

Die Tyrosinphosphatase Shp2 agiert unterhalb der Rezeptor-Tyrosinkinase Ret in der embryonalen Nierenentwicklung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Regina Willecke
aus Düsseldorf

2011

Die vorliegende Arbeit wurde vom Februar 2006 bis November 2010 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen
2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Birchmeier

Disputation am 10.3.2011

Zusammenfassung der Arbeit

Die Protein-Tyrosinphosphatase Shp2 ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches unterhalb einer Reihe von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Hormon- oder Zytokinrezeptoren als positiver Signalüberträger agiert. Eine konditionelle *Shp2*-Deletion wurde im Epithel des Wolff'schen Gangs und im Ureterepithel mit Hilfe der Kreuzung einer transgenen *HoxB7/Cre*-Mauslinie und einer *Shp2^{fl}*-Mauslinie erzielt. Die entsprechenden Nachkommen besitzen rudimentäre Nieren bei der Geburt und sterben kurz darauf. Die nähere Analyse der *Shp2*-defizienten Nieren zeigt einen starken Verzweigungsdefekt der Ureterknospe und eine verminderte Zellteilungsrate in den Ureterknospenspitzen. Ähnlich starke Phänotypen sind bisher nur bei Mutationen von Komponenten des GDNF/Ret-Signalwegs beobachtet worden. Es wurde deshalb vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen Shp2 und dem Ret-Signalweg in der Nierenentwicklung gibt. Die Expressionsanalyse der *Ret*-Zielgene *Etv4*, *Etv5* und *Wnt11* durch *In-situ*-Hybridisierung ergab, dass sie in der konditionellen *Shp2*-Mutante herunterreguliert sind. Eine Stimulation von *Shp2*-mutanten Nieren in Organkultur mit GDNF ergab, dass sie eine stark herabgesetzte Sensitivität für den Wachstumsfaktor haben. Des Weiteren wurde durch die Kreuzung der konditionellen *Shp2*-Mutante mit einer *Spry1*-Null-Mauslinie deutlich, dass das Auswachsen der vielfachen Ureterknospen und die exzessive Verzweigung der Ureterknospen in der *Spry1*-Mutante durch Verlust von *Shp2* behoben werden konnte. D.h. die Doppelmutanten waren phänotypisch gleich wie *Shp2*-Einfachmutanten. Somit konnte für beide Gene eine genetische Interaktion nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde demnach gefunden, dass die Tyrosinphosphatase Shp2 in der Nierenentwicklung in den GDNF/Ret-Signalweg einzuordnen ist, und dass *Shp2* epistatisch unterhalb von *Spry1* liegt.

Abstract (English)

The tyrosine phosphatase Shp2 is a cytoplasmic enzyme, which acts as a positive signal transducer downstream of receptor tyrosine kinases, hormone and cytokine receptors. Through conditional mutagenesis in mice using a *HoxB7/Cre* line, *Shp2* was deleted in the epithelium of the Wolffian duct and the ureteric bud. Mutant mice are born with rudimentary, dysplastic kidneys and die within one day. Analysis of the *Shp2*-deficient kidneys reveals branching defects of the ureteric bud and a low proliferation index in the ureteric bud tips. This phenotype resembles those of mutants for GDNF/Ret pathway components. The expression of the Ret target genes *Etv4*, *Etv5* and *Wnt11* is down-regulated in the conditional *Shp2* mutants, and the kidneys have a reduced sensitivity for the growth factor GDNF in organ culture. These findings confirm that Shp2 functions downstream of the receptor tyrosine kinase Ret.

Compound mutants of *Shp2* and *Spry1* were also examined. *Spry1* is a feedback inhibitor of receptor tyrosine kinase signaling in the kidney, and *Spry1*^{-/-} mutant mice show excessive kidney branching and multiplex kidneys. In contrast, compound *Shp2*; *Spry1* mutants exhibit strongly reduced branching of the ureteric bud, similar to *Shp2* single mutants. This suggests that *Shp2* and *Spry1* interact genetically in the epithelium of the Wolffian duct during ureter outgrowth and in branching, and that *Shp2* is epistatically located downstream of *Spry1*.

Zusammenfassung der Arbeit	2
Abstract (English).....	3
1. Einleitung	6
1.1. Die Entwicklung der Säugerniere - ein Überblick	6
1.2. Die Aktivierung von Ret durch Liganden	9
1.3. Mausmodelle mit genetischen Veränderungen von Ret	12
1.4. Signalweiterleitung unterhalb des Ret-Rezeptors in der Ureter-knospe	13
1.5. Die Bedeutung von FGF10 in der Nierenentwicklung.....	15
1.6. Die Bedeutung der Proteintyrosinkinase Shp2	17
1.7. Die Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren Spry1-4.....	21
1.8. Zielstellung der Arbeit	22
2. Ergebnisse	23
2.1. Die Deletion von <i>Shp2/PTPN11</i> im Wolff´schen Gang und in der Ureterknospe der Maus führt zu schweren Fehlbildungen der Nieren	23
2.2. Konditionelle <i>Shp2</i> -Mutanten zeigen eine verminderte Expression von bestimmten Ret-Zielgenen.....	28
2.3. <i>Shp2</i> defiziente Nieren zeigen Defekte im der Vorgang der Verzweigung der Ureterknospe	31
2.4. Deletion von <i>Shp2</i> in <i>Spry</i> -Mutanten ergibt einen Verlust des <i>Spry1</i> ^{-/-} - spezifischen Phänotyps	35
3. Diskussion	39
Die Funktion von Shp2 in der Niere des Menschen	44
4. Materialien und Methoden.....	45
4.1. Materialien	45
Verwendete Reagenzien und Chemikalien	45
Verwendete Geräte	45
Antikörper und Antisense-RNA-Transkripte	45
Zellkulturmedien und Wachstumsfaktor	46
Mausstämme.....	46

4.2. Methoden.....	47
Standardmethoden und Kits	47
Histologische Färbungen von Embryonschnitten	47
Immunfärbungen von Gewebeschnitten	48
Immunfärbungen von ganzen embryonalen Nieren	48
<i>In-situ</i> -Hybridisierung mit ganzen embryonalen Nieren.....	49
<i>In-situ</i> -Hybridisierung von Gewebeschnitten.....	50
Kultivierung von embryonalen Nieren	51
Abkürzungsverzeichnis.....	52
5. Literaturverzeichnis.....	53

1. Einleitung

1.1. Die Entwicklung der Säugerniere - ein Überblick

Die Nieren eines erwachsenen Säugetiers sind multifunktionale Organe, die das Blut filtern, den Wasserhaushalt regulieren, den Körper entgiften und endokrine Funktionen haben. Die Säugerniere (Metanephros) entsteht aus dem intermediären Mesoderm, welches in der Embryonalentwicklung zwischen den Somiten und dem lateralen Plattenmesoderm liegt. Bei Nabeltieren (Amnioten) gibt es zwei Vorstufen, die Vorniere (Pronephros) und die Urnieren (Mesonephros). Diese entwickeln sich von rostral nach kaudal und sind im Säugetier transiente Strukturen, die nur im Embryo vorhanden und teilweise nicht funktionell sind. Vorniere, Urnieren und Nachnieren enden im Wolff'schen Gang (Saxen und Sariola 1987).

Die Säugerniere entsteht zunächst aus zwei unterschiedlichen Gewebestrukturen, der Ureterknospe und einem Teil des intermediären Mesoderms, dem metanephrogenen Mesenchym. In der Maus beginnt die Nierenentwicklung etwa am embryonalen Tag 10,5 (E10,5) mit der Bildung der Ureterknospe am Wolff'schen Gang. Der Wolff'sche Gang schwillt caudal, in einer Region, die an das metanephrogenen Mesenchym angrenzt, durch starke Proliferation und Migration der Zellen an. Das kubische Epithel entwickelt sich an dieser Stelle zu pseudoprismatischem Epithel (Chi et al. 2009). Hieraus entstehen die Ureterknospen als paarige Strukturen, die in das jeweilige Mesenchym hinein wachsen (Abb.1). Die Ureterknospen induzieren die Kondensation des Mesenchyms und dessen Differenzierung in die Nephrone, die funktionellen Einheiten der Niere. Umgekehrt induziert das Mesenchym Wachstum und Verzweigung der Ureterknospen (Grobstein 1956). Sobald eine Ureterknospe das Mesenchym erreicht hat, bildet sie durch Anschwellen der Spitze eine Ampulla und leitet damit die erste Verzweigung ein. Die so entstandenen Röhren verzweigen sich, wachsen weiter in die Länge in Richtung Peripherie und verzweigen sich wieder. Diese Verzweigungen der Ureterknospe dauern während der gesamten Nierenentwicklung an, und schließlich bildet sich aus den Röhren das Sammelsystem der Niere (Abb. 1).

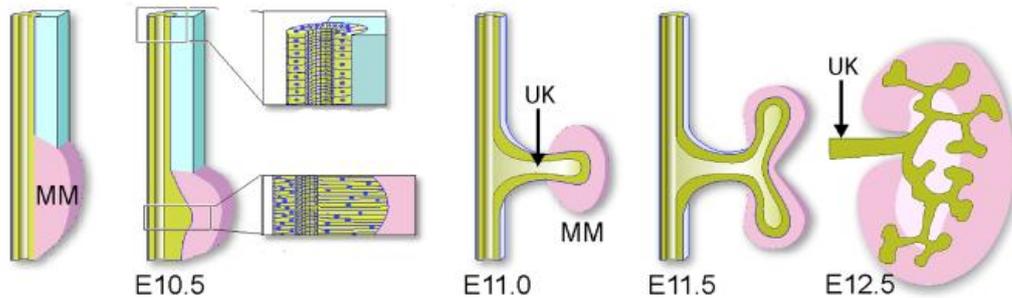


Abb. 1 Die Bildung der Ureterknospe und ihre Verzweigung wird induziert durch das metanephrogene Mesenchym E10.5: Das Epithel des Wolff'schen Gangs (grün) schwillt kaudal durch Induktion des metanephrogenen Mesenchyms (violett) an. E11,0- 11,5: Es bildet sich die Ureterknospe (UK), sie wächst in das Mesenchym ein und verzweigt sich. E12,5: Es folgen weitere Verzweigungen des Röhrensystems, hauptsächlich durch Teilung an den Spitzen. MM, metanephrogenes Mesenchym. Abbildung Modifiziert nach Costantini und Kopan (2010)

Die Ureterknospen wachsen durch Zellproliferation in den Spitzen und im Stamm. Verstärkte Zellproliferation in den Spitzen findet vor allem in den Phasen der starken Verzweigung statt. Zellproliferation im Stamm findet vorwiegend während der Phase der Verlängerung der Ureterknospe statt (Michael und Davies 2004; Karner et al. 2009). Die Zellproliferation in den Spitzen führt zur Vergrößerung der terminalen Ampulla, die sich umformt und zwei bis drei neue Äste bilden kann (Watanabe und Costantini 2004). Die Zellen der Spitzen unterscheiden sich von den Zellen des Stamms durch ihr Genexpressionsprofil. So exprimieren die Zellen der Spitzen zum Beispiel die Rezeptor-Tyrosinkinasen Ret, Ros und den Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor 2 (FGFR-2) (Tessarollo et al. 1992; Schuchardt et al. 1994; Meyer et al. 2004), den GDNF-Familienrezeptor alpha-1 (Gfra-1), den sezernierten Faktor Wnt11 (Pepicelli et al. 1997), die Transkriptionsfaktoren Etv4 und Etv5 (Lu et al. 2009), den Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor Sprouty1 (Spry1) (Zhang et al. 2001) und die Matrix-Metalloproteinasen MT1-MMP und MMP2 (Meyer et al. 2004; Lu et al. 2009).

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, und die Nephronvorläuferzellen entstehen aus dem metanephrogenen Mesenchym. Das Mesenchym wird durch induzierende Faktoren aus der Ureterknospe zunächst kondensiert und dann in Epithel umgewandelt, und durchläuft eine Mesenchymal-Epitheliale-Transition (MET) (Abb. 2). Epitheliale Zellen (im Gegensatz zu mesenchymalen Zellen) sind polarisiert, d. h. sie haben eine apikale Seite, die an

ein Lumen angrenzt, und eine basale Seite, die eine Basalmembran bildet. Aus dem kondensierten Mesenchym bildet sich zunächst ein Zellaggregat, das prätubuläre Aggregat. Dieses bildet einen Hohlraum aus und wird zu einem Nierenvesikel, welches aus Epithelzellen besteht. Die Bildung dieses Vesikels ist die „Geburt“ eines Nephrons, da alle späteren Bestandteile des Nephrons aus Zellen eines dieser Zellaggregate bestehen. Epitheliale Zwischenformen, der Comma-Shaped Body und der S-Shaped Body, bilden sich aus und vereinigen sich mit den Spitzen der Ureterknospe zu einer Röhre. Diese Struktur wird durch Proliferation zu einem langen Rohr und schließlich zum Nephron.

Ein Nephron in der adulten Niere besteht aus einem Glomerulus (Nierenkörperchen) und den Tubuli (Nierenkanälchen). Im Glomerulus wird das Blut gefiltert. Das Filtrat, der Primärharn, fließt durch die Tubuli, welche aus dem proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, dem distalen Tubulus und schließlich dem Verbindungstubulus, der Verbindung zum Sammelrohr, besteht (Abb. 2). Die Kanälchen vieler Nephrene vereinigen sich schließlich zu den Sammelrohren, die in das Nierenbecken münden.

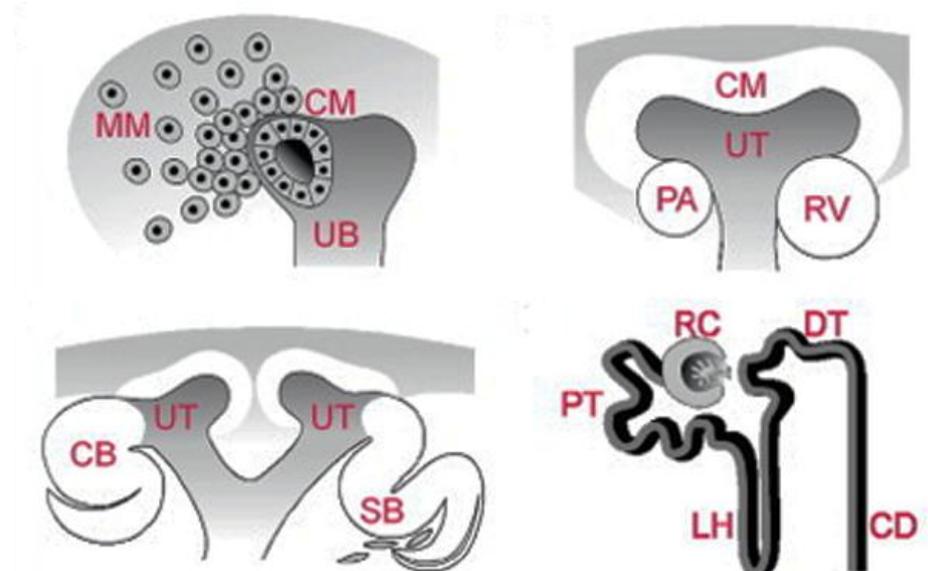


Abb.2 Entstehung eines Nephrons aus metanephrogenem Mesenchym Zellen des Ureterepithels (UB) induzieren eine Verdichtung des metanephrogenen Mesenchyms (MM) zum Kapfenmesenchym (CM). Angrenzend an die Ureterknospenspitzen (UT) entwickeln sich aus dem Mesenchym prätubuläre Aggregate (PA) und Nierenvesikel (RV), daraus entwickeln sich die epithelialen Strukturen Comma-shaped Body (CB) und S-shaped Body (SB). Das funktionelle Nephron besteht aus Nierenkörperchen (RC), Proximalem Tubulus (PT), Henle'scher Schleife (LH), Distalem Tubulus (DT) und dem Verbindungstubulus (CD). (Little et al. 2010)

1.2. Die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret

Ret ist ein Akronym für „rearranged during transfection“ und wurde als eine Genumordnung entdeckt, welches bei Transformation von NIH3T3-Fibroblasten durch humane Desoxyribonukleinsäure eine Rolle spielte (Takahashi et al. 1985). Onkogene Formen von Ret konnten aus Patienten mit Phäochromocytomen (PCC) und medullärem Schilddrüsenkarzinom (FMTC) isoliert werden (Santoro et al. 1990). Ret ist eine transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinase, deren Gen auf dem Chromosom 10q11.2 im Menschen lokalisiert wurde (Ishizaka et al. 1989). Das *Ret*-Gen besteht aus 20 Exons und kodiert für ein Proteinprodukt mit zwei Hauptisoformen, Ret9 und Ret51, die durch alternatives Splicing des 3´ Endes der mRNA entstehen. Der Carboxyterminus des reifen Proteins ist identisch bis zum Aminosäurerest 1063; bei Ret9 folgen hier 9 Aminosäurereste, die sich von den 51 folgenden in Ret51 unterscheiden (Carter et al. 2001) (Abb. 2).

Aktivierende Ret-Mutationen können zu Erbkrankheiten wie der Multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN2), dem medullärem Schilddrüsenkarzinom (FMTC) oder papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) führen (Mak und Ponder 1996). Aktivierende Mutationen in Ret sind auch häufig der Grund für spontan auftretende Schilddrüsenkarzinome. Neuere Forschungen konnten eine Interaktion des Ret- und des Östrogenrezeptor-Signalwegs bei der Entstehung von Brustkrebs belegen (Boulay et al. 2008).

1.2. Die Aktivierung von Ret durch Liganden

Die Liganden für Ret waren lange Zeit unbekannt, aber schließlich konnte GDNF (glia cell derived neurotrophic factor), der aufgrund seiner Molekülstruktur der TGF β -Familie angehört, dem Ret-Signalweg zugeordnet werden (Durbec et al. 1996). Weitere Liganden sind Artemin (ARTN), Neurturin (NTN) und Persephin (PSP), die mit GDNF zur Ligandenfamilie der GLFs (glia cell derived neurotrophic factor family) zusammengefasst werden. Die Liganden binden nicht direkt an Ret, sondern bilden zunächst ein Dimer, das mit hoher Affinität einen 2:2 Komplex mit einem Dimer aus zwei Korezeptoren, den „GDNF Familien Rezeptoren“ (GFR α), bildet. Im nächsten Schritt bindet der GLF-GFR α -Komplex die extrazelluläre Domäne von Ret. Während der Nierenentwicklung werden der Rezeptor Ret und

der Korezeptor $GFR\alpha$ -1 im Epithel der Ureterknospe exprimiert. Der Ligand GDNF wird im metanephrogenen Mesenchym exprimiert.

