

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6513

In vitro und *in vivo* Studien
zur Funktion des Tumorsuppressorgens *w¹*

Ute Christiane Herzer

Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2000

Zusammenfassung

Das Wilms Tumor Gen 1 (*WT1*) ist ein Tumorsuppressorgen, das bei einem pädiatrischen Nierenkrebs inaktiviert ist. Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer C-terminalen DNA-Bindedomäne, welche aus vier Zinkfingern besteht. WT1 stellt eine Familie verschiedener Isoformen dar, die sich unter anderem in der Insertion von drei Aminosäuren (KTS) zwischen Zinkfinger drei und vier unterscheiden. Die damit verbundene Konformationsänderung verhindert die Bindung von WT1 an eine seiner Konsensussequenzen und resultiert in der Sequestrierung der entsprechenden Isoformen in subnukleären Domänen (*Speckles*).

Das für diese Lokalisation verantwortliche Fragment, die *Speckling*-Domäne, konnte im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden. Diese Domäne ist ausreichend und notwendig, um Wt1 sowie andere Proteine in *Speckles* zu dirigieren. Die *Speckling*-Domäne überlappt außerdem mit der minimalen Repressionsdomäne von Wt1 und stellt ein Mittel zur Analyse der entsprechenden nukleären Domänen und der Funktion der (+KTS)-Isoformen dar.

Wie für viele andere Transkriptionsfaktoren mit nukleärer Lokalisation konnte hier gezeigt werden, daß Wt1 posttranslational durch Phosphorylierung modifiziert wird. Dabei handelt es sich um Phosphorylierung der Aminosäuren Serin und Threonin. Die Modifikation betrifft sowohl den für die DNA-Bindung verantwortlichen C-Terminus des Moleküls als auch den zentralen Bereich von Wt1, welcher die transaktivierende Domäne umfaßt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei der multiplen Phosphorylierung von Wt1 um eine konstitutive oder regulierte Modifikation handelt.

WT1 ist nicht nur ein Tumorsuppressor, sondern auch ein Faktor, der eine zentrale Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. In *wt1*^{-/-}-Mäusen sind verschiedene Organe entweder in ihrer Entwicklung gestört oder fehlen wie die Niere vollständig. Die Inaktivierung von *wt1* resultiert außerdem in einer frühen embryonalen Letalität. Durch Einkreuzen der Mutation in andere Mausstämmen konnte gezeigt werden, daß die Penetranz der *wt1*-Mutation durch mindestens eine weitere Mutation beeinflusst wird, denn die Embryonen mit einem gemischten genetischen Hintergrund überleben bis zur Geburt. Diese *wt1*^{-/-}-Embryonen besitzen nur eine rudimentäre Milz und detaillierte Untersuchungen zeigten, daß die Entwicklung der Milz bereits in einem frühen Stadium gestört ist. Dies ist auf eine erhöhte Apoptoserate im Milzprimordium zurückzuführen und spricht Wt1 eine antiapoptotische Funktion zu.

Mit der Milz konnte somit ein weiteres Organ beschrieben werden, für dessen Ausbildung Wt1 essentiell ist. Wie im Fall der Niere erfolgt auch bei der Entwicklung der Milz eine Differenzierung mesenchymaler zu epithelialen Strukturen. Diese Studie unterstreicht und erweitert damit die Bedeutung von Wt1 bei der Steuerung des genetischen Programmes zur Differenzierung bestimmter embryonaler Gewebe.

In vitro* and *in vivo* studies on the function of the tumorsuppressor gene *wt1

Abstract

The Wilms tumor gene 1 (*WT1*) is a tumorsuppressor gene, which is inactivated in pediatric kidney cancer. It encodes a transcription factor with a C-terminal DNA binding domain, which contains four zinc fingers. WT1 represents a family of several isoforms, which differ among others in the insertion of three amino acids (KTS) between zinc finger three and four. The subsequent conformational change inhibits the binding of WT1 to one of its consensus sequences and results in the sequestration of the respective isoforms in subnuclear domains (*speckles*).

The fragment responsible for this localisation could be identified through this work. This so-called *speckling* domain is sufficient and necessary to direct Wt1 and other proteins into *speckles*. The *speckling* domain overlaps with the minimal repression domain of Wt1 and provides a tool to analyse the respective nuclear domains and the function of (+KTS)-isoforms.

As with many other transcription factors with nuclear localisation, it could be demonstrated that Wt1 undergoes posttranslational modification via phosphorylation of the amino acids serine and threonine. This modification refers to the C-terminal DNA binding domain as well as a central region of Wt1, which comprises the transactivation domain. Within the scope of this work it could not be concluded, whether the phosphorylation is a constitutive or regulated modification.

WT1 is not only a tumorsuppressor, but also a factor, which plays a central role in embryonic development. In *wt1*^{-/-} mice some organs are either impaired in their development or, like the kidney, are completely absent. The inactivation of *wt1* also results in an early embryonic lethality. Crossing of the mutation in other mouse strains showed that the penetrance of the *wt1* mutation is influenced by at least one other mutation, since embryos with a mixed genetic background survive until birth. These *wt1*^{-/-} embryos have only a rudimentary spleen and detailed analysis showed that the development of the spleen is already disturbed at an early stage. This is due to an increased rate of apoptotic cells in the splenic primordium and suggests that Wt1 has an antiapoptotic function.

Thus the spleen is another organ where Wt1 is essential for proper development. As in the case of the kidney, during the development of the spleen a differentiation of mesenchymal to epithelial structures takes place. This study outlines and extends the importance of Wt1 in the regulation of genetic programs critical for the differentiation of certain embryonic tissues.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Krebs und Gene	1
1.2	Tumorsuppressorgene	2
1.3	Wilms Tumor und <i>WT1</i>	2
1.4	<i>WT1</i> -Mutationen und damit assoziierte Krankheiten	3
1.5	Struktur und Isoformen von WT1	4
1.6	Das Expressionsmuster von <i>WT1</i> und seine Rolle während der Embryonalentwicklung	7
1.7	Zielgene von WT1	9
1.8	RNA-Bindung und Spleißen durch WT1?	11
1.9	WT1-interagierende Proteine	12
1.10	Der Einfluß von WT1 auf Zellproliferation und Apoptose	14
1.11	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Bezugsquellen	17
2.1.2	Radiochemikalien	19
2.1.3	Enzyme	19
2.1.4	Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien	19
2.1.5	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	20
2.1.6	Plasmide	21
2.1.7	Oligonukleotide	22
2.1.8	Antikörper	23
2.1.9	Mausstämme	24

2.2	Methoden	24
2.2.1	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren	24
2.2.2	Klonierungstechniken	25
2.2.3	Transformation von Bakterien	26
2.2.4	Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien	26
2.2.5	Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Sequenzierprodukte	27
2.2.6	Zellkultur	28
2.2.7	Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA	28
2.2.8	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen	29
2.2.8.1	Probenerstellung für SDS-PAGE	29
2.2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.2.8.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele	29
2.2.9	Methoden zum Nachweis spezifischer Proteine	30
2.2.9.1	Immunzytochemische Färbung von Zellen	30
2.2.9.2	Transfer von Proteinen auf Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern (<i>Westernblot</i>)	31
2.2.9.3	Radioaktive Markierung und anschließende Immunpräzipitation von Proteinen	31
2.2.9.4	Phosphoaminosäureanalyse	32
2.2.9.5	Phosphopeptidanalyse	33
2.2.10	Methoden zur Präparation von Mäusen und Analyse von Mausgeweben	34
2.2.10.1	Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien	34
2.2.10.2	Genotypisierung von <i>knock out</i> -Mäusen	34

2.2.10.3	Isolation von Mausembryonen	35
2.2.10.4	Blastozystentransfer	35
2.2.11	Anfertigung und Analyse von histologischen Schnitten	36
2.2.11.1	Beschichten von Objektträgern	36
2.2.11.2	Einbetten und Anfertigung von histologischen Schnitten	36
2.2.11.3	Entparaffinierung, Färbung und Entwässerung der Schnitte	37
2.2.12	Nachweis apoptotischer Zellen anhand des TUNEL-Assays unter Verwendung des ApopTag Plus Peroxidase Kits (Appligene, Heidelberg)	37
2.2.13	Immunhistochemische Expressionsanalyse	38
2.2.14	<i>In situ</i> -Hybridisierung embryonalen Gewebes (<i>whole mounts</i>)	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Die <i>Speckling</i> -Domäne von Wt1 umfaßt die Aminosäuren 76-120	41
3.1.1	Identifizierung der <i>Speckling</i> -Domäne	43
3.1.2	Die Aminosäuren 84-177 sind notwendig und ausreichend für die Lokalisation von Wt1 in <i>Speckles</i>	45
3.2	Posttranslationelle Modifikation von Wt1 durch Phosphorylierung	49
3.2.1	Phosphorylierung von Wildtyp- und mutantern Wt1	49
3.2.2	Wt1 ist an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphoryliert	50
3.2.3	Phosphopeptidanalyse von Wildtyp- und mutantern Wt1	52
3.2.4	Wt1 ist an multiplen Stellen phosphoryliert	53
3.3	<i>Wt1</i> ist notwendig für die Entwicklung der Milz	56
3.3.1	Der mit der Inaktivierung von <i>wt1</i> assoziierte Phänotyp ist vom genetischen Hintergrund abhängig	56

3.3.2	In <i>wt1</i> defizienten Embryonen findet keine Entwicklung der Milz statt	57
3.3.3	Wt1 ist ein antiapoptotischer Faktor	60
3.3.4	Während der Milzentwicklung werden <i>wt1</i> und <i>hox11</i> unabhängig voneinander reguliert	63
4	Diskussion	66
4.1	Lokalisation von Wt1 (+KTS) in <i>Speckles</i>	67
4.1.1	Die Identifikation der <i>Speckling</i> -Domäne von Wt1	67
4.1.2	Die <i>Speckling</i> -Domäne als Mittel zur Analyse der Funktion von <i>wt1</i>	69
4.1.3	Dienen die <i>Speckles</i> als Depot für Wt1 (+KTS)-Isoformen?	70
4.2	Wt1 ist posttranslational modifiziert	71
4.3	<i>In vivo</i> Studien zur Funktion von <i>wt1</i>	74
4.3.1	Der Einfluß modifizierender Gene	74
4.3.2	Die Rolle von Wt1 bei der Milzentwicklung	75
4.3.3	Wt1 - ein antiapoptotischer Faktor?	76
5	Abkürzungen	78
6	Literatur	80

1 Einleitung

1.1 Krebs und Gene

Krebs ist eine Erkrankung, deren Ursachen zu einem geringen Anteil in der Vererbung von mutierten Genen liegen und häufig auf äußere Einflüsse zurückzuführen sind. So können z.B. durch das Rauchen Mutationen erworben werden. In Studien bezüglich der Altersabhängigkeit von Krebs konnte gezeigt werden, daß für die Entwicklung einer normalen Zelle zu einer Krebszelle sechs bis sieben Mutationsereignisse stattfinden müssen (Armitage und Doll, 1954). Ein gut dokumentiertes Beispiel hierfür ist die Entstehung des kolorektalen Krebs, bei dem über mehrere Zwischenstufen aus gutartigen Adenomen maligne Karzinome hervorgehen. Die sequentielle Inaktivierung oder deregulierte Expression bestimmter Gene führt dabei zur Progression des Tumors (Kinzler und Vogelstein, 1996).

Das Eintreten multipler Mutationsereignisse kann durch die Inaktivierung eines sogenannten Mutatorgens, dessen Produkt einen Einfluß auf die Integrität des Genoms hat, begünstigt werden. Zu dieser Klasse von Genen gehören u.a. *BRCA1* und *BRCA2* (*breast cancer gene 1* und *2*), die für Faktoren, die in der DNA-Reparatur beteiligt sind, kodieren (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995). Durch eine Mutation in solchen Genen wird die Wahrscheinlichkeit für die Manifestation einer DNA-Schädigung stark erhöht.

Neben den Mutatorgenen sind außerdem Onkogene und Tumorsuppressorgene an der Entstehung von Krebs beteiligt.

Die Produkte von Onkogenen sind meist Faktoren, die an der Vermittlung von Signalen der Zelloberfläche in den Zellkern beteiligt sind. Dabei handelt es sich insbesondere um Signale, welche die Zellproliferation induzieren. Infolge der Modifikation des Genproduktes oder einer deregulierten Expression des Onkogens werden sie aktiviert und bewirken eine unkontrollierte Proliferation.

1.2 Tumorsuppressorgene

Die Tumorentstehung ist nicht nur auf dominante Onkogene zurückzuführen, sondern kann auch mit dem Funktionsverlust von Genen einhergehen. Dies wurde bereits vermutet, als transformierte, tumorigene Zellen mit normalen Zellen fusioniert wurden und einige der Hybridzellen kein transformierendes Potential besaßen. Der tumorigenen Eigenschaft konnte durch Einbringen eines Faktors aus der normalen Zelle entgegengewirkt werden (Harris et al., 1969). Das gehäufte Auftreten bestimmter Tumorarten in Familien sprach ebenfalls für die Existenz von Tumorsuppressorgenen. Dies wurde zuerst für das Retinoblastom, einen Tumor der Augennetzhaut, beschrieben. Die Tatsache, daß dieser Tumor meist in einem Auge und nur selten in beiden Augen auftritt, wobei letzteres familiär gehäuft und früher stattfindet (Cavenee et al., 1983), hat Knudson (1971) zur Aufstellung seiner Zwei-Treffer-Hypothese veranlaßt: er postulierte, daß zwei unabhängige Mutationen in beiden Allelen eines Tumorsuppressorgens stattfinden. Damit kann in erblichen Fällen, bei denen bereits ein Allel in der Keimbahn mutiert ist, ein früheres Auftreten des Tumors gegenüber spontan auftretenden Tumoren erklärt werden. Bei letzteren finden beide Mutationen in einer Körperzelle statt, hier ist eine Tumorentstehung in beiden Augen unwahrscheinlich.

Über die Funktion der einzelnen Tumorsuppressorgene ist meist nur wenig bekannt, es scheint jedoch, daß sie an ganz unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sein können. Das am besten studierte Tumorsuppressorgen ist *p53*, das in 50 % aller Krebszellen mutiert ist. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der genomischen Integrität spielt und deshalb als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane, 1992).

1.3 Wilms Tumor und *WT1*

Wilms Tumor (Nephroblastom), ist ein pädiatrischer Tumor der Niere, der mit einer Häufigkeit von 1 zu 10000 Neugeborenen auftritt (Matsunaga et al., 1981). Er gehört zu den sogenannten embryonalen Tumoren, da er histologisch Geweben gleicht, wie sie während der Organogenese vorzufinden sind. Dies sind Tumore, die durch Mutationen in Genen, die bei der

Embryogenese von Bedeutung sind, eine Rolle spielen. Wilms Tumor tritt meist sporadisch und unilateral auf und nur in den mit 5% eher seltenen erblichen Fällen sind beide Nieren betroffen (Breslow et al., 1996), auch hier bestätigt sich die Zwei-Treffer-Theorie von Knudson (1971).

Die Prädisposition für Wilms Tumor wird mit mindestens drei chromosomalen Loci in Verbindung gebracht. Dabei handelt es sich zum einen um den Bereich 11p15, dem neben dem Wilms Tumor auch das Beckwith-Wiedemann Syndrom zugeordnet wird (Henry et al., 1989; Coppes et al., 1992; Koufos et al., 1989), sowie um den Lokus 16q, der in Wilms Tumoren häufig deletiert ist (Maw et al., 1992). Bei dem WAGR Syndrom (Wilms Tumor, Aniridia, Fehlbildungen des Genitaltraktes und geistige Retardation) konnte eine chromosomale Deletion in der Region 11p13 nachgewiesen werden (Riccardi et al., 1978). Unter Verwendung von Wilms Tumor Material und DNA von WAGR Patienten führte positionelle Klonierung schließlich zur Identifizierung von *WT1*, dem Wilms Tumor Gen 1 (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990). Die mit WAGR assoziierte Deletion betrifft neben *WT1* mindestens zwei weitere Gene: das Aniridiagen Pax 6 (Hill et al., 1991) sowie Reticulocalbin (Kent et al., 1997).

1.4 *WT1*-Mutationen und damit assoziierte Krankheiten

Verschiedene Syndrome mit Defekten in der Entwicklung des Urogenitaltraktes sind mit Mutationen von *WT1* assoziiert (Tab.1). Dazu gehört neben dem WAGR Syndrom das DDS (Denys-Drash Syndrom), bei dem dominant negative Mutationen von *WT1* zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Entwicklungsstörungen des Urogenitaltraktes führen (Pelletier et al., 1991). In dem sehr seltenen Frasier Syndrom führen intronische Mutationen in Spleiß-Erkennungsstellen zur Entstehung von männlichem Pseudohermaphroditismus und starker Glomerulopathie (Barboux et al., 1997; Kikuchi et al., 1998; Klamt et al., 1998).

Auch im adulten Organismus können infolge fehlender oder gestörter *WT1*-Funktion Tumore auftreten. Dazu gehören Mesothelioma, DSRCT (*Desmoplastic small round cell tumor*) und Leukämie. Beim Mesotheliom handelt es sich um einen Tumor, der von Zellen der mesothelialen Auskleidung von Bauch- und Brustraum abstammt (Park et al., 1993). DSRCT kommt durch eine translokationsbedingte Fusion der DNA-Bindedomäne von *WT1* mit der

Einleitung

putativen Transaktivierungsdomäne des *EWS*-Genes (*Ewing sarcoma gene*) zustande. In diesem Fall wandelt sich die Funktion von *WT1* als Tumorsuppressorgen zum dominanten Onkogen (Ladanyi und Gerald, 1994). In 4 von 36 Fällen akuter Leukämie konnten Mutationen in *WT1* festgestellt werden. Dabei handelt es sich um Insertions- bzw. Nonsense-Mutationen, die in verkürzten Proteinen mit fehlender DNA-Bindedomäne resultieren (King-Underwood et al., 1996).

Krankheit	Phänotyp	<i>WT1</i> -Mutation
Wilms Tumor	pädiatrischer Nierentumor	Nonsense-, selten Missense-Mutationen
WAGR Syndrom	Wilms Tumor, Aniridia, Fehlbildung der Genitalien, Geistige Retardation, Prädisposition für Wilms Tumor	Deletion des chromosomalen Abschnittes 11p13
Denys-Drash Syndrom	Pseudohermaphroditismus, Nephropathie, Prädisposition für Wilms Tumor	Missense-Mutationen in der Zinkfingerregion und daraus resultierendes verkürztes Protein
Frasier Syndrom	Pseudohermaphroditismus, Glomerulopathie	Mutationen in der Spleiß-Erkennungssequenz in Exon 9
Mesotheliom	vom Peritoneum abstammender Tumor	Missense-Mutationen in der Transaktivierungsdomäne
DSRCT	Primitiver Tumor mit breitem phänotypischem Spektrum	Fusion der Zinkfinger 2-4 mit dem N-Terminus des <i>EWS</i> -Genes
Leukämie	Akute Leukämie	Meist kleine Insertionen in Exon 1 bzw. 7

Tab.1: Krankheiten, die mit *WT1*-Mutationen assoziiert sind.

1.5 Struktur und Isoformen von WT1

Die Struktur des WT1-Proteins ist in Abb. 1b dargestellt. Es besitzt C-terminal vier Zinkfinger vom Typ Cys2-His2, ähnlich der DNA-Bindedomäne im Produkt des *Krüppel*-Genes von *Drosophila*. Außerdem besteht ein gewisser Grad an Homologie zu den Transkriptionsfaktoren der *EGR* (*early growth response gene*)-Familie, was zu der Vermutung führt, daß WT1 ein Transkriptionsfaktor ist.

Sowohl das murine als auch das menschliche *WT1*-Gen besteht aus 10 Exons, die auf einer ca. 50 kb großen genomischen Sequenz verteilt sind (Abb. 1a). Verschiedene Mechanismen resultieren in einer Vielzahl von *WT1*-Isoformen. Die alternative Verwendung zweier Spleiß-Sequenzen führt zu vier verschiedenen, hauptsächlich vertretenen mRNA-Spezies. Bei der mehr 5' gelegenen Spleiß-Sequenz I handelt es sich um Exon 5, welches für 17 Aminosäuren kodiert, die Spleiß-Sequenz II in Exon 9 führt zum Einfügen dreier Aminosäuren (KTS) zwischen Zinkfinger drei und vier (Haber et al., 1991). In dieser Arbeit werden die vier Spleiß-Formen folgendermaßen beschrieben: *WT1* (-/-) für *WT1* (- Exon 5, - KTS) und entsprechend *WT1* (-/+), *WT1* (+/-) sowie *WT1* (+/+). Bisher gibt es keine Hinweise darauf, daß die alternative Verwendung von Spleiß-Sequenz I funktionelle Konsequenzen besitzt. Für die beiden Spleiß-Formen (+KTS) bzw. (-KTS) jedoch wurde zum einen gezeigt, daß sie eine unterschiedliche Verteilung im Kern aufweisen: (-KTS)-Formen sind homogen im Kern verteilt, während (+KTS)-Formen außerdem in nukleären Subdomänen lokalisiert sind. Die Natur dieser nukleären Kompartimente, sogenannter *Speckles*, ist noch nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, daß ein Zusammenhang mit dem Spleißen besteht, da *WT1* mit Komponenten des Spleißosoms kolokalisiert werden konnte (siehe Abschnitt 1.8) (Larsson et al., 1995). Die beiden Isoformen unterscheiden sich außerdem in ihrer Fähigkeit, an bestimmte DNA-Sequenzen zu binden, denn der Einschluß der drei Aminosäuren zwischen Zinkfinger 3 und 4 verändert die sterische Konformation der DNA-Bindedomäne (Bickmore et al., 1992). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die beiden Isoformen während verschiedener Entwicklungsstadien in einem konstanten Verhältnis zueinander exprimiert werden. Bei Patienten mit dem Frasier Syndrom ist infolge von Mutationen in der Spleiß-Erkennungssequenz eines Allels die Menge an *WT1* (+KTS) reduziert, was zu einer starken Beeinträchtigung der Entwicklung von Nieren und Gonaden führt (Klamt et al., 1998).

Durch sogenanntes Editieren der *WT1*-RNA wird die Zahl der verschiedenen *WT1*-Isoformen in adulten Rattennieren sowie in menschlichen Hoden erhöht. Dabei handelt es sich in einem Teil der Transkripte um die Umwandlung von Uracil839 in ein Cytidin, was zum Austausch von Leucin280 gegen Prolin führt. Da *in vitro* Experimente zeigten, daß die Leucin-Form effizienter den *EGR-1* (*early growth response 1 gene*)-Promotor reprimieren kann, scheint es sich hier um einen Mechanismus zur Inaktivierung von *WT1* zu handeln (Sharma et al., 1994).

Einleitung

Desweiteren wurde die Verwendung alternativer Translationsstarts beschrieben. Dabei handelt es sich zum einen um ein CUG-Kodon 204 bp 5' vom Haupttranslationsstart (Bruening et al., 1996), zum anderen um ein weiteres Translationsstartkodon, 378 bp 3' des eigentlichen Translationsstarts gelegen. Diese N-terminal verkürzten WT1-Isoformen können in verschiedenen Zelllinien, Maushoden sowie Wilms Tumoren nachgewiesen werden (Scharnhorst et al., 1999).

Der N-Terminus, der vor allem in dem die Aminosäuren 1-147 umfassenden Bereich sehr Prolin- und Glutamin-haltig ist, besitzt mehrere funktionelle Domänen. Die Regionen, welche für die Transrepression und Transaktivierung verantwortlich sind, konnten auf die Aminosäuren 84-124 bzw. 180-294 eingegrenzt werden (Wang et al., 1993a). McKay et al. (1999) haben die Funktion dieser Domänen genauer untersucht und konnten zeigen, daß die Repressionsdomäne eine suprimierende Wirkung auf die Aktivierungsdomäne vermittelt. Dies könnte entweder in einer sterischen Konformationsänderung begründet sein, oder auf die Aktivität eines Korepressors zurückzuführen sein.

WT1 besitzt die Fähigkeit zur Selbstassoziation, was durch die N-terminalen Aminosäuren 1-180 vermittelt wird (Englert et al., 1995b; Moffett et al., 1995; Reddy et al., 1995), und bindet vermutlich als Dimer an DNA. Dies wird durch die Beobachtung bekräftigt, daß Proteine mit einer inaktivierten DNA-Bindedomäne einen dominant negativen Wirkungsmechanismus besitzen. Diese in DDS Patienten vorkommenden Mutanten resultieren aus Punktmutationen in der Zinkfingerregion oder vollständige Deletion derselben (Baird et al., 1992). Vermutlich durch Bindung mit ihrem N-terminus an das Wildtyp-Protein, kodiert durch das nicht betroffene Allel, sind sie dazu in der Lage, dessen Bindung an DNA und transkriptionelle Aktivität zu unterbinden (Reddy et al., 1995).

Mindestens zwei Domänen sind dafür zuständig, das Protein in den Kern zu dirigieren. Diese nukleären Lokalisationssignale (NLS) sind unabhängig voneinander und liegen in der DNA-Bindedomäne (Bruening et al., 1996). Für die Existenz eines weiteren NLS spricht die Tatsache, daß auch Mutanten mit deletierter Zinkfingerregion im Kern lokalisiert sind (Englert et al., 1995b).

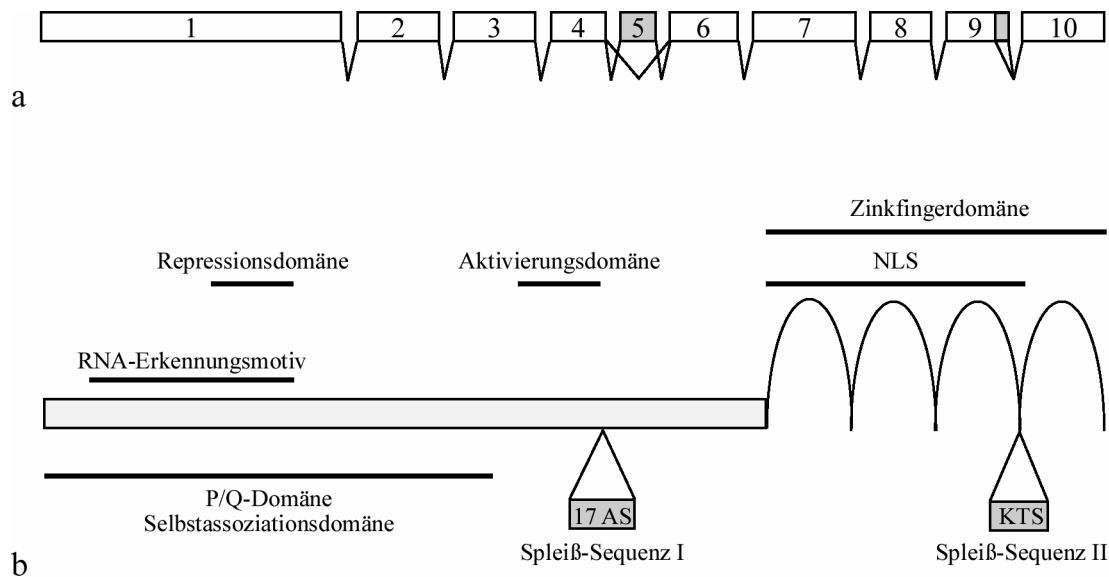


Abb. 1: Die Struktur von WT1: a) mRNA und b) Protein. KTS, Aminosäuresequenz KTS; NLS, nukleäres Lokalisationssignal.

