

**Konditionale Überexpression des  
Transkriptionsfaktors HNF1 $\beta$  und dessen  
Einfluss auf die Nierenentwicklung von  
*Xenopus laevis***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät  
Biologie und Geographie

an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Kathrin Sauert  
aus Emmerich

September 2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen (Standort Essen) durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Gerhart -U. Ryffel

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Elke Winterhager

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2010

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikation mit eingegangen:

**Roose M., Sauert K., Turan G., Solomentsew N., Werdien D., Pramanik K., Senkel S., Ryffel G.U., Waldner C.** (2009). Heat-shock inducible Cre strains to study organogenesis in transgenic *Xenopus laevis*. *Transgenic Research* **Aug; 18**: 595-605.

Das Manuskript für eine weitere Publikation (**Sauert et al.**) befindet sich in der Vorbereitung und wird voraussichtlich Ende 2010 bei einer internationalen Fachzeitschrift eingereicht.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>8</b>
1.1	Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 $\beta$ .....	8
1.2	Die Nierenentwicklung der höheren Vertebraten .....	12
1.3	Die Pronephrosentwicklung in <i>Xenopus laevis</i> .....	14
1.4	<i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus .....	17
1.5	Konditionale Kontrolle von Genen in <i>Xenopus laevis</i> mit dem binären Cre/loxP-System.....	19
1.6	Zielsetzung .....	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>24</b>
2.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme.....	24
2.2	Molekularbiologische Standardmethoden .....	24
2.3	Plasmide .....	24
2.3.1	Konstruktion des (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ -Fragmentes für die Herstellung transgener Xenopoden .....	24
2.3.2	Konstruktion der pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ -Plasmide für die Herstellung transgener Xenopoden .....	25
2.4	Herstellung transgener <i>Xenopus laevis</i> .....	26
2.4.1	Haltung, <i>in vitro</i> -Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i> .....	26
2.4.2	REMI-Methode .....	27
2.4.3	I-Scel-Methode.....	28
2.4.4	Verwendete transgene <i>Xenopus laevis</i> Stämme.....	29
2.5	PCR-Analyse genomischer DNA .....	29

2.6	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	31
2.6.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>Xenopus</i> -Embryonen .....	31
2.6.2	cDNA-Synthese.....	31
2.6.3	qRT-PCR.....	31
2.6.4	Berechnung der Genexpression.....	33
2.7	Induktion der Rekombinase-Expression durch Hitzeschock .....	33
2.8	Induktion der Rekombinase-Expression durch Laserbestrahlung.....	34
2.9	Immunfluoreszenz der Pronephri in <i>Xenopus laevis</i> Larven .....	34
2.10	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen .....	35
2.11	Statistische Auswertung.....	36
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>37</b>
3.1	Charakterisierung der Aktivatorstämme HSPCre1 und HSPCre13.....	37
3.2	Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$ , sowie der HNF1 $\beta$ - Mutanten P328L329del und A263insGG .....	42
3.2.1	Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante P328L329del durch einstündigen Hitzeschock .....	43
3.2.2	Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante P328L329del durch zweistündigen Hitzeschock .....	50
3.3	Analyse der Expression spezifischer Pronephros-Markergene nach Überexpression der Mutante P328L329del .....	53
3.3.1	Analyse des Glomusmarkers nephrin.....	54
3.3.2	Analyse von collectrin (tmem27) und slc3a1, Markern für die proximalen Tubuli (PT) des Pronephros.....	55
3.3.3	Analyse von clcnk, einem Marker für die intermediären (IT) und distalen Tubuli (DT), sowie für den verbindenden Tubulus (CT).....	56
3.3.4	Analyse von slc12a3, einem Marker für den distalen (DT2) und verbindenden (CT) Tubulus, sowie für die Kloake .....	57
3.4	Hitzeschockinduzierbare Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante A263insGG.	58

3.5	Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$ .....	61
3.6	Herstellung von Effektorstämmen zur pronephrospezifischen Überexpression von HNF1 $\beta$ .....	64
3.6.1	Herstellung transgener Tiere für die pronephrosspezifischen Effektorstämme HNF1 $\alpha$ -wt, HNF1 $\alpha$ -A263insGG und HNF1 $\alpha$ -del .....	67
3.6.2	Weitergabe des jeweiligen Effektortransgens potentieller Gründertiere für die neuen Effektorstämme .....	68
3.7	Laserinduzierte Hitzeschockaktivierung von Genen .....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
4.1	Charakterisierung der Aktivatorstämme HSPCre1 und HSPCre13.....	81
4.2	Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$ und der mutanten Derivate A263insGG und P328L329del.....	83
4.2.1	Optimierung des Hitzeschock-Protokolles.....	83
4.2.2	Hitzeschockinduzierte Überexpression der Mutante P328L329del .....	86
4.2.3	Analyse der Expression spezifischer Pronephros-Markergene nach Überexpression von P328L329del.....	87
4.2.4	Hitzeschockinduzierbare Überexpression der Mutante A263insGG.....	90
4.2.5	Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$ .....	91
4.3	Herstellung der pronephrosspezifischen Effektorstämme HNF1 $\alpha$ -wt, HNF1 $\alpha$ - A263ins und HNF1 $\alpha$ -del .....	93
4.4	Laserinduzierte Hitzeschockaktivierung von Genen .....	96
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary DNA
DsRed	Discosoma Red Fluorescent Protein
E.coli	Escherichia coli
ECFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
F0	Parentalgeneration
F1	1. Tochtergeneration
GOI	Gene Of Interest
h	Stunde
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
HS	Hitzeschock
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
min	Minute
MMR	Marc's Modified Ringer
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS-222	Tricain Methansulfonat
mRNA	Messenger-RNA
mW	Milliwatt
$\mu$ m	Mikrometer
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
REMI	Restriction Enzyme Mediated Integration
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)

Für eine einfache Unterscheidung wurden in dieser Arbeit die humanen Gene in Großbuchstaben, die Gene der Maus mit großem Anfangsbuchstaben und die *Xenopus*-Gene kleingeschrieben.

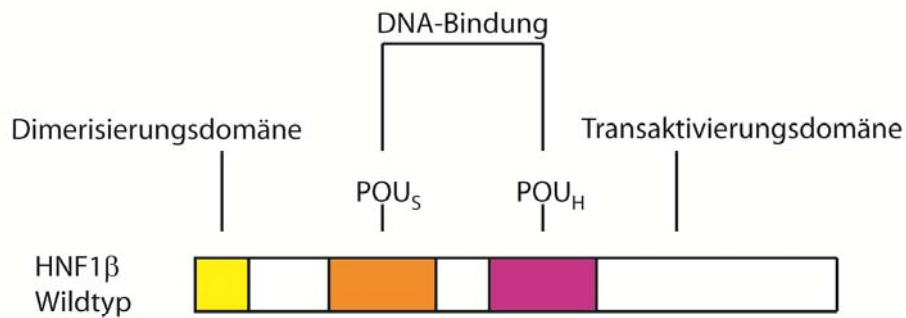
# **1 Einleitung**

## **1.1 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 $\beta$**

Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF (**H**epatocyte **N**uclear **F**actor) 1 $\beta$  wurde erstmalig in dedifferenzierten Ratten-Hepatomazelllinien durch Bindung an den Albuminpromotor entdeckt (Cereghini et al., 1988). Er wird in der Leber (Bach et al., 1991), der Bauchspeicheldrüse, dem Darm, im Genitaltrakt und der Niere exprimiert (Blumenfeld et al., 1991; Coffinier et al., 1999a). HNF1 $\beta$  gehört zusammen mit dem eng verwandten HNF1 $\alpha$  zur Familie der POU-Transkriptionsfaktoren. Bis heute gehören 13 Homeodomänen-Proteine, wie z.B. Pit-1, Oct-1 und Unc-86, dieser Familie an. Alle diese Proteine haben die POU-Homeodomäne gemeinsam (Lu et al., 2007). In Abb. 1 ist die Struktur des HNF1 $\beta$ -Proteins (A), sowie die der beiden Mutanten P328L329del und A263insGG (B) dargestellt. Am N-Terminus des HNF1 $\beta$ -Proteins befindet sich die Dimerisierungsdomäne, die durch vier  $\alpha$ -Helices gebildet wird. Mit der Dimerisierungsdomäne kann HNF1 $\beta$  sowohl Homo- als auch Heterodimere mit dem strukturell verwandten HNF1 $\alpha$  bilden. Sowohl HNF1 $\beta$  als auch HNF1 $\alpha$  binden ausschließlich als Dimere an die DNA, wohingegen andere POU-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Pit-1 und Oct-1, auch als Monomere agieren können (Ryan und Rosenfeld, 1997; Phillips und Luisi, 2000). Die sequenzspezifische DNA-Bindedomäne besteht aus der POU<sub>H</sub> (Homeodomäne)- und der POU<sub>S</sub>-Domäne (spezifische Domäne) (Rosenfeld, 1991). Die POU<sub>H</sub>-Domäne besteht aus 60 Aminosäuren, die drei  $\alpha$ -Helices bilden, wobei die dritte Helix als DNA-Erkennungshelix fungiert. Bei der POU<sub>S</sub>-Domäne bilden 75 AS ein  $\alpha$ -helicales Motiv. Dieses interagiert mit der POU<sub>H</sub>-Domäne und verstärkt deren DNA-Bindungsaffinität und Spezifität. HNF1 $\beta$  und HNF1 $\alpha$  sind atypische Mitglieder der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren. Die POU-Domänen dieser beiden Transkriptionsfaktoren weisen am N-Terminus eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix auf und die darauf folgende  $\alpha$ -Helix und der sich anschließende Loop der POU<sub>H</sub>-Domäne sind um 21 AS länger, was zu einer extensiven Verbindung der beiden POU-Domänen führt (Lu et al., 2007). Am C-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne, die etwa die Hälfte des Proteins ausmacht (Tronche und Yaniv, 1992).



A



B



**Abb. 1: Schematische Darstellung des HNF1 $\beta$ -Proteins**

A: Tertiärstruktur von HNF1 $\beta$ . POU<sub>S</sub> ist die POU-spezifische Domäne. POU<sub>H</sub> die POU-Homeodomäne.

B: Tertiärstruktur der HNF1 $\beta$ -Mutanten P328L329del und A263insGG. Die schwarze Box kennzeichnet den durch eine Leserasterverschiebung verursachten Austausch von Aminosäuren.

HNF1 $\beta$  ist vom Zebrafisch bis zum Menschen hoch konserviert (Demartis et al., 1994; Bingham et al., 2001; Sun und Hopkins, 2001). Im Menschen verursachen heterozygote Mutationen des HNF1 $\beta$ -Gens ein breites klinisches Spektrum von Erkrankungen. In betroffenen Patienten tritt vor allem MODY 5 (**M**aturity **O**nset **D**iabetes of the **Y**oung Type 5), eine autosomal-dominant vererbte Form der Diabetes, auf (Horikawa et al., 1997). Weitere Folgen der Mutation sind Fehlbildungen des Genitaltraktes, eine gestörte Funktion der Leber, Gicht und verschiedene Fehlentwicklungen der Niere. Diese Nierendefekte manifestieren sich vorwiegend in Zystenbildung, insbesondere in vergrößerten polyzystischen Nieren, aber auch in renaler Hypoplasie (signifikante Reduktion der Nephronenzahl) und Dysplasie (das Nierenmesenchym ist nicht oder nur teilweise zu Nephronen ausdifferenziert und die Filtrationsleistung aufgrund dessen nur sehr schwach oder gar nicht vorhanden), dem Fehlen der Niere und der sogenannten „Hufeisen“-Niere,

einer Verschmelzung beider Nieren (Edghill et al., 2008). Aber auch eine Atrophie der Niere (Schrumpfniere), genetisch bedingte Pankreatitis und eine Hypoplasie der Bauchspeicheldrüse sind typische Krankheitsbilder (Bellanne-Chantelot et al., 2004; Haumaître et al., 2006; Maestro et al., 2007; Fischer und Pontoglio, 2008). Heterozygote Mutationen des eng verwandten Transkriptionsfaktors HNF1 $\alpha$  führen im Menschen zu MODY3 (Pontoglio, 2000). Nierendefekte wurden jedoch nicht beobachtet (Ryffel, 2001).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von HNF1 $\beta$  zu polyzystischen Nieren (Gresh et al., 2004), einer Fehlfunktion der Niere, fehlerhafter Entwicklung der Gallenblase (Coffinier et al., 2002), zu einem Fehlen der Bauchspeicheldrüse (Haumaître et al., 2005), zu einer verminderten Glukosetoleranz aufgrund beeinträchtigter Insulinsekretion (Wang et al., 2004) und zu einer Missbildung der Leberknospe mit beeinträchtigter Leberfunktion (Lokmane et al., 2008) führt. Auf molekularer Ebene spielt HNF1 $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Dekondensation des Chromatins nach mitotischem Silencing, was als Mechanismus der Zystenbildung diskutiert wird (Verdeguer et al., 2010).

Auch im Zebrafisch sind Mutationen in *hnf1b* der Grund für polyzystische Nieren (Sun et al., 2004). Zudem ist *hnf1b* hier essentiell für die korrekte Entwicklung des Nachhirns und des Darms (Sun und Hopkins, 2001; Hernandez et al., 2004), des Pankreas und der Leber, (Song et al., 2007) sowie des Hörbläschens (Lecaudey et al., 2007).

Im südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von neun verschiedenen, natürlich vorkommenden Mutanten des HNF1 $\beta$ -Gens, die im Menschen Defekte in der Nierenentwicklung verursachen, zu unterschiedlichen Nierenphänotypen in *Xenopus laevis*-Larven führt (Wild et al., 2000; Bohn et al., 2003). Die Mutanten konnten hier in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Überexpression der Mutanten der ersten Gruppe hatte eine signifikante Vergrößerung der Niere zur Folge, wohingegen die Überexpression der Mutanten der zweiten Gruppe eine Verkleinerung der Niere, oder sogar das völlige Fehlen der Niere verursachte. Die Mutanten A263insGG (Vergrößerung der Niere) und P328L329del (Verkleinerung der Niere) zeigten hierbei den stärksten Phänotyp. Die Überexpression von HNF1 $\beta$  führte ebenfalls zu einer verkleinerten Niere. Die P328L329del-Mutation geht im Menschen mit einer zystischen Nierendysplasie

einher (Bingham et al., 2001), Individuen mit der A263insGG-Mutation weisen Zysten in den Nieren auf (Nishigori et al., 1998). Beide Mutationen führen in den betroffenen Individuen zum Ausbruch von MODY5. Die P328L329del-Mutation resultiert in einem trunkierten Protein mit einer intakten Dimerisierungs- und DNA-Bindedomäne und einer verkürzten Transaktivierungsdomäne (Abb. 1 B). Die Mutante besitzt immer noch die Fähigkeit zur Bildung von Heterodimeren und zur DNA-Bindung und weist ein erhöhtes Transaktivierungspotential im Vergleich zum Wildtyp auf (Wild et al., 2000; Thomas et al., 2004). Außerdem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne von HNF1 $\beta$  zur Aktivierung des PKHD1-Promotors benötigt wird (Hiesberger et al., 2005). Diese interagiert mit dem P300/CBP assoziierten Faktor, der für die Aktivierung des Promotors notwendig ist. Wird ein HNF1 $\beta$ -Protein mit deletierter C-terminaler Domäne, ähnlich der P328L329-Mutation, exprimiert, so wirkt dies dominant-negativ auf den PKHD1-Promotor. Die Mutante A263insGG besitzt keine Transaktivierungsdomäne und lediglich eine verkürzte DNA-Bindedomäne und kann daher nicht mehr an die DNA binden (Senkel et al., 2005). Sie besitzt jedoch immer noch die Fähigkeit zur Dimerbildung und wirkt dadurch dominant-negativ im Vergleich zu HNF1 $\beta$  (Tomura et al., 1999; Bai et al., 2002; Hiesberger et al., 2004). Dies scheint jedoch kein allgemeingültiger Effekt zu sein. Experimente von Bohn et al., 2003 zeigten, dass die A263insGG-Mutation nicht mit der Aktivität des HNF1 $\beta$ -Proteins interferiert.

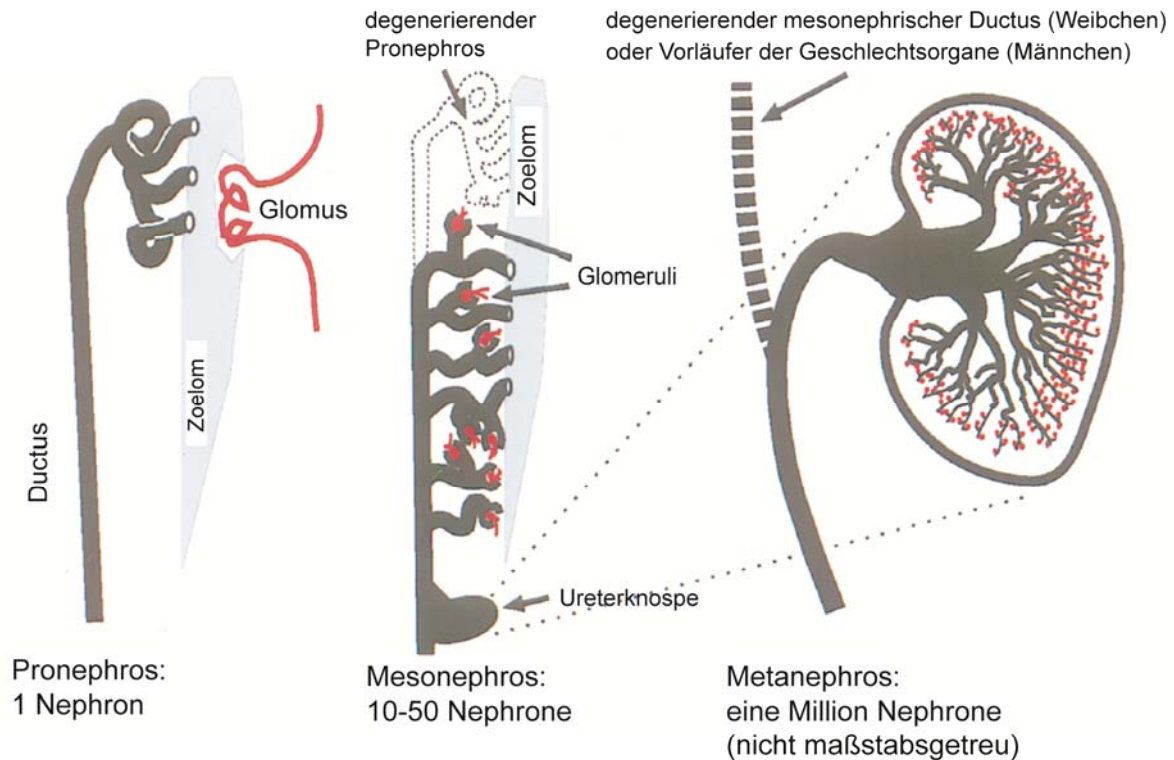
All diese Daten deuten darauf hin, dass HNF1 $\beta$  ein sehr breites Funktionsspektrum in der Entwicklung verschiedener Organismen besitzt. Um die Funktion von HNF1 $\beta$  in der Entwicklung von Endo- und Mesoderm, sowie in der Organogenese, wie z.B. bei der Entwicklung der Niere, des Magen-Darm-Traktes und des Gehirns, differenzierter zu analysieren, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Für diese Untersuchungen ist das Mausmodell nicht optimal. Eine homozygote Deletion von HNF1 $\beta$  ist wegen eines Defektes in der Differenzierung des viszeralen Endoderms schon vor der Gastrulation letal (Coffinier et al., 1999b; Barbacci et al., 1999). Eine heterozygote Deletion hat dagegen keinen Einfluss auf die Entwicklung (Coffinier et al., 1999b; Pontoglio, 2000). Um die Rolle von HNF1 $\beta$  in späteren Stadien der Embryonalentwicklung untersuchen zu können, wurde HNF1 $\beta$  konditional deletiert. Erst mit dieser konditionalen Deletion konnte die Funktion von

HNF1 $\beta$  in der Maus genauer analysiert werden (Gresh et al., 2004; Wang et al., 2004). Für die nierenspezifische Deletion von HNF1 $\beta$  wurde das binäre Cre/loxP-System angewandt. (Dieses binäre System wird in Kapitel 1.5. S. 19 detailliert beschrieben.) Hierfür wurde ein Stamm generiert, in dem das HNF1 $\beta$ -Gen durch Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase, sog. loxP-Sequenzen, flankiert ist, so dass HNF1 $\beta$  durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden kann. Die Cre-Rekombinase befand sich unter der Kontrolle des Ksp-cadherin-Promotors, der im Ductus und den proximalen Tubuli aktiv ist. Der Ksp-Promotor wird durch HNF1 $\beta$  selbst kontrolliert und ist zudem in einem Stadium aktiv, in dem die ersten Entwicklungsschritte der Niere bereits abgeschlossen sind. Daher konnten nur die Ereignisse in der späten Nierenentwicklung untersucht werden. In den Mäusen führt die konditionale Deletion von HNF1 $\beta$  in der Niere zu Zystennieren (Gresh et al., 2004).

### 1.2 Die Nierenentwicklung der höheren Vertebraten

In Vertebraten sind insgesamt drei Nierenformen bekannt, die sich sukzessiv entwickeln: der Pronephros, der Mesonephros und der Metanephros. Alle drei Nierenformen haben die gleiche funktionelle Einheit, das Nephron, gemeinsam. Die Niere dient als exkretorisches Organ, das lösliche Substanzen aus dem Blut herausfiltert und für den Organismus brauchbare Stoffe absorbiert.

Die einfachste Form der Niere in Vertebraten ist der Pronephros, die funktionale Niere larvaler Stadien der Fische und Amphibien. Der Pronephros besteht aus einem einzelnen Nephron, das sich in drei Abschnitte unterteilen lässt (Abb. 2 links). Der Glomus dient als Filtrationseinheit. Durch ihn wird das Blut gepresst und es entsteht der Primärharn, der anschließend ins Zoelom gelangt. In das Zoelom münden drei Nephrostome. Die Nephrostome enthalten Wimperntrichter und befördern den Primärharn durch Cilienbewegungen in die Tubuli, wo die Reabsorption von wichtigen Ionen und Makromolekülen stattfindet. Die restliche Flüssigkeit wird über den Ductus zur Kloake geleitet und ausgeschieden.



**Abb. 2: Die drei Nierenformen in Vertebraten** (modifiziert nach Vize et al., 1997)

In den adulten Tieren wird der Pronephros schließlich durch den Mesonephros ersetzt, der aus 10-50 Nephronen besteht (Abb. 2 Mitte). In höheren Vertebraten, den Säugern und den Vögeln, stellt der Mesonephros die embryonale Form der Niere dar, der Pronephros entwickelt sich lediglich als ein rudimentäres Organ. Die komplexeste Form der Niere ist der Metanephros, der die funktionelle Niere adulter Vögel und Säugetiere darstellt (Abb. 2 rechts). Er enthält etwa eine Million Nephronen.

Für die Entstehung des Pro-, des Meso- und des Metanephros spielen die gleichen Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Deswegen eignet sich der Pronephros aufgrund seiner einfachen Struktur besonders für die Untersuchung molekularer Prozesse in der Nierenentwicklung (Ryffel, 2003; Jones, 2005).

### **1.3 Die Pronephrosentwicklung in *Xenopus laevis***

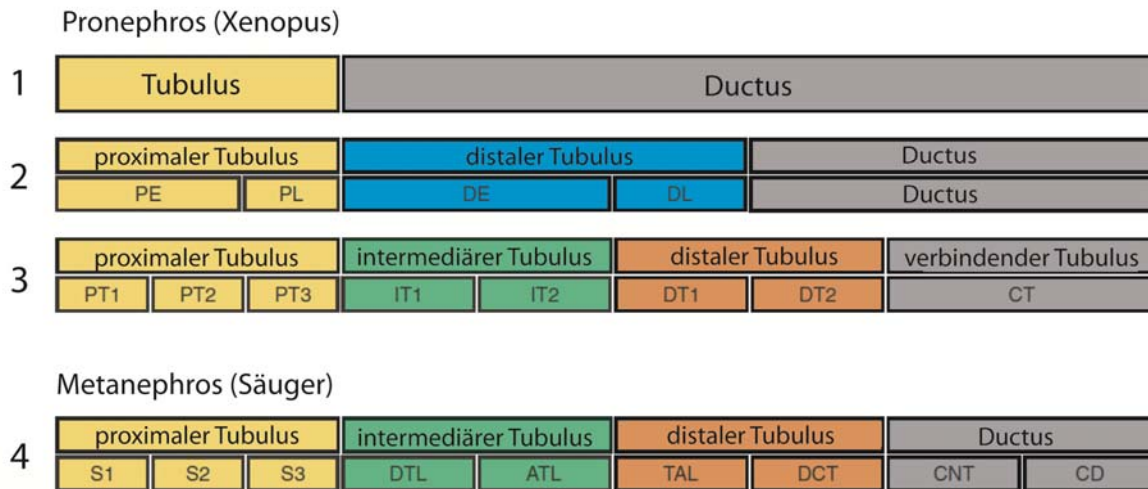
Der Pronephros von *Xenopus laevis* entwickelt sich innerhalb von fünf Tagen aus dem intermediären Mesoderm. Die Spezifizierung der Pronephrosanlage findet bereits im frühen Neurulastadium (Stadium 12/13) statt. In diesem Stadium werden bereits einige pronephrosspezifische Transkriptionsfaktoren, wie *Osr1* und *Osr2* (Tena et al., 2007), sowie u.a. *Lim1*, *Pax8* und *HNF1 $\beta$*  (Ryffel, 2003) exprimiert. Die zelluläre Differenzierung des Pronephros beginnt im späten Neurulastadium (Stadium 20/21) mit einer Verdickung des Mesoderms unter den Somiten 3 bis 5. Im Schwanzknospenstadium (Stadium 25) hat sich ein kompaktes Aggregat gebildet, in dem die Zellen radial angeordnet sind. Dieses Primordium teilt sich in den freischwimmenden Larven (Stadium 30-38) in Tubulus und Ductus auf. Ab dem Stadium 30 entwickelt sich auch der Glomus aus dem viszeralem Mesoderm. Ein Markergen des Glomus ist Wilms Tumorfaktor 1 (*Wt1*), der bereits in der späten Neurula exprimiert wird. Neben den bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren spielen bei der Entwicklung der Tubuli auch Proteine des Notch-Signalweges (*delta-1*, *serrate-1* und *Notch1*) und des Wnt-Signalweges (*Wnt1* und *frizzled3*) eine Rolle (Brändli, 1999). Diese Faktoren werden ebenfalls ab dem späten Neurulastadium exprimiert (Ryffel, 2003). Im Ductus beginnt in diesem Stadium die Expression von *Pax2*, *Id2* und *POU2*. Ab dem Schwanzknospenstadium werden *HNF1 $\alpha$* , *ets-2* und *Iro-3* exprimiert. In freischwimmenden Larven in Stadium 30 werden Natrium-Kalium-ATPasen, der Glukose-Kotransporter *sglt-1l* und der Chlorid-Ionenkanal *clcnk* (*CLC-K*) exprimiert. Diese Moleküle werden für die Reabsorptionsfunktion des Pronephros benötigt. Ebenso sind jetzt zwei Antigene präsent, die von zwei monoklonalen Antikörpern, 3G8 und 4A6 erkannt werden können und für die Markierung der Tubuli und des Ductus in späten Entwicklungsstadien sehr nützlich sind (Vize et al., 1995). In der Glomusanlage beginnt zu diesem Zeitpunkt die Expression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Im Stadium 38 ist der Pronephros schließlich ausdifferenziert.

Ursprünglich wurde angenommen, dass der Pronephros von *Xenopus* einer relativ einfachen Struktur aufweist, bestehend aus zwei Kompartimenten, den Tubuli und dem Ductus (Abb. 3 A1) (Brändli, 1999; Vize et al., 1997). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich der Tubulus in zwei

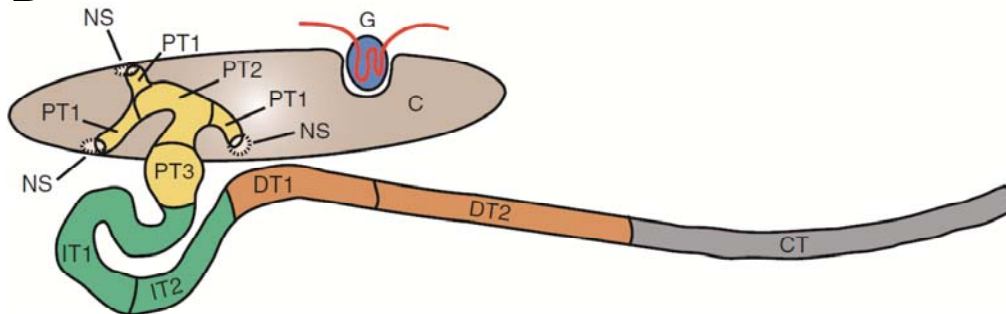
Untersegmente und der Ductus in insgesamt drei Untersegmente einteilen ließ (Abb. 3 A2) (Zhou und Vize, 2004). Kürzlich wurde jedoch beschrieben, dass der *Xenopus*-Pronephros noch weitaus komplexer aufgebaut ist (Raciti et al., 2008). Das Organ besteht nicht nur aus den zwei Hauptstrukturen, dem Tubulus und dem Ductus, sondern kann in vier verschiedene Domänen eingeteilt werden (Abb. 3 A3). Diese Domänen weisen auf molekularer Ebene ähnliche Charakteristika auf, wie die Domänen des Metanephros der Säugtiere (Abb. 3 A4). Diese vier Domänen können anhand der Expression definierter Markergene in *Xenopus* wiederum in acht Segmente mit unterschiedlicher Funktion unterteilt werden. Diese Segmente wurden in einem weitläufig angelegten Screen identifiziert, in dem nach terminalen Differenzierungsmarkern gesucht wurde, die in genau definierten Regionen des Pronephros exprimiert werden. Die Analyse erfolgte für über 240 Gene, die Mitglieder der Familien der slc (**S**olute **C**arrier)-Transportproteine, der Claudine (wichtiger Bestandteil der „Tight Junctions“) und der Aquaporine (Proteine, die beim Membrantransport -insb. von Wasser- eine wichtige Rolle spielen). In dem durchgeführten Screen konnten über hundert Mitglieder der Familie der slc (**S**olute **C**arrier)-Gene identifiziert werden, die eine spezifische Expression in genau definierten Segmenten des *Xenopus* Pronephros aufweisen (Raciti et al., 2008).

Der proximale Tubulus wird hierdurch in drei Untersegmente (PT1-PT3) geteilt. So wird beispielsweise slc7a7 ausschließlich im PT1-, slc25a10 im PT2- und slc1a1 im PT3-Segment des proximalen Tubulus exprimiert. Ein weiteres slc-Gen, slc3a1, wird in allen drei Segmenten des proximalen Tubulus exprimiert. Slc3a1, auch bekannt unter dem Namen rBAT, ist essentiell für den Transport von Cystin, sowie anderer Aminosäuren. Der intermediäre Tubulus setzt sich aus zwei Segmenten, bezeichnet als IT1 und IT2, zusammen. Das proximale IT1-Segment wird definiert durch die Expression des slc20a1-Gens, das distale IT2-Segment durch die Expression des slc5a8-Gens. Auch der distale Tubulus kann in zwei Segmente unterteilt werden. Im proximalen DT1-Segment wird der Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )-Transporter slc4a4 exprimiert, im distalen DT2-Segment der Ammoniak-Transporter slc42a3. Der verbindende Tubulus (CT) verbindet den Pronephros mit der Kloake.

A



B



**Abb. 3: Der *Xenopus* Pronephros** (modifiziert nach Raciti et al. 2008)

A: Vergleich der verschiedenen Modelle des *Xenopus*-Pronephros: (a) ursprüngliche Einteilung; (b): Modell nach Zhou and Vize, 2004; (c): neue Einteilung nach Raciti et al. 2008; (d): Struktur des Metanephros der Säugetiere.

**Xenopus:** G: Glomus ; PE: früher proximaler Tubulus; PL: später proximaler Tubulus; PT: Proximale Tubuli- werden unterteilt in die Segmente PT1-3; IT: Intermediäre Tubuli-werden unterteilt in die Segmente IT1 (proximaler Teil) und IT2 (distaler Teil); DE: früher distaler Tubulus; DL: später distaler Tubulus; DT: Distaler Tubulus- wird unterteilt in die Segmente DT1 und DT2; CT/CNT: Verbindender Tubulus; NS: Nephrostom; C: Zoelom **Säuger:** S1-S3: Segmente des proximalen Tubulus der Säuger; DTL: Absteigender Teil der Henle-Schleife; ATL/TAL: Aufsteigender Teil der Henle-Schleife; DCT: früher distaler Tubulus; CD: Sammelrohr.

B: Schematische Darstellung des *Xenopus*-Pronephros nach der neuen Nomenklatur von Raciti et al. 2008.

In diesem Segment werden *slc8a1* (Natrium-Kalzium-Austauscher) und der Zink-Transporter *slc30a8* exprimiert. Dem verbindenden Tubulus des *Xenopus*-Pronephros entspricht der Ductus der Säuger, der im Gegensatz zum verbindenden Tubulus des Krallenfisches in zwei Untersegmente, das CNT-Segment



(verbindender Tubulus) und das CD-Segment (Sammelrohr), unterteilt ist (Abb. 3 A4). Abb. 3 B zeigt eine schematische Darstellung des *Xenopus*-Pronephros nach der neuen Nomenklatur von Raciti et al. (2008). Ein Marker für den Glomus, die Filtrationseinheit des Pronephros, ist nephrin, auch bekannt als NHPS1. Nephrin kodiert für ein etwa 1200 AS langes Transmembranprotein, das eine wichtige Rolle bei der glomerulären Filtration, d.h. bei der selektiven Absorption von Stoffen aus dem Blut in die Nephronen der Niere spielt (Gerth et al., 2005; Tran et al., 2007).

### 1.4 *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein attraktiver Modellorganismus, der seit vielen Jahren für die Erforschung entwicklungsbiologischer Prozesse verwendet wird. Die Tiere können unter sehr einfachen Bedingungen im Labor gehalten werden und benötigen nur eine minimale Infrastruktur. Die Weibchen können alle drei Monate durch die Injektion von Choriongonadotropin in den dorsalen Lymphsack zur Ablage von ~2000 Eiern stimuliert werden (Sive et al., 2000). Die Eier lassen sich leicht mit einem zuvor isolierten Hoden *in vitro* befruchten. Die Embryonen sind sehr robust und entwickeln sich außerhalb des Muttertieres in einer einfachen Salzlösung oder in Wasser, dadurch sind sie unproblematisch in der Handhabung und einfach zu manipulieren. Aufgrund der Transparenz der Larven können die zahlreichen morphologischen Veränderungen während der Organogenese sehr gut beobachtet werden.

Eine einfache Methode die Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* zu manipulieren, besteht in der Injektion von RNA (Sive et al., 2000). Hierdurch können bestimmte Proteine überexprimiert werden. Die injizierte RNA ist allerdings nicht dauerhaft stabil, so dass nach einigen Tagen kein Protein mehr überexprimiert wird. Die kodierende RNA wird *in vitro* hergestellt und in eine oder mehrere Blastomeren des sich entwickelnden Embryos injiziert. Die Auswahl der Blastomere bestimmt hierbei, in welchen Teilen des Embryos das Protein überexprimiert wird. Umgekehrt kann die Expression von Genen durch die Injektion synthetisch hergestellter Nukleinsäuren, der Morpholino-Oligonukleotide, gehemmt werden. Wie injizierte RNA ist auch das Morpholino-Oligonukleotid nicht dauerhaft stabil, weswegen auch hier

nach einigen Tagen die Expression eines Gens nicht mehr gehemmt wird. Somit können nur die Auswirkungen auf die frühe Embryonalentwicklung untersucht werden. Weiterhin unterscheidet sich die injizierte Menge der jeweiligen Nukleinsäure von Embryo zu Embryo. Zudem ist eine präzise Injektion in einen bestimmten Bereich des Embryos sehr schwierig. Dies resultiert in erheblichen Unterschieden bei den Phänotypen der manipulierten Larven (Bohn et al., 2003). Die stabile Integration von Transgenen in das Genom stellt eine bessere Möglichkeit dar, die Funktion bestimmter Proteine in der Entwicklung genauer zu untersuchen (Kroll und Amaya, 1996; Pan et al., 2006). Durch die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors wird die Expression des Transgens auf bestimmte, genau definierte Gewebe des *Xenopus*-Embryos begrenzt (Beck und Slack, 1999; Ryffel und Lingott, 2000; Göttgens et al., 2002; Schreiber et al., 2009). Eine zeitliche Kontrolle wird durch den Einsatz von induzierbaren Promotoren erreicht. Dies sind z.B. der Hitzeschock-Promotor (Wheeler et al., 2000; Beck et al., 2003; Buchholz et al., 2004) oder der Tetrazyklin-induzierbare Promotor (Das und Brown, 2004; Ridgway et al., 2000). Somit kann die Expression eines Transgens zu einem beliebigen Zeitpunkt induziert werden, so dass auch Ereignisse in der späten Embryonalentwicklung untersucht werden können. Da bei der Transgenese eine unterschiedliche Anzahl von Genkopien an unterschiedlichen chromosomalen Loci integriert wird, resultiert daraus eine gewisse Variabilität in der Expressionsstärke. Dieses Problem kann durch die Etablierung stabiler transgener Stämme umgangen werden, in denen das Transgen an die nächste Generation weitergegeben wird. So können hunderte von F1-Larven, in denen das Transgen in gleichem Maße exprimiert wird, in einem Experiment analysiert werden. Um gleichzeitig eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Genexpression in demselben Tier untersuchen zu können, wurden binäre Systeme etabliert, in denen Aktivator- und Effektorstämme verwendet werden (Chae et al., 2002; Hartley et al., 2002; Ryffel et al., 2003; Waldner et al., 2006; Roose M., 2008).

Es wird zwischen zwei Varianten binärer Systeme unterschieden. Bei der ersten Variante erfolgt die Steuerung eines Gens durch transkriptionelle Aktivierung. Bei der anderen Variante wird die Expression eines Gens durch Rekombination auf DNA-Ebene kontrolliert. Ein Beispiel für die transkriptionelle Aktivierung von Genen stellt das GAL4/UAS-System dar (Hartley et al., 2002; Chae et al., 2002). Bei diesem

System wird ein Aktivator-Stamm (Treiberlinie) verwendet, der als Transgen ein GAL4-Konstrukt enthält. GAL4 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Hefe. Durch Kreuzung des Aktivator-Stammes mit einem Effektorstamm (Responderlinie), der als Transgen ein spezifisches GOI (**Gene Of Interest**) trägt, das von UAS (**Upstream Activating Sequences**)-Sequenzen flankiert ist, die als Zielsequenzen für den GAL4-Transkriptionsfaktor dienen, wird das GOI überexprimiert (Brand und Perrimon, 1993). Das GAL4/UAS-System wurde bereits in *Xenopus* angewendet (Chae et al., 2002; Hartley et al., 2002). Eine räumliche Kontrolle der Expression des GOI kann durch die Fusion des GAL4-Treibers mit einem gewebespezifischen Promotor erreicht werden (Hartley et al., 2002). Die Aktivierung des GOI kann induzierbar gemacht werden, indem die GAL4-DNA-Bindedomäne mit der modifizierten Ligandenbindungsdomäne des Progesteronrezeptors und der Aktivierungsdomäne des Herpes-Simplex-Virus VP16 fusioniert wird (Wang et al., 1997). Aufgrund der veränderten Ligandenbindungsdomäne kann das endogene Progesteron-Hormon nicht mehr an den Rezeptor binden. Das hieraus resultierende chimäre Konstrukt bindet an die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 und wird so im Zytoplasma zurückgehalten. Durch Zugabe der synthetischen Steroide RU486 oder ZK98.734 wird diese Bindung gelöst und das Konstrukt gelangt in den Zellkern und kann so das von den UAS-Sequenzen flankierte GOI aktivieren. Erfolgt keine Zugabe des entsprechenden Steroids mehr, binden die Hitzeschockproteine erneut an das chimäre Konstrukt, das hierdurch wieder dauerhaft im Zytoplasma lokalisiert wird (Lewandoski, 2001).

Die konditionale Steuerung der Expression eines GOIs durch Rekombination auf DNA-Ebene wird im nächsten Kapitel detailliert erläutert.

### **1.5 Konditionale Kontrolle von Genen in *Xenopus laevis* mit dem binären Cre/loxP-System**

Neben der transkriptionellen Aktivierung können Gene auch durch eine sequenzspezifische DNA-Rekombination aktiviert werden. Die Rekombination ist im Gegensatz zur transkriptionellen Aktivierung irreversibel. Zwei Mitglieder der Familie

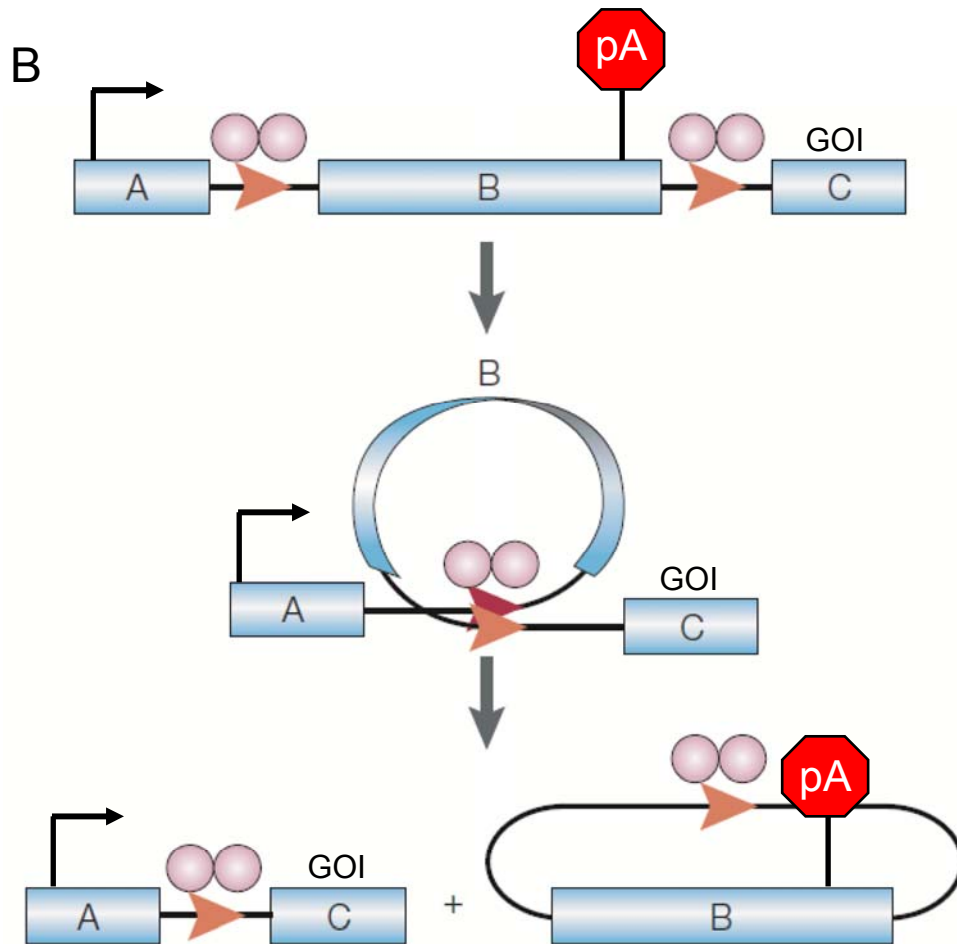
der sequenzspezifischen Rekombinasen, die Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 und die Flp-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae*, werden in diesem System angewendet (O'Gorman et al., 1991). Sowohl die Cre-, als auch die Flp-Rekombinase katalysieren die DNA-Rekombination zwischen spezifischen 34 bp langen Erkennungssequenzen, den loxP-Sequenzen (Cre-Rekombinase) und den FRT-Sequenzen (Flp-Rekombinase) (Kilby et al., 1993; Stark et al., 1992). Die Erkennungssequenzen setzen sich jeweils aus zwei 13 bp langen palindromischen Sequenzen zusammen, die eine 8 bp lange Kernsequenz flankieren und invers zueinander orientiert sind. Die Kernsequenzen und die palindromischen Sequenzen der loxP- und FRT-Erkennungssequenzen sind unterschiedlich (Abb. 4 A). DNA-Fragmente, die sich zwischen zwei Erkennungssequenzen befinden, können durch die Rekombinasen herausgeschnitten werden.

Der Mechanismus der Cre-, bzw. Flp-Rekombinase vermittelten Rekombination ist in Abb. 4 B schematisch dargestellt. Cre- oder Flp-Dimere binden an ihre jeweiligen Erkennungssequenzen, was zu der Bildung eines synaptischen Komplexes führt. Innerhalb dieses Komplexes wird die DNA geschnitten und religiert. Dabei wird die Sequenz B entfernt und Sequenz A und C nebeneinander ligiert. Im Anschluss werden die einzelnen Komponenten getrennt. Bei der durch Rekombinasen vermittelten Aktivierung von Transgenen enthält der Effektorstamm ein Konstrukt, in dem die Expression des GOI durch ein Stoppsignal verhindert wird. Dieses Stoppsignal ist zwischen dem Promotor und dem GOI lokalisiert und wird durch die rekombinasespezifischen Erkennungssequenzen flankiert. Zieht man die Abb. 4 zum Vergleich hinzu, so stünde die Sequenz A für den Promotor, die Sequenz B für das Stoppsignal und die Sequenz C für das induzierbare GOI. Wird solch ein Effektorstamm mit einem Aktivatorstamm, der als Transgen eine Rekombinase (Cre oder Flp) enthält, gekreuzt, so wird das Stoppsignal durch die aktivierte Rekombinase herausgeschnitten, das GOI somit unter die direkte Kontrolle des Promotors gestellt und exprimiert. Durch die Verwendung bestimmter Promotoren kann in *Xenopus laevis* eine ubiquitäre oder gewebespezifische Expression erreicht werden (Ryffel et al., 2003; Waldner et al., 2006; Roose M., 2008). Ein Nachteil bei der Verwendung der Cre-Rekombinase ist ihre Zytotoxizität, die vor allem bei hohen Konzentrationen auftritt. Dies führt bei Mäusen zu Schädigungen des Gehirns und Sterilität (Pfeifer et al., 2001; Schmidt et al., 2000).

A

*loxP*  
 ATAACTTCGTATAAATGTATGCTATACGAAGTTAT

*FRT*  
 CTTCAAGGATAAGAGATCTTTGTATAGGAACTTC



#### Abb.4: Durch Rekombinasen kontrollierte Genexpression

A: 34 bp lange loxP-, bzw. FRT-Sequenz. Die Kernsequenz (rot) wird flankiert durch zwei 13 bp lange invers zueinander orientierte, palindromische Sequenzen (schwarz). Die Kernsequenz ermöglicht eine Orientierung der Sequenz, die durch einen Pfeil oberhalb der Sequenz gekennzeichnet ist.

B: Dimere der Cre-oder Flp-Rekombinase (pink) katalysieren die konservative DNA-Umlagerung zwischen zwei loxP-, bzw. FRT-Sequenzen (rote Pfeile), was in der Bildung einer synaptischen Struktur resultiert, Region B wird herausgeschnitten und die Regionen A und C liegen nebeneinander. Wäre Region B ein bestimmtes Gen, so würde dieses durch die Rekombination inaktiviert. Wäre Region A ein Promotor und Region C ein GOI, so würde dieses nach der Rekombination aktiviert (modifiziert nach Lewandoski, 2001). pA: Polyadenylierungssignal. GOI: Gene Of Interest.

Für beide Rekombinasen wurde nachgewiesen, dass diese eine geringe Aktivität an sog. pseudo-loxP/FRT-Sequenzen aufweisen. In der Maus konnte die Existenz von pseudo-loxP-Sequenzen nachgewiesen werden (Thyagarajan et al., 2000). Pseudo-loxP- oder auch kryptische loxP-Sequenzen, stellen funktionale Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase dar, deren Sequenz sich von der der nativen loxP-Sequenzen unterscheidet. Die Cre-vermittelte Rekombination von pseudo-loxP-Sequenzen kann zu DNA-Schädigungen führen (Semprini et al., 2007). Aus diesem Grund ist es notwendig, die Cre-Aktivität soweit wie möglich auf einen bestimmten Zeitraum, bzw. auf ein bestimmtes Gewebe zu begrenzen. Zudem sollte die Konzentration der Cre-Rekombinase in der Zelle so niedrig wie möglich gehalten werden. Dies ist möglich durch den Einsatz induzierbarer Systeme. In der Maus werden ligandeninduzierte Rekombinasen verwendet. Die Rekombinase wird hier an die modifizierte Ligandenbindungsdomäne des Progesteron- oder Östrogenrezeptors fusioniert, wodurch sie nach der Expression im Zytoplasma festgehalten wird. Durch Zugabe eines synthetischen Steroids gelangt die Rekombinase in den Zellkern und vermittelt die Rekombination (Danielian et al., 1998). In *Xenopus laevis* wurde ein induzierbares Rekombinase-System unter Verwendung des *Xenopus* HSP70 (**H**eat-**S**hock-**P**rotein)-Promotors etabliert (Roose M., 2008). Dieser ist ubiquitär aktiv und kann durch eine einfache Erhöhung der Wassertemperatur auf 34° C aktiviert werden. Für *Drosophila* (Halfon et al., 1997), den Schmetterling (Ramos et al., 2006) und den Zebrafisch (Halloran et al., 2000) wurde zudem beschrieben, dass der HSP70-Promotor durch einen Laser zellspezifisch aktiviert werden kann. Im Zebrafisch kann die räumlich begrenzte Genaktivierung auch durch einen lokalen Hitzeschock mit Hilfe eines modifizierten LötKolbens erreicht werden (Hardy et al., 2007).

### 1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Funktion des Transkriptionsfaktors HNF1 $\beta$  während der Nierenentwicklung von *Xenopus laevis* näher charakterisiert werden. Hierzu wird das binäre Cre/loxP-System mit Aktivator- und Effektorstämmen verwendet, mit dem HNF1 $\beta$  durch einen Hitzeschock konditional überexprimiert werden kann.

Im ersten Teil der Arbeit soll das Potential der beiden Aktivatorstämme HSPCre1 und HSPCre13 getestet werden. Zu diesem Zweck soll die Expression der Cre-Rekombinase durch einen Hitzeschock aktiviert und die Kinetik der induzierbaren Cre-Transkripte und die eines induzierbaren Reportergens näher charakterisiert werden.

In zweiten Teil der Arbeit soll die Funktion von HNF1 $\beta$  während Nierenentwicklung von *Xenopus laevis* untersucht werden. Hierfür wird HNF1 $\beta$  mit dem binären Cre/loxP-System zu einem definierten Zeitpunkt in der Entwicklung konditional überexprimiert. Mittels nierenspezifischer Differenzierungsmarker kann der Effekt der Überexpression von HNF1 $\beta$  auf einzelne Segmente der embryonalen Niere untersucht werden, um einen Einblick in den molekularen Mechanismus zu erhalten, bei dem HNF1 $\beta$  eine Rolle spielt.

Im dritten Teil der Arbeit sollen neue Effektorstämme generiert werden, mit denen HNF1 $\beta$  pronephrosspezifisch überexprimiert werden kann. Hierzu sollen zunächst transgene potentielle Gründertiere hergestellt und nach Erreichen der Geschlechtsreife auf die Weitergabe des jeweiligen Effektortransgens getestet werden.

Im vierten Teil der Arbeit soll in *Xenopus laevis* eine neue Methode getestet werden, bei der die gewebespezifische Aktivierung von Genen mit einem lokalen Hitzeschock durch Laserstrahlen erfolgt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme**

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Lösungen und Puffer, deren Zusammensetzung nicht anders vermerkt ist, wurden nach Protokollen der Methodensammlung von (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme für DNA stammten von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg) und Roche (Mannheim).

### **2.2 Molekularbiologische Standardmethoden**

Molekularbiologische Techniken wie Anzucht von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Modifikation von DNA und Gelelektrophoresen wurden nach Sambrook et al (1989) durchgeführt. Die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen.

### **2.3 Plasmide**

#### **2.3.1 Konstruktion des (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ -Fragmentes für die Herstellung transgener Xenopoden**

Das Ursprungsplasmid Xen HNF1 $\alpha$ -6-207 GFP (Ryffel und Lingott, 2000) wurde mit den Restriktionsenzymen SmaI, NotI und PinAI (=AgeI) einem sequentiellen Verdau unterzogen. Im ersten Schritt erfolgte ein Doppelverdau mit SmaI und PinAI. Nach 1,5 stündiger Inkubation bei 37° C wurde Not I mit einem entsprechenden Restriktionspuffer zum Ansatz hinzugegeben und dieser weitere 1,5 h bei 37° C inkubiert. Aus diesem Verdau resultierten nach gelelektrophoretischer Auftrennung insgesamt drei DNA-Fragmente, von denen eines dem Promotor-Fragment (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$  entsprach. Das Fragment wurde aus dem Gel eluiert und aufgereinigt und mit der REMI-Methode in unbefruchtete *Xenopus*-Eier injiziert.



### 2.3.2 Konstruktion der pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ -Plasmide für die Herstellung transgener Xenopoden

#### pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt

Die Klonierung des pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Plasmids erfolgte in drei Schritten. Im ersten Schritt wurde aus dem Ursprungsplasmid pLCMVECFPmt-HNF1 $\beta$  ein KpnI/HindIII-Fragment mit dem HNF1 $\beta$ -Gen ausgeschnitten und dieses Fragment anschließend über die entsprechenden KpnI/HindIII-Schnittstellen in einen pBlu2KSP-Vektor kloniert. Das hieraus resultierende Plasmid wird im weiteren Verlauf als pBS-(del)HNF1 $\beta$ wt bezeichnet. Im zweiten Schritt der Klonierung sollte nun das HNF1 $\beta$ -Gen mit einem (-3932-207 bp)-Fragment des HNF1 $\alpha$ -Promotors aus *Xenopus laevis* fusioniert werden. Zu diesem Zweck wurde aus dem Ursprungsplasmid Xen HNF1 $\alpha$ -6-207 GFP (Ryffel und Lingott, 2000), das den „Full length“-HNF1 $\alpha$ -Promotor enthielt, mit den Restriktionsenzymen HindIII- und AgeI ein auf -3932-207 bp verkürztes Fragment des HNF1 $\alpha$ -Promotors herausgeschnitten. Das so erhaltene Fragment wurde in hiernach ebenso über diese Schnittstellen in das bBS-(del)HNF1 $\beta$ -Plasmid kloniert. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pBS-HNF1 $\alpha$ -3932-207-(del)HNF1 $\beta$ wt. Im dritten und letzten Schritt der Klonierung sollte nun das von loxP- und FRT- Sequenzen flankierte Fluoreszenz-Markergen ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) in das pBS-HNF1 $\alpha$ -3932-207-(del)HNF1 $\beta$ wt-Plasmid eingefügt werden. Ein das ECFP-Gen enthaltendes Fragment inklusive der loxP- und FRT-Sequenzen wurde mit dem HindIII-Restriktionsenzym aus dem bereits in Schritt 1 erwähnten Plasmid pLCMVECFPmt-HNF1 $\beta$  herausgeschnitten und über die entsprechenden HindIII-Schnittstellen in das pBS-HNF1 $\alpha$ -3932-207-(del)HNF1 $\beta$ wt-Plasmid eingefügt. Hieraus resultierte das zu herzustellende pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Plasmid. Zur Herstellung transgener Xenopoden mit der I-SceI-Meganuclease-Methode war im Anschluss die Umklonierung des HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Fragmentes in einen Vektor erforderlich, der Erkennungssequenzen für die I-SceI-Meganuclease enthielt. Hierzu wurde ein modifizierter p-Bluescript-Vektor (I-SceI-pBlueScript IISK+; (Thermes et al., 2002) verwendet, der diese Sequenzen enthielt (Pan et al., 2006). Das HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Fragmente wurde mit NotI ausgeschnitten und anschließend wieder über NotI in den modifizierten Vektor eingefügt. Für die

Transgenese wurde das HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Scel-Plasmid mit der I-Scel-Meganuclease inkubiert und der gesamte Ansatz in befruchtete *Xenopus*-Eier im Einzellstadium injiziert.

### pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ mut

Dieses Konstrukt beinhaltet das mutante HNF1 $\beta$ -Derivat A263insGG. Die Klonierungsstrategie ist dieselbe wie die des pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Plasmids.

### pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ del

Dieses Konstrukt beinhaltet das mutante HNF1 $\beta$ -Derivat P328L329del. Die Klonierungsstrategie ist dieselbe wie die des pBS-HNF1 $\alpha$ (-4-207)-(loxP)(FRT)mt-HNF1 $\beta$ wt-Plasmids.

## 2.4 Herstellung transgener *Xenopus laevis*

### 2.4.1 Haltung, *in vitro*-Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Die südafrikanischen Krallenfrösche der Art *Xenopus laevis* wurden von der Firma Xenopus Express (Frankreich) bezogen und im zentralen Tierlabor des Essener Uniklinikums unter Standardbedingungen gehalten. Adulte Weibchen wurden durch Injektion von 200-500 Einheiten humanen Chorion-Gonadotropins (hCG) zur Eiablage gebracht. Durch gezielte Massage des Rückens und des Bauches konnte nach ca. 10-12 Stunden eine spontane Eiablage induziert werden. 200-500 Eier wurden in einer Petrischale platziert und so verteilt, dass sie als Monolayer vorlagen. Für die *in vitro* Befruchtung wurde den männlichen Tieren unter Betäubung mit 0,5% MS 222 der Hoden entnommen. Ohne den Hoden zu quetschen wurde ein Stück abgeschnitten. Die Qualität der Spermien konnte nach deren Aktivierung durch Wasserzugabe mikroskopisch anhand ihrer Beweglichkeit bestimmt werden. Mit der Schnittfläche wurde der Hoden über die Eier gerieben. Der präparierte Hoden konnte in Holfreter-Lösung bei 4° C für eine Woche gelagert werden. 5 min nach der Befruchtung wurden die Eier mit Wasser überschichtet. Durch die nach 20 min einsetzende Kortikalreaktion, bei der sich der pigmentierte animale Pol nach oben

dreht, war eine erfolgreiche Befruchtung erkennbar. Anschließend wurde die Gallerthülle durch eine 2-5 minütige Inkubation in 2% Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH8 entfernt und danach mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Kultivierung der Embryonen fand in 0,1x MMR oder abgestandenem Wasser bei 14-23° C statt. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

Holfreter-Lösung:

60 mM NaCl; 0,6 mM KCl; 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2 mM NaHCO<sub>3</sub>

1x MMR:

0,1 M NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM HEPES; 0,1 mM EDTA  
pH(7,8)

### 2.4.2 REMI-Methode

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* mit der REMI-Methode wurde zunächst die Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und die Transgen-DNA vom bakteriellen Teil durch Gelelektrophorese getrennt. Die Transgen-DNA wurde mit dem „QIAquick Gel Extraktions Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und in Wasser eluiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die DNA auf eine Konzentration von 100 ng/μl verdünnt und bei -20° C aufbewahrt.

Die Spermienkerne wurden nach der Methode von Kroll und Amaya (1996) präpariert. Allerdings wurde für die Permeabilisierung der Spermien Digitonin anstelle von Lysolecithin verwendet (Huang et al., 1999). Die Spermienkerne wurden in 200 μl Glycerinpuffer resuspendiert, gezählt und auf 100 Kerne/μl verdünnt. Anschließend wurden die Kerne entweder direkt zur Herstellung transgener Tiere verwendet oder aliquotiert und bei -80° C aufbewahrt.

Adulte *Xenopus laevis* Weibchen wurden, wie in 2.4.1 beschrieben, zur Eiablage gebracht. Die Gallerthülle wurde durch eine 2-5 minütige Inkubation in 2% Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH8 entfernt und die Eier danach mehrmals mit Wasser gewaschen. Bis zur Injektion wurden die unbefruchteten Eier in 1x MMR bei 14° C aufbewahrt. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt.

Für die Injektion wurden 4 µl Spermienkernsuspension mit 2,5 µl linearisierter DNA bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 22,5 µl SDB-Puffer wurde die Suspension vorsichtig mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze gemischt. 5 µl des Spermienkern-DNA-Gemisches wurden mit weiteren 150 µl SDB-Puffer verdünnt und mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 10nl/sec in die unbefruchteten *Xenopus*-Eier injiziert. Die Injektionsnadel mit einer Spitze von 0,05 mm Durchmesser wurde aus 100µl-Kapillaren (BLAZBRAND intraMARK; BRANDWertheim/Main) gezogen. Um ein Auslaufen der Eier zu verhindern, wurde die Injektion in 0,4x MMR mit 6% Ficoll durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 10 nl/Ei. Nach der Injektion wurden die Eier bis zum Stadium 9 bei 14° C gehalten. Eier, die sich normal geteilt hatten, wurden anschließend in 0,1x MMR überführt und die Temperatur schrittweise bis auf Raumtemperatur erhöht.

Transgene Larven wurden ab Stadium 40 in Plastikcontainern gehalten und dreimal täglich mit Sera micron (Sera, Heinsberg) gefüttert. Die Larven entwickelten sich in etwa 2 Monaten zu Jungfröschen. Diese wurden in ein Aquarium umgesetzt, mit Tubifex (Futterhaus, Essen) und Regenwürmern (Superwurm e.K.) gefüttert und innerhalb von 10-12 Monaten zu geschlechtsreifen Fröschen aufgezogen.

Glycerinpuffer:

250 mM Sucrose; 15 mM HEPES (pH 7,7); 1 mM EDTA; 0,5 mM Spermidin; 0,2 mM Spermin; 1 mM Dithiothreitol; 0,3 mM BSA; 30 % Glycerin

SDB:

250 mM Sucrose; 75 mM KCl; 0,5 mM Spermidin; 0,2 mM Spermin; pH 7,5

### 2.4.3 I-Scel-Methode

Zur Herstellung transgener *Xenopus laevis* mit der I-Scel-Methode (Pan et al., 2006) wurde, falls nicht anders angegeben, ein Restriktionsansatz aus 320 ng Plasmid-DNA und 8 U I-Scel-Meganuclease (New England Biolabs) in 1x I-Scel-Puffer in 20 µl Gesamtvolumen angesetzt und 40 min bei 37° C inkubiert. Adulte Weibchen wurden wie in 2.4.1 beschrieben zur Eiablage gebracht, den Männchen der Hoden

entnommen, die Eier befruchtet und enthüllt. Bis zur Injektion wurden die Eier in 0,1x MMR mit 2% Ficoll bei 12,5° C gehalten.

Die Injektion des Restriktionsansatzes aus Plasmid-DNA und I-SceI-Meganuclease erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde nach der Befruchtung in noch nicht geteilte Eier mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 10nl/sec. Die Injektionsnadel mit einer Spitze von 0,02 mm Durchmesser wurde aus 100 µl-Kapillaren (BLAZEBRAND intraMARK; BRANDWertheim/Main) gezogen. Das Injektionsvolumen betrug 10 nl/Ei. Nach der Injektion wurden die Eier bis zum Achtzell-Stadium bei 12,5° C gehalten. Eier, deren Furchung regulär erfolgte, wurden anschließend in 1x MMR überführt und die Temperatur schrittweise bis auf Raumtemperatur erhöht. Mit den transgenen Larven wurde wie in 2.4.2 beschrieben verfahren.

### 2.4.4 Verwendete transgene *Xenopus laevis* Stämme

**Tabelle 1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Aktivator-und Effektorstämme**  
Alle verwendeten transgenen Stämme wurden in der AG Ryffel (IFZ) hergestellt.

Bezeichnung	Transgen	Verwendungszweck
HSPCre1	HSP70:Cre (Roose et al., 2009)	Aktivatorstamm
HSPCre13	HSP70:Cre-tdTomato (Roose et al., 2009)	„
del-4	CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1β-P328L329del	Effektorstamm
del-3	„	„
A263ins-6	CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1β-A263insGG	„
wt2	CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1β-wt	„
C5	CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP (Ryffel 2003)	Reporterstamm
G/R	CAG:EGFP(loxP)DsRed2 (Waldner et al., 2006)	Reporterstamm

## 2.5 PCR-Analyse genomischer DNA

Die Präparation der genomischen DNA erfolgte aus ganzen Embryonen oder aus der Schwanzspitze mit dem „Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die Proben wurden mit Proteinase K lysiert, die Lysate mit RNase A inkubiert und anschließend auf Zentrifugationssäulchen aufgetragen. Die Bindung der DNA an die Silicagel-Partikel der Säule erfolgte durch Zentrifugation.

Anschließend wurde die DNA gewaschen, in 50-100 µl AE-Puffer eluiert und bei -20° C gelagert. Für die PCR-Analyse wurden 5-10 µl des Eluates als Template eingesetzt. In Tabelle 2 ist das für die PCR verwendete Programm schematisch dargestellt. Die Elongationsdauer und die Temperatur der Primerhybridisierung variierten je nach verwendetem Primerpaar. Diese Werte, sowie die Namen der Primer und deren Sequenzen, sind in Tabelle 3 angegeben.

**Tabelle 2: Allgemeines Schema des verwendeten PCR-Programms für die Amplifikation genomischer DNA**

	Dauer	Temperatur [° C]	Zahl der Zyklen
Denaturierung	15 min	95	1
Denaturierung	30 s	95	35
Primerhybridisierung	45 s	Y	
1. Elongation	X	72	
2. Elongation	7 min	72	1
Kühlung	∞	4	

**Tabelle 3: PCR-Analyse genomischer DNA**

**X: Dauer der 1. Elongation; Y: Temperatur für die Primerhybridisierung**

PCR			Primer		Verwendung
Name	Bedingungen		Name	Sequenz	
	X	Y			
CFP	2 min	57° C	CFP GEN FWD1	5'-CCTGAAGTTCATCTGCACCA-3'	Überprüfung der Präsenz des ECFP- Markergens
			CFP GEN RV1	5'-GGTCTTGTAGTTGCCGTCGT-3'	
Cre	2 min	54° C	Cre vor	5'- CGCTCCGGACCGATATGTCCAAT TTACTGA-3'	Überprüfung der Präsenz der Cre- Rekombinase
			Cre rev	5'- CGCGAATTCTCACTATAGTTCTAG AGAACC-3'	

### 2.6 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

#### 2.6.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus *Xenopus*-Embryonen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus einzelnen Embryonen erfolgte mit dem „peqGOLD Total RNA Kit“ (PeqLab) entsprechend den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden die Embryonen zunächst in im Kit enthaltenen Lysispuffer mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators (PeqLab) lysiert und die Lysate auf Zentrifugationssäulen gegeben. Die Bindung der RNA an die Silikamembran der Säulen erfolgte durch Zentrifugation. Anschließend wurden mehrere Waschschriffe, sowie ein DNase-Verdau zur Entfernung genomischer DNA auf der Säule durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde in 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Proben wurden bei -80° C gelagert und dienten in einer 3 ng/µl Verdünnung als RT (Reverse Transkriptase)-negativ-Kontrollen in der im Anschluss durchgeführten qRT-PCR. Wurde die RNA nicht sofort aus den Embryonen isoliert, so wurden diese einzeln in Eppendorfgefäße überführt und zum Schutz und zur Stabilisierung der RNA mit RNAlater (Ambion) überschichtet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C gelagert.

#### 2.6.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die für die cDNA-Synthese verwendete Menge der RNA-Matrize betrug ≤ 200 µg pro 20µl Syntheseansatz. Die Syntheseansätze wurden zunächst für 10 min bei 25° C (Heizblock), dann für 2 h bei 37° C (Brutschrank) inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 5 minütige Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 85° C (Heizblock). Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20° C. Die so synthetisierten cDNA-Proben dienten in einer 3ng/µl Verdünnung als Matrize für die qRT-PCR.

#### 2.6.3 qRT-PCR

Die Quantifizierung von spezifischen mRNAs erfolgte durch eine Reverse Transkription (RT) mit nachgeschalteter quantitativer Real-time-PCR (Echtzeit-PCR). Bei der Real-time-PCR, oder auch qRT-PCR, erfolgt eine Fluoreszenzmessung der cDNA-Menge während oder nach jedem Zyklus der PCR. So wird eine quantitative

Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge ermöglicht. Als Parameter für die Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge wird in der exponentiellen Phase der PCR der CT-Wert (threshold cycle) berechnet, der die Zykluszahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

Für die qRT-PCR wurden zunächst die entsprechenden Proben (cDNA-Matrize und jeweils die entsprechende RT-negativ-Kontrolle zur Detektion evtl. noch vorhandener Kontaminationen mit genomischer DNA) auf eine Konzentration von 3 ng/µl verdünnt und zusammen mit einem Mastermix aus den entsprechenden Primern, POWR-SYBR-Green (Applied Biosystems) und RNase-freiem H<sub>2</sub>O in eine 96-Well-Platte pipettiert. Der zur DNA-Quantifizierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen interkaliert während der Primer-Verlängerungsreaktion in die neu gebildete doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung durch eine Halogenlampe. Die emittierte Fluoreszenz ist linear zur Konzentration der gebildeten DNA-Moleküle. Die verwendeten genspezifischen Primer wurden mit dem Programm *Primer3* (<http://primer3.sourceforge.net/>) gemäß den Vorgaben berechnet. Eine Überprüfung auf unspezifische Produkte (z. B. Primer-Dimere) erfolgte nach abgeschlossener PCR mittels einer Schmelzpunktanalyse im Thermocycler. Dies ermöglichte die Differenzierung zwischen kurzen, bei niedriger Temperatur schmelzenden Primer-Dimeren und den längeren spezifischen PCR-Produkten. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgte die qRT-PCR zur Detektion der entsprechenden Transkripte mit dem „7900HT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems). Als Referenzgen diente das für die *Xenopus* Ornithin Decarboxylase kodierende Haushaltsgen ODC. Die für die qRT-PCR verwendeten Primer und deren Sequenzen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

<u>Standardansatz qRT-PCR:</u>	2 µl cDNA-Matrize/RT-negativ-Kontrolle (3 ng/µl)
	2 µl Primer 1 (3 µM)
	2 µl Primer 2 (3 µM)
	10 µl POWR-SYBR-Green
	<u>4 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O</u>
Gesamtvolumen:	20 µl



**Tabelle 4: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten Primerpaare und deren Sequenzen, sowie des entsprechenden Amplifikates**

Name des Primers	Sequenz des Primers	Amplifikat
RT HSP70 fwd	5'-TCCAGAGAAGTGCACACA-3'	endogenes HSP70
RT HSP70 rv	5'-TTCTGCTGGAAGGCA-3'	
RT Cre fwd	5'-CCTGGGGGTAAGTAACTGGT-3'	Cre-Rekombinase
RT Cre rv	5'-TCATCAGCTACACCAGAGACG-3'	
HNF1 $\beta$ _RNA_FOR	5'-GGGACGTCGGACGAAGCTT-3'	exogenes HNF1 $\beta$
HNF1 $\beta$ _RNA_REV	5'-GCTTTTCGTCCATTAGCTTTA-3'	
RT YFP fwd	5'-GGGACGTCGGAGCAAGCTT-3'	exogenes EYFP-Markergen
RT YFP rv2	5'-ATGGTGGCGATGGATCTCCTA-3'	
ODC5	5'-TGGGCTGGATCGTATCGT-3'	ODC-Referenzgen
ODC6	5'-CATTGAATGTGAGGCTGCA-3'	

#### 2.6.4 Berechnung der Genexpression

Von jeder Doppelbestimmung wurde der Mittelwert gebildet und die Differenz der Mittelwerte von GOI- und Referenzgen errechnet ( $\Delta CT$ ). Die erhaltenen  $\Delta CT$ -Werte wurden mit der Basis 2 potenziert ( $2^{-\Delta CT}$ ) und hierdurch die x-fache Induktion (fold induction) des GOI im Vergleich zum Referenzgen errechnet. Die Induktion des Referenzgens wurde = 1 gesetzt und durch die Induktion des GOI dividiert ( $1/\text{Induktion GOI}$ ). Der hieraus resultierende Wert entspricht der relativen Transkriptmenge des GOI im Vergleich zu derjenigen des Referenzgens (angegeben als „relative Menge GOI/Referenzgen“, z.B. „relative Menge HNF1 $\beta$ /ODC“).

#### 2.7 Induktion der Rekombinase-Expression durch Hitzeschock

Der Hitzeschock wurde in einem 2-Liter-Becherglas mit abgestandenem Wasser, das im Wasserbad auf die gewünschte Temperatur von 34° C erwärmt worden war, durchgeführt. Die Embryonen wurden mit Hilfe eines Netzes für die gewünschte Zeit im erwärmten Wasser platziert und im Anschluss in 22° C warmes Wasser überführt. Der Dauer des Hitzeschocks der Embryonen betrug je nach Experiment zwischen 5 min und 2 Stunden.

### 2.8 Induktion der Rekombinase-Expression durch Laserbestrahlung

Die Laserbestrahlung der Embryonen erfolgte mit einem Diodenlaser (Typ:“ 810 nm Oculight SL 2,0 Watt“; Firma: Dieter Mann GmbH, Mainaschaff). Die Embryonen wurden bis zur Laserbestrahlung bei 16° C in Petrischalen kultiviert und anschließend für die Bestrahlung mit Hilfe einer Plastik-Pasteurpipette einzeln auf einen Objektträger transferiert. Mit dem im Laserequipment enthaltenen Applikator wurde nun der Laserstrahl (Infrarot; 810 nm) manuell auf das zu bestrahlende Gewebe ausgerichtet und der Laserimpuls per Fußschalter aktiviert. Nach der Bestrahlung erfolgte die weitere Kultivierung der Embryonen bei 20° C in einer Petrischale mit abgestandenem Wasser. Die Analyse der Embryonen fand an einem Stereo-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Köln) statt.

### 2.9 Immunfluoreszenz der Pronephri in *Xenopus laevis* Larven

Zunächst erfolgte die Fixierung der Larven in Stadium 46 in MEMFA, anschließend die Dehydrierung in Methanol. Die so fixierten Larven konnten in Methanol bei -20° C gelagert werden. Für die Immunfluoreszenz wurden die fixierten Larven zunächst in PBS rehydriert. Der sich anschließende einstündige Blockingschritt in PBT/10% Ziegenserum bei RT sollte die Bindung der jeweiligen Antikörper an unspezifische Bindestellen verhindern. Nach dem Blockingschritt erfolgte die Inkubation der Larven in einem Gemisch der beiden Erstantikörper 3G8 (1:40 in PBT/10% Ziegenserum) und 4A6 (1:4 in PBT/10% Ziegenserum) bei 4° C über Nacht. Der 3G8-Antikörper ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der gegen die terminalen Differenzierungsmarker der proximalen Tubuli und Nephrostome gerichtet ist (Vize et al., 1995). 4A6 ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen die terminalen Differenzierungsmarker des Ductus gerichtet ist (Vize et al., 1995). Nach 5 Waschschritten (je 1,5 Stunden) in PBT erfolgte die Inkubation der Larven mit einem Cy3-gekoppelten Ratte-Anti-Maus-Zweitantikörper (Codennr. 415-166-166, Jackson ImmunoResearch) bei 4° C über Nacht im Dunkeln. Hiernach wurde erneut mit PBT

bei RT gewaschen. Die Auswertung erfolgte an einem Stereo-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Köln).

MEMFA:

0, 1 M MOPS; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 3,7% Formaldehyd; pH 7

PBS:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBT:

1x PBS; 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin, Fraktion 5); 0,1% Triton X-100

Erstantikörper:

Die Antikörper 3G8 und 4A6 wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. A. Oliver-Jones (Warwick-University, Coventry, England).

### **2.10 Whole mount *in situ*-Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen**

Die Whole mount *in situ*-Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll der Cold Spring Harbour Laboratories durchgeführt (Sive et al., 2000). Zur Synthese der Digoxigenin markierten RNA-Proben wurde das DIG-RNA-Labeling-Kit (Roche, Mannheim) verwendet. Die als Matrize dienenden Plasmide wurden entsprechend der Tabelle 5 mit Restriktionsenzymen linearisiert und mit verschiedenen RNA-Polymerasen als Sense-, bzw. Antisense-Probe transkribiert.

Für die Farbreaktion, mit der die Anwesenheit der gesuchten Transkripte sichtbar gemacht wurde, wurde das präzipitierende BM Purple AP Substrat (Roche, Mannheim) verwendet. Die Embryonen wurden je nach verwendeter Sonde über Nacht bei 4° C oder mehrere Stunden bei 37° C mit dem BM Purple AP Substrat inkubiert und nach Standardvorschrift gebleicht. Die Embryonen wurden unter dem Stereo-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Köln) fotografiert. Der Hintergrund der Fotos

wurde bei manchen Aufnahmen mit Adobe Photoshop neu eingefärbt (*in situ*-Hybridisierung für collectrin).

**Tabelle 5: Übersicht zur Herstellung der sense- und antisense-Sonden für die whole mount in situ Hybridisierung**

Probe	Vektor	Restriktionsenzym		RNA-Polymerase		RZPD-Klon	Organismus
		antisense	sense	antisense	sense		<i>Xenopus laevis</i>
nephrin	pCMV-SPORT6	SmaI	Apal	T7	Sp6	IMAG-P998J1410938Q	<i>Xenopus laevis</i>
clcnk	pCMV-SPORT6	SmaI	Apal	T7	Sp6	IMAG-P998G1114717Q	<i>Xenopus laevis</i>
slc3a1	pCMV-SPORT6	EcoRV	Apal	T7	Sp6	IMAG-Gp998F179297Q	<i>Xenopus laevis</i>
slc12a3	pCMV-SPORT6	SmaI	Apal	T7	Sp6	IMAG-P998C0711388Q	<i>Xenopus laevis</i>
collectrin	pCMV-SPORT6	SmaI	Apal	T7	Sp6	McCoy et al.,2007	<i>Xenopus laevis</i>

### 2.11 Statistische Auswertung

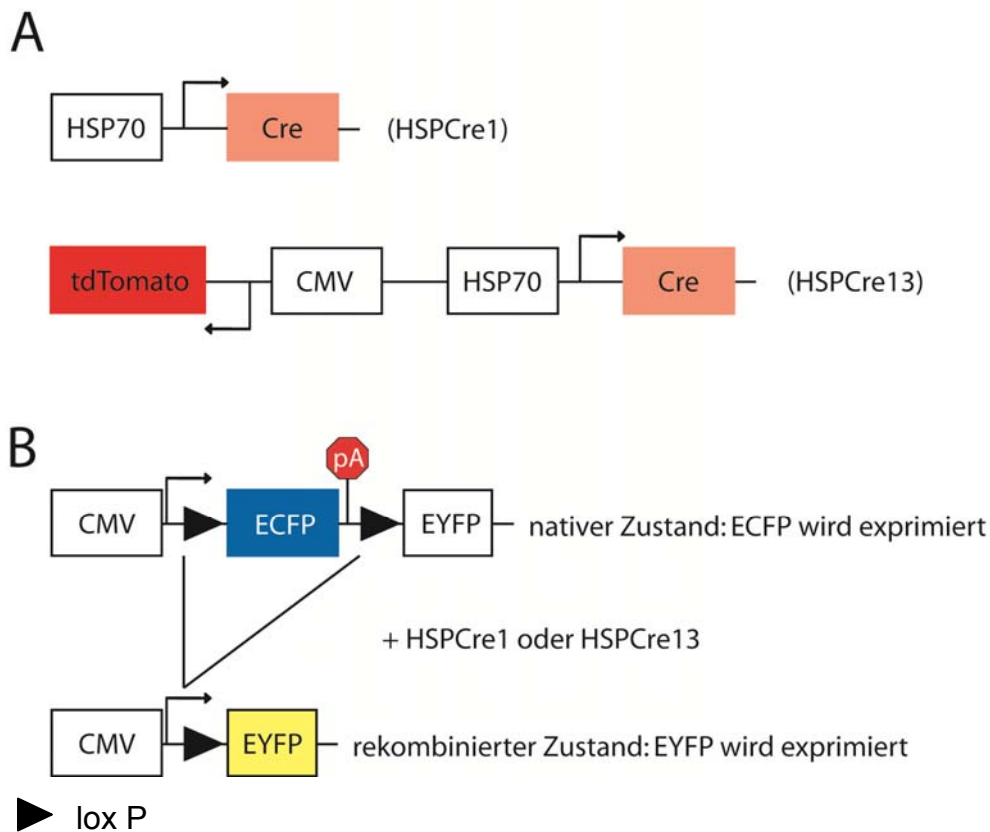
Für die statistische Auswertung wurde von den immunfluoreszierenden Larven eine Größenbestimmung der Nierenkanälchen (proximale Tubuli) und des Sammelrohres (Ductus) durchgeführt. Diese Strukturen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes AxioVision von Zeiss vermessen. Um die Daten auf signifikante Unterschiede zu testen (p-Wert) wurde der Student's t-Test verwendet. Es wurden jeweils die Daten von Embryonen mit und ohne aktiviertem mutanten HNF1 $\beta$  verglichen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Charakterisierung der Aktivatorstämme HSPCre1 und HSPCre13**

Das binäre Cre/loxP-System wurde durch vorangegangene Arbeiten in *Xenopus laevis* etabliert (Waldner et al., 2006; Roose M., 2008). Die durch die Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination zwischen den loxP-Sequenzen führt hier zu einer irreversiblen Exzision des entsprechenden DNA-Fragmentes. Um das Cre/loxP-System anwenden zu können, werden zwei Komponenten benötigt: ein sog. Aktivatorstamm und ein sog. Effektorstamm. In den beiden in dieser Arbeit verwendeten Aktivatorstämmen wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Promotors des induzierbaren *Xenopus* Hitze-Schock-Proteins HSP70 gestellt. Der konditional aktive HSP70-Promotor ist bei einer Temperatur von 20° C, bei der *Xenopus laevis* gehalten wird, inaktiv. Durch eine Erhöhung der Wassertemperatur auf 34° C und somit gleichzeitig der Körpertemperatur der wechselwarmen Tiere, wird der Promotor aktiv und die Rekombinase wird exprimiert (Wheeler et al., 2000). Somit wurde eine kontrollierte Aktivität der Cre-Rekombinase erreicht. Die beiden Aktivatorstämme erhielten die Bezeichnung HSPCre1 und HSPCre13 (Abb. 5 A). Der HSPCre13-Stamm weist im Vergleich zum HSPCre1 Stamm die Besonderheit auf, dass sich die hitzeschockinduzierbare Cre-Rekombinase in diesem Stamm auf dem gleichen Plasmid befindet wie das rot fluoreszierende Markergen tdTomato, welches sich unter der Kontrolle des CMV-Promotors befindet. Somit können Cre-positive Tiere des HSPCre13-Stammes sehr einfach anhand roter Fluoreszenz identifiziert werden. Im HSPCre13-Stamm befinden sich der CMV-Promotor und das tdTomato-Markergen in gegensätzlicher Orientierung zum HSP70-Promotor und der Cre-Rekombinase. So wird verhindert, dass u.U. durch einen ineffektiven Terminationsstopp nach dem tdTomato-Gen die Transkription nicht abgebrochen wird und durch den aktiven CMV-Promotor Cre-Transkripte gebildet werden. Zunächst wurden die beiden Aktivatorstämme in Bezug auf die Kinetik der Transkripte der Cre-Rekombinase nach Hitzeschockaktivierung näher charakterisiert und miteinander verglichen. Außerdem wurde die HSPCre1-vermittelte Induktion eines definierten Reportergens untersucht.

Zu diesem Zweck wurde ein heterozygotes Weibchen des bereits etablierten Reporterstammes C5 (Ryffel et al., 2003) mit den Spermien eines heterozygoten Männchens des HSPCre13-Stammes *in vitro* befruchtet. Tiere des C5-Stammes enthalten als Transgen das CMV:ECFP(loxP)(FRT)EYFP-Konstrukt (Abb. 5 B). Im C5-Reporterstamm steuert der ubiquitär aktive CMV-Promotor die Expression des blau-fluoreszierenden Proteins ECFP (**E**nhanced **C**yan **F**luorescent **P**rotein). Die Expression von ECFP detektiert gleichzeitig die Präsenz des Transgens. Stromabwärts des ECFP-Gens ist ein Terminationsstopp integriert, der die Expression des gelb fluoreszierenden Proteins EYFP (**E**nhanced **Y**ellow **F**luorescent **P**rotein) verhindert. Das ECFP-Gen und der Terminationsstopp sind durch Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase (loxP) flankiert und können durch diese Rekombinase herausgeschnitten werden.



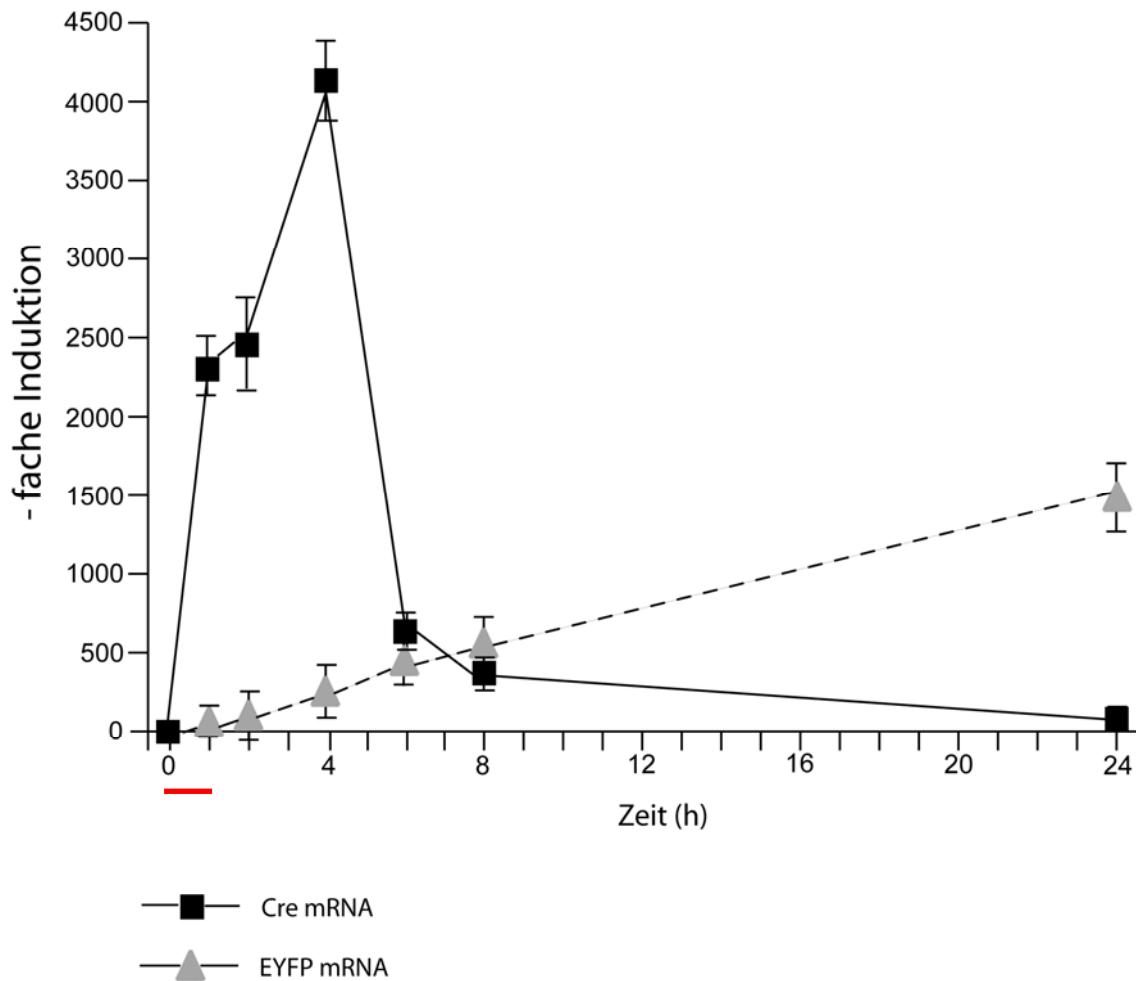
**Abb. 5: Kreuzungsschema des HSPCre1- und HSPCre13-Aktivatorstammes mit dem C5-Reporterstamm**

A: Schematische Darstellung des jeweiligen im HSPCre1- und HSPCre13-Stamm vorhandenen Transgens. In beiden Stämmen befindet sich die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des induzierbaren HSP70-Promotors. Im HSPCre13-Stamm befindet sich die Rekombinase auf dem gleichen Plasmid wie das Markergen tdTomato.

B: Schematische Darstellung des C5-Reporter-Konstruktes in nativem und rekombiniertem Zustand.

Hierdurch wird das zuvor inaktive EYFP-Gen exprimiert. Da der C5-Stamm für das Transgen heterozygot ist, ist das EYFP-Gen nur in 50 % der Nachkommen zu erwarten; dasselbe gilt für die Cre-Rekombinase. Somit enthalten 25 % der Nachkommen beide Transgene. Nach der Kreuzung wurden die F1-Embryonen bis zum Stadium 11 (frühe Gastrula) bei 16° C gehalten. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Cre-Rekombinase nicht vorzeitig induziert wird (Michiue und Asashima, 2005). In Stadium 11 wurden die Embryonen für 1 h bei 34° C hitzegeschockt. Um die Kinetik der Cre-Rekombinase und des induzierbaren Reportergens EYFP genauer untersuchen zu können, wurde zu definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 24 h nach dem Hitzeschock sowohl die Transkriptmenge der Cre-Rekombinase, als auch die des induzierbaren EYFP-Reportergens im gesamten Embryo bestimmt.

Pro Zeitpunkt erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA mit anschließender cDNA-Synthese aus jeweils 30 einzelnen Embryonen. Mit einer qRT-PCR-Analyse wurden zunächst die Cre-positiven Embryonen identifiziert und die durchschnittliche Cre-Transkriptmenge pro Zeitpunkt aus den Einzelwerten von 12 Embryonen ermittelt. Aufgrund einer geringen Basalaktivität der Cre-Rekombinase konnten auch in den nicht-hitzegeschockten Embryonen des Zeitpunktes 0 h Cre-positiv Tiere mit der qRT-PCR-Analyse eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich wurde die Transkriptmenge des induzierbaren EYFP-Reportergens für jeden Zeitpunkt ebenfalls mittels einer qRT-PCR-Analyse bestimmt (Abb. 6). Im Vergleich zu den nicht-hitzegeschockten Embryonen des Zeitpunktes 0 h weisen die Cre-positiven Embryonen des heterozygoten Stammes 1 h nach Beginn des Hitzeschocks bereits einen erheblichen Anstieg der Cre-Transkripte um das ~2300-fache auf. Diese Menge steigt weiter und erreicht 4 h nach Beginn des Hitzeschocks ihren Höchstwert, d.h. eine Steigerung verglichen mit dem Zeitpunkt 0 h um das ~4000-fache. In den folgenden Stunden werden die Cre-Transkripte wieder abgebaut und sind 24 h nach Beginn des Hitzeschocks nur noch in sehr geringer Menge vorhanden. Transkripte des durch die aktivierte Cre-Rekombinase induzierten EYFP-Reportergens sind bereits 1 h nach Beginn des Hitzeschocks detektierbar und ihre Menge nimmt kontinuierlich zu. Nach 24 h liegen die EYFP-Transkripte in 1500-facher Menge verglichen mit dem Zeitpunkt 0 h vor.



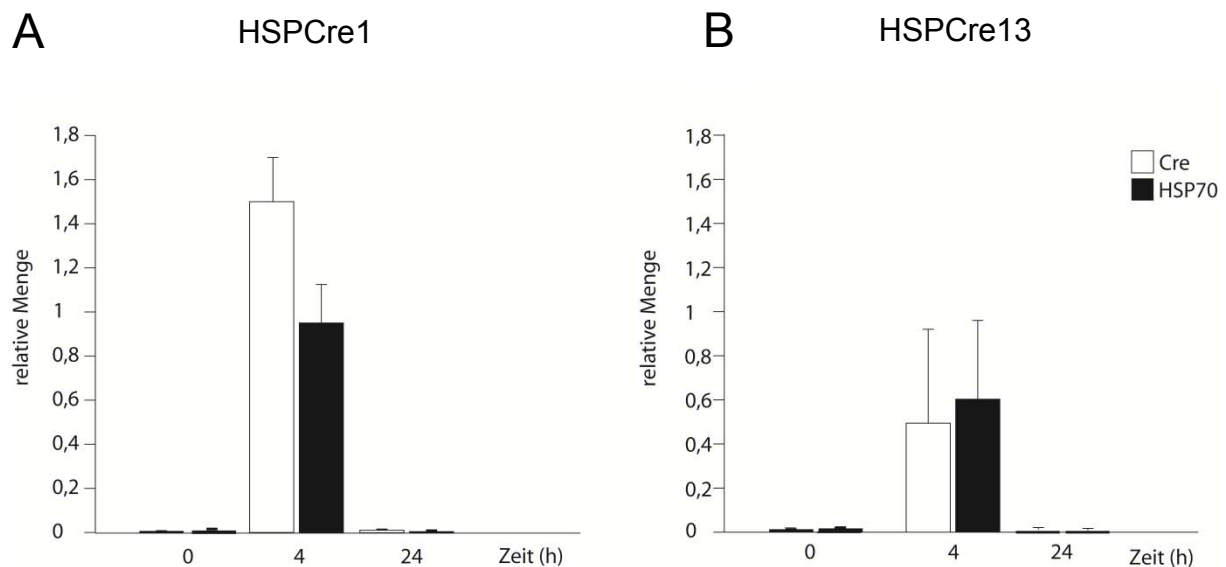
**Abb. 6: Kinetik der Cre-Rekombinase des HSPCre1-Stammes und Induktion des EYFP-Reportergens nach dem Hitzeschock**

qRT-PCR-Analyse der Cre-Transkripte des HSPCre1-Stammes, sowie der EYFP-Transkripte des C5-Reporterstammes nach Hitzeschockaktivierung. Die relative Menge wurde gegen das Referenzgen ODC normalisiert. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der relativen Menge der Cre-Rekombinase (jeweils N=12 Cre-positive von insgesamt 30 Embryonen pro Datenpunkt) und des EYFP-Reportergens (jeweils N=5 Embryonen pro Datenpunkt). Der rote Balken markiert den Zeitraum des durchgeführten Hitzeschocks (0-1h). Induktion: x-fache Induktion der Cre-, bzw. EYFP-Transkripte im Vergleich zum Zeitpunkt 0h.

Im HSPCre1-Aktivator-Stamm steuert der HSP70-Promotor die Expression der Cre-Rekombinase. Um herauszufinden, wie sich die Induzierbarkeit der exogenen Cre-Rekombinase und die Induzierbarkeit des endogenen HSP70-Genes zueinander verhalten, wurde in einem nächsten Experiment in denselben Embryonen aus der HSPCre1 x C5-Kreuzung eine qRT-PCR-Analyse zur Detektion der endogenen HSP70-Transkripte durchgeführt. Auch bei den HSP70-Transkripten lässt sich 4 h nach Beginn des Hitzeschocks ein deutlicher Anstieg der relativen Transkriptmenge



verzeichnen. Nach 24 h ist ebenfalls der Großteil der Transkripte degradiert (Abb. 7 A). Somit ähnelt die Kinetik der Transkripte des endogenen HSP70 der Kinetik der Transkripte der Cre-Rekombinase bei Verwendung des HSPCre1-Stammes. Für den HSPCre13-Stamm wurde ebenfalls die Kinetik der Cre-Rekombinase und des endogenen HSP70 untersucht (Abb. 7B). Wie beim HSPCre1-Stamm nimmt die relative Menge der Transkripte sowohl der Cre-Rekombinase, als auch des endogenen HSP70 nach dem Hitzeschock zu und erreicht nach 4 h ihren Höchstwert. Nach 24 h ist auch hier ein Großteil der Transkripte degradiert. Somit ist die grundsätzliche Kinetik der hitzeinduzierten Aktivierung der beiden Gene vergleichbar. Auffallend ist jedoch, dass die relative Menge der Cre-Rekombinase und des endogenen HSP70 des HSPCre1-Stammes 4 h nach der Hitzeschockaktivierung deutlich höher ist, als die des HSPCre13-Stammes.



**Abb. 7: Vergleich der Expression der Cre-Rekombinase und des endogenen HSP70 nach dem Hitzeschock in den beiden Aktivatorstämmen**

qRT-PCR-Analyse der Transkriptmengen der Cre-Rekombinase (*weiße Balken*) und des endogenen HSP70 (*schwarze Balken*). Die relative Menge wurde gegen das Referenzgen ODC normalisiert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus N=10 Embryonen +/- Standardabweichung.

Relative Menge der Cre-Rekombinase und des endogenen HSP70 nach einstündigem Hitzeschock bei Verwendung des HSPCre1-Stammes (A) und des HSPCre13-Stammes (B).

Auffällig ist auch die größere Streuung der relativen Transkriptmenge bei Verwendung des HSPCre13-Stammes (Abb. 7 B) verglichen mit dem HSPCre1-Stamm (Abb. 7 A). Zum Zeitpunkt 0 h, also in nicht-hitzegechockten Embryonen,

war in Cre-positiven Tieren beider Stämme eine geringe Basalaktivität der Cre-Rekombinase nachweisbar. Diese betrug für den HSPCre1-Stamm 0,001 (relative Menge Cre/ODC; Mittelwert aus N=10 Cre-positiven Embryonen) und für den HSPCre13-Stamm 0,002 (relative Menge Cre/ODC; Mittelwert aus N=10 Cre-positiven Embryonen). Somit wird die Cre-Rekombinase in beiden Aktivatorstämmen bereits vor dem Hitzeschock in sehr geringem Maße exprimiert. Der endogene HSP70-Promotor weist ebenfalls eine geringe Basalaktivität auf. Diese betrug für den HSPCre1-Stamm 0,006 (relative Menge HSP70/ODC; Mittelwert aus N=10 Cre-positiven Embryonen) und für den HSPCre13-Stamm 0,01 (relative Menge HSP70/ODC; Mittelwert aus N=10 Cre-positiven Embryonen).

### **3.2 Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$ , sowie der HNF1 $\beta$ -Mutanten P328L329del und A263insGG**

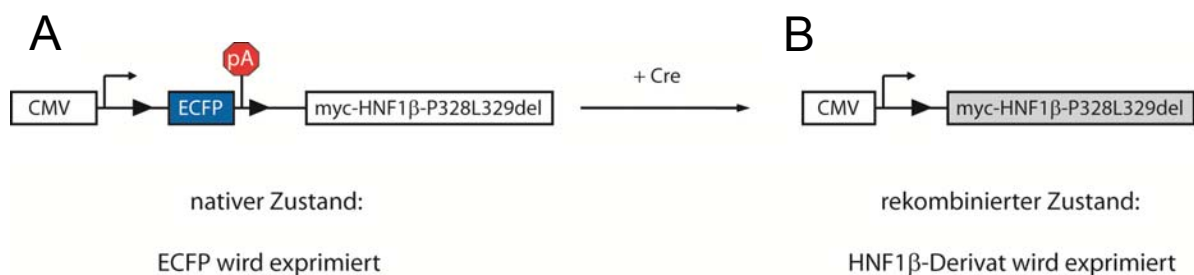
Um den Effekt der Überexpression der Mutanten P328L329del und A263insGG, sowie von HNF1 $\beta$  genauer untersuchen zu können, wurden Männchen des HSPCre13-Aktivatorstammes, bei dessen Verwendung Cre-positive Larven anhand roter Fluoreszenz identifiziert werden können, in Kombination mit Weibchen entsprechender Effektorstämmen benutzt und die Mutanten, sowie HNF1 $\beta$  zu einem definierten Zeitpunkt in der Entwicklung von *Xenopus laevis* konditional überexprimiert. Die beiden unabhängigen Effektorstämmen, mit denen die Mutante P328L329del konditional überexprimiert werden kann, werden im Folgenden als 328del-4- und 328del-3-Stamm bezeichnet, der Effektorstamm zur Überexpression der Mutante A263insGG als A263ins-6-Stamm und der Effektorstamm zur Überexpression von HNF1 $\beta$  als wt-2-Stamm.

Die Präsenz des Effektor-Transgens wird durch die blaue Fluoreszenz des ECFP-Markergens markiert. Da die Expression des ECFP-Gens durch den ubiquitär aktiven CMV-Promotor gesteuert wird, enthalten die Eier der Effektor-Weibchen maternales ECFP und fluoreszieren blau. Das maternale ECFP ist nur für eine begrenzte Zeit stabil, daher geht die blaue Fluoreszenz im Laufe der Entwicklung verloren. Ab Beginn der zygotischen Transkription wird in transgenen Embryonen endogenes ECFP exprimiert, so dass in diesen Tieren die blaue Fluoreszenz erhalten bleibt.

Ebenso werden ab Beginn der zygotischen Transkription die paternalen Gene, d.h. in diesem Fall das CMV:tdTomato-Markergen des HSPCre13-Stammes, exprimiert. Ab dem frühen Schwanzknospenstadium können somit transgene Larven anhand roter und blauer Fluoreszenz identifiziert werden.

### 3.2.1 Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante P328L329del durch einstündigen Hitzeschock

Tiere der beiden Effektorstämme zur Überexpression von des mutanten HNF1 $\beta$ -Derivates P328L329del tragen das Konstrukt CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 $\beta$ -P328L329del (Abb. 8). Durch den ubiquitär aktiven CMV-Promotor wird eine Überexpression im ganzen Tier erreicht. Somit können in allen Organen evtl. auftretende Effekte untersucht werden. Wie im C5-Stamm detektiert auch hier die Expression von ECFP die Präsenz des Transgens. Stromabwärts des ECFP-Gens ist ein Terminationsstopp integriert, der die Expression des GOIs (**Gene Of Interest**), in diesem Falle das mutante HNF1 $\beta$ -Derivat P328L329del, verhindert. Nach einer erfolgreichen Rekombination wird die Expression des GOI aktiviert.



#### ► lox P

#### Abb. 8: Effektorkonstrukt für die durch die Cre-Rekombinase aktivierbare Expression des HNF1 $\beta$ -Derivates P328L329del

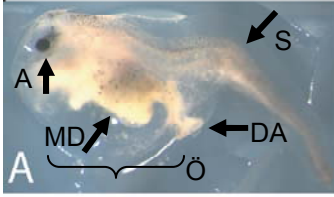
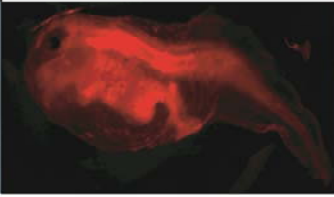
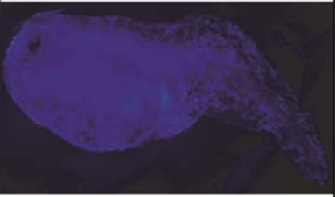


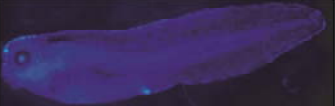

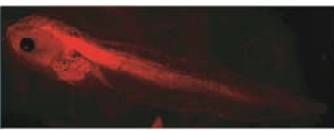




A: Das Effektor-Konstrukt in nativem Zustand. Der CMV-Promotor steuert die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (ECFP). Das ECFP-Gen und der stromabwärts integrierte Terminationsstopp sind durch loxP-Sequenzen (schwarzes Dreieck) flankiert und können durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden.

B: Das Effektor-Konstrukt in rekombiniertem Zustand. Durch die Rekombination wird das induzierbare HNF1 $\beta$ -Derivat P328L329del unter die direkte Kontrolle des CMV-Promotors gestellt und somit exprimiert.

Für die Überexpression des mutanten HNF1 $\beta$ -Derivates P328L329del wurde ein heterozygotes 328del-4-Weibchen mit den Spermien eines heterozygoten HSPCre13-Männchens *in vitro* befruchtet. Da hier der Hitzeschock-Promotor HSP70

die Expression der Cre-Rekombinase kontrolliert, wurden die F1-Nachkommen bis zum Hitzeschock bei 16° C gehalten.

Nach der Kreuzung wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) 109 Embryonen für 1 h bei 34° C hitzegeschockt. In 25 % der F1-Tiere wurde die Präsenz beider Transgene erwartet, somit sollten diese Tiere rot und blau fluoreszieren. Dies war in 31 (28 %) von 109 Larven der Fall. Diese Larven besitzen also das durch den Hitzeschock aktivierte P328L329del und werden im Folgenden als *mutant* bezeichnet. Die Larvenentwicklung wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen beobachtet. Nach der Beobachtungsphase wurde den Larven (Stadium 46) die Schwanzspitze abgeschnitten und daraus RNA für eine qRT-PCR-Analyse isoliert, der Rumpf wurde für eine Immunhistofärbung fixiert. 12 (39 %) der mutanten Larven entwickelten in diesem Zeitraum große Ödeme, Defekte im Schwanzbereich und des Magen-Darm-Traktes, sowie verkleinerte Augen (Abb. 9 A). Doppelt-transgene, nicht-hitzegeschockte Larven (N=11) entwickelten sich normal und wiesen die genannten Defekte nicht auf (Abb. 9 B). Ebenfalls normal entwickelt waren hitzegeschockte Larven, die entweder nicht blau (kein Effektor-Transgen) (Abb. 9 C) oder nicht rot (kein Aktivator-Transgen) fluoreszierten (Abb. 9 D).

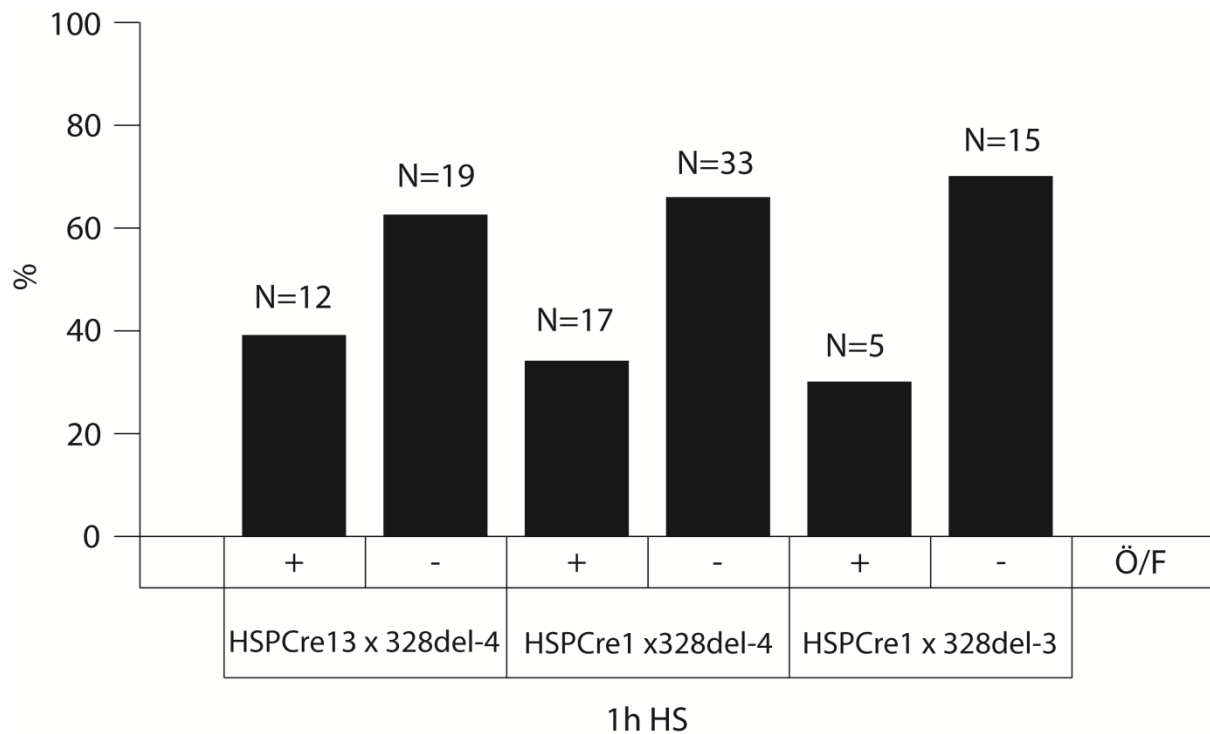
Normallicht	roter Filter	blauer Filter	Cre13	del4	HS
			+	+	+
			+	+	-
			+	-	+
			-	+	+

**Abb. 9.: Effekt der Überexpression der P328L329del-Mutation auf die Larvenentwicklung.**

Repräsentative Larven aus der Kreuzung eines heterozygoten 328del-4 Weibchens mit einem heterozygoten HSPCre13-Männchen. Die F1-Nachkommen wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) für 1 h bei 34° C hitzegeschockt und die Larvenentwicklung kontinuierlich beobachtet.

**A:** Phänotyp einer Larve mit hitzeschockaktiviertem P328L329del. **B:** Normal entwickelte Larve ohne Hitzeschockaktivierung von P328L329del. **C,D:** Normal entwickelte Larven ohne Hitzeschockaktivierung von P328L329del, entweder ohne das Effektor-(**C**) oder das Aktivator-Transgen (**D**). *Schwarze Pfeile* markieren Fehlentwicklungen: MD: abnormaler Magen-Darm-Trakt, A: verkleinertes Auge DA: verdickter Darmausgang, S: abnormale Schwanzstruktur; *geschweifte Klammer* Ö: Ödem. HSPCre13 positive Tiere weisen rote Fluoreszenz, 328del-4 positive Tiere blaue Fluoreszenz auf.

Nur 39 % der mutanten Tiere mit induziertem P328L329del wiesen einen Phänotyp auf. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um einen stammspezifischen Effekt handelte, wurde das Experiment mit jeweils einem anderen Aktivator- und Effektorstamm wiederholt (Abb. 10). In allen drei unabhängigen Kreuzungen, d.h. HSPCre13 x 328del-4, HSPCre1 x 328del-4 und HSPCre1 x 328del-3, liegt der Anteil der mutanten Larven mit Ödemen immer bei etwa 40 %. Somit kann hier ein stammspezifischer Effekt ausgeschlossen werden.

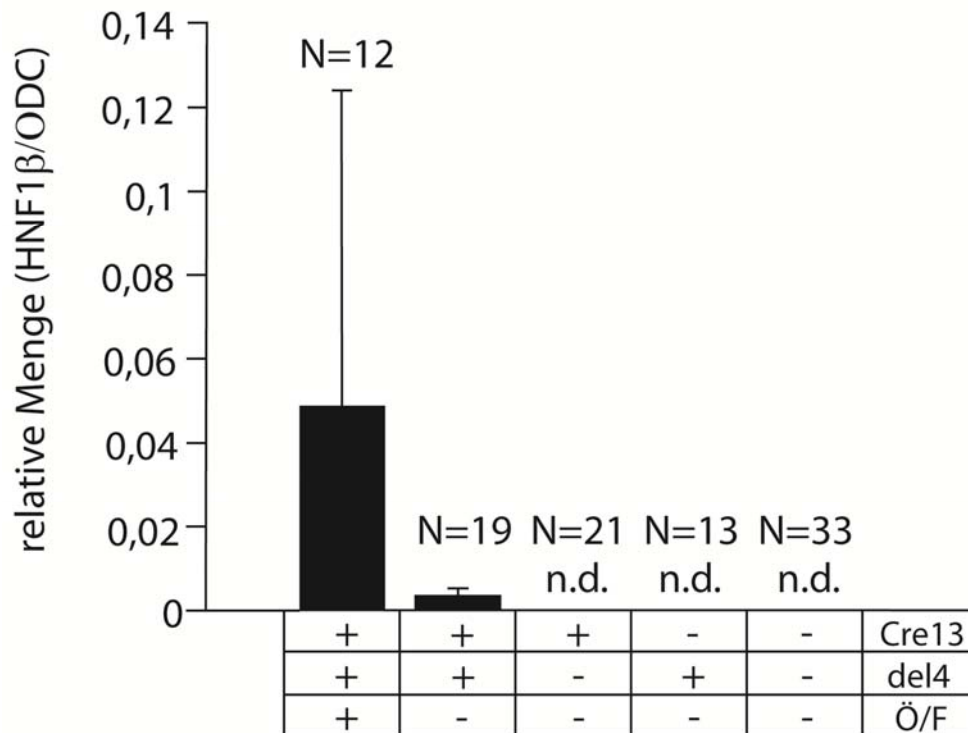


**Abb. 10: Prozentualer Anteil mutanter Larven mit und ohne Ödembildung nach Überexpression der Mutante P328L329del in unterschiedlichen Kreuzungen**  
Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4 Stamm, sowie des HSPCre1-Stammes mit den beiden unabhängigen Effektorstämmen 328del-3 und 328del-4. Der Hitzeschock (HS) erfolgte für 1 h. Dargestellt ist der prozentuale Anteil mutanter Larven mit/ohne Ödembildung/Fehlentwicklungen. N=Anzahl Embryonen. Ö=Ödem. F= Fehlentwicklungen.

Um zu untersuchen, ob dieser heterogene Phänotyp mit einer unterschiedlichen Menge von P328L329del-Transkripten in den einzelnen Tieren zusammenhing, wurde für jede einzelne Larve eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt. Dies war möglich, da als Transgen die humane HNF1 $\beta$ -Sequenz in die Effektorstämme eingebracht wurde, so dass ausschließlich die Transkripte des exogenen HNF1 $\beta$  detektiert wurden und nicht die des endogenen hnf1b.

Diese Analyse ergab, dass die P328L329del-Transkripte in den mutanten Larven mit dem aktivierten HNF1 $\beta$ -Derivat, die Ödeme und Fehlentwicklungen aufwiesen, deutlich induziert waren (Abb. 11). Mutante Larven mit aktiviertem P328L329del, die keine Ödeme und Fehlentwicklungen besaßen, wiesen insgesamt eine geringere Menge von exogenen P328L329-Transkripten auf. Larven in denen entweder nur das HSPCre13- oder das 328del-4-Transgen vorhanden war und in nicht-transgenen Larven (s. Abb. 9 B-D und Abb. 11) konnte keine Expression des exogenen HNF1 $\beta$ -Derivates detektiert werden. Zwischen mutanten Larven mit und ohne Ödemen, bzw.

Fehlbildungen konnte kein signifikanter Unterschied in der P328L329del-Transkriptmenge festgestellt werden, obwohl eine Tendenz zu einer höheren Expression besteht, wenn Ödeme, bzw. Fehlbildungen vorhanden sind. Insgesamt ist die Streuung der Transkriptlevel nach dem einstündigen Hitzeschock sehr groß.

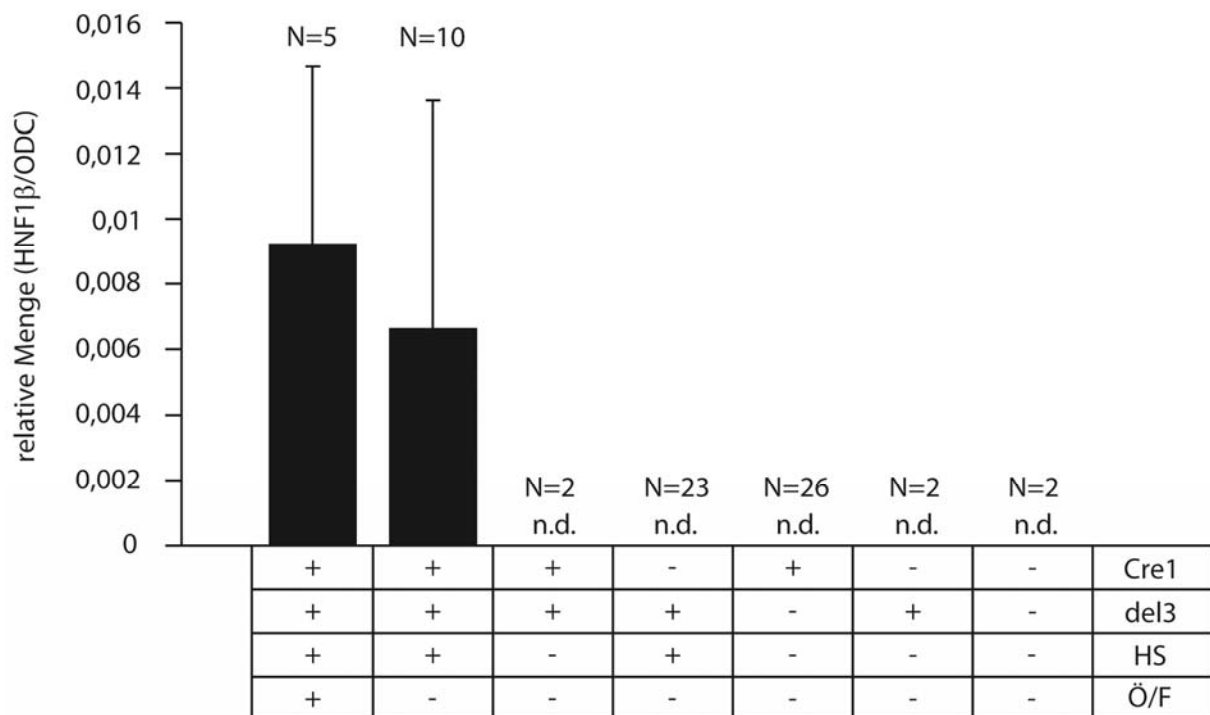


**Abb. 11: Expression der P328L329del-Transkripte nach einstündiger Hitzeschockaktivierung nach einer Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm**

qRT-PCR-Analyse der einzelnen Larven (Stichprobe: N=98) aus der bereits in Abb. 9 beschriebenen Kreuzung eines heterozygoten 328del-4 Weibchens mit einem heterozygoten HSPCre13 Männchens. Die F1-Nachkommen wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) für 1 h bei 34° C hitzegeschockt.

Die relative Menge der P328L329del-Transkripte gemessen mit qRT-PCR wurde gegen das Referenzgen ODC normalisiert. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert aus N Embryonen +/- Standardabweichung. n.d.= P328L329del-Transkripte nicht detektiert. Ö=Ödeme. F=Fehlentwicklungen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde nach Kreuzung des HSPCre1-Stammes mit dem 328del-3-Stamm erzielt. 5 (33%) von 15 mutanten Larven wiesen Ödeme auf (Abb. 12). Die Expression von P328L329del war in den Mutanten deutlich induziert und in den einzelnen Kontrollgruppen nicht detektierbar (Abb. 12). Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression des mutanten HNF1β zwischen den mutanten Larven mit und ohne Ödemen festgestellt werden.



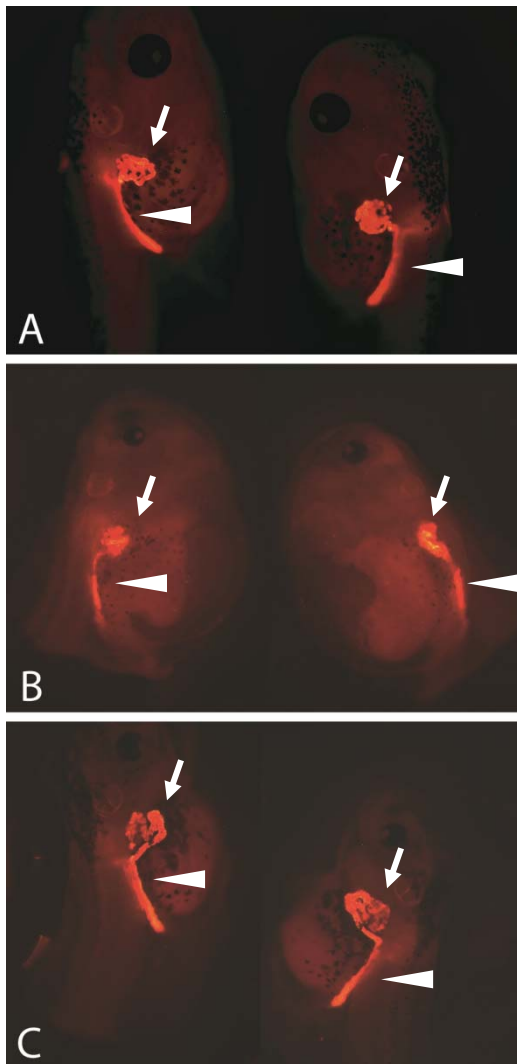
**Abb. 12: Expression der P328L329del-Transkripte nach einstündiger Hitzeschock-Aktivierung nach einer Kreuzung des HSPCre1-Stammes mit dem 328del-3-Stamm**  
 qRT-PCR-Analyse der einzelnen Larven (Stichprobe N=70). Der Hitzeschock wurde in der späten Gastrula (Stadium 11) für 1 h bei 34° C durchgeführt. Die relative Menge der P328L329del-Transkripte gemessen mit qRT-PCR wurde gegen das Referenzgen ODC normalisiert. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert aus N Embryonen +/- Standardabweichung. n.d.= P328L329del-Transkripte nicht detektiert. Ö=Ödeme. F=Fehlentwicklungen.

