

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Regulation
der Amine Oxidase Copper-containing 1 durch den
Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian Friederich Wolf Braun

aus Bielefeld

Datum der Promotion: 09.12.2016

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| Zusammenfassung | 4 |
| Abstract..... | 6 |
| 1. Einleitung | 8 |
| 1.1 Der Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1 (WT1) | 8 |
| 1.1.1 Hintergrund | 8 |
| 1.1.2 WT1 in der Embryonalentwicklung | 10 |
| 1.1.3 WT1 in Tumoren | 11 |
| 1.2 Biogene Polyamine | 13 |
| 1.2.1 Hintergrund und Metabolismus..... | 13 |
| 1.2.2 Polyamine in der Embryonalentwicklung..... | 15 |
| 1.2.3 Polyamine in Tumoren..... | 16 |
| 1.3 Die Amine Oxidase Copper-containing 1 (AOC1)..... | 16 |
| 1.4 Schnittstellen des WT1 und Polyaminhaushalts | 19 |
| 1.5 Entwicklung der Fragestellung | 20 |
| 2. Material und Methoden | 22 |
| 2.1 Versuchstiere | 22 |
| 2.2 Zellkulturtechniken | 22 |
| 2.2.1 Zellkultivierung und Passagierung..... | 22 |
| 2.2.2 WT1-Stimulation in UB27-Zellen | 23 |
| 2.2.3 Transiente Transfektion und Reporteragen Assay | 23 |
| 2.3. Molekularbiologische Methoden..... | 25 |
| 2.3.1 RNA-Extraktion | 25 |
| 2.3.2 Reverse Transkription..... | 26 |
| 2.3.3 Realtime Polymerase Chain Reaction | 27 |
| 2.3.4 Polymerase Chain Reaction | 28 |
| 2.3.5 Klonierung und Plasmidpräparation..... | 29 |
| 2.3.6 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ... | 32 |
| 2.3.7 Westernblot..... | 33 |
| 2.3.8 siRNA-Knockdown..... | 34 |
| 2.3.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)..... | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.3.10 Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Assay | 37 |
| 2.3.11 Organentnahme, Organkulturen und Morpholino <i>Wt1</i> -Knockdown | 38 |
| 2.3.12 Anfertigung von Gewebeschnitten und immunhistologische Färbung | 39 |
| 2.4 Datenbanken | 41 |
| 2.5 Statistik | 42 |
| 3. Ergebnisse | 43 |
| 3.1 Die zellulären Expressionsniveaus von WT1 und AOC1 sind korreliert..... | 43 |
| 3.2 Der proximale <i>AOC1</i> -Promotor besitzt eine potenzielle <i>Wt1</i> -Bindungsstelle | 46 |
| 3.3 Der <i>AOC1</i> -Promotor wird durch WT1 stimuliert | 48 |
| 3.4 WT1 bindet an den proximalen <i>AOC1</i> -Promotor..... | 50 |
| 3.5 WT1 reguliert die <i>AOC1</i> -Expression in embryonalen Mäuseherzen | 54 |
| 3.6 <i>AOC1</i> und WT1 sind im embryonalen Epikard co-exprimiert..... | 56 |
| 4. Diskussion..... | 58 |
| 4.1 Die <i>AOC1</i> -Expression steht unter der transkriptionellen Kontrolle von WT1 | 58 |
| 4.2 Bedeutung einer transkriptionellen Regulation des <i>AOC1</i> -Gens durch WT1..... | 61 |
| 4.2.1 Mögliche Bedeutung einer Regulation des <i>AOC1</i> -Gens durch WT1 in der Tumorgenese und Tumorsuppression..... | 62 |
| 4.2.2 Mögliche Bedeutung einer Regulation des <i>AOC1</i> -Gens durch WT1 während der Embryonalentwicklung..... | 64 |
| 4.3 Fazit und Ausblick | 68 |
| 5. Literaturverzeichnis | 71 |
| Eidesstattliche Versicherung..... | 82 |
| Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen | 82 |
| Lebenslauf | 83 |
| Komplette Publikationsliste | 86 |
| Danksagung..... | 87 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|--|
| +/+ | Wildtyp |
| +/- | Heterozygot |
| -/- | Knockout |
| A | Adenin |
| 4-ABT | 4-Aminobutanal |
| ABP1 | Amiloride binding Protein 1 |
| ADAMTS | A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs |
| AG | Arbeitsgruppe |
| Amhr2 | Anti-Müller-Hormon-Rezeptor 2 |
| ANOVA | Analysis of variance |
| AOC1 | Amine Oxidase Copper-containing 1 |
| APC | Adenomatous-polyposis-coli |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| cDNA | Complementary DNA |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| CoA | Coenzym A |
| Ct | Cycle threshold |
| Cy | Cyanine Dye |
| DAO | Diaminoxidase |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindole |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DFMO | Difluoromethylornithin |
| DIG | Digoxigenin |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's Medium |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |

| Abkürzung | Bedeutung |
|-----------------------------|--|
| E-Cadherin | Endotheliales Cadherin |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| EMT | Epithelial-mesenchymale Transition |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| G | Guanin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| h | Human |
| HDC | L-Histidin Decarboxylase |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HS | High salt |
| IP | Immunpräzipitation |
| kDa | Kilo Dalton |
| KRAS | Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog |
| KTS | Lysin, Threonin und Serin |
| LS | Low salt |
| m | Murin |
| MABT | Maleic acid buffer containing Tween |
| MET | Mesenchymal-epitheliale Transition |
| mRNA | messenger RNA |
| Mut | Mutiert |
| N ¹ AC-Spermidin | N ¹ -Acetyl-Spermidin |
| NBT/BCIP | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat |
| OCT-1 | Octamer transcription factor-1 |
| ODC | Ornithin-Decarboxylase |
| PAO | Polyaminoxidase |
| Pax-2 | Paired box gene 2 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction |
| SAMDC | S-Adenosylmethionin-Decarboxylase |

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|---|
| SD | Standardabweichung |
| SD-Syn. | Spermidinsynthese |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SM-Syn. | Sperminsynthese |
| Snai1 | Snail family zinc finger 1 |
| SP1 | Specificity-Protein 1 |
| SSAT | N ¹ -Spermidin/Spermin-acetyltransferase |
| T | Thymin |
| TBE | Tris, Borsäure, EDTA |
| TBST | Tris Buffered Saline with Tween |
| TE | Tris, EDTA |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TNF-β1 | Tumor necrosis factor- β1 |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UTR | Untranslatierte Region |
| WT1 | Wilms-Tumor-Protein/Transkriptionsfaktor 1 |

Zusammenfassung

Fragestellung: Das Wilms-Tumor-Protein 1 ist ein Transkriptionsfaktor, der u.a. für die Entwicklung des Herzens und der Nieren notwendig ist. WT1 ist außerdem als Tumorsuppressor wirksam und wird in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert.

Die Diaminoxidase AOC1 (Amine Oxidase Copper-containing 1) degradiert Putrescin und hat damit eine wichtige Funktion im Polyaminstoffwechsel. Polyamine sind organische Polykationen, die u.a. Zellproliferations- und Differenzierungsprozesse beeinflussen. Darüber hinaus spielen sie auch eine Rolle in der Entwicklung des Herzens und der Nieren sowie in der Entstehung von Tumoren. In dieser Arbeit wurde die Hypothese überprüft, dass die Expression der AOC1, und damit der Polyaminkatabolismus, durch den Transkriptionsfaktor WT1 reguliert wird.

Methoden: Hierfür wurde die AOC1 mRNA nach Veränderung der WT1 Expression in verschiedenen Zelllinien sowie in primären embryonalen Epikardkulturen und in den Herzen von *Wt1* Knockoutembryonen der Maus gemessen. Mittels Reportergenassays wurde die Regulation des AOC1-Promotors durch WT1 untersucht. Die Bindung von WT1 an den AOC1-Promotor wurde durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) und Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Assays analysiert. Die Lokalisation von AOC1 und WT1 Protein in embryonalen Herzen erfolgte mittels Immunhistochemie.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass Kotransfektion von WT1 zu einer signifikanten Zunahme der AOC1 Promotoraktivität führt. Mutation einer transkriptionsstartnahen, *in silico* ermittelten WT1 Bindungsstelle verhinderte diesen WT1 Effekt. Der EMSA und ChIP-Assay bewiesen, dass WT1 tatsächlich an den AOC1-Promotor bindet. Die Regulation der AOC1 Expression durch WT1 konnte auch in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden, in denen eine signifikante Korrelation der Expression von WT1 und AOC1 festgestellt wurde. Die Expressionsniveaus von AOC1 und WT1 waren auch in den Herzen von Wildtyp- und *Wt1*-heterozygoten (*Wt1*^{+/-}) bzw. homozygoten (*Wt1*^{-/-}) Knockoutembryonen der Maus sowie in primären embryonalen Epikardkulturen assoziiert. Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte ferner gezeigt werden, dass AOC1 und WT1 im embryonalen Epikard co-exprimiert werden.

Schlussfolgerungen: Diese Resultate belegen, dass WT1 die Transkription der AOC1, und dadurch möglicherweise den terminalen Polyaminkatabolismus, stimuliert.

Nachdem zuvor bereits das für die Polyaminsynthese limitierende Enzym ODC (Ornithin-Decarboxylase) als WT1 Zielgen beschrieben wurde, scheint der Polyaminmetabolismus somit ein zentraler Mediator der WT1 Effekte zu sein. WT1 und Polyamine haben komplexe Funktionen während der Embryonalentwicklung und in der Genese von Tumoren. In dieser Arbeit werden Mechanismen diskutiert, wie die Regulation der AOC1 durch WT1 das Tumorwachstum und die Embryonalentwicklung, insbesondere die Reifung des Herzens, beeinflussen kann. Weiterhin wird die Bedeutung der WT1-abhängigen AOC1 Expression für die epithelial-mesenchymalen Transition im embryonalen Epikard dargestellt.

Abstract

Introduction: The Wilms tumor protein 1 is a transcription factor with an essential function for the development of the heart and kidneys. WT1 additionally acts as a tumor suppressor gene but is also highly expressed in several tumors.

The diamine oxidase AOC1 (Amine Oxidase Copper-containing 1) degrades putrescine and therefore plays an important role in the polyamine metabolism. Polyamines are organic polycations, which, among other things, affect cell proliferation and differentiation. They are also involved in the development of the heart, kidneys and in tumor formation. This thesis examines the hypothesis that transcription of *AOC1* gene, and therefore the polyamine catabolism, is controlled by WT1.

Methods: *AOC1* mRNA was measured in the hearts of *Wt1* knockout mouse embryos, in primary embryonic epicardial cells, and in different cell lines with variable WT1 levels. Regulation of the *AOC1* promoter by WT1 was examined with reporter gene assays. The binding of WT1 to the *AOC1* promoter was analysed using Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) and Chromatin immunoprecipitation (ChIP). Localization of AOC1 and WT1 proteins in the embryonic heart was studied by immunohistochemical staining.

Results: Co-transfection of WT1 resulted in a significant increase in *AOC1* promoter activity. Mutation of an *in silico* predicted WT1 binding site close to the transcription start abolished this effect. EMSA and ChIP proved the binding of WT1 to the *AOC1* promoter. Regulation of AOC1 expression by WT1 was shown in different cell lines, in terms of a significant correlation between the AOC1 and WT1 expression levels. AOC1 and WT1 expression levels were also correlated in wild type-, *Wt1*-heterozygous (*Wt1*^{+/-}) and *Wt1*-homozygous (*Wt1*^{-/-}) mouse hearts, as well as in primary embryonic epicardial cells. Immunohistochemical staining showed a co-localisation of AOC1 and WT1 protein in the embryonic epicardium of the mouse.

Conclusion: These results demonstrate that WT1 stimulates the transcription of the *AOC1* gene and thereby possibly regulates the terminal polyamine catabolism. The fact that WT1 is already known to regulate the rate limiting enzyme of the polyamine synthesis ODC (Ornithine Decarboxylase) suggests the polyamine metabolism as a major mediator of WT1's effects. WT1 and polyamines play complex roles during embryonic development and tumor genesis. This thesis discusses several potential mechanisms by which the regulation of AOC1 through WT1 could influence tumor

growth, embryonic development and especially the development of the heart. It furthermore illustrates the relevance of the WT1 dependent regulation of AOC1 for the epithelial-mesenchymal transition in the embryonic epicardium.

1. Einleitung

Jede kernhaltige Zelle im menschlichen Organismus enthält mindestens eine Kopie des gesamten Genoms. Damit sich die für die Entwicklung des Menschen notwendigen unterschiedlichen Zelltypen differenzieren können, muss im Verlauf der Embryogenese eine Vielzahl von Genen in zeitlich und räumlich geordneter Weise an- und abgeschaltet werden. Dies geschieht unter anderem durch Transkriptionsfaktoren. Störungen dieser Regulation, z. B. aufgrund einer zu geringen, fehlerhaften oder zu starken Wirkung bestimmter Transkriptionsfaktoren, können zu Störungen in der Embryonalentwicklung sowie zu der Entartung von Zellen führen. (Vaquerizas et al. 2009)

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1 (WT1) und seiner regulatorischen Kontrolle der Amine Oxidase Copper-containing 1. WT1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in der Entwicklung von Herz, Nieren und Gonaden sowie in der Genese von Neoplasien eine Rolle spielt. Die Amine Oxidase Copper-containing 1 hat, neben einer Funktion als Histaminbarriere in Darm und Placenta, eine Funktion im terminalen Katabolismus des Polyaminhaushalts. Polyaminkristalle wurden erstmalig 1678 von Herrn van Leeuwenhoek in der Samenflüssigkeit gefunden. Dass es sich bei den Kristallen um Polyamine handelte, wurde jedoch erst im frühen 20. Jahrhundert entdeckt (Kusano et al. 2008). Die Polyamine Spermin, Spermidin und ihre Diamin-Vorstufe Putrescin bilden einen eng regulierten Interkonversionszyklus und sind u. a. in Proliferations- und Differenzierungsprozesse involviert. Weiterhin haben sie eine Funktion in der Embryonalentwicklung sowie in der Entstehung von Tumoren (Moinard et al. 2005; Loikkanen et al. 2005; Auvinen et al. 1997). In dieser Arbeit wird über die Regulation des *AOC1*-Gens durch WT1 berichtet, und es werden Hypothesen über mögliche Funktionen dieses Zusammenspiels formuliert.

1.1 Der Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1 (WT1)

1.1.1 Hintergrund

Das Wilms-Tumorgen *WT1* wurde erstmals aufgrund inaktivierender Mutationen in malignen Nierentumoren (Wilms-Tumoren, Nephroblastomen), die im Kindesalter mit

einer Häufigkeit von 1/10.000 auftreten, beschrieben. *WT1* ist ein Tumorsuppressorgen, welches in 10-15% der Wilms-Tumoren defekt vorliegt. Das auf Chromosom 11p13 lokalisierte Gen kodiert für das Wilms-Tumorprotein 1 (WT1) (Abb. 1). WT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der mit seinen vier Zinkfingern GC-reiche Basensequenzen bindet. WT1 weist vier alternative Spleißvarianten auf. Durch Verwendung einer alternativen Spleißdonorstelle am Ende von Exon 9 werden drei zusätzliche Aminosäuren, Lysin-Threonin-Serin (KTS), zwischen den dritten und vierten Zinkfinger integriert (Gessler et al. 1992; Haber et al. 1991). Daraus resultiert eine verminderte DNA-Bindungsaffinität des vierten Zinkfingers (Laity et al. 2000). Während die Funktion der WT1(+KTS) Proteinvarianten noch weitgehend ungeklärt ist, sind die WT1(-KTS) Proteine als nukleäre Transkriptionsfaktoren wirksam (Lee et al. 2001).

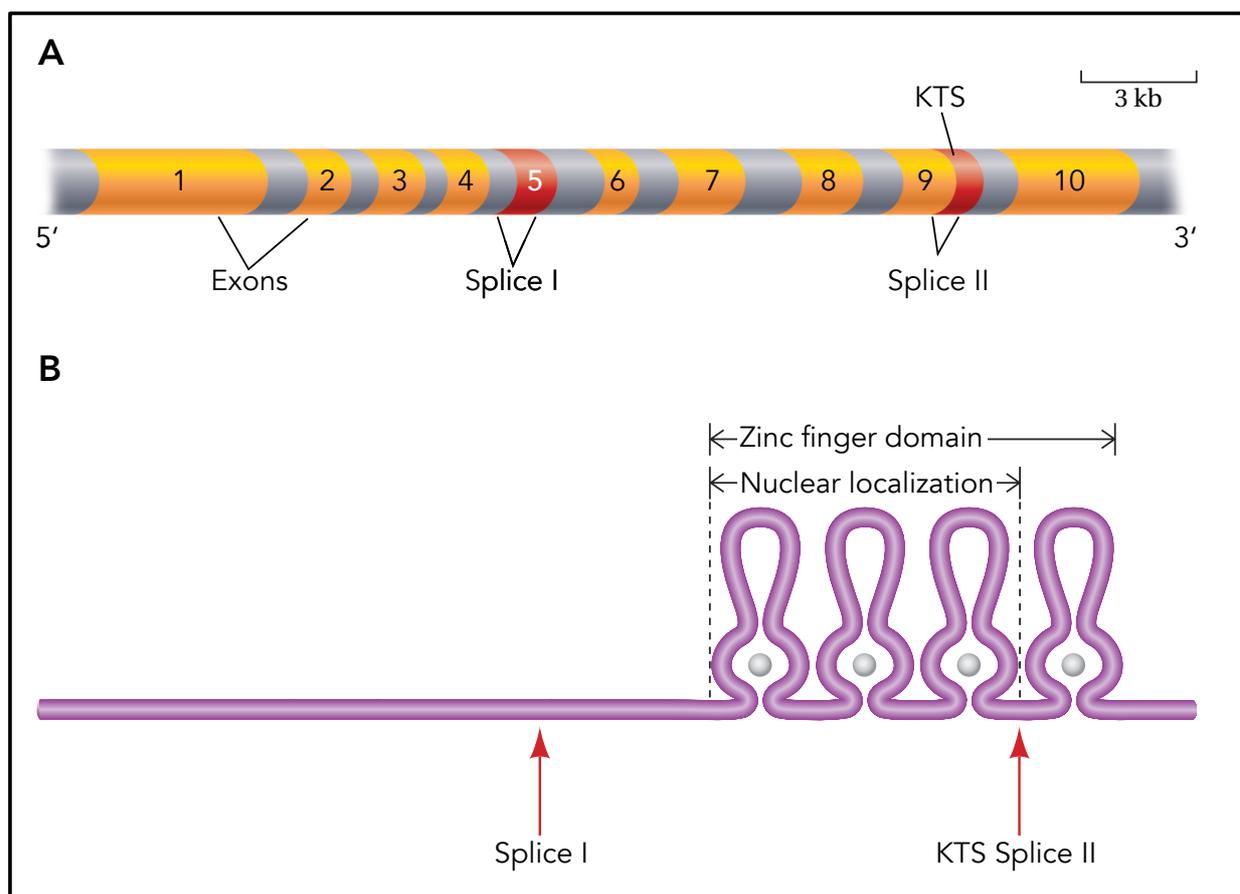


Abb. 1: Genaufbau (A) und Proteinstruktur (B) des WT1. WT1 weist zwei alternative Spleißdonorstellen auf. „Splice I“ in Exon fünf codiert für 17 Aminosäuren. „KTS Splice II“ in Exon 9 liegt zwischen Zinkfinger drei und vier und codiert für die +KTS- bzw. -KTS-Variante. Bei der +KTS-Variante sind drei zusätzliche Aminosäuren [Lysin (K) Threonin (T) und Serin (S)] zwischen den Zinkfingern eingeführt, was die spezifischen Bindungseigenschaften der +KTS- bzw. -KTS-Variante hervorruft. Grafik modifiziert nach Scholz et al. 2005.

Für WT1 wurde eine Reihe von Zielgenen beschrieben, welche u. a. bei der Zelladhäsion, Wachstumsprozessen, der Regulation des Zellzyklus und Apoptose-

Vorgängen eine Rolle spielen (Hohenstein et al. 2006).

1.1.2 WT1 in der Embryonalentwicklung

WT1 wird im adulten Organismus nur in wenigen Zelltypen physiologisch exprimiert. So ist die WT1-Expression in der Niere auf die Podozyten der Glomeruli und im gesunden Herzen auf das Endothel der großen Koronargefäße beschränkt (Mundlos et al. 1993; Duim et al. 2015). In der Embryonalentwicklung hingegen wird es hauptsächlich in der Niere und den Gonaden, aber auch im Epikard und in den Endothelzellen der Herzmuskelgefäße exprimiert (Mundlos et al. 1993; Duim et al. 2015; Moore et al. 1999). WT1 ist von entscheidender Bedeutung während der Entwicklung des Urogenitalsystems, des Herzens und der Lunge (Kreidberg et al. 1993). Homozygote *Wt1*^{-/-} Mäuse sterben am Tag E13,5. Dies ist am ehesten auf schwere Entwicklungsdefekte des Herzens zurückzuführen. Zusätzlich weisen die Embryonen vor allem eine Fehlbildung der Nieren und Gonaden auf (Lee et al. 2001).

Während der Nierenentwicklung kommt es zu einer Interaktion zwischen dem metanephrischen Mesenchym, in welchem WT1 zu diesem Zeitpunkt exprimiert wird, und der einsprossenden epithelialen Ureterknospe. Diese Interaktion ist essentiell für die folgende Verästelung der Ureterknospe. Die Aufzweigung der Ureterknospe führt wiederum im umliegenden metanephrischen Mesenchym zu einer Konversion des Mesenchyms zu Epithel und damit zur Bildung der Nephrone (Michos et al. 2009; Kreidberg et al. 1993). Ein solcher Differenzierungsprozess von mesenchymalen zu epithelialen Zellen wird als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet. Im Fall der Nephronbildung ist WT1 unter anderem für diesen Schritt notwendig (Davies et al. 2004). Auch das initiale Aussprossen der Ureterknospe ist von WT1 abhängig, obwohl in der Knospe selbst kein WT1 exprimiert wird (Kreidberg et al. 1993). Folglich induziert WT1 vermutlich im metanephrischen Mesenchym Signale, die das Wachstum der Harnleiterknospe stimulieren.

Der gegensätzliche Prozess zur MET, welcher ebenfalls für die Embryonalentwicklung und in der Entstehung von Neoplasien relevant ist, wird als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet; ein Vorgang, bei dem sich bestehendes Epithel zu Mesenchym dedifferenziert. Dabei verliert es seine Polarisierung sowie die Verbindungen zu anderen Zellen und beginnt, mesenchymale Marker zu exprimieren (Thiery et al. 2006).

Wt1^{-/-}-Mäuse weisen eine unvollständige Bildung des Epikards sowie perikardiale

Blutungen und ein dünnes Myokard auf (Kreidberg et al. 1993; Moore et al. 1999). Während der Herzentwicklung wird WT1 in den Epithelzellen des Epikards exprimiert. Hier ist es, im Gegensatz zur Nierenentwicklung, für eine epithelial-mesenchymale Transition epikardialer Zellen notwendig (Moore et al. 1999; Martínez-Estrada et al. 2010; von Gise et al. 2011). Diese EMT führt zur Bildung subepikardialer Mesenchymzellen, die als Vorläufer von glatten Muskel- und Endothelzellen der Koronargefäße und von Myokardzellen gelten (Moore et al. 1999; Zhou et al. 2008). All dies zeigt, dass WT1 während der Embryonalentwicklung eine Funktion in der Regulation epithelial-mesenchymaler Interaktionen hat (Abb. 2) (Hohenstein et al. 2006; Miller-Hodges et al. 2012).

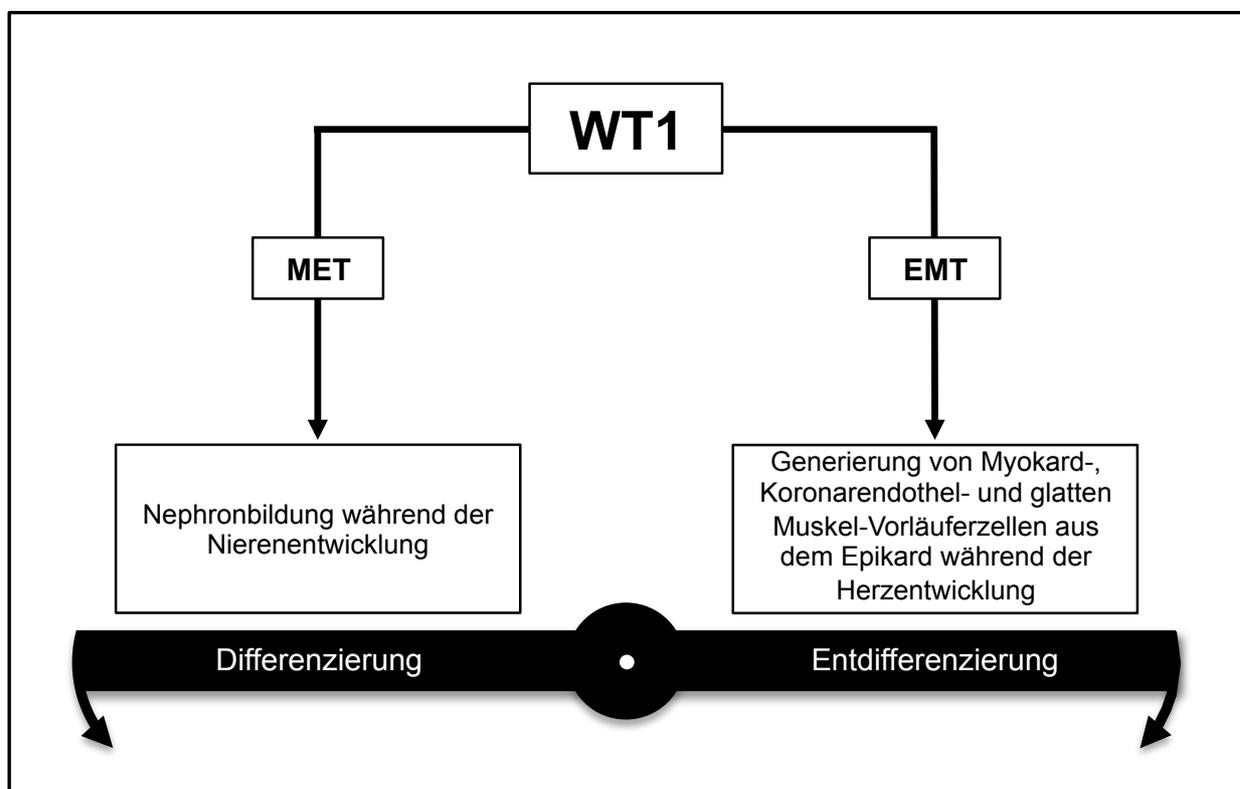


Abb. 2: Darstellung der gewebeabhängigen, gegensätzlichen Effekte des Wilms-Tumor-Proteins (WT1) auf Differenzierungs- und Entdifferenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung. WT1 stimuliert die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) während der Herzentwicklung bzw. die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bei der Nephrogenese (Davies et al. 2004; Moore et al. 1999; Zhou et al. 2008).

1.1.3 WT1 in Tumoren

Im Gegensatz zu seiner oben beschriebenen initialen Charakterisierung als Tumorsuppressor besitzt WT1 interessanterweise in verschiedenen Leukämieformen sowie in einer Reihe solider Tumoren eine pro-onkogene Wirkung: WT1 aktiviert

Zellzyklusregulatoren, kontrolliert epithelial-mesenchymale Transformationsvorgänge und stimuliert möglicherweise die Tumorangiogenese (Sugiyama 2001; Hohenstein et al. 2006). Bei Leukämien des lymphoiden und myeloiden Typs wird WT1 spezifisch und ausreichend stark exprimiert, um als Marker für das Tumorwachstum und als Angriffspunkt für die Entwicklung von Tumorstimmimpfungen verwendet werden zu können (Cilloni et al. 2004; Sugiyama 2010). Darüber hinaus wird WT1 in diversen soliden Tumoren als prognostischer Marker eingesetzt. So ist die Expression von WT1 in Kolon-, Mamma- und hepatozellulären Karzinomen häufig erhöht und mit einer signifikant schlechteren Prognose verbunden (Bejrananda et al. 2011; Miyoshi et al. 2002; Sera et al. 2008).

