

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

DISSERTATION

Regulation des *GATA4* Gens durch den Wilmstumor-
Transkriptionsfaktor WT1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matti Klockziem

aus Potsdam

Datum der Promotion: 07.12.2018

Meiner Oma Rosel

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Abstract	6
3. Einleitung	8
3.1 Wilms-Tumor-Protein (WT1)	9
3.2 GATA4 Transkriptionsfaktor	13
3.3 Regulation von GATA4	15
3.4 Hinweise auf eine mögliche Interaktion von WT1 und GATA4	17
3.5 Zielsetzung	18
4. Material und Methoden	19
4.1 Kultivierung und Passagierung der Zelllinien	19
4.2 Transfektion von M15-Zellen mit siRNA	19
4.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	20
4.4 Luziferase-Assay	20
4.4.1 Zellyse	20
4.4.2 Luziferase-Messung	21
4.4.3 Proteinbestimmung	21
4.5 Klonierung von Subfragmenten des <i>Gata4</i> -Enhancers	21
4.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung der PCR-Produkte	21
4.5.2 Restriktionsverdau des Vektors und der Insertionen	22
4.5.3 Gel-Reinigung des Vektors und der Insertionen	22
4.5.4 Ligation des Vektors und der Insertionen	22
4.5.5 Transformation in <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) und Selektion mit Ampicillin	22
4.5.6 Plasmidpräparation und spektrophotometrische DNA-Quantifizierung	22
4.6 Western Blot	23
4.7 RNA-Extraktion	24
4.8 Reverse Transkription	24
4.9 Quantitative real-time PCR	24
4.10 Elektrophorese Mobilitätsshift Assay (EMSA)	25
4.10.1 Oligonukleotid-Markierung mit Digoxigenin	25
4.10.2 Annealing der einzelsträngigen zu doppelsträngiger DNA	25

4.10.3 Reaktionsansätze	25
4.10.4 Gelelektrophorese, Transfer und Detektion	25
4.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	26
4.12 Immunfluoreszenzfärbungen	27
4.13 Versuchstiere	27
4.14 Statistik	28
5. Ergebnisse	39
5.1 WT1 ist für eine normale Expression von <i>Gata4</i> in Herz und Gonaden erforderlich	39
5.2 WT1 und GATA4 werden im Herz und in den Gonaden von Mausembryonen überlappend exprimiert	40
5.3 WT1 stimuliert die Expression von GATA4	41
5.4 Die stimulierende Wirkung von WT1 auf die <i>Gata4</i> Expression wird nicht durch den <i>Gata4</i> Promotor vermittelt	43
5.5 WT1 transaktiviert den mesodermalen <i>Gata4</i> -Enhancer	44
5.5.1 Subklonierung verschieden langer Fragmente aus dem mesodermalen <i>Gata4</i> -Enhancer	44
5.5.2 WT1 aktiviert den murinen <i>Gata4</i> Enhancer	46
5.6 WT1 Protein bindet an den mesodermalen <i>Gata4</i> Enhancer	47
6. Diskussion	50
6.1 Koexpression von WT1 und GATA4 im Epikard und in den Gonaden	50
6.2 Bedeutung von WT1 für die <i>Gata4</i> Expression <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	51
6.3 <i>In vitro</i> Regulation des mesodermalen <i>Gata4</i> Enhancers durch WT1	52
6.4 Direkte Bindung des WT1 Proteins an die <i>Gata4</i> Enhancer Sequenz	54
6.5 Die Bedeutung des lateralen Mesoderms in der Entwicklung	55
6.6 Klinisch relevante Aspekte der epi-/myokardialen Expression von WT1 und GATA4	57
7. Literaturverzeichnis	60
8. Abkürzungsverzeichnis	74
9. Eidesstattliche Versicherung	77
10. Lebenslauf	78
11. Publikationen	80

12. Danksagung 81

1. Zusammenfassung

Das Wilmsstumorgen *WT1* wurde ursprünglich als Tumorsuppressorgen charakterisiert und kodiert ein Zinkfingerprotein. Von den zahlreichen bekannten Proteinvarianten ist es die sog. WT1(-KTS) Isoform, die als Transkriptionsfaktor wirkt. Während der Embryonalentwicklung wird WT1 hauptsächlich im Urogenitalsystem und Mesothel exprimiert, für deren Entwicklung es erforderlich ist.

Das *GATA4* Gen gehört zu einer Familie von 6 Transkriptionsfaktoren mit dem gemeinsamen Merkmal einer hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne, mit der sie an die Nukleotidsequenz (A/T)GATA(A/G) binden. *GATA4* wird im Endoderm und Mesoderm sowie daraus abgeleiteten Geweben exprimiert und ist in der Embryogenese unter anderem für die Epikardentwicklung sowie Gonadendifferenzierung erforderlich.

WT1 und *GATA4* zeigen während der Embryonalentwicklung unter anderem in den Gonaden sowie im Epikard phasenweise ein überlappendes Expressionsmuster. Eine Inaktivierung der Gene sowohl von *Wt1* als auch von *Gata4* führt in transgenen Mäusen zu ähnlichen Phänotypen mit Störungen der Herz- und Gonadendifferenzierung. Darüber hinaus regulieren beide Proteine gemeinsame gonadale Zielgene. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft werden, dass die Expression des *GATA4* Gens durch WT1 reguliert wird.

Wt1-defiziente Mausembryonen (*Wt1*^{-/-}) wiesen einen signifikant reduzierten *Gata4* mRNA Gehalt in Herz (ca. 50% Reduktion) und Gonaden (ca. 80% Reduktion) gegenüber Wildtyp Wurfgeschwistern auf. Mithilfe von Immundoppelfluoreszenzfärbungen wurden die WT1 und *GATA4* Proteine in epikardialen Zellen von murinen embryonalen Herzen (E12.5) sowie in den Gonaden adulter Wildtyp Mäuse kolokalisiert. In M15-Zellen aus der Mesonephros/Gonaden-Region führte eine Hemmung der *Wt1* Expression durch siRNA zu einer Reduktion der *Gata4* mRNA um ca. 50%. Diese Resultate zeigen, dass WT1 während der Mausembryogenese für eine normale Expression von *GATA4* in den Herzen und Gonaden notwendig ist. Um den zugrundeliegenden molekularen Regulationsmechanismus weiter zu analysieren, wurden *Gata4* Promotor-Reporterkonstrukte gemeinsam mit WT1(-KTS) Expressionskonstrukten zellulär kotransfiziert. Ein signifikanter Einfluss von WT1 auf die Aktivität des *Gata4* Promotors konnte in diesen Kontransfektionsexperimenten jedoch nicht nachgewiesen werden. Hingegen zeigte der distale *Gata4* Enhancer, der für die Ausbildung des lateralen