Um speziell die Nierenentwicklung in den mutanten Larven der Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Effektorstamm im Vergleich zu den einzelnen Kontrollgruppen näher zu untersuchen, wurde für alle Larven (Stadium 46) eine Immunhistofärbung des Pronephros durchgeführt.

Im Vergleich zu Larven der Kontrollgruppen (Abb. 13 A) konnten in den mutanten Larven Fehlbildungen des Pronephros beobachtet werden. Diese Fehlbildungen manifestierten sich zum einen in einem insgesamt verkleinerten Pronephros mit deformierten proximalen Tubuli und einem verkürzten Ductus (Abb. 13 B). Zum anderen waren auch Larven vorhanden, in denen sich der Ductus normal entwickelt hatte und nur die proximalen Tubuli verkürzt, bzw. verdickt erschienen (Abb. 13 C). Auffallend war, dass primär die proximalen Tubuli von den Fehlentwicklungen betroffen waren. Jedoch wiesen nicht alle Larven, in denen P328L329del aktiviert war, diese Missbildungen auf und die Missbildungen korrelierten auch nicht mit dem



Vorhandensein von Ödemen. 14 von 19 mutanten Larven ohne Ödeme und Fehlbildungen, sowie 8 von 12 mutanten Larven mit Ödemen und Fehlbildungen wiesen einen missgebildeten Pronephros auf (vgl. Abb. 11). Insgesamt belief sich der prozentuale Anteil der missgebildeten mutanten Larven auf 70 % (22 von 31 Larven). Eine mögliche Erklärung für die nicht 100 % ige Penetranz des Nierenphänotyps in den mutanten Larven war, dass der einstündige Hitzeschock nicht ausreichte, um in allen Larven eine effiziente Rekombination des P328L329del-Effektor-Konstruktes zu gewährleisten, was sich auch in der Menge der HNF1 $\beta$ -Transkripte zeigte. Aus diesem Grund wurde im folgenden Experiment die Dauer des Hitzeschocks auf 2 h erhöht, so dass mehr Cre-Transkripte produziert werden konnten, um das Effektor-Konstrukt in allen Tieren effizient zu rekombinieren.

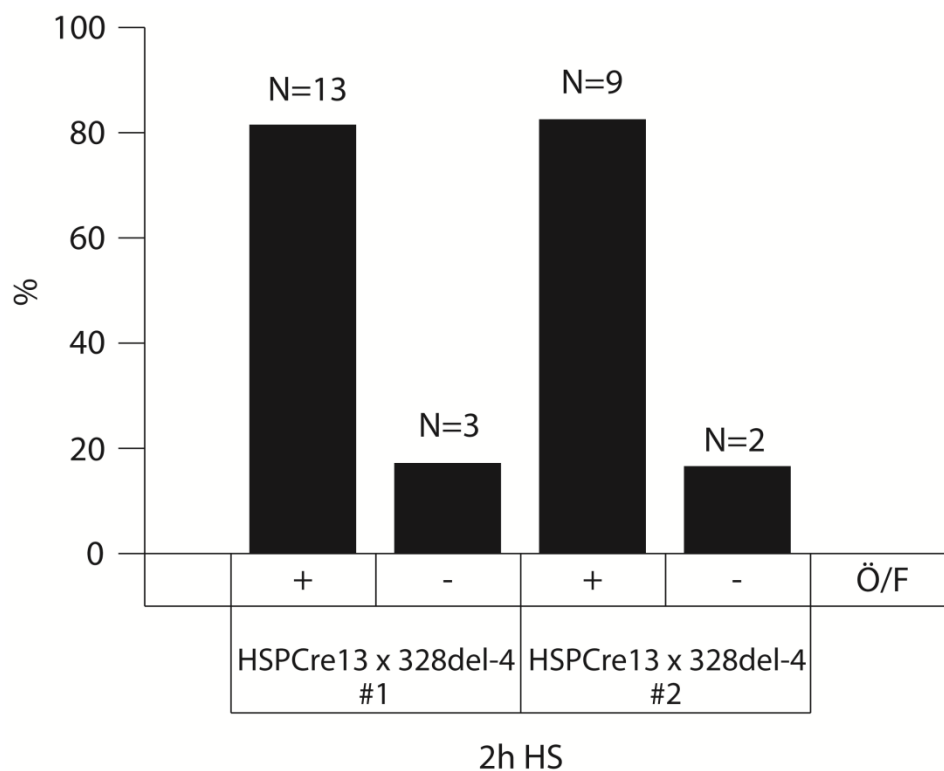


**Abb.: 13: Durch Überexpression von P328L329del verursachte Fehlbildungen des Pronephros nach einstündigem Hitzeschock nach einer Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm**

Das Pronephrogewebe der Larven wurde immunhistochemisch mit zwei Antikörpern, spezifisch für die proximalen Tubuli oder den Ductus sichtbar gemacht. A: Repräsentative Kontroll-Larve B;C: Mutante Larven mit Ödemen und Fehlbildungen. B: Larve mit insgesamt verkleinertem Pronephros. Sowohl die Länge der proximalen Tubuli als auch die des Ductus ist verkürzt. C: Larve mit entwundenen und verdickten proximalen Tubuli. Der Ductus erscheint normal. *Weißer Pfeile* proximale Tubuli. *Weißer Dreiecke* Ductus. A-C zeigt jeweils eine Aufnahme der rechten, bzw. linken Seite derselben Larve.

### 3.2.2 Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante P328L329del durch zweistündigen Hitzeschock

Es wurde ein weiteres heterozygoten 328del-4-Weibchen mit den Spermien eines heterozygoten HSPCre13-Männchens *in vitro* befruchtet und mit den F1-Nachkommen wie zuvor beschrieben verfahren. Der Hitzeschock wurde auf 2 h verlängert. In diesem Experiment wiesen 13 (81 %) von insgesamt 16 mutanten Larven Ödeme und Fehlbildungen auf (Abb. 14 #1). Dieser prozentuale Anteil konnte in einer weiteren unabhängigen Kreuzung bestätigt werden, bei der ein anderes heterozygoten Weibchen des 328del-4-Stammes mit den Spermien eines HSPCre13-Männchens befruchtet wurde (Abb. 14 #2).

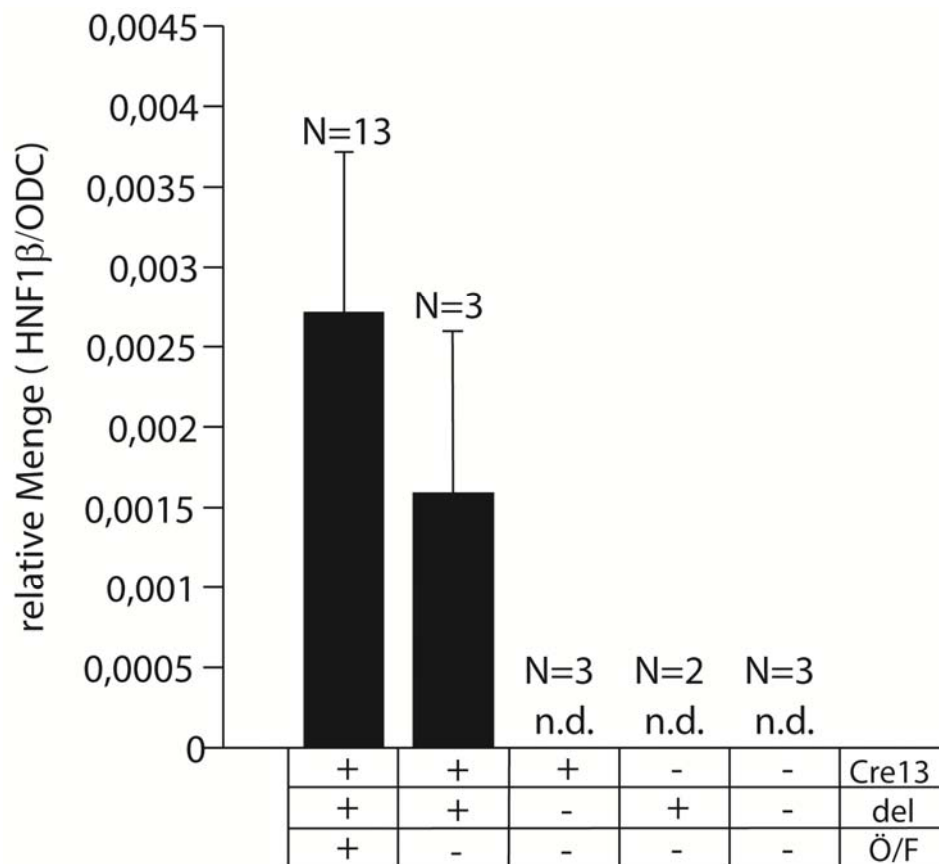


**Abb. 14: Prozentualer Anteil mutanter Larven mit und ohne Ödembildung nach Überexpression von der Mutante P328L329del durch zweistündigen Hitzeschock in unterschiedlichen Kreuzungen des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm**

Zwei verschiedene Kreuzungen des HSPCre13-Stammes mit dem Effektorstamm 328del-4. Der Hitzeschock (HS) erfolgte für 2 h. Der prozentuale Anteil mutanter Larven mit Ödembildung liegt in beiden Fällen bei etwa 80 %. N = Anzahl Embryonen. Ö=Ödeme. F=Fehlentwicklungen.

Hier wiesen 9 (81 %) von insgesamt 11 mutanten Tieren Ödeme und Fehlbildungen auf (Abb. 14 #2). Die qRT-PCR-Analyse einer Stichprobe einzelner Larven aus Kreuzung #1 zeigte, dass nach dem zweistündigen Hitzeschock die P328L329del-

Transkriptlevel insgesamt wesentlich homogener verteilt und zwischen mutanten Larven mit und ohne Ödemen/Fehlbildungen vergleichbar waren (Abb. 15).



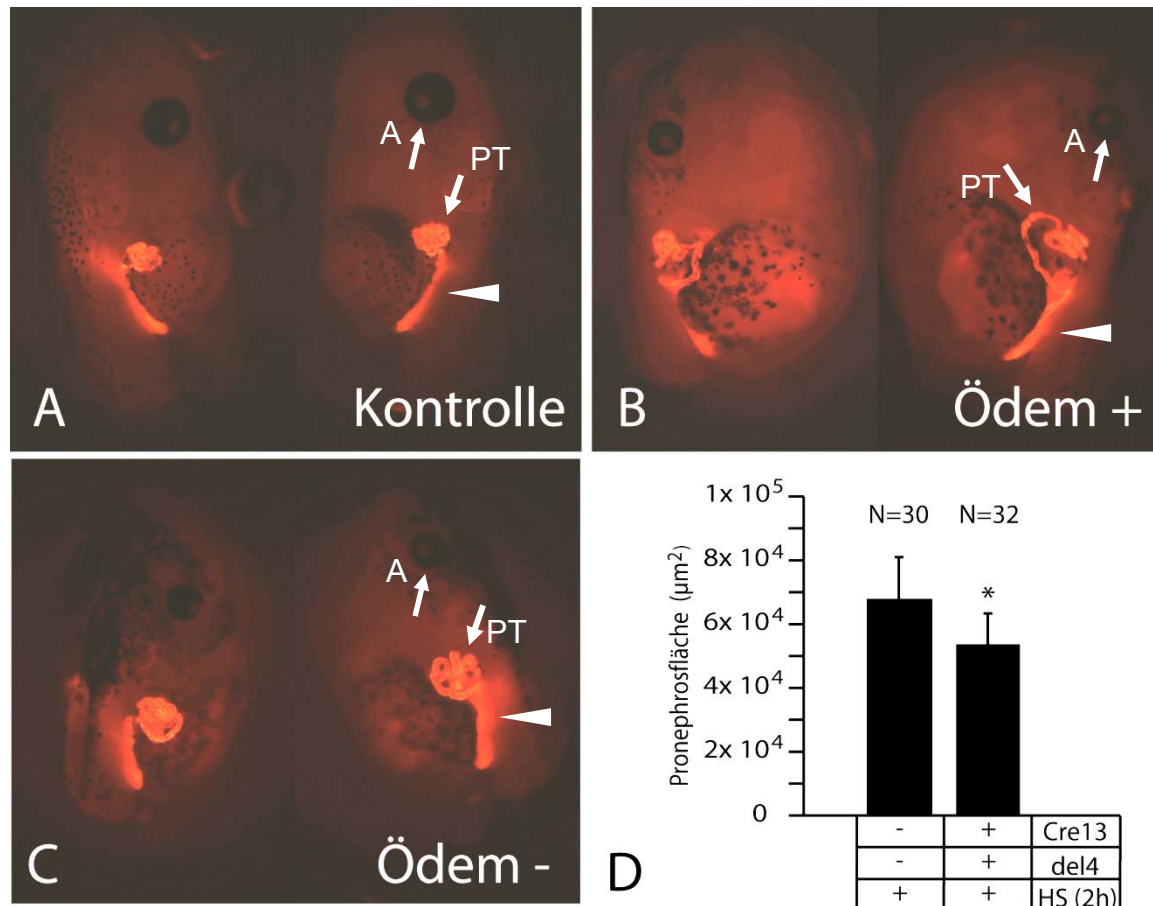
**Abb. 15: Expression der P328L329del-Transkripte nach zweistündiger Hitzeschockaktivierung nach einer Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm**

qRT-PCR-Analyse einer Stichprobe einzelner Larven aus der Kreuzung #1 eines heterozygoten 328del-4 Weibchens mit einem heterozygoten HSPCre13 Männchens. Die F1-Nachkommen wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) für 2 h bei 34° C hitzegeschockt.

Die relative Menge der P328L329del-Transkripte gemessen mit qRT-PCR wurde gegen die Transkripte des Referenzgenes ODC normalisiert. Die einzelnen Balken repräsentieren den Mittelwert aus N Embryonen +/- Standardabweichung. n.d.= P328L329del-Transkripte nicht detektiert. Ö=Ödeme. F=Fehlentwicklungen.

Die durchgeführte Immunhistofärbung zeigte, dass 100 % (16 von 16) der mutanten Larven einen missgebildeten Pronephros aufwiesen (Abb. 16 A-C). 13 der insgesamt 16 mutanten Larven entwickelten zusätzlich große Ödeme (Abb. 16 B). Erneut resultierte die Überexpression der Mutante P328L329del in einer Verkürzung des Ductus und insbesondere zu verkleinerten und verdickten proximalen Tubuli (Abb. 16 B und C). Zusätzlich war die durchschnittliche Pronephrosgröße in den Mutanten im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf 77 % verkleinert (Abb. 16 D).

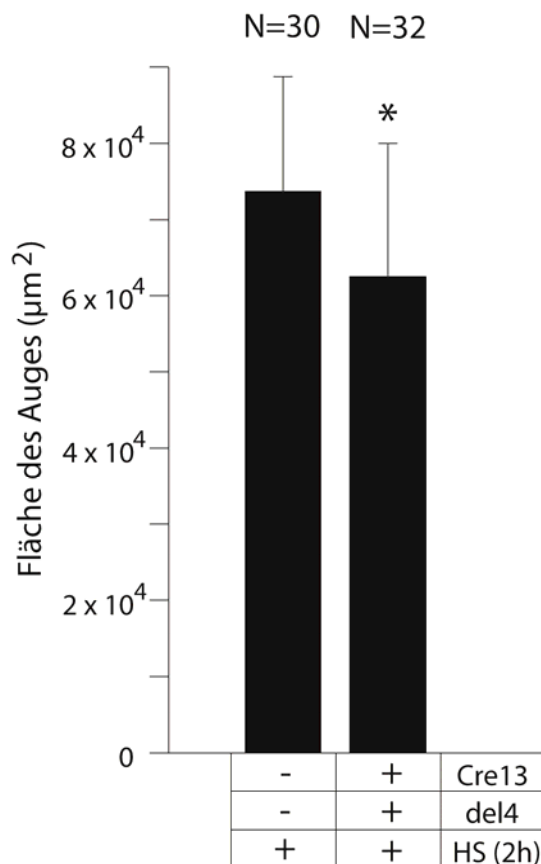
Unter diesen optimierten Bedingungen, d.h. einer Hitzeschockaktivierung der Cre-Rekombinase für 2 h, stellt das Cre/loxP-System ein ideales Werkzeug dar, mit dem der Effekt der Überexpression von mutantem HNF1 $\beta$  auf die Nierenentwicklung in *Xenopus laevis* untersucht werden kann.



**Abb. 16: Durch Überexpression der Mutante P328L329del verursachte Fehlbildungen des Pronephros nach zweistündigem Hitzeschock nach einer Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm**

Das Pronephrosgewebe der Larven wurde immunhistochemisch mit zwei Antikörpern, spezifisch für die proximalen Tubuli oder den Ductus, sichtbar gemacht. A: Repräsentative Kontroll-Larve B: Mutante Larve mit Ödem und fehlentwickeltem Pronephros. Die proximalen Tubuli sind verkleinert und verdickt. C: Mutante Larve ohne Ödem und fehlentwickeltem Pronephros. Die proximalen Tubuli sind auch hier verkleinert und verdickt, der Ductus verkürzt. *Weißer Pfeile* A: Auge PT: Proximale Tubuli *weiße Dreiecke* Ductus. D: Quantifizierung der durchschnittlichen Pronephrosgröße in den Mutanten und Kontrollen. \* =  $p < 0,01$  (Student's t-test). Zur Bestimmung der Pronephrosgröße wurde mit dem Computerprogramm AxioVision die Fläche des Ductus und der proximalen Tubuli vermessen. A-C zeigt jeweils eine Aufnahme der rechten, bzw. linken Seite derselben Larve.

Ebenfalls auffällig war, dass die Mutanten mit aktiviertem P328L329del kleinere Augen aufwiesen, als die Larven der Kontrollgruppe (Abb. 16; weiße Pfeile). Die Messung der Fläche der Augen ergab, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe die Augen der Mutanten signifikant auf 84 % verkleinert waren (Abb. 17).



**Abb. 17: Quantifizierung der durchschnittlichen Augengröße in Mutanten und Kontrollen nach einer Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm**  
Zur Bestimmung der Augengröße wurde mit dem Computerprogramm AxioVision die Fläche der Augen vermessen. \* =  $p \leq 0,01$  (Student's t-test).

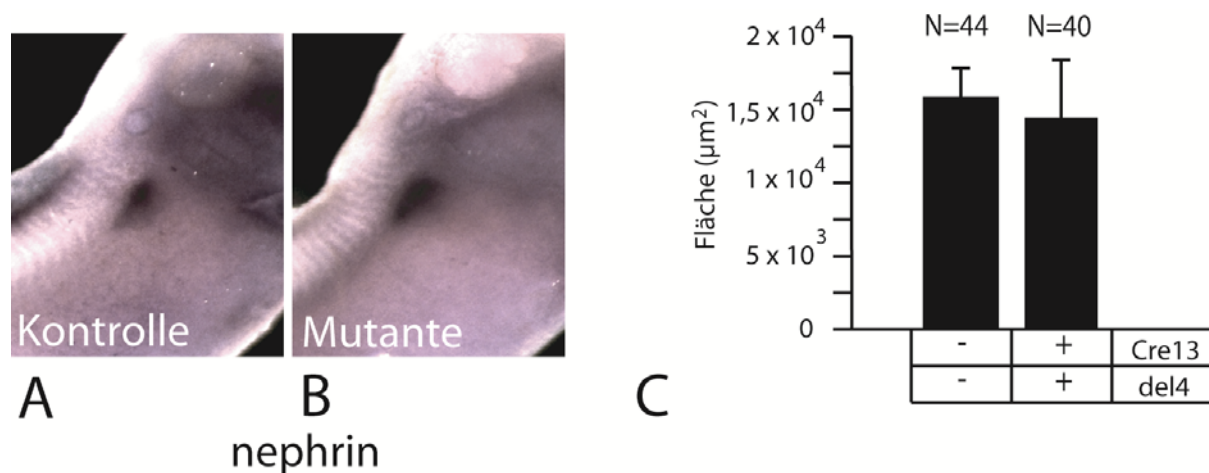
### 3.3 Analyse der Expression spezifischer Pronephros-Markergene nach Überexpression der Mutante P328L329del

Um zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt und in welchen Strukturen des Pronephros die bereits beschriebenen Nierendefekte während der Entwicklung von *Xenopus*, insbesondere die verkleinerten proximalen Tubuli, sich in den mutanten Larven manifestieren, wurden die Expressionsmuster definierter Pronephrosmarker in Embryonen mit aktiviertem P328L329del näher untersucht. Die gewählten Marker werden im Glomus und in definierten Segmenten des Pronephros exprimiert: den

proximalen Tubuli, den intermediären und distalen Tubuli, sowie dem Ductus (Nomenklatur nach Raciti et al., 2008). Zu diesem Zweck wurde erneut ein heterozygotes 328del-4-Weibchen mit den Spermien eines heterozygoten HSPCre13-Männchens *in vitro* befruchtet und die F1-Nachkommen für 2 h bei 34° C hitzegeschockt. Im Schwanzknospfenstadium (Stadium 28/29) wurden die mutanten Larven anhand roter und blauer Fluoreszenz identifiziert. Für die Analyse wurden F1-Larven im Stadium 35/36 verwendet. In diesem Stadium (35/36) kann die Struktur des noch nicht funktionalen Pronephros sehr einfach analysiert werden, da dieser hier noch als lineare Struktur ohne die sich in der weiteren Entwicklung bildenden Windungen der proximalen Tubuli vorliegt. Eine Ausnahme bildet die Analyse von *tmem27* (*collectrin*). Hierfür wurden Embryonen in Stadium 30/32 verwendet, da *tmem27* in diesem Stadium die stärkste Expression aufweist.

### 3.3.1 Analyse des Glomusmarkers nephrin

Nephrin, auch bekannt als NHPS1, wird im Glomus exprimiert. Das Expressionsmuster dieses Glomusmarkers wurde in den mutanten Embryonen mit aktiviertem P328L329del untersucht (Abb. 18 B). Die Fläche des nephrin-Expressionsmusters war in den mutanten Larven im Vergleich zur Kontrolle, d.h. nicht-transgene Larven aus derselben Kreuzung (Abb. 18 A), unverändert (Abb. 18 C).



**Abb. 18: Expression des Glomusmarkers nephrin in Embryonen mit aktiviertem P328L329del**

*In situ*-Hybridisierung für nephrin.

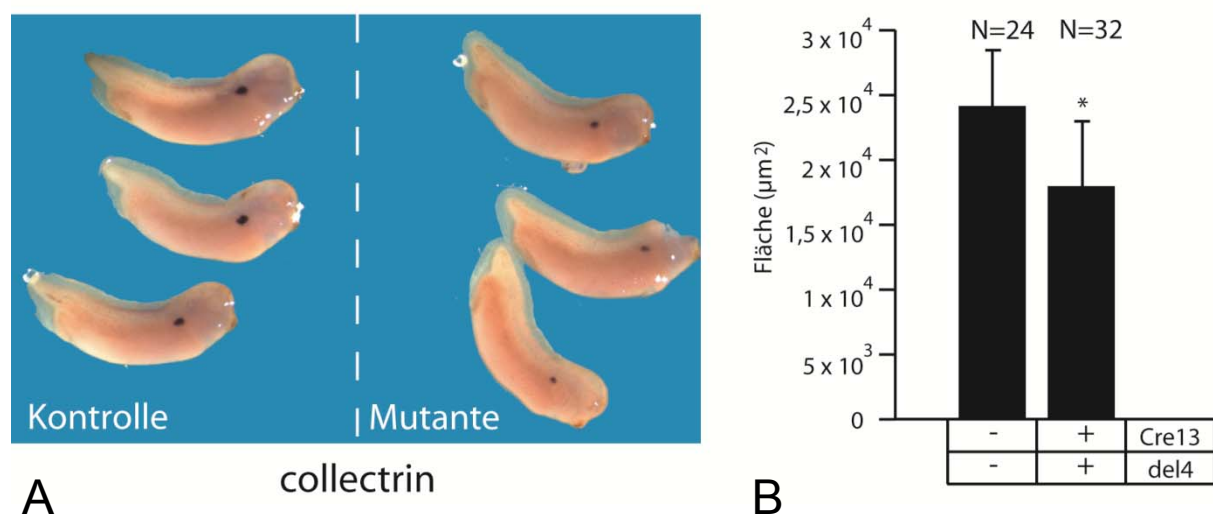
A: Repräsentativer Embryo der Kontrollgruppe. B: Repräsentativer Embryo mit aktiviertem P328L329del. C: Quantifizierung des Expressionsmusters. Die Fläche des Expressionsmusters wurde mit dem Computerprogramm AxioVision gemessen.

### 3.3.2 Analyse von collectrin (tmem27) und slc3a1, Markern für die proximalen Tubuli (PT) des Pronephros

Die Pronephrosmarker collectrin und slc3a1 werden beide in den proximalen Tubuli (PT1-PT3) exprimiert.

#### 3.3.2.1 Analyse von collectrin

TMEM27, auch bekannt als collectrin, kodiert für ein am Aminosäuretransport beteiligtes Transmembranprotein und wird in *Xenopus*-Embryonen ab dem frühen Schwanzknospenstadium (Stadium 28) bis zum Stadium 39 in den proximalen Tubuli exprimiert (McCoy et al., 2008).



**Abb. 19: Expression von collectrin in Embryonen mit aktiviertem P328L329del**  
*In situ*-Hybridisierung für collectrin.

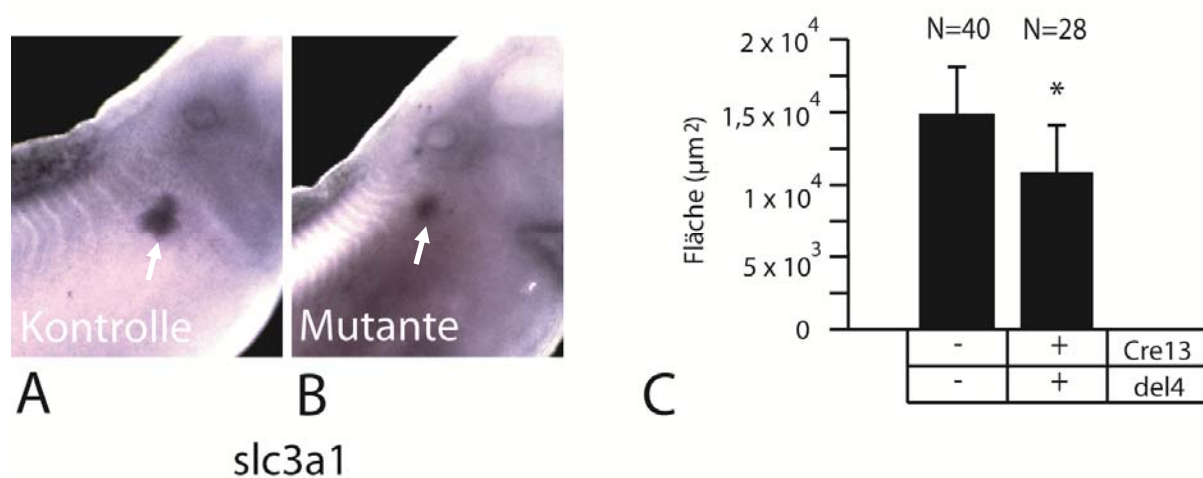
A: Repräsentative Embryonen der Kontrollgruppe, sowie Embryonen mit aktiviertem P328L329del. B: Quantifizierung des Expressionsmusters. Die Fläche des Expressionsmusters wurde mit dem Computerprogramm AxioVision gemessen.

\* =  $p < 0,01$  (Student's t-Test).

Die Analyse wurde an Embryonen im Schwanzknospenstadium (Stadium 30/32) durchgeführt. Die Überexpression von P328L329del führte in den mutanten Larven zu einer Veränderung des collectrin-Expressionsmusters. Im Vergleich zur Kontrolle, d.h. nicht-transgene Larven aus derselben Kreuzung, wies der Bereich der Expression insgesamt eine kleinere Fläche auf (Abb. 19 A). Die anschließende Quantifizierung ergab eine signifikante Verkleinerung dieser Fläche auf 75 % (Abb. 19 B). Sowohl in den Kontrolltieren als auch in den mutanten Larven ist das collectrin-Expressionsmuster der einzelnen Tiere sehr homogen, wie in der Übersicht gezeigt (Abb. 19 A).

## 3.3.2.2 Analyse von slc3a1

Slc3a1, auch bekannt als rBAT, gehört zu einer Familie von Transportproteinen, der *slc* (Solute Carrier)-Genfamilie. Die durchgeführte *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass das slc3a1-Expressionsmuster in Embryonen mit aktiviertem P328L329del (Abb. 20 B) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 20 A) deutlich verändert war, d.h. die Fläche der slc3a1-Expression in den Mutanten war im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant auf 74 % verkleinert (Abb. 20 C). Zudem war die Intensität der Expression geringer, was sich in einer insgesamt schwächeren Färbung des Bereiches der slc3a1- Expression widerspiegelte (Abb. 20 B).



**Abb. 20: Expression von slc3a1 in Embryonen mit aktiviertem P328L329del**  
*In situ*-Hybridisierung für slc3a1.

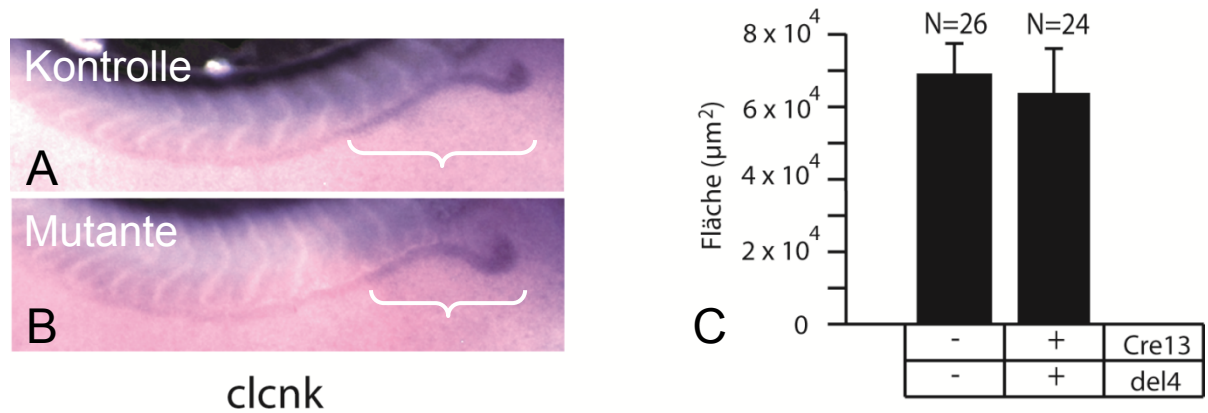
A: Repräsentativer Embryo der Kontrollgruppe. B: Repräsentativer Embryo mit aktiviertem HNF1β P328L329del. *weißer Pfeil* Expressionsmuster von slc3a1 im proximalen Tubulus. C : Quantifizierung des Expressionsmusters. Die Fläche des Expression wurde mit dem Computerprogramm AxioVision gemessen. \* =  $p < 0,01$  (Student's t-Test).

### 3.3.3 Analyse von clnk, einem Marker für die intermediären (IT) und distalen Tubuli (DT), sowie für den verbindenen Tubulus (CT)

Clnk, auch bekannt als CLC-K, gehört zur CLC (Chloride Channel)-Familie und kodiert für einen Kanal zum Transport von Chlorid-Ionen (Raciti et al., 2008). Durch die *in situ*-Hybridisierung für die Expression von clnk in Embryonen des Stadiums 35/36 sind deutlich der intermediäre Tubulus (IT1 und IT2) und der distale Tubulus (DT1 und DT2) markiert. Zwischen den Kontrolltieren (Abb. 21 A) und den Mutanten (Abb. 21 B) wurde kein Unterschied in der Intensität und Fläche (Abb. 21 C) der clnk-Expression festgestellt. Die durch die *in situ*-Hybridisierung markierte



Expression von *clcnk* im verbindenden Tubulus war sehr schwach. Aus diesem Grund wurden für die Flächenmessung der *clcnk*-Expression nur die intermediären und distalen Tubuli berücksichtigt.



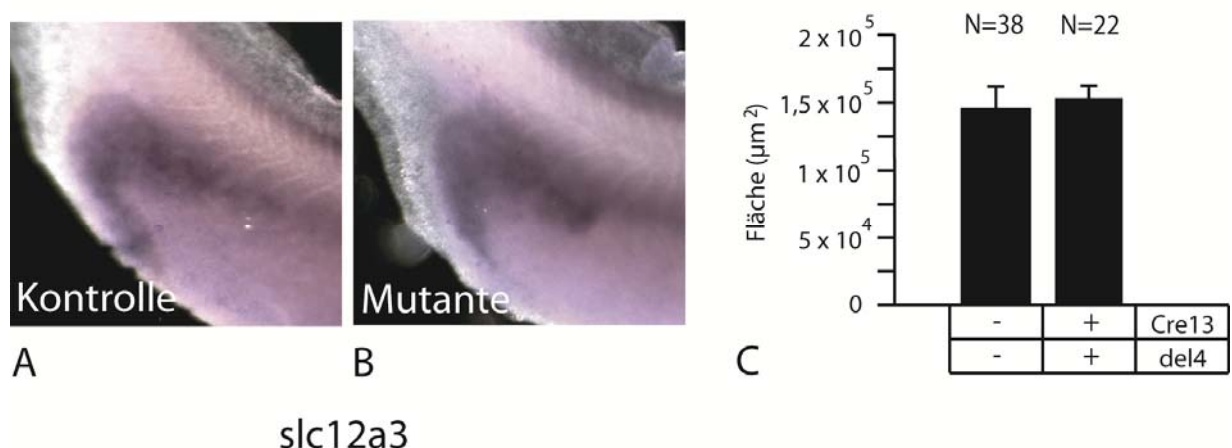
**Abb. 21: Expression von *clcnk* in Embryonen mit aktiviertem P328L329del**

*In situ*-Hybridisierung für *clcnk*.

A: Repräsentativer Embryo der Kontrollgruppe. B: Repräsentativer Embryo mit aktiviertem P328L329del. Die *geschweifte Klammer* markiert den Bereich des Pronephros, der für die Flächenmessung herangezogen wurde. C: Quantifizierung des Expressionsmusters. Die Fläche des Expressionsmusters wurde mit dem Computerprogramm AxioVision gemessen.

### 3.3.4 Analyse von *slc12a3*, einem Marker für den distalen (DT2) und verbindenden (CT) Tubulus, sowie für die Kloake

*Slc12a3* kodiert für einen Natriumchloridtransporter und wird im Ductus des Pronephros und in der Kloake exprimiert.



**Abb. 22: Expression von *slc12a3* in Embryonen mit aktiviertem P328L329del**

*In situ*-Hybridisierung für *slc12a3*.

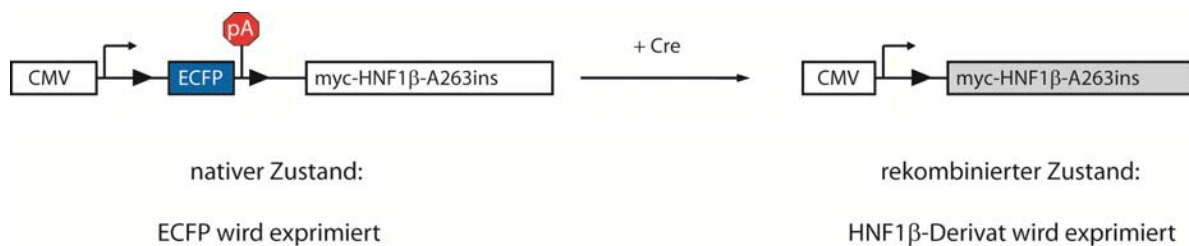
A: Repräsentativer Embryo der Kontrollgruppe. B: Repräsentativer Embryo mit aktiviertem P328L329del. C: Quantifizierung des Expressionsmusters. Die Fläche des Expressionsmusters wurde mit dem Computerprogramm AxioVision gemessen.

Das *slc12a3*-Expressionsmuster war im Gegensatz zur Kloake im Ductus sehr schwach. Aus diesem Grund wurde für die Flächenmessung des Expressionsmusters nur die Expression in der Kloake berücksichtigt. Zwischen Kontrolltieren (Abb. 22 A) und Mutanten (Abb. 22 B) wurde kein Unterschied in der Intensität und Fläche der Expression (Abb. 22 C) festgestellt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Überexpression von P328L329del zu Veränderungen der Expression der Pronephrosmarker *collectrin* und *slc3a1* führte, die ausschließlich in den proximalen Tubuli (PT) exprimiert werden. Die Expressionsmuster von *clcnk* und *slc12a3*, die in den intermediären (IT) und distalen (DT) Tubuli, sowie dem verbindenden (CT) Tubulus exprimiert werden, waren unverändert. Auch die Expression des Glomusmarkers *nephrin* blieb unbeeinträchtigt.

### 3.4 Hitzeschockinduzierbare Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante A263insGG

Um den Effekt der Überexpression des mutanten HNF1 $\beta$ -Derivates A263insGG zu analysieren, wurde der A263ins-6-Effektorstamm verwendet. Tiere des A263ins-6-Effektorstammes tragen das Konstrukt CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 $\beta$ -A263insGG (Abb. 23) und exprimieren das Transgen ubiquitär. Das ECFP detektiert auch hier die Präsenz des Transgens.



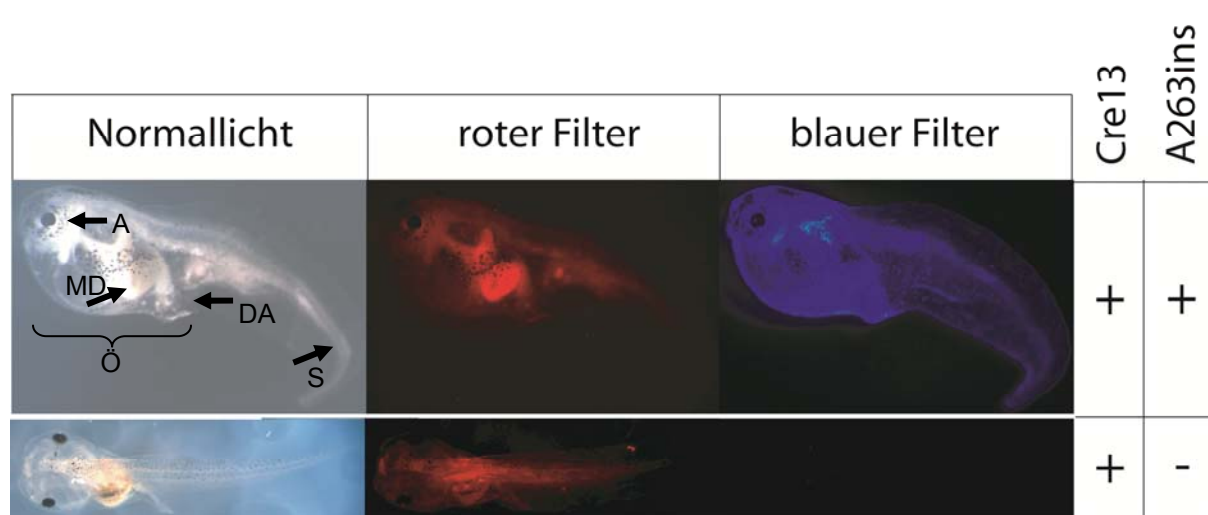
#### ► lox P

#### Abb. 23: Effektorkonstrukt für die durch die Cre-Rekombinase aktivierbare Expression des HNF1 $\beta$ -Derivates A263insGG

A: Das Effektor-Konstrukt in nativem Zustand. Der CMV-Promotor steuert die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (ECFP). Das ECFP-Gen und der stromabwärts integrierte Terminationsstopp sind durch loxP-Sequenzen (schwarzes Dreieck) flankiert und können durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden.

B: Das Effektor-Konstrukt in rekombiniertem Zustand. Durch die Rekombination wird das induzierbare HNF1 $\beta$ -Derivat A263insGG unter die direkte Kontrolle des CMV-Promotors gestellt und somit exprimiert.

Ein heterozygotes Weibchen des A263ins-6-Effektorstammes wurde mit den Spermien eines HSPCre13-Männchens *in vitro* befruchtet. Da das Weibchen noch jung war, standen für die weitere Analyse relativ wenige Embryonen zur Verfügung. Nach der Kreuzung wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) 45 Embryonen für 2 h bei 34° C hitzegeschockt. Aus den 45 Embryonen entwickelten sich 41 Larven. 10 (24 %) der 41 Larven besaßen sowohl das Cre-Aktivator-, als auch das Effektortransgen und konnten somit untersucht werden. Die Larvenentwicklung wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen beobachtet. Nach der Beobachtungsphase wurde der Rumpf der Larven für eine spätere Immunhistofärbung fixiert. 5 (50 %) dieser 10 mutanten Larven entwickelten in diesem Zeitraum große Ödeme, sowie Defekte im Schwanzbereich und des Magen-Darm-Traktes. Zusätzlich war eine Verkleinerung der Augen zu beobachten (Abb. 24 A).



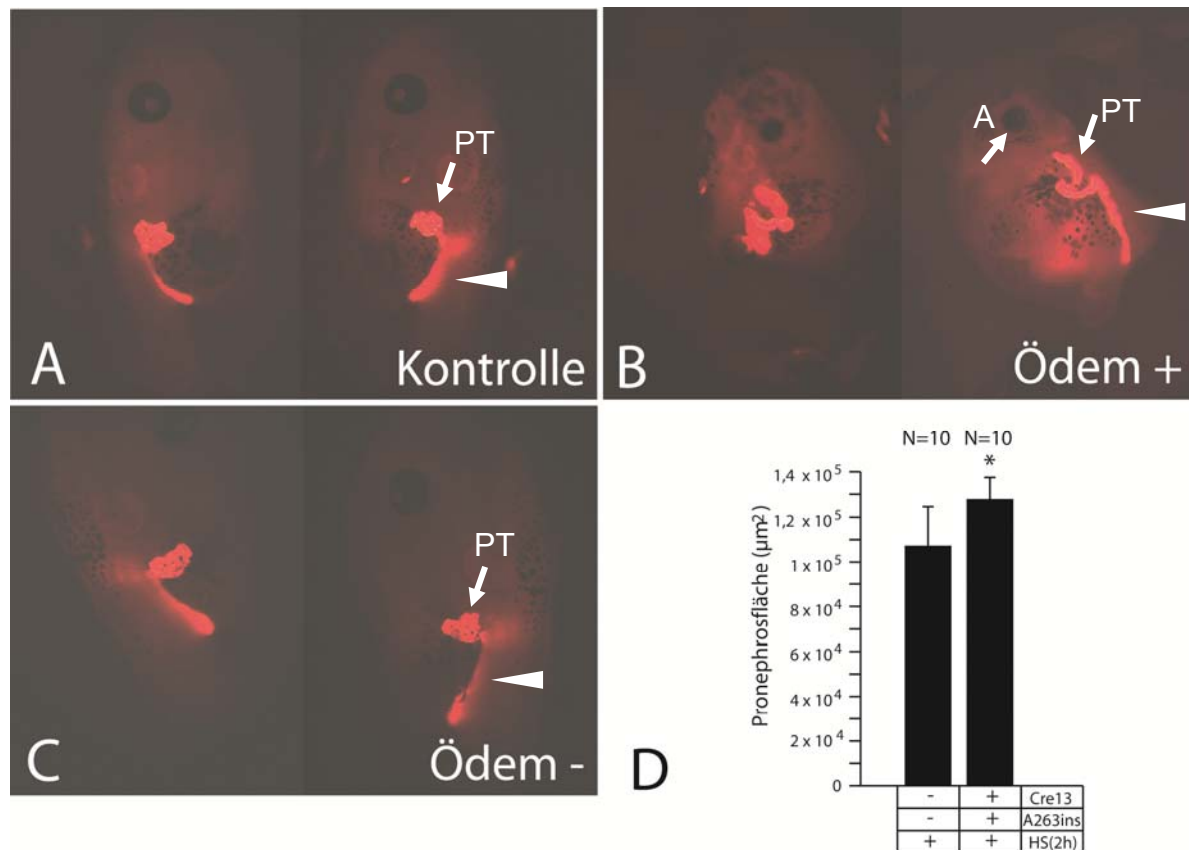
**Abb. 24: Effekt der Überexpression der A263insGG-Mutation auf die Larvenentwicklung nach einer Kreuzung des A263ins-6-Stammes mit dem HSPCre13-Stamm**

Repräsentative Larven aus der Kreuzung eines heterozygoten A263ins-6-Weibchens mit einem heterozygoten HSPCre13-Männchen. Die F1-Nachkommen wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) für 2 h bei 34° C hitzegeschockt und die Larvenentwicklung kontinuierlich beobachtet.

**A:** Phänotyp einer Larve mit hitzeschockaktiviertem A263insGG. **B:** Normal entwickelte Larve ohne Hitzeschockaktivierung von A263insGG, die das Effektortransgen nicht besitzt. *Schwarze Pfeile* markieren Fehlentwicklungen: MD: abnormaler Magen-Darm-Trakt ohne die typischen Windungen, A: verkleinertes Auge DA: verdickter Darmausgang, S: abnormale gebogene Schwanzstruktur; *geschweifte Klammer* Ö: Ödem. HSPCre13 positive Tiere weisen rote Fluoreszenz auf. Blaue Fluoreszenz markiert die Präsenz des Effektortransgenes.

Hitzegeschockte Larven, die entweder kein Effektor-Transgen (Abb. 24 B) oder kein Cre-Aktivator-Transgen trugen waren normal entwickelt. Nicht-transgene

Geschwister entwickelten sich ebenfalls normal und wiesen die genannten Defekte nicht auf.

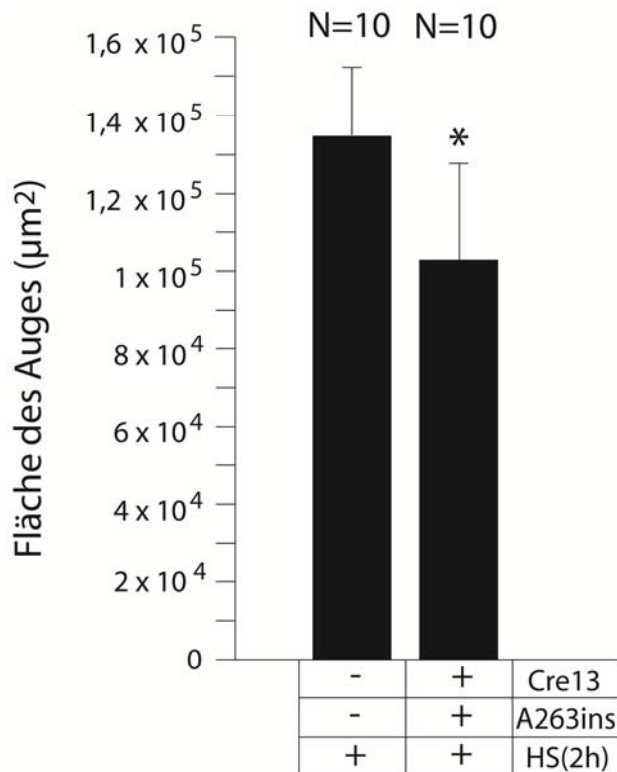


**Abb. 25: Durch Überexpression von A263insGG verursachte Fehlbildungen des Pronephros nach zweistündigem Hitzeschock nach einer Kreuzung des A263ins-6-Stammes mit dem HSPCre13-Stamm**

Das Pronephrosgewebe der Larven wurde immunhistochemisch mit zwei Antikörpern, spezifisch für die proximalen Tubuli oder den Ductus sichtbar gemacht. A: Repräsentative hitzegeschockte Kontroll-Larve aus derselben Kreuzung ohne Cre-Aktivator- und Effektortransgen. B: Mutante Larve mit Ödem und fehlentwickeltem Pronephros. Die proximalen Tubuli sind verdickt, der Ductus ist teilweise nicht vorhanden. C: Mutante Larve ohne Ödem und fehlentwickeltem Pronephros. Die proximalen Tubuli sind auch hier verdickt, der Pronephros ist insgesamt größer. *Weiße Pfeile* A: verkleinertes Auge PT: proximale Tubuli *weiße Dreiecke* Ductus. D: Quantifizierung der durchschnittlichen Pronephrosgröße in den Mutanten und Kontrollen. \* =  $p < 0,01$  (Student's t-Test). Zur Bestimmung der Pronephrosgröße wurde mit dem Computerprogramm AxioVision die Fläche des Ductus und der proximalen Tubuli vermessen. A-C zeigt jeweils eine Aufnahme der rechten, bzw. linken Seite derselben Larve.

Die durchgeführte Immunhistofärbung zeigte, dass der Pronephros in den Larven mit aktiviertem A263insGG Fehlbildungen aufwies. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 25 A) waren in den mutanten Larven die proximalen Tubuli verdickt und der Ductus teilweise nicht ausgebildet (Abb. 25 B). In anderen mutanten Larven kam es ebenfalls zu einer Verdickung der proximalen Tubuli und der Pronephros erschien

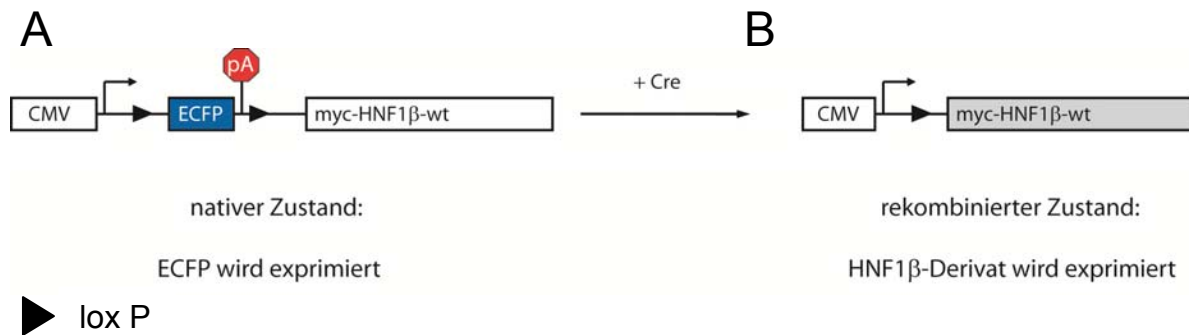
insgesamt vergrößert (Abb. 25 C). Eine Quantifizierung der Pronephrosgröße zeigte, dass in den Mutanten im Vergleich zu nicht-transgenen Larven aus derselben Kreuzung der Pronephros signifikant auf 120 % vergrößert war (Abb. 25 D). Eine Quantifizierung der Augengröße ergab, dass in den Larven mit aktiviertem A263insGG die durchschnittliche Größe des Auges im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf 73 % verkleinert war (Abb. 26).



**Abb. 26: Quantifizierung der durchschnittlichen Augengröße in Mutanten und Kontrollen nach einer Kreuzung des A263ins-6-Stammes mit dem HSPCre13-Stamm**  
Zur Bestimmung der Augengröße wurde mit einem Computerprogramm die Fläche der Augen vermessen. \* =  $p \leq 0,01$  (Student's t-Test).

### 3.5 Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$

Zusätzlich zur Überexpression der beiden potentiell dominant-negativen HNF1 $\beta$ -Derivate P328L329del und A263insGG wurde HNF1 $\beta$  mit dem binären Cre/loxP-System überexprimiert. Mit den Spermien eines heterozygoten HSPCre13-Männchens wurde ein heterozygotes Weibchen des wt-2-Stammes *in vitro* befruchtet, das als Transgen das CMV:ECFP(loxP)(FRT)HNF1 $\beta$ -wt Konstrukt enthielt (Abb. 27).

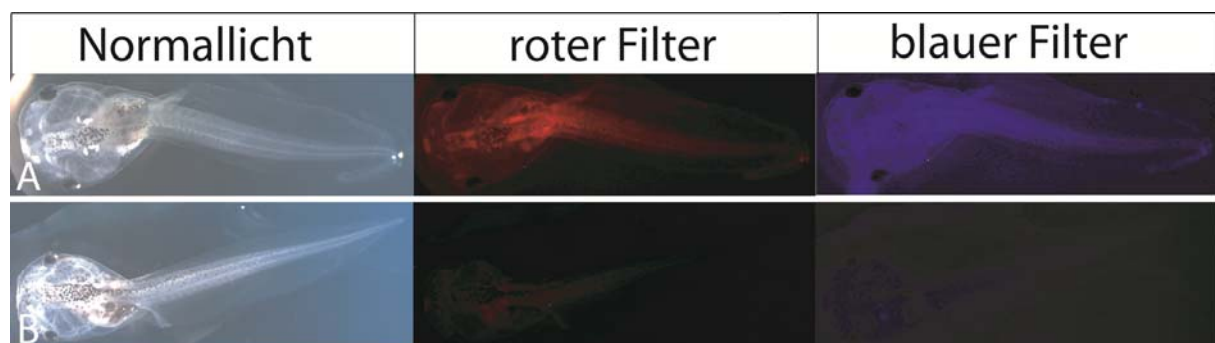


**Abb. 27: Verwendetes Effektor-konstrukt für die durch die Cre-Rekombinase aktivierbare Expression von HNF1β**

A: Das Effektor-Konstrukt in nativem Zustand. Der CMV-Promotor steuert die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (ECFP). Das ECFP-Gen und der stromabwärts integrierte Terminationsstopp sind durch loxP-Sequenzen (schwarzes Dreieck) flankiert und können durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden.

B: Das Effektor-Konstrukt in rekombiniertem Zustand. Durch die Rekombination wird HNF1β unter die direkte Kontrolle des CMV-Promotors gestellt und somit exprimiert.

Nach hitzeschockinduzierter Cre-Aktivierung und Rekombination wird HNF1β überexprimiert. Da das wt-2-Weibchen relativ jung war, standen nur wenige Eier für die weitere Analyse zur Verfügung. Nach der Kreuzung wurden 35 Embryonen für 2 h bei 34° C hitzegeschockt. Daraus entwickelten sich 30 Larven, davon fluoreszierten 6 Larven blau und rot und waren somit doppelt-transgen. Die Larvenentwicklung wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen beobachtet. Nach der Beobachtungsphase wurde der Rumpf für eine spätere Immunhistofärbung fixiert. Keine der 6 mutanten Larven wies nach der Hitzeschockaktivierung von HNF1β Defekte auf (Abb. 28 A und B).

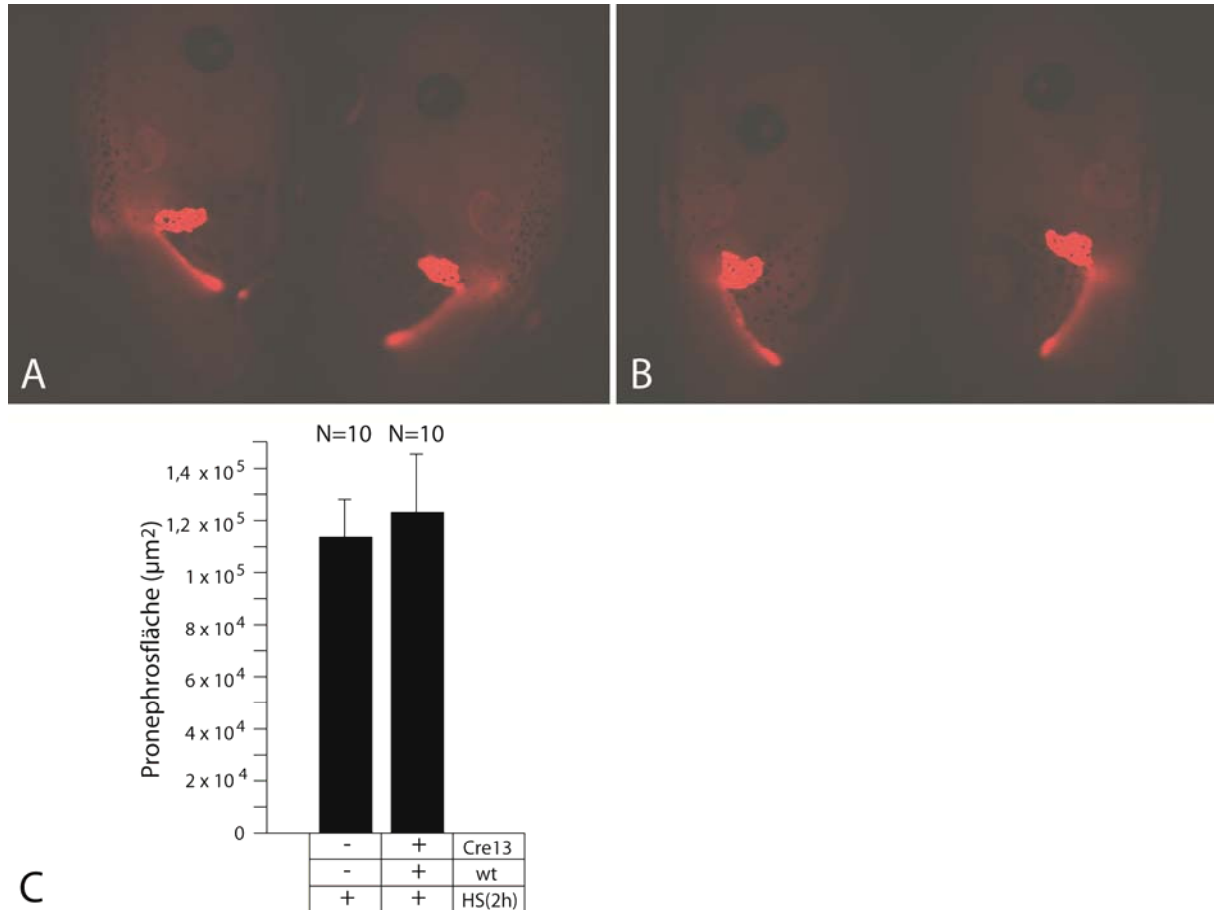


**Abb. 28: Überexpression von HNF1β nach Kreuzung eines des wt-2-Stammes mit dem HSPCre13-Stamm**

Repräsentative Larven aus der Kreuzung eines heterozygoten Weibchens des wt-2-Stammes mit einem heterozygoten HSPCre13-Männchen. Die F1-Nachkommen wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) für 2 h bei 34° C hitzegeschockt und die Larvenentwicklung kontinuierlich beobachtet.

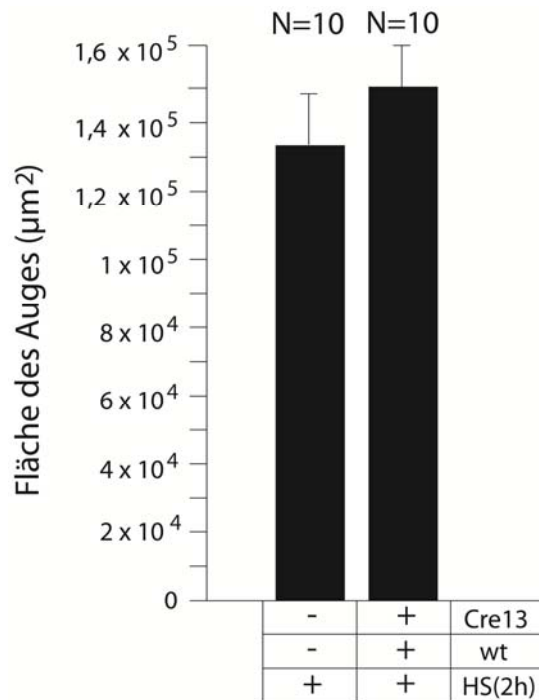
**A:** Larve mit hitzeschockaktiviertem HNF1β. **B:** Larve mit Hitzeschockaktivierung von HNF1β, die weder das Effektortransgen noch das Aktivatortransgen besitzt. HSPCre13 positive Tiere weisen rote Fluoreszenz auf. Die blaue Fluoreszenz markiert die Präsenz des Effektortransgens.

Nach der Immunhistofärbung konnten in Larven mit aktiviertem HNF1 $\beta$  zudem keine Veränderungen der Nierenstruktur (Abb. 29) und der Größe der Augen (Abb. 30) beobachtet werden.



**Abb. 29: Die Überexpression von HNF1 $\beta$  verursacht keine Fehlbildungen des Pronephros nach einer Kreuzung des wt-2-Stammes mit dem HSPCre13-Stamm**

Das Pronephrosgewebe der Larven wurde immunhistochemisch mit zwei Antikörpern, spezifisch für die proximalen Tubuli oder den Ductus sichtbar gemacht. A: Repräsentative Kontroll-Larve B: Mutante Larve. C. Quantifizierung der Pronephrosgröße. Zur Bestimmung der Pronephrosgröße wurde mit dem Computerprogramm AxioVision die Fläche des Ductus und der proximalen Tubuli vermessen.



**Abb. 30: Quantifizierung der durchschnittlichen Augengröße in Mutanten und Kontrollen nach einer Kreuzung des wt-2-Stammes mit dem HSPCre13-Stamm**  
Zur Bestimmung der Augengröße wurde mit dem Computerprogramm AxioVision die Fläche der Augen vermessen.

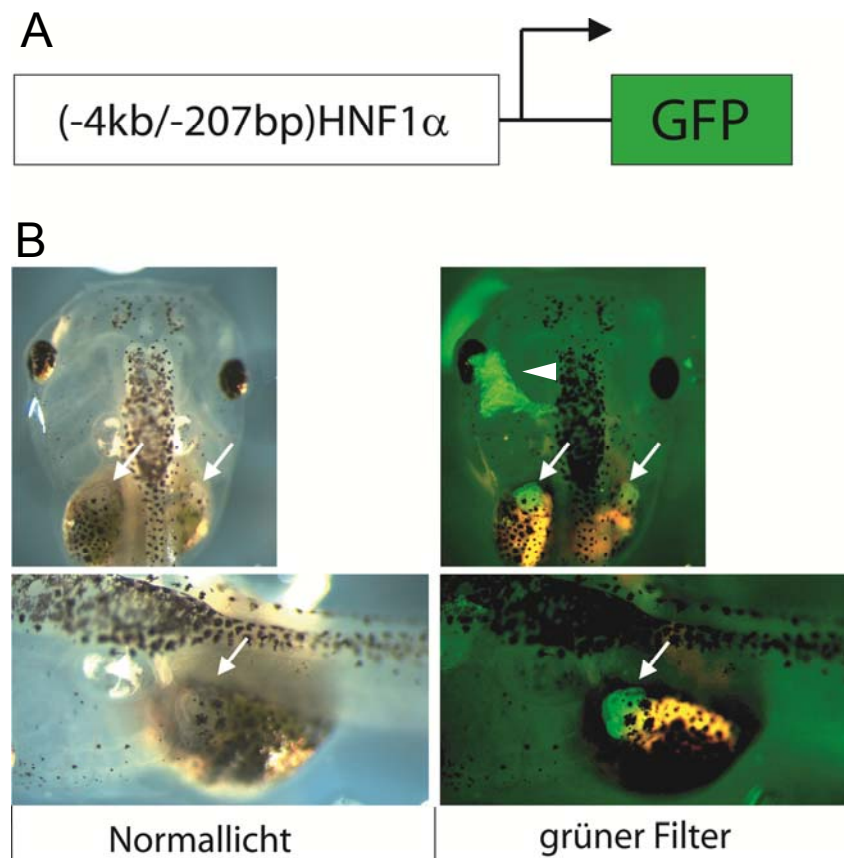
### 3.6 Herstellung von Effektorstämmen zur pronephrospezifischen Überexpression von HNF1 $\beta$

In den zuvor beschriebenen Experimenten wurde der globale Effekt der Überexpression von HNF1 $\beta$ , sowie der beiden mutanten Derivate P328L329del und A263insGG untersucht, indem die Aktivierung im ganzen Tier erfolgte. Neben dem Einfluss auf die Nephrogenese wurden hier auch Defekte beobachtet, die die Entwicklung des Auges, des Magen-Darm-Traktes und der Schwanzregion beeinflussten. Um die Funktion von HNF1 $\beta$  in der Nephrogenese noch spezifischer untersuchen zu können und um Wechselwirkungen mit anderen Effekten der Überexpression von mutiertem HNF1 $\beta$  zu vermeiden, wurden pronephrosspezifische Effektorstämmen generiert. Die Verwendung gewebespezifischer Cre-Aktivatorstämmen ist in dem verwendeten Hitzeschockmodell nicht möglich.

Zu diesem Zweck wurde von einem verkürzten Fragment des *Xenopus* HNF1 $\alpha$ -Promotors Gebrauch gemacht. Der endogene HNF1 $\alpha$ -Promotor ist in *Xenopus* in Organen endodermalen Ursprungs, z.B. der Leber und dem Darm, sowie auch in



Organen mesodermalen Ursprungs, wie der Niere, aktiv (Weber et al., 1996a; Weber et al., 1996b; Pogge von Strandmann et al., 1997). Ein Promotorfragment von -6 kb bis -58 bp, das mit dem grün-fluoreszierenden Markergen GFP (**G**reen **F**luorescent **P**rotein), fusioniert wurde, führt zu einer GFP-Expression in den genannten Organen. Wird dieses Fragment auf -6 kb bis -207 bp verkürzt, ist die GFP-Fluoreszenz auf den Pronephros begrenzt (Ryffel und Lingott, 2000). Für die Herstellung der neuen Effektorstämme wurde das -6 kb -207 bp – Fragment noch einmal auf -3932 bp -207 bp verkürzt. Im Folgenden wird dieses Fragment als (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ -Fragment bezeichnet. Um zu testen, ob dieses Fragment immer noch zu einer pronephrosspezifischen Expression führt, wurde ein (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ :GFP – Konstrukt mit der REMI-Methode in unbefruchtete *Xenopus*-Eier injiziert und die Lokalisation der grünen GFP-Fluoreszenz untersucht.



**Abb. 31: Expression des (-4kb/-207bp):GFP-Konstruktes in einer repräsentativen transgenen Larve**

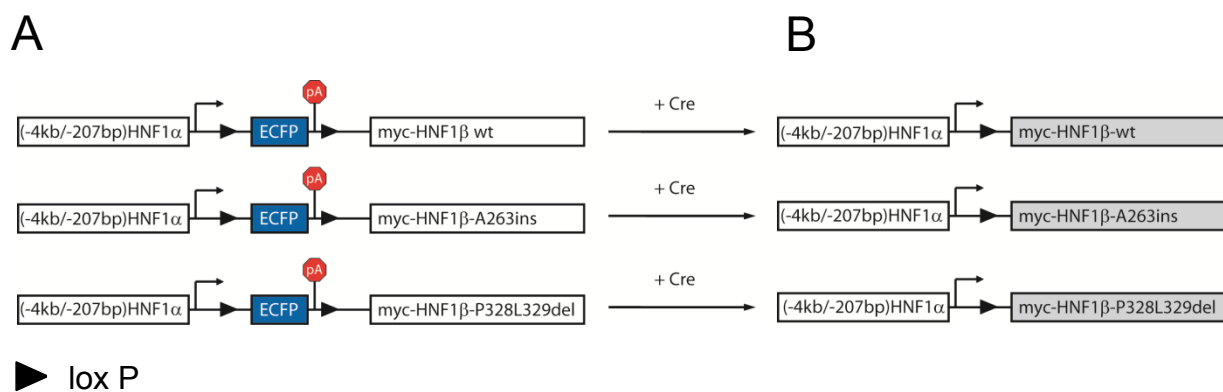
A: Schematische Darstellung des (-4kb/-207bp):GFP-Konstruktes.

B: *oben* Dorsalansicht einer transgenen Larve. *Unten* Lateralansicht derselben transgenen Larve.

Die dargestellte Larve trägt das (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ :GFP-Konstrukt, angezeigt durch grüne Fluoreszenz im Pronephros (*weiße Pfeile*) unter dem grünen Filterset. *weißes Dreieck* grüne Fluoreszenz nicht-integrierten Plasmids.

Insgesamt wurde das Konstrukt in 3000 Eier injiziert. 26 Embryonen entwickelten sich bis zum Schwanzknospenstadium, wovon 4 eine GFP-Expression im Pronephros aufwiesen (Abb. 31). Im Kopfbereich der in Abb. 31 gezeigten Larve war eine zusätzliche GFP-Expression detektierbar (weißes Dreieck). Dies beruht wahrscheinlich auf einer transienten Expression durch nicht-integrierte Plasmid-DNA und sollte in den F1-Nachkommen des Gründertieres nicht mehr vorhanden sein. Somit war das (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ -Fragment geeignet, um pronephrosspezifische Effektorstämme zu generieren.

Zu diesem Zweck wurden drei Konstrukte für die Überexpression von HNF1 $\beta$ , sowie der mutanten Derivate A263insGG und P328L329del kloniert, die in Abb. 32 in ihrem nativen (A) und rekombinierten (B) Zustand dargestellt sind.



**Abb. 32: Schematische Darstellung der neuen Effektorkonstrukte für die gewebespezifische Überexpression verschiedener HNF1 $\beta$ -Derivate**

A: Die neuen Effektor-Konstrukte in nativem Zustand. Ein nierenspezifisches Fragment des HNF1 $\alpha$ -Promotors steuert die Expression des blau fluoreszierenden Proteins (ECFP). Das ECFP-Gen und der stromabwärts integrierte Terminationsstopp sind durch loxP-Sequenzen (schwarzes Dreieck) flankiert und können durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden.

B: Das Effektor-Konstrukt in rekombiniertem Zustand. Durch die Rekombination werden die induzierbaren HNF1 $\beta$ -Derivate unter die direkte Kontrolle des HNF1 $\alpha$ -Promotorfragmentes gestellt und somit exprimiert.

Wie bereits unter 3.2 und Abb. 8 beschrieben, detektiert auch hier das ECFP-Markergen die Präsenz des Transgens. Stromabwärts des ECFP ist der Terminationsstopp integriert, der die Expression der HNF1 $\beta$ -Derivate verhindert. Das ECFP-Gen und der Terminationstopp sind auch hier durch loxP-Sequenzen flankiert und können nach Kreuzung mit einem Aktivatorstamm durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten werden. Nach einer erfolgreichen Rekombination wird die

Expression des GOI, das entweder für HNF1 $\beta$ , die A263insGG- oder die P328L329-Mutation kodiert, aktiviert.

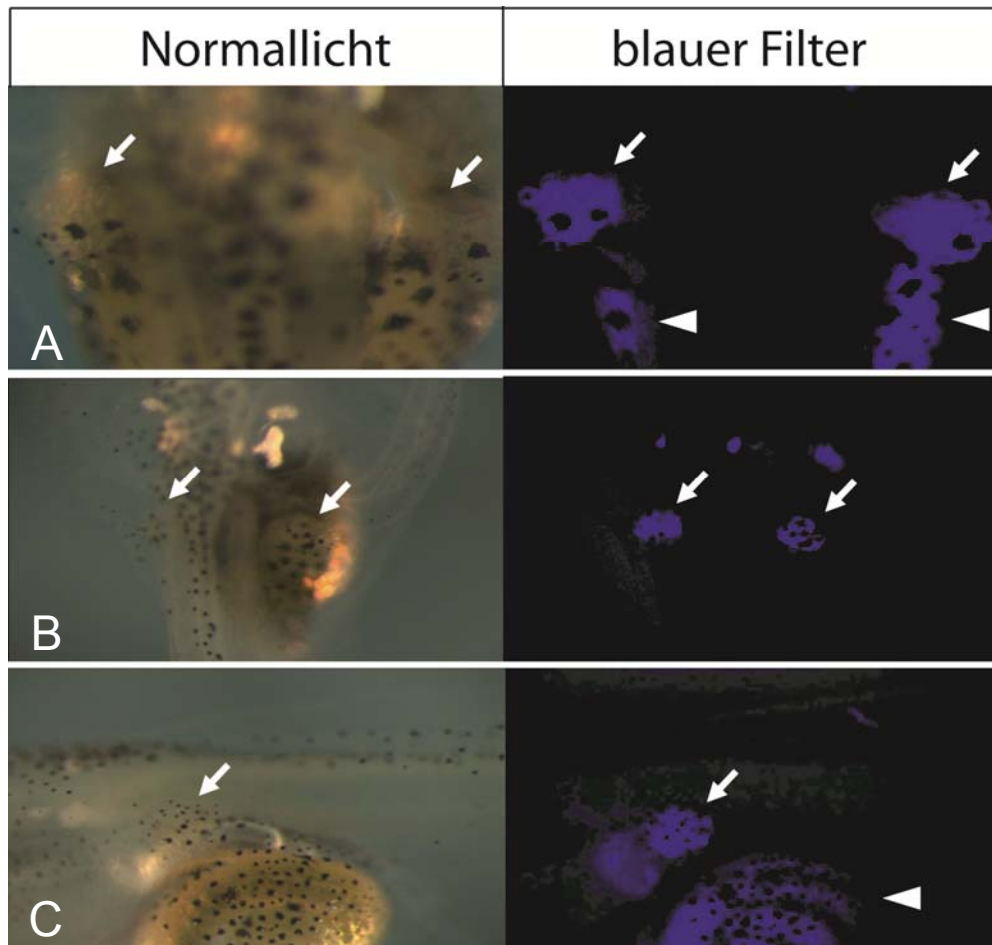
### **3.6.1 Herstellung transgener Tiere für die pronephrosspezifischen Effektorstämme HNF1 $\alpha$ -wt, HNF1 $\alpha$ -A263insGG und HNF1 $\alpha$ -del**

Die drei Effektorstrukturen wurden einzeln mit der I-SceI-Meganuklease-Methode in befruchtete *Xenopus*-Eier injiziert. Die Ergebnisse der Injektionen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die effizientere I-SceI-Meganuklease-Methode wurde verwendet, da die Transgenese-Effizienz nach Injektion des (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ -Fragmentes mit der REMI-Methode nur 0,1 % betrug und damit sehr niedrig war.

**Tabelle 6: Zusammenstellung der potentiellen Gründertiere für die pronephrosspezifischen Effektorstämme**

Stamm	Anzahl injizierte Eier	Anzahl Larven	Anzahl transgene Larven	Gründertiere
HNF1 $\alpha$ -wt	3153	503	25	8
HNF1 $\alpha$ -A263insGG	4350	367	26	24
HNF1 $\alpha$ -del	2818	409	25	8

Für alle drei Effektorstrukturen konnten transgene Larven generiert und zu adulten Fröschen aufgezogen werden (Tabelle 6). Abb. 33 zeigt repräsentative Gründertiere des HNF1 $\alpha$ -wt- (A), des HNF1 $\alpha$ -A263ins- (B) und des HNF1 $\alpha$ -del-Stammes (C) mit pronephrosspezifischer blauer Fluoreszenz.



**Abb. 33: Repräsentative Gründertiere für die Herstellung der pronephrosspezifischen Effektorstämme HNF1 $\alpha$ -wt, -A263ins und -del**

A: HNF1 $\alpha$ -wt. B: HNF1 $\alpha$ -A263insGG. C (Lateralansicht): HNF1 $\alpha$ -del. *weiße Pfeile* Pronephros *weiße Dreiecke* Autofluoreszenz des Darms.

### 3.6.2 Weitergabe des jeweiligen Effektortransgens potentieller Gründertiere für die neuen Effektorstämme

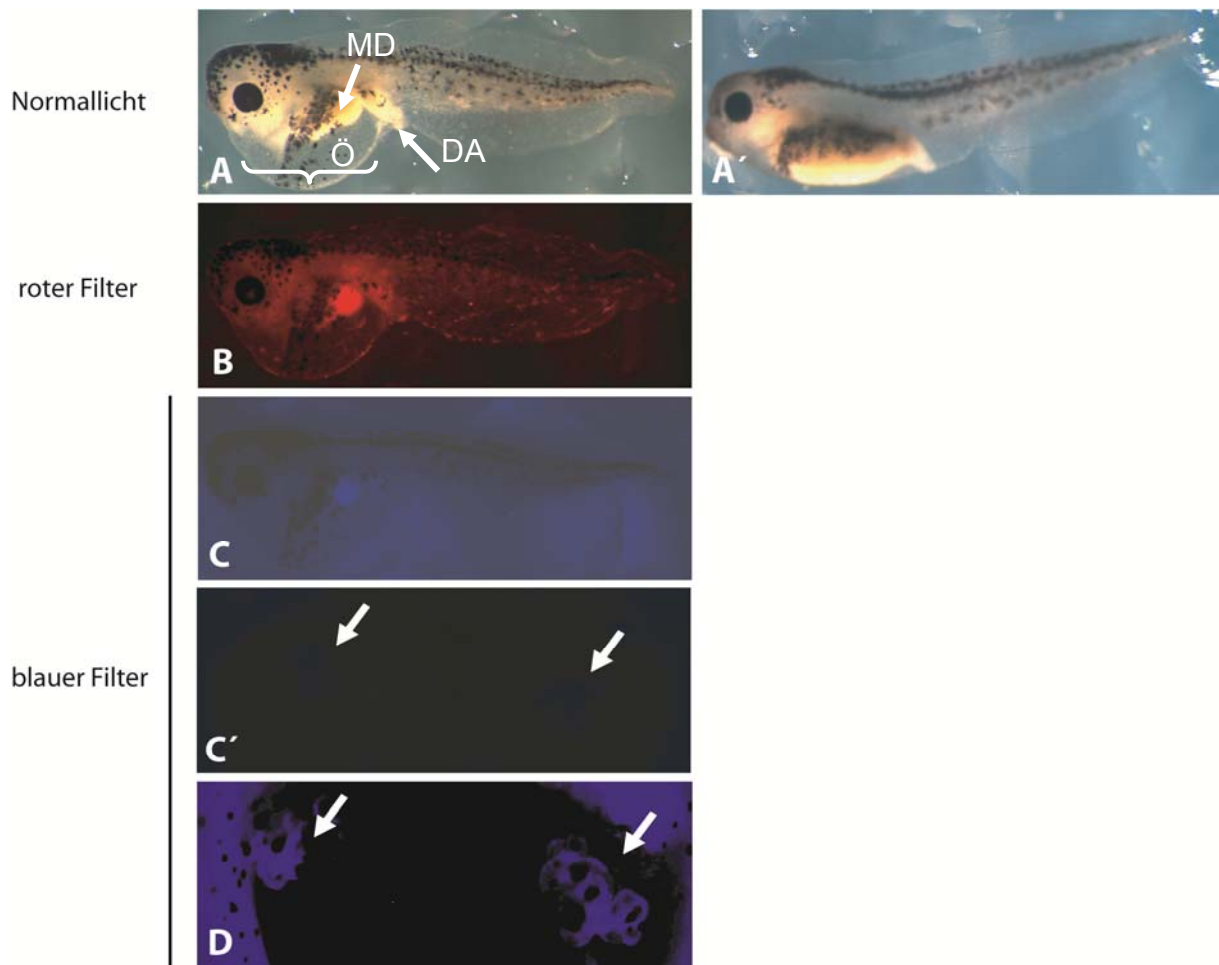
Nach Erreichen der Geschlechtsreife nach etwa 1-2 Jahren wurden die potentiellen Gründertiere für die pronephrosspezifischen Effektorstämme auf die Weitergabe des Effektortransgens getestet. Dies waren zehn geschlechtsreife Gründer-Weibchen, die jeweils entweder das (4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ :ECFP:HNF1 $\beta$ -wt, -A263insGG oder das -P328L329del-Transgen enthielten (Tabelle 7). Die restlichen der insgesamt 40 Gründertiere hatten entweder die Geschlechtsreife noch nicht erreicht, oder es handelte sich um geschlechtsreife männliche Tiere, die für dieses Experiment hätten getötet werden müssen, um mit den Spermien entsprechende Weibchen *in vitro* zu befruchten. Die F1-Nachkommen eines Gründer-Männchens sind nach etwa einem Jahr geschlechtsreif und hätten erst dann für weitere Experimente verwendet werden

können. Daher wurden zunächst die geschlechtsreifen Weibchen verwendet, die alle 4 Monate durch eine Hormoninjektion zur Eiablage stimuliert werden können. Jedes dieser zehn Weibchen wurde mit Spermien eines heterozygoten HSPCre13-Männchens befruchtet. Bei Weitergabe eines Effektortransgens sollten 25 % der F1-Larven der entsprechenden Kreuzung beide Transgene enthalten. Die F1-Larven wurden anschließend in der späten Gastrula (Stadium 11) für 2 h bei 34° C hitzegeschockt. Somit konnte in diesem Experiment einerseits getestet werden, ob die potentiellen Gründertiere ihr jeweiliges Effektortransgen vererbten, andererseits bestand parallel die Möglichkeit, in demselben Experiment Effekte der pronephrospezifischen Überexpression von HNF1 $\beta$ -wt, -A263insGG oder – P328L329del zu analysieren.

**Tabelle 7: Zusammenstellung der getesteten Gründertiere**

Bezeichnung	Weitergabe des Effektortransgens an die F1-Generation
HNF1 $\alpha$ -wt-1	nein
HNF1 $\alpha$ -wt-2	nein
HNF1 $\alpha$ -wt-3	nein
HNF1 $\alpha$ -wt-4	ja (PCR)
HNF1 $\alpha$ -A263insGG-1	nein
HNF1 $\alpha$ -A263insGG-2	nein
HNF1 $\alpha$ -del-1	ja (PCR)
HNF1 $\alpha$ -del-2	nein
HNF1 $\alpha$ -del-3	nein

Nach der Kreuzung und dem anschließenden Hitzeschock wiesen 5 von 24 Nachkommen des HNF1 $\alpha$ -wt-4-Gründertieres als freischwimmende Larven (Stadium 46) Ödeme, sowie Fehlbildungen des Magen-Darm-Traktes auf (Abb. 34 A). Die Augen waren normal entwickelt. Alle 5 Larven fluoreszierten rot und waren somit positiv für das Cre13-Transgen (Abb. 34 B). Allerdings konnte in diesen Larven keine blaue Fluoreszenz im Pronephros detektiert werden (Abb. 34 C und C'). In 4 Larven, die nicht rot fluoreszierten war jedoch eine blaue Fluoreszenz im Pronephros sichtbar (Abb. 34 D).



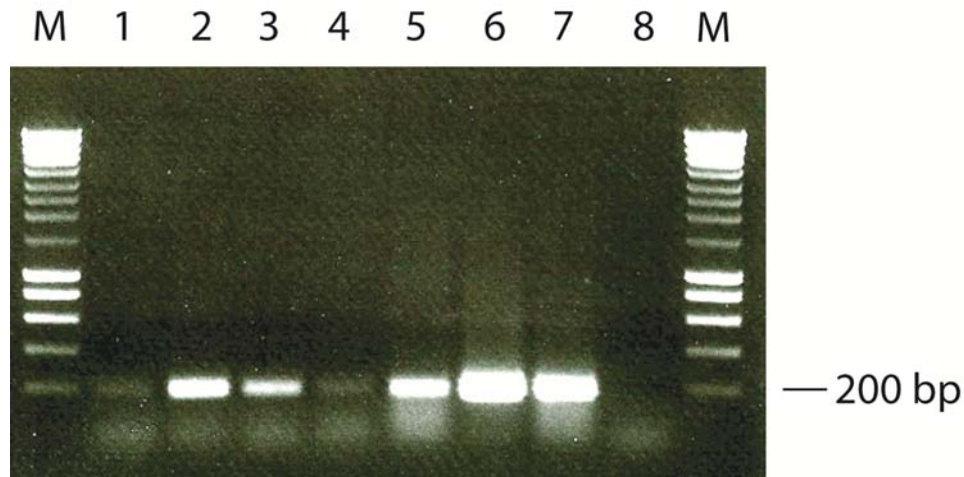
**Abb. 34: Effekt der pronephrosspezifischen Überexpression von HNF1 $\beta$ -wt auf die Larvenentwicklung.**

Repräsentative Larven aus der Kreuzung des heterozygoten Gründerweibchens HNF1 $\alpha$ -wt-4 mit einem heterozygoten HSPCre13-Männchen. Die F1-Nachkommen wurden in der späten Gastrula (Stadium 11) für 2 h bei 34° C hitzegeschockt und die Larvenentwicklung kontinuierlich beobachtet.

**A:** Phänotyp einer Larve mit hitzeschockaktiviertem HNF1 $\beta$ -wt. *weiße Pfeile:* MD (abnormaler Magen-Darm-Trakt ohne die typischen Windungen); DA (verdickter Darmausgang); *geschweifte Klammer:* Ö (Ödem) **A':** Repräsentative hitzegeschockte Kontrollarve ohne Aktivator- und Effektortransgen. **B:** Die rote Fluoreszenz in demselben Tier (**A**) zeigt die Präsenz des HSPCre13-Transgens. **C, C':** Die Larve unter dem ECFP-spezifischen Filterset. **C':** Vergrößerter Ausschnitt der Nierenregion. Es war keine blaue Fluoreszenz im Pronephros sichtbar. **D:** Vergrößerter Ausschnitt der Nierenregion einer repräsentativen Cre-negativen Larve mit blauer, pronephrosspezifischer Fluoreszenz. *Weiße Pfeile* in C' und D: Pronephros.

Eine PCR-Analyse der Schwanzspitzen-DNA der mutanten Larven für das Effektortransgen zeigte jedoch die Präsenz des Effektortransgens in allen 5 Cre-positiven Larven, die Ödeme und Fehlbildungen entwickelt hatten (Abb. 35). Das schwächere Signal der Spuren 1 und 4 könnte ein Hinweis darauf sein, dass in diesen Larven schon mehr Genkopien rekombiniert sind, d.h. es hat eine Exzision

des ECFP-Genes stattgefunden, als in den anderen Larven. Es ist bekannt, dass transgene Tiere zwischen 5 und 35 Genkopien pro Zelle enthalten können (Kroll und Amaya, 1996; Marsh-Armstrong et al., 1999). Ein Grund für das Fehlen der ECFP-Fluoreszenz in den Larven könnte darin bestehen, dass nach erfolgreicher Rekombination das ECFP-Gen vollständig ausgeschnitten und somit nicht mehr in ausreichendem Maße exprimiert wird.



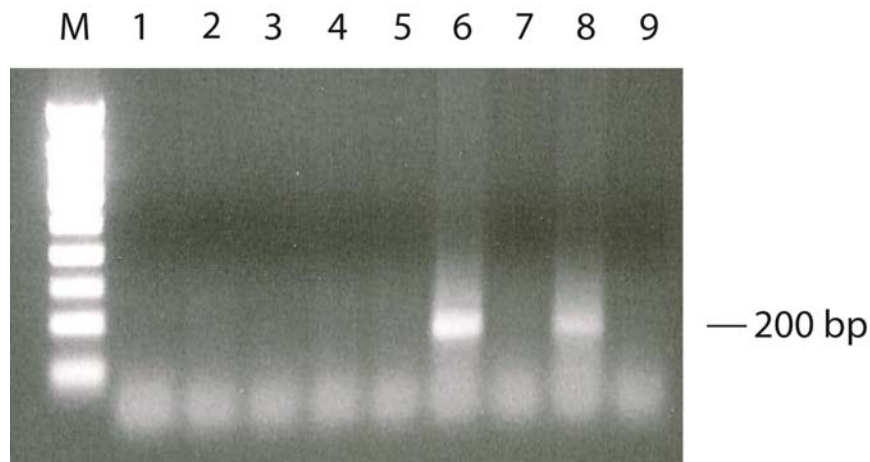
**Abb. 35: PCR-Analyse der Nachkommen des Gründertieres HNF1 $\alpha$ -wt-4**

Amplifiziert wurde ein 200 bp langes Fragment des im Effektorkonstrukt vorhandenen ECFP-Markergens.

Die Spuren 1-5 entsprechen der DNA der 5 Larven, die nach Hitzeschockaktivierung des HNF1 $\beta$ -wt-Derivates Ödeme und Fehlbildungen aufwiesen. 6: HNF1 $\alpha$ :ECFP:HNF1 $\beta$ -wt-Plasmid (1 ng). 7: Positiv-Kontrolle (ECFP-positive Larve des C5-Reporterstammes). 8: H<sub>2</sub>O-Kontrolle. M: Marker.

Auch in den Nachkommen des HNF1 $\alpha$ -del-1-Gründertieres konnte die Weitergabe des Effektortransgens in 2 von insgesamt 16 Cre-positiven, rot fluoreszierenden Larven durch die PCR-Analyse bestätigt werden (Abb. 36). Alle 16 Larven entwickelten sich normal und wiesen keinen Phänotyp auf.

Somit konnten zwei gewebespezifische Effektorstämme etabliert werden, der HNF1 $\alpha$ -del-1-Stamm und der HNF1 $\alpha$ -wt-4-Stamm (Tabelle 7). Die Tiere des HNF1 $\alpha$ -del-Stammes wiesen nach Hitzeschockaktivierung des HNF1 $\alpha$ -del-Transgens keinen Phänotyp auf. Es muss jedoch noch weiter analysiert werden, ob die Rekombination des Effektortransgens in diesem Stamm effizient erfolgt. Mutante Tiere des HNF1 $\alpha$ -wt-4-Stammes wiesen nach Hitzeschockaktivierung des HNF1 $\beta$ -wt-Transgens einen Phänotyp auf.



**Abb. 36: PCR-Analyse der Nachkommen des Gründertieres HNF1 $\alpha$ -del-1**

Amplifiziert wurde ein 200 bp langes Fragment des in den Effektoronstrukten vorhandenen ECFP-Markergens.

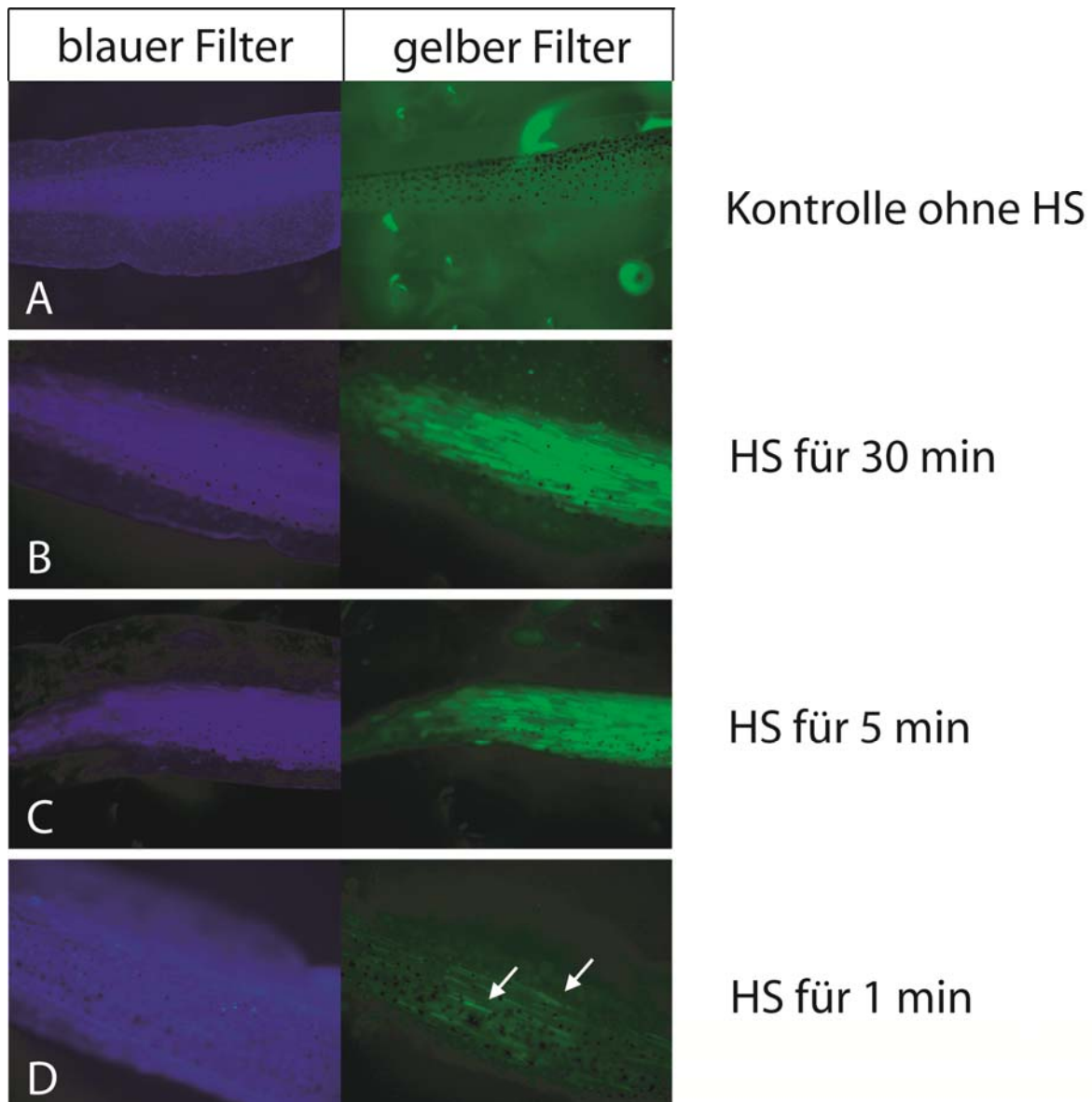
Die Spuren 1-9 entsprechen Cre-positiven Nachkommen des HNF1 $\alpha$ -del-1 Gründertieres. 2 der Larven (6 und 8) wurden positiv für das Effektor-Transgen getestet.

### 3.7 Laserinduzierte Hitzeschockaktivierung von Genen

Eine weitere Möglichkeit Gene gewebespezifisch zu aktivieren, besteht in der Induktion eines lokalen Hitzeschocks durch Laserlicht. Dadurch wird die Cre-Rekombinase des entsprechenden HSPCre-Stammes nur lokal aktiviert. Diese Methode wurde bereits für *Drosophila*, den Schmetterling *Bicyclus anynana* und den Zebrafisch beschrieben. Ein Vorteil der Methode ist, dass hier für die gewebespezifische Aktivierung bestimmter Gene kein eigener transgener Stamm benötigt wird, sondern der Laserstrahl gezielt auf definierte Gewebe, bzw. Zellen ausgerichtet werden kann.

Um diese Methode in unserem System zu testen, schien der C5-Stamm mit dem induzierbaren EYFP-Reportergen gut geeignet. Transkripte des durch die Cre-Rekombinase aktivierten EYFP-Reportergens sind bereits 1 h nach einem einstündigen Hitzeschock detektierbar (vgl. Abb. 6, S. 40). Die gelbe EYFP-Fluoreszenz ist im Regelfall etwa 5 Tage nach Hitzeschockaktivierung im gesamten Tier unter dem gelben Filterset sichtbar (Abb. 37 A-D). In den mehrkernigen Schwanzmuskelzellen ist eine Induktion der gelben Fluoreszenz auch dann detektierbar, wenn der Zeitraum der Hitzeschockaktivierung des EYFP-Gens auf 30 min (Abb. 37 B) oder auf 5 min (Abb. 37 C) verkürzt wird. Auch ein einminütiger Hitzeschock reicht hier noch aus um die EYFP-Expression in einzelnen Schwanzmuskelzellen zu induzieren (Abb. 37 D).



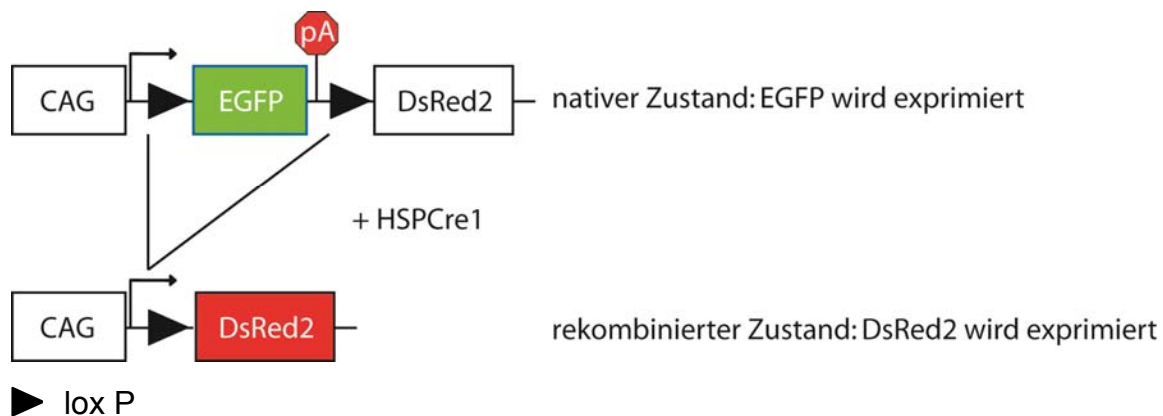


**Abb. 37: Induktion der gelben EYFP-Fluoreszenz nach Verkürzung des Hitzeschocks nach einer Kreuzung des HSPCre1-Stammes mit dem C5-Reporterstamm**

A: Doppelt transgene, nicht-hitzegechockte Larve. B-D: Doppelt-transgene Larven, die unterschiedlich lange hitzegechockt wurden. *Blauer Filter* ECFP-Fluoreszenz *gelber Filter* EYFP-Fluoreszenz. *Weißer Pfeile* EYFP-Induktion in einzelnen Schwanzmuskelzellen. HS=Hitzeschock.

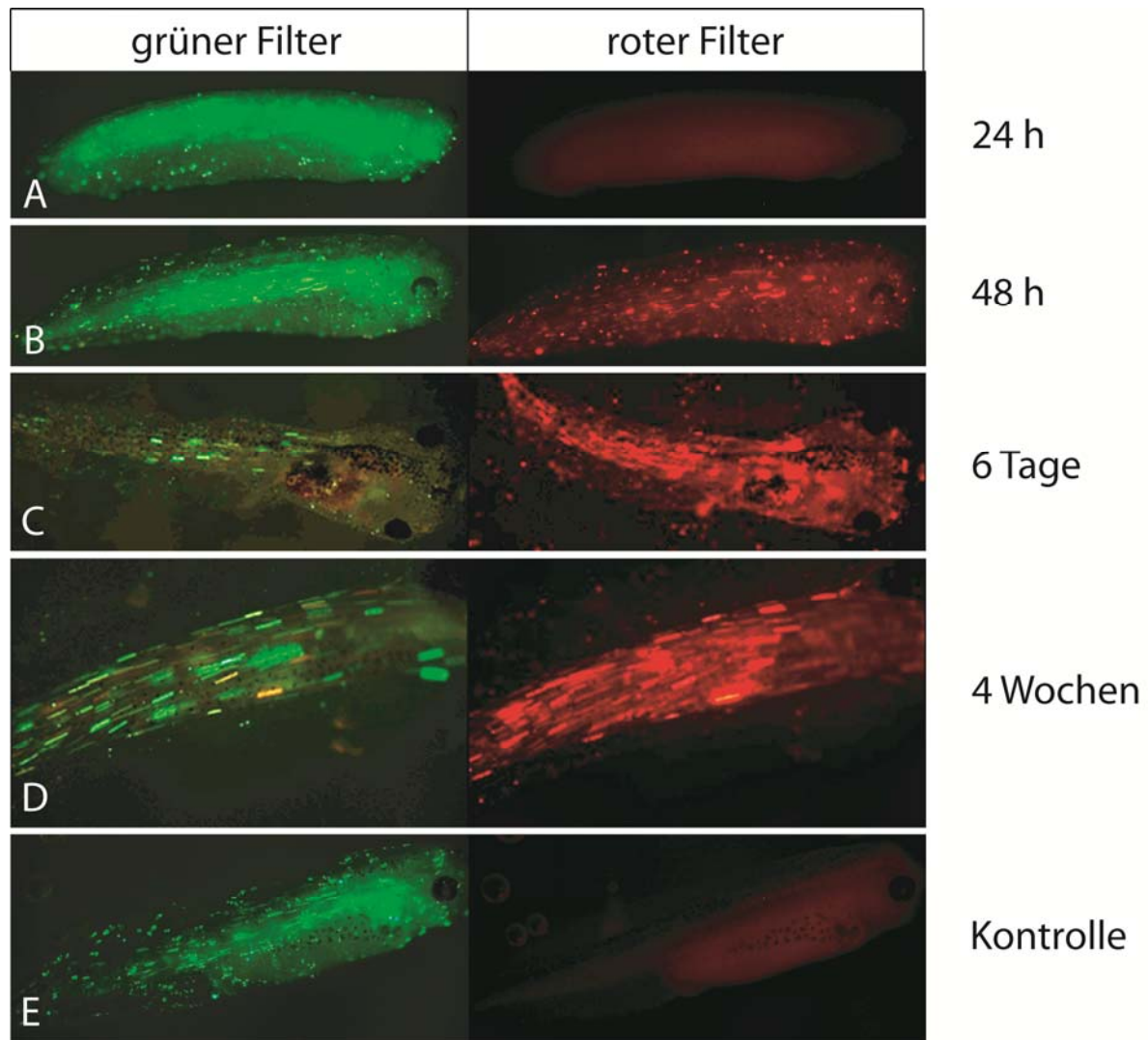
Um zu testen ob andere Fluoreszenzproteine nach der Hitzeschockaktivierung u.U. noch besser zu detektieren sind, wurde von dem G/R-Reporterstamm mit induzierbarer roter Fluoreszenz Gebrauch gemacht (Waldner et al., 2006). Die rote Fluoreszenz lässt sich aufgrund ihrer Wellenlänge besser durch den entsprechenden Filter von der grünen GFP-Fluoreszenz des Markergens dieses Stammes trennen und ist deshalb möglicherweise eher detektierbar als die EYFP-Fluoreszenz. Tiere des G/R-Reporterstammes enthalten als Transgen das CAG:EGFP(loxP):DsRed2-

Konstrukt (Abb. 38). In diesem Stamm steuert der ubiquitär aktive CAG (CMV Enhancer/ chicken  $\beta$ -actin)-Promotor (Sakamaki et al., 2005) die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins EGFP (**E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein). Nach Aktivierung der Cre-Rekombinase erfolgt die Exzision des EGFP-Gens und das induzierbare, rot-fluoreszierende DsRed2-Gen wird exprimiert.



**Abb. 38: Schematische Darstellung des in Tieren des G/R-Stammes vorhandenen G/R-Reporterkonstruktes in nativem und rekombiniertem Zustand.**

Es wurde ein Weibchen des G/R-Reporterstammes mit den Spermien eines HSPCre1-Männchens *in vitro* befruchtet und die Nachkommen für 1 h bei 34° C hitzegeschockt. Wie in Abb. 39 B gezeigt, konnte die rote DsRed-Fluoreszenz bereits 48 h nach dem Hitzeschock- und somit deutlich früher als das EYFP des C5-Stammes- detektiert werden. Im weiteren Zeitverlauf nahm die Fluoreszenz weiter zu (Abb. 39 C und D). Allerdings wies die DsRed-Expression im Gegensatz zur EYFP-Expression kein homogenes Muster, sondern eine mosaikartige Expression auf, d.h. DsRed wurde nicht in allen Zellen exprimiert. Aufgrund seiner Mosaik-Expression ist der verwendete G/R-Reporterstamm für Laserexperimente zur zellspezifischen Genaktivierung nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde der C5-Stamm für die folgenden Laserexperimente verwendet.



**Abb. 39: Kreuzung des G/R-Reporterstammes mit dem HSPCre1-Aktivatorstamm**

Doppelt transgene Nachkommen einer Kreuzung eines HSPCre1-Männchens mit einem G/R-Reporter-Weibchen. A-D: Doppelt transgene, hitzegeschockte Larven (1 h bei 34° C) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Hitzeschock. E: Doppelt transgene, nicht hitzegeschockte Kontrolllarve. *Grüner Filter* EGFP-Fluoreszenz *roter Filter* DsRed2-Fluoreszenz.

Es wurde ein heterozygotes Weibchen des C5-Reporterstammes mit den Spermien eines ebenfalls heterozygoten HSPCre1-Männchens *in vitro* befruchtet (vgl. Abb. 5, S. 38) und die Nachkommen bis zum Schwanzknospenstadium (Stadium 26) aufgezogen.

Tabelle 8 illustriert die gewählten Parameter, d.h. die Intensität und Dauer, der Laserbestrahlung. Die Bestrahlung mit einem Infrarot-Diodenlaser (s. auch Kapitel 2.8, S. 34) erfolgte im Schwanzbereich der Larven, wobei der Laserstrahl auf einen Punkt mit etwa 200 µm Durchmesser fokussiert wurde (Abb. 40). Die Anwendung

verschiedener Kombinationen von Intensität und Bestrahlungsdauer sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Cre-abhängige Aktivierung des EYFP-Reportergenes des C5-Reporterstammes durch einen lokalen Hitzeschock mittels Laserbestrahlung in *Xenopus laevis* möglich ist.

**Tabelle 8: Parameter der Laserbestrahlung**

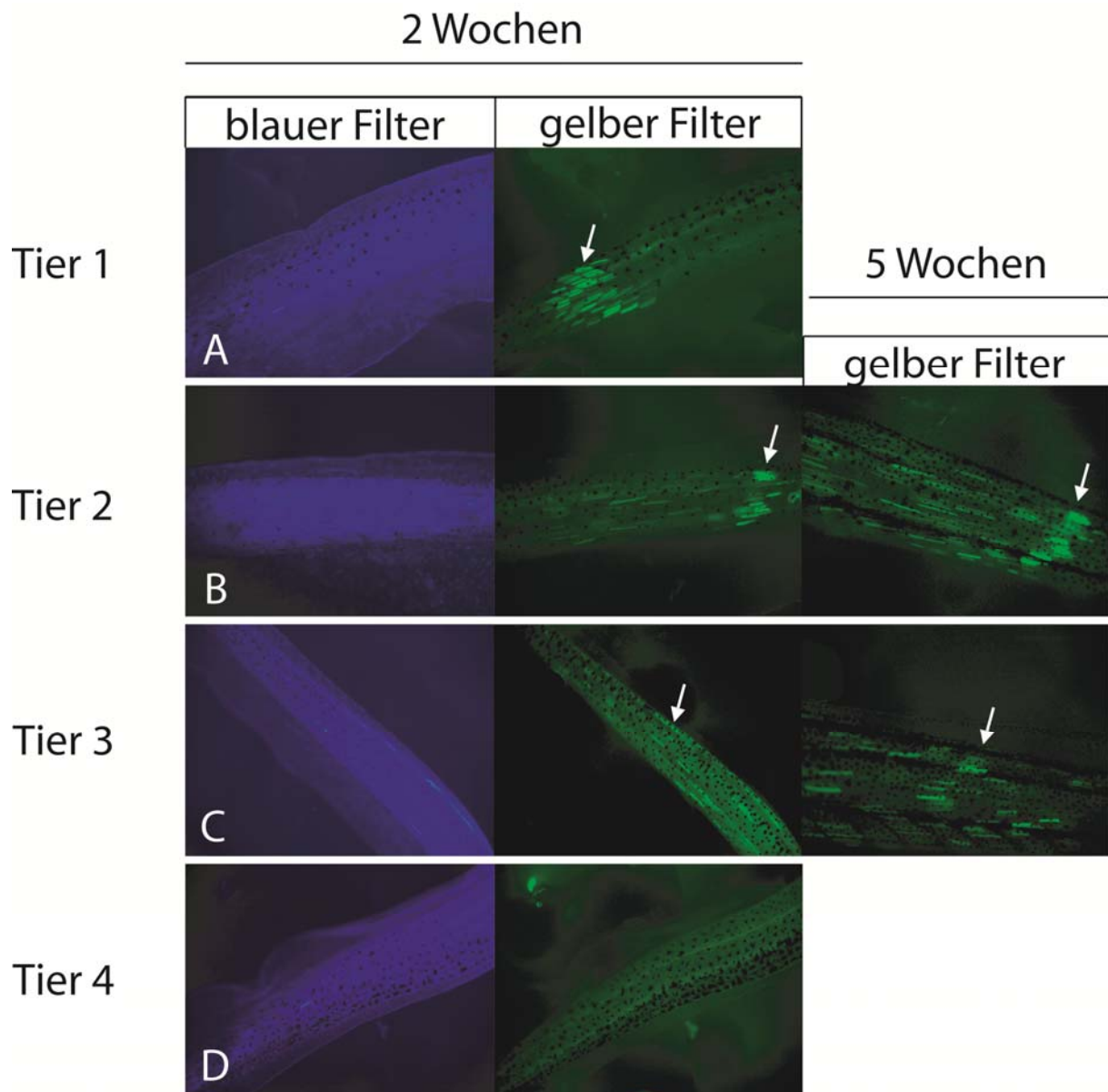
Intensität (mW)	Bestrahlungsdauer	bestrahlte Larven (N)	überlebende Larven		Larven mit EYFP-Expression (N)
			nach 48 h	nach 2 Wochen	
2000	1 x 0,2 s	10	10	8	6
2000	1 x 1 s	4	2	2	0
110	1 x 9 s	5	5	4	1
100	1 x 9 s	10	10	7	1
100	3 x 9 s	8	8	6	3
100	6 x 9 s	8	6	5	2



**Abb. 40: Laserbestrahlung im Schwanzbereich**  
Der rote Kreis markiert die Lokalisation des Laserstrahls.

48 h nach der Bestrahlung betrug die Überlebensrate der Larven 96 %, zwei Wochen nach der Bestrahlung 71 % der anfänglichen Zahl von 45 Larven. Diese Überlebensraten liegen im Normbereich. Somit hatte die Bestrahlung keine letalen Auswirkungen auf die Tiere. 45 der insgesamt 98 bestrahlten Tiere wiesen als freischwimmende Larven die blaue ECFP-Fluoreszenz auf. Zwei Wochen nach der Bestrahlung war in 13 der 45 bestrahlten Tiere die gelbe EYFP-Fluoreszenz in einzelnen Schwanzmuskelzellen zu erkennen (Tabelle 8 und Abb. 41 A-C). Die 13 Tiere wurden mit einer PCR-Analyse der Schwanzspitzen-DNA als Cre-positiv

identifiziert. Die gelbe Fluoreszenz war auch 5 Wochen nach der Bestrahlung präsent und nahm teilweise noch an Intensität zu (Abb. 41 B und C).

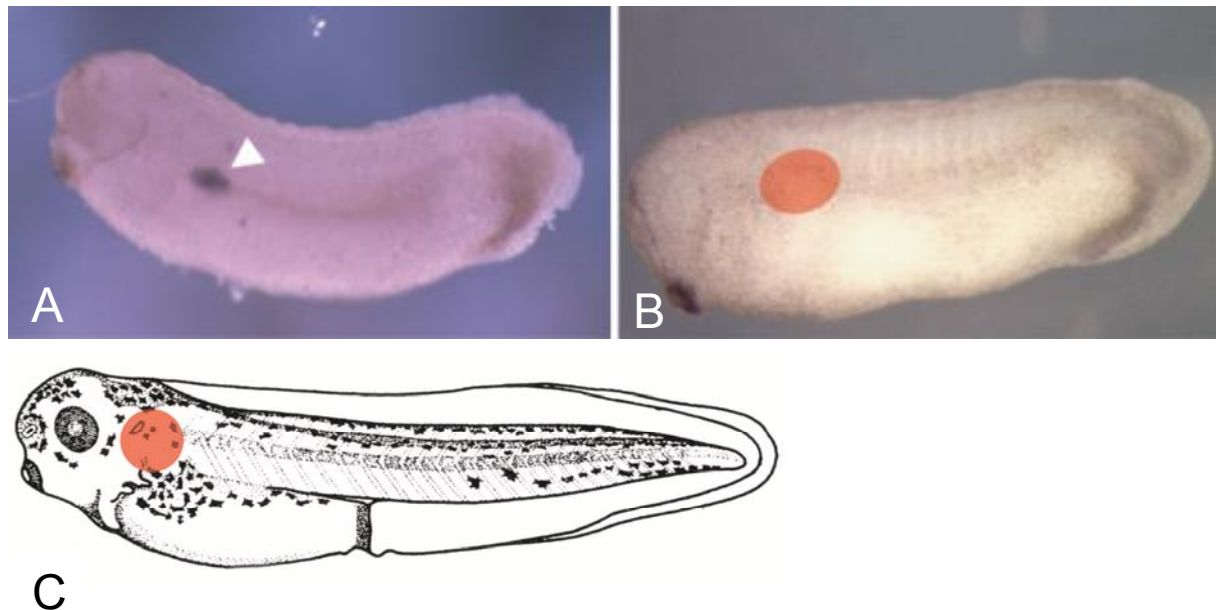


**Abb. 41: Lokale Hitzeschockaktivierung des induzierbaren EYFP-Genes im C5-Reporterstamm nach einer Kreuzung mit dem HSPCre1-Stamm**

Repräsentative F1-Larven der Kreuzung eines heterozygoten HSPCre1-Männches mit einem heterozygoten C5-Weibchen, die im freischwimmenden Larvenstadium einer Laserbestrahlung unterzogen wurden. A: EYFP-Fluoreszenz zwei Wochen nach der Bestrahlung. B und C: EYFP-Fluoreszenz zwei und fünf Wochen nach der Bestrahlung. D : Bestrahlte Cre-negative Larve ohne EYFP-Induktion (Kontrolle). Die *weißen Pfeile* markieren einzelne EYFP-exprimierende Schwanzmuskelnzellen.

Wie in Tabelle 8 gezeigt, reichte bereits eine Bestrahlungsdauer von 0,2 s bei 2000 mW aus, um das EYFP-Gen zu aktivieren. Grundsätzlich funktionierte somit die laserinduzierte Aktivierung des EYFP-Gens des C5-Reporterstammes.

Im Folgenden wurde versucht, eine pronephrosspezifische Induktion des EYFP-Gens zu erreichen. Es wurde die gleiche Kreuzung wie oben beschrieben durchgeführt und die Embryonen dieses Mal entweder bis zum frühen Schwanzknospfenstadium (Stadium 26) oder bis zum freischwimmenden Larvenstadium (Stadium 40) aufgezogen. In Stadium 26 existieren lediglich die Vorläuferzellen der frühen Pronephrosanlage. Dieser ca. 100 µm große Bereich wurde bei den entsprechenden Larven (N=30) mit dem Laser (5 s bei 100 mW) bestrahlt (Abb. 42 A und B). Eine geringe Strahlungsintensität mit verhältnismäßig langer Dauer der Bestrahlung wurde einer hohen Intensität mit sehr kurzer Bestrahlungsdauer (0,2 s bei 2000 mW) vorgezogen, da eine Intensität von 2000 mW bei Bestrahlung des kleinen Bereiches der Pronephrosanlage zu Gewebeschädigungen führte. Die Bestrahlung erfolgte in jedem Tier auf einer Seite, so dass die unbestrahlte Seite in ein und demselben Tier als Kontrolle diente.



**Abb. 42: Laserbestrahlung im Bereich der Pronephrosanlage (A und B) und des ausdifferenzierten Pronephros (C)**

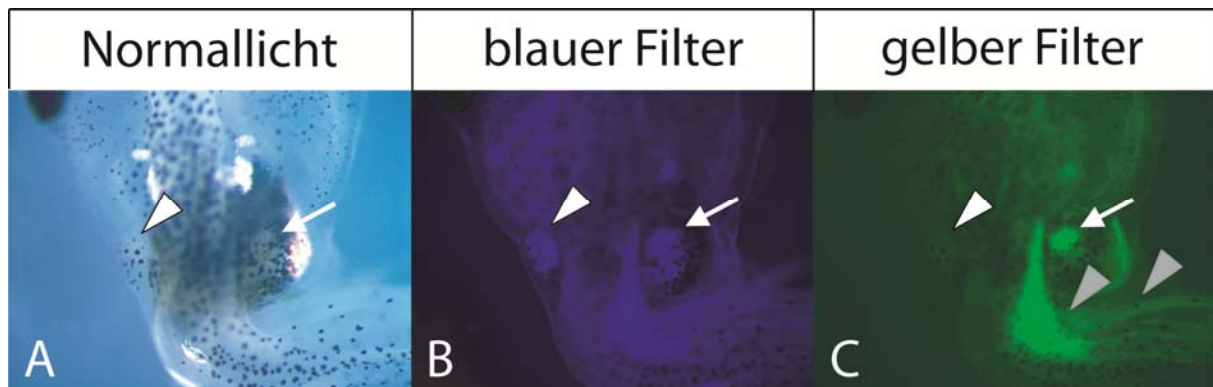
A: Durch *in situ*-Hybridisierung für HNF1 $\beta$  markierte Pronephrosanlage (modifiziert nach Rosengarten, 2006).

B: Larve in Stadium 26.

C: Schematische Darstellung einer freischwimmenden Larve in Stadium 40.

Die roten Kreise markieren die Lokalisation des Laserstrahls.

In Stadium 40 ist der Pronephros bereits vollständig entwickelt und beginnt seine exkretorische Funktion aufzunehmen. Der Laserstrahl konnte in Larven in diesem Stadium exakt auf den Pronephros ausgerichtet werden. Die Bestrahlung erfolgte auch hier bei 30 Larven für 5 s bei 100 mW auf einer Seite (Abb. 42 C). Von den 30 in Stadium 26 bestrahlten Larven wiesen 14 Larven blaue Fluoreszenz auf und waren somit positiv für das C5-Transgen. Bei keiner der Larven war über einen Beobachtungszeitraum von 8 Wochen die Induktion der gelben EYFP-Fluoreszenz detektierbar, obwohl 8 der 14 ECFP-positiven Larven gleichzeitig durch PCR-Analyse als Cre-positiv identifiziert wurden. Von den 30 in Stadium 40 bestrahlten Larven wiesen 16 Larven die blaue ECFP-Fluoreszenz auf und 7 davon wurden als Cre-positiv identifiziert.



**Abb. 43: Pronephrosspezifische EYFP-Induktion nach der Hitzeschockaktivierung durch Laserbestrahlung in einer in Stadium 40 bestrahlten Larve**

A: Larve unter Normallicht. B: Dieselbe Larve unter dem ECFP-spezifischen Filterset. C: Dieselbe Larve unter dem EYFP-spezifischen Filterset. *Weißer Pfeil* bestrahlter rechter Pronephros. *Weißes Dreieck* unbestrahlter linker Pronephros. *Graue Pfeile* EYFP-Fluoreszenz im Schwanzbereich.

In einer der 7 sowohl ECFP- als auch Cre-positiven Larven war die Induktion der gelben EYFP-Fluoreszenz im Pronephros der bestrahlten rechten Seite detektierbar (Abb. 43 C, weißer Pfeil). Auf der unbestrahlten Seite fluoreszierte der Pronephros nicht gelb (Abb. 43 C, weißes Dreieck). Somit hatte in dieser Larve die pronephrosspezifische Induktion des EYFP-Reportergens funktioniert. Zusätzlich zur pronephrosspezifischen EYFP-Fluoreszenz war auch im Schwanzansatz gelbe Fluoreszenz detektierbar (Abb. 43 C). Dies ist dadurch zu erklären, dass neben den Vorläuferzellen des Pronephros die Cre-Rekombinase auch in einzelnen Schwanzmuskelzellen aktiviert wurde und diese somit ebenfalls das EYFP-Gen exprimierten.

Grundsätzlich ist es somit auch in *Xenopus laevis* möglich, die Expression eines Gens mittels Laserlicht lokal zu aktivieren. Diese Methode muss allerdings in Zukunft weiter optimiert werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der Aktivatorstämme HSPCre1 und HSPCre13

In den beiden Aktivatorstämmen HSPCre1 und HSPCre13 wurde die Cre-Rekombinase unter die Kontrolle des Promotors des induzierbaren *Xenopus* Hitzeschock-Proteins HSP70 gestellt, wodurch eine konditionale Aktivierung der Rekombinase ermöglicht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in beiden Stämmen die Kinetik der Transkripte der Cre-Rekombinase nach der Hitzeschockaktivierung untersucht. In Cre-positiven Tieren des HSPCre1-Stammes war bereits 1 h nach Beginn des Hitzeschocks ein deutlicher Anstieg der Cre-Transkripte zu verzeichnen. Nach 4 h war die Transkriptmenge im Vergleich zu nicht-hitzegeschockten Cre-positiven Embryonen um das 4000-fache induziert. Die Analyse der Kinetik des induzierbaren EYFP-Reportergens zeigte, dass bereits 1 h nach Beginn des Hitzeschocks die ersten EYFP-Transkripte detektierbar waren und im weiteren Zeitverlauf kontinuierlich zunahm (Abb. 6; S.40). In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass 1 h nach Beginn des Hitzeschocks die Cre-vermittelte Rekombination des Reporterkonstruktes auf DNA-Ebene beginnt (Roose et al., 2009). Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass bereits 1 h nach Beginn des Hitzeschocks die ersten, für eine Rekombination notwendigen, aktivierten Cre-Transkripte präsent waren. Nach 4 h ist die DNA-Rekombination bereits vollständig (Roose et al., 2009), obwohl zu diesem Zeitpunkt die Menge der Cre-Transkripte erst sein Maximum erreicht. Zudem weist das exogene Cre-Gen eine vergleichbare Induktion auf wie das endogene HSP70. Für den HSPCre13-Aktivatorstamm wurde die gleiche Analyse für drei Zeitpunkte durchgeführt. Die gemessenen relativen Transkriptmengen für sowohl die Cre-Rekombinase als auch für das endogene HSP70 waren bei Verwendung des HSPCre13-Stammes im Durchschnitt um das 3-fache niedriger als beim HSPCre1-Stamm (Abb. 7; S.41). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Hitzeschockantwort in verschiedenen Stämmen unterschiedlich stark ausfallen kann. In *Xenopus laevis*-Oozyten, in die das HSP70-Gen aus *Drosophila* eingebracht wurde, variierte das Level der nach einem Hitzeschock bei 34° C induzierten HSP70-Transkripte von der 20-fachen bis zur 100-

fachen Menge verglichen mit nicht-hitzegechockten Oozyten (Bienz und Pelham, 1982). Grundsätzlich können beide Aktivatorstämme als Komponenten des binären Cre/loxP-Systems verwendet werden. In nicht-hitzegechockten, Cre-positiven Tieren des HSPCre1- und des HSPCre13-Stammes war eine sehr geringe basale Transkriptmenge der Cre-Rekombinase detektierbar. Die basale Transkriptmenge der Cre-Rekombinase war im HSPCre13-Stamm etwa doppelt so hoch wie im HSPCre1-Stamm. Somit weist der HSP70-Promotor im HSPCre13-Stamm eine etwa zweimal so hohe Basalaktivität auf, wie im HSPCre1-Stamm. Diese Basalaktivität führte nach Kreuzung des HSPCre1- und auch des HSPCre13-Stammes mit einem entsprechenden Effektorstamm allerdings nicht zu einer hitzeschockunabhängigen Aktivierung des Effektortransgens. Die Präsenz einer Basalaktivität des HSP70-Promotors wird durch Untersuchungen von Le et al., 2007 bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass auch in nicht-hitzegechockten HSPCre-positiven Zebrafischembryonen geringe Transkriptlevel der Cre-Rekombinase vorhanden sind. In *Xenopus laevis* wird zudem das induzierbare EYFP-Protein des C5-Reporterstammes nach Kreuzung mit dem HSPCre1-Stamm in geringem Maße in der Augenlinse von nicht-hitzegechockten Larven exprimiert (Roose et al., 2009). Für den Zebrafisch wurde ebenfalls eine hitzeschockunabhängige Aktivität des HSP70-Promotors im Notochord (Thummel et al., 2005) und in der Augenlinse beschrieben (Halloran et al., 2000; Blechinger et al., 2002). Somit ist der HSP70-Promotor auch ohne vorangegangene Hitzeinduktion in geringem Maße aktiv. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der HSP70-Promotor nicht nur äußerst sensitiv auf hitzebedingten Stress, sondern auch auf andere Faktoren wie z.B. die mangelhafte Versorgung eines Gewebes mit Nährstoffen, eine Änderung des pH-Wertes oder bestimmte Chemikalien reagiert (Siddiqui et al., 2008; Kawashima et al., 2009). Die geringe basale Menge der Cre-Transkripte in den hier in *Xenopus laevis* beschriebenen HSPCre-Aktivatorstämmen ist dennoch im Vergleich zu anderen Systemen wesentlich geringer. In der Maus (Schwenk et al., 1998) und *in vitro* (Fuhrmann-Benzakein et al., 2000) wurde eine vergleichsweise hohe Basalaktivität hormoninduzierbarer Cre-Rekombinasen beobachtet. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde hauptsächlich mit dem HSPCre13-Aktivatorstamm gearbeitet, da Tiere dieses Stammes neben dem HSPCre13-Transgen zusätzlich das rot fluoreszierende Markergen tdTomato auf demselben Plasmid besitzen. Dies ermöglicht eine einfache

Selektion der Cre-positiven Tiere ab dem Schwanzknospenstadium anhand roter Fluoreszenz.

### 4.2 Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$ und den mutanten Derivaten A263insGG und P328L329del

#### 4.2.1 Optimierung des Hitzeschock-Protokolles

Die Überexpression des mutanten HNF1 $\beta$ -Derivates P328L329del durch einen einstündigen Hitzeschock nach einer Kreuzung des HSPCre13-Stammes mit dem 328del-4-Stamm führte nur in 70 % der doppelt-transgenen Larven zu einem Nierenphänotyp, der zudem nicht mit der Präsenz von Ödemen und Fehlentwicklungen anderer Organe korrelierte (Abb. 13, S.49). Eine mögliche Erklärung für die nicht 100 % ige Penetranz des Phänotyps in den mutanten Larven nach einstündigem Hitzeschock ist, dass hier die Dauer des Hitzeschocks nicht ausreichte, um in allen Larven eine effiziente Rekombination des P328L329del-Effektorkonstruktes zu gewährleisten. Das Effektor-konstrukt des 328del-4-Stammes wird nach dem einstündigen Hitzeschock durch die Cre-Rekombinase des HSPCre1-Stammes zwar erfolgreich rekombiniert. Diese Rekombination ist jedoch unvollständig, d.h. es sind noch Moleküle des nativen, unrekombinierten Effektor-konstruktes vorhanden (Roose et al., 2009). Auch im Zebrafisch verursachte die durch einen Hitzeschock aktivierte Cre-Rekombinase in zwei voneinander unabhängigen transgenen Linien nur eine unvollständige DNA-Rekombination (Thummel et al., 2005; Le et al., 2007). Ein Grund für die unvollständige DNA-Rekombination im 328del-4-Stamm könnte die Integration mehrerer Genkopien des Effektortransgens sein, was bei der Transgenese von *Xenopus* häufig vorkommt (Kroll und Amaya, 1996). Die exogenen P328L329del-Transkripte waren in den mutanten Larven, die Ödeme und andere Fehlentwicklungen aufwiesen, deutlich erhöht. Mutante Larven ohne Ödeme und Fehlentwicklungen wiesen insgesamt niedrigere P328L329del-Transkriptmengen auf. In den Kontrollgruppen, d.h. in hitzegeschockten Larven die entweder nur die Cre-Rekombinase oder das Effektortransgen besaßen, und in hitzegeschockten nicht-transgenen Larven waren keine exogenen P328L329del-Transkripte detektierbar (Abb. 11; S.47). Die Streuung der Transkriptmenge zwischen den einzelnen mutanten Larven war allerdings sehr

groß, was durch die unvollständige Rekombination des Effektortransgens des 328del-4-Stammes erklärt werden kann. Dies ist u.U. auch der Grund dafür, dass es nicht in allen mutanten Larven zur Ausprägung eines Nierenphänotyps kam und der Phänotyp in den einzelnen Tieren variabel war, d.h. nicht alle Tiere entwickelten Ödeme. Zwischen mutanten Tieren mit und ohne Ödemen konnte kein signifikanter Unterschied in der Transkriptmenge festgestellt werden, obwohl bei Tieren mit Ödemen eine Tendenz zu einer höheren Expression besteht. Tatsächlich korreliert in Mäusen, die die dominant-negative HNF1 $\beta$ -Mutante A263insGG in der Niere überexprimieren, die Menge der exogenen A263insGG-Transkripte mit der Stärke des erhaltenen Nierenphänotyps (Hiesberger et al., 2004).

Nach einer Verlängerung des Hitzeschocks auf 2 h entwickelten 80 % der mutanten Larven Ödeme, sowie Fehlentwicklungen anderer Organe und 100 % der mutanten Larven wiesen den beschriebenen Nierenphänotyp auf, d.h. der Pronephros war insgesamt signifikant verkleinert und insbesondere die proximalen Tubuli waren deformiert (Abb. 16, S.52). Zusätzlich war die Menge der exogenen P328L329del-Transkripte wesentlich homogener, d.h. die Transkriptmengen zwischen Larven mit und ohne Ödemen, bzw. Fehlentwicklungen nach zweistündigem Hitzeschock waren vergleichbar, im Gegensatz zum einstündigen Hitzeschock (Abb. 15, S.51). Während des zweistündigen Hitzeschocks wurde somit offensichtlich eine ausreichende Menge an Cre-Transkripten produziert, um eine effiziente Aktivierung der P328L329del-Mutante zu erreichen.

Unter diesen optimierten Bedingungen, d.h. bei einer Verlängerung des Hitzeschocks auf zwei Stunden, stellt das Cre/loxP-System ein ideales Werkzeug dar, mit dem der Effekt der Überexpression von mutantem HNF1 $\beta$  auf die Nierenentwicklung in *Xenopus laevis* untersucht werden kann. Ein solches binäres System, das die zeitliche und räumliche Kontrolle der Überexpression des GOI erlaubt, ist gegenüber der RNA-Injektionsmethode zur Überexpression bestimmter Gene sehr vorteilhaft. Die injizierte RNA-Menge unterscheidet sich von Embryo zu Embryo und die gleichmäßige Injektion in einen bestimmten Bereich des Embryos ist unmöglich. Dies führt zu einer hohen Variabilität der Phänotypen der manipulierten Larven (Bohn et al., 2003). Mit der RNA-Injektionsmethode können zudem nur Effekte untersucht werden, die kurz nach der Injektion auftreten, da die injizierte RNA nur für eine begrenzte Zeit stabil ist. Durch den Gebrauch unseres binären Systems mit

Aktivator- und Effektorstämmen zur konditionalen Aktivierung von Genen konnte diese Variabilität begrenzt werden. In unserem System ist die Cre-Rekombinase konditional durch einen Hitzeschock zu einem beliebigen Zeitpunkt in der Entwicklung aktivierbar. Somit kann der Effekt der Überexpression eines Gens, z.B. HNF1 $\beta$ , sowohl in frühen als auch in späten Entwicklungsstadien beobachtet werden. Roose et al., 2009 konnten bereits zeigen, dass die Überexpression der HNF1 $\beta$ -Mutante P328L329del mit dem binären Cre/loxP-System unter Verwendung des HSPCre1-Aktivatorstammes durch einstündigen Hitzeschock zu einer signifikanten Verkleinerung des Pronephros in den Larven mit aktiviertem P328L329del (auch als *Mutanten* bezeichnet) führt. Allerdings wiesen hier nur etwa 40 % der mutanten Tiere einen Phänotyp auf. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit durch drei weitere unabhängige Kreuzungen mit jeweils einem anderen Aktivator- (HSPCre1 oder HSPCre13), bzw. Effektorstamm (328del-3 oder 328del-4) bestätigt werden, in denen die Hitzeschockaktivierung der Cre-Rekombinase ebenfalls für 1 h erfolgte (Abb. 10; S.46).

In der Maus führt die Inaktivierung von Hnf1b zu embryonaler Letalität vor der Gastrulation, die durch einen Entwicklungsdefekt des viszeralen Endoderms hervorgerufen wird (Barbacci et al., 1999). Erst durch eine konditionale Deletion konnte die Funktion von HNF1 $\beta$  in der Maus genauer analysiert werden (Gresh et al., 2004). Hierfür wurde der Ksp-cadherin-Promotor verwendet, der in den proximalen Tubuli und dem Ductus aktiv ist. Da der Ksp-cadherin-Promotor erst ab einem Stadium aktiv ist, in dem die ersten Schritte der Nierenentwicklung bereits abgeschlossen sind, konnten nur Ereignisse in der späten Nierenentwicklung untersucht werden. In *Xenopus laevis* kann durch die Anwendung unseres binären Systems die Expression von HNF1 $\beta$  bereits von Beginn der Embryonalentwicklung an zu einem beliebigen Zeitpunkt manipuliert werden. Die frühe Letalität von Maus-Embryonen nach der Inaktivierung von Hnf1b konnte kürzlich durch die Herstellung tetraploider und diploider Chimeren umgangen und somit auch in der Maus frühe Effekte der Deletion von Hnf1b untersucht werden. Diese manifestierten sich u.a. in Entwicklungsdefekten der Ureterknospe und des Wolffschen Ganges (Lokmane et al., 2010).

### 4.2.2 Hitzeschockinduzierte Überexpression der Mutante P328L329del

Die Entwicklung der Ödeme in den mutanten Larven mit aktiviertem P328L329del ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Pronephros nicht korrekt ausdifferenziert wurde und somit seine exkretorische Funktion nicht übernehmen konnte. Mäuse, in denen ein nierenspezifischer Knock-Out von *Hnf1b* stattgefunden hat, entwickeln beispielsweise polyzystische Nieren (Gresh et al., 2004). Auch im Zebrafisch ist die Mutation von *hnf1b* der Grund für Nierendefekte, insbesondere Zysten (Sun und Hopkins, 2001). Die Fehlentwicklung des Magen-Darm-Traktes manifestierte sich in den mutanten Larven in einem verdickten Darmausgang, zusätzlich wies der Darm insgesamt nicht die für ihn typischen Windungen auf (Abb. 9, S.45). Da *Hnf1b* in der Maus auch im Magen-Darm-Trakt exprimiert wird (Cereghini, 1996; Haumaître et al., 2005; Lokmane et al., 2008), besteht durchaus die Möglichkeit, dass dieser Transkriptionsfaktor auch bei der Magen-Darm-Entwicklung von *Xenopus laevis* eine Rolle spielt. In *Xenopus laevis* wird *hnf1b* zusätzlich zur Pronephrosanlage auch in der Schwanzknospe exprimiert (Rosengarten, 2006). Dies erklärt die beobachteten Defekte im Schwanzbereich nach der Aktivierung der Mutante P328L329del. Die Überexpression der P328L329del-Mutante nach dem zweistündigen Hitzeschock führte in den mutanten Larven auch zu einer signifikanten Verkleinerung des Auges (Abb. 17, S.53). Im Menschen führen heterozygote Mutationen im *HNF1 $\beta$* -Gen zu der autosomal-dominant vererbaren Diabetesform MODY5 (Horikawa et al., 1997). Diabetespatienten leiden häufig an einer Augenerkrankung, die als diabetische Retinopathie (DR) bezeichnet wird (Mohamed et al., 2007). Bei der DR kommt es auf der Retina zur Bildung abnormaler Blutgefäße mit erhöhter Permeabilität, was Blutungen im Auge verursachen kann. Dies kann zunächst zu einem beeinträchtigten Sehvermögen und letztendlich zur Erblindung des betroffenen Patienten führen. Bisher ist nicht bekannt, dass *HNF1 $\beta$*  auch im Auge exprimiert wird. In Säugern wird *HNF1* von einem Kofaktor, bekannt als DCoH, moduliert, der die transkriptionelle Aktivität von *HNF1* stimuliert (Mendel et al., 1991). Das *Xenopus*-Homolog, XDCoH, wird während der Embryogenese im Darm, in der Niere und auch im Auge exprimiert (Pogge von Strandmann und Ryffel, 1995). Da sich das mutante *HNF1 $\beta$* -Derivat P328L329del unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven CMV-Promotors befindet und somit im gesamten Tier überexprimiert wird, ist es möglich, dass XDCoH als Kofaktor an mutante P328L329del-Dimere oder an *HNF1 $\beta$* /P328L329del-Heterodimere bindet

und hierdurch u.a. seine Aktivität im Auge beeinträchtigt wird. Dies ist eine mögliche Erklärung für den Augenphänotyp in den mutanten Larven. Im Zebrafisch spielt *hnf1b* u.a. eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Nachhirns (Sun und Hopkins, 2001). Die Inaktivierung von *hnf1b* führt zu Entwicklungsdefekten des Nachhirns, des Kopfskeletts, sowie zu einer Verkleinerung des Hörbläschens. Während der Entwicklung wird *hnf1b* jedoch nicht im Hörbläschen selbst exprimiert, sondern wie bereits erwähnt, im Nachhirn und ist dort essentiell für die Spezifizierung einzelner Regionen, indem es bestimmte Gene reguliert. Die Inaktivierung von *hnf1b* führt im Nachhirn zu Musterbildungsdefekten. Die korrekte Entwicklung des Nachhirns ist wichtig für die normale Entwicklung des Hörbläschens (Phillips et al., 2001). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Verkleinerung des Hörbläschens aus den Musterbildungsdefekten im Nachhirn resultiert (Sun und Hopkins, 2001). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch die Verkleinerung des Auges nach der Überexpression von mutantern HNF1 $\beta$  in *Xenopus laevis* erklären. Obwohl *hnf1b* nicht im Auge selbst exprimiert wird, könnte es an der Regulation bestimmter Gene in anderen Organen, wie z.B. dem Gehirn beteiligt sein, die für die Augenentwicklung von Bedeutung sind. Hierzu müssen jedoch weitere Untersuchungen gemacht werden.

### **4.2.3 Analyse der Expression spezifischer Pronephros-Markergene nach Überexpression von P328L329del**

Die im vorherigen Kapitel (4.2.2.) beschriebenen, nach der Überexpression der Mutante P328L329del auftretenden, Entwicklungsdefekte wurden in freischwimmenden Larven beobachtet, d.h. in einem späten Entwicklungsstadium. Um den Effekt der Überexpression von P328L329del in einem früheren Stadium zu analysieren, wurden insgesamt fünf Markergene ausgewählt, die in den einzelnen Segmenten des sich entwickelnden Pronephros, sowie dem Glomus exprimiert werden. Für die Analyse wurden Larven im Schwanzknospenstadium verwendet, um den Einfluss von HNF1 $\beta$  auf die Differenzierung des noch nicht funktionalen Pronephros zu untersuchen. In diesem Stadium kann die Struktur dieses Organs sehr einfach untersucht werden, da es hier noch als lineare Struktur ohne die sich während der weiteren Entwicklung bildenden Windungen der proximalen Tubuli vorliegt. Die mutanten Larven wiesen im Schwanzknospenstadium keine Defekte wie

Ödeme und andere Fehlentwicklungen auf. Bei zweien der fünf Marker, *slc3a1* und *tmem27* (collectrin), die Marker für die proximalen Tubuli darstellen, führte die Überexpression der Mutante P328L329del zu einer deutlichen Veränderung des Expressionsmusters im Vergleich zu nicht-transgenen Larven. Insgesamt war der Bereich der *slc3a1*-Expression in den mutanten Embryonen signifikant verkleinert (Abb. 20, S.56). *Slc3a1*, auch bekannt als rBAT, gehört zu einer Familie von Transportproteinen, der *slc* (**Solute Carrier**)-Genfamilie, die insgesamt mehr als 350 Gene umfasst. Die SLC-Transporter transportieren geladene und ungeladene organische Moleküle, insbesondere Aminosäuren, aber auch anorganische Ionen. Die meisten Aminosäuretransporter setzen sich aus einzelnen Proteinen zusammen, die entweder als Monomere oder als homomerische Multimere agieren. Heterodimerische Aminosäuretransporter stellen eine eigene Klasse dar. Transportmoleküle dieser Klasse setzen sich aus zwei verschiedenen Proteinen zusammen, einer schweren und einer leichten Untereinheit (Ganapathy, 2009). Die schweren Untereinheiten sind gewöhnlich Membran-Glykoproteine vom Typ II mit einer einzelnen Transmembrandomäne (Palacin und Kanai, 2004). *Slc3a1* (rBAT) kodiert für solch eine schwere Untereinheit, *Slc7a9* ( $b^{0,+}$ AT) für eine leichte Untereinheit. *Slc3a1* und *Slc7a9* bilden zusammen das rBAT/ $b^{0,+}$ AT-Transportprotein. Das rBAT/ $b^{0,+}$ AT-Transportprotein wird primär in der Niere synthetisiert und ist in den Epithelzellen der proximalen Tubuli lokalisiert (Fernandez et al., 2006). Es ist essentiell für die renale Reabsorption der Aminosäure Cystin (Fernandez et al., 2002). Durch Mutationen im *Slc3a1*- oder *Slc7a9*-Gen, die zu einer funktionellen Beeinträchtigung des rBAT/  $b^{0,+}$ AT-Transportproteins führen, ist die Fähigkeit der Niere Aminosäuren, vor allem Cystin, zu reabsorbieren beeinträchtigt, wodurch dessen Konzentration im Urin rapide ansteigt. Als Folge davon präzipitiert das Cystin, was letztendlich in der Bildung von Nierensteinen und renaler Insuffizienz resultiert. Dieses autosomal-rezessiv vererbte Krankheitsbild wird auch als „Cystinurie“ bezeichnet. Untersuchungen an Cystinurie-Patienten zeigten, dass diese Krankheit mit Mutationen in *SLC3A1* und *SLC7A9* einhergeht (Bisceglia et al., 2010). Mit einer *in silico*-Analyse konnte gezeigt werden, dass *SLC3A1* potentielle Bindestellen für HNF1 aufweist (Lockwood et al., 2003).



Auch das Expressionsmuster des Pronephrosmarkers *tmem27*, der genau wie *slc3a1* in den proximalen Tubuli exprimiert wird, war nach Überexpression von *P328L329del* deutlich verändert, was sich ebenfalls in einer signifikanten Verkleinerung der Fläche der Expression manifestierte (Abb. 19, S.55). *TMEM27* wurde kürzlich als Zielgen des HNF1-Komplexes (HNF1 $\beta$ -Homodimere oder HNF1 $\beta$ / $\alpha$ -Heterodimere) identifiziert (Brunskill et al., 2008) und im Mausmodell näher untersucht. *Tmem27* stimuliert die Proliferation pankratischer  $\beta$ -Zellen (Akpinar et al., 2005) und spielt eine Rolle bei der Insulinsekretion (Fukui et al., 2005), sowie bei der renalen Reabsorption von Aminosäuren (Danilczyk et al., 2006). *Tmem27* kolokalisiert mit *Slc3a1* in den Epithelzellen der proximalen Tubuli und reguliert den Transport von Aminosäuren, indem es Aminosäuretransporter, wie z.B. das *rBAT/b<sup>0,+</sup>AT*-Transportprotein beeinflusst (Malakauskas et al., 2007; McCoy et al., 2008). In *Tmem27*-defizienten Mäusen kommt es zu einer deutlichen Verringerung der Menge des *rBAT/b<sup>0,+</sup>AT*-Transportproteins und damit aufgrund der verminderten Aminosäure-Reabsorption zu Cystin-Kristallen im Urin, bzw. zu Cystinurie. Es wird angenommen, dass *Tmem27* für die korrekte Lokalisation des *rBAT/b<sup>0,+</sup>AT*-Transportproteins, insbesondere für die der von *Slc3a1* kodierten *rBAT*-Untereinheit, an der Plasmamembran essentiell ist (Malakauskas et al., 2007). Dies wird durch Studien bestätigt, in denen gezeigt wurde, dass Mutationen in *rBAT/Slc3a1* zu Störungen des Transports des *rBAT*-Proteins zur Plasmamembran der renalen Epithelzellen führen. Das Protein wird in diesem Fall wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten (Chillaron et al., 1997; Pineda et al., 2004). Sowohl *SLC3A1* als auch *TMEM27* stellen potentielle Zielgene von HNF1 $\beta$  dar. Diese Tatsache ist eine mögliche Erklärung für den Nierenphänotyp in den mutanten Larven und enthüllt eine bislang unbekannt Funktion von HNF1 $\beta$  in der Nierenphysiologie. Die Überexpression der potentiell dominant negativen Mutante *P328L329del* führt zur Verringerung der Expression von *tmem27* und *slc3a1* in den mutanten Larven. Der Defekt in der *tmem27*- und *slc3a1*-Expression könnte wiederum die *rBAT*-Untereinheit des *rBAT/b<sup>0,+</sup>AT*-Transportproteins in ihrer Funktion beeinträchtigen. Dies resultiert in einer fehlerhaften Osmoregulation, da Aminosäuren nicht korrekt reabsorbiert werden und daher im Urin zu hoch konzentriert sind. Der gestörte Flüssigkeitshaushalt könnte die beobachteten Nierendefekte, wie z.B. die Erweiterung der proximalen Tubuli und die Ödeme,

erklären, da Flüssigkeiten und Stoffwechselprodukte nicht mehr in korrektem Maße ausgeschieden werden und die Flüssigkeit sich somit in der Niere ansammelt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass in den mutanten Larven primär die proximalen Tubuli von den Defekten betroffen sind und sowohl *slc3a1* auch *tmem27* und *hnf1b* (Abb. 42, S.78) dort lokalisiert sind. Die Expression der Markergene *clnk* (intermediäre Tubuli) und *slc12a3* (distale Tubuli) und *nephrin* (Glomus) war unverändert (Abb. 21 und Abb. 22, S.57; Abb. 18, S.54). Für eine genauere Analyse müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eine Analyse der Expression von *slc7a9* brächte z.B. Aufschluss darüber, ob das gesamte rBAT/b<sup>0,+</sup>AT-Transportprotein funktional beeinträchtigt sein könnte, oder ob nur die von *slc3a1* kodierte rBAT-Untereinheit betroffen ist.

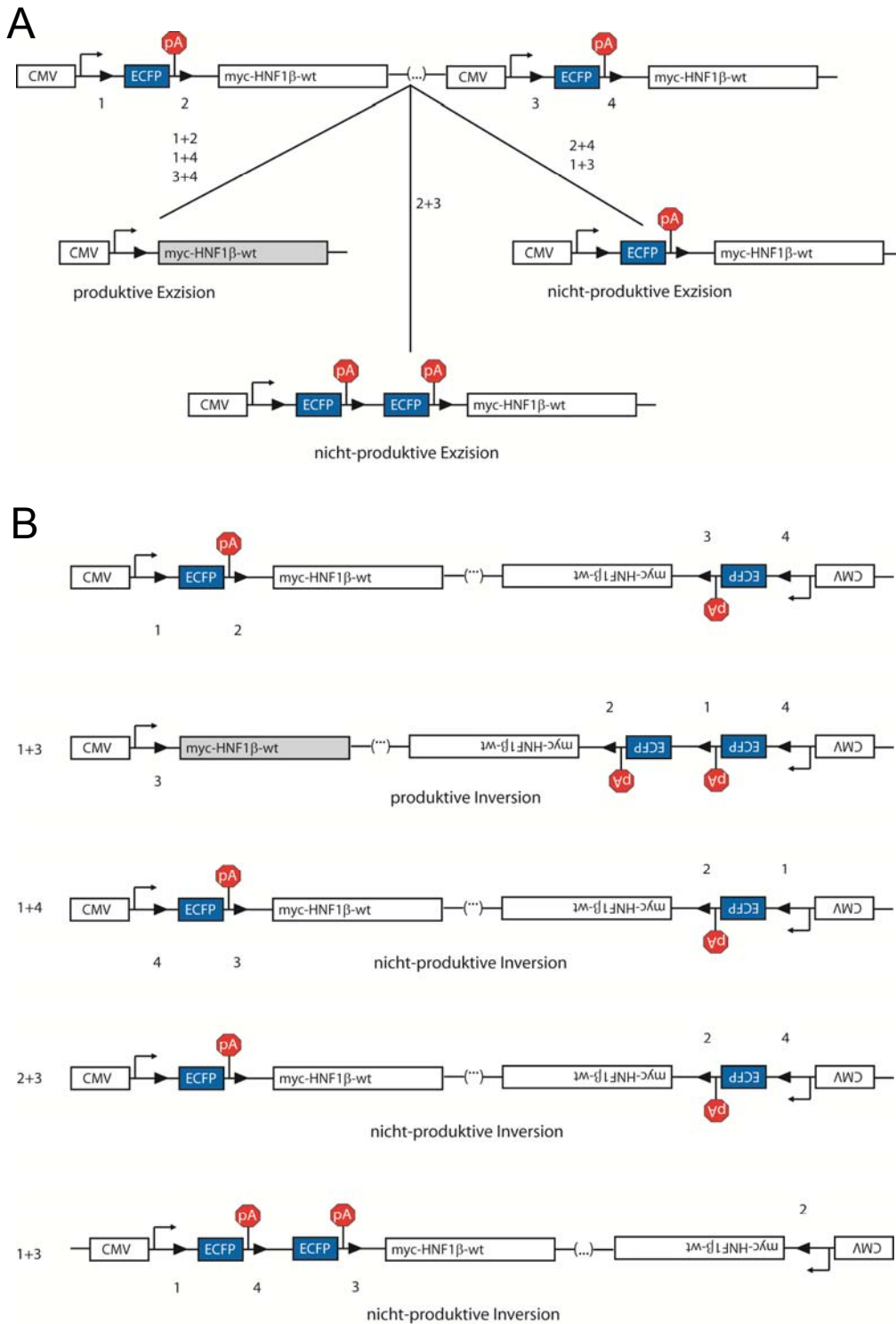
### 4.2.4 Hitzeschockinduzierbare Überexpression der Mutante A263insGG

Beim A263ins-6-Stamm standen für die durchgeführten Experimente nur sehr junge Weibchen zur Verfügung, die durch Hormon-Injektion zur Abgabe von nur sehr wenigen Eiern stimuliert werden konnten. Deshalb konnten nicht alle Untersuchungen wie beim 328del-4-Stamm durchgeführt werden. Mutante Larven entwickelten im Laufe der Entwicklung Ödeme, Defekte des Magen-Darm-Traktes, sowie des Schwanzes (Abb. 24, S.59). Zusätzlich waren die Augen der mutanten Tiere signifikant verkleinert (Abb. 26, S.61). Insgesamt ähnelten die Fehlentwicklungen denen nach der Überexpression der P328L329del-Mutante. Eine Immunhistofärbung zeigte, dass der Pronephros in den Larven mit hitzeschockaktiviertem A263insGG signifikant vergrößert war (Abb. 25, S. 60). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener RNA-Injektionsexperimente (Bohn et al., 2003). In den Versuchen von Bohn et al. konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von neun verschiedenen HNF1 $\beta$ -Mutanten, die im Menschen Defekte in der Nierenentwicklung verursachen, zu unterschiedlichen Nierenphänotypen in den entsprechenden Larven führte. Die Mutanten konnten hier in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Überexpression der Mutanten der ersten Gruppe hatte eine signifikante Vergrößerung der Niere zur Folge, wohingegen die Überexpression der Mutanten der zweiten Gruppe eine Verkleinerung der Niere, oder sogar das völlige Fehlen der Niere verursachte. Die Mutanten A263insGG (Vergrößerung der Niere) und P328L329del (Verkleinerung der Niere) zeigten hierbei den stärksten Phänotyp.

Auffällig in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war, dass nach der Überexpression von A263insGG, im Vergleich zur Überexpression von P328del329del, auch hier vor allem die proximalen Tubuli betroffen waren und verdickt erschienen. Dies könnte ebenfalls auf den in Kapitel 4.2.3 diskutierten fehlerhaften Transport von Aminosäuren und eine gestörte Osmoregulation hinweisen. Um dies zu belegen, müssen in Folgeexperimenten die Expressionsmuster der beschriebenen Pronephrosmarker, insbesondere *slc3a1* und *tmem27*, in Larven mit aktiviertem A263insGG analysiert werden. Neben dem Nierenphänotyp wiesen auch die Larven mit aktiviertem A263insGG signifikant verkleinerte Augen auf.

### 4.2.5 Hitzeschockinduzierbare Überexpression von HNF1 $\beta$

Beim wt-2-Stamm standen wie auch beim A263ins-6-Stamm nur sehr junge Weibchen zur Verfügung, so dass auch hier nur wenige Embryonen analysiert werden konnten. Die Überexpression von HNF1 $\beta$  verursachte keine Ödeme (Abb. 28, S.62) und auch der Pronephros (Abb. 29, S.63), sowie die Augen (Abb. 30, S.64) waren normal entwickelt. Durch vorangegangene RNA-Injektionsexperimente wurde gezeigt, dass die Überexpression von HNF1 $\beta$  zu einem verkleinerten Pronephros führt (Wild et al., 2000). Im Vergleich zu den nach der Überexpression von P328L329del auftretenden Nierendefekten ist dieser Phänotyp allerdings weniger stark ausgeprägt. Nach einstündiger Hitzeschockaktivierung ist die Cre-vermittelte DNA-Rekombination des Effektoronstruktes des wt-2-Stammes unvollständig (Roose M., 2008). Es wäre möglich, dass auch die zweistündige Hitzeschockaktivierung der Cre-Rekombinase in diesem Fall nicht ausreicht, um die DNA des Effektoronstruktes vollständig umzulagern. Es ist bekannt, dass transgene Tiere zwischen 5 und 35 Genkopien pro Zelle enthalten können (Kroll und Amaya, 1996). Möglicherweise ist die in das Genom integrierte Kopienzahl des Effektortransgens in Tieren des wt-2-Stammes so hoch, dass die Cre-Rekombinase trotz zweistündiger Aktivierung nicht alle Kopien rekombinieren konnte. Die Kopien können in einer „Kopf-Schwanz“- oder „Schwanz-Schwanz“-Orientierung in das Genom integriert sein (Abb. 44 A und B).



**Abb. 44: Möglichkeiten der Umlagerung der DNA des Effektoronstruktes des wt-2-Stammes durch die Cre-Rekombinase**

A: Eine „Kopf-Schwanz“-Orientierung führt zu einer Exzision. Je nachdem zwischen welchen loxP-Sequenzen die Umlagerung stattfindet, ist die Rekombination produktiv oder nicht-produktiv. Die einzelnen loxP-Sequenzen sind nummeriert. Neben den Linien sind die loxP-Kombinationen angegeben, die zu der jeweils dargestellten Exzision führen.

B: Eine „Schwanz-Schwanz“-Orientierung führt zu einer Inversion. Die loxP-Sequenzen sind nummeriert. Die loxP-Kombination, die zu der jeweiligen produktiven oder nicht-produktiven Inversion führt, ist jeweils links angegeben.

Bei einer „Kopf-Schwanz“-Integration sind alle loxP-Sequenzen in gleicher Richtung orientiert (Abb. 44 A). Somit kann eine Exzision zwischen zwei beliebigen loxP-Sequenzen stattfinden. Dies resultiert in einer produktiven oder nicht-produktiven Exzision. Im Falle einer produktiven Exzision wird das Effektorgen unter die Kontrolle des CMV-Promotors gestellt und exprimiert. Im Falle einer nicht-produktiven Exzision wird weiterhin das ECFP-Markergen exprimiert. Bei einer „Schwanz-Schwanz“-Integration existieren neben loxP-Sequenzen, die in gleicher Richtung orientiert sind, auch solche Sequenzen, die invers zueinander ausgerichtet sind (Abb. 44 B). Somit kann es hier auch zu einer Inversion kommen. Je nachdem zwischen welchen loxP-Sequenzen die Rekombination stattfindet, kommt es zu einer produktiven oder nicht-produktiven Inversion. Im direkten Anschluss an eine Inversion kann zwischen in gleicher Richtung orientierten loxP-Sequenzen wieder eine Exzision stattfinden. Es gibt somit viele Möglichkeiten, wie die DNA eines Effektoronstruktes rekombiniert werden kann und nicht jede Rekombination führt zu einer Expression des Effektorgenes. Aus diesem Grund muss in zukünftigen Experimenten überprüft werden, wieviele Genkopien in das Genom der Tiere des wt-2-Stammes integriert sind und in welcher Orientierung diese zueinander stehen. Zudem sollte der Level der exogenen HNF1 $\beta$ -Transkripte in den Larven bestimmt werden, um herauszufinden, ob überhaupt eine effiziente Überexpression stattfindet. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass eine HNF1 $\beta$ -Überexpression auf einem niedrigen physiologischen Level, im Gegensatz zu der Überexpression der beiden potentiell dominant-negativen Mutanten, keinen Effekt verursacht. Zudem scheint hier ein stammspezifischer Effekt vorliegen, da es in mutanten Larven des HNF1 $\alpha$ -wt-Stammes, mit dem HNF1 $\beta$  pronephrosspezifisch überexprimiert werden kann, zu Fehlentwicklungen kommt (Abb. 34, S. 70).

### **4.3 Herstellung der pronephrosspezifischen Effektorstämme HNF1 $\alpha$ -wt, HNF1 $\alpha$ -A263ins und HNF1 $\alpha$ -del**

Um eine pronephrosspezifische Überexpression von HNF1 $\beta$  zu erreichen, wurde ein geeigneter Promotor benötigt. In dieser Arbeit wurde anhand eines GFP-Reporters gezeigt, dass ein -4kb/-207bp Fragment des HNF1 $\alpha$ -Promotors für eine pronephrosspezifische Expression ausreicht (Abb. 31, S.65). Dieses Fragment ist wesentlich kleiner und damit besser zu handhaben als das zuvor identifizierte (-6kb/-

207bp) Fragment (Ryffel und Lingott, 2000). Somit war das (-4kb/-207bp)HNF1 $\alpha$ -Fragment für die Herstellung pronephrosspezifischer Effektorstämme sehr gut geeignet. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Larven im Verhältnis zu der Anzahl injizierter Eier lag hier bei Verwendung der REMI-Methode bei nur 0,1 %. Daher erfolgten die weiteren Versuche zur Herstellung der pronephrosspezifischen Effektorstämme mit der effizienteren I-SceI-Meganukleasemethode. Für die Herstellung der pronephrosspezifischen Effektorstämme wurden drei Konstrukte kloniert, die zu einer pronephrosspezifischen Aktivierung von HNF1 $\beta$ , sowie der beiden mutanten Derivate A263insGG und 328L329del führen. Diese Konstrukte werden auch als HNF1 $\alpha$ -wt, HNF1 $\alpha$ -A263insGG und HNF1 $\alpha$ -del bezeichnet. Mit diesen Konstrukten wurden transgene Larven hergestellt und diese bis zur Geschlechtsreife aufgezogen (Tabelle 6, S.67). Nach etwa einem Jahr hatten die ersten potentiellen Gründerweibchen für die drei Effektorstämme die Geschlechtsreife erreicht und konnten getestet werden. Cre-positive Nachkommen des HNF1 $\alpha$ -wt-4-Gründertieres, in denen exogenes HNF1 $\beta$  durch die Cre-Rekombinase induziert wurde, wiesen als freischwimmende Larven Ödeme, sowie Fehlbildungen des Magen-Darm-Traktes und einen verdickten Darmausgang auf (Abb. 34, S.70). Fehlbildungen des Schwanzes und verkleinerte Augen, wie sie nach der Überexpression von P238L329del und A263insGG im gesamten Tier beobachtet wurden, waren nicht vorhanden. Diese Beobachtung ist konsistent mit der pronephrosspezifischen Überexpression von HNF1 $\beta$  im HNF1 $\alpha$ -wt-4-Stamm. Alle Cre-positiven Larven mit aktiviertem HNF1 $\beta$  wiesen keine pronephrosspezifische blaue Fluoreszenz des ECFP-Markergens auf, da das ECFP-Gen durch die aktivierte Rekombinase größtenteils aus dem in den einzelnen Zellen vorhandenen Effektorkonstrukt herausgeschnitten wird. Hierdurch kommt es zu einer Abnahme der blauen Fluoreszenz. Eine PCR zur Detektion des ECFP-Markergens des (-4 kb/-207 bp)HNF1 $\alpha$ :ECFP(loxP)HNF1 $\beta$ -wt-Konstruktes, bei der die genomische DNA aus der Schwanzspitze der Larven als Matrize diente, zeigte, dass alle Larven positiv für das Transgen waren (Abb. 35, S.71). In vier hitzegeschockten Cre-negativen Larven war die blaue pronephrosspezifische Fluoreszenz des unrekombinierten Effektorkonstruktes sehr gut zu erkennen (Abb. 34 D, S.70). Die pronephrosspezifische Überexpression von HNF1 $\beta$  sollte primär zu Nierendefekten führen. Ein Hinweis hierauf sind die Ödeme, die in den Larven mit

pronephrosspezifisch aktiviertem HNF1 $\beta$  zu finden waren. Für eine nähere Charakterisierung muss mit einer Immunhistofärbung die Struktur des Pronephros genau analysiert werden. Mäuse, in denen HNF1 $\beta$  nierenspezifisch deletiert wurde, entwickeln polyzystische Nieren, weisen in anderen Organen aber keine Defekte auf (Gresh et al., 2004). Die Defekte des Magen-Darm-Bereichs in den mutanten Larven sind dadurch erklärbar, dass das (-4 kb/-207 bp)HNF1 $\alpha$ :ECFP(loxP)HNF1 $\beta$ -wt-Konstrukt möglicherweise auch sehr schwach im Darm aktiv ist. Dies ist schwierig zu detektieren, da der Darm eine starke Autofluoreszenz aufweist und die Fluoreszenz des ECFP-Markergens hiervon nicht eindeutig unterschieden werden kann. Diese Vermutung wird bestätigt durch die Tatsache, dass in allen anderen Organen, z.B. dem Schwanz und den Augen, keine Fehlentwicklungen zu beobachten waren.

In dem HNF1 $\alpha$ -del-1-Gründertier konnte die Weitergabe des Effektortransgens mit der PCR-Analyse in 2 von insgesamt 16 hitzegeschockten Cre-positiven Larven bestätigt werden (Abb. 36, S.72). Allerdings fluoreszierte keine der 16 Larven blau oder wies Fehlbildungen auf. Bei der Integration eines Transgens in einen einzelnen chromosomalen Locus sollten 50 % der Nachkommen das Transgen aufweisen. Wurde das ECFP-Markergen vollständig aus dem Effektorkonstrukt herausgeschnitten, so wäre es weder durch eine PCR-Analyse, noch durch die Präsenz blauer Fluoreszenz zu detektieren. Dies könnte der Grund dafür sein, dass nur 2 von 16 Larven positiv für das Transgen getestet wurden. Ein anderer Grund wäre eine Mosaikexpression des Transgens in den Keimzellen des Gründertieres, die dazu führt, dass das Transgen nur an wenige Nachkommen vererbt werden kann.

Insgesamt konnten zwei gewebespezifische Effektorstämme etabliert werden, der HNF1 $\alpha$ -wt-4- und der HNF1 $\alpha$ -del-1-Stamm. Da jedoch in diesem Versuch aufgrund des jungen Alters der Gründerweibchen nur eine geringe Anzahl Larven zur Verfügung stand, sollten diese Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bekräftigt werden. Zudem müssen weitere potentielle Gründertiere für den HNF1 $\alpha$ -A263ins-Stamm getestet werden, da in dem hier durchgeführten Experiment keines der beiden getesteten Weibchen das Effektortransgen weitervererbte.

#### **4.4 Laserinduzierte Hitzeschockaktivierung von Genen**

Neben der Verwendung gewebespezifischer Promotoren besteht auch die Möglichkeit, Gene durch die Anwendung eines lokalen Hitzeschocks in definierten Geweben oder einzelnen Zellen zu aktivieren. Diese Methode wurde bereits in verschiedenen Modellorganismen wie *Drosophila* (Halfon et al., 1997), dem Schmetterling *Bicyclus anynana* (Ramos et al., 2006) und dem Zebrafisch (Halloran et al., 2000) etabliert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in *Xenopus laevis* die Cre-Rekombinase eines entsprechenden HSPCre-Stammes durch Laserlicht lokal aktiviert werden kann. In einem ersten Experiment wurde der Schwanzbereich von Larven im Schwanzknospenstadium, die doppelt transgen für die Cre-Rekombinase und das EYFP-Gen waren, mit Laserlicht im Infrarotbereich bestrahlt, wobei der Laserstrahl auf einen Punkt von 200 µm Durchmesser fokussiert wurde. Nach zwei Wochen konnte die gelbe EYFP-Fluoreszenz in einzelnen Schwanzmuskelzellen detektiert werden (Abb. 41, S.77). Eine Bestrahlungsdauer von 0,2 s bei 2000 mW war für die EYFP-Induktion am effizientesten. Dies ist eine vergleichsweise sehr kurze Dauer des Hitzeschocks. Sowohl in *Drosophila* als auch im Zebrafisch erfolgte die lokale Laserbestrahlung für etwa 2 min, im Schmetterling sogar für etwa 20 min (Halfon et al., 1997; Ramos et al., 2006; Halloran et al., 2000). Eine lokale Begrenzung des Hitzeschocks auf die Zellen der Pronephrosanlage ist eine gute Möglichkeit, ein bestimmtes Gen, wie z.B. HNF1β, nierenspezifisch überzuexprimieren, ohne dass ein gewebespezifischer Promotor benötigt wird. In einem weiteren Experiment wurde der Laserstrahl auf etwa 100 µm Durchmesser fokussiert (Abb. 42, S.78). Dies entspricht der Größe der frühen Pronephrosanlage im Schwanzknospenstadium. Der lokale Hitzeschock konnte so auf die Pronephrosanlage begrenzt werden. Für dieses Experiment war die Anwendung einer geringeren Laserintensität und einer längeren Bestrahlungsdauer erforderlich (5 s bei 100 mW), da die Energie des Laserstrahls auf einen kleineren Bereich gebündelt wurde und eine zu hohe Intensität zu Schädigungen des Gewebes führte. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Zellen der Pronephrosanlage im Schwanzknospenstadium oder der bereits ausdifferenzierte Pronephros in freischwimmenden Larven bestrahlt wurde. Die Induktion nierenspezifischer EYFP-Fluoreszenz konnte nur in einer Larve beobachtet werden, bei der der ausdifferenzierte Pronephros bestrahlt worden war (Abb. 43, S.79).



Möglicherweise wurde die Cre-Rekombinase in den einzelnen Larven nicht in allen Zellen des Pronephros, bzw. der Pronephrosanlage aktiviert, bzw. der Laserstrahl konnte nicht auf alle Zellen fokussiert werden. Es könnte auch sein, dass die EYFP-Fluoreszenz in einzelnen Pronephroszellen im Gegensatz zu den mehrkernigen Schwanzmuskelzellen sehr schwach ist und nicht detektiert werden kann. In den mehrkernigen Schwanzmuskelzellen wird pro Zelle mehr EYFP-Protein synthetisiert, was somit leichter identifiziert werden kann. Die Hitzeschockaktivierung von EYFP ist in der Regel sehr effizient, so reicht ein fünfminütiger Hitzeschock aus, um eine gelbe Fluoreszenz in der gesamten Larve zu erhalten (Abb. 37, S.73). Diese kann allerdings bei einer Induktion im gesamten Tier erst etwa 5 Tage nach dem Hitzeschock beobachtet werden, bei einer lokalen Induktion in wenigen Zellen sogar erst nach zwei Wochen. Die induzierbare DsRed2-Fluoreszenz eines anderen Reporterstammes konnte bereits 48 h nach Hitzeschockaktivierung im gesamten Tier beobachtet werden (Abb. 39, S.75). Für weitere Laserexperimente ist u.U. das stärker fluoreszierende tdTomato-Protein besser geeignet, um eine Expression in nur wenigen Zellen detektieren zu können. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass es grundsätzlich auch in *Xenopus laevis* möglich ist, die Überexpression eines Gens mit dem binären Cre/loxP-System durch Anwendung eines lokalen Hitzeschocks auf wenige Zellen zu begrenzen. Die Methode muss allerdings in weiteren Experimenten optimiert werden, um eine pronephrosspezifische Aktivierung von Genen zu erreichen.

Mit dieser Methode wäre es auch möglich, HNF1 $\beta$  durch einen lokalen Hitzeschock pronephrosspezifisch zu aktivieren. Hierfür würden Tiere benötigt, die als Transgene ein HNF1 $\beta$ -Derivat und ein Markergen, wie z.B. tdTomato, sowie die hitzeschockinduzierbare Cre-Rekombinase besitzen. In diesen Tieren könnte die pronephrosspezifische, Cre-vermittelte Hitzeschockaktivierung von HNF1 $\beta$  und tdTomato durch Laserbestrahlung erfolgen. Durch das tdTomato-Markergen könnten Zellen, in denen eine Hitzeschockaktivierung der beiden Effektortransgene stattgefunden hat, sehr einfach anhand roter Fluoreszenz identifiziert werden. Die Herstellung der hierfür notwendigen Effektorstämme ist allerdings relativ zeitaufwendig.

Grundsätzlich ist die Aktivierung von Genen mit einem lokalen Hitzeschock durch Laserlicht eine gute Alternative zur gewebespezifischen Überexpression von Genen

mittels gewebespezifischer Promotoren. Diese erlauben zwar eine genau definierte räumliche und zeitliche Expression. Soll die Expression eines Transgens aber auf ein sehr kurzes Zeitfenster oder nur sehr wenige Zellen begrenzt werden, so ist allerdings nicht immer ein entsprechender Promotor verfügbar. Die Isolierung eines brauchbaren Promotorelementes ist zudem sehr zeitaufwendig. Die Aktivität des Hitzeschockpromotors kann jedoch durch einen lokalen Hitzeschock mittels Laserlicht auf genau definierte Bereiche und sogar auf einzelne Zellen beschränkt werden. So wurden z.B. im Schmetterling *Bicyclus anynana* und im Zebrafisch transgene Linien etabliert, die ein HSP70-GFP-Transgen tragen. Durch einen lokalen Hitzeschock mittels Laserlicht konnte die GFP-Expression im Schmetterling *Bicyclus anynana* auf einzelne Zellen des sich entwickelnden Flügels (Ramos et al., 2006) und im Zebrafisch auf einzelne Nervenzellen (Halloran et al., 2000) beschränkt werden.

## **5 Zusammenfassung**

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist ein attraktives Modell, um die frühe Entwicklung von Vertebraten auf molekularer und zellulärer Ebene zu untersuchen. Die Transparenz der Larven ermöglicht eine effiziente Beobachtung der zahlreichen morphologischen Veränderungen während der Organogenese.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1 $\beta$  insbesondere in der Nierenentwicklung von *Xenopus laevis* näher charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde das binäre Cre/loxP-System mit Aktivator- und Effektorstämmen verwendet. In diesem System kann die Cre-Rekombinase konditional durch einen Hitzeschock aktiviert werden.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Transkription der Cre-Rekombinase sowohl im HSPCre1- und im HSPCre13-Aktivatorstamm durch einen einstündigen Hitzeschock effizient aktiviert wird und beide Stämme als Aktivatorstämme für das Cre/loxP-System verwendet werden können.

Durch Kreuzung des C5-Stammes mit dem HSPCre1-Stamm wurde gezeigt, dass bereits eine Stunde nach Beginn des Hitzeschocks Transkripte eines induzierbaren Reportergens detektierbar waren.

Die HSPCre13 vermittelte Überexpression der P328L329del-Mutation durch einen einstündigen Hitzeschock führte zu Nierendefekten und Fehlentwicklungen anderer Organe. Es wiesen jedoch nicht alle mutanten Larven Nierendefekte auf. Dieses Ergebnis konnte in weiteren Kreuzungen mit unabhängigen Aktivator- und Effektorstämmen bestätigt werden.

Nach der Optimierung des binären Cre/loxP-Systems durch einen zweistündigen Hitzeschock konnte gezeigt werden, dass die ubiquitäre Überexpression der P328L329del-Mutation in allen mutanten Larven zu einem Nierenphänotyp führte. Insgesamt war die Niere signifikant verkleinert. Zusätzlich interferierte die Überexpression mit der Entwicklung des Magen-Darm-Traktes, des Schwanzes und des Auges.

Durch die Analyse ausgewählter Marker für die einzelnen Segmente des sich entwickelnden Pronephros konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des mutanten Derivates P328L329del die Expression der Gene *slc3a1* und *tmem27*, welche spezifisch in den proximalen Tubuli exprimiert werden, beeinflusste. Beide

Gene spielen eine Rolle bei der renalen Reabsorption von Aminosäuren. Dieses Resultat enthüllt eine neue Rolle von HNF1 $\beta$  in der Nierenphysiologie.

Larven in denen das mutante HNF1 $\beta$ -Derivat A263insGG ubiquitär aktiviert war, wiesen ebenfalls Defekte der Niere, des Magen-Darm-Traktes, des Schwanzes und des Auges auf. Im Gegensatz zu dem durch die Überexpression von P328L329del verursachten Nierenphänotyp, war die Niere hier signifikant vergrößert. Die Überexpression von HNF1 $\beta$  hatte hingegen keinen Einfluss auf die Larvenentwicklung.

Desweiteren konnten zwei neue Effektorstämme etabliert werden, mit denen HNF1 $\beta$  und das mutante Derivat P328L329del im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten ausschließlich im Pronephros überexprimiert werden können. Es konnte gezeigt werden, dass die pronephrosspezifische Überexpression von HNF1 $\beta$  mit der Entwicklung der Niere und des Magen-Darm-Traktes interferierte. Im Schwanzbereich und im Auge wurden keine Defekte beobachtet.

Weiterhin wurde eine neue Methode in *Xenopus laevis* getestet und optimiert, bei der die lokale Hitzeschockaktivierung eines Gens mittels Laserbestrahlung erfolgt. Mit dieser Methode war es möglich, das EYFP-Reporter-gen des C5-Stammes lokal in einzelnen Schwanzmuskelzellen und im Pronephros zu aktivieren. Diese Methode wurde in dieser Arbeit erstmalig in *Xenopus laevis* angewandt und ermöglicht eine gewebespezifische Überexpression von Genen ohne die Verwendung gewebespezifischer Promotoren.

## 6 Literaturverzeichnis

Akpinar,P., Kuwajima,S., Krutzfeldt,J., and Stoffel,M. (2005). Tmem27: a cleaved and shed plasma membrane protein that stimulates pancreatic beta cell proliferation. *Cell Metab* 2, 385-397.

Bach,I., Mattei,M.G., Cereghini,S., and Yaniv,M. (1991). Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res.* 19, 3553-3559.

Bai,Y., Pontoglio,M., Hiesberger,T., Sinclair,A.M., and Igarashi,P. (2002). Regulation of kidney-specific Ksp-cadherin gene promoter by hepatocyte nuclear factor-1beta. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 283, F839-F851.

Barbacci,E., Reber,M., Ott,M.O., Breillat,C., Huetz,F., and Cereghini,S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* 126, 4795-4805.

Beck,C.W., Christen,B., and Slack,J.M. (2003). Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Dev. Cell* 5, 429-439.

Beck,C.W. and Slack,J.M. (1999). Gut specific expression using mammalian promoters in transgenic *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 88, 221-227.

Bellanne-Chantelot,C., Chauveau,D., Gautier,J.F., Dubois-Laforgue,D., Clauin,S., Beaufils,S., Wilhelm,J.M., Boitard,C., Noel,L.H., Velho,G., and Timsit,J. (2004). Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann. Intern. Med.* 140, 510-517.

Bienz,M. and Pelham,H.R. (1982). Expression of a *Drosophila* heat-shock protein in *Xenopus* oocytes: conserved and divergent regulatory signals. *EMBO J.* 1, 1583-1588.

Bingham,C., Bulman,M.P., Ellard,S., Allen,L.I., Lipkin,G.W., Hoff,W.G., Woolf,A.S., Rizzoni,G., Novelli,G., Nicholls,A.J., and Hattersley,A.T. (2001b). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 219-224.

Bisceglia,L., Fischetti,L., Bonis,P.D., Palumbo,O., Augello,B., Stanziale,P., Carella,M., and Zelante,L. (2010). Large rearrangements detected by MLPA, point mutations, and survey of the frequency of mutations within the SLC3A1 and SLC7A9 genes in a cohort of 172 cystinuric Italian patients. *Mol. Genet. Metab* 99, 42-52.

Blechinger,S.R., Evans,T.G., Tang,P.T., Kuwada,J.Y., Warren,J.T., Jr., and Krone,P.H. (2002). The heat-inducible zebrafish hsp70 gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions. *Mech. Dev.* 112, 213-215.

Blumenfeld,M., Maury,M., Chouard,T., Yaniv,M., and Condamine,H. (1991). Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) shows a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113, 589-599.

- Bohn,S., Thomas,H., Turan,G., Ellard,S., Bingham,C., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2003). Distinct molecular and morphogenetic properties of mutations in the human HNF1beta gene that lead to defective kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 2033-2041.
- Brand,A.H. and Perrimon,N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brändli,A.W. (1999). Towards a molecular anatomy of the *Xenopus* pronephric kidney. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 381-395.
- Brunskill,E.W., Aronow,B.J., Georgas,K., Rumballe,B., Valerius,M.T., Aronow,J., Kaimal,V., Jegga,A.G., Yu,J., Grimmond,S., McMahon,A.P., Patterson,L.T., Little,M.H., and Potter,S.S. (2008). Atlas of gene expression in the developing kidney at microanatomic resolution. *Dev. Cell* 15, 781-791.
- Buchholz,D.R., Fu,L., and Shi,Y.B. (2004). Cryopreservation of *Xenopus* transgenic lines. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 65-69.
- Cereghini,S. (1996). Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* 10, 267-282.
- Cereghini,S., Blumenfeld,M., and Yaniv,M. (1988). A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes Dev.* 2, 957-974.
- Chae,J., Zimmerman,L.B., and Grainger,R.M. (2002). Inducible control of tissue-specific transgene expression in *Xenopus tropicalis* transgenic lines. *Mech. Dev.* 117, 235-241.
- Chillaron,J., Estevez,R., Samarzija,I., Waldegger,S., Testar,X., Lang,F., Zorzano,A., Busch,A., and Palacin,M. (1997). An intracellular trafficking defect in type I cystinuria rBAT mutants M467T and M467K. *J. Biol. Chem.* 272, 9543-9549.
- Coffinier,C., Barra,J., Babinet,C., and Yaniv,M. (1999a). Expression of the vHNF1/HNF1beta homeoprotein gene during mouse organogenesis. *Mech. Dev.* 89, 211-213.
- Coffinier,C., Gresh,L., Fiette,L., Tronche,F., Schutz,G., Babinet,C., Pontoglio,M., Yaniv,M., and Barra,J. (2002). Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* 129, 1829-1838.
- Coffinier,C., Thepot,D., Babinet,C., Yaniv,M., and Barra,J. (1999b). Essential role for the homeoprotein vHNF1/HNF1beta in visceral endoderm differentiation. *Development* 126, 4785-4794.
- Danielian,P.S., Muccino,D., Rowitch,D.H., Michael,S.K., and McMahon,A.P. (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.* 8, 1323-1326.

- Danilczyk,U., Sarao,R., Remy,C., Benabbas,C., Stange,G., Richter,A., Arya,S., Pospisilik,J.A., Singer,D., Camargo,S.M., Makrides,V., Ramadan,T., Verrey,F., Wagner,C.A., and Penninger,J.M. (2006). Essential role for collectrin in renal amino acid transport. *Nature* 444, 1088-1091.
- Das,B. and Brown,D.D. (2004). Controlling transgene expression to study *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4839-4842.
- Demartis,A., Maffei,M., Vignali,R., Barsacchi,G., and De,S., V (1994). Cloning and developmental expression of LFB3/HNF1 beta transcription factor in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 47, 19-28.
- Edghill,E.L., Oram,R.A., Owens,M., Stals,K.L., Harries,L.W., Hattersley,A.T., Ellard,S., and Bingham,C. (2008). Hepatocyte nuclear factor-1beta gene deletions--a common cause of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 627-635.
- Fernandez,E., Carrascal,M., Rousaud,F., Abian,J., Zorzano,A., Palacin,M., and Chillaron,J. (2002). rBAT-b(0,+)-AT heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 283, F540-F548.
- Fernandez,E., Jimenez-Vidal,M., Calvo,M., Zorzano,A., Tebar,F., Palacin,M., and Chillaron,J. (2006). The structural and functional units of heteromeric amino acid transporters. The heavy subunit rBAT dictates oligomerization of the heteromeric amino acid transporters. *J. Biol. Chem.* 281, 26552-26561.
- Fischer,E. and Pontoglio,M. (2008). HNF1beta and defective nephrogenesis: a role for interacting partners? *Kidney Int.* 74, 145-147.
- Fuhrmann-Benzakein,E., Garcia-Gabay,I., Pepper,M.S., Vassalli,J.D., and Herrera,P.L. (2000). Inducible and irreversible control of gene expression using a single transgene. *Nucleic Acids Res.* 28, E99.
- Fukui,K., Yang,Q., Cao,Y., Takahashi,N., Hatakeyama,H., Wang,H., Wada,J., Zhang,Y., Marselli,L., Nammo,T., Yoneda,K., Onishi,M., Higashiyama,S., Matsuzawa,Y., Gonzalez,F.J., Weir,G.C., Kasai,H., Shimomura,I., Miyagawa,J., Wollheim,C.B., and Yamagata,K. (2005). The HNF-1 target collectrin controls insulin exocytosis by SNARE complex formation. *Cell Metab* 2, 373-384.
- Ganapathy,V. (2009). A traffic signal for heterodimeric amino acid transporters to transfer from the ER to the Golgi. *Biochem. J.* 417, e9-11.
- Gerth,V.E., Zhou,X., and Vize,P.D. (2005). Nephric expression and three-dimensional morphogenesis of the *Xenopus* pronephric glomus. *Dev. Dyn.* 233, 1131-1139.
- Göttgens,B., Nastos,A., Kinston,S., Piltz,S., Delabesse,E.C., Stanley,M., Sanchez,M.J., Ciau-Uitz,A., Patient,R., and Green,A.R. (2002). Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by a multiprotein complex containing Ets and GATA factors. *EMBO J.* 21, 3039-3050.

- Gresh,L., Fischer,E., Reimann,A., Tanguy,M., Garbay,S., Shao,X., Hiesberger,T., Fiette,L., Igarashi,P., Yaniv,M., and Pontoglio,M. (2004). A transcriptional network in polycystic kidney disease. *EMBO J.* 23, 1657-1668.
- Halfon,M.S., Kose,H., Chiba,A., and Keshishian,H. (1997). Targeted gene expression without a tissue-specific promoter: creating mosaic embryos using laser-induced single-cell heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6255-6260.
- Halloran,M.C., Sato-Maeda,M., Warren,J.T., Su,F., Lele,Z., Krone,P.H., Kuwada,J.Y., and Shoji,W. (2000). Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* 127, 1953-1960.
- Hardy,M.E., Ross,L.V., and Chien,C.B. (2007). Focal gene misexpression in zebrafish embryos induced by local heat shock using a modified soldering iron. *Dev. Dyn.* 236, 3071-3076.
- Hartley,K.O., Nutt,S.L., and Amaya,E. (2002). Targeted gene expression in transgenic *Xenopus* using the binary Gal4-UAS system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1377-1382.
- Haumaître,C., Barbacci,E., Jenny,M., Ott,M.O., Gradwohl,G., and Cereghini,S. (2005). Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 1490-1495.
- Haumaître,C., Fabre,M., Cormier,S., Baumann,C., Delezoide,A.L., and Cereghini,S. (2006). Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2363-2375.
- Hernandez,R.E., Rikhof,H.A., Bachmann,R., and Moens,C.B. (2004). vhnf1 integrates global RA patterning and local FGF signals to direct posterior hindbrain development in zebrafish. *Development* 131, 4511-4520.
- Hiesberger,T., Bai,Y., Shao,X., McNally,B.T., Sinclair,A.M., Tian,X., Somlo,S., and Igarashi,P. (2004). Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice. *J. Clin. Invest* 113, 814-825.
- Hiesberger,T., Shao,X., Gourley,E., Reimann,A., Pontoglio,M., and Igarashi,P. (2005). Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 10578-10586.
- Horikawa,Y., Iwasaki,N., Hara,M., Furuta,H., Hinokio,Y., Cockburn,B.N., Lindner,T., Yamagata,K., Ogata,M., Tomonaga,O., Kuroki,H., Kasahara,T., Iwamoto,Y., and Bell,G.I. (1997). Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat. Genet.* 17, 384-385.
- Huang,H., Marsh-Armstrong,N., and Brown,D.D. (1999). Metamorphosis is inhibited in transgenic *Xenopus laevis* tadpoles that overexpress type III deiodinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 962-967.



- Jones,E.A. (2005). *Xenopus*: a prince among models for pronephric kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*, 313-321.
- Kawashima,D., Asai,M., Katagiri,K., Takeuchi,R., and Ohtsuka,K. (2009). Reinvestigation of the effect of carbenoxolone on the induction of heat shock proteins. *Cell Stress. Chaperones.* *14*, 535-543.
- Kilby,N.J., Snaith,M.R., and Murray,J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* *9*, 413-421.
- Kroll,K.L. and Amaya,E. (1996). Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development* *122*, 3173-3183.
- Le,X., Langenau,D.M., Keefe,M.D., Kutok,J.L., Neuberg,D.S., and Zon,L.I. (2007). Heat shock-inducible Cre/Lox approaches to induce diverse types of tumors and hyperplasia in transgenic zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 9410-9415.
- Lecaudey,V., Ulloa,E., Anselme,I., Stedman,A., Schneider-Maunoury,S., and Pujades,C. (2007). Role of the hindbrain in patterning the otic vesicle: a study of the zebrafish *vhnf1* mutant. *Dev. Biol.* *303*, 134-143.
- Lewandoski,M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 743-755.
- Lockwood,C.R., Bingham,C., and Frayling,T.M. (2003). In silico searching of human and mouse genome data identifies known and unknown HNF1 binding sites upstream of beta-cell genes. *Mol. Genet. Metab* *78*, 145-151.
- Lokmane,L., Haumaître,C., Garcia-Villalba,P., Anselme,I., Schneider-Maunoury,S., and Cereghini,S. (2008). Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification. *Development* *135*, 2777-2786.
- Lokmane,L., Heliot,C., Garcia-Villalba,P., Fabre,M., and Cereghini,S. (2010). vHNF1 functions in distinct regulatory circuits to control ureteric bud branching and early nephrogenesis. *Development* *137*, 347-357.
- Lu,P., Rha,G.B., and Chi,Y.I. (2007). Structural basis of disease-causing mutations in hepatocyte nuclear factor 1beta. *Biochemistry* *46*, 12071-12080.
- Maestro,M.A., Cardalda,C., Boj,S.F., Luco,R.F., Servitja,J.M., and Ferrer,J. (2007). Distinct roles of HNF1beta, HNF1alpha, and HNF4alpha in regulating pancreas development, beta-cell function and growth. *Endocr. Dev.* *12*, 33-45.
- Malakauskas,S.M., Quan,H., Fields,T.A., McCall,S.J., Yu,M.J., Kourany,W.M., Frey,C.W., and Le,T.H. (2007). Aminoaciduria and altered renal expression of luminal amino acid transporters in mice lacking novel gene collectrin. *Am. J. Physiol Renal Physiol* *292*, F533-F544.

- Marsh-Armstrong,N., Huang,H., Berry,D.L., and Brown,D.D. (1999). Germ-line transmission of transgenes in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14389-14393.
- McCoy,K.E., Zhou,X., and Vize,P.D. (2008). Collectrin/tmem27 is expressed at high levels in all segments of the developing *Xenopus* pronephric nephron and in the Wolffian duct. *Gene Expr. Patterns*. 8, 271-274.
- Mendel,D.B., Khavari,P.A., Conley,P.B., Graves,M.K., Hansen,L.P., Admon,A., and Crabtree,G.R. (1991). Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 254, 1762-1767.
- Michiue,T. and Asashima,M. (2005). Temporal and spatial manipulation of gene expression in *Xenopus* embryos by injection of heat shock promoter-containing plasmids. *Dev. Dyn.* 232, 369-376.
- Mohamed,Q., Gillies,M.C., and Wong,T.Y. (2007). Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 298, 902-916.
- Nieuwkoop P.D. and Faber J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier/North-Holland Publishing Co). 1975. Ref Type: Report
- Nishigori,H., Yamada,S., Kohama,T., Tomura,H., Sho,K., Horikawa,Y., Bell,G.I., Takeuchi,T., and Takeda,J. (1998). Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes* 47, 1354-1355.
- O'Gorman,S., Fox,D.T., and Wahl,G.M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251, 1351-1355.
- Palacin,M. and Kanai,Y. (2004). The ancillary proteins of HATs: SLC3 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* 447, 490-494.
- Pan,F.C., Chen,Y., Loeber,J., Henningfeld,K., and Pieler,T. (2006). I-SceI meganuclease-mediated transgenesis in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 235, 247-252.
- Pfeifer,A., Brandon,E.P., Kootstra,N., Gage,F.H., and Verma,I.M. (2001). Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 11450-11455.
- Phillips,B.T., Bolding,K., and Riley,B.B. (2001). Zebrafish *fgf3* and *fgf8* encode redundant functions required for otic placode induction. *Dev. Biol.* 235, 351-365.
- Phillips,K. and Luisi,B. (2000). The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit. *J. Mol. Biol.* 302, 1023-1039.
- Pineda,M., Wagner,C.A., Broer,A., Stehberger,P.A., Kaltenbach,S., Gelpi,J.L., Martin Del,R.R., Zorzano,A., Palacin,M., Lang,F., and Broer,S. (2004). Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b0,+AT. *Biochem. J.* 377, 665-674.

- Pogge von Strandmann E. and Ryffel,G.U. (1995). Developmental expression of the maternal protein XDCoH, the dimerization cofactor of the homeoprotein LFB1 (HNF1). *Development* 121, 1217-1226.
- Pogge von Strandmann,E.P., Nastos,A., Holewa,B., Senkel,S., Weber,H., and Ryffel,G.U. (1997). Patterning the expression of a tissue-specific transcription factor in embryogenesis: HNF1 alpha gene activation during *Xenopus* development. *Mech. Dev.* 64, 7-17.
- Pontoglio,M. (2000). Hepatocyte nuclear factor 1, a transcription factor at the crossroads of glucose homeostasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 Suppl 16, S140-S143.
- Raciti,D., Reggiani,L., Geffers,L., Jiang,Q., Bacchion,F., Subrizi,A.E., Clements,D., Tindal,C., Davidson,D.R., Kaissling,B., and Brandli,A.W. (2008). Organization of the pronephric kidney revealed by large-scale gene expression mapping. *Genome Biol.* 9, R84.
- Ramos,D.M., Kamal,F., Wimmer,E.A., Cartwright,A.N., and Monteiro,A. (2006). Temporal and spatial control of transgene expression using laser induction of the hsp70 promoter. *BMC. Dev. Biol.* 6, 55.
- Ridgway,P., Quivy,J.P., and Almouzni,G. (2000). Tetracycline-regulated gene expression switch in *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.* 256, 392-399.
- Roose M. (2008). Beeinflussung der Genregulation durch Rekombinasen in der Entwicklung von *Xenopus laevis* (Inaugural-Dissertation).
- Roose,M., Sauert,K., Turan,G., Solomentsev,N., Werdien,D., Pramanik,K., Senkel,S., Ryffel,G.U., and Waldner,C. (2009). Heat-shock inducible Cre strains to study organogenesis in transgenic *Xenopus laevis*. *Transgenic Res.* 18, 595-605.
- Rosenfeld,M.G. (1991). POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators. *Genes Dev.* 5, 897-907.
- Rosengarten, S. (2006) Untersuchung der Expressionsmuster verschiedener Pronephrosmarker in der whole mount in situ-Hybridisierung in *Xenopus laevis* (Bachelorarbeit).
- Ryan,A.K. and Rosenfeld,M.G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* 11, 1207-1225.
- Ryffel,G.U. (2001). Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 11-29.
- Ryffel,G.U. (2003). What can a frog tell us about human kidney development. *Nephron Exp. Nephrol.* 94, e35-e43.
- Ryffel,G.U. and Lingott,A. (2000). Distinct promoter elements mediate endodermal and mesodermal expression of the HNF1alpha promoter in transgenic *Xenopus*. *Mech. Dev.* 90, 65-75.

- Ryffel,G.U., Werdien,D., Turan,G., Gerhards,A., Goosses,S., and Senkel,S. (2003). Tagging muscle cell lineages in development and tail regeneration using Cre recombinase in transgenic *Xenopus*. *Nucleic Acids Res.* 31, e44.
- Sakamaki,K., Takagi,C., Yoshino,J., Yokota,H., Nakamura,S., Kominami,K., Hyodo,A., Takamune,K., Yuge,M., and Ueno,N. (2005). Transgenic frogs expressing the highly fluorescent protein venus under the control of a strong mammalian promoter suitable for monitoring living cells. *Dev. Dyn.* 233, 562-569.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis T. *Molecular cloning- a laboratory manual.* (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York). 1989.
- Schmidt,E.E., Taylor,D.S., Prigge,J.R., Barnett,S., and Capecchi,M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13702-13707.
- Schreiber,A.M., Mukhi,S., and Brown,D.D. (2009). Cell-cell interactions during remodeling of the intestine at metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 331, 89-98.
- Schwenk,F., Kuhn,R., Angrand,P.O., Rajewsky,K., and Stewart,A.F. (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res.* 26, 1427-1432.
- Semprini,S., Troup,T.J., Kotelevtseva,N., King,K., Davis,J.R., Mullins,L.J., Chapman,K.E., Dunbar,D.R., and Mullins,J.J. (2007). Cryptic loxP sites in mammalian genomes: genome-wide distribution and relevance for the efficiency of BAC/PAC recombineering techniques. *Nucleic Acids Res.* 35, 1402-1410.
- Senkel,S., Lucas,B., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2005). Identification of target genes of the transcription factor HNF1beta and HNF1alpha in a human embryonic kidney cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1731, 179-190.
- Siddiqui,F., Avery,P.R., Li,C.Y., Zhang,X., LaRue,S.M., Dewhirst,M.W., and Ullrich,R.L. (2008). Induction of the human heat shock promoter HSP70B by nutritional stress: implications for cancer gene therapy. *Cancer Invest* 26, 553-561.
- Sive, H., Grainger, R.M., and Harland, R.M. *Early development of Xenopus laevis: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbour, New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press). 2000.
- Song,J., Kim,H.J., Gong,Z., Liu,N.A., and Lin,S. (2007). Vhnf1 acts downstream of Bmp, Fgf, and RA signals to regulate endocrine beta cell development in zebrafish. *Dev. Biol.* 303, 561-575.
- Stark,W.M., Boocock,M.R., and Sherratt,D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* 8, 432-439.

- Sun,Z., Amsterdam,A., Pazour,G.J., Cole,D.G., Miller,M.S., and Hopkins,N. (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* 131, 4085-4093.
- Sun,Z. and Hopkins,N. (2001). *vhnf1*, the MODY5 and familial GCKD-associated gene, regulates regional specification of the zebrafish gut, pronephros, and hindbrain. *Genes Dev.* 15, 3217-3229.
- Tena,J.J., Neto,A., de,I.C.-M., Bras-Pereira,C., Casares,F., and Gomez-Skarmeta,J.L. (2007). Odd-skipped genes encode repressors that control kidney development. *Dev. Biol.* 301, 518-531.
- Thermes,V., Grabher,C., Ristoratore,F., Bourrat,F., Choulika,A., Wittbrodt,J., and Joly,J.S. (2002). I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mech. Dev.* 118, 91-98.
- Thomas,H., Senkel,S., Erdmann,S., Arndt,T., Turan,G., Klein-Hitpass,L., and Ryffel,G.U. (2004). Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* 32, e150.
- Thummel,R., Burket,C.T., Brewer,J.L., Sarras,M.P., Jr., Li,L., Perry,M., McDermott,J.P., Sauer,B., Hyde,D.R., and Godwin,A.R. (2005). Cre-mediated site-specific recombination in zebrafish embryos. *Dev. Dyn.* 233, 1366-1377.
- Thyagarajan,B., Guimaraes,M.J., Groth,A.C., and Calos,M.P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244, 47-54.
- Tomura,H., Nishigori,H., Sho,K., Yamagata,K., Inoue,I., and Takeda,J. (1999). Loss-of-function and dominant-negative mechanisms associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations in familial type 2 diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 274, 12975-12978.
- Tran,U., Pickney,L.M., Ozpolat,B.D., and Wessely,O. (2007). *Xenopus* Bicaudal-C is required for the differentiation of the amphibian pronephros. *Dev. Biol.* 307, 152-164.
- Tronche,F. and Yaniv,M. (1992). HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network. *Bioessays* 14, 579-587.
- Verdeguer,F., Le,C.S., Fischer,E., Callens,C., Garbay,S., Doyen,A., Igarashi,P., Terzi,F., and Pontoglio,M. (2010). A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease. *Nat. Med.* 16, 106-110.
- Vize,P.D., Jones,E.A., and Pfister,R. (1995). Development of the *Xenopus* pronephric system. *Dev. Biol.* 171, 531-540.
- Vize,P.D., Seufert,D.W., Carroll,T.J., and Wallingford,J.B. (1997). Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. *Dev. Biol.* 188, 189-204.

Waldner,C., Sakamaki,K., Ueno,N., Turan,G., and Ryffel,G.U. (2006). Transgenic *Xenopus laevis* strain expressing cre recombinase in muscle cells. *Dev. Dyn.* 235, 2220-2228.

Wang,L., Coffinier,C., Thomas,M.K., Gresh,L., Eddu,G., Manor,T., Levitsky,L.L., Yaniv,M., and Rhoads,D.B. (2004). Selective deletion of the *Hnf1beta* (*MODY5*) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* 145, 3941-3949.

Wang,Y., Xu,J., Pierson,T., O'Malley,B.W., and Tsai,S.Y. (1997). Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther.* 4, 432-441.

Weber,H., Holewa,B., Jones,E.A., and Ryffel,G.U. (1996a). Mesoderm and endoderm differentiation in animal cap explants: identification of the *HNF4*-binding site as an activin A responsive element in the *Xenopus HNF1alpha* promoter. *Development* 122, 1975-1984.

Weber,H., Strandmann,E.P., Holewa,B., Bartkowski,S., Zapp,D., Zoidl,C., and Ryffel,G.U. (1996b). Regulation and function of the tissue-specific transcription factor *HNF1 alpha* (*LFB1*) during *Xenopus* development. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 297-304.

Wheeler,G.N., Hamilton,F.S., and Hoppler,S. (2000). Inducible gene expression in transgenic *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* 10, 849-852.

Wild,W., Pogge von,S.E., Nastos,A., Senkel,S., Lingott-Frieg,A., Bulman,M., Bingham,C., Ellard,S., Hattersley,A.T., and Ryffel,G.U. (2000). The mutated human gene encoding hepatocyte nuclear factor 1beta inhibits kidney formation in developing *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4695-4700.

Zhou,X. and Vize,P.D. (2004). Proximo-distal specialization of epithelial transport processes within the *Xenopus* pronephric kidney tubules. *Dev. Biol.* 271, 322-338.

## 7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. phil. nat. Gerhart U. Ryffel für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, sowie die ständige Gesprächsbereitschaft und konstruktive Kritik. Weiterhin danke ich ihm für die Durchsicht dieses Manuskripts und die Erstellung des Erstgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Christoph Waldner für die intensive Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft, sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Gülüzar Turan und Sabine Senkel danke ich für die Unterstützung bei technischen Fragen zu jeder Zeit.

Natalie Solomentsew danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der vielen PCR-Analysen.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AGIII, die mich während meiner Promotionszeit begleitet haben, bedanke ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und die vielen Kekse. Die Zeit mit euch wird mir noch lange in Erinnerung bleiben!

Detlef Szengel, Michael Oepp und Thomas Haberland danke ich für die gute Pflege der adulten *Xenopus laevis*.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie stets an mich geglaubt haben.

Johannes danke ich für seine liebevolle Unterstützung und unendliche Geduld in allen Lebenslagen. Dies hat mir vor allem in schwierigeren Phasen der Promotionszeit sehr geholfen!

## **LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes in der Online-Version nicht enthalten.



**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Konditionale Überexpression des Transkriptionsfaktors HNF1 $\beta$  und dessen Einfluss auf die Nierenentwicklung in *Xenopus laevis*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Kathrin Sauert befürworte.

Essen, den 22.09.2010

\_\_\_\_\_

(Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 22.09.2010

\_\_\_\_\_

(Kathrin Sauert)

**Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 22.09.2010

\_\_\_\_\_

(Kathrin Sauert)