Die Interaktion des GLF- $GFR\alpha$ Komplexes führt zur Dimerisierung von Ret und zu dessen Autophosphorylierung an Tyrosinen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne (Arighi et al. 2005). Tyrosin 905 (Y905) ist notwendig für die Kinaseaktivität von Ret und steuert die Phosphorylierung der fünf wichtigsten Bindestellen für intrazelluläre Adaptormoleküle, die Tyrosine Y905, Y981, Y1015 und Y1062 und 1096. Die Aminosäure Y905 wurde als Bindestelle für die Src-Homologie2- (SH2-) Domänen der Adaptormoleküle Grb7 (Growth factor receptor-bound protein 7) und Grb10 identifiziert (Pandey et al. 1995; Pandey et al. 1996). Tyrosin Y981 bindet die Tyrosinkinase Src, Y1015 bindet die Phospholipase C- γ (PLC- γ) (Borrello et al. 1996) und Y1096 Grb2 (Lorenzo et al. 1997) (Abb. 2). Die Bindestelle Y1062 fungiert als Multiadaptor und bindet eine Reihe von Adaptormolekülen wie Shc (src homology 2 domain-containing transforming protein C), Frs2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2), Dok (docking protein) 1 bis 6 und Enigma (Durick et al. 1996; Grimm et al. 2001; Kurokawa et al. 2001; Crowder et al. 2004; Arighi et al. 2005). Die Phosphorylierung von Y1062 ermöglicht die Bindung von Shc an Adaptormoleküle wie Grb2-associated binder 1 (Gab1), was in der Aktivierung von PI3K/AKT (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) resultiert, oder die Bindung von Shc an Grb2/Sos (son of sevenless), was zu Aktivierung von Mitogen Activated (MAP)-Kinase-Kaskaden führt. Das Adaptorprotein Frs2 rekrutiert den Grb2/Sos-Komplex an die Plasmamembran und aktiviert die MAP-Kinase-Kaskade über Ras. Frs2 kann außerdem mit der Proteintyrosinphosphatase Shp2 interagieren (Kurokawa et al. 2001; Melillo et al. 2001) (Abb. 2).

Die Hauptsignalwege, die durch Ret aktiviert werden, sind der Ras-MAP-Kinase, der PLC γ - und der PI3K-Signalweg. Diese regulieren zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration, und Regeneration in gewebespezifischen Stammzellen bzw. Vorläuferzellen, wie in Spermatozyten, Neuralleistenzellen, Neuronen des Zentral- und des peripheren Nervensystems und in den epithelialen Zellen in der Ureterknospe (Sariola und Saarma 2003).

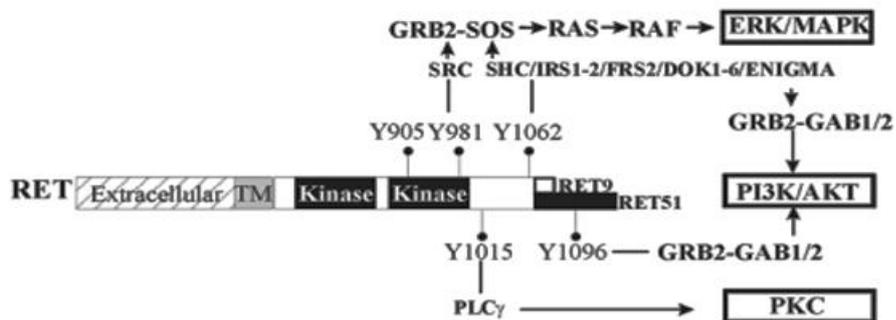


Abb.2 Bindestellen für intrazelluläre Adaptormoleküle in Ret Markiert sind die extrazelluläre Domäne (schraffiert), die transmembrane Domäne (grau) die Kinasedomänen (schwarz) und die alternativen Carboxytermini des Ret9 und des Ret51 Moleküls. Die Tyrosin-Bindestellen und die jeweiligen Adaptorproteine sind angegeben. Desweiteren sind die Signalketten aufgelistet, die unterhalb der Adaptorproteine angegliedert sind. (Jain et al. 2009)

1.3. Mausmodelle mit genetischen Veränderungen von Ret

Ret, GFR α -1 und GDNF zeigen ein interessantes Expressionsprofil in der Nierenentwicklung von Mäusen: Die Rezeptor-Tyrosinkinase Ret und der Korezeptor GFR α -1 sind im Wolffschen Gang ab dem Stadium E8,5 exprimiert. Vor der Knospung der Ureterknospe bei E10,5 ist ein Anstieg der Ret-Expression im distalen Wolffschen Gang, am Ort der Knospung, zu bemerken (Schuchardt et al. 1994; Schuchardt et al. 1996; Golden et al. 1999). Das metanephrogene Mesenchym, ein kaudaler Teil des intermädären Mesoderms, exprimiert zu diesem Zeitpunkt den Liganden GDNF, welcher den Rezeptorkomplex der Epithelzellen aktiviert. So fördert das metanephrogene Mesenchym den Auswuchs und die Verzweigung der Ureterknospe (Sainio et al. 1997). In den Anfangsstadien der Entwicklung der Säugerniere sind Ret und GFR α 1 im Stamm und in den Spitzen der Ureterknospe exprimiert. Während der Verzweigung der Ureterknospe verschwindet die Expression im Stamm und bleibt nur noch in den Spitzen erhalten. In späteren Stadien der Nierenentwicklung findet man Ret-Expression nur noch in der Peripherie (Sainio et al. 1997; Yu et al. 1998).

Im Einklang mit diesen Expressionsmustern von Ret, GFR α 1 und GDNF zeigen Gen-Knockout-Studien in der Maus, daß der Ret-Signalweg essentiell für die frühe Nierenentwicklung ist. Null-Mutationen von Ret, GFR α -1, und GDNF resultieren in der Agenesie der Nieren oder in rudimentären Nieren und einer perinatalen Lethalität am Tag der Geburt (P0) (Schuchardt et al. 1994; Sanchez et al. 1996; Cacalano et al. 1998). Diese Phänotypen beweisen, dass der Ret-Signalweg eine wichtige Rolle beim Knospen des Ureters vom Wolff'schen Gang spielt.

Schließlich hat man zusätzlich Mutanten mit stark eingeschränkter Ret-Signalübermittlung charakterisiert, Man konnte auf diese Weise belegen, dass der Ret-Signalweg weitere Funktionen in der Nierenentwicklung steuert. Eine dieser Mausmutanten exprimiert ein hypomorphes Allel von *Ret*. Die homozygoten Tiere haben kleine, zystische Nieren (de Graaff et al. 2001). Ein weiteres Beispiel sind Mausmutanten, die dominant-negative Allele tragen, welche die Signalübermittlung durch Y1062 von Ret maßgeblich beeinträchtigen (Jain et al. 2004; Jijiwa et al. 2004). Daraus resultieren Nieren-

entwicklungsstörungen von großer Bandbreite; die entsprechenden Phänotypen reichen von einseitiger Agenesie der Nieren über beidseitige hypoplastische Nieren bis hin zu normalgroßen, aber zystischen Nieren.

Um die Rolle der verschiedenen Ret-Phosphotyrosin-Bindestellen für Adaptormoleküle in der Nierenentwicklung zu ermitteln, und so auf die nachgeordneten Signalwege schließen zu können, wurden Mausmutanten generiert, die Punktmutationen in den kritischen Tyrosinen Y981, Y1015, Y1062 und Y1096 trugen. Diese Mutationen wurden in die humane Ret9 oder Ret51 cDNA eingefügt, so daß die resultierenden Mutanten nur eine Isoform exprimierten. Im Kontext der Ret51-Isoform resultiert nur die Mutation des Tyrosins Y1015 zu Phenylalanin in starken Nierenmissbildungen wie multizystischen Nieren und Hydroureter, die aus überzähligen Ureterknospen entstehen. Ähnliche Phänotypen ergaben sich bei einer Mutation von Y1015 zu Phenylalanin auf dem Ret9-Hintergrund. Eine weitere interessante Mutation ist die von Y1062 auf dem Ret9-Hintergrund. Sie führt zu mangelhafter AKT/MAP-Kinase-Aktivierung und somit zu Agenesie der Nieren oder stark rudimentären Nieren. Die Mutation von Y1062 auf dem Ret51-Hintergrund hat dagegen keine offensichtlichen Folgen hat (Jain et al. 2006) .

Um herauszufinden, wie die GDNF/Ret-Signale das Zellverhalten steuern, wurden Maus-Chimären generiert, die aus *Ret*^{-/-}- und Wildtyp-Zellen bestehen. Die Analyse des Zellverhaltens im Wolffschen Gang und in der Ureterknospe zum Zeitpunkt der Knospung zeigt, daß Wildtyp-Zellen die führende Position einnehmen und in der ausgewachsenen Ureterknospe ausschließlich zur Population der Ampullazellen beitragen (Chi et al. 2009).

1.4. Signalweiterleitung unterhalb des Ret-Rezeptors in der Ureter-knospe

Ret und andere Rezeptor-Tyrosinkinase können das Auswachsen der Ureterknospe und ihre Verzweigung steuern. Ret aktiviert den Ras/MAP-Kinase wie auch den PLC γ - und den PI3K-Signalweg (Takahashi 2001). Sie alle sind für die normale Nierenentwicklung wichtig (Fisher et al. 2001; Wong et al. 2005; Jain et al. 2006). Das führt zu Veränderungen in der Genexpression, wodurch die

Morphogenese der sich verzweigenden Ureterknospe maßgeblich gesteuert wird. Zum Beispiel reguliert Ret seine eigene Expression und die von *Wnt11* in zwei „feed-forward“-Schleifen hoch. *Wnt11* wirkt parakrin auf die Mesenchymzellen, diese regulieren daraufhin GDNF hoch. *Wnt11*-Knockout-Mäuse haben kleinere Nieren als Wildtyp-Mäuse, was im Zusammenhang mit reduzierter GDNF/Ret-Signalübermittlung steht (Majumdar et al. 2003). Weitere Gene, die durch GDNF/Ret-Signale hochreguliert werden, sind das des Rezeptors Chemokine receptor 4 (*Cxcr4*) und des Cytokine receptor-like factor 1 (*Crlf1*), der Signalinhibitoren Dual specificity phosphatase 6 (*Dusp6*) und *Spred2* (Sprouty-related, EVH1 domain containing 2) und der Transkriptionsfaktoren Myb (Myeloblastosis viral oncogene homolog), *Etv4* (Ets variant gene 4) und *Etv5* (Ets variant gene 4) (Lu et al. 2009).

Etv4 und *Etv5* spielen eine bedeutsame Rolle unterhalb von Ret und anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen. In der Niere werden *Etv4* und *Etv5* zunächst im Wolff'schen Gang und später in den Spitzen der Ureterknospe koexprimiert, wo sie durch GDNF/Ret hochreguliert werden. Einzelne Knock-outs der zwei Gene führen zu eher unauffälligen Entwicklungsstörungen der Niere. Doch Doppelmutanten zeigen eine Agenesie der Nieren (Lu et al. 2009). In einem chimären Mausmodell verhalten sich *Etv4*^{-/-}; *Etv5*^{-/-}-Zellen ähnlich wie *Ret*^{-/-}-Zellen, denn sie tragen nur wenig zur Bildung des Wolffschen Gangs bei und werden nicht in der Ureterknospe gefunden (Kuure et al. 2010). Allerdings agieren Ret und *Etv4*/*Etv5* nicht in einem linearen Signalweg, sondern sind in ein komplexes Netzwerk eingebunden. Mehrere Gene, die durch Ret hochreguliert werden, werden beispielsweise in *Etv4*/*Etv5*-Doppelmutanten normal exprimiert (Lu et al. 2009). Desweiteren agieren *Etv4* und *Etv5* unterhalb anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie den FGF-Rezeptoren (Firnberg und Neubuser 2002; Liu et al. 2003; Brent und Tabin 2004), die ebenfalls wichtig sind für die Verzweigung der Ureterknospe (Ohuchi et al. 2000; Zhao et al. 2004; Michos et al. 2010). Also können die Effekte, die in *Etv4*/*Etv5*-Doppelmutanten beobachtet werden, nicht vollständig der Blockierung des Ret-Signalwegs zugeschrieben werden (Kuure et al. 2010).

1.5. Die Bedeutung von FGF10 in der Nierenentwicklung

Die Familie der FGF-Wachstumsfaktoren und ihre zugehörigen Rezeptoren (FGF-R) spielen wichtige Rollen in Zellwachstums und – differenzierungsvorgängen in der Embryogenese, der Neuritogenese, Angiogenese und in der Wundheilung (Kanai et al. 1997). Bislang sind 24 FGF-Liganden bekannt, welche an vier Klassen von FGF-Rezeptoren binden und deren Dimerisierung induzieren. Letztere führt zur Autophosphorylierung des Rezeptordimers und zur Rekrutierung von intrazellulären Adaptormolekülen und Signalenzymen (Mason 1994). Verschiedene Adaptormoleküle, die SH2-Domänen besitzen, können an spezifische Phosphotyrosine in der intrazellulären Domäne des FGF Rezeptors binden. FGFRs rekrutieren z.B nach Stimulierung durch ihren Liganden den Grb2/Sos-Komplex durch das Adaptormolekül Frs2. Dieses bindet den Rezeptor phosphorylierungs-unabhängig durch eine Phosphotyrosinbindungs (PTB)-Domäne. Die Bildung des Grb2/Frs2-Komplexes ist der wichtigste Weg zur Aktivierung von MAP-Kinasen unterhalb der FGFRs (Ong et al. 2000). Grb2 kann auch Gab1 binden, was zur Aktivierung des PI3K-Signalwegs führt. Andere untergeordnete Signalwege von FGFRs sind der PLC γ -Signalweg und die Rekrutierung von Shc und Crk (Dailey et al. 2005; Eswarakumar et al. 2005).

Transgene Mäuse, die ein dominant-negatives FGFR-Fragment exprimieren, besitzen keine oder nur sehr kleine Nieren. Dardurch wurde erkannt, wie wichtig FGF-Signale in der Nierenentwicklung sind (Celli et al. 1998). FGF10 wurde als wichtigster Ligand des FGFR2b identifiziert. Knockout-Mäuse des *FGFR2b* sowie der *FGF10*- und *FGF7*-Gene haben kleinere Nieren als Wildtyp-Mäuse, was durch fehlerhafte Verzweigung der Ureterknospe verursacht wird (Qiao et al. 1999; Ohuchi et al. 2000; Zhao et al. 2004). Zwei weitere Rezeptor-Tyrosinkinasen, die in der Verzweigung der Ureterknospe eine Rolle spielen, sind der EGF-Rezeptor und Met. Met-Knockout im Ureterepithel führt zu einer gering reduzierten Anzahl von Nephronen, was auf leichte Ureterknospenverzweigungsdefizite hinweist und eine erhöhte Expression des

EGFR. Ein Doppel-Knockout von Met und dem EGFR im Ureterepithel führt zu kleineren Nieren und zu einer Reduktion der Verzweigung der Ureterknospe (Ishibe et al. 2009). Die Phänotypen der erwähnten Mauslinien und der im weiteren Verlauf der Arbeit besprochenen Mausmutanten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle1: Phänotypen der Mauslinien mit Defekten von Genen, welche in der Ureterknospe exprimiert werden.

Genotyp	Phänotyp
<i>Ret</i>	Agenesie (Schuchardt et al. 1994)
<i>GDNF</i>	Agenesie (Cacalano et al. 1998)
<i>Gfra-1</i>	Agenesie (Sanchez et al. 1996)
<i>Etv4/Etv5</i>	Agenesie (Lu et al. 2009)
<i>Wnt11</i>	Weniger Verzweigungen der Ureterknospe (Majumdar et al. 2003).
<i>Spry1</i>	Vermehrte Ureterzahl, Multiplex Nieren, verstärkte Verzweigung der Ureterknospe (Basson et al. 2005)
<i>Ret/Spry1</i>	Leichte Defizite in der Verzweigung der Ureterknospe (Michos et al. 2010)
<i>GDNF/Spry1</i>	Leichte Defizite in der Verzweigung der Ureterknospe (Michos et al. 2010)
<i>FGFR1b</i>	Weniger Verzweigungen der Ureterknospe (Zhao et al. 2004)
<i>FGF10</i>	Weniger Verzweigungen der Ureterknospe (Ohuchi et al. 2000)
<i>FGF7</i>	Weniger Verzweigungen der Ureterknospe (Qiao et al. 1999)
<i>Frs2</i>	Weniger Verzweigungen der Ureterknospe (Sims-Lucas et al. 2009)
<i>GDNF/Spry1/FGF10</i>	Agenesie (Michos et al. 2010)
<i>Etv4/Etv5/Spry1</i>	Agenesie (Michos et al. 2010)
<i>EGFR/Met</i>	Weniger Verzweigungen der Ureterknospe (Ishibe et al. 2009)

1.6. Die Bedeutung der Proteintyrosinkinase Shp2

Shp2 gehört zur Gruppe der Nicht-Rezeptor Protein-Tyrosinphosphatasen und ist im Menschen im *PTPN11* Gen auf Chromosom 12q24 im Menschen kodiert. Shp2 spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Signalwegen und ist unter anderem an der Regulation unterschiedlicher zellulärer Vorgänge, wie Zellproliferation, -adhäsion, -migration und -überleben beteiligt. Shp2 ist ein positiver Signalüberträger und wurde bisher als wichtiger Faktor in Signalwegen unterhalb von fast allen Rezeptor-Tyrosinkinasen, aber auch im Integrin-Signalweg, im Januskinase/Stat (Signal-transducer and activator of transcription) Signalweg, im JNK (c-Jun NH2-terminal kinase), im NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) und NFκB (Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells) Signalwegen identifiziert (Grossmann et al. 2010).

Die Bedeutung von Shp2 wird anhand genetischer Erkrankungen wie dem Noonan-Syndrom oder dem Leopard-Syndrom deutlich. Bei beiden Erbkrankheiten handelt es sich um Keimbahnmutationen im *PTPN11*-Gen welches für Shp2 kodiert. Anhand von *In-vitro* und *In-vivo*-Analysen wurde in den letzten Jahren die Wichtigkeit von Shp2 für den Organismus deutlich. Der Phosphatase konnten viele wichtige regulatorische Funktionen in unterschiedlichen biologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, dem Immunsystem oder der Entstehung von Tumoren zugeordnet werden. Leopard- und Noonan-Syndrom werden aufgrund der vielen ähnlichen Symptome häufig als überlappende Syndrome beschrieben, doch die krankheitsverursachenden biochemischen Veränderungen von Shp2 sind bei den beiden Krankheiten verschieden. Die Patienten mit Noonan-Syndrom haben eine Kombination aus Herzdefekten, einen kleinen Körperbau, Gesichtsfehlbildungen (z.B. Hypertelorismus), Genitalfehlbildungen und Hörstörungen. Des Weiteren sind somatische Mutationen in *PTPN11* in den häufigsten Fällen der Grund für hematologische Tumore, treten aber auch vereinzelt in festen Tumoren auf (Mohi und Neel 2007). Mutationen, die das Noonan-Syndrom oder Tumore verursachen, sind aktivierende Mutationen. Sie betreffen die N-SH2- und die PTP-Domäne, was *in vitro* zu einer Verstärkung der katalytischen Aktivität führt (Fragale et al. 2004; Keilhack et al. 2005; Niihori et al. 2005; Tartaglia et al. 2006). Im Gegensatz dazu zeichnet sich das Leopard-Syndrom durch

inaktivierende Mutationen im *PTPN11*-Gen aus (Hanna et al. 2006; Kontaridis et al. 2006; Tartaglia et al. 2006).

Analysen am Mausmodell konnten die Bedeutung und Funktion von Shp2 im Säugetier näher definieren. Mausembryos, die homozygot für eine hypomorphe Mutation im *PTPN1*- Gen sind, haben Gastrulationsdefekte. Zellen aus diesen Embryos zeigen bei verschiedenen Stimuli Fehler in der der Ras/Erk (Extracellular regulated MAP kinase)-Aktivierung (Saxton et al. 1997; Shi et al. 2000; Zhang et al. 2004). Eine Nullmutation von *PTPN11* in Mäusen führt dagegen zu Implantationsdefekten und Letalität im Blastozystenstadium (Yang et al. 2006).

Tiermodelle, Zellkulturstudien und strukturelle Analysen haben bereits gute Einsichten in die Funktionsweise von Shp2 geschaffen. Die Phosphatase besteht aus zwei N-terminalen SH2-Domänen, einer katalytischen Phosphotyrosin-Phosphatase-Domäne (PTP Domäne), einem Carboxyl-Ende mit Tyrosin-Phosphorylierungsstellen und einer prolinreichen Sequenz. Die Tyrosylreste am Carboxyl-Ende werden bei Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert, darauf hin binden die SH2-Domänen an Phosphotyrosyl-Reste von Adaptormolekülen oder an Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die PTP-Domäne bindet das Substrat und katalysiert dessen Dephosphorylierung (Abb.3). Strukturanalysen und funktionelle Studien haben eine Autoregulation von Shp2 identifiziert. Die Shp2-Aktivität wird durch einen „molekularen Schalter“ reguliert, der die Bindung an Substrate mit der Phosphataseaktivität koppelt (Barford und Neel 1998; Hof et al. 1998). Die Molekülstruktur im basalen Zustand ist eine „geschlossene“ Konformation. Die N-terminale SH2-Domäne bindet das katalytische Zentrum der PTP-Domäne und verhindert somit die Substratbindung. Die Bindung der SH2-Domänen an das Phosphotyrosin resultiert in einer „offenen“ Konfiguration und einer Freilegung des katalytischen Zentrums (Abb.3).

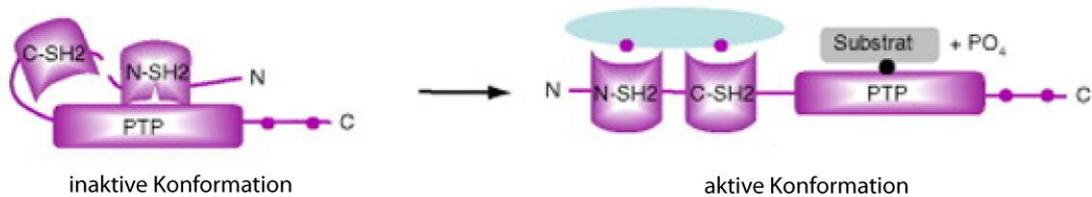


Abb.3 Die inaktive und aktive Konformation von Shp2 In der inaktiven Konformation (geschlossen) bindet die N-SH2-Domäne an das katalytische Zentrum. In der aktiven (offenen) Konformation binden die SH2-Domänen an den Rezeptorkomplex und das katalytische Zentrum kann ein Substrat binden und dephosphorylieren. N, Aminogruppe; C, Carboxylgruppe; N-SH2, N-terminale SH2 Domäne; C-SH2, C-terminale SH2 Domäne; PO₄, Phosphat. Abbildung modifiziert nach Grossmann et al. (2010)

Es sind die Interaktionspartner, die die Aktivität von Shp2 und auch die entsprechende Signalkettenintegration von Shp2 im zellulären Kontext bestimmen. Shp2 ist in Signaltransduktionsketten unterhalb von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Zytokin-Rezeptoren, dem T-Zellrezeptor sowie Integrinen regulatorisch involviert. Dabei kann Shp2 direkt an den entsprechenden Rezeptor (wie es für den PDGF-Rezeptor, den EGF-Rezeptor und Ret gezeigt wurde) oder an Adaptermoleküle binden (Neel et al. 2003).

Ein gängiges Modell erklärt die Funktion von Shp2 als Aktivator von Ras unterhalb von Rezeptor-Tyrosinkinasen, indem es die Tyrosinbindestellen von RasGAP am Rezeptor dephosphoryliert. So wird die negative Regulation von Ras durch RasGAP verhindert. Dieser Mechanismus konnte bis dato für die Rezeptor-Tyrosinkinase Torso in *Drosophila* (Cleghon et al. 1998), den PDGF-Rezeptor (Klinghoffer und Kazlauskas 1995), und den EG- Rezeptor (Agazie und Hayman 2003) nachgewiesen werden. Desweiteren sind die Adaptermoleküle Gab1 (GRB2-associated binding protein 1) und Dos (Daughter of sevenless), das homologe Protein in *Drosophila*, gut untersuchte Zielmoleküle von Shp2. Die Phosphatase kann RasGAP-Bindestellen an Gab1 oder Dos dephosphorylieren und nach dem oben beschriebenen Mechanismus den Ras Inhibitor aus dem Signalkomplex fernhalten. Weitere Zielmoleküle von Shp2 sind Paxillin und PAG1 (Phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1). Beide Moleküle sind in der Nähe bzw. in der Plasmamembran lokalisiert, werden

Tyrosin-phosphoryliert und binden dann die SH2 Domäne der C-terminalen Src Kinase (Csk), die wiederum Kinasen der Src Familie mit einem inhibitorischen Phosphotyrosin versieht. Shp2 kann Paxillin und PAG1 dephosphorylieren, was dazu führt, dass das inhibitorische Protein Csk nicht zur Plasmamembran rekrutiert wird. Ein weiteres molekulares Zielmolekül von Shp2 ist der Zytokinrezeptor Janus-Kinase2, welcher sich nach Bindung des Liganden selbst phosphoryliert. Shp2 dephosphoryliert die Tyrosin-Bindestelle für Socs1, verhindert somit die Ubiquitinierung und Degradierung des Rezeptors und sorgt für eine Aufrechterhaltung des Signals (Ali et al. 2003).

Im Kontext vieler Rezeptor-Tyrosinkinase Signalwege wurde gezeigt, dass Shp2 an den Rezeptor oder Adaptormoleküle bindet und den Ras/MAPKinase Signalweg reguliert. In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass katalytisch inaktive Shp2-Mutanten dominant-negative Effekte auf Signalwege unterhalb verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen haben. Sie hemmen die Ras/Erk-Aktivierung, Zellproliferation, Turnover der Fokalkontakte und Zellmigration (Neel et al. 2009). In den meisten Modellen konnte in Abwesenheit von Shp2 eine initiale Erk-Aktivierung nachgewiesen werden, doch die Aufrechterhaltung des Signals war gestört. Auch *in vivo* werden zum Beispiel durch Mutationen im *Drosophila*-Homologen von Shp2, Corkscrew, Rezeptor-Tyrosinkinase-Signale verhindert. Die Defekte können durch „Gain-of-Function“-Mutationen von Ras/Erk-Signalwegskomponenten wieder blockiert werden (Allard et al. 1996; Pepicelli et al. 1997). Shp2 reguliert ebenfalls den PI3K-Signalweg, den Focal adhesion kinase (Fak), den Stat Signalweg und weitere Signaltransduktionsketten (Grossmann et al. 2010). Doch im Rahmen dieser Arbeit soll der Ras/MAP Kinase Signalweg unterhalb von Shp2 und besonders die Interaktion von Shp2 mit bestimmten MAP Kinase Inhibitoren, den Sprouty Proteinen betont werden.

1.7. Die Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren Spry1-4

Das *Sprouty* (*Spry*)-Gen wurde in *Drosophila melanogaster* in genetischen Screens zur Identifizierung von Genen gefunden, die in der Tracheen- und Augenentwicklung wichtig sind (Hacohen et al. 1998; Casci et al. 1999). Diese Arbeiten zeigen, dass *Drosophila* Spry ein wichtiger genereller Inhibitor des Ras-Signalwegs unterhalb von Rezeptotyrosin-Kinasen ist. Das führte zur Suche nach den Säugerhomologen und deren funktioneller Analyse. Im Säuger gibt es vier Sprouty-Proteine (de Maximy et al. 1999). *Spry1*, *2* und *4* werden in der Mausentwicklung in verschiedensten Organen exprimiert. *Spry1* und *Spry2* werden in Epithelzellen und *Spry4* wird in mesenchymalen und in neuralen Gewebe exprimiert (Zhang et al. 2001). Spry-Proteine sind wie Shp2 wichtig in Signalwegen unterhalb von Rezeptor-Tyrosinkinasen, sie inhibieren spezifisch den Ras-Erk-MAPK-Signalweg (Gross et al. 2001; Yusoff et al. 2002). Die bekannten Daten weisen darauf hin, dass es verschiedene Mechanismen der Signalhemmung durch Spry-Moleküle gibt, die je nach Zelltyp und nach der Art des Rezeptors differieren.

Spry2 wurde als wichtiger Inhibitor unterhalb der FGFRs in der Linsenentwicklung, der Entwicklung der Tränendrüse und der Lunge identifiziert. In der Linsenentwicklung wurde gezeigt, dass Shp2 ein negativer Regulator von *Spry2* unterhalb von FGF10 ist. (Pan et al. 2010). In RNAi-Studien mit embryonalen Lungenexplantaten wurde *Spry2* ebenfalls als negativer Regulator des FGF10-Signalwegs identifiziert (Tefft et al. 2002). Neben weiteren Funktionen von der Spry-Moleküle in verschiedenen Organen zeigen genetische Studien, dass *Spry1* als Antagonist des GDNF/Ret-Signalwegs in der Nierenentwicklung agiert. *Spry1*-Null-Mäuse und solche, die eine konditionelle *Spry1*-Mutation im Epithel der Ureterknospe tragen, haben überzählige Ureterknospen im Stadium E10,5, woraus eine vermehrte Anzahl an Uretern und Multiplex-Nieren entstehen. Diese Defekte entstehen durch eine erhöhte Sensitivität des Wolffschen Gangs gegenüber GDNF (Basson et al. 2005).

In Abwesenheit von GDNF oder Ret und *Spry1* werden in der Maus fast normale Nieren, mit ausreichender Verzweigung der Ureterknospe und vielen Glomeruli gebildet. Daher lag die Vermutung nahe, daß ein anderer Wachstumsfaktor die

Funktion von GDNF übernehmen kann. Durch eine genetische Kreuzung konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um FGF10 handelt (Basson et al. 2005; Michos et al. 2010). Die Expression von *Spry1* im Ureterepithel unterliegt verschiedenen Kontrollmechanismen. *Spry1* wird durch GDNF/Ret-Signale heraufreguliert (Basson et al. 2005). Es wird aber auch durch Angiotensin2, das Verzweigung der Ureterknospe induziert, herunterreguliert (Yosypiv et al. 2008).

1.8. Zielstellung der Arbeit

Die Funktion von Shp2 wurde bereits in verschiedensten Organen der Maus untersucht (Tefft et al. 2002; Ke et al. 2006; Pan et al. 2010). Viele dieser Organe, wie Lunge und Brustdrüse haben gemeinsam, dass es sich bei ihnen um sich verzweigende Epithelien handelt. Die Entwicklung der Niere ist morphologisch sehr ähnlich zu der Entwicklung dieser Organe, das Knospen und die Verzweigung der Ureterknospe wird hauptsächlich durch GDNF/Ret gesteuert, doch auch andere Wachstumsfaktoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen sind an der Entwicklung der Niere durch Verzweigung und Wachstum der Ureterknospe beteiligt. In dieser Arbeit wird durch eine Deletion des *PTPN11* (*Shp2*)-Gens im Wolff'schen Gang und im Epithel der Ureterknospe zum ersten Mal deutlich, welche wichtigen Funktionen Shp2 in der Nierenentwicklung hat.

Ziel der Arbeit war es, Shp2 durch genaue Analyse des Phänotyps und Expressionsanalysen in den Ret-Signalweg oder alternative Signalwege einzuordnen. Durch genetische Kreuzungen sollten molekulare Zielmoleküle von Shp2 bestimmt werden. Die Rolle von *Spry1* als intrazellulärer Inhibitor des Ret-Signalwegs und molekularer Interaktionspartner von Shp2 sollte in der Nierenentwicklung genauer definiert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Die Deletion von *Shp2/PTPN11* im Wolff'schen Gang und in der Ureterknospe der Maus führt zu schweren Fehlbildungen der Nieren

Mäuse, die einen konventionellen *Shp2*-Knockout tragen, zeigen embryonale Lethalität. Die Embryonen sterben aufgrund von Apoptose der inneren Zellmasse der Blastozyste und einem Defekt in der Bildung einer Trophoblasten-Stammzelllinie (Yang et al. 2006). Um die Funktion von *Shp2* in der Säugerniere zu ermitteln, habe ich mich der Technik des konditionellen Knock-outs bedient. Dazu wurde ein Mausstamm verwendet, den Katja Grossmann in unserem Labor hergestellt hatte (Grossmann et al. 2009). Exon 3 und 4 des *Shp2* - Gens waren hier von *loxP*- (locus of cross-over (x) des Bakteriophagen P1) Erkennungssequenzen flankiert, der Stamm wurde *Shp2^{fl}* benannt (Abb. 5 A). Den *Shp2^{fl}*-Mausstamm habe ich mit der *HoxB7/Cre*-Mauslinie gekreuzt, die ein Transgen exprimiert, das aus dem Nierenepithel-spezifischen *HoxB7*-Promoter, der DNA-Rekombinase Cre (causes recombination), einer internen ribosomalen Eintrittsstelle und dem darauf folgenden *EGFP*-Reporter gen besteht (Zhao et al. 2004). Der *HoxB7*- Promotor wird im Wolff'schen Gang der Maus ab dem Tag E9,5 aktiviert (Kress et al. 1990). In Embryonen, die aus dieser Kreuzung stammen, werden Exon 3 und 4 in *Shp2* durch die Cre-Rekombinase spezifisch im Epithel des Wolff'schen Gangs und den daraus entstehenden Geweben wie der Ureterknospe deletiert. Eine Leserasterverschiebung führt zu einem vorgezogenen Stopcodon in Exon 5 von *Shp2* und resultiert somit in einer nierenspezifischen Nullmutation, *Shp2^{del}*.

Abb.5 A zeigt die Positionen der Sonden, die für die Southern-Hybridisierung zur Genotypisierung benutzt wurden. Abb. 5 B zeigt die Genotypisierung mittels Southern-Hybridisierung und Abb. 5 C die routinemäßige Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Die erfolgreiche Rekombination des *Shp2^{fl}*-Allels durch HoxB7-Cre in der Niere ist in Abb. 5 D gezeigt. Eine PCR, welche das *Shp2^{del}* Allel detektiert, zeigt ein positives Resultat, eine Bande aus DNA-Fragmenten mit 380bp in Nieren aus *HoxB7/Cre;Shp2^{+/fl}*-Mäusen, und ein negatives Ergebnis (keine Bande) in Nieren aus *Shp2^{+/+}*-Mäusen.

Bei der Kreuzung des transgenen *HoxB7/Cre*-Mausstamms mit dem *Shp2^{fl}*-Mausstamm erwartet man gemäß den Mendelschen Regeln bei 25% der Nachkommen eine Deletion des *Shp2* Gens im Epithel des Wolff'schen Gangs und der daraus entstehenden Gewebe, wie dem Sammelsystem der Niere und den männlichen Gonaden. Die Anzahl der *HoxB7/Shp2^{fl/fl}*-Mäuse (konditionelle *Shp2*-Mutanten) entsprach dieser Erwartung. Sie starben innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt. Die Analyse des Urogenitaltrakts der *Shp2*-defizienten Mäuse zeigte, dass sie kleine, rudimentäre, Zystennieren haben (Abb. 6, A und B). Die männlichen Gonaden, die ebenfalls aus dem Wolff'schen Gang entstehen, waren phänotypisch nicht verändert. Die Niere einer Wildtyp-Maus besteht bei der Geburt aus drei verschiedenen funktionellen Zonen, der Medulla (Mark), dem Cortex (Rinde) und der nephrogenen Zone. Die histologische Analyse zeigte, dass die Nieren der konditionellen Mutanten aus unorganisierten Tubuli und Zysten mit wenigen Glomeruli bestanden. Die drei verschiedenen funktionellen Zonen waren in der *Shp2*-mutanten Niere nicht zu erkennen (Abb. 6, C, D und E). Einige Mutanten hatten bei der Geburt vergrößerte Hydroureter. Die Analyse der Mutanten im Embryonalstadium E16,5 zeigte, daß die *Shp2*-defizienten Nieren weniger Tubuli, weniger Glomeruli und eine verringerte Größe haben (Abb. 6, F, G) Dieser Phänotyp der Nieren wurde bei allen homozygoten Mutanten beobachtet.

