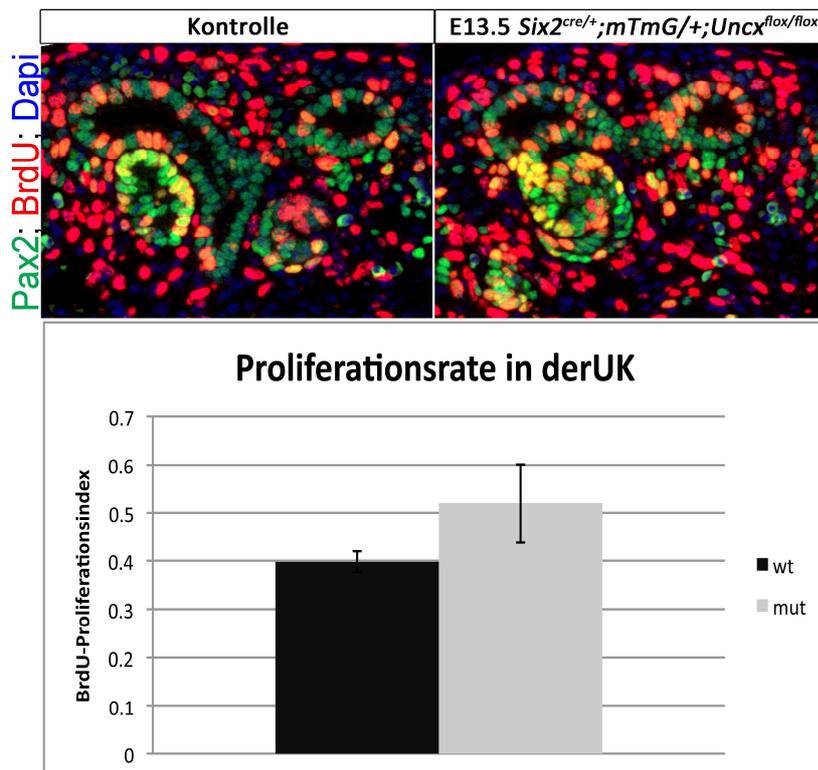


Abbildung 3.14: Ureterknospen von *Uncx*-mutanten Mäusen zeigen eine höhere Proliferationsrate. Pax2/BrdU/Dapi-Immunfluoreszenzfärbung und BrdU Inkorporationsassay auf E13.5 Wildtyp und *Six2^{cre/+};mTmG/+;Uncx^{fllox/fllox}* Nierenschnitten. BrdU-Proliferationsindex: Quantifizierung proliferierender BrdU positiver Zellen im Verhältnis zu Pax2 positiven Ureterknospe Zellen. Proliferationsrate innerhalb *Six2^{cre/+};mTmG/+;Uncx^{fllox/fllox}* Ureterknospen ist erhöht (0,61 BrdU-positive Zellen/Pax2 positive Zellen), verglichen mit Kontrollen (0,41 BrdU-positive Zellen/Pax2 positive Zellen) (Proliferationsindex*: p=0,013) (n=3)

3.9 *Uncx*-mutantes Kappenmesenchym zeigt ein geringeres Potential zur Nephroninduktion

Uncx-mutante Nieren zeigen eine gesteigerte Verzweigungsmorphogenese und weniger Nephrogenese. Unklar ist allerdings ob *Uncx*-mutante Kappenmesenchymzellen ein geringeres intrinsisches Potenzial zur Nephrogenese besitzen, oder ob die Nephroninduktion durch die gesteigerte Dynamik der Verzweigungsmorphogenese beeinträchtigt wird.

Das dorsale Rückenmark imitiert die Signalübertragung des Ureterepithels und vermag Nephrogenese im isolierten Kappenmesenchym zu induzieren (Kispert et al., 1998). Kappenmesenchym wurde von E11.5 *Uncx*-Mutanten sowie Kontrolltieren, isoliert und zusammen mit dorsalem Rückenmark kokultiviert. Nach zwei tägiger Kokultivierung mit dorsalem Rückenmark konnte in wildtypischem Kappenmesenchym, über die Detektion des in nephrogenen Strukturen exprimierten *Pax8* (Torban and Goodyer, 1998), die Nephroninduktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.15A). In *Uncx*-mutantem Kappenmesenchym, welches durch das dorsale Rückenmark induziert wurde, konnten dagegen signifikant weniger nephrogene Strukturen nachgewiesen werden, die zudem eine, im Vergleich zur Kontrolle, sehr schwache Expression von *Pax8* zeigten (Abbildung 3.15B,C). *Uncx*-mutantes Kappenmesenchym, welches 4 Tage mit dorsalem Rückenmark kokultiviert wurde zeigte dagegen eine, mit der Kontrolle vergleichbare Expression von *Pax8* (Abbildung 3.15D,E). *Uncx*-mutante Nieren, welche kurz nach Induktion durch die Ureterknospe bei E11.5 explantiert und für zwei Tage kultiviert wurden unterschieden sich weder in ihrer Größe, noch in der Anzahl an *Pax8*⁺ Strukturen vom Wildtyp (Abbildung 3.15F,G).

Dieses Ergebnis deutet auf eine verzögerte Nephroninduktion in *Uncx*-mutanten Kappenmesenchymzellen hin. Diese Verzögerung ist auf eine Beeinträchtigung des Kappenmesenchyms selbst zurückzuführen, die unabhängig von der Verzweigungsmorphogenese der Ureterknospe ist. Dass es sich dabei lediglich um eine Verzögerung der Induktion handelt, isoliertes Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Mäuse jedoch grundsätzlich die Fähigkeit zur Nephroninduktion aufweist, konnte durch die Induktion nephrogener Strukturen in mutantem Kappenmesenchym nach 4 Tagen Kultur gezeigt werden. Der Größe der *Pax8*⁺ detektierten Strukturen unterschied sich nicht von der des Wildtyps (Abbildung 3.15D,E). Dieser Phänotyp konnte durch *Uncx*-mutante Nieren, welche vollständig bei E11.5 explantiert und für 2 Tage kultiviert wurden, nicht rekapituliert werden (Abbildung 3.15F,G).

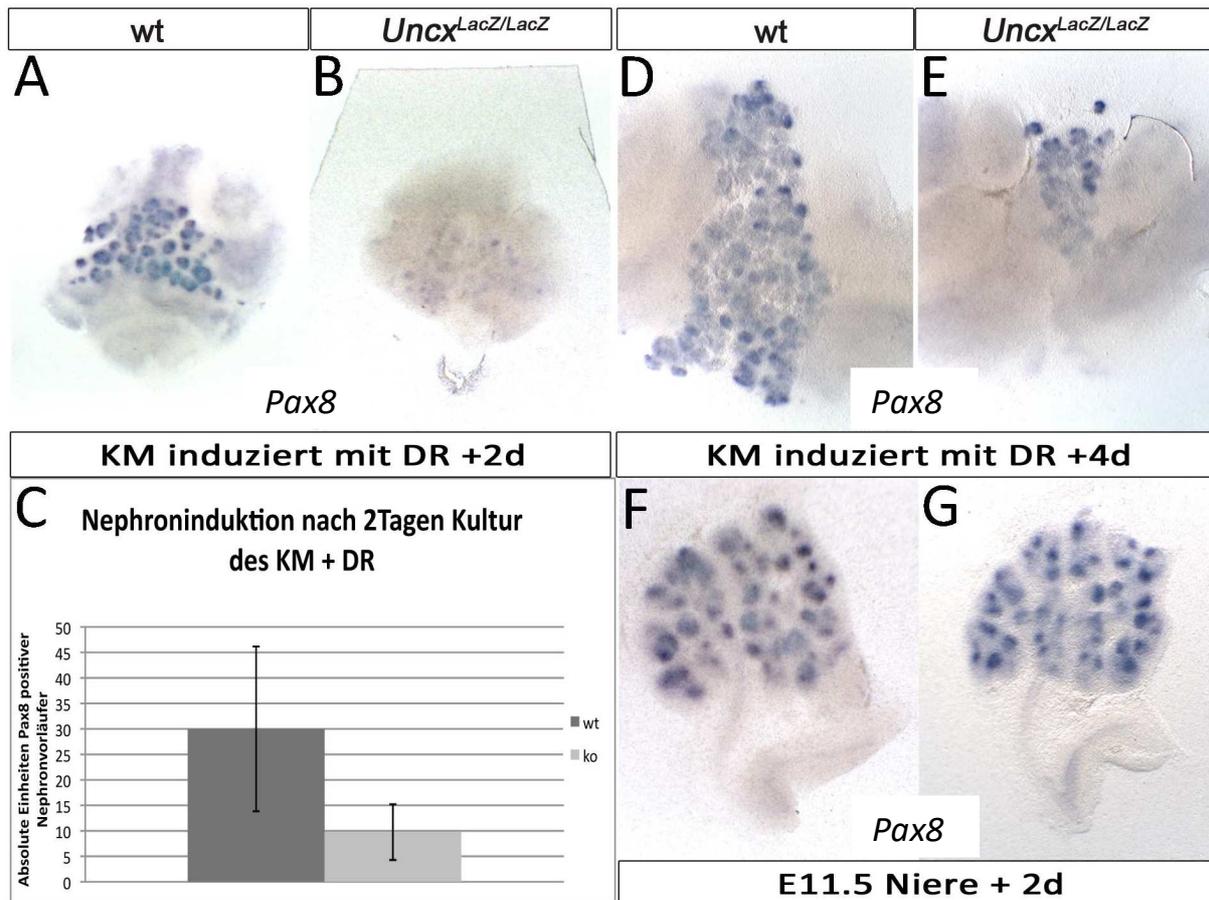


Abbildung 3.15: Isoliertes Kappenmesenchym von *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mäusen zeigt ein geringeres Potenzial zur Nephroninduktion. (A-E) Ko-kultivierung von isoliertem Kappenmesenchym mit dorsalem Rückenmark (DR) von E11.5 Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Embryonen. Anschließende Ganzpräparat-ISH der Kulturen mit *Pax8* zur Detektion epithelialer Strukturen. (A,B) Starke Färbung *Pax8*⁺ Strukturen in induziertem E11.5 Wildtyp Kappenmesenchym nach 2 Tagen Kultivierung. Schwache *Pax8*-Färbung in induziertem E11.5 *Uncx^{LacZ/LacZ}* Kappenmesenchym nach 2 Tagen Kultivierung. (C) Strukturen sind im Kappenmesenchym von *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mäusen in ihrer Anzahl reduziert (*Pax8* positive Strukturen: p=0,0046). (D,E) Starke Färbung *Pax8* positiver Strukturen auf induzierten E11.5 Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Kappenmesenchyms nach 2 Tagen Kultur. (F,G) Kein offensichtlicher Unterschied der Anzahl *Pax8* positiver Strukturen auf E11.5 *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nieren nach 2 Tagen Kultur, im Vergleich zum Wildtyp. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte (n=7). KM, Kappenmesenchym; DR, dorsales Rückenmark

3.10 *Uncx* hat keinen Einfluss auf die Expression bekannter *Wnt9b*, *Wt1* und *Yap* Zielgene

Es konnte gezeigt werden, dass *Uncx* in die Steuerung des Epithelialisierungsprozesses der Kappenmesenchymzellen involviert ist. Durch welche Signalwege der Transkriptionsfaktor *Uncx* diesen Prozess vermittelt, ist jedoch weiterhin unklar. Als potentielle Kandidaten kommen Zielgene infrage, welche durch Faktoren gesteuert werden, die auch die Expression von *Uncx* positiv regulieren. Epithelial exprimiertes *Wnt9b*, mesenchymales *Wt1* und das durch den Hippo-Signalweg regulierte *Yap* wurden bereits als *Uncx*-Regulatoren beschrieben (Karner et al., 2011; Motamedi et al., 2014; Reginensi et al.,

2013). Ob und inwiefern *Uncx* die molekulare Steuerung der Nierenentwicklung unterhalb dieser Faktoren beeinflusst, sollte durch eine Analyse der Expression prominenter Zielgene von *Wnt9b*, *Wt1* und *Hippo* gezeigt werden.

Axin2 ist ein Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs und gilt als etablierter Marker für Wnt-Signalwirkung (Willert et al., 1999). In der nephrogenen Zone aller analysierten Stadien konnte im Wildtyp eine starke Expression der *Axin2* mRNA innerhalb der Ureterknospe und eine schwache Expression in benachbarten Kappenmesenchymzellen detektiert werden (Abbildung 3.16A,C,E). *Uncx*-mutante Nieren zeigten keine Abweichung der wildtypischen *Axin2* Expression (Abbildung 3.16B,D,F).

Inwiefern *Uncx* eine Rolle in der Vermittlung des *Wnt9b* Signals innerhalb der Kappenmesenchymzellen spielt, sollte anhand der Expression von *Wnt9b* Zielgenen (Karner et al., 2011) untersucht werden. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nieren kein Unterschied in der Expression von *Cdh4*, *Wnt4*, *Crym*, *Cited1* und *Etv5* beobachtet werden (Abbildung 3.17A-D; Abbildung 3.7M-R; Abbildung 3.4A-F). Auch die Expression der *Wt1*-Zielgene *Bmper*, *Sall1*, *Etv5* (Abbildung 3.17E-J) und *Wnt4* (Abbildung 3.7G-L) (Hartwig et al., 2010; Motamedi et al., 2014a) unterschied sich auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten nicht von der wildtypischen. Zielgene des Yap-Signalwegs *Capn6*, *Meox2*, *Fgf10* (Reginensi et al., 2013) und *Sostdc1* (Yanagita et al., 2004) zeigten auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten eine mit dem Wildtypen vergleichbare Expression (Abbildung 3.7M-R).

Zusammenfassend konnte keine Rolle von *Uncx* in der Regulation der getesteten Zielgene gezeigt werden.

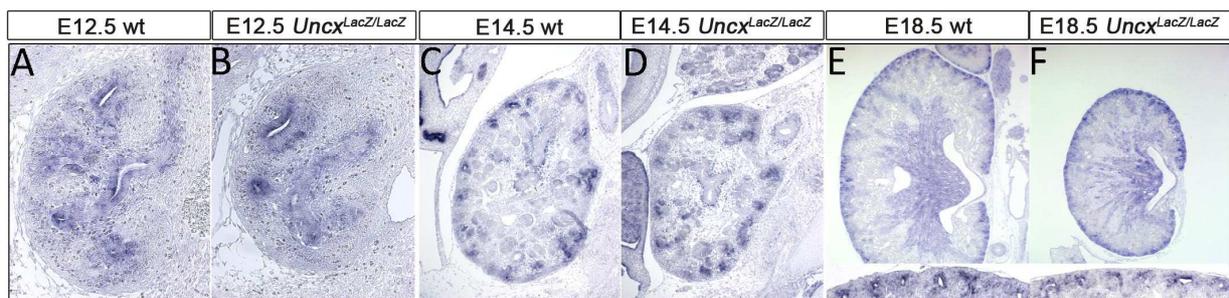


Abbildung 3.16: Die Wnt Aktivität wird über das Zielgen *Axin2* ausgelesen. ISH zur Detektion von *Axin2* RNA auf E12.5, E14.5 und E18.5 repräsentativen midsagitalen Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten. Es wurde kein Unterschied im Expressionsmuster von *Axin2* auf verschiedenen Stadien der *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitte im Vergleich zur Kontrolle detektiert.

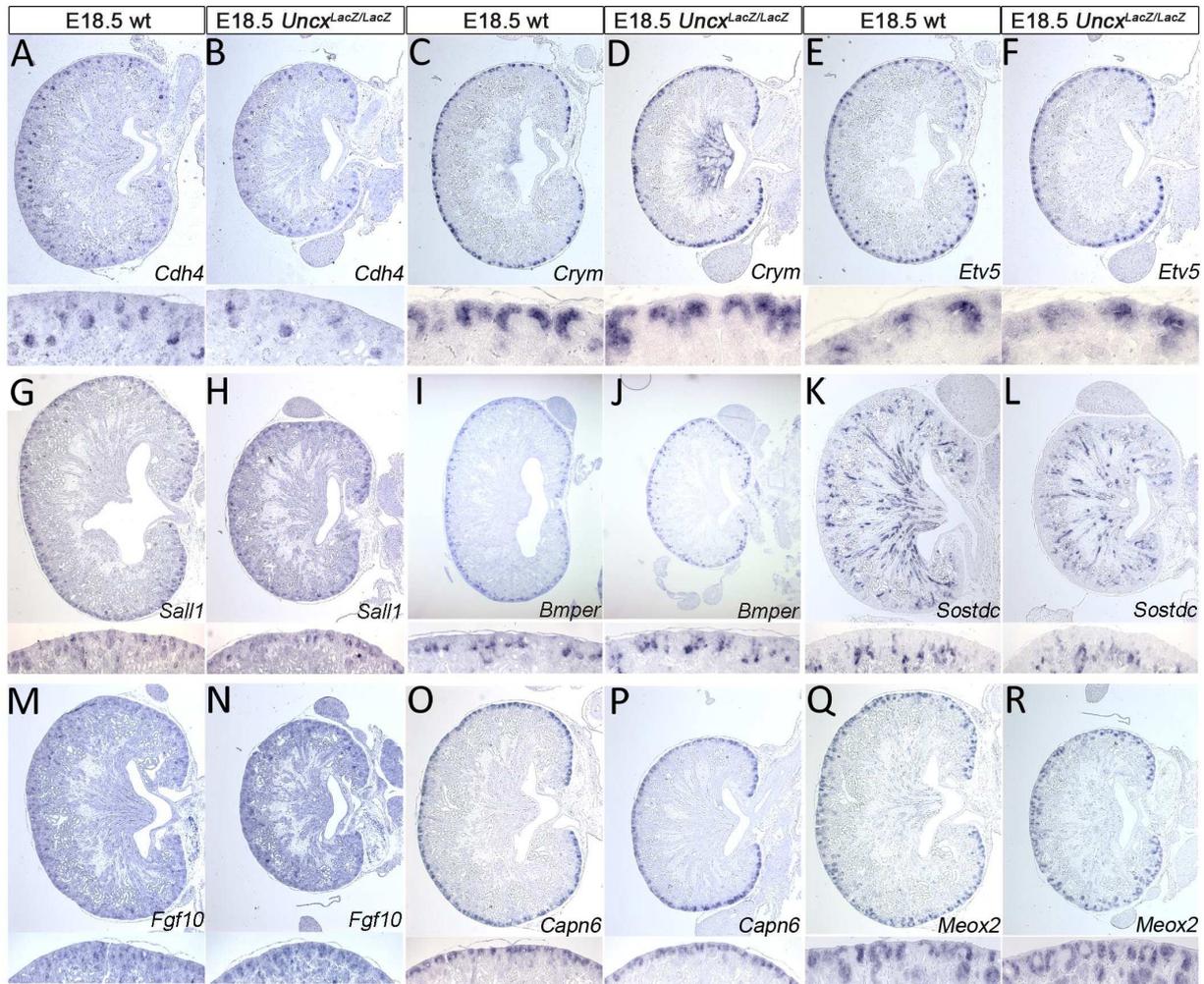


Abbildung 3.17: Prominente Zielgene des Wnt9b-, Wt1- und Hippo-Signalwegs sind in *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mäuse nicht dereguliert. (A-F) Wnt9b Klasse I Zielgene (A,B, *Cdh4*) und Wnt9b Klasse II Zielgene (C,D, *Crym*; E,F *Etv5*) zeigen keine Abweichung ihres Expressionsmusters auf E18.5 *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten verglichen mit Kontrollen. (E-H) Wt1 Zielgene (E,F *Etv5*; G,H, *Sall1*; J,L; *Bmper*) zeigen keine Abweichung ihres Expressionsmusters auf E18.5 *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten, verglichen mit Kontrollen. Zielgene des Yap vermittelten Hippo-Signalwegs (K,L, *Sostdc*; M,N, *Fgf10*; O,P *Capn6*; Q,R, *Meox2*) zeigen keine Abweichung ihres Expressionsmusters auf E18.5 *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten, verglichen mit Kontrollen (n=3).

3.11 Über eine Transkriptomanalyse *Uncx*-mutanter Nieren können potentielle Zielgene von *Uncx* detektiert werden

Welche Gene mittel- und unmittelbar durch die transkriptionelle Regulation von *Uncx* gesteuert werden, sollte durch eine Transkriptomanalyse *Uncx*-mutanter Nieren gezeigt werden. Eine RNA Mikroarray Analyse wurde für *Uncx*-mutante Nieren durchgeführt, deren Entwicklungsstadien nahe am Eintreten der Größenreduktion lagen, welche durch die *Uncx*-Mutation verursacht wird. Dadurch sollten sekundäre Effekte, welche auf strukturelle Veränderungen der Niere zurückgingen, weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei E12.5 konnte histologisch keine Abweichungen *Uncx*-mutanter Nieren gegenüber Wildtyp Nieren beobachtet werden (Abbildung 3.18A,B). E14.5 *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nieren zeigten gegenüber wildtypischen Nieren dagegen eine signifikante Größenreduktion (Farin, 2005) (Abbildung 3.18C,D). Die Mikroarray Analyse wurde aus diesem Grund mit E12.5, E13.5 und E14.5 *Uncx*-mutanten Nieren durchgeführt. Potenzielle *Uncx*-Zielgene wurden anschließend mittels ISH auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten validiert.

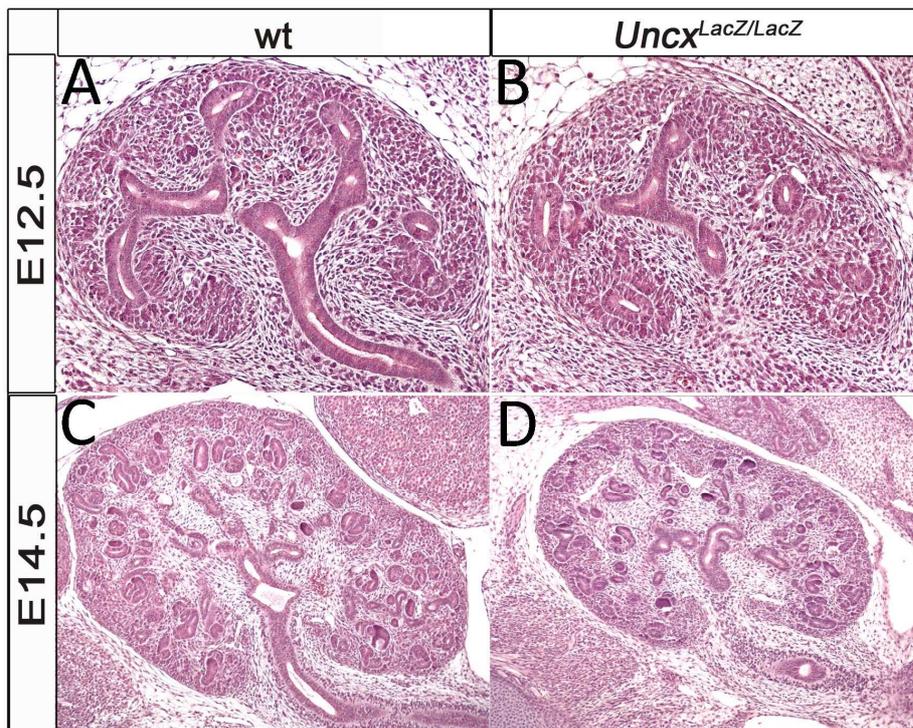


Abbildung 3.18: Beginn phänotypischer Unterschiede von *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nieren im Vergleich zum Wildtyp. (A-D) HE Färbung von E12.5 und E14.5 Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten (n=3).