Mesoderms erforderlich ist, eine signifikante Aktivierung durch WT1. Unter Verwendung von Deletionskonstrukten konnte der WT1-sensitive Bereich innerhalb des *Gata4* Enhancers auf eine ca. 50 bp lange Sequenz eingegrenzt werden. Die *in vivo* Bindung von WT1 Protein an die Enhancer-Region in M15-Zellen wurde mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) nachgewiesen. Schließlich konnte im Elektrophoresemobilitätsshiftassay (EMSA) eine Bindung von WT1(-KTS) an den WT1-sensitiven, 50 bp langen Bereich des mesodermalen *Gata4*-Enhancers belegt werden. Zusammenfassend dokumentieren diese Ergebnisse eine direkte Stimulation des mesodermalen *Gata4*-Enhancers durch WT1. Damit wurde ein neuer Mechanismus für die Entwicklung des lateralen Mesoderms beschrieben.

2. Abstract

The Wilms' tumor gene *WT1* was initially characterized as tumor suppressor gene and is encoding a zinc finger protein. Of the many known protein isoforms it is the WT1(-KTS) isoform which acts as transcription factor. Throughout embryogenesis, WT1 is expressed in the genitourinary system and mesothelium.

The *GATA4* gene belongs to a family of 6 transcription factors which have in common a highly conserved DNA binding domain that directs binding to the nucleotide sequence element (A/T)GATA(A/G). *GATA4* is expressed in the endoderm and mesoderm as well as in derived tissues and needed for epicardial development and gonadal differentiation during embryogenesis.

Throughout embryogenesis, WT1 and *GATA4* proteins display an overlapping spatio-temporal expression pattern in gonads and epicardium. Transgenic mice with inactivation of the *Wt1* and *Gata4* genes have similar phenotypes of disrupted cardiac and gonadal differentiation. Furthermore, both proteins jointly regulate gonadal genes. The purpose of this study is to verify the hypothesis that the expression of the *GATA4* gene is regulated by WT1.

Wt1-deficient mouse embryos (*Wt1*^{-/-}) showed a significant reduction of *Gata4* mRNA levels in heart (approx. 50%) and gonads (about 80%) compared to their wildtype littermates. Double immunofluorescent stainings revealed a co-localization of WT1 and *GATA4* proteins in murine epicardial cells (e12.5) and in the gonads of adult wildtype mice. Inhibition of *Wt1* expression by RNA interference in M15 cells, which are derived from the mesonephros/gonad region, resulted in an approx. 50% reduction of *Gata4* mRNA levels. These results show that WT1 is essential for normal expression of *GATA4* in heart and gonads during mouse embryogenesis.

To further analyze the regulatory molecular mechanisms, *Gata4* promoter reporter constructs were co-transfected along with WT1(-KTS) expression constructs. WT1 protein had no significant effect on the *Gata4* promoter activity in these co-transfection experiments. However, the distal *Gata4* enhancer, required for development of the lateral mesoderm, showed a significant activation by WT1. By usage of deletion constructs, the WT1-sensitive region within the *Gata4* enhancer could be narrowed down to a 50 bp long sequence. *In vivo* binding of *Wt1* protein to the enhancer region in M15 cells was demonstrated with chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). Finally, binding of WT1(-KTS) to the WT1-sensitive 50 bp long *Gata4* enhancer region was

proved by electromobility shift assay (EMSA). In summary, the results document a direct stimulation of the mesodermal *Gata4* enhancer by WT1. Thereby a new mechanism for the development of the lateral mesoderm has been described.

3. Einleitung

Embryogenese (gr. ἐμβρυον - „ungeborene Leibesfrucht“ und γένεσις – „Entwicklung“) beschreibt den Weg von der befruchteten Eizelle über die Stadien der Furchung, Blastulation und Gastrulation bis einschließlich der Ausbildung der Organanlagen (Moore und Persaud 2007). Beim Menschen ist die Embryogenese 8 Wochen post conceptionem abgeschlossen. Danach erfolgt die Reifung der Organe, die zumeist über den Geburtstermin hinausreicht (Moore und Persaud 2007).

Es ist bemerkenswert, dass zwar alle Zellen des Körpers dasselbe Erbgut besitzen, aber trotzdem zu strukturell und funktionell unterschiedlichen Zelltypen differenzieren können. Hierfür ist die zeitlich und räumlich koordinierte Expression bestimmter, für die Zellspezifizierung relevanter Gene entscheidend. Grundsätzlich kann die Regulation der Genexpression auf verschiedenen Ebenen, z.B. der Transkription, dem mRNA Spleißen und der Proteintranslation erfolgen, oder durch post-translationale Vorgänge reguliert sein (Löffler, Petrides und Heinrich 2007).

Für eine normale Embryonalentwicklung ist die zell- und gewebespezifische Kontrolle der Genexpression durch Transkriptionsfaktoren von zentraler Bedeutung. Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Herstellung einer Genkopie in Form eines mRNA-Einzelstrangmoleküls steuern (Löffler, Petrides und Heinrich 2007). Bei der Transkription können verschiedene Stadien unterschieden werden: Während der *Initiation* erfolgt die Rekrutierung der RNA-Polymerasen an den Transkriptionsstartpunkt. *Elongation* bezeichnet die Verknüpfung der einzelnen Nukleotide zu einem wachsenden RNA-Strang durch den sog. Elongationskomplex. Während der *Termination* wird die Transkription beendet, und es erfolgt eine Polyadenylierung am 3'-Ende der mRNA. Grundsätzlich können Transkriptionsfaktoren alle Phasen der Transkription beeinflussen. Sie binden dabei an *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen, die sich zumeist in der Promotorregion der von ihnen regulierten Zielgene befinden. *Cis*-regulatorische Elemente außerhalb des Promotors lassen sich sog. Enhancern oder Silencern zuordnen (Löffler, Petrides und Heinrich 2007). Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren an Enhancer und Silencer wird die Transkription des betreffenden Gens verstärkt bzw. abgeschwächt. Man vermutet, dass durch Anlagerung von Transkriptionsfaktoren eine räumliche Nähe des Enhancers/ Silencers zum Initiationskomplex an der Transkriptionsstartstelle hergestellt und dadurch die

Transkriptionseffizienz verändert wird (Abbildung 1). Die promotorfernen Enhancer/Silencer vermitteln häufig eine Gewebespezifität der Genexpression.

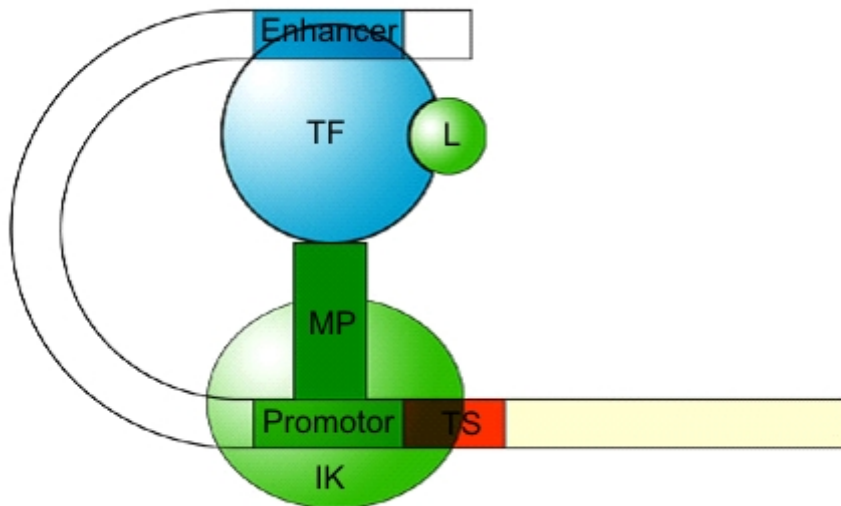


Abbildung 1: Modell zur Wirkung von Transkriptionsfaktoren an promotorfernen Enhancern. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an *cis*-regulatorische Enhancerelemente stellt eine enge räumliche Beziehung zum Initiationskomplex im Bereich der Transkriptionsstartstelle her. Auf diese Weise wird die Transkription durch Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen an den Promotor verstärkt. TF: Transkriptionsfaktor, L: Ligand, MP: Mediatorprotein, IK: Initiationskomplex mit Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase, TS: Transkriptionsstartstelle. (Nach Löffler, Petrides und Heinrich 2007)

Mutationen von Transkriptionsfaktoren, die für eine normale Embryogenese erforderlich sind, können beim Menschen krankheitsrelevante Entwicklungsdefekte verursachen. Beispiele hierfür sind die Transkriptionsfaktoren WT1 und GATA4 bzw. deren kodierende Gene.

3.1 Wilms-Tumor-Protein (WT1)

Das humane Wilmstumor-Gen *WT1* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p13) lokalisiert und hat eine Gesamtlänge von ca. 50 kb (Call et al. 1990, Gessler et al. 1990, Haber et al. 1991). Es wurde ursprünglich aufgrund inaktivierender Mutationen, die in ca. 10% der Wilms-Tumoren nachweisbar sind, als ein Tumorsuppressorgen charakterisiert (Haber et al. 1991, Hastie 1994). Wilms-Tumoren (Nephroblastome) sind maligne Nierentumoren, die zumeist im Kindesalter mit einer Häufigkeit von ca. 1:10.000

auftreten. Sie entstehen aus persistierenden Resten embryonalen Nierengewebes und gelten als das Resultat einer gestörten Nierenentwicklung (Hastie 1994).

Die 10 Exons des *WT1* Gens kodieren für ein Protein mit vier C-terminalen Cys₂His₂ Zinkfingern, über die eine Bindung an Nukleinsäuren erfolgt (Abb. 2, Call et al. 1990, Gessler et al. 1990, Scholz und Kirschner 2005). Im N-terminalen Proteinabschnitt befinden sich die transkriptionelle Aktivierungs- und Repressionsdomäne (Abb. 2, Scholz und Kirschner 2005, Wang et al. 1993, Hastie 1994, Roberts 2005, Scharnhorst 2001). Weitere funktionell wichtige Proteindomänen sind ein Autoassoziations- und RNA-Erkennungsmotiv sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (Scholz und Kirschner 2005, Roberts 2005, Scharnhorst 2001, Englert et al. 1995, Kennedy et al. 1996, Depping et al. 2012). Mehr als 30 verschiedene WT1-Proteinvarianten mit molaren Massen zwischen 33 und 62 kDa wurden bislang beschrieben (Bruening und Pelletier 1996, Scharnhorst 2001, Dallosso et al. 2004, Hohenstein und Hastie 2006). Die Vielzahl der Proteine entsteht durch unterschiedliches mRNA Spleißen, Translationsbeginn an verschiedenen Start-Codons, RNA-Editing und post-translationalen Modifizierungen (Haber et al. 1991, Sharma et al. 1994, Bruening und Pelletier 1996, Scharnhorst 2001, Dallosso et al. 2004, Roberts 2005). Zu den wichtigsten Spleißvarianten gehört die Insertion von 17 Aminosäuren durch den Gebrauch von Exon 5, und die Insertion von drei Aminosäuren (Lysin, Threonin, Serin [+KTS]) zwischen den dritten und vierten Zinkfinger durch Verwendung einer alternativen Spleißdonorstelle in Exon 9 (Abb. 2, Haber et al. 1991, Scholz und Kirschner 2005). Die WT1(-KTS) Varianten, denen die Tripeptid-Insertion fehlt, binden an GC-reiche DNA-Sequenzen mit dem Konsensusmotiv 5'-GCG(T/G)(G/A)GG(C/A)G(G/T)-3' und wirken als Transkriptionsfaktoren (Rauscher et al. 1990, Hartwig et al. 2010, Scharnhorst 2001). WT1-Zielgene kodieren unter anderem für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, zelluläre Strukturproteine und Signalmoleküle (Mayo et al. 1999, Wagner et al. 2005a, Übersichten in Scharnhorst 2001 und Roberts 2005). Die WT1(+KTS) Isoformen besitzen eine höhere RNA-Bindungsaffinität als die WT1(-KTS) Varianten und wurden als Regulatoren von RNA-Spleißprozessen postuliert (Kennedy et al. 1996, Englert et al. 1995, Larsson et al. 1995, Übersicht in Scharnhorst 2001).

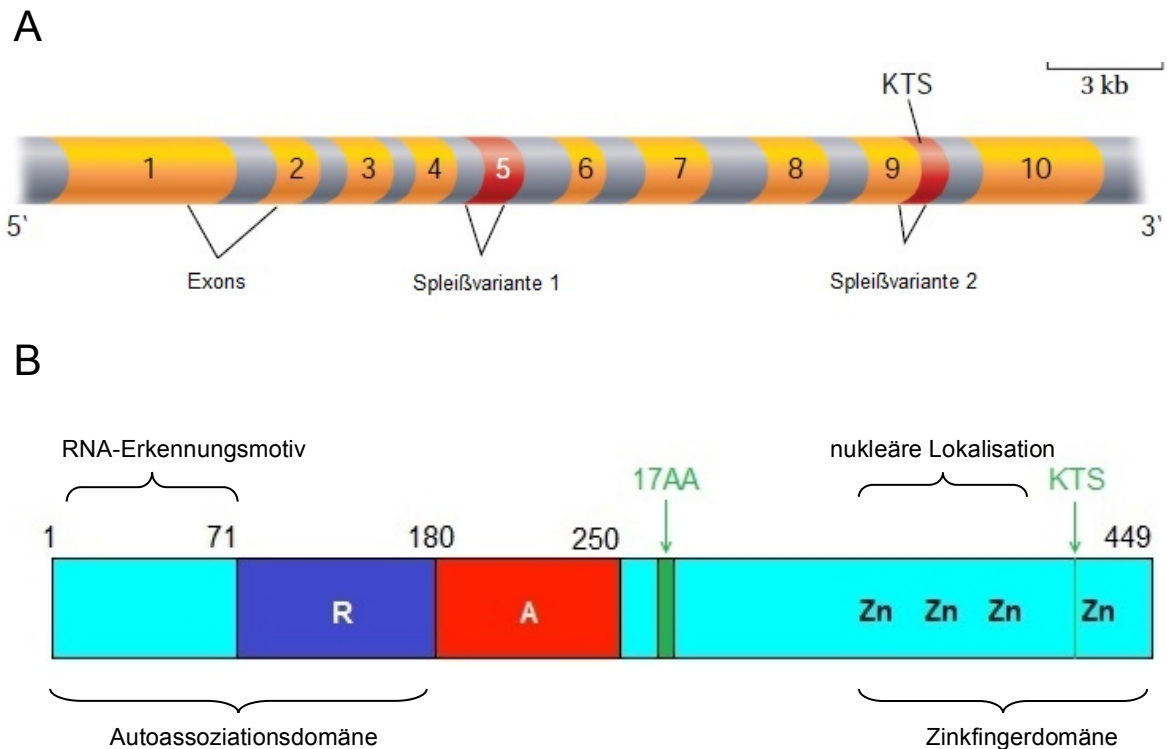


Abbildung 2: Organisation des *WT1* Gens (A) und Domänenstruktur von *WT1* Protein (B). R bezeichnet die Repressionsdomäne, A die Aktivierungsdomäne. Zn, Zinkfinger. Grün markiert sind in Abb. B die beiden wichtigsten Spleißvarianten: Spleißvariante 1 ist das für 17 Aminosäuren (17AA) kodierende Exon 5, Spleißvariante 2 in Exon 9 bezeichnet die Insertion dreier Aminosäuren (Lysin-Threonin-Serin, KTS) zwischen den dritten und vierten Zinkfinger. Die Zahlen in B entsprechen den Positionen der Aminosäuren (Abbildung A modifiziert nach Scholz und Kirschner 2005, B modifiziert nach Roberts 2005).

Während der Embryonalentwicklung wird *WT1* hauptsächlich im Urogenitalsystem und Mesothel exprimiert (Pritchard-Jones et al. 1990, Buckler et al. 1991, Armstrong et al. 1992). Ein besonders hohes Expressionsniveau ist in den Nieren- und Gonadenanlagen nachweisbar (Call et al. 1990, Pelletier et al. 1991, Mundlos et al. 1993). Im Verlauf der Entwicklung nimmt die *WT1* Expression ab, so dass im Organismus des Erwachsenen *WT1* nur noch in wenigen Zelltypen, u.a. in den Podozyten der Nierenglomeruli und im Epikard, gebildet wird (Armstrong et al. 1992, Mundlos et al. 1993, Moore et al. 1999, Scholz und Kirschner 2011).

WT1 ist für die normale Embryogenese erforderlich. Mausembryonen mit homozygotem *Wt1*-Gendefekt (*Wt1*^{-/-}) sind ab dem 13. Entwicklungstag letal. Ein phänotypisches Merkmal der Knockout-Mutanten ist das weitgehende Fehlen der Nieren- und Gonadenanlagen (Kreidberg et al. 1993, Davies et al. 2004). Weitere Entwicklungsdefekte betreffen unter anderem die Milz, Nebennieren, die neuronalen

Zellen der Retina sowie das Riechepithel und blutbildende System (Herzer et al. 1999, Moore et al. 1999, Wagner et al. 2002a, Wagner et al. 2005b, Alberta et al. 2003).

Die meisten WT1 exprimierenden Zelltypen besitzen die Eigenschaft, zwischen einem undifferenzierten mesenchymalen Zustand und einer epithelialen Differenzierung wechseln zu können. Diese Vorgänge, die WT1 erfordern, werden als mesenchymal-epitheliale bzw. epithelial-mesenchymale Transition (MET bzw. EMT) bezeichnet. Ein Beispiel für MET ist die Epithelbildung in Nieren und Gonaden aus unreifen mesenchymalen Vorläuferzellen während der Embryogenese (Pritchard-Jones et al. 1990, Davies et al. 2004, Hohenstein und Hastie 2006). EMT, d.h. die Entwicklung mesenchymaler Zellen aus Epithelgewebe, ist für die Entwicklung kardiovaskulärer Progenitorzellen im embryonalen Epikard von zentraler Bedeutung. Das Epikard ist ein Mesothel, das im Bereich des Sinus venosus aus dem Proepikard entsteht und die äußere Herzoberfläche bedeckt (Männer et al. 2001). Während der Herzentwicklung erlangen epikardiale Zellen durch EMT einen mesenchymalen Phänotyp, der ihnen die Einwanderung in das benachbarte Herzmuskelgewebe ermöglicht (Wessels und Pérez-Pomares 2004). Dort differenzieren die Mesenchymzellen zu Kardiomyozyten, interstitiellen Fibroblasten und Gefäßzellen (Mikawa und Gourdie 1996, Dettman et al. 1998, Pérez-Pomares et al. 2002; Cai et al. 2008, Zhou et al. 2008). In Einklang mit der Rolle von WT1 als Mediator des EMT wurde in *Wt1*-defizienten Mausembryonen ein Vaskulogenesedefekt im Herzen sowie eine Hypoplasie des Ventrikelmyokards festgestellt (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999, Wagner et al. 2005a). Interessanterweise wurde nach Myokardinfarkt bei Ratten eine *de novo* Expression von WT1 in Blutgefäßen im Infarkttrandbereich beobachtet (Wagner et al. 2002b, Smart et al. 2011). Dies deutet darauf hin, dass WT1 möglicherweise auch im vollständig entwickelten Herzmuskel EMT ermöglicht und dadurch die Ausbildung von Blutgefäßen fördert. Als transkriptionelle WT1-Zielgene im Rahmen des EMT/MET wurden *Snai1* und *Cdh1*, die für den Transkriptionsfaktor SNAIL bzw. das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin kodieren, identifiziert (Cano et al. 2000, Martinez-Estrada et al. 2010).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass WT1 auch in adulten Organen von großer Relevanz ist. Die induzierte *Wt1*-Deletion verursachte bei Mäusen ein Multiorganversagen (Chau et al. 2011). Neben einer Glomerulosklerose der Nieren und weiteren Organschäden wurde bei den Versuchstieren u.a. eine ausgeprägte Osteoporose und Störung der Hämatopoiese festgestellt (Chau et al. 2011).

Auch beim Menschen können *WT1*-Gendefekte Krankheiten verursachen. Beispiele hierfür sind das WAGR Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, urogenitale Fehlbildungen, mentale Retardierung) (Morrison et al. 2008), das Beckwith-Wiedemann Syndrom (asymmetrische Organomegalie, umbilikale Hernie, Hypoglykämie, moderat erhöhtes Karzinomrisiko) und das Denys-Drash Syndrom (Pseudohermaphroditismus, renale mesangiale Sklerose, Prädisposition zu Wilms-Tumoren) (Morrison et al. 2008). Mutationen im *WT1* Gen wurden auch bei Patienten mit Meacham-Syndrom (männlicher Pseudohermaphroditismus, kongenitale Herzfehler, Diaphragmdefekte) gefunden (Suri et al. 2007). Interessanterweise wird *WT1* in einigen malignen Tumoren, z.B. in Neuroblastomen, malignen Melanomen, Lungenkarzinomen und Leukämiezellen, stärker exprimiert als in den gesunden Geweben, von denen diese Tumoren abstammen (Oji et al. 2002, Wagner et al. 2008, Wang et al. 2011, Übersichten in Yang et al. 2007 und Huff 2011). Es wird deshalb vermutet, dass *WT1* das Wachstum mancher Karzinome fördert. Eine überzeugende Erklärung für die dualen Eigenschaften von *WT1* als Tumorsuppressor und Onkogen gibt es bislang nicht. Möglicherweise beruhen die gegensätzlichen Wirkungen von *WT1* (proliferativ bzw. antiproliferativ-apoptotisch) auf zelltypspezifischen Interaktionen mit unterschiedlichen Proteinbindungspartnern und/ oder auf Veränderungen im relativen Mengenverhältnis der verschiedenen *WT1*-Proteinvarianten (Hohenstein und Hastie 2006, Yang et al. 2007, Huff 2011, Scholz und Kirschner 2011, Hartkamp und Roberts 2010, Depping et al. 2012).

3.2 GATA4 Transkriptionsfaktor

GATA4 gehört zu einer Familie von 6 Transkriptionsfaktoren, die als gemeinsames Merkmal eine hoch konservierte DNA Bindungsdomäne besitzen, mit der sie an die Nukleotidsequenz (A/T)GATA(A/G) binden (Arceci et al. 1993, Morrisey et al. 1997). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Gewebeexpression werden die GATA Proteine in zwei Subgruppen unterteilt: Die Faktoren GATA1, -2 und -3 kommen überwiegend in hämatopoietischen Stammzellen vor und regulieren differenzierungsabhängig die Genexpression in T-Lymphozyten, erythroiden Zellen sowie Megakaryozyten (Molkentin 2000). GATA-4, -5 und -6 werden in Geweben exprimiert, die vom Mesoderm und Endoderm abstammen (Molkentin 2000).

Das *GATA4* Gen befindet sich auf Chromosom 8p23.1 und besteht aus sieben Exons (Pehlivan et al. 1999, Molkentin 2000). Das murine Protein hat ein Molekulargewicht von ca. 48 kDa (Arceci et al. 1993). Es besitzt zwei Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys Zinkfinger und zwei angrenzende basische Regionen, wobei der C-terminale Zinkfinger für die DNA-Bindung erforderlich ist. Außerdem enthält das *GATA4* Protein zwei N-terminale Transaktivierungsdomänen und eine C-terminale nukleäre Lokalisationssequenz in der basischen Region (Morrisey et al. 1997, Molkentin 2000).

GATA4 wird im Endoderm und Mesoderm sowie in daraus abgeleiteten Geweben exprimiert (Arceci et al. 1993). Während der Mausembryogenese ist es im Herzen (Endokard, Epikard und Myokard), Darmepithel, Testes, Ovarien, Leber, Nebennieren, viszeralem sowie parietalem Endoderm nachweisbar (Arceci et al. 1993, Heikinheimo et al. 1994, Morrisey et al. 1996, Molkentin 2000, Kiiveri et al. 2002). In adulten Mäusen kann *GATA4* im Herzen, den Ovarien, den Testes und der Leber sowie in der Lunge und im Dünndarm detektiert werden (Arceci et al. 1993, Molkentin 2000).

GATA4 ist für die normale Embryogenese notwendig. Während der frühen Embryonalentwicklung spielt *GATA4* eine zentrale Rolle in der ventralen Morphogenese und der Ausbildung des Herzschlauchs. Mausembryonen mit homozygotem *Gata4*-Gendefekt sind ab Tag 7.5 post conceptionem (E7.5) aufgrund von Defekten im extraembryonalen viszeralem Endoderm letal und weisen infolge einer Fusionsstörung eine Spaltung der Herzanlage (*Cardia bifida*) auf (Kuo et al. 1997, Molkentin et al. 1997, Narita et al. 1997).

Untersuchungen an konditionellen Knockout-Mäusen zeigen, dass *GATA4* während der frühen Stadien für die Entwicklung von Proepikard und Epikard erforderlich ist (Watt et al. 2004). Außerdem beobachtete man bei *Gata4* deletierten Mausembryonen eine Störung der Zytoarchitektur der Kardiomyozyten sowie – ähnlich wie bei *Wt1*-Defizienz – eine ausgeprägte Hypotrophie des Myokards und einen kardialen Vaskulogenesedefekt (Crispino et al. 2001, Pu et al. 2004, Watt et al. 2004, Zeisberg et al. 2005). In der späten Herzmorphogenese wird *GATA4* für die Septierung und Valvula-Bildung benötigt (Watt et al. 2004).

Die Bedeutung von *GATA4* für die Herzentwicklung zeigt sich auch in der Regulation von Genen, die für spezifische kardiale Proteine wie z.B. α MHC (Molkentin et al. 1994), ANF (Thuerauf et al. 1994) und BNP (He et al. 2002) kodieren, sowie in der Interaktion mit anderen, für die Kardiogenese relevanten Transkriptionsfaktoren (Übersicht in McCulley und Black 2012). Für die normale Funktion von *GATA4* ist eine direkte

Interaktion mit Friend-of-GATA-Protein 2 (FOG-2) durch Kontakt über den N-terminalen Zinkfinger erforderlich (Crispino et al. 2001). Mutationen im *GATA4* Genlocus sind beim Menschen mit Herzanomalien, u.a. (Vorhof)septumdefekten, rechtsventrikulärer Hypoplasie und Endokardkissendefekten, assoziiert (Garg et al. 2003, Rajagopal et al. 2007, weiterführend in McCulley und Black 2012). Weiterhin ist die GATA4 induzierte transkriptionelle Aktivierung von *bcl-2* ein wichtiger Mechanismus für das Überleben differenzierter Kardiomyozyten (Kobayashi et al. 2006). Eine Hemmung der GATA4 Expression in Herzmuskelzellen durch Chemotherapeutika vom Typ des Doxorubicin ist mit einer dilatativen Kardiomyopathie assoziiert (Kim et al. 2003, Aries et al. 2004, Kobayashi et al. 2006).

Neben der Entwicklung von Leber und ventralem Pankreas (Watt et al. 2007) spielt GATA4 – gemeinsam mit dem Bindungspartner FOG-2 – auch in der Gonadendifferenzierung eine zentrale Rolle (Tevosian et al. 2002, Bouma et al. 2007). GATA4 wird zu einem frühen Zeitpunkt in den somatischen Zellen der indifferenten Gonadenanlagen exprimiert. In späteren Entwicklungsstadien ist GATA4 in den Sertolizellen und interstitiellen Zellen der XY Gonadenanlagen nachweisbar, wohingegen im Verlauf der Differenzierung von XX Gonaden eine Herabregulation von GATA4 erfolgt (Heikinheimo et al. 1997, Viger et al. 1998). Im geschlechtsreifen Stadium wird GATA4 in den Granulosazellen des Follikelepithels exprimiert (Heikinheimo et al. 1997). Weiterhin ist GATA4 für die Differenzierung der steroidhormonbildenden Zellen in den Gonaden erforderlich (Bielinska et al. 2007). Konditionelle Deletion von *Gata4* in den Gonaden verursachte bei Mäusen beiderlei Geschlechts eine Infertilität (Kyrönlähti 2011a, Kyrönlähti 2011b). Beim Menschen sind *loss-of-function* Mutationen im *GATA4* Gen mit Störungen der Gonadenentwicklung assoziiert (Lourenço et al. 2011).

3.3 Regulation von GATA4

Die Expression von GATA4 wird auf der Ebene der Transkription und Translation sowie durch post-translationale Modifikationen reguliert (Übersicht bei Zhou, He und Pu 2012). Eine Phosphorylierung von Serin 105 im Bereich der N-terminalen Aktivierungsdomäne durch Erk und p38 MAPK Kinasen erhöht die DNA-Bindungsaffinität und transkriptionelle Aktivität von GATA4 (Charron et al. 2001, Liang et al. 2001). Weiterhin wird die Aktivität von GATA4 durch Sumoylierung beeinflusst (Wang et al. 2004). Eine

Kontrolle der GATA4 Translation erfolgt durch die herzmuskelspezifische microRNA miR-208 (Callis et al. 2009) sowie durch ATG-reiche repetitive Sequenzen in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der *GATA4* mRNA (Sharma et al. 2007).

Über die transkriptionellen Mechanismen, die die *GATA4* Genexpression in unterschiedlichen Geweben regulieren, ist bislang wenig bekannt. In jüngerer Zeit wurden verschiedene Enhancer im *Gata4* Genlocus der Maus beschrieben, die für eine Expression im Endoderm sowie im Endokard und in Teilen des lateralen Mesoderms eine Rolle spielen (Rojas et al. 2005, 2009, 2010, Schächterle et al. 2012). Die identifizierten Enhancer enthalten hochkonservierte Sequenzen und sind im Bereich zwischen 90 und 40 kb antegrad (5') zum Transkriptionsstartpunkt im murinen *Gata4* Gen verteilt (Abb. 3).

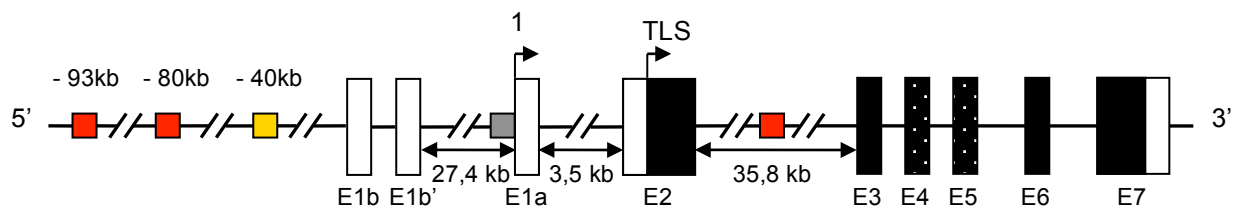


Abbildung 3: Genomische Organisation des *Gata4* Locus der Maus. Als rechteckige Boxen und mit E bezeichnet, sind die 7 Exons dargestellt sowie die drei variablen Versionen des nicht kodierten Exons 1. Weiß markiert sind nicht kodierende Exons. Schraffiert sind die beiden Zinkfinger der Exons 4 und 5. Die kleine graue Box beschreibt den Promotor, die kleinen roten bzw. orangenen Boxen die bisher identifizierten Enhancer 93 kb, 80 kb und 40 kb. Der in dieser Arbeit untersuchte mesodermale Enhancer ist -40 kb antegrad des Transkriptionsstartpunktes, der mit 1 markiert ist, lokalisiert (orangene Box). Der Translationsstartpunkt ist mit TLS gekennzeichnet. Zwischen den Exons 2 und 3 befindet sich im 2. Intron der intronische Enhancer (nach Mazaud Guittot et al. 2009 und Rojas et al. 2009).

Für meine Arbeit ist ein ca. 40 kbp antegrad des Transkriptionsstarts lokalisiertes, hoch konserviertes Enhancerelement von besonderem Interesse (Abb. 3). In transgenen Mausembryonen ist dieser Enhancer für eine Reportergenexpression im lateralen Mesoderm, einschließlich des Septum transversum, notwendig und ausreichend (Rojas et al. 2005). Vom Mesenchym des Septum transversum stammen u.a. die GATA4 und WT1 exprimierenden proepikardialen Vorläuferzellen ab, aus denen das Epikard hervorgeht (Saito et al. 2012). Der mesodermale *Gata4*-Enhancer besitzt eine Länge von 817 bp und enthält Bindungsstellen für den Forkhead-Transkriptionsfaktor FOXF1 sowie für GATA4 (Rojas et al. 2005). Die normale Aktivität des Enhancers im lateralen Mesoderm erfordert *bone morphogenetic protein*, BMP4 (Rojas et al. 2005).

3.4 Hinweise auf eine mögliche Interaktion von WT1 und GATA4

Experimentelle Arbeiten und klinische Studien haben Hinweise auf funktionelle Synergismen von WT1 und GATA4 erbracht. Beide Proteine zeigen während unterschiedlicher Stadien der Embryogenese ein überlappendes Expressionsmuster, u.a. in den Gonaden sowie im (Pro)Epikard (Kreidberg et al. 1993, Mundlos et al. 1993, Morrisey et al. 1996, Viger et al. 1998, Moore et al. 1999, Watt et al. 2004). Weiterhin weisen Mausembryonen mit Inaktivierung des *Wt1* bzw. *Gata4* Gens ähnliche Phänotypen auf und sind bei vollständigem Fehlen der jeweiligen Proteine letal (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999, Watt et al. 2004, Tevosian et al. 2002).

GATA4 ist von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung des Proepikards. Das Proepikard hat seinen Ursprung im Seitenplattenmesoderm (laterales Mesoderm) und entwickelt sich zum Epikard (Männer et al. 2001). Im Zebrafischmodell wurde nachgewiesen, dass WT1 für die Ausbildung des Proepikards eine wesentliche Rolle spielt (Serluca 2008). Weiterhin ist WT1 für die Entwicklung des Epikards aus dem Proepikard erforderlich und ermöglicht die Ausbildung subepikardialer Mesenchymzellen, die durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) aus dem Epikard hervorgehen und als kardiovaskuläre Stammzellen erachtet werden (Moore et al. 1999, Muñoz-Chápuli et al. 2002, Wessels und Pérez-Pomares 2002, Limana et al. 2011). Mausembryonen mit homozygoter *Gata4* Deletion (*Gata4*^{-/-}) sind durch eine Agenesie des Proepikards, ein hypotrophes Myokard und fehlgebildete Koronararterien gekennzeichnet (Watt et al. 2004). Ähnliche Anomalien finden sich auch bei homozygotem *Wt1* Gendefekt (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999, Wagner et al. 2005a). Zudem sind beide Gene für die Entwicklung der Gonaden erforderlich (Pritchard-Jones et al. 1990, Pelletier et al. 1991, Kreidberg et al. 1993, Tevosian et al. 2002, Hu et al. 2013).

Weitere Hinweise auf funktionelle Synergismen von WT1 und GATA4 ergeben sich aus dem Nachweis gemeinsamer Zielgene. In den Gonaden wird die Expression der für die Geschlechtsdeterminierung und -differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren AMH, SOX9 und SRY durch WT1 und GATA4 gemeinsam reguliert (Viger et al. 1998, Tremblay et al. 2001, Tevosian et al. 2002, Matsuzawa-Watanabe et al. 2003, Gao et al. 2006, Manuylov et al. 2007). Für die Expressionskontrolle von SRY und AMH wurde sogar eine Kooperation von WT1 und GATA4 im Sinne einer direkten Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen (Miyamoto et al. 2008).

In fetalen Hepatozyten transaktiviert GATA4 die Expression von Erythropoietin (EPO) und scheint beim Übergang der EPO-Produktion aus der fetalen Leber in die Nieren eine wichtige Rolle zu spielen (Dame et al. 2004). Auch WT1 wurde als transkriptioneller Aktivator der EPO Expression identifiziert, und Mausembryonen mit homozygoter *Wt1* Deletion (*Wt1*^{-/-}) zeigten im Vergleich zu Wildtypen ein signifikant reduziertes hepatisches *Epo* mRNA Niveau (Dame et al. 2006). Bemerkenswert ist, dass EPO und WT1 Protein in Sertolizellen, einem bekannten Expressionsort von GATA4, kolokalisiert sind (Dame et al. 2006). Weiterhin stimuliert Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) bei niedrigem O₂-Partialdruck die Transkription sowohl des *EPO*- als auch des *WT1* Gens (Wagner et al. 2003, Haase 2010). Es erscheint denkbar, dass die Wirkung von WT1 auf die EPO Expression zumindest teilweise durch GATA4 vermittelt ist. In Kardiomyozyten stimuliert GATA4 zusammen mit Sp1 die Expression des *EPO*-Rezeptorgens (von Salisch et al. 2011), das auch als WT1-Zielgen identifiziert wurde (Kirschner et al. 2008).

3.5 Zielsetzung

Der aktuelle Stand der Forschung legt nahe, dass zwischen GATA4 und WT1 ein funktioneller Zusammenhang besteht. Dies erschließt sich unter anderem aus dem Vorkommen beider Proteine in den Gonaden und im (Pro)Epikard. Weiterhin weisen Mausembryonen mit *Gata4*- bzw. *Wt1*-Defizienz ähnliche Entwicklungsanomalien auf. Übereinstimmend wurden mehrere, durch WT1 und GATA4 gemeinsam regulierte Zielgene identifiziert.

Vor diesem Hintergrund bestand die Zielsetzung meiner Arbeit darin, zu überprüfen, ob die Expression von *GATA4* durch WT1 direkt reguliert wird. Insbesondere sollte die Hypothese untersucht werden, dass der für eine Expression von *Gata4* im lateralen Mesoderm verantwortliche distale Enhancer durch WT1 induziert wird. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe von Reporter-genexperimenten funktionelle Abschnitte im *Gata4*-Gen hinsichtlich einer direkten Transaktivierung durch WT1 untersucht. Der Nachweis von Protein-DNA Interaktionen erfolgte mittels Elektromobilitätsshiftassays und Chromatinimmunopräzipitationen. Weiterhin wurde der Einfluss einer Hemmung von WT1 mittels RNA-Interferenz auf die zelluläre GATA4 Expression ermittelt. Zur Überprüfung einer zellulären Kolokalisation von WT1 und GATA4 wurden Immundoppelfärbungen angefertigt.

4. Material und Methoden

4.1 Kultivierung und Passagierung der Zelllinien

Für die Transfektionsexperimente und Reporter-gen Assays wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293) (Katalognummer: ACC 305, DSMZ, Braunschweig) verwendet. Die Transfektion von siRNA und die ChIP-Assays erfolgten an M15 Zellen aus dem Mesonephros der Maus (Larsson et al., 1995). Beide Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAA Laboratories, Cölbe) kultiviert. Das Medium enthielt als Zusätze Pyruvat, Glukose [4,5 g/l] und 10% fetales Kälberserum (FBS) (Biochrom) sowie Penicillin und Streptomycin (Biochrom). Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 21% O₂ und 5% CO₂ inkubiert (CB210 Inkubator, Binder, Tuttlingen). Die Aussaat der Zellen erfolgte in 20 cm Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen). Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen von 2 bis 3 Tagen passagiert, indem sie mit 1x Trypsin in PBS abgelöst und im Verhältnis von 1:10 in frischem DMEM resuspendiert wurden. Die Zelldichte wurde vorher in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (Axiovert100, Carl Zeiss) bestimmt. Für die Transfektionsexperimente wurden die Zellen in 12-Loch Zellkulturplatten (TPP, Trasadingen) in einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen/Loch in 800 µl DMEM ausgesät.

4.2. Transfektion von M15-Zellen mit siRNA

M15-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 60% in 6-Lochschalen (TPP, Trasadingen) kultiviert und anschließend mit einem Gemisch von 4 verschiedenen siRNAs (ON-TARGETplus, SMARTpool siRNA, L-040686-01-0005, 50 pmol/Loch, Dharmacon, Thermo Fisher Scientific) gegen das murine *Wt1*-Gen (NM_144783) transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde DharmaFECT 1 nach Herstellerangaben (Dharmacon) verwendet. Als Negativkontrolle wurden entsprechend 4 siRNAs ohne Sequenzhomologie im Mausgenom (siGENOME non-targeting siRNA Pool 2, Dharmacon) eingesetzt. 48 h nach Transfektion wurde die RNA- bzw. Proteinpräparation durchgeführt.

4.3 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die Zellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium nochmals erneuert. Die Transfektion erfolgte nach der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode (Kingston et al. 2003). Ein Transfektionsansatz von insgesamt 80 µl Volumen bestand aus 33,2 µl DNase freiem Wasser, 2,8 µl Plasmid-DNA, 4 µl 2M CaCl₂ und 40 µl Hepes Buffered Saline (HEBS) 2x Puffer. Als erstes wurde das Wasser in die Eppendorf-Röhrchen vorgelegt, in welchem anschließend die Plasmid-DNA gelöst wurde. Als nächstes wurde die CaCl₂-Lösung auf die Oberfläche des Gemisches im Röhrchen pipettiert und der Inhalt vorsichtig durchmischt. Schließlich wurde der HEBS 2x Puffer hinzugefügt und der Inhalt gut durchmischt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die DNA an das ausfallende Calciumphosphat binden konnte. Danach wurden die 80 µl Transfektionsansatz jeweils in die entsprechenden Löcher der Zellkulturplatte pipettiert und 24 Stunden lang auf den Zellen belassen. Die Transfektion erfolgte mindestens in Doppelansätzen. Eingesetzt wurden Luziferase-Reporterkonstrukte, die unterschiedlich lange Sequenzen aus dem *Gata4*-Enhancer enthielten. Als Negativkontrolle erfolgte die Transfektion von „leerem“ Reporterplasmid (pGL3basic). Die Luziferase-Reporterkonstrukte wurden zusammen mit einem Expressionsplasmid kodierend für die WT1(-KTS) Spleißvariante beziehungsweise mit Leervektor (pCB6⁺) kotransfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurde den Ansätzen ein Renilla-Luziferasekonstrukt zugefügt. Insgesamt wurden pro Transfektionsansatz 804 ng DNA verwendet, davon 4 ng Renilla-Plasmid [2 ng/µl] und jeweils 400 ng WT1-Plasmid [1 µg/µl] sowie Luziferase-Reporterkonstrukt [1 µg/µl].

4.4 Luziferase-Assay

4.4.1 Zellyse

24 h nach der Transfektion wurde das Nährmedium von den Zellen entfernt und diese mit Passive Lysis Buffer (PLB) (Promega, Mannheim) behandelt. Für die Zellyse wurden die Kulturschalen für 15 min bei Raumtemperatur (RT) auf eine Rüttelplatte (Gyro-Rocker[®] STR9, Stuart Scientific) gestellt. Das Zellysat wurde anschließend bei 13.000 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung benutzt.

4.4.2 Luziferase-Messung

Zunächst wurde 50 µl Luziferase Assay Reagent II (LAR II) (Promega, Mannheim) in Glasröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) vorgelegt und anschließend 10 µl des entsprechenden Zelllysats zugegeben. Die Messung der Lichtemission erfolgte über einen Zeitraum von 10 s im Luminometer (Lumat LB9501 Tube Luminometer, Berthold). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Stop and Glow Buffer (Promega, Mannheim) im Verhältnis von 50:1 zu Renilla-Substrat (Promega, Mannheim) gestoppt. Danach erfolgte die Messung der Renilla-Luziferaseaktivität über einen Zeitraum von 10 Sekunden.

4.4.3 Proteinbestimmung

Zur Angleichung der Luziferaseaktivitäten an die effektiven Proteinkonzentrationen wurde die zelluläre Gesamtproteinmenge pro Well bestimmt. Dazu wurde der Überstand des Zelllysats 1:500 mit ddH₂O verdünnt. Anschließend wurden 200 µl Bio-Rad Protein Assay Reagenz in Plastikküvetten pipettiert und 800 µl des verdünnten Zelllysats hinzugegeben. Das Absorptionsmaximum und somit die relative Proteinmenge im Zelllysats wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm ermittelt.

4.5 Klonierung von Subfragmenten des *Gata4*-Enhancers

4.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Aufreinigung der PCR-Produkte

Zunächