

**Charakterisierung der molekularen und morphogenetischen
Eigenschaften von Mutationen des humanen HNF1 β Gens**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Des Fachbereiches Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der Universität Duisburg Essen

Standort Essen

vorgelegt von

Silvia Bohn

aus Eschwege

Juli 2003

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

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Grunz

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Dr. D. Hering

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 09. 2003

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

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 HNF1 β
Gene That Lead to Defective Kidney Development. J. Am. Soc. Nephrol. 14: 2033-2041.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
1.	Transkription.....	1
1.1	Die gewebespezifische Transkription.....	2
1.2	Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β	3
1.3	Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF1 β des Menschen.....	5
1.4	Der Krallenfrosch <i>Xenopus laevis</i> als Modellorganismus.....	10
1.5	Der Pronephros von <i>Xenopus laevis</i>	11
2.	Zielsetzung der Arbeit.....	14
II.	Material und Methoden.....	15
1.	Chemikalien Puffer und Enzyme.....	15
2.	Molekularbiologische Standardmethoden und Expressionsvektoren.....	15
2.1	Expressionsvektoren.....	15
2.2	Reportergene.....	16
3.	Zellkultur von HeLa- und HEK293- Zellen.....	17
4.	Transiente Transfektion, Luciferaseassay, Herstellung von Kernextrakten und Immunfluoreszenz.....	17
4.1	Luciferaseassay.....	17
4.2	Herstellung von Kernextrakten aus HeLa Zellen.....	18
4.3	Immunofluoreszenz von HeLa Zellen.....	19
5.	Gelretardationsanalyse	19
6.	Gekoppelte in vitro Transkription / Translation und Western Blotting.....	20
6.1	Gekoppelte in vitro Transkription / Translation.....	20
6.2	Western Blotting.....	21
7.	Haltung, in vitro Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches <i>Xenopus laevis</i>.....	22

8.	In vitro Synthese von mRNA und Injektion der Embryonen.....	23
8.1	In vitro Synthese von mRNA.....	23
8.2	Injektion der Embryonen.....	23
9.	Immunfluoreszenz von <i>Xenopus laevis</i> Larven.....	24
10.	Statistische Auswertung.....	25
11.	Whole mount in situ Hybridisierung von <i>Xenopus laevis</i> Embryonen.....	25
III.	Ergebnisse.....	27
1.	Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF1β verändern dessen Eigenschaften.	27
1.1	Die HNF1 β Mutanten kodieren für Proteine unterschiedlicher Größe.....	28
1.2	Unterschiede in der DNA-Bindungsfähigkeit der HNF1 β Mutanten.....	29
1.3	Unterschiede in der Dimerisierung der HNF1 β Mutanten.....	31
1.4	Die HNF1 β Mutanten zeigen ein unterschiedliches Transaktivierungspotential.....	32
1.5	Keine der HNF1 β Mutanten wirkt dominant negativ.....	34
1.6	Unterschiede in der zellulären Lokalisation der HNF1 β Mutanten.....	37
2.	Durch Überexpression von mutiertem HNF1β in <i>Xenopus laevis</i> Embryonen kommt es zu Störungen bei der Pronephrosentwicklung.....	39
2.1	Reduktion des Pronephros durch Injektion der Mutante Y352.....	40
2.2	Vergrößerung des Pronephros durch Injektion der Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263.....	42
3.	Die Expression früher Nierenmarkergene wird durch mutiertes HNF1β nicht beeinflusst.....	47

IV. Diskussion.....	52
1. Basierend auf den molekularen Daten kann man zwei Gruppen von HNF1 β Mutanten unterscheiden.....	52
2. Basierend auf dem Einfluss der HNF1 β Mutanten auf die Pronephrosentwicklung im Xenopus kann man zwei Gruppen von Mutanten unterscheiden.....	56
3. Zusammenhang zwischen mutiertem HNF1 β und Erkrankungen des Menschen.....	59
4. Zusammenhang zwischen mutiertem HNF1 β und nonsense mediated mRNA decay (NMD).....	61
5. Mutationen im HNF1 β Gen haben keinen Einfluss auf die Expression anderer nierenspezifischer Gene.....	63
V. Zusammenfassung.....	68
VI. Literaturverzeichnis.....	70

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GRBB	gel retardation binding buffer
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNF	hepatocyte nuclear factor
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
min	Minuten
mRNA	messenger-RNA
nb	nicht bekannt
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamid
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	units (Einheit für Enzymaktivität)
Vol	Volumen

I. Einleitung

1. Transkription

Die erste und wichtigste Stufe der Regulation der Genexpression eukaryotischer Gene stellt die Transkription dar. Die Regulation der Transkription erfolgt durch regulatorische Proteine, die sogenannten Transkriptionsfaktoren. Sie binden an spezifische DNA-Elemente (*cis*-acting elements) im Promotorbereich von Genen und ermöglichen eine selektive Expression und Regulation der Gene. Durch die Bindung vieler unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren innerhalb eines Promotors ergibt sich über Kombination dieser Faktoren eine Ebene der Kontrolle der Genexpression. Eine zusätzliche Ebene der Regulation stellen Protein-Protein-Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren oder Korepressoren dar. Zusammen mit der Transkriptionsmaschinerie formen diese Proteine einen Multiproteinkomplex, der die regulierte mRNA Synthese ermöglicht. (Pabo and Sauer, 1992; Giordano and Avantaggiati, 1999; Klug, 1999; Goodman and Smolik, 2000).

Die räumlich und zeitlich differenziert auftretende Aktivität von Transkriptionsfaktoren ist Grundlage der differentiellen Genexpression und entscheidend für die embryonale Musterbildung und die Ontogenese mehrzelliger Organismen (Biggin and Tjian, 1989; Kessel and Gruss, 1990; Kessel and Gruss, 1990; Melton, 1991).

Grundsätzlich kann man zwei Arten von Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Zum einen die basalen Transkriptionsfaktoren, die ubiquitär in jedem Zelltyp vorhanden sind (Buratowski, 1994), und zum anderen die zell- und gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, die nur in bestimmten Geweben exprimiert werden und dort zelltypspezifische Gene regulieren. Somit enthält jeder Zelltyp neben den ubiquitären Proteinen auch eine charakteristische Ausstattung zelltypspezifischer Proteine.

1.1 Die gewebespezifische Transkription

Transkriptionsfaktoren, die nur in wenigen Geweben vorhanden sind und bei einer geringen Anzahl von Genen eines Organismus transkriptionsregulierend wirken, werden als regulatorische bzw. als gewebespezifische Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Muskelzellen weisen aufgrund vorhandener muskelspezifischer Transkriptionsfaktoren typische Proteine auf, wie zum Beispiel Aktin, Myosin und Troponin, die anderen Zelltypen fehlen. Für die Differenzierung von Zellen konnte die Bedeutung von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Das Einbringen myogener Transkriptionsfaktoren wie MyoD und Myogenin in Fibroblasten führt zur Ausbildung des muskelspezifischen Phänotyps (zur Übersicht: Olson, 1994). Untersuchungen zur Differenzierung anderer Zelltypen, wie beispielsweise Hepatozyten, zeigen jedoch, dass die alleinige Expression eines Transkriptionsfaktors zur Zelldetermination häufig nicht ausreicht. Die Expression leberspezifischer Gene wird vielmehr kooperativ von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert (Sladek and Darnell, 1992).

In ihrem molekularen Aufbau weisen viele Transkriptionsfaktoren eine modulare Zusammensetzung einzelner sogenannter Strukturdomänen auf, die gleichzeitig funktionelle Domänen repräsentieren. Derartige Funktionsdomänen erfüllen z.B. die Aufgaben der spezifischen DNA-Erkennung und DNA-Bindung (DNA-Bindungsdomänen) oder der Transkriptionsaktivierung (Transaktivierungsdomänen). Die Transaktivierungsdomänen sind häufig durch einen erhöhten Anteil repetitiver Aminosäuresequenzen charakterisiert. Anhand dieser Aminosäuren werden sie in Glutamin-, Serin/Threonin- bzw. Prolin-reiche sowie azide Transaktivierungsdomänen untergliedert (Seipel et al., 1992). Die Bindung an die DNA mit Hilfe der DNA-Bindungsdomäne ist Voraussetzung für die Aktivierung der Transkription, denn dadurch gelangt die Transaktivierungsdomäne in die Nähe des Startpunktes (Lewin 1997). Vergleiche der Aminosäuresequenzen von spezifischen Transkriptionsfaktoren ermöglichten die Identifizierung von Proteindomänen, die zur Bindung an die DNA führen (Ptashne, 1988). Dies führte zu der heute üblichen Klassifizierung spezifischer Transkriptionsfaktoren entsprechend ihrer DNA-Bindungsmodule (Pabo and Sauer, 1992).

1.2 Der gewebespezifische Transkriptionsfaktor HNF1 β

Der Transkriptionsfaktor HNF1 β (für **H**epatocyte **N**uclear **F**actor 1 β (Mendel et al., 1991)) wurde zuerst in Zellextrakten aus dedifferenzierten Ratten-Hepatoma-Zelllinien durch seine Bindung an das proximale Promotorelement (PE) des Albumin Gens identifiziert (Cereghini et al., 1988; Baumhueter et al., 1988). Später wurde das menschliche Homolog aus Leberzellen und ein Homolog aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* kloniert (Bach et al., 1991; Demartis et al., 1994). Aus humanen Leberzellen konnten drei Isoformen des HNF1 β Gens isoliert werden (HNF1 β A-C), die durch alternatives Splicen entstehen (Bach and Yaniv, 1993). Dabei unterscheidet sich Isoform HNF1 β -C deutlich von den anderen beiden, da HNF1 β -C nicht in der Lage ist zu transaktivieren und sich bei Kotransfektion mit HNF1 α als transdominanter Repressor verhält.

HNF1 β (auch benannt als LFB3 oder vHNF1) gehört zusammen mit dem nah verwandten Transkriptionsfaktor HNF1 α zur Familie der Homeoboxproteine, die sich durch eine 60 Aminosäuren enthaltende Domäne, die Homeodomäne, auszeichnet. Diese DNA-bindende Domäne ist während der Evolution von der Hefe zum Menschen konserviert worden. Die Homeodomäne ähnelt einem Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH), ist aber im Unterschied zur HTH-Einheit länger und stellt somit eine stabilere Struktur dar, die die DNA separat binden kann (Affolter et al., 1990; Scott et al., 1989; Holland and Hogan, 1988; Gehring, 1987). Die Analyse der Kristallstruktur der *Drosophila engrailed*-Homeodomäne zeigt, dass die Homeodomäne drei Helices (H α 1-3) und einen verlängerten N-terminalen Arm enthält (Kissinger et al., 1990). Die beiden HNF1 Proteine unterscheiden sich von allen anderen Homeoboxproteinen durch eine zusätzliche Sequenz von 21 Aminosäuren zwischen Helix II und III (Finney, 1990) der Homeodomäne. Neben dieser außergewöhnlichen Homeodomäne besitzen die beiden Transkriptionsfaktoren eine zweite DNA-bindende Domäne, die einer POU-Domäne ähnlich ist und als pseudo-POU-Domäne bezeichnet wird. Sie besteht aus fünf Helices (P α 1-5) (Chi et al., 2002). Die Homologie zwischen dem HNF1 α und β Protein ist in diesen beiden DNA-bindenden Domänen am größten. Sie beträgt 98% in der POU- und 93% in der Homeodomäne. Am Aminoterminus liegt eine Dimerisierungsdomäne (Aminosäure 1 bis 32), die eine Homo- und Heterodimerisierung der beiden HNF1 Proteine ermöglicht. Am C-terminalen Bereich befindet sich die Transaktivierungsdomäne, die ungefähr die Hälfte des Proteins darstellt und zwischen HNF1 α und β relativ wenig (47%) konserviert ist (Tronche

and Yaniv, 1992). Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht der Domänenstruktur der beiden HNF1 Proteine.

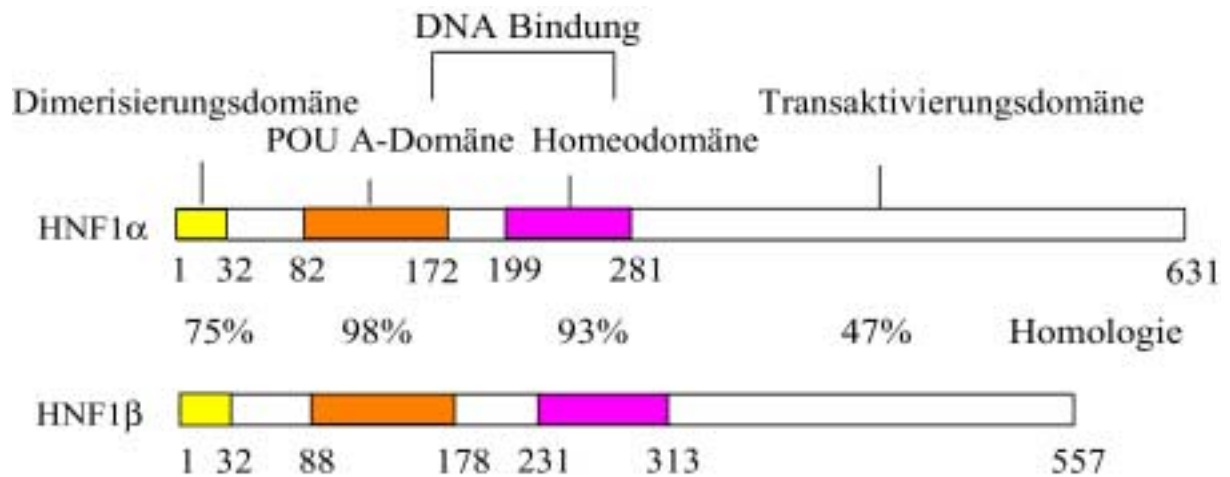


Abbildung 1: Schema der Transkriptionsfaktoren HNF1α und HNF1β

Die verschiedenen Domänen sind gekennzeichnet. Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäureposition und die Prozentzahlen auf die Homologie zwischen dem HNF1α und HNF1β Protein (Cereghini, 1996; Tronche and Yaniv, 1992).

Die wichtigsten Synthesorte des gewebespezifischen Transkriptionsfaktors HNF1β sind die Leber, die Niere, der Magendarmtrakt und die Lunge (Cereghini, 1996). In der Nierenentwicklung der Ratte können Transkripte von HNF1β in Zellen mesodermalen Ursprungs detektiert werden, sobald bei diesen die Differenzierung in ein polarisiertes Epithelium induziert wird. HNF1α hingegen wird zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert. Erst wenn die Segmentierung des Nephrons in drei unterschiedliche Bereiche bereits begonnen hat, wird HNF1α aktiviert. Auch der Expressionsort im Nephron ist zwischen HNF1α und β unterschiedlich. Die Expression von HNF1α beschränkt sich auf den proximalen und distalen Tubulus, wohingegen HNF1β zusätzlich im Sammelrohr aktiv ist (Lazzaro et al., 1992). Der Unterschied in der zeitlichen Expression beider Faktoren ist in der Embryonalentwicklung von Vertebraten konserviert, da bei allen untersuchten Spezies die Expression von HNF1β der von HNF1α vorausgeht. Untersuchungen an „knock-out“ Mäusen zeigten, dass der Verlust von HNF1α oder HNF1β unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Mäuse hat. Die homozygote Inaktivierung von HNF1β führt kurz nach der Implantation der Blastocyste zum Tod der Embryonen. Diese Letalität wird verursacht durch abnormale Entwicklung des extraembryonalen Gewebes, schlecht ausgebildetes Ektoderm

und fehlerhafter Differenzierung des parietalen und visceralen Endoderms (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Eine heterozygote Inaktivierung des HNF1 β Gens führt dagegen zu keiner Beeinträchtigung in der Mausentwicklung. Durch die frühe Sterblichkeit der HNF1 β inaktiven Embryonen ist die Untersuchung des Einflusses von HNF1 β auf spätere Entwicklungsstadien ausgeschlossen.

Der Verlust von HNF1 α manifestiert sich dagegen erst nach der Geburt durch Hepatomegalie, Phenylketonurie und Fanconi Syndrom, welches sich durch das Ausscheiden von Glukose, Phosphat und Aminosäuren mit dem Urin auszeichnet (Pontoglio et al., 1996). Eine genauere Analyse der HNF1 α inaktiven Mäuse zeigte eine gestörte Insulin Sekretion in den β -Zellen des Pankreas. Dagegen hat eine heterozygote Inaktivierung des HNF1 α Gens, genau wie von HNF1 β , keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Tiere (Dukes et al., 1998; Pontoglio et al., 1998; Pontoglio, 2000).

Durch die verschiedenen Phänotypen der HNF1 α und HNF1 β „knock-out“ Mäuse wird die unterschiedliche Funktion der beiden Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung deutlich.

1.3 Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF1 β des Menschen

Die heterozygoten Mutationen des Transkriptionsfaktor HNF1 β sind beim Menschen für die Entwicklung eines Subtyps von **m**aturity **o**nset **d**iabetes of the young (MODY), bezeichnet als MODY5, verantwortlich (Horikawa et al., 1997). Dabei handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte, monogene Form des nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus (NIDDM; **n**on **i**nsulin **d**ependent **d**iabetes **m**ellitus). Charakteristisch für MODY ist das frühe Ausbrechen der Krankheit, meist vor dem 25. Lebensjahr. Die Hauptursache dieser Krankheit ist eine Störung der β -Zellen im Pankreas, was sich in einer unzureichenden Insulinsekretion bei erhöhtem Glukosespiegel im Blut äußert. Klinisch definiert sich MODY durch das Auftreten des Diabetes in mindestens zwei Generationen und zumindest einem Betroffenen unter dem 25. Lebensjahr. (Hattersley, 1998; Froguel and Velho, 1999; Winter and Silverstein, 2000). Bisher sind fünf weitere Gene bekannt, bei denen heterozygote Mutationen für MODY verantwortlich sind. Bei MODY1 ist das HNF4 α Gen betroffen, bei MODY2 das Glukokinase Gen, bei MODY3 HNF1 α , bei MODY4 das IPF1 Gen (insulin promoter factor 1) und bei MODY6 das Neuro D1/Beta 2 Gen. Die Glukokinase gehört zur Enzymgruppe der

Hexokinasen, welche die Phosphorylierung von Glukose am Anfang der Glykolyse vermittelt. Durch die MODY-assoziierten Mutationen der Glukokinase ist die Kopplung des Glukosemetabolismus der β -Zellen mit der Insulinsekretion gestört und es kommt zu einer unzureichenden Insulinsekretion. Alle anderen MODY-assoziierten Mutationen betreffen Transkriptionsfaktoren. Die Mechanismen jedoch, die zur Ausprägung der Krankheit führen, sind weitgehend unverstanden.

Offensichtlich sind Mutationen in den MODY-Genen jedoch nicht gleichwertig, da Mutationen im HNF1 β Gen zusätzlich zu MODY5 mit einer abnormen Entwicklung der Niere assoziiert sind. Diese Nierenfehlentwicklungen sind nicht die Folgen eines Diabetes, sondern liefern einen Hinweis auf den Einfluss von mutiertem HNF1 β auf die Nierenentwicklung.

Zu Beginn dieser Arbeit waren uns neun Mutationen im Exon-Bereich und zwei im Intron-Bereich nahe der Exon-Intron Grenzen im menschlichen Transkriptionsfaktor HNF1 β bekannt. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der Domänenstruktur und der Helices der POU A und der Homeodomäne von HNF1 β , sowie Position und Art der Mutationen der Exon Bereiche. Die bis zu diesem Zeitpunkt einzige bekannte missense Mutation S151P führt zum Austausch der Aminosäure Serin durch Prolin an Position 151 (Bingham et al., 2002). Die Identifikation von nur einer missense Mutation stellt einen großen Unterschied zum verwandten HNF1 α Gen dar, bei dem missense Mutationen mehr als 65% aller Mutationen ausmachen (Ryffel, 2001). Die beiden Mutationen E101X (Bingham et al., 2001a) und R177X (Montoli et al., 2002) sind sogenannte nonsense Mutationen, die durch Mutation eines einzelnen Nukleotids zu einem Stopcodon führen und so ein vorzeitiges Ende der Proteinsynthese verursachen. Dieses verfrühte Stopcodon wird als **premature termination codon (PTC)** bezeichnet und befindet sich bei diesen beiden Mutanten in der POU A Domäne. Des Weiteren konnten die frameshift Mutationen P159delT (P159) (Bingham et al., 2001a), Q243delC (Q243) (Bingham et al., 2002), A263insGG (A263) (Nishigori et al., 1998); P328L329delCCTCT (P328) (Bingham et al., 2000) und Y352insA (Y352) (Kolatsi-Joannou et al., 2001) identifiziert werden. Bei dieser Art der Mutation kommt es durch Insertion oder Deletion von Nukleotiden zu einer Verschiebung des Leserahmens, was sofort oder nach einigen Nukleotiden zu einem PTC führen kann. Alle diese verkürzten Proteine beinhalten die komplette Dimerisierungsdomäne, aber variieren am C-terminalen Ende. Während das PTC von Mutante P159 in der POU A Domäne lokalisiert ist, enden die Mutanten A263 und Q243 weiter C-terminal in der Homeodomäne. Im Gegensatz dazu haben die Mutanten P328 und Y352 noch die DNA-Bindungsdomänen und einen kleinen Teil der Transaktivierungsdomäne.

Die Mutation R137-K161del (Lindner et al., 1999b) ist eine Deletion von 24 Aminosäuren im Bereich der POU A Domäne, wodurch es jedoch zu keiner Verschiebung des Leserahmens kommt und somit das vollständige Protein, bis auf die 24 Aminosäuren, synthetisiert wird.

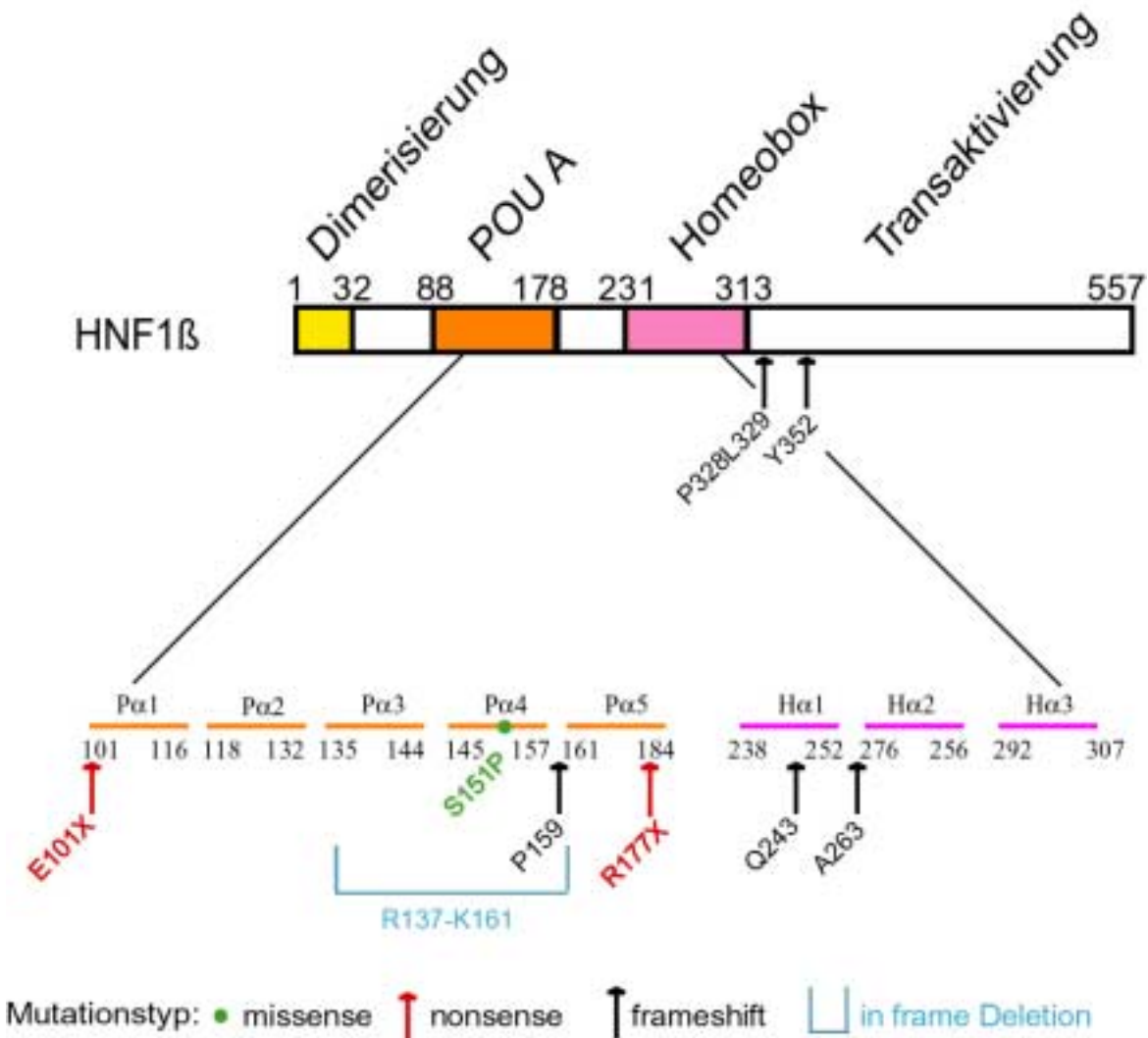


Abbildung 2: Schema des humanen Transkriptionsfaktors HNF1β und der untersuchten Mutationen

Die unterschiedlichen Domänen sind eingezeichnet und die Nummern beziehen sich auf die Aminosäureposition (Cereghini, 1996). Typ und Position der Mutationen sind angegeben. Die Helices der POU A (Pα1-5) und der Homeodomäne (Hα1-3) sind eingezeichnet (Chi et al., 2002).