In der Pathogenese von Tumoren scheint eine gestörte epithelial-mesenchymale Balance von Bedeutung zu sein. Wahrscheinlich ist eine fehlerhafte bzw. unvollständige MET während der Nierenentwicklung, welche durch WT1 reguliert wird, ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung von Wilms-Tumoren (Hastie 1994; Hohenstein et al. 2006; Miller-Hodges et al. 2012). WT1 kann je nach Gewebe einen differenzierenden oder entdifferenzierenden Effekt ausüben. Momentan gelten diese unterschiedlichen kontextabhängigen Einflüsse auf die epithelial-mesenchymale Balance als potenzielle Erklärung für die duale Rolle des WT1 als Tumorsuppressor- und Protoonkogen. (Hohenstein et al. 2006; Miller-Hodges et al. 2012).

1.2 Biogene Polyamine

1.2.1 Hintergrund und Metabolismus

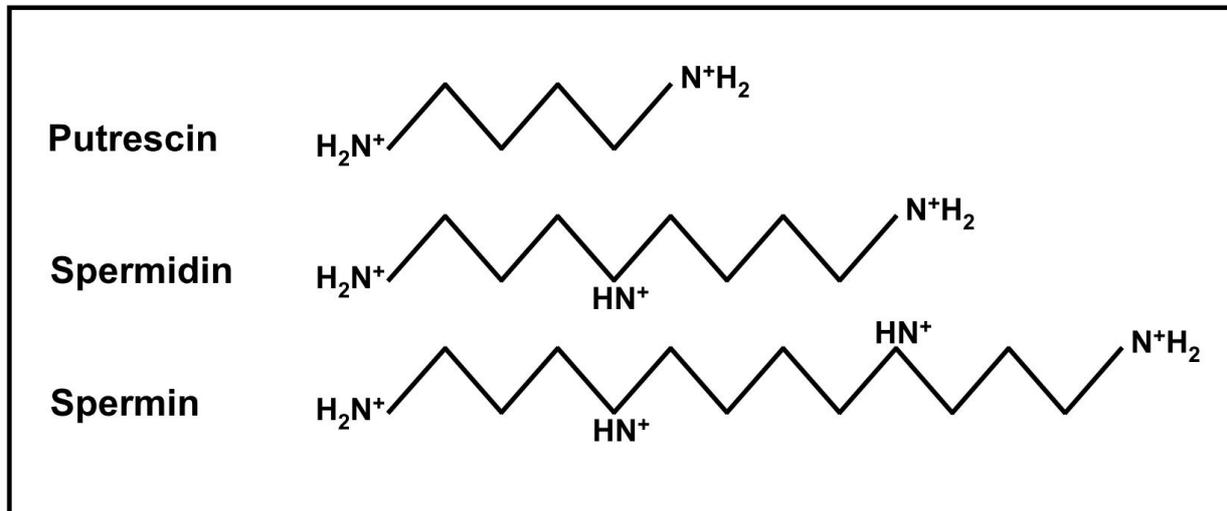


Abb. 3: Molekülstruktur der Polyamine. Bei Polyaminen handelt es sich um positiv geladene, aliphatische Kohlenstoffketten unterschiedlicher Länge mit zwei oder mehreren primären bzw. sekundären Aminogruppen (Tabor et al. 1964). Grafik modifiziert nach Lefèvre et al. 2011.

Die Polyamine Spermidin und Spermin sowie ihre Diaminorstufe Putrescin sind organische Polykationen (Abb. 3), deren Funktionen Wachstums- und Differenzierungsprozesse beeinflussen. So interagieren sie mit DNA, beeinflussen Protein-Syntheseraten und sind an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Man findet hohe Polyaminkonzentrationen während des Wachstums und in stark proliferierenden Zellen. (Loikkanen et al. 2005; Moinard et al. 2005; Feuerstein et al. 1991; Gritli-Linde et al. 2001). Der genaue Wirkmechanismus der Polyamine ist weitestgehend unbekannt, doch scheint eine enge Regulation der Polyaminkonzentration kritisch für normale Entwicklungs-, Differenzierungs- und Regenerationsprozesse zu sein (Gerner et al. 2004; Moinard et al. 2005; Babbar et al. 2007). Die Polyamin-Level werden durch ein komplexes Zusammenwirken von Produktion, Degradierung und Interkonversion sowie durch einen noch weitestgehend ungeklärten Transport zwischen Intra- und Extrazellulärraum reguliert (Abdulhusein et al. 2014; Seiler 2004). Abbildung 4 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Polyaminhaushalts.

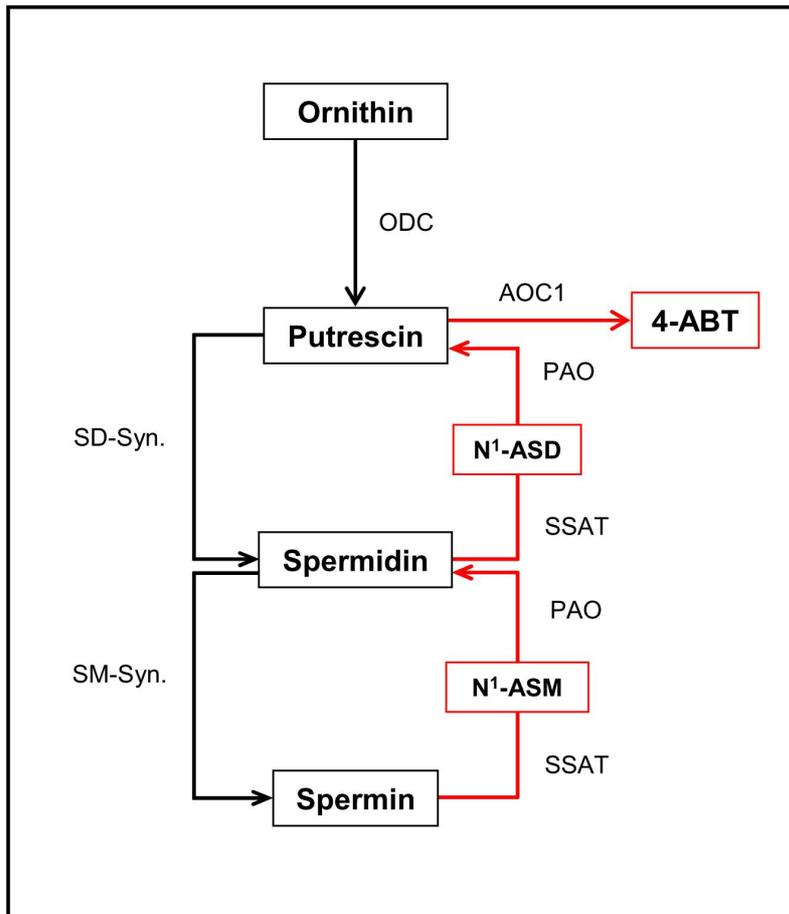


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung des Polyaminmetabolismus nach Lefèvre et al. 2011; Thomas et al. 2003 und Kusano et al. 2008. Die schwarzen Pfeile symbolisieren die Synthese, die roten den Katabolismus der Polyamine. **ODC**= Ornithin-Decarboxylase; **SD-Syn.**= Spermidinsynthase; **SM-Syn.**= Sperminsynthase; **SSAT**= N¹-Spermidin/Spermin-acetyltransferase; **N¹-ASM**= N¹-Acetylspermin; **PAO**= Polyaminoxidase; **N¹-ASD**= N¹-Acetylspermidin; **AOC1**= Amine Oxidase Copper-containing 1; **4-ABT**= 4-Aminobutanal

Die Produktion der endogenen Polyamine leitet sich von der aus Arginin gewonnenen Aminosäure Ornithin ab. Diese wird durch das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC) zu dem Diamin Putrescin decarboxyliert. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Polyaminproduktion (Thomas et al. 2003). Putrescin ist das Ausgangsmolekül des Polyamin-Interkonversionskreislaufs, in dem Putrescin, Spermidin und Spermin ineinander umgewandelt werden (Abb. 4). Putrescin wird dabei durch die Spermidinsynthase zu Spermidin und im Folgenden Spermidin durch die Sperminsynthase zu Spermin konvertiert. Dabei wird durch die Spermidin-Sperminsynthase jeweils eine, von der S-Adenosylmethionin-Decarboxylase (SAMDC) aus S-Adenosylmethionin gewonnene, Aminopropyl-Gruppe an das Substrat angehängt (Thomas et al. 2003; Moinard et al. 2005).

Die Rekonversion von Spermin über Spermidin zu Putrescin geschieht jeweils in einer zweistufigen Reaktion, in der das Substrat zunächst durch die Spermidin/Sperminacetyltransferase an der N¹-Position acetyliert und dann in einem Folgeschritt durch die Polyamin-Oxidase unter Bildung der toxischen Substanzen H₂O₂

und Acetamido-Propanal oxidiert wird (Abb. 4). Dies schließt den Polyamin-Interkonversions-Zyklus (Seiler 2004; Moinard et al. 2005). Der terminale Katabolismus der Polyamine geht ebenfalls von Putrescin aus und wird, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, durch die Diaminoxidase AOC1 reguliert (Sessa et al. 1994; Moinard et al. 2005).

1.2.2 Polyamine in der Embryonalentwicklung

Polyamine werden während der Embryogenese in vielen Geweben produziert. So konnte die Ornithin-Decarboxylase, das Schlüsselenzym für die Polyaminsynthese, beispielsweise im Nervensystem, den Nieren, den Testes, dem Darm sowie im Endo- und Myokard während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (Gritli-Linde et al. 2001). Mausembryonen mit einem Knockout der ODC sterben kurz nach der Implantation (Pendeville et al. 2001). Die Behandlung tragender Ratten mit dem ODC Inhibitor α -Difluoromethylornithin (DFMO) war in höheren Dosen ebenfalls letal für die Embryonen. Bei Injektion von DFMO in der Spätschwangerschaft sowie bei geringeren Dosen zeigte sich eine allgemeine Gewichtsreduktion des Nachwuchses und im Speziellen ein Gewichtsdefizit des Gehirns, Herzens und der Nieren (Slotkin et al. 1983). Die ODC wird während der Embryonalentwicklung vor allem in Epithelien exprimiert, deren Entwicklung von epithelial-mesenchymalen Interaktionen abhängt (Gritli-Linde et al. 2001).

Polyamine scheinen eine Rolle in der Regulation dieser epithelial-mesenchymalen Interaktionen zu spielen. So führte eine Polyamindepletion mit DFMO in MDCK-Nierenzellen zu einer deutlichen Steigerung der TNF- β 1 induzierten EMT. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Polyaminen fast vollständig verhindert. Zusätzlich konnten MDCK-Zellen, die bereits eine EMT durchlaufen hatten, mittels Zugabe von Polyaminen zurück in einen epithelialen Zustand geführt werden (Compagnone et al. 2012; Prunotto et al. 2010).

In der embryonalen Niere wird die ODC im Epithel der Ureterknospe sowie im umliegenden Mesenchym exprimiert (Loikkanen et al. 2005). Loikkanen et al. postulierten, dass die Funktion der ODC und damit das Vorkommen von Polyaminen essentiell für die normale Nierenentwicklung sind. Hemmung der ODC verursachte in *ex vivo* kultivierten Nierenanlagen der Maus deutliche morphologische Veränderungen. So waren eine Reduktion des Nierenvolumens, der Verästelungen der Ureterknospe

und eine verzögerte Entwicklung der Tubuli festzustellen. Loikkanen et al. konnten ferner zeigen, dass die Wirkung von DFMO auf die Nierenentwicklung mit einer Veränderung im Expressionsniveau einiger Gene verbunden ist, die für die Steuerung epithelial-mesenchymaler Interaktionen verantwortlich sind (Loikkanen et al. 2005).

1.2.3 Polyamine in Tumoren

Wegen ihrer Rolle im Rahmen von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose waren Polyamine schon früh ein interessanter Ansatzpunkt für die Tumorforschung. Dysregulationen des Polyaminhaushalts sind in vielen Neoplasien zu finden. So zeigen sich gesteigerte Polyaminkonzentrationen bzw. erhöhte ODC-Aktivitäten unter anderem in Kolon-, Brust-, Haut- und Prostatakarzinomen (Manni et al. 1995; Gilmour SK 2007; Gupta et al. 2000; Upp et al. 1988).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der ODC in NIH3T3 Zellen, einer murinen Fibroblasten-Zelllinie, zu einem Verlust der Zellkontaktinhibierung sowie einem beschleunigten Zellzyklus führen, und dass diese Zellen nach der Implantation in Mäuse gefäßreiche Fibrosarkome ausbilden (Moshier et al. 1993; Auvinen et al. 1997).

Es konnte für mehrere Tumorsupressor- und Protoonkogene ein Einfluss auf den Polyaminhaushalt nachgewiesen werden. So ist z. B. das der familiären adenomatösen Polyposis zugrundeliegende APC-Tumorsupressorgen ein Hemmer der ODC. Die Polyamin abbauende SSAT ist negativ reguliert durch das ebenfalls in Kolonkarzinomen vorkommende *KRAS* Onkogen (Gerner et al. 2004).

Aufgrund einer Assoziation mit onkogenen Prozessen ist der Polyaminhaushalt seit langem ein Angriffspunkt für Chemotherapeutika, die sich bislang vor allem im Bereich der Tumorprävention erfolgreich erweisen konnten (Gerner et al. 2004; Nowotarski et al. 2013).

1.3 Die Amine Oxidase Copper-containing 1 (AOC1)

Die Amine Oxidase Copper-containing 1 (AOC1), auch bekannt unter den Namen Amiloride binding Protein 1 (ABP1) und Diaminoxidase (DAO), wurde erstmals aus Schweinenieren isoliert und zunächst aufgrund ihrer Amilorid bindenden Eigenschaften fälschlicherweise für die Komponente eines apikalen Na⁺-Kanals gehalten (Barbry et al. 1987; Barbry et al. 1990). Tatsächlich katalysiert AOC1 die oxidative Desaminierung

biogener Amine wie Histamin und Putrescin (Novotny et al. 1994). Die AOC1 wurde vor allem in der Niere, dem Dünndarm, der Leber und der Plazenta, aber auch im Herzen nachgewiesen (Seiler 2004; Morel et al. 1992; Schwelberger et al. 1997; Perin et al. 1986).

Das *AOC1*-Gen ist im Menschen auf Chromosom 7 lokalisiert und enthält fünf Exons sowie vier Introns. Das Gen kodiert ein sezerniertes, homodimeres 186 kDa Glykoprotein, welches über Disulfidbrücken stabilisiert wird (Schwelberger et al. 1997). Das humane *AOC1*-Protein ist mit einer Übereinstimmung von 86% im Vergleich zum murinen *AOC1*-Protein hoch konserviert (Lundwall et al. 2003; Chassande et al. 1994). *AOC1* weist keine alternativen Spleißvarianten auf, in Ratten wurde jedoch eine verkürzte Variante des *AOC1*-Proteins in Lunge, Milz und Kolon nachgewiesen. Diese geht von einem, auch im humanen *AOC1*-Gen vorhandenen, sekundären Promotor im Intron 2 aus. Dieser kurzen Variante fehlt jedoch ein für die Enzymaktivität der *AOC1* essentieller Teil des aktiven Zentrums, so dass die Funktion ungeklärt bleibt (Chassande et al. 1994; Lingueglia et al. 1993).

Über die Regulation der *AOC1*-Expression ist wenig bekannt. Die Analyse des *AOC1*-Promotors ergab potenzielle Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren und eine für die Regulation besonders relevante GC-reiche, palindromische Sequenz nahe des Transkriptionsstarts (Chassande et al. 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Putrescin bei Ratten zu einer Erhöhung der *AOC1* in Niere, Leber und Herz führt (Perin et al. 1986). Weitere regulatorische Einflüsse auf *AOC1* sind für Östrogen, cAMP, Hydrocortison und den epidermal growth factor beschrieben (Liang et al. 2010; Sessa et al. 1994).

AOC1 desaminiert biogene Amine unter Bildung der zellschädigenden Metabolite H_2O_2 , NH_3 und einem Aldehyd-Rest. Die bevorzugten Substrate sind Histamin und Putrescin, wobei noch ungeklärt ist, welches der beiden Substrate in den verschiedenen Geweben die physiologisch wichtigere Rolle einnimmt (Biegański et al. 1983; Mizuguchi et al. 1994; Schwelberger et al. 1997). Der Abbau von Putrescin durch die *AOC1* ist in Abbildung 5 beispielhaft dargestellt. Auch Spermidin und N^1AC -Spermidin können mit verringerter Effektivität durch *AOC1* umgesetzt werden. Darüber hinaus sind möglicherweise auch noch andere Zwischenmetabolite des Polyaminhaushalts Substrate der *AOC1* (Seiler 2004).

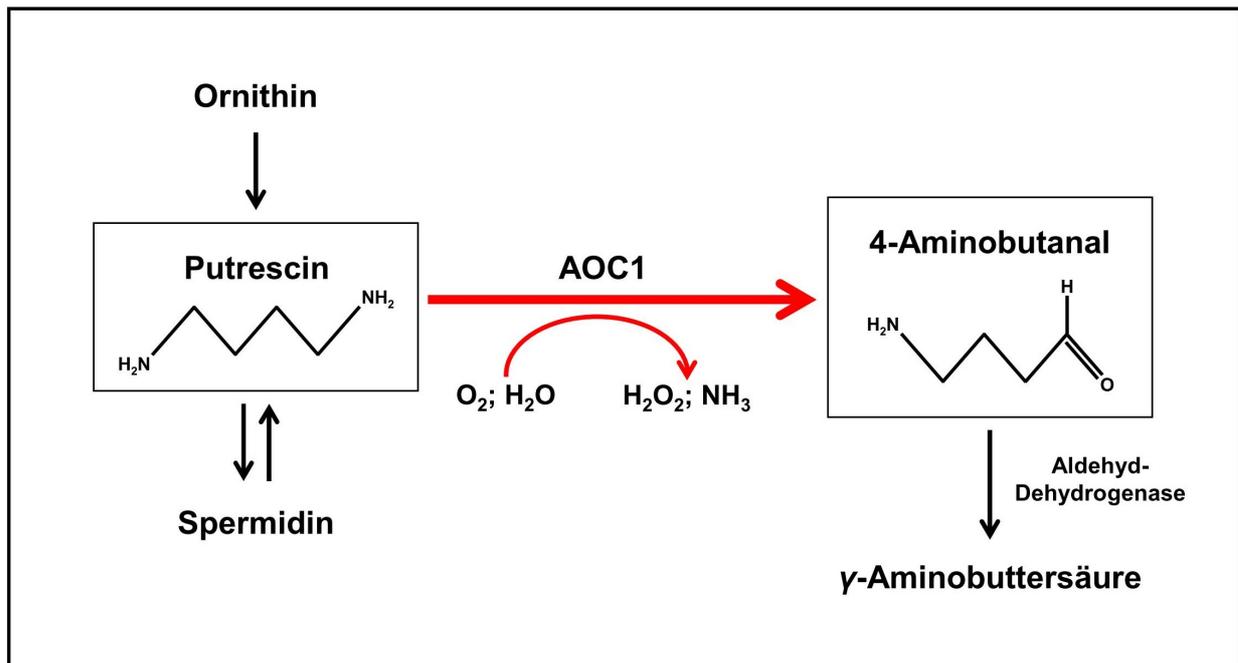


Abb. 5: Beispielhafte Darstellung des Putrescinabbaus durch die Amine Oxidase Copper-containing 1 (AOC1). Grafik nach Kusano et al. 2008.

Insbesondere in stark proliferierenden Geweben spielt die Expression von AOC1 eine wichtige Rolle in der Regulation des Polyaminhaushalts (Sessa et al. 1982; Seiler 2004). So erhöht die Gabe des AOC1-Hemmers Aminoguanidin bei Ratten den Putrescin-Gehalt in Nieren, Leber und Herz um das 34-, 25-, bzw. 11-fache (Perin et al. 1986). Zusätzlich führt die Gabe von Aminoguanidin über einen Zeitraum von fünf Tagen in Ratten zu einer 2,5-fachen Erhöhung der Gesamt-Polyaminausscheidung über die Niere. Dies weist darauf hin, dass normalerweise ca. 60% der zu eliminierenden Polyamine über den Weg der oxidativen Desaminierung abgebaut werden (Seiler 2004). Auch beim Menschen konnte nach wiederholter Gabe von Aminoguanidin eine Erhöhung der Ausscheidung von nicht metabolisiertem Putrescin und Spermidin über die Niere nachgewiesen werden (Chayen et al. 1985).

Über die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von AOC1 ist wenig bekannt. Es wird spekuliert, dass AOC1 in den Deciduazellen der Plazenta und dem Dünndarmepithel eine Barrierefunktion gegen ein Überangebot an Histamin und Polyaminen ausübt (Liang et al. 2010; Mizuguchi et al. 1994).

Darüber hinaus scheint AOC1 für die Kontrolle der Differenzierung, Entdifferenzierung und Proliferation verschiedener Gewebe bedeutsam zu sein. So ändert sich die AOC1-Aktivität im Verlauf des Zellzyklus. Die AOC1-Aktivität steigt besonders in der G1-Phase

und während der Mitose und sinkt während der S-Phase. Dabei scheint die AOC1-Aktivität eine wichtige Rolle in der Regulation der Polyaminlevel während des Zellzyklus einzunehmen (Sunkara et al. 1981). Die AOC1-Aktivität ist bei Nieren- und Herzhypertrophie sowie bei Regenerationsvorgängen, z. B. nach Hepatektomie, erhöht (Sessa et al. 1982). Es findet sich eine Steigerung des AOC1-Gehaltes in diversen Tumoren, wie z. B. dem medullären Schilddrüsenkarzinom, Lungen-Adenokarzinom und chemisch induziertem hepatozellulären Karzinom (Ippolito et al. 2006; Sessa et al. 1990). Im Unterschied zu diesen Effekten der Entdifferenzierung und Proliferation ist eine antiproliferative und differenzierungsfördernde Wirkung für AOC1 im Darm beschrieben. Versuche mit der Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo-2, die Ähnlichkeiten mit Dünndarm-Enterozyten aufweist, zeigten eine niedrige AOC1-Aktivität während proliferativer Phasen und einen Anstieg der AOC1-Aktivität und Sekretion während Phasen der Differenzierung (D'Agostino et al. 1989). Die AOC1-Aktivität ist in Kolon-Polypen und -Tumoren reduziert (Mennigen et al. 1988, Sessa et al. 1994), und eine Langzeitinhibierung der AOC1 in Ratten führte zum Auftreten von Tumoren des Kolons (Kusche et al. 1988). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei Ratten eine Hemmung der AOC1 eine Erhöhung der Proliferationsrate nach Dünndarmresektion bewirkt (Erdman et al. 1989).

1.4 Schnittstellen des WT1 und Polyaminhaushalts

Es gibt eine Reihe von Schnittstellen zwischen dem Polyaminhaushalt und WT1. Beide regulieren sowohl in der Embryogenese als auch in manchen Tumoren die Zelldifferenzierung. Die Expression von ODC und WT1 ist in Neoplasien häufig erhöht. Die AOC1, die den Abbau der Polyamine katalysiert, ist in Kolonkarzinomen im Gegensatz zu WT1 erniedrigt. In hepatozellulären Karzinomen ist sie jedoch wie WT1 erhöht. Polyamine und WT1 sind von essentieller Bedeutung für die Entwicklung der Niere. Hier werden beide im kondensierenden Mesenchym gebildet und haben synergistische Effekte auf die Aussprossungen der Ureterknospe sowie, durch eine Induktion der MET, auf die Bildung der Nephrone.

Darüber hinaus gibt es auch eine direkte Kontrolle des Polyaminhaushalts durch WT1. Li et al. beschrieben eine transkriptionelle Regulierung von *ODC* durch WT1. Sie zeigen, dass WT1 an eine Cytosin-reiche Sequenz des *ODC*-Promotors bindet, wodurch die transkriptionelle Aktivität signifikant inhibiert wird. Nach Mutation der WT1-

Bindungsstellen war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Li et al. 1999). Bereits zuvor kamen Moshier et al. zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten in NIH3T3-, HCT 116- sowie HepG2-Zellen ebenfalls eine Bindung von WT1 an den *ODC*-Promotor und, mittels Luciferase-Reportergen-Assay, einen damit verbundenen Abfall in der Promotoraktivität zeigen. Interessanterweise konnten Moshier et al. nach Transfektion der HepG2-Zellen mit DNA des SV40-Virus eine Aktivitätssteigerung des *ODC*-Promotors durch WT1 nachweisen (Moshier et al. 1996). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass der *ODC*-Promotor nicht in jedem Fall durch WT1 inhibiert wird, sondern dass WT1 auch eine Stimulation des *ODC*-Promotors bewirken kann. Die Ursachen für diese gegensätzlichen Effekte von WT1 sind noch ungeklärt.

1.5 Entwicklung der Fragestellung

Die oben aufgeführten Inhalte legen nahe, dass zwischen dem Polyaminstoffwechsel und WT1 ein funktioneller Zusammenhang in Tumoren und während der Embryonalentwicklung besteht. Ferner wird die Expression von *ODC*, des Schlüsselenzyms der Polyaminsynthese, durch WT1 reguliert (Moshier et al. 1996; Li et al. 1999). In einer unveröffentlichten, genomweiten Microarrayanalyse in einer Mesonephroszelllinie (M15) – durchgeführt von der Arbeitsgruppe „Zelluläre Entwicklungsphysiologie und Pathophysiologie“ der Charité unter der Leitung von Herrn Prof. Holger Scholz – bewirkte ein WT1-Knockdown eine Abnahme der *AOC1* mRNA. Dies könnte bedeuten, dass neben der *ODC* ein weiteres Enzym des Polyaminstoffwechsels durch WT1 reguliert wird. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft, dass die Transkription des *AOC1*-Gens durch WT1 reguliert wird. Gegebenenfalls sollten die molekularen Mechanismen, die dieser Regulation zugrunde liegen, aufgedeckt werden. Ferner sollte der Zusammenhang zwischen WT1 und *AOC1* während der embryonalen Herzentwicklung genauer analysiert werden. Hierzu wurden die folgenden Versuchsansätze gewählt.

1. In verschiedenen Zelllinien wurde die Korrelation zwischen WT1-Expression und *AOC1* mRNA analysiert.
2. Es wurde der *AOC1*-Promotor *in silico* auf putative WT1-Bindungselemente untersucht.
3. Die putative WT1-Bindungstelle sowie die Regulation des *AOC1*-Promotors wurden in einem Reportergenassay untersucht.

4. Der Frage, ob WT1 tatsächlich an den AOC1-Promotor bindet, wurde mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) und Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Assay nachgegangen.
5. Um das Verhältnis von WT1 und AOC1 im embryonalen Herzen zu ermitteln, wurde der *AOC1* mRNA-Gehalt muriner embryonaler Epikardkulturen mit und ohne WT1-Knockdown sowie embryonaler muriner *Wt1*^{+/+}, *Wt1*^{+/-} und *Wt1*^{-/-} Herzen analysiert.
6. Murine embryonale Herzen wurden mit einer immunhistologischen Färbung auf eine Co-Lokalisation von WT1 und AOC1 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für dieses Projekt wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J mit normalem ($Wt1^{+/+}$) und heterozygotem ($Wt1^{+/-}$) $Wt1$ -Gen im hausinternen Tierstall gemäß geltender Tierschutzverordnung verpaart (Genehmigungsnummer: T0308/12). Die C57BL/6J-Mäuse mit heterozygotem $Wt1$ -Allel wurden ursprünglich vom Jackson Labor (Bar Harbor, ME) bezogen. Bei der Verpaarung wurde der Morgen, an dem ein Vaginalpfropf sichtbar wurde, als Tag E0,5 *post conceptionem* definiert. Gewonnene Embryonen wurden protokollgemäß mittels PCR genotypisiert (Wagner et al. 2002).