3.11.1 Durch die Mikroarray Analyse können Gene ermittelt werden, welche durch den Verlust von *Uncx* eine höhere Expression aufweisen

Mittels der Mikroarray Analyse konnten für einige Gene erhöhte Expressionsintensitäten in *Uncx*-mutanten Nieren, verglichen mit entsprechenden Wildtypen, detektiert werden (siehe: Anhang). Durch ISH sollten einerseits die Ergebnisse der Microarray Analyse validiert, andererseits die räumliche Expression der entsprechenden Kandidaten innerhalb *Uncx*-mutanter Nieren definiert werden. Gene mit einer erhöhten Expression im Kappenmesenchym galten als potentielle Kandidaten einer direkten Reprimierung durch *Uncx*.

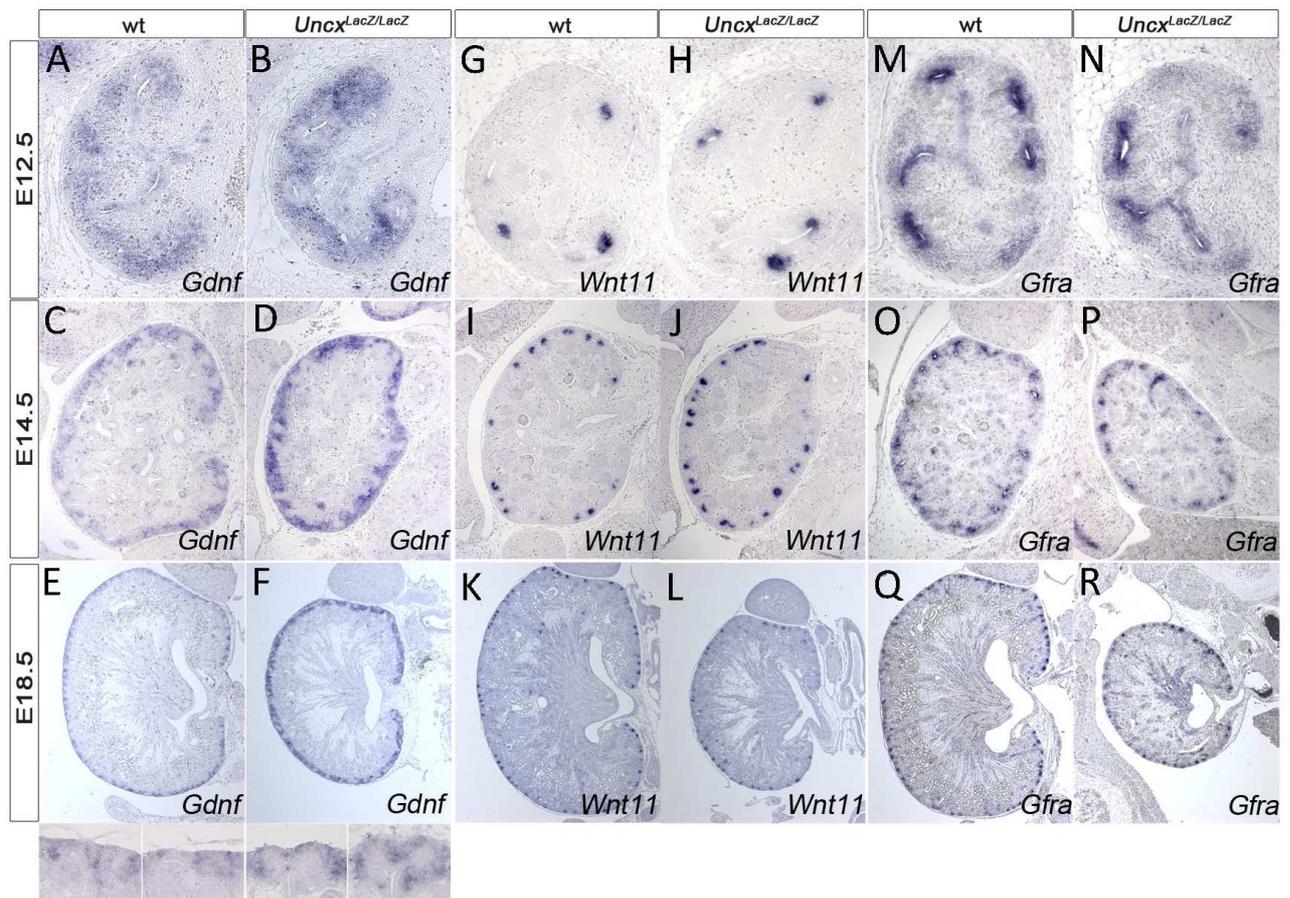


Abbildung 3.19: Validierung der Mikroarraydaten. Analyse der Differenziellen Genexpression mittels ISH für (A-F) *Gdnf*, (F-L) *Wnt11* und (M-R) *Gfra* mRNA auf E12.5, E14.5 und E18.5 Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten (n=3).

Die *Gdnf* Expressionsdomäne ist auf das Kappenmesenchym begrenzt (Pepicelli et al., 1997) und die zu erwartende Hochregulation von *Gdnf* wurde in *Uncx*-mutanten Nieren mittels ISH im Kappenmesenchym von E12.5, E14.5 und E18.5 Nieren bestätigt (Abbildung 3.19A-F). Auch *Gfra*, *Wnt11*, *Crlf1*, *Hoxb3* und *Id4* zeigten der Mikroarray Analyse zufolge eine erhöhte Expression in *Uncx*-mutanten Nieren, im Vergleich zum Wildtyp. Eine stärkere Expression dieser Gene innerhalb ihrer jeweiligen Expressionsdomäne konnte in *Uncx*-mutanten Nieren, im Vergleich zum Wildtyp, für kein Stadium durch ISH bestätigt werden (Abbildung 3.20).

Einige der Faktoren, für die mittels Mikroarray Analyse eine erhöhte Expression innerhalb *Uncx*-mutanter Nieren gezeigt werden konnte, hatten eine starke Expressionsdomäne innerhalb des Ureterepithels (siehe auch (Abbildung 3.21C,D; I,J; K,L)). Eine ektopische Expression dieser Gene konnte zwischen wildtypischen und *Uncx*-mutanten Nierenschnitten nicht beobachtet werden. Die erhöhte Anzahl an

Ureterknospen, könnte jedoch in *Uncx*-mutanten Nieren ursächlich für die erhöhten Transkriptraten dieser epithelialen Faktoren sein.

Für einige Kandidaten, konnte das Ergebnis der Mikroarray Analyse nicht durch ISH validiert werden. In diesem Zusammenhang schien die Methode der ISH zu unsensitiv um marginale Unterschiede der Expression entsprechender Faktoren auf *Uncx*-mutanten Nieren, im Vergleich zum Wildtyp, bestätigen zu können (Abbildung 3.21A,B; E,F; G,H; Abbildung 3.22; Abbildung 3.23).

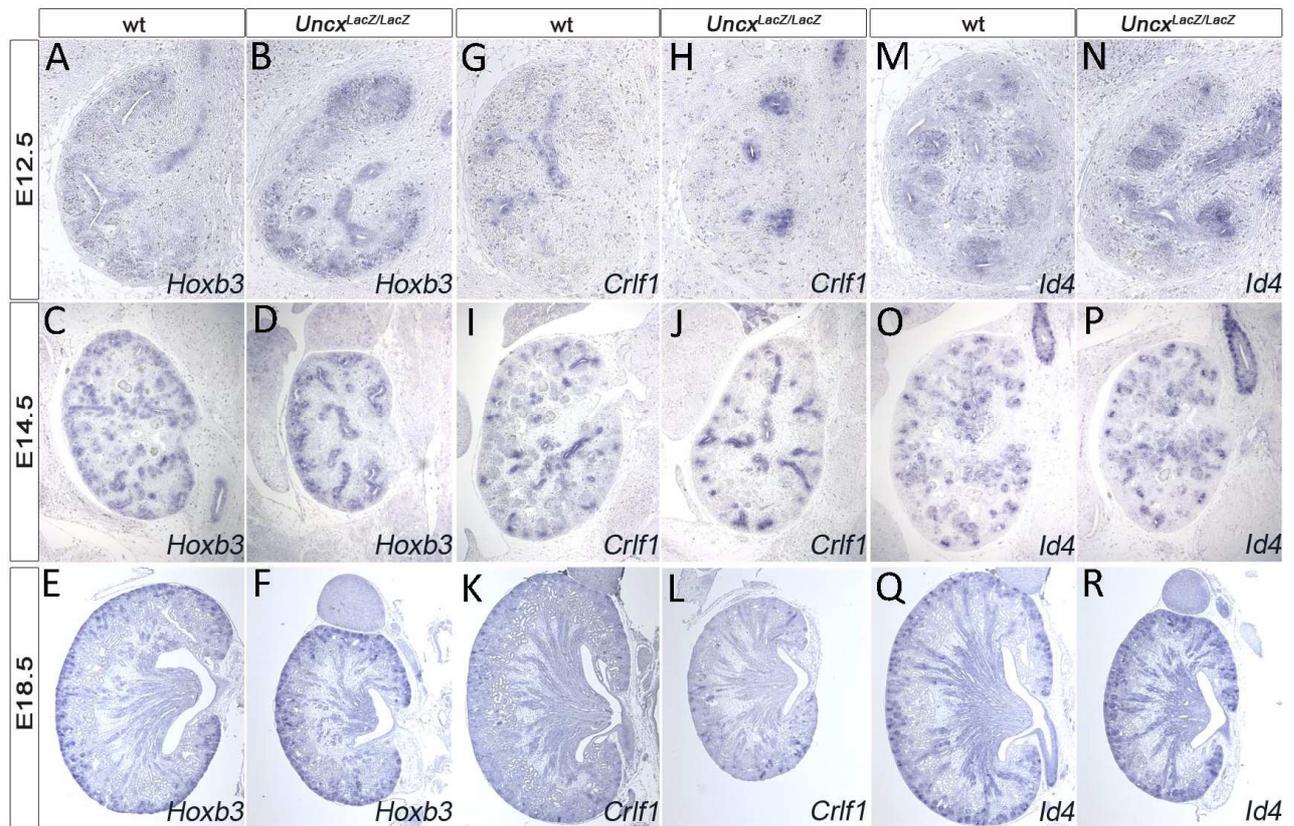


Abbildung 3.20: Validierung der Mikroarraydaten. Analyse der differentiellen Genexpression mittels ISH für (A-F) *Hoxb3*, (G-L) *Crlf1* und (M-R) *Id4* mRNA auf E12.5, E14.5 und E18.5 Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten (n=3).

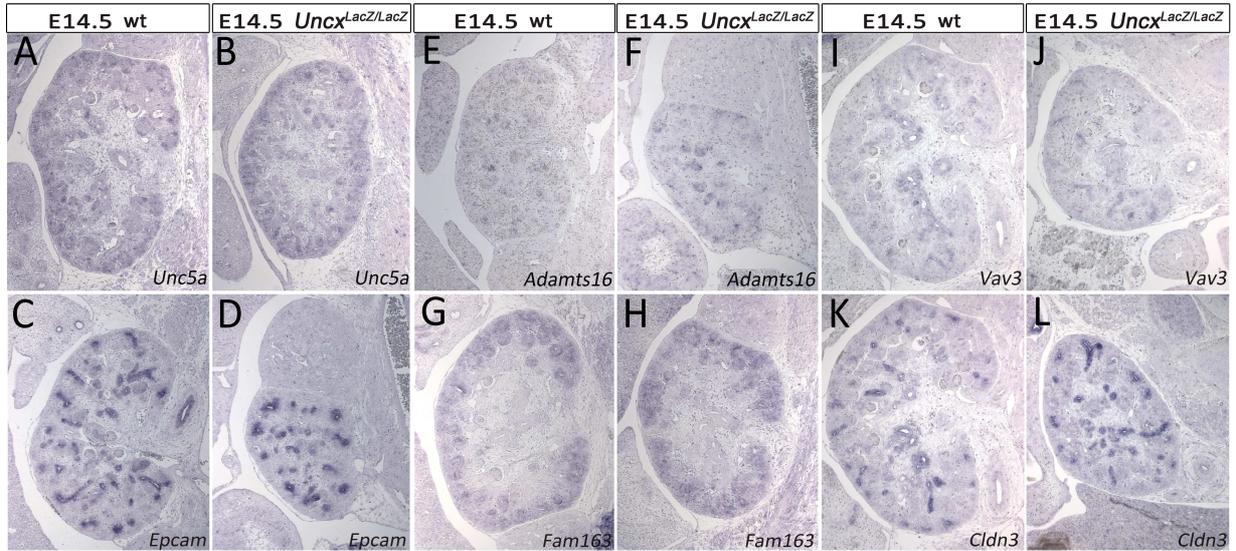


Abbildung 3.21: Validierung der Mikroarraydaten. ISH der im Mikroarray hochregulierten Gene auf Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E14.5. Expression von Genen im: Ureterepithel (C,D, *Epcam*; I,J, *Vav3*; K,L, *Cldn3*), äußeren Kortex (A,B, *Unc5a*; G,H, *Fam163*), ohne eindeutige Expressionsdomäne innerhalb der Niere (E,F, *Adamts16*) (n=3).

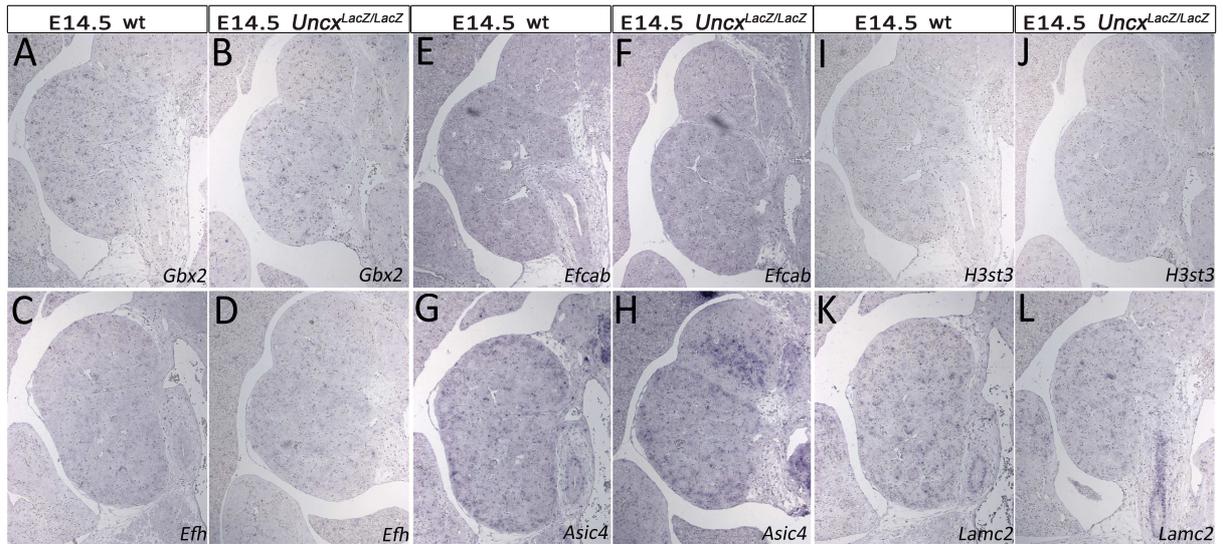


Abbildung 3.22 Validierung der Mikroarraydaten. ISH der im Mikroarray hochregulierten Gene auf Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten bei E14.5. Expression von Genen ohne eindeutige Expressionsdomäne innerhalb der Niere (A,B, *Gbx2*; C,D, *Efh*; G,H, *Asic4*; E,F, *Efcab*; I,J, *H3st3*; K,L, *Lamc2*) (n=3).

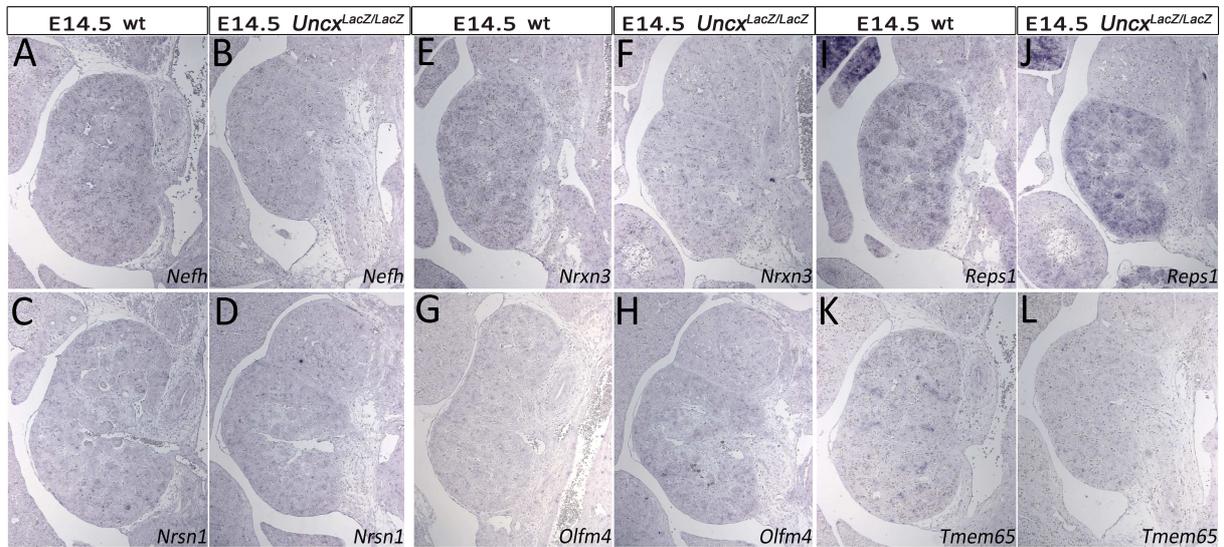


Abbildung 3.23 Validierung der Mikroarraydaten. ISH der im Mikroarray hochregulierten Gene auf Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten bei E14.5. Expression von Genen ohne eindeutige Expressionsdomäne innerhalb der Niere (A,B, *Nefh*; C,D, *Nrsn1*; E,F, *Nrnx3*; G,H, *Olfm4*; I,J, *Reps1*; K,L, *Tmem65*) (n=3).

3.11.2 Einige der durch die Mikroarray Analyse ermittelten Gene, welche in *Uncx*-mutanten Nieren herunter reguliert sind, werden innerhalb nephrogener Strukturen und dem Kappenmesenchym exprimiert

Die Mikroarray Analyse zeigte für einige Gene eine geringere Expressionsintensität in *Uncx*-mutanten Nieren, verglichen mit entsprechenden Wildtypen (siehe: Anhang). Um dieses Ergebnis zu validieren und die Expressionsdomäne innerhalb der sich entwickelnden Niere zu detektieren wurde eine ISH einiger Kandidaten auf *Uncx*-mutanten Nierenschnitten zu verschiedenen Stadien der Nierenentwicklung durchgeführt.

Sulf1, *Dll1*, *Fzd10*, *Crb2* und *Eva1a* wurden mittels ISH in nephrogenen Körperchen detektiert. Die Expressionstärke dieser Kandidaten war auf Nierenschnitten *Uncx*-mutanter Tieren mit der wildtypischen vergleichbar (Abbildung 3.24). Demnach ist die durch die Mikroarray Analyse detektierte Deregulation dieser Gene mit großer Wahrscheinlichkeit auf die verminderte Anzahl nephrogener Strukturen zurück zu führen. Das deutet darauf hin, dass die verminderte Expression dieser Gene eine Konsequenz der strukturellen phänotypischen Veränderungen der *Uncx*-Niere darstellt.

Auf E12.5 wildtypischen und *Uncx*-mutanten Nierenschnitten konnte eine *Gata6* Expression im Uretermesenchym und eine sehr schwache Expression innerhalb der Niere detektiert werden (Abbildung 3.27). Ab E14.5 konnte durch ISH keine *Gata6* mRNA auf Nierenschnitten des Wildtyps und der *Uncx*-Mutanter mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3.27). Ob und inwiefern die Expression von *Gata6*

innerhalb der Niere in *Uncx*-mutanten Nieren reduziert ist, konnte durch diese Methode nicht eindeutig beantwortet werden.

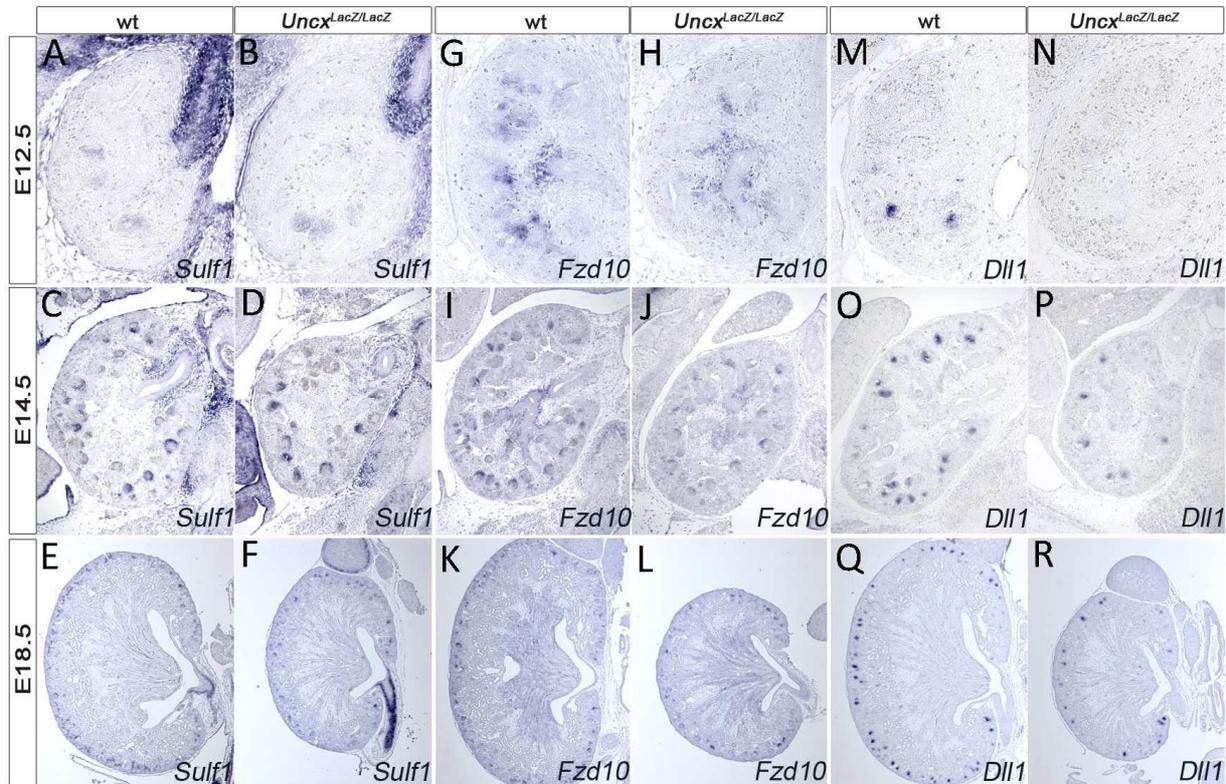


Abbildung 3.24: Validierung der Mikroarraydaten. Analyse der differentiellen Genexpression mittels ISH für (A-F) *Sulf1*, (G-L) *Fzd10* und (M-R) *Dll1* mRNA auf E12.5, E14.5 und E18.5 Wildtyp und *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten (n=3).

Das Zelladhäsionsprotein *Ncam* zeigt eine schwache Expression in mesenchymalen Zellen, die zu differenzierteren Kappenmesenchymzellen hin zunimmt (Bard et al., 2001) und im gesamten nephrogenen Körperchen aufrechterhalten wird (Klein et al., 1988).

Durch eine ISH zum Nachweis von *Ncam* mRNA auf wildtypischen Nierenschnitten verschiedener Stadien, konnten die für *Ncam* beschriebenen Expressionsdomänen bestätigt werden (Abbildung 3.25 A). Wohingegen E12.5, E14.5 und E18.5 Wildtyp Nierenschnitte eine *Ncam* Expression im Kappenmesenchym zeigten, war *Uncx*-mutantes Kappenmesenchym annähernd frei von *Ncam* Expression (Abbildung 3.25 A-F). Nephrogene Körperchen *Uncx*-mutanter Nieren zeigten dagegen eine mit dem Wildtyp vergleichbare *Ncam* Expression (Abbildung 3.25 A E,F). Im Wildtyp konnte *Ncam*-Protein in dem Aspekt des Kappenmesenchyms nachgewiesen werden, in dem Zellen eine epitheliale Konversion durchlaufen (Abbildung 3.25 B). Im Kappenmesenchym der *Uncx*-Mutante war die Expression

von Ncam massiv reduziert (Abbildung 3.25 D). Die Ergebnisse der ISH für *Ncam* werden durch die Detektion des Ncam-Proteins bestätigt (Abbildung 3.26).

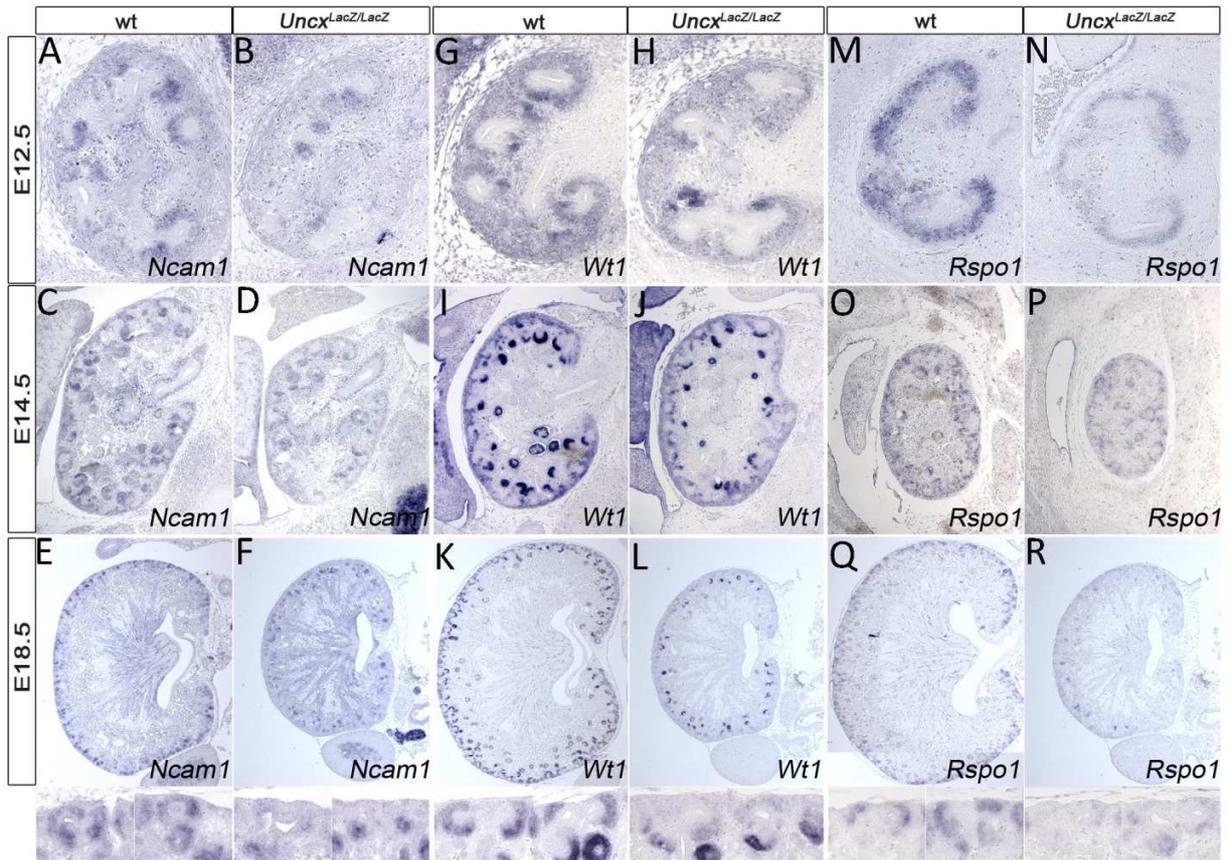


Abbildung 3.25: Validierung der Mikroarraydaten. Analyse der Differenziellen Genexpression mittels ISH für (A-F) *Ncam1*, (G-L) *Wt1* und (M-R) *Rspo1* mRNA auf E12.5, E14.5 und E18.5 Wildtyp und *Uncx1^{LacZ/LacZ}* Nierenschnitten (n=3).

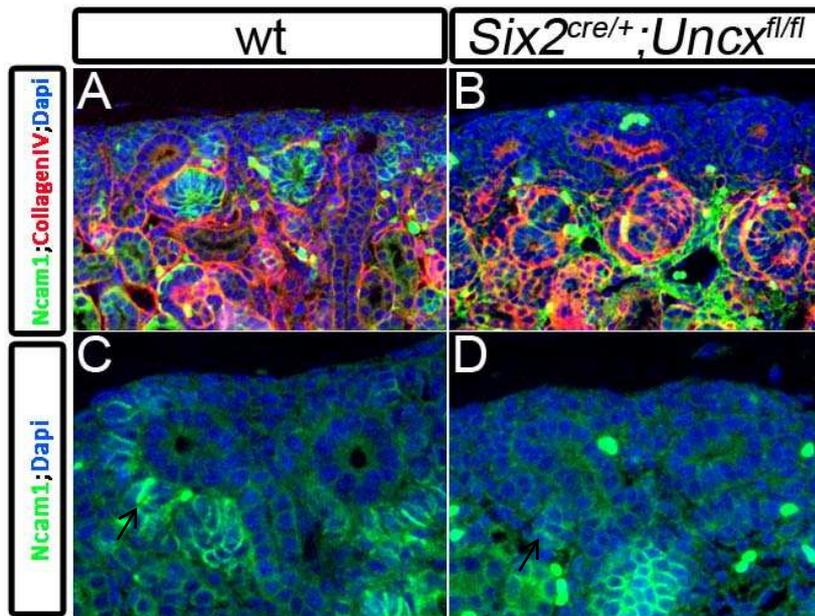


Abbildung 3.26: Ncam1-Protein kann nicht im Kappenmesenchym der *Uncx*-Mutante bei E18.5 detektiert werden. (A,B) Immunfluoreszenzfärbung von Ncam/CollagenIV/Dapi (20x) und (C,D) Immunfluoreszenzfärbung von Ncam/Dapi zeigt eine massive Reduktion der Ncam Expression im Kappenmesenchym der *Six2^{cre/+};Uncx^{fl/fl}* Mutante (n=3).

Wt1 wird sowohl im Kappenmesenchym als auch im proximalen Anteil nephrogener Körperchen exprimiert (Donovan et al., 1999; Palmer et al., 2001). *Uncx*-mutante und wildtypische Nierenschnitte zeigten bei E14.5 und E18.5 eine starke Expression von *Wt1* in Sichel,- und halbkreisförmigen Strukturen zukünftiger Nierenkörperchen (Abbildung 3.25: I-L). Im Vergleich zum Wildtyp zeigten *Uncx*-mutante Nieren eine schwächere *Wt1* Expression im kortikalen Mesenchym bei E12.5 und E14.5 sowie eine schwächere *Wt1* Expression innerhalb des Kappenmesenchyms bei E18.5 (Abbildung 3.25: H,L).

Die *Rspo1* Expression ist auf wildtypischen sowie *Uncx*-mutanten Nierenschnitten bei E12.5 auf das Kappenmesenchym begrenzt und wird dort bis E18.5 exprimiert (Abbildung 3.25: M,N). In *Uncx*-mutanten Nieren ist die *Rspo1* Expression im Kappenmesenchym zu allen analysierten Stadien drastisch reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.25: N,P,R).

Zusammenfassend wurden durch die Mikroarray Analyse einerseits Gene erkannt deren reduzierte Expressionsintensitäten wahrscheinlich aus der Reduktion der Anzahl ihrer Expressionsdomänen resultierte. Andererseits war die Expressionsstärke einiger Kappenmesenchym-Gene reduziert, was möglicherweise auf eine potentielle direkte Regulation durch *Uncx* hinweist.

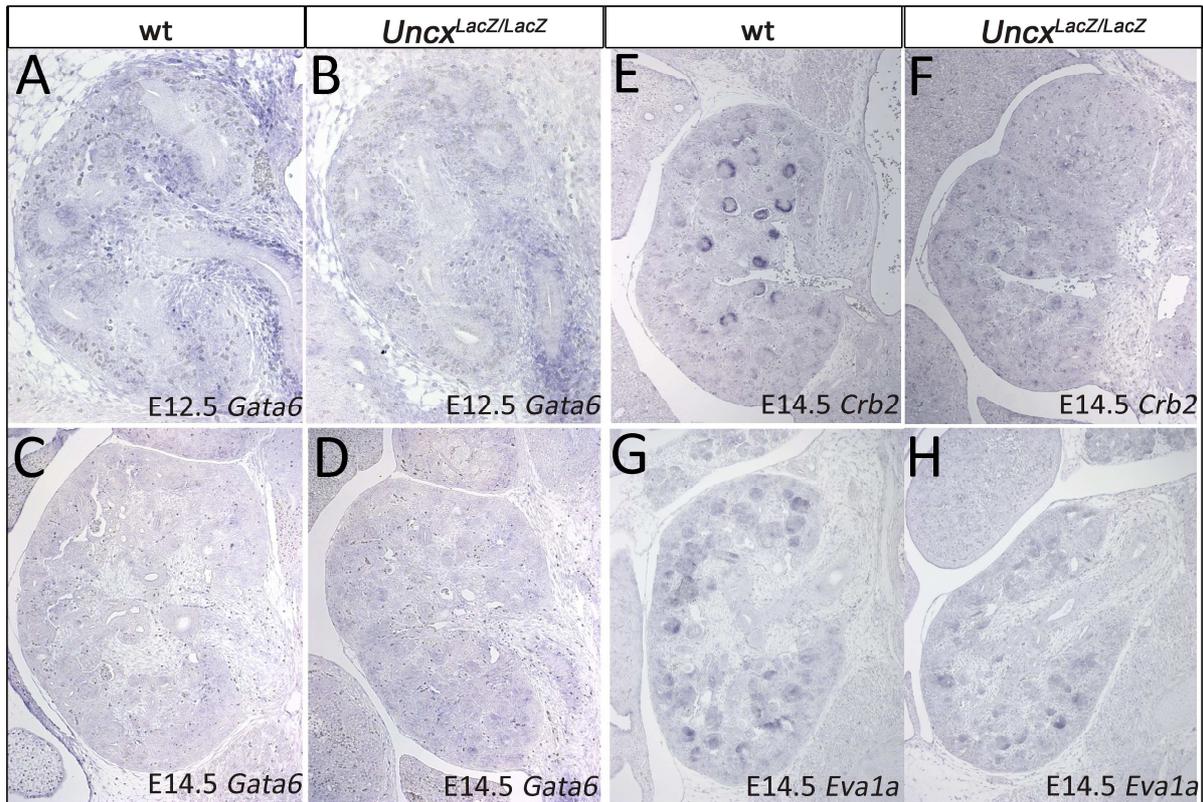


Abbildung 3.27: Validierung der Mikroarraydaten. Analyse der Differenziellen Genexpression mittels ISH für (A-H) *Eva1a*, (G-H) *Crb2* und (A-D) *Gata6* mRNA auf E12.5 und E14.5 Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten (n=3).

3.12 Wt1 zeigt geringere Proteinkonzentrationen im Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Nieren

Inwiefern die Wt1 Proteinkonzentration in *Uncx*-mutantem Kappenmesenchym von der des Wildtypen variiert, sollte mittels einer Kofärbung von Wt1- und Six2-Protein in Wildtyp und *Uncx*-mutantem Kappenmesenchym nachgewiesen werden.

Wildtypisches sowie *Uncx*-mutantes Kappenmesenchym zeigten eine vergleichbar starke, nukleare Six2-Proteinfärbung. Induzierte Nephrone zeigten weder im Wildtyp noch in der *Uncx*-Mutante eine Six2 Proteinfärbung (Abbildung 3.28).

Wt1-Protein dagegen konnte im Wildtyp im gesamten Six2⁺ Kappenmesenchym, sowie im proximalen Teil nephrogener Strukturen nachgewiesen werden. In *Uncx*-Mutanten war die mesenchymale Wt1-Proteinintensität schwächer und variierte zwischen einzelnen Zellen des Kappenmesenchyms (Abbildung 3.28 (Pfeil)). In *Uncx*-mutanten Nieren konnte Wt1-Protein im proximalen Teil des induzierten Nephrons detektiert werden und die Intensität war in dieser Domäne vergleichbar mit der des Wildtyp (Abbildung 3.28).

Die Analyse der Wt1-Proteinexpression deutet auf eine Regulation von *Wt1* durch *Uncx* in den Zellen des Kappenmesenchyms hin. Die *Wt1* Expression im proximalen Teil des Nephrons war dagegen unabhängig von *Uncx*. Durch die Detektion des Wt1-Proteins wurden die Ergebnisse der ISH für *Wt1* (Abbildung 3.25 G-L) bestätigt.

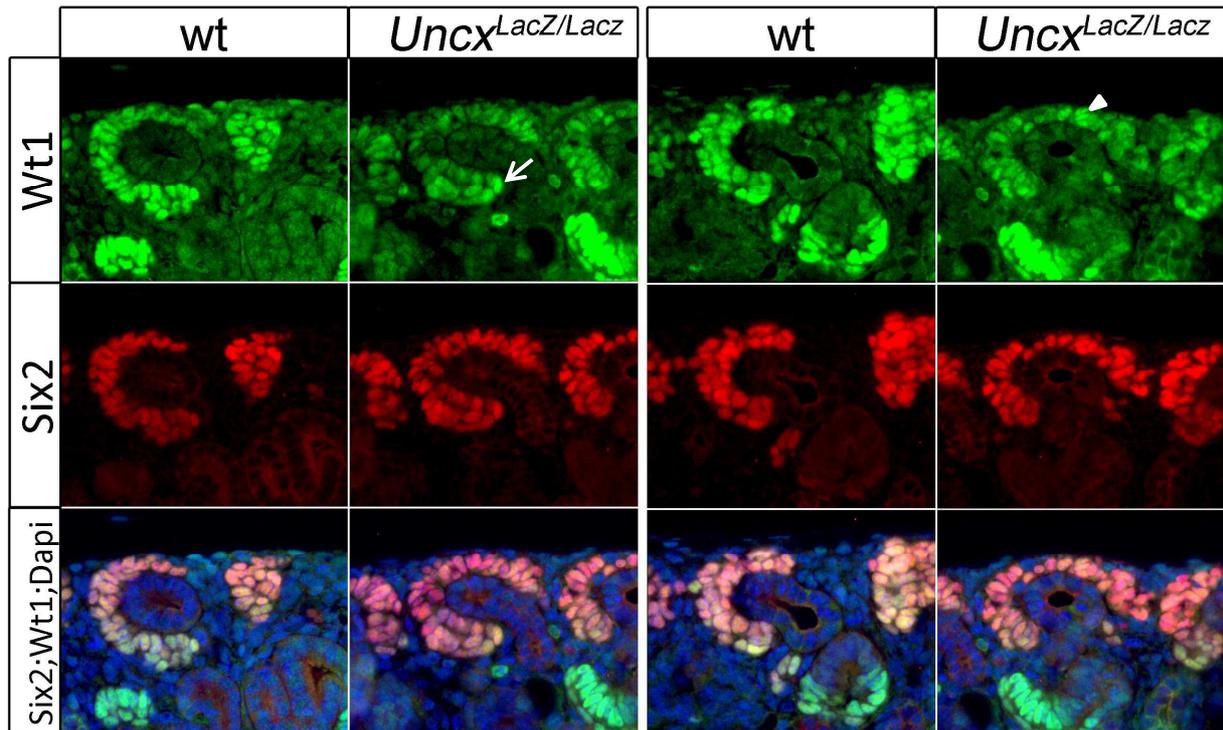


Abbildung 3.28: Weniger Wt1-Protein im Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Tiere. Immunfluoreszenzfärbung von Wt1/Six2/Dapi auf Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten bei E18.5 (40X). Six2 (rot) zeigt eine starke Färbung im Kappenmesenchym von Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten. Wt1 (grün) zeigt eine starke Färbung in glomerulären Strukturen auf Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten. Wt1 Färbung im Kappenmesenchym von *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten ist drastisch reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Wt1-Proteinkonzentrationen nehmen im unteren Teil des Kappenmesenchyms von *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten zu (Pfeil). Wt1 Proteinkonzentrationen variieren zwischen einzelnen Zellen des Kappenmesenchyms in *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nieren (Pfeilkopf) (n=3).

3.13 Zellen *Uncx*-mutanter Kappenmesenchyme zeigen erhöhte Apoptose

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Regulation von *Wt1* durch *Uncx* gezeigt werden. Da *Wt1* als Anti-apoptotischer Faktor beschrieben wurde (Motamedi et al., 2014) sollten Auswirkungen der Herunterregulation von *Wt1* im Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Nieren durch ein Tunel-Apoptose-Assay funktionell getestet werden. Die Anzahl der beim programmierten Zelltod entstehenden apoptotischen Körperchen wurde ins Verhältnis zu der Gesamtzellzahl des Six2⁺ Kappenmesenchyms gesetzt (Abbildung 3.29A).

Auf einem wildtypischen Nierenschnitt befanden sich im Durchschnitt 2026 $Six2^+$ Zellen, wohingegen es auf dem kleineren *Uncx*-mutanten Nierenschnitt im Durchschnitt 1395 waren (Abbildung 3.29B). Demnach befanden sich auf *Uncx* mutanten Nierenschnitten 711 Zellen pro mm^2 , wohingegen es auf Wildtyp Nierenschnitten 486 Zellen pro mm^2 waren. Im Wildtyp waren durchschnittlich 10 apoptotische Körperchen innerhalb des gesamten $Six2^+$ Kappenmesenchyms eines Nierenschnittes lokalisiert, was 0,5% der Gesamtzellzahl des Kappenmesenchyms ausmachte (Abbildung 3.29). In der *Uncx*-Mutante waren es dagegen im Mittel 19 apoptotische Körperchen innerhalb des gesamten Kappenmesenchyms, was im Verhältnis zur Gesamtzellzahl $Six2^+$ Zellen 1,5% betrug (Abbildung 3.29). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Apoptoserate im Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Nieren leicht erhöht ist, verglichen mit der des Wildtyps. Die Anzahl $Six2^+$ Zellen war auf Nierenschnitten der *Uncx*-Mutante mit 714,9 Zellen pro mm^2 erhöht, gegenüber 486,3 Zellen pro mm^2 im Wildtyp.

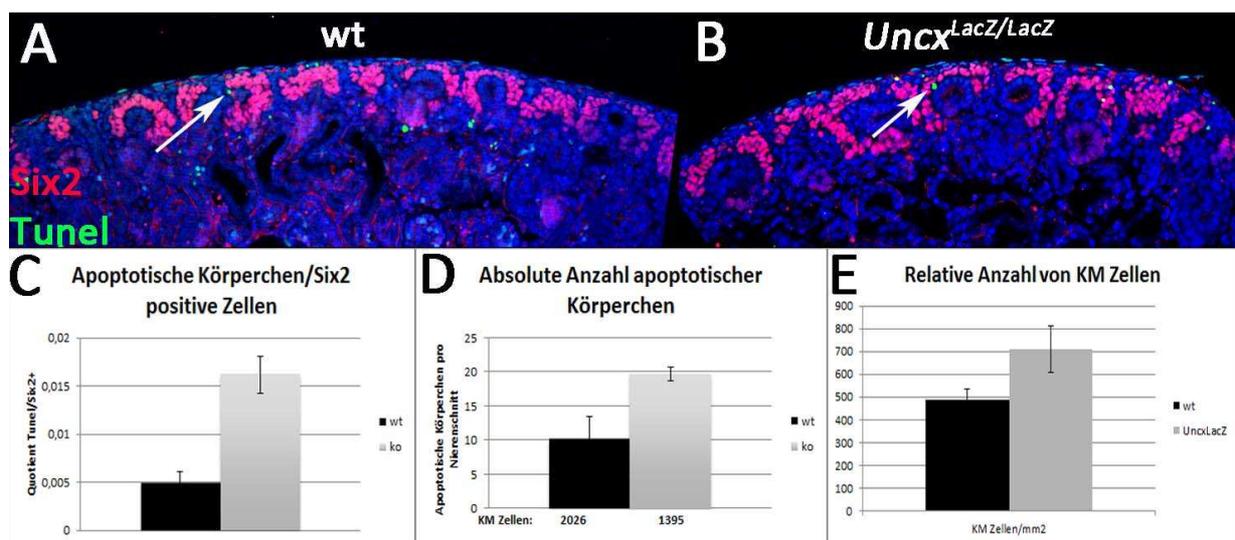


Abbildung 3.29: Tunelfärbung auf Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten zeigt erhöhte Apoptose im Kappenmesenchym in Abwesenheit von *Uncx*. (A,B) Immunfluoreszenzfärbung von $Six2$ /Dapi/Tunel auf Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenschnitten bei E18.5 (20x). Apoptotische Körperchen (grün) innerhalb des $Six2^+$ Kappenmesenchyms (rot) (Pfeile) (C) Wildtyp: 0,0048 Apoptotische Körperchen pro Gesamtzahl $Six2^+$ -Zellen. *Uncx*^{LacZ/LacZ}: 0,0162 Apoptotische Körperchen pro Gesamtzahl $Six2^+$ -Zellen ($p=0,0011$). (D) Wildtyp: 2026 $Six2^+$ -Zellen pro Nierenschnitt; 10,17 apoptotische Körperchen pro Nierenschnitt *Uncx*^{LacZ/LacZ}: 1395 $Six2^+$ -Zellen; 19,67 apoptotische Körperchen pro Nierenschnitt. (E) Wildtyp: 486,3 $Six2^+$ -Zellen pro mm^2 ; *Uncx*^{LacZ/LacZ}: 711 $Six2^+$ -Zellen pro mm^2 ($p=0,0026$). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte ($n=3$).

3.14 *Uncx* ist nicht hinreichend um die Expression von *Wt1* zu induzieren

Es konnte gezeigt werden, dass *Uncx* notwendig ist um eine normale Expression von *Wt1* im Kappenmesenchym aufrechtzuerhalten.

Die *Tbx18* Expressionsdomäne ist während der Entwicklung des murinen Metanephros auf das Uretermesenchym begrenzt (Bohnenpoll et al., 2013). Durch *Uncx*-Fehlexpression in der *Tbx18*⁺-Domäne, sollte die Frage adressiert werden, ob *Uncx* ausreichend ist um die Expression von *Wt1* im Uretermesenchym zu induzieren.

Für die *Uncx*-Fehlexpressionsmutante wurde ein *Uncx*-Konstrukt in den X-chromosomalen *Hprt* Locus inseriert (Schmidt, 2011), wobei die ektopische *Uncx* Expression abhängig von der Orientierung des Konstrukts im *Hprt* Locus war. Durch eine Cre vermittelte Rekombination, die zur Invertierung des *Uncx*-Konstrukts im *Hprt* Locus führte, konnte die Expression von *Uncx* unter der Kontrolle eines starken synthetischen CAG Promotors (Alexopoulou et al., 2008) aufrechterhalten werden.

Weder *Wt1* noch seine Zielgene *Rspo1* oder *Etv5* (Motamedi et al., 2014a) wurden im wildtypischen Uretermesenchym exprimiert (Abbildung 3.30 A,C,E). Die ektopische Expression von *Uncx* unter der Kontrolle von *Tbx18* resultierte in keiner Induktion von *Wt1* oder *Wt1*-Zielgenen *Rspo1* und *Etv5* (Abbildung 3.30 B,D,F). *Uncx* ist demnach nicht hinreichend um die Expression von *Wt1* im Uretermesenchym zu induzieren.

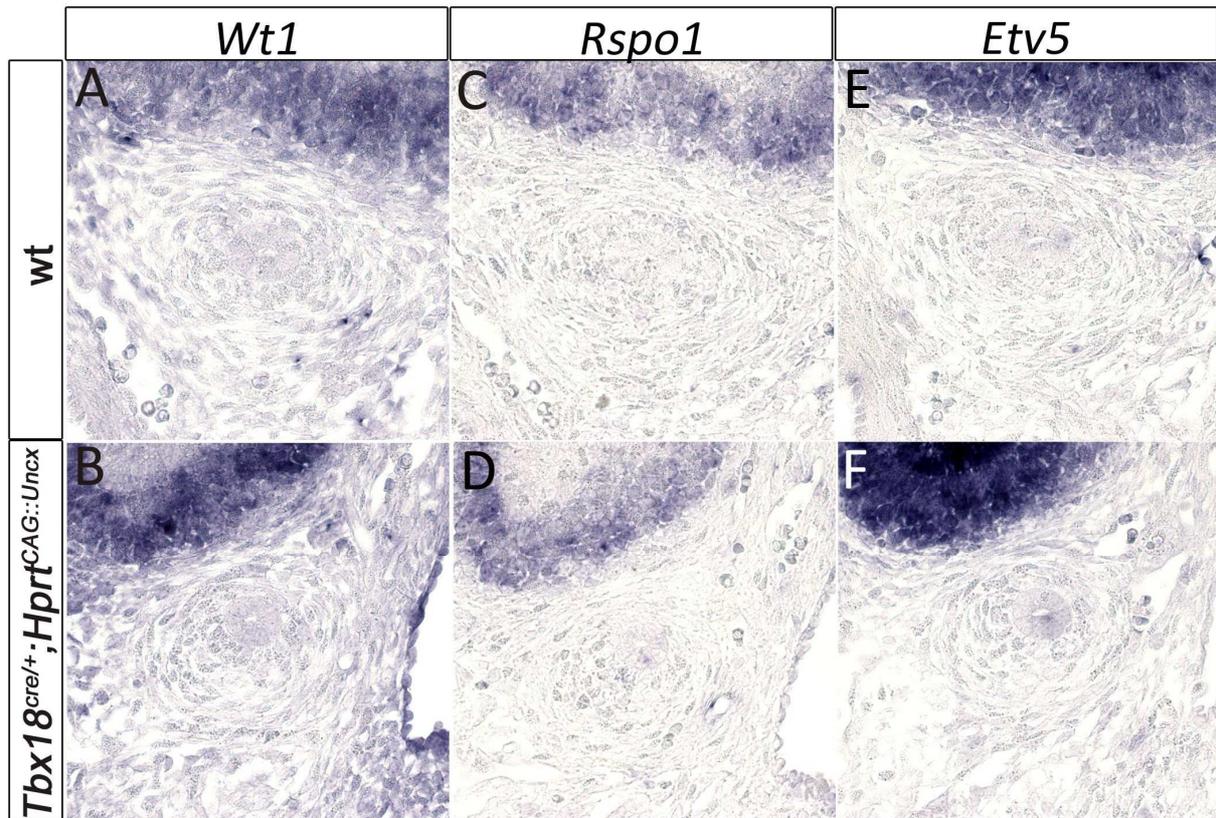


Abbildung 3.30: Die Fehlexpression von *Uncx* im Uretermesenchym führt nicht zur Induktion von *Wt1*. ISH von *Wt1*, *Rspo1* und *Etv5* mRNA auf E12.5 transversalen, proximalen Wildtyp und *Tbx18*^{cre/+}; *Hprt*^{CAG::Uncx/y} Ureterschnitten. Keiner der beiden Genotypen zeigt eine Expression von *Wt1* oder seinen Zielgenen *Rspo1* und *Etv5* innerhalb des Uretermesenchyms (n=3).

3.15 Die Deletion eines *Wt1*-Allels im *Uncx*-mutanten Hintergrund resultiert in einer Verstärkung des *Uncx*-Phänotyps

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Uncx* notwendig ist um eine normale *Wt1* Expression in Zellen des Kappenmesenchyms aufrecht zu erhalten. Inwiefern *Uncx* und *Wt1* gemeinsame molekulare Prozesse der Nierenentwicklung steuern soll an *Uncx*^{LacZ/LacZ} Mäusen, welche eine heterozygote Deletion des *Wt1* Allels aufweisen, untersucht werden. *Uncx*^{LacZ/LacZ}; *Wt1*^{+/-}-Mutanten wurden am Tag E18.5 im korrekten mendelschen Verhältnis isoliert.

Nieren von *Uncx*^{LacZ/+}; *Wt1*^{+/-}-Mäusen wiesen keine Größenreduktion auf, was darauf hindeutet, dass jeweils ein *Wt1*- sowie ein *Uncx*-Allel ausreicht um eine normale Nierenentwicklung zu gewährleisten. Nieren von *Uncx*^{LacZ/LacZ}; *Wt1*^{+/-} Mäusen zeigten dagegen eine Größenreduktion im Vergleich zu Nieren des Wildtyps sowie Nieren von *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mäusen. Histologisch zeigen *Uncx*^{LacZ/LacZ}; *Wt1*^{+/-}-Nierenschnitte eine korrekte Zonierung in einen äußeren Kortex, eine innere Medulla und eine Pelvis. Im Vergleich zu wildtypischen und Nierenschnitten der *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mutante, zeigen Nierenschnitte der *Uncx*^{LacZ/LacZ};

Wt1^{+/-}-Mutante kaum luminal Tubulstrukturen in der kortikalen Region. Die Anzahl der durch *Podocin* angefärbten Nierenkörperchen (Roselli et al., 2002) ist in der *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}-Mutante mit durchschnittlich 9,1 Nierenkörperchen pro Nierenschnitt drastisch reduziert gegenüber der *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/+}-Mutante mit durchschnittlich 26,2 Nierenkörperchen pro Nierenschnitt und dem Wildtyp mit durchschnittlich 52,3 Nierenkörperchen pro Nierenschnitt. Während pro Ureterknospe im Wildtyp 0,5 renale Vesikel und in der *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/+}-Mutante 0,3 renale Vesikel induziert wurden, war die Nephroninduktion in der *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}-Mutante mit 0,2 renalen Vesikeln pro Ureterknospe weiter reduziert.

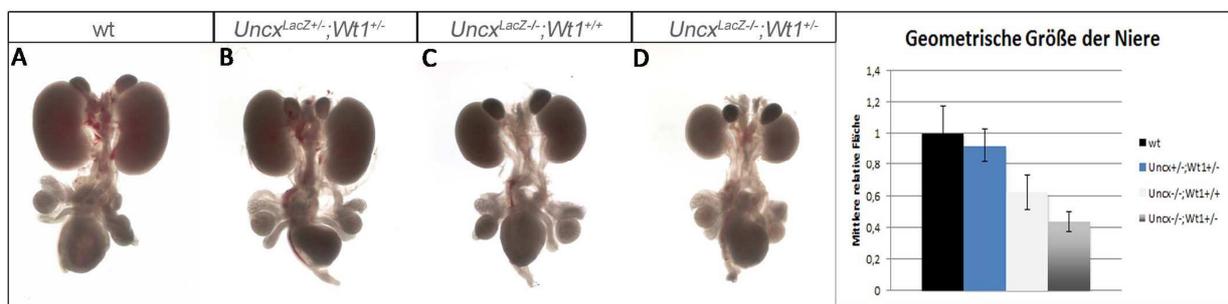


Abbildung 3.31: Morphologische Analyse von *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nieren. (A-D) *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nieren sind im Vergleich zu Wildtyp und *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nieren kleiner bei E18.5. (A-D) Makroskopische Aufnahme von E18.5 Urogenitalsystemen folgender Genotypen: (A) wt; (B) *Uncx*^{LacZ/+};*Wt1*^{+/-}; (C) *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/+}; (D) *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}. Nieren von *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Mäusen (43,63%) weisen im Vergleich zum Wildtyp (100%) und *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/+} (61,84%) eine signifikante bilaterale Reduktion ihrer Größe auf (Nierenfläche *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} - wt: p=2,1E-06 ; Nierenfläche *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} - *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/+}: p=0,0001). Nieren von *Uncx*^{LacZ/+};*Wt1*^{+/-} Mäusen entsprechen in ihrer Größe der des Wildtyps. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte (n=7).

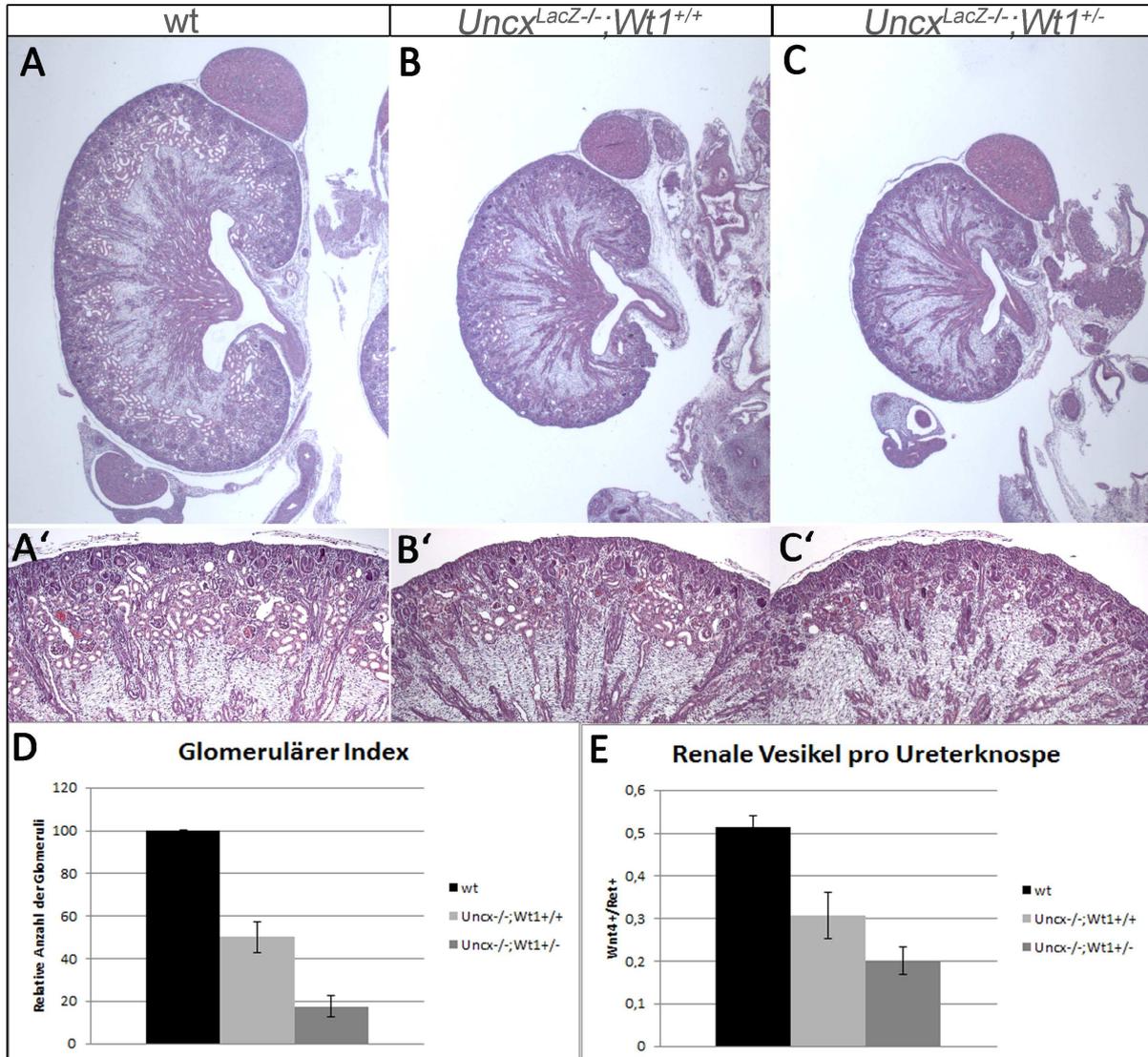


Abbildung 3.32: Histologische und morphometrische Analyse von *Uncx*^{LacZ/+};*Wt1*^{+/-} Nieren. HE Färbung repräsentativer midsagitaler E18.5 (A) Wildtyp; (B) *Uncx*^{LacZ/+};*Wt1*^{+/-} und (C) *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nierenschnitte. Wildtyp: 0,51 Renale Vesikel/Ureterknospe; *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}: 0,31 Renale Vesikel/Ureterknospe; *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}: 0,2 Renale Vesikel/Ureterknospe (Wildtyp - *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}: p=0,003; *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} - *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}: p=0,02). Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte (n=3).

Spezifische Marker der Nierenkörperchen (*Podocin*) (Roselli et al., 2002), Abschnitte S1-S3 des proximalen Tubulussegments (*Slc34a1*) (Biber et al., 2009; Lapointe et al., 2006; Madjdpour et al., 2004)), der Henleschleife (*Slc12a1*) (Féraille and Doucet, 2001), des distalen Tubulus (*Slc12a3*) (Ko et al., 2012) sowie der Sammelrohre (*Aqp2*) (Nielsen and Agre, 1995) wurden auf wildtypischen, *Uncx*-mutanten sowie *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}-mutanten E18.5 Nierenschnitten nachgewiesen. Die Anzahl der durch eine Nephronsegmentmarker-Analyse detektierten Nephronsegmente war in *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}-Mutanten

drastisch reduziert im Vergleich zu *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mutanten (Abbildung 3.33). Die heterozygote Deletion von *Wt1* resultiert demnach in einer Verschlimmerung des *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nierenphänotyps. Dieses Ergebnis deutet auf einen kooperativen Wirkmechanismus von *Uncx* und *Wt1* hin.

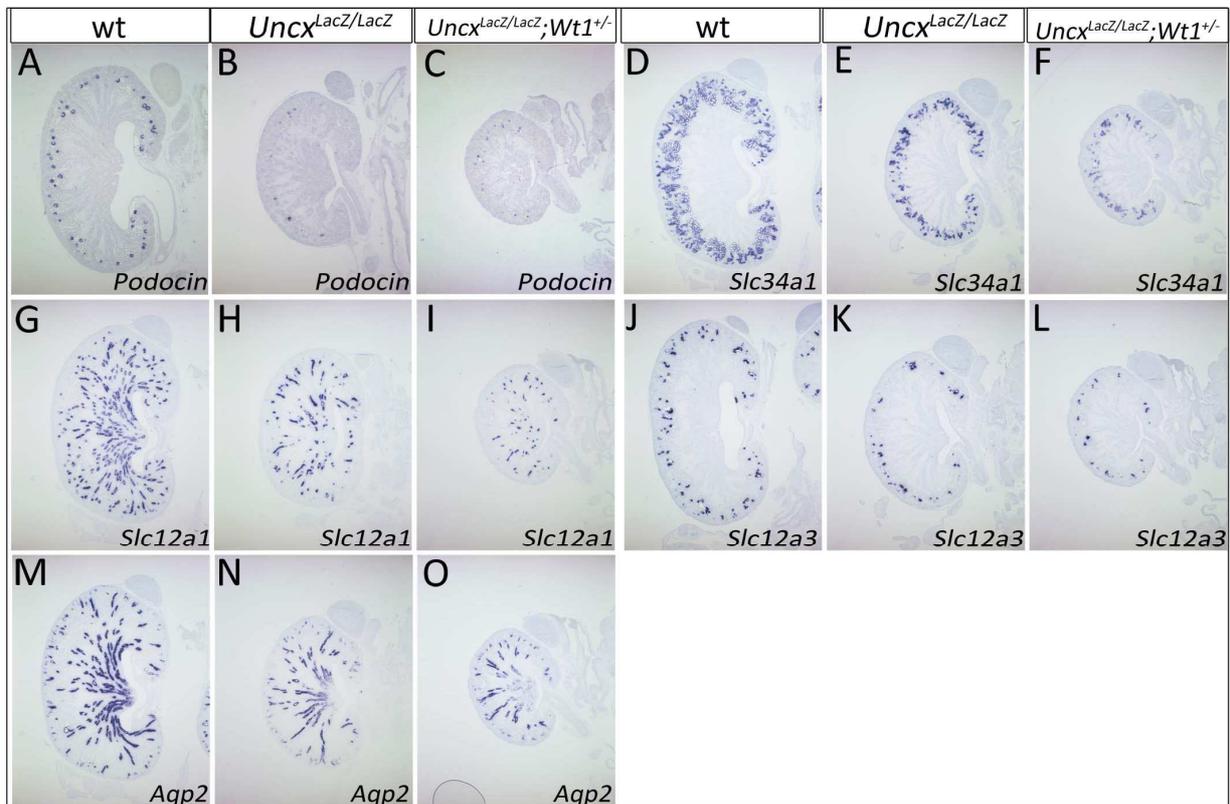


Abbildung 3.33: E18.5 *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-}-Mutanten besitzen weniger Nephrone verglichen mit *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mutanten. ISH von Nephronsegmentmarkern auf repräsentativen midsagitalen E18.5 Wildtyp, *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} und *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nierenschnitten. Nierenkörperchen (*Podocin*, A,B), Proximale Tubuli (*Slc5a2*, C,D; *Slca1*, E,F; *Slc34a1*, G,H), Henle Schleifen (*Slc12a1*, I,J), Distale Tubuli (*Slc12a3*, K,L), Sammelrohre (*Aqp2*, M,N). E18.5 *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nieren weisen weniger Strukturen auf die positiv für Nephronsegmentmarker sind, verglichen mit dem Wildtyp sowie *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nieren (n=3).

Die Frage inwiefern *Uncx*-Zielgene im Kappenmesenchym auch durch *Wt1* reguliert werden, wurde über eine ISH von *Wt1*, *Rspo1*, *Gdnf* und *Ncam1* auf *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Nierenschnitten adressiert. Im Vergleich zum Wildtyp war die Expression von *Wt1*, *Rspo1* und *Ncam1* im Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Mäuse massiv reduziert (Abbildung 3.34 A-F; J-L). Eine entsprechende Reduktion der jeweiligen Expression wurde auch für die *Uncx*^{LacZ/LacZ};*Wt1*^{+/-} Mutante beobachtet. Durch diese Methode konnte demnach keine weitere Herunterregulation von *Uncx*-Zielgenen durch den heterozygoten Verlust von *Wt1*, im *Uncx*-mutanten Hintergrund gezeigt werden. Die Expressionsdomäne von *Gdnf* war hingegen

leicht ausgeweitet auf Nierenschnitten der *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/-}*-Mutante im Vergleich zur *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mutante (Abbildung 3.34 G-I).

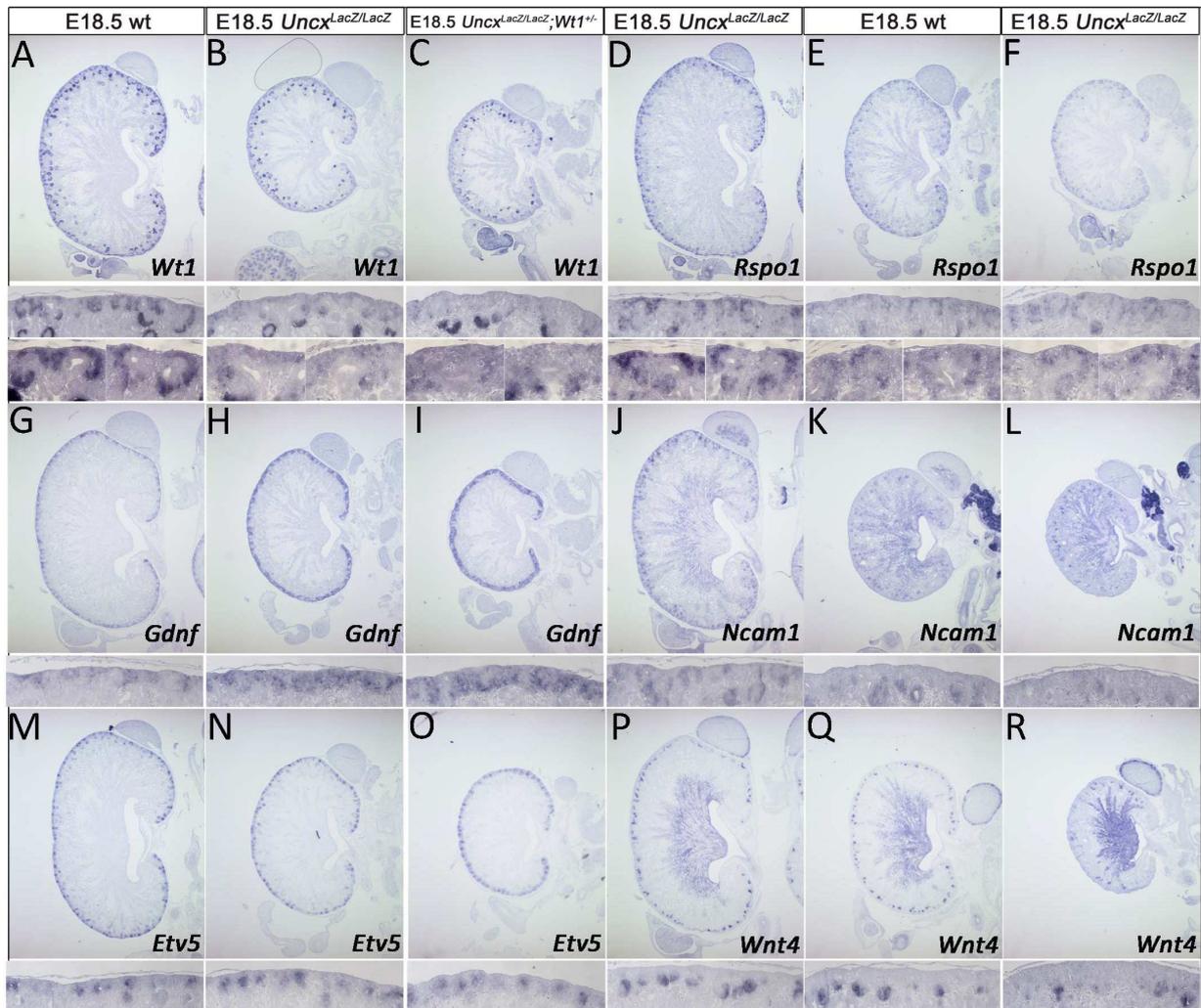


Abbildung 3.34: Zielgene von *Uncx* und *Wt1* weisen keine *Deregulation* in *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/-}* Nieren auf im Vergleich zu *Uncx^{LacZ/LacZ}* Nieren. (A-L) ISH für *Uncx*-Zielgene auf Wildtyp, *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/+}* und *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/-}* E18.5 Nierenschnitten (A-C) *Wt1*, (D-F) *Rspo1*, (E-G) *Gdnf*, (J-L) *Ncam1*, (M-O) *Etv5* und (P-R) *Wnt4* (n=3).