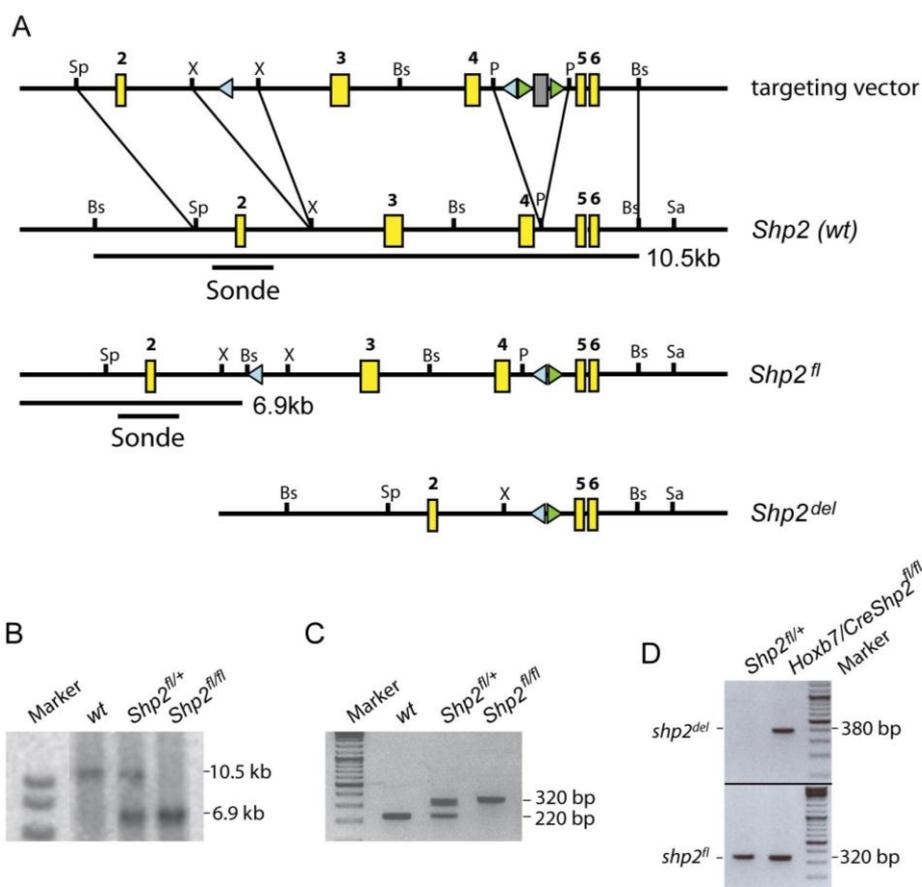


Abb. 5 Generierung eines konditionellen *Shp2/PTPN11*-Allels durch Gen-Targeting. A) Schematische Darstellung des Rekombinationsvektors (targeting vector) mit den Exonen 2-6 (gelbe Rechtecke), die Restriktionsschnittstellen der Enzyme, die zum Klonieren benutzt wurden, sind markiert. LoxP Sequenzen (blaue Dreiecke) flankieren Exon 3 und Exon 4. Flippase-Erkennungssequenzen (grüne Dreiecke) flankieren ein Neomycin-Resistenz-Gen (graues Rechteck). Darstellung der genomischen Sequenz im *Shp2*-Wildtyp (*wt*) mit Exon 2-6. Die Länge (10,5 kb) und Position des Fragments, welches in der Southern-Hybridisierung detektiert wird, sind angegeben. Darstellung des durch homologe Rekombination entstandenen Allels (*Shp2^{fl}*) und der Länge (6,9 kb) und Position des Fragments, welches in der Southern-Hybridisierung detektiert wird. B) Southern-Hybridisierung zur Detektion des *wt* (10,5) und des *Shp2^{fl}* (6,9) Allels. C) PCR zur Detektion des *wt* (220 bp) und *Shp2^{fl}* Allels (320bp). D) PCR zur Detektion des *Shp2^{del}* Allels (380bp) in der Niere einer *HoxB7Cre/Shp2^{fl/+}* Maus. Abbildung 5A modifiziert nach Grossmann et al. (2009).

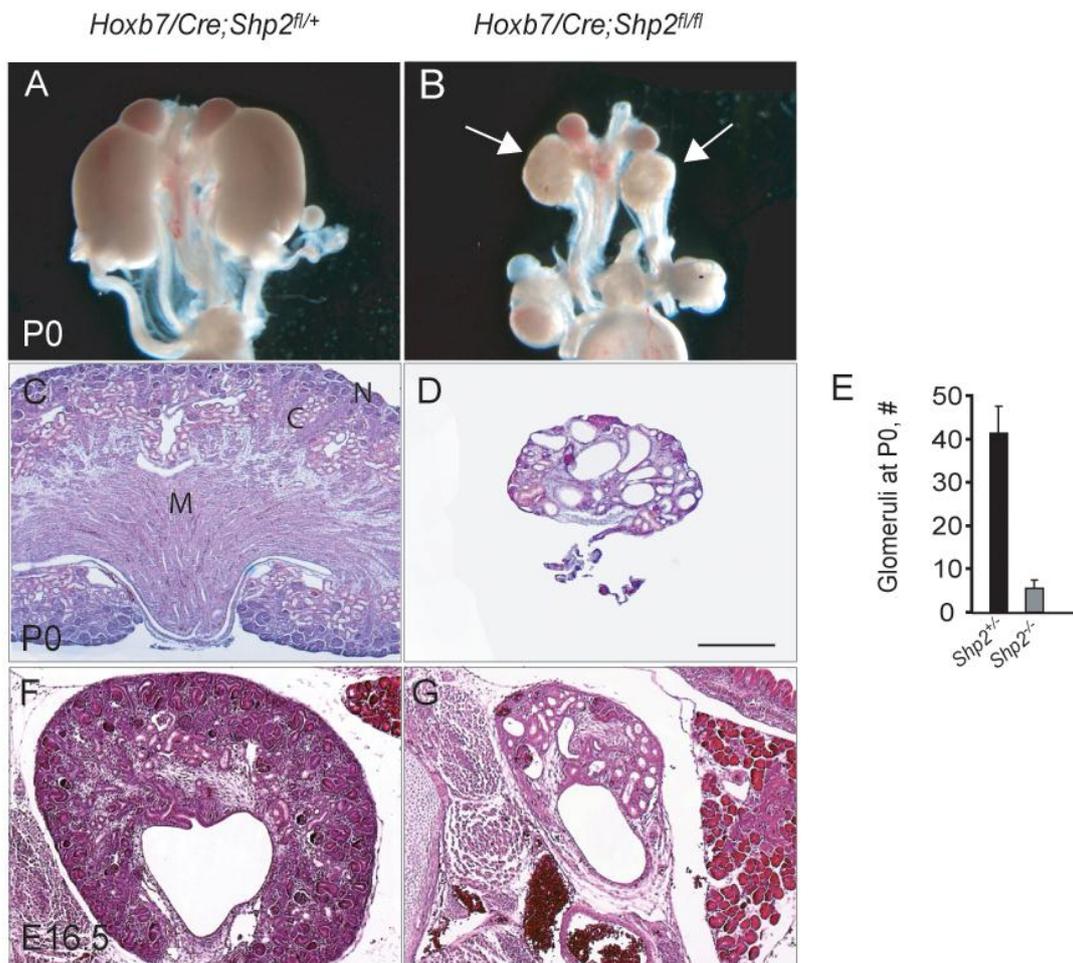


Abb. 6 Deletion von *Shp2* unter Kontrolle des *HoxB7* Promoters resultiert in rudimentären Nieren und neonataler Lethalität. A, B) Urogenitaltrakt einer weiblichen Kontrollmaus (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/+}*) und einer männlichen *Shp2*-Mutante (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/fl}*) am Tag ihrer Geburt (P0). Pfeile markieren die rudimentären Nieren der Mutante. C,D) Hämatoxylin-EosinFärbung von histologischen Gewebeschnitten einer Kontrollmaus und einer Mutante an P0. E) Anzahl der Glomeruli auf einem Schnitt auf der Höhe des Nierenbeckens an P0; Anzahl Schnitte ≥ 6 . F,G) HE-Färbungen von histologischen Gewebeschnitten am Tag E16,5. M, Medulla; C, Cortex; N, Nephrogene Zone

Die histologische Analyse der *Shp2*-mutanten Nieren an P0 zeigt eine stark reduzierte Anzahl an Glomeruli (Abb. 6 E). Eine Reduktion der Glomeruli ist üblicherweise ein Hinweis auf reduzierte Verzweigung der Ureterknospe. Um die Verzweigung der Ureterknospe und die Anzahl der Spitzen in der konditionellen *Shp2*-Mutante zu untersuchen, wurden ganze embryonale Nieren einer Immunfärbung unterzogen. E-Cadherin wird in der embryonalen Niere in Epithelien der Ureterknospe sowie auch in den Epithelien mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Die Detektion von E-Cadherin im Wildtyp an E15,5 zeigt eine regelmäßige Anordnung von sich verzweigenden Spitzen der Ureterknospe

in der Peripherie der Niere. Die Färbung der konditionellen *Shp2*-Mutante zeigt wenige Ureterknospenspitzen an E15,5, stattdessen sind die Tubuli des Nephrons sichtbar (Abb. 7, H, I). Die Immunfärbung an Tag E13,5 mit einem gegen Zytokeratin gerichteten Antikörper, welcher nur das Epithel der Ureterknospe markiert, zeigt eine regelmäßige Verzweigung der Ureterknospe in der Wildtyp-Niere. Die Färbung in der konditionellen Mutante ergibt im Gegensatz dazu eine stark reduzierte Anzahl der Ureterknospenspitzen (Abbildung 7, C-E).

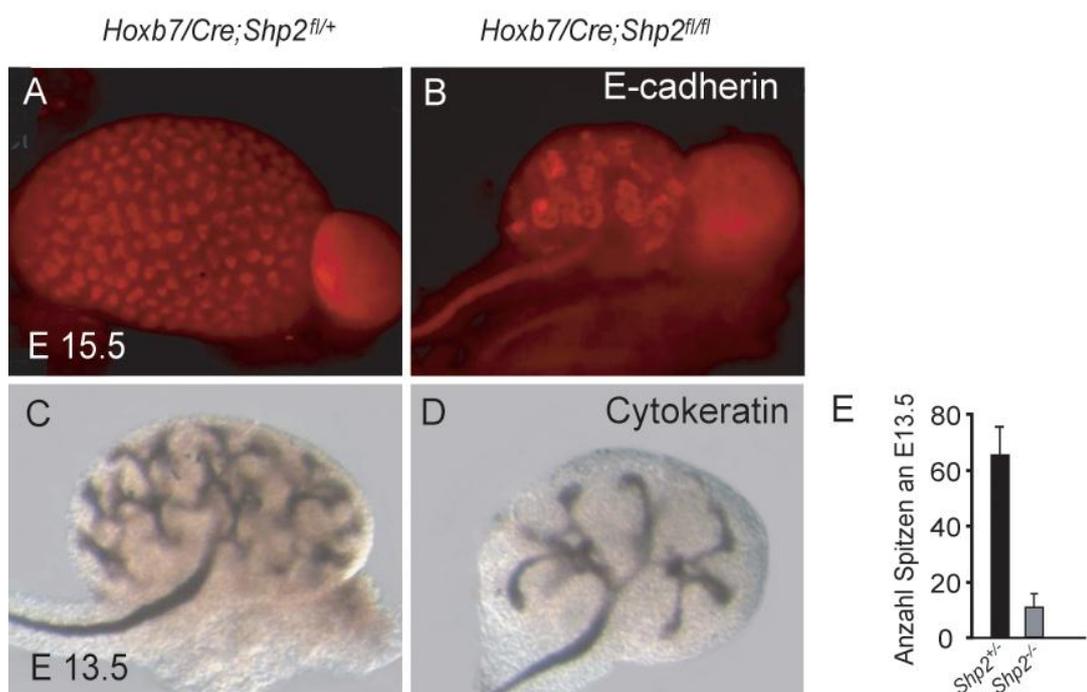


Abb. 7 *Shp2* defiziente embryonale Nieren zeigen eine gestörte Verzweigung der Ureterknospe. A), B) Embryonale Nieren einer konditionellen *Shp2* Mutante (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/fl}*) und einer Kontrollmaus (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/+}*) im Stadium E15,5. Die Epithelien sind in der Immunfärbungsguoreszenz mit einem E-Cadherin-Antikörper markiert. C), D) Nieren einer konditionellen *Shp2*-Mutante und einer Kontrollmaus im Stadium E13,5. Das Epithel der sich verzweigenden Ureterknospe ist mit einem Cytokeratin-Antikörper markiert. E) Anzahl der Ureterknospenspitzen in *Shp2* defizienten E13,5 und Kontrollnieren (Anzahl Nieren = 3)

2.2. Konditionelle *Shp2*-Mutanten zeigen eine verminderte Expression von bestimmten Ret-Zielgenen

Embryonale Nieren, die eine Mutation des *Shp2*-Gens in den Zellen des Wolff'schen Gangs tragen, zeigen eine geringere Verzweigung der Ureterknospe im Stadium E12,5 als Wildtyp-Nieren. Vergleichbare Verzweigungsdefizite sind in diesem Stadium nur in Mäusen zu finden, die Mutationen von Ret-Signalwegskomponenten tragen, zu finden. Daher lag die Vermutung nahe, daß *Shp2* in den Ret-Signalweg eingebunden ist. Die Expression von Ret-Zielgenen in *Shp2*-defizienten Nieren wurde mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung untersucht. *Ret* ist ein Zielgen des eigenen Signalwegs (Lu et al. 2009). Es wird in der Niere der konditionellen *Shp2*-Mutante an E12,5 ebenso stark exprimiert wie in der Kontrollniere (Abb. 8 A, B). Im Gegensatz dazu sind die Ret-Zielgene *Etv4* und *Etv5* (Lu et al. 2009) an E12,5 im Epithel der Ureterknospe der *Shp2*-defizienten Niere herunter reguliert. (Abb. 8 C-F). Ein weiteres gut untersuchtes Zielgen des GDNF/Ret-Signalwegs, *Wnt11* (Majumdar et al. 2003), ist in den *Shp2*-defizienten Nieren an E12,5 herunterreguliert (Abb. 8 G, H). Im Stadium E13,5 ist hingegen keine *Wnt11*-Expression mehr zu detektieren (Abb. 9). Weitere Analysen zeigten, dass die Ret-Zielgene *Crlf* und *Cxcr4* in den Spitzen der Ureterknospen der Mutante nicht herunter reguliert sind, da an Tag 14,5 eine Expression zu detektieren ist (Abb. 9).

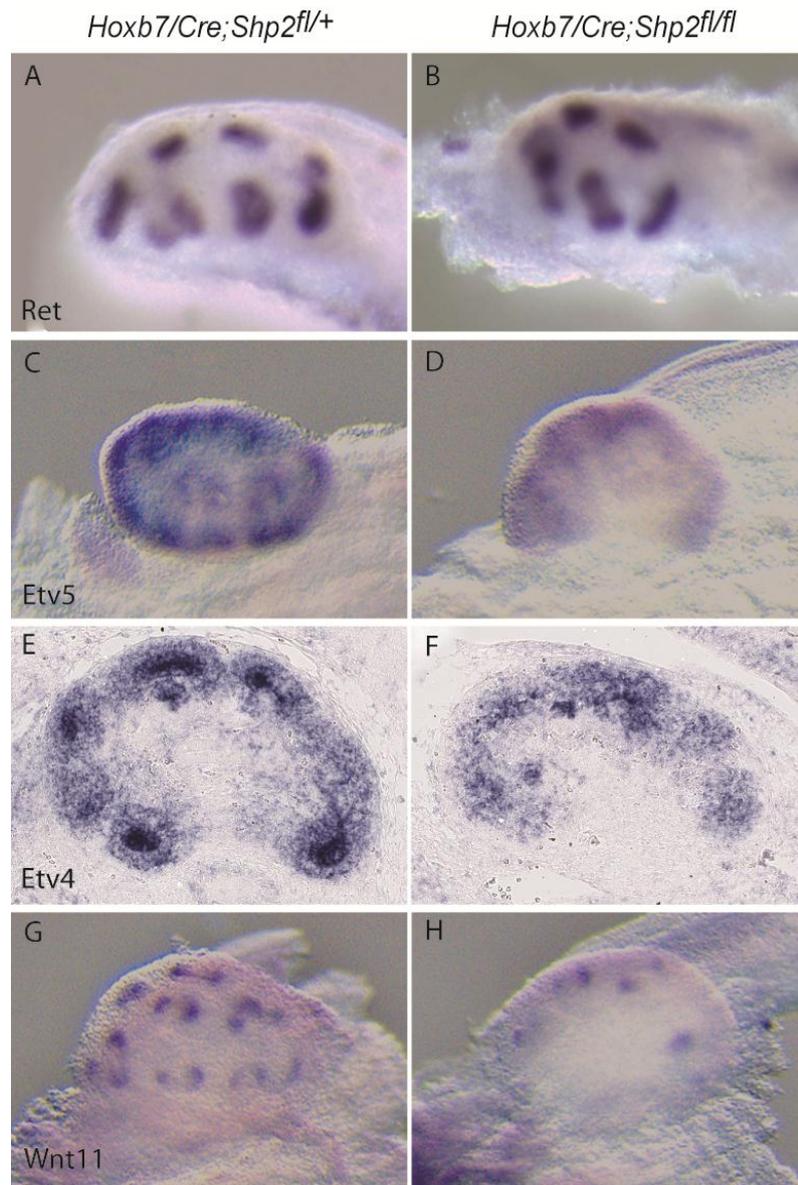


Abb. 8 Bestimmte Zielgene des GDNF/Ret-Signalwegs sind in der konditionellen *Shp2* Mutante herunterreguliert. A,B,C,D) Expression von *Ret* und *Etv5* in den Spitzen der Ureterknospe einer konditionellen *Shp2*-Mutante (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/fl}*) und einer Kontrollmaus (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/+}*) an E12,5. E,F) Expression von *Etv4* auf histologischen Schnitten einer konditionellen *Shp2*-Mutante und einer Kontrolle im Stadium E12,5. G,H) Expression von *Wnt11* in den Ureterknospenspitzen im Stadium E12,5.

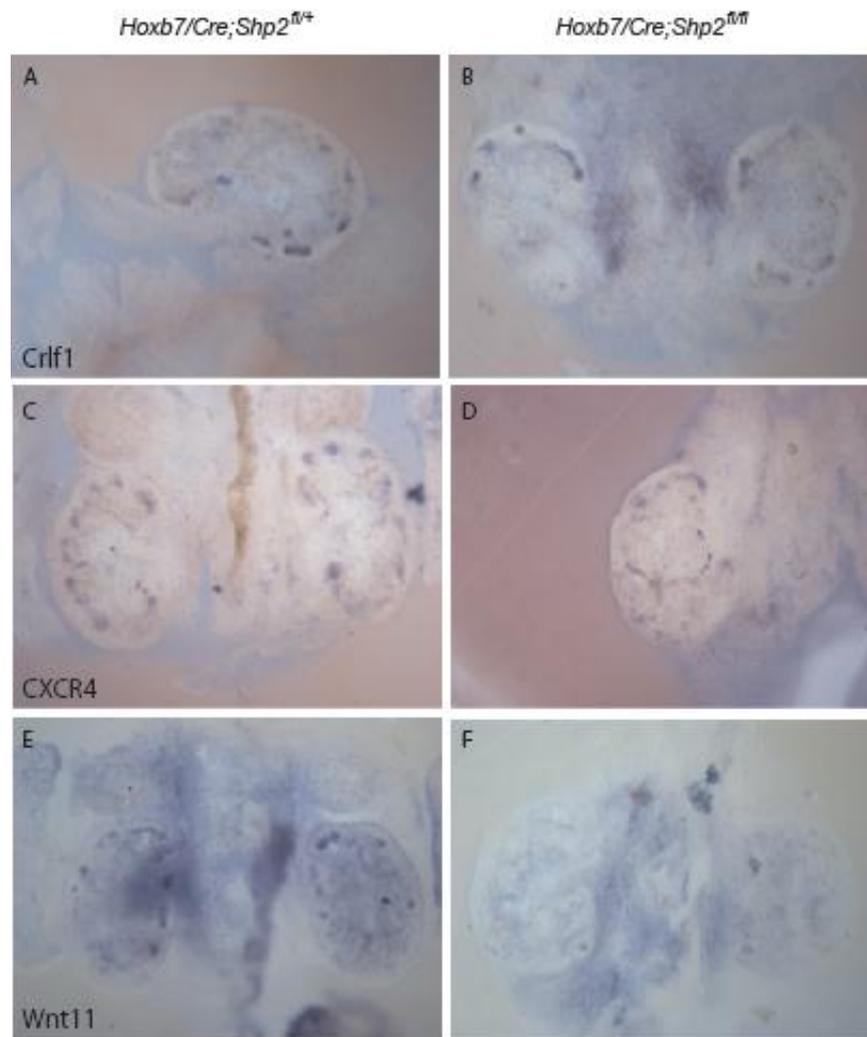


Abb. 9 Zielgene des GDNF/Ret-Signalwegs sind in der konditionellen *Shp2* Mutante teilweise herunterreguliert. A,B,C,D) Expression von *Crlf* und *Cxcr4* in den Spitzen der Ureterknospe einer konditionellen *Shp2*-Mutante (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/fl}*) und einer Kontrollmaus (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/+}*) an E14,5. Beide Zielgene sind in der Kontrolle sowie in der Mutante exprimiert. E,F) Expression von *Wnt11* an E14,5. Das Zielgen ist in der Kontrolle exprimiert, in der Mutante jedoch herunterreguliert.

2.3. *Shp2* defiziente Nieren zeigen Defekte im der Vorgang der Verzweigung der Ureterknospe

Shp2-defiziente Nieren zeigen im Stadium E13,5 eine verringerte Anzahl an Ureterknospenspitzen (Abb. 7 C-E) und im Stadium E12,5 ebenfalls ein unregelmäßiges Verzweigungsmuster (Abb. 8 A ,B). Um den Verzweigungsdefekt der *Shp2*-defizienten Nieren genauer zu untersuchen, wurden aus Embryonen im Stadium E11,5 die Nierenanlagen, bestehend aus der Ureterknospe und dem metanephrogenen Mesenchym, entnommen und auf einem Nitrozellulose-Filter unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Mäuse, die das *HoxB7/Cre*-Transgen tragen, exprimieren zusätzlich das Reporterogen *EGFP* (enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle des *HoxB7*-Promotors. Daher konnte das Epithel der Ureterknospe in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden, und der Verzweigungsgrad der kultivierten Nieren konnte so während der Entwicklung dokumentiert werden. Die Organanlagen wurden im Stadium E11,5 explantiert. Zu diesem Zeitpunkt hat sich die Ureterknospe der *Shp2*-defizienten Niere sowie die der Kontrolle einmal verzweigt, so dass zwei Ureterknospenspitzen sichtbar sind (Abb. 1).

Nach 12 Stunden konnte in den Kontrollnieren eine regelmäßige Verzweigung der Ureterknospe gesehen werden. Das Epithel hatte zu diesem Zeitpunkt mehrere Generationen an dichotomen oder trichotomen Verzweigungen durchlaufen (Abb.10 A, A'). Die Ureterknospen der konditionellen *Shp2*-Mutante dagegen verzweigten sich nur sehr wenig. Nach 12 Stunden konnte nur die erste (bei E11,5 schon vorhandene) und die zweite Generation an Verästelungen ausgemacht werden (Abb.10 B, B'). Nach 36 Stunden hatte sich in der Kontrollkultur ein regelmäßig verästeltes Ureterepithel gebildet, welches aufgrund der reziproken Interaktion zwischen Ureterknospe und Mesenchym bis zu 5 Tage weiterkultiviert werden konnte. Nach 36 Stunden hatten sich bis zu fünf Generationen an Verästelungen gebildet (Abb.10 C, C'). Die Ureterknospe der *Shp2*-defizienten Niere wächst und verästelt sich nach 36 Stunden weiter, besteht aber zu diesem Zeitpunkt nur aus drei Generationen an Verästelungen. Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, daß die Defekte in der Verzweigung der *Shp2*-defizienten Ureterknospe schon ab der zweiten Verzweigung vorhanden sind.

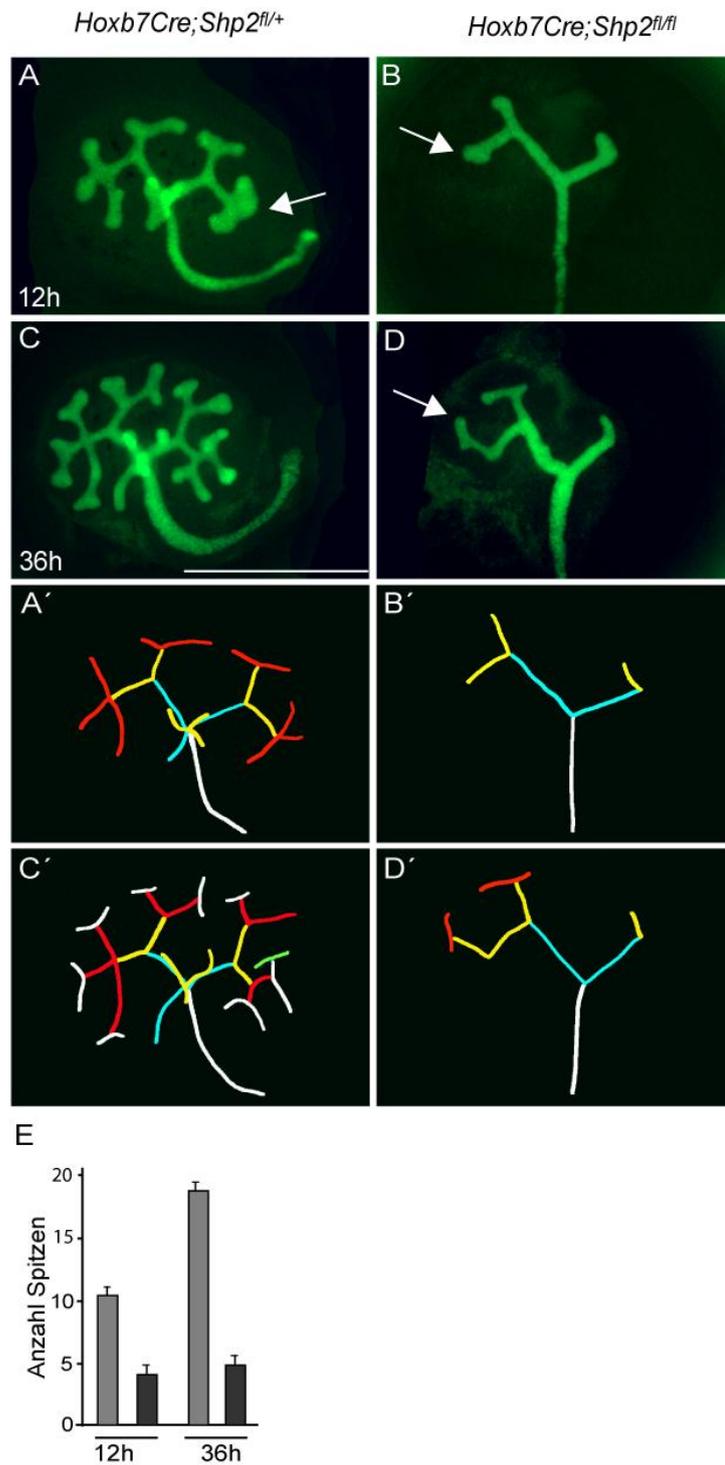


Abb.10 *Shp2* defiziente Nieren zeigen verminderte Verzweigung der Ureterknospe in Organkultur A,B) *Ex-vivo*-Kultur von Nierenanlagen (E11,5) einer konditionellen *Shp2*-Mutante (*HoxB7Cre/Shp2^{fl/fl}*) und Kontrolle *HoxB7Cre/Shp2^{fl/+}* nach 12 Stunden. C,D) Dieselben Explantate nach 36 Stunden. Weiße Pfeile markieren terminale Ampullen. E) Anzahl der Ureterknospenspitzen (Anzahl *Shp2*-defiziente Nieren=4; Anzahl Kontrollnieren=2); Messbalken = 1µm

Weitere Analysen führten zu der Beobachtung, dass *Shp2*-defiziente Nieren kleinere terminale Ampullen haben als Kontrollen (weiße Pfeile in Abb. 10 A-D). Terminale Ampullen entstehen durch vermehrte Proliferation der Epithelzellen. Um die Vermutung zu bestätigen, dass die kleineren Ampullen der Nieren von konditionellen *Shp2*-Mutanten durch verminderte Zellproliferation zustande kommen, wurden die Epithelzellen der Ureterknospe mit einem gegen Zytokeratin gerichteten Antikörper durch Immunfluoreszenz markiert und proliferierende Zellen mit einem gegen phosphoryliertes Histon3 gerichteten Antikörper sichtbar gemacht (Abb. 11 A, B). Das Verhältnis von proliferierenden Zellen zur Gesamtzellzahl (mitotischer Index) in den Ureterknospen wurde bestimmt. Es wurden für Kontrolle und Mutante jeweils 570 Epithelzellen gezählt. Das Balkendiagramm in Abb. 11 C zeigt, dass in der Mutante die Anzahl der proliferierenden Zellen pro Epithelzelle (1,75 %) deutlich niedriger ist als in der Kontrolle (4,3 %). Ein χ^2 -Test wurde für beide Datenmengen durchgeführt um die Signifikanz des Unterschiedes im proliferativen Index zu testen. Das Ergebnis des Tests bestätigt (mit $p=0,01$) die Signifikanz dieses Unterschiedes.

Ein weiteres Experiment sollte die Funktion von Shp2 im Ret-Signalweg belegen. Dazu wurden Nieren, die im Stadium E11,5 einer konditionellen *Shp2*- Mutante und einer Kontrollmaus entnommen worden waren, in Anwesenheit und Abwesenheit von GDNF (10 ng/ml) im Medium kultiviert. Die Anzahl der Ureterknospenspitzen (und somit der Grad der Verzweigung) wurde bestimmt (Abb. 12). Die GDNF-Konzentration wurde nicht weiter erhöht, da man bei höheren Konzentrationen mit exzessiver Verzweigung der Ureterknospe rechnen mußte, was eine Quantifizierung der Spitzen unmöglich gemacht hätte. Die Stimulation der Kontrollnieren mit GDNF führte zu dem erwarteten Anstieg an Verzweigung der Ureterknospe und somit zu mehr Ureterknospenspitzen als in unstimulierten Nieren. Dagegen zeigten die *Shp2*-defizienten Nieren keine Antwort auf Stimulation mit dem Wachstumsfaktor (Abb. 11 D). In diesem Experiment wurde die Konzentration des fetalen Kälberserums im Kulturmedium von 10% auf 5% gesenkt. Die Verzweigung der Ureterknospe der konditionalen

Shp2-Mutante zeigte schon nach eintägiger sowie zweitägiger Kultur weniger Verzweigungen als in der Organkultur im vorhegehenden Absatz.

Zusammengenommen zeigt die reduzierte Verzweigung des *Shp2*-defizienten Epithels, der kleinere mitotische Index und die verringerte Responsivität auf GDNF, dass Shp2 ein wichtiges positives Signalmolekül im GDNF/Ret-Signalweg ist.

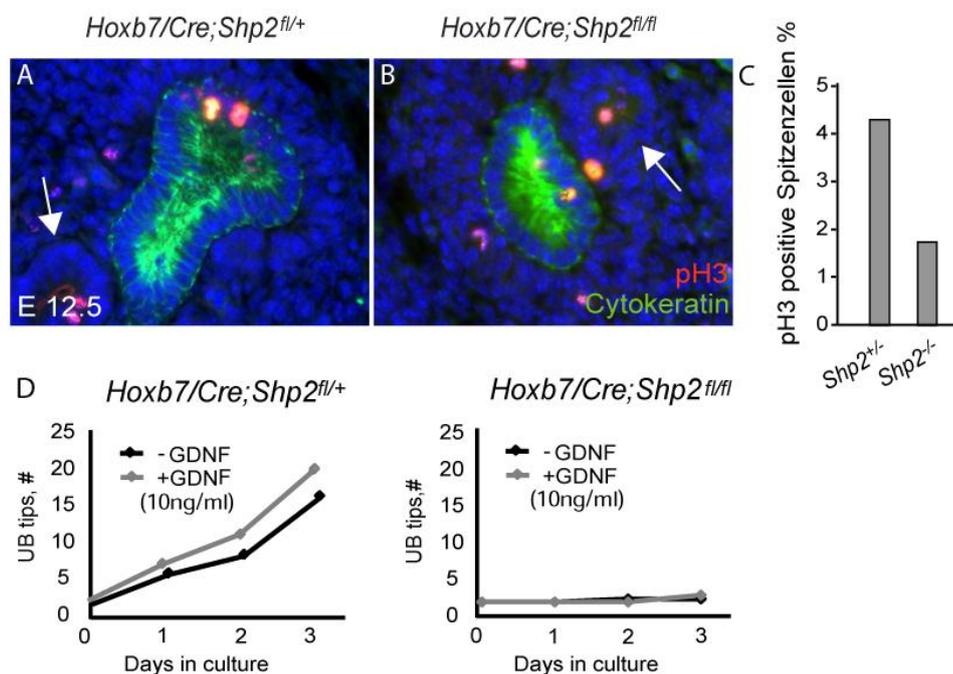


Abb.11 Die Zellproliferation in Ureterknospenspitzen der *Shp2*-defizienten Nieren ist reduziert. A, B) Schnitte durch embryonale Nieren, Stadium E12,5. Anti-Zytokeratin-Immunfluoreszenz (grün) markiert die Epithelzellen der Ureterknospe. Anti-Phospho-Histon3-Immunfluoreszenz (rot) markiert die proliferierenden Zellen. C) Mitotischer Index der *Shp2*-defizienten und der Kontrollnieren. D) Verzweigung der Ureterknospe von *Shp2*-defizienten Nieren und Kontrollen in Kultur. Quantifizierung der Ureterknospenspitzen in Anwesenheit und Abwesenheit von 10ng/ml GDNF im Kulturmedium. In diesem Experiment wurde die Konzentration des fetalen Kälberserums im Kulturmedium von 10% auf 5% gesenkt.

2.4. Deletion von *Shp2* in *Spry*-Mutanten ergibt einen Verlust des *Spry1*^{-/-}-spezifischen Phänotyps

Spry1 und *Shp2* haben in der Nierenentwicklung antagonistische Funktionen. *Spry1* ist ein Inhibitor des GDNF/Ret-Signalwegs sowohl in der Bildung der Ureterknospe als auch in deren Verzweigung in späteren Stadien. *Shp2* ist ein positiver Modulator des GDNF/Ret-Signalwegs, wie der Knockout von *Shp2* in der Ureterknospe zeigt. Durch Deletion beider Gene in der Maus sollte ermittelt werden, ob beide Signalmoleküle genetisch interagieren. In *Spry1*-Null-Mäusen findet man mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% mehr als einen Ureter (Basson et al. 2005). Auf histologischen Schnitten wurde gezeigt, daß die Nieren von *Spry1*^{-/-}-Mutanten aus mehr als einem Primordium entstanden sind. Diese Nieren haben mehrere Nierenbecken, und die nephrogene Zone zieht sich in der Mitte zwischen den einzelnen Nierenanlagen hindurch (Abb.12 C, C' und D, D').

Fast alle analysierten Doppelmutanten besaßen im Gegensatz dazu einzelne Nieren mit einem einzelnen Ureter (Abb.12 A, A'). In den sieben hier analysierten *HoxB7/Cre;Shp2*^{fl/fl};*Spry1*^{-/-}-Doppelmutanten konnte nur eine ausgemacht werden, die eine einseitige Duplexniere besaß. Des Weiteren zeigten alle Doppelmutanten eine geringere Anzahl an Tubuli und Glomeruli. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit dem Phänotyp der einfachen *HoxB7/Cre;Shp*^{fl/fl}-Mäuse. Der einzige sichtbare Unterschied zu den konditionellen *Shp2*-Mutanten war das häufige Auftreten von Hydronephrose und Hydrouretern. Das sind Ureter, Nierenbecken und Sammelrohre, welche mit Flüssigkeit gefüllt sind. Diese Abnormalitäten entstehen, wenn die Ureterknospe nicht an der richtigen Stelle am Wolff'schen Gang auswächst, sondern zu weit kaudal oder rostral entsteht und sich die Verbindung zwischen Ureter und Blase nicht richtig bilden kann (Mendelsohn 2009). Das Gesamtergebnis der Doppelmutanten ist also ein Nierenphänotyp, welcher dem der einfachen, hier beschriebenen konditionellen *Shp2*-Mutante sehr ähnlich ist. Dieser Phänotyp ist geprägt von einer stark reduzierten Anzahl an Glomeruli und demnach einem starken Defizit in der Verzweigung der Ureterknospe.

Die Untersuchung der frühen Nierenanlage am Tag E12,5 sollte Aufschluss darüber geben, ob in der Doppelmutante in frühen Stadien überzählige Ureterknospen entstehen, wie es in der *Spry1*⁻Null-Mutante der Fall ist. In Abb. 12 C'' (im Rechteck) erkennt man deutlich die überzähligen Ureterknospen, die in der *Spry1*-Null-Maus aus dem Wolff'schen Gang entstehen. In der Kontrolle, der konditionellen *Shp2*-Mutante und in der *Shp2/Spry1*-Doppelmutante entstehen keine überzähligen Ureterknospen (Abb. 12 A'', Rechteck, B'', D''). Der Phänotyp der *Spry1*^{-/-}-Mutante ist demnach in *Shp2/Spry1*-Doppelmutanten stark abgeschwächt, was eine genetische Interaktion von *Shp2* und *Spry1* in der Morphogenese der Ureterknospe bestätigt. Abbildung 13 zeigt die PCR zur Genotypisierung der *Spry1/Shp2* Doppelmutanten.

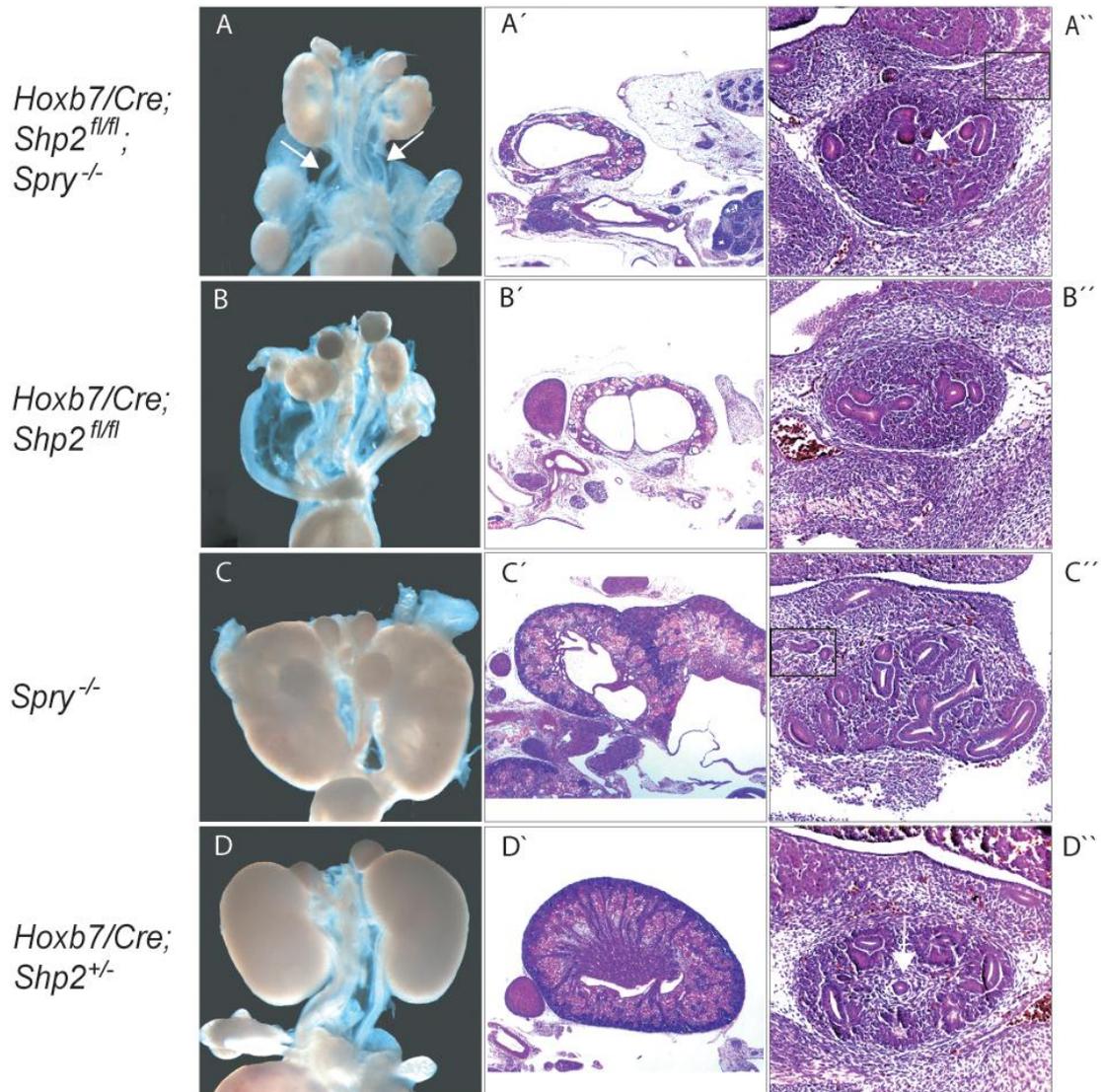


Abb.12 Deletion von *Shp2* zusammen mit *Spry1* führt zum Verlust der vielfachen Ureterknospen in *Spry^{-/-}* Mäusen. A-D) Urogenitalsysteme von Mäusen des angegebenen Genotyps am Tag P0, weiße Pfeile deuten auf Ureter in der *Shp2/Spry1*-Doppelmutante. A'-D') Histologische Querschnitte durch Nieren des angegebenen Genotyps am Tag P0. A''-D'') Hämatoxylin-Eosin-Färbung von histologischen Gewebeschnitten durch Nieren des angegebenen Genotyps an E12,5. Weiße Pfeile markieren einzelne Ureter in der Kontrolle (D'') und in der Doppelmutante (A''). Ein schwarzes Quadrat zeigt die Region, in der ektopische Ureterknospen entstehen können.

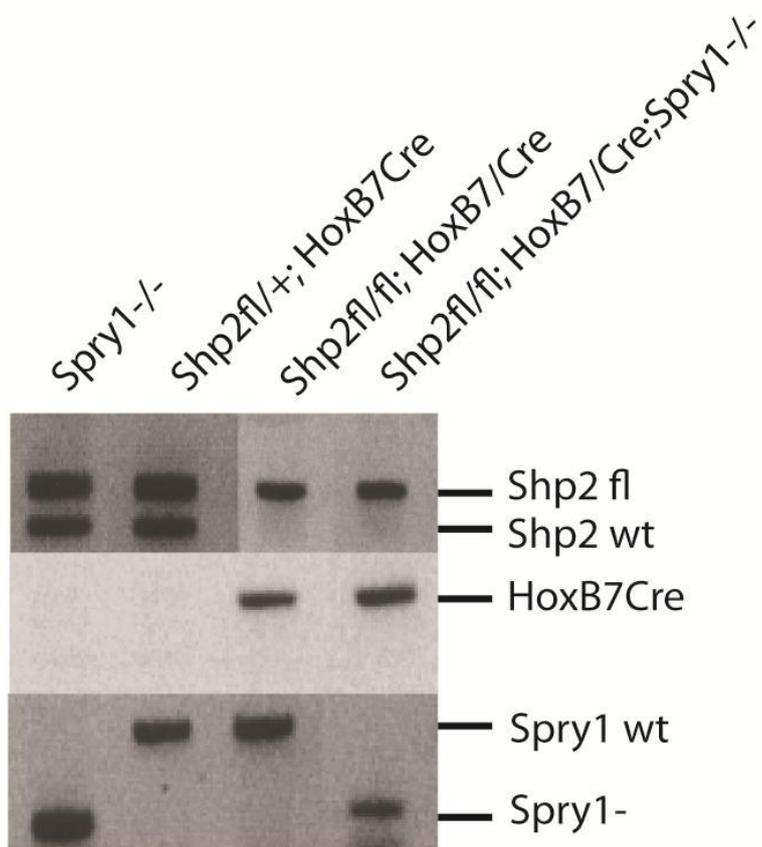


Abb.13 PCR der Mutanten aus Abbildung 12. Die Genotypisierungs-PCRs zeigen das *Spry1*-Allel, das *Spry1*-wildtyp-Allel, Das *HoxB7/Cre*-Allel, das *Shp2*-wildtyp-Allel und das *Shp2fl*-Allel.

3. Diskussion

Shp2 agiert in der Nierenentwicklung als positiver Signalüberträger im GDNF/Ret-Signalweg

In der vorliegenden Arbeit wurde durch konditionelle Mutagenese eine Mauslinie mit einer *Shp2*-Deletion im Ureterepithel hergestellt und analysiert. Die Mutation der Tyrosinphosphatase *Shp2* im Epithel des Wolff'schen Gangs und der Ureterknospe resultiert in kleinen, unorganisierten Zystennieren, die nur wenige Glomeruli besitzen und führt zum Tod der Neugeborenen kurz nach der Geburt. Das Wachstum und die Verzweigung der Ureterknospe sind stark reduziert, was sowohl *in-vivo* als auch in Organkultur beobachtet werden kann. Diese Defizite entstehen aus einer stark reduzierten Proliferation in den Ureterknospenspitzen und dementsprechend kleinen Ampullen in den *Shp2*-Mutanten.

Der Phänotyp der Nieren der *Shp2*-Mutanten ist den Phänotypen sehr ähnlich, wie sie in *Ret*^{-/-}; *GDNF*^{-/-} und *Gfra-1*^{-/-} Mäusen vorkommen. Diese Mutanten sind ebenfalls geprägt durch starke Verzweigungsdefizite der Ureterknospe. Doch sie haben im Allgemeinen auch schon Defizite beim Auswachsen der Ureterknospe vom Wolff'schen Gang (Shakya et al. 2005). Die Stärke des Verzweigungsdefizits der konditionellen *Shp2*-Mutanten ist also etwas schwächer, aber sehr gut mit einer *Ret*-Mutante vergleichbar, die eine Mutation des Tyrosins Y1062 der Ret9-Isoform auf einem Ret9-momoiisoformen Hintergrund trägt (Wong et al. 2005; Jain et al. 2006). Die Nieren dieser *Ret*-Mutanten sind ebenfalls klein und zystisch und haben eine stark reduzierte Anzahl an Glomeruli, was auf Verzweigungsdefizite der Ureterknospe deutet (siehe Einleitung). Der hier beschriebene Phänotyp der *Shp2*-Mutante weist also darauf hin, dass es sich um die Mutation eines Gens im Ret-Signalweg handelt. Auch die starke Reduktion der Proliferation in den Ureterknospenspitzen zeigt, daß *Shp2* im Ret-Signalweg liegt, denn auch in *Ret*-defizienten Zellen wurde eine verminderte Proliferation festgestellt. Man kann eventuell die Tatsache nicht vollständig ausschließen, dass der leicht hypomorphe Phänotyp der konditionellen *Shp2*-Mutante durch geringe Mengen von Restprotein entsteht,

welches in dem Cre-exprimierenden Epithel wegen größerer Stabilität überdauern könnte. Allerdings waren in den Ureterknospenspitzen die Ret-Zielgene *Etv4* und *Etv5* vollständig herunterreguliert, was die Interpretation unwahrscheinlich macht.

Die Funktion von Shp2 im Ret-Signaltransduktionsweg der Nierenentwicklung

Der Phänotyp der *Shp2*-defizienten Nieren ist auch vergleichbar mit Wildtyp-Nieren, in welchen der Erk/MAPK-Signalweg durch Zugabe des Inhibitors PD 98059 in Organkultur blockiert wurde (Fisher et al. 2001), was darauf hin deutet, dass Shp2 in der Niere den MAPKinase-Signalweg aktiviert. Hinzu kommt die Tatsache, dass Shp2 generell in Organismen wie *Drosophila*, *Xenopus* und im Säuger *in vitro* und *in vivo* als Ras/MAPKinase-aktivierender Faktor wirkt (Neel et al. 2003; Rosario und Birchmeier 2003; Feng 2007; Grossmann et al. 2010). Im Weiteren ist ja bekannt, dass Überaktivierung anderer Ras/MAPKinase-Signalwegskomponenten genau wie überaktiviertes Shp2 das menschliche Noonan-Syndrom auslösen, was wiederum darauf hinweist, dass der Ras/MAPKinase-Signalweg der Haupt-Signalweg unterhalb von Shp2 ist (Carta et al. 2006; Schubbert et al. 2006; Roberts et al. 2007; Tartaglia et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich durch Analyse der Zellproliferation in den Ureterknospenspitzen gezeigt werden, dass die Proliferationsrate in den konditionellen *Shp2*-Mutanten stark beeinträchtigt ist. Dies ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass der Ras/MAPKinase-Signalweg gestört ist. Andererseits gibt es Studien, die Shp2 in Zusammenhang mit dem PI3Kinase-Signalweg bringen (Besset et al. 2000; Schuringa et al. 2001; Jain et al. 2006; Lu et al. 2009). Die in dieser Arbeit vorliegenden *In-situ*-Hybridisierungs-Experimente zeigen, dass *Etv4* und *Etv5* klar unterhalb von Shp2 liegen. Diese Transkriptionsfaktoren sind essentiell für die Ret-Signalgebung und werden wahrscheinlich über den PI3Kinase Signalweg reguliert, da die Expression dieser Transkriptionsfaktoren durch den Inhibitor LY294002 blockiert wird. Diese Befunde basieren aber auf einer einzigen Studie mit dem Inhibitor (Lu et al. 2009) und sind daher nicht sehr gefestigt (persönliche Mitteilung, Frank Costantini). Doch könnte Shp2 in der Nierenentwicklung beide Signalwege, den

Ras/MAPKinase und den PI3Kinase Signalweg regulieren (Abb.14). Es handelt sich also bei der Signalweiterleitung unterhalb der Ret Rezeptor-Tyrosinkinase eventuell um ein komplexes Netzwerk und nicht um eine lineare Signalweiterleitungskette.

Die möglichen Andockstellen von Shp2 an den Ret-Rezeptorkomplex sind durch Zellkulturstudien sehr gut untersucht worden. Shp2 kann Ret direkt durch Phosphotyrosin Y687 oder indirekt durch die Adaptormoleküle Frs2 α , Grb2, Gab1 oder Gab2 binden (Kouhara et al. 1997; Kurokawa et al. 2001; D'Alessio et al. 2003; Perrinjaquet et al. 2010). Zum Beispiel kann Frs2 α Ret an der Bindestelle Y1062 binden und so Shp2 an den Rezeptorkomplex heranholen (Kurokawa et al. 2001). Neuere Studien zeigen, dass konditionelle *Frs2 α* -mutante Mäuse neben kleineren Nieren durch reduzierte Verzweigung der Ureterknospe auch eine reduzierte Expression des Ret-Zielgens *Wnt11* aufweisen. Frs2 ist demnach ein guter Kandidat als Adaptormolekül zwischen Ret und Shp2 (Abb.14).

Die Interaktion von Shp2 und Spry1 in der Nierenentwicklung

Um eine mögliche genetische Interaktion von Shp2 und dem Ret-Signalwegs-Antagonisten Spry1 zu untersuchen, wurden die konditionellen *Shp2*-Mutanten mit den *Spry1*-Null Mäusen gekreuzt. Die *Shp2/Spry1* Doppelmutanten zeigten, wie die konditionalen *Shp2* Mutanten, kleine und zystische Nieren mit wenigen Glomeruli. Das lässt auf eine stark reduzierte Verzweigung der Ureterknospe schließen. Dies war unerwartet, da die genetische Reduktion von *GDNF* in *Spry1* Null-Nieren oder die gemeinsame Deletion von *Ret* und *Spry1* zu einem Wildtyp-ähnlichen Phänotyp führen. In anderen Worten: Die Deletion von Ret rettet den *Spry1*^{-/-} Phänotyp, die Deletion von Shp2 dagegen nicht.

Neueste genetische Studien zeigen neben früheren Experimenten, dass Ret nicht die einzige Rezeptor-Tyrosinkinase ist, die Wachstum und Verzweigung der Ureterknospe anregt (Qiao et al. 1999; Ohuchi et al. 2000; Zhao et al. 2004; Ishibe et al. 2009; Michos et al. 2010). Es können nämlich der FGF10/FGFR1b-Signalweg oder eventuell auch der Met/EGFR in Abwesenheit von GDNF oder Ret und Spry1 für den Ret-Signalweg kompensieren. Aus diesem Grund haben

GDNF/Spry1-Null- und Ret/Spry1-Null-Mäuse fast normale Nieren (Basson et al. 2005; Michos et al. 2010). Da der Shp2-Phänotyp nicht durch den Verlust von Spry1 zu Wildtyp konvertiert wird, agiert Shp2 nicht nur unterhalb von Ret, sondern womöglich auch unterhalb der anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen, die in die Verzweigung der Ureterknospe involviert sind. Eine genetische Interaktion von Shp2 und Spry1 ist dafür verantwortlich, dass die exessive Verzweigung der Ureterknospe, die charakteristisch für Spry1-Null-Mäuse ist, in der Doppelmutante zu reduzierter Verzweigung wird. Genauso gibt es keinen vielfachen Ureter in der Doppelmutante, sondern in den meisten Fällen nur noch einen. Shp2 und Spry1 liegen also beide im Ret Signalweg, wobei *Shp2* sich epistatisch zu *Spry1* verhält (Abb. 14).

Es konnte in Zellkultur gezeigt werden, dass Spry ein molekulares Substrat der Proteintyrosinphosphatase Shp2 ist (Hanafusa et al. 2004; Jarvis et al. 2006). Shp2 dephosphoryliert das essentielle Tyrosin Y55 von Spry1 und inaktiviert es. Diese Interaktion ist eine Möglichkeit des positiven Feedbacks und eine Erklärung dafür, wie Shp2 unterhalb von Ret auf die Aufrechterhaltung des Signals wirkt (Abb.14). Diese Wirkung kann aber nicht der einzige positive Effekt sein, den Shp2 in den Ureterknospenzellen hat. Denn in diesem Fall hätte der Verlust von Shp2 in der Doppelmutante keinen Effekt.

Abbildung 14 zeigt ein Schema, welches die in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge mit bekannten Vorgängen des Ret-Signalwegs in der Ureterknospe verknüpft. Der aktivierte Ret Rezeptor-Komplex bindet Adaptormoleküle (z.B. Frs2) an Tyrosin-Bindestellen (z.B. Y1062). Shp2 bindet diese Adaptormoleküle und leitet das Signal an untergeordnete Signalmoleküle weiter. Aktiviertes Spry1 ist membranständig und hemmt das Signal oberhalb von Shp2. Shp2 hemmt möglicherweise Spry1 durch Dephosphorylierung. Shp2 reguliert die Transkription der wichtigen Zielgene *Wnt11*, *Etv4* und *Etv5*, des Weiteren aktiviert es womöglich den PI3Kinase-Signalweg und den Erk/MAPKinase-Signalweg. Letzterer steuert wiederum die Expression von Spry1.

Das Wissen um die Funktionen der Tyrosinphosphatase Shp2 in der Embryonalentwicklung, in Erbkrankheiten und in Krebs wurde in den letzten Jahren vor allem durch Studien mit Mausmodellen stark erweitert (Grossmann et al. 2010). Die vorliegende Arbeit zeigt eine vorher nicht beschriebene, essentielle Funktion von Shp2 in der Nierenentwicklung. Shp2 ist in Zellen der Ureterknospe ein zentraler Signalüberträger unterhalb von Ret und anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen.

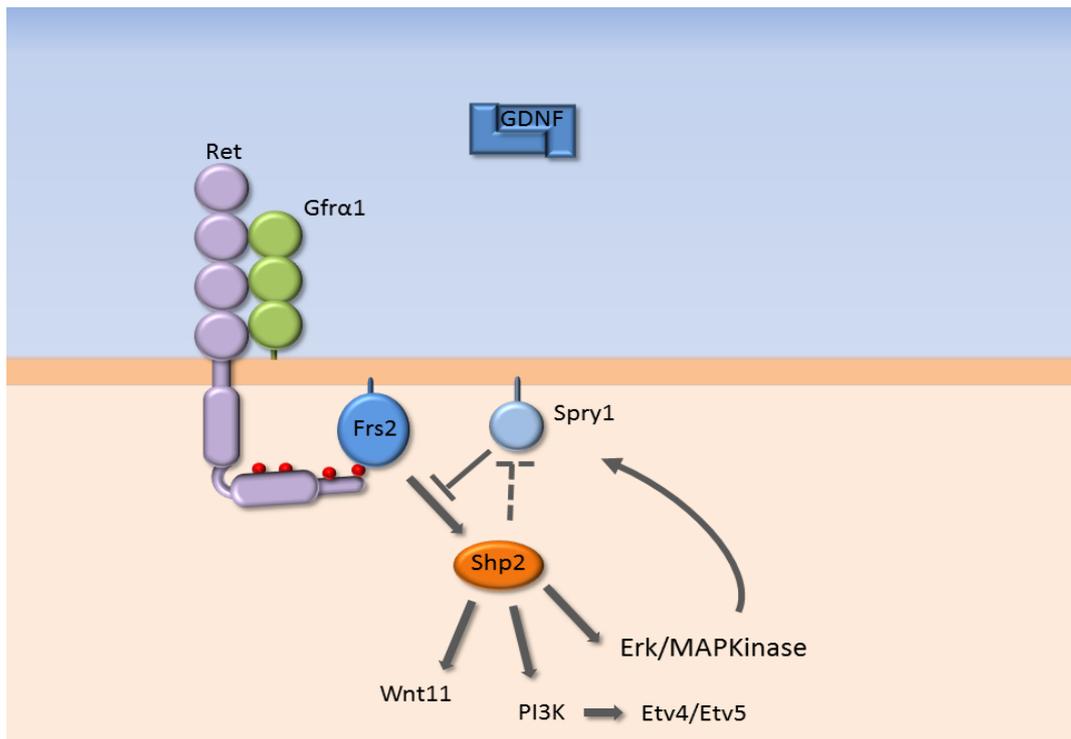


Abb.14 Einordnung von Shp2 in den GDNF/Ret Signalweg Ein GDNF-Dimer (dunkelblau) bindet den Komplex aus Ret (violett) und dem Korezeptor Gfra-1 (grün). Ret9 kann durch Autophosphorylierung an vier Tyrosinen phosphoryliert werden (rote Markierungen). Das Adaptormolekül Frs2 (mittelblau), welches in der Verzweigung der Ureterknospe eine Rolle spielt bindet an phosphoryliertes Y1062. Shp2 (orange) bindet an Frs2 und Spry1, wobei es Spry1 dephosphoryliert und deaktivieren kann. Shp2 aktiviert den Erk/MAPK-Signalweg, der wiederum die Transkription von Spry1 reguliert. Shp2 ist ebenfalls wichtig für die transkriptionelle Regulation von Etv4, Etv5 und Wnt11. Spitzer Pfeile bedeuten aktivierende Interaktion, stumpfer Pfeil bedeutet hemmende Interaktion, gestrichelte Linie bedeutet mögliche Interaktion.

Die Funktion von Shp2 in der Niere des Menschen

Die Fehlregulation der Protein-Tyrosinphosphatase Shp2 im Menschen führt zu Erbkrankheiten wie dem Noonan-Syndrom und dem Leopard-Syndrom. Das Noonan-Syndrom entsteht durch aktivierende Mutationen in *Shp2* oder in Genen von anderen Erk/Ras-Signalwegskomponenten wie Kras, Raf und Sos1 (Carta et al. 2006; Schubbert et al. 2006; Roberts et al. 2007; Tartaglia et al. 2007). Das Leopard-Syndrom entsteht durch deaktivierende Mutationen in *Shp2*. Patienten beider Erbkrankheiten haben auffällige Entwicklungsdefizite wie Herzdefekte, kognitive Defekte, Gesichtsfehlbildungen, und Genitalfehlbildungen (Grossmann et al. 2010). Bis heute wurden bei diesen Patienten keine Nierendefekte festgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die essentielle Funktion von Shp2 in der frühen Nierenentwicklung gezeigt. Demnach müssten menschliche Embryonen mit schwerwiegenden Shp2-Mutationen ebenfalls geringe Überlebenschancen besitzen. Aber auch Menschen mit dem Leopard-Syndrom sollten eigentlich Nierendefekte haben. Solche Nierendefekte wurden aber bisher nicht beobachtet. Da es sich bei den Leopard-Patienten um leichte, dominant-negative Mutationen handelt sind die Nierendefekte möglicherweise zu schwach und daher bis heute nicht auffällig geworden. Leichte Nierendefekte können, solange nicht weitere Schädigungen der Nieren hinzukommen, physiologisch gut kompensiert werden und fallen nicht auf. Im Gegensatz dazu sind leichte Gesichtsfehlbildungen oder leichte kognitive Defekte im Patienten schnell zu erkennen. Leichte Herzdefekte wirken sich ebenfalls längerfristig stärker aus. Es wäre demnach doch sinnvoll, sowohl bei Noonan-Syndrom als auch bei Leopard-Syndrom-Patienten auch die Nieren zu untersuchen.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Die verwendeten Enzyme, Molekulargewichtsmarker und Oligonucleotide wurden von den Herstellern Amersham-Buchler (Braunschweig), Böttlinger Mannheim (Mannheim), BioTeZ (Berlin), Fermentas, Invitrogen, New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Roche (Basel/Mannheim) bezogen. Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben von den Herstellern Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Verwendete Geräte

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Geräte verwendet:

PCR Gerät (Biometra, T3 Thermocycler),

Zentrifugen (Beckman J2-MI, Heraeus Multifuge 4KR, Eppendorf Centrifuge S417R),

Mikroskope (Axioskop, Zeiss; StemiSV11 Apo, Zeiss; Axio Imager Z1m, Zeiss; MZ10F, Leica),

Mikrotom (Microm HM 355S)

Incubator (Heraeus BBD 6220),

Präparierbesteck von FST (Heidelberg) und Süd-Laborbedarf (Gauting)

Antikörper und Antisense-RNA-Transkripte

Anti-pan-Cytokeratin (Sigma, 1:20), Phospho-Histone H3 (Upstate, 1:250), Anti-E-Cadherin (BD-Biosciences), Anti-DIG Fab Fragmente, gekoppelt an alkalische Phosphatase (AP) (Roche, 1:4000), Cy2 oder Cy3-gekoppelte sekundäre Antikörper. Die Kernfärbung wurde mittels DAPI (Sigma, 1:2000) durchgeführt.

Für die *In-situ*-Hybridisierungen wurden anti-sense Transkripte der folgenden Maus-cDNAs verwendet: c-Ret, mSpry1, Wnt11, Etv4, Etv5, Cxcr4, und Crlf1.

Zellkulturmedien und Wachstumsfaktor

Für die Organkultur wurden CO₂-Independent Medium von Gibco und DMEM +GlutaMAX von Gibco verwendet. Für die Wachstumsstimulation der kultivierten embryonalen Nieren wurde rekombinantes humanes GDNF (R&D Systems Minneapolis) verwendet.

Mausstämme

Es wurden folgende Mauslinien verwendet: *HoxB7/Cre* (Zhao et al. 2004), *Shp2^{fl}* und *Spry1* (Basson 2005). Für die Genotypisierung der Tiere wurde standardmässig die Polymerasekettenreaktion verwendet. Dafür wurden Gewebebiopsien der adulten Mäuse oder Teile der Embryonen in 35µl Lysepuffer (100 mM Tris pH 8,5, 10 mM EDTA pH 8, 0,2% SDS, 200 mM NaCl) und 0,2 µg/µl Proteinase K (Sigma) für mindestens 12 Stunden bei 55°C aufgelöst. Nach dem Erhitzen auf 95°C für 10 min wurden die Lysate stark verdünnt in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die Bedingungen für diese Reaktion entnehme man für die *HoxB7/Cre*-Genotypisierung und die *Spry1*-Genotypisierung den Publikationen. Für die *Shp2*-Genotypisierung wurden 30 sec Hybridisierung bei 60°C, 1 min Elongation bei 72°C mit 45 Zyklen einprogrammiert. Folgende PCR-Primer wurden verwendet:

FIShp2fw: 5'-ATG ACT CCT GAA GCC CAT TG-3'

FIShp2rv: 5'-TTC CCA TCA CCT CAG ACT CC-3'

HoxB7/Crefw: 5'-AGC GCG ATC ACA TGG TCC TG-3'

HoxB7/Crerev: 5'-ACG ATC CTG AGA CTT CCA CAC T-3'

Spry1P1: 5'-CTCAATAGGAGTGGACTGTGAAACTGC-3'

Spry1P2: 5'-GGGAAAACCGTGTTCTAAGGAGTAGC-3'

Spry1P3: 5'-GTTCTTTGTGGCAGACACTCTTCATTC-3'

4.2. Methoden

Standardmethoden und Kits

Molekularbiologische Standardmethoden basieren auf den Lehrbüchern Sambrook et al. (1989), Asubel et al. (1987), Berger et al. (1987) und werden an dieser Stelle nicht näher beschrieben. Zu diesen Methoden gehören unter anderem die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonucleasen, Polymerasekettenreaktion, Auftrennung von Nucleinsäuren in Agarosegelen, Phenol/Chloroform Extraktion von DNA aus Mausgewebe, Aufreinigung linearisierter Plasmid-DNA und Transformation von Bakterien.

Folgende molekularbiologische Methoden wurde unetr Verwendung von kommerziellen Kits nach Herstellerangaben durchgeführt: Plasmid-DNA-Präparation (Qiagen), Digoxigeninmarkierung von antisense-RNA-Transkripten (Roche) und deren Aufreinigung mittels des RNeasy Kits (Qiagen) sowie Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen).

Histologische Färbungen von Embryonenschnitten

Histologische Übersichtsfärbungen (Hämatoxylin/Eosin) wurden auf Paraffinschnitten durchgeführt. Für Paraffinschnitte wurden die Embryonen nach Fixierung in 4% Formaldehyd in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 10- 20 Minuten: 70%, 80%, 95%, 2-mal 100% Ethanol) dehydriert, 2-mal 45 min in Toluol inkubiert, danach über Nacht in flüssiges, 60°C-warmes Paraffin überführt und im Folgenden in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 7 µm-dünne Paraffinschnitte angefertigt und in ein 55°C-Wasserbad überführt, von welchem die Schnitte auf Objektträger aufgezozen wurden. Die getrockneten Paraffinschnitte wurden über Nacht im 60°C-Ofen erwärmt und die Objekte

danach durch dreifache 7-minütige Inkubation in Xylol vom Paraffin befreit. Nach Rehydrierung in einer absteigender Ethanolreihe (je 3 min: 2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol) wurden die Schnitte erst 1 min in Hämatoxylin gefärbt, sofort in warmes Leitungswasser überführt und danach 5 min in 0.1%-ethanolischem Eosin gefärbt, wieder in ansteigender Ethanolreihe dehydriert und in zwei 3-minütigen Xylolschritten auf das anschließende Verschließen mit Entellan (Merck) vorbereitet.

Immunfärbungen von Gewebeschnitten

Für die Immunofärbung von Paraffinschnitten wurden die 7 µm dicken Gewebeschnitte mit Xylol entwacht und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert, danach folgte eine Antigen-Demaskierung durch Kochen in 10 µM Natriumcitrat Puffer (pH 6,0). Unspezifische Antigene wurden durch eine einstündige Inkubation mit mindestens 5% inaktiviertem Pferdeserum und 0,1% Tween/PBS blockiert. Danach wurden die Gewebeschnitte mit dem in 5% Pferdeserum in PBST verdünnten Antikörper über Nacht inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden zur Entfernung von ungebundenem Antikörper 3-mal für 10 min mit PBST gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Cy2- oder Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörpern sowie dem DNA-spezifischen Farbstoff DAPI für 60 min inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend 3-mal für 20 min in PBST gewaschen und schließlich mit „Immu-Mount“ (Shandon) eingeschlossen.

Immunfärbungen von ganzen embryonalen Nieren

Die Nieren der Mausembryonen wurden in eiskaltem PBS präpariert und über Nacht schüttelnd in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Nieren wurden in einer aufsteigenden Methanolreihe (je 10-20 Minuten: 25%, 50%, 75%, 100% Methanol) dehydriert und konnten bei Bedarf wieder rehydriert werden. Nach einer Permeabilisierung mit 10 µg Proteinase K und der Blockierung der unspezifischen Antigene mit 10% Schafserum wurden die Nieren für mindestens 12 Stunden zusammen mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Nach mehreren

Waschschritten wurden sie für mindestens 4 Stunden zusammen mit der zweiten, an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten, Antikörper inkubiert. Nach weiteren Waschungen wurde die Färbereaktion mit 0,03% NiCl₂ und 0,3 mg/ml Diaminobenzidin angesetzt.

***In-situ*-Hybridisierung mit ganzen embryonalen Nieren**

Für *In-situ*-Hybridisierungen der ganzen embryonalen Nieren wurden Embryonen genotypisiert und die Nieren in 100% Methanol eingelagert. Alle im Folgenden beschriebenen Lösungen wurden mit DEPC- H₂O angesetzt und vor jedem Versuch steril filtriert.

Das Protokoll für *In-situ*-Hybridisierungen mit ganzen embryonalen Nieren bedarf einer viertägigen Behandlung der Nieren und wurde wie folgt durchgeführt: Der erste Behandlungstag wurde soweit nicht anders beschrieben auf Eis durchgeführt. Am ersten Tag der Behandlung wurden die embryonalen Nieren 15 min in 6% H₂O₂ (in 100% Methanol) geblichen und in einer absteigenden Methanolreihe (je 10 min: 75%, 50%, 25% Methanol) rehydriert. Nach 8-minütiger Inkubation in 0.2 M HCl wurden die embryonalen Nieren 3-mal für 10 min mit PBST (PBS+ 0.1% Tween) gewaschen, für 12 min mit 4,5 µg/ml Proteinase K in PBST bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 10 min in 2 mg/ml Glycin/PBST gewaschen. Die embryonalen Nieren wurden 3-mal für 5 min in PBST gespült, in 4% PFA/0.2% Glutaraldehyd bei Raumtemperatur nachfixiert und es wurden drei weitere Waschungen in PBST vorgenommen.

Embryonale Nieren wurden im Anschluss für 3 h in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC pH 5.0, 5% Böhlinger Block, 10% Dextransulfat, 5 mM EDTA, 0.1% Tween, 10 µg/ml tRNA, 10 µg/ml ssDNA, 40 µg/ml Heparin) bei 70°C präinkubiert. Danach wurden DIG-markierte antisense-RNA-Sonden zu der Hybridisierungslösung gegeben. Embryonale Nieren wurden zusammen mit DIGRNA- Sonde in Hybridisierungslösung über Nacht bei 70°C leicht schüttelnd inkubiert.

Am zweiten Tag der Behandlung wurden Embryonen zweimal 30 min bei 70°C in Lösung 1 gewaschen (50% Formamid, 5x SSC pH7, 0.1% Tween), gefolgt von einem 10 minütigen Waschschritt in einer 1:1 Mischung aus Lösung 1 und Lösung 2 (0.5 M NaCl, 10mM Tris pH 7.4, 0.1% Tween) bei 70°C und drei 5-

minütigen Waschgängen in Lösung 2. Durch eine 15 minütige Behandlung mit 50 µg/ml RNase A (Böhringer, Mannheim) in Lösung 2 (schüttelnd bei 37°C) wurden einzelsträngige RNA hydrolysiert. Danach folgten drei je einstündige Waschgänge in Lösung 3 (50% Formamid, 2x SSC pH 7.0, 0.1% Tween) bei 65°C. Die Embryonen wurden bei RT für je 5 min zweimal mit TBS und einmal mit PBS gewaschen, bevor sie in 1% Böhringer-Block (mit 10% Schafserum und 0.2% Tween) für 1 h bei 4°C blockiert wurden. Es folgte eine Inkubation über Nacht mit dem an AP gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000).

Der dritte Tag der *In-situ*-Hybridisierung bedarf einer Folge von drei 5-minütigen und sechs einstündigen Waschschritten in TBS. Am vierten Tag wurden die Embryonen zweimal je 1h in AP-Puffer gewaschen (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween) und danach in BM Purple (Roche) bis zu 2 Tage lang bei RT gefärbt und anschließend fotografiert.

***In-situ*-Hybridisierung von Gewebeschnitten**

Die *In-situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten wurde mit DIG markierten antisense-Sonden mit denselben Puffern und Reagenzien wie die *In-situ*-Hybridisierung mit ganzen embryonalen Nieren durchgeführt. Dafür wurden die 7 µm dicken Gewebeschnitte mit Xylol entwachst und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) rehydriert.

Die Proben wurden mit 4% Formaldehyd für 15 min erneut fixiert, mit 6% H₂O₂ für 15 min geblichen und 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden danach mit 10 µg/ml Proteinase K für 10 min behandelt und mit 0,2% Glycin/PBS für 2 min gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 100 mM Tris-Acetat für 10 min, in 2x SSC für 10 min und eine Dehydrierung für je 2 min mit 30%, 50%, 75%, 85%, 95% und 100% Ethanol.

Die luftgetrockneten Proben wurden über Nacht bei 63°C in einer feuchten Kammer (5x SSC) mit Hybridisierungslösung und antisense-RNA-Sonden inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben wie folgt gewaschen: 2-mal 15 min mit Lösung 1 bei 60°C, 3-mal 30 min mit Lösung 2-mal bei 60°C und 3-mal für 5 min mit TBST gewaschen. Die Proben wurden in 10% Schafserum und 1% Böhringer-Block in TBST für 2 Stunden blockiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht mit dem an AP gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:1000). Am folgenden

Tag wurden die Proben 6-mal für 15 min mit TBST und 2-mal für 10 min mit NTMT gewaschen, woran sich eine 10 minütige Inkubation in 1 mM Levamisol anschloss. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte mit BM Purple über Nacht in einer feuchten Kammer. Die Gewebeschnitte wurden anschließend dehydriert und mit Entellan eingeschlossen.

Kultivierung von embryonalen Nieren

Für die Beobachtungen der Verzweigung der Ureterknospe wurden embryonale Nieren an Tag E11,5 explantiert und auf 0,4 µm dicken Transwell Filtern (Corning, Schiphol-Rijk) bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert. Die Präparation der Nieren erfolgte in eiskaltem CO₂-unabhängigem Kulturmedium. Die Nierenanlagen wurden in einer 96-Well Platte in eiskaltem CO₂-unabhängigen Kulturmedium gesammelt und anschließend auf die Transwell-Filter platziert. Dabei wird das Kulturmedium unter den Filter gegeben und das Nierenexplantat wird auf den Filter gesetzt so dass die Oberfläche der Luft ausgesetzt ist. Die Organanlagen können auf diese Weise bis zu fünf Tage kultiviert werden und das Wachstum kann in Echtzeit dokumentiert werden. Das Kulturmedium ist DMEM mit 10% FCS.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent (Vol/Vol)
°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
Cy2, Cy3	Cyanine Dye2+3
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol-Hydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	Embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et altera
FCS	fetal calf serum / fötales Kälberserum
FST	Fine science tools
GDNF	glia cell derived neurotrophic factor
h	Stunde(n)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Lösung
M	Mol/l
m	murine (von der Maus)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
P	Postnataler Tag
PBST	phosphate buffered saline with Tween20
PCR	polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentium hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SSC	standard saline citrate / Natrimchlorid-Natrimcitrat-Puffer
ssDNA	single strand DNA/einzelsträngige DNA
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline with Tween20
tRNA	Transfer-RNA
µ mikro	(10 ⁻⁶)

5. Literaturverzeichnis

Ali, S., et al. (2003). "SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor." J Biol Chem **278**(52): 52021-31.

Allard, J. D., et al. (1996). "The SH2-containing tyrosine phosphatase corkscrew is required during signaling by sevenless, Ras1 and Raf." Development **122**(4): 1137-46.

Arighi, E., et al. (2005). "RET tyrosine kinase signaling in development and cancer." Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 441-67.

Barford, D., et al. (1998). "Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2." Structure **6**(3): 249-54.

Basson, M. A., et al. (2005). "Sprouty1 Is a Critical Regulator of GDNF/RET-Mediated Kidney Induction." Developmental Cell **8**(2): 229-239.

Beset, V., et al. (2000). "Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase." J Biol Chem **275**(50): 39159-66.

Borrello, M. G., et al. (1996). "The full oncogenic activity of Ret/ptc2 depends on tyrosine 539, a docking site for phospholipase Cgamma." Mol Cell Biol **16**(5): 2151-63.

Boulay, A., et al. (2008). "The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer." Cancer Res **68**(10): 3743-51.

Brent, A. E., et al. (2004). "FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression." Development **131**(16): 3885-96.

Cacalano, G., et al. (1998). "GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney." Neuron **21**(1): 53-62.

Carta, C., et al. (2006). "Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype." Am J Hum Genet **79**(1): 129-35.

Carter, M. T., et al. (2001). "Conservation of RET proto-oncogene splicing variants and implications for RET isoform function." Cytogenet Cell Genet **95**(3-4): 169-76.

Casci, T., et al. (1999). "Sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signaling." Cell **96**(5): 655-65.

Celli, G., et al. (1998). "Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for fibroblast growth factors in multi-organ induction and patterning." EMBO J **17**(6): 1642-55.

Chi, X., et al. (2009). "Ret-dependent cell rearrangements in the Wolffian duct epithelium initiate ureteric bud morphogenesis." Dev Cell **17**(2): 199-209.

Cleghon, V., et al. (1998). "Opposing actions of CSW and RasGAP modulate the strength of Torso RTK signaling in the Drosophila terminal pathway." Mol Cell **2**(6): 719-27.

Crowder, R. J., et al. (2004). "Dok-6, a Novel p62 Dok family member, promotes Ret-mediated neurite outgrowth." J Biol Chem **279**(40): 42072-81.

- D'Alessio, A., et al. (2003). "The tyrosine phosphatase Shp-2 mediates intracellular signaling initiated by Ret mutants." Endocrinology **144**(10): 4298-305.
- Dailey, L., et al. (2005). "Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 233-47.
- de Graaff, E., et al. (2001). "Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis." Genes Dev **15**(18): 2433-44.
- de Maximy, A. A., et al. (1999). "Cloning and expression pattern of a mouse homologue of drosophila sprouty in the mouse embryo." Mech Dev **81**(1-2): 213-6.
- Durbec, P., et al. (1996). "GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase." Nature **381**(6585): 789-93.
- Durick, K., et al. (1996). "Mitogenic signaling by Ret/ptc2 requires association with enigma via a LIM domain." J Biol Chem **271**(22): 12691-4.
- Eswarakumar, V. P., et al. (2005). "Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 139-49.
- Feng, G. S. (2007). "Shp2-mediated molecular signaling in control of embryonic stem cell self-renewal and differentiation." Cell Res **17**(1): 37-41.
- Firnberg, N., et al. (2002). "FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region." Dev Biol **247**(2): 237-50.
- Fisher, C. E., et al. (2001). "Erk MAP kinase regulates branching morphogenesis in the developing mouse kidney." Development **128**(21): 4329-38.

Fragale, A., et al. (2004). "Noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 mutants cause EGF-dependent prolonged GAB1 binding and sustained ERK2/MAPK1 activation." Hum Mutat **23**(3): 267-77.

Golden, J. P., et al. (1999). "Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse." Exp Neurol **158**(2): 504-28.

Grimm, J., et al. (2001). "Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation." J Cell Biol **154**(2): 345-54.

Grobstein, C. (1956). "Inductive tissue interaction in development." Adv Cancer Res **4**: 187-236.

Gross, I., et al. (2001). "Mammalian sprouty proteins inhibit cell growth and differentiation by preventing ras activation." J Biol Chem **276**(49): 46460-8.

Grossmann, K. S., et al. (2010). "The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer." Adv Cancer Res **106**: 53-89.

Grossmann, K. S., et al. (2009). "The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) directs Neuregulin-1/ErbB signaling throughout Schwann cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(39): 16704-9.

Hacohen, N., et al. (1998). "sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways." Cell **92**(2): 253-63.

Hanafusa, H., et al. (2004). "Shp2, an SH2-containing protein-tyrosine phosphatase, positively regulates receptor tyrosine kinase signaling by dephosphorylating and inactivating the inhibitor Sprouty." J Biol Chem **279**(22): 22992-5.

Hanna, N., et al. (2006). "Reduced phosphatase activity of SHP-2 in LEOPARD syndrome: consequences for PI3K binding on Gab1." FEBS Lett **580**(10): 2477-82.

Hof, P., et al. (1998). "Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2." Cell **92**(4): 441-50.

Ishibe, S., et al. (2009). "Met and the epidermal growth factor receptor act cooperatively to regulate final nephron number and maintain collecting duct morphology." Development **136**(2): 337-45.

Ishizaka, Y., et al. (1989). "Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2." Oncogene **4**(12): 1519-21.

Jain, S., et al. (2006). "Critical and distinct roles for key RET tyrosine docking sites in renal development." Genes Dev **20**(3): 321-33.

Jain, S., et al. (2004). "Mice expressing a dominant-negative Ret mutation phenocopy human Hirschsprung disease and delineate a direct role of Ret in spermatogenesis." Development **131**(21): 5503-13.

Jarvis, L. A., et al. (2006). "Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases." Development **133**(6): 1133-42.

Jijiwa, M., et al. (2004). "A targeting mutation of tyrosine 1062 in Ret causes a marked decrease of enteric neurons and renal hypoplasia." Mol Cell Biol **24**(18): 8026-36.

Kanai, M., et al. (1997). "Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein." J Biol Chem **272**(10): 6621-8.

Karner, C. M., et al. (2009). "Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis." Nat Genet **41**(7): 793-9.

Ke, Y., et al. (2006). "Conditional deletion of Shp2 in the mammary gland leads to impaired lobulo-alveolar outgrowth and attenuated Stat5 activation." J Biol Chem **281**(45): 34374-80.

Keilhack, H., et al. (2005). "Diverse biochemical properties of Shp2 mutants. Implications for disease phenotypes." J Biol Chem **280**(35): 30984-93.

Klinghoffer, R. A., et al. (1995). "Identification of a putative Syp substrate, the PDGF beta receptor." J Biol Chem **270**(38): 22208-17.

Kontaridis, M. I., et al. (2006). "PTPN11 (Shp2) mutations in LEOPARD syndrome have dominant negative, not activating, effects." J Biol Chem **281**(10): 6785-92.

Kouhara, H., et al. (1997). "A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway." Cell **89**(5): 693-702.

Kress, C., et al. (1990). "Hox-2.3 upstream sequences mediate lacZ expression in intermediate mesoderm derivatives of transgenic mice." Development **109**(4): 775-786.

Kurokawa, K., et al. (2001). "Identification of SNT/FRS2 docking site on RET receptor tyrosine kinase and its role for signal transduction." Oncogene **20**(16): 1929-38.

Kuure, S., et al. (2010). "The transcription factors Etv4 and Etv5 mediate formation of the ureteric bud tip domain during kidney development." Development **137**(12): 1975-9.

Little, M., et al. (2010). "Kidney development: two tales of tubulogenesis." Curr Top Dev Biol **90**: 193-229.

Liu, Y., et al. (2003). "Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development." Dev Biol **261**(1): 10-24.

Lorenzo, M. J., et al. (1997). "RET alternate splicing influences the interaction of activated RET with the SH2 and PTB domains of Shc, and the SH2 domain of Grb2." Oncogene **14**(7): 763-71.

Lu, B. C., et al. (2009). "Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis." Nat Genet **41**(12): 1295-302.

Majumdar, A., et al. (2003). "Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development." Development **130**(14): 3175-85.

Mak, Y. F., et al. (1996). "RET oncogene." Curr Opin Genet Dev **6**(1): 82-6.

Mason, I. J. (1994). "The ins and outs of fibroblast growth factors." Cell **78**(4): 547-52.

Melillo, R. M., et al. (2001). "Docking protein FRS2 links the protein tyrosine kinase RET and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade." Mol Cell Biol **21**(13): 4177-87.

Mendelsohn, C. (2009). "Using mouse models to understand normal and abnormal urogenital tract development." Organogenesis **5**(1): 306-14.

Meyer, T. N., et al. (2004). "Spatiotemporal regulation of morphogenetic molecules during in vitro branching of the isolated ureteric bud: toward a model of branching through budding in the developing kidney." Dev Biol **275**(1): 44-67.

Michael, L., et al. (2004). "Pattern and regulation of cell proliferation during murine ureteric bud development." J Anat **204**(4): 241-55.

Michos, O., et al. (2010). "Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10." PLoS Genet **6**(1): e1000809.

Mohi, M. G., et al. (2007). "The role of Shp2 (PTPN11) in cancer." Curr Opin Genet Dev **17**(1): 23-30.

Neel, B. G., et al. (2003). "The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling." Trends Biochem Sci **28**(6): 284-93.

Niihori, T., et al. (2005). "Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia." J Hum Genet **50**(4): 192-202.

Ohuchi, H., et al. (2000). "FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development." Biochem Biophys Res Commun **277**(3): 643-9.

Ong, S. H., et al. (2000). "FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors." Mol Cell Biol **20**(3): 979-89.

Pan, Y., et al. (2010). "Sprouty2-modulated Kras signaling rescues Shp2 deficiency during lens and lacrimal gland development." Development **137**(7): 1085-93.

Pandey, A., et al. (1995). "The Ret receptor protein tyrosine kinase associates with the SH2-containing adapter protein Grb10." J Biol Chem **270**(37): 21461-3.

Pandey, A., et al. (1996). "Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7." J Biol Chem **271**(18): 10607-10.

Pepicelli, C. V., et al. (1997). "GDNF induces branching and increased cell proliferation in the ureter of the mouse." Dev Biol **192**(1): 193-8.

Perrinjaquet, M., et al. (2010). "Protein-tyrosine phosphatase SHP2 contributes to GDNF neurotrophic activity through direct binding to phospho-Tyr687 in the RET receptor tyrosine kinase." J Biol Chem **285**(41): 31867-75.

Qiao, J., et al. (1999). "FGF-7 modulates ureteric bud growth and nephron number in the developing kidney." Development **126**(3): 547-54.

Roberts, A. E., et al. (2007). "Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome." Nat Genet **39**(1): 70-4.

Rosario, M., et al. (2003). "How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase." Trends Cell Biol **13**(6): 328-35.

Sainio, K., et al. (1997). "Glial-cell-line-derived neurotrophic factor is required for bud initiation from ureteric epithelium." Development **124**(20): 4077-87.

Sanchez, M. P., et al. (1996). "Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF." Nature **382**(6586): 70-3.

Santoro, M., et al. (1990). "The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas." Oncogene **5**(10): 1595-8.

Sariola, H., et al. (2003). "Novel functions and signalling pathways for GDNF." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3855-62.

Saxen, L., et al. (1987). "Early organogenesis of the kidney." Pediatr Nephrol **1**(3): 385-92.

Saxton, T. M., et al. (1997). "Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2." EMBO J **16**(9): 2352-64.

Schubbert, S., et al. (2006). "Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome." Nat Genet **38**(3): 331-6.

Schuchardt, A., et al. (1994). "Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret." Nature **367**(6461): 380-3.

Schuchardt, A., et al. (1996). "Renal agenesis and hypodysplasia in ret-k- mutant mice result from defects in ureteric bud development." Development **122**(6): 1919-29.

Schuringa, J. J., et al. (2001). "MEN2A-RET-induced cellular transformation by activation of STAT3." Oncogene **20**(38): 5350-8.

Shakya, R., et al. (2005). "The role of GDNF/Ret signaling in ureteric bud cell fate and branching morphogenesis." Dev Cell **8**(1): 65-74.

Shi, Z. Q., et al. (2000). "Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity." Mol Cell Biol **20**(5): 1526-36.

Sims-Lucas, S., et al. (2009). "Deletion of Frs2alpha from the ureteric epithelium causes renal hypoplasia." Am J Physiol Renal Physiol **297**(5): F1208-19.

Takahashi, M. (2001). "The GDNF/RET signaling pathway and human diseases." Cytokine & Growth Factor Reviews **12**(4): 361-373.

Takahashi, M., et al. (1985). "Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement." Cell **42**(2): 581-8.

Tartaglia, M., et al. (2006). "Diversity and functional consequences of germline and somatic PTPN11 mutations in human disease." Am J Hum Genet **78**(2): 279-90.

- Tartaglia, M., et al. (2007). "Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome." Nat Genet **39**(1): 75-9.
- Tefft, D., et al. (2002). "mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L700-6.
- Tessarollo, L., et al. (1992). "c-ros: the vertebrate homolog of the sevenless tyrosine kinase receptor is tightly regulated during organogenesis in mouse embryonic development." Development **115**(1): 11-20.
- Watanabe, T., et al. (2004). "Real-time analysis of ureteric bud branching morphogenesis in vitro." Dev Biol **271**(1): 98-108.
- Wong, A., et al. (2005). "Phosphotyrosine 1062 is critical for the in vivo activity of the Ret9 receptor tyrosine kinase isoform." Mol Cell Biol **25**(21): 9661-73.
- Yang, W., et al. (2006). "An Shp2/SFK/Ras/Erk signaling pathway controls trophoblast stem cell survival." Dev Cell **10**(3): 317-27.
- Yosypiv, I. V., et al. (2008). "Downregulation of Spry-1, an inhibitor of GDNF/Ret, causes angiotensin II-induced ureteric bud branching." Kidney Int **74**(10): 1287-93.
- Yu, T., et al. (1998). "Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction." J Neurosci **18**(12): 4684-96.
- Yusoff, P., et al. (2002). "Sprouty2 inhibits the Ras/MAP kinase pathway by inhibiting the activation of Raf." J Biol Chem **277**(5): 3195-201.
- Zhang, S., et al. (2001). "Expression of Sprouty genes 1, 2 and 4 during mouse organogenesis." Mech Dev **109**(2): 367-70.

Zhang, S. Q., et al. (2004). "Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment." Mol Cell **13**(3): 341-55.

Zhao, H., et al. (2004). "Role of fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the ureteric bud." Developmental Biology **276**(2): 403-415.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin den 9.11.2010

Regina Willecke

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Professor Dr. Walter Birchmeier danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können und für die wissenschaftliche Betreuung innerhalb aller Phasen der Dissertationszeit.

Herrn Professor Dr. Rathjen möchte ich hiermit herzlich danken, die Vertretung der Doktorarbeit im Fachbereich Biologie und alle damit verbundenen Arbeiten übernommen zu haben.

Dr. Katja Grossmann, Dr. Odysee Michos, Dr. Benson Lu, und Dr. Christina Cebrian danke ich für ihre Mitarbeit an der Publikation, sowie für ihre vielen guten Ratschläge bezüglich der Mausgenetik und anderer experimenteller Techniken.

Ich bedanke mich bei Angel Quiroga Negreira, Tamara Grigoryan und Sebastian Diecke für die nette Atmosphäre und gute Laune auch an grauen Tagen.

Ganz besonderer Dank gebührt den Korrekturlesern der Arbeit, Dr. Klaus Hellmuth und Julian Heuberger.

Ganz besonderer Dank gebührt natürlich meinen Eltern, Eduard und Sabine Willecke, die immer für mich da sind und die mir schon immer geholfen haben, meine Ziele zu erreichen.

Wahrscheinlich schulde ich den größten Dank Rolf Grummel, für seine Geduld und dafür, dass er seitdem wir uns kennen immer für mich da ist, mich mit allen erdenklichen Mitteln unterstützt und mich immer wieder motiviert hat.