2.2 Zellkulturtechniken

2.2.1 Zellkultivierung und Passagierung

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|--|---------------------------------|
| Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) high Glucose [4,5g/L], with stable Glutamine | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Biochrom KG, Berlin |
| 10x Trypsin/EDTA [5 g/L Trypsin, 2 g/L EDTA in 0,9% NaCl; pH 7,5] | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| -/- Dulbecco's PBS [0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH_2PO_4 8 g/L NaCl; 1,15 g/L Na_2HPO_4] | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Tetracyclin Hydrochlorid | Sigma, Steinheim |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| HeraSafe Bench | Heraeus Instruments, Hanau |
| Inkubator CB150 | Binder, Tuttlingen |
| Zellkulturmaterial | TPP, Trasadingen |
| Axiovert 35 | Zeiss, Jena |

In dieser Arbeit wurden Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 (DSMZ-Nr.: ACC 305), der humanen Osteosarkomzelllinie UB27 (bezogen von Prof. Dr. C. Englert) und die murine Mesonephros Zelllinie M15 (Larsson et. al. 1995) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luft und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Kulturmedium wurde DMEM mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin verwendet (in das Kulturmedium der UB27 Zellen wurde zusätzlich 1µg/ml Tetracyclin gegeben, s. Kapitel

2.2.2). In Monolayerkulturen gewachsen, wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Hierfür wurden die Zellen zweimalig mit auf 37°C erwärmten PBS gewaschen und anschließend mit in PBS verdünntem 1X Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend wurde frisches DMEM-Medium bei 37°C hinzugegeben und die Zellen in gewünschter Dichte ausgesät.

2.2.2 WT1-Stimulation in UB27-Zellen

Bei UB27-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie mit einem stabil transfiziertem WT1(-KTS)-Konstrukt, welches unter der Kontrolle eines Tetracyclin gesteuerten Promotors exprimiert wird (Englert et al. 1995) Die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert und passagiert. Um die WT1-Produktion zu inhibieren, wurde dem Medium der UB27-Zellen zusätzlich 1µg/ml Tetracyclin (Tetracyclin Hydrochlorid - Sigma) beigegeben. Für die WT1-Induktionsversuche wurde dieses durch tetracyclinfreies DMEM-Medium mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin ersetzt, wodurch die WT1-Expression angeregt wurde. Die WT1-Expression wurde mittels Westernblot überprüft (s. Kapitel 2.3.7)

2.2.3 Transiente Transfektion und Reportergen Assay

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---|---------------------------------|
| Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) high Glucose [4,5 g/L], with Stable Glutamine | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Fötiales Kälberserum (FCS) | Biochrom KG, Berlin |
| -/- Dulbecco's PBS [0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH ₂ PO ₄ ; 8 g/L NaCl; 1,15 g/L Na ₂ HPO ₄] | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Fugene-6 | Roche, Mannheim |
| 5X Passiv-Lyse-Puffer | Promega, Mannheim |
| Firefly Substrat [470µM D-Luciferin; 270µM Coenzym A; 33,3mM DTT; 530mM ATP; 2,67mM MgSO ₄ ; 20mM Trichine; 0,1µM EDTA; pH-Wert 7,8] | Laborbestand |
| Renilla Substrat [1,1M NaCl; 2,2mM Na ₂ EDTA; 0,22M KH ₂ O ₄ (pH 5,1); 0,44 mg/ml BSA; 1,3mM NaN ₃ ; 1,43µM Coelenterazin (gelöst in Ethanol); pH-Wert 5,0] | Laborbestand |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| HeraSafe Bench | Heraeus Instruments, Hanau |
| Inkubator CB150 | Binder, Tuttlingen |
| 24-Loch-Platte | TPP, Trasadingen |
| Axiovert 35 | Zeiss, Jena |
| Microlite TLX 1 Luminometer | MGM Instruments, Hamden |
| Teströhrchen 5ml | Sarstedt, Nümbrecht |

Für die transiente Transfektion wurden HEK293 Zellen in 24-Loch-Platten 24h vor Transfektion ausgesät. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 40% erreicht hatten, wurde die Transfektion durchgeführt. Hierfür wurde für jedes Loch ein 50µl Ansatz, bestehend aus zusatzfreiem DMEM-Medium und 350ng der zu transfizierenden DNA angesetzt, 15min mit jeweils 1µl Fugene-6 inkubiert und anschließend als Doppelansatz auf die Zellen gegeben. Die 350ng zu transfizierende DNA setzte sich jeweils aus 50ng Vergleichskonstrukt (phRL-TK-Plasmid mit einem Renilla-Luziferase Expressionskonstrukt), 150ng Expressionskonstrukt (pC130-Plasmid, ein WT1(-KTS)-Expressionskonstrukt bzw. das leere pCB6+ Plasmid als Negativkontrolle) und 150ng Reportergenkonstrukt (pGL3-basic Plasmid mit einem der Firefly Luziferase vorgeschalteten hAOC1-Promotorkonstrukt bzw. das leere pGL3-basic Plasmid als Negativkontrolle) zusammen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verwendeten Konstrukte, die jeweils in Doppelansätzen transfiziert wurden. Für jedes Reportergenkonstrukt wurden Kotransfektionen mit dem WT1(-KTS)-Expressionskonstrukt und leerem pCB6+-Plasmid als Negativkontrolle angesetzt. Daraufhin wurden die transfizierten Zellen für 24h bei 37°C, 5% CO₂, 95% Luft und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

| Tabelle 1: Überblick über die in der transienten Transfektion eingesetzten Konstrukte | | |
|--|---|---|
| Name | Funktion/Beschreibung | Quelle |
| phRL-TK | Vergleichskonstrukt - Renilla Luciferase | Promega, Mannheim |
| pCB6+ | Expressionskonstrukt - Negativkontrolle | ATCC 37274 |
| pC130 | Expressionskonstrukt - WT1(-KTS Spleißvariante) | Bezogen von D.A. Haber |
| pGL3-basic | Reportergenkonstrukt - Basis Vektor- Negativkontrolle | Promega, Mannheim |
| pGL3-hAOC1-Prom 2 | Reportergenkonstrukt - hAOC1 Promotorkonstrukt [367bp lang (299bp AOC1-Promtor, 68bp AOC1-5'UTR)] | Kloniert und präpariert siehe Kapitel 2.3.5 |
| pGL3-hAOC1-Prom 3 | Reportergenkonstrukt - hAOC1 Promotorkonstrukt [115bp lang (47bp AOC1-Promtor, 68bp AOC1-5'UTR)] | Kloniert und präpariert siehe Kapitel 2.3.5 |
| pGL3-hAOC1-Prom-mutiert | Reportergenkonstrukt - hAOC1 Promotorkonstrukt mit Mutation der WT1-Bindungsstelle [367bp lang (299bp AOC1-Promtor, 68bp AOC1-5'UTR)] | Kloniert und präpariert siehe Kapitel 2.3.5 |

In den transfizierten Zellen wurde für jeden Ansatz die Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität bestimmt. Um die Zellen zu lysieren, wurde jedem Loch 100µl 1 x Passiv-Lyse-Puffer zugegeben und die 24-Well-Platte auf einem Schüttler 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 30µl des Zelllysats in ein Teströhrchen gegeben und 100µl Firefly-Puffer hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde die Firefly-Luziferaseaktivität mit einem Luminometer bestimmt. Anschließend

wurden dem Teströhrchen 100µl Renilla-Puffer zugegeben und auf gleiche Weise die Renilla-Luziferaseaktivität bestimmt. Dieser Vorgang wurde für sämtliche Ansätze wiederholt. Darauf folgend wurde für jeden Ansatz ein Quotient aus Firefly- und Renillaaktivität gebildet und die Werte der Doppelansätze gemittelt. Auf diese Weise wurde für jedes Reportergenkonstrukt ein Luziferaseaktivitätsquotient mit exprimiertem WT1 und mit transfiziertem Leervektor (pCB6+) errechnet. Diese Quotienten wurden ins Verhältnis gebracht, wobei der Luziferaseaktivitätsquotient der Negativkontrolle mit 1 gleichgesetzt wurde. Da die Luciferaseaktivität des leeren Reportervektors (pGL3basic) nach Kotransfektion von WT1 auf einen Wert von 0,65 absank (n=5; SD= 0,32), wurden die gemessenen Luciferaseaktivitäten durch den Korrekturfaktor 0,7 dividiert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Extraktion

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|--|---------------------------------|
| TRizol LS Reagent | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| DEPC-Wasser [0,05% DEPC (v/v)] | Laborbestand |
| | |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| Kühlzentrifuge 5415 R, Festwinkelrotor | Eppendorf AG, Hamburg |
| UV/Vis Spectrophotometer DU 730 | Beckman Coulter, München |

Eine RNA-Extraktion wurde für die WT1-Überexpressionsversuche in UB27-Zellen, den *Wt1* siRNA-Knockdown in M15-Zellen, den Morpholino-Knockdown in murinen Epikardzellen sowie für die Herzen von Wildtyp- und *Wt1*-Knockoutembryonen durchgeführt. Für die Extraktion wurde TRizol LS nach Herstellerangaben verwendet. Dafür wurde das Medium abgegossen und jeweils 1ml TRizol LS auf die Zellen bzw. Herzen gegeben. Das Zellmaterial wurde 5min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 1/5 Volumen Chloroform der Lösung beigelegt. Die Lösung wurde geschüttelt und weitere 5min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für 15min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert wurde. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene RNA mit 0,5ml Isopropanol gefällt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugierung

bei 12.000g und 4°C über 10min. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen. Die RNA wurde anschließend in DEPC-Wasser resuspendiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260nm in 100-facher Verdünnung durchgeführt.

2.3.2 Reverse Transkription

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---|---------------------------------|
| Superscript II Reverse Transkriptase mit 5x Puffer und 0,1 M DTT | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Oligo(dT)₁₂₋₁₈ [0,5 µg/µL] | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| dNTPs [je 10mM] | Roth, Karlsruhe |
| DEPC-Wasser [0,05% DEPC (v/v)] | Laborbestand |
| | |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| GeneAmp PCR System 2400 | Applied Biosystems, Mannheim |
| UNO-Thermoblock | Biometra, Göttingen |

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Superscript II Reverse Transkriptase Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Reaktion wurde ein 20µl Ansatz in DEPC-Wasser ohne Zusatz von DNAsen und RNAsen verwendet.

Ansatz: 2µg Gesamt-RNA in 11/20 (Vol.) Ansatz H₂O, 1/20 Ansatz Superscript II Reverse Transkriptase, 1/5 Ansatz 5x Puffer, 1/10 Ansatz DTT, 1/20 Ansatz Oligo(dT)₁₂₋₁₈, 1/20 Ansatz dNTPs

In einem ersten Schritt wurden 2µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf 11µl aufgefüllt und anschließend Oligo(dT)₁₂₋₁₈ und dNTPs hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Es wurde 5X Puffer und DTT hinzugegeben und für 2min bei 42°C inkubiert, woraufhin 200U Superscript II Reverse Transkriptase hinzugefügt wurde. Nach 50min Inkubation bei 42°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 72°C über 15min gestoppt.

2.3.3 Realtime Polymerase Chain Reaction

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| SYBR Green PCR Master Mix | Roche, Rotkreuz |
| Primer | Eurofins MWG, Ebersberg |
| Destilliertes Wasser | Gibco, Darmstadt |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| StepOnePlus System | Thermo Fisher Scientific, Waltham |
| 96-Well Reaction Plates | Thermo Fisher Scientific, Waltham |
| MicroAmp Optical Adhesive Film | Thermo Fisher Scientific, Waltham |

Die quantitative Realtime PCR wurde mit dem StepOnePlus System unter Verwendung des SYBR Green PCR Master Mix in Doppelansätzen von je 10µl durchgeführt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die in der Realtime PCR verwendeten Primer.

Ansatz: 1/2 (Vol.) Ansatz SYBR Green; Primer (50nM); 2/10 Ansatz cDNA

| Primer | Sequenz | Anwendung |
|-----------------|---------------------------|---|
| hAOC1-F | CGGCCTCCGCTTCAAAA | WT1 Stimulierung in UB27-Zellen (s. Kapitel 2.2.2) |
| hAOC1-R | TGCTCAAAGACCACGGGC | |
| mAOC1-F | GGAACAAAAGTCTGGGAGC | <i>Wt1</i> siRNA-Knockdown (s. Kapitel 2.3.8), <i>Aoc1</i> mRNA-Gehalt in <i>Wt1</i> -Wildtyp, -heterozygoten und -knockout Herzen (s. Kapitel 2.3.11), Morpholino <i>Wt1</i> -Knockdown in Epikardkulturen (s. Kapitel 2.3.11) |
| mAOC1-R | GGCCAAAAGTCAGATTCTTG | |
| hGAPDH-F | ACAGTCAGCCGCATCTTCTT | WT1 Stimulierung in UB27-Zellen (s. Kapitel 2.2.2) |
| hGAPDH-R | GACAAGCTTCCCGTTCTCAG | |
| mGapdh-F | ACGACCCCTTCATTGACCTCA | <i>Wt1</i> siRNA-Knockdown (s. Kapitel 2.3.8), <i>Aoc1</i> mRNA-Gehalt in <i>Wt1</i> -Wildtyp, -heterozygoten und -knockout Herzen (s. Kapitel 2.3.11), Morpholino <i>Wt1</i> -Knockdown in Epikardkulturen (s. Kapitel 2.3.11) |
| mGapdh-R | TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG | |
| mAoc1-ChIP-F | ACACAGTATGTAACAGAGAAAGCCA | ChIP-Assay (s. Kapitel 2.3.10) |
| mAoc1-ChIP-R | CCACTGACACAAGAAGTCTTCTTAA | |
| mActin-ChIP-F | ATAGGACTCCCTTCTATGAGC | |
| mActin-ChIP-R | TCCACTTAGACCTACTGTGCA | |
| mAmhr2-PromBS-F | CAGCTGGACAGCCAAGGTC | |
| mAmhr2-PromBS-R | CAGCCAAGGCTTCCTACAAA | |

Für die PCR wurden folgende Temperatur- und Zeiteinstellungen gewählt: 45 Zyklen: DNA Denaturierung (15s) bei 94°C; Primerannealing (15s) bei 60°C; Extension der DNA (60s) bei 60°C; Detektion des SYBR Green Fluoreszenzfarbstoffes (30s) bei 77°C.

Auswertung: Threshold cycle (Ct)-Werte wurden während der Mitte der exponentiellen Phase ermittelt. Der Ct-Wert gibt die Anzahl der PCR-Zyklen an, die notwendig sind, bis

die Fluoreszenz des SYBR Greens durch Bindung an doppelsträngige DNA einen Schwellenwert (threshold) erreicht hat. Die Ct-Werte der Doppelansätze wurden gemittelt. Zur Bestimmung des relativen mRNA-Gehalts der Proben wurde der sogenannte ΔCt -Wert errechnet, indem vom gemessenen Ct-Wert des zu untersuchenden Gens jeweils der Ct-Wert eines ebenfalls bestimmten Housekeepinggens (GAPDH bzw. Aktin) abgezogen wurde. Um das Expressionsniveau zweier Proben miteinander zu vergleichen, wurde die Differenz aus den betreffenden ΔCt -Werten, der sog. $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert, gebildet. Unter der Annahme einer Verdopplung der DNA-Menge mit jedem Zyklus errechnet sich der relative Gehalt der Zielgen-mRNA in den Proben nach der Formel $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.3.4 Polymerase Chain Reaction

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| AmpliAq Polymerase mit 10x PCR-Puffer | Applied Biosystems, Mannheim |
| dNTPs [je 10mM] | Roth, Karlsruhe |
| Primer (Tabelle 3) | Eurofins MWG, Ebersberg |
| | |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| UNO-Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| GeneAmp PCR System 2400 | Applied Biosystems, Mannheim |

Die PCR wurde mit dem AmpliAq Polymerase Kit der Firma Applied Biosystems nach den Herstelleranweisungen in 25 μ l-Ansätzen durchgeführt.

Ansatz: 2/25 (Vol.) Ansatz DNA, 1/10 Ansatz 10X PCR-Puffer, 1/50 Ansatz dNTPs, 1/50 Ansatz Primer (200nM), 1/50 Ansatz AmpliAq Polymerase (2,5 U)

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer. Die PCR wurde mit einer Annealing-Temperatur von 55°C, einer Annealing-Zeit von 2,5min, einer Extensionstemperatur von 72°C und einer Extensionszeit von 2,5min pro Zyklus über 38 Zyklen durchgeführt.

2.3.5 Klonierung und Plasmidpräparation

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---|--|
| KpnI-FastDigest | Thermo Scientific Fermentas, Waltham |
| NheI-FastDigest | Thermo Scientific Fermentas, Waltham |
| 10x FastDigest Buffer | Thermo Scientific Fermentas, Waltham |
| FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase | Thermo Scientific Fermentas, Waltham |
| MinElute Gel Extraction Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| T4 DNA Ligase | Promega, Mannheim |
| 2x Rapid Ligation Buffer | Promega, Mannheim |
| One Shot TOP10 chemisch-kompetente E. coli | Eingesetzter Stamm ursprünglich von Life Technologies, chemische Kompetenz wurde in der Arbeitsgruppe selbst erzeugt |
| LB-Medium [10 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl; 0,1% (v/v) 1 mol/L NaOH; pH 7] | Laborbestand |
| LB-Medium + Amp [100 µg/mL Ampicillin] | Laborbestand |
| Agarplatten [LB-Medium; 15 g/L Agarose, 100 µg/mL Ampicillin] | Laborbestand |
| S.O.C.-Medium [2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mmol/L NaCl; 2,5 mmol/L KCl; 10 mmol/L MgCl ₂ ; 10 mmol/L MgSO ₄ ; 20 mmol/L Glucose] | Thermo Fisher Scientific, Waltham |
| Gefriermedium für Glycerinkulturen [65% Glycerin (v/v); 0,1 mol/L MgSO ₄ ; 0,025 mol/L Tris-HCl; pH 8] | Laborbestand |
| Kryoröhrchen 1,8ml | Greiner Labortechnik, Kremsmünster |
| HiSpeed Plasmid Midi Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | Qiagen GmbH, Hilden |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| Wasserbad | GFL GmbH, Burgwedel |
| Kühlzentrifuge 5415R | Eppendorf AG, Hamburg |
| EcoLine 003, Typ E100 Wasserbad | LAUDA, Lauda-Königshofen |
| 311DS Schüttelinkubator | Labnet, Edison |
| UV/Vis Spectrophotometer DU 730 | Beckman Coulter, München |
| Universal 30 F Zentrifuge | Hettich, Tuttlingen |

Für die Klonierungen der *AOC1*-Promotorreporterkonstrukte wurde als Vektor das pGL3-basic Plasmid von Promega verwendet. Die Inserts wurden jeweils mittels PCR (siehe Kapitel 2.4.4) unter der Verwendung der in Tabelle 3 aufgeführten Primer synthetisiert. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die klonierten Inserts. Als PCR-Template für alle Insertsynthesen wurde ein von Dr. Karin Kirschner in den pGL3-basic Vektor kloniertes 3060 basenpaarlanges Fragment des *hAOC1*-Promotors (s. Tabelle 4) verwendet. Das mutierte Insert wurde in zwei PCR-Schritten synthetisiert. Dabei wurde zunächst eine PCR mit dem Primerpaar *hAOC1*-Prom-Vorwärts 2/ *hAOC1*-Mut-Rückwärts 1 und eine PCR mit dem Primerpaar *hAOC1*-Mut-Vorwärts 1/ *hAOC1*-Prom-Rückwärts 1 durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des MinElute Gelextraktionskits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die beiden mutierten Templates wurden in einen Ansatz gegeben und eine

PCR mit dem Primerpaar hAOC1-Prom-Vorwärts 2/ hAOC1-Prom-Rückwärts 1 durchgeführt. Abbildung 6 zeigt die hAOC1 Wildtyp-Sequenz und die eingefügte Mutation.

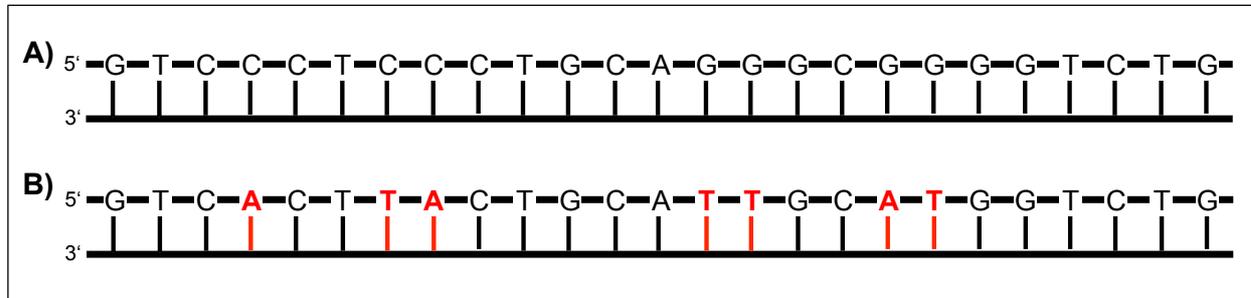


Abb. 6: hAOC1-Sequenz von -21bp - +4bp. Grafik A zeigt die Wildtyp-Sequenz. Grafik B zeigt die in Kapitel 2.3.5 eingeführte mutierte Sequenz. Die Mutationen sind in rot dargestellt.

In Restriktionsverdauansätzen wurden der Vektor und die Inserts jeweils mit den Restriktionsenzymen KpnI und NheI in einem 20µl Ansatz geschnitten.

Ansatz: 5µg DNA; 1/10 Volumen 10X FastDigest Puffer, je 1/20 Volumen KpnI- und NheI Fastdigest Enzym, bei 37°C für 30min.

Der verdaute Vektor wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen Alkaline Phosphatase (FastAP) für 30min bei 37°C dephosphoryliert. Insert und dephosphorylierter Vektor wurden anschließend auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und nach Durchlauf mit Hilfe des MinElute Gelextraktionskits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend wurden Insert und Vektor in einem 10µl Ansatz unter Verwendung des LigaFast Kits, Promega, ligiert.

Ansatz: 1/10 Volumen dephosphorylierter Vektor, 3/10 Volumen Insert, 5/10 Volumen 2x Rapid Ligation Buffer und 1/10 Volumen (3u) T4 DNA Ligase für 10min bei Raumtemperatur.

| Tabelle 3: Überblick über die in der Klonierung verwendeten Primer | |
|--|--|
| Primer | Sequenz |
| hAOC1-Prom-Vorwärts 1 | GTCGGTACCATCCTGCGTCTTCCATGA |
| hAOC1-Prom-Vorwärts 2 | GTCGGTACCCTGTCAGCTTCAGGTAAG |
| hAOC1-Prom-Vorwärts 3 | ATTGGTACCTCCTAGGCCAGCTCAGG |
| hAOC1-Prom-Rückwärts 1 | GTCGCTAGCCCCAGTTCGCTCTGCTTC |
| hAOC1-Mut-Vorwärts 1 | CTTGTC <u>ACTT</u> ACTGCATTGCATGGTCTG |
| hAOC1-Mut-Rückwärts 1 | <u>CATGCAAT</u> TGCAGT <u>AAGT</u> GAC |

Anschließend wurde die Hälfte des Ligationsansatzes zu einer Suspension (50µl) chemisch-kompetenter E. coli Bakterien gegeben. Es wurde über 45s ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt, 450µl S.O.C. Medium hinzugegeben und die Bakterien nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator auf mit Ampicillin versetzten Agarplatten ausgesät. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die auf der Agarplatte gewachsenen Klone geerntet und für 24h in dem mit 2ml Ampicillin versetzten LB-Medium bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Es wurde 1ml des mit Bakterien gesättigten Mediums abgenommen und daraus unter Verwendung der Puffer P1 (Resuspensionspuffer), P2 (Lysepuffer) und P3 (Neutralisationspuffer) aus dem Quiagen MaxiKit eine Miniprep zur Kontrolle der Klonierung vorgenommen.

Die gewonnene DNA wurde mit einem Restriktionsverdau durch KpnI- und NheI FastDigest Enzyme geschnitten, auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und daraufhin eine Elektrophorese durchgeführt. Es wurde kontrolliert, ob das herausgeschnittene DNA-Stück der Länge des gewünschten Inserts entsprach, um anschließend mit der übrig gebliebenen Hälfte der Bakterienkultur eine 10ml-Kultur anzupflanzen. Die 10ml-Kultur wurde 24h lang bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Aus den so gewonnenen 10ml Bakterienkulturen wurden die Plasmide unter Verwendung des HiSpeed Plasmid Midi Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Die Konzentration der DNA-Menge wurde über die Bestimmung der optischen Dichte bei 260nm in einer 100µl-Quarzglasküvette in 1:100 Verdünnung unter Verwendung des UV/Vis-Spektralphotometer DU730 durchgeführt. Von den Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt und diese bei -80°C gelagert. Eine Kontrollsequenzierung des Inserts wurde durch Eurofins MWG durchgeführt.

| Konstrukt | Primer | Position im AOC1 Gen | Länge |
|------------------------|---|-----------------------------|--------------|
| hAOC1-Promotor- 1 | hAOC1-Prom-Vorwärts 1 / hAOC1-Prom-Rückwärts 1 | -2992 bis +68 | 3060bp |
| hAOC1-Promotor- 2 | hAOC1-Prom-Vorwärts 2 / hAOC1-Prom-Rückwärts 1 | -299 bis +68 | 367bp |
| hAOC1-Promotor- 3 | hAOC1-Prom-Vorwärts 3 / hAOC1-Prom-Rückwärts 1 | -47 bis +68 | 115bp |
| hAOC1-Promotor-mutiert | hAOC1-Prom-Vorwärts 2 / hAOC1-Prom-Rückwärts 1 mutiert mit hAOC1-Mut-Vorwärts 1 / hAOC1-Mut-Rückwärts 1 | -299 bis +68 | 367bp |

2.3.6 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|--|---------------------------------|
| PBS Puffer [137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mmol/L KH ₂ PO ₄] | Laborbestand |
| Laemmli Puffer [50mM Tris-HCl, pH 6,8, 4M Harnstoff, 1% (w/v) SDS, 7,5mM DTT] | Laborbestand |
| SDS-PAGE Laufpuffer [25 mmol/L Tris-Base; 192 mmol/L Glycin; 0,1% SDS] | Laborbestand |
| 1X SDS-Probenpuffer [50 mmol/L Tris-HCl pH 6,8; 4 mol/L Harnstoff; 1% SDS; 6,25 µmol/L DTT] | Laborbestand |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| APS | Roth, Karlsruhe |
| TEMED | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | BIOMOL, Hamburg |
| Proteinmarker Precision Plus Protein WesternC Standards | BIO-RAD, München |
| | |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| LABSONIC U Ultraschallgerät | B. Braun, Melsungen |
| Test Tube Thermostat TCR | Roth, Karlsruhe |
| DU 730, UV/Vis Spectrophotometer | Beckman Coulter, Krefeld |
| Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN 3 Cell | BIO-RAD, München |
| Power Pac 200 | BIO-RAD, München |

Zur Gewinnung der Proteinproben wurden die Zellen zweimalig mit 1X PBS Puffer gewaschen und danach mit 400µl 1X Laemmli Puffer lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit Ultraschall behandelt und über 5min bei 95°C gekocht. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Spektralphotometer durch Bestimmung der optischen Dichte bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

Für die SDS-PAGE wurde ein Trenngel mit darüber geschichtetem Sammelgel gegossen. Hierfür wurde zunächst ein 1mm dickes 10% Polyacrylamid Trenngel hergestellt (10% Rotiphorese Gel 30, 0,375 mol/L Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 1% APS und 0,05% TEMED), wobei APS als Initiator und TEMED als Katalysator erst in einem letzten Schritt hinzugefügt wurden. Nach Aushärtung des Gels wurde das 3,3% Sammelgel (3,3% Rotiphorese Gel 30, 0,125 mmol/L Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 1% APS und 0,05% TEMED) nach der oben beschriebenen Vorgehensweise aufgegossen. Pro Ansatz wurden 20µg der Proteinprobe mit 1X SDS-Probenpuffer auf 20µl aufgefüllt. Anschließend wurden noch je 2µl 1X SDS-Probenpuffer plus 0,5 mg/mL Bromphenolblau hinzugegeben und die Ansätze bei 95°C für 5min gekocht und auf das Gel aufgetragen. Zur Größeneinschätzung der Proben wurden in eine Tasche 4-5µl Proteinmarker eingesetzt. Anschließend wurde für ca. 15min eine Spannung von 80V

angelegt. Sobald die Bromphenolblau Lauffront das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung für ca. eine Stunde auf 110V erhöht, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.3.7 Westernblot

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|--|--------------------------------------|
| Primärantikörper: Anti-WT1 C19 Rabbit polyclonal IgG Katalognummer: sc-192 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| Primärantikörper: Anti-actin clone C4 Mouse monoclonal IgG1kappa Katalognummer: MAB1501R | Merck Millipore, Darmstadt |
| Sekundärantikörper: Donkey anti-rabbit IgG-HRP Katalognummer: sc-2313 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Sekundärantikörper: Goat anti-mouse IgG-HRP Katalognummer: sc-2005 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Polyvinylidene difluoride (PVDF) Membran | GE Healthcare, Freiburg |
| Semi-Dry-Blotpuffer [10 mmol/L 6-Amino-hexansäure, 10% Methanol] | Laborbestand |
| TBST-Puffer [50 mmol/L Tris-HCl pH 7,4; 150 mmol/L NaCl; 0,1% Tween 20] | Laborbestand |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe |
| Western Lightning Plus ECL | PerkinElmer, Massachusetts |
| Hyperfilm MP | Amersham Biosciences, München |
| | |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell | BIO-RAD, München |
| Spannungsquelle Power Pac 200 | BIO-RAD, München |
| Plattformschüttler taumelnd Polymax 1040 | Heidolph, Schwabach |

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dafür wurde das Sammelgel vom Trenngel (siehe Kapitel 2.3.6) abgetrennt und kurz mit Semi-Dry-Blotpuffer versetzt. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Methanol, Wasser und Blotpuffer geschwenkt. Die PVDF-Membran und das Trenngel wurden mit in Semi-Dry-Blotpuffer äquilibrierten Filterpapieren zu einem Blot-Stapel zusammengelegt. Der Transfer des Proteins auf die PVDF-Membran wurde mit der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell bei konstanten 15V über 45min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran über 60min bei Raumtemperatur mit 5% fettfreier Milch in TBST-Puffer blockiert, um unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren. Der Primärantikörper Anti-WT1 C19 wurde mit 10ml 2,5% fettfreier Milch in TBST-Puffer auf 1:400 verdünnt, auf die Membran gegeben und auf einem Plattformschüttler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran 3x für 5min mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der an eine Peroxidase gebundene, mit 2,5% fettfreier Milch in TBST-Puffer auf 1:20.000 verdünnte

Sekundärantikörper, donkey anti-rabbit IgG-HRP, auf die Membran gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und daraufhin ein erneuter Waschschrift (dreimalig fünf Minuten) mit TBST-Puffer. Western Lightning Plus ECL wurde als Substrat für die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase verwendet. Die Chemoluminiszenzreaktion wurde auf Hyperfilm MP detektiert. Um die Proben nach Detektion des Zielproteins bezüglich ihrer Gesamt-Proteinmenge vergleichbar zu machen, wurden zunächst die Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt. Dafür wurde die Membran kurz in TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 10min mit 0,2 mol/L NaOH behandelt. Es folgten drei Waschschriffe mit Wasser à 5min und ein weiterer mit TBST-Puffer für 5min. Anschließend wurde auf der Membran das Housekeeping-Protein β -Actin als Referenzprotein mit dem Primärantikörper anti-Actin clone C4 in 1:6.000-facher Verdünnung und Sekundärantikörper goat anti-mouse IgG-HRP in 1:30.000-facher Verdünnung wie oben beschrieben nachgewiesen.

2.3.8 siRNA-Knockdown

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|--|---------------------------------|
| WT1 target siRNA pool: ON-TARGET plus; SMARTpool siRNA; L-040686-01-0005; NM_144783 | Dharmacon, Bonn |
| Non-targeting siRNA: siGENOME non-targeting siRNA pool 2 | Dharmacon, Bonn |
| DharmaFECT 1 Reagenz | Dharmacon; Bonn |
| Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |

| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|-------------------------------|---------------------------------|
| HeraSafe Bench | Heraeus Instruments, Hanau |
| Inkubator CB150 | Binder, Tuttlingen |
| Zellkulturmaterial | TPP, Trasadingen |
| Axiovert 35 | Zeiss, Jena |

Für den Knockdown von *Wt1* wurden M15-Zellen in 6-Loch-Platten bis zu ca. 60% Konfluenz herangezüchtet. Es wurde ein Pool von vier verschiedenen, gegen die murine *Wt1* mRNA gerichteten, siRNAs eingesetzt (WT1 target siRNA pool: ON-TARGET plus; SMARTpool siRNA; L-040686-01-0005; NM_144783). Als Negativkontrolle wurden vier siRNAs ohne Zielsequenz im Mausgenom verwendet (Non-targeting siRNA: siGENOME non-targeting siRNA pool 2). Die Transfektion wurde mit DharmaFECT 1 Reagenz durchgeführt. Pro Loch wurden 50pmol siRNA nach

Herstellerangaben transfiziert. Die Zellen wurden nach 48h geerntet und die Extraktion von mRNA und Protein wurde wie oben beschrieben durchgeführt (s. Kapitel 2.3.1 und 2.3.6). Die Effektivität des WT1-Knockdowns wurde mittels Westernblot überprüft; die Gewinnung von cDNA wurde mittels RT-PCR und die Quantifizierung mittels Realtime PCR durchgeführt.

2.3.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---|---------------------------------|
| DNA 3'DIG labeling Kit | Roche, Rotkreuz |
| 5X EMSA Binding buffer [50mM Tris-HCl pH 7.5, 250mM KCl, 250mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 5mM EDTA, Vor Gebrauch frisch dazugegeben: 25mM DTT, 25mM PMSF] | Laborbestand |
| Poly[d(I-C)] [0,5 µg/µl] | Roche, Rotkreuz |
| Rekombinantes murines WT1 - KTS Variante [0,1 µg/µl] GST-Tag gereinigt | Laborbestand |
| Rekombinantes murines WT1 + KTS Variante [0,1 µg/µl] GST-Tag gereinigt | Laborbestand |
| Rotiphorese Gel 30 | Roth, Karlsruhe |
| 5X TBE Puffer [445mM TRIS Base pH 8, 445mM Borsäure, 10mM EDTA] | Laborbestand |
| 10% APS | Roth, Karlsruhe |
| TEMED | Roth, Karlsruhe |
| Positiv geladene Nylonmembran | Roche Applied Science |
| EMSA Waschpuffer [MABT: 0,1M Maleinsäure, 0,15M NaCl, pH 7,5, 0,3% (v/v) Tween 10] | Laborbestand |
| 1% Blocking reagent | Roche, Rotkreuz |
| Anti-3'-Digoxigenin-Alkaline Phosphatase (DIG) Antikörper Katalognummer: 11093274910 | Roche, Rotkreuz |
| NBT/BCIP | Roche, Rotkreuz |
| NBT/BCIP Detektionspuffer [0,1 M Tris-HCL pH 9,5, 0,1M NaCl] | Laborbestand |
| TE Puffer [10mM Tris-HCl; 0,1mM EDTA (pH 8,0)] | Laborbestand |
| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
| Elektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN 3 Cell | BIO-RAD, München |
| Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell | BIO-RAD, München |
| Spannungsquelle Power Pac 200 | BIO-RAD, München |
| Stratalinker UV crosslinker | Stratagene, La Jolla |

Es wurden komplementäre Oligonukleotide (Tabelle 5) bei der Firma Eurofins MWG, Ebersberg synthetisiert. 100pmol des jeweiligen *sense* Oligonukleotids wurden mittels des DNA 3'DIG labeling Kit den Herstelleranweisungen folgend terminal DIG markiert. Anschließend wurden äquimolare Mengen des markierten *sense* Oligonukleotids mit

dem nicht markierten *antisense* Oligonukleotid durch fünfminütiges Kochen und einstündiges Abkühlen annealed.

| Bezeichnung | Sequenz |
|---|--------------------------------|
| hAOC1 EMSA F | CCTTGTCCCTCCCTGCAGGGCGGGGTCTGA |
| hAOC1 EMSA R | TCAGACCCCGCCCTGCAGGGAGGGACAAGG |
| hAOC1 MUT EMSA F (Mutation) | CCTTGTCACTTACTGCATTGCATGGTCTGA |
| hAOC1 MUT EMSA R (Mutation) | TCAGACCATGCAATGCAGTAAGTGACAAGG |
| ADAMTS16 EMSA F1 (Kompetitor; pos. Kontrolle) | TCCTCTATCCCCTCCCCTCTCCTCTCCTTT |
| ADAMTS16 EMSA R1 (Kompetitor; pos. Kontrolle) | AAAGGAGAGGAGAGGGGAGGGGATAGAGGA |

Für die Bindungsreaktion zwischen Protein und Oligonukleotid wurde jeweils ein 20µl Ansatz gewählt. Eingesetzt wurden pro Ansatz 1/5 (Vol.) Ansatz 5X EMSA Binding Puffer, 1/10 Ansatz Poly[d(I-C)], ggf. 1/20 Ansatz rekombinantes murines WT1 der +KTS oder -KTS Variante sowie 1pmol der markierten Oligonukleotid-Sonde. In Ansätzen mit Kompetitor wurden zusätzlich 50pmol bzw. 100pmol eines nicht markierten Oligonukleotids, welches eine bekannte WT1-Bindungsstelle enthält (siehe unten), hinzugefügt. Anschließend wurde das Ansatzvolumen mit Aqua dest. auf 20µl aufgefüllt. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die Ansätze.

Als Kompetitor wurde das Oligonukleotid einer bereits beschriebenen WT1-Bindungsstelle im Promotor des *ADAMTS16*-Gens (Jacobi et al. 2013) verwendet (Tabelle 5). Für die Nutzung als Positivkontrolle wurde dieses *ADAMTS16*-Oligonukleotid zusätzlich wie bereits oben beschrieben mit DIG markiert.

| Ansatz | Eingesetztes Protein | Eingesetztes Oligonukleotid |
|--------|----------------------|---|
| 1 | Kein Protein | hAOC1 EMSA F/R |
| 2 | WT1 (+KTS) | hAOC1 EMSA F/R |
| 3 | WT1 (-KTS) | hAOC1 EMSA F/R |
| 4 | WT1 (-KTS) | hAOC1 EMSA F/R: ADAMTS16 EMSA F1/R1 (unmarkiert) Verhältnis 1:50 |
| 5 | WT1 (-KTS) | hAOC1 EMSA F/R: ADAMTS16 EMSA F1/R1 (unmarkiert) Verhältnis 1:100 |
| 6 | Kein Protein | hAOC1 MUT EMSA F/R |
| 7 | WT1 (+KTS) | hAOC1 MUT EMSA F/R |
| 8 | WT1 (-KTS) | hAOC1 MUT EMSA F/R |
| 9 | WT1 (-KTS) | ADAMTS16 EMSA F1/R1 (markiert) |

Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert, auf ein 6% Polyacrylamidgel (6% Rotiphorese Gel 30, 10% 5x TBE Puffer, 0,075% APS und 0,05% TEMED) aufgetragen und bei 100V (8 V/cm) über 45min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran gelegt und bei konstanten 0,1A für 1h geblotted. Danach wurde die DNA auf der Membran mittels UV-Crosslinking fixiert und mit EMSA-Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde die Membran zunächst mit 1% Blockingreagenz versetzt und dann 30min mit in 1% Blockingreagenz gelöstem anti-DIG Antikörper bei 1:10.000-facher Verdünnung inkubiert. Die Membran wurde mehrfach mit EMSA-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit NBT/BCIP 20 µl/ml in NBT/BCIP Detektionspuffer für ca. 1h im Dunkeln entwickelt. Die Reaktion wurde mit TE-Puffer gestoppt.

2.3.10 Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Assay

| Chemikalien und Lösungen | Hersteller/ Bezugsquelle |
|---|--|
| Anti-WT1 Antikörper C19 [Kaninchen polyklonal; Katalognr.: sc-192] | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Normal-Kaninchen-IgG [Katalognr.: sc-2027] | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| PBS [0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH ₂ PO ₄ 8 g/L NaCl; 1,15 g/L Na ₂ HPO ₄] | Laborbestand |
| Lysispuffer [1% (w/v) SDS; 10mM EDTA; 50mM Tris-HCl (pH 8,1)] | Laborbestand |
| Complete | Roche, Rotkreuz |
| IP-Puffer [0,01% (w/v) SDS; 1,1% (v/v) Triton X-100; 1,2mM EDTA; 16,7mM Tris-HCl (pH 8,1)] | Laborbestand |
| Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA | Merck Millipore, Darmstadt |
| LS-Puffer [0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) Triton X-100; 2mM EDTA; 20mM Tris-HCl (pH 8,1); 150 mM NaCl] | Laborbestand |
| HS-Puffer [0,1% (w/v) SDS; 1% (v/v) Triton X-100; 2mM EDTA; 20mM Tris-HCl (pH 8,1); 500mM NaCl] | Laborbestand |
| Lithium-Puffer [0,25M LiCl; 1% (v/v) Nonidet-P40; 1% (w/v) Na-Desoxycholat; 1mM EDTA; 10mM Tris-HCl (pH 8,1)] | Laborbestand |
| TE-Puffer [10mM Tris-HCl; 0,1mM EDTA (pH 8,0)] | Laborbestand |
| Elutionspuffer [1% (w/v) SDS; 0,1M NaHCO ₃] | Laborbestand |
| Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) | Invitrogen, Darmstadt |
| ultraPURE- Wasser | PAA Laboratories, Cölbe |
| Geräte und Materialien | Hersteller/ Bezugsquelle |
| Labsonic U | B. Braun, Melsungen |
| Neubauer-Zählkammer | Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen |

Für den ChIP-Assay wurden pro Ansatz ca. 1×10^6 M15-Zellen verwendet. Um die DNA mit den an sie gebundenen Proteinen zu verknüpfen, wurden die Zellen in 4% Formaldehyd 10min lang bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS + Complete gewaschen. Darauffolgend wurden die Zellen 15min auf Eis mit Lysepuffer + Complete lysiert. Mit dem Labsonic U folgte die Ultraschallfragmentierung der DNA in ca. 300-600bp große Stücke. Die Proben wurden mit IP-Puffer + Complete je 1:10 verdünnt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, erfolgte für jeden Ansatz eine Vorreinigung mit 80µl Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA über 1h bei 4°C. Nach Abzentrifugieren wurden die Agarosebeads verworfen. Daraufhin erfolgte die Antikörper-Bindung. Hierfür wurden pro Ansatz 0,6µg des anti-WT1-Antikörpers C19 bzw. normales Kaninchen-IgG als Negativkontrolle eingesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Immunpräzipitation wurde mit Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA über 1h bei 4°C durchgeführt, wobei die Präzipitate an die Agaroseperlen gebunden wurden. Daraufhin folgten Waschschrte von jeweils 5min mit LS-, HS-, Lithium- und TE-Puffer. Die Proben wurden mit frisch angesetzttem Elutionspuffer eluiert und anschließend die DNA nach Herstellerangaben mittels Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die DNA wurde mit 100% Ethanol gefällt und das DNA-Pellet in UltraPURE-Wasser resuspendiert. Die Auswertung der ChIP-Assays erfolgte mittels RT-PCR und anschließender quantitativer PCR. Es wurden Primer verwendet, welche die vorausgesagte WT1-Bindungsstelle im murinen *AOC1*-Promotor flankierten (Tabelle 2). Als Positivkontrolle wurde die Anreicherung der bekannten WT1-Bindungsstelle im murinen anti-Müller-Hormon-Rezeptor 2 (*Amhr2*) Gen (Klattig et al. 2007) mitbestimmt (Tabelle 2).

2.3.11 Organentnahme, Organkulturen und Morpholino *Wt1*-Knockdown

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|--|---------------------------------|
| Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) high Glucose [4,5 g/L], with stable Glutamine | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| -/- Dulbecco's PBS [0,2 g/L KCl; 0,2 g/L KH_2PO_4 8 g/L NaCl; 1,15 g/L Na_2HPO_4] | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| FCS | Biochrom KG, Berlin |
| Penicillin | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Streptomycin | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Wt1-Antisense vivo-Morpholino (CAGGTCCCGCACGTCGGAACCCATG) | Gene Tools, Philomath |
| Mismatch vivo-Morpholino (CAGCTCCGGCACCTCGCAACCGATG) | Gene Tools, Philomath |

| <u>Geräte und Materialien</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Stemi 2000-C Stereo Mikroskop | Zeiss, Jena |

Für die *AOC1* mRNA-Quantifizierung in den Herzen von Mausembryonen (Wildtyp, *Wt1*^{+/-}, *Wt1*^{-/-}) wurden C57BL/6J-Mäuse mit heterozygotem *Wt1*-Allel termingerecht verpaart (s. Kapitel 2.1). Die Embryonen wurden entnommen und die Herzen in einer mit PBS gefüllten 10cm-Petrischale präpariert. Anschließend wurde aus den Herzen die mRNA extrahiert, zu cDNA umgeschrieben und mittels Realtime PCR quantifiziert (s. Kapitel 2.3.1, 2.3.2 und 2.3.3).

Für die Epikardkulturen wurden termingerecht verpaarten C57BL/6J Mäusen die Embryonen entnommen. Die embryonalen Herzen wurden präpariert und jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte übertragen. Hier wurden sie in DMEM-Medium mit stabilem L-Glutamin, 10% FCS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ über fünf Tage kultiviert. In dieser Zeit wuchsen Epikardzellen als Monolayer auf dem Boden der Platte aus. Die Zellen wurden aufgrund ihrer Befähigung zur Expression von WT1 und ihrem charakteristischen kopfsteinpflasterartigen Wachstumstyp identifiziert. Vor Zugabe der Morpholino Oligonukleotide wurden die Herzen aus den Kulturschalen entfernt, so dass nur die Epikard-Zellschicht zurückblieb. Der WT1-Knockdown wurde mit vivo-Morpholinos durchgeführt. Hierfür wurde der *Wt1*-antisense vivo-Morpholino (CAGGTCCCGCACGTCGGAACCCATG) bzw. für die Negativkontrolle der Mismatch vivo-Morpholino (CAGCTCCGGCACCTCGCAACCGATG) in jeweils 10µM-Konzentration auf die Epikardkultur gegeben. Zelllyse und RNA-Extraktion wurden, wie im Kapitel 2.3.1 beschrieben, nach 72h Inkubation durchgeführt. Die Effektivität des WT1-Knockdowns wurde mittels Westernblot überprüft, die mRNA-Umschreibung erfolgte mittels RT-PCR und die Quantifizierung erfolgte mittels Realtime-PCR.

2.3.12 Anfertigung von Gewebeschnitten und immunhistologische Färbung

| <u>Chemikalien und Lösungen</u> | <u>Hersteller/ Bezugsquelle</u> |
|---|---|
| Primärantikörper: Anti-AOC1 [Abp1 V-15, goat anti-mouse, Katalognummer: SC-67660] | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Primärantikörper: Anti-WT1 [WT1 180, rabbit anti-mouse, Katalognummer: SC-846] | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Sekundärantikörper: Cy2 donkey anti-goat IgG [Katalognummer: 705-225-147] | Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove |
| Sekundärantikörper: Cy3 donkey anti-rabbit IgG | Jackson ImmunoResearch |

2. Material und Methoden

| | |
|--|---|
| [Katalognummer: 711-166-152] | Laboratories, West Grove |
| Ziegen- bzw. Kaninchen-Serum | Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove |
| Antibody Diluent Reagent Solution Ready-to-use | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Formalin | J. T. Baker, Griesheim |
| PBS Puffer [137 mmol/L NaCl, 2,7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mmol/L KH ₂ PO ₄] | Laborbestand |
| Saccharose-Lösung [30% Saccharose (w/v); 0,1M Na ₂ HPO ₄] | Laborbestand |
| Tissue-Tek O.C.T. Compound | Sakura Finetek, Heppenheim |
| Aceton:Methanol (3:2) | Laborbestand |
| Protein Block, Serum-Free Katalognummer: X0909 | Dako, Hamburg |
| DAPI 70 | Invitrogen, Darmstadt |
| VECTASHIELD Mounting Medium for Fluorescence H-1000 | Vector Laboratories, Burlingame |
| Geräte und Materialien | Hersteller/ Bezugsquelle |
| Cryostat CM 1800 | Leica Biosystems, Wetzlar |
| Einbettmulden | PolyScience, Niles |
| Deckgläser | Roth, Karlsruhe |
| Objektträger SuperFrost Plus | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Axiovert S100 | Zeiss, Jena |

Für die Färbungen wurden Schnitte von E 12,5 Mausembryonen angefertigt. Hierfür wurden die Embryonen nach Entnahme 3h lang in Formalin fixiert. Anschließend folgten drei Waschschrte à 5min und drei Waschschrte à 20min mit 4°C kaltem PBS. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht bei 4°C in Saccharose-Lösung gelagert und am nächsten Tag in Tissue Tek O.C.T. Compound eingebettet und bei -80°C eingefroren. Unter Verwendung eines Kryostaten wurden 7µm dicke Schnitte angefertigt und bei -80°C gelagert.

Für die Doppelfärbung wurden als Primärantikörper anti-AOC1 (Abp1 V-15, goat anti-mouse, Katalognummer: SC-67660, Santa Cruz, Verdünnung: 1:75) und anti-WT1 (WT1 180, rabbit anti-mouse, Katalognummer: SC-846, Santa Cruz, Verdünnung: 1:75) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Kaninchen- bzw. Ziegen-Serum verwendet. Zur Detektion des primären Antikörpers wurden mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Hierfür wurde Cy2-konjugiertes donkey anti-goat IgG (Katalognummer: 705-225-147, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Verdünnung 1:200) und Cy3-gekoppeltes donkey anti-rabbit IgG (Katalognummer: 711-166-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Verdünnung 1:200) verwendet. Die Verdünnungen wurden jeweils mit Antibody Diluent Reagent Solution Ready-to-use angesetzt.

Die bei -80°C gelagerten Schnitte wurden vor der Färbung in Aceton:Methanol (3:2) bei -20°C für 10min fixiert. Anschließend wurden die Objektträger in PBS gewaschen, in einer lichtdichten Stahlkassette mit eingelegtem, feuchtem Tuch aufgereiht und mit serumfreiem Proteinblock 5min lang bei Raumtemperatur blockiert. Darauf folgte die 90-minütige Inkubation mit den Primärantikörpern. Anschließend wurden die Schnitte dreimal à 5min in PBS gewaschen, mit Sekundärantikörpern versetzt und über 45min unter Lichtausschluss inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden sofern möglich ebenfalls unter Verdunkelung durchgeführt, um die an die sekundären Antikörper gebundenen fotosensiblen Farbstoffe zu schützen. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal fünfminütig in PBS gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit in Wasser 1:25 (vol/vol) verdünntem DAPI 70 für 3min. Nach zwei weiteren fünfminütigen PBS-Waschschritten wurden die Objektträger mit VECTASHIELD Mounting Medium eingedeckelt. Die Immunfluoreszenzmarkierungen wurden mit einer Digitalkamera, die mit einem Mikroskop (Axiovert S100) verbunden war, unter Verwendung der Metamorph Software Version 6.1 (Universal Imaging Corporation) fotografiert.

2.4 Datenbanken

Um putative WT1-Bindungsstellen im AOC1-Promotor aufzudecken, wurde eine *in silico* Analyse des AOC1-Gens von -1bp bis -2700bp durchgeführt. Hierfür wurde das auf der Internetseite <http://www.gene-regulation.com> bereitgestellte, auf der TRANSFAC 4.0 Datenbank basierende und von Niels Grabe entwickelte Programm AliBaba 2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) verwendet.

Um die putative WT1-Bindungsstelle im AOC1-Promotor auf ihre evolutionäre Konservierung hin zu analysieren, wurde der „UCSC Genome Browsers on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19)“ (Kent Sugnet et al. 2002), mit dem BLAT - the BLAST-like alignment tool (Kent 2002) und das PhastCons tool (Siepel et al. 2005) auf der Internetseite <http://genome.ucsc.edu/> verwendet. Eine ausführlich Auflistung der dem Genome Browser zugrundeliegenden Sequenzierungen sind unter folgendem Link zu finden: <http://genome.ucsc.edu/goldenPath/credits.html>.

2.5 Statistik

Die statistische Analyse der Versuche in UB27-Zellen, in murinen *Wt1^{+/+}*, *Wt1^{+/-}* und *Wt1^{-/-}* Herzen wurde mittels ANOVA und dem Tukey-Post-hoc-Test (SPSS Statistics 20, IBM) durchgeführt. Alle weiteren Ergebnisse wurden mit dem gepaarten student t-test (Microsoft Excel, Microsoft) analysiert. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Alle Ergebnisse sind im Mittel \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der transkriptionellen Regulation der Amine Oxidase Copper-containing 1 (AOC1) durch den Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1 (WT1). Erste Hinweise auf eine Expressionskontrolle von *AOC1* durch WT1 resultierten aus DNA-Microarrayanalysen, die im Auftrag der AG Zelluläre Entwicklungsphysiologie und Pathophysiologie des Instituts für Vegetative Physiologie der Charité durchgeführt wurden. Die Analysen hatten ergeben, dass die Hemmung der zellulären Expression von WT1 mittels RNA-Interferenz eine Abnahme der *AOC1* mRNA verursacht.

An diese Vorergebnisse anknüpfend sollte im Rahmen dieser Arbeit der Zusammenhang von WT1 und AOC1 näher charakterisiert werden. Hierzu wurde zunächst überprüft, ob die Expressionsniveaus beider Moleküle in verschiedenen Zelllinien miteinander korrelieren. Anschließend wurde unter Anwendung bioinformatischer Methoden nach potenziellen WT1-Bindungsstellen im *AOC1*-Promotor gesucht. Danach wurde experimentell ermittelt, ob das WT1-Protein tatsächlich mit dem *AOC1*-Promotor interagiert und diesen reguliert. Die abschließenden Experimente widmeten sich der Frage, ob eine Regulation des *AOC1*-Gens durch WT1 auch in Mäuseembryonen *in vivo* erfolgt.

3.1 Die zellulären Expressionsniveaus von WT1 und AOC1 sind korreliert

Als erster Schritt zur Charakterisierung der Bedeutung von WT1 für die Regulation des *AOC1*-Gens wurde in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen der Zusammenhang von WT1- und AOC1-Expression untersucht.

Dafür wurde zunächst die Expression von WT1 in M15-Zellen aus dem Mesonephros der Maus durch Transfektion mit spezifischer siRNA gehemmt. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion mit siRNA ohne bekannte Zielsequenz im Mausgenom. Der Knockdown von WT1 wurde mittels Westernblot nachgewiesen (Abb. 7B). M15-Zellen mit gehemmter WT1-Expression wiesen im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikant geringeren Gehalt an *AOC1* mRNA auf (Abb. 7A). Nach mRNA-Abgleich gegen das Housekeeping-Gen *GAPDH* betrug der relative Gehalt der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen $1,01 \pm 0,53$ (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=5$), während sich für die mit *Wt1* siRNA behandelten Zellen ein entsprechender Wert von $0,37 \pm 0,28$

(n=5) ergab (Abb. 7A). Mit dem Studentschen t-Test wurde eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein siRNA-Knockdown von WT1 zu einer signifikanten Reduktion der *AOC1* mRNA in M15-Zellen führt.

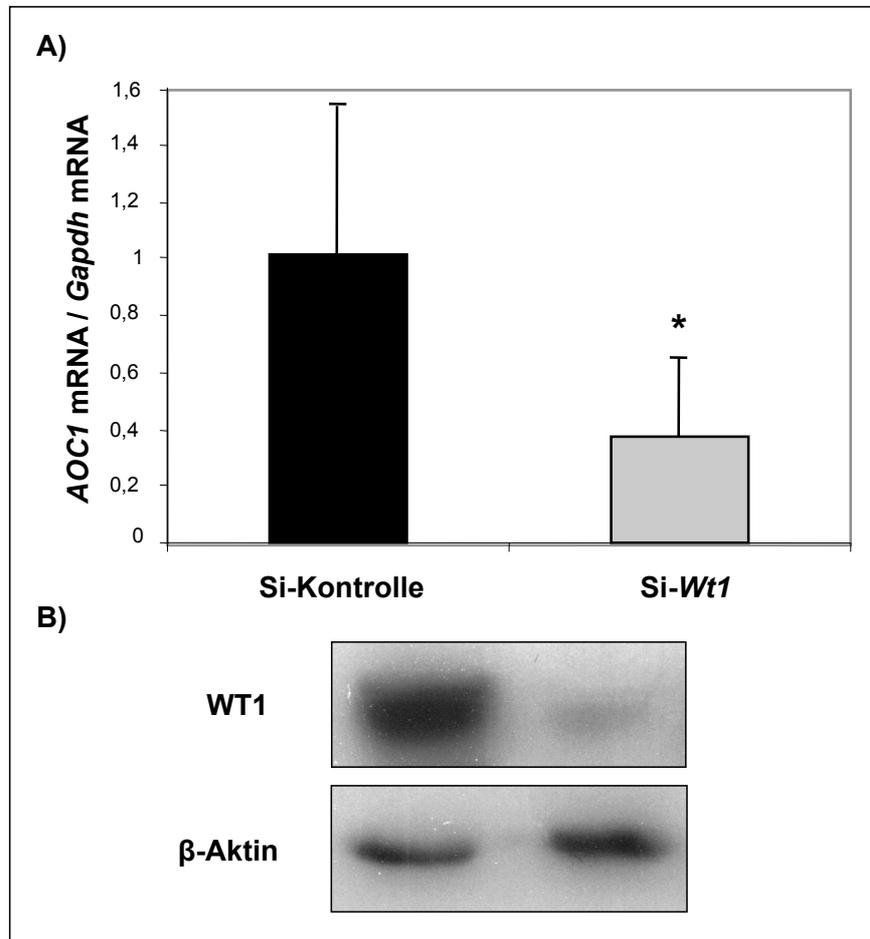


Abb. 7: WT1-Knockdown in M15-Zellen bewirkt eine Reduktion der *AOC1* mRNA.

Die Grafik A) zeigt einen verminderten Gehalt an *AOC1* mRNA nach siRNA-Knockdown von WT1 in M15-Zellen aus dem Mesonephros der Maus. In Grafik B) ist ein repräsentatives Westernblot für WT1 und β -Aktin dargestellt. Er dokumentiert eine Abnahme von WT1-Protein in den mit *Wt1* siRNA behandelten M15-Zellen. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion mit einer siRNA, für die keine bekannte Zielsequenz im Mausgenom existiert. Alle Werte sind gemittelt +SD angegeben. Es gilt n=5; das Signifikanzniveau ($*p < 0,05$) wurde mittels Studentschem t-Test gegen die Kontrolle berechnet (veröffentlicht in Kirschner et al. 2014).

Anschließend wurde untersucht, ob eine Überexpression des WT1-Proteins konsekutiv eine Erhöhung der *AOC1* mRNA bewirkt. Hierzu wurde die humane Osteosarkomzelllinie UB27 als Modell gewählt. Dabei handelt es sich um eine gentechnisch veränderte Zelllinie, bei der die Expression der WT1(-KTS)-Proteinvariante unter der Kontrolle des Tetrazyklin-Repressors erfolgt. In Gegenwart von Tetrazyklin ist die WT1-Expression in UB27-Zellen gehemmt. Zum Zeitpunkt 0h

wurde das Zellkulturmedium durch ein Tetracyclin-freies Nährmedium ersetzt, woraufhin ein fortlaufender Anstieg von WT1-Protein über die nächsten 72h erfolgte (Abb. 8B). Die *AOC1* mRNA wurde mittels Real-time-PCR quantifiziert und gegen *GAPDH* mRNA abgeglichen. Die zum Ausgangszeitpunkt 0h gemessene *AOC1* mRNA wurde auf den Wert $1 \pm 0,2$ ($n=4$) gesetzt. Bezogen auf den Ausgangswert betrug der relative Gehalt an *AOC1* mRNA nach 24, 48 und 72h jeweils $1,07 \pm 0,44$ ($n=3$), $3,38 \pm 1,54$ ($n=4$) und $3,35 \pm 1,07$ ($n=3$). Die Zunahme der *AOC1* mRNA erwies sich nach 48 und 72h, jeweils gegenüber 0 und 24h, als statistisch signifikant (ANOVA, $F(3,10) = 8$ $p < 0.05$) (Abb. 8A).

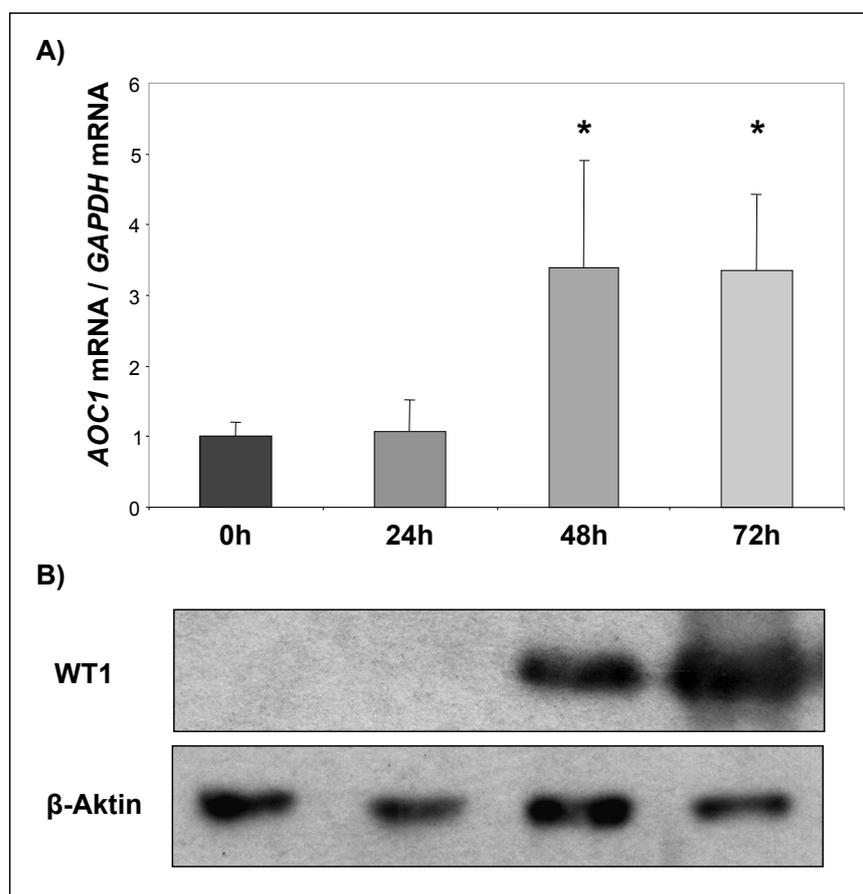


Abb. 8: WT1 steigert den *AOC1* mRNA-Gehalt in UB27-Zellen.

In dieser Abbildung wird die Veränderung der *AOC1* mRNA-Menge unter einer Zunahme des WT1(-KTS)-Proteins in humanen Osteosarkomzellen (UB27) gezeigt. In UB27-Zellen lässt sich die *Wt1*-Expression durch Zugabe von Tetracyclin zum Nährmedium hemmen. In Grafik A) ist die Menge an *AOC1* mRNA in UB27-Zellen 0, 24, 48 und 72 Stunden nach Entfernen von Tetracyclin aus dem Kulturmedium dargestellt. Alle Werte sind gemittelt +SD angegeben. Anzahl der durchgeführten Experimente $n=4$ für die Zeitpunkte 0h und 48h bzw. $n=3$ für die Untersuchungszeitpunkte 24h und 72h. Die Signifikanzniveaus $*p < 0,05$ wurden durch ANOVA ermittelt. Der in Grafik B) dargestellte repräsentative Westernblot zeigt Veränderungen im Gehalt an WT1-Protein zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Als Kontrolle erfolgte der Nachweis von β -Aktin (veröffentlicht in Kirschner et al. 2014).

3.2 Der proximale *AOC1*-Promotor besitzt eine potenzielle *Wt1*-Bindungsstelle

Um *WT1*-Bindungsstellen im humanen *AOC1*-Promotor zu identifizieren, wurde als erster Schritt eine Sequenzanalyse mit Hilfe des auf der TRANSFAC-Datenbank basierenden AliBaba2.1-Programms (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) durchgeführt. Es wurde eine 2700bp lange Sequenz upstream der *AOC1*-5'UTR (-1 bis -2700bp) auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen durchsucht. Dabei wurden 243 Ergebnisse erzielt, unter denen sich ein *WT1*-Konsensusmotiv in einem palindromischen Bereich an Position -1 bis -7 befand. Die Abbildung 9A zeigt eine schematische Darstellung des *AOC1*-Promotors unter Einschluss des in Abbildung 9B dargestellten Sequenzabschnitts. Eine Auswahl der in diesem Abschnitt gefundenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen sowie das minimale *WT1*-Konsensusmotiv sind markiert.

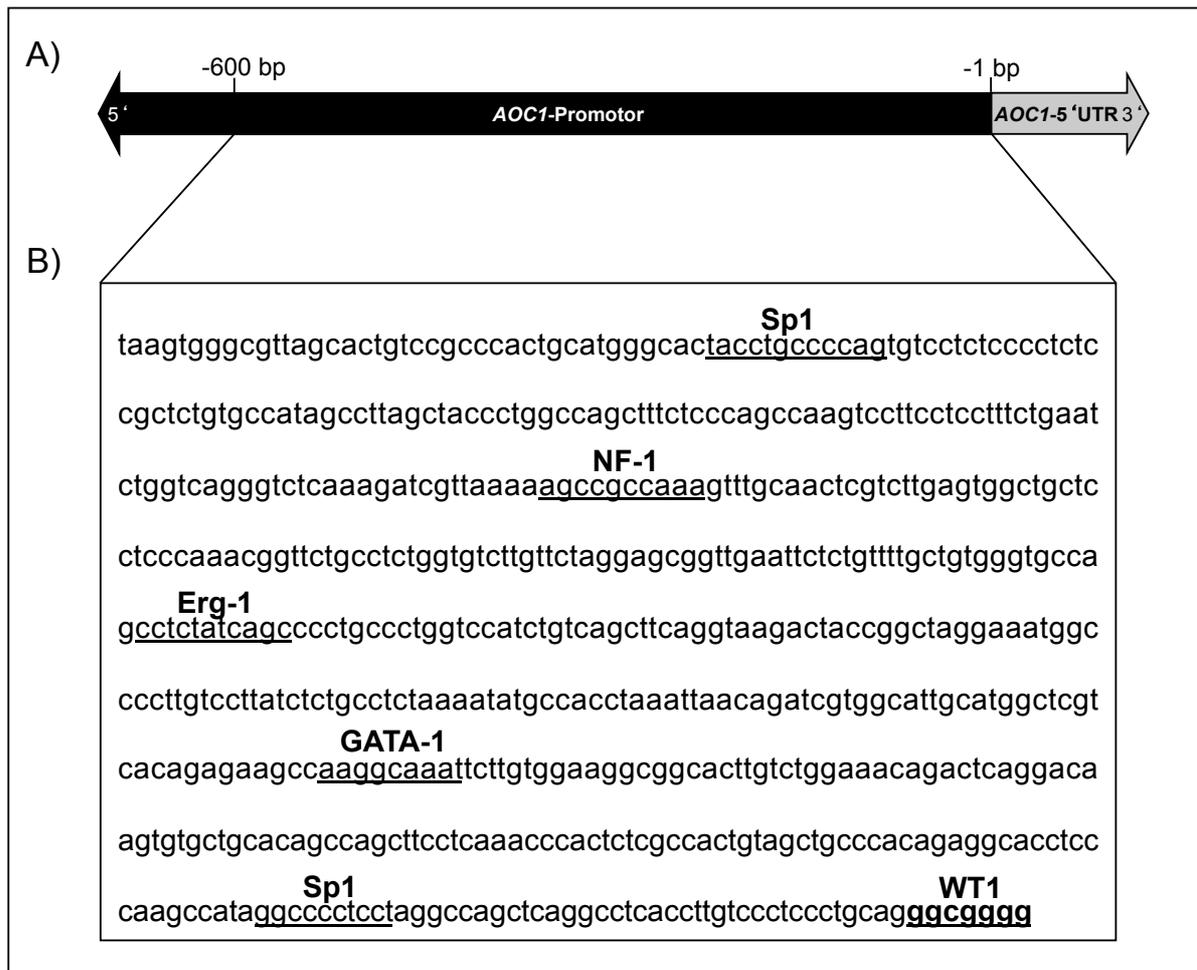


Abb. 9: Transkriptionsfaktorbindungsstellen (Auswahl) im proximalen AOC1-Promotor.

Diese Grafik wurde auf Basis der TRANSFAC-Datenbank unter Verwendung des AliBaba2.1-Programms erstellt (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>). Es wird eine WT1-Bindungsstelle im proximalen AOC1-Promotor vorausgesagt. Abbildung A) zeigt eine schematische Darstellung des humanen AOC1-Promotors. Abbildung B) zeigt einen 600bp (-1bp bis -600bp) langen Ausschnitt der AOC1-Promotors, die mit Hilfe des auf der TRANSFAC-Datenbank basierenden AliBaba2.1-Programms auf mögliche WT1-Bindungsstellen untersucht wurde. In der Abbildung ist eine Auswahl anderer, in diesem Abschnitt vorausgesagter Transkriptionsfaktorbindungsstellen, einschließlich der ermittelten potenziellen WT1 Bindungsstelle, hervorgehoben.

Anschließend wurde die ermittelte WT1-Bindungssequenz mit Hilfe des „UCSC Genome Browsers on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19)“ (Kent Sugnet 2002) (<http://genome.ucsc.edu/>) und dem BLAT - the BLAST-like alignment tool (Kent 2002) auf ihre evolutionäre Konservierung untersucht. Dabei wurde mittels der PhastCons-Methode (Siepel et al. 2005) anhand des Sequenzvergleichs mehrerer Säugetiere ein Wahrscheinlichkeitswert, demzufolge es sich um eine konservierte Sequenz handelt, bestimmt und grafisch dargestellt (Abb. 10A). Zusätzlich wurden mit Hilfe des UCSC Genome Browsers die korrespondierenden AOC1-Promotorsequenzen mehrerer Wirbeltiere direkt verglichen (Abb. 10B)

(<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/credits.html>). Es konnte damit gezeigt werden, dass es sich bei der potenziellen WT1-Bindungsstelle um eine hoch konservierte Region des *AOC1*-Promotors handelt.

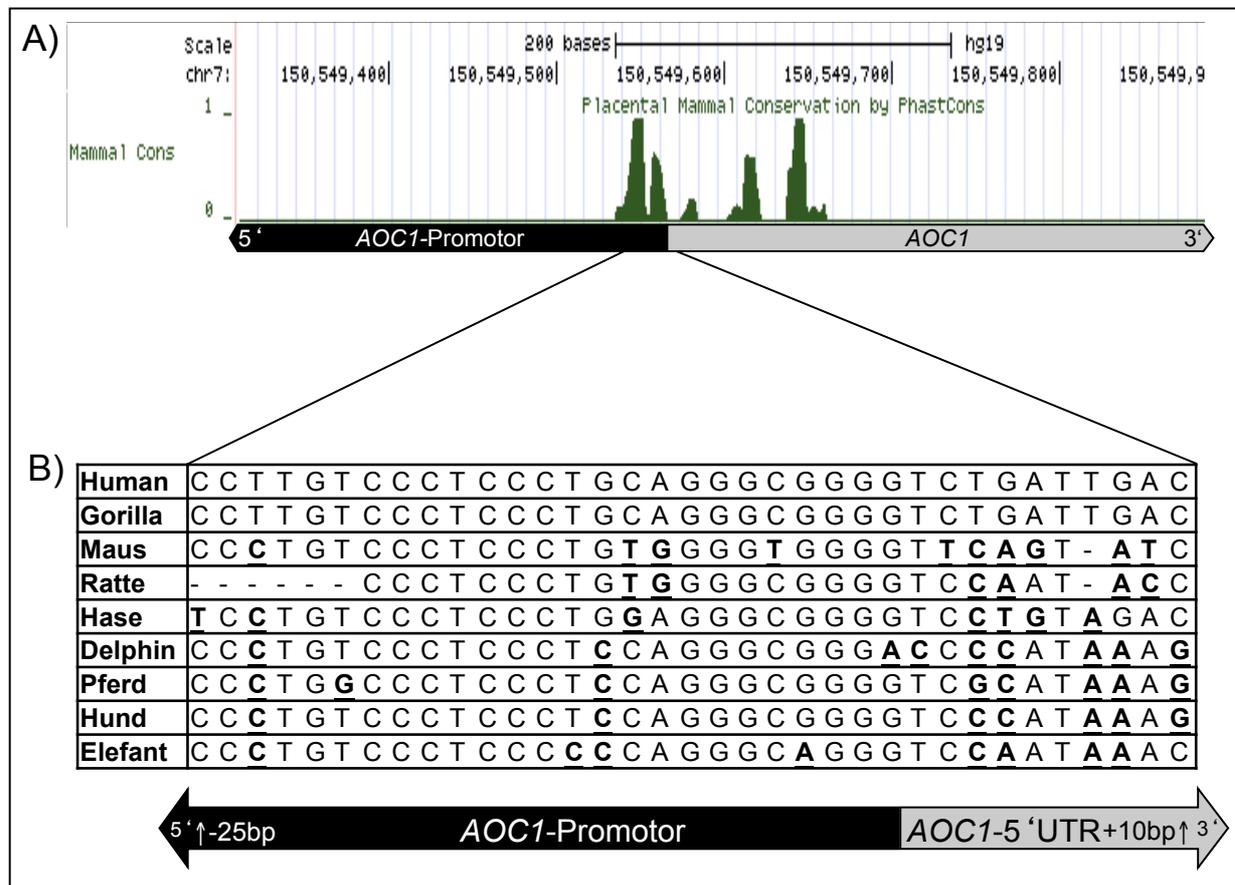


Abb. 10: Die WT1-Bindungsstelle im proximalen *AOC1*-Promotor ist hoch konserviert.

Abb. A) zeigt die Sequenzkonservierung für einen Ausschnitt aus dem *AOC1*-Gen im Bereich des proximalen *AOC1* Promotors. Die Sequenzkonservierung ist mittels "Mammal PhastCons" (Siepel et al. 2005) grafisch dargestellt. *AOC1*-Promotor und 5'UTR sind als Pfeil veranschaulicht.

In Abb. B) ist ein Ausschnitt aus der in Abb. A) gezeigten Sequenz dargestellt, in dem sich die vermutete WT1-Bindungsstelle befindet. Die humane Sequenz wurde mit einer Auswahl von *AOC1*-Promotorsequenzen verschiedener Wirbeltiere verglichen; Abweichungen von der humanen Sequenz sind fett gedruckt und unterstrichen. Im untersten Bereich der Abbildung ist die Position der Sequenz im *AOC1*-Gen grafisch als Pfeil veranschaulicht. Die Grafik ist eine bearbeitete Abbildung, generiert durch den „UCSC Genome Browsers on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19)“ (<http://genome.ucsc.edu/>; Kent Sugnet et al. 2002; Kent 2002).

3.3 Der *AOC1*-Promotor wird durch WT1 stimuliert

Um experimentell zu überprüfen, ob der Promotor des *AOC1*-Gens durch WT1 aktivierbar ist, wurden *AOC1*-Luciferase-Reporterassays durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein 367bp langer Sequenzabschnitt aus dem humanen *AOC1*-Promotor

(299bp AOC1-Promotor, 68bp AOC1-5'UTR) in das pGL3basic Reporterplasmid ligiert. Anschließend wurden kürzere bzw. mutierte Promotorkonstrukte mittels PCR hergestellt. Abbildung 11A gibt einen Überblick über die in den Reporterassays eingesetzten Promotorkonstrukte. Als Kontrolle wurde der Luciferase-Leervektor (pGL3basic) verwendet. Die AOC1-Promotorfragmente bestanden jeweils aus einer 68bp langen 5'UTR-Sequenz und einem angrenzenden Promotorstück von unterschiedlicher Länge. Zusätzlich zu den zwei hier dargestellten AOC1-Wildtyp-Konstrukten mit natürlicher Basenfolge wurde ein Reporterkonstrukt mit einer Mutation der vorausgesagten WT1-Bindungsstelle (s. o.) hergestellt. Die Sequenz der potenziellen WT1-Bindungsstelle GTCCCTCCCTGCAGGGCGGGGTCTG wurde folgendermaßen mutiert: GTCACTTACTGCATTGCATGGTCTG.

Nach Transfektion wurden die HEK293-Zellen 48h lang inkubiert und anschließend lysiert. Die ermittelten Firefly-Luciferaseaktivitäten wurden gegen die Aktivität eines co-transfizierten Renilla-Luciferasekonstrukts normalisiert, um unterschiedliche Transfektionseffizienzen abzugleichen. Für jedes Konstrukt wurde als Kontrolle eine Kotransfektion mit leerem Expressionsvektor durchgeführt, für die der ermittelte *Firefly-/Renilla* Luciferasequotient gleich 1 gesetzt wurde. Das Signifikanzniveau wurde gegen die jeweilige Leervektor-Kontrolle mittels t-Test errechnet.

In Abbildung 11B sind die Ergebnisse der Reporterassays grafisch dargestellt. Die Luciferaseaktivität des Reporterkonstrukts mit einem 299bp langen Promotorfragment stieg unter Kotransfektion von WT1 um mehr als das 2,5-fache relativ zur Leervektor-Kontrolle an ($n=4$; $SD=0,82$; $p<0,05$).

Ein 47bp langes proximales Promotorstück wurde durch WT1 um den Faktor 3,2 stimuliert ($n=5$; $SD=1,14$; $p<0,05$). Die Mutation der vorhergesagten WT1-Bindungsstelle im 299bp langen Promotorfragment verursachte einen Verlust der WT1-Induzierbarkeit (Abb. 11). Die Luciferaseaktivität des mutierten Konstrukts lag nach Kotransfektion von WT1 bei einem Wert von 1,06 ($n=4$; $SD=0,42$). Diese Resultate zeigen, dass der AOC1-Promotor durch WT1 stimuliert wird. Für diesen Effekt ist die mit Hilfe bioinformatischer Methoden vorausgesagte WT1-Bindungsstelle erforderlich.

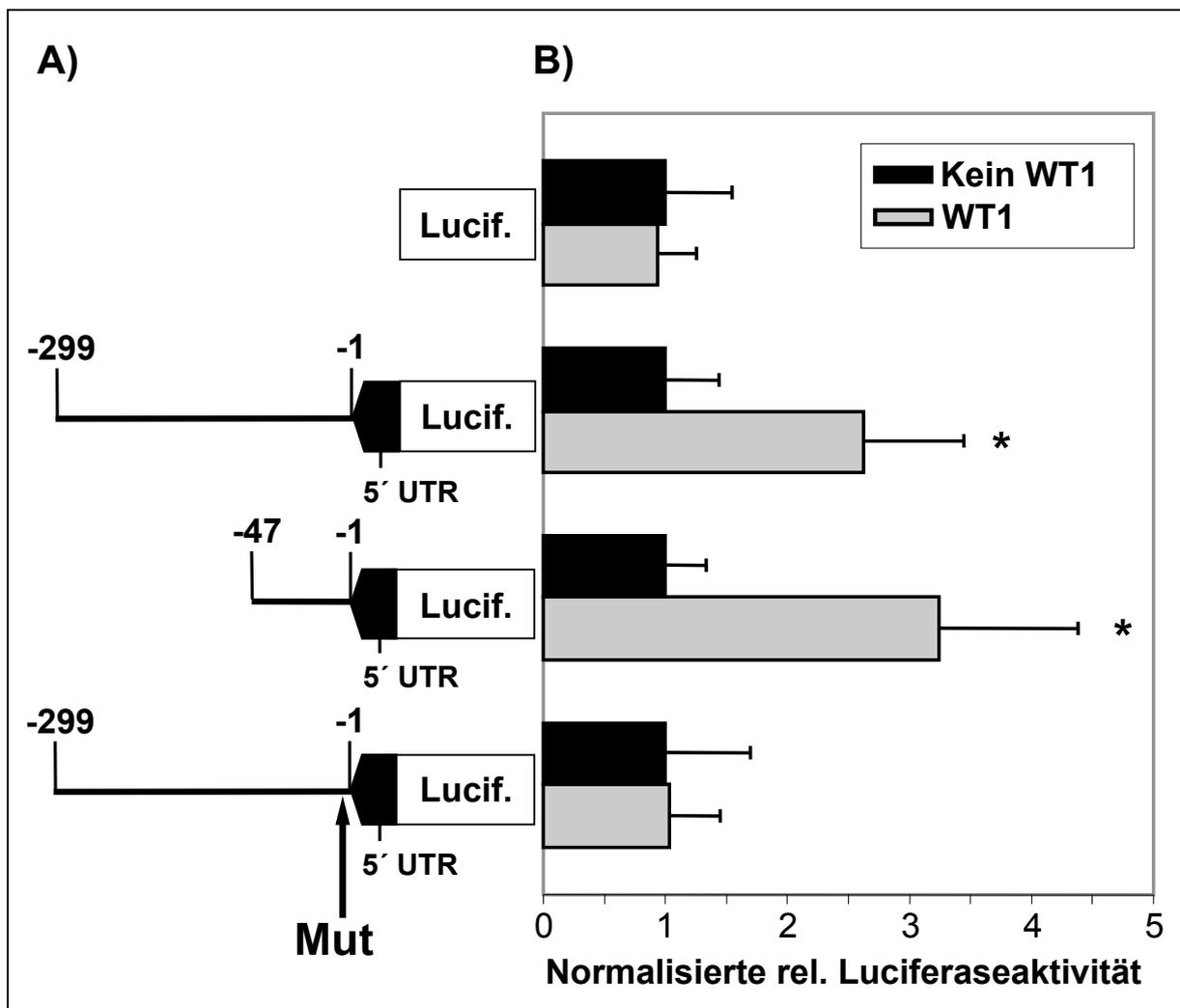


Abb. 11: WT1 stimuliert den humanen AOC1-Promotor im Luciferase-Reporterassay.