Die häufigste Form der Nierenfehlentwicklung die bei MODY Patienten mit einer HNF1β Mutation auftritt, ist die Ausbildung von Zysten. Dabei wird das gesunde Nierengewebe durch Zysten und zystische Glomeruli ersetzt. Des weiteren ist eine Unterentwicklung der Nierenkanälchen zu beobachten. Dieses Krankheitsbild wurde für Personen mit den HNF1β Mutationen S151P, Q243, A263, P328 und Y352 beschrieben. Das Vorhandensein einer

HNF1 β Mutation in Verbindung mit Nierenzysten und Diabetes wird als *renal cysts and diabetes* (RCAD) *Syndrom* bezeichnet (Bingham et al., 2001b; Kolatsi-Joannou et al., 2001).

Die Mutation R177X ist assoziiert mit Nephropatie bei drei Patienten und Hypoplasie, Zysten und kleinen hyperechoischen Nieren bei vier Patienten (Montoli et al., 2002; Horikawa et al., 1997).

MODY Patienten, die die HNF1 β Mutation E101X oder P159 tragen, zeigen ein Krankheitsbild, das als hypoplastische *glomerulocystic kidney disease* (GCKD; Human accession No. NM_000458) beschrieben ist (Bingham et al., 2001a). GCKD ist definiert durch kortikale glomeruläre Zysten mit Dilatation der Bowmanschen Kapsel und primitiven glomerularen Büscheln in mindestens 5% der Zysten. Der hypoplastische Subtyp, wie er bei HNF1 β Mutationsträgern gefunden wird, zeichnet sich durch typische kleine Nieren mit abnormen Nierenkelchen und Papillen aus.

Die HNF1 β Mutation R137-K161del verursacht einen Nierendefekt der als Oligomeganephronie bezeichnet wird. Er ist charakterisiert durch eine verringerte Anzahl von Glomeruli und Hypertrophie der verbleibenden Glomeruli sowie des proximalen Tubulus (Lindner et al., 1999a).

Zusätzlich zu MODY und den unterschiedlichen Nierendefekten wurden für die HNF1 β Mutationen S151P, Q243 und R137-K161del Fehlentwicklungen im Genitalbereich diagnostiziert. Der Uterus kann bei Frauen nur rudimentär ausgebildet sein bis hin zur vaginalen Aplasie oder es kommt während der Embryonalentwicklung zu einer unvollständigen Verschmelzung des Müllerschen Ganges, was zu einem Uterus duplex oder Uterus bicornis führen kann. (Lindner et al., 1999b). Bei Männern wurde Hypospadie beschrieben (Bingham et al., 2002). In Tabelle 1 ist die Domänenstruktur der HNF1 β Mutanten, sowie der dazugehörige klinische Phänotyp zusammengefasst dargestellt.

	Klinischer Phänotyp			
	Nieren- erkrankung	Genital- erkrankung	Diabetes	Referenz
HNF1β				
S151P	Zysten	Uterus duplex, Hypospadie	-	Bingham et al. 2002
E101X	hypoplastische GCKD	-	MODY	Bingham et al. 2001
R177X	Nephropathie	-	MODY	Horikawa et al. 1997
P159delT	hypoplastische GCKD	-	Typ II	Bingham et al. 2001
Q243delC	zystische Nieren Dysplasie	Uterus bicornis	-	Bingham et al. 2002
A263insGG	Zysten	-	MODY	Nishigori et al. 1998
P328L329del	zystische Nieren Dysplasie	-	MODY	Bingham et al. 2000
Y352insA	Zysten	-	MODY	Kolatsi-Joannou et al. 2001
R137-K161del	Oligomeganephronie	rudimentärer Uterus, vaginale Aplasie	MODY	Lindner et al. 1999

Tabelle 1: Zusammenfassung der HNF1β Mutanten und ihres klinischen Phänotyps

Die verschiedenen Domänen sind angegeben und die Nummern beziehen sich auf die Aminosäure Position. Der durch die Leserahmenverschiebung verursachte Austausch von Aminosäuren ist durch eine schwarze Box gekennzeichnet. (GCKD) glomerulocystic kidney disease, (MODY) maturity onset diabetes of the young.

Ein Grund für die verschiedenen klinischen Phänotypen der einzelnen HNF1β Mutanten könnte in den unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der Mutanten liegen. Einige dieser HNF1β Mutanten wurden bereits funktionell in *in vitro* und *in vivo* Systemen analysiert. Wild et al. konnten für die HNF1β Mutante P328L329 zeigen, dass diese wie der Wildtyp an DNA binden und transaktivieren kann. Im Vergleich zum Wildtyp ist das Transaktivierungspotential dieser Mutante sogar höher und man bezeichnet sie als eine „gain of function“ Mutation. Die Mutante R137-K161 hat dagegen ihr DNA-Bindungsvermögen und ihr Transaktivierungspotential verloren. Daraus ergibt sich der erste Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit, der sich mit der Untersuchung der molekularen Eigenschaften der weiteren HNF1β Mutanten befasst.

1.4 Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Modellorganismus

Ein etabliertes Vertebratenmodell, um Faktoren der frühen Embryogenese auf zellulärer und molekularer Ebene untersuchen zu können, stellt der Krallenfrosch *Xenopus laevis* dar. Die *Xenopus* Eier können mit einer einfachen Hormoninjektion in den dorsalen Lymphsack der Weibchen das ganze Jahr über in großer Anzahl (500-2000 Eier pro Ovulation) erhalten werden. Da die Embryonen sehr robust sind und die Embryonalentwicklung extrakorporal in einer einfachen Salzlösung erfolgen kann, sind sie leicht manipulierbar und alle Entwicklungsstadien analysierbar. Die einfachste Methode der Manipulation ist die Injektion von DNA oder RNA in frühe *Xenopus* Embryonen (Sive et al., 2000). Durch die daraus resultierende Überexpression von Genen kann die Funktion des entsprechenden Genproduktes in der Embryonalentwicklung analysiert und durch gezielte Injektion in einzelne Blastomere auf spezifische Regionen im Embryo gerichtet werden. Bei der Injektion von DNA erfolgt die Genexpression erst relativ spät in der Entwicklung mit Beginn der zygotischen Transkription im Stadium 8,5 (Yasuda and Schubiger, 1992), so dass eine Manipulation von früheren Entwicklungsstadien nicht möglich ist. Dagegen hat die Injektion von RNA den Vorteil, dass sie sofort nach Injektion translatiert wird, also auch schon die ersten Entwicklungsstadien manipulierbar sind. Durch gezielte mRNA Injektion in nur eine Blastomere im Zwei-Zell-Stadium ist es möglich, die Manipulation auf eine Seite des Embryos zu beschränken und die andere Tierhälfte kann als Kontrollseite fungieren. Die lokalisierte Expression einer exogenen mRNA kann durch die Koinjektion eines geeigneten Markers, wie zum Beispiel β -Galaktosidase oder GFP (green fluorescence protein), kontrolliert werden. Der Nachteil bei der transienten DNA oder RNA Injektion ist jedoch, dass die injizierten Nukleinsäuren und die translatierten Proteine im Embryo mit der Zeit abgebaut werden. Sie sind demnach nur begrenzt stabil und Untersuchungen an späteren Entwicklungsstadien sind mit dieser Methode nur eingeschränkt durchführbar.

Durch Überexpressionsexperimente im *Xenopus* konnten die Hauptklassen induzierender Faktoren, die an der Mesoderminduktion und Achsenbildung beteiligt sind, identifiziert werden. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die embryonale Niere ein ideales System für die Erforschung von Zell-Signalwegen, Spezifikation, Adhäsion, Formveränderung, Morphogenese und Organogenese ist (Vize et al., 1997).

1.5 Der Pronephros von *Xenopus laevis*

Die erste funktionelle Nierenform in der Embryonalentwicklung von Fischen und Amphibien stellt der Pronephros (Vorniere) dar. Er wird später im adulten Tier durch den Mesonephros (Urniere) ersetzt. Der Pronephros setzt sich aus einem einzelnen Nephron mit einem externen Glomus (nonintegrated nephron) zusammen. Ein Nephron ist in drei Abschnitte unterteilt: Glomus, Nierenkanälchen und Sammelrohr. Abbildung 3 zeigt eine schematische Zeichnung eines Nephrons. Der Glomus ist eine vasculäre Filtrationseinheit, die die filtrierte Substanzen aus dem Blut in das Nephrozoel abgibt. Dort werden sie über Wimperntrichter (Nephrostome) in die Nierenkanälchen (Tubulus) weitergeleitet. Anura haben gewöhnlich drei Nierenkanälchen, wobei jedes Kanälchen über ein eigenes Nephrostom mit dem Zoelom verbunden ist. Die Nephrostome sind dünner als die Nierenkanälchen und komplett mit Cilien besetzt. Durch Cilienschlag wird die Flüssigkeit in die Nierenkanälchen befördert. Diese Kanälchen haben verschiedene proximale und distale Segmente. Das proximale Segment dient der Resorption von wichtigen Molekülen und der Abfall-Exkretion, wohingegen das distale Segment Wasser resorbiert. Vom distalen Bereich der Nierenkanälchen wird der Urin durch das Sammelrohr zur Kloake transportiert und ausgeschieden (Vize et al., 1997).

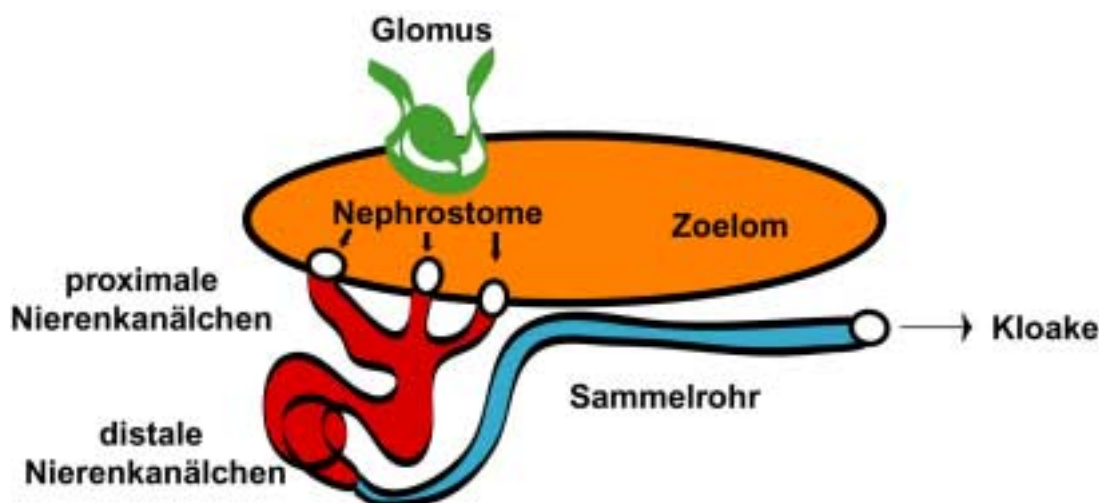


Abbildung 3: Anatomie des Pronephros von *Xenopus laevis*

Die Grundstruktur des Pronephros ist schematisch dargestellt. Glomus (grün), Nierenkanälchen (rot) und Sammelrohr (blau) sind eingezeichnet. Leicht modifiziert übernommen aus Ryffel (2003).

Im *Xenopus laevis* entwickelt sich der Pronephros innerhalb von 5 Tagen aus dem intermediären Mesoderm. Die Spezifikation der Pronephros Anlage kann bereits in der frühen Neurula (Stadium 12/13) identifiziert werden. Die ersten Anzeichen der zellulären Differenzierung sind in der späten Neurula (Stadium 20/21) zu beobachten, durch eine Verdickung der somatischen Zellen der lateralen Platte nahe den Somiten. Ab Stadium 25 ist eine kompakte Struktur zu erkennen, die aus radial angeordneten Zellen besteht. Dieses Primordium teilt sich in der weiteren Entwicklung (Stadium 30 bis 38) dann in Nierenkanälchen und Sammelkanal auf. In diesem Entwicklungsstadium wird auch die dritte Komponente des Pronephros, der Glomus, gebildet. Er entwickelt sich aus dem viszeralem Mesoderm auf der anderen Seite des Zoeloms (Bernardini et al., 1999).

In höheren Vertebraten entwickelt sich der Pronephros nur noch als ein rudimentäres Organ und die erste funktionelle Nierenform im Embryo ist der Mesonephros der in der weiteren Entwicklung durch den Metanephros ersetzt wird. Diese drei Nierenformen der Vertebraten haben sich im Verlauf der Evolution sukzessiv voneinander abgeleitet (Vize et al., 1997).

Die Identifikation der regulatorischen Elemente, die für die Nierenentwicklung wichtig sind, machte deutlich, dass in allen drei Nierenformen die gleichen Faktoren benötigt werden, um die Entwicklung auszulösen und die Niere zu formen. Aus diesem Grund ist der Pronephros ein ideales Modellsystem, um die Schlüsselmoleküle der Nierenorganogenese zu untersuchen.

In der Embryonalentwicklung von *Xenopus* beginnt die Expression von HNF1 β zum Zeitpunkt der Spezifikation der Zellen, d.h. lange bevor die Differenzierung der Zellen beginnt (Demartis et al., 1994). Die ersten Transkripte sind im Endoderm sowie im Bereich der Pronephros Anlage ab Stadium 11 detektierbar. Weitere Gene, deren Expression in der Pronephros Anlage der frühen Neurula detektiert wurde, sind die Transkriptionsfaktoren lim 1 (LIM Domäne enthaltendes Protein) und Pax8 (**P**aired **B**ox 8), so dass man vermuten kann, dass HNF1 β zusammen mit Lim1 und Pax8 bei der Spezifikation oder Determinierung der Zellen eine Rolle spielt und somit zu einem frühen Regulator der Pronephrosentwicklung gehört. Der genauere Mechanismus, wie die einzelnen Faktoren interagieren, ist dabei jedoch noch nicht bekannt. Zwei weitere Marker sind die Antikörper 3G8 und 4A6. Der Antikörper 3G8 ist dabei spezifisch für die Nierenkanälchen und die Nephrostome und Antikörper 4A6 für das Sammelrohr. Beide sind gegen Antigene gerichtet, die aktiv sind, wenn die ersten Pronephrosstrukturen sich formen (Stadium 31) und stellen somit Marker der terminalen Differenzierung dar (Vize et al., 1995). Das erste aktive Gen in der Glomus Anlage ist der

Transkriptionsfaktor WT1 (**W**ilms' **T**umor **S**upressor **G**en 1). Seine Expression ist nur auf den Glomus beschränkt und unterscheidet sich dadurch deutlich von der der anderen Faktoren.

Durch Überexpression der Transkriptionsfaktoren *lim1*, *Pax8* und *HNF1 β* im *Xenopus* Embryo konnte gezeigt werden, dass sie in der Nephrogenese eine entscheidende Rolle spielen. Überexprimiert man *lim1* oder *Pax8*, so kommt es zu einer Vergrößerung des Pronephros, der sich durch die Ausbildung von mehr als drei Nierenkanälchen auszeichnet (Carroll et al., 1999). Im Gegensatz dazu hat die Überexpression von *HNF1 β* einen inhibitorischen Effekt auf die Pronephrosentwicklung, der sich in einer Unterentwicklung der Nierenkanälchen äußert und in einigen Fällen sogar zum vollständigen Verlust der Nierenkanälchen führt (Wild et al., 2000). Der Einfluss der *HNF1 β* Mutanten P328L329 und R137-K161del auf die Pronephrosentwicklung wurde durch Überexpressionsexperimente von Wild et al. (2000) untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Mutante P328L329 ebenfalls zum Verlust des Pronephros führt und im Vergleich zum Wildtyp dieser Effekt verstärkt auftritt. Diesen stärkeren Effekt des mutierten *HNF1 β* erklären die Autoren mit der Tatsache, dass es sich bei der Mutation P328L329 um eine „gain of function“ Mutation handelt, wie in Transaktivierungsassays in Zellkulturen gezeigt werden konnte. Die Deletionsmutante R137-K161del, die ihr Transaktivierungspotential verloren hat, bewirkt bei Überexpression im *Xenopus* Embryo eine schwächere jedoch signifikante Reduktion des Pronephros. Diese Resultate deuten an, dass die einzelnen *HNF1 β* Mutanten sich unterschiedlich auf die Pronephrosentwicklung auswirken und damit die verschiedenen klinischen Phänotypen erklärt werden könnten.

2. Zielsetzung der Arbeit

Mutationen im zellspezifischen Transkriptionsfaktor HNF1 β führen beim Menschen zu Fehlentwicklungen der Niere, des Genitalbereiches und zu MODY. Um Hinweise auf die Wirkungsweise der Mutationen bei der Entstehung des für jede Mutation typischen klinischen Phänotyps zu erhalten, sollten die Folgen der Mutationen auf die Eigenschaften des Transkriptionsfaktors untersucht werden.

Die molekulare Charakterisierung der Mutanten sollte mit verschiedenen zell- und molekularbiologischen Methoden erfolgen. In Bindungsstudien sollte die Fähigkeit zur DNA-Bindung und zur Dimerisierung mit dem Wildtyp untersucht werden. Das Transaktivierungspotential der Mutanten sollte in verschiedenen Zelllinien ermittelt und mit dem des Wildtyps verglichen, sowie ein Einfluss der Mutanten auf die Aktivität des Wildtyps überprüft werden. Des Weiteren sollten Unterschiede in der zellulären Lokalisation der mutierten Proteine im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte eine Gruppierung der Mutanten vorgenommen werden.

In einem zweiten Schritt sollte der Einfluss der Mutationen auf die Nierenentwicklung in einem lebendigen Organismus analysiert werden. Dazu sollten die Mutationen durch Injektion von *in vitro* synthetisierter mRNA in eine Embryonenseite des Krallenfroschs *Xenopus laevis* überexprimiert werden, so dass die Nierenentwicklung auf der manipulierten Tierseite mit der Kontrollseite verglichen werden kann. Basierend auf den erhaltenen Phänotypen sollte ebenfalls eine Gruppierung der Mutanten erfolgen, die mit der basierend auf den molekularen Daten verglichen werden sollte.

Da HNF1 β ein früher Regulator der Nierenentwicklung ist, kann es durch das Auftreten einer Mutation zu Störungen des Regulationsmechanismus kommen. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen sollte überprüft werden, ob die HNF1 β Mutanten andere nierenspezifische Regulatoren in ihrem Expressionsverhalten beeinflusst, um eine Aussage über den Mechanismus, der der Regulation zu Grunde liegt, machen zu können.

II. Material und Methoden

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 und RNA stammten von den Firmen Biolabs (Schwalbach), Invitrogen (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg) und Roche (Mannheim).

2. Molekularbiologische Standardmethoden und Expressionsvektoren

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.

2.1 Expressionsvektoren

Die Expressionsvektoren pCSGFP2, myc-Rc/CMVHNF1 β , P328L329delCCTCT und R137-K161del wurden wie bei Wild et al. (2000) beschrieben verwendet.

Mit Hilfe des „QuickChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene wurden die in dieser Arbeit verwendeten HNF1 β Mutationen in den myc-Rc/CMVHNF1 β Expressionsvektor eingeführt. Die für die Mutagenesereaktion verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 1 aufgeführt, dabei wurden die vom Hersteller beschriebenen Bedingungen

eingehalten. Die Benennung der Konstrukte erfolgte nach der Mutante, welche sie exprimieren zum Beispiel: Rc/CMVS151P. Die Sequenzen der durch PCR amplifizierten Mutanten wurde durch Sequenzierung des gesamten offenen Leserahmens überprüft.

Mutante	Mutageneseprimer
S151P	A: 5' -CGCACCT C CCCCAGCATC-3' B: 5' -GATGCTGGGG G AGGTGCG-3'
E101x	A: 5' -CTCAACACCT T AGGAGGCGG-3' B: 5' -CCGCCTCCT A GGTGTGAG-3'
R177x	A: 5' -CAGAAAGCAAT T GAGAGATC-3' B: 5' -GATCTCTC A TTGCTTTCTG-3'
P159delT	A: 5' -CAAGGGCACCCCATGAAGACCCAG-3' B: 5' -CTGGGTCTTCAT G GGGTGCCCTTG-3'
Q243delC	A: 5' -CCCGCGTCC A GCAAATC-3' B: 5' -GATTGCTGGACGCGGG-3'
A263insGG	A: 5' -GAGAGAGAG GG GCCTTAGTGGAGG-3' B: 5' -CCTCCACTAAGG CC CTCTCTCTC-3'
Y352insA	A: 5' -GAGTGGCTA A CAGCCAGCAG-3' B: 5' -CTGCTGGCTG T TAGCGCACTC-3'

Tabelle 2: Zusammenstellung der Primerpaare für die Mutagenese
Die Mutation ist jeweils gekennzeichnet.

2.2 Reportergene

syn(0)4tk-luc

Der syn(0)4tk-luc Reporter besitzt vier HNF1 Bindestellen vor dem Thymidinkinase Promotor und dem Luciferase-Gen (Drewes et al., 1996).

HNF4 α P2(-285)-luc

Der alternative P2 Promotor des HNF4 α Genes bis Position (-285) in Bezug auf den Translationsstart wurde in den pGL3-BasicII (Promega) kloniert und enthält eine HNF1 Bindestelle (Thomas et al., 2001).

3. Zellkultur von HeLa- und HEK293- Zellen

HeLa Zellen (Cervixkarzinomzelllinie des Menschen) und HEK293 Zellen (Immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen) wurden bei 37°C, 7,2% CO₂ und 95% wassergesättigter Atmosphäre in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (Biochrom), 2 mM L-Glutamin sowie je 100U/ml Penicillin und Streptomycin kultiviert.

Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden 10⁷ Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM) aufgenommen, in 1 ml Aliquots langsam auf -70°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Die Aliquots wurden zum Auftauen auf 37°C erwärmt und in 10 ml vorgewärmtes Medium in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

4. Transiente Transfektion, Luciferaseassay, Herstellung von Kernextrakten und Immunfluoreszenz

4.1 Luciferaseassay

Für den Luciferaseassay wurden HeLa- und HEK293-Zellen mit 1,3 µg Reportervektor und 0,3 µg Expressionsvektor transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 6-Well-Schalen mit 300000 Zellen pro Well und 6 µl Lipofektamin (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in 50 µl Lysepuffer aufgenommen, dabei wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummispatels von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden für 5 min. mit 10000 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert und 20 µl des Überstandes wurden mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

Lysepuffer:

25 mM Trisphosphat (pH 7,8); 2 mM DTT; 2 mM CDTA; 10% Glycerol; 1% Triton-X-100

4.2 Herstellung von Kernextrakten aus HeLa Zellen

Zur Herstellung von Kernextrakten wurden 300000 HeLa-Zellen pro Well mit 2 µg DNA transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 6-Well-Schalen mit 6 µl Lipofektamin. 24 Stunden nach der Transfektion wurden Kernextrakte aus den transfizierten Zellen hergestellt. Die Zellen wurden mit PBS (4°C) gewaschen, dann zwei mal in 0,7 ml PBS mit einem Gummispatel von der Kulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min., 1000 rpm, 0°C, Hettich 24-48R Kühlzentrifuge), in 0,5 ml Puffer A suspendiert, 10 min. auf Eis inkubiert, erneut abzentrifugiert (5 min., 2000 rpm, 0°C) und in 250 µl Puffer A aufgenommen. Mit einem Handhomogenisator wurden die Zellen aufgebrochen und die Kerne abzentrifugiert (10 min., 10000 rpm, 0°C). Das Sediment wurde in 50 µl Puffer C aufgenommen und 30 min. bei 0°C unter häufigem Vortexen inkubiert. Dann wurde 20 min. bei 50000 rpm zentrifugiert (2°C, Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge), der die Kernproteine enthaltende Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Kernextrakte erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung des „BioRad Protein-Assay“-Systems (BioRad).

PBS:

137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄ (pH 7,2 bis 7,4)

Puffer A:

10 mM HEPES (pH 7,6); 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT

Puffer C:

20 mM HEPES (pH 7,6); 25% (v/v) Glycerol; 420 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA;
0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT

4.3 Immunofluoreszenz von HeLa Zellen

Für die Immunfluoreszenz wurden 300000 HeLa Zellen mit 2 µg DNA in 3 cm Zellkulturschalen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Methanol fixiert, einmal mit PBS/0,01% Tween-20 und danach zweimal mit PBS gewaschen. Durch Inkubation mit PBS/10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei 4°C wurden unspezifische Bindungen abgesättigt. Der Erstantikörper 9E10 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den myc-tag gerichtet ist (Evan et al., 1985). Er wurde in einer Verdünnung von 1:5 in DMEM auf die Zellen gegeben und 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde mehrmals mit PBS gewaschen und der Cy3 gekoppelte Zweitantikörper (Codenr. 415-166-100, Jackson ImmunoResearch) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/10% Ziegen Serum zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS und Trocknen mit einem Zellfasertuch, wurden die fixierten Zellen mit „Mounting-Medium“ (Vectashield, Vector-Laboratories) eingedeckelt und mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss) ausgewertet.