Die Expression der *Wt1*-Zielgene *Etv5* und *Wnt4* (Kreidberg et al., 1993; Motamedi et al., 2014), ist auf E18.5 Nierenschnitten der *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/-}*-Mutante unverändert gegenüber der *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/+}*-Mutante sowie dem Wildtyp (Abbildung 3.34 M-R).

Zusammenfassend regulieren *Uncx* und *Wt1* die Nephroninduktion. Eine heterozygote Deletion von *Wt1*, im *Uncx*-mutanten Hintergrund führt zu einer Verstärkung des *Uncx*-Phänotypen. Einerseits sind Nieren der *Uncx^{LacZ/LacZ};Wt1^{+/-}*-Mutante kleiner, andererseits werden in dieser weniger Nephrene induziert und

es konnten weniger Segmente reifer Nephrone detektiert werden verglichen mit der *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mutante. Jedoch gab es keinen Hinweis auf Gene, welche durch *Uncx* und *Wt1* kooperativ reguliert werden.

3.16 Fehlexpressionsmutanten die *Uncx* ektopisch in nephrogenen Vorläufern und ihren Derivaten exprimieren, entwickeln hypoplastische Nieren mit weniger Nephrone

In der *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}* Mutante wurde die Expression von *Uncx*, unter der Kontrolle von *Six2*, in nephrogenen Vorläuferzellen überexprimiert sowie im gesamten induzierten Nephron als auch in reifen Nephronstrukturen fehlexprimiert. Die am Tag E18.5 isolierten *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}* Embryonen zeigten eine korrekte mendelsche Verteilung. Am Tag P7 lag der Anteil für *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}*-Mutanten bei 0%. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Fehlexpression von *Uncx*, unter der Kontrolle des *Six2*-Promotors zu keiner pränatalen Letalität führt, *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}* Mäuse jedoch postnatal sterben. Nieren der *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}*-Mutante zeigen eine wildtypische Expression für *Uncx* in der nephrogenen Zone. Im Gegensatz zum Wildtyp kann *Uncx* in *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}*-Mutanten in reifen Nephronstrukturen wie den Nierenkörperchen detektiert werden (Abbildung 3.35A,B (Pfeil)).

Nieren des *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}*-Genotyps waren am Tag E18.5 kleiner, das Urogenitalsystem wies darüber hinaus jedoch keine weiteren phänotypischen Besonderheiten auf (Abbildung 3.35 C,D). Während die mittlere Fläche eines midsagitalen wildtypischen Nierenschnitts 4,5mm² betrug, waren es in der Überexpressionsmutante nur durchschnittlich 1,6mm². Die histologische Färbung zeigte einen nahezu vollständigen Verlust der, im Wildtyp kortikal lokalisierten, luminalen Tubulusstrukturen (Abbildung 3.35 G,H). Auch die Anzahl glomerulärer Strukturen war mit 17% der Anzahl des Wildtyps drastisch reduziert (Abbildung 3.35).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Nieren in denen *Uncx* in der nephrogenen Zone und deren Derivaten fehlexprimiert wurde, eine Größenreduktion und weniger luminalen Tubulusstrukturen im Kortex aufweisen.

Zur quantitativen sowie qualitativen Charakterisierung der Nephrone in *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}* Nieren wurden einzelne Nephronsegmente mit spezifischen Nephronsegmentmarkern nachgewiesen (siehe 3.4). Die Expression von Markern für Nierenkörperchen (*Podocin*) (Roselli et al., 2002), das erste proximale Tubulussegment S1 (*Slc5a2*) (Vallon, 2011; Wright et al., 2007) und das distale Segment (*Slc12a3*) (Ko et al., 2012) konnten auf *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}* Nierenschnitten mittels ISH kaum nachgewiesen werden. Distale Abschnitte des proximalen Segments (*Slc5a1*) (Vallon, 2011), Henleschleifen (*Slc12a1*) (Férraille and Doucet, 2001), und Sammelrohre (*Aqp2*) (Nielsen and Agre, 1995)

wiesen eine Reduktion ihrer Anzahl auf $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$ Nierenschnitten, im Vergleich zum Wildtyp, auf (Abbildung 3.36).

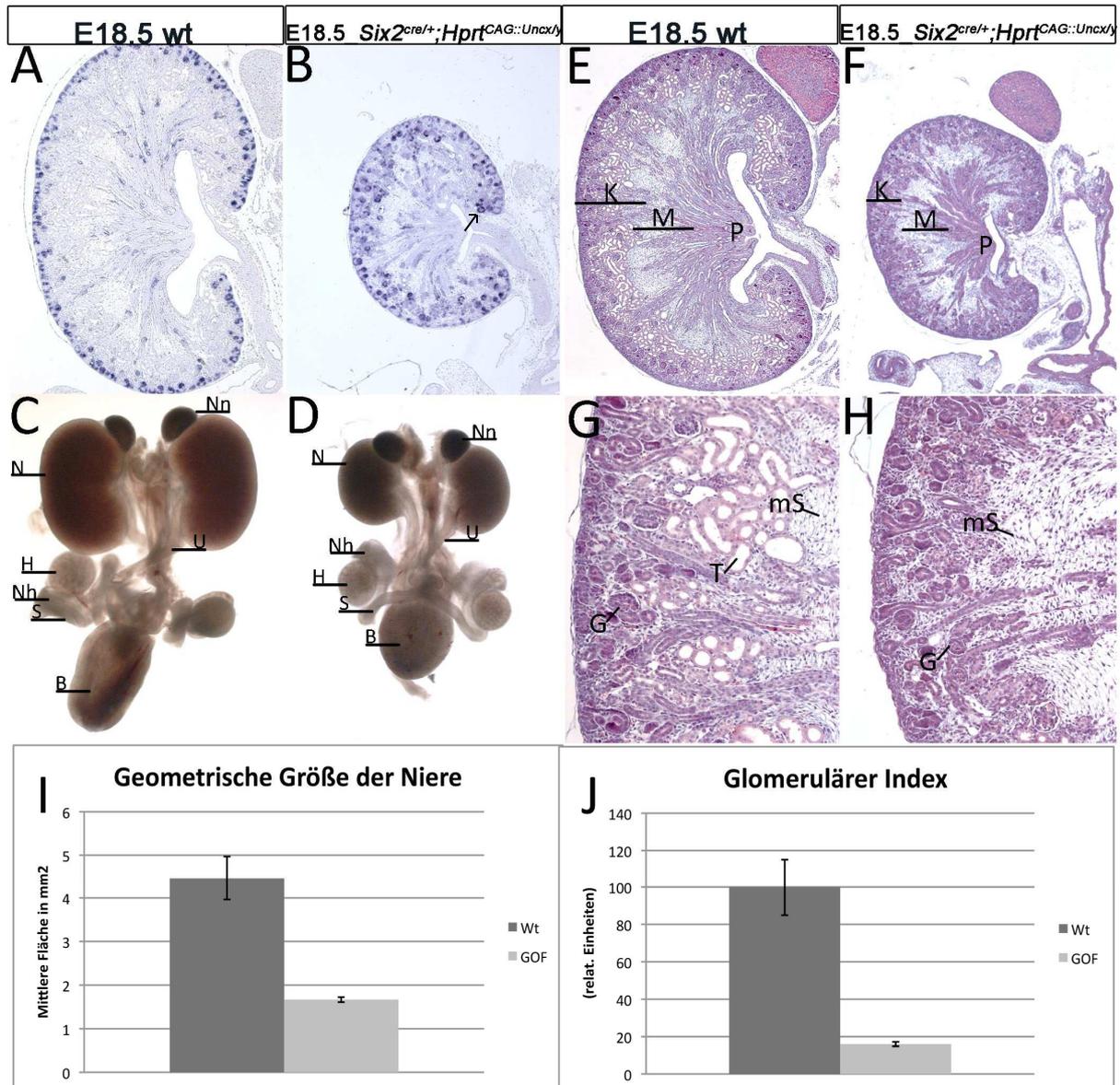


Abbildung 3.35: Morphologische, histologische und morphometrische Analyse der Nieren konditioneller *Uncx*-Mutanten. (A,B) Nieren der $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$ -Mutante exprimieren *Uncx* in Nephronvorläufern und reifen Nephronstrukturen (Pfeil). (C,D) $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$ Nieren variierten morphologisch und histologisch von Wildtyp Nieren bei E18.5 (C,D) Makroskopische Aufnahme von E18.5 Wildtyp und $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$ Urogenitalsystemen. Nieren der $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$ -Mutante weisen im Vergleich zum Wildtyp eine bilaterale Reduktion ihrer Größe auf. (E-H) HE Färbung repräsentativer midsagitaler E18.5 Wildtyp und $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$ Nierenschnitte. (I) Wildtyp: 4,47mm²; $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$: 1,67mm² (p=0,0099) (J) Wildtyp: 43 Glomeruli/Nierenschnitt; $Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}$: 6,89 Glomeruli/Nierenschnitt (p=0,0103). Alle angegebenen Werte sind Durchschnittswerte (n=3). B, Blase; G, Glomerulus, H, Hoden; iN, induziertes Nephron; M, Medulla, mS, medulläres Stroma, N, Niere; Nh, Nebenhoden; Nn, Nebenniere; P, Pelvis; S, Samenleiter, T, tubuläre Gänge, U, Ureter.

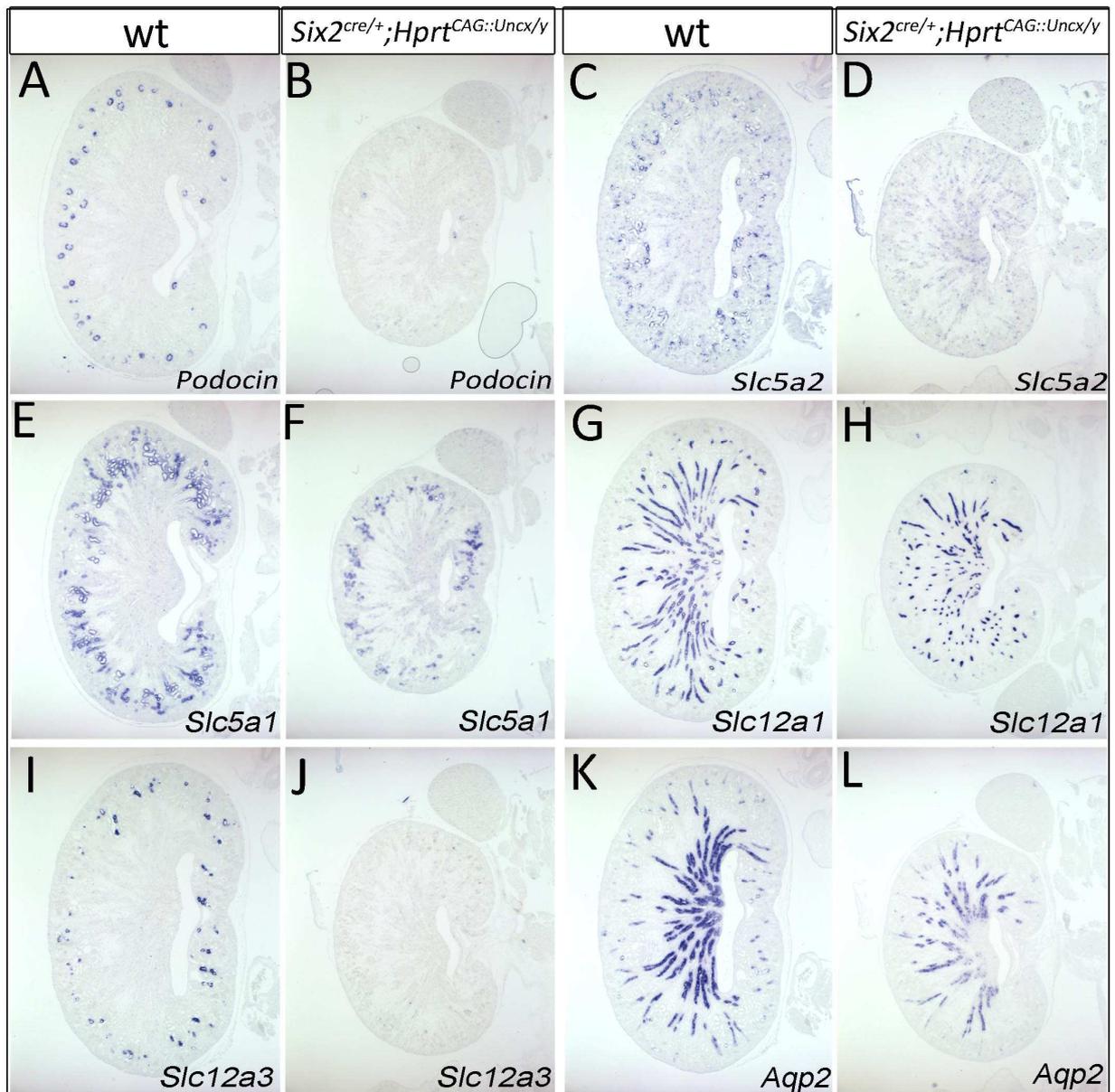


Abbildung 3.36: *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}*-Nieren besitzen weniger Nephronen die zudem in ihrer Segmentierung beeinträchtigt sind. ISH von Nephronsegmentmarkern auf repräsentativen midsagitalen E18.5 Wildtyp und *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}* Nierenschnitten. Nierenkörperchen (*Podocin*, A,B), Proximale Tubuli (*Slc5a2*, C,D; *Slc5a1*, E,F; *Slc34a1*, G,H), Henle Schleifen (*Slc12a1*, I,J), Distale Tubuli (*Slc12a3*, K,L), Sammelrohre (*Aqp2*, M,N) (n=3).

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sich in *Six2^{cre/+};Hprt^{CAG::Uncx/y}*-Nieren weniger Nephronen entwickelten als im Wildtyp und diese Nephronen darüber hinaus in ihrer Segmentierung beeinträchtigt sind. Nierenkörperchen, das proximale Tubulussegment (Abbildung 3.36 A-D) sowie distale Tubuli (Abbildung 3.36 I,J) waren drastisch unterrepräsentiert.

4 Diskussion

Genmutationen und dadurch verursachte molekulare Dysbalancen können Störungen der Nierentwicklung zur Folge haben, die in einem breiten Spektrum renaler Missbildungen und Fehlfunktionen resultieren (Ramanathan et al., 2016). Besonders kritisch ist die Aufrechterhaltung einer konstanten Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der Zellen innerhalb der Nephronvorläuferpopulation. Die räumliche und zeitliche Abfolge der Differenzierung mesenchymaler Nephronvorläufer ist mit der Verzweigungsmorphogenese der Ureterknospe synchronisiert (Saxen, 1987). Andererseits ist die Induktion neuer Nephrone erforderlich, um die Verzweigungsmorphogenese aufrecht zu erhalten (Perantoni et al., 2005; Stark et al., 1994b). Die präzise aufeinander abgestimmte Interaktion der Ureterknospe mit dem umgebenden Kappenmesenchym nimmt entscheidenden Einfluss auf die finale Anzahl der Nephrone und somit der Funktion der Niere. Mäuse mit einer homozygoten Deletion des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors *Uncx* entwickeln hypoplastische Nieren, welche durch eine reduzierte Anzahl von nephrogenen Strukturen sowie reifer Nephrone charakterisiert sind. Darüber hinaus weisen Nieren *Uncx*-mutanter Tiere eine gesteigerte Verzweigungsmorphogenese und in der Folge eine erhöhte relative Anzahl von Ureterknospen auf. Tiere mit einem konditionellen Verlust von *Uncx* sterben wenige Wochen nach der Geburt, was auf eine Nierendysfunktion hindeutet.

Uncx wird sowohl in nephrogenen Vorläuferzellen als auch in nephrogenen Körperchen exprimiert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Uncx* eine Rolle innerhalb nephrogener Vorläuferzellen spielt und die epitheliale Konversion reguliert. In den nephrogenen Vorläuferzellen steuert *Uncx* die Expression von *Wt1* sowie die des *Wt1*-Zielgens *Rspo1*. Für *Wt1* wurde bereits eine Rolle in der Differenzierung nephrogener Vorläuferzellen gezeigt. Inwiefern *Uncx* die Nephroninduktion über die Regulation von *Wt1* steuert und ob die Verzweigungsmorphogenese von diesem Prozess abhängt, ist Gegenstand dieser Diskussion.

4.1 In *Uncx*-mutanten Nieren werden weniger Nephrone induziert

Mäuse in denen *Uncx* homozygot deletiert wurde, entwickeln hypoplastische Nieren mit einer geringeren Anzahl an Nephronen. Frühere Studien zeigten bereits, dass Nieren *Uncx*-mutanter Mäuse ab E14.5 kleiner sind als jene von Kontrolltieren (Farin, 2005). Mäuse mit einer konditionellen *Uncx*-Mutation im Kappenmesenchym, sterben einige Wochen nach ihrer Geburt, was auf eine eingeschränkte Nierenfunktion dieser Mutanten hindeutet. Die spezifische Expression von *Uncx* in nephrogenen Vorläuferzellen und deren Derivaten deutet auf eine potentielle Rolle von *Uncx* innerhalb des Kappenmesenchyms und/oder der Nephrogenese hin. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit

gezeigt werden, dass reife Nephrone *Uncx*-mutanter Tiere korrekt segmentiert sind. Darüber hinaus gibt es keine Hinweise auf einen Defekt in der regionalspezifischen Organisation der nephrogenen Körperchen. Demnach können Musterungsdefekte die zu einer Fehlentwicklung des Nephrons führen in *Uncx*-mutanten Tieren ausgeschlossen werden.

Sowohl eine verminderte Proliferation, als auch eine gesteigerte Apoptose renaler Vorläuferzellen können als Ursache für die Hypoplasie der Niere ausgeschlossen werden. Die Proliferation nephrogener Vorläuferzellen der *Uncx*-Mutante ist nicht beeinträchtigt. Die Apoptose ist innerhalb des Kappenmesenchyms *Uncx*-mutanter Tiere zwar leicht erhöht, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Anzahl nephrogener Vorläuferzellen dadurch nicht reduziert wird. Eine Quantifizierung nephrogener Strukturen zeigte, dass der Verlust von *Uncx* einen Einfluss auf die Induktion von Nephronen hat. Kappenmesenchym, welches von der Ureterknospe isoliert und mit einem Induktor rekombiniert wird, zeigt nach 2 tägiger Kultur die Induktion epithelialer Tubuli (Saxen, 1987). Dieses Experiment dient der unabhängigen Untersuchung der Nephroninduktion von der Verzweigungsmorphogenese. Nieren *Uncx*-mutanter Tiere zeigten nach 2 tägiger Kultur kaum Nephroninduktion. Demnach besitzen Zellen des Kappenmesenchyms *Uncx*-mutanter Tiere eine intrinsische Beeinträchtigung der Nephroninduktion, unabhängig von der Verzweigungsmorphogenese. *Uncx* hat folglich eine Funktion innerhalb nephrogener Vorläuferzellen und reguliert dort zellautonom die Differenzierung von Kappenmesenchymzellen.

Im Allgemeinen kann die Entwicklung hypoplastischer Nieren mit einer verminderten Anzahl an Nephronen, auf verschiedene Gendefekte und daraus resultierenden Anomalien der Nierenentwicklung zurückgeführt werden (Woolf, 2006). In der Literatur wurden bereits Gene beschrieben, deren Mutation im Kappenmesenchym zu einer beeinträchtigten Nephroninduktion führt. So konnte gezeigt werden, dass *Wnt4* notwendig (Stark et al., 1994) und hinreichend (Kispert et al., 1998) ist, um die epitheliale Konversion der Kappenmesenchymzellen zu steuern. *Fgf8* kooperiert mit *Wnt4* um epitheliale Musterungsgene zu induzieren (Perantoni et al., 2005). Weder in *Wnt4*- (*Wnt4*^{-/-}) noch in *Fgf8*- (*Fgf8*^{-/-}) mutanten Embryonen werden Nephrone induziert und es kommt ab E16.5 zu einer Stagnation der Verzweigungsmorphogenese (Perantoni et al., 1995; Stark et al., 1994). Fehlen andererseits molekulare Faktoren, welche die Proliferation multipotenter Nephronvorläuferzellen regulieren, führt dies zur vorzeitigen Differenzierung der gesamten nephrogenen Vorläuferpopulation. In der Folge entwickeln sich hypoplastische Nieren die, im Vergleich zum Wildtyp, weniger Nephrone aufweisen (Self et al., 2006; Xu et al., 2014). In diesem Zusammenhang wurde sowohl für *Six2*^{-/-} als auch der *Osr1*^{-/-}-Mutante (Gene, welche im Kappenmesenchym exprimiert werden) eine ektopische Nephroninduktion gezeigt, die zur vorzeitigen Differenzierung der Kappenmesenchymzellen führt. Die Nierenentwicklung kommt bei E14.5

zum Stillstand (Self et al., 2006; Xu et al., 2014). In Nieren *Uncx*-mutanter Tiere kann weder eine ektopische Induktion renaler Vesikel, noch ein Unterschied der Proliferation in Kappenmesenchymen *Uncx*-mutanter Tiere beobachtet werden. *Uncx* reguliert demnach nicht die Zellteilung innerhalb des Kappenmesenchyms. Die beschriebenen Mechanismen steuern die Differenzierung oder Proliferation von Kappenmesenchymzellen nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip und eine Mutation resultiert in entsprechend gravierenden Phänotypen. Der im Vergleich mildere Nierenphänotyp *Uncx*-mutanter Tiere resultiert somit höchstwahrscheinlich aus einer beeinträchtigten Feinregulation der Nephroninduktion. Um Mechanismen zu ermitteln, welche durch *Uncx* reguliert werden, rückten Faktoren in den Fokus, welche den Prozess der Nephroninduktion feinregulatorisch beeinflussen und deren Mutationen einen mit der *Uncx*-Mutante vergleichbaren Phänotyp hervorbringen.

Eine kritische Balance zwischen proliferierenden und differenzierenden Zellen des Kappenmesenchyms sichert den Erhalt der nephrogenen Vorläuferpopulation einerseits, sowie eine adäquate Abfolge der Nephroninduktion andererseits (Saxen, 1987). Mechanismen, welche dem hochproliferativen Charakter einer Subpopulation der Kappenmesenchymzellen entgegenwirken, können demnach die Differenzierung indirekt unterstützen. So unterstützt stromal exprimiertes *Fat4* die Differenzierung der nephrogenen Vorläuferzellen durch Induktion des Protocadherins *Dchs1* und/oder *Dchs2* im Kappenmesenchym (Bagherie-Lachidan et al., 2015; Mao et al., 2015). Durch den Verlust von entweder *Fat4* oder *Dchs1/2* kommt es zu einer Expansion des Kappenmesenchyms. Nephrogene Vorläuferzellen dieser Mutanten verbleiben in einem undifferenzierten Vorläuferstatus, was darauf hindeutet, dass *Fat4* sowie *Dchs1* die Proliferation innerhalb der Zellen des Kappenmesenchyms reprimieren (Bagherie-Lachidan et al., 2015; Mao et al., 2015). Eine Expansion der Kappenmesenchymzellen wie sie für die *Fat4* und *Dchs1/2*-Mutante gezeigt wurde, kann in der *Uncx*-Mutante nicht beobachtet werden. Zusammen mit der unveränderten Proliferationsrate der Zellen innerhalb des Kappenmesenchyms deutet dies darauf hin, dass *Uncx* die Differenzierung der Kappenmesenchymzellen nicht durch Unterdrückung der Zellteilung reguliert.

Große Ähnlichkeit mit dem Nierenphänotyp der *Uncx*-Mutante haben Tiere in denen *Yap* in Zellen des Kappenmesenchyms konditionell deletiert wurde. Wie auch *Uncx* fördert der Hippo-Signalweg die Differenzierung der Kappenmesenchymzellen ohne die Zellteilung der Kappenmesenchymzellen zu reprimieren (Reginensi et al., 2013). Ähnlich der *Uncx*-Mutante sind in *Yap*^{CM -/-} Mutanten weniger nephrogene Körperchen vorhanden und die finale Anzahl nephrogener Strukturen ist massiv reduziert. Durch eine Analyse des mRNA Expressionsprofils von *Yap*^{CM -/-} Nieren und anschließende Validierung mittels ISH, konnte eine positive Regulation von *Uncx* durch den Hippo-Signalweg gezeigt werden (Reginensi et al., 2013). Allerdings zeigten *Uncx*-abhängige Gene keine Veränderung im

Kappenmesenchym von *Yap*^{CM -/-}-Mutanten und Expressionsmuster Hippo-regulierter Gene waren unverändert im Kappenmesenchym der *Uncx*^{LacZ/LacZ}-Mutante. Dies weist daraufhin, dass beide Mutanten zwar einen sehr ähnlichen Phänotyp hervorbringen, es jedoch keinen Hinweis auf gemeinsam durch *Uncx* und Hippo regulierte Zielgene gibt.

Beeinträchtigungen molekularer Mechanismen, welche zu phänotypisch kleineren Nieren mit einer reduzierten Anzahl von Nephronen führen sind vielfältig. Der phänotypische Vergleich legt eine Funktion von *Uncx* auf die direkte Regulation der Differenzierung nephrogener Vorläuferzellen nahe. Ein Einfluss von *Uncx* auf die Proliferation kann in diesem Kontext ausgeschlossen werden.

4.2 *Wt1* ist ein funktionelles *Uncx*-Zielgen

Durch eine Mikroarray basierte Transkriptomanalyse *Uncx*-mutanter Nieren wurde gezeigt, dass die Expression von *Wt1* in Nieren der *Uncx*-Mutante reduziert ist. Durch Validierung mittels ISH wurde eine massive Reduktion der *Wt1* Expression innerhalb der Zellen des Kappenmesenchyms *Uncx*-mutanter Tiere nachgewiesen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *Uncx* die Expression von *Wt1* im Kappenmesenchym reguliert. Andererseits führt die Fehlexpression von *Uncx* im Uretermesenchym nicht zur Induktion von *Wt1*. *Uncx* ist demnach nicht hinreichend um die Expression von *Wt1* zu induzieren. Ein genetisches Modell indem ein *Wt1* Allel in homozygoten *Uncx*-Mutanten ausgeschaltet wurde, sollte Aufschluss über eine potentielle genetische Interaktion von *Wt1* und *Uncx* geben. Sowohl *Uncx*^{LacZ/+} als auch *Wt1*^{+/-} Mutanten entwickeln normale Nieren. Doppelheterozygote Embryonen (*Uncx*^{LacZ/+}; *Wt1*^{+/-}) haben am Tag E18.5 einen mit dem Wildtyp vergleichbaren Nierenphänotyp. Ein Allel von *Wt1* sowie *Uncx* ist demnach ausreichend um eine normale Nierenentwicklung zu gewährleisten. Die Deletion eines *Wt1*-Allels im *Uncx*-mutanten Hintergrund führt dagegen zu einer Verstärkung des schon bei *Uncx*^{LacZ/LacZ} beobachteten Phänotyps. Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl *Uncx* als auch *Wt1* die Nephroninduktion regulieren. Es gibt jedoch keinen Hinweis auf Zielgene, deren Expression im Kappenmesenchym kooperativ durch *Uncx* und *Wt1* reguliert werden.

Zwei unterschiedliche Funktionen wurden für *Wt1* innerhalb der Zellen des Kappenmesenchyms identifiziert. Zum einen ist *Wt1* für seine anti-apoptotische Funktion innerhalb des metanephrischen Mesenchyms bekannt. Eine homozygote Deletion des *Wt1* Allels resultiert im Absterben des metanephrischen Mesenchyms und Nierenagenese (Donovan et al., 1999; Kreidberg et al., 1993). Andererseits reguliert *Wt1* die epitheliale Konversion von Kappenmesenchymzellen. Das konnte zum einen durch Nierenexplantate, in denen die *Wt1* Expression herunterreguliert wurde, und zum anderen durch eine spezifische Deletion von *Wt1* im Kappenmesenchym gezeigt werden (Davies et al., 2004; Essafi et al., 2011; Hartwig et al., 2010; Motamedi et al., 2014). Dabei steuert *Wt1* die Nephroninduktion

wahrscheinlich durch direkte Regulation von *Wnt4* und *Fgf8* (Essafi et al., 2011; Hartwig et al., 2010; Motamedi et al., 2014). Darüber hinaus konnte auch *Uncx* als *Wt1*-Zielgen identifiziert werden (Motamedi et al., 2014). Demnach könnte eine genetische Interaktion von *Uncx* und *Wt1* die Differenzierung von Kappenmesenchymzellen und somit die Nephroninduktion regulieren. Mittels eines Tunnel Apoptose Assays konnte gezeigt werden, dass die Apoptose im Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Tiere leicht erhöht ist. Dies könnte einen Hinweis auf eine Beteiligung von *Uncx* in der, durch *Wt1* gesteuerten Reprimierung der Apoptose geben.

Mikroarray und ISH Analysen haben gezeigt, dass die Expression von *Rspo1* in Nieren *Uncx*-mutanter Tiere reduziert ist. Durch vergleichbare Analysen wurde *Rspo1* bereits als Zielgen von *Wt1* identifiziert (Motamedi et al., 2014). *Rspo1* stabilisiert den Wnt-Signalweg indem es negative Rückkopplungsregulatoren des Wnt-Signalwegs hemmt, die zur Internalisierung des Wnt-Rezeptors führen (Binnerts et al., 2007; Farin et al., 2016). Für die Entwicklung der Ovarien konnte eine positive Regulation der *Wnt4* Expression durch *Rspo1* gezeigt werden (Tomizuka et al., 2008). *Wnt4* ist bekannt dafür sich selbst zu regulieren (Boyer et al., 2010). Auch den Prozess der MET der Kappenmesenchymzellen steuert *Wnt4* autoregulatorisch (Stark et al., 1994). Folglich liegt die Vermutung nahe *Rspo1* könnte als Zielgen von *Uncx* und *Wt1* die Expression von *Wnt4* regulieren und dadurch die Differenzierung der Kappenmesenchymzellen steuern. Nieren von *Rspo1*^{-/-} Mäusen zeigen jedoch morphologisch keine Auffälligkeiten und keine Herunterregulation von *Wnt4* (Auguste et al., 2011; Tomizuka et al., 2008). Demnach hat *Rspo1* entweder keine Funktion während der Entwicklung der Niere oder redundante Faktoren kompensieren den Verlust von *Rspo1*. Die Expression von *Rspo1* in *Uncx*^{LacZ/LacZ}; *Wt1*^{+/-}-Nieren entspricht der Expression von *Rspo1* in *Uncx*^{LacZ/LacZ} Nieren. Demnach ist entweder ein *Wt1*-Allel hinreichend um die verringerte Expression von *Rspo1* aufrechtzuhalten oder zusätzliche Faktoren regulieren *Rspo1* im Kappenmesenchym.

In *Uncx*-mutanten Nieren konnte eine Herunterregulation des Zelladhäsionsproteins *Ncam* im Kappenmesenchym nachgewiesen werden, was auf eine *Uncx* vermittelte Regulation von *Ncam* in diesem Kompartiment hindeutet. *Ncam* wurde bisher nicht als *Wt1* Zielgen beschrieben und spielt somit wahrscheinlich keine Rolle in einer *Wt1* vermittelten Signalwirkung von *Uncx*. *Ncam1* ist schwach im Kappenmesenchym exprimiert, die Expression nimmt in prä tubulären Aggregaten zu und wird bis zur Ausreifung des Nephrons aufrecht erhalten (Bard et al., 2001; Klein et al., 1988). Aufgrund des *Ncam1* Expressionsmusters innerhalb des Kappenmesenchyms, sowie seiner Rolle in der Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsion (Rutishauser et al., 1988), propagierten Klein et al. eine Funktion von *Ncam* in der

Aggregation der Kappenmesenchymzellen und deren anschließenden Epithelialisierung (Klein et al., 1988). Demnach deutet eine Herunterregulation von *Ncam* im der *Uncx*-Mutante auf eine Störung der Adhäsion prä tubulärer Aggregate hin. *Uncx* könnte demnach über die Steuerung der Zelladhäsion, die Epithelialisierung der Kappenmesenchymzellen vermitteln.

4.3 *Uncx* reguliert nicht-zellautonom die Verzweigungsmorphogenese

Durch den Nachweis des ureterknospenspezifischen Markers *Ret* konnte gezeigt werden, dass Nierenschnitte *Uncx*-mutanter Tiere mehr Ureterknospen pro mm² aufweisen als der Wildtyp. Das weist darauf hin, dass die Verzweigungsmorphogenese in der *Uncx*-Mutante verstärkt abläuft und entsprechend mehr Ureterknospen generiert werden. Die Verzweigungsmorphogenese beruht auf einer koordinierten Balance zwischen der durch die Proliferation angetriebenen Wachstumsgeschwindigkeit und der durch Chemotaxis gesteuerten Zellmobilität (Hirashima et al., 2009). Mittels eines Proliferationsassays konnte gezeigt werden, dass die epitheliale Proliferation der Ureterknospenzellen in *Uncx*-mutanten Tieren bei E13.5 erhöht ist, was wiederum auf eine erhöhte Geschwindigkeit der Verzweigungsmorphogenese hindeutet. Gestützt wird diese Hypothese durch den Nachweis erhöhter Transkriptn von *Gdnf* in *Uncx*-mutanten Nieren, da die *Ret*/*Gdnf* Signalkaskade als kritischer Regulator der Verzweigungsmorphogenese gilt. Dabei wirkt *Gdnf* einerseits als Chemoattraktor der *Ret*⁺ Ureterknospe und reguliert andererseits das Auswachsen der Ureterknospe über die lokale Proliferationsinduktion der Ureterknospenzellen (Michael and Davies, 2004; Sainio et al., 1997). Kulturexperimente zeigen, dass die Anzahl der Ureterknospen direkt von der *Gdnf* Konzentration abhängt (Pepicelli et al., 1997). Übereinstimmend damit könnte die gesteigerte Verzweigungsmorphogenese in *Uncx*-mutanten Nieren durch eine erhöhte Expression von *Gdnf* vermittelt werden. *Uncx* würde demnach die Verzweigungsmorphogenese nicht-zellautonom über die Reprimierung von *Gdnf* im Kappenmesenchym regulieren.

Die gesteigerte Verzweigungsmorphogenese des Ureterepithels und die verminderte Nephroninduktion legen eine Beeinträchtigung der Wechselwirkung zwischen der Ureterknospe und dem Kappenmesenchym *Uncx*-mutanter Tiere nahe. Die Wechselwirkung ist notwendig um die Nephroninduktion mit der Verzweigungsmorphogenese zu synchronisieren (Saxen, 1987). Demnach korreliert die Induktion neuer Nephrone mit der Verzweigungsmorphogenese (Schuchardt et al., 1996) und die Entstehung neuer Nephrone könnte durch eine gesteigerte Verzweigungsmorphogenese erschwert werden. Die Frage inwiefern dies auf die *Uncx*-Mutante zutrifft, konnte durch eine Analyse der Nephroninduktion, unabhängig von der Verzweigungsmorphogenese adressiert werden. Durch

Kulturrexperimente konnte gezeigt werden, dass die verminderte Nephroninduktion in *Uncx*-Mutanten auf eine intrinsische Beeinträchtigung der Zellen des Kappenmesenchyms zurückgeführt werden kann und somit unabhängig von der verstärkten Verzweigungsmorphogenese ist.

Zwar werden in der *Uncx*-Mutante mehr Ureterknospen durch die gesteigerte Verzweigungsmorphogenese gebildet, die Zellen des Kappenmesenchyms zeigen jedoch keine erhöhte Proliferation. Konsequenterweise müsste demnach die Anzahl der Zellen einzelner Kappenmesenchyme durch den Verlust von *Uncx* stark abnehmen. Dass dies nicht der Fall ist, zeigt eine histologische Analyse bei E18.5. Einzelne Kappenmesenchyme der *Uncx*-Mutante unterscheiden sich demnach nicht von denen des Wildtypen. Eine mögliche Erklärung dafür bietet die verminderte Induktion neuer Nephrone in der *Uncx*-Mutante. Folglich verlassen weniger Zellen das Kappenmesenchym über Epithelialisierung was in diesem Fall zur Aufrechterhaltung einer konstanten Zellzahl einzelner Kappenmesenchyme führt. Tatsächlich konnte mittels Quantifizierung der Gesamtzellzahl nephrogener Vorläufer gezeigt werden, dass die relative Anzahl von Six2⁺-Zellen, in der *Uncx*-Mutante signifikant höher ist als im Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass die verminderte Nephroninduktion, zusammen mit der gesteigerten Verzweigungsmorphogenese, in einer konstanten Zellzahl einzelner Kappenmesenchyme resultiert. Demnach könnte der Prozess der Verzweigungsmorphogenese durch die Akkumulation nephrogener Vorläuferzellen vorangetrieben werden um dadurch die Zellzahl einzelner Kappenmesenchyme zu kompensieren. Die Existenz von Mechanismen, welche die Anzahl nephrogener Vorläuferzellen direkt mit der Verzweigungsmorphogenese verknüpfen, konnte bereits belegt werden. Dabei resultierte eine genetische Entfernung von 40% der Kappenmesenchymzellen in einer reduzierten Verzweigungsmorphogenese (Cebrian et al., 2014). Mittels eines Korrekturmechanismus der Niere wird dadurch die Zellzahl einzelner Kappenmesenchyme konstant gehalten. Die Frage, ob die Akkumulation der Kappenmesenchymzellen in *Uncx*-Mutanten, die Proliferation der Ureterknospenzellen zu regulieren vermag, sollte durch die Ergebnisse der Mikroarray Analyse beantwortet werden. Ziel der Analyse war es, Expressionsdomänen von Genen, welche in Nieren der *Uncx*-Mutante differenziell reguliert wurden, zu identifizieren. Dadurch konnten initiale Veränderungen der Verzweigungsmorphogenese und/oder der Akkumulation von Kappenmesenchymzellen, in der *Uncx*-Mutante, zeitlich eingeordnet werden. Gene mit einer spezifischen Expression in Ureterknospen der *Uncx*-Mutante erschienen bei E12.5 zwar hochreguliert, jedoch zeigten diese keine ektopische Expression auf *Uncx*-mutante Nierenschnitten. Demnach unterliegen diese Gene wahrscheinlich keiner direkten Regulation durch *Uncx*, sondern weisen in der *Uncx*-Mutante eine höhere relative Anzahl ihrer Expressionsdomänen auf. Dieses Ergebnis legt

nahe, dass in der *Uncx* Mutante bereits bei E12.5 mehr Ureterknospen pro mm^2 vorhanden sind, als im Wildtyp.

Dagegen gab die Mikroarray Analyse keinen Hinweis auf eine Hochregulation von Kappenmesenchymmarkern wie *Six2*, *Cited1* oder *Eya1* in der *Uncx*-Mutante. Folglich gibt es keinen Hinweis darauf, dass die Anzahl nephrogener Vorläufer in *Uncx*-mutanten Nieren bis E14.5 von der des Wildtypen abweicht. Dies zeigt dass es zu keiner Akkumulation von Kappenmesenchymzellen in frühen Embryonalstadien der *Uncx*-Mutante kommt. Dass diese jedoch zu späteren Stadien stattfindet, wurde mittels Quantifizierung der *Six*⁺-Zellen auf Nierenschnitten der *Uncx*-Mutante bei E18.5 gezeigt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Steigerung der Verzweigungsmorphogenese durch den Verlust von *Uncx* bereits früh einsetzt und nicht durch die Akkumulation der Kappenmesenchymzellen reguliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Uncx* zu einer Steigerung der Verzweigungsmorphogenese führt. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass auch die Anzahl der aus den Ureterknospen hervorgehenden Sammelrohre erhöht ist. Demnach differenzieren entweder nicht alle Ureterknospen zu Epithelzellen des Sammelrohrsystems oder ausdifferenzierte Sammelrohre degenerieren in *Uncx*-mutanten Nieren. Stochastisch kann eine Vielzahl der in *Uncx*-mutanten Nieren gebildeten Ureterknospen nicht mit dem distalen Ende eines nephrogenen Körperchens fusionieren, da durch den Verlust von *Uncx* zu wenig Nephrone induziert werden. Eine dadurch verursachte Degeneration der Ureterknospe wäre eine plausible Erklärung für die geringere Anzahl von Sammelrohren. Ob und inwiefern sich der Fusionsprozess auf die Differenzierung des Ureterepithels auswirkt, wurde bisher jedoch nicht gezeigt.

4.4 Werden stromal exprimierte Gene durch *Uncx* reguliert?

Durch ISH konnte das Retinsäure-synthetisierende Enzym *Aldh1a2* (Rosselot et al., 2010b) in Kappenmesenchymzellen *Uncx*-mutanter Nieren nachgewiesen werden. Im Wildtyp ist die *Aldh1a2* Expression dagegen auf das kortikale Stroma begrenzt. Dies könnte zum einen darauf hindeuten, dass *Uncx* notwendig ist, um die Expression von *Aldh1a2* in Zellen des Kappenmesenchyms zu reprimieren und dadurch die Synthese von Retinsäure innerhalb des Kappenmesenchyms zu verhindern. Inwiefern *Uncx* eine Rolle in der Regulation der Retinsäure Signalübertragung spielt, kann durch Analysen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, nicht beantwortet werden. Andererseits könnte *Uncx* dazu beitragen die Grenze zwischen der Zelllinie des Stromas und des Kappenmesenchyms aufrechterhalten und dadurch verhindern, dass *Aldh1a2*⁺-Zellen in das Kappenmesenchym einwandern. Als dritte Möglichkeit könnten Kappenmesenchymzellen in Abwesenheit von *Uncx* stromale

Charakteristika annehmen. Demnach würde *Uncx* eine Rolle in der Aufrechterhaltung des kappenmesenchymalen Schicksals spielen. Eine Expressionsanalyse für weitere Marker, welche entweder auf das Stroma oder das Kappenmesenchym begrenzt sind, zeigen eine wildtypische Expression in *Uncx*-mutanten Nieren. Das zeigt, dass der Verlust von *Uncx* weder zu einer Migration stromaler Zellen in das Kappenmesenchym führt, noch, dass Kappenmesenchymzellen ihr Schicksal zugunsten der stromalen Linie ändern. *Uncx* hat demnach keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung zellulärer Charakteristika des Kappenmesenchyms oder der Abgrenzung von Zelllinien.

4.5 Nephronen *Uncx*-mutanter Nieren weisen strukturelle Anomalien auf

Am Ende der Embryogenese konnten alle Nephronsegmente in *Uncx*-mutanten Nieren nachgewiesen werden. Nephrogene Körperchen weisen zudem keine Musterungsdefekte auf, die aus dem Verlust von *Uncx* resultieren. Demnach hat *Uncx* keinen Einfluss auf die Musterung und die nachfolgende Nephronsegmentierung. Bereits durch eine frühere Analyse der *Uncx*-Mutante wurde jedoch gezeigt, dass diese, im Vergleich zum Wildtyp, kleinere Nierenkörperchen aufweist, die zudem schlechter vaskularisiert sind (Farin, 2005). Proximale Nephronsegmente sind in E18.5 *Uncx*-mutanten Nieren kleiner und aufgrund des fehlenden Lumens kollabiert. Durch die Analyse der konditionellen *Uncx*-Mutante bei P14 konnte gezeigt werden, dass das erste proximale Tubulussegment in dieser Mutante degeneriert. *Uncx* scheint somit eine Rolle in der finalen Ausreifung einzelner Nephronsegmente zu spielen. Demnach resultiert die frühe Letalität konditioneller *Uncx*-Mutanten wahrscheinlich aus der verringerten Anzahl an Nephronen und deren funktionellen Beeinträchtigung.

5 Referenzen

- Airik, R., and Kispert, A. (2007). Down the tube of obstructive nephropathies: the importance of tissue interactions during ureter development. *Kidney Int.* 72, 1459–1467.
- Alexopoulou, A.N., Couchman, J.R., and Whiteford, J.R. (2008). The CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol.* 9, 2.
- Auguste, A., Chassot, A.-A., Grégoire, E.P., Renault, L., Pannetier, M., Treier, M., Pailhoux, E., and Chaboissier, M.-C. (2011). Loss of R-spondin1 and Foxl2 amplifies female-to-male sex reversal in XX mice. *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determin. Differ.* 5, 304–317.
- Bagherie-Lachidan, M., Reginensi, A., Pan, Q., Zaveri, H.P., Scott, D.A., Blencowe, B.J., Helmbacher, F., and McNeill, H. (2015). Stromal Fat4 acts non-autonomously with Dchs1/2 to restrict the nephron progenitor pool. *Dev. Camb. Engl.* 142, 2564–2573.
- Barak, H., Huh, S.-H., Chen, S., Jeanpierre, C., Martinovic, J., Parisot, M., Bole-Feysot, C., Nitschké, P., Salomon, R., Antignac, C., et al. (2012). Fgf9 and FGF20 maintain the stemness of nephron progenitors in mice and man. *Dev. Cell* 22, 1191–1207.
- Bard, J.B., Gordon, A., Sharp, L., and Sellers, W.I. (2001). Early nephron formation in the developing mouse kidney. *J. Anat.* 199, 385–392.
- Barrantes, I.B., Elia, A.J., Wünsch, K., Hrabe de Angelis, M.H., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., Gossler, A., and de la Pompa, J.L. (1999). Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse. *Curr. Biol. CB* 9, 470–480.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642.
- Biber, J., Hernando, N., Forster, I., and Murer, H. (2009). Regulation of phosphate transport in proximal tubules. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 458, 39–52.
- Binnerts, M.E., Kim, K.-A., Bright, J.M., Patel, S.M., Tran, K., Zhou, M., Leung, J.M., Liu, Y., Lomas, W.E., Dixon, M., et al. (2007). R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14700–14705.
- Blake, J., and Rosenblum, N.D. (2014). Renal branching morphogenesis: Morphogenetic and signaling mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 2–12.
- Bohnenpoll, T., Bettenhausen, E., Weiss, A.-C., Foik, A.B., Trowe, M.-O., Blank, P., Airik, R., and Kispert, A. (2013). Tbx18 expression demarcates multipotent precursor populations in the developing urogenital system but is exclusively required within the ureteric mesenchymal lineage to suppress a renal stromal fate. *Dev. Biol.* 380, 25–36.