Abb. A) zeigt eine Übersicht der verwendeten AOC1-Promotorkonstrukte. „Lucif.“ bezeichnet den als Negativkontrolle verwendeten pGL3basic Leervektor. Die anderen Konstrukte setzen sich jeweils aus einem 68bp langen Fragment der AOC1-5' UTR und einem angrenzenden AOC1-Promotorfragment angezeigter Länge zusammen. Das Reporterkonstrukt mit mutierter WT1-Bindungsstelle sowie deren Lokalisation ist mit „Mut“ und einem schwarzen Pfeil markiert.

Abb. B) zeigt die Luciferaseaktivitäten der dargestellten Reporterkonstrukte nach Kotransfektion mit Leervektor bzw. einem WT1(-KTS)-Expressionskonstrukt. Alle Werte sind gemittelt +SD angegeben. Es gilt $n=4$ für die Negativkontrolle und das nicht mutierte 299bp lange Promotorfragment sowie $n=3$ für das 47bp lange Promotorkonstrukt und das mutierte 299bp Promotorfragment; das Signifikanzniveau $*p < 0,05$ wurde mittels t-Test bestimmt (veröffentlicht in Kirschner et al. 2014).

3.4 WT1 bindet an den proximalen AOC1-Promotor

Im Anschluss an diese Experimente wurde untersucht, ob tatsächlich eine Bindung des WT1-Proteins an das identifizierte Element im proximalen AOC1-Promotor erfolgt.

Zunächst wurde ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt. Bei diesem Experiment wurden DIG-markierte Oligonukleotide mit rekombinantem WT1-

Protein inkubiert. Danach wurden die Reaktionsansätze in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Sofern WT1 Protein an das Oligonukleotid bindet, läuft der Protein-DNA-Komplex in der Gelelektrophorese langsamer als das ungebundene Oligonukleotid. Nach Sichtbarmachung der Oligonukleotide zeigt sich folglich eine zusätzliche Retardierungsbande.

Die Sequenz des verwendeten *AOC1*-Oligonukleotids enthielt das anhand der Reporterassays experimentell ermittelte WT1-Konsensusmotiv (CCTTGTCCTCCCTGCAGGGCGGGGTCTGA). Zusätzlich wurde eine Variante dieses Oligonukleotids mit mutierter WT1-Bindungsstelle untersucht (CCTTGTC**ACTTACTGCATTGCAT**GGTCTGA). Die hier hervorgehobene Mutation ist mit der Mutation des für die Reporterassays verwendeten Promotorkonstrukts identisch. In Abbildung 12 ist der durchgeführte EMSA dargestellt. Für das nicht mutierte *AOC1*-Oligonukleotid konnte eine Bindung sowohl der WT1(+KTS)- als auch der WT1(-KTS)-Spleißvariante nachgewiesen werden. Um die Spezifität dieser Interaktionen zu überprüfen, wurde den Reaktionsansätzen ein unmarkiertes Oligonukleotid mit einem bekannten WT1-Bindungselement aus dem Promotor des *Adamts16*-Gens zugegeben (Jacobi et al. 2013). Die Versuche zeigten, dass durch den *Adamts16*-Kompetitor eine konzentrationsabhängige Verdrängung von WT1 aus der *AOC1*-Bindung bewirkt wurde. Während bei einem Verhältnis *AOC1*- zu *Adamts16*-Oligonukleotid von 1:50 noch eine schwache Retardierungsbande erkennbar war, resultierte ein Verhältnis von 1:100 in einem vollständigen Bindungsverlust. Mutation des WT1-Konsensusmotivs im *AOC1*-Oligonukleotid verhinderte ebenfalls die Bindung sowohl von WT1(+KTS)- als auch von WT1(-KTS)-Protein (Abb. 12). Diese Resultate zeigen, dass WT1 Protein *in vitro* spezifisch an das identifizierte Oligonukleotid aus dem *AOC1*-Promotor bindet.

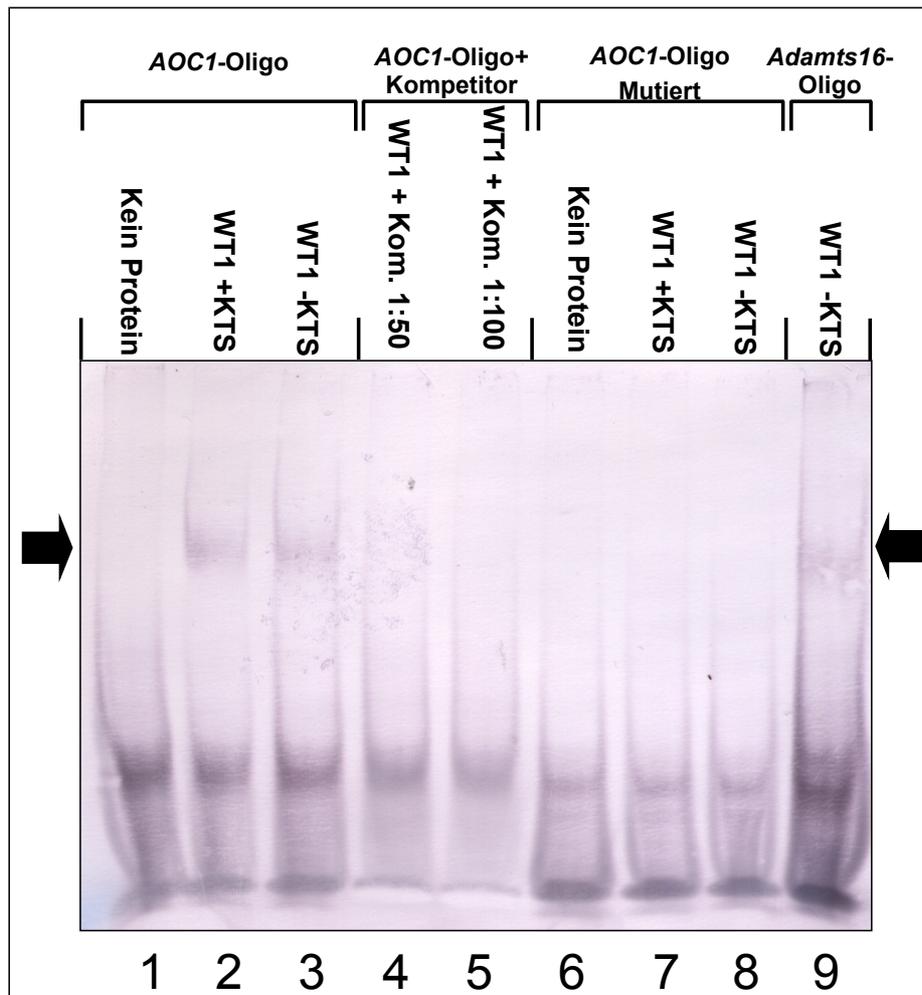


Abb. 12: WT1 bindet an eine 5'UTR-nahe Region des humanen AOC1-Promotors. Gezeigt wird das repräsentative Ergebnis eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA), in dem die Bindung von rekombinantem WT1-Protein an DIG-markiertes Oligonukleotid nachgewiesen wird. Die Bindung von WT1 an das Oligonukleotid wurde anhand der Retardierungsbanden in der mit Pfeilen markierten Laufhöhe nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die WT1 -KTS Variante als auch die WT1 +KTS Variante an das AOC1-Promotorfragment bindet (Spuren 2 und 3). In Spur 1 ist im Sinne einer Negativkontrolle kein WT1-Protein aufgetragen. Die Mutation des AOC1-Oligonukleotides verhindert die Bindung von WT1 an das AOC1-Promotorfragment (s. Spuren 7 und 8). Spur 6 fungiert erneut als Negativkontrolle. Spuren 4 und 5 zeigt die Bindung von WT1 an das AOC1-Promotoroligonukleotid unter Zugabe eines Kompetitors in Form eines nicht DIG-markierten Oligonukleotids, das eine bekannte WT1-Bindungsstelle im *Adamts16*-Promotor trägt (Jacobi et al. 2013), in 1:50-facher und 1:100-facher Konzentration. Erst die Zugabe des Kompetitors im Verhältnis 1:100 reicht aus, um die WT1/AOC1-Bindung vollkommen aufzuheben (Spuren 4 und 5). In Spur 9 wurde das als Kompetitor verwendete *Adamts16*-Oligo in DIG-markierter Form als Positivkontrolle verwendet (veröffentlicht in Kirschner et al. 2014).

In weiteren Experimenten wurde versucht, eine Interaktion von WT1-Protein mit dem AOC1-Promotor auch bei erhaltener Chromatinstruktur nachzuweisen. Hierfür wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit M15-Zellen, die ursprünglich aus dem Mesonephros der Maus etabliert wurden, durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Fixierung von Protein-DNA-Verbindungen durch Formalinbehandlung der Zellen. Nach

Chromatinfragmentierung mittels Ultraschall wurde DNA-gebundenes WT1-Protein mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurde die DNA gereinigt und mittels real-time PCR quantifiziert. Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass sie die Region des murinen *AOC1*-Promotors, in dem sich das konservierte WT1-Bindungselement befand, einschlossen. Um unspezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen zu erfassen, wurde anstelle der Immunpräzipitation mit einem WT1-Antikörper normales Kaninchen IgG verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine Promotorsequenz des anti-Müller-Hormon-Rezeptor 2 (*Amhr2*) kodierenden Gens - einem bekannten WT1-Zielgen (Klattig et al. 2007) - amplifiziert. Die ermittelten Werte für *Amhr2*- bzw. *AOC1*-DNA wurden auf amplifizierte DNA aus dem ersten Intron des *Aktin*-Gens, das kein WT1-Bindungselement aufweist, bezogen. Die Ergebnisse wurden gemittelt und auf die Kontrollexperimente mit normalem Kaninchen IgG, deren Werte auf 1 gesetzt wurden, normiert.

Die Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der ChIP-Assays. Im Vergleich zur Verwendung von normalem Kaninchen IgG (0,98, SD=0,16, n=7) wurde DNA aus dem *AOC1*-Promotor durch Präzipitation mit einem WT1-Antikörper signifikant auf mehr als das Doppelte angereichert (2,08, SD=1,19, n=7, $p < 0,05$ t-Test). Ebenso konnte durch WT1-Immunpräzipitation eine signifikante Anreicherung von *Amhr2*-DNA nachgewiesen werden (1,74, SD=0,72 vs. 1, SD=0,07, n=7, $p < 0,05$ t-Test). Diese Resultate zeigen, dass WT1 Protein im Kontext der natürlichen Chromatinstruktur an den *AOC1*-Promotor bindet.

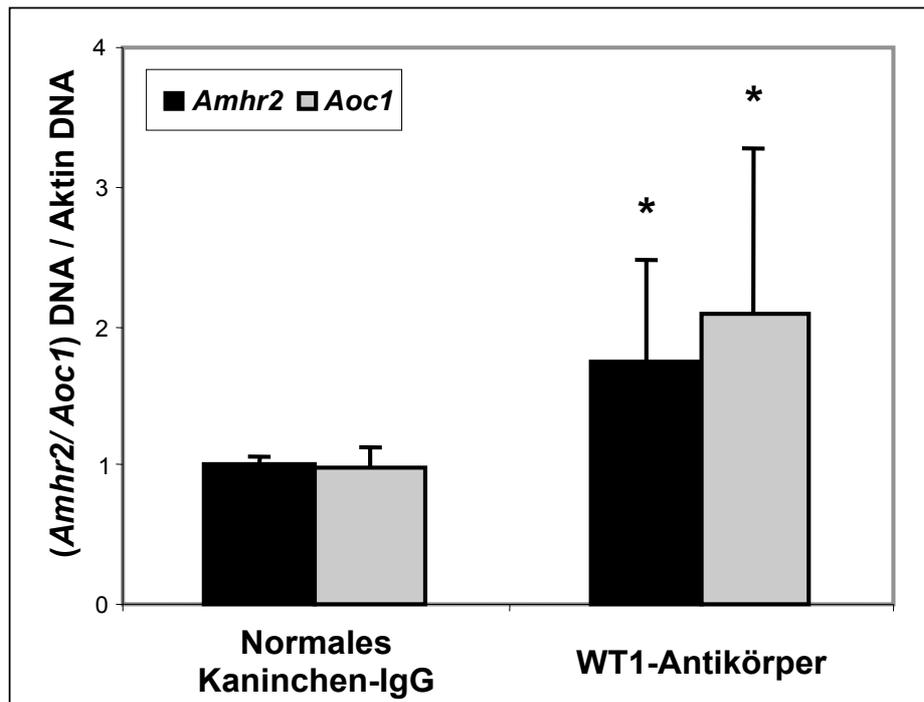


Abb. 13: WT1 bindet den AOC1-Promotor bei erhaltener Chromatinstruktur.

Dargestellt sind die Ergebnisse von Chromatin Immunpräzipitationen (ChIP) in murinen Mesonephros M15-Zellen. Mittels ChIP-Assay wurde die Menge an WT1 gebundener genomischer DNA ermittelt. In diesem Fall wurde eine Bindung von WT1-Protein an den proximalen AOC1-Promotor sowie an den Promotor des bereits als WT1-Zielgen identifizierten *Amhr2* (Anti-Müller-Hormon-Rezeptor 2) nachgewiesen. Die Werte sind gemittelt +SD angegeben. Das Signifikanzniveau von $*p < 0,05$ wurde durch t-Test gegen die jeweilige Kontrolle mit normalem Kaninchen-IgG bestimmt (veröffentlicht in Kirschner et al. 2014).

3.5 WT1 reguliert die AOC1-Expression in embryonalen Mäuseherzen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Regulation der *Aoc1*-Expression durch WT1 auch *ex vivo* nachweisbar ist. Da in der Literatur beschrieben ist, dass sowohl WT1 als auch Polyamine eine Rolle in der Entwicklung des Herzens spielen (Kreidberg et al. 1993; von Gise et al. 2011; Slotkin et al. 1983; Gritli-Linde et al. 2001), sollte der Zusammenhang von WT1 und *Aoc1* im embryonalen Herzen untersucht werden. Dafür wurden die Herzen von Wildtyp-, heterozygoten (*Wt1*^{+/-})- und Knockout (*Wt1*^{-/-})-Mäuseembryonen (E12,5) entnommen. Anschließend wurde der *Aoc1* mRNA-Gehalt der Herzen mittels Real-time-PCR quantifiziert.

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse. Alle Werte wurden gemittelt und der mittlere *Aoc1* mRNA-Gehalt der Wildtyp-Herzen wurde gleich 1 (n=6; SD=0,4) gesetzt. Im Vergleich zu Wildtypen war die *Aoc1* mRNA in den *Wt1*-heterozygoten Herzen mit einem Wert von 1,11 (n=6; SD=0,75) nicht signifikant verändert. In den *Wt1*-Knockout-Herzen (*Wt1*^{-/-}) war ein signifikanter Rückgang der *Aoc1* mRNA auf einen Wert von 0,4 nachweisbar (n=6; SD=0,22; ANOVA, $F(2,15) = 6,526$, $p < 0,05$). Diese Resultate

zeigen, dass die Expression von *Aoc1* in embryonalen Mäuseherzen WT1-abhängig ist.

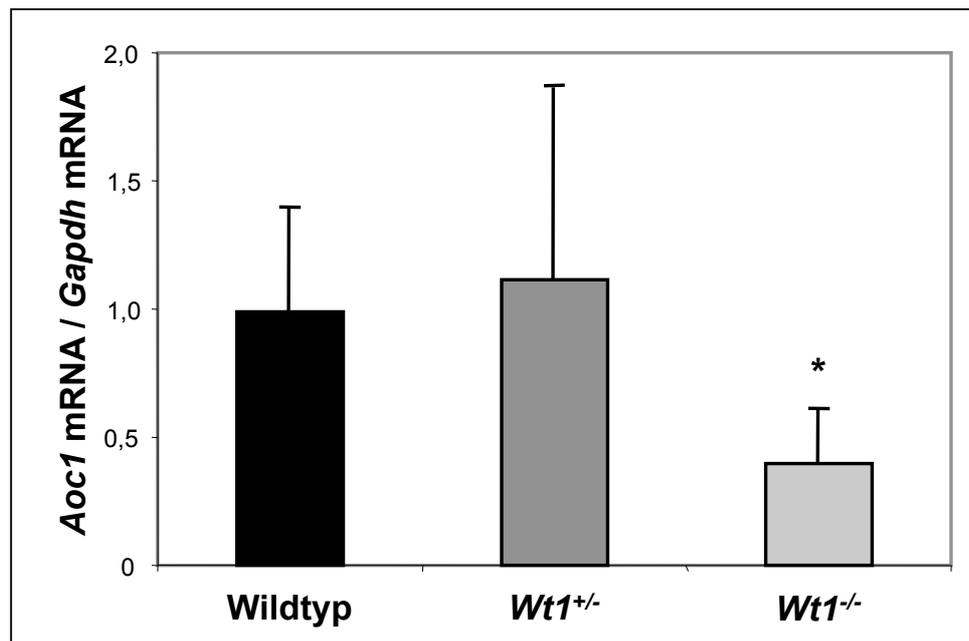


Abb. 14: Die *Aoc1* mRNA ist in den Herzen von *Wt1*-defizienten Mäusembryonen signifikant erniedrigt. Die Grafik zeigt den *Aoc1* mRNA-Gehalt in embryonalen Herzen (E12,5) von Wildtyp-, heterozygoten- (*Wt1*^{+/-}) und Knockout-Mäusen (*Wt1*^{-/-}). Die mRNA wurde mittels RT-real-time-PCR quantifiziert. Alle Werte sind gemittelt +SD angegeben. Es gilt n=6, das Signifikanzniveau liegt bei * $p < 0,05$ und wurde mittels ANOVA gegen die Wildtyp- und heterozygoten-Hezen berechnet.

In der Literatur ist eine Expression von WT1 im Epikard des embryonalen Herzen beschrieben. Um die Regulation von *AOC1* durch WT1 noch besser zu charakterisieren, sollte dieser Zusammenhang im Epikard embryonaler Mäuse analysiert werden. Dafür wurden die Herzen von E12,5-Mäusembryonen (Wildtyp) entnommen. Aus Organkulturen wurden zunächst Epikardzellen angezüchtet, deren WT1-Expression durch Transfektion mit einem spezifischen antisense *vivo*-Morpholino gehemmt wurde. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion eines mismatch-Morpholinos. Nach 72-stündiger Inkubation in Gegenwart der Morpholinos wurde aus den Epikardzellkulturen RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die *Aoc1* mRNA mittels real-time PCR quantifiziert. Die Ergebnisse wurden gemittelt und auf die Kontrolle mit mismatch-Morpholino (=1) normiert. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Studentschen *t*-Test ermittelt. Der Erfolg des *Wt1*-Morpholino-Knockdowns wurde im Westernblot überprüft (Abb. 15B). Abbildung 15A zeigt die erzielten Ergebnisse. In primären embryonalen Epikardzellen mit *Wt1*-Knockdown (*Wt1*-Mo) sank die *Aoc1* mRNA höchst signifikant auf einen relativen Wert von 0,045 (n=5; SD=0,025; $p < 0,001$). Dies entspricht einer Abnahme auf unter 5% relativ zur Kontrolle mit mismatch-

Morpholino. Diese Resultate belegen, dass *Aoc1* im Epikard von Mausembryonen WT1-abhängig exprimiert wird.

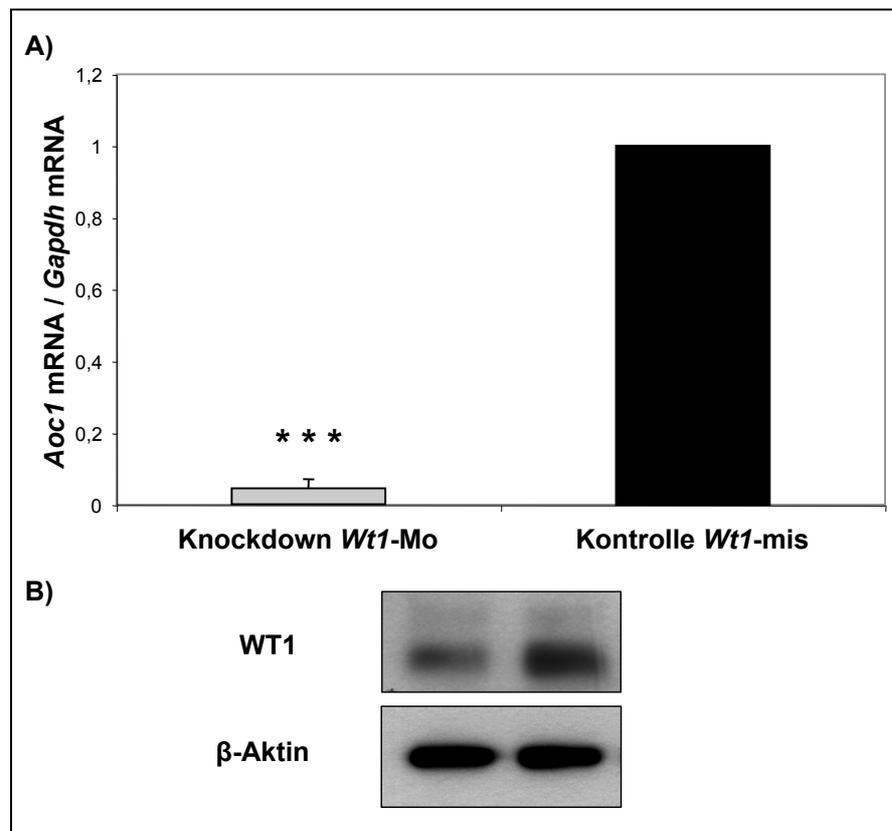


Abb. 15: Der *Aoc1* mRNA-Gehalt ist nach WT1-Knockdown in murinen embryonalen Epikardzellkulturen erniedrigt.

Grafik A) zeigt die Veränderung der *Aoc1* mRNA nach Morpholino-Knockdown von WT1 in murinen embryonalen Epikardzellkulturen. Die Kulturen wurden gepaart und dann auf die mismatch-Kontrolle mit dem Wert 1 normiert. Alle Werte sind gemittelt bei $n=5$. Die +Standardabweichung wurde angegeben. Das Signifikanzniveau wurde mittels t-Test gegen die Kontrolle bestimmt und liegt bei $***p<0,000001$. Grafik B) zeigt einen repräsentativen Westernblot, der den Rückgang von WT1 und damit die Wirksamkeit des Morpholino-Knockdowns bestätigt.

3.6 AOC1 und WT1 sind im embryonalen Epikard co-exprimiert

In einem letzten Schritt sollte untersucht werden, ob AOC1 und WT1 zeitgleich und in denselben Zellen des embryonalen Herzens exprimiert werden. Dafür wurden Mausherzen zum Entwicklungszeitpunkt E12,5 entnommen, fixiert, und in einem Kryostat geschnitten. Anschließend wurden immunhistochemische Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen WT1 und AOC1 durchgeführt. Die gebundenen Primärantikörper wurden mit Hilfe von unterschiedlich markierten Zweitantikörpern detektiert. Wie in Abbildung 16A zu erkennen ist, werden AOC1 (Grünfluoreszenz) und WT1 (Rotfluoreszenz) im Epikard des embryonalen Mausherzens co-exprimiert. Als

Negativkontrolle wurde Normalserum anstelle der AOC1- und WT1-Antikörper verwendet (Abb. 16B). Die Kerne wurden mit Dapi (blau) dargestellt.

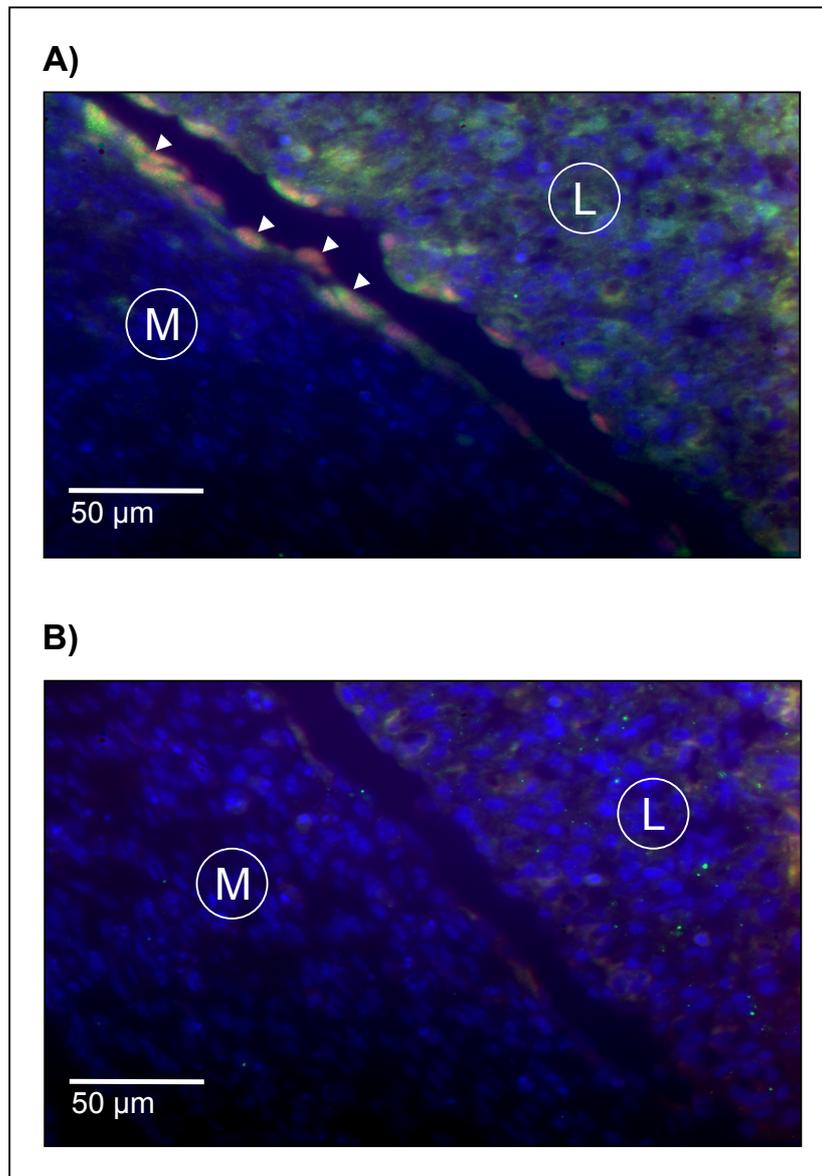


Abb. 16: WT1 und AOC1 sind im Epikard embryonaler Mäuse (E12,5) co-exprimiert. Gezeigt ist eine repräsentative Immunfluoreszenz-Färbung von WT1 (rot) und AOC1 (grün) in murinen embryonalen Herzen (E12,5). Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau gefärbt. In beiden Abbildungen ist das Herz im linken unteren, die Leber im rechten oberen Bildabschnitt zu sehen. Das Myokard ist mit „M“, die Leber mit „L“ markiert. Abbildung A) zeigt die Färbung mit WT1- (rot) und AOC1- (grün) Antikörpern. Co-exprimierende Epikardzellen sind durch weiße Pfeilköpfe markiert. Abbildung B) zeigt die Serum-Negativkontrolle.

4. Diskussion

Die Amine Oxidase copper containing 1 (AOC1) ist eine kupferhaltige Aminoxidase, die in tierischen, pflanzlichen und bakteriellen Zellen zu finden ist. Bestimmte funktionell relevante Regionen des Proteins sind hochgradig konserviert (Kusano et al. 2008; Tipping et al. 1995). In Säugetieren besteht eine sehr große Homologie zwischen den verschiedenen Diaminoxidasen (Schwelberger et al. 1997). In Mäusen und Ratten ist das *AOC1*-Gen Teil eines ca. 100 Kilobasen langen DNA-Abschnitts auf Chromosom 6 bei Mäusen und Chromosom 4 bei Ratten (Lundwall et al. 2003). Dieser DNA-Abschnitt kodiert neben *AOC1* mehrere Gene, die eine hohe Homologie mit *AOC1* aufweisen. Ihre tatsächliche Funktionsfähigkeit ist allerdings teilweise fraglich. Im menschlichen Genom befindet sich im korrespondierenden Genlocus auf Chromosom 7 ausschließlich das Gen für *AOC1*, da die restlichen *AOC1*-ähnlichen Gene in der evolutionären Linie der Primaten durch Chromosomenumlagerung wahrscheinlich verloren gegangen sind (Lundwall et al. 2003). Dies könnte auf eine besondere Relevanz des *AOC1*-Gens im menschlichen Organismus hinweisen.