5. Gelretardationsanalyse

Die Gelretardationsanalysen wurden mit Kernextrakten aus transfizierten HeLa Zellen durchgeführt (siehe 4.1 und 4.3). Jeder Reaktionsansatz enthielt 3 µg Gesamtprotein, 30 ng Lachssperma-DNA als unspezifischer Kompetitor und ggf. 1 µl 1:10 in DMEM verdünnter Antikörper 9E10 (siehe 4.4). Die erste Inkubation erfolgte in einem 15 µl Ansatz in GRBB⁻ für 15 min. bei RT, dann wurden 10⁴ cpm/Ansatz (5µl Volumen in GRBB⁻) ³²P-markiertes Oligonukleotid mit einer HNF1 Bindestelle (HP-1) zugegeben und für weitere 15 min. bei RT inkubiert. Die entstandenen Protein-DNA-Komplexe wurden in 4% Polyacrylamidgelen in 0,25 x TBE für 1,5 Stunden bei 100 Volt aufgetrennt. Um die Komplexe sichtbar zu machen, wurden die Gele getrocknet und für 12-48 Stunden mit Kodak-Röntgen-Filmen belegt.

GRBB⁻:

10 mM HEPES (pH7,6); 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 4% Ficoll

10 x TBE:

900 mM Tris borate; 20 mM EDTA

Oligonukleotide:

Die radioaktive Markierung des doppelsträngigen Oligonukleotids erfolgte durch Auffüllung der 3' Zurückhängenden Enden mittels Klenow-Enzyms und $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Ausubel et al., 1989).

HP-1 Oligonukleotid

Das HP-1 Oligonukleotide beinhaltet eine HNF1 Bindestelle aus dem Albuminpromotor des *Xenopus laevis* (Schorpp et al., 1988).



6. Gekoppelte *in vitro* Transkription / Translation und Western Blotting

6.1 Gekoppelte *in vitro* Transkription / Translation

Zur Synthese von Proteinen wurde eine gekoppelte Transkription / Translation (TNT) im Kaninchen-Reticulocytenlysat (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Synthese fand unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase und radioaktiv markiertem (^{35}S)-Methionin statt. Zum Nachweis der Proteine wurden 10% Standard-SDS-Proteingele (nach Sambrook et al., 1989) mit 3 μl TNT gefahren. Zur Auswertung wurden die Gele getrocknet und ein Röntgen-Film exponiert.

6.2 Western Blotting

Für die Western-Blot-Analyse wurden nicht radioaktiv markierte TNT's verwendet (Herstellung siehe 5.1). Die TNT Produkte wurden mit dem gleichen Volumen von 2 x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) versetzt und in einem 10% SDS-Polyacrylamidgel (Mini-Protean II-Gele, BioRad) aufgetrennt. Durch Elektrotransfer (Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer-Cell, BioRad) wurden die Proteine bei 1,5 mA/cm² Gel für 1 Stunde in Transferpuffer auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Das Blocking der Membran erfolgte über Nacht bei 4°C mit 0,5% Blockingreagenz (Liquid block, RPN 3601, Amersham, Braunschweig) in PBS. Danach folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei RT mit dem Erstantikörper 9E10 (Evan et al., 1985) der 1:5 in PBS/0,1% Tween 20 verdünnt wurde. Anschließend wurde 3 x 10 min. mit PBS/0,1% Tween 20 gewaschen und mit dem 1:5000 in PBS/0,1% Tween 20 verdünnten Zweitantikörper (Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper IgG, Dianova) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mit dem Enhanced Chemoluminescence-System (ECL-System, Amersham) entsprechend den Herstellerangaben.

Transferpuffer:

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,04% SDS; 20% Methanol

7. Haltung, *in vitro* Befruchtung und Kultur der Embryonen des Krallenfrosches *Xenopus laevis*

Die südafrikanischen Krallenfrösche der Art *Xenopus laevis* wurden von der Firma Xenopus I (USA) bezogen und im Institut für Zellbiologie (Essen) unter Standardbedingungen gehalten. Adulte Weibchen wurden durch subkutane Injektion von 200-1000 Einheiten humanem Chorion-Gonadotropin Pregnesin (Serono Pharma GmbH, Unterschleißheim) in die dorsalen Lymphsäcke zur Eiablage gebracht. Es wurden 200-500 Eier manuell in eine Petrischale abgestreift. Für die *in vitro* Befruchtung der Eier wurde den männlichen Tieren der Hoden unter Betäubung mit 0,5% MS 222 entnommen und über die Eier gestreift. Der Hoden wurde in Holtfreter-Lösung bei 4°C bis zu einer Woche gelagert. Die Qualität der Spermien wurde nach deren Aktivierung durch H₂O Zugabe, anhand mikroskopischer Untersuchung ihrer Beweglichkeit überprüft. 5 Minuten nach der Befruchtung wurden die Eier mit 0,1 x MMR überschichtet. Durch die nach 20 min. einsetzende Kortikalreaktion, bei der sich der pigmentierte animale Pol nach oben dreht, ist eine erfolgreiche Befruchtung erkennbar. Die Gallerthülle wurde nach ca. 45 min. durch eine 1-2 minütige Inkubation in 2% Cystein-Hydrochlorid (Fluka) pH 8 entfernt und danach mehrmals mit H₂O gewaschen. Die Kultivierung der Embryonen fand in 0,1 x MMR bei 14 – 23°C statt. Die Entwicklungsstadien wurden nach Nieuwkoop und Faber (1975) bestimmt. (Nieuwkoop and Faber, 1975)

Holtfreter-Lösung

60 mM NaCl; 0,6 mM KCl; 0,9 mM CaCl₂; 0,2 mM NaHCO₃

1 x MMR

0,1 M NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgSO₄; 2 mM CaCl₂; 5 mM HEPES (pH 7,8); 0,1 mM EDTA

8. *In vitro* Synthese von mRNA und Injektion der Embryonen

8.1 *In vitro* Synthese von mRNA

Die *in vitro* Synthese der mRNA wurde nach dem Protokoll von Nielsen und Shapiro (1986) durchgeführt. Es wurden jeweils 3 µg linearisierter Vektor und 100 Einheiten RNA-Polymerase verwendet. Die Konstrukte im Rc/CMV Vektor wurden mit dem Restriktionsenzym SmaI (1 Stunde, 27°C) linearisiert und mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert, bei pCSGFP2 hingegen wurde das Restriktionsenzym PvuII (1 Stunde, 37°C) und die SP6-RNA-Polymerase verwendet. Nach Synthese und enzymatischem Abbau der DNA (Nielsen and Shapiro, 1986) wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe von Phase Lock Gel™ Heavy, (1,5 ml, Eppendorf) nach Herstellerangaben extrahiert und mit Ethanol gefällt. Jeder Ansatz wurde auf 4 Aliquots verteilt und bei -80°C aufbewahrt. Die RNA Konzentration wurde photometrisch ermittelt und die Qualität durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

8.2 Injektion der Embryonen

Die in Form des Ethanol-Präzipitat eingefrorene RNA wurde in DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Aqua dest. aufgenommen. Zur Injektion wurden Mikrokapillaren (ø 0,58 mm, World Precision Instruments, Sarasota) unter Verwendung der Injektionsapparatur PicospitzerII (General Valve Corporation, Fairfield) benutzt. In eine Blastomere eines Embryos im Zwei-Zell-Stadium wurden 250 pg mRNA einer HNF1β Mutation zusammen mit 100 pg RNA des Green Fluorescence Protein (GFP) in einem Volumen von 10 nl injiziert. Als Kontrolle wurden 350 pg GFP RNA alleine injiziert. Das Injektionsvolumen wurde durch Messen der Tropfengröße bestimmt. Alle Injektionen wurden in einer 2%-Ficoll-Lösung durchgeführt, um ein Auslaufen der Eier zu verhindern. Nach 2 Stunden wurden die Embryonen in 0,1 x MMR überführt. Im Neurula-Stadium wurden alle normal entwickelten Larven, die grüne Fluoreszenz auf nur einer Seite des Tieres zeigten, aussortiert und für weitere Untersuchungen kultiviert. Die Larven wurden im Stadium 45 in MEMFA fixiert, in Methanol dehydriert und bei -20°C aufbewahrt.

MEMFA

0,1 M MOPS; 2 mM EGTA; 1 mM MgSO₄; 3,7% Formaldehyd

9. Immunfluoreszenz von *Xenopus laevis* Larven

Für die Immunfluoreszenz wurden die injizierten und fixierten Larven mit PBS rehydriert und mit PBT/20% Ziegenserum für 1 Stunde bei RT geblockt. Danach wurde mit dem ersten Antikörper, der 1:2 in PBT/20% Ziegenserum verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen für je 1,5 Stunden in PBT bei RT, erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 in PBT/20% Ziegenserum verdünnten Cy3 gekoppelten Ratte-Anti-Maus Zweitantikörper (Codennr. 415-166-100, Jackson ImmunoResearch) bei 4°C über Nacht im Dunkeln. Dann erneutes Waschen mit PBT bei RT und Auswertung am Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Leica, Köln).

PBT

PBS; 2 mg/ml BSA (bovine serum albumin, Fraktion 5); 0,1% Triton X-100

Erstantikörper:

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

3G8

Monoklonaler Antikörper der gegen die terminalen Differenzierungsmarker der Pronephrokanälchen gerichtet ist (Vize et al., 1995).

4A6

Monoklonaler Antikörper der gegen die terminalen Differenzierungsmarker des Pronephrosanges gerichtet ist (Vize et al., 1995).

10. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden von den immunfluoreszierenden Larven eine Größenbestimmung des Pronephroskanals und des proximalen Abschnittes des Pronephrosanges durchgeführt. Diese Strukturen wurden mit Hilfe des Computerprogramms Kappa Image Base Metro (opto-electronics GmbH, Gleichen) vermessen und der Größenunterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite berechnet. Kein Größenunterschied wurde gleich 100 gesetzt. Um die Signifikanz der erhaltenen Phänotypen zu prüfen (p-Wert) wurde ein Mann-Whitney-Test durchgeführt, wobei die Ergebnisse von den Injektionen der HNF1 β Mutationen mit den Kontrollinjektionen von GFP alleine verglichen wurden.

11. Whole mount in situ Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen

Die Whole mount in situ Hybridisierung wurde nach dem Standardprotokoll von Harland durchgeführt (Harland, 1991). Zur Synthese der Digoxigenin markierten RNA Proben wurde das DIG-RNA-Labeling-Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet. Die als Matrize dienenden Vektoren wurden mit Restriktionsenzymen linearisiert und mit verschiedenen RNA-Polymerasen als Sense- bzw. Antisense-Probe transkribiert (Tabelle 3).

Probe	Vektor	Restriktionsenzym		RNA-Polymerase		Quelle
		antisense	sense	antisense	sense	
XWT-1	pBluescript II SK	EcoRV	SmaI	T3	T7	(Semba et al., 1996)
XPax-2	pBluescript II SK	EcoRI	XbaI	T3	T7	(Heller and Braendli, 1997)
XPax-8	pBluescript II SK	EcoRI	XhoI	T7	T3	(Heller and Brändli, 1999)
XHNF1 β	pGEM7	SmaI	XhoI	T7	SP6	(Demartis et al., 1994)
XSox9	pGEMT easy	NcoI	n.b.	SP6	n.b.	(Spokony et al., 2002)

Tabelle 3: Übersicht der Herstellung der verschiedenen RNA-Proben

In Abweichung zum Protokoll von Harland wurden die RNA-Proben nicht hydrolysiert. Die Farbreaktion wurde mit chromagen NBT/BCIP für einige Minuten bis 24 Stunden durchgeführt. Dabei wurden 4,5 μ l NBT und 3,5 μ l BCIP zusammen in 1 ml eiskaltem APB gemischt und über die Embryonen gegeben.

APB:

100 mM Tris (pH 9,5); 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1% Tween 20; 1 mM Levanisol

III. Ergebnisse

1. Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF1 β verändern dessen Eigenschaften

Heterozygote Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF1 β führen beim Menschen zu unterschiedlichen Formen von Nierenkrankheiten, zu MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) und in seltenen Fällen wurden Genitalfehlentwicklungen diagnostiziert. Abbildung 2 und Tabelle 1 geben einen Überblick über die Art der Mutation und das sie begleitende Krankheitsbild. Zu Beginn dieses Projektes waren 11 unterschiedliche Mutationen in dem humanen HNF1 β Gen bekannt. Diese sind über die gesamte Gensequenz, d.h. sowohl in Exon-Bereichen als auch in Intron-Bereichen nahe der Exon-Intron-Grenzen, lokalisiert. Da eine Mutation im Intron-Bereich das Spleißen in einer nicht vorhersehbaren Weise beeinflussen kann, wurden nur Mutationen aus den Exon-Bereichen berücksichtigt. Es konnten sowohl missense (S151P), als auch nonesense (E101X, R177X) und frameshift (P159delT, Q243delC, A263insGG, Y352insA) Mutationen identifiziert werden. Die nonesense und frameshift Mutationen führen jeweils zu einem frühzeitigen Stopcodon, so dass verkürzte Proteine entstehen. Die missense Mutation dagegen führt lediglich zum Austausch einer Aminosäure gegenüber dem Wildtyp.

Die beiden Mutanten R137-K161 und P328L329 wurden von Wild et al. ausführlich untersucht. Sie klonierten die cDNA des humanen HNF1 β Wildtyp in den Expressionsvektor myc-Rc/CMV, welcher ein myc-tag trägt (Wild et al., 2000). Von diesem Wildtyp-Expressionsvektor ausgehend, wurden die Mutanten durch Mutagenese generiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die genaue Analyse der weiteren HNF1 β Mutanten, um eine Korrelation zwischen Art der Mutation und dem Auftreten der verschiedenen Nierenkrankheiten zu überprüfen. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Mutanten wurden sowohl durch molekularbiologische Untersuchungen, in *in vitro* Analysen und in Zellkulturexperimenten, als auch durch *in vivo* Analysen im Krallenfrosch *Xenopus laevis* untersucht.

1.1 Die HNF1 β Mutanten kodieren für Proteine unterschiedlicher Größe

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten des HNF1 β Gens wurden durch Mutagenese des Wildtyp HNF1 β -Expressionsvektors myc-Rc/CMV generiert. Die Überprüfung der Funktionalität dieser Konstrukte erfolgte durch in vitro Synthese der Proteine. Die Proteine wurden entweder durch western-blotting mit dem myc-tag spezifischen Antikörper 9E10 oder durch radioaktive Markierung sichtbar gemacht.

Die in Abbildung 4A gezeigte Western-Blot-Analyse wurde mit in vitro synthetisierten Proteinen aus dem Reticulocytelysat und mit dem myc-tag spezifischen Antikörper 9E10 durchgeführt. Das Protein des HNF1 β Wildtyps (Spur 2) ist am größten und läuft erwartungsgemäß bei ca. 78 kDa im Gel. Die Mutante E101X kodiert das kürzeste Protein von 101 Aminosäuren (Spur 3) und läuft entsprechend schneller im Gel, wohingegen die Mutanten P159 (Spur 4) und Y352 (Spur 5) entsprechend größer sind.

Eine weitere Form der Überprüfung der Funktionalität der mutierten HNF1 β -Expressionsvektoren war die radioaktive Markierung der synthetisierten Proteine. In Abbildung 4B ist ein SDS-Proteingel mit radioaktiv markierten Proteinen gezeigt. Die Proteine des HNF1 β Wildtyps und der missense Mutante S151P sind gleich groß, ihre Banden (Spur 7 und 8) laufen mit gleicher Geschwindigkeit im Gel. Die Mutanten R177X und Q243 (Spur 9 und 10) laufen entsprechend ihrer zu erwartenden Proteingröße schneller als das Vollängen-Protein.

Der als Kontrolle dienende Rc/CMV Leervektor produziert kein spezifisches Protein, denn in den Gelen (Spur 1 und 6) ist kein Signal detektierbar.

Die mutierten HNF1 β -Expressionsvektoren generierten Proteine von unterschiedlicher Größe, entsprechend dem Auftreten des Stopcodons.

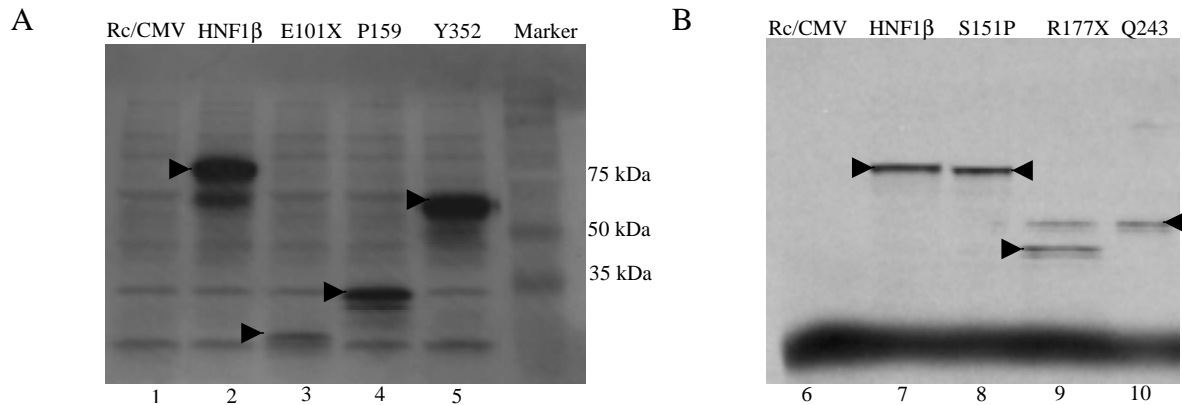


Abbildung 4: Die HNF1β Mutanten kodieren Proteine von unterschiedlicher Größe

Durch western-blotting und durch radioaktive Markierung wurden die Proteine der mutierten HNF1β-Expressionsvektoren untersucht. (A) Western-Blot mit TNT Produkten aus dem Kaninchen-Reticulocytenlysat und dem myc-tag spezifischen monoklonalen Antikörper 9E10. Die Auswertung erfolgte mit dem ECL-System. (B) SDS-Proteingel mit (³⁵S)-Methionin markierten TNT Produkten. Es wurden 3 µl TNT eingesetzt. Zur Auswertung wurde das Gel getrocknet und mit einem Röntgen Film exponiert. Die spezifischen Proteinbanden sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die zusätzliche Bande in Spur 9 ist durch Überlaufen der Proteine von Spur 10 entstanden, da sie auf gleicher Höhe laufen.

1.2 Unterschiede in der DNA-Bindungs-fähigkeit der HNF1β Mutanten

Durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich von Genen regulieren Transkriptionsfaktoren die Expression dieser Gene. Die für diese DNA-Bindung verantwortlichen Domänen sind beim HNF1β Gen die POU A und die Homeodomäne. Diese Domänen können jedoch durch das Auftreten einer Mutationen in ihrer Funktion gestört oder sogar deletiert sein. Mit Hilfe von Gelretardationsanalysen sollte getestet werden, inwieweit die Mutationen des HNF1β Gens die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors beeinträchtigen, an seine spezifische Erkennungssequenz zu binden. Dazu wurden Kernextrakte aus HeLa-Zellen hergestellt, welche mit den entsprechenden HNF1β Expressionsvektoren transfiziert wurden. HeLa-Zellen exprimieren selbst kein HNF1β und eignen sich somit gut zur Generierung der Proteine. Weiterhin wurde das ³²P markierte HP1 Oligonukleotid verwendet, welches eine HNF1-Bindestelle aus dem Xenopus Albumin Promotor enthält, von der man weiß, dass HNF1 daran bindet (Schorpp et al., 1988). Da alle HNF1β-Konstrukte N-terminal mit einem myc-Epitop tag versehen sind, kann die Spezifität der erhaltenen Komplexe mit dem 9E10 Antikörper überprüft werden, der gegen den myc-tag gerichtet ist.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis des Gelretardationsexperimentes. Der HNF1 β Wildtyp (Spur 2) bildet mit dem HP1 Oligonukleotid einen DNA-Protein-Komplex, der sich durch Zugabe des 9E10 Antikörpers retardieren lässt (Spur 3).

Im Gegensatz dazu sind die HNF1 β Mutanten E101X (Spur 4), S151P (Spur 6), P159 (Spur 8), R177X (Spur 10), Q243 (Spur 12) und A263 (Spur 14) nicht in der Lage an das HP1 Oligonukleotid zu binden. Auch durch Zugabe des Antikörpers wird kein DNA-Protein-Komplex (Spuren 5, 7, 9, 11, 13 und 15) detektierbar. Diese Mutanten haben ihre Fähigkeit an eine HNF1-Bindestelle zu binden verloren.

Anders verhält sich die Mutante Y352 (Spur 16). Sie kann genau wie der Wildtyp an das HP1 Oligonukleotid binden und einen DNA-Protein-Komplex bilden. Dieser läuft erwartungsgemäß schneller im Gel als der des Volllängen-HNF1 β (Spur 2) und wird durch Zugabe des myc-spezifischen Antikörpers retardiert (Spur 17).

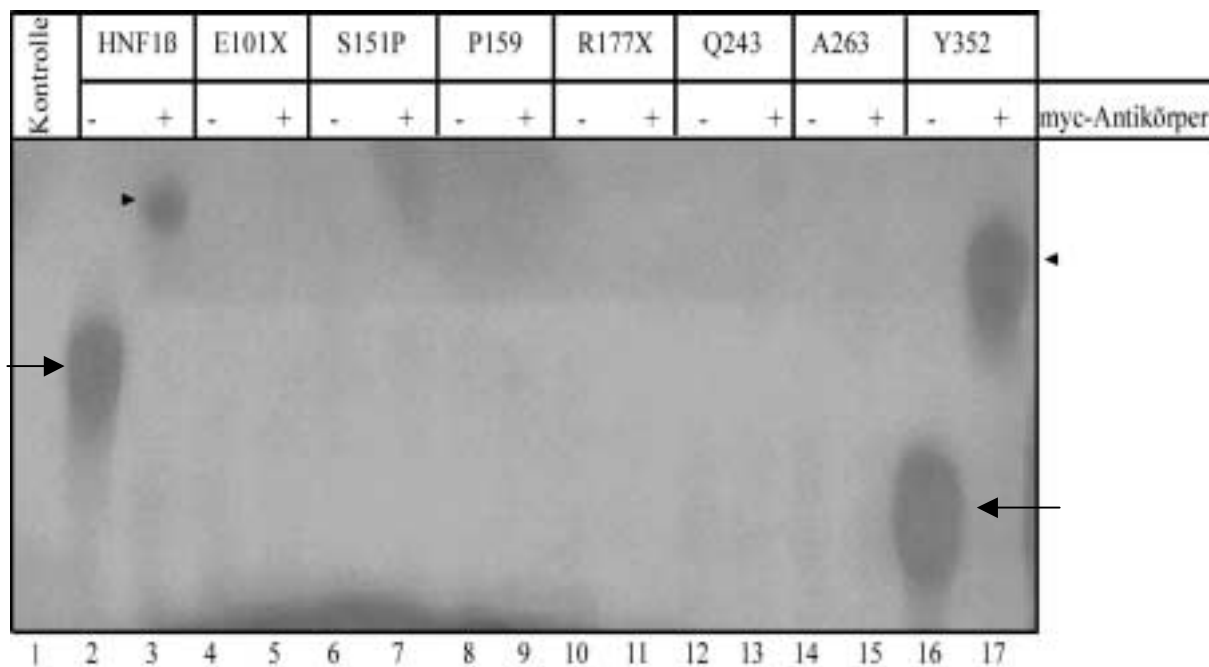


Abbildung 5: Unterschiedliche DNA-Bindungsfähigkeit der HNF1 β Mutanten im Gelretardationsassay

HeLa-Zellen wurden mit Expressionsvektoren, welche Wildtyp oder mutiertes HNF1 β kodieren, transfiziert und nach 24 Stunden Kernextrakte präpariert. Für das Gelretardationsexperiment wurden 3 μ g Gesamtprotein eingesetzt und als Sonde diente ein 32 P markiertes Oligonukleotid mit einer HNF1-Bindestelle aus dem Xenopus Albumin Promotor (HP1). Als Kontrolle wurde Kernextrakt von nicht transfizierten Zellen eingesetzt. Die im Gel sichtbaren DNA-Protein-Komplexe sind durch Pfeile markiert. Die Spezifität der DNA-Protein-Komplexe wurde durch Zugabe des monoklonalen Antikörpers 9E10, welcher gegen den myc-tag gerichtet ist, überprüft. Die durch den Antikörper stärker im Gel retardierenden Komplexe sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Um auch schwache Banden sichtbar zu machen, wurde der Film stark überexponiert.

1.3 Unterschiede in der Dimerisierung der HNF1 β Mutanten

Am N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors HNF1 β ist die Dimerisierungsdomäne lokalisiert, so dass HNF1 β in der Lage ist Homo- und Heterodimere zu bilden. Da bei allen HNF1 β Mutanten diese Domäne komplett vorhanden ist, sollte untersucht werden, ob sie mit dem Wildtyp Dimere bilden können, die an DNA mit einer HNF1-Bindestelle binden. Zur Überprüfung wurden Gelretardationsanalysen mit Kernextrakten aus transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Es wurden die Kernextrakte von Zellen, die entweder mit Wildtyp HNF1 β oder einer Mutante transfiziert wurden, im Verhältnis 1:1 gemischt und getestet, ob sie an das 32 P markierte HP1 Oligonukleotid binden, welches eine HNF1 Bindestelle enthält.

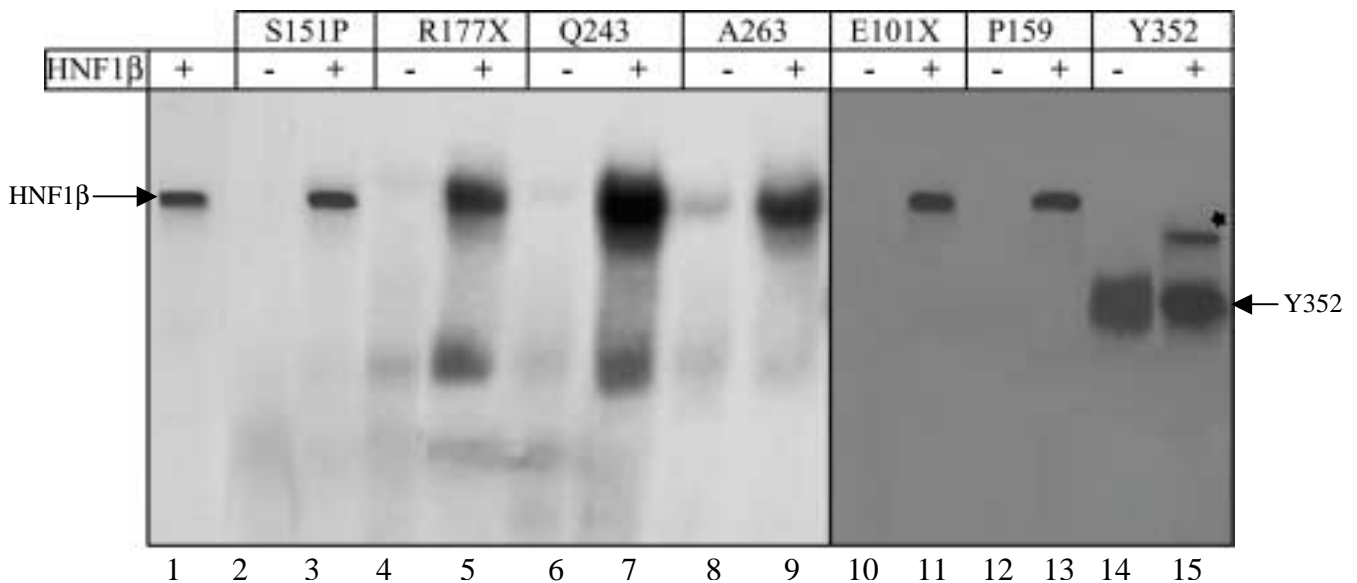


Abbildung 5: Die Dimerisierungsfähigkeit der HNF1 β Mutanten ist unterschiedlich

Gelretardationsanalyse mit einer 1:1 Mischung aus Kernextrakten von HeLa-Zellen, die mit dem HNF1 β -Wildtyp oder einer Mutante transfiziert wurden. Es wurden 3 μ g Gesamtprotein pro Ansatz verwendet und zu einer radioaktiv markierten HNF1-Bindestelle gegeben. Es sind zwei Gele dargestellt, die unter gleichen Bedingungen gefahren wurden. Das Heterodimer ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Die in Abbildung 5 dargestellten Gelretardationsanalysen zeigen ein unterschiedliches Dimerisierungsvermögen der HNF1 β Mutanten. Die HNF1 β Wildtyp Homodimere binden an das HP1 Oligonukleotid und bilden einen DNA-Protein-Komplex (Spur 1). Die Mutanten S151P, R177X, Q243, A263, E101X und P159 sind nicht in der Lage mit dem Wildtyp zu dimerisieren (Spur 3, 5, 7, 9, 11 und 13), denn die detektierten Komplexe laufen im Gel mit der gleichen Geschwindigkeit wie die DNA gebundenen Homodimere des HNF1 β Wildtyps

(Spur 1). Im Gegensatz dazu bildet die Mutante Y352 mit dem Wildtyp ein Heterodimer (Spur 15), das an das HP1 Oligonukleotid bindet. Im Vergleich zu den DNA gebundenen Homodimeren aus Wildtyp oder der Mutante entsteht im Gel ein DNA-Protein-Komplex mit intermediärer Geschwindigkeit.

Wie bereits in Abbildung 3 gezeigt, sieht man auch hier, dass nur die Mutante Y352 an das HP1 Oligonukleotid binden kann (Spur 14). Die anderen Mutanten haben diese Fähigkeit verloren (Spur 2, 4, 6, 8, 10 und 12) und binden auch in Gegenwart des Wildtyp Proteins nicht an die DNA.

1.4 Die HNF1 β Mutanten zeigen ein unterschiedliches Transaktivierungspotential

Die Aufgabe von Transkriptionsfaktoren ist die Regulation der Genexpression. Sie binden an spezifische DNA-Sequenzen im Promotorbereich ihrer Zielgene und beeinflussen somit deren Expression. Dies bedeutet, dass die Fähigkeit an DNA zu binden Voraussetzung für die Transaktivierung der Zielgene ist. Durch Gelretardationsanalysen (vergleiche Abschnitt 1.2) konnte gezeigt werden, dass die HNF1 β Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 nicht mehr an das HP1 Oligonukleotid mit einer HNF1- Bindestellen binden können. Es ist daher zu erwarten, dass diese Mutanten nicht in der Lage sind, ein Reporter gen zu aktivieren. In Zellkulturexperimenten wurde das Transaktivierungspotential der verschiedenen HNF1 β Mutanten durch Kotransfektion der entsprechenden Expressionsvektoren mit dem Luciferase Reporter gen syn(0)4tk-luc in HeLa-Zellen untersucht. Die Luciferaseaktivität wurde bei 50 ng oder 300 ng an transfiziertem Expressionsvektor gemessen und mit der Aktivität bei Transfektion von entsprechenden Mengen Wildtyp-HNF1 β verglichen. Der verwendete Luciferase Reporter enthält vier HNF1- Bindestellen aus dem Xenopus Albumin Promotor stromaufwärts des Thymidinkinase-Promotors. Da HeLa-Zellen kein endogenes HNF1 β enthalten, welches das Reporter gen beeinflussen könnte, sind sie gut für diese Reporter genanalysen geeignet. Die Luciferaseaktivität wurde 20 Stunden nach Transfektion bestimmt und ist ein direktes Maß für die Aktivierung des Promotors durch HNF1 β . In Abbildung 7 sind die Transaktivierungspotentiale des Wildtyp-HNF1 β und der Mutanten bei unterschiedlichen Mengen an transfiziertem Expressionsvektor dargestellt.

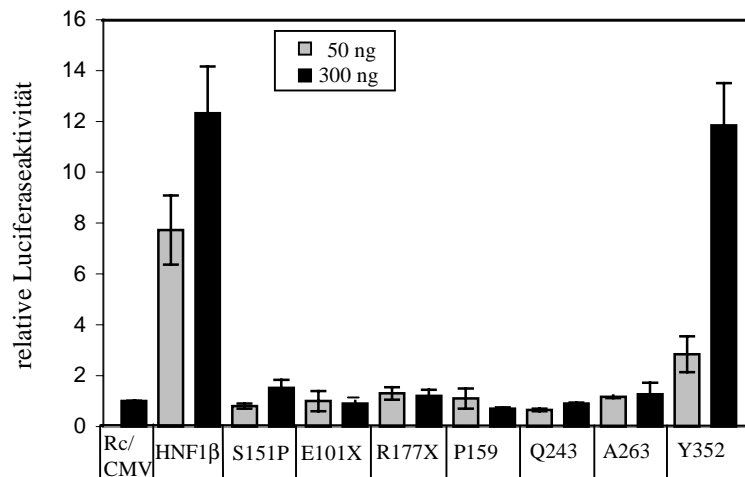


Abbildung 7: Unterschiedliches Transaktivierungspotential der HNF1β Mutanten

HeLa-Zellen wurden mit 50 ng (graue Balken) oder 300 ng (schwarze Balken) HNF1β Wildtyp oder Mutante kodierendem Expressionsvektor und 1,3 µg syn(0)4tk-luc Reporter gen kotransfiziert. 20 Stunden später wurde der Luciferaseassay durchgeführt. Bei allen Transfektionen wurde die Gesamtmenge an DNA mit dem Rc/CMV Leervektor konstant gehalten. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität des Reporter gens bei Transfektion von 300 ng Leervektor. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

HNF1β Wildtyp aktiviert den Promotor 7,5-fach nach Transfektion von 50 ng Expressionsvektor. 300 ng HNF1β aktivieren den Promotor 12-fach. Unter diesen Bedingungen ist die Sättigung erreicht (Wild et al., 2000). Wie erwartet haben die Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 ihr Transaktivierungspotential verloren, denn ihre Aktivität ist vergleichbar mit der des Rc/CMV Leervektors. Im Gegensatz dazu ist die Mutante Y352 in der Lage das Reporter gen zu aktivieren. Die gemessene relative Luciferaseaktivität ist bei niedriger Konzentration ca. 3-fach, also niedriger als der Wildtyp, und bei sättigender Menge 12-fach, was dem Wildtyp entspricht.

Um das Transaktivierungspotential des HNF1β Wildtyps und der Mutante Y352 eingehender vergleichen zu können, wurden Sättigungskurven mit dem syn(0)4tk-luc Reporter erstellt. Dazu wurde HeLa-Zellen mit dem Reporter und mit steigenden Mengen an Expressionsvektor kotransfiziert.

Abbildung 8A zeigt die Sättigungskurven des HNF1β Wildtyps (durchgehende Linie) und der Mutante Y352 (gestrichelte Linie) im Vergleich. Die Aktivität der Mutante ist bei niedrigen Konzentrationen (5 - 100 ng) an transfiziertem Expressionsvektor deutlich geringer als die des Wildtyps. Transfiziert man jedoch sättigende Mengen (150 - 300 ng), so ist das Transaktivierungspotential beider Proteine identisch.

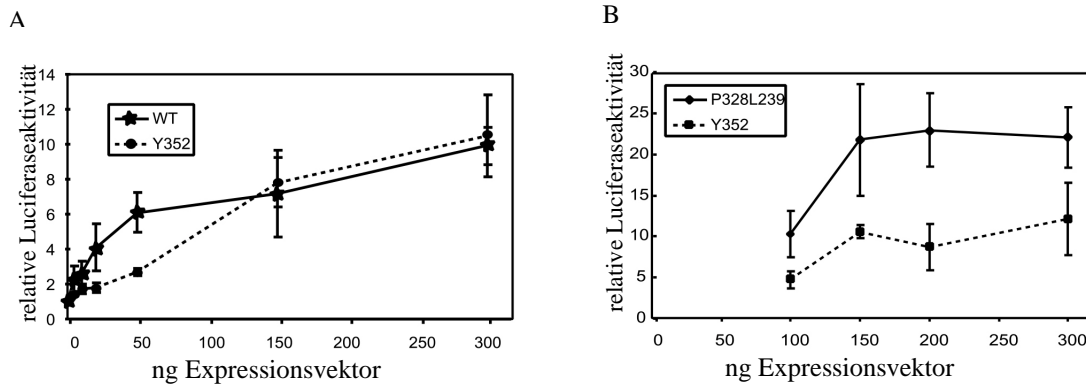


Abbildung 8: Sättigungskurven vom HNF1 β Wildtyp und den Mutanten Y352 und P328L329 im Vergleich

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität bezogen auf den Wert nach Transfektion mit Rc/CMV Leervektor. Es wurden jeweils 1,3 μ g syn(0)4tk-luc Reportergen und für (A) Expressionsvektor des Wildtyps (WT, durchgehende Linie) und der Mutante Y352 (gestrichelte Linie) in Mengen 5, 10, 20, 150 und 300 ng oder für (B) Expressionsvektor der Mutanten P328L329 (durchgehende Linie) und Y352 (gestrichelte Linie) in den Mengen 100, 150, 200 und 300 ng in HeLa-Zellen transfiziert. Die DNA-Menge wurde mit dem Rc/CMV-Vektor konstant gehalten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

Wild et al. haben für die Mutante P328L329 beschrieben, dass diese bei hohen Konzentrationen an transfiziertem Expressionsvektor aktiver als der Wildtyp ist, was für eine „gain of function“ Mutation spricht. Um einen direkten Vergleich des Transaktivierungspotentials dieser Mutante und der Mutante Y352 zu haben, wurden Sättigungskurven mit transfizierten HeLa-Zellen aufgestellt, die in Abbildung 8B graphisch dargestellt sind. Bei jeder gemessenen Konzentration (100 ng - 300 ng) zeigte die Mutante P328L329 eine deutlich höhere Aktivität als die Mutante Y352. Das Transaktivierungspotential der Mutante Y352 ist demnach geringer als das der P328L329 Mutante und sie ist keine „gain of function“ Mutation, da ihre Aktivität nicht höher als die des Wildtyps ist.

1.5 Keine der HNF1 β Mutanten wirkt dominant negativ

Jedes mutierte HNF1 β Protein enthält am N-terminalen Ende die vollständige Dimerisierungsdomäne, aber nur die Mutante Y352 ist in der Lage Heterodimere mit dem Wildtyp zu bilden, die an HNF1 Bindestellen binden können (siehe Abb. 5). Es besteht aber durchaus die Möglichkeit, dass die anderen Mutanten auch Dimere mit dem Wildtyp bilden, diese aber nicht mehr an die DNA binden können und somit auch nicht als Protein-DNA-

Komplex im Gelretardationsassay sichtbar werden. Behält ein Protein seine Fähigkeit Dimere zu bilden, so kann es durch Interaktion mit dem Wildtyp-Protein dessen Aktivität hemmen. Gerade im Bezug auf heterozygote Mutationen würde dadurch die Gesamtaktivität des in der Zelle vorhandenen Faktors unter die Aktivität sinken, die bei der Addition der Einzelaktivitäten von Wildtyp-Protein und mutiertem Protein zu erwarten wäre. Durch diese dominant negative Wirkung, könnten inaktive Mutanten für einen Funktionsverlust des Wildtyp Faktors verantwortlich sein.

Um die dominant negative Wirkung der HNF1 β Mutanten zu testen, wurden 50 ng Expressionsvektor des Wildtyp-HNF1 β mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Mutanten gemischt und mit dem syn(0)4tk-luc Reporter gen in HeLa-Zellen kotransfiziert.

Die Mutante Y352 besitzt noch ein eigenes Transaktivierungspotential, so dass bei Kotransfektion gleicher Mengen Expressionsvektor für Wildtyp und Mutante eine Aktivität zu erwarten ist, die der Summe der beiden Einzelaktivitäten entspricht. In Abbildung 9A ist die relative Luciferaseaktivität bei Transfektion von 50 ng Wildtyp zusammen mit 25, 50 oder 100 ng der Mutante Y352 dargestellt. Transfiziert man gleiche Mengen an Wildtyp und Mutante (je 50 ng), so ist die Gesamtaktivität gleich dem Wert, wie er bei Transfektion der gleichen Menge Wildtyp (50 ng) erreicht wird. Sogar ein zweifacher Überschuss an mutiertem Faktor bewirkt keine Veränderung der Gesamtaktivität. Dies liegt daran, dass sich bei Transfektion von 50 ng Wildtyp das Transaktivierungspotential bereits in der Sättigung befindet, so dass eine Erhöhung der Menge an transfiziertem Expressionsvektor keine Erhöhung der Aktivität zur Folge hat.

Wie in Abbildung 7 gezeigt, haben die HNF1 β Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 kein Transaktivierungspotential und stellen somit typische Kandidaten für dominant negativ wirkende Proteine dar. HeLa-Zellen wurden mit 50 ng Wildtyp und 25, 50 oder 100 ng Mutante kotransfiziert. Sollte sich eine Mutante dominant negativ verhalten, so würde die Gesamtaktivität unter der Aktivität liegen, die bei Transfektion von 50 ng Wildtype alleine erreicht wird. Abbildung 9B zeigt die Luciferaseaktivitäten nach Kotransfektion des Wildtyps und der nonsense Mutante R177X oder der frameshift Mutante A263. Bei Transfektion von gleichen Mengen Wildtyp (50 ng) und Mutante (50 ng) sinkt die Gesamtaktivität nicht unter die Aktivität des Wildtyps alleine. Auch bei einem zweifachen Überschuss an Mutante sinkt die Gesamtaktivität nicht unter die des Wildtyps bei Transfektion von je 50 ng Expressionsvektor. Beide Mutanten zeigen keinen dominant negativen Effekt. Die Mutanten S151P, E101X, P159 und Q243 wurden unter gleichen

Bedingungen untersucht. Auch bei ihnen wurde kein dominant negativer Effekt festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Der Reporter syn(0)4tk-luc ist ein künstlich hergestelltes Konstrukt, welches in dieser Form nicht in den Zellen vorhanden ist. Um möglichst authentische Gegebenheiten zu haben, wurde in den folgenden Experimenten der HNF4 α P2(-285)-luc Reporter verwendet. Dieser Reporter beinhaltet einen Teil des natürlichen P2 Promotors des menschlichen HNF4 α Genes mit einer HNF1-Bindestelle (Thomas et al., 2001) und stellt somit einen natürlichen Zielpromotor des HNF1 β Gens dar. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus einem Cervixkarzinom. Diesen Zellen können wichtige Cofaktoren, wie zum Beispiel das in Nierenzellen vorkommende DCoH (Dimerisations Cofaktor von HNF-1/pterin-4 α -carbinolamine dehydratase, MIM# 126090) fehlen. DCoH stabilisiert unter anderem die Dimere zwischen HNF1 α und HNF1 β . Durch das Fehlen dieses stabilisierenden Cofaktors kann die Wirkungsweise des HNF1 β Proteins in den HeLa-Zellen beeinträchtigt sein. Aus diesem Grund wurden die gleichen Versuche in humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK293-Zellen) durchgeführt, die diese wichtigen Cofaktoren exprimieren. Die HEK293-Zellen wurden mit 50 ng Wildtyp und verschiedenen Mengen der Mutante A263 zusammen mit dem HNF4 α P2(-285)-luc Reporter gen kotransfiziert.

Die Luciferaseaktivität bei Transfektion von 50 ng Wildtyp mit unterschiedlichen Mengen (50 ng, 100 ng oder 250 ng) der Mutante A263 ist in Abbildung 9C gezeigt. Auch hier wurde keine Veränderung der Gesamtaktivität durch den mutierten Faktor festgestellt. Sogar bei einem fünffachen Überschuss an mutiertem Transkriptionsfaktor wird die Gesamtaktivität von Wildtyp und Mutante nicht unter die Aktivität des Wildtyps bei Transfektion von 50 ng alleine gesenkt. Dies gilt auch für die nonsense Mutante E101X (Daten nicht gezeigt). Für beide Mutanten konnte in HEK293-Zellen mit dem HNF4 α P2(-285)-luc Reporter gen keine dominant negative Wirkung festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den beschriebenen Bedingungen für keine der HNF1 β Mutanten ein dominant negativer Effekt gezeigt werden konnte.

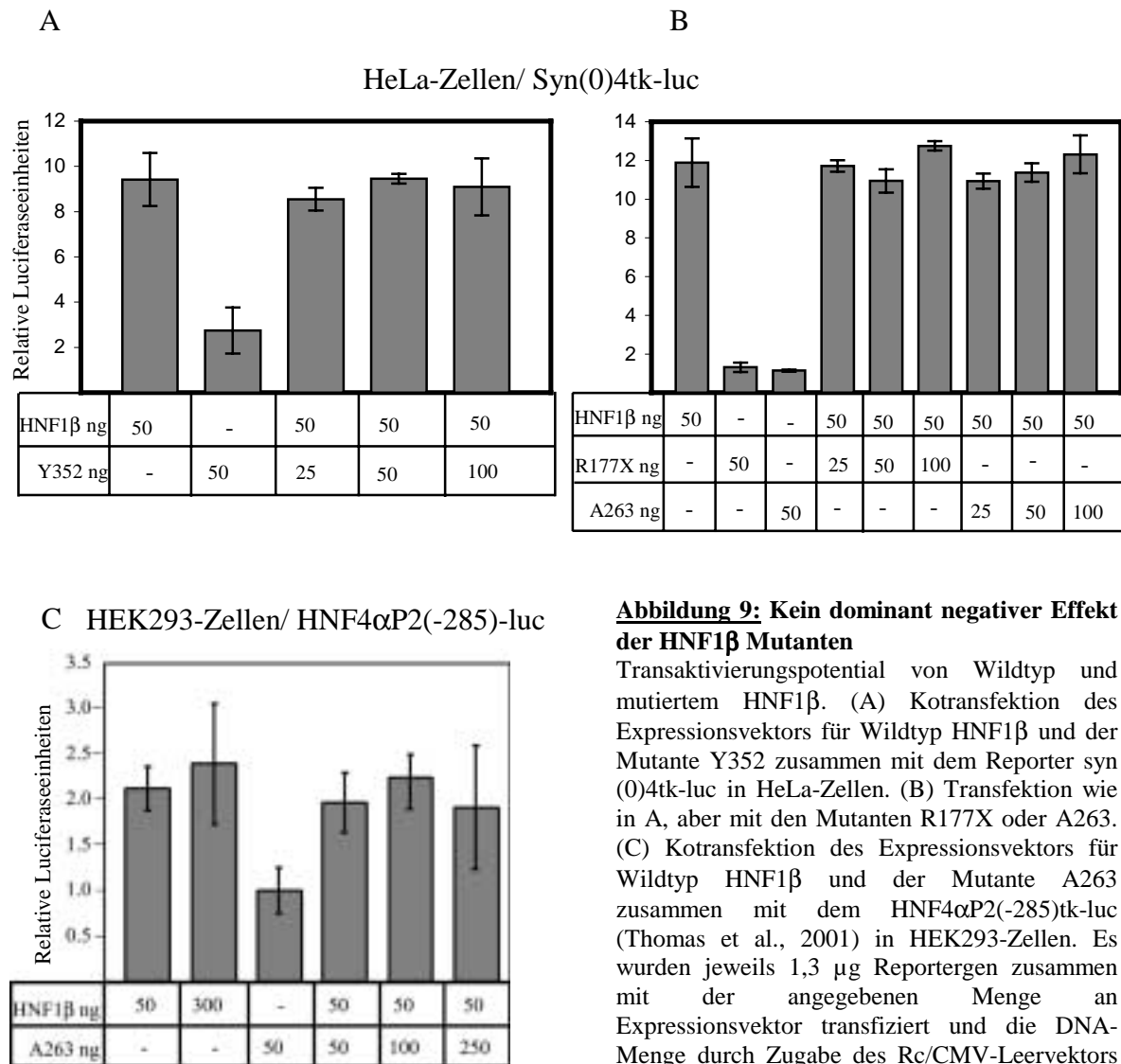


Abbildung 9: Kein dominant negativer Effekt der HNF1β Mutanten

Transaktivierungspotential von Wildtyp und mutiertem HNF1β. (A) Kotransfektion des Expressionsvektors für Wildtyp HNF1β und der Mutante Y352 zusammen mit dem Reporter syn (0)4tk-luc in HeLa-Zellen. (B) Transfektion wie in A, aber mit den Mutanten R177X oder A263. (C) Kotransfektion des Expressionsvektors für Wildtyp HNF1β und der Mutante A263 zusammen mit dem HNF4αP2(-285)tk-luc (Thomas et al., 2001) in HEK293-Zellen. Es wurden jeweils 1,3 µg Reporter gen zusammen mit der angegebenen Menge an Expressionsvektor transfiziert und die DNA-Menge durch Zugabe des Rc/CMV-Leervektors konstant gehalten. Die relative Luciferaseaktivität bezieht sich auf die Aktivität nach Transfektion mit dem Leervektor und wurde nach 20 Stunden gemessen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von sechs unabhängigen Werten an.

1.6 Unterschiede in der zellulären Lokalisation der HNF1β Mutanten

Die Mutationen in dem Transkriptionsfaktor HNF1β können bewirken, dass sich die Lokalisation des Proteins in der Zelle ändert, so dass weniger HNF1β im Kern zur Transaktivierung von Genen zur Verfügung steht. Um die zelluläre Lokalisation der mutierten HNF1β-Proteine zu detektieren, wurden Immunfluoreszenzen von transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt.

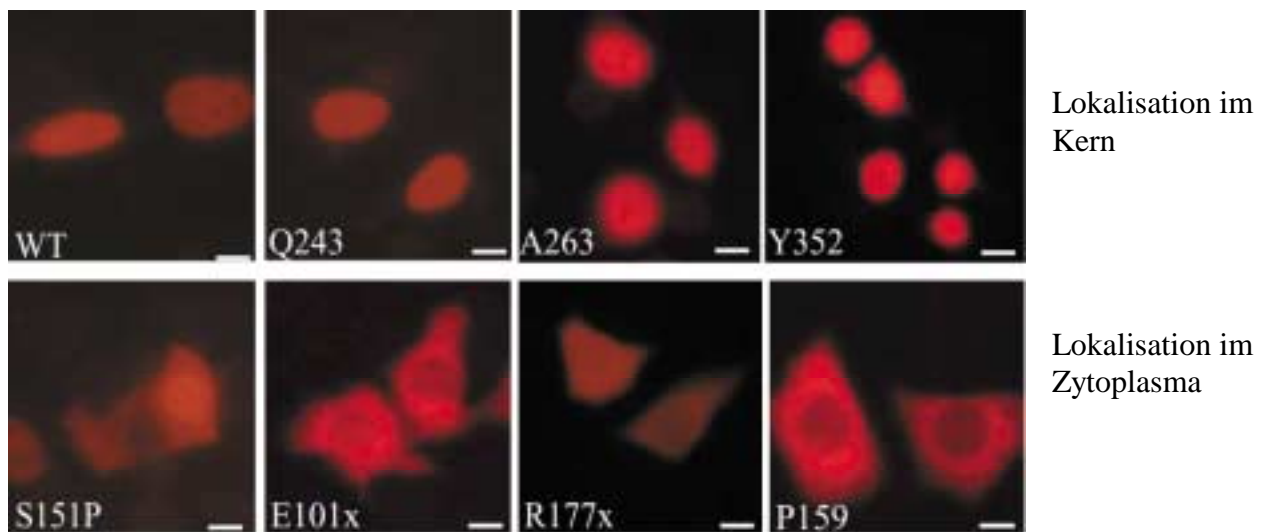


Abbildung 10: Unterschiedliche Lokalisation der HNF1 β Mutanten in HeLa-Zellen

Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen die mit dem Expressionsvektor für HNF1 β Wildtyp oder einer Mutante transfiziert wurden. Als Erstantikörper diente der gegen den myc-tag gerichtete monoklonale Antikörper 9E10 und die rote Fluoreszenz wurde durch einen Cy3 gekoppelten Zweitantikörper erreicht. Der Wildtyp (WT) oder die entsprechende Mutante sind im Bild angegeben. Der im Bild angegebene Maßstab beträgt 5 μ m.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, ist das transfizierte HNF1 β Wildtyp-Protein (WT) ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Dies gilt ebenfalls für die Mutanten Q243, A263 und Y352. Im Gegensatz dazu zeigen die Mutanten E101X, P159 und R177X eine andere Verteilung in der Zelle. Sie konnten im Zytoplasma der Zellen detektiert werden. Daraus lässt sich auf ein Kernlokalisierungssignal (nuclear localisation signal, NLS) im N-terminalen Bereich der Homeodomäne schließen. Das Protein der missense Mutation S151P konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden.

2. Durch Überexpression von mutiertem HNF1 β in *Xenopus laevis* Embryonen kommt es zu Störungen bei der Pronephrosentwicklung

Um den Einfluss der HNF1 β Mutanten auf die Nierenentwicklung untersuchen zu können, wurden die weiteren Analysen in einem lebenden Organismus durchgeführt. Als Modellorganismus diente in der vorliegenden Arbeit der Krallenfrosch *Xenopus laevis*. In Amphibien ist der Pronephros (Vorniere) die erste funktionelle Nierenform im Larvenstadium, die später durch den Mesonephros (Urnieren) im erwachsenen Tier ersetzt wird. Durch Überexpression der verschiedenen HNF1 β Mutanten in den Froschembryonen soll ihr Einfluss auf die Nierenentwicklung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde *in vitro* synthetisierte mRNA, welche die entsprechende Mutante kodiert, zusammen mit mRNA des Green Fluorescence Protein (GFP) in einen Blastomer einer sich im Zwei-Zell-Stadium befindenden Zygote injiziert. Im Neurula-Stadium wurden die Embryonen aussortiert, wobei das GFP als Selektionsmarker diente. Für die weiteren Analysen wurden nur Tiere verwendet, die sich normal entwickelten und die grüne Fluoreszenz auf nur eine Embryohälfte beschränkt zeigten (Abbildung 11). Diese fluoreszierende Seite ist die injizierte Tierhälfte und kann mit der nicht injizierten Seite, die somit als Kontrollseite fungiert, verglichen werden. Sobald die Tiere freischwimmend waren erfolgte die Fixierung in MEMFA. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz wurde der Pronephros durch Inkubation mit einer Mischung aus den zwei Erstantikörpern 3G8 (Nierenkanälchen) und 4A6 (Sammelrohr) und einem Cy3 gekoppelten Zweitantikörper sichtbar gemacht. Pro Mutante wurden ca. 100 Tiere untersucht (genaue Mengenangaben in Abbildung 13 bzw. 16).



Abbildung 11: Grüne Fluoreszenz der mit dem Green Fluorescence Protein (GFP) injizierten Embryoseite

Fluoreszenzaufnahme eines *Xenopus* Embryos im Neurula-Stadium in dorsaler Ansicht. Im Zwei-Zell-Stadium wurden 350 pg mRNA, welche das GFP kodiert, in eine Blastomere injiziert. Die injizierte rechte Seite ist durch einen Stern gekennzeichnet. Der Maßstab beträgt 500 μm .

2.1 Reduktion des Pronephros durch Injektion der Mutante Y352

Durch Überexpression des HNF1 β Wildtyps oder der Mutanten P328L329 und R137K161del in *Xenopus laevis* Embryonen wird die Pronephrosentwicklung auf der injizierten Seite des Tieres gestört, was zu einer Reduktion der Nierenstrukturen führt (Wild et al., 2000). Da sich die Ergebnisse der Mutante Y352 und der Mutante P328L329 in Zellkulturexperimenten und in *in vitro* Analysen gleichen (Abb.8), vermutete man auch eine ähnliche Beeinflussung der Pronephrosentwicklung in injizierten *Xenopus* Larven. Dazu wurden die *Xenopus* Eier wie beschrieben injiziert, kultiviert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

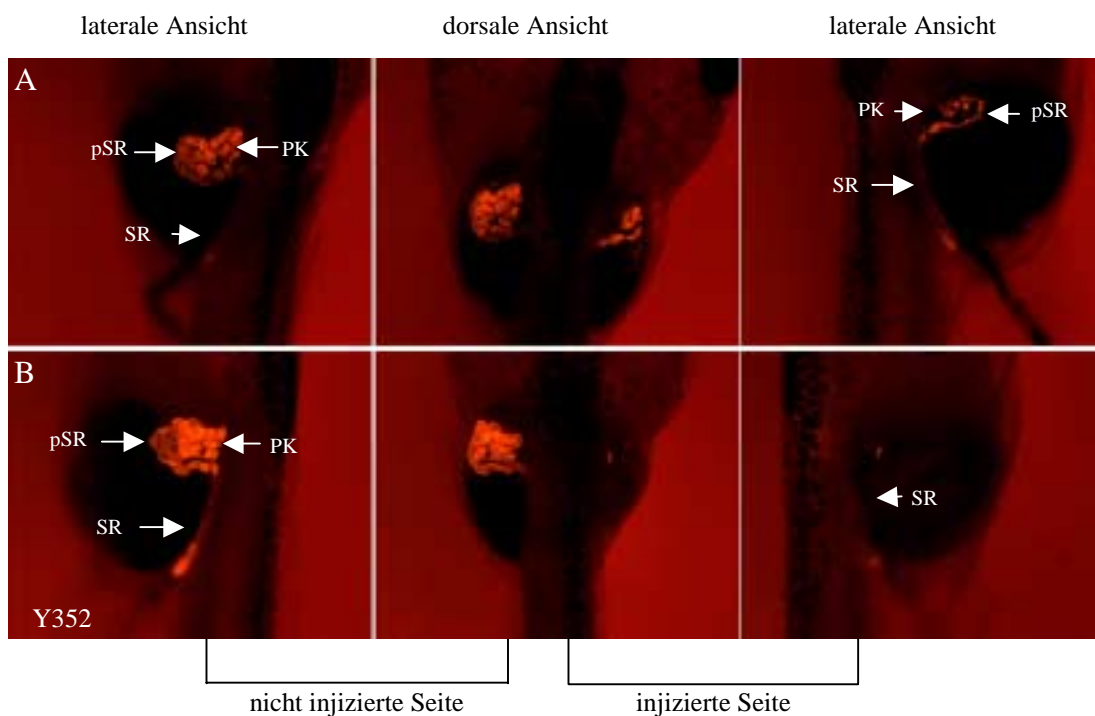


Abbildung 12: Reduktion des Pronephros durch Überexpression der Mutante Y352

Immunfluoreszenzaufnahme einer mit Mutante Y352 injizierten *Xenopus* Larve. Im Zwei-Zell-Stadium wurde in eine Blastomere 250 pg mRNA, die Mutante Y352 kodierend, zusammen mit 100 pg mRNA, das Green Fluorescence Protein (GFP) kodierend, injiziert. Im Stadium 45 erfolgte die Fixierung und die Immunfluoreszenzfärbung mit einer Mischung aus den beiden pronephrosspezifischen Erstantikörpern 3G8 und 4A6 und einem Cy3 gekoppelten Zweitantikörper. (A) 80% und (B) 10% der Larven zeigten diesen Phänotyp. In der lateralen Ansicht sind gekennzeichnet: Pronephroskanälchen (PK), Sammelrohr (SR) und proximales Sammelrohr (pSR). Der Maßstab beträgt 500 μ m.

Injiziert man RNA der Mutante Y352 in die Larven, so kommt es zu einer Reduktion des Pronephros auf der injizierten Seite, wie in Abbildung 12 zu sehen ist. Von dieser Reduktion sind die Pronephroskanälchen und der proximale Bereich des Sammelrohres betroffen. Über 80% der untersuchten Tiere zeigten diesen Phänotyp (Abb. 12A) und bei 10% der Larven

wurde kein Pronephros auf der manipulierten Seite gebildet (Abb. 12B). Der distale Bereich des Sammelrohres scheint dagegen durch den mutierten Transkriptionsfaktor nicht betroffen zu sein. Er ist bei allen Larven normal entwickelt.

Durch Überexpression der Mutante Y352 zeigt sich demnach der gleiche Phänotyp wie durch Überexpression des HNF1 β Wildtyps oder der Mutanten P328L329 und R137K161del.

Für die statistische Auswertung des Pronephrosgrößenunterschieds zwischen injizierter und nicht injizierter Tierhälfte wurden die fluoreszierenden Pronephroskanälchen und der proximale Bereich des Sammelrohrs mit dem Computerprogramm Kappa Metro ausgemessen und die Größendifferenz zwischen injizierter und nicht injizierter Seite berechnet. Es wurden 111 Larven, die mit der Mutante Y352 injiziert waren, untersucht. Kein Größenunterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite wurde gleich 100 gesetzt. Die so erhaltenen Werte für die Mutante wurden mit den Werten verglichen, die man erhält, wenn man entsprechende Mengen des Green Fluorescence Protein (GFP) alleine injiziert. Durch einen Mann-Whitney-Test wurde überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen dem durch Injektion der Mutante oder GFP hervorgerufenen Phänotyp besteht.

Abbildung 13 zeigt den erhaltenen p-Wert des Mann-Whitney-Tests beim Vergleich der Mutante Y352 mit GFP. Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ ist die Mutante klar von der GFP Injektion verschieden. Die graphische Darstellung erfolgt in Form eines Box-Plot-Diagramm. Es sind der minimale und maximale Wert, der Median (blaue Linie) und der Bereich in dem $\frac{3}{4}$ der Werte lokalisiert sind (roter Kasten) angegeben. Der Median der GFP Injektion befindet sich bei 100, was bedeutet, dass kein Unterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite besteht. Im Gegensatz dazu ist der Median der Mutante Y352 deutlich kleiner als 100, was die Reduktion des Pronephros widerspiegelt. Vergleicht man den Bereich in dem 75% der Werte lokalisiert sind, so sieht man ganz deutlich, dass bei der Mutante fast alle Werte unter 100 liegen, wohingegen sie bei GFP um 100 herum verteilt sind, was einer Normalverteilung entspricht.

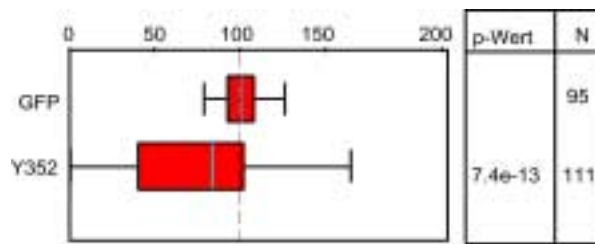


Abbildung 13: Signifikanter Unterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite beim Vergleich der Mutante Y352 mit GFP

Box-Plot-Diagramm und p-Werte des Mann-Whitney-Tests. Die Pronephroskanälchen und der proximale Abschnitt des Sammelrohrs wurden durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht und mit Hilfe des Computerprogramms Kappa Metro vermessen. Die Larven wurden mit der HNF1 β Mutante Y352 und GFP oder mit gleicher Menge GFP alleine injiziert. Der Pronephrosgrößenunterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite wurde berechnet und keine Größendifferenz gleich 100 gesetzt. Durch einen Mann-Whitney-Test wurde die Signifikanz des erhaltenen Phänotyps bei Injektion der Mutante im Vergleich zur Injektion von GFP alleine ermittelt. Im Box-Plot-Diagramm sind gekennzeichnet: minimaler und maximaler Wert, der Median (blaue Linie) und der Bereich in dem 75% der Werte lokalisiert sind (roter Kasten). Der p-Wert bezieht sich auf die Mutante im Vergleich zu GFP. (N) gibt die Anzahl der untersuchten Larven an.

2.2 Vergrößerung des Pronephros durch Injektion der Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263

Wie in Abschnitt 1 beschrieben, zeigen die HNF1 β Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 in *in vitro* Assays und in Zellkulturexperimenten ein anderes Verhalten als die Mutante Y352. Sie können nicht an eine HNF1-Bindesequenz binden und haben ihr Transaktivierungspotential verloren. Es ist daher wahrscheinlich, dass sie sich in einem kompletten Organismus anders auswirken als die Mutante Y352. Durch Überexpression in *Xenopus* Embryonen soll untersucht werden, wie diese Mutanten die Pronephrosentwicklung beeinflussen. Die Injektionsexperimente wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Durch mRNA Injektion der Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 kommt es ebenfalls zu einer Störung in der Entwicklung des Pronephros. Im Gegensatz jedoch zu der Mutante Y352, die eine Reduktion zur Folge hat, bewirken diese Mutanten eine Vergrößerung der Nierenstrukturen. Alle sechs Mutanten verursachen den gleichen Phänotyp in der injizierten Seite der Larven. In Abbildung 14 ist je eine Larve pro Mutante mit dem typischen

Phänotyp dargestellt. Bei über 80% der untersuchten Tiere war eine Vergrößerung des Pronephros zu sehen. Um genauer unterscheiden zu können, welche Bereiche des Pronephros betroffen sind, wurden Immunfluoreszenzen mit jeweils nur einem Pronephrosspezifischen Erstantikörper durchgeführt. Die Larven wurden entweder mit dem 3G8 Antikörper, welcher die Pronephroskanälchen erkennt, oder mit dem 4A6 Antikörper, der das Sammelrohr erkennt, inkubiert.

Abbildung 15A zeigt eine Larve, die auf der rechten Seite mit der Mutante A263 injiziert und mit dem Pronephroskanälchen spezifischen Antikörper 3G8 inkubiert wurde. Vergleicht man injizierte und nicht injizierte Seite, so sieht man, dass die Pronephroskanälchen vergrößert sind. Es hat den Anschein, als wären sie länger und mehr „geknäuel“. Aber auch das Sammelrohr ist betroffen, wie in Abbildung 15B zu sehen ist. Die gezeigte Larve wurde auf der rechten Seite mit der Mutante A263 injiziert und mit dem für das Sammelrohr spezifischen Antikörper 4A6 inkubiert. Man erkennt deutlich die Vergrößerung des proximalen Bereichs des Rohres. Auch hier scheint eine Verlängerung und eine stärkere Windung im proximalen Abschnitt des Ganges vorzuliegen. Im distalen Bereich ist das Sammelrohr normal entwickelt. Hier ist keine Vergrößerung der Strukturen zu beobachten. Überexpression der Mutante scheint auf die Entwicklung dieses Abschnittes keine Auswirkungen zu haben.

Auch bei Überexpression der Mutanten S151P, E101X, R177X, P159 oder Q243 kommt es zur Vergrößerung der Pronephroskanälchen und des proximalen Bereichs des Sammelrohres. Auch hier ist der distale Bereich des Ganges nicht beeinträchtigt.

Die Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 verhalten sich bei Überexpression in *Xenopus laevis* Embryonen identisch.

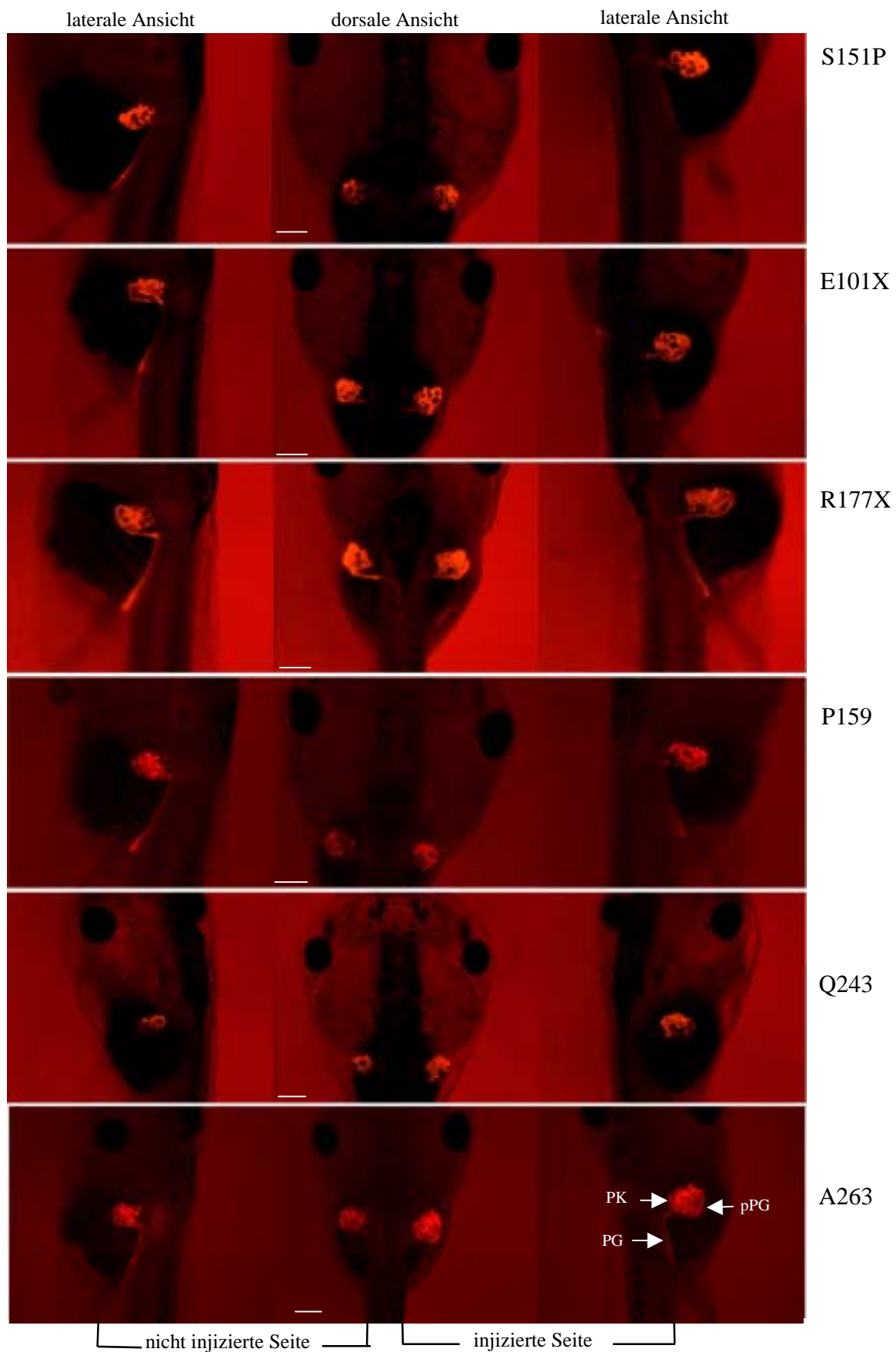
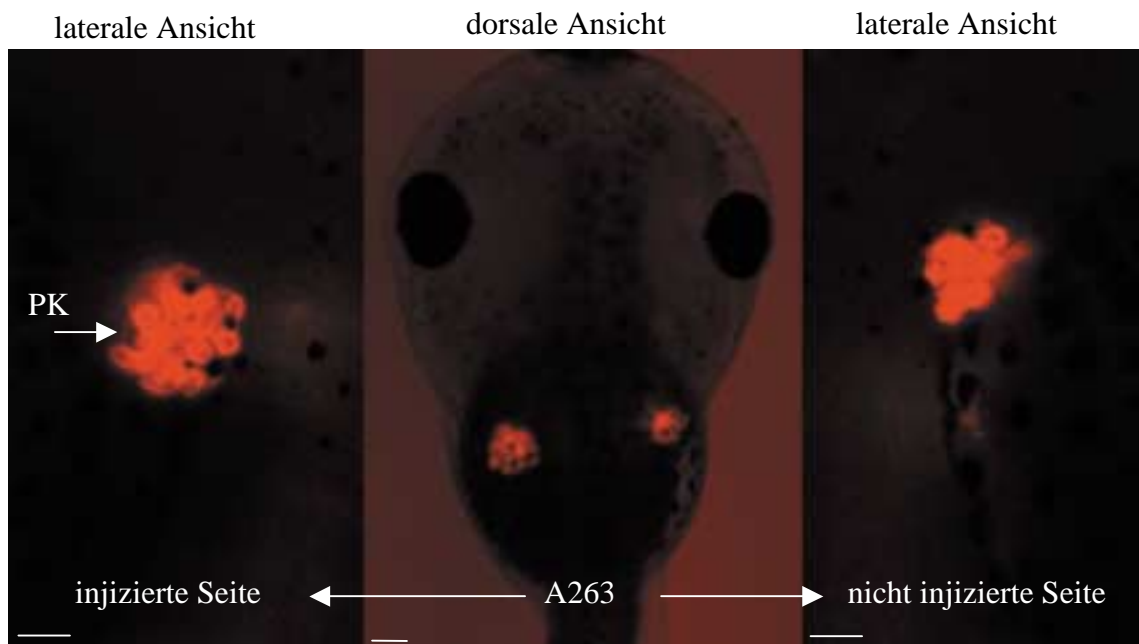


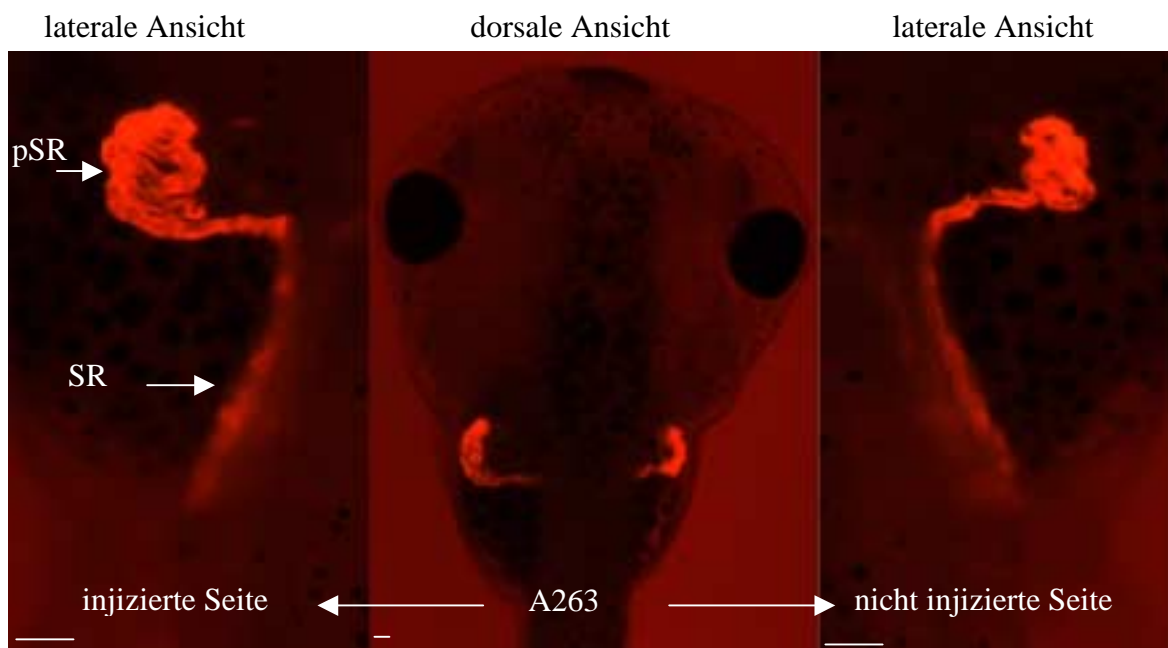
Abbildung 14: Vergrößerung des Pronephros durch Injektion der Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263

Immunfluoreszenzaufnahmen von *Xenopus* Larven, die mit den Mutanten E101X, S151P, P159, R177X, Q243 und A263 injiziert wurden. Injektion und Immunfluoreszenzfärbung wurden, wie in Abbildung 12 beschrieben durchgeführt. Pro Mutante ist eine Larve mit dem typischen Phänotyp dargestellt. Alle Larven wurden rechtsseitig injiziert. Die überexprimierte Mutante ist daneben angegeben. In der lateralen Ansicht sind gekennzeichnet: Pronephroskanälchen (PK), Sammelrohr (SR) und proximales Sammelrohr (pSR). Der Maßstab beträgt 500 µm.

A Antikörper: 3G8; Pronephroskanälchen



B Antikörper: 4A6, Sammelrohr

**Abbildung 15: Vergrößerung der Pronephroskanälchen und des Pronephrosanges**

Immunfluoreszenzaufnahmen von *Xenopus laevis* Larven die mit der Mutante A263 injiziert wurden. Injektion und Immunfluoreszenzfärbung wie in Abbildung 11 beschrieben. (A) Inkubation mit dem Erstantikörper 3G8, der die Pronephroskanälchen erkennt und einem Cy3 gekoppelten Zweitantikörper. Maßstab 250 μm . (B) Inkubation mit dem 4A6 Erstantikörper, der gegen den Pronephrosgang gerichtet ist und einem Cy3 gekoppelten Zweitantikörper. Maßstab 100 μm . In der lateralen Ansicht sind gekennzeichnet: Pronephroskanälchen (PK), Sammelrohr (SR) und proximales Sammelrohr (pSR).

Zur Überprüfung der Signifikanz des beobachteten Phänotyps wurde ein Mann-Whitney-Test, wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt die erhaltenen p-Werte des Mann-Whitney-Tests beim Vergleich der einzelnen Mutanten mit der GFP-Kontrollinjektion, sowie die Anzahl (N) der insgesamt untersuchten Larven. Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ sind die Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 signifikant von der alleinigen GFP Injektion verschieden. Dies sieht man auch sehr deutlich in dem Box-Plot-Diagramm, in dem der minimale und maximale Wert, der Median (blaue Linie) und der Bereich in dem $\frac{3}{4}$ der Werte lokalisiert sind (roter Kasten), gekennzeichnet ist. Bei jeder Mutante sind mehr als 75% der Werte größer als 100.

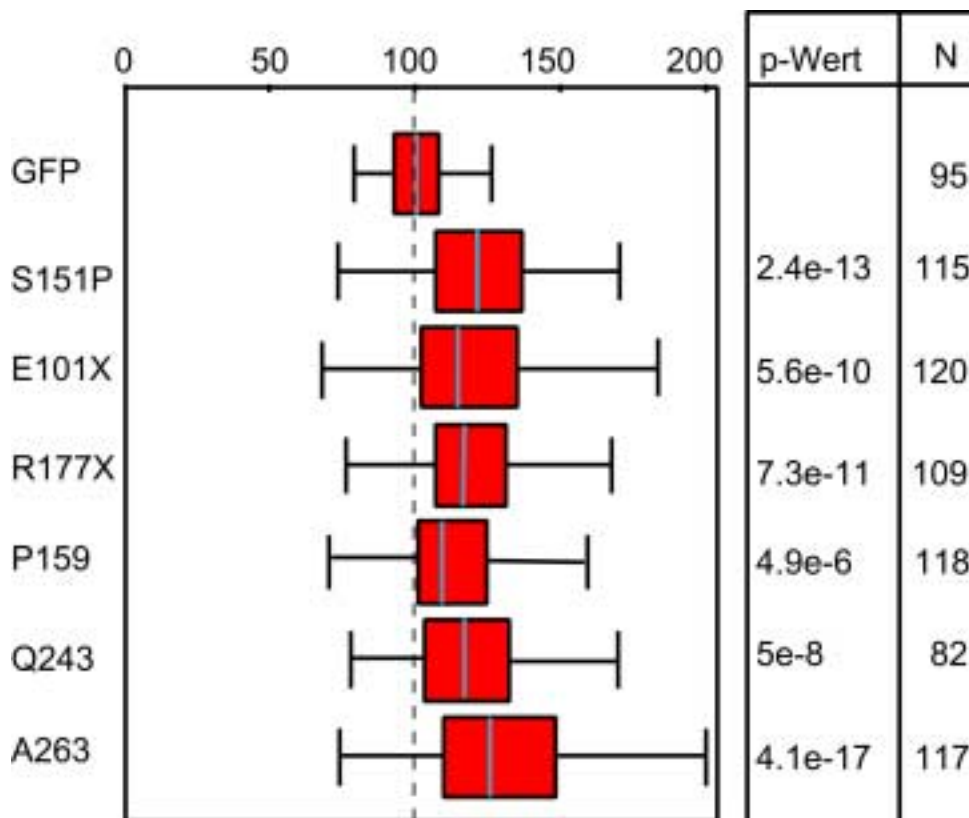


Abbildung 16: Signifikanter Größenunterschied zwischen injizierter und nicht injizierter Seite der Mutanten S151, E101X, R177X, P159, Q243 und A263 im Vergleich mit GFP

Box-Plot-Diagramm und p-Werte des Mann-Whitney-Tests. Durchführung wie in Abbildung 12 beschrieben. Im Box-Plot-Diagramm sind gekennzeichnet: minimaler und maximaler Wert, der Median (blaue Linie) und der Bereich in dem 75% der Werte lokalisiert sind (roter Kasten). Der p-Wert bezieht sich auf die jeweilige Mutante im Vergleich zu GFP. (N) gibt die Anzahl der untersuchten Larven an.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass jeder beobachtete Phänotyp, egal ob Vergrößerung oder Reduktion des Pronephros, signifikant verschieden von der GFP Kontrollinjektion ist.

3. Die Expression früher Nierenmarkergene wird durch mutiertes HNF1 β nicht beeinflusst

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von mutiertem HNF1 β die Pronephrosentwicklung in *Xenopus laevis* Embryonen gestört wird. Diese morphologischen Veränderungen sind erst später in der Entwicklung in älteren Larven sichtbar, die auslösenden Mechanismen finden jedoch in den frühen Entwicklungsstadien statt. Mit Hilfe von Whole Mount *in situ* Hybridisierungen sollte getestet werden, ob durch Überexpression des mutierten humanen HNF1 β in *Xenopus* Embryonen das Expressionsmuster früher nierenspezifischer Gene beeinflusst wird. Lässt sich eine Änderung im Expressionsprofil anderer Regulatoren feststellen, so bietet dies einen Ansatzpunkt für die Aufklärung des Regulationsmechanismus der Pronephrosentwicklung.

Für die *in situ* Hybridisierungen wurden Embryonen verwendet, die mit einer HNF1 β Mutante aus der „Vergrößerungsgruppe“ (A263) oder mit einer aus der „Reduktionsgruppe“ (Y352) injiziert waren. So ist ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Gruppen von Mutanten möglich. Die Hybridisierungen wurden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien durchgeführt. Als Vergleich diente das Expressionsmuster des zu untersuchenden Gens auf der nicht injizierten Seite, sowie nicht injizierte Embryonen.

Eines der untersuchten Gene ist das Paired Box Gen Pax8. Pax8 ist wie HNF1 β bereits in der Pronephros Anlage aktiv (Carroll et al., 1999a) und somit wahrscheinlich auch an der Determinierung und Differenzierung des Pronephros beteiligt. Weiterhin lässt es sich auch in der Ohr Anlage nachweisen. Im Laufe der Embryonalentwicklung ist Pax8 sowohl in den Nierenkanälchen als auch im Sammelrohr aktiv. Ab Stadium 36, kurz bevor der Pronephros funktionell aktiv wird, beschränkt sich die Expression jedoch nur noch auf die Kanälchen (Carroll et al., 1999a). Abbildung 17 zeigt die Expression von Pax8 in *Xenopus* Embryonen die entweder mit der HNF1 β Mutante A263 (A) oder Y352 (B) injiziert wurden. Die Expression im frühen Stadium (18) in der Pronephros Anlage (weiße Pfeilspitze) und in der Ohr Anlage (gelbe Pfeilspitze), sowie im späterem Stadium (27) in den Nierenkanälchen (weißer Pfeil) und im Sammelrohr (roter Pfeil) ist klar detektierbar. Vergleicht man bei beiden HNF1 β Mutanten die injizierte mit der nicht injizierten Seite des jeweiligen Embryos, so stellt man keinen Unterschied der Pax8 Expression fest.

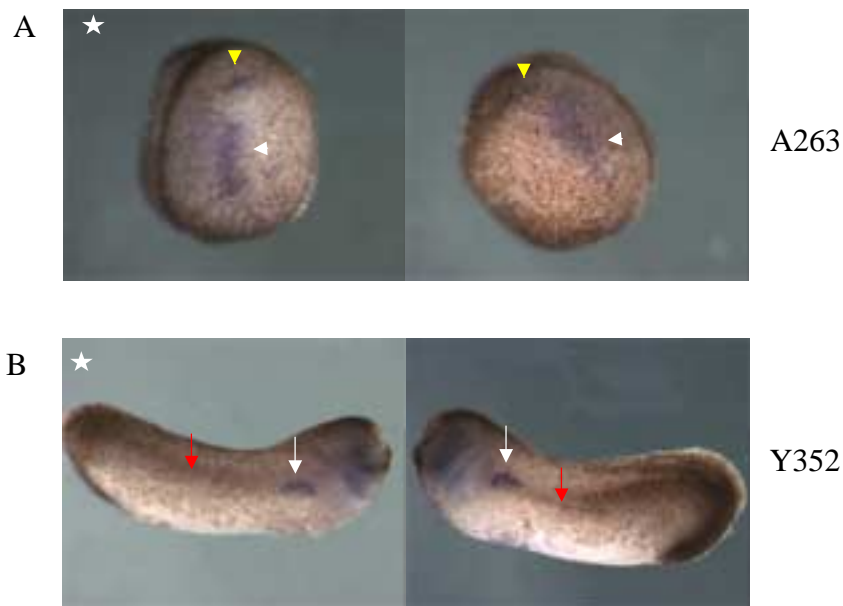


Abbildung 17: Kein Unterschied im Expressionsmuster von Pax8 nach Überexpression der HNF1 β Mutanten A263 oder Y352

Whole Mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen mit einer Pax8 Sonde. Die Embryonen wurden im Zwei-Zell-Stadium in eine Blastomere mit mRNA der Mutante A263 (A) oder Y352 (B) zusammen mit mRNA des Green Fluorescence Protein injiziert. Die Hybridisierung fand in (A) im Entwicklungsstadium 18 und in (B) im Stadium 27 statt. Die injizierte Seite ist mit einem Stern gekennzeichnet. Es ist eingezeichnet: die Expression in der Pronephros Anlage (weiße Pfeilspitze), Pronephroskanälchen (weißer Pfeil), Sammelrohr (roter Pfeil), Ohr Anlage (gelbe Pfeilspitze).

Das Expressionsprofil von Pax2 ist dem von Pax8 sehr ähnlich, jedoch ist Pax2 erst etwas später in der Entwicklung, ab Stadium 20, aktiv. Man schreibt ihm deswegen eine Rolle in späten Differenzierungsprozessen zu (Carroll et al., 1999a). Transkripte lassen sich in frühen Stadien in der Ohr und Pronephros Anlage und später im Ohr und in den Nierenkanälchen sowie im Sammelrohr nachweisen. Im Gegensatz zu Pax8 ist Pax2 während der kompletten Entwicklung im Sammelrohr aktiv. In Abbildung 18 ist die Expression von Pax2 an zwei Larven, die mit HNF1 β Mutante Y352 (A) oder A263 (B) injiziert wurden, dargestellt. Man sieht die Expression in der Ohr (gelbe Pfeilspitze) und in der Pronephros Anlage (weiße Pfeilspitze) im frühen Stadium (24), sowie in den Kanälchen, im Sammelrohr und im Ohr im späteren Stadium (29). Vergleicht man die injizierte Seite mit der nicht injizierten, so ist bei der Überexpression beider HNF1 β Mutanten kein Einfluss auf das Expressionsprofil von Pax2 festzustellen.

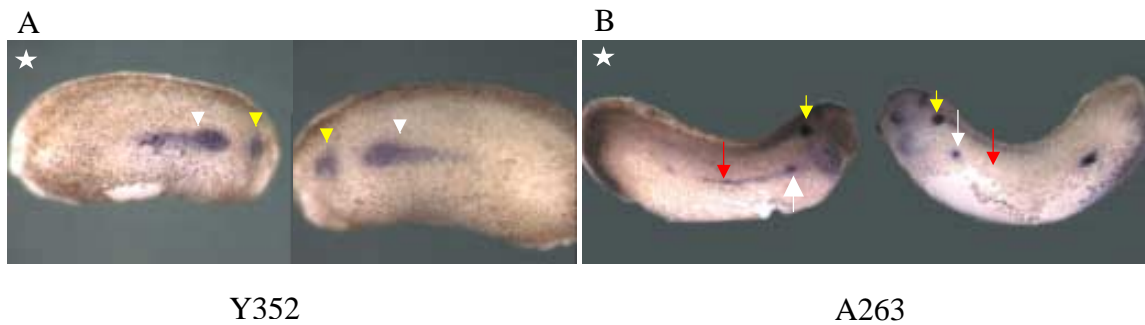


Abbildung 18: Kein Unterschied im Expressionsmuster von Pax2 nach Überexpression der HNF1 β Mutanten A263 oder Y352

Whole Mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen mit einer Pax2 Sonde. Die Embryonen wurden im Zwei-Zell-Stadium in eine Blastomere mit mRNA der Mutante Y352 (A) oder A263 (B) zusammen mit mRNA des Green Fluorescence Protein injiziert. (A) Die Larve ist im Entwicklungsstadium 24. Es ist gekennzeichnet Pronephros Anlage (weiße Pfeilspitze) und Ohr Anlage (gelbe Pfeilspitze). (B) Larve im Stadium 29. Es ist eingezeichnet: die Expression in den Pronephroskanälchen (weißer Pfeil), im Sammelrohr (roter Pfeil) und im Ohr (gelber Pfeil). Die injizierte Seite ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Die untersuchten Paired Box Gene Pax2 und Pax8 sind zwar in der Pronephros Anlage aktiv, jedoch nicht im Bereich des Glomus. Das Wilms' Tumor Suppressor Gen WT1 dagegen spielt eine Schlüsselrolle in der Glomus Entwicklung (Hastie, 1994) und ist während der Pronephrosentwicklung ausschließlich im Glomus ab Stadium 18 aktiv (Carroll et al., 1999b). Abbildung 19 zeigt die Expression von WT1 im Glomus (schwarzer Pfeil) zweier Larven, die mit der HNF1 β Mutante A263 (A) oder Y352 (B) injiziert wurden. Die Expression von WT1 ist beim Vergleich von injizierter mit nicht injizierter Seite identisch. Keine der beiden HNF1 β Mutanten hat Einfluss auf das WT1 Expressionsprofil.

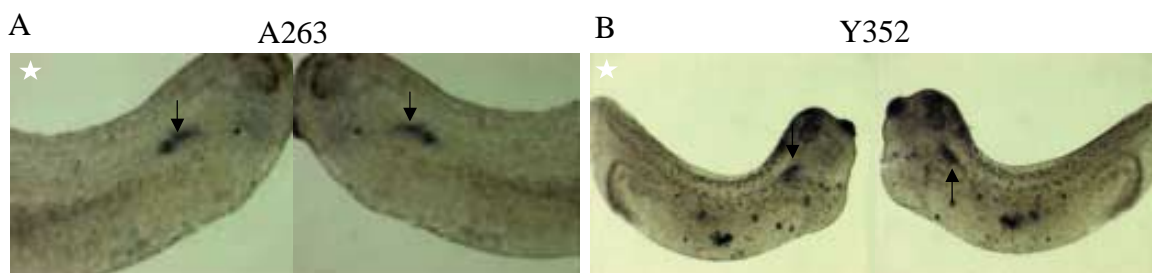


Abbildung 19: Kein Unterschied im Expressionsmuster von WT1 nach Überexpression der HNF1 β Mutanten A263 oder Y352

Whole Mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen mit einer WT1 Sonde. Die Embryonen wurden im Zwei-Zell-Stadium in eine Blastomere mit mRNA der Mutante A263 (A) oder Y352 (B) zusammen mit mRNA des Green Fluorescence Protein injiziert. Die Hybridisierungen fanden im Entwicklungsstadium 29 statt. Die injizierte Seite ist mit einem Stern und der Glomus durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Einige Patienten mit einer HNF1 β Mutation weisen neben den Nierendefekten auch Fehlentwicklungen im Genitalbereich auf. HNF1 β scheint demnach auch eine Rolle in der Genitalentwicklung zu spielen. Der Transkriptionsfaktor Sox9 ist ähnlich wie HNF1 β früh in der Embryogenese aktiv, wird aber in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert, unter anderem in der Genitalleiste der Embryonen (Spokony et al., 2002). Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierungen wurde untersucht, ob sich mutiertes HNF1 β auf die Expression von Sox9 auswirkt, um einen möglichen Zusammenspiel der beiden Transkriptionsfaktoren bei der Genitalentwicklung zu untersuchen. In Abbildung 20 ist eine Larve in Stadium 29 gezeigt, die mit HNF1 β Mutante A263 injiziert wurde. Sie zeigt die typische Sox9 Expression in der Neuralleiste (blauer Pfeil) und in der Genitalleiste (grüner Pfeil). Beim Vergleich von injizierter mit nicht injizierter Seite ist kein Unterschied im Expressionsprofil von Sox9 festzustellen. Auch für die Mutante Y352 konnte keine Differenz zwischen injizierter und nicht injizierter Seite gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

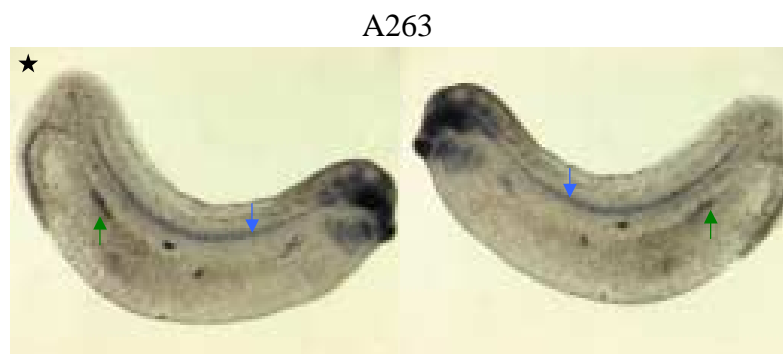


Abbildung 20: Kein Unterschied im Expressionsmuster von Sox9 nach Überexpression der HNF1 β Mutante A263

Whole Mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Laven mit einer Sox9 Sonde. Der Embryo wurde im Zwei-Zell-Stadium in eine Blastomere mit mRNA der Mutante A263 zusammen mit mRNA des Green Fluorescence Protein injiziert. Die Hybridisierung fand im Entwicklungsstadium 29 statt. Die injizierte Seite ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Expression in der Neuralleiste (blauer Pfeil) und in der Genitalleiste (grüner Pfeil) ist angegeben.

Um zu überprüfen, ob sich die verschiedenen HNF1 β Mutanten auch auf die Expression des endogenen HNF1 β auswirken und eine eventuelle Autoregulation beeinflussen, wurde durch *in situ* Hybridisierungen die Expression des endogenen HNF1 β bei Embryonen, die entweder die Mutante A263 oder die Mutante Y352 überexprimieren, untersucht. HNF1 β wird im Entoderm und ab Stadium 11 in der Pronephros Anlage exprimiert (Demartis et al., 1994). Später in der Entwicklung ist es unter anderem in den Nierenkanälchen aktiv. In Abbildung 21 ist die Expression des endogenen HNF1 β in Embryonen, die mit der Mutante A263 (A,B) oder Y352 (C,D) injiziert wurden, gezeigt. HNF1 β Expression ist in den frühen Stadien 20

(A) und 24 (C) in der Pronephros Anlage (weiße Pfeilspitze) zu sehen und im Stadium 27 (B) und 29 (D) in den Pronephroskanälchen (weißer Pfeil). Beim Vergleich von injizierter mit nicht injizierter Seite lässt sich für keine der beiden HNF1 β Mutanten eine Veränderung auf des endogenen HNF1 β feststellen, so dass man einen autoregulatorischen Einfluss ausschließen kann.

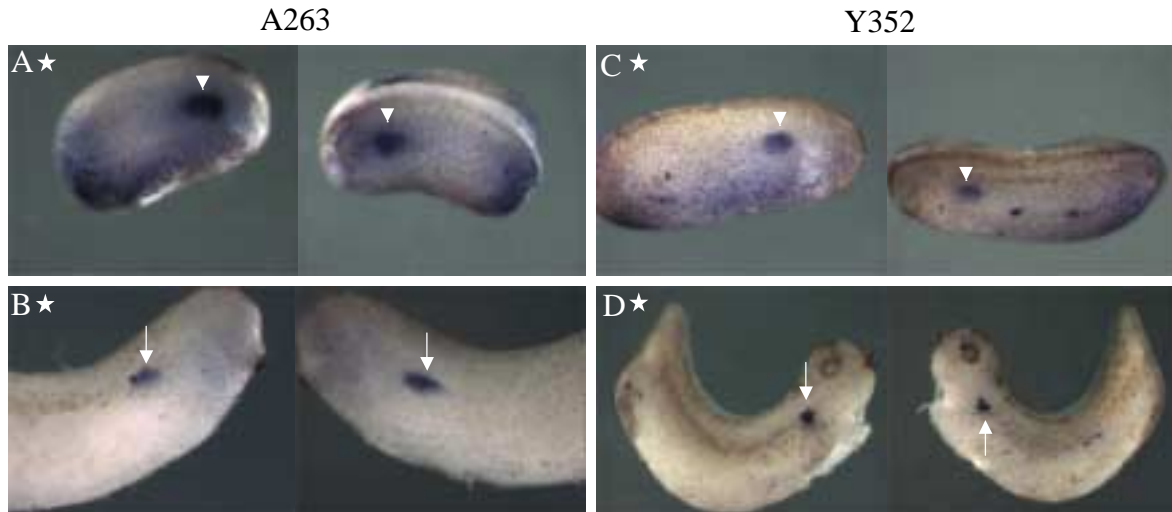


Abbildung 21: Kein Unterschied im Expressionsmuster des endogenen HNF1 β nach Überexpression der HNF1 β Mutanten A263 oder Y352

Whole Mount *in situ* Hybridisierung von *Xenopus laevis* Embryonen mit einer HNF1 β Sonde. Die Embryonen wurden im Zwei-Zell-Stadium in eine Blastomere mit mRNA der Mutante A263(A,B) oder Y352 (C,D) zusammen mit mRNA des Green Fluorescence Protein injiziert. Die Hybridisierungen fanden in den Entwicklungsstadien 20 (A), 27 (B), 24 (C) und 29 (D) statt. Die injizierte Seite ist mit einem Stern gekennzeichnet. Die Expression in der Pronephros Anlage (weiße Pfeilspitze) und in den Pronephroskanälchen (weißer Pfeil) ist angegeben.

In Tabelle 4 ist die Anzahl der untersuchten Tiere pro Mutante und Sonde dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für keines der hier untersuchten Gene (HNF1 β , WT1, Pax8, Pax2 und Sox9) eine Änderung im Expressionsmuster durch Überexpression der Mutante A263 oder der Mutante Y352 festgestellt wurde.

Sonde	HNF1 β Mutante	
	A263	Y352
HNF1 β	9	8
WT1	11	11
Sox9	16	17
Pax8	25	25
Pax2	20	18

Tabelle 4: Anzahl der untersuchten Tiere pro Mutante und Sonde

Es wurden Whole Mount *in situ* Hybridisierungen durchgeführt von Tieren die entweder mit der Mutante A263 oder der Mutante Y352 injiziert waren. Die Injektionen wurden, wie in Abbildung 17 beschrieben, durchgeführt. Die verwendeten Sonden und die genaue Anzahl der Tiere, die pro Sonde untersucht wurden, sind angegeben.

IV Diskussion

Mutationen im Transkriptionsfaktor HNF1 β führen beim Menschen zu MODY. Der Unterschied zu allen anderen MODY Genen ist jedoch, dass Mutationen im HNF1 β Gen auch mit verschiedenen Nierenfehlentwicklungen assoziiert sind. Der Einfluss von HNF1 β auf die Entwicklung der Niere konnte zum ersten Mal von Wild et al. (2000) klar bewiesen werden. Sie zeigten, dass durch Injektion von mutiertem oder Wildtyp HNF1 β die Pronephrosentwicklung in *Xenopus* Embryonen behindert wird. Dieser Effekt ist eindeutig spezifisch für HNF1 β , da die Injektion des nah verwandten HNF1 α Genes keinen Einfluss auf die Pronephrosentwicklung hat (Wild et al., 2000). Dies zeigt, dass HNF1 β bei der Nierenentwicklung eine essentielle Rolle spielt. Beim Menschen sind die durch die Mutationen verursachten klinischen Phänotypen äußerst variabel, jedoch ist die Ausbildung von Zysten in der Niere mit mehreren Mutationen assoziiert. Aufgrund der hohen Variabilität der klinischen Phänotypen lassen sich unterschiedliche Eigenschaften der mutierten Faktoren vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen HNF1 β Mutanten zum einen molekularbiologisch analysiert und zum anderen ihr Einfluss auf die Nierenentwicklung im Krallenfrosch *Xenopus laevis* und auf das Expressionsprofil anderer nierenspezifischer Gene untersucht. Mit den so gewonnenen Daten ist einerseits eine Kategorisierung der Mutanten möglich und andererseits kann eine Korrelation zwischen Art der Mutation und begleitendem Krankheitsbild hergestellt werden.

1. Basierend auf den molekularen Daten kann man zwei Gruppen von HNF1 β Mutanten unterscheiden

In Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen HNF1 β Mutanten sich in Bezug auf ihre Fähigkeit an DNA zu binden unterscheiden. Alle Mutanten denen Teile oder die kompletten DNA-Bindedomänen, POU A und Homeodomäne, fehlen, können nicht mehr an DNA mit einer spezifischen HNF1 Bindesequenz binden. Dazu gehören die nonsense Mutanten E101X und R177X, die frameshift Mutanten P159delT, Q243delC und A263insGG, sowie die Mutante R137-K161 (Abb. 5). Interessanterweise hat die missense

Mutation S151P ebenfalls ihre Fähigkeit verloren DNA zu binden, obwohl nur eine Aminosäure gegenüber dem Wildtyp Protein ausgetauscht ist. Für das HNF1 α Protein konnte durch Kokristallisation mit einem Promotor, der eine hohe Affinität besitzt, gezeigt werden, dass das helix-turn-helix (HTH) DNA-Bindemotiv von den Helices 3 und 4 der POU A Domäne geformt wird (Chi et al., 2002). Da in diesem Bereich die Homologie zwischen HNF1 α und HNF1 β bei 98% liegt (siehe Abb. 1), kann man davon ausgehen, dass auch bei HNF1 β diese beiden Helices das HTH-Motiv bilden. Der Austausch der polaren Aminosäure Serin durch Prolin an Position 151 verursacht eine Verzerrung der vierte α -Helix (Abb.2) der POU A Domäne (P α 4) um etwa 20 Grad in Richtung der Helixachse. Prolin kann zum einen aufgrund von sterischen Hindernissen keine reguläre α -Helix formen und zum anderen blockiert seine zyklische Seitenkette das N-Atoms der Hauptkette und hindert es chemisch daran eine Wasserstoffbrückenbindung zu formen (MacArthur and Thornton, 1993). Dies erklärt den Verlust der DNA-Bindung der Mutante S151P.

Die Fähigkeit der verschiedenen HNF1 β Mutanten an DNA zu binden korreliert streng mit ihrer Fähigkeit zu dimerisieren und zu transaktivieren. Dies ist jedoch zu erwarten, da in den durchgeführten Gelretardationsassays DNA-Bindung eine Voraussetzung zur Detektion der Dimere darstellt und Transaktivierung von der Fähigkeit mit der HNF1-Bindestelle des Reportergens zu interagieren abhängt. Die Daten belegen einen Funktionsverlust der Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243, A263 und R137-K161, sie stellen sogenannte „loss of function“ Mutationen dar.

Im Gegensatz dazu kann die frameshift Mutante Y352, welche die POU A und die Homeodomäne enthält, genauso effizient an DNA mit einer HNF1 Bindestelle binden wie der Wildtyp, oder wie die von Wild et al. (2000) charakterisierte Mutante P328L329, die ebenfalls die vollständigen DNA-Bindedomänen enthält. Vergleicht man jedoch die Aktivität des Wildtyps mit der der Mutante Y352 (Abb. 8A), der fast die gesamte Transaktivierungsdomäne fehlt, so ist die Aktivität der Mutante niedriger bei niedrigen Mengen an transfiziertem Expressionsvektor, erreicht aber erstaunlicherweise die Aktivität des Wildtyps bei sättigenden Mengen an transfizierter DNA. Dies dokumentiert, dass die Mutante Y352 unterschiedliche funktionelle Eigenschaften als der zum Wildtyp hat. Dies entspricht den Beobachtungen die für die Mutante P328L329 gemacht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutante bei hohen Mengen an transfiziertem Expressionsvektor sogar aktiver als der Wildtyp ist und somit eine „gain of function“ Mutation darstellt, obwohl

ihr ebenfalls ein großer Teil der Transaktivierungsdomäne fehlt (Wild et al., 2000). Da dieser „gain of function“ Effekt für die Mutante Y352 nicht beobachtet werden konnte (Abb. 8A), lässt sich vermuten, dass die 27 Aminosäuren, welche durch die Leserahmenverschiebung der Mutation P328L329delCCTCT generiert werden, Eigenschaften einer Transaktivierungsdomäne aufweisen. Da es bei der Mutation Y352insA zu keiner Leserahmenverschiebung kommt, sondern ein sofortiges Stopcodon entsteht, könnte dies den Unterschied der beiden Mutanten erklären.

Auch in der Fähigkeit zu dimerisieren unterscheidet sich die Mutante Y352 von den „loss of function“ Mutanten. In den durchgeführten Bindungsstudien konnten eindeutig Heterodimere zwischen Wildtyp und Mutante Y352 detektiert werden, die an DNA mit einer HNF1 β Bindestelle binden (Abb. 6). Dimerisierung konnten Wild et al. (2000) auch für die Mutante P328L329 nachweisen. Dies zeigt erneut, dass die Fähigkeit zu dimerisieren mit der Fähigkeit der DNA Bindung korreliert.

Für keine der untersuchten HNF1 β Mutanten konnte in den durchgeführten Experimenten ein Einfluss auf die Aktivität des Wildtyps nachgewiesen werden. Es konnte jedoch von anderen Gruppen für die Mutante A263 gezeigt werden, dass sie sowohl in HepG2 (Leberzelllinie) und MIN6 Zellen (β -Zelllinie des Pankreas) (Tomura et al., 1999) als auch in HeLa-Zellen (Bai et al., 2002) dominant negativ wirkt. In diesen Untersuchungen wurden jedoch andere Reporterkonstrukte mit anderen Promotoren verwendet. Die Autoren verwendeten in den HepG2 und MIN6 Zellen die Promotorregion des humanen GLUT2 Gens, eines Glukose-Transporters in Leber- und Pankreaszellen und in HeLa-Zellen den Ksp cadherin (Kidney specific cadherin) Promotor. Dies lässt darauf schließen, dass das Verhalten der Mutanten promotorspezifisch ist. Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls mit unterschiedlichen Promotoren durchgeführt. Dabei wurde zum einen ein artifizieller Promotor (syn(0)4tk-luc) und zum anderen ein natürlicher Zielpromoter (HNF4 α P2(-285)-luc) des HNF1 β Gens untersucht. Es konnte aber für beide Promotoren kein dominant negativer Effekt der Mutanten nachgewiesen werden.

Der Zelltyp scheint ebenfalls Auswirkungen auf die Eigenschaften der Mutanten zu haben. Tomura et al. (1999) konnten für die Mutante R177X in HepG2-Zellen einen dominant negativen Effekt finden, jedoch nicht in MIN6-Zellen. Dies lässt vermuten, dass die funktionellen Fähigkeiten der Mutanten A263 und R177X in den β -Zellen des Pankreas anders sind als in Leberzellen. Ein genereller und profunder Effekt der HNF1 β Mutanten auf das Wildtyp-Protein in einem Organismus ist jedoch eher unwahrscheinlich, da solch ein Effekt die Aktivität des HNF1 β Wildtyp-Allels ausschalten würde. Dies wäre, wie Ergebnisse

aus Untersuchungen an „Knock-out“ Mäusen zeigen höchstwahrscheinlich letal, denn eine homozygote Inaktivierung des HNF1 β Gens führt zu einem frühen embryonalen Entwicklungsstopp und somit zum Tod der Embryonen, verursacht durch Differenzierungsstörungen des viszeralen Endoderms (Coffinier et al., 1999; Barbacci et al., 1999).

Mit Hilfe von Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die mutierten HNF1 β Proteine eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation aufweisen (Abb.10). Aufgrund der Ergebnisse lässt sich auf ein Kernlokalisierungssignal im N-terminalen Bereich der Homeodomäne schließen. Alle untersuchten Mutanten, die diesen Abschnitt beinhalten, sind im Kern der Zellen lokalisiert. Diese Vermutung stimmt mit Angaben der Literatur überein. Es konnte gezeigt werden, dass ein Cluster von konservierten Aminosäuren am N-terminalen Ende der Homeodomäne als Kernlokalisierungssignal dient (Boulikas, 1994). Im Fall von HNF1 β wäre dies die Proteinsequenz KMRRNR (Aminosäure 229-234), die diese Funktion erfüllt.

Eine Ausnahme stellt jedoch die missense Mutante S151P dar, da sie sowohl im Zytoplasma als auch im Kern nachgewiesen werden konnte. Der Austausch der Aminosäure Serin durch Prolin hat nicht nur Auswirkungen auf die DNA-Bindung, sondern die durch den Austausch verursachte Konformationsänderung des Proteins scheint auch die Verteilung des mutierten Proteins in der Zelle zu beeinflussen.

Fasst man die molekularen Daten der HNF1 β Mutanten zusammen, so lassen sich zwei Gruppen von Mutanten unterscheiden. Zum einen die Mutanten P328L329 und Y352. Sie sind aktiv, d.h. sie binden an DNA, dimerisieren und transaktivieren. Und zum anderen die Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243, A263 und R137-K161, die durch den Verlust der DNA-Bindung auch nicht dimerisieren und transaktivieren können. Sie werden als „loss of function“ Mutationen bezeichnet.

Die Analyse der molekularen Eigenschaften der mutierten HNF1 β Proteine *in vitro* bzw. in Zellkulturexperimenten erlaubt lediglich eine Aussage darüber inwieweit sich die Mutationen auf die funktionellen Eigenschaften des Transkriptionsfaktors in einem artifiziellen System auswirken. Es erlaubt aber keine Aussage darüber wie sich genetische Veränderungen im sich entwickelnden Organismus auswirken. Aus diesem Grund wurden die HNF1 β Mutanten außerdem im Krallenfrosch *Xenopus leavis* überexprimiert und ihr Einfluss auf die Nierenentwicklung untersucht. Ziel dabei war es, festzustellen inwieweit die so gewonnenen *Xenopus* Daten mit den verschiedenen klinischen Phänotypen, wie sie bei Patienten mit einer HNF1 β Mutation auftreten, korrelieren.

2. Basierend auf dem Einfluss der HNF1 β Mutanten auf die Pronephrosentwicklung im Xenopus kann man zwei Gruppen von Mutanten unterscheiden

Die Anatomie des Xenopus Pronephros ist im Vergleich zum Metanephros des Menschen recht einfach, jedoch ist die Grundstruktur bei beiden identisch. Beide Organe werden aus Nephronen gebildet, lediglich die Anzahl der Nephrone variiert. So besteht der Pronephros der Amphibien aus einem einzigen Nephron, wohingegen der Metanephros des Menschen sich aus über einer Millionen Nephronen zusammensetzt. Dabei ist die basale Struktur eines Nephrons bestehend aus Glomus, Nierenkanälchen und Sammelrohr identisch und die gleichen essentiellen Regulatoren werden in beiden Organismen exprimiert (Carroll et al., 1999; Vize et al., 1997; Brändli, 1999; Ryffel, 2003). Dieser identische Aufbau erlaubt es den Pronephros des Xenopus als Modell für die Niere des Menschen zu benutzen. In der Embryonalentwicklung des Menschen kommt es zwar ebenfalls zu einer Pronephrosentwicklung, jedoch werden diese Strukturen nur rudimentär angelegt und haben keinerlei Funktion. Dadurch ist es nur schwer möglich diese frühe Nierenform beim Menschen zu untersuchen. Bereits in der vierten Schwangerschaftswoche beginnt die Rückbildung des Pronephrossystems und am Ende der fünften Woche ist es vollständig verschwunden. Stattdessen hat sich aus dem intermediären Mesoderm der thorakalen und lumbalen Segmente der Mesonephros entwickelt, der später durch den Metanephros als definitive Niere ersetzt wird.

Durch Überexpression der HNF1 β Mutanten in Xenopus Embryonen konnte gezeigt werden, dass die Nierenentwicklung der Larven auf unterschiedliche Weise gestört ist. Die Mutanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe verursacht eine Vergrößerung der Pronephroskanälchen und des proximalen Bereichs des Sammelrohrs (Abb.14). Zu dieser „Vergrößerungsgruppe“ zählen die Mutanten S151P, E101X, R177X, P159, Q243 und A263, die nicht mehr in der Lage sind, an DNA mit einer spezifischen HNF1 Erkennungssequenz zu binden und somit auch nicht dimerisieren und transaktivieren. Da sie dennoch die Pronephrosentwicklung in den Xenopus Embryonen beeinflussen, ist es wahrscheinlich, dass sie mit anderen regulatorischen Komponenten interagieren und so indirekt auf die Nierenentwicklung einwirken. Die zweite Gruppe der HNF1 β Mutanten verursacht eine Reduktion der Pronephroskanälchen und des proximalen Bereichs des Sammelrohrs, in einigen Fällen konnte sogar ein kompletter Verlust dieser Strukturen beobachtet werden

(Abb.12). Zur dieser „Reduktionsgruppe“ gehört zum einen die Mutanten P328L329, die höheres Transaktivierungspotential als der Wildtyp aufweist und zum anderen die Mutante Y352, welche ein kaum beeinträchtigtes Transaktivierungspotential im Vergleich zum Wildtyp besitzt. Im Einklang dazu steht, dass die Überexpression von HNF1 β Wildtyp ebenfalls zu einer Reduktion des Pronephros in den sich entwickelnden Larven führt (Wild et al., 2000). Überraschenderweise gehört zu den Mutanten der „Reduktionsgruppe“ auch die Mutante R137-K161, die kein Transaktivierungspotential aufweist (Lindner et al., 1999). Auch hier ist eine Interaktion der Mutante mit anderen Faktoren der Nierenentwicklung wahrscheinlich, so dass die Pronephrosentwicklung gestört wird.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Mutanten aus der „Vergrößerungsgruppe“ untereinander fällt die hohe Streuung der Werte auf (Abb.16) auf. Einige Mutanten scheinen die Pronephrosentwicklung stärker zu beeinflussen als andere. Die Streuung der Werte lässt sich durch die Technik der RNA Injektion erklären. Es ist äußerst schwierig, die Tropfengröße, die pro Ei injiziert wird, konstant zu halten, so dass die Menge an injizierter RNA pro Embryo variiert. Tiere mit einer höheren Konzentration an injizierter RNA zeigen einen stärkeren Effekt, als solche mit geringeren Mengen. Um solche Schwankungen ausgleichen zu können, ist es wichtig eine große Anzahl an Tieren zu untersuchen und eine statistisch relevante Analyse durchzuführen.

Die Einteilung der HNF1 β Mutanten in zwei Gruppen basierend auf dem hemmenden oder fördernden Einfluss auf die Pronephrosentwicklung im *Xenopus* korreliert mit der Einteilung, wie sie aufgrund der molekularen Daten vorgenommen wurde, mit Ausnahme der Mutante R137-K161. Sie gehört zur „Reduktionsgruppe“ im *Xenopus*, ist aber funktionell inaktiv, wie die Mutanten der „Vergrößerungsgruppe“ und auch im klinischen Phänotyp (Oligomeganephronie) unterscheidet sie sich von den anderen, so dass man sie einer dritten Gruppe zuordnen muss.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der molekularen und *Xenopus* Untersuchungen sowie der klinischen Phänotyp zusammengefasst. Die Unterteilung der Mutanten in drei Gruppen, basierend auf diesen Ergebnissen, ist farblich gekennzeichnet. Fasst man die Resultate zusammen so ergibt sich daraus, dass die HNF1 β Mutanten qualitativ nicht gleichwertig sind. Man kann drei Gruppen von Mutanten unterscheiden: Vergrößerung des Pronephros und funktionell inaktiv, oder Reduktion des Pronephros und funktionell aktiv, sowie die dritte Gruppe, die eine Reduktion des Pronephros verursacht, aber funktionell inaktiv ist.

Bei der Gruppierung der HNF1 β Mutanten zeigt sich keine Korrelation mit der Lokalisation des mutierten Proteins in der Zelle. In allen drei Gruppen sind Mutanten vorhanden, deren

Protein im Kern der Zellen lokalisiert wurde. Die Kernlokalisierung hängt vielmehr von dem Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals ab, das, wie oben diskutiert, am N-terminalen Bereich der Homeodomäne vermutet werden kann.

Mutant	Xenopus Phänotyp	Molekularer Phänotyp					Klinischer Phänotyp		
		Proteinstabilität	DNA-Bindung	Dimerisierung	Transaktivierung	Dominant negativ	Kernlokalisiert	Nierendefekt	Gemaldefekt
HNF1β	vergrößert	-	-	-	-	-/+	Zysten	+	-
S151P	vergrößert	-	-	-	-	-	hypoplastische GCKD	-	MODY
E101X	vergrößert	-	-	-	-	-	Nephropathie	-	MODY
R177X	vergrößert	-	-	-	-	-	hypoplastische GCKD	-	Typ II
P159delT	vergrößert	-	-	-	-	-	Zystische Nieren Dysplasie	+	-
Q243delC	vergrößert	-	-	-	-	+	Zysten	-	MODY
A263insGG	vergrößert	-	-	-	-	+	Zystische Nieren Dysplasie	-	MODY
P328L329del	reduziert	+	+	+	-	+	Zysten	-	MODY
Y352insA	reduziert	+	+	+	-	+	Oligomeganephronie	+	MODY
R137-K161del	reduziert	-	-	-	-	+	Oligomeganephronie	+	MODY

Tabelle 5: Zusammenfassung der Xenopus, molekularen und klinischen Phänotypen der HNF1β Mutanten

Die verschiedenen Domänen sind angegeben und die Nummern beziehen sich auf die Aminosäure Position. Der durch die Leserahmenverschiebung verursachte Aminosäure Austausch ist durch eine schwarze Box gekennzeichnet. Die Daten für die Mutante R137-K161 sind aus Lindner et al. (1999) und für P328L329 aus Wild et al. (2000) übernommen. (GCKD) glomerulocystic kidney disease, (MODY) maturity onset diabetes of the young.

3. Zusammenhang zwischen mutiertem HNF1 β und Erkrankungen des Menschen

Die durch Überexpression der HNF1 β Mutanten verursachten verschiedenen *Xenopus* Phänotypen, Reduktion oder Vergrößerung des Pronephros, zeigen, dass es sich dabei um qualitativ unterschiedliche Mutanten handelt. Eine direkte Übertragung auf den klinischen Phänotyp im Menschen ist jedoch schwierig, da der Pronephros im Vergleich zum Mesonephros des Menschen einfacher gebaut ist (siehe oben). Und auch ein direkter Vergleich der klinischen Phänotypen untereinander ist schwierig, denn dabei ergeben sich mehrere Probleme. Da bis jetzt nur etwa 30 Patienten untersucht wurden, stehen die klinischen Daten nur in limitierter Anzahl zur Verfügung. Vergleicht man dies mit den Untersuchungen am *Xenopus*, bei dem pro Mutante ca. 100 Tiere untersucht wurden, so wird der Vorteil des *Xenopus*systems deutlich. Man kann in kurzer Zeit eine statistisch aussagekräftige Anzahl von Tieren auf die gleiche Art und Weise analysieren. Die einheitliche Untersuchungsmethode der *Xenopus* Larven stellt einen weiteren Vorteil zu den humanen Daten dar, da die klinischen Daten auf unterschiedlichste Weise erhoben wurden. Dies liegt an der Tatsache, dass von den meisten Patienten nur radiologische Aufnahmen gemacht wurden und keine histologischen Ergebnisse der erkrankten Nieren zur Verfügung stehen. In den seltenen Fällen, in denen histologische Untersuchungen möglich waren, sind nur kleine Teile der Nieren untersucht worden und diese repräsentieren nicht die komplette Struktur des Organs. Darüber hinaus wurde fötales Gewebe mit Gewebeproben von Erwachsenen verglichen, ohne progressive Veränderungen, die während des Krankheitsverlaufes auftreten, zu berücksichtigen. Die Tatsache, dass die meisten Mutationen *de novo* Mutationen sind, also spontan auftreten und somit nur ein Familienstammbaum zur Verfügung steht, stellt ein weiteres Problem beim direkten Vergleich der Mutationen dar. Nur für die Mutation R177X konnten bis jetzt zwei unabhängigen Familien identifiziert werden (Montoli et al., 2002; Horikawa et al., 1997). Bei einer Mutation in einer Familie mit einem großen Stammbaum kann statistisch gut abgesichert werden, ob die Mutation mit dem Auftreten der Krankheit korreliert. Jedoch zeigen Mutationsträger innerhalb einer Familie ebenfalls erhebliche Variationen in den Nierenfunktionsstörungen. Ein gutes Beispiel für eine hohe Variabilität im klinischen Phänotyp sind die Familiendaten der Mutationsträger P328L329. In der beschriebenen Familie variiert der Schweregrad der Nierenerkrankung von nichtfunktionsfähigen zystischen Nieren in einem 17 Wochen alten Fötus, was zu dessen Tode führte, bis hin zum Auftreten einer kleinen Anzahl vom Zysten in den Nieren und

mäßiger Beeinträchtigung des Kreatinin-Clearence Wertes im Alter von 22 Jahren (Bingham et al., 2000). Daraus wird die hohe Variabilität der Patientendaten deutlich, und eine systematische Datenerfassung der verschiedenen Krankheiten hat nicht stattgefunden.

Zu Beginn dieses Projektes waren nur zwei HNF1 β Mutanten bekannt, die die hypoplastische Unterart der familiären glomerulocystic kidney disease (GCKD) verursachen. Dies sind die Mutanten E101X und P159delT (Bingham et al., 2001). Da es sich bei beiden um „loss of function“ Mutationen handelt, sahen die Autoren in dem Funktionsverlust eine Ursache der Erkrankung. Im vergangenen Jahr wurde jedoch eine weitere mit GCKD assoziierte HNF1 β Mutante identifiziert. Dabei handelt es sich um die frameshift Mutation P334insC (P334), die eine heterozygote C \rightarrow G Substitution im Codon 334 aufweist und somit einen großen Teil der Transaktivierungsdomäne verloren hat (Mache et al., 2002). Es entsteht ein verkürztes Protein, das dem der Mutanten Y352 und P328L329 sehr ähnlich ist und somit auch die gleichen Eigenschaften aufweisen dürfte. Bei den Mutanten Y352 und P328L329 handelt es sich jedoch um aktive Mutanten, d.h. sie können noch DNA-bindern und haben ein Transaktivierungspotential. Dies steht jedoch im Widerspruch zu der These, dass GCKD durch den Funktionsverlust der HNF1 β Mutanten verursacht wird. Erst eine genaue Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der Mutante P334 (DNA-Bindung, Transaktivierung) ließe eine Aussage über die Entstehung der GCKD zu. Sollte die Mutante P334 ebenfalls inaktiv sein, so wäre die Theorie, dass GCKD durch einen Funktionsverlust der HNF1 β Mutanten ausgelöst wird, bestätigt. Eine weitere Besonderheit der Mutante P334 ist die Tatsache, dass bei keinem der Mutationsträger Diabetes diagnostiziert wurde (Mache et al., 2002). Ein oraler Glucosetoleranztest (OGGT) zeigte aber eine verminderte Glucosetoleranz des 38 jährigen Vaters woraus sich in der Zukunft Diabetes entwickeln könnte.

Die HNF1 β Mutationen S151P, Q243 und R137-K161 verursachen im Menschen neben MODY und Nierendefekten auch genitale Fehlentwicklungen (Lindner et al., 1999; Bingham et al., 2002). Bei Frauen kann der Uterus nur rudimentär ausgebildet sein bis hin zur vaginalen Aplasie oder es kommt zu einer unvollständiger Verschmelzung des Müllerschen Ganges während der Embryonalentwicklung, was zu einem Uterus duplex oder Uterus bicornis führen kann. Für einen männlichen Patienten mit der Mutation S151P wurde Hypospadie beschrieben. Dies ist eine Fehlmündung der Harnröhre an der Unterseite des männlichen Gliedes. Bei der Hypospadie handelt es sich jedoch um eine sehr häufige Fehlbildung des männlichen Urogenitaltraktes mit einer Incidenz von etwa 1:300 bis 1:500 Geburten, so dass ein direkter Zusammenhang mit der Mutation noch geklärt werden muss.

Für die Untersuchung von genitalen Fehlentwicklungen eignet sich ebenfalls *Xenopus* als Modellorganismus. Die in dieser Arbeit durchgeführten Überexpressionsexperimente der verschiedenen HNF1 β Mutanten zeigten, dass der posteriore Abschnitt des Sammelrohrs, aus dem sich später der Genitalbereich entwickelt, stets normal entwickelt ist (Abb.15B). Es konnte kein Unterschied zwischen Mutanten aus der „Vergrößerungsgruppe“ und der „Reduktionsgruppe“ festgestellt werden. Dies könnte ein Argument gegen das *Xenopus*-Modell sein, jedoch wurden in unserem Versuchsansatz die humanen HNF1 β Mutanten nur transient in den *Xenopus* eingebracht und eine genauere Untersuchung des Genitalbereiches, zum Beispiel mit spezifischen Antikörpern, fand nicht statt. Ein Nachteil der transienten Manipulation ist dabei, dass die injizierte RNA nur eine begrenzte Zeit im sich entwickelnden Embryo stabil ist, so dass ein Einfluss in späteren Entwicklungsstadien nicht möglich ist. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, die HNF1 β Mutanten als Transgen in den *Xenopus* einzubringen. Damit wäre es möglich das morphogenetische Potential der Mutanten auf die Genitalentwicklung zu untersuchen. Mit Hilfe von Rekombinasen kann eine konditionelle Expression des Transgens im Embryo erreicht werden. Durch den Gebrauch von spezifischen Promotoren zusätzlich kann eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Aktivität des Transgens erreicht werden. Diese Methode könnte schon bald im *Xenopus* etabliert sein, da in letzter Zeit große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt wurden (Ryffel et al., 2003). Mit diesem Ansatz ist es möglich, den Einfluss der HNF1 β Mutanten auch auf die spätere Nierenform, den Mesonephros, zu untersuchen, was mit der transienten Methode nicht machbar ist. Es wäre interessant zu wissen, ob die Wirkung der HNF1 β Mutanten auf die Entwicklung des Mesonephros mit der auf den Pronephros vergleichbar ist.

4. Zusammenhang zwischen mutiertem HNF1 β und nonsense mediated mRNA decay (NMD)

Verkürzte oder nonsense Transkripte werden von einem spezifischen Signalweg der Zelle erkannt und degradiert. Man bezeichnet diesen Mechanismus als **nonsense mediated mRNA decay (NMD)**. Dieser Überwachungsmechanismus ist ubiquitär unter Eukaryonten vorhanden. NMD schützt die Zelle vor schädlichen dominant negativen oder „gain of function“ Effekten von verkürzten Proteinen, die durch stabile Transkripte entstehen würden.

Für die Säugetierentwicklung ist NMD essentiell. Mäuse Embryonen, denen beide Allele einer RNA Helikase, die für NMD notwendig ist, fehlen, sterben kurz nach der Implantation. Einen Grund dafür sehen die Autoren in der Produktion von schädlichen oder unvollständigen Proteinen und der ungenauen Expression von physiologischen mRNAs (Maquat, 2002).

Durch den Abbau des mutierten Transkriptes kommt es zu einer Halbierung der Gendosis (Haploinsuffizienz), wodurch auch nur etwa die Hälfte an Protein gebildet wird. Diese Haploinsuffizienz könnte als Ursache für die Erkrankungen durch mutiertes HNF1 β angesehen werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen zwei nonsense (E101X, R177X) und fünf frameshift (P159, Q243, A263, P328, Y352) Mutationen verursachen ein frühzeitiges Stopcodon, so dass ein verkürztes Transkript entsteht, was dem Mechanismus des NMD unterliegen müsste. Die missense Mutation S151P und die in frame Deletion R137-K161 hingegen führen zu keinem vorzeitigen Abbruch in der Aminosäurekette und ein volllängen Protein entsteht. Hier kann NMD nicht als Ursache der Erkrankungen angesehen werden. Bei Injektion der missense Mutante in *Xenopus* Embryonen zeigte sich, dass sie den gleichen Phänotyp verursacht, wie die nonsense und frameshift Mutanten E101X, R177X, P159, Q243 und A263. Alle verursachen eine Vergrößerung des Pronephros auf der injizierten Seite. Auch die Mutante R137-K161 zeigt bei Injektion im *Xenopus* den gleichen Phänotyp wie die frameshift Mutanten P328L329 und Y352. Sie führen alle zu einer Reduktion des Pronephros. Fasst man die *Xenopus* Daten zusammen, so lässt sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Mutationstypen (missense, nonsense oder frameshift) feststellen. Überträgt man dies auf den Menschen lässt sich spekulieren, dass sich die mutierten Transkripte dort ebenfalls identisch verhalten. Dies würde bedeuten, dass die nonsense und frameshift Mutationen nicht dem Mechanismus des NMD unterliegen würden. Zur Überprüfung dieser Theorie ist es jedoch nötig die Transkripte in vivo nachweisen zu können. Eine Möglichkeit stellt die Untersuchung von Lymphblasten der Patienten dar. Diese können in Kultur gehalten werden und repräsentieren die nativen Expressionsverhältnisse, wie sie im Gewebe vorherrschen. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Zugabe des Translationsinhibitors Cycloheximid ins Kulturmedium einer Degradierung der nonsense mRNA durch NMD verhindert werden kann (Carter et al., 1996; Carter et al., 1995). Cycloheximid blockiert reversibel die Proteinsynthese durch Hemmung der Translation in zytosolisch lokalisierten Ribosomen durch Blockierung der Peptidbindung nach Ankopplung einer neuen Aminosäure an der tRNA (Alberts et al., 1994, Kap 6, S 240). Die so stabilisierten Transkripte können durch Northern-Blotting nachgewiesen werden und eine Quantifizierung durch zum Beispiel einen Phosphor Imager

gibt Aufschluss über das Verhältnis zwischen Wildtyp und mutierter RNA. Sollte NMD vorliegen ist die Intensität des Wildtyp Signals etwa doppelt so stark wie das der Mutante. Der Nachteil der Lymphoblasten ist jedoch, dass es sich hierbei nicht um Zellen handelt, in denen HNF1 β besonders aktiv ist, wie dies zum Beispiel in Nierenzellen der Fall wäre. Um eine möglichst authentische Repräsentation der Gegebenheiten in Nierenzellen zu bekommen, ist es nötig diese Zellen zu analysieren. Da Nierenzellen mit dem Urin ausgeschieden werden, kann man diese aus dem Urin isolieren und die Transkripte ebenfalls wie oben beschrieben nachweisen und quantitativ vergleichen. Durch diese Methode lassen sich die natürlichen Verhältnisse widerspiegeln und eine genaue Aussage, ob die verschiedenen HNF1 β Mutanten dem Mechanismus des NMD unterliegen wäre möglich.

5. Mutationen im HNF1 β Gen haben keinen Einfluss auf die Expression anderer nierenspezifischer Gene

Durch in situ Hybridisierungen von *Xenopus* Embryonen ist bekannt, dass HNF1 β in der Pronephros Anlage noch vor der zellulären Differenzierung exprimiert wird (Demartis et al., 1994) und somit zusammen mit *lim1* und *Pax8* bei der Spezifikation oder Determinierung der Zellen eine Rolle spielt (Vize et al., 1995). Der genaue Mechanismus, mit dem die einzelnen Faktoren interagieren, ist dabei jedoch noch nicht bekannt. Die durch Injektion der verschiedenen HNF1 β Mutanten verursachten morphologischen Veränderungen der Pronephrosentwicklung sind erst in späten Entwicklungsstadien sichtbar, der auslösende Mechanismus liegt jedoch in den frühen Entwicklungsstadien.

Überexprimiert man *lim1* oder *Pax8* in *Xenopus* Embryonen, so führen beide dazu, dass mehr als drei Pronephroskanälchen gebildet werden (Carroll and Vize, 1999). Bei einer gleichzeitigen Überexpression von *lim1* und *Pax8* tritt ein synergistischer Effekt ein und es kommt zu einer ektopischen Pronephrosbildung. Dies deutet auf eine Kooperation beider Faktoren in der Nierenentwicklung hin. Da diese ektopische Expression sich auf die Somiten und das intermediäre Mesoderm beschränkt, müssen noch andere Faktoren bei der Determinierung der Pronephros Anlage eine Rolle spielen.

Um eine Aussage über das Zusammenspiel verschiedener Regulatoren machen zu können, wurde bereits von Wild et al. (2000) das Expressionsprofil von *lim1* in *Xenopus* Larven untersucht, die entweder mit HNF1 α oder HNF1 β injiziert worden waren. Überexpression

von HNF1 β bewirkt eine Reduktion des Pronephros, wohingegen die Überexpression von HNF1 α keinen Einfluss auf die Pronephrosentwicklung hat. Die Autoren konnten weder bei HNF1 β noch bei HNF1 α injizierten Larven eine Veränderung des Expressionsprofils von *lim1* feststellen und spekulieren, dass der Effekt von HNF1 β auf die Pronephrosentwicklung erst nach der Expression von *lim1* einsetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun ebenfalls mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung der Einfluss einer HNF1 β Mutante aus der „Vergrößerungsgruppe“ (A263) und einer aus der „Reduktionsgruppe“ (Y352) auf das Expressionsprofil anderer Regulatoren der Nephrogenese untersucht werden. Es ist bekannt, dass die Gene *WT1*, *Pax2* und *Pax8* eine entscheidende Rolle in der Nierenentwicklung im *Xenopus* spielen, dabei ist *WT1* in der Glomus Anlage und *Pax2* und *Pax8* in der Pronephros Anlage aktiv. Die Überexpression der HNF1 β Mutanten A263 oder Y352 im *Xenopus* Embryo, hat keinen Einfluss auf die Aktivität dieser drei Gene, da keine Veränderung des Expressionsprofils festgestellt werden konnte (Abb.17, 18, 19).

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Mutanten sich auf die Expression des endogenen HNF1 β auswirken und eine eventuelle Autoregulation beeinflussen. Die Überexpression der beiden HNF1 β Mutanten führte ebenfalls zu keiner Veränderung im Expressionsprofil des endogenen HNF1 β (Abb.21), so dass man einen autoregulatorischen Effekt ausschließen kann.

Da bei einigen menschlichen HNF1 β Mutationsträgern Fehlentwicklungen des Genitalbereiches festgestellt wurden, ist im Rahmen dieser Doktorarbeit der Einfluss der HNF1 β Mutanten A263 und Y353 auf die Expression von Genen, die in der Genitalregion der Larven aktiv sind, untersucht worden. Als Beispiel wurde der Transkriptionsfaktor *Sox9* ausgewählt. Er ist in vielen verschiedenen Geweben aktiv, unter anderem auch in der Genitalleiste der *Xenopus* Embryonen (Spokony et al., 2002). Bei den durchgeführten *in situ* Hybridisierungen konnte kein Einfluss der beiden Mutanten auf die Expression von *Sox9* gefunden werden (Abb.20). Dies ist einerseits zu erwarten, da bis jetzt noch für keinen Patienten mit einer dieser Mutationen eine Fehlentwicklung des Genitalbereichs veröffentlicht wurde. Andererseits sind, wie oben erwähnt, die Patienten Daten sehr limitiert, so dass die Wahrscheinlich hoch ist, dass auch für diese Mutationen Patienten mit Defekten im Genitalbereich existieren. Zukünftige Experimente mit den Mutanten S151 oder Q243, für die Fehlentwicklungen des Genitaltraktes beschrieben sind, sind sicherlich sinnvoll, so dass ein besserer Vergleich des *Xenopus* Phänotyps mit dem Menschlichen möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die HNF1 β Mutanten A263 und Y352 keinen Einfluss auf das Expressionsprofil der Gene WT1, Pax2, Pax8 und Sox9 haben. Unabhängig davon, ob die Mutante zur „Vergrößerungsgruppe“ (A263) oder zur „Reduktionsgruppe“ (Y352) gehört, verändern beide die Expression der untersuchten Gene nicht. Dadurch ist eine Aussage über mögliche regulatorische Zusammenhänge nur schwer möglich. Es hat jedoch den Anschein, dass sich der Einfluss der HNF1 β Mutanten auf die Pronephrosentwicklung erst nach der Expression der untersuchten frühen Regulatoren auswirkt.

Der nächste Schritt wäre die Untersuchung der Expression von späteren Markern. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper 3G8 und 4A6 sind gegen Gene gerichtet, die erst dann in der Pronephrosentwicklung aktiv sind, wenn die morphologischen Veränderungen durch mutiertes HNF1 β schon eingetreten sind. Sie sind in ihrem Expressionsprofil klar beeinflusst. Durch die Analyse verschiedener Marker, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiviert werden, lässt sich der Zeitpunkt feststellen, an dem die früheste Veränderung in der Pronephrosentwicklung auftritt.

Des Weiteren muß aufgrund der hohen Streuung des *Xenopus* Phänotyps (siehe oben) eine größere Anzahl von Tieren untersucht werden. Die in dieser Arbeit analysierten Larven (Tabelle 4) bieten einen ersten Hinweis auf die regulatorischen Mechanismen der Pronephrosentwicklung, jedoch sind die Ergebnisse keinesfalls statistisch signifikant. Ähnlich der RNA Injektion sollten ca. 100 Tiere pro Mutante und Sonde untersucht werden, was aus zeitlichen und technischen Gründen in dieser Arbeit jedoch leider nicht möglich war.

Ein weiterer Punkt, um eine Aussage über die Regulationsmechanismen von HNF1 β machen zu können, ist die Identifizierung von Zielgenen von HNF1 β . Zielgene von Transkriptionsfaktoren wie HNF1 α und β können entweder durch das Auffinden von spezifischen Bindesequenzen im Promotor oder Enhancer Bereich eines Gens oder durch die Analyse der Genexpression in HNF1 überexprimierenden oder HNF1 inaktiven speziellen Zelltypen identifiziert werden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente im Modellorganismus *Xenopus* bieten eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von HNF1 β . Man kann in kurzer Zeit eine große Anzahl von Tieren untersuchen. Der Nachteil ist jedoch, dass der Frosch dem Menschen verwandtschaftlich nicht so nah steht wie zum Beispiel die Maus. Die Untersuchung der homozygoten HNF1 β „Knock-out“ Maus ist jedoch aufgrund des frühen Todes des Embryos in der Entwicklung sehr schwierig, daher müssen alternative Ansätze zur Identifizierung von Zielgenen und zur Rolle von HNF1 β in der Embryonalentwicklung genutzt werden. Eine Methode ist die Herstellung von transgenen Mäusen, bei denen die Expression von mutiertem HNF1 β oder der „knock-out“ des Gens

konditionell durch die Verwendung von Rekombinasen gesteuert wird. Dabei kann durch spezielle Promotoren eine räumliche und zeitliche Kontrolle des Transgens erreicht werden. Die Herstellung von transgenen Mäusen ist jedoch ein sehr komplizierter Prozess und äußerst zeitintensiv. Eine alternative Möglichkeit bieten die sogenannten „embryoid bodies“ (EB), die sich aus zwei Zellschichten zusammensetzen: Einer äußeren endodermalen Zellschicht, ähnlich dem viszeralem Endoderm, die eine zweite innere ektodermale Zellschicht des Eizylinders umschließt. Diese multizelluläre Struktur kann geformt werden, wenn embryonale Stammzellen (ES) in Suspension kultiviert werden. Verwendet man ES mit einer homozygoten Inaktivierung des HNF1 β Gens, so ist die Formation der EB massiv gestört. Die EB bleiben klein ohne die Ausbildung der typischen Zysten, da keine externe viszerale-endodermale Zellschicht geformt wird. Vergleicht man die Expression von HNF1 α , HNF3 γ und der Splice-Variante HNF4 α 1 in diesen fehlerhaften EB mit denen von normal entwickelten, so ist ihre Aktivität stark reduziert, wohingegen die Aktivität der Transkriptionsfaktoren GATA4 und GATA6 induziert ist (Barbacci et al., 1999; Coffinier et al., 1999). Dies bedeutet, dass HNF1 β eine entscheidende Rolle in der Regulation der Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren im viszeralem Endoderm eines Embryos spielt. Es ist dabei noch nicht geklärt, ob es sich um direkte Zielgene von HNF1 β handelt.

Die neueste und sehr effektive Methode zur Identifizierung von Genen, die durch mutiertes HNF1 β in ihrer Expression beeinflusst werden, ist die Verwendung von Mikroarrays. Solche hochdurchsatz Expressionsanalysen erlauben z.B. Vergleiche der Expressionsmengen sehr vieler Gene gleichzeitig in gesundem und krankem Gewebe oder Vergleiche der Genexpression vor und nach Arzneimittelzugabe zur Risikoabschätzung (Pharma-/Toxikogenomik), sowie Abschätzung der Komplexität polygener Erkrankungen. Leider stehen zur Zeit noch keine Xenopus Chips zu Verfügung, jedoch ist in naher Zukunft sicher auch die Expressionsanalyse von Xenopus Genen möglich. Dann könnte man transgene Xenopus Larven, die eine HNF1 β Mutante exprimieren, mit normalen Larven vergleichen. Auf diese Weise identifiziert man Gene, die eine veränderte Expression zeigen und somit potentielle Zielgene von HNF1 β darstellen.

Ein alternativer Ansatz, um zum einen den Einfluss von HNF1 β auf die Pronephrosentwicklung und zum anderen um Aussagen über regulatorische Zusammenhänge der Pronephrosentwicklung machen zu können, ist für das Xenopus System die Verwendung von animalen Kappen. Entfernt man im Stadium der Blastula die animale Hemisphäre des Embryos (animale Kappe) und kultiviert diese weiter, so kann man durch Zugabe bestimmter

Faktoren die Entwicklung verschiedener Organe induzieren. Kultiviert man zum Beispiel die animalen Kappen in Aktivin A, einem Mitglied der TGF β Familie (transforming growth factor beta), und Retinolsäure, kommt es in vitro zur Differenzierung von Pronephros gewebe. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die HNF1 β Mutanten Y352 bei Injektion in *Xenopus* Embryonen zu einem kompletten Verlust des Pronephros auf der injizierten Larvenseite führt. Durch die Präparation von animalen Kappen aus Embryonen, die mit dieser Mutante injiziert wurden, ließe sich überprüfen, ob der Verlust des Pronephros bereits im Stadium der Blastula determiniert ist, so dass es durch Zugabe von Aktivin A und Retinolsäure nicht möglich ist, die Differenzierung von Pronephros gewebe zu induzieren.

Aktivin A wirkt über den TGF β -Signalweg, der eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Wachstum und Differenzierung spielt und scheinbar auch bei der Nierenentwicklung eine Funktion übernimmt. Somit könnte eine Interaktion von HNF1 β mit dem TGF β Signalweg für die Nierenfehlentwicklungen durch mutiertes HNF1 β verantwortlich sein. Würde sich dies bestätigen, wäre ein entscheidender Schritt zum Verständnis der Wirkungsweise von HNF1 β gemacht.

V Zusammenfassung

Hepatocyte nuclear factor 1 β (HNF1 β) ist ein gewebespezifischer Transkriptionsfaktor der Homeodomän-Familie. Er wird in verschiedenen Geweben exprimiert, besonders in Leber, Pankreas und Niere. Im Menschen führen heterozygote Mutationen zu einer Vielzahl von Erkrankungen. Mutationsträger zeigen unterschiedlichste Formen der Nierenfehlentwicklung, MODY (maturity onset diabetes of the young) und in seltenen Fällen auch Defekte in der Genitalentwicklung. Die häufigste Art der Nierendefekte besteht in der Ausbildung von Zysten und ist als renal cyst and diabetes (RCAD) Syndrom beschrieben worden.

In dieser Arbeit wurden neun verschiedene HNF1 β Mutationen miteinander verglichen und klassifiziert, die beim Menschen neben Zysten auch zu Nieren Dysplasie, glomerulocystic kidney disease (GCKD) und Oligomeganephronie führen.

Bei der *in vitro* Analyse dieser Mutanten zeigt sich, dass es Unterschiede in der Fähigkeit an DNA zu binden gibt. Einige Mutanten können genau wie der Wildtyp an DNA binden, andere hingegen haben diese Eigenschaft verloren. Bei der Untersuchung des Transaktivierungspotentials der Mutanten in transfizierten Zelllinien stellte sich heraus, dass eine strenge Korrelation zwischen DNA-Bindung und Transaktivierung besteht. Man kann basierend auf der Fähigkeit DNA zu binden eine Unterteilung in zwei Gruppen vornehmen.

Ein weitere Schritt zur Analyse der HNF1 β Mutanten war die Untersuchung ihres Verhaltens in einem vollständigen Organismus. Exprimiert man diese Mutanten in *Xenopus* Embryonen kommt es zu einer Störung der Pronephrosentwicklung, der ersten Nierenform der Amphibien. Es konnten zwei unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden. Sechs der untersuchten Mutanten führen zu einer Vergrößerung der Nierenkanälchen und des proximalen Bereichs des Sammelrohrs. Wohingegen drei Mutanten eine Reduktion dieser Strukturen verursachen. In einigen Fällen kam es sogar zum kompletten Verlust des Nierenkanälchen. Das unterschiedliche morphogenetische Potential der HNF1 β Mutanten in den sich entwickelnden Embryonen zeigt keine strikte Korrelation mit den funktionellen Eigenschaften der Mutanten. Die Einteilung der Mutanten basierend auf den molekularbiologischen Ergebnissen ist nicht auf den *Xenopus* Phänotyp übertragbar. Dies impliziert, dass durch die Injektionsexperimente der *Xenopus* Embryonen Fähigkeiten des HNF1 β Proteins definiert werden, die mit Zellkulturexperimenten nicht untersucht werden

können. Das Resultat dieser Arbeit, dass es sich bei den HNF1 β Mutanten um qualitativ unterschiedliche Mutanten handelt, bietet einen Anhaltspunkt bei der Klassifizierung der verschiedenen klinischen Phänotypen, wie sie bei Patienten mit einer HNF1 β Mutation beobachtet werden.

HNF1 β ist schon früh in der Embryonalentwicklung in der Pronephros Anlage aktiv, bevor die Differenzierung der Zellen beginnt. Um Aussagen über das Zusammenspiel verschiedener Gene, die eine essentielle Rolle bei der Differenzierung des Pronephros spielen, treffen zu können, wurde mit Hilfe von in situ Hybridisierungen überprüft, ob durch Überexpression einer HNF1 β Mutante das Expressionsprofil dieser Gene im Xenopus Embryo verändert wird. Dabei konnte weder für Mutanten die eine Vergrößerung noch für welche die eine Reduktion des Pronephros im Xenopus verursachenden ein Einfluss auf die Expression der frühen Gene WT1, Pax2, Pax8 und Sox9 festgestellt werden. Die durch mutierten HNF1 β verursachten morphologischen Veränderungen scheinen sich erst nach der Expression dieser Gene auszuwirken.

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Prof. Dr. G. U. Ryffel am Institut für Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. U. Ryffel für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit, sowie für seine hervorragende Betreuung, Diskussions- und Hilfsbereitschaft in vielen theoretischen und praktischen Fragen.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Frau Dr. Heike Thomas für die tolle Einarbeitung, ihre vielen guten Ratschläge, die mir über manche Tücke des Projektes hinweggeholfen haben und die kritische Korrektur dieser Arbeit.

Frau Gülüzar Turan danke ich für ihre Unterstützung bei den Transfektionen und für ihre ständige Hilfsbereitschaft auch außerhalb des Labors, besonders für die netten Tage am Baldeneysee und in Holland.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe III meinen Dank aussprechen, die mir mit Rat und Tat während dieser Dissertation geholfen haben und durch das gute Arbeitsklima vieles erleichtert haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Silke Erdmann für das kompetente Korrekturlesen, die lustigen DVD abende und vielen Aufheiterungen.

Daniela Plitzko und Kenneth Simon danke ich für die interessanten Tage auf den verschiedenen Xenopus Meetings.

Für die vielfältige Unterstützung außerhalb des Labors danke ich meinen Eltern, meinem Bruder sowie allen Freunden und Bekannten.

Lebenslauf

Name: Silvia Bohn

Geburtsdatum: 01.02.1974

Geburtsort: Eschwege

Schulausbildung: 1980-1993 Rhenanusschule Bad Sooden – Allendorf
Gymnasialer Zweig

1993 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1993-1996 Studium der Biologie an der
Georg-August Universität, Göttingen

1996-1997 Sciences et Techniques du Languedoc
Université Montpellier II, Frankreich

1997-1999 Georg-August Universität, Göttingen

1999 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel:
„ Ultrastrukturelle Untersuchung des
Protonephridialsystems bei *Retronectes spec*
(Retronectidae, Catenulida)“

1999 Abschluss des Studiums der Biologie mit dem Diplom

ab 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut
für Zellbiologie des Uniklinikums Essen in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G.U. Ryffel

Essen den 01.07.2003

Silvia Bohn

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung der molekularen und morphogenetischen Eigenschaften von Mutationen des humanen HNF1 β Gens“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Silvia Bohn befürworte.

Essen, den 01.07.2003

Prof. Dr. G. U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 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 01.07.2003

Silvia Bohn

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 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 01.07.2003

Silvia Bohn