- Bouchard, M. (2004). Transcriptional control of kidney development. *Differ. Res. Biol. Divers.* *72*, 295–306.
- Bouchard, M., Souabni, A., Mandler, M., Neubüser, A., and Busslinger, M. (2002). Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes Dev.* *16*, 2958–2970.
- Boyer, A., Lapointe, É., Zheng, X., Cowan, R.G., Li, H., Quirk, S.M., DeMayo, F.J., Richards, J.S., and Boerboom, D. (2010). WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J.* *24*, 3010–3025.
- Brophy, P.D., Ostrom, L., Lang, K.M., and Dressler, G.R. (2001). Regulation of ureteric bud outgrowth by Pax2-dependent activation of the glial derived neurotrophic factor gene. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 4747–4756.
- Brown, A.C., Adams, D., de Caestecker, M., Yang, X., Friesel, R., and Oxburgh, L. (2011). FGF/EGF signaling regulates the renewal of early nephron progenitors during embryonic development. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 5099–5112.
- Brown, A.C., Muthukrishnan, S.D., Guay, J.A., Adams, D.C., Schafer, D.A., Fetting, J.L., and Oxburgh, L. (2013). Role for compartmentalization in nephron progenitor differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4640–4645.
- Bussen, M., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Leitges, M., Gossler, A., and Kispert, A. (2004). The T-box transcription factor Tbx18 maintains the separation of anterior and posterior somite compartments. *Genes Dev.* *18*, 1209–1221.
- Cacalano, G., Fariñas, I., Wang, L.C., Hagler, K., Forgie, A., Moore, M., Armanini, M., Phillips, H., Ryan, A.M., Reichardt, L.F., et al. (1998). GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* *21*, 53–62.
- Carroll, T.J., and Das, A. (2013). Defining the signals that constitute the nephron progenitor niche. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *24*, 873–876.
- Carroll, T.J., Park, J.-S., Hayashi, S., Majumdar, A., and McMahon, A.P. (2005). Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev. Cell* *9*, 283–292.
- Cebrian, C., Asai, N., D'Agati, V., and Costantini, F. (2014). The number of fetal nephron progenitor cells limits ureteric branching and adult nephron endowment. *Cell Rep.* *7*, 127–137.
- Chai, L., Yang, J., Di, C., Cui, W., Kawakami, K., Lai, R., and Ma, Y. (2006). Transcriptional activation of the SALL1 by the human SIX1 homeodomain during kidney development. *J. Biol. Chem.* *281*, 18918–18926.
- Costantini, F. (2006). Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differ. Res. Biol. Divers.* *74*, 402–421.
- Costantini, F., and Shakya, R. (2006). GDNF/Ret signaling and the development of the kidney. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *28*, 117–127.

Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 364–371.

Das, A., Tanigawa, S., Karner, C.M., Xin, M., Lum, L., Chen, C., Olson, E.N., Perantoni, A.O., and Carroll, T.J. (2013). Stromal-epithelial crosstalk regulates kidney progenitor cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1035–1044.

Davidson, A. (2008). Mouse kidney development. *StemBook*.

Davies, J.A., Ladomery, M., Hohenstein, P., Michael, L., Shafe, A., Spraggon, L., and Hastie, N. (2004). Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 235–246.

Davis, J.M., Thureau, K., and Häberle, D. (1996). Carl Ludwig: the discoverer of glomerular filtration. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *11*, 717–720.

Donovan, M.J., Natoli, T.A., Sainio, K., Amstutz, A., Jaenisch, R., Sariola, H., and Kreidberg, J.A. (1999). Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev. Genet.* *24*, 252–262.

Dressler, G.R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *22*, 509–529.

Dressler, G.R. (2009). Advances in early kidney specification, development and patterning. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3863–3874.

Eastman, Q., and Grosschedl, R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 233–240.

Eaton, D.C., and Pooler, J. (2009). *Vander's Renal Physiology*, 7th Edition (McGraw Hill Professional).

Enomoto, H., Araki, T., Jackman, A., Heuckeroth, R.O., Snider, W.D., Johnson, E.M., and Milbrandt, J. (1998). GFR alpha1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron* *21*, 317–324.

Essafi, A., Webb, A., Berry, R.L., Slight, J., Burn, S.F., Spraggon, L., Velecela, V., Martinez-Estrada, O.M., Wiltshire, J.H., Roberts, S.G.E., et al. (2011). A wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev. Cell* *21*, 559–574.

Farin, H. (2005). Funktionelle Analyse von Uncx4.1, einem Homeobox-Gen der Maus.

Farin, H.F., Jordens, I., Mosa, M.H., Basak, O., Korving, J., Tauriello, D.V.F., de Punder, K., Angers, S., Peters, P.J., Maurice, M.M., et al. (2016). Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature* *530*, 340–343.

Féraïlle, E., and Doucet, A. (2001). Sodium-Potassium-Adenosinetriphosphatase-Dependent Sodium Transport in the Kidney: Hormonal Control. *Physiol. Rev.* *81*, 345–418.

Gattineni, J., and Baum, M. (2015). Developmental changes in renal tubular transport—an overview. *Pediatr. Nephrol.* *30*, 2085–2098.

- Grieshammer, U., Le Ma, null, Plump, A.S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G.R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev. Cell* *6*, 709–717.
- Grobstein, C. (1956). Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp. Cell Res.* *10*, 424–440.
- Grote, D., Souabni, A., Busslinger, M., and Bouchard, M. (2006). Pax 2/8-regulated Gata 3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 53–61.
- Haber, D.A., Buckler, A.J., Glaser, T., Call, K.M., Pelletier, J., Sohn, R.L., Douglass, E.C., and Housman, D.E. (1990). An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell* *61*, 1257–1269.
- Hartman, H.A., Lai, H.L., and Patterson, L.T. (2007). Cessation of renal morphogenesis in mice. *Dev. Biol.* *310*, 379–387.
- Hartwig, S., Ho, J., Pandey, P., Macisaac, K., Taglienti, M., Xiang, M., Alterovitz, G., Ramoni, M., Fraenkel, E., and Kreidberg, J.A. (2010). Genomic characterization of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 1189–1203.
- Hatini, V., Huh, S.O., Herzlinger, D., Soares, V.C., and Lai, E. (1996). Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev.* *10*, 1467–1478.
- Hirashima, T., Iwasa, Y., and Morishita, Y. (2009). Dynamic modeling of branching morphogenesis of ureteric bud in early kidney development. *J. Theor. Biol.* *259*, 58–66.
- Hoar, R.M. (1976). Comparative developmental aspects of selected organ systems. II. Gastrointestinal and urogenital systems. *Environ. Health Perspect.* *18*, 61–66.
- Itäranta, P., Chi, L., Seppänen, T., Niku, M., Tuukkanen, J., Peltoketo, H., and Vainio, S. (2006). Wnt-4 signaling is involved in the control of smooth muscle cell fate via Bmp-4 in the medullary stroma of the developing kidney. *Dev. Biol.* *293*, 473–483.
- James, R.G., and Schultheiss, T.M. (2005). Bmp signaling promotes intermediate mesoderm gene expression in a dose-dependent, cell-autonomous and translation-dependent manner. *Dev. Biol.* *288*, 113–125.
- James, R.G., Kamei, C.N., Wang, Q., Jiang, R., and Schultheiss, T.M. (2006). Odd-skipped related 1 is required for development of the metanephric kidney and regulates formation and differentiation of kidney precursor cells. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 2995–3004.
- Kardasz, S. (2009). The function of the nephron and the formation of urine. *Anaesth. Intensive Care Med.* *10*, 265–270.
- Karner, C.M., Das, A., Ma, Z., Self, M., Chen, C., Lum, L., Oliver, G., and Carroll, T.J. (2011). Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 1247–1257.

Kim, D., and Dressler, G.R. (2005). Nephrogenic factors promote differentiation of mouse embryonic stem cells into renal epithelia. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16, 3527–3534.

Kispert, A., Vainio, S., and McMahon, A.P. (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4225–4234.

Klein, G., Langegger, M., Goridis, C., and Ekblom, P. (1988). Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney. *Dev. Camb. Engl.* 102, 749–761.

Ko, B., Mistry, A.C., Hanson, L., Mallick, R., Cooke, L.L., Hack, B.K., Cunningham, P., and Hoover, R.S. (2012). A new model of the distal convoluted tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 303, F700-710.

Kobayashi, A., Kwan, K.-M., Carroll, T.J., McMahon, A.P., Mendelsohn, C.L., and Behringer, R.R. (2005). Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Dev. Camb. Engl.* 132, 2809–2823.

Kobayashi, A., Valerius, M.T., Mugford, J.W., Carroll, T.J., Self, M., Oliver, G., and McMahon, A.P. (2008). *Six2* defines and regulates a multipotent self-renewing nephron progenitor population throughout mammalian kidney development. *Cell Stem Cell* 3, 169–181.

Kobayashi, A., Mugford, J.W., Krautzberger, A.M., Naiman, N., Liao, J., and McMahon, A.P. (2014). Identification of a multipotent self-renewing stromal progenitor population during mammalian kidney organogenesis. *Stem Cell Rep.* 3, 650–662.

Kopan, R., Cheng, H.-T., and Surendran, K. (2007). Molecular insights into segmentation along the proximal-distal axis of the nephron. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 18, 2014–2020.

Koseki, C., Herzlinger, D., and al-Awqati, Q. (1992). Apoptosis in metanephric development. *J. Cell Biol.* 119, 1327–1333.

Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993). *WT-1* is required for early kidney development. *Cell* 74, 679–691.

Kretchmer, N., and Bernstein, J. (1974). The dynamic morphology of the nephron: Morphogenesis of the “protein droplet.” *Kidney Int.* 5, 96–105.

Kriz, W., and Koepsell, H. (1974). The structural organization of the mouse kidney. *Z. Für Anat. Entwicklungsgeschichte* 144, 137–163.

Kühl, M. (2003). *Wnt Signaling in Development* (Springer Science & Business Media).

Kume, T., Deng, K., and Hogan, B.L. (2000). Murine forkhead/winged helix genes *Foxc1* (*Mf1*) and *Foxc2* (*Mfh1*) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* 127, 1387–1395.

Kusaba, T., Lalli, M., Kramann, R., Kobayashi, A., and Humphreys, B.D. (2014). Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1527–1532.

- Lapointe, J.-Y., Tessier, J., Paquette, Y., Wallendorff, B., Coady, M.J., Pichette, V., and Bonnardeaux, A. (2006). NPT2a gene variation in calcium nephrolithiasis with renal phosphate leak. *Kidney Int.* 69, 2261–2267.
- Leimeister, C., Bach, A., and Gessler, M. (1998). Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of the secreted frizzled related protein family. *Mech. Dev.* 75, 29–42.
- Leitges, M., Neidhardt, L., Haenig, B., Herrmann, B.G., and Kispert, A. (2000). The paired homeobox gene *Uncx4.1* specifies pedicles, transverse processes and proximal ribs of the vertebral column. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2259–2267.
- Lemley, K.V., and Kriz, W. (1991). Anatomy of the renal interstitium. *Kidney Int.* 39, 370–381.
- Levinson, R.S., Batourina, E., Choi, C., Vorontchikhina, M., Kitajewski, J., and Mendelsohn, C.L. (2005). *Foxd1*-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. *Dev. Camb. Engl.* 132, 529–539.
- Li, W., Hartwig, S., and Rosenblum, N.D. (2014). Developmental origins and functions of stromal cells in the normal and diseased mammalian kidney. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 243, 853–863.
- Liebelt, A.G. (1998). Unique Features of Anatomy, Histology, and Ultrastructure Kidney, Mouse. In *Urinary System*, T.C.J.D.V.M. D.Sc, G.C.H.Bvs. FAToxSci, DSc, FRCPath, FRCVS, and U.M. M.D, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 37–57.
- Little, M.H., and Bertram, J.F. (2009). Is there such a thing as a renal stem cell? *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20, 2112–2117.
- Little, M.H., and McMahon, A.P. (2012). Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Mackie, G.G., and Stephens, F.D. (1975). Duplex kidneys: a correlation of renal dysplasia with position of the ureteral orifice. *J. Urol.* 114, 274–280.
- Madjdpour, C., Bacic, D., Kaissling, B., Murer, H., and Biber, J. (2004). Segment-specific expression of sodium-phosphate cotransporters NaPi-IIa and -IIc and interacting proteins in mouse renal proximal tubules. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 402–410.
- Mansouri, A., Yokota, Y., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Gruss, P. (1997). Paired-related murine homeobox gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 210, 53–65.
- Mansouri, A., Voss, A.K., Thomas, T., Yokota, Y., and Gruss, P. (2000). *Uncx4.1* is required for the formation of the pedicles and proximal ribs and acts upstream of *Pax9*. *Dev. Camb. Engl.* 127, 2251–2258.
- Mao, Y., Francis-West, P., and Irvine, K.D. (2015). *Fat4/Dchs1* signaling between stromal and cap mesenchyme cells influences nephrogenesis and ureteric bud branching. *Development* 142, 2574–2585.
- Michael, L., and Davies, J.A. (2004). Pattern and regulation of cell proliferation during murine ureteric bud development. *J. Anat.* 204, 241–255.

- Michos, O., Gonçalves, A., Lopez-Rios, J., Tiecke, E., Naillat, F., Beier, K., Galli, A., Vainio, S., and Zeller, R. (2007). Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2397–2405.
- Miyazaki, Y., Oshima, K., Fogo, A., Hogan, B.L.M., and Ichikawa, I. (2000). Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J. Clin. Invest.* *105*, 863–873.
- Miyazaki, Y., Oshima, K., Fogo, A., and Ichikawa, I. (2003). Evidence that bone morphogenetic protein 4 has multiple biological functions during kidney and urinary tract development. *Kidney Int.* *63*, 835–844.
- Motamedi, F.J., Badro, D.A., Clarkson, M., Lecca, M.R., Bradford, S.T., Buske, F.A., Saar, K., Hübner, N., Brändli, A.W., and Schedl, A. (2014). WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nat. Commun.* *5*, 4444.
- Mugford, J.W., Sipilä, P., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (2008). *Osr1* expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an *Osr1*-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Dev. Biol.* *324*, 88–98.
- Mugford, J.W., Yu, J., Kobayashi, A., and McMahon, A.P. (2009). High-resolution gene expression analysis of the developing mouse kidney defines novel cellular compartments within the nephron progenitor population. *Dev. Biol.* *333*, 312–323.
- Murdaugh, H.V., Schmidt-Nielsen, B., Doyle, E.M., and O'dell, R. (1958). Renal tubular regulation of urea excretion in man. *J. Appl. Physiol.* *13*, 263–268.
- Narlis, M., Grote, D., Gaitan, Y., Boualia, S.K., and Bouchard, M. (2007). Pax2 and Pax8 Regulate Branching Morphogenesis and Nephron Differentiation in the Developing Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* *18*, 1121–1129.
- Neidhardt, L.M., Kispert, A., and Herrmann, B.G. (1997). A mouse gene of the paired-related homeobox class expressed in the caudal somite compartment and in the developing vertebral column, kidney and nervous system. *Dev. Genes Evol.* *207*, 330–339.
- Nie, X., Xu, J., El-Hashash, A., and Xu, P.-X. (2011). Six1 regulates Grem1 expression in the metanephric mesenchyme to initiate branching morphogenesis. *Dev. Biol.* *352*, 141–151.
- Nielsen, S., and Agre, P. (1995). The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney Int.* *48*, 1057–1068.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Scully, S., Lacey, D.L., et al. (2001). Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 3105–3115.
- Palacios Loro, M.L., Segura Ramírez, D.K., Ordoñez Álvarez, F.A., and Santos Rodríguez, F. (2015). [Congenital anomalies of the kidney and urinary tract. A vision for the paediatrician]. *An. Pediatria Barc. Spain 2003* *83*, 442.e1-5.
- Palmer, R.E., Kotsianti, A., Cadman, B., Boyd, T., Gerald, W., and Haber, D.A. (2001). WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr. Biol. CB* *11*, 1805–1809.

Park, J.-S., Ma, W., O'Brien, L.L., Chung, E., Guo, J.-J., Cheng, J.-G., Valerius, M.T., McMahon, J.A., Wong, W.H., and McMahon, A.P. (2012). *Six2* and *Wnt* regulate self-renewal and commitment of nephron progenitors through shared gene regulatory networks. *Dev. Cell* *23*, 637–651.

Paroly, S.S., Wang, F., Spraggon, L., Merregaert, J., Batourina, E., Tycko, B., Schmidt-Ott, K.M., Grimmond, S., Little, M., and Mendelsohn, C. (2013). Stromal protein *Ecm1* regulates ureteric bud patterning and branching. *PLoS One* *8*, e84155.

Pepicelli, C.V., Kispert, A., Rowitch, D.H., and McMahon, A.P. (1997). GDNF induces branching and increased cell proliferation in the ureter of the mouse. *Dev. Biol.* *192*, 193–198.

Perantoni, A.O., Dove, L.F., and Karavanova, I. (1995). Basic fibroblast growth factor can mediate the early inductive events in renal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4696–4700.

Perantoni, A.O., Timofeeva, O., Naillat, F., Richman, C., Pajni-Underwood, S., Wilson, C., Vainio, S., Dove, L.F., and Lewandoski, M. (2005). Inactivation of *FGF8* in early mesoderm reveals an essential role in kidney development. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 3859–3871.

Pichel, J.G., Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., et al. (1996). GDNF is required for kidney development and enteric innervation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *61*, 445–457.

Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G., and Heller, H.C. (2010). *Biologie: plus 1 Jahr Online-Zugang "Lexikon der Biologie"* (Spektrum Akademischer Verlag).

Ramanathan, S., Kumar, D., Khanna, M., Al Heidous, M., Sheikh, A., Virmani, V., and Palaniappan, Y. (2016). Multi-modality imaging review of congenital abnormalities of kidney and upper urinary tract. *World J. Radiol.* *8*, 132–141.

Reginensi, A., Scott, R.P., Gregorieff, A., Bagherie-Lachidan, M., Chung, C., Lim, D.-S., Pawson, T., Wrana, J., and McNeill, H. (2013). *Yap*- and *Cdc42*-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet.* *9*, e1003380.

Reidy, K.J., and Rosenblum, N.D. (2009). Cell and molecular biology of kidney development. *Semin. Nephrol.* *29*, 321–337.

Roselli, S., Gribouval, O., Boute, N., Sich, M., Benassy, F., Attié, T., Gubler, M.-C., and Antignac, C. (2002). Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* *160*, 131–139.

Rosselot, C., Spraggon, L., Chia, I., Batourina, E., Riccio, P., Lu, B., Niederreither, K., Dolle, P., Duyster, G., Chambon, P., et al. (2010). Non-cell-autonomous retinoid signaling is crucial for renal development. *Dev. Camb. Engl.* *137*, 283–292.

Rothernpieler, U.W., and Dressler, G.R. (1993). *Pax-2* is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development* *119*, 711–720.

Rovescalli, A.C., Asoh, S., and Nirenberg, M. (1996). Cloning and characterization of four murine homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10691–10696.

- Rumballe, B.A., Georgas, K.M., Combes, A.N., Ju, A.L., Gilbert, T., and Little, M.H. (2011). Nephron formation adopts a novel spatial topology at cessation of nephrogenesis. *Dev. Biol.* *360*, 110–122.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A.K., Mann, D.M., and Sunshine, J. (1988). The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* *240*, 53–57.
- Sainio, K., Suvanto, P., Davies, J., Wartiovaara, J., Wartiovaara, K., Saarma, M., Arumäe, U., Meng, X., Lindahl, M., Pachnis, V., et al. (1997). Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 4077–4087.
- Saxen, L. (1987). *Organogenesis of the Kidney* (Cambridge University Press).
- Schedl, A. (2007). Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 791–802.
- Schmidt, M.K. (2011). Untersuchungen zur Funktion der Transkriptionsfaktoren Tbx18 und Uncx4.1 in der Somitogenese der Maus.
- Schuchardt, A., D’Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, 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.
- Schuchardt, A., D’Agati, V., Pachnis, V., and Costantini, F. (1996). Renal agenesis and hypodysplasia in ret- mutant mice result from defects in ureteric bud development. *Dev. Camb. Engl.* *122*, 1919–1929.
- Self, M., Lagutin, O.V., Bowling, B., Hendrix, J., Cai, Y., Dressler, G.R., and Oliver, G. (2006). Six2 is required for suppression of nephrogenesis and progenitor renewal in the developing kidney. *EMBO J.* *25*, 5214–5228.
- Sharma, R., Sanchez-Ferras, O., and Bouchard, M. (2015). Pax genes in renal development, disease and regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *44*, 97–106.
- Shawlot, W., and Behringer, R.R. (1995). Requirement for Lim1 in head-organizer function. *Nature* *374*, 425–430.
- Sim, E.U.-H., Smith, A., Szilagi, E., Rae, F., Ioannou, P., Lindsay, M.H., and Little, M.H. (2002). Wnt-4 regulation by the Wilms’ tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* *21*, 2948–2960.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., and McMahon, A.P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* *372*, 679–683.
- Stewart, K., and Bouchard, M. (2014). Coordinated cell behaviours in early urogenital system morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *36*, 13–20.
- Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., et al. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 1278–1291.
- Torban, E., and Goodyer, P. (1998). What PAX genes do in the kidney. *Exp. Nephrol.* *6*, 7–11.

- Torres, M., Gómez-Pardo, E., Dressler, G.R., and Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 4057–4065.
- Treuting, P.M., and Dintzis, S.M. (2012). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas* (Academic Press).
- Tsang, T.E., Shawlot, W., Kinder, S.J., Kobayashi, A., Kwan, K.M., Schughart, K., Kania, A., Jessell, T.M., Behringer, R.R., and Tam, P.P. (2000). Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev. Biol.* *223*, 77–90.
- Uetani, N., and Bouchard, M. (2009). Plumbing in the embryo: developmental defects of the urinary tracts. *Clin. Genet.* *75*, 307–317.
- Vallon, V. (2011). Molecular determinants of renal glucose reabsorption. Focus on “Glucose transport by human renal Na⁺/d-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2.” *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *300*, C6–C8.
- Vigneau, C., Polgar, K., Striker, G., Elliott, J., Hyink, D., Weber, O., Fehling, H.-J., Keller, G., Burrow, C., and Wilson, P. (2007). Mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies generate progenitors that integrate long term into renal proximal tubules in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *18*, 1709–1720.
- Vilar, J., Gilbert, T., Moreau, E., and Merlet-Bénichou, C. (1996). Metanephros organogenesis is highly stimulated by vitamin A derivatives in organ culture. *Kidney Int.* *49*, 1478–1487.
- Wang, Q., Lan, Y., Cho, E.-S., Maltby, K.M., and Jiang, R. (2005). Odd-skipped related 1 (Odd1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev. Biol.* *288*.
- Wellik, D.M., Hawkes, P.J., and Capecchi, M.R. (2002). Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev.* *16*, 1423–1432.
- Willert, K., Shibamoto, S., and Nusse, R. (1999). Wnt-induced dephosphorylation of Axin releases β -catenin from the Axin complex. *Genes Dev.* *13*, 1768–1773.
- Winnier, A.R., Meir, J.Y., Ross, J.M., Tavernarakis, N., Driscoll, M., Ishihara, T., Katsura, I., and Miller, D.M. (1999). UNC-4/UNC-37-dependent repression of motor neuron-specific genes controls synaptic choice in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* *13*, 2774–2786.
- Woolf, A.S. (2006). Renal Hypoplasia and Dysplasia: Starting to Put the Puzzle Together. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 2647–2649.
- Wright, E.M., Hirayama, B.A., and Loo, D.F. (2007). Active sugar transport in health and disease. *J. Intern. Med.* *261*, 32–43.
- Xu, J., Liu, H., Park, J.-S., Lan, Y., and Jiang, R. (2014). Osr1 acts downstream of and interacts synergistically with Six2 to maintain nephron progenitor cells during kidney organogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *141*, 1442–1452.
- Xu, P.X., Adams, J., Peters, H., Brown, M.C., Heaney, S., and Maas, R. (1999). Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat. Genet.* *23*, 113–117.

Yamada, E. (1955). The Fine Structure of the Renal Glomerulus of the Mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *1*, 551–566.

Yanagita, M., Oka, M., Watabe, T., Iguchi, H., Niida, A., Takahashi, S., Akiyama, T., Miyazono, K., Yanagisawa, M., and Sakurai, T. (2004). USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 490–500.

Yeger, H., Forget, D., Alami, J., and Williams, B.R.G. (1996). Analysis of WT1 Gene Expression during Mouse Nephrogenesis in Organ Culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *32*, 496–504.

Yoshino, K., Rubin, J.S., Higinbotham, K.G., Uren, A., Anest, V., Plisov, S.Y., and Perantoni, A.O. (2001). Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mech. Dev.* *102*, 45–55.

6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anne-Kathrin Schäfer
Adresse Berliner Straße 9, 10715 Berlin
Geburtsdatum 15.12.1984
Nationalität Deutsch
Familienstand Ledig

Akademischer Werdegang

Oktober 2012 bis heute

Promotion im Institut für Molekularbiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Kispert

Thema der Arbeit: Rolle des Homeobox-Gens *Uncx* während der Entwicklung der murinen Niere

Juni 2011 – März 2012

Diplomand am Institut für Pathobiochemie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. Behl

Thema der Arbeit: Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf die Entstehung von Alzheimer.

Mai 2005 – Mai 2012

Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Abschluss: Diplom

Juni 1995 - März 2005

Integrierte Gesamtschule Kurt Schumacher Ingelheim

Abschluss: Abitur

Internationale Erfahrung

August 2008 – Juni 2009

Wissenschaftliches Jahr an der Universidad Autónoma Madrid

August 2008 – Juni 2009

Praktikum am Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" Madrid unter der Leitung von Prof. Dr. Diaz-Benjumea

Thema: Rolle der zusätzlich während der Larvenentwicklung gebildeten leukokinergen Zellen im zentralen Nervensystem von *D. melanogaster*

Hilfswissenschaftliche Tätigkeit

Mai 2010 – Dezember 2010

Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie in Mainz.

Das Aufgabenspektrum war vergleichbar mit dem einer biologisch technischen Assistentin

Praktika

Februar 2011

Praktikum am Institut für Pathobiochemie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Thema: Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Strahlung auf die Entstehung von amyotropher Lateralsklerose

November 2009

Praktikum am Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Thema: Rolle des *Cannabinoid Rezeptor 1* in der neuronalen Entwicklung der Maus

August 2009

Praktikum am Institut für Zoologie an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Thema: Verhaltensdefekte von *amnesia* Mutanten (*D. melanogaster*)

August 2008 – Juni 2009

Praktikum am Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” Madrid

Thema: Rolle der zusätzlich während der Larvenentwicklung gebildeten leukokinergen Zellen im zentralen Nervensystem von *D. melanogaster*

7 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation „Rolle des Homeobox-Gens Uncx in der Entwicklung der murinen Niere“ selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 28.04.2016

(Anne-Kathrin Schäfer)

8 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Whole-exome sequencing identifies mutations of TBC1D1 encoding a Rab-GTPase-activating protein in patients with congenital anomalies of the kidneys and urinary tract (CAKUT).

Anne Kosfeld · Martin Kreuzer · Christoph Daniel · Frank Brand · **Anne-Kathrin Schäfer** · Alexandra Chadt · Anna-Carina Weiss · Vera Riehmer · Cécile Jeanpierre · Michael Klintschar · Jan Hinrich Bräsen · Kerstin Amann · Lars Pape · Andreas Kispert · Hadi Al-Hasani · Dieter Haffner · Ruthild G. Weber (2015).

Hum Genet DOI 10.1007/s00439-015-1610-1

Low-frequency magnetic fields do not aggravate disease in mouse models of Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis.

Liebl MP, Windschmitt J, Besemer AS, **Schäfer AK**, Reber H, Behl C, Clement AM. (2015).

Sci Rep. 2015; 5: 8585.

Bithorax-complex genes sculpt the pattern of leucokinergic neurons in the Drosophila central nervous system.

Estacio-Gómez A, Moris-Sanz M, **Schäfer AK**, Perea D, Herrero P, Díaz-Benjumea FJ (2013).

Development. 2013 May;140(10):2139-48

9 Anhang

Differentielle Genexpression mit 1,1 facher Deregulation in E12.5, E13.5 und E14.5 *Uncx^{LacZ/LacZ}*-Mutanten (Angewandene Werte sind Mittelwerte (n=2))

Gen-Name	Gen-Symbol	E12.5	E13.5	E14.5
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	Oasl1	1,20	1,20	1,20
3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdpk1	0,83	0,91	0,91
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled	Htr2b	0,45	0,56	0,36
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A, ionotropic	Htr3a	1,10	1,90	1,50
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B	Htr5b	1,80	1,50	1,50
aarF domain containing kinase 4	Adck4	1,30	1,10	1,10
achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila)	Ascl2	1,20	1,10	1,10
acid phosphatase, prostate	Acpp	0,77	0,83	0,83
acid-sensing (proton-gated) ion channel family member 4	Asic4	2,10	3,00	1,90
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 17	Adamts17	0,71	0,67	0,67
adenosine A3 receptor	Adora3	0,32	0,83	0,71
anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase	Alk	1,20	1,30	1,10
ankyrin repeat and SOCS box containing 4	Asb4	0,91	0,91	0,83
antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	Mfi2	1,20	1,30	1,30
arachidonate 15-lipoxygenase	Alox15	1,80	1,80	1,70
arginase, type II	Arg2	1,30	2,00	1,20
asialoglycoprotein receptor 1	Asgr1	4,70	6,50	4,60
BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like	Bnipl	1,40	1,30	1,20
brain-derived neurotrophic factor	Bdnf	1,50	1,80	2,20
brain-specific angiogenesis inhibitor 1	Bai1	1,60	1,60	1,60
BRICHOS domain containing 5	Bricd5	0,59	0,67	0,56
calbindin 1, 28kDa	Calb1	1,40	1,40	1,90
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta	Camk2d	0,77	0,71	0,91
calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	Camk2b	0,59	0,67	0,59
carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-O) sulfotransferase 8	Chst8	1,80	1,30	1,20
carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	Chst2	0,77	0,71	0,83
catenin (cadherin-associated protein), delta 2	Ctnnd2	1,40	1,20	1,10
CD109 molecule	Cd109	0,77	0,83	0,91
CD55 antigen	Cd55	0,56	0,59	0,77
chemokine (C-C motif) ligand 24	Ccl24	0,40	0,56	0,37
chimerin 2	Chn2	1,60	1,60	1,40
cholinergic receptor, nicotinic, alpha 6 (neuronal)	Chrna6	0,53	0,63	0,50
cholinergic receptor, nicotinic, delta (muscle)	Chrnd	1,50	1,70	1,20
chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	Chga	0,77	0,91	0,56
chromosome 1 open reading frame 173	4922501L14Rik	2,10	4,40	3,40
chromosome 10 open reading frame 35	2010107G23Rik	1,30	1,20	1,10

chromosome 11 open reading frame 63	493142911Rik	1,50	2,20	1,50
clarin 1	Clrn1	1,30	2,30	1,50
claudin 3	Cldn3	1,70	1,30	1,30
coiled-coil domain containing 11	Ccdc11	1,30	1,30	1,40
collapsin response mediator protein 1	Crmp1	1,40	1,50	1,10
complement component 1, q subcomponent-like 1	C1ql1	1,90	1,70	1,50
corticotropin releasing hormone binding protein	Crhbp	3,20	2,30	2,90
crumbs homolog 2 (Drosophila)	Crb2	0,71	0,56	0,50
crystallin, gamma F	Crygf	2,00	1,40	1,50
C-type lectin domain family 10, member A	Clec10a	1,90	2,80	1,80
cysteine dioxygenase, type I	Cdo1	1,40	1,60	1,30
cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1	Cyp26a1	0,26	0,45	0,37
cytokine receptor-like factor 1	Crlf1	2,00	1,70	1,30
Dab, mitogen-responsive phosphoprotein, homolog 2 (Drosophila)	Dab2	0,71	0,59	0,83
delta(4)-desaturase, sphingolipid 2	Degs2	2,60	1,40	1,40
delta-like 1 (Drosophila)	Dll1	0,67	0,83	0,77
dendrocyte expressed seven transmembrane protein	Dcstamp	2,30	3,30	1,70
desmin	Des	1,60	1,30	1,50
doublesex and mab-3 related transcription factor 3	Dmrt3	3,90	1,70	3,30
EF-hand calcium binding domain 12	Efcab12	1,20	1,20	1,20
endothelin converting enzyme-like 1	Ecel1	1,10	1,70	1,10
engrailed homeobox 2	En2	0,77	0,67	0,34
epithelial cell adhesion molecule	Epcam	1,50	1,20	1,20
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	Epb4.114b	1,40	1,30	1,10
ets homologous factor	Ehf	1,50	1,30	1,30
ets variant 1	Etv1	0,83	0,71	0,91
eva-1 homolog A (C. elegans)	Eva1a	0,77	0,83	0,77
expressed sequence AI314831	AI314831	0,77	0,50	0,67
eyes absent homolog 2 (Drosophila)	Eya2	1,50	1,60	1,40
family with sequence similarity 149, member A	Fam149a	1,30	1,10	1,10
family with sequence similarity 163, member A	Fam163a	3,80	2,60	2,60
fatty acid 2-hydroxylase	Fa2h	0,42	0,67	0,71
F-box protein 2	Fbxo2	1,40	1,60	1,20
FK506 binding protein 14, 22 kDa	Fkbp14	0,71	0,91	0,91
free fatty acid receptor 4	Ffar4	1,40	1,80	1,30
frizzled family receptor 10	Fzd10	0,77	0,77	0,91
G protein-coupled receptor 20	Gpr20	1,20	1,90	1,20
galanin/GMAP prepropeptide	Gal	2,20	2,10	1,90
galectin-related inter-fiber protein	Grifin	0,53	0,67	0,77
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 3	Gabra3	0,63	0,63	0,83
gap junction protein, beta 2, 26kDa	Gjb2	0,71	0,45	0,56
gastrulation brain homeobox 2	Gbx2	2,20	3,30	2,20

GATA binding protein 6	Gata6	0,83	0,83	0,83
GDNF family receptor alpha 1	Gfra1	1,40	1,60	1,10
GLI pathogenesis-related 1	Glipr1	0,83	0,91	0,91
glial cell derived neurotrophic factor	Gdnf	1,60	1,60	1,30
glutamate receptor, ionotropic, kainate 4	Grik4	1,30	1,70	1,40
glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2C	Grin2c	2,90	2,50	1,90
glycoprotein M6B	Gpm6b	0,77	0,67	0,91
golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)	Golph3	0,91	0,91	0,91
guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	Gucy1b3	0,71	0,77	0,91
heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1	Hs3st3a1	1,30	2,10	1,20
HIG1 hypoxia inducible domain family, member 1C	Higd1c	0,34	0,59	0,50
homeobox B3	Hoxb3	1,40	1,10	1,30
hyaluronan and proteoglycan link protein 1	Hapln1	0,71	0,56	0,83
hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	Hpgd	1,50	1,90	1,50
hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2	Hsd11b2	1,80	1,90	1,50
immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3	Igdcc3	1,60	1,60	1,60
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	Id4	1,20	1,20	1,20
insulin receptor-related receptor	Insrr	0,83	0,91	0,71
interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	0,71	0,59	0,83
iroquois homeobox 4	Irx4	1,90	2,30	2,30
keratin 23 (histone deacetylase inducible)	Krt23	1,90	1,90	1,30
KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 2	Khdrbs2	0,67	0,91	0,83
KIAA1549-like	D430041D05Rik	1,30	1,60	1,20
laminin, gamma 3	Lamc3	0,77	0,77	0,83
lipoma HMGIC fusion partner-like 1	Lhfp1	1,40	1,80	1,60
lymphocyte antigen 6 complex, locus A	Ly6g	0,77	0,67	0,71
lysyl oxidase-like 2	Loxl2	0,59	0,77	0,83
MANSC domain containing 4	Gm5887	2,00	1,80	1,30
MARVEL (membrane-associating) domain containing 3	Marveld3	1,40	1,40	1,10
matrix Gla protein	Mgp	0,67	0,71	0,83
melanoma antigen family F, 1	Magef1	1,20	1,40	1,20
microsomal glutathione S-transferase 2	Mgst2	1,20	1,60	1,30
microtubule associated tumor suppressor 1	Mtus1	0,77	0,77	0,91
murine retrovirus integration site 1 homolog	Mrvi1	0,91	0,91	0,91
musculin	Msc	0,56	0,53	0,67
myosin XVA	Myo15	1,60	1,80	1,90
myosin, heavy chain 14, non-muscle	Myh14	1,60	1,20	1,10
myotubularin related protein 14	Mtmr14	0,71	0,40	0,67
NEL-like 1 (chicken)	Nell1	1,40	1,70	1,40
neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	0,77	0,71	0,77
neurensin 1	Nrsn1	2,60	6,00	4,70
neurexin III	Nrxn3	1,40	1,60	1,50

neurexophilin 1	Nxph1	2,10	1,10	1,40
neurofilament, heavy polypeptide	Nefh	1,80	1,70	1,30
neuronal guanine nucleotide exchange factor	Ngef	0,71	0,77	0,77
neuron-derived neurotrophic factor	Ndnf	0,56	0,48	0,50
neuropeptide Y receptor Y1	Npy1r	0,67	0,43	0,91
neutral cholesterol ester hydrolase 1	Nceh1	0,83	0,83	0,91
NHS-like 1	Nhsl1	0,83	0,77	0,91
olfactomedin 4	Olfm4	2,40	3,20	2,30
oxytocin receptor	Oxtr	0,67	0,63	0,67
parathyroid hormone-like hormone	Pthlh	1,10	3,70	1,50
pellino E3 ubiquitin protein ligase family member 2	Peli2	0,71	0,83	0,71
phenylethanolamine N-methyltransferase	Pnmt	1,80	2,10	1,20
phospholipase C, epsilon 1	Plce1	0,67	0,71	0,91
phospholipase C, eta 2	Plch2	1,50	1,20	1,30
phosphorylase, glycogen, muscle	Pygm	1,20	1,40	1,20
phosphotyrosine interaction domain containing 1	Pid1	0,77	0,91	0,83
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	Kcnj5	0,56	0,50	0,63
predicted gene 13446	Gm13446	1,50	2,10	1,40
predicted gene 2011	Gm2011	1,20	1,30	1,10
predicted gene 5067	Gm5067	3,20	1,20	4,20
predicted gene 5144	Gm5144	0,77	0,91	0,77
predicted gene 7285	Gm7285	0,77	0,24	0,71
predicted gene, 16863	Gm16863	2,10	2,20	1,40
predicted gene, 19958	Gm19958	3,00	1,40	1,50
pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	Ppbbp	0,71	0,83	0,71
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	Ptger4	0,67	0,71	0,71
protein disulfide isomerase family A, member 6	Pdia6	0,83	0,91	0,91
protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1E	Ppm1e	0,71	0,67	0,77
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	Ptpn6	1,30	1,60	1,10
protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	Ptprd	1,60	1,30	1,50
protocadherin 8	Pcdh8	1,90	2,90	2,30
Purkinje cell protein 4	Pcp4	0,56	0,38	0,38
RALBP1 associated Eps domain containing 1	Reps1	1,20	1,20	1,10
Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3	Rassf3	0,77	0,77	0,77
relaxin/insulin-like family peptide receptor 2, Insl3	Rxfp2	1,40	1,80	1,40
retinoic acid early transcript 1E	Raet1e	0,83	0,91	0,77
retinoic acid early transcript gamma	Raet1c	0,77	0,83	0,71
retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	Rarres1	0,91	0,91	0,71
retinol binding protein 1, cellular	Rbp1	0,91	0,91	0,91
Rh family, C glycoprotein	Rhcg	2,00	1,10	1,10
ribonucleoprotein, PTB-binding 2	Raver2	0,71	0,77	0,71
RIKEN cDNA 0610005C13 gene	0610005C13Rik	0,77	0,50	0,77

RIKEN cDNA 0610040B09 gene	ENSMUST00000150698	1,50	1,50	1,20
RIKEN cDNA 2310015B20 gene	2310015B20Rik	0,53	0,71	0,53
RIKEN cDNA 2610028E06 gene	2610028E06Rik	0,71	0,71	0,67
RIKEN cDNA 2810416G20 gene	2810416G20Rik	1,20	1,50	1,20
RIKEN cDNA 4930412O13 gene	4930412O13Rik	1,40	1,30	1,20
RIKEN cDNA 5330426P16 gene	5330426P16Rik	0,83	0,91	0,77
RIKEN cDNA A630081J09 gene	A630081J09Rik	1,50	1,50	1,20
Riken cDNA C130021I20 gene	ENSMUST00000147294	0,56	0,53	0,48
RIKEN cDNA F930015N05 gene	F930015N05Rik	1,60	1,20	1,30
ring finger protein 186	Rnf186	2,10	1,40	1,40
RNA binding motif protein 24	Rbm24	1,60	1,70	1,30
R-spondin 1	Rspo1	0,67	0,67	0,56
sel-1 suppressor of lin-12-like 3 (C. elegans)	Sel1l3	1,40	1,60	1,50
serine/threonine kinase 32A	Stk32a	1,90	1,80	3,70
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Serpina1a	0,67	0,56	0,71
serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Serpina1c	0,53	0,59	0,71
serum amyloid A1	Saa1	1,80	2,00	1,80
serum amyloid A1	Saa2	2,40	2,80	2,20
SH3 and PX domains 2B	Sh3pxd2b	0,83	0,83	0,91
sine oculis binding protein homolog (Drosophila)	Sobp	1,10	1,30	1,20
SNAP-associated protein	Snapin	0,91	0,91	0,91
solute carrier family 16, member 11 (monocarboxylic acid transporter 11)	Slc16a11	3,20	2,40	1,90
solute carrier family 16, member 5 (monocarboxylic acid transporter 6)	Slc16a5	1,80	1,40	1,20
solute carrier family 18, subfamily B, member 1	Slc18b1	0,77	0,77	0,91
solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4	Slc22a4	0,67	0,91	0,71
solute carrier family 26, member 7	Slc26a7	0,71	0,63	0,77
solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 5	Slc4a5	1,10	1,20	1,10
solute carrier family 9, subfamily B (NHA2, cation proton antiporter 2), member 2	Slc9b2	0,71	0,91	0,77
somatostatin receptor 3	Sstr3	0,59	0,56	0,40
spleen tyrosine kinase	Syk	0,77	0,77	0,83
Src homology 2 domain containing E	She	0,83	0,83	0,91
ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	St8sia1	0,77	0,83	0,91
sulfatase 1	Sulf1	0,63	0,77	0,83
SWI5-dependent recombination repair 1	Sfr1	0,91	0,91	0,91
synapse differentiation inducing 1	Tmem90b	1,80	1,20	1,40
synaptotagmin VII	Syt7	0,53	0,67	0,67
syndecan 2	Sdc2	0,83	0,83	0,91
syntaxin 7	Stx7	0,83	0,83	0,91
TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 80kDa	Taf6	0,91	0,91	0,91
tetraspanin 1	Tspan1	2,50	1,40	1,30

tetraspanin 12	Tspan12	0,71	0,83	0,91
torsin family 3, member A	Tor3a	1,50	1,50	1,40
transcription factor 23	Tcf23	0,77	0,63	0,63
transcription factor EC	Tfec	0,91	0,53	0,83
transforming growth factor, alpha	Tgfa	0,63	0,71	0,59
transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4	Trpc4	1,10	1,20	1,10
transmembrane protein 45B	Tmem45b	2,90	1,30	1,20
tripartite motif containing 63, E3 ubiquitin protein ligase	Trim63	2,00	1,80	1,20
tubulin, gamma 2	Tubg2	1,20	1,20	1,10
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15	Tnfsf15	1,40	1,30	1,50
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	0,67	0,91	0,71
two pore segment channel 1	Tpcn1	0,91	0,83	0,83
UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5	B3galt5	0,43	0,56	0,59
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GalNAc-T14)	Galnt14	0,83	0,77	0,83
UNC homeobox	Uncx	0,24	0,19	0,34
unc-5 homolog A (C. elegans)	Unc5a	3,10	1,70	1,70
unc-93 homolog A (C. elegans)	Unc93a	0,48	0,83	0,59
uncharacterized protein 3830612M24	3830612M24	1,40	1,80	1,50
vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	0,71	0,83	0,83
vav 3 guanine nucleotide exchange factor	Vav3	1,30	1,40	1,30
V-set and immunoglobulin domain containing 8	Vsig8	0,59	0,67	0,63
V-set and transmembrane domain containing 2 like	Vstm2l	1,50	1,80	1,70
WAP four-disulfide core domain 2	Wfdc2	1,30	1,30	1,10
WD repeat domain 66	Wdr66	1,30	1,90	1,40
Wilms tumor 1	Wt1	0,77	0,59	0,67
wingless-type MMTV integration site family, member 11	Wnt11	1,50	1,70	1,30
wingless-type MMTV integration site family, member 8B	Wnt8b	0,56	0,50	0,71
YY2 transcription factor	Yy2	0,77	0,77	0,91
zinc finger, matrin-type 4	Zmat4	2,10	5,00	3,10
zinc finger, SWIM-type containing 4	Zswim4	1,30	1,20	1,10
zona pellucida binding protein 2	Zpbp2	1,20	1,50	1,40