4.1 Die *AOC1*-Expression steht unter der transkriptionellen Kontrolle von WT1

In dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob das *AOC1*-Gen durch den Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor (WT1) reguliert wird. Einen ersten Hinweis hierfür ergaben unveröffentlichte Microarray-Untersuchungen an M15-Zellen, die zeigten, dass ein Knockdown von WT1 zu einer Reduktion des *AOC1*-Expressionsniveaus führt. Dieses Ergebnis konnte in dieser Arbeit durch Messung der *AOC1* mRNA mittels quantitativer PCR bestätigt werden (Abb. 7). M15-Zellen, die vom Mesonephros der Maus abstammen, wurden aufgrund ihrer starken WT1-Expression für dieses Experiment gewählt. Da sowohl WT1 als auch Polyamine für die embryonale Nierenentwicklung wesentlich sind (Davies et al. 2004; Loikkanen et al. 2005), ist eine Korrelation von WT1 und *AOC1* in dieser Zelllinie von besonderer Signifikanz.

Passend zu den Ergebnissen aus M15-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der WT1(-KTS)-Variante in der humanen Osteosarkom-Zelllinie UB27 zu einer signifikanten Erhöhung des *AOC1*-mRNA-Gehaltes führt (Abb. 8). Diese Resultate deuten darauf hin, dass WT1 die Expression von *AOC1* stimuliert und

dadurch möglicherweise einen verstärkten Abbau der von AOC1 metabolisierten Substrate bewirkt.

Eine Korrelation der Expression von WT1 und AOC1 sagt allerdings nichts über eine Kausalität bzw. einen direkten Regulationsmechanismus aus. Frühere Arbeiten hatten ergeben, dass die Transkription des *ODC*-Gens, das für ein Schlüsselenzym der Polyaminsynthese kodiert, durch WT1 reguliert wird (Li et al. 1999; Moshier et al. 1996). Da die WT1(-KTS)-Variante als Transkriptionsfaktor wirksam ist (Larsson et al. 1995; Hamilton et al. 1995), lag die Vermutung nahe, dass WT1 direkt am *AOC1*-Promotor wirksam ist. Daher wurde das auf der TRANSFAC-Datenbank beruhende Programm Alibaba2.1 benutzt, um die *AOC1*-Promotorregion nach WT1-Konsensusmotiven zu durchsuchen. Eine potenzielle WT1-Bindungsstelle mit der Sequenz GGCGGGG konnte in Position -1bp bis -7bp vom Transkriptionsstart identifiziert werden (Abb. 9). Diese Sequenz ist Teil eines palindromischen E-PAL-Motivs, das auch im Promotor des epithelialen WT1-Zielgens E-Cadherin zu finden ist und bereits bei der erstmaligen Charakterisierung des proximalen *AOC1*-Promotors beschrieben wurde (Chassande et al. 1994, Behrens et al. 1991, Hosono et al. 2000). Diese Sequenz ist für die Funktion des *AOC1*-Promotors von entscheidender Bedeutung (Chassande et al. 1994).

In der Charakterisierung des Promotors durch Chassande et al. wurde für den cytosinreichen Abschnitt distal und den guaninreichen Abschnitt proximal der palindromischen Sequenz jeweils eine Specificity-Protein 1 (SP1) Bindungsstelle vorausgesagt. Bei SP1 handelt es sich um einen GC-reiche Regionen bindenden Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, der mit WT1 verwandt ist (Drummond et al. 1994).

Die Analyse des potenziellen WT1-Konsensusmotivs mit dem UCSC-Genbrowser ergab, dass es sich um eine evolutionär hochgradig konservierte Region handelt (Abb. 10). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass dieser Promotorabschnitt funktionell wichtig ist. Denn Sequenzkonservierung wird dadurch erklärt, dass schon wenige Mutationen der Sequenz einen Selektionsnachteil bedeuten würden und deshalb nicht an die nachfolgenden Generationen weiter vererbt werden (Cooper et al. 2004; Siepel et al. 2005).

Der Luciferase Reporterassay zeigt, dass die als Transkriptionsfaktor wirksame WT1(-KTS)-Variante die Aktivität des humanen *AOC1*-Promotors in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) erhöht (Abb. 11). Die Stimulation des Promotors durch WT1 war nach Mutation der oben beschriebenen WT1-Bindungsstelle nicht mehr nachweisbar (Abb. 11). Damit scheint dieser bereits als regulatorisch relevant

beschriebene Sequenzabschnitt für die Regulation des *AOC1*-Gens durch WT1 essentiell zu sein. Die Beobachtung, dass bei Mutation der entsprechenden Sequenz die Aktivität des *AOC1*-Promotors in Gegenwart von WT1(-KTS) auf das Niveau der Negativkontrolle zurückfällt (Abb. 11), könnte darauf hinweisen, dass es sich um die einzige funktionelle WT1-Bindungsstelle im *AOC1*-Promotor handelt.

Dass WT1 tatsächlich an die beschriebene *AOC1*-Promotorsequenz bindet, wurde durch den Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) und die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) nachgewiesen. Der EMSA zeigt, dass die *in vitro* Bindung von WT1 an die Konsensussequenz durch Einfügen der im Reporterassay verwendeten Mutation verhindert wird (Abb. 12). Die Tatsache, dass ein 50-facher molarer Überschuss des WT1 bindenden *Admts16*-Oligonukleotids (Jacobi et al. 2013) nicht ausreicht, um die *AOC1*-WT1-Interaktion komplett aufzuheben (Abb. 12), könnte auf eine besonders starke Bindung des WT1-Proteins an die *AOC1*-Sequenz hinweisen. Auffällig ist jedoch, dass zusätzlich zur WT1(-KTS)-Variante auch die WT1(+KTS) Isoform an die *AOC1*-Sequenz bindet. Die +KTS- und die -KTS-Varianten unterscheiden sich durch 9bp, die für die Aminosäuren Lysin, Threonin und Serin (im Einbuchstabencode KTS) codieren (Drummond et al. 1994). Diese Aminosäuren befinden sich zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger und verändern deren Abstand zueinander. Die +KTS-Variante mit dem größeren Abstand zwischen den Zinkfingern bindet schlechter an die für die -KTS-Variante ausgelegten Konsensussequenzen. Sie besitzt stattdessen eine höhere Bindungsaffinität für RNA und interagiert mit Spleißfaktoren. Diese Verteilung ist jedoch nicht absolut, sondern als Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Spleißvarianten zu sehen (Drummond et al. 1994; Larsson et al. 1995). Ob die +KTS-Variante für die Regulation der *AOC1*-Expression auch eine funktionelle Rolle spielt, bleibt mittels zellulärer Überexpression und Reporterassays zu überprüfen.

Mittels eines ChIP-Assays wurde die Bindung von WT1 an den *AOC1*-Promotor bei erhaltener Chromatinstruktur nachgewiesen (Abb. 13). Dies ist von besonderer Relevanz für die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf eine *in vivo* Situation, denn als Polykationen können Polyamine DNA binden (Thomas et al. 2003; Feuerstein et al. 1991). Sie können Veränderungen in der Sekundärstruktur der DNA bewirken und diese stabilisieren (Feuerstein et al. 1991). Möglicherweise spielen Polyamine auch in der Modulierung der Chromatinstruktur eine Rolle (Matthews 1993). Hinzukommend können Polyamine die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA regulieren

(Thomas et al. 2003). So erleichtert Spermin die Bindung von Östrogen Rezeptor Alpha an das Östrogen Response Element und verstärkt die daraus resultierende transkriptionelle Aktivierung (Shah et al. 2001). Gleichzeitig wird die Bindung des Transkriptionsfaktors OCT-1 an die DNA durch Polyamine behindert (Panagiotidis et al. 1995). Darüber hinaus werden die Transkriptionsrate der *AOC1* und der ebenfalls in den Katabolismus der Polyamine involvierte Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase durch das Polyaminlevel reguliert (Pegg 2008; Perin et al. 1986).

4.2 Bedeutung einer transkriptionellen Regulation des *AOC1*-Gens durch WT1

Die *AOC1* katalysiert die oxidative Desaminierung biogener Amine (Novotny et al. 1994) und besitzt eine große Relevanz in der Regulation des Polyaminhaushalts, indem sie den Abbau von Putrescin und damit den terminalen Polyaminkatabolismus katalysiert (Seiler 2004; Missala et al. 1980). Gleichzeitig ist *AOC1* auch für den Abbau von Histamin von Bedeutung und wirkt in Darm und Placenta im Sinne einer Histaminbarriere (Schwelberger et al. 2010; Biegański et al. 1983; Maintz et al. 2008). Es stellt sich daher die Frage, ob die Regulation der *AOC1*-Genexpression durch WT1 vornehmlich einen Effekt auf den Polyaminhaushalt, den Histaminstoffwechsel oder auf beide hat. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keine eindeutige Antwort auf diese Frage. Jedoch gibt es eine Reihe von Indizien, die darauf hinweisen, dass im Zusammenhang mit WT1 die Funktion der *AOC1* im Rahmen des Polyaminhaushalts von besonderer Relevanz ist. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass das Histamin produzierende Enzym L-Histidin Decarboxylase (HDC) erst ab dem 13. Embryonaltag exprimiert wird (Karlstedt et al. 2001), während *Wt1*-Knockout-Mäuse bereits am Embryonaltag 13,5 sterben (Kreidberg et al. 1993). Dies bedeutet, dass die frühen WT1-abhängigen embryonalen Entwicklungsschritte der Nieren, des Herzens und der Gonaden bereits zu einem Zeitpunkt erfolgen, bevor Histamin in signifikantem Ausmaß vom Embryo gebildet wird. Somit scheint die Aktivierung des *AOC1*-Gens durch WT1 während der frühen Embryonalentwicklung eher den Polyaminhaushalt als den Histaminmetabolismus zu beeinflussen. Des Weiteren wird mit der ODC ein zweites Schlüsselenzym des Polyaminstoffwechsels durch WT1 reguliert (Li et al. 1999; Moshier et al. 1996), was die Relevanz einer Aktivierung der *AOC1*-Expression durch WT1 für den Polyaminhaushalt unterstreicht. Eine vereinfachte Darstellung des

Polyaminmetabolismus und seiner transkriptionellen Regulation durch WT1 stellt Abbildung 17 dar.

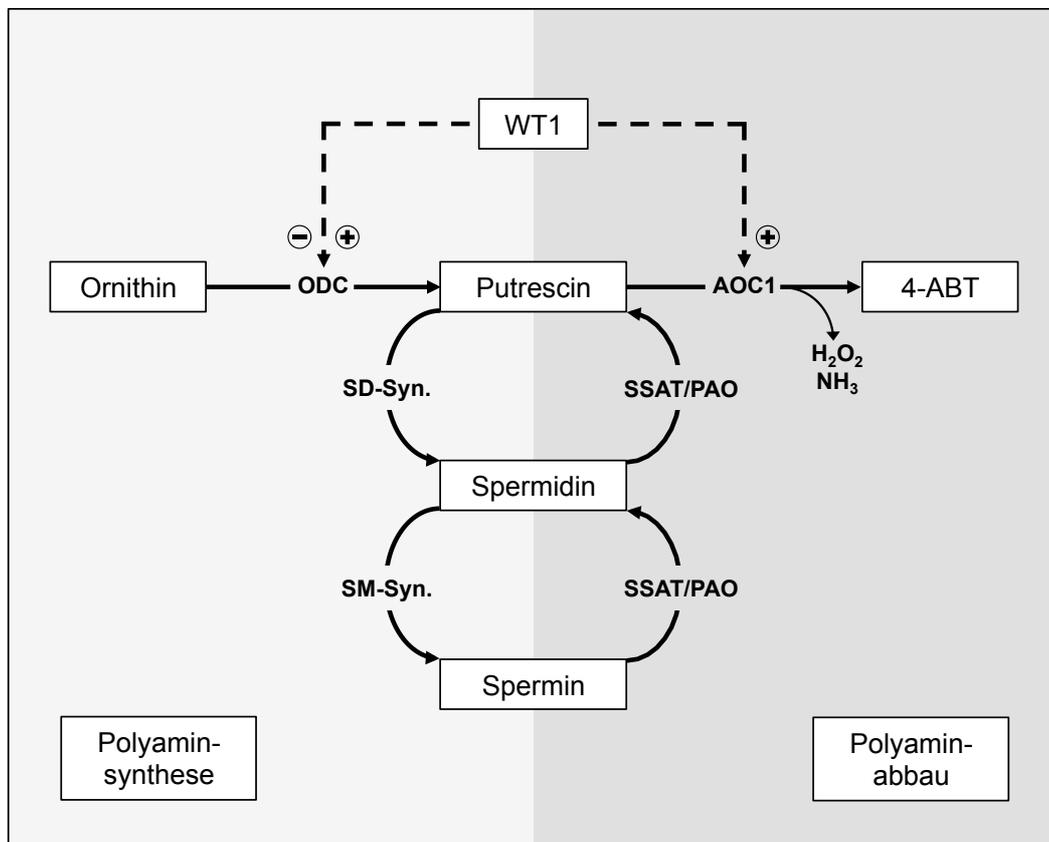


Abb.17: Vereinfachte Darstellung des Polyaminhaushalts und seiner transkriptionellen Regulation durch WT1 (Thomas et al. 2003; Moshier et al. 1996; Li et al. 1999; Kirschner et al. 2014).

WT1= Wilms-Tumor-Protein1; **ODC**= Ornithin-Decarboxylase; **AOC1**= Amine Oxidase Copper-containing 1; **4-ABT**= 4-Aminobutanal; **SD-Syn.**= Spermidinsynthase; **SM-Syn.**= Sperminsynthase; **SSAT**= N¹-Spermidin/Spermin-acetyltransferase; **PAO**= Polyaminoxidase; **durchgängige Pfeile**= enzymatische Reaktion; **gestrichelte Pfeile**= transkriptionelle Regulation; Pluszeichen symbolisieren Stimulation, Minuszeichen Inhibierung

4.2.1 Mögliche Bedeutung einer Regulation des AOC1-Gens durch WT1 in der Tumorgenese und Tumorsuppression

Im Zellkultur- und Tiermodell erwies sich eine gesteigerte Putrescinsynthese infolge verstärkter ODC-Expression als kanzerogen. Diese Wirkung konnte durch eine Blockierung der ODC aufgehoben bzw. rückgängig gemacht werden (Auvinen et al. 1997; Soda 2011; Tabib et al. 1998; Peralta-Soler et al. 1998; Shantz et al. 2007). Moshier et al. und Li et al. berichteten, dass WT1 in verschiedenen Zelllinien die Aktivität des ODC-Promotors senkt (Li et al. 1999; Moshier et al. 1996). Als Folge dieser Wirkung ist eine verminderte zelluläre Putrescinsynthese zu erwarten. In der hier

vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass WT1 die Transkription des *AOC1*-Gens stimuliert und dadurch möglicherweise den Abbau von Putrescin fördert (Abb. 17). Es erscheint deshalb plausibel, dass der Tumor suppressierende Effekt von WT1 zumindest teilweise auf eine gesteigerte Putrescindegradation aufgrund der Expression von *AOC1* zurückzuführen ist. Interessanterweise wurden im Blut von Kindern mit Wilms-Tumor, in dessen Pathogenese ein Verlust der *WT1*-Tumorsuppressorfunktion eine zentrale Rolle spielt, signifikant erhöhte Polyaminkonzentrationen festgestellt (Balitskaia et al. 1992). Es lässt sich spekulieren, dass die Erhöhung der Polyamine eventuell auf einen Verlust der regulierenden Funktion des WT1 auf den Polyaminmetabolismus zurückzuführen ist.

Zusätzlich zu einer Senkung der Putrescinspiegel sind noch weitere mögliche Konsequenzen einer *AOC1*-Regulation durch WT1 in Betracht zu ziehen. Beim Putrescinabbau durch *AOC1* werden die zelltoxischen Metabolite H_2O_2 , NH_3 und ein Aldehyd produziert. Diese Abbauprodukte können unabhängig von Veränderungen im Polyaminspiegel wichtige Zellfunktionen, z. B. Proliferation, Apoptose und Differenzierung, negativ beeinflussen (Thomas et al. 2003; Seiler 2004; Mizuguchi et al. 1994; Novotny et al. 1994). Grundsätzlich kann somit eine gesteigerte *AOC1*-Aktivität auch aufgrund dieser Nebeneffekte kanzerogene Wirkungen haben. In manchen Karzinomen ist tatsächlich eine erhöhte Expression der *AOC1* zu finden (Ippolito et al. 2006; Sessa et al. 1990), die häufig mit einer gesteigerten ODC-Expression assoziiert ist (Sessa et al. 1990; Seiler 2004). Sessa et al. postulierte, dass die *AOC1* in chemisch induzierten Leberkarzinomen entweder reaktiv auf eine verstärkte Produktion von Putrescin erhöht sein könnte, oder dass sie selbst zur verstärkten Aktivität der ODC und damit des Polyaminsatzes beitrage, indem sie die Produktinhibierung der ODC durch Putrescin verhindere (Sessa et al. 1990). Ein ähnliches Phänomen ist von Tucker et al. beschrieben, die eine transgene Überexpression der Spermidine/Spermine-N1-Acetyltransferase (*SSAT*) (Abb. 17) in einem etablierten Maus-Darntumormodell untersuchten. Die Überexpression der *SSAT* verursachte vermehrt Darntumoren (Tucker et al. 2005). Als Ursache wird eine aufgrund des gesteigerten Polyaminkatabolismus reaktiv erhöhte ODC-Aktivität und damit Polyaminbiosynthese vermutet. Dies resultiert in einem verstärkten Umsatz durch den Polyamininterkonversionszyklus ohne Veränderung der Spermidin- und Sperminkonzentrationen. Die kanzerogene Wirkung der Überexpression der *SSAT* in dem von Tucker et al. verwendeten Mausmodell wurde auf diesen erhöhten Umsatz

und den dadurch gesteigerten Verbrauch von Acetyl-CoA, ATP sowie das Anfallen toxischer Stoffe wie H_2O_2 und Aldehyde zurückgeführt (Tucker et al. 2005; Jänne et al. 2006). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für ODC und AOC1 vorstellbar, denn eine Erhöhung der AOC1 könnte zu einer reaktiven Steigerung der ODC führen bzw. umgekehrt. Dies hätte einen erhöhten Putrescinumsatz mit Akkumulation toxischer Metabolite zur Folge (Abb. 17).

Auch ein Zusammenhang mit der Regulation durch WT1 wäre in diesem Kontext denkbar. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Regulation der ODC Genexpression durch WT1 vom zellulären Kontext abhängig ist (Moshier et al. 1996; Kirschner et al. 2014). Demnach bewirkt WT1 in einigen Zelltypen eine Aktivierung anstelle der üblichen Inhibierung der ODC. Somit könnte WT1 in manchen Situationen den Putrescinumsatz durch gleichzeitige Stimulation der Putrescinproduktion via ODC und des Putrescinabbaus via AOC1 steigern, und dadurch über die oben beschriebenen Mechanismen einen kanzerogenen Effekt ausüben. Tatsächlich wurde in Tumoren unterschiedlicher Gewebe eine erhöhte WT1-Expression festgestellt (Bejrananda et al. 2011; Miyoshi et al. 2002; Sera et al. 2008; Cilloni et al. 2004). Dies hat zu der Auffassung geführt, dass WT1 neben seiner Eigenschaft als Tumorsuppressor auch ein onkogenes Potenzial besitzt. Möglicherweise bieten die weitestgehend ungeklärten, kontextabhängig teils kanzerogenen, teils tumorprotektiven Eigenschaften der AOC1 eine Erklärung für die Dichotomie des WT1 als Tumorsuppressor- bzw. Protoonkogen.

4.2.2 Mögliche Bedeutung einer Regulation des AOC1-Gens durch WT1 während der Embryonalentwicklung

Während der Embryonalentwicklung erfolgt die Differenzierung von Zellen zu spezialisierten Geweben. Dabei kommt es in manchen Organen, z. B. den Nierenanlagen, zur Ausbildung eines Epithels aus dem undifferenzierten Mesenchym. Dieser Vorgang wird als mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet. Auch der Umkehrprozess, die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ist für die Entwicklung mancher Organe, z. B. des Herzens, notwendig. Mittels EMT wird eine Population undifferenzierter, mesenchymaler Zellen generiert, die in unterschiedliche Richtungen differenzieren können. Sowohl Polyamine als auch WT1 spielen bei MET bzw. EMT während der Embryonalentwicklung eine Rolle (Hohenstein et al. 2006; Gritti-

Linde et al. 2001; Moore et al. 1999; Loikkanen et al. 2005), indem sie die Expression von Proteinen mit einer Funktion während der EMT bzw. MET, wie z. B. E-Cadherin, Snai1 oder Pax-2, beeinflussen (Kreidberg et al. 1993; Wagner et al. 2005; Martínez-Estrada et al. 2010; Loikkanen et al. 2005; Prunotto et al. 2010; Compagnone et al. 2012).

Die Niere entwickelt sich, indem die aus dem Ductus mesonephricus auswachsende Ureterknospe in das metanephrische Blastem eindringt und sich dort verästelt. Diese Verästelung erfordert Signale aus dem umliegenden metanephrischen Blastem. Die in das umgebende Mesenchym einwachsende Harnleiterknospe produziert ihrerseits Signale, die eine MET im metanephrischen Blastem auslösen und zur Ausbildung der Nephrone führen. Die verästelte Ureterknospe bildet das Harnsammelsystem der Niere (Kreidberg et al. 1993, Davies et al. 2004). WT1 wird während dieser Prozesse ausschließlich im kondensierenden Mesenchym, nicht jedoch in der Ureterknospe exprimiert, und ist für die Aussprossung der Harnleiterknospe sowie die Differenzierung der Nephrone aus dem umliegenden Mesenchym durch MET notwendig (Davies et al. 2004). In *Wt1*-Knockout-Embryonen bleibt die Sprossung der Ureterknospe aus und es erfolgt eine Apoptose des umgebenden metanephrischen Blastems (Kreidberg et al. 1993). Davies et al. führten mittels Transfektion von siRNA zu verschiedenen Zeitpunkten einen *Wt1*-Knockdown an murinen embryonalen Nierenorgankulturen durch. Sie konnten auf diese Weise zeigen, dass *Wt1*-Knockdown zum Entwicklungszeitpunkt E11 die Differenzierung des Mesenchyms zu Nephronen verhindert und stattdessen zur Proliferation des Mesenchyms führt. Das Phänomen einer gesteigerten mesenchymalen Zellproliferation ist auch in Wilms-Tumoren zu beobachten. WT1 scheint demnach während verschiedener Stadien der Nierenentwicklung unterschiedliche Funktionen zu haben (Davies et al. 2004).

ODC, das Schlüsselenzym für die Putrescinsynthese, wird gemeinsam mit WT1 im metanephrischen Mesenchym exprimiert. Darüber hinaus konnte ODC-Aktivität auch in der Harnleiterknospe nachgewiesen werden, die kein WT1 enthält (Loikkanen et al. 2005). Loikkanen et al. zeigten, dass die Behandlung von murinen embryonalen Nierenorgankulturen mit dem ODC Inhibitor DFMO (ab dem Zeitpunkt E11) zu einer geringeren Nierengröße, reduzierten Anzahl an Ureterknospenverästelungen und einer Verzögerung der Nephronbildung führt. Weitere Genexpressionsanalysen ergaben, dass die ODC ebenso wie WT1 in Prozesse der MET während der Nierenentwicklung involviert ist (Loikkanen et al. 2005).

In der 2014 erschienenen Studie von Kirschner et al., in welcher auch Ergebnisse aus dieser Arbeit veröffentlicht sind, wurde der Zusammenhang von WT1 und Polyaminen während der Nierenentwicklung genauer untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass ein WT1-Knockdown zu den Zeitpunkten E11,5, E12,5 und E13,5 die AOC1-Expression in murinen embryonalen Nierenorgankulturen hemmt. Gleichzeitig führte der WT1-Knockdown zu einer Reduktion der *Odc*-mRNA. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass WT1 während der Nierenentwicklung einen stimulierenden Effekt auf die AOC1- und die ODC-Expression hat (Kirschner et al. 2014). Dies unterstreicht die Komplexität der Regulation des Polyaminhaushalts durch WT1 und dokumentiert, dass WT1 je nach Zelltyp unterschiedliche regulatorische Effekte auf den Polyaminmetabolismus besitzt (Abb. 17).

Für die normale Nierenentwicklung scheint ein ausgeglichener Polyaminspiegel von Bedeutung zu sein. Passend zu den Ergebnissen von Loikkanen et al. konnten Kirschner und MitarbeiterInnen zeigen, dass eine Hemmung der AOC1, und damit des Putrescinabbaus, zum Zeitpunkt E11,5 eine Zunahme der Ureterverästelungen bewirkt. In einem späteren Entwicklungsstadium (13,5) verursachte allerdings sowohl eine Hemmung der AOC1 als auch die externe Gabe von Putrescin eine Reduktion der Ureterverästelungen. Diese zeitpunktabhängigen Unterschiede in der Polyaminwirkung lassen sich möglicherweise auf einen variablen Polyaminbedarf während verschiedener Entwicklungsphasen der Niere zurückführen. So ist es denkbar, dass während früher Stadien, in denen vorwiegend zelluläre Proliferationsprozesse erfolgen, ein höherer Bedarf an Polyaminen besteht als zu späteren Phasen, in denen hauptsächlich Differenzierungsvorgänge ablaufen (Kirschner et al. 2014). Die Zugabe von AOC1 zu den Nierenorgankulturen führte interessanterweise ebenfalls zu einer Reduktion der Ureterverästelungen. Dieser Effekt wurde durch zusätzliche Gabe von Putrescin verstärkt und erst bei gleichzeitiger Gabe von AOC1 und dem Radikalfänger Vitamin C kam es zu einer verstärkten Ureterverästelung zum Zeitpunkt 13,5. Dies zeigt, dass eine erhöhte Expression bzw. Aktivität der AOC1 und die dadurch verstärkte H_2O_2 -Produktion einen ungünstigen Einfluss auf die Nierenentwicklung besitzt. Damit wird erneut die Notwendigkeit für eine stabile Regulation des Polyaminhaushalts unterstrichen (Kirschner et al. 2014).

Eine Regulation der AOC1-Expression durch WT1 wurde auch in murinen Organkulturen der embryonalen Gonaden nachgewiesen (Kirschner et al. 2014). Sowohl Polyamine als auch WT1 spielen in der Gonadenentwicklung eine wichtige

Rolle. Es erscheint deshalb plausibel, dass WT1 die Expression der *AOC1* in Gonadenanlagen reguliert (Kirschner et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im embryonalen Herzen die *AOC1*-Expression durch WT1 kontrolliert wird. In *Wt1*-Knockout-Mäusen wird die *AOC1* mRNA im Vergleich zu Wildtyp und *Wt1*-heterozygoten Embryonen deutlich schwächer exprimiert (s. Abb. 14). *Wt1*-Knockout-Embryonen sterben aufgrund von Herzfehlern ab Embryonaltag E13 (Kreidberg et al. 1993). *Wt1*-Knockout in der Maus verursacht Epikarddefekte, eine fehlerhafte Entwicklung der Koronargefäße sowie eine Myokardhypoplasie (Moore et al. 1999; Kreidberg et al. 1993; von Gise et al. 2011). WT1 wird im murinen Herzen ab dem Embryonaltag E9 in epikardialen Vorläuferzellen exprimiert und ist für die normale Ausbildung des Epikards notwendig.

Während der Herzentwicklung durchlaufen epitheliale Epikardzellen eine EMT und sammeln sich subepikardial als Mesenchymzellen an. Die Bildung dieser mesenchymalen Zellen durch EMT fehlt in WT1-defizienten Mäusen nahezu vollständig (Moore et al. 1999; von Gise et al. 2011; Martínez-Estrada et al. 2010). Im weiteren Entwicklungsverlauf wandern WT1-positive Mesenchymzellen in das Myokard ein und differenzieren dort zu glatten Gefäßmuskelzellen, interstitiellen Fibroblasten und nach neueren Erkenntnissen auch zu Kardiomyozyten (Zhou et al. 2008; von Gise et al. 2011; Mikawa et al. 1996; Dettman et al. 1998). Mit der endgültigen Differenzierung endet die WT1-Expression in diesen Zellen (Moore et al. 1999).

Auch Polyamine spielen in der Entwicklung des Herzens eine wichtige Rolle. So wiesen die Jungtiere von Ratten, denen während der Tragzeit der ODC-Inhibitor DFMO verabreicht wurde, ein signifikant geringeres Herzgewicht auf als die Kontrolltiere (Slotkin et al. 1983). Die ODC ist bereits ab Embryonaltag E8 in der kardiogenen Platte nachweisbar und wird ausschließlich im Endo- und Myokard exprimiert (Gritli-Linde et al. 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass *AOC1* und WT1 in den Zellen des embryonalen Epikards koexprimiert sind (Abb. 16). Weiterhin bewirkte ein Knockdown von WT1 in murinen embryonalen Epikardkulturen eine signifikante Reduktion des *Aoc1*-mRNA-Gehalts (Abb. 15). Dieses Resultat zeigt, dass die *AOC1*-Expression im embryonalen Epikard von WT1 abhängig ist. Auf den ersten Blick mag es verwunderlich sein, dass das Putrescin abbauende Enzym *AOC1* im Epikard exprimiert wird, während das für die Putrescinproduktion relevante Enzym ODC ausschließlich im Endo- und Myokard vorkommt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Polyamine zwischen dem

Intra- und Extrazellulärraum ausgetauscht werden können, und damit die vom Endo- und Myokard produzierten Polyamine sehr wohl einen Effekt auf das Epikard haben können (Gritli-Linde et al. 2001; Abdulhusein et al. 2014). Angesichts der Verteilung der ODC-Expression ist es denkbar, dass in der Embryonalphase Endo- und Myokard einen höheren Polyaminbedarf aufweisen als das Epikard. Folgt man diesem Gedanken, so ist es vorstellbar, dass die WT1-abhängige Expression der AOC1 im Epikard die vom Endo- und Myokard produzierten Polyamine abbaut und dadurch ein für das Epikard günstiges Polyaminangebot aufrechterhält.

Polyamine spielen insbesondere während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Epithel und Mesenchym (Gritli-Linde et al. 2001; Loikkanen et al. 2005). Polyamindepletion mittels DFMO begünstigt in MDCK-Zellen eine EMT (Compagnone et al. 2012; Prunotto et al. 2010). Weiterhin verhinderte externe Gabe von Polyaminen die EMT und versetzte MDCK-Zellen zurück in einen epithelialen Zustand (Compagnone et al. 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass Polyamine auch im Herzen Differenzierungsprozesse beeinflussen. Muscari et al. wiesen nach, dass Polyamindepletion die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Kokulturen mit adulten Kardiomyozyten signifikant verbessert (Muscari et al. 2008). Wie oben beschrieben, durchlaufen Zellen des Epikards während der Herzentwicklung WT1-abhängig eine EMT, um anschließend im Myokard glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten zu bilden (Zhou et al. 2008; von Gise et al. 2011; Mikawa et al. 1996; Dettman et al. 1998). Somit liegt die Vermutung nahe, dass WT1 über die Expression der AOC1 die Polyaminkonzentration im Epikard auf ein für die EMT günstiges Niveau begrenzt.

4.3 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Amine Oxidase copper-containing 1 (AOC1) durch den Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor (WT1) transkriptionell reguliert wird. WT1 bindet an eine konservierte Region im proximalen AOC1-Promotor und stimuliert die Expression des AOC1-Gens in verschiedenen Zelllinien. Hinweise aus der Literatur lassen darauf schließen, dass die Regulation der AOC1-Expression durch WT1 für den Polyaminstoffwechsel von Bedeutung ist. In zukünftigen funktionellen Untersuchungen sollte ermittelt werden, inwieweit eine Überexpression bzw. ein Knockdown von WT1 die Polyaminspiegel sowie die Konzentration der von

AOC1 produzierten Abbauprodukte in verschiedenen Geweben verändert. Da es sich bei der AOC1 wahrscheinlich um ein sezerniertes Protein handelt und die Polyamine zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum ausgetauscht werden, wäre es ebenfalls interessant zu ermitteln, in welchem Kompartiment diese Veränderungen vornehmlich auftreten.

Es wurden mehrere Mechanismen diskutiert, über die eine Regulation des *AOC1*-Gens und damit des Polyaminhaushalts durch WT1 im Zusammenhang mit Tumoren von Relevanz sein könnte. Veränderungen des Polyaminmetabolismus und der WT1-Expression sind teilweise in den gleichen Karzinomentitäten beschrieben. Allerdings existieren bislang keine Untersuchungen, die eine Kolo-kalisation von WT1 mit Enzymen des Polyaminstoffwechsels in Tumoren nachweisen. Weiterhin ist es von großer Bedeutung, die Polyaminkonzentrationen, die Abbauprodukte der AOC1 sowie die genaue regulatorische Wirkung des WT1 auf die AOC1 und ODC zu analysieren. Dadurch können neue Erkenntnisse über die zelltypabhängigen Unterschiede in der Regulation des Polyaminhaushalts durch WT1 sowie deren Bedeutung für die Tumorgenese gewonnen werden. Wegen der Verfügbarkeit von Pharmaka, die den Polyaminstoffwechsel beeinflussen, kann ein genaueres Verständnis der Polyaminregulation durch WT1 in Karzinomen auch zu therapeutisch relevanten Erkenntnissen führen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass während der Embryonalentwicklung des Herzens die AOC1 im Epikard durch WT1 reguliert wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dieser Mechanismus für eine Abschirmung des Epikards vor der Polyaminproduktion durch das Endo- und Myokard relevant ist und die epithelial-mesenchymale Transition epikardialer Vorläuferzellen begünstigt. Weitere Untersuchungen, z. B. mittels eines *Aoc1*-Knockout bzw. einer Überexpression, sind geeignet, um diese Hypothese zu überprüfen.

WT1, AOC1 und Polyamine scheinen insbesondere im Rahmen von ischämischen Prozessen des Herzens eine wichtige Rolle zu spielen. Der Polyaminhaushalt wird durch myokardiale Ischämie aktiviert. *In vitro* Untersuchungen an einer Myokardzelllinie haben ergeben, dass es unter simulierten ischämischen Bedingungen zu einer Induktion der ODC, einer verstärkten Produktion von Putrescin und dadurch zu einer verstärkten Apoptose kommt. Der programmierte Zelltod konnte durch Hemmung der ODC verhindert werden (Tantini et al. 2006). In Ischämie-Reperusionsversuchen an Ratten wurde ebenfalls eine Aktivierung der ODC sowie der Polyamin abbauenden

SSAT festgestellt (Han et al. 2009). Ischämie-Präkonditionierung erhöht die ODC-Aktivität im Rattenmyokard und hat einen kardioprotektiven Effekt, der durch Hemmung der ODC während der Präkonditionierung aufgehoben wurde (Zhang et al. 2014; Zhao et al. 2009). Nach Myokardischämie wird WT1 im Gefäßendothel des Infarkttrandbereichs hochreguliert (Wagner et al. 2005; Duim et al. 2015). Es wäre deshalb von Interesse zu untersuchen, ob die Regulation des *AOC1*-Gens durch WT1 Einfluss auf den Polyamingehalt im Infarktgewebe und damit eventuell eine Relevanz für Apoptose- und Präkonditionierungsprozesse hat.

In diesem Zusammenhang sind auch vertiefende Einblicke in die Bedeutung der WT1-induzierten *AOC1*-Expression während der Embryonalentwicklung notwendig. Neuere Forschungsarbeiten haben ergeben, dass ischämische Schädigung ein embryonales Genexpressionsprofil im Epikard aktiviert. Dabei kam es im Infarktbereich zu einer Reaktivierung der WT1-Expression im Epikard und dadurch zur Bildung von mesenchymalen Vorläuferzellen, die in Fibroblasten, Myofibroblasten, Koronarendothelzellen und Myokardzellen differenzieren können (van Wijk et al. 2012; Smart et al. 2011; Limana et al. 2010). Angesichts des hohen Nutzens, den weitere Erkenntnisse im Bereich der Kardioregeneration haben, sollte der Zusammenhang zwischen WT1, Polyaminen und *AOC1* in diesem Kontext weiter untersucht werden.

5. Literaturverzeichnis

Abdulhussein AA, Wallace HM. Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids* **2014**;46(3):655–60.

Auvinen M1, Laine A, Paasinen-Sohns A, et al. Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer Res* **1997**;57(14):3016-25.

Babbar N, Murray-Stewart T, Casero RA Jr. Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly. *Biochem Soc Trans* **2007**;35(Pt 2):300-4.

Balitskaia OV, Berdinskikh NK, Kononenko NG. The possibilities of using the free polyamines of the peripheral blood as biochemical tumor markers in nephroblastoma in children. *Vopr Onkol* **1992**;38(6):674-82.

Barbry P, Chassande O, Vigne P, et al. Purification and subunit structure of the [3H]phenamil receptor associated with the renal apical Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**;84(14):4836-40.

Barbry P, Champe M, Chassande O, et al. Human kidney amiloride-binding protein: cDNA structure and functional expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**;87(19):7347-51.

Behrens J, Löwrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88(24):11495-9.

Bejrananda T, Phukaoloun M, Boonpipattanapong T, et al. WT1 expression as an independent marker of poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Biomark* **2010-2011**;8(1):35-42.

Biegański T, Kusche J, Lorenz W, Hesterberg R, Stahlknecht CD, Feussner KD. Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochim Biophys Acta* **1983**;756(2):196-203.

Chassande O, Renard S, Barbry P, Lazdunski M. The human gene for diamine oxidase, an amiloride binding protein. Molecular cloning, sequencing, and characterization of the promoter. *J Biol Chem* **1994**;269(20):14484-9.

Chayen R, Goldberg S, Burke M. Excretion of polyamines by humans following inhibition of diamine oxidase. *Isr J Med Sci* **1985**;21(6):543-5.

Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* **2004**;112(1-2):79-84.

Compagnone A, Bandino A, Meli F, et al. Polyamines modulate epithelial-to-mesenchymal transition. *Amino Acids* **2012**;42(2-3):783-9.

Cooper GM, Brudno M, Stone EA, Dubchak I, Batzoglou S, Sidow A. Characterization of evolutionary rates and constraints in three Mammalian genomes. *Genome Res* **2004**;14(4):539-48.

D'Agostino L, Daniele B, Pignata S, et al. Ornithine decarboxylase and diamine oxidase in human colon carcinoma cell line CaCo-2 in culture. *Gastroenterology* **1989**;97(4):888-94.

Davies JA, Ladomery M, Hohenstein P, et al. Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum Mol Genet* **2004**;13(2):235-46.

Dettman RW, Denetclaw W Jr, Ordahl CP, Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* **1998**;193(2):169-81.

Drummond IA, Rupprecht HD, Rohwer-Nutter P, et al. DNA recognition by splicing variants of the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Mol Cell Biol* **1994**;14(6):3800-9.

Duim SN, Kurakula K, Goumans MJ, Kruithof BP. Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1: Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol* **2015**;81:127-35

Englert C, Hou X, Maheswaran S, et al. WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J* **1995**;14(19):4662-75.

Erdman SH, Park JH, Thompson JS, Grandjean CJ, Hart MH, Vanderhoof JA. Suppression of diamine oxidase activity enhances postresection ileal proliferation in the rat. *Gastroenterology* **1989**;96(6):1533-8.

Feuerstein BG, Williams LD, Basu HS, Marton LJ. Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *J Cell Biochem* **1991**;46(1):37-47.

Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* **2004**;4(10):781-92.

Gessler M, König A, Bruns GA. The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* **1992**;12(4):807-13.

Gilmour SK. Polyamines and nonmelanoma skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **2007**;224(3):249-56.

von Gise A, Zhou B, Honor LB, Ma Q, Petryk A, Pu WT. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol* **2011**;356(2):421-31.

Gritli-Linde A, Nilsson J, Bohlooly-Y M, Heby O, Linde A. Nuclear translocation of antizyme and expression of ornithine decarboxylase and antizyme are developmentally regulated. *Dev Dyn* **2001**;220(3):259-75.

Gupta S, Ahmad N, Marengo SR, MacLennan GT, Greenberg NM, Mukhtar H. Chemoprevention of prostate carcinogenesis by alpha-difluoromethylornithine in TRAMP mice. *Cancer Res* **2000**;60(18):5125-33.

Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**;88(21):9618-22.

Hamilton TB, Barilla KC, Romaniuk PJ. High affinity binding sites for the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Nucleic Acids Res* **1995**;23(2):277-84.

Han L, Xu C, Guo Y, Li H, Jiang C, Zhao Y. Polyamine metabolism in rat myocardial ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol* **2009**;132(1):142-4.

Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development. *Annu Rev Genet* **1994**;28:523-58.

Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* **2006**;15 Spec No 2:196-201.

Hosono S, Gross I, English MA, Hajra KM, Fearon ER, Licht JD. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* **2000**;275(15):10943-53.

Ippolito JE, Merritt ME, Bäckhed F, et al. Linkage between cellular communications, energy utilization, and proliferation in metastatic neuroendocrine cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**;103(33):12505-10.

Jacobi CL, Rudigier LJ, Scholz H, Kirschner KM. Transcriptional regulation by the Wilms tumor protein, Wt1, suggests a role of the metalloproteinase Adamts16 in murine genitourinary development. *J Biol Chem* **2013**;288(26):18811-24.

Jänne J, Alhonen L, Pietilä M, et al. Genetic manipulation of polyamine catabolism in rodents. *J Biochem* **2006**;139(2):155-60.

Karlstedt K, Nissinen M, Michelsen KA, Panula P. Multiple sites of L-histidine decarboxylase expression in mouse suggest novel developmental functions for histamine. *Dev Dyn* **2001**;221(1):81-91.

Kent WJ. BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* **2002**;12(4):656-64.

Kent WJ, **Sugnet CW**, Furey TS, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. **2002**;12(6):996-1006.

Kirschner KM, Braun JF, Jacobi CL, Rudigier LJ, Persson AB, Scholz H. Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development. *J Biol Chem* **2014**;289(35):24452-62.

Klattig J, Sierig R, Kruspe D, Besenbeck B, Englert C. Wilms' tumor protein Wt1 is an activator of the anti-Müllerian hormone receptor gene Amhr2. *Mol Cell Biol* **2007**;27(12):4355-64.

Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* **1993**;74(4):679-91.

Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **2008**;228(3):367-81.

Kusche J, Menningen R, Leisten L, Krakamp B. Large bowel tumor promotion by diamine oxidase inhibition: animal model and clinical aspects. *Adv Exp Med Biol* **1988**;250:745-52.

Laity JH, Dyson HJ, Wright PE. Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**;97(22):11932-5.

Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, et al. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* **1995**;81(3):391-401.

Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res* **2001**;264(1):74-99.

Lefèvre PL, Palin MF, Murphy BD. Polyamines on the reproductive landscape. *Endocr Rev* **2011**;32(5):694-712.

Li RS, Law GL, Seifert RA, Romaniuk PJ, Morris DR. Ornithine decarboxylase is a transcriptional target of tumor suppressor WT1. *Exp Cell Res* **1999**;247(1):257-66.

Liang XH, Zhao ZA, Deng WB, et al. Estrogen regulates amiloride-binding protein 1 through CCAAT/enhancer-binding protein-beta in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Endocrinology* **2010**;151(10):5007-16.

Limana F, Bertolami C, Mangoni A, et al. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol* **2010**;48(4):609-18.

Lingueglia E, Renard S, Voilley N, et al. Molecular cloning and functional expression of different molecular forms of rat amiloride-binding proteins. *Eur J Biochem* **1993**;216(2):679-87.

Loikkanen I, Lin Y, Railo A, Pajunen A, Vainio S. Polyamines are involved in murine kidney development controlling expression of c-ret, E-cadherin, and Pax2/8 genes. *Differentiation* **2005**;73(6):303-12.

Lundwall A, Malm J, Clauss A, Valtonen-Andre C, Olsson AY. Molecular cloning of complementary DNA encoding mouse seminal vesicle-secreted protein SVS I and demonstration of homology with copper amine oxidases. *Biol Reprod* **2003**;69(6):1923-30.

Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, van der Ven K, Novak N. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review. *Hum Reprod Update* **2008**;14(5):485-95.

Manni A, Grove R, Kunselman S, Aldaz CM. Involvement of the polyamine pathway in breast cancer progression. *Cancer Lett* **1995**;92(1):49-57.

Martínez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* **2010**;42(1):89-93.

Matthews HR. Polyamines, chromatin structure and transcription. *Bioessays* **1993**;15(8):561-6.

Mennigen R, Kusche J, Krakamp B, et al. Large bowel tumors and diamine oxidase (DAO) activity in patients: a new approach for risk group identification. *Agents Actions* **1988**;23(3-4):351-3.

Michos O. Kidney development: from ureteric bud formation to branching morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **2009**;19(5):484-90.

Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* **1996**;174(2):221-32.

Miller-Hodges E, Hohenstein P. WT1 in disease: shifting the epithelial-mesenchymal balance. *J Pathol* **2012**;226(2):229-40.

Missala K, Sourkes TL. Putrescine catabolism in rats given heparin or aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* **1980**;64(4):307-11.

Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, et al. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2002**;8(5):1167-71.

Mizuguchi H, Imamura I, Takemura M, Fukui H. Purification and characterization of diamine oxidase (histaminase) from rat small intestine. *J Biochem* **1994**;116(3):631-5.

Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* **2005**;24(2):184-97.

Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* **1999**;126(9):1845-57.

Morel F, Surla A, Vignais PV. Purification of human placenta diamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**;187(1):178-86.

Moshier JA, Dosesco J, Skunca M, Luk GD. Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression. *Cancer Res* **1993**;53(11):2618-22.

Moshier JA, Skunca M, Wu W, Boppana SM, Rauscher FJ 3rd, Dosesco J. Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res* **1996**;24(6):1149-57.

Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* **1993**;119(4):1329-41.

Muscari C, Bonafé F, Carboni M, et al. Difluoromethylornithine stimulates early cardiac commitment of mesenchymal stem cells in a model of mixed culture with cardiomyocytes. *J Cell Biochem* **2008**;103(4):1046-52.

Novotny WF, Chassande O, Baker M, Lazdunski M, Barbry P. Diamine oxidase is the amiloride-binding protein and is inhibited by amiloride analogues. *J Biol Chem* **1994**;269(13):9921-5.

Nowotarski SL, Woster PM, Casero RA Jr. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev Mol Med* **2013**;15:e3.

Panagiotidis CA, Artandi S, Calame K, Silverstein SJ. Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* **1995**;23(10):1800-9.

Pegg AE. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2008**;294(6):E995-1010.

Pendeville H, Carpino N, Marine JC, et al. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol* **2001**;21(19):6549-58.

Peralta Soler A, Gilliard G, Megosh L, George K, O'Brien TG. Polyamines regulate expression of the neoplastic phenotype in mouse skin. *Cancer Res* **1998**;58(8):1654-9.

Perin A, Sessa A, Desiderio MA. Response of tissue diamine oxidase activity to polyamine administration. *Biochem J* **1986**;234(1):119-23.

Prunotto M, Compagnone A, Bruschi M, et al. Endocellular polyamine availability modulates epithelial-to-mesenchymal transition and unfolded protein response in MDCK cells. *Lab Invest* **2010**;90(6):929-39.

Scholz H, Kirschner KM. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)* **2005**;20:54-9.

Schwelberger HG, Bodner E. Purification and characterization of diamine oxidase from porcine kidney and intestine. *Biochim Biophys Acta* **1997**;1340(1):152-64.

Schwelberger HG. Histamine intolerance: a metabolic disease? *Inflamm Res* **2010**;59 Suppl 2:S219-21.

Seiler N. Catabolism of polyamines. *Amino Acids* **2004**;26(3):217-33.

Sera T, Hiasa Y, Mashiba T, et al. Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Eur J Cancer* **2008**;44(4):600-8.

Sessa A, Desiderio MA, Perin A. Diamine oxidase activity induction in regenerating rat liver. *Biochim Biophys Acta* **1982**;698(1):11-4.

Sessa A, Desiderio MA, Perin A. Diamine oxidase activity in a model of multistep hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett* **1990**;51(1):75-8.

Sessa A, Perin A. Diamine oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism. *Agents Actions* **1994**;43(1-2):69-77.

Shah N, Thomas TJ, Lewis JS, et al. Regulation of estrogenic and nuclear factor kappa B functions by polyamines and their role in polyamine analog-induced apoptosis of breast cancer cells. *Oncogene* **2001**;20(14):1715-29.

Shantz LM, Levin VA. Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino Acids* **2007**;33(2):213-23.

Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* **2005**;15(8):1034-50.

Slotkin TA, Seidler FJ, Whitmore WL, et al. Critical periods for the role of ornithine decarboxylase and the polyamines in growth and development of the rat: Effects of exposure to α -difluoromethylornithine during discrete prenatal or postnatal intervals. *Int J Dev Neurosci* **1983**;1(2):113-27.

Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* **2011**;474(7353):640-4.

Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res* **2011**;30:95.

Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol* **2001**;73(2):177-87.

Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol* **2010**;40(5):377-87.

Sunkara PS, Ramakrishna S, Nishioka K, Rao PN. The relationship between levels and rates of synthesis of polyamines during mammalian cell cycle. *Life Sci* **1981**;28(13):1497-506.

Tabib A, Bachrach U. Polyamines induce malignant transformation in cultured NIH 3T3 fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* **1998**;30(1):135-46.

Tabor H, Tabor CW. Spermidine, Spermine and related amines. *Pharmacol Rev* **1964**;16:245-300.

Tantini B, Fiumana E, Cetrullo S, et al. Involvement of polyamines in apoptosis of cardiac myoblasts in a model of simulated ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **2006**;40(6):775-82.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**;7(2):131-42.

Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* **2003**;7(2):113-26.

Tippling AJ, McPherson MJ. Cloning and molecular analysis of the pea seedling copper amine oxidase. *J Biol Chem* **1995**;270(28):16939-46.

Tucker JM, Murphy JT, Kisiel N, et al. Potent modulation of intestinal tumorigenesis in *Apcmin/+* mice by the polyamine catabolic enzyme spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *Cancer Res* **2005**;65(12):5390-8.

Upp JR Jr, Saydjari R, Townsend CM Jr, Singh P, Barranco SC, Thompson JC. Polyamine levels and gastrin receptors in colon cancers. *Ann Surg* **1988**;207(6):662-9.

Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet* **2009**;10(4):252-63.

Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, et al. The Wilms' tumor gene *Wt1* is required for normal development of the retina. *EMBO J* **2002**;21(6):1398-405.

Wagner N, Wagner KD, Theres H, Englert C, Schedl A, Scholz H. Coronary vessel development requires activation of the *TrkB* neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor *Wt1*. *Genes Dev* **2005**;19(21):2631-42.

van Wijk B, Gunst QD, Moorman AF, van den Hoff MJ. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One* **2012**;7(9):e44692.

Zhang H, Xue G, Zhang W, et al. Akt and Erk1/2 activate the ornithine decarboxylase/polyamine system in cardioprotective ischemic preconditioning in rats: the role of mitochondrial permeability transition pores. *Mol Cell Biochem* **2014**;390(1-2):133-42.

Zhao YJ, Zhang WH, Xu CQ, et al. Involvement of the ornithine decarboxylase/polyamine system in precondition-induced cardioprotection through an interaction with PKC in rat hearts. *Mol Cell Biochem* **2009**;332(1-2):135-44.

Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **2008**;454(7200):109-13.

Internetquellen

<http://genome.ucsc.edu/> - „UCSC Genome Bioinformatics.“ (Accessed 01.05.2013)

<http://genome.ucsc.edu/goldenPath/credits.html> - „UCSC Genome Browser Acknowledgments.“ (Accessed 01.05.2013).

<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html> - „AliBaba2 is a program, developed by Niels Grabe, for predicting binding sites of transcription factor binding sites in an unknown DNA sequence using binding sites from TRANSFAC® Public.“ (Accessed 24.05.2013).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julian Friederich Wolf Braun, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Regulation

der Amine Oxidase Copper-containing 1 durch den

Wilms-Tumor-Transkriptionsfaktor 1“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Julian Friederich Wolf Braun hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Kirschner KM, Braun JF, Jacobi CL, Rudigier LJ, Persson AB, Scholz H. Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development. J Biol Chem 2014;289(35):24452-62.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Mitwirkung bei der Planung der Experimente. Durchführung eines wesentlichen Teils der Untersuchungen mit Beiträgen insbesondere zu den Abbildungen 4 und 5 der Publikation. Beteiligung bei der Erstellung des Mansukripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Publikationen

- Kirschner KM, Braun JF, Jacobi CL, Rudigier LJ, Persson AB, Scholz H. Amine oxidase copper-containing 1 (AOC1) is a downstream target gene of the Wilms tumor protein, WT1, during kidney development. *J Biol Chem* 2014;289(35):24452-62.

Posterbeiträge

- Braun J, Jacobi CLJ, Scholz H, Kirschner K. Wilms tumor suppressor stimulates expression of the gene encoding amiloride-binding protein 1. *Acta Physiologica* 2011; Volume 201, Supplement 682.
- Kirschner K.M., Braun J., Scholz H. Expression of the amiloride binding protein1 (Abp1) is stimulated in response to hypoxia and myocardial infarction. *Acta Physiologica* 2011; Volume 201, Supplement 682.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Scholz. Für die Ermöglichung dieser Dissertation in seiner Arbeitsgruppe, sein stets offenes Ohr, seine wertvollen Ratschläge und seine rundherum fantastische Betreuung möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Karin Kirschner für ihre ausgezeichnete Betreuung und ihre stetige Bereitschaft, mir geduldig bei Problemen und Fragen zu helfen, bedanken. Danke auch für die vielen anregenden und angenehmen Gespräche.

Mein Dank gilt auch Dr. Charlotte Jacobi, Dr. Anja Bondke Persson und Dr. Lina Sciesielski für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung während und nach der Anfangsphase dieser Promotion.

Bei Frau Inge Grätsch, Frau Angelika Richter und Frau Ulrike Neumann möchte ich mich ebenfalls von ganzem Herzen für eine wunderbare Zusammenarbeit sowie ihre Unterstützung und Hilfe bedanken. Auch möchte ich allen weiteren Kolleginnen und Kollegen des Instituts meinen Dank aussprechen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, für ihr Verständnis, ihre Hilfe und ihren Beistand sowie einfach dafür, dass es sie gibt.

Zum Abschluss möchte ich mich nochmals bei der AG Scholz als Ganzes bedanken. Ich habe mit euch allen eine wunderbare Zeit erlebt und habe selten in einem so warmen und herzlichen Umfeld arbeiten dürfen. Vielen Dank, dass ich ein Teil dieser Arbeitsgruppe sein durfte. Ich werde stets mit Freude auf diese Zeit zurückblicken.