1.6 Das Expressionsmuster von *WT1* und seine Rolle während der Embryonalentwicklung

Die Expression von *WT1* während der Embryonalentwicklung ist vor allem in der Niere genau untersucht. Die Entwicklung dieses Organs wird durch die Interaktion und gegenseitige Induktion des Ureterepithels, das vom Wolffschen Gang abstammt, und des umgebenden metanephrischen Mesenchyms bestimmt. Dabei bewirkt das Mesenchym die Verlängerung und Verzweigung des Ureters. An der Spitze der Ureterknospen wird das Mesenchym zur Kondensierung und Ausbildung eines epithelialen Aggregates induziert (Abb. 2). Dieses verlängert sich zunächst zu einem Komma-förmigen, dann zu einem S-förmigen Tubus. Die Zellen differenzieren unter anderem zu Podozyten und zu distalen sowie proximalen tubulären Zellen. Im folgenden entsteht eine Verbindung dieser Tubuli mit den Ureterknospen und die Ausbildung des Nephrons, der funktionellen Einheit der Niere (Gilbert, 1997).

Die Expression von *WT1* kann bereits im uninduzierten Mesenchym nachgewiesen werden, wohingegen kein *WT1*-Transkript im Ureterepithel vorzufinden ist. Im kondensierten

Einleitung

Mesenchym ist die *WT1*-Expression dann wesentlich stärker und bleibt auf diesem Niveau in den Komma- und S-förmigen Strukturen. In der ausgereiften Niere auch adulter Tiere ist die Expression auf die Podozyten reduziert.

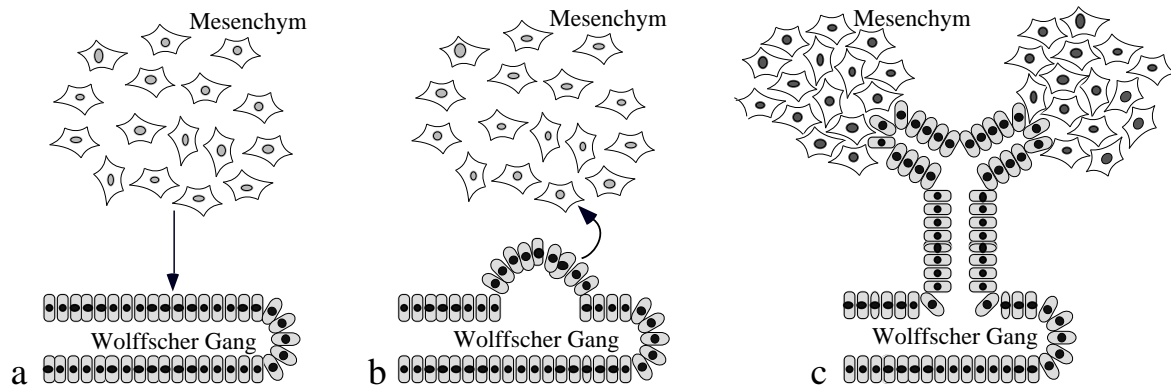


Abb. 2: Frühe Stadien der Nierenentwicklung. Ein induzierendes Signal des Mesenchyms (a) führt zur Ausknospung des Ureters (b) und dieser wiederum induziert die Kondensierung des Mesenchyms um die Ureterspitze (c). Die Schattierung der Nuklei im Mesenchym markiert die Stärke der *WT1*-Expression.

Neben der Niere wird *WT1* auch in der Gonadalleiste, in den sich entwickelnden Gonaden und im ausgewachsenen Organismus in den Sertolizellen bzw. Granulosazellen exprimiert. Bei allen weiteren *WT1* exprimierenden Geweben und Organen ist die Expression auf die Embryonalentwicklung beschränkt. Dazu gehört das Mesothel, welches Herz, Lunge und Thymus umgibt, sowie die mesotheliale Auskleidung der Leibeshöhle. Auch das sich entwickelnde Sklerotom der Somiten und die Milz weisen *WT1*-Transkripte auf. Neben diesen Geweben mesodermalen Ursprungs gibt es auch ektodermale Gewebe mit nachweisbarer *WT1* Expression. Dies sind Neuronen der Neuralleiste sowie eine kleine Region im Dach des vierten Ventrikels (Armstrong et al., 1992; Rackley et al., 1993).

Die gezielte Inaktivierung des *wt1*-Allels führt in homozygoten Mäusen zu embryonaler Letalität im Stadium E13,5-E15,5 (Kreidberg et al., 1993). Diese Embryonen entwickeln keine Nieren und es sind keine Ureterknospen nachweisbar. Das metanephrische Blastem dagegen ist vorhanden, degeneriert jedoch infolge massiver Apoptose innerhalb kurzer Zeit. Dieses Absterben ist nicht im Ausbleiben des induzierenden Signals vom Ureter begründet, sondern

das Resultat der fehlenden *wt1*-Expression. Dies konnte mit Organkulturexperimenten nachgewiesen werden, denn obwohl das Rückenmark einen potenten Induktor des metanephrischen Mesenchyms darstellt (Grobstein, 1955), kann es keine Differenzierung des *wt1* defizienten Gewebes bewirken (Kreidberg et al., 1993).

Auch die Entwicklung der Gonaden der *knock out*-Embryonen ist unterbunden. Die im Wildtyp beobachtete Verdickung des auf dem Mesonephros gelegenen Epithels ist der erste erkennbare Schritt in der Gonadogenese. In den Mutanten ist diese Verdickung reduziert, es findet keine weitere Entwicklung der Gonaden statt.

Außerdem weisen diese Embryonen eine abnorme Entwicklung von Herz und Lungen auf. Beide Organe sind wesentlich kleiner als im Wildtyp. Da Embryonen ohne Nieren bis zur Geburt überleben können (Kleinbrecht et al., 1982), ist anzunehmen, daß die frühe Sterblichkeit in einer fehlenden Funktion des Herzens begründet ist. In der Tat weisen die Tiere starke Ödeme auf, die Wand der Ventrikel ist sehr dünn und im Interperikardialraum befinden sich Blutzellen.

Mesotheliale Strukturen sind ebenfalls durch fehlende *wt1*-Expression beeinträchtigt. Das Diaphragma entwickelt sich nur unvollständig, denn Brust- und Bauchraum sind nicht durchgehend getrennt. Die Störung der *wt1*-Expression führt also zu vielfachen Abnormalitäten in Geweben und Organen, in denen *wt1* vornehmlich exprimiert wird. Heterozygote *knock out*-Mäuse entwickeln sich normal, auch 10 Monate nach der Geburt sind keine Tumore entstanden.

1.7 Zielgene von WT1

Die Bindung von WT1 an DNA wird durch die C-terminale Zinkfingerdomäne vermittelt. Durch Gelretardationsanalyse mit synthetischen DNA-Sequenzen oder sogenannte DNase-*Footprint*-Analyse verschiedener Promotoren wurde mehrfach gezeigt, daß rekombinantes WT1-Protein an verschiedene Sequenzen binden kann. Eine sehr effektive Bindung der (-KTS)-Formen kann man für die Sequenz CGCCCCGC nachweisen, die vom Produkt des *EGR-1* (*early growth response-1 gene*)-Gens erkannt und reguliert wird (Rauscher et al., 1990). In der Tat kann WT1 (-KTS) ebenfalls die Expression von Genen steuern, deren

Einleitung

Promotor diese Sequenz beinhaltet. Dazu gehören u.a. *IGF2* (*insulin-like growth factor 2 gene*), *IGF1-R* (*insulin-like growth factor 1 receptor gene*), *PDGF- α* (*platelet-derived growth factor α gene*), *Pax2* und *CSF1* (*colony stimulating factor gene*) (Drummond et al., 1992; Gashler et al., 1992; Wang et al., 1992; Harrington et al., 1993; Werner et al., 1993; Dey et al., 1994). *In vitro* Analysen zeigten, daß WT1 (-KTS) durch Bindung an die EGR-1-Konsensussequenz als transkriptioneller Repressor fungiert (Madden et al., 1991). Obwohl die (+KTS)-Formen nicht an die EGR-1-Konsensussequenz binden, gibt es andere WT1-Erkennungsstellen, an die diese Isoformen mit der gleichen Affinität wie die (-KTS)-Formen binden (Bickmore et al., 1992). DNase-Footprint-Analyse des *PDGF- α* -Promotors führten zur Identifikation einer weiteren WT1-Bindestelle, die 3' von der EGR-1-Konsensussequenz liegt: (TCC)₄TCTCC. Die Bindung von WT1 an nur eine der beiden Sequenzen resultiert in der Aktivierung des entsprechenden Gens, wohingegen die konzertierte Bindung an beide Sequenzen zur Repression der *PDGF- α* -Expression führt. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, daß WT1 als Dimer an DNA bindet (Wang et al., 1993b).

Die Zahl der putativen Zielgene von WT1 nimmt permanent zu, neben den bereits erwähnten werden hier nun beispielhaft drei Faktoren genannt, deren Regulation durch WT1 erst kürzlich beschrieben wurde: Die Expression des *hTERT*-Genes (*human telomerase reverse transcriptase gene*), der katalytischen Untereinheit des Telomerase Enzyms, wird durch Bindung von WT1 an eine der *WT1*-Konsensussequenz nahezu identische Sequenz im *hTERT*-Promotor reprimiert (Oh et al., 1999). Dies legt nahe, daß die Hemmung der Telomerase-Aktivität in differenzierenden Zellen durch WT1 vermittelt wird und daß die Inaktivierung von *WT1* in der deregulierten *hTERT*-Expression resultiert und dadurch die Tumorentstehung ermöglichen könnte.

WT1 vermittelt jedoch nicht nur die transkriptionelle Repression, sondern kann auch die Expression verschiedener Gene aktivieren. Ein Beispiel hierfür stellt *amphiregulin* dar, ein Mitglied der *EGF* (*epidermal growth factor gene*)-Familie und Ligand des EGF-Rezeptors. Die Expression von *amphiregulin* während der Nierenentwicklung spiegelt die *WT1*-Expression wider (Lee et al., 1999) und unterstreicht die Bedeutung von WT1 während der Nierenentwicklung, denn rekombinantes Amphiregulin kann die Ausknospung epithelialer

Strukturen bewirken und stellt vermutlich einen Vermittler des induktiven Signals des Mesenchyms dar.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß WT1 die Expression von *Dax-1* (*DSS [dosage-sensitive sex reversal]-AHC [adrenal hypoplasia congenita] critical region on the X-chromosome gene 1*), einem entscheidenden Faktor der Gonadalentwicklung, reprimiert (Kim et al., 1999). Dies deutet auf eine wichtige Rolle von WT1 in der Differenzierung der indifferenten Gonade hin.

Allein die Zielgene *hTERT*, *amphiregulin* und *Dax-1* zeigen die Bandbreite des Wirkungsspektrums von WT1 und verdeutlichen, wie WT1 seine Funktion als Tumorsuppressor und wichtiger Faktor der Organogenese vermittelt.

1.8 RNA-Bindung und Spleißen durch WT1?

Viele nukleäre Faktoren, wie auch WT1 (+KTS) sind in distinkten nukleären Kompartimenten vorzufinden, die bei immunzytochemischer Färbung als ein punktförmiges Muster erscheinen. In diesen sogenannten *Speckles* sind sehr häufig Faktoren lokalisiert, die mit der Prozessierung oder Transkription von RNA in Verbindung gebracht werden (Spector, 1993; Lamond und Earnshaw, 1998).

Koimmunopräzipitationsanalysen ebenso wie immunzytochemische Expressionsanalysen konnten zeigen, daß WT1 mit Proteinen des Spleiß-Apparates interagiert bzw. mit ihnen kolokalisiert. Dabei handelt es sich um snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein particles*), das 70 kDa Polypeptid des U1snRNP-Komplexes, das B"-Protein des U2-Komplexes (U2-B"), U2AF65 und p80 coilin (Larsson et al., 1995; Davies et al., 1998). Letzteres ist ein Faktor, der in sogenannten *coiled bodies*, das sind von *Speckles* unterschiedliche nukleäre Kompartimente, vorkommt. Obwohl selbst die Funktion der *coiled bodies* nicht bekannt ist, läßt die Interaktion von WT1 und snRNPs auf eine mögliche Funktion von WT1 beim Spleißen von prä-mRNA schließen. Erhärtet wird dies durch die Tatsache, daß WT1 bestimmte RNA-Sequenzen, z.B. exonische RNA-Sequenzen von *IGF-2*, bindet (Caricasole et al., 1996; Bardeesy et al., 1998). Notwendig hierfür ist die Zinkfingerregion von WT1. Computerbasierende Strukturanalysen dagegen ermittelten ein potentielles RNA-Erkennungsmotiv im N-Terminus von WT1 (Aminosäuren 20-120) (Kennedy et al., 1996).

Einleitung

Bisher gibt es jedoch keine biochemischen Daten, die eine Rolle von WT1 beim Spleißen bekräftigen würden. Eine solche Funktion würde auf keinen Fall einen generellen Mechanismus darstellen, da die Expression von *WT1* sowohl temporal als auch auf bestimmte Gewebe beschränkt ist. Vielmehr könnte dadurch eine spezifische Regulation der Expression bestimmter Zielgene während der Entwicklung ermöglicht werden.

1.9 WT1-interagierende Proteine

Die Funktion eines Proteins kann durch Interaktion mit verschiedenen Proteinpartnern reguliert werden. Dies ist eine Möglichkeit, funktionelle Spezifität auf der Ebene von Organen, Geweben, Zelltypen oder gar subzellulären Kompartimenten festzulegen und eine zeitlich beschränkte Aktivität zu erzielen.

Für verschiedene Proteine konnte mit Hilfe der Koimmunipräzipitationsanalyse oder der *Yeast-two-hybrid*-Analyse gezeigt werden, daß sie mit WT1 interagieren (Abb. 3). Zu diesen Proteinen gehört p53, ebenfalls das Produkt eines Tumorsuppressorgens. Die Expression von *WT1* stabilisiert p53, fördert dessen Bindung an DNA und die damit verbundene Transaktivierung. Außerdem hemmt WT1 die durch p53 vermittelte Apoptose, greift jedoch nicht in den durch p53 eingeleiteten Zellzyklusarrest ein (Maheswaran et al., 1995). *Gadd45* (*growth arrest and DNA-damage inducible gene*) ist ein infolge von DNA-Schädigung exprimiertes Gen, dessen Produkt eine Rolle im G2-Kontrollpunkt des Zellzyklus spielt (Wang et al., 1999; Zhan et al., 1999). Die Aktivierung dieses Faktors durch p53 erfordert die Interaktion von p53 und WT1, denn WT1 bindet an die EGR-1-Konsensussequenz im *gadd45*-Promotor, wohingegen p53 nicht direkt an diesen Promotor bindet (Zhan et al., 1998). Ein weiteres WT1 bindendes Protein ist PAR-4 (*prostate apoptosis response 4*), ein die Expression hemmender Faktor, der durch Bindung an WT1 dessen Funktion als transkriptioneller Aktivator unterbindet und die Repression verstärkt (Johnstone et al., 1996). Im Gegensatz zu den bisher genannten Proteinen, die alle an die Zinkfingerdomäne von WT1 binden, stellt Hsp70 (*heat shock protein 70*) einen Partner für WT1 dar, der mit dessen N-terminaler Domäne interagiert. Das induzierbare Chaperon Hsp70 kolokalisiert mit WT1 in *Speckles* u.a. in embryonalen Nierenzellen der Ratte und in Podozyten der sich entwickelnden

Niere. Die Interaktion dieser beiden Proteine ist wichtig für die Hemmung der Zellproliferation durch WT1 (Maheswaran et al., 1998b).

Daß die Interaktion mit einem Partnerprotein die Funktion von WT1 gewebes- und entwicklungspezifisch steuern kann, zeigt die Bindung an SF-1 (*steroidogenic factor 1*), einen für die Gonadogenese essentiellen Faktor. Auch dieses Zusammenwirken wird durch die N-terminale Domäne von WT1 vermittelt. SF-1 und WT1 binden zusammen an den Promotor von *MIS* (*Müllerian inhibiting substance gene*) und verhindern dadurch die Ausbildung der weiblichen Sexualorgane. Die Tatsache, daß Mutationen im sogenannten Denys-Drash Syndrom mit männlichem Pseudohermaphroditismus assoziiert sind, unterstreicht die physiologische Relevanz dieser Interaktion (Nachtigal et al., 1998).

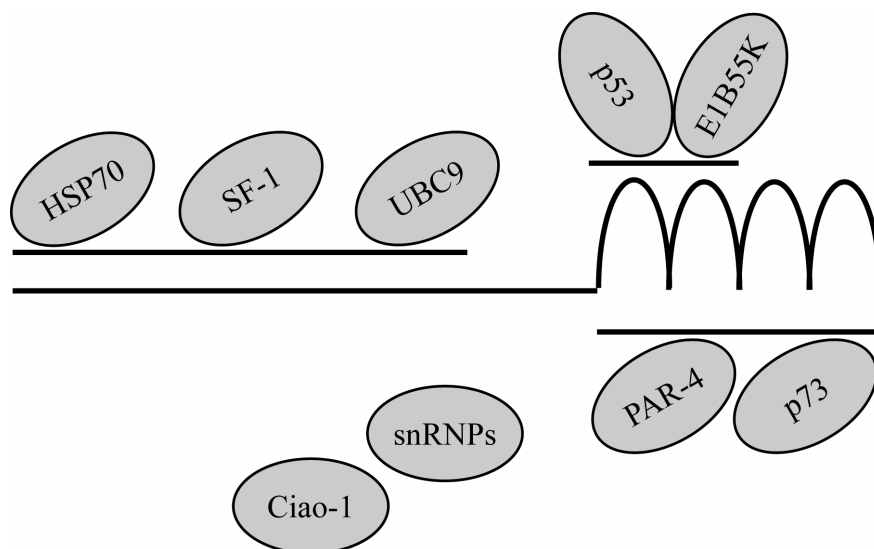


Abb.3: Proteine, die mit WT1 interagieren. Die Bindung an UBC9 (*ubiquitin-conjugating enzyme 9*) sowie an das Hitzeschockprotein HSP70 und an SF-1 wird durch die N-terminale Dimerisierungsdomäne von WT1 vermittelt (Wang et al., 1996; Maheswaran et al., 1998b; Nachtigal et al., 1998). p53 ebenso wie E1B55K, ein Onkoprotein des Adenovirus, interagieren mit den ersten beiden Zinkfingern von WT1 (Maheswaran et al., 1995; Maheswaran et al., 1998a) und die an PAR-4 sowie an p73, ein zu p53 homologes Protein, bindenden Domänen befinden sich innerhalb der Zinkfingerregion (Johnstone et al., 1996; Scharnhorst et al., 2000). Die mit Ciao-1, einem Mitglied der WD40-Proteinfamilie, und den snRNPs interagierende Domäne wurde bislang nicht charakterisiert (Larsson et al., 1995; Johnstone et al., 1998).

1.10 Der Einfluß von WT1 auf Zellproliferation und Apoptose

Die Rolle von WT1 in der Kontrolle der Zellproliferation ist von zentraler Bedeutung und kann Aufschluß darüber geben, wie WT1 seine Funktion sowohl als Tumorsuppressor als auch als wichtiger Faktor in der Embryonalentwicklung ausübt. Einzelne Aspekte bezüglich Wachstumskontrolle, Apoptose oder Zellzyklusarrest wurden bereits beleuchtet, sind jedoch schwierig in einem Gesamtkonzept darstellbar. Ein Grund dafür ist, daß entsprechende Studien in Zellsystemen durchgeführt wurden. Die physiologische Funktion von WT1 im Kontext eines Gewebeverbandes, Organs oder gar Organismus dagegen ist für die einzelnen beschriebenen Phänomene sehr wahrscheinlich von spezifisch vorhandenen Kofaktoren abhängig.

Mit seiner Rolle als Tumorsuppressor geht einher, daß WT1 die Zellproliferation inhibiert. Der zugrunde liegende Mechanismus scheint eine Blockierung des Zellzyklus in der G1-Phase zu sein, da *WT1* überexprimierende Zellen nicht in die S-Phase eintreten (Kudoh et al., 1995). Dabei ist von entscheidender Rolle, welche Spleiß-Variante von WT1 betrachtet wird, denn nur die (-KTS)-Formen können diese Funktion vermitteln (Haber et al., 1993).

Mehrfach wurde untersucht, ob WT1 einen Einfluß auf die Apoptose besitzt, denn bereits im *knock out*-Tiermodell wurde gezeigt, daß bei Inaktivierung von *wt1* das mesonephrische Mesenchym durch Apoptose abstirbt (Kreidberg et al., 1993). Ob dies jedoch ein direkter Effekt von WT1 ist oder vielmehr indirekt durch eine fehlende Induktion der Zellen zur Differenzierung ausgelöst wird, ist nicht klar. Eine Verbindung mit der Apoptose konnte im Zusammenhang mit p53 hergestellt werden, denn WT1 interagiert mit p53, stabilisiert dieses Protein und inhibiert die p53-vermittelte Apoptose (Maheswaran et al., 1995). Außerdem wird WT1 in sporadischen Wilms Tumoren mit *bcl-2* (*B-cell-lymphoma*), einem Inhibitor des programmierten Zelltodes, koexprimiert und induziert durch Bindung an *bcl-2*-Promotorsequenzen dessen Expression (Mayo et al., 1999).

Im Gegensatz dazu scheint WT1 auch an der Induktion der Apoptose beteiligt zu sein. Infolge der Repression des EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptors durch WT1 wird eine erhöhte Apoptoserate beobachtet (Englert et al., 1995a), welcher die durch WT1 vermittelte Induktion

der *p21* (*cyclin-dependent kinase inhibitor gene*)-Expression vorangeht und damit einhergehend eine Blockade des Zellzyklus in der G1-Phase (Englert et al., 1997).

Dies erscheint zunächst verwirrend, doch man muß in Betracht ziehen, daß WT1 vermutlich in mehrere, voneinander unabhängige Prozesse involviert ist, deren Abläufe abhängig vom Kontext des Gesamtorganismus sind.

1.11 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte anhand verschiedener Ansätze die Funktion von *WT1* durch *in vitro* und *in vivo* Studien näher charakterisiert werden:

1. Die alternative Verwendung der (+KTS)-Spleiß-Sequenz hat Einfluß auf die Fähigkeit von WT1, an bestimmte DNA-Sequenzen zu binden und damit die Expression von Zielgenen zu steuern. Bei Patienten mit dem Frasier Syndrom hat die Reduktion von (+KTS)-Spleiß-Formen schwerwiegende physiologische Auswirkungen. Die Tatsache, daß die verschiedenen Spleiß-Formen in unterschiedlichen nukleären Domänen lokalisiert sind, kann als Angriffspunkt für mögliche funktionelle Analysen betrachtet werden. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit die Domäne im WT1-Protein identifiziert werden, welche die (+KTS)-Isoformen in *Speckles* dirigiert.
2. Die sowohl zeitlich als auch räumlich eng begrenzte Expression von *WT1* läßt auf eine Steuerung der WT1-Funktion auf transkriptioneller Ebene schließen. Ob WT1 außerdem durch posttranslationelle Modifikation in seiner Funktion reguliert wird, ist bislang nicht bekannt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß WT1 als Transkriptionsfaktor mit nukleärer Lokalisation wie viele andere Transkriptionsfaktoren eine Veränderung in Form der Phosphorylierung erfährt. Dies sollte im zweiten Teil der Arbeit mit Hilfe eines *in vitro* Systems analysiert werden.
3. Die Inaktivierung von *wt1* resultiert in früher embryonaler Letalität und viele der *wt1*-exprimierenden Organe und Gewebe sind infolge der Mutation in ihrer Entwicklung

Einleitung

beeinträchtigt. Die Ausprägung eines Phänotyps scheint vom genetischen Hintergrund abzuhängen, denn z.B. in *EGF-Rezeptor* (*epidermal growth factor receptor gene*) defizienten Mäusen ist der Phänotyp und auch die Überlebensdauer vom gewählten Mausstamm abhängig (Sibilia et al., 1995, Threadgill et al., 1995). Hier sollte nun untersucht werden, ob dies auch auf *wtl knock out*-Mäuse zutrifft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in pro Analysis (p.A.) Qualität bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit über ein Milli-Q Reinstwasser-System (Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigtem Wasser angesetzt.

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hameln
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bakterienschalen (9cm)	Greiner, Nürtingen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Serva, Heidelberg
Chloroform (p.A.)	Merck, Darmstadt
Chloroform (technisch)	Roth, Karlsruhe
DEAE-Membran, NA45	Schleicher&Schuell, Dassel
Desoxynukleosidphosphate	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid	Fluka, Buchs, Schweiz
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	Gibco, Eggenstein
ECL <i>Westernblotting detection reagents</i>	Amersham, Braunschweig
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Filterpapier 3MM	Bender & Hobein, Karlsruhe
FCS	Gibco, Eggenstein
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Geneticin®-sulphat (G418)	Gibco, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
Hyperfilm XR [®]	Amersham, Braunschweig
Immobilon-P	Millipore, Bedford, MA, USA
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Nürtingen
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Bio Rad, München
Nonidet P-40	Sigma, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Polyacrylamid	Roth, Karlsruhe
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNAse A	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilme (HyperfilmMP)	Amersham, Braunschweig
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Bio Rad, München
Tris-HCl, Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Bio Rad, München
Trypsin	Gibco, Eggenstein
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Whatman 3MM-Papier	Bender & Hobein, Karlsruhe
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth/Karlsruhe, Merck/Darmstadt und Sigma/Deisenhofen bezogen.

2.1.2 Radiochemikalien

Die folgenden Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham, Braunschweig bezogen:

Pro-Mix aus L-[³⁵ S]-Methionin und L-[³⁵ S]-Cystein	14,3 mCi/ml
³² Orthophosphat	10 mCi/ml
[³³ P]-ddNTP	450 µCi/ml

2.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEB, Schwalbach Roche GmbH, Mannheim Promega, Madison, WI, USA
Taq-Polymerase	Gibco, Karlsruhe
T3-, T7-, Sp6-RNA-Polymerase	Gibco, Karlsruhe
T4 DNA-Ligase	Gibco, Karlsruhe

2.1.4 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

E. coli DH5α

Rekombinationsdefekte, suppressive Linie des Bakterienstammes *E. coli*
(supE44delta lacU169δ80lacZdelta M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1)

U2OS	menschliche Osteosarkomazelllinie (<i>p53</i> ^{+/+})
Saos	menschliche Osteosarkomazelllinie (<i>p53</i> ^{-/-})
UB27	U2OS-Zelllinie, die induzierbar die Spliceform <i>wt1</i> (+/-) exprimiert (Englert, 1995a).
UZ9	U2OS-Zelllinie, die induzierbar eine Mutante von <i>wt1</i> exprimiert (kodiert für Aminosäuren 1-326, die Zinkfingerregion ist deletiert) (Englert et al., 1995b)
SD3	Saos-Zelllinie, die induzierbar die Spliceform <i>wt1</i> (+/+) exprimiert (Englert et al., 1995a)
M15	murine mesonephrische Zelllinie (Larsson et al., 1995)
HEK293	menschliche embryonale Nierenzelllinie, mit Adenovirus immortalisiert

Zur Induktion der *wt1*-Expression in den Zelllinien UB27, UZ9 und SD3 wurde das von Gossen und Bujard (1992) entwickelte Tetrazyklinsystem gewählt. Der konstitutiv exprimierte Transaktivator des Operons für Tetrazyklinresistenz kann nur in Abwesenheit

von Tetrazyklin an einen Promotor, der aus dem minimalen Promotor des humanen Cytomegalovirus (P_{hCMV}) und der Bindedomäne für den Transaktivator besteht, binden. Nachgeschaltet ist das Zielgen, dessen Expression durch Zugabe bzw. Entfernung von Tetrazyklin gesteuert wird.

2.1.5 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Vorbemerkung: Falls nicht anders angegeben, handelt es sich bei Prozentangaben in Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern um Volumenprozent (v/v).

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) Glucose

Selektivagar: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) Glucose, 1,5% (w/v) Agar, 100 µg/ml Ampicillin

Standard-Kulturmedium für eukaryontische Zellen:

Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM) wurde mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt.

Kulturmedium für die induzierbaren Zelllinien UB27, UZ9 und SD3:

Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM) wurde mit 10% FCS, 1 µg/ml Puromycin, 0,5 mg/ml Geneticin®-sulfat und 1 µg/ml Tetrazyklin versetzt.

Schwefelfreies Medium: DMEM ohne L-Methionin und ohne L-Cystein

Phosphatfreies Medium: DMEM ohne Phosphat

1 x Laemmli-Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

1 x Laemmli-Probenpuffer: 80 mM Tris pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 8% Glycerin, 2% β-Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau

Na₃VO₄: Zur Herstellung einer 0,1 M Lösung wurden 90 mg Na₃VO₄ in 5 ml H₂O gelöst und mit 70 µl 37 prozentiger HCl versetzt, 10 min bei 100°C gekocht und abgekühlt. Der pH-Wert sollte mindestens 8,5 betragen.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,3

PBS^{-/-} (-Ca/-Mg): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM K₂HPO₄, pH 7,3

RIPA-Puffer: 10 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X 100, 1% DOC, 0,1% (w/v) SDS

Elektrophorese-Puffer pH 1,9: 0,58 M Ameisensäure, 1,36 M Eisessig

Elektrophoresepuffer pH 3,5: 0,87 M Eisessig, 0,5% Pyridin, 0,5 mM EDTA

Hybridisierungspuffer: 0,5 g Boehringer Block (Roche, Mannheim), 25 ml Formamid und 12,5 ml 20 x SSC, pH 7,0 wurden für 1 h bei 65°C gelöst, danach wurden 6 ml H₂O, 5 ml tRNA (10 mg/ml), 100 µl Heparin (50 mg/ml), 250 µl Tween-20 (20%), 500 µl CHAPS (w/v) (10%) und 500 µl EDTA (0,5M) hinzugefügt.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Base, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA

TBE-Puffer: 138 mM Tris-Base, 56 mM Borsäure, 5 mM EDTA

SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na₃Citrat

2.1.6 Plasmide

RC-CMV

Invitrogen, Heidelberg

RC-CMV-HA

In den HindIII/EcoRI geschnittenen Vektor RC-CMV wurde anhand der Oligonukleotide HA-5 und HA-3 eine Hämagglutinin-Erkennungssequenz (HA) eingefügt.

WT1/A-B

In den EcoRI/ApaI geschnittenen Vektor RC-CMV-HA wurde die für Aminosäuren A bis B kodierende Sequenz von *wt1* kloniert. Mit Hilfe der Oligonukleotide p273, p182, p120 bzw. p91 wurde ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) angefügt. Folgende Oligonukleotidkombinationen wurden eingesetzt:

Material und Methoden

Wt1/A-B:	Oligonukleotide:
Wt1/1-273	pHAN / p273
Wt1/1-182	pHAN / p182
Wt1/1-120	pHAN / p120
Wt1/1-91	pHAN / p91
Wt1/76-273	pHA76 / p273
Wt1/99-273	pHA99 / p273

CHD

Die für die Spliceform Wt1(+/-) kodierende Sequenz wurde mit Hilfe der Oligonukleotide pHAN und pZNF3 in den EcoRI/ApaI geschnittenen Vektor RC-CMV-HA kloniert.

CHD Δ 84-177

Durch Schneiden des Plasmids CHD mit BssSI und Religation wurde die für die Aminosäuren 84-177 kodierende Sequenz von Wt1(+/-) deletiert.

WT670

Wt1-Kodons 98-449 in pBluescript II SK (Stratagene, Heidelberg)

pGEMT-hox11

Ein genomisches Fragment von *hox11* wurde unter Verwendung der Oligonukleotide Hox11R und Hox11F (Roberts et al., 1994) in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert.

Wt1 Δ 1-127, Wt1 Δ 124-263, Wt1 Δ 282-364, Wt1 Δ 6-180, Wt1 Δ 235-280

Diese Plasmide kodieren unter der Kontrolle des CMV-Promotors für Wt1-Deletionsmutanten, die mit der HA-Erkennungssequenz fusioniert sind. Sie wurden von D. Haber zur Verfügung gestellt (Maheswaran et al., 1995).

2.1.7 Oligonukleotide

IMR013: 5'- CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC - 3'

IMR014: 5'- AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC 3'

IMR150: 5'- GCC TTC ACC TTG CAC TTC TC - 3'

IMR151: 5'- GCA TTG GGG AAC ATC CTG - 3'

Hoxwt5: 5'- GCT TCG GTA TCG AAC AGA TCC TC - 3'

Hoxwt 3: 5'- CTG CGG TTA CTC TCC ATC CAG G - 3'

Hox11F	5'-AGA GGA ACG TGA GGC CGA GA-3'
Hox11R	5'-GGA TCC CAG AAG CCT TCC GG-3'
HA-5	5'-AGC TTC GCC ATG GCC TAT CCC TAT GAC GTG CCC GAC TAC GCC AGC CTG GGA ATT C-3'
HA-3	5'-AAT TCC CAG GCT GGC GTA GTC GGG CAC GTC ATA GGG ATA GGC CAT GGC GGA AGC TT-3'
pHAN	5'-GGG GGA ATT CGT TCC GAC GTG CGG GAC CT-3'
pHA76	5'-GGG GGA ATT CCC AGC TGG GGC GGC GCC GA -3'
pHA99	5'-GGG GGA ATT CAG TTC ACC GGT ACA GCC GGG G-3'
p91	5'-G GGG GGG CCC TCA TTC TAC CTT TCT CTT CTT TTT GGC GCT CAG GCA CTG CTC CTC-3'
p120	5'-G GGG GGG CCC TCA TTC TAC CTT TCT CTT CTT TTT CGC CTG GCT GGG CGG GGG AGG-3'
p182	5'-G GGG GGG CCC TCA TTC TAC CTT TCT CTT CTT TTT CAT GGG GTC CTC GTG TTT GAA GGA-3'
p273	5'-G GGG GGG CCC TCA TTC TAC CTT TCT CTT CTT TTT ACT CTC GTA CCC TAT ACC GTG GTT-3'

2.1.8 Antikörper

Maus-anti PCNA	Dako, Hamburg.
Kaninchen-anti bcl-2 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus-anti HA (12CA5)	Roche, Mannheim
Kaninchen-anti WT1 (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen-anti WT1 (WTC8)	von Christoph Englert hergestellt und zur Verfügung gestellt
Ziege-anti Kaninchen, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen-anti Maus, HRP konjugiert	Dako, Hamburg
Ziege-anti Maus, Fluorescein-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti Kaninchen, Rhodamin-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti Kaninchen, Biotin konjugiert	VectorLab, Burlingame, CA, USA
Ziege-anti Ratte, Biotin konjugiert	VectorLab, Burlingame, CA, USA
Ziege-anti Maus, Biotin konjugiert	VectorLab, Burlingame, CA, USA

2.1.9 Mausstämme

Alle Mausstämme wurden im Tierstall des Institutes in einem 12 stündigen Lichtzyklus gehalten. Die Tiere hatten freie Verfügung über M/RH-Futter (Sniff, Soest) und Wasser.

C57BL/6J-WT1 ^{tm1Jae}	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57BL/6J-Tlx1 ^{tm1Sjk}	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57/Bl6-OlaHsd (Inzuchtstamm)	Harlan, Winkelmann, Borchon
MF1-HsdOla (Auszuchtstamm)	Harlan, Winkelmann, Borchon

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, dabei wurde die Extinktion der wässrigen Nukleinsäurelösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer gemessen. Die Extinktion bei 280 nm zeigt Verunreinigung durch Proteine an. Das Verhältnis E_{260} zu E_{280} sollte für DNA zwischen 1,8 und 2 liegen. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA oder 20 µg/ml Oligonukleotid.

Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zur nukleinsäurehaltigen wässrigen Lösung wurde ein gleiches Volumen Phenol gegeben und gut durchmischt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt. Die Trennung der beiden Phasen erfolgte durch erneutes Zentrifugieren. Die obere wässrige Phase wurde zur weiteren Verwendung abgenommen.

Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung

Die nukleinsäurehaltige Lösung wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 4,8) auf eine Konzentration von 0,3 M eingestellt. Nach Zugabe von 2,5 Volumina Ethanol erfolgte die Fällung für 30 min bei -20°C oder für 10 min bei -80°C. Das Präzipitat wurde anschließend bei 12.000 g 15 min zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzen wurde mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min zentrifugiert und an der Luft oder im Vakuum-Konzentrator (Speed Vac® Sarvant, Farmingdale, NY, USA) getrocknet.

2.2.2 Klonierungstechniken

Fragmentierung von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen

Für die Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden pro µg Plasmid-DNA mit der Größe von 48 kb 1U Enzym eingesetzt und für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben, andernfalls wurde zuerst der Verdau bei niedrigerer Ionenstärke durchgeführt und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung das zweite Enzym mit entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke zupipettiert. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 1-2 prozentige Agarosegele in TAE-Puffer (mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) benutzt. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei 40-50 mA (70 - 100 V). Bei UV-Bestrahlung wurden die DNA-Banden infolge der Ethidiumbromidfärbung sichtbar.

Elektrophoretische Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach Identifizierung des interessierenden DNA-Fragmentes unter UV-Licht wurde mit einem Skalpell unmittelbar oberhalb bzw. unterhalb der Bande in einer Breite, welche der DNA-Bande entsprach, in das Agarosegel eingeschnitten und ein Stück DEAE-Papier (NA45) geeigneter Größe in den Spalt eingeführt; zwischen Membran und Gel duften sich dabei keine Luftblasen befinden. Anschließend wurde Spannung angelegt (war der Schnitt oberhalb der Bande gesetzt worden, so erfolgte zuvor eine Umpolung) und nach wenigen Minuten unter UV-Licht geprüft, ob die DNA an die Membran gebunden hat. War dies der Fall, wurde die Membran in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml Waschpuffer (0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) überführt und gut durchmischt und anschließend in 450 µl Elutionspuffer (10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) gegeben und für 30 min bei 55°C inkubiert. Nach Entfernen der Membran wurde die DNA nach der beschriebenen Methode präzipitiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis 5:1 (Fragment/Vektor) gemischt, mit 4 µl 5 x Ligasepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 7,6; 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT und 25% (w/v) Polyethylenglycol-8000) und 1-3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Dabei wurde mit H₂O das Volumen der Reaktion auf 20 µl ergänzt und für 16 h bei 15°C inkubiert.

2.2.3 Transformation von Bakterien

Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien (Hanahan, 1986)

Eine Kolonie von *E.coli* XL1-Blue-Bakterien wurde in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C so lange geschüttelt, bis die optische Dichte bei 590 nm einen Wert von 0,3-0,5 erreichte (ungefähr 2 h). Die Bakterienkultur wurde in einem Plastikzentrifugenbecher 15 min auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte fanden bei 4°C statt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 5.000 g wurde der Überstand entfernt, das Bakteriensediment in 10 ml CaCl₂ (50 mM) vorsichtig resuspendiert und in ein vorgekühltes 50 ml Greiner Plastik-Röhrchen überführt. Danach wurde erneut für 10 min bei 5.000 g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml CaCl₂ (50 mM) aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 100 mM CaCl₂ / 20% Glycerol aufgenommen. Die nun kompetenten Bakterien wurden portionsweise bei -80°C aufbewahrt. Die Transformationseffizienz der so präparierten Bakterien liegt bei etwa 1 - 5 x 10⁶ Kolonien pro µg Plasmid-DNA.

Transformation von Bakterien

Hierzu wurde ein auf -80°C aufbewahrtes Aliquot kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl des Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA zugemischt und 30 min auf Eis gestellt. Nach 80 sec Hitzeschock bei 42°C und 3 min auf Eis wurde 3 ml LB-Medium zugegeben und 45 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 3 min bei 1.000 g abzentrifugiert (RT) und in 200 µl LB-Medium gelöst. Die gesamte Menge wurde auf einer Selektiv-Agar-Platte ausgestrichen.

2.2.4 Präparation von rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

Präparation großer Mengen Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Die Präparation wurde nach dem Prinzip der Ionenaustauscher-Säulenchromatographie zur Isolierung von Plasmid-DNA mittels *Qiagen-tip-500 Säulen* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. 250 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (37°C, LB-Kulturmedium, 100 µg/ml Ampicillin) wurden 10 min bei 5.000 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, RNase A 100 µg/ml, pH 8,0) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugegeben und etwa 5 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden 10 ml Puffer 3 (3,0 M Kac, pH 5,5) dazugegeben und für 5 min auf Eis gegeben, danach wurde die Suspension bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Laborwischtuch auf eine mit 10 ml Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7, 0,15 %

Triton X-100) äquilibrierte *Qiagen-tip-500* Säule gegeben. Nach Durchfluß des Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol, pH 7,0) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % Ethanol, pH 8,5) eluiert. Durch Zugabe des 0,7- fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA aus der Lösung gefällt, das Präzipitat bei 13.000 g abzentrifugiert und nach Waschen mit 70 prozentigem Ethanol getrocknet, in Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA (Minipräparation)

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde das Wizard *Mini-prep kit* (Promega, Mannheim) eingesetzt. Dazu wurden 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur (37°C, in LB-Kulturmedium mit 100 µg/ml Ampicillin) 5 min bei 5.000 g abzentrifugiert. Das so erhaltene Bakteriensediment wurde in 200 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A, pH 7,5) aufgenommen, mit 200 µl Lysispuffer (0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS) versetzt und schließlich durch Hinzufügen von 200 µl 1,32 M Kaliumacetat-Lösung neutralisiert. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wurde unter Verwendung der vom Hersteller zur Verfügung gestellten DNA-bindenden Säulen aufgereinigt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O eluiert.

2.2.5 Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Sequenzierprodukte

Unter Verwendung des Thermo-Sequenase-Kits (Amersham, Braunschweig) wurde die Sequenzierung nach der [α -³³P]-ddNTP Methode durchgeführt. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA sowie 2 pmol des entsprechenden Oligonukleotides (T3 bzw. Sp6 Universal-Oligonukleotid) mit 8 U Thermo-Sequenase-Polymerase und 2 µl Reaktionspuffer (260 mM Tris-HCl, pH 9,5, 65 mM MgCl₂) in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Davon wurden jeweils 4,5 µl zu einem vorgelegten Gemisch aus dNTPs (6 µM) und dem entsprechenden [α -³³P]-ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP, 0,06 µM) gegeben und die Reaktion in einer Perkin Elmer 9600 PCR Maschine unter den folgenden Bedingungen inkubiert: Denaturierung bei 95°C, 30 s; Annealing: 55°C, 30 s und Elongation 72°C, 1 min; Gesamtzahl der PCR-Zyklen: 30. Nach Zugabe von 4 µl Stopplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF) wurden vom Gesamtvolumen 3 µl auf einem denaturierenden Polyacrylamid/Harnstoff-Gel, (6% Acrylamid, 1/10 Volumen 10 x TBE, 7 M Harnstoff, 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED) das zur Erwärmung zuvor für 30 min bei 1500 V in 1x TBE-Puffer inkubiert wurde, in 1 x TBE-Puffer bei 1500 V aufgetrennt. Das Gel wurde auf Whatman 3MM Papier für 2 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und über Nacht bei RT gegen einen Röntgenfilm exponiert.

2.2.6 Zellkultur

Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit 0,25% Trypsin (1,5 ml pro 10 cm-Kulturschale) bis zu ihrem Ablösen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurden diese aus dem trypsinhaltigen Medium abzentrifugiert (3 min, 1.000 g) und in neuem Kulturmedium aufgenommen.

Einfrieren und Auftauen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden abtrypsinisiert, abzentrifugiert und in kaltem Einfriermedium (80 % FCS, 20 % DMSO) aufgenommen. Die Zellen wurden zunächst 30 min auf Eis inkubiert und nach einem Tag bei -80°C in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Danach wurden die Zellen in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, abzentrifugiert und zur Kultivierung erneut in Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen verteilt.

Transiente Transfektionen

24 h vor der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen auf einer 6 cm Platte kultiviert. 2 µg der zu transfizierenden DNA wurde mit 10 µl Superfect Transfektionsreagenz (Quiagen, Hilden) in 100 µl DMEM ohne FCS gelöst. Dieses Gemisch wurde 10 min bei RT inkubiert, mit 600 µl DMEM mit FCS versetzt und auf die zuvor mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 2 stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das DNA/Superfect-Gemisch abgesaugt und DMEM mit FCS zugefügt.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation spezifischer Sequenzen aus genomischer DNA

In der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR) wurden ausgehend von zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zu Bereichen des zu untersuchenden Gen-Lokus sind, DNA-Fragmente, die innerhalb der Oligonukleotide liegen, mit der temperaturbeständigen Taq-Polymerase amplifiziert. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen in einem Peltier Thermo Cycler (Biozym, Oldendorf): 1/10 Volumen 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 1/10 Volumen DMSO, 1,5 mM MgCl₂, dNTPs (je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), sequenzspezifische Oligonukleotide (je 0,2 µM), 0,5U Taq-Polymerase und 10-500 ng genomischer DNA wurden mit Wasser auf das Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 30 sec, die Hybridisierung bei der für die verwendeten Oligonukleotide optimalen Temperatur für

30 sec und die DNA-Synthese bei 72°C für 1 min. Nach 33 Zyklen wurden die Amplifikationsprodukte durch gelelektrophoretische Auftrennung überprüft.

2.2.8 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen

2.2.8.1 Probenerstellung für SDS-PAGE

Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in RIPA-Puffer lysiert. Das Zellysate wurde anschließend zur Scherung der DNA mit Ultraschall behandelt (mittels eines Branson sonifier, Heinemann, Schwäbisch Gmünd). Dabei wurden alle Arbeitsgänge bei 4°C durchgeführt. Vor Auftragen der Proben wurden diese 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Aus einer Proteinlösung wurden 2 µl entnommen und mit 1 ml einer 1:5 mit H₂O verdünnten Proteinassay-Lösung (Bradford-Reagenz, Bio Rad, München) vermischt und die Absorption spektrometrisch bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve, welche durch Messen bekannter Mengen an BSA erstellt wurde, ließ sich die Konzentration der Proteinlösung bestimmen.

2.2.8.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele

Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem 5 prozentigen Sammelgel und einem 12 prozentigen Trenngel und wurden zwischen zwei durch Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten vertikal gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen mit Agarose abgedichtet. Für die Trenngellösung wurden 390 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS und 12 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) durch Zugabe von 0,1% (w/v) APS und 0,04 % TEMED polymerisiert. Das Gel wurde bis zu einer Höhe von 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen. Bis zum Auspolymerisieren des Trenngels wurde es mit Ethanol überschichtet. Für die Sammelgellösung wurden 130 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS und 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) mit 0,1% (w/v) APS und 0,1% TEMED versetzt. Das Sammelgel wurde nach Entfernen des Ethanols auf das Trenngel gegossen und ein geeigneter Kamm zum Aussparen der Probenfächer eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden mit 1/4 Volumen 4 x Laemmli-

Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und in die vom Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (Amersham, Braunschweig) mit vorgefärbten Proteinen auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten und dann bei 35 mA bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Nach der Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Immobilon-P-Membran übertragen (siehe *Westernblot*).

2.2.9 Methoden zum Nachweis spezifischer Proteine

2.2.9.1 Immunzytochemische Färbung von Zellen

Kultivierung und Behandlung der Zellen

Je ein Deckgläschen (22 x 22 mm) wurde abgeflammt und in eine 3,5 cm Kulturschale gelegt. 3×10^5 Zellen pro Schale wurden 24 h vor der Transfektion mit Superfect Transfektionsreagenz ausgesät und konnten 48 h nach der Transfektion immunzytochemisch gefärbt werden.

Fixierung und immunzytochemische Färbung von Zellen

Zur folgenden Behandlung wurden die Deckgläschen in der Kulturschale belassen und die Lösungen durch Absaugen entfernt.

Zunächst wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und für 20 min mit 4% PFA in PBS fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 mM Glycin in PBS (PBS-Gly) erfolgte eine 5 minütige Inkubation mit einprozentigem NP40 in PBS-Gly, erneutes zweimaliges Waschen mit PBS-Gly und Blocken mit 3 prozentigem BSA in PBS (Blockierlösung) für 30 min. Anschließend wurde die Detektion spezifischer Proteine mit den entsprechenden Primäantikörpern durchgeführt (WTC19 1:100, anti-HA-Antikörper 1:5). Dazu wurde der Antikörper in der benötigten Weise mit Blockierlösung verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 1 h Inkubation und 2 mal Waschen mit PBS-Gly erfolgte die Inkubation mit dem mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundäantikörper (1:300 in Blockierlösung). Nun wurden die Zellen 2 mal mit PBS-Gly und 2 mal mit PBS gewaschen und für 2 min mit Hoechstfarbstofflösung in PBS (5 µg/ml) behandelt. Danach wurde erneut 2 mal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen wurden mit Einschlußmedium (Dako, Hamburg) auf Objektträger montiert und bis zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.9.2 Transfer von Proteinen auf Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern (Westernblot)

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransfer-Kammer (Trans-Blot, Bio Rad, München) auf eine Immobilon-P-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran auf das Gel gelegt und luftblasenfrei zwischen je zwei Lagen Whatman 3MM-Papier, mit Transfer-Puffer (20 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,01% (w/v) SDS, 10 % Methanol) befeuchtet, in eine Trägerplatte montiert. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt, so daß die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 300 mA. Nach beendetem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei Raumtemperatur in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver geschwenkt.

Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (1:1000 in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver) luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dann viermal für 3 min in PBS mit 0,3% Tween 20 gewaschen und danach, analog zur ersten Antikörperbehandlung, mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:2500 verdünnt in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver) für eine Stunde inkubiert. Nach viermaligem Waschen für jeweils 3 min in PBS mit 0,3% Tween 20 wurden die spezifisch erkannten Proteine durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Hierzu wurde die Membran mit einer frischbereiteten 1:1-Mischung der ECL *Westernblot* Nachweisreagenzien (Amersham, Braunschweig) beschichtet und in Folie eingeschlagen. Anschließend wurde so lange ein Röntgenfilm exponiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

2.2.9.3 Radioaktive Markierung und anschließende Immunpräzipitation von Proteinen

Kultivierung und Behandlung der Zellen

Ca. 48 h vor der radioaktiven Markierung wurden stabile, induzierbare Zellen (UB27, UZ9) in einer Dichte von 8×10^5 Zellen auf eine 10 cm Schale gegeben, außerdem wurden 293 Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Die stabilen, induzierbaren Zellen wurden etwa 16 h vor der Markierung durch 4maliges Waschen mit PBS und Zugabe von Medium ohne Tetrazyklin induziert.

***In vivo*-Markierung mit ^{32}P und ^{35}S**

Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS wurde für die Markierung mit ^{35}S 3 ml schwefelfreies DMEM-Medium bzw. für die Markierung mit ^{32}P 3 ml phosphatfreies

Medium, jeweils mit 10% dialysiertem FCS, auf die Zellen gegeben. Nach 20 min wurden pro Schale 100 μCi [^{35}S]-Promix bzw. 0,5 mCi $^{32}\text{Orthophosphat}$ zu stabil transfizierten Zellen und 1 mCi $^{32}\text{Orthophosphat}$ zu transient transfizierten Zellen gegeben. Anschließend wurde für 3,5 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Immunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen (nicht jedoch die 293-Zellen, da sie sich leicht von der Gewebeschale lösen), in 500 μl RIPA-Puffer (versetzt mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 1 mM PMSF und 1 mM Na_3VO_4) aufgenommen und zur Scherung der DNA durch eine 0,4 x 20 mm Kanüle (Braun, Melsungen) mehrfach auf und ab gezogen. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 13.000 g (4°C) wurde der Überstand zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in ein Reaktionsgefäß gegeben, in dem Protein A Sepharose vorgelegt war. Dafür wurden zuvor 50 μl einer 3 prozentigen Protein A Sepharose-Lösung 2 mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1 min bei 1.0000 g) und der Überstand verworfen. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C in rotierenden Behältern wurde für 30 sec bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, in dem Protein A Sepharose und der spezifische Antikörper (1 μg WTC19 oder 5 μl WTC8 Serum oder 100 μl anti-HA-Antikörper in Hybridomzellüberstand) vorgelegt waren. Auch hier war die Protein A Sepharose in der beschriebenen Weise behandelt worden. Nun folgte eine 3 stündige Inkubation bei 4°C in einem rotierenden Gefäß. Anschließend wurde 30 sec bei 13.000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 500 μl RIPA-Puffer zum Waschen aufgenommen. Dies wurde 3 mal wiederholt, die sedimentierte Protein A Sepharose dann mit einer 0,4 x 20 mm Kanüle trocken gesaugt und 40 μl 1 x Lämmli-Puffer zugegeben. Anschließend wurde für 5 min bei 95 °C inkubiert, gut geschüttelt, 30 sec bei 13.000 g abzentrifugiert und erneut bei 95°C für 5 min inkubiert. Nach weiterem Zentrifugieren bei 13.000 g (30 sec) konnte der Überstand auf ein 12 prozentiges SDS-PAGE Gel aufgetragen werden. Die Proteine wurden bei 50 V über Nacht aufgetrennt und danach auf eine Immobilon-P-Membran überführt (siehe *Western blot*). Die Membran wurde in Folie eingeschlagen und auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.9.4 Phosphoaminosäureanalyse

Die Banden der mit ^{32}P markierten Proteine wurden aus der Membran ausgeschnitten und in H_2O gewaschen. Die Filterstücke wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, getrocknet und in einem Szintillationsgerät konnte die Aktivität gemessen werden. Anschließend erfolgte die Hydrolyse der Proteine durch Zugabe von 300 μl 6N HCl und 1 h Kochen bei 110°C. Danach wurden unlösliche Partikel abzentrifugiert, das Hydrolysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuum-Konzentrator (Speed Vac®, Sarvant, Farmingdale, NY, USA)

lyophilisiert. Das Sediment wurde in 5 µl H₂O aufgenommen und zusammen mit 1 µl Phosphoaminosäurestandard-Lösung (P-Serin, P-Threonin und P-Tyrosin je 300 ng/µl) auf einen Punkt jeweils 2 cm vom unteren und linken Rand einer Dünnschichtchromatographie-Platte (Schleicher&Schuell, Dassel) aufgetragen. Dazu wurden jeweils kleinste Mengen aufpipettiert und mit einem Fön getrocknet um die Auftragsfläche möglichst klein zu halten und eine Diffusion in der Zellulosematrix zu verhindern. Anschließend wurde die Platte mit dem Laufpuffer für die 1. Dimension (Elektrophoresepuffer pH 1,9) befeuchtet und so in eine horizontale, gekühlte Hochspannungselektrophoresekammer gelegt, daß sich die Aminosäuren bei einer Spannung von 1 kV für 1 h zur Anode bewegten. Danach wurde die Platte getrocknet, mit dem Laufpuffer für die 2. Dimension befeuchtet (Elektrophoresepuffer pH 3,5) und um 90°C gedreht erneut in die Elektrophoresekammer gelegt. Nun wurde eine Spannung von 1,3 kV für 20 min angelegt. Die Platte wurde nach dem Trocknen mit 0,25 prozentigem Ninhydrin besprüht und für mehrere Tage einem Röntgenfilm exponiert. Anschließend konnten die Signale auf dem Röntgenfilm mit den durch Ninhydrin sichtbar gemachten Phosphoaminosäurestandards verglichen und zugeordnet werden.

2.2.9.5 Phosphopeptidanalyse

Zur Eingrenzung phosphorylierter Domänen innerhalb eines Proteins wurden phosphorylierte Proteine aus der Membran geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 0,5% Polyvinylpyrrolidin-360 in 100 mM Essigsäure folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde das Filterstück zunächst in H₂O, dann in 0,05 M NH₄HCO₃-Lösung getaucht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in 100 µl 0,05 M NH₄HCO₃-Lösung sowie 5 µl 100% Trypsinlösung (Roche, Mannheim) bei 37°C inkubiert. Nach 5 h wurden erneut 5 µl Trypsinlösung hinzugefügt und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Die Peptidlösung wurde daraufhin abgenommen und das Membranstück mit 1 ml H₂O gewaschen. Peptidlösung und H₂O wurden vereinigt und die Peptide im Vakuum-Konzentrator (Speed Vac®, Sarvant, Farmingdale, NY, USA) eingetrocknet, 3 x mit H₂O gewaschen und lyophilisiert. Zur Oxidation der Peptide wurden zunächst 900 µl 100 prozentige Ameisensäure mit 100 µl 30 prozentiger H₂O₂-Lösung gemischt und 1 h bei RT inkubiert. 50 µl der so entstandenen Perameisensäure wurden auf die getrockneten und gekühlten Peptide gegeben und 1 h bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes H₂O hinzugefügt, gut durchmischt und auf Trockeneis gegeben. Die Peptide wurden erneut eingetrocknet und dann mit 500 µl Elektrophoresepuffer pH 1,9 versetzt. Anschließend wurde für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut unter Vakuum eingedampft. Die Peptide wurden nun in 5 µl Elektrophoresepuffer pH 1,9 aufgenommen und wie unter Punkt 2.2.9.4 beschrieben auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und bei einer Spannung von 750 V für 30 min elektrophoretisch in Elektrophoresepuffer pH

1,9 aufgetrennt. Die Dünnschichtplatte wurde nach dem Trocknen um 90°C gedreht, in eine Chromatographiekammer gestellt und dort belassen bis 4/5 der Platte vom Chromatographiepuffer (37,5% N-Butanol, 0,5% Pyridin, 1,3 M Essigsäure) befeuchtet waren. Nach dem Trocknen wurde ein Röntgenfilm exponiert.

2.2.10 Methoden zur Präparation von Mäusen und Analyse von Mausgeweben

2.2.10.1 Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien

Um Embryonen eines bestimmten Embryonalstadiums zu erhalten wurden jeweils weibliche Mäuse eines heterozygoten *knock out*-Stammes (*Wt1*^{+/-} und *Hox11*^{+/-}) mit männlichen Tieren des gleichen Stammes am späten Nachmittag verpaart. Bei Vorhandensein eines Vaginalpfropfs (*vaginal plug*) am folgenden Morgen wurde der Mittag als Stadium der Embryonalentwicklung E0,5 angenommen, da die cervixstimulierte Ovulation der weiblichen Mäuse, die in einem 12 Stundentag-Rhythmus gehalten werden, in der Mitte der Dunkelphase stattfindet.

2.2.10.2 Genotypisierung von *knock-out*-Mäusen

Isolation von genomischer DNA

Für die Bestimmung des Genotyps der Embryonen oder geborenen Nachkommenschaft der Mauslinien wurde zunächst aus Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Tiere genomische DNA isoliert. Dazu wurden die Biopsien in 500 µl *tail buffer* (100 mM Tris-base pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% (w/v) SDS, 200 mM NaCl) unter Zugabe von 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C über Nacht verdaut. Durch Zugabe von 250 µl 5M NaCl-Lösung und anschließendem 2 minütigem Schütteln wurden die Proteine ausgefällt und durch Zentrifugation (13.000 g, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und für 2 min bei RT geschüttelt. Durch 15 minütige Zentrifugation bei 4°C wurde die ausgefallene genomische DNA pelletiert, mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in geeigneter Menge H₂O aufgenommen.

PCR mit Genlokus-spezifischen Oligonukleotiden zur Identifikation des Genotyps

Zur Identifikation des Genotyps der Mäuse der *wt1*^{-/-}-Linie wurde durch PCR mit den *wt1* spezifischen Oligonukleotiden IMR150 und IMR151 ein 122 bp großes Fragment für das Wildtyp-Allel und mit den für die Neomycinresistenz-Kassette spezifischen Oligonukleotiden

IMR013 und IMR014 ein 280 bp großes Fragment für das *knock-out*-Allel amplifiziert (Abb. 4a).

Der *knock out*-Lokus der Mäuse aus der *hox11*^{-/-}-Linie wurden ebenfalls unter Verwendung der für die Neomycinresistenz-Kassette spezifischen Oligonukleotide identifiziert, das Wildtyp-Allel wurde durch Amplifikation eines 499 bp großes Fragment mit Hilfe der Oligonukleotide Hoxwt5 und Hoxwt3 nachgewiesen (Abb. 4b).

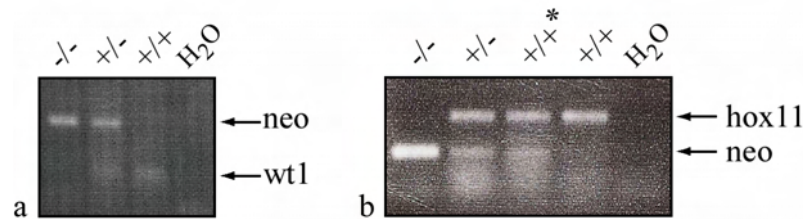


Abb. 4: Genotypisierung der Embryonen aus der Verpaarung von *wt1*^{+/-} - (a) bzw. *hox11*^{+/-} -Elterntieren (b). Amplifikation spezifischer Sequenzen der Neomycinresistenz-Kassette (neo) sowie des *wt1*- bzw. *hox11*-Wildtyp-Allels in *knock out*- (-/-), Wildtyp- (+/+) sowie heterozygoten Embryonen (+/-). * Diese DNA stammt aus einem *wt1*^{+/-}-Embryo, d.h. Wildtyp in Bezug auf *hox11*.

2.2.10.3 Isolation von Mausembryonen

Schwangere Weibchen wurden durch Luxation der Halswirbelsäule getötet und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Der Uterus wurde entnommen und die Embryonen herauspräpariert. Dabei wurden sowohl die embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) als auch die Plazenta entfernt und zur Genotypisierung ein Stück des Schwanzes abgetrennt. Anschließend wurden die Embryonen in Einbettkassetten (Histosette, Simport, Quebec, Can.) überführt und über Nacht bei 4°C in 4% PFA in PBS^{-/-} fixiert oder für die Präparation von Fibroblasten eingesetzt.

2.2.10.4 Blastozystentransfer

Embryonen des Blastozystenstadiums (E2,5) wurden aus den Uteri gespült und in M2-Medium (Sigma, Deisenhofen) gegeben. Weibchen des Mausstammes MF1, die 1,5 Tage zuvor einen vaginalen Pfropf von einem vasektomierten Männchen erhalten hatten, wurde unter Narkose (15 µl pro g Körpergewicht einer 2,5 prozentigen Avertin-Lösung in PBS) seitlich die Bauchhöhle geöffnet, die Blastozysten in den Uterus injiziert und wieder zugenäht. Nach

weiteren 16 Tagen wurde ein Kaiserschnitt durchgeführt, d.h. die Embryos wurden am Tag E18,5 ihrer Entwicklung entnommen und analysiert.

2.2.11 Anfertigung und Analyse von histologischen Schnitten

2.2.11.1 Beschichten von Objektträgern

Die Objektträger wurden nacheinander jeweils für 10 sec in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan (Fluka, Buchs, Schweiz), Aceton und H₂O getaucht und anschließend für 2 h bei 80°C getrocknet.

2.2.11.2 Einbetten und Anfertigung von histologischen Schnitten

Die fixierten Embryonen wurden für jeweils 1 h zunächst in PBS^{-/-} und anschließend in 50 prozentiges Ethanol gegeben. Die weitere Entwässerung und die darauffolgende Einbettung in Paraffin erfolgte in einem Gewebereinbettautomaten (Hypercenter XP, Shandon, Frankfurt) mit folgenden Schritten:

70% Ethanol	1 x 30min
95% Ethanol	3 x 15 min
100% Ethanol	1 x 15 min, 2 x 30 min
Xylol	2 x 30 min
Histowax (Leica, Nussloch) bei 60°C	2 x 40 min

Nach Ablauf dieser Prozedur wurden die Embryonen aus den Kassetten genommen und in vorgewärmte Einschlußformen (LaboNord, Mönchengladbach) gelegt. Diese Formen wurden mit flüssigem Wachs (Histowax, 60°C) aufgefüllt und eine Einbettkassette aufgedrückt. Nach Erkalten des Wachses wurden die Wachsblöcke aus den Einbettformen genommen. Das Loslösen des Wachsblockes wurde, nachdem das Wachs auf RT abgekühlt war, durch Abschrecken auf Eis unterstützt.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Wachsblöcke in die Halterung eines Mikrotoms (Leica, Nussloch) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden dann 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42°C geglättet und auf die beschichteten Objektträger transferiert.

2.2.11.3 Entparaffinierung, Färbung und Entwässerung der Schnitte

Die Behandlung der Schnitte wurde automatisch durchgeführt (Varistain XY, Shandon, Frankfurt), dabei waren die einzelnen Schritte folgendermaßen programmiert:

Entparaffinierung:

Xylol	2 x 5 min
100% Ethanol	1 min
95% Ethanol	2 x 1 min
70% Ethanol	1 min

Färbung:

Leitungswasser	2 min
Hämatoxylin	1 min
(GILL II, Surgipath, Richmond, IL, USA)	
Leitungswasser	5 min
Eosin	1 min
(Accustain™, Sigma, Deisenhofen)	

Entwässerung:

70% Ethanol	2 x 1 min
95% Ethanol	2 x 1 min
100% Ethanol	2 x 1 min
Xylol	2 x 1 min

2.2.12 Nachweis apoptotischer Zellen anhand des TUNEL-Assays unter Verwendung des ApopTag Plus Peroxidase Kits (Appligene, Heidelberg)

Entparaffinierte Schnitte wurden in PBS überführt und anschließend für 15 min mit Proteinase K (20 µg/ml in PBS) inkubiert. Nach zwei Waschschritten in H₂O für je 2 min wurden die Schnitte für 5 min mit H₂O₂-Lösung (3% in PBS) behandelt und dann 2 x 5min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Equilibrierungspuffer bedeckt, welcher nach ca. 1 min wieder entfernt wurde. Dann folgte die Enzymreaktion durch Zugabe der TdT-Enzymlösung (3 Teile Enzym und 7 Teile Reaktionspuffer). Nach einstündiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C wurde die Reaktion durch 10 minütiges Einwirken des Stop/Wasch-Puffers (1:35 verdünnt in H₂O) beendet. Nun wurde 3 x 1 min in PBS gewaschen, das Anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat auf die Schnitte gegeben und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde 4 x 2 min in PBS gewaschen, das Peroxidase-Substrat (50 x DAB-Substrat 1:50 in DAB Verdünnungspuffer) hinzugefügt und nach 6 min durch Waschen in H₂O für 3 x 1 min und 1 x 5 min wieder entfernt. Die Gegenfärbung des

Gewebes erfolgte mit 0,5% (w/v) Methylgrün, danach wurden die Schnitte 3 x 10 sec und 1 x 30 sec in H₂O gewaschen und automatisch entwässert. Das Eindeckeln erfolgte ebenfalls maschinell (Consul, Shandon, Frankfurt) mit CV Mount (Leica, Nussloch). Zur Auswertung wurde die Anzahl apoptotischer Zellen pro Fläche des untersuchten Gewebes bestimmt.

2.2.13 Immunhistochemische Expressionsanalyse

Entparaffinierte Schnitte wurden 2 x 2 min in PBS gewaschen, für 10 min bei 37°C mit 2 M HCl behandelt, erneut 2 x 2 min in PBS gewaschen und mit 0,1 prozentiger H₂O₂-Lösung 15 min inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift umrandet und nach zweimaligem Waschen in PBS für 2 min zunächst mit Avidin und dann mit Biotin (Avidin/Biotin Blocking Kit, VectorLab, Burlingame, CA, USA) jeweils für 15 min inkubiert. Zum Blockieren unspezifischer Proteine wurde eine 5 prozentige Serumlösung (Blockierlösung) auf die Schnitte gegeben. Dabei wurde das verwendete Serum abhängig vom Sekundärantikörper gewählt. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 3 min folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:100 in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen, eine Verdünnung des biotinylierten Sekundärantikörpers (1:1000 in Blockierlösung) eingesetzt und nach einer Stunde mit PBS gewaschen, erneut 3 x 5 min. Nun wurde ein Avidin-Peroxidase-Komplex (VectorLab, Burlingame, CA, USA), welcher 30 min zuvor angesetzt worden war, auf die Schnitte gegeben. Dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 5 min wurde gefolgt von der Färbung mit einer DAB-Lösung (VectorLab, Burlingame, CA, USA). Anschließend wurden die Schnitte entwässert und zum Eindeckeln mit CV Mount (Leica, Nussloch) in das entsprechende Gerät gegeben (Consul, Shandon, Frankfurt).

2.2.14 In situ-Hybridisierung embryonalen Gewebes (whole mounts)

Präparation der Digoxigenin-markierten Sonde

Zur Linearisierung wurde das Plasmid *pGEM-T-hox11* mit der Restriktionsendonuklease ApaI zur Herstellung der *Hox11*-antisense Hybridisierungssonde (mit Sp6-RNA-Polymerase) und mit BstXI zur Herstellung der *Hox11*-sense Sonde (mit T7-RNA-Polymerase) geschnitten. Das Plasmid *WT670* wurde mit EcoRI für die Synthese der *WT1*-antisense Sonde (mit T7-RNA-Polymerase) und mit HindIII für die Synthese der *WT1*-sense Sonde (mit T3-RNA-Polymerase) geschnitten. Der Verdau wurde gelelektrophoretisch überprüft und die linearisierte DNA einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen und gefällt. Anschließend wurde die DNA in geeigneter Menge DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Die Transkriptionsreaktion setzte sich folgendermaßen zusammen: 1 µg DNA, 4 µl

5 x Transkriptionspuffer (200 mM Tris pH 8,0, 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 50 mM NaCl, 20 mM Spermidin, 250 µg/ml BSA) 2 µl 10 x *Labellingmix* (je 10 mM ATP, CTP und GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM Dig-11-UTP, pH 7,5) 1 µl RNAsin (Promega, Mannheim) und 2 µl der entsprechenden RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde 1 µl auf einem Agarosegel überprüft. Infolge Zugabe von 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl 100% Ethanol wurde die RNA 30 min auf Eis gefällt und durch 30 minütige Zentrifugation bei 13.000 g und 4°C pelletiert, mit 70 prozentigem Ethanol gewaschen und in DEPC-H₂O aufgenommen. Anschließend wurde 1 µl zur Überprüfung auf ein Agarosegel geladen.

Präparation des Gewebes

Embryonaler Magen mit anhängendem Milzprimordium wurde über Nacht bei 4°C in 4 prozentigem PFA in PBS⁻ fixiert, danach 2 x in PBSw (PBS mit 0,1% Tween-20) gewaschen und in einer Methanol-Serie (25%, 50%, 75%, 100% in PBSw) dehydriert. Nach zweimaligem Wechseln des Methanols konnte das Gewebe bei -20°C aufbewahrt werden.

Hybridisierung

Zunächst wurde das Gewebe durch Methanolserien (75%, 50%, 25% in PBSw) je 5 min auf Eis rehydriert. Anschließend wurde 3 x 5min in PBSw auf Eis gewaschen und für 4 min in 4,5 µg/ml Proteinase K in PBSw bei RT inkubiert. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 2 mg/ml Glycin in PBSw gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit PBSw für 5 min wurde das Gewebe für 15 min in Fixierlösung (4% PFA, 0,2% Glutaraldehyd in PBS) gegeben. Anschließend wurde erst 4 x 5 min mit PBSw, dann 1 x in 50% PBSw / 50% Hybridisierungspuffer und schließlich 1 x in 100% Hybridisierungspuffer gewaschen. Das Gewebe wurde danach 3 h bei 65°C in 900 µl Hybridisierungspuffer prähybridisiert. 200 ng der RNA-Probe in 100 µl Hybridisierungspuffer wurden zunächst für 5 min bei 95°C denaturiert, zum Gewebe gegeben und über Nacht bei 70°C hybridisiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung entfernt, 800 µl Hybridisierungspuffer zugegeben und 5 min bei 70°C gewaschen. Anschließend wurden 3 x je 400 µl 2 x SSC pH 4,5 hinzugefügt und 5 min bei 70°C gewaschen. Diese Mischung wurde daraufhin entfernt und es folgte zweimaliges Waschen für 30 min bei 70°C in 2 x SSC pH 7,0 und zweimaliges Waschen für 10 min bei RT in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) sowie 2 x 30 min bei 70°C in Maleinsäurepuffer. Nun folgten zwei Waschschrte in PBS für 10 min bei RT und 1 x 5 min in PBSw. Zum Blockieren wurde das Gewebe 2 h bei 4°C in Antikörperpuffer (10% hitzeinaktiviertes Ziegenserum, 1% Boehringer Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) in PBSw) inkubiert. Gleichzeitig wurde der an Alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, Mannheim) in Antikörperpuffer (0,075 U/ml) vorinkubiert, nach 2 h bei 4°C auf das Gewebe gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde

Material und Methoden

das Gewebe 1 x 30 sec und 5 x 45 min mit 0,1% BSA in PBSw sowie 2 x 30 min in PBSw gewaschen, gefolgt von 2 x 10 min Waschen bei RT in AP1-Puffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Danach folgte die Färbung in 1 ml BM purple (Roche, Mannheim) im Dunkeln. Im Falle der *hox11*-Sonde war eine Inkubation von 5 h, für die *w11*-Sonde von 3,5 h erforderlich. Durch dreimaliges Waschen in PBS wurde die Färbereaktion abgestoppt, das Gewebe wurde durch Methanolreihen in 100% Methanol überführt und bei -20°C aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Die *Speckling*-Domäne von Wt1 umfaßt die Aminosäuren 76-120

Die Existenz verschiedener Isoformen von WT1 ist unter anderem auf die Verwendung einer für die Aminosäuren KTS kodierenden alternativen Spleiß-Sequenz am 3'-Ende von Exon 9 zurückzuführen (Haber et al., 1991). Die resultierenden Spleißformen werden in einem konstanten Verhältnis zueinander exprimiert und besitzen unterschiedliche Eigenschaften: die homogen im Kern lokalisierten (-KTS)-Formen binden u.a. an die EGR-1 (*early growth response gene 1*)-Konsensussequenz CGCCCCCGC, die in Promotoren verschiedener Zielgene von WT1 enthalten ist. Die (+KTS)-Formen hingegen sind neben der homogenen nukleären Lokalisation auch in sogenannten *Speckles* vorzufinden und binden nicht an die EGR-1-Konsensussequenz (Bickmore et al., 1992). In diesen subnukleären Domänen sind verschiedene Kernfaktoren lokalisiert, die einer bestimmten Funktion, wie z.B. der Replikation, der Transkription oder dem prä-mRNA-Spleißen, zugeordnet werden können. Da Faktoren, die in DNA-Replikation involviert sind, nicht mit Komponenten des Spleißosoms kolokalisieren (Übersicht in Spector, 1993; Lamond und Earnshaw, 1998), könnte die Natur der *Speckles*, in denen sich die (+KTS)-Isoformen aufhalten, einen Hinweis auf die Funktion dieser Proteine liefern.

Die *Speckling*-Domäne von WT1 muß sich im N-terminalen Bereich des Proteins befinden, denn auch eine WT1-Mutante mit vollständiger Deletion der C-terminalen Zinkfingerregion ist in *Speckles* lokalisiert (Englert et al., 1995b). Deshalb wurden verschiedene Konstrukte mit C-terminalen oder N- und C-terminalen Deletionen hergestellt. Der Aufbau dieser Konstrukte ist in Abb. 5 schematisch dargestellt. Folgende Konstrukte wurden kloniert: *Wt1/1-273*, *Wt1/1-182*, *Wt1/1-120*, *Wt1/1-91*, *Wt1/76-273* und *Wt1/99-272*. Dabei gibt die erste Zahl die Position der ersten Aminosäure und die zweite Zahl die Position der letzten Aminosäure im entsprechenden Protein an. Alle Konstrukte wurden zur Überprüfung der Expression in U2OS-Zellen transfiziert und mit Hilfe einer *Westernblot*-Analyse wurde nachgewiesen, daß die resultierenden Produkte die richtige Größe haben (Abb. 6). Allerdings werden die

Ergebnisse

Konstrukte *Wt1/1-120* und *Wt1/76-273*, vor allem aber *Wt1/1-91* und *Wt1/99-272* nur sehr schwach exprimiert (Abb. 6b). Auf die in dieser Abbildung gezeigten Konstrukte *CHD* und *CHDΔ84-177* wird in Abschnitt 3.1.2 eingegangen.

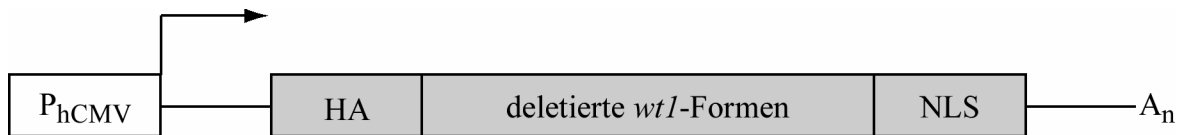


Abb. 5: Schematische Darstellung der Struktur der Expressionskonstrukte, die zur Identifizierung der Speckling-Domäne verwendet wurden. Verschiedene C-terminal oder C- und N-terminal deletierte Mutanten von *wt1* werden unter Kontrolle des Promotors des humanen Cytomegalovirus (P_{hCMV}) exprimiert. HA, Hämagglutinin-Erkennungssequenz; NLS, Kernlokalisationssequenz; A_n , Polyadenylierungssignal.

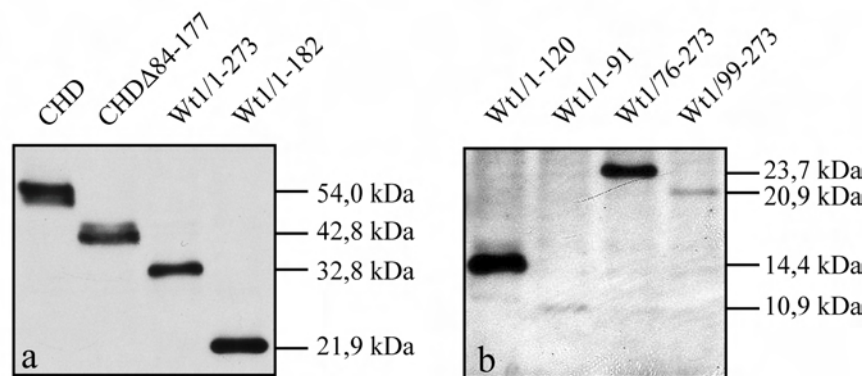


Abb. 6: Westernblot-Analyse von Proteinextrakten aus U2OS-Zellen, die mit *CHD*, *CHDΔ84-177* oder verschiedenen Deletionskonstrukten transfiziert wurden. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion geerntet, lysiert und Extrakte mit der gleichen Menge an Protein in einem 12 prozentigen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Membran wurden die Proteine mit Hilfe eines anti-HA-Antikörpers nachgewiesen. Da *Wt1/1-91* und *Wt1/99-273* zu einem vergleichbar geringeren Grad exprimiert sind, werden hier zwei verschiedene Expositionen derselben Membran gezeigt. Die Zahlen an der rechten Seite bezeichnen das Molekulargewicht.

3.1.1 Identifizierung der *Speckling*-Domäne

Zur Analyse der nukleären Verteilung der beschriebenen Wt1-Mutanten wurden die Konstrukte in U2OS-Zellen transfiziert und eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Die Plasmide *Wt1/1-273*, *Wt1/1-182*, *Wt1/1-120* und *Wt1/1-91* dienen der C-terminalen Eingrenzung der *Speckling*-Domäne durch sukzessive Deletion C-terminaler Sequenzen. Die ersten drei Konstrukte unterscheiden sich nicht in ihrem Expressionsmuster, die entsprechenden Proteine sind alle in subnukleären Domänen vorzufinden (Abb. 7a,b und c). Das Erscheinungsbild der *Speckles* kann dabei unabhängig von der Deletionsmutante in Größe und Form variieren. Lediglich *Wt1/1-91* weist keine Lokalisation in *Speckles* auf (Abb. 7d). Allerdings ist es nicht, wie erwartet, homogen im Kern exprimiert, sondern im Zytoplasma. Da dieses Konstrukt auch ein NLS besitzt und dessen Funktion durch die nukleäre Expression der anderen Konstrukte nachgewiesen wurde, kann man davon ausgehen, daß *Wt1/1-91* in den Kern gelangt, aber aufgrund seiner geringen Größe ins Zytoplasma zurück diffundiert. Aus der Analyse der nukleären Lokalisation dieser Mutanten kann man schließen, daß für die Sequestrierung von Wt1 in *Speckles* Sequenzen im für die Aminosäuren 1-120 kodierenden Bereich erforderlich sind.

Um herauszufinden, wo die *Speckling*-Domäne N-terminal begrenzt ist, wurden die Proteine *Wt1/76-273* und *Wt1/99-273* bezüglich ihrer nukleären Lokalisation untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß ersteres in *Speckles* aufzufinden ist (Abb. 7e) und *Wt1/99-273* homogen im Kern verteilt ist (Abb. 7f). Dies verdeutlicht, daß Sequenzen zwischen den Aminosäuren 76-273 für die Expression von *wt1* in *Speckles* benötigt werden. Gemeinsam mit dem Ergebnis aus der Analyse der Konstrukte mit C-terminaler Deletion kann die *Speckling*-Domäne auf die Aminosäuren 76-120 eingegrenzt werden.

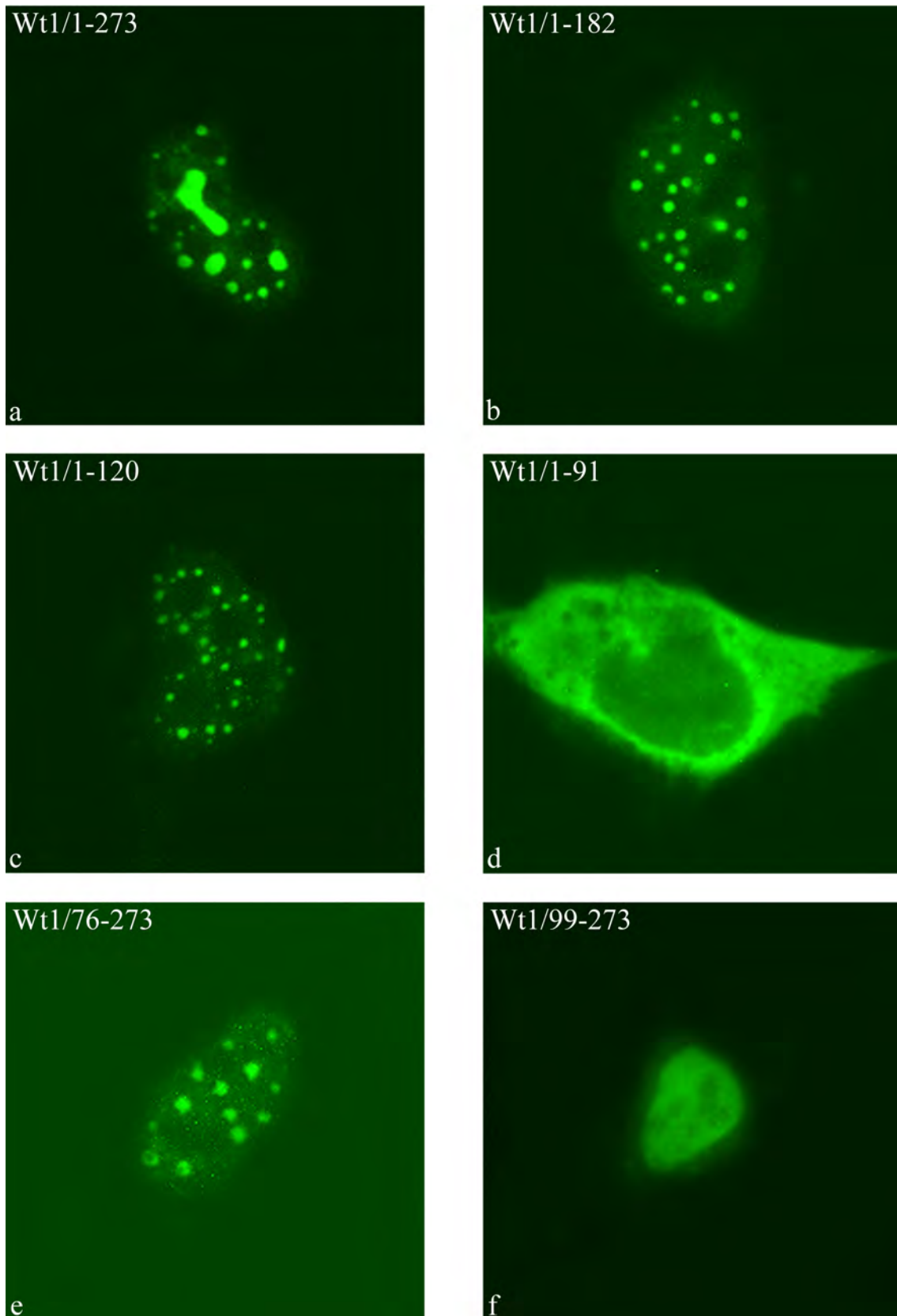


Abb. 7: Die Lokalisation von Wt1 in *Speckles* wird durch die Aminosäuren 76-120 vermittelt. Immunzytochemische Analyse von U2OS-Zellen, die mit verschiedenen Deletionskonstrukten transfiziert wurden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und unter Verwendung eines anti-HA-Antikörpers und eines mit Fluorescein konjugierten Sekundärantikörpers immunzytochemisch gefärbt.

3.1.2 Die Aminosäuren 84-177 sind notwendig und ausreichend für die Lokalisation von Wt1 in Speckles

Nach der Identifizierung der *Speckling*-Domäne durch N- und C-terminale Deletionen wurde die Frage nach der Bedeutung der *Speckling*-Domäne im Kontext des Gesamtmoleküles gestellt. Hierzu wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem, ausgehend von der *wt1* (+/+)-cDNA (*CHD*), die für die Aminosäuren 84-177 kodierende Sequenz deletiert worden war. Die Deletion in diesem Konstrukt (*CHD* Δ 84-177) betrifft neben der eigentlichen *Speckling*-Domäne aus technischen Gründen auch noch angrenzende Bereiche.

Eine *Westernblot*-Analyse der Expression von *CHD* und *CHD* Δ 84-177 nach Transfektion in U2OS-Zellen ist in Abb. 6a dargestellt und zeigt, daß beide Konstrukte gleich stark exprimiert werden. Zur Untersuchung der nukleären Lokalisation wurden diese Konstrukte zunächst in U2OS-Zellen transfiziert und die entsprechenden Proteine immunzytochemisch analysiert. In Abb. 8 kann man erkennen, daß im Vergleich zum Wildtyp-Protein, das zum Teil in *Speckles* lokalisiert ist (a), die Deletionsvariante homogen im Kern verteilt ist (b). Das bedeutet, daß diese Sequenz, die zwar nicht mit der definierten *Speckling*-Domäne identisch ist, jedoch mit ihr überlappt, notwendig für die Lokalisation in *Speckles* ist. Um dies zu verifizieren, wurden beide Konstrukte auch in M15-Zellen zur Expression gebracht. Dies ist eine mesonephrische Zelllinie, die eine verhältnismäßig starke endogene *wt1*-Expression aufweist (Larsson et al., 1993). Auch in diesen Zellen ist das Wildtypprotein zum Teil in *Speckles* (Abb. 8c) und die Mutante homogen im Kern lokalisiert (Abb. 8d). Diese Befunde bestätigen, daß tatsächlich die deletierte Domäne für das veränderte Expressionsmuster verantwortlich ist.

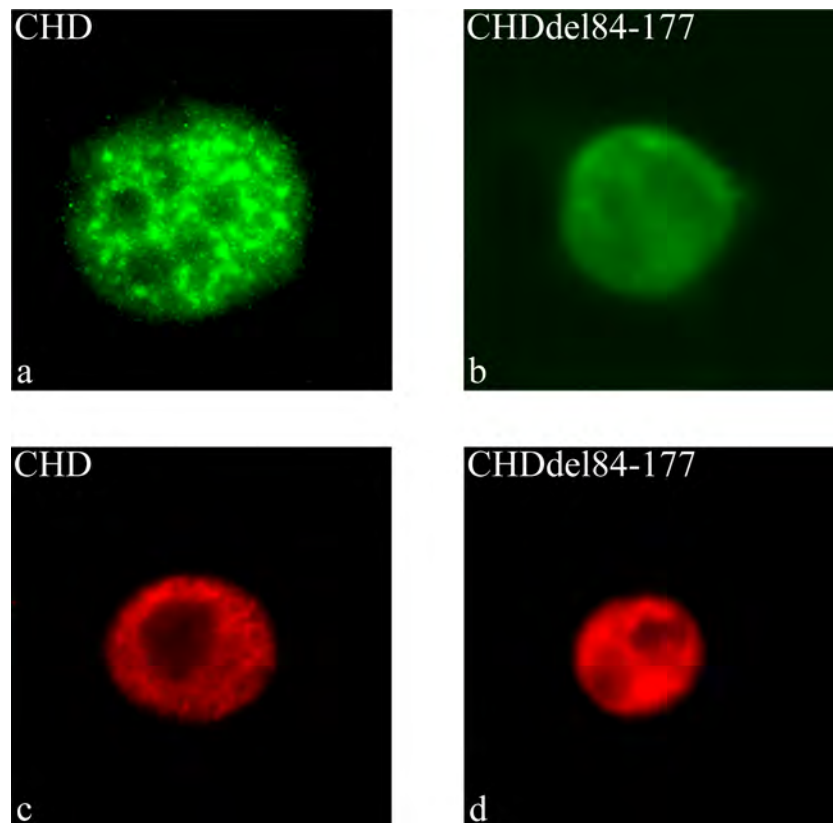


Abb. 8: Die Deletion der *Speckling*-Domäne verhindert die Lokalisation von Wt1 (+KTS) in *Speckles*. Immunzytochemische Analyse von U2OS-Zellen (a und b) bzw. M15-Zellen (c und d), die mit *CHD* (a und c) bzw. *CHDΔ84-177* (b und d) transfiziert wurden. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Dabei fand in U2OS-Zellen ein anti-HA-Antikörper und in M15-Zellen ein anti-WT1-Antikörper (WTC19) Verwendung. Die Sekundärantikörper waren mit Fluorescein bzw. Rhodamin konjugiert.

Daß die *Speckling*-Domäne auch ausreichend für die Expression in *Speckles* ist, wurde festgestellt, indem die für Aminosäuren 76-120 kodierende Sequenz mit *Glutathion-S-Transferase* (GST) und einem NLS fusioniert wurde (GST-spd) und die zelluläre Expression dieses Konstruktes immunzytochemisch analysiert wurde. Im Vergleich zu GST, das lediglich mit einem NLS fusioniert ist und homogen im Kern lokalisiert ist, wird GST-spd in *Speckles* vorgefunden (Daten werden nicht gezeigt, persönliche Mitteilung von B. Lutz). Dies zeigt, daß diese Domäne auch dazu in der Lage ist, ein von Wt1 unterschiedliches Protein in *Speckles* zu dirigieren. Vermutlich enthält sie eine Sequenz, die ein allgemeines Erkennungsmotiv für die Lokalisation in *Speckles* darstellt.

Die Form und Größe der *Speckles*, in denen sich Wt1-(+KTS) bzw. die Wt1-Deletionsmutanten befinden, unterscheiden sich nicht unerheblich voneinander. Um herauszufinden, ob es sich dennoch um die gleichen nukleären Domänen handelt, wurde die Lokalisation einer Mutante mit der des Wildtypproteins verglichen. Zu diesem Zweck wurde das Konstrukt *Wt1/1-273* in SD3-Zellen transfiziert. Dabei handelt es sich um eine stabil transfizierte Zelllinie, die induzierbar die *wt1 (+/+)*-cDNA exprimiert. Bei der immunzytochemischen Färbung konnte unter Verwendung zweier verschiedener Antikörper zwischen dem Wildtyp-Protein und der Mutante diskriminiert werden. Abb. 9a zeigt zwei Zellen, die *wt1 (+/+)* in subnukleären Kompartimenten exprimieren. Eine dieser Zellen hat bei der Transfektion das Deletionsplasmid aufgenommen und exprimiert dieses ebenfalls in *Speckles* (Abb. 9b). Durch Überlagerung der beiden Färbungen wird deutlich, daß sowohl Wildtyp- als auch mutantes Protein in denselben nukleären Kompartimenten vorzufinden sind (Abb. 9c). Folglich wird die Lokalisation in *Speckles* tatsächlich durch die *Speckling*-Domäne bestimmt und nicht vom Rest des Moleküls. Proteine mit der *Speckling*-Domäne gelangen unabhängig von ihrer Struktur an den gleichen Ort.

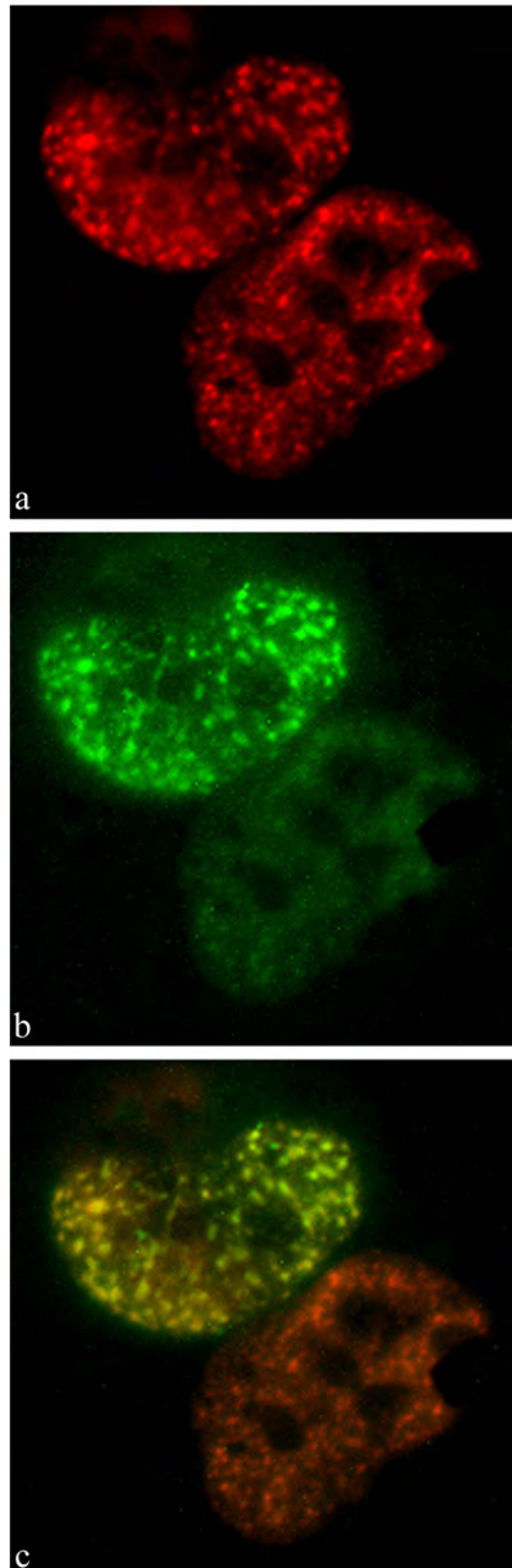


Abb. 9: Kolokalisation von Wildtyp-Protein und mutiertem Wt1 in denselben nukleären Kompartimenten. SD3-Zellen, eine stabil transfizierte Zelllinie, die induzierbar die *wt1* (+/+)-cDNA exprimiert, wurden mit *Wt1/I-273* transfiziert. Das Wildtyp-Protein (a) wurde mit einem anti-WT1-Antikörper (WTC19), die Mutante (b) mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. (c) zeigt die Überlagerung der beiden Färbungen.

3.2 Posttranslationelle Modifikation von Wt1 durch Phosphorylierung

Transkriptionsfaktoren erfahren oft eine posttranslationelle Modifikation in Form von Phosphorylierung und werden dadurch in ihrer Aktivität reguliert, wie dies z.B. für p53 beschrieben wurde (Siliciano et al., 1997). Es ist nicht auszuschließen, daß auch die Funktion von WT1 durch eine solche Modifikation reguliert wird, denn es konnte mit Hilfe eines Fusionsproteins aus GST und der Zinkfingerdomäne von WT1 gezeigt werden, daß WT1 durch die Proteinkinasen PKA und PKC phosphoryliert wird und infolge dessen seine DNA-bindende Kapazität verliert (Ye et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb analysiert, ob auch das Produkt des in eukaryontischen Zellen exprimierten Vollängen-*wtl* phosphoryliert ist. Das besondere Interesse galt dabei dem N-Terminus von Wt1, da dort die regulatorischen Sequenzen vermutet werden.

Dafür wurde ein System stabil transfizierter Zellen gewählt, die induzierbar verschiedene *wtl*-Formen exprimieren.

3.2.1 Phosphorylierung von Wildtyp- und mutantern Wt1

Zur Analyse der Phosphorylierung von Wt1 wurde in zwei verschiedenen Zelllinien die Expression von *wtl*(+/-) (UB27) bzw. einer *wtl*-Mutante mit deletierter Zinkfingerregion (UZ9) induziert und anschließend ³²Orthophosphat zur Verfügung gestellt. In einer Immunpräzipitation mit daran anschließender SDS-PAGE wurde das Wt1-Protein angereichert und bezüglich des Einbaus von ³²P überprüft. Als Kontrolle und zum Größenvergleich wurde parallel eine Markierung der Zellen mit L-[³⁵S]-Methionin und -Cystein durchgeführt. Die Verwendung dieser beiden Zelllinien ermöglicht die Diskriminierung von N- und C-Terminus von Wt1. Abb. 10 zeigt, daß mit Hilfe des ³⁵S-Einbaus in beiden Zelllinien *wtl*-Expression nachgewiesen werden kann. Desweiteren ist zu erkennen, daß beide Proteine phosphoryliert werden. Daraus kann man schließen, daß Wt1 in einem Bereich außerhalb der Zinkfingerregion phosphoryliert wird. Die Quantifizierung der Signale aus Abb. 10 ergab, daß das Verhältnis ³²P-Einbau / ³⁵S-Einbau im Wildtypprotein gegenüber der Mutante um das 1,4 fache größer ist.

Ergebnisse

Dies legt nahe, daß das Wildtypprotein stärker phosphoryliert ist und sich weitere Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Zinkfingerdomäne befinden.

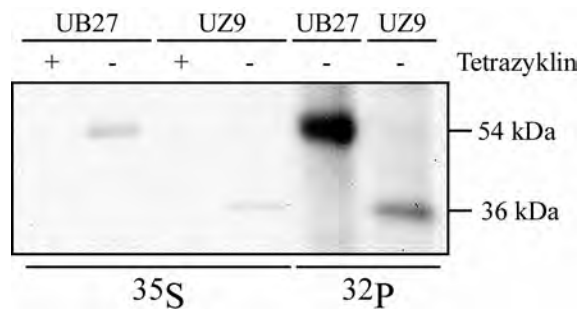


Abb. 10: Phosphorylierung von Wt1 (+/-) und einer Wt1-Mutante, deren Zinkfingerregion deletiert ist. Die stabil transfizierten Zelllinien UB27 und UZ9 wurden zur Expression von *w1* induziert. Nach 24 h wurde das Medium durch schwefel- bzw. phosphatfreies Medium ersetzt und ^{35}S bzw. ^{32}P hinzugefügt und nach weiteren 3,5 h eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei fanden folgende anti-WT1-Antikörper Verwendung: WTC19 für Extrakte aus UB27-Zellen und WTC8 für Extrakte aus UZ9-Zellen. Die Immunkomplexe wurden auf einem 12 prozentigen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Zahlen an der rechten Seite bezeichnen das Molekulargewicht.

3.2.2 Wt1 ist an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphoryliert

Um festzustellen, welche Aminosäuren phosphoryliert werden, wurden die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen phosphorylierten Proteine für eine Phosphoaminosäureanalyse eingesetzt. Sowohl das Wildtypprotein (Abb. 11) als auch die Mutante (Daten werden nicht gezeigt) sind an Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Dagegen konnte keine Phosphorylierung von Tyrosin detektiert werden. Bei den anderen Signalen handelt es sich zum einen um nicht hydrolysierte Dipeptide, zum anderen um freies Phosphat, dessen Bindung an die Aminosäure aufgebrochen wurde.

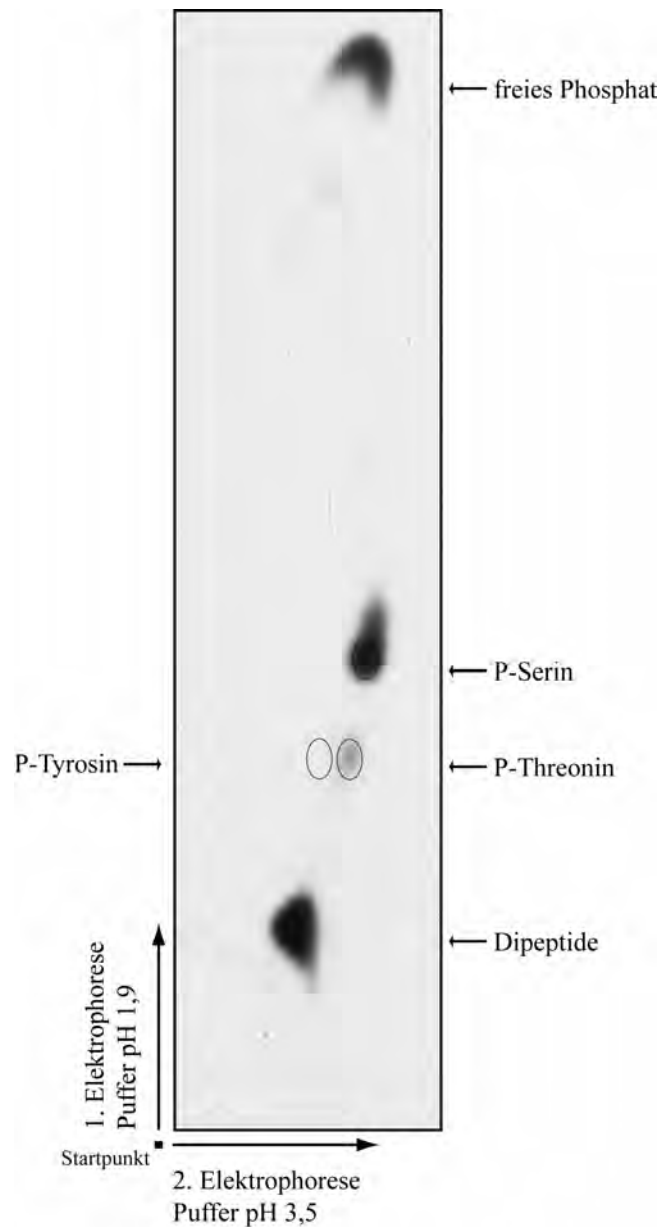


Abb. 11: Wt1 ist an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphoryliert. Phosphoaminosäureanalyse der Wt1 (+/-)-Isoform. Die Bande des ^{32}P -markierten Proteins aus Abb. 10 wurde ausgeschnitten, einer sauren Hydrolyse unterworfen und die aufgeschlossenen Aminosäuren elektrophoretisch aufgetrennt. Diese wurden hierfür punktförmig auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen (Startpunkt) und in einer zweidimensionalen Elektrophorese zunächst in Puffer pH 3,5, dann in Puffer pH 1,9 aufgetrennt. Die Ellipsen markieren die Stellen, an denen die gleichzeitig aufgetragenen Phosphoaminosäurestandards durch Färbung mit Ninhydrin sichtbar gemacht wurden.

3.2.3 Phosphopeptidanalyse von Wildtyp- und mutantern Wt1

Um die phosphorylierten Positionen des Proteins auf kleinere Bereiche einzugrenzen, wurde eine Phosphopeptidanalyse durchgeführt. Wie bei der Phosphoaminosäureanalyse wurden hierfür die phosphorylierten Proteine aus UB27- bzw. UZ9-Extrakten aus der Membran ausgeschnitten. Durch tryptischen Verdau wurden die Proteine in Peptide aufgespalten, welche dann in einer Kombination aus Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt wurden. Für das Wildtypprotein konnten sieben verschiedene phosphorylierte Peptide nachgewiesen werden (Abb. 12a, A-G), in der Mutante sind dagegen nur vier verschiedene Peptide phosphoryliert (Abb. 12b, A-D).

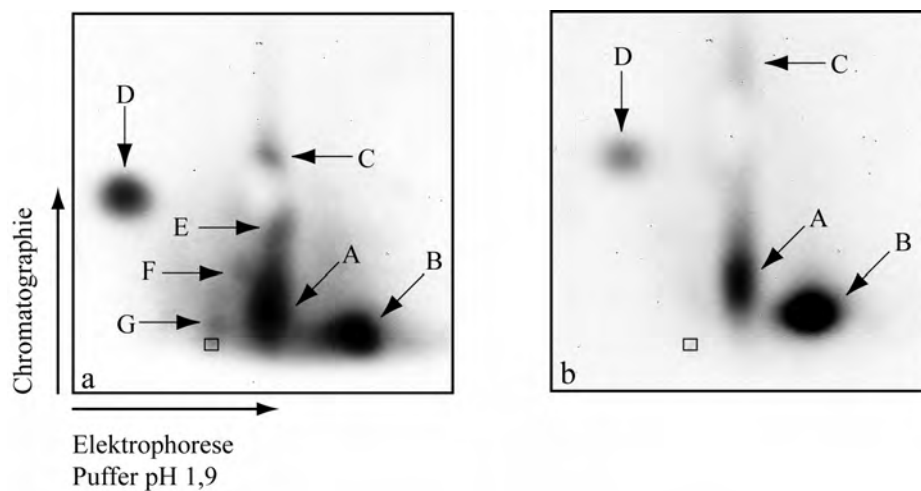


Abb. 12: Die Wt1 (+/-) Isoform ist gegenüber der C-terminal deletierten Mutante an zusätzlichen Positionen phosphoryliert. Phosphopeptidanalyse von Wt1 (+/-) (a) und einer Mutante, deren Zinkfingerregion deletiert ist (b). Die Banden der ^{32}P -markierten Proteine (siehe Abb. 10) wurden ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterworfen. Die dabei aufgeschlossenen Peptide wurden punktförmig auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und dann zunächst elektrophoretisch und anschließend chromatographisch aufgetrennt. A-D markieren phosphorylierte Peptide, die sowohl im Wildtypprotein als auch in der Mutante vorzufinden sind, die Peptide E-G sind nur im Wildtyp phosphoryliert. Das Rechteck bezeichnet den Auftragspunkt.

Man kann davon ausgehen, daß die Peptide A-D des Wildtypproteines mit den Peptiden A-D der Mutante identisch sind, da das relative Laufverhalten der Peptide zueinander und zum Auftragspunkt jeweils im gleichen Verhältnis steht. Die Peptide des Wildtyp sind sowohl bei

der Elektrophorese als auch bei der Chromatographie weniger weit gewandert als die der Mutante. Da jeweils die gleichen Laufbedingungen angewandt wurden, ist diese Differenz vermutlich auf eine unterschiedliche Beschichtung der Chromatographieplatte zurückzuführen. Die Peptide E-G konnten nur im Wildtyp nachgewiesen werden, es handelt sich dabei wahrscheinlich um Peptide des C-Terminus. Es könnte allerdings auch sein, daß sie in der Mutante nicht zu erkennen sind, da hier die Signale generell etwas schwächer sind und im Wildtyp die Peptide E-G weniger stark phosphoryliert sind als die Peptide A-D.

3.2.4 Wt1 ist an multiplen Stellen phosphoryliert

Da anhand der beiden Zelllinien UB27 und UZ9 die phosphorylierten Regionen im Wt1-Protein nicht genauer charakterisiert werden können, wurde eine Serie von Deletionskonstrukten in 293-Zellen transfiziert und bezüglich ihrer Phosphorylierung analysiert. Diese Konstrukte weisen Deletionen verschiedener N-terminaler Bereiche auf und decken damit den gesamten N-Terminus ab. Sie sind dem hCMV-Promotor nachgeschaltet und mit einer Hämagglutinin-Erkennungssequenz versehen. In Abb. 13 wird gezeigt, daß in alle Proteine ^{35}S eingebaut wurde. Dabei wird deutlich, daß *Wt1* Δ 124-263, *Wt1* Δ 282-364 und *Wt1* Δ 236-280 wesentlich stärker exprimiert werden als *Wt1* Δ 1-127 und *Wt1* Δ 6-180, jedoch bei weitem nicht so stark wie die Proteine der stabil transfizierten Zelllinien UB27 und UZ9. Für all diese Mutanten konnte außerdem gezeigt werden, daß sie phosphoryliert werden. Damit ist es nicht möglich, die Phosphorylierung auf eine bestimmte Region im Wt1-Protein einzugrenzen.

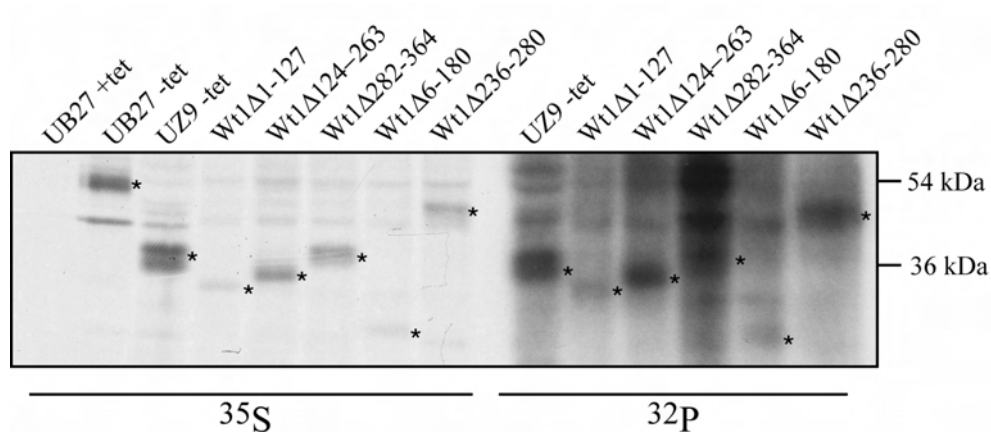


Abb. 13: Verschiedene Deletionsmutanten von Wt1 sind phosphoryliert. Die Deletionskonstrukte wurden 48 h vor der radioaktiven Markierung in 293-Zellen transfiziert, die stabil transfizierten Zelllinien UB27 und UZ9 wurden zur Expression von *wt1* induziert. Nach 24 h wurde das Medium durch schwefel- bzw. phosphatfreies Medium ersetzt und ^{35}S bzw. ^{32}P hinzugefügt und nach weiteren 3,5 h eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei fanden folgende anti-WT1-Antikörper Verwendung: WTC19 für Extrakte aus UB27-Zellen und WTC8 für Extrakte aus UZ9-Zellen sowie ein anti-HA-Antikörper für Extrakte der transfizierten 293-Zellen. Die Immunkomplexe wurden auf einem 12 prozentigen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Zahlen an der rechten Seite bezeichnen das Molekulargewicht, * markiert die entsprechenden Proteine.

In Tab. 2 wird eine Quantifizierung dargestellt, bei der die Signale der ^{32}P -markierten Proteine zu denen der entsprechenden ^{35}S -markierten Proteine aus Abb. 13 ins Verhältnis gesetzt werden. Dieser Faktor ist beim Protein mit deletierter Zinkfingerregion (UZ9) am kleinsten und bei den Proteinen mit N-terminaler Deletion (Wt1Δ1-127 und Wt1Δ6-180) am größten. Wt1Δ124-263, Wt1Δ282-364 und Wt1Δ236-280, die Deletionen im zentralen Bereich von Wt1 aufweisen, sind dazwischen anzuordnen. Unter der Voraussetzung einer gleichmäßigen Verteilung von Cystein und Methionin bedeutet dies, daß das Verhältnis ^{32}P -Einbau / ^{35}S -Einbau des zentralen Bereiches von Wt1 größer ist als das des N-Terminus. Ein entsprechender Vergleich für Proteine mit Deletionen im mittleren Bereich und der Mutante mit deletierter Zinkfingerregion ist nicht unbedingt möglich, da es sich hier um unterschiedliche Zelllinien handelt, die außerdem transient bzw. stabil transfiziert wurden. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die phosphorylierten Positionen sowohl in der Zinkfingerregion liegen als auch dem zentralen Bereich von Aminosäuren 124 bis 364

zuzuordnen sind. Ob auch im Bereich der ersten 123 Aminosäuren des N-Terminus Phosphorylierung stattfindet, wird hieraus nicht ersichtlich. Es ist jedoch möglich, die phosphorylierten Positionen zwei funktionellen Regionen des Wt1-Proteins zuzuordnen, denn die transaktivierende Domäne wird von den Aminosäuren 180-294 umfaßt (Wang et al., 1993a) und die DNA-Bindung durch die C-terminale Zinkfingerregion vermittelt (Rauscher et al., 1990).

Wt1-Deletion	³² P- / ³⁵ S-Markierung
UZ9	1,7
Wt1Δ1-127	7,2
Wt1Δ124-263	3,1
Wt1Δ282-364	4,3
Wt1Δ6-180	8,1
Wt1Δ236-280	4,4

Tab. 2: Der Phosphorylierungsgrad verschiedener Wt1-Mutanten. Die Signale der Banden aus Abb. 13 wurden quantifiziert und für die einzelnen Mutanten wurde jeweils die ³²P-Markierung zur ³⁵S-Markierung ins Verhältnis gesetzt.

Die Deletionsmutanten waren nicht ausreichend genug phosphoryliert für eine Phosphopeptidanalyse, nach dieser sehr langwierigen und mit Verlust einhergehenden Prozedur konnten keine phosphorylierten Peptide mehr detektiert werden.

Zusammenfassend legen diese Daten nahe, daß Wt1 C-terminal und im Bereich der Aminosäuren 124-364, welcher die transaktivierende Domäne enthält, phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung findet an den Aminosäureresten Serin und Threonin statt. Aus der Phosphopeptidanalyse und der Tatsache, daß Mutanten mit verschiedenen N-terminalen Deletionen phosphoryliert sind, geht hervor, daß es mehrere, mindestens jedoch sieben phosphorylierte Positionen im Wt1-Protein gibt.

3.3 *Wt1* ist notwendig für die Entwicklung der Milz

Während der Embryogenese wird *WT1* in verschiedenen Organen exprimiert. Dazu gehören Nieren, Gonaden, die stromalen Zellen der Milz sowie mesotheliale Zellen, die den Bauch- und Brustraum auskleiden. All diese Gewebe enthalten Epithelium mesodermalen Ursprungs (Armstrong et al., 1992). Die Inaktivierung von *wt1* in Mäusen des C57BL/6 (B6) Inzuchtstammes resultiert in embryonaler Letalität am Tag E13,5-E15,5, nach dem Stadium E15,5 wurden keine lebenden *wt1*^{-/-}-Tiere aufgefunden. Die *knock out*-Embryonen besitzen weder Nieren noch Gonaden, außerdem sind mesotheliale Strukturen sowie Herz und Lungen in ihrer Entwicklung stark beeinträchtigt (Kreidberg et al., 1993).

3.3.1 Der mit der Inaktivierung von *wt1* assoziierte Phänotyp ist vom genetischen Hintergrund abhängig

Angeregt durch die Beobachtung, daß der genetische Hintergrund einen Einfluß auf den Phänotyp von Mäusen mit inaktiviertem EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor gene*) hat (Sibilia et al., 1995; Threadgill et al., 1995), wurde die *wt1*-Mutation in die Mausstämme MF1, Balb/c und C3H gekreuzt. Genotypische Analyse der Nachkommen aus Verkreuzungen heterozygoter Tiere der F1-Generation zeigte, daß homozygote *wt1*^{-/-}-Tiere geboren wurden. Die Mäuse starben kurz nach der Geburt, da sie nicht in der Lage waren zu atmen.

Alle folgenden Genotypisierungen und phänotypischen Analysen beziehen sich auf den MF1-Auszuchtstamm. Hierfür wurde am Tag E18,5 ein Kaiserschnitt durchgeführt. 16% (11/67) der untersuchten Embryonen des gemischten B6 x MF1 Hintergrundes waren *wt1*^{-/-}. Um zu unterscheiden, ob die Ursache für die verlängerte Lebensspanne der *wt1*^{-/-}-Embryonen in der Widerstandsfähigkeit des jeweiligen Muttertieres liegt oder im unterschiedlichen genetischen Hintergrund begründet ist, wurden Blastozysten sowohl vom reinen B6 Hintergrund als auch vom gemischten B6 x MF1 Hintergrund in Ammentiere des MF1 Stammes übertragen. Die Embryonen, die sich hieraus entwickelten, wurden ebenfalls per Kaiserschnitt am Tag E18,5 entnommen und analysiert. Wie in Tab. 3 aufgeführt, waren 33 % der Embryonen aus dem

gemischten Hintergrund vom Genotyp $wtI^{-/-}$, wohingegen keine $wtI^{-/-}$ -Embryonen infolge des Transfers aus dem reinen B6-Hintergrund vorzufinden waren. Damit kann man einen Einfluß der Widerstandsfähigkeit des Muttertieres ausschließen und muß davon ausgehen, daß ein oder mehrere modifizierende Gene existieren, die die Auswirkungen der wtI Mutation beeinflussen.

	Lebende $wtI^{-/-}$ -Embryonen	Gesamtanzahl der Embryonen
B6	0	20
B6 x MF1	4	12

Tab. 3: Ergebnis von Blastozystentransferexperimenten. Blastozysten des B6 bzw. des gemischten B6 x MF1 Hintergrundes wurden in scheinträchtige MF1 Weibchen überführt. Am Tag E18,5 wurde ein Kaiserschnitt durchgeführt und die Embryonen genotypisiert.

3.3.2 In wtI defizienten Embryonen findet keine Entwicklung der Milz statt

Die verlängerte Lebensspanne der $wtI^{-/-}$ Embryonen im B6 x MF1 Hintergrund ermöglichte eine detaillierte Analyse des Phänotyps von wtI -Mutanten. Dabei wurden unter anderem die Nebennieren analysiert, denn kürzlich konnte gezeigt werden, daß wtI eine Rolle bei der Entwicklung dieses Organes spielt (Moore et al., 1999). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung fehlen auch in den mutanten Embryonen des B6 x MF1 Hintergrundes die Nebennieren. Zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Defekten in der Embryogenese (Kreidberg et al., 1993), kann man in diesen Embryonen ein fast vollständiges Fehlen der Milz beobachten (Abb. 14).

Die Milz entwickelt sich infolge der Verdickung des cöломischen Epithels des dorsalen Mesogastriums. Dabei wandern diese proliferierenden Zellen in das darunterliegende Mesenchym, welches daraufhin kondensiert und vaskularisiert. Diese Gewebe schließen sich anschließend zusammen, um die Milz zu bilden. Das Organ bleibt über das lienorenale Ligament mit der dorsalen Körperwand und über das Gastro-Milz-Ligament mit dem Magen verbunden. Die Bauchspeicheldrüse, welche sich ebenfalls innerhalb des dorsalen

Mesogastriums entwickelt, ist später im lienorenenalen Ligament lokalisiert (Gray, 1995). Die ersten hämatopoetischen Zellen wandern erst nach dem Stadium E15,5 in die Milz ein.

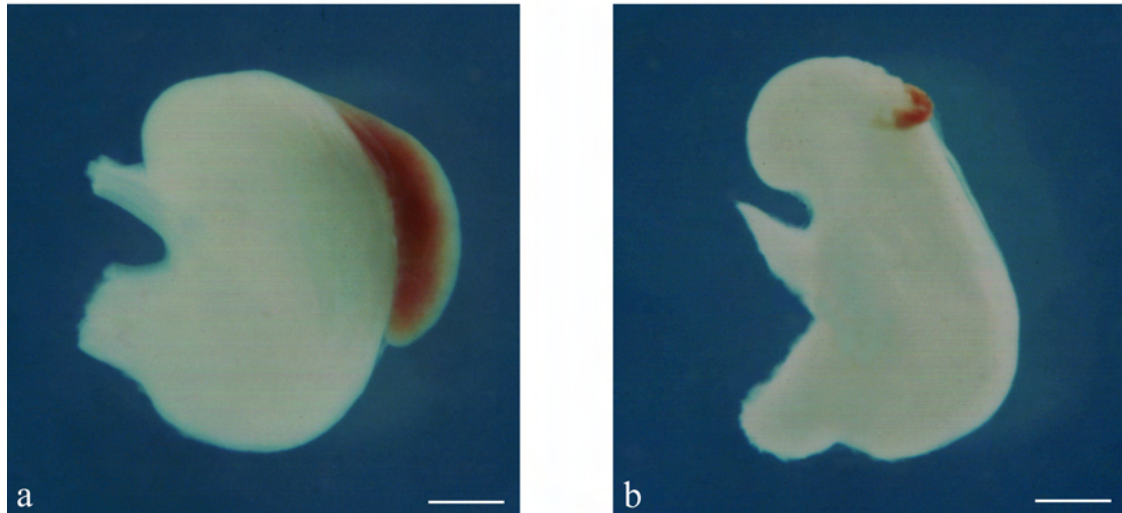


Abb. 14: Die Milz ist in $wt1^{-/-}$ -Embryonen nur rudimentär ausgebildet. Präparation von Magen und Milz aus Wildtyp- (a) und *knock out*-Embryonen (b) des Embryonalstadiums E18,5. Obwohl der Magen vergleichbar in Größe und Erscheinung ist, ist beim *knock out*-Embryo nur eine rudimentäre Milz vorzufinden. In beiden Fällen ist die Milz rötlich braun gefärbt, was auf eine Kolonisation der Milz durch hämatopoetische Zellen auch in der rudimentären Milz des *knock out*-Embryos hinweist. Maßstab: 0,6 mm.

Um den Milzdefekt genau zu untersuchen, wurden histologische Schnitte verschiedener Entwicklungsstadien analysiert. Querschnitte von Wildtyp-Embryonen des Stadiums E13,5 zeigen eine starke Verdickung des Milzprimordiums (Abb. 15a), dagegen ist das Milzprimordium in mutierten Embryonen wesentlich kleiner und die Verbindung zum Pankreas stark verkürzt (Abb. 15b). Im Stadium E15,5, bevor die Einwanderung hämatopoetischer Zellen in die Milz stattfindet, ist im Gegensatz zu $wt1^{+/+}$ -Embryonen (Abb. 15c) in *knock out*-Embryonen nur eine schwach ausgeprägte Verdickung des Mesogastriums zu erkennen (Abb. 15d). Diese Beobachtung legt nahe, daß die gestörte Entwicklung der Milz auf einer Fehlentwicklung stromaler Zellen dieses Organs beruht und nicht in mangelnder Invasion hämatopoetischer Zellen begründet ist. In mutanten Embryonen des Stadiums E18,5 hat sich die Milz nicht weiterentwickelt (Abb. 15f). Abb. 15e zeigt ein normal entwickeltes Organ im Wildtyp.

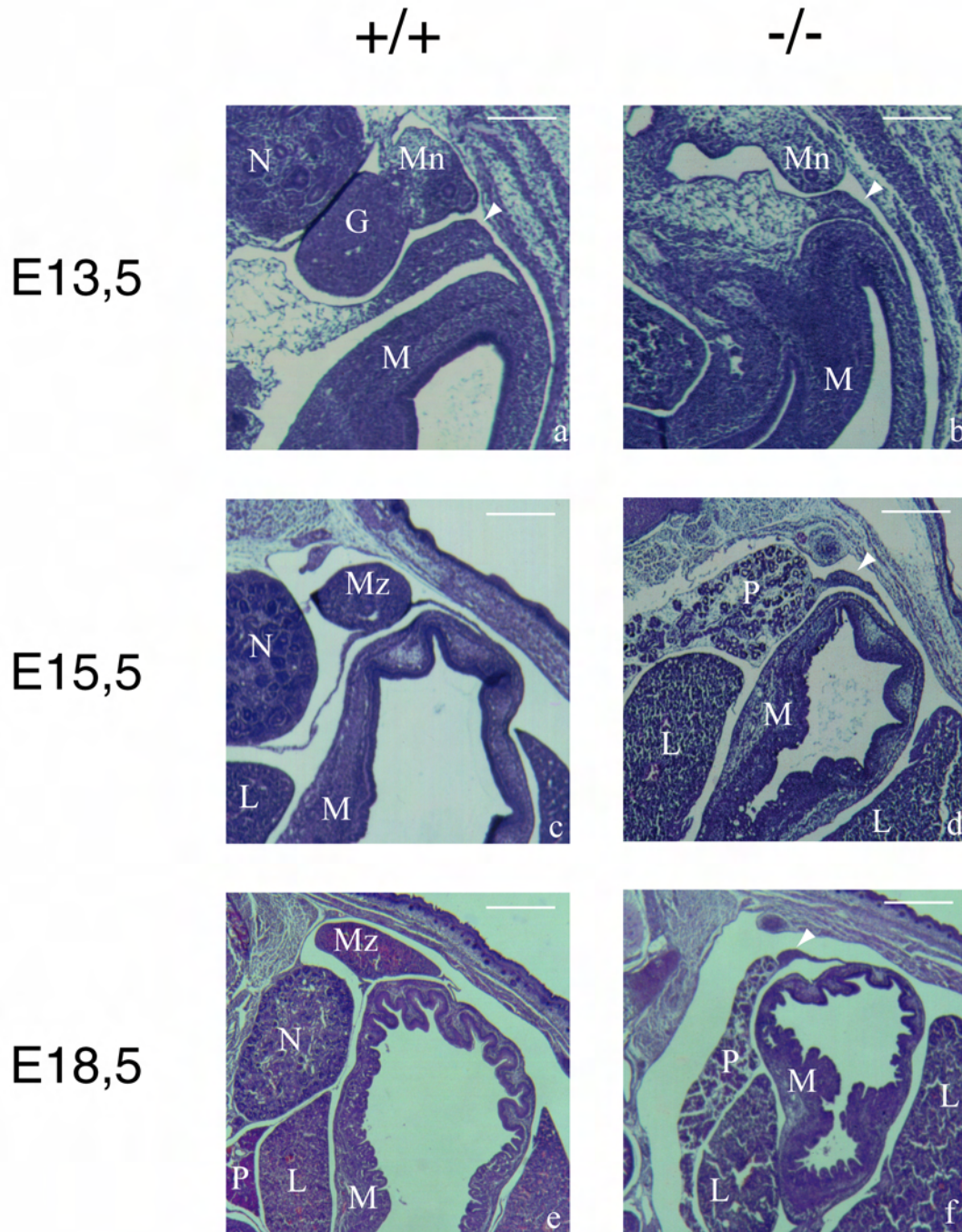


Abb. 15: Die Entwicklung der Milz in *knock out*-Embryonen ist bereits in frühen Stadien gestört, betroffen ist das stromale Gewebe und nicht die Einwanderung von Blutzellen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Querschnitten von Wildtyp- (a, c, e) und *knock out*-Embryonen (b, d, f) der Stadien E13,5 (a, b), E15,5 (c, d) und E18,5 (e, f). (a) zeigt das Milzprimordium innerhalb des dorsalen Mesogastriums sowie Magen, Gonade und die sich entwickelnde Niere eines Wildtypembryos. (b) Das Mesogastrium des *knock out*-Embryos ist ebenfalls verdickt (Pfeilspitze), jedoch nicht so stark ausgeprägt wie im Wildtyp. Sowohl Niere als auch Gonade fehlen. Am Tag E15,5 hat sich die Milz des Wildtypembryos vergrößert (c). Aufgrund des Fehlens der Niere ist der normal entwickelte Pankreas im *knock out*-Embryo direkt neben dem Milzprimordium (Pfeilspitze) gelegen. Dieses hat sich im Vergleich zu (b) nicht weiter entwickelt. (e) zeigt eine normale Milz im Wildtyp-Embryo, im *knock out*-Embryo fehlt die Milz fast vollständig (f, Pfeilspitze). G, Gonade; L, Leber; M, Magen; Mn, Mesonephros; Mz, Milz; N, Niere; P, Pankreas. Maßstab: (a, b) 0,2 mm, (c, d) 0,4 mm, (e, f) 0,6 mm.

3.3.3 Wt1 ist ein antiapoptotischer Faktor

Die Tatsache, daß die Milzentwicklung in *wt1*^{-/-}-Embryonen gestört ist, wirft die Frage auf, ob dies mit einer gestörten Proliferation einhergeht oder in einer erhöhten Apoptoserate begründet ist. Um dies zu analysieren, wurde mit Schnitten des Mesogastriums von Wildtyp- und *knock out*-Embryonen eine immunhistochemische Analyse mit einem Antikörper gegen PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einem Marker für Zellproliferation (Hall et al., 1990), durchgeführt. Bei dieser Analyse wurde in verschiedenen Organen, wie z.B. Niere, Rückenmark und Leber, PCNA-Färbung nachgewiesen. Im Mesogastrium von Wildtyp- und *knock out*-Embryonen der Stadien E13,5 (Abb. 16 a und b) bzw. E14,5 (Daten werden nicht gezeigt) konnten jedoch keine proliferierenden Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse wurden durch Behandlung der Tiere mit Bromdesoxyuridin und anschließender immunhistochemischer Analyse mit einem anti-BrdU-Antikörper bestätigt (Daten werden nicht gezeigt).

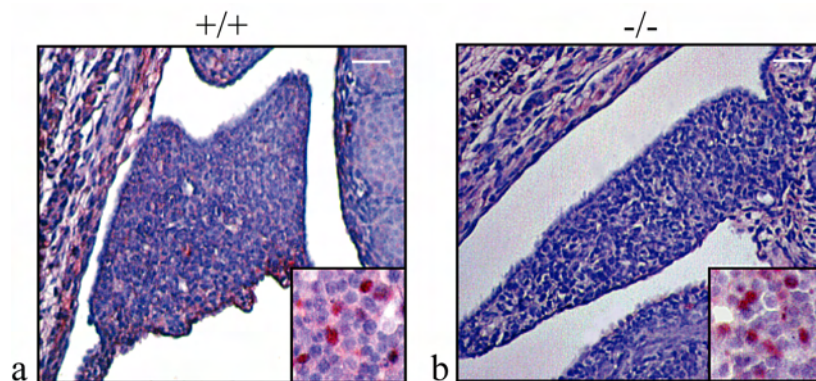


Abb. 16: Wildtyp- (a) und *knock out*-Embryonen (b) des Stadiums E13,5 weisen keine Proliferation im Mesogastrium auf. Immunhistochemische Analyse von Querschnitten von Embryonen am Tag E13,5. Zum Nachweis der PCNA-Expression wurde ein anti-PCNA-Antikörper verwendet. Als Kontrolle wird die Färbung des Lebergewebes auf denselben Schnitten gezeigt (eingrücktes Feld). Maßstab: 40 µm bzw. 20 µm (eingrücktes Feld).

Daraus kann man schließen, daß zum untersuchten Zeitpunkt der Milzentwicklung die Proliferation nicht der bestimmende Faktor ist. Statt dessen wurde anhand der TUNEL (Terminale Desoxynukleotidyl Transferase vermittelte dUTP-Biotin Markierung freier Enden)-Färbung ein wesentlicher Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen am Tag E13,5 der Embryogenese nachgewiesen (Abb. 17a, b). Während die Apoptoserate im

Mesogastrium von Wildtyp-Embryonen recht niedrig ist, ist sie im *wtl*^{-/-}-Mesogastrium stark erhöht. Um festzustellen, ob dieser Unterschied signifikant ist, wurde die Anzahl apoptotischer Zellen quantifiziert. Daraus ergab sich, daß die Apoptoserate im Mesogastrium der mutanten Embryonen des Stadiums E13,5 um das 4-5 fache gegenüber der Apoptoserate im Wildtyp-Mesogastrium erhöht ist (Abb. 17c). Ein ähnlicher Unterschied konnte am Tag E14,5 der Embryonalentwicklung festgestellt werden. In *knock out*-Embryonen geht also die Beeinträchtigung der Milzentwicklung mit einer erhöhten Apoptoserate einher.

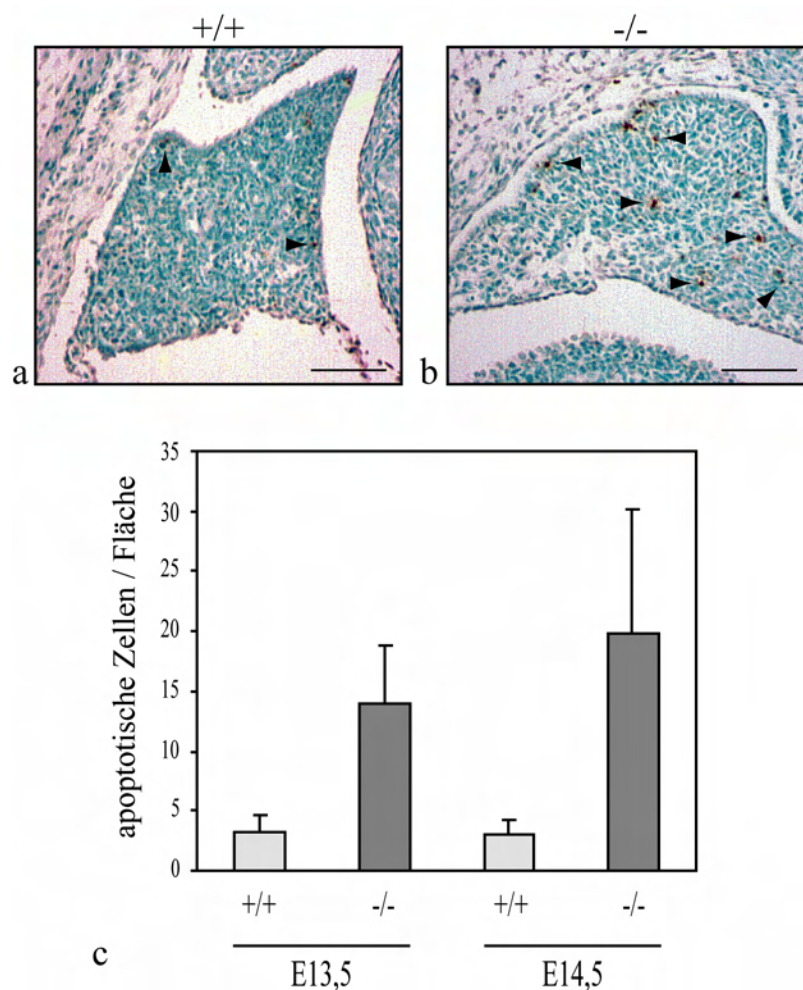


Abb. 17: Die Apoptoserate im Mesogastrium von *knock out*-Embryonen ist erhöht. Querschnitte von Wildtyp- (a) und *knock out*-Embryonen (b) wurden mittels TUNEL-Färbung analysiert. Die Pfeilspitzen markieren apoptotische Zellen. Maßstab: 80 μ m. (c) Quantifizierung der Apoptoserate in Wildtyp- (+/+) und *knock out*-Embryonen (-/-) am Tag E13,5 und E14,5. Die Werte wurden erhalten, indem die Zahl der apoptotischen Zellen durch die Fläche des entsprechenden Mesogastriums geteilt wurde. Die Durchschnittswerte und Standardabweichungen wurden durch Analyse von vier Embryonen (bzw. drei *knock out*-Embryonen des Stadiums E14,5) ermittelt, es wurden jeweils mindestens 4 Schnitte ausgezählt.

Ergebnisse

Das Mesogastrium wurde außerdem einer Expressionsanalyse zum Nachweis der *bcl-2* (*b-cell-lymphoma gene*)-Expression, einem Inhibitor der Apoptose (McDonnell et al., 1990), unterworfen. *Bcl-2* hat in seiner Promotorsequenz Erkennungstellen für WT1 und wird durch dessen Bindung aktiviert (Mayo et al., 1999). Die immunhistochemische Analyse konnte weder in Wildtyp- noch in *knock out*-Embryonen *bcl-2*-Expression im Mesogastrium nachweisen, obwohl die dorsalen Wurzelganglien, von denen beschrieben wurde, daß sie *bcl-2* am Tag E13,5 exprimieren (Novack und Korsmeyer, 1994), in den gleichen Gewebeschnitten gefärbt werden konnten (Abb. 18a, b). Sollte Wt1 seine Rolle während der Milzentwicklung durch Hemmung der Apoptose vermitteln, so geschieht dies nicht durch Aktivierung der *bcl-2*-Expression.

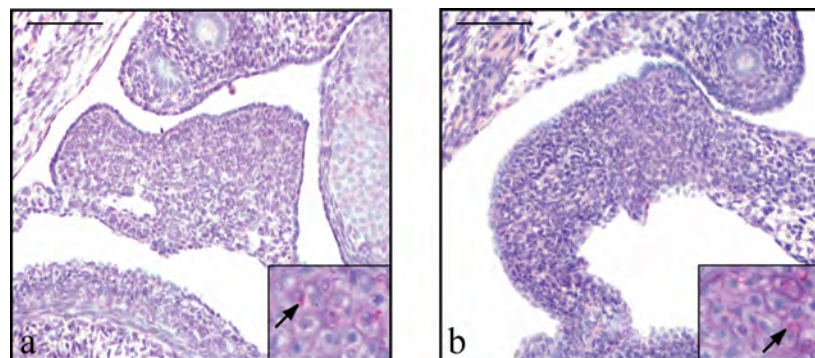


Abb. 18: Die hohe Apoptoserate im Mesogastrium von *knock out*-Embryonen ist nicht in fehlender *bcl-2*-Expression begründet. Immunhistochemische Analyse von Querschnitten von Wildtyp- (a) und *knock out*- (b) Embryonen am Tag E13,5. Zum Nachweis des *bcl-2*-Proteins wurde ein anti-*bcl-2*-Antikörper eingesetzt. Als Kontrolle wird die Färbung des dorsalen Wurzelganglions auf denselben Schnitten gezeigt (ingerücktes Feld). Die Pfeilspitze markiert die Färbung im Zytoplasma. Maßstab: 120 μ m, bzw. 60 μ m (ingerücktes Feld).

3.3.4 Während der Milzentwicklung werden *wt1* und *hox11* unabhängig voneinander reguliert

Die Expression von *wt1* in den stromalen Zellen der Milz (Armstrong et al., 1992; Rackley et al., 1993) spiegelt die Expression von *hox11* wider, dessen Inaktivierung ebenfalls in einer gestörten Entwicklung der Milz resultiert. *Hox11* ist ein eine Homeodomäne enthaltender Transkriptionsfaktor, der bei der Analyse eines Bruchpunktes von Translokationen, die bei T-ALL (akute lymphoblastische T-Zell-Leukämie) auftreten, kloniert wurde. *Hox11* kann deshalb als Protoonkogen bezeichnet werden (Dube et al., 1991; Hatano et al., 1991; Kennedy et al., 1991; Lu et al., 1991). *Hox11* defiziente Mäuse weisen neben der fehlenden Milzentwicklung keinen weiteren Phänotyp auf (Roberts et al., 1994; Dear et al., 1995).

Um festzustellen, ob die beiden Faktoren *Wt1* und *Hox11* abhängig voneinander die Entwicklung der Milz regulieren, wurde die Expression von *hox11* in *wt1*^{+/+}- und *wt1*^{-/-}-Embryonen analysiert. Mittels *in situ*-Hybridisierung von Embryonen des Stadiums E13,5 konnte sowohl bei Wildtyp- als auch bei *knock out*-Embryonen die Expression von *hox11* in dem dorsal am Magen hängenden Mesogastrium nachgewiesen werden (Abb. 19a und b). Das gleiche Resultat wurde bei Embryonen des Stadiums E12,5 erzielt (Daten werden nicht gezeigt). Aus dieser Expressionsanalyse kann man schließen, daß *Wt1* keine regulatorische Wirkung auf die Expression von *hox11* hat. Umgekehrt könnte jedoch *hox11* einen Einfluß auf die Expression von *wt1* ausüben. Um dies zu untersuchen, wurde eine *in situ*-Hybridisierung von Wildtyp- und *hox11*^{-/-}-Embryonen durchgeführt. Weder am Tag E12, 5 (Abb. 19c und d) noch am Tag E11,5 (Daten werden nicht gezeigt) konnte ein Unterschied der *wt1*-Expression im Mesogastrium festgestellt werden. Daraus kann man folgern, daß *Hox11* keinen Einfluß auf die Expression von *wt1* während der Milzentwicklung hat. Obwohl *wt1* und *hox11* während der Milzentwicklung koexprimiert werden, scheinen sie sich nicht gegenseitig zu regulieren.

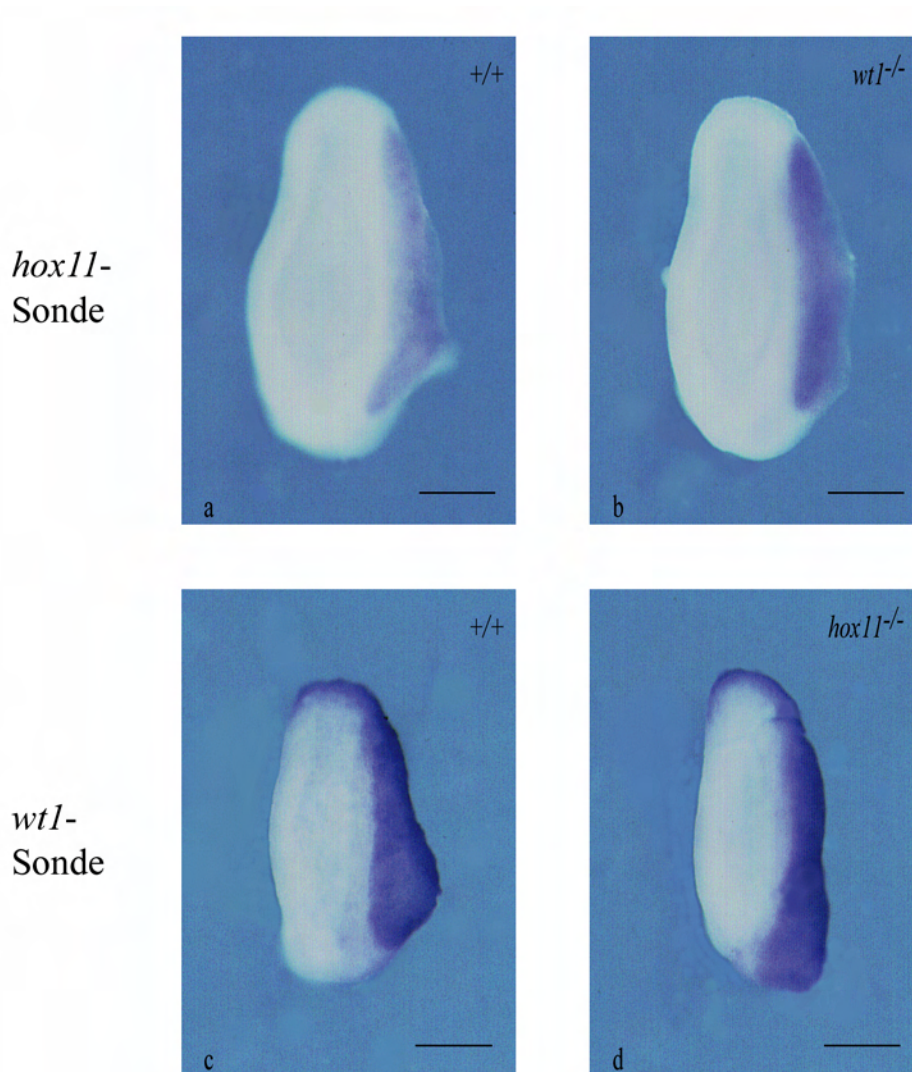


Abb. 19: Hox11 und Wt1 regulieren unabhängig voneinander die Milzentwicklung. *In situ*-Hybridisierung von Wildtyp- (a) und *wt1*^{-/-}- (b) Magen und Mesogastrium aus Embryonen des Stadiums E13,5 mit einer *hox11*-spezifischen Sonde. Färbung des Mesogastriums auf der dorsalen Seite des Magens kann in beiden Fällen beobachtet werden. *In situ*-Hybridisierung von Wildtyp- (c) und *hox11*^{-/-}- (d) Magen und Mesogastrium aus Embryonen des Stadiums E13,5 mit einer *wt1*-spezifischen Sonde. Das Expressionsmuster von *wt1* ist infolge der *hox11*-Mutation nicht verändert. Maßstab: 0,4 mm.

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, daß die Inaktivierung von Wt1 zu einem vom genetischen Hintergrund abhängigen Phänotyp führt, was für die Existenz eines oder mehrerer modifizierender Gene spricht. Durch die verlängerte Lebensspanne von *wt1*^{-/-}-Embryonen in einem gemischten genetischen Hintergrund konnte festgestellt werden, daß Wt1 einen wichtigen Faktor für die Entwicklung der Milz darstellt. Die gestörte Milzentwicklung geht

mit einer erhöhten Apoptoserate einher und spricht *Wt1* eine antiapoptotische Rolle zu. Obwohl *hox11* und *wt1* ein vergleichbares Expressionsmuster in der Milz aufweisen und auch ihre Inaktivierung im gleichen Phänotyp bezüglich der Milzentwicklung resultiert, scheinen sie unabhängig voneinander die Entwicklung der Milz zu steuern.

4 Diskussion

Während der Entwicklung eines Embryos und der Entstehung von Tumoren finden gemeinsame Prozesse statt wie z.B. Zellmigration oder Zellproliferation. Bei der Organogenese geht dies mit der fortschreitenden Differenzierung einher, wohingegen bei der Tumorigenese eine Dedifferenzierung von Zellen stattfindet.

WT1 ist ein Faktor, der sowohl bei der Differenzierung verschiedener Gewebe eine Rolle spielt, als auch bei der Entstehung bestimmter Tumoren von zentraler Bedeutung ist. Zum einen beeinträchtigt die Inaktivierung von *wt1* in Mäusen die Entwicklung diverser, z.T. lebensnotwendiger Organe (Kreidberg et al., 1993; Herzer et al., 1999). Andererseits zählt *WT1* zu den Tumorsuppressorgenen, da der Verlust beider Allele zur Entstehung des Wilms Tumors führt (Lewis et al., 1988).

Die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen sind nur zum Teil bekannt. So wurde gezeigt, daß WT1 ein Transkriptionsfaktor ist, der u.a. die Transkription von Wachstumsfaktoren reprimieren kann (Wang et al., 1993a). Außerdem kann WT1 die Expression gewisser für die Entwicklung verschiedener Organe wichtiger Faktoren steuern. Ein Beispiel hierfür ist *amphiregulin*, ein Faktor, der eine Rolle bei der Nierenentwicklung spielt, und durch WT1 aktiviert wird (Lee et al., 1999). Durch Repression der Expression von *Dax-1* (*DSS [dosage-sensitive sex reversal]-AHC [adrenal hypoplasia congenita] critical region on the X-chromosome gene 1*) kann die Differenzierung der Gonade reguliert werden (Kim et al., 1999). Die Steuerung der *WT1*-Funktion findet auf transkriptioneller Ebene statt, denn es wird sowohl in einem räumlich als auch zeitlich eng begrenzten Rahmen exprimiert. Ob auch extrazelluläre Signale und signaltransduzierende Kaskaden an der Aktivierung von WT1 beteiligt sind, ist noch nicht bekannt.

Mit Hilfe von drei verschiedenen Ansätzen wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Funktion von *wt1* studiert.

Zunächst wurde eine Domäne im Wt1-Protein identifiziert, die Wt1 (+KTS)-Isoformen in sogenannte *Speckles* dirigiert. Diese *Speckling*-Domäne ermöglicht nun die Analyse der entsprechenden nukleären Domäne und der Funktion der Wt1 (+KTS)-Isoformen.

In einem weiteren Ansatz wurde festgestellt, daß Wt1 posttranslational durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin und Threonin modifiziert wird. Dies betrifft sowohl den die Zinkfingerdomäne beinhaltenden C-Terminus des Moleküls als auch den zentralen Bereich von Wt1.

Schließlich konnte durch Kreuzung des *wt1 knock out*-Allels in einen anderen Mausstamm die Lebensspanne der *wt1^{-/-}*-Embryonen verlängert werden. Dies erlaubte die detaillierte Analyse der Milz, bei deren Entwicklung Wt1 von essentieller Bedeutung ist.

4.1 Lokalisation von Wt1 (+KTS) in Speckles

4.1.1 Die Identifikation der *Speckling*-Domäne von Wt1

WT1-Isoformen unterscheiden sich unter anderem in der C-terminalen Zinkfingerregion, mit der die DNA-bindende Kapazität dieses Faktors vermittelt wird. Durch die Insertion der drei Aminosäuren KTS zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger wird die Bindung an die EGR-1-Konsensussequenz verhindert (Bickmore et al., 1992), weshalb die Expression vieler WT1-Zielgene nur durch die (-KTS)-, nicht aber durch die (+KTS)-Formen vermittelt werden kann. Letztere sind jedoch wichtig für die physiologische Funktion von WT1, denn in Patienten mit dem Frasier Syndrom hat das Fehlen der (+KTS)-Formen Auswirkungen auf die Funktion der Nieren und die Entwicklung der Gonaden (Barboux et al., 1997; Kikuchi et al., 1998; Klamt et al., 1998). Die Tatsache, daß die (+KTS)-Formen in bestimmten nukleären Domänen, den *Speckles*, lokalisiert sind, bietet die Möglichkeit, ihre Funktion zu studieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Domäne, die für die Lokalisation der (+KTS)-Formen in *Speckles* verantwortlich ist, identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene *wt1*-Deletionskonstrukte hergestellt und bezüglich ihrer nukleären Expression analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß die *Speckling*-Domäne von den Aminosäuren 76-120 umfaßt wird.

Um herauszufinden, ob diese Domäne notwendig und ausreichend für die Lokalisation in *Speckles* ist, wurde zunächst gezeigt, daß durch Deletion des mit der *Speckling*-Domäne überlappenden Bereiches der Aminosäuren 84-177 der Wt1 (+/+)-Isoform das Protein nicht

Diskussion

mehr in *Speckles* dirigiert wird. Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus Glutathion-S-Transferase und der *Speckling*-Domäne (GST-spd) wurde verdeutlicht, daß diese Domäne auch ein von Wt1 unterschiedliches Protein in *Speckles* leiten kann, denn auch dieses Fusionsprotein ist in *Speckles* lokalisiert. Dies deutet darauf hin, daß mit der identifizierten Domäne eine Sequenz bestimmt wurde, die generell für die Lokalisation von Proteinen in *Speckles* zuständig ist.

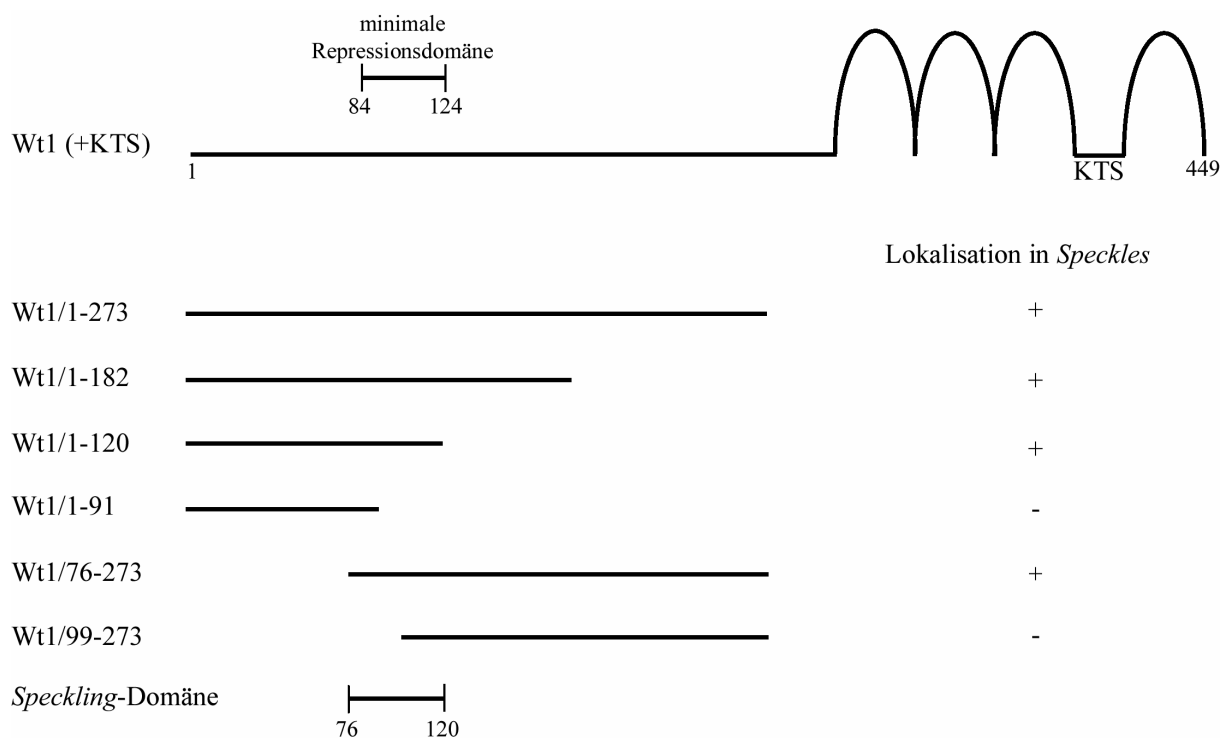


Abb. 20: Schematische Darstellung der *Speckling*-Domäne. Sie umfaßt die Aminosäuren 76-120 und überlappt mit der minimalen Repressionsdomäne. Die Zahlen bezeichnen die Position der ersten bzw. letzten Aminosäure des entsprechenden Proteins.

Die identifizierte *Speckling*-Domäne überlappt größtenteils mit der minimalen Repressionsdomäne von WT1 (Abb. 20). Diese Domäne vermittelt die transreprimierende Wirkung von WT1 auf die Expression verschiedener Gene, wie z.B. *PDGF- α* (*platelet-derived growth factor α*) (Wang et al., 1992). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Repressionsdomäne eine suprimierende Wirkung auf die Aktivierungsdomäne von WT1

besitzt (McKay et al., 1999). Möglicherweise verhindert die Repressionsdomäne durch direkte Interaktion mit der Aktivierungsdomäne deren Präsentation zur allgemeinen Transkriptionsmaschinerie. Die Aktivierungsdomäne könnte jedoch auch durch einen Korepressor, der an die reprimierende Domäne bindet, aktiviert werden. Sollte ein solcher Faktor existieren, so ist nicht auszuschließen, daß er auch eine Rolle bei der Lokalisation von WT1 (+KTS) in *Speckles* spielt. Mögliche Mechanismen hierfür wären zum einen eine direkte Interaktion des Korepressors mit den entsprechenden nukleären Domänen oder aber seine Konkurrenz mit einem weiteren, für die Lokalisation in *Speckles* verantwortlichen Faktor um die Bindung an die Repressions- bzw. *Speckling*-Domäne. Bei diesem Modell stellt sich die Frage, weshalb WT1 (-KTS) nicht in *Speckles* dirigiert wird. Dies könnte zum einen in der Bindung an DNA begründet sein, oder aber von einer veränderten Tertiärstruktur aufgrund intramolekularer, von den Aminosäuren KTS abhängiger Bindung herrühren. Auf diese Weise könnte die Interaktion mit dem am Transport in *Speckles* beteiligten Faktor verhindert werden.

4.1.2 Die *Speckling*-Domäne als Mittel zur Analyse der Funktion von *w1*

Mit der *Speckling*-Domäne wurde ein Bereich in Wt1 charakterisiert, der sowohl notwendig als auch ausreichend für die Lokalisation von Proteinen in *Speckles* ist. Diese Domäne kann nun dafür eingesetzt werden, die Eigenschaften dieser *Speckles* zu beschreiben. *Speckles* sind subnukleäre Domänen, in denen unterschiedliche Prozesse ablaufen können. So wurde berichtet, daß die DNA-Replikation in distinkten nukleären Kompartimenten stattfindet. Ebenso sind Komponenten des Spleißosoms in *Speckles* versammelt und auch die Transkription ist auf gewisse Bereiche des Kerns beschränkt (Spector, 1993; Lamond und Earnshaw, 1998). Es ist also anzunehmen, daß *Speckles* Orte darstellen, in denen bestimmte Prozesse ablaufen. Könnte man anhand der *Speckling*-Domäne spezifische Interaktionspartner von WT1 identifizieren, indem man z.B. einen *Yeast-two-hybrid-screen* durchführte, würde man möglicherweise auf Faktoren stoßen, die bei den in *Speckles* stattfindenden Vorgängen eine Rolle spielen. Davies et al. (1998) konnten zeigen, daß WT1 mit dem Spleißfaktor U2AF65 interagiert und daß die (+KTS)-Formen im Vergleich zu den (-KTS)-Formen besser mit diesem Faktor kolokalisieren. Es wurde allerdings nicht beschrieben, welche Domäne von

WT1 mit U2AF65 interagiert. Dies und auch die zuvor beschriebene Kolo­kalisierung von WT1 mit snRNPs (*small ribonucleoprotein particles*) (Larsson et al., 1995) sind Hinweise darauf, daß WT1 möglicherweise eine Rolle bei der Prozessierung von mRNA spielt.

4.1.3 Dienen die *Speckles* als Depot für Wt1 (+KTS)-Isoformen?

Neben der Hypothese, daß die (+KTS)- bzw. (-KTS)-Isoformen voneinander unabhängige Funktionen besitzen, ist nicht auszuschließen, daß es sich bei den *Speckles* um Domänen handelt, die ein Reservoir für Proteinmoleküle darstellen, die in der Zelle augenblicklich keine Verwendung finden. Auf diese Weise könnte die Verfügbarkeit der (-KTS)-Formen gesteuert werden, denn WT1 besitzt eine Dimerisierungsdomäne und bindet vermutlich als Dimer an DNA (Wang et al., 1993a; Englert et al., 1995b). Da die (+KTS)-Formen zwar dimerisieren, jedoch nicht an die DNA-Konsensussequenz in den Promotoren vieler WT1-Zielgene binden können, besteht die Funktion der (+KTS)-Formen möglicherweise darin, durch Dimerisierung mit der (-KTS)-Form deren DNA-bindende Kapazität zu stören. Somit würde WT1 seine eigene transkriptionelle Aktivität auf Proteinebene regulieren und durch die Bindung der (+KTS)-Formen an *Speckles* könnte diese Regulation bewerkstelligt werden.

Alle Erkenntnisse bezüglich der nukleären Lokalisation von WT1-Isoformen beruhen auf Experimenten, in denen *WT1* überexprimiert wurde. Unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch die (+KTS)- bzw. (-KTS)-Formen erkennen, könnte die tatsächliche Verteilung der endogenen WT1-Isoformen analysiert werden.

4.2 Wt1 ist posttranslationalell modifiziert

Die posttranslationelle Modifikation von Proteinen ist ein Mechanismus, ihre Aktivität zu regulieren. Dazu gehört u.a. die Phosphorylierung, die gerade bei der Steuerung von Transkriptionsfaktoren häufig eine Rolle spielt. Extrazelluläre Stimuli werden in Kaskaden von Signalen bis hin zum Transkriptionsfaktor gelenkt und durch dessen Aktivierung kann dann die gezielte Expression spezifischer Gene erfolgen. Die Signalkaskaden werden durch Enzyme dargestellt, die andere Proteine phosphorylieren (Kinasen) oder dephosphorylieren (Phosphatasen) können. Dabei kann ein aktiviertes Enzym seinerseits viele Substratmoleküle aktivieren, was zur Verstärkung des ursprünglichen Signales führt.

Die Regulation eines Transkriptionsfaktors durch (De-)Phosphorylierung kann sehr unterschiedlich von statten gehen. Für p53 wurde gezeigt, daß es durch Phosphorylierung in der transaktivierenden Domäne aktiviert wird (Siliciano et al., 1997), c-Jun hingegen durch Phosphorylierung der DNA-bindenden Domäne (Boyle et al., 1991). Schließlich kann die Modifikation auch einen Einfluß auf die Lokalisation eines Transkriptionsfaktors haben, denn für den Komplex I κ B/NF- κ B (*inhibitor of NF- κ B / nuclear factor κ B*) konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung der Untereinheit I κ B zur Auflösung des Komplexes führt und damit den nukleären Import von NF- κ B ermöglicht (Bäuerle und Baltimore, 1988).

Von WT1 war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, ob es eine posttranslationelle Modifikation in Form der Phosphorylierung erfährt. Erste Hinweise darauf lieferten Experimente von Ye et al. (1996), die zeigten, daß rekombinantes WT1, bestehend aus der Zinkfingerdomäne, phosphoryliert ist. Sowohl das die Aminosäuren KTS enthaltende Protein als auch das der (-KTS)-Form entsprechende Protein kann durch Aktivierung der Proteinkinasen PKA und PKC, die am Beginn vieler Signaltransduktionskaskaden stehen, phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung hat die Hemmung der DNA-Bindung zur Folge. In Zellen, die mit einem *WT1*-Expressionskonstrukt transfiziert wurden und in denen die Aktivierung der PKA erfolgte, konnte keine durch WT1 vermittelte Repression von Reporterkonstrukten nachgewiesen werden.

Diskussion

Da die Phosphorylierung lediglich für rekombinantes Zinkfingerprotein nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob dies auch auf das in eukaryontischen Zellen vorkommende Vollängen-Protein zutrifft. Außerdem war noch nicht gezeigt worden, welche Aminosäuren der Zinkfingerregion phosphoryliert sind. Neben der C-terminalen Zinkfingerdomäne könnte auch der N-Terminus, der u.a. die Transrepressionsdomäne und Transaktivierungsdomäne enthält, phosphoryliert sein.

Aus diesen Gründen wurde hier zur Analyse der Phosphorylierung von Wt1 ein System stabil transfizierter Zellen, in denen die Expression von *wt1* induziert werden kann, gewählt. Es konnte zunächst gezeigt werden, daß Wt1 am N-Terminus phosphoryliert ist, denn bei einer Wt1-Mutante, deren Zinkfingerregion deletiert war, konnte Phosphorylierung festgestellt werden. Das Wildtypprotein ist gegenüber der Mutante um das 1,4 fache stärker phosphoryliert, was für weitere phosphorylierte Bereiche im C-Terminus spricht. Tatsächlich konnten im Wildtyp anhand von Phosphopeptidanalysen zusätzliche phosphorylierte Peptide im Vergleich zur Mutante nachgewiesen werden. Bei den phosphorylierten Aminosäuren handelt es sich sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante um Serin und Threonin. Die Stöchiometrie der Phosphorylierung an Serin und Threonin betrug dabei etwa 7:1, was möglicherweise in einer stärkeren Affinität der entsprechenden Kinase zum Serin begründet ist. Es ergab sich anschließend die Frage, welche Aminosäuren des N-Terminus phosphoryliert sind, und ob diese innerhalb einer Domäne, der eine Funktion zugeordnet werden kann, liegen. Deshalb wurden verschiedene Mutanten mit N-terminalen Deletionen hinsichtlich ihres Phosphateinbaus analysiert. Dabei stellte sich heraus, daß alle Mutanten phosphoryliert werden und gemäß der Stärke des Signals in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Mutanten mit Deletionen am 5'-Ende des N-Terminus sind stärker phosphoryliert, als die mit einer Deletion im zentralen Bereich des Proteins. Diese wiederum weisen ein schwächeres Signal gegenüber der Mutante mit fehlender Zinkfingerregion auf. Daraus kann man schließen, daß die Modifikation sowohl den für die DNA-Bindung verantwortlichen C-Terminus des Moleküls betrifft als auch den zentralen Bereich von Wt1, der die transaktivierende Domäne umfaßt.

Daraufhin wurde analysiert, ob es sich bei der Phosphorylierung von Wt1 um eine konstitutive oder regulierte Modifikation handelt. Um dies herauszufinden, wurden die Zellen verschiedenen Stimuli ausgesetzt, von denen bekannt ist, daß sie eine spezifische Genexpression auslösen können und daß die Faktoren der beteiligten Signaltransduktionswege durch Phosphorylierung gesteuert werden. Mit keiner dieser Behandlungen konnte jedoch ein Einfluß auf die Stärke des Phosphorylierungsgrades von Wt1 verzeichnet werden.

Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung von endogen exprimiertem WT1 in Podozyten aus Nieren von Rattenembryonen studiert. Es gelang jedoch nicht, in diesen WT1 exprimierenden Zellen Phosphateinbau nachzuweisen. Allerdings war es auch nicht möglich, das Protein mit ³⁵S zu markieren, weshalb man annehmen kann, daß entweder eine zu geringe Expression von WT1 in diesen Zellen oder technische Probleme den Nachweis von phosphoryliertem WT1 verhinderten.

Zwischenzeitlich ist eine Publikation erschienen, die untermauert, daß die Funktion von WT1 durch Phosphorylierung reguliert wird. Sakamoto et al. (1997) konnten zeigen, daß infolge transienter Transfektion eines *WT1*-Expressionsplasmides in COS-Zellen WT1 phosphoryliert ist. Die Behandlung mit Forskolin, das cAMP (cyclo-Adenosinmonophosphat)-abhängige Proteinkinasen aktiviert, resultierte in der Phosphorylierung zusätzlicher Aminosäurereste. Bei diesen handelt es sich um die in Zinkfinger 2 bzw. 3 gelegenen Serine S-365 und S-393. Die Phosphorylierung dieser Aminosäuren verhindert die durch WT1 vermittelte transkriptionelle Repression. Nach wie vor fehlt jedoch der Nachweis, daß diese Phosphorylierung auch bei endogen exprimiertem *WT1* einen Einfluß auf die transkriptionelle Repression hat.

Während in der Arbeit von Sakamoto et al. (1997) der C-Terminus von WT1 fokussiert wurde, konnte mit dem hier gewählten System gezeigt werden, daß WT1 auch in einer zentralen Domäne phosphoryliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei der multiplen Phosphorylierung von WT1 um eine konstitutive oder regulierte Modifikation handelt.

4.3 *In vivo* Studien zur Funktion von *wt1*

4.3.1 Der Einfluß modifizierender Gene

Die Inaktivierung von *wt1* wurde ursprünglich in Mäusen des Inzuchtstammes C57BL/6 (B6) eingeführt und hat drastische Auswirkungen auf den Phänotyp, denn die Entwicklung mehrerer Organe ist beeinträchtigt und die Embryonen sterben am Tag E13,5-E15,5. Die Ursache für diese frühe Letalität ist nicht bekannt, wurde jedoch auf die abnorme Entwicklung des Herzens zurückgeführt (Kreidberg et al., 1993). Da bereits beschrieben wurde, daß der genetische Hintergrund einen Einfluß auf die Auswirkungen des Phänotyps haben kann (Sibilia et al., 1995; Threadgill et al., 1995), wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob dies auch auf die Inaktivierung von *wt1* zutrifft. Diese Mutation wurde deshalb in drei andere Mausstämmen eingekreuzt. Die genotypische Analyse der Nachkommen zeigte, daß *wt1*-negative Embryonen geboren werden, diese aber sofort nach der Geburt sterben, da sie nicht atmen können.

Aufgrund der Tatsache, daß in allen drei Mausstämmen die frühe Sterblichkeit gerettet werden kann, scheint der Mausstamm B6 eine Ausnahme darzustellen. Durch Transfer von Blastozysten sowohl vom reinen B6 Hintergrund als auch vom gemischten B6 x MF1 Hintergrund in Ammentiere des MF1 Stammes konnte gezeigt werden, daß der beobachtete Effekt nicht in der Widerstandsfähigkeit des jeweiligen Muttertieres begründet ist, sondern tatsächlich vom genetischen Hintergrund abhängt. Daraus kann man schließen, daß es mindestens ein modifizierendes Gen gibt, das die Penetranz der *wt1*-Mutation beeinflussen kann. Geht man davon aus, daß im B6 Hintergrund der Phänotyp des Herzens ursächlich für die frühe Letalität ist, so könnte es sich bei dem Produkt des modifizierenden Gens um einen Faktor handeln, der eine Rolle bei der Entwicklung des Herzens spielt. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß auch in den *wt1*^{-/-}-Embryonen des gemischten Hintergrundes eine beträchtliche Fehlbildung des Herzens vorliegt.

Die Identifizierung des oder der entsprechenden Genes würde eine langwierige Rückkreuzung des B6 x MF1 Hintergrundes in den B6 Stamm über mehrere Generationen hinweg erfordern, wobei zunächst das entsprechende Chromosom identifiziert und anschließend mit Hilfe von

spezifischen Markern eine RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse durchgeführt werden müßte.

4.3.2 Die Rolle von Wt1 bei der Milzentwicklung

Aufgrund der verlängerten Lebensdauer der *wt1*^{-/-}-Embryonen konnte beobachtet werden, daß in diesen Tieren die Milz-Entwicklung erheblich gestört ist. Schon im Embryonalstadium E13,5, bei dem sich das Milzprimordium innerhalb des dorsalen Mesogastriums ausbildet, kann man feststellen, daß das Milzprimordium von *wt1*^{-/-}-Embryonen nicht so stark verdickt ist wie das der Wildtyp-Embryonen. Im Stadium E15,5, einem Zeitpunkt, bei dem im Wildtyp das Milzstroma ausgebildet ist, jedoch noch keine hämatopoetischen Zellen in die Milz eingewandert sind, ist in *wt1*^{-/-}-Embryonen nur ein Überbleibsel der Milz vorhanden. Dies bedeutet, daß in *knock out*-Embryonen die Entwicklung der stromalen Zellen in der Milz gestört ist, also der Zellen, die auch *wt1* exprimieren (Armstrong et al., 1992; Rackley et al., 1993). Somit erklärt sich die Beobachtung, daß am Tag E18,5 die Milz nur rudimentär ausgebildet ist. Dies ist nicht auf ein Problem bei der Invasion hämatopoetischer Zellen zurückzuführen, vielmehr ist das Gewebe, in das diese Zellen einwandern sollen, nicht vorhanden.

Während der Milzentwicklung findet eine Interaktion des cölonischen Epithels mit dem Mesenchym statt. Dieses kondensiert daraufhin und differenziert zu epitheliale Gewebe. Ein sehr ähnlicher Vorgang findet auch während der Entwicklung der Niere statt, wo das metanephrische Mesenchym mit dem Epithel des Ureters interagiert und daraufhin kondensiert. Dieses Gewebe differenziert zu epitheliale Gewebe, welches schließlich das Glomerulum ausbildet. Die Parallelen in der Entwicklung dieser beiden Organe weisen darauf hin, daß es sich bei der Interaktion epithelialen und mesenchymalen Gewebes sowie der Differenzierung epithelialen Gewebes aus dem Mesoderm um Vorgänge handelt, bei denen *Wt1* seine Funktion ausübt. Wie dies auf molekularer Ebene bewerkstelligt wird, ist nicht bekannt, man nimmt jedoch an, daß *Wt1* als Transkriptionsfaktor agiert und genetische Programme steuert, die für die entsprechende Differenzierung verantwortlich sind (Englert, 1998).

Hox11 ist ein Gen, das wie *Wt1* im Milzprimordium exprimiert wird und dessen Inaktivierung in einer Störung der Milzentwicklung resultiert (Roberts et al., 1994; Dear et al., 1995). Um zu überprüfen, ob die Expression von *hox11* in *wt1*^{-/-}-Embryonen beeinflusst ist, wurden *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß *hox11* auch in *wt1*^{-/-}-Embryonen exprimiert wird. Da *hox11* ebenfalls ein Transkriptionsfaktor ist, wurde im umgekehrten Experiment untersucht, ob die Expression von *wt1* in *hox11*^{-/-}-Embryonen beeinträchtigt ist. Doch auch in diesem Fall konnte kein Unterschied zwischen der Expression in Wildtyp- und *knock out*-Gewebe festgestellt werden. Damit kann man ausschließen, daß die beiden Faktoren sich gegenseitig in ihrer Expression regulieren. Es könnte jedoch sein, daß *Wt1* und *Hox11* das gleiche Zielgen haben, welches wiederum eine spezifische Rolle in der Entwicklung der Milz spielt. Es besteht außerdem die Möglichkeit, daß die beiden Proteine interagieren, was zur Aktivierung bestimmter Faktoren führt.

4.3.3 Wt1 - ein antiapoptotischer Faktor?

Um herauszufinden, ob die fehlende Milzentwicklung in *wt1*^{-/-}-Embryonen entweder mit einer gestörten Proliferation oder mit erhöhter Apoptose erklärt werden kann, wurde eine immunhistochemische Analyse der Expression von *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*), einem Marker für Zellproliferation, durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß im Mesogastrium von sowohl Wildtyp- als auch *knock out*-Embryonen keine *PCNA*-positiven Zellen nachgewiesen werden können. Die Färbung apoptotischer Zellen hingegen ergab, daß die Apoptoserate im Mesogastrium der *knock out*-Embryonen gegenüber dem der Wildtyp-Embryonen signifikant erhöht ist. Dies kann am Tag E13,5 ebenso wie am Tag E14,5 beobachtet werden.

Weder im Wildtyp- noch im *knock out*-Mesogastrium konnte die Expression von *bcl-2* nachgewiesen werden, obwohl Mayo et al. (1999) zeigten, daß im Promotor von *bcl-2* Sequenzen enthalten sind, an die *WT1* binden kann und dadurch dessen Expression aktivieren kann. Dies scheint jedoch zumindest im Milzprimordium keine physiologische Bedeutung zu haben.

Hier treten erneut Parallelen zur Nierenentwicklung auf, denn im metanephrischen Mesenchym findet infolge fehlender *wt1*-Expression verstärkt Apoptose statt (Kreidberg et

al., 1993). Auch in einem Zellsystem konnte nachgewiesen werden, daß WT1 antiapoptotische Eigenschaften besitzt, denn es kann die p53-vermittelte Apoptose in Osteosarcoma-Zellen verhindern (Maheswaran et al., 1995). Außerdem zeigt die Tatsache, daß bei einer chromosomalen Translokation die Zinkfingerdomäne von *WT1* mit der transaktivierenden Domäne des *EWS*-Genes fusioniert wird und dies zur Ausbildung des DSRCT (*desmoplastic small round cell tumor*) führt (Ladanyi und Gerald, 1994), daß *WT1* durchaus auch Eigenschaften eines Onkogens innehaben kann. Dies steht zunächst im Widerspruch zur anfänglichen Betrachtung, daß WT1 als Tumorsuppressor wirkt. Geht man jedoch davon aus, daß WT1 eine Rolle bei der Differenzierung von mesenchymalem zu epithelialelem Gewebe spielt, ist es möglich, daß die im metanephrischen Mesenchym und im Milzprimordium beobachtete Apoptose auf einen indirekten Mechanismus zurückzuführen ist. Dies kann man sich so vorstellen, daß bei fehlender *WT1*-Expression keine Differenzierung stattfindet und daraufhin in den entsprechenden Zellen ein von WT1 unabhängiges Signal aktiviert wird, das zur Induktion der Apoptose führt.

Es ist also anzunehmen, daß WT1 durch seine Rolle bei der Differenzierung von Geweben dazu beiträgt, die Entstehung von Krebs zu verhindern. Die Inaktivierung von WT1 allein führt höchst wahrscheinlich nicht zur Tumorentstehung. Dies bedeutet, daß zur Ausbildung z.B. eines Wilms Tumors neben *WT1* weitere Gene inaktiviert sein müssen. Darunter könnte sich z.B. ein Gen befinden, dessen Funktion es ist, in Zellen, die keinem normalen Differenzierungsprogramm folgen, den programmierten Zelltod zu induzieren.

Dieses Modell entspricht damit der Theorie, daß die Tumorentstehung ein mehrere Stufen erfordernder Prozess ist. Dabei kann WT1 den sogenannten *gatekeepern* zugeordnet werden, deren Inaktivierung am Beginn der Tumorigenese steht und den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
<i>bcl-2</i>	B-Zell Lymphoma 2 Gen
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	zur RNA komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAB	Diaminobenzidin
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat (analog: dCTP, dGTP, dTTP)
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosintriphosphat (analog: ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes <i>Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinäure
DTT	Dithiothreitol
E	Stadium der Embryonalentwicklung in Tagen
E_{260} , E_{280}	Extinktion bei 260 bzw. 280 nm
ECL	<i>enhanced</i> Chemolumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin-Erkennungssequenz
hrp	<i>horse radish peroxidase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	molar
mA	Milliampere
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minuten
mM	millimolar

MOPS	N-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
ng	Nanogramm
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	nukleäres Antigen proliferierender Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunden
SSC	<i>standard saline citrate</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Enzymeinheiten (<i>units</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT1	Wilms Tumor 1 Gen
w/v	Masse pro Volumen

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

6 Literatur

Armstrong, J., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W., Hastie, N. und Bard, J. (1992) The expression of the Wilms' tumor gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev*, **40**, 85-97.

Armitage, P. und Doll, R. (1954) The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*, **8**, 1-12.

Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1988) Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell*, **53**, 211-217.

Baird, P.N., Santos, A., Groves, N., Jadresic, L. und Cowell, J.K. (1992) Constitutional mutations in the WT1 gene in patients with Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Genet*, **1**, 301-305.

Barboux, S., Niaudet, P., Gubler, M.C., Grunfeld, J.P., Jaubert, F., Kuttann, F., Fekete, C.N., Souleyreau-Therville, N., Thibaud, E., Fellous, M. und McElreavey, K. (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet*, **17**, 467-470.

Bardeesy, N. und Pelletier, J. (1998) Overlapping RNA and DNA binding domains of the wt1 tumor suppressor gene product. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1784-1792.

Bickmore, W.A., Oghene, K., Little, M.H., Seawright, A., van Heyningen, V. und Hastie, N.D. (1992) Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science*, **257**, 235-237.

Boyle, W.J., Smeal, T., Defize, L.H., Angel, P., Woodgett, J.R., Karin, M. und Hunter, T. (1991) Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell*, **64**, 573-584.

Breslow, N.E., Olson, J., Moksness, J., Beckwith, J.B. und Grundy, P. (1996) Familial Wilms' tumor: a descriptive study. *Med Pediatr Oncol*, **27**, 398-403.

Bruening, W., Moffett, P., Chia, S., Heinrich, G. und Pelletier, J. (1996) Identification of nuclear localization signals within the zinc fingers of the WT1 tumor suppressor gene product. *FEBS Lett*, **393**, 41-47.

Bruening, W. und Pelletier, J. (1996) A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem*, **271**, 8646-8654.

Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H. et al. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, **60**, 509-520.

Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S.H., Hastie, N.D., Little, M., Holmes, G., Todorov, I. und Ward, A. (1996) RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7562-7566.

Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C. und White, R.L. (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, **305**, 779-784.

Coppes, M.J., Bonetta, L., Huang, A., Hoban, P., Chilton-MacNeill, S., Campbell, C.E., Weksberg, R., Yeger, H., Reeve, A.E. und Williams, B.R. (1992) Loss of heterozygosity mapping in Wilms tumor indicates the involvement of three distinct regions and a limited role for nondisjunction or mitotic recombination. *Genes Chromosomes Cancer*, **5**, 326-334.

Davies, R.C., Calvio, C., Bratt, E., Larsson, S.H., Lamond, A.I. und Hastie, N.D. (1998) WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes. *Genes Dev*, **12**, 3217-3225.

Dear, T.N., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Lavenir, I., Larson, T., Smith, A.J., Warren, A.J., Evans, M.J., Sofroniew, M.V. und Rabbitts, T.H. (1995) The Hox11 gene is essential for cell survival during spleen development. *Development*, **121**, 2909-2915.

Dey, B.R., Sukhatme, V.P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Rauscher, F.J., 3rd und Kim, S.J. (1994) Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol*, **8**, 595-602.

Drummond, I.A., Madden, S.L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G.I., Sukhatme, V.P. und Rauscher, F.J.d. (1992) Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science*, **257**, 674-678.

Dube, I.D., Kamel-Reid, S., Yuan, C.C., Lu, M., Wu, X., Corpus, G., Raimondi, S.C., Crist, W.M., Carroll, A.J., Minowada, J. et al. (1991) A novel human homeobox gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with chromosomal translocation t(10;14). *Blood*, **78**, 2996-3003.

Englert, C. (1998) WT1--more than a transcription factor? *Trends Biochem Sci*, **23**, 389-393.

Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G.G., Garvin, A.J., Rosner, M.R. und Haber, D.A. (1995a) WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *Embo J*, **14**, 4662-4675.

Englert, C., Maheswaran, S., Garvin, A.J., Kreidberg, J. und Haber, D.A. (1997) Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res*, **57**, 1429-1434.

Englert, C., Vidal, M., Maheswaran, S., Ge, Y., Ezzell, R.M., Isselbacher, K.J. und Haber, D.A. (1995b) Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11960-11964.

Literatur

Gashler, A.L., Bonthron, D.T., Madden, S.L., Rauscher, F.J.d., Collins, T. und Sukhatme, V.P. (1992) Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10984-10988.

Gilbert, S.F. (1997) Edited by Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H. und Bruns, G.A. (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, **343**, 774-778.

Gossen, M. und Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5547-5551.

Gray's Anatomy (1995) Edited by Williams PL. Edinburgh, UK:Churchill Livingstone.

Grobstein, C. (1955) Inductive interactions in the development of the mouse metanephros. *J Exp Zool* **130**, 319-340.

Haber, D.A., Park, S., Maheswaran, S., Englert, C., Re, G.G., Hazen-Martin, D.J., Sens, D.A. und Garvin, A.J. (1993) WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science*, **262**, 2057-2059.

Haber, D.A., Sohn, R.L., Buckler, A.J., Pelletier, J., Call, K.M. und Housman, D.E. (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9618-9622.

Hall, P.A., Levison, D.A., Woods, A.L., Yu, C.C., Kellock, D.B., Watkins, J.A., Barnes, D.M., Gillett, C.E., Camplejohn, R., Dover, R. et al. (1990) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms [see comments]. *J Pathol*, **162**, 285-294.

Hanahan, D. (1986) Techniques for the transformation of *E. coli*. In *DNA cloning*. D. M. Glover (ed.). IRL Press, Oxford, **1**, 109-135.

Harrington, M.A., Konicek, B., Song, A., Xia, X.L., Fredericks, W.J. und Rauscher, F.J.d. (1993) Inhibition of colony-stimulating factor-1 promoter activity by the product of the Wilms' tumor locus. *J Biol Chem*, **268**, 21271-21275.

Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P. und Tachibana, T. (1969) Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, **223**, 363-368.

Hatano, M., Roberts, C.W., Minden, M., Crist, W.M. und Korsmeyer, S.J. (1991) Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science*, **253**, 79-82.

- Henry, I., Grandjouan, S., Couillin, P., Barichard, F., Huerre-Jeanpierre, C., Glaser, T., Philip, T., Lenoir, G., Chaussain, J.L. und Junien, C. (1989b) Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3247-3251.
- Herzer, U., Crocoll, A., Barton, D., Howells, N. und Englert, C. (1999) The Wilms tumor suppressor gene *wt1* is required for development of the spleen. *Curr Biol*, **9**, 837-840.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D. und van Heyningen, V. (1991) Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene [published erratum appears in *Nature* 1992 Feb 20;355(6362):750]. *Nature*, **354**, 522-525.
- Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., Rosenberg, M.P., Zhan, Q., Fernandez-Salguero, P.M., Morgan, W.F., Deng, C.X. und Fornace, A.J., Jr. (1999) Genomic instability in *Gadd45a*-deficient mice. *Nat Genet*, **23**, 176-184.
- Johnstone, R.W., See, R.H., Sells, S.F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D.A., Licht, J.D., Sugrue, S.P., Roberts, T., Rangnekar, V.M. und Shi, Y. (1996) A novel repressor, *par-4*, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor *WT1*. *Mol Cell Biol*, **16**, 6945-6956.
- Johnstone, R.W., Wang, J., Tommerup, N., Vissing, H., Roberts, T. und Shi, Y. (1998) *Ciao 1* is a novel WD40 protein that interacts with the tumor suppressor protein *WT1*. *J Biol Chem*, **273**, 10880-10887.
- Kennedy, D., Ramsdale, T., Mattick, J. und Little, M. (1996) An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (*WT1*) revealed by structural modelling. *Nat Genet*, **12**, 329-331.
- Kennedy, M.A., Gonzalez-Sarmiento, R., Kees, U.R., Lampert, F., Dear, N., Boehm, T. und Rabbitts, T.H. (1991) *HOX11*, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8900-8904.
- Kent, J., Lee, M., Schedl, A., Boyle, S., Fantes, J., Powell, M., Rushmere, N., Abbott, C., van Heyningen, V. und Bickmore, W.A. (1997) The reticulocalbin gene maps to the *WAGR* region in human and to the *Small eye* Harwell deletion in mouse. *Genomics*, **42**, 260-267.
- Kikuchi, H., Takata, A., Akasaka, Y., Fukuzawa, R., Yoneyama, H., Kurosawa, Y., Honda, M., Kamiyama, Y. und Hata, J. (1998) Do intronic mutations affecting splicing of *WT1* exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet*, **35**, 45-48.
- Kim, J., Prawitt, D., Bardeesy, N., Torban, E., Vicaner, C., Goodyer, P., Zabel, B. und Pelletier, J. (1999) The Wilms' tumor suppressor gene (*wt1*) product regulates *Dax-1* gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol*, **19**, 2289-2299.

Literatur

- King-Underwood, L., Renshaw, J. und Pritchard-Jones, K. (1996) Mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in leukemias. *Blood*, **87**, 2171-2179.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-70.
- Klamt, B., Koziell, A., Poulat, F., Wieacker, P., Scambler, P., Berta, P. und Gessler, M. (1998) Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/-KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet*, **7**, 709-714.
- Kleinbrecht, J., Selow, J. und Winkler, W. (1982) The mouse mutant limb-deformity (ld). *Anat Anz*, **152**, 313-324.
- Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 820-823.
- Koufos, A., Grundy, P., Morgan, K., Aleck, K.A., Hadro, T., Lampkin, B.C., Kalbakji, A. und Cavenee, W.K. (1989) Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5. *Am J Hum Genet*, **44**, 711-719.
- Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. und Jaenisch, R. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, **74**, 679-691.
- Kudoh, T., Ishidate, T., Moriyama, M., Toyoshima, K. und Akiyama, T. (1995) G1 phase arrest induced by Wilms tumor protein WT1 is abrogated by cyclin/CDK complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4517-4521.
- Ladanyi, M. und Gerald, W. (1994) Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res*, **54**, 2837-2840.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamond, A.I. und Earnshaw, W.C. (1998) Structure and function in the nucleus. *Science*, **280**, 547-553.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome [news; comment] [see comments]. *Nature*, **358**, 15-16.
- Larsson, S.H., Charlier, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V. und Hastie, N.D. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, **81**, 391-401.
- Lee, S.B., Huang, K., Palmer, R., Truong, V.B., Herzlinger, D., Kolquist, K.A., Wong, J., Paulding, C., Yoon, S.K., Gerald, W., Oliner, J.D. und Haber, D.A. (1999) The Wilms tumor suppressor WT1 encodes a transcriptional activator of amphiregulin. *Cell*, **98**, 663-673.

- Lewis, W.H., Yeger, H., Bonetta, L., Chan, H.S., Kang, J., Junien, C., Cowell, J., Jones, C. und Dafoe, L.A. (1988) Homozygous deletion of a DNA marker from chromosome 11p13 in sporadic Wilms tumor. *Genomics*, **3**, 25-31.
- Lu, M., Gong, Z.Y., Shen, W.F. und Ho, A.D. (1991) The tcl-3 proto-oncogene altered by chromosomal translocation in T-cell leukemia codes for a homeobox protein. *Embo J*, **10**, 2905-2910.
- Madden, S.L., Cook, D.M., Morris, J.F., Gashler, A., Sukhatme, V.P. und Rauscher, F.J., III. (1991) Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science*, **253**, 1550-1553.
- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G. und Haber, D.A. (1995) The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev*, **9**, 2143-2156.
- Maheswaran, S., Englert, C., Lee, S.B., Ezzel, R.M., Settleman, J. und Haber, D.A. (1998a) E1B 55K sequesters WT1 along with p53 within a cytoplasmic body in adenovirus-transformed kidney cells. *Oncogene*, **16**, 2041-2050.
- Maheswaran, S., Englert, C., Zheng, G., Lee, S.B., Wong, J., Harkin, D.P., Bean, J., Ezzell, R., Garvin, A.J., McCluskey, R.T., DeCaprio, J.A. und Haber, D.A. (1998b) Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70. *Genes Dev*, **12**, 1108-1120.
- Matsunaga, E. (1981) Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet*, **57**, 231-246.
- Maw, M.A., Grundy, P.E., Millow, L.J., Eccles, M.R., Dunn, R.S., Smith, P.J., Feinberg, A.P., Law, D.J., Paterson, M.C., Telzerow, P.E. et al. (1992) A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res*, **52**, 3094-3098.
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Drouin, S.S., Madrid, L.V., Marshall, A.F., Reed, J.C., Weissman, B.E. und Baldwin, A.S. (1999) WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *Embo J*, **18**, 3990-4003.
- McDonnell, T.J., Nunez, G., Platt, F.M., Hockenberry, D., London, L., McKearn, J.P. und Korsmeyer, S.J. (1990) Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol*, **10**, 1901-1907.
- McKay, L.M., Carpenter, B. und Roberts, S.G. (1999) Regulation of the Wilms' tumour suppressor protein transcriptional activation domain. *Oncogene*, **18**, 6546-6554.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. et al. (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**, 66-71.

Literatur

Moffett, P., Bruening, W., Nakagama, H., Bardeesy, N., Housman, D., Housman, D.E. und Pelletier, J. (1995) Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11105-11109.

Moore, A.W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N.D. und Schedl, A. (1999) YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*, **126**, 1845-1857.

Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D. und Ingraham, H.A. (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, **93**, 445-454.

Novack, D.V. und Korsmeyer, S.J. (1994) Bcl-2 protein expression during murine development [see comments]. *Am J Pathol*, **145**, 61-73.

Oh, S., Song, Y., Yim, J. und Kim, T.K. (1999) The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem*, **274**, 37473-37478.

Park, S., Schalling, M., Bernard, A., Maheswaran, S., Shipley, G.C., Roberts, D., Fletcher, J., Shipman, R., Rheinwald, J., Demetri, G. et al. (1993) The Wilms tumour gene WT1 is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma. *Nat Genet*, **4**, 415-420.

Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L. et al. (1991) Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*, **67**, 437-447.

Pritchard-Jones, K. (1997) Molecular genetic pathways to Wilms tumor. *Crit Rev Oncog*, **8**, 1-27.

Rackley, R.R., Flenniken, A.M., Kuriyan, N.P., Kessler, P.M., Stoler, M.H. und Williams, B.R. (1993) Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ*, **4**, 1023-1031.

Rauscher, F.J.d., Morris, J.F., Tournay, O.E., Cook, D.M. und Curran, T. (1990) Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*, **250**, 1259-1262.

Reddy, J.C., Morris, J.C., Wang, J., English, M.A., Haber, D.A., Shi, Y. und Licht, J.D. (1995) WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J Biol Chem*, **270**, 10878-10884.

Riccardi, V.M., Sujansky, E., Smith, A.C. und Francke, U. (1978) Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics*, **61**, 604-610.

Roberts, C.W., Shutter, J.R. und Korsmeyer, S.J. (1994) Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature*, **368**, 747-749.

Sakamoto, Y., Yoshida, M., Semba, K. und Hunter, T. (1997) Inhibition of the DNA-binding and transcriptional repression activity of the Wilms' tumor gene product, WT1, by cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of Ser-365 and Ser-393 in the zinc finger domain. *Oncogene*, **15**, 2001-2012.

Scharnhorst, V., Dekker, P., van der Eb, A.J. und Jochemsen, A.G. (1999) Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem*, **274**, 23456-23462.

Scharnhorst, V., Dekker, P., van Der Eb, A.J. und Jochemsen, A.G. (2000) Physical interaction between wilms tumor 1 and p73 proteins modulates their functions [In Process Citation]. *J Biol Chem*, **275**, 10202-10211.

Sharma, P.M., Bowman, M., Madden, S.L., Rauscher, F.J., 3rd und Sukumar, S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev*, **8**, 720-731.

Sibilia, M. und Wagner, E.F. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor [published erratum appears in *Science* 1995 Aug 18;269(5226):909]. *Science*, **269**, 234-238.

Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. und Kastan, M.B. (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*, **11**, 3471-3481.

Spector, D.L. (1993) Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 265-315.

Threadgill, D.W., Dlugosz, A.A., Hansen, L.A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R.C. et al. (1995) Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*, **269**, 230-234.

Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr. und Harris, C.C. (1999) GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3706-3711.

Wang, Z.Y., Madden, S.L., Deuel, T.F. und Rauscher, F.J.d. (1992) The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J Biol Chem*, **267**, 21999-22002.

Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q. und Deuel, T.F. (1993a) The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem*, **268**, 9172-9175.

Literatur

Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Enger, K.T. und Deuel, T.F. (1993b) A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8896-8900.

Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Seufert, W., Taguchi, T., Testa, J.R., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Welsh, D., Shenk, T. und Deuel, T.F. (1996) Molecular cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human ubiquitin-conjugating enzyme 9. *J Biol Chem*, **271**, 24811-24816.

Werner, H., Re, G.G., Drummond, I.A., Sukhatme, V.P., Rauscher, F.J.d., Sens, D.A., Garvin, A.J., LeRoith, D. und Roberts, C.T., Jr. (1993) Increased expression of the insulin-like growth factor I receptor gene, IGF1R, in Wilms tumor is correlated with modulation of IGF1R promoter activity by the WT1 Wilms tumor gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5828-5832.

Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. und Micklem, G. (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 [see comments] [published erratum appears in Nature 1996 Feb 22;379(6567):749]. *Nature*, **378**, 789-792.

Ye, Y., Raychaudhuri, B., Gurney, A., Campbell, C.E. und Williams, B.R. (1996) Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *Embo J*, **15**, 5606-5615.

Zhan, Q., Chen, I.T., Antinore, M.J. und Fornace, A.J., Jr. (1998) Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding [published erratum appears in Mol Cell Biol 1998 Sep;18(9):5620]. *Mol Cell Biol*, **18**, 2768-2778.

Zhan, Q., Kontny, U., Iglesias, M., Alamo, I., Jr., Yu, K., Hollander, M.C., Woodworth, C.D. und Fornace, A.J., Jr. (1999) Inhibitory effect of Bcl-2 on p53-mediated transactivation following genotoxic stress. *Oncogene*, **18**, 297-304.