

Forschungszentrum Karlsruhe  
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte  
FZKA 6513

*In vitro* und *in vivo* Studien  
zur Funktion des Tumorsuppressorgens *w<sup>t</sup>1*

**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*<sup>-/-</sup>-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*<sup>-/-</sup>-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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
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
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
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
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>41</b>
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>wtl</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
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>66</b>
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
<b>5</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>80</b>

# 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 Zinkfinger-region 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).

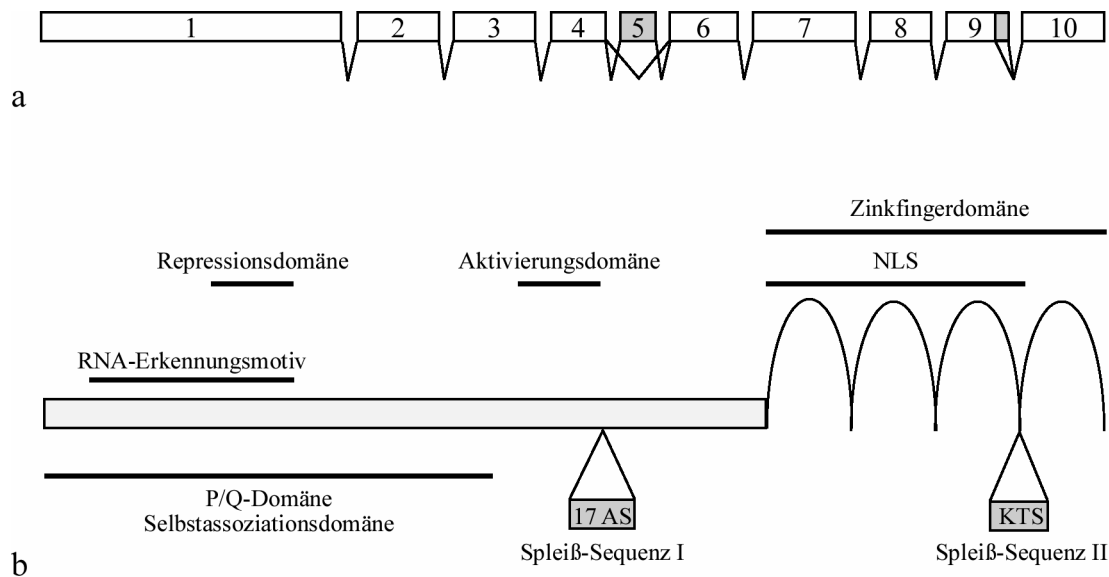
## *Einleitung*

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.

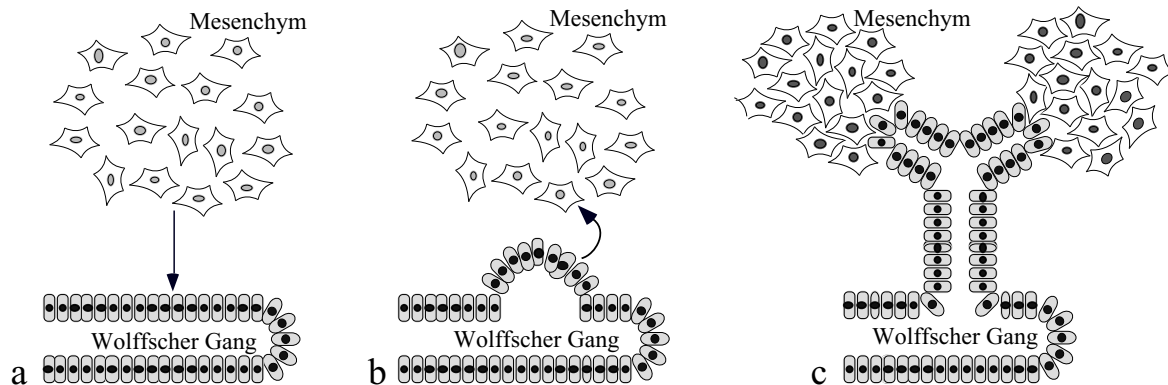
## 1.6 Das Expressionsmuster von *WT1* und seine Rolle während der Embryonalentwicklung

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 CGCCCCCGC 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- $\alpha$*  (*platelet-derived growth factor  $\alpha$  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- $\alpha$* -Promotors führten zur Identifikation einer weiteren WT1-Bindestelle, die 3' von der EGR-1-Konsensussequenz liegt: (TCC)<sub>4</sub>TCTCC. 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- $\alpha$* -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).

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.

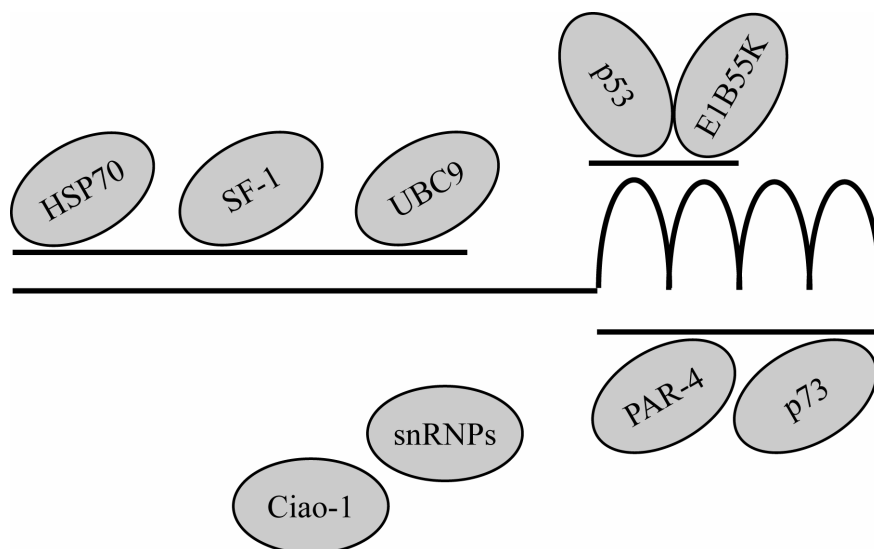
### 1.9 WT1-interagierende Proteine

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 *w1* 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 *w1* resultiert in früher embryonaler Letalität und viele der *w1*-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 <sup>®</sup>	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-[ <sup>35</sup> S]-Methionin und L-[ <sup>35</sup> S]-Cystein	14,3 mCi/ml
<sup>32</sup> Orthophosphat	10 mCi/ml
[ <sup>33</sup> 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> <sup>+/+</sup> )
Saos	menschliche Osteosarkomazelllinie ( <i>p53</i> <sup>-/-</sup> )
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

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>:** Zur Herstellung einer 0,1 M Lösung wurden 90 mg Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> in 5 ml H<sub>2</sub>O 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 CaCl<sub>2</sub>, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,3

**PBS<sup>-/-</sup> (-Ca/-Mg):** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 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 H<sub>2</sub>O, 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 Na<sub>3</sub>Citrat

### 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ 1-127, Wt1 $\Delta$ 124-263, Wt1 $\Delta$ 282-364, Wt1 $\Delta$ 6-180, Wt1 $\Delta$ 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 <sup>tm1Jae</sup>	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
C57BL/6J-Tlx1 <sup>tm1Sjk</sup>	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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g/ml}$  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 dürfen 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  5 x Ligasepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 7,6; 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM ATP, 5 mM DTT und 25% (w/v) Polyethylenglycol-8000) und 1-3 U T4-DNA-Ligase versetzt. Dabei wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  das Volumen der Reaktion auf 20  $\mu\text{l}$  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 CaCl<sub>2</sub> (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 CaCl<sub>2</sub> (50 mM) aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 100 mM CaCl<sub>2</sub> / 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 10<sup>6</sup> 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 H<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.2.5 Sequenzierung von DNA und Auftrennung der Sequenzierprodukte**

Unter Verwendung des Thermo-Sequenase-Kits (Amersham, Braunschweig) wurde die Sequenzierung nach der [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-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 MgCl<sub>2</sub>) in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Davon wurden jeweils 4,5 µl zu einem vorgelegten Gemisch aus dNTPs (6 µM) und dem entsprechenden [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-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  $5 \times 10^5$  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 MgCl<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub>O 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 Gelektrophorese 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.  $3 \times 10^5$  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  $8 \times 10^5$  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 $^{32}\text{P}$ und $^{35}\text{S}$**

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

Medium, jeweils mit 10% dialysiertem FCS, auf die Zellen gegeben. Nach 20 min wurden pro Schale 100  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-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  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer (versetzt mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 1  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin, 1 mM PMSF und 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}$  WTC19 oder 5  $\mu\text{l}$  WTC8 Serum oder 100  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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  $^{32}\text{P}$  markierten Proteine wurden aus der Membran ausgeschnitten und in  $\text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{l}$  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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O, dann in 0,05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-Lösung getaucht, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in 100 µl 0,05 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>-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 H<sub>2</sub>O gewaschen. Peptidlösung und H<sub>2</sub>O wurden vereinigt und die Peptide im Vakuum-Konzentrator (Speed Vac®, Sarvant, Farmingdale, NY, USA) eingetrocknet, 3 x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und lyophilisiert. Zur Oxidation der Peptide wurden zunächst 900 µl 100 prozentige Ameisensäure mit 100 µl 30 prozentiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 H<sub>2</sub>O 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 Mausegeweben**

### **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*<sup>+/-</sup> und *Hox11*<sup>+/-</sup>) 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**

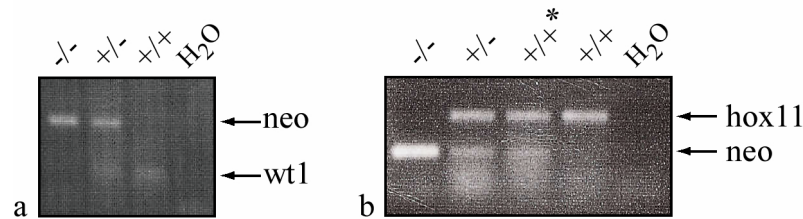
Für die Bestimmung des Genotyps der Embryonen oder geborenen Nachkommenschaft der Mauslinien wurde zunächst aus Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Tiere genomische DNA isoliert. Dazu wurden die Biopsien in 500 µl *tail buffer* (100 mM Tris-base pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% (w/v) SDS, 200 mM NaCl) unter 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 H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **PCR mit Genlokus-spezifischen Oligonukleotiden zur Identifikation des Genotyps**

Zur Identifikation des Genotyps der Mäuse der *wt1*<sup>-/-</sup>-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*<sup>-/-</sup>-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*<sup>+/-</sup> - (a) bzw. *hox11*<sup>+/-</sup> -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*<sup>+/-</sup>-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 H<sub>2</sub>O 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<sup>-/-</sup> 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 Wachsböcke 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 Wachsböcke 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 H<sub>2</sub>O für je 2 min wurden die Schnitte für 5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 H<sub>2</sub>O) 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 Sekundäntikörper gewählt. Nach dreimaligem Waschen in PBS für 3 min folgte die Inkubation mit dem Primäntikörper (1:100 in Blockierlösung) über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen, eine Verdünnung des biotinylierten Sekundäntikörpers (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-H<sub>2</sub>O 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 MgCl<sub>2</sub>, 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-H<sub>2</sub>O 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<sup>-</sup> 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 MgCl<sub>2</sub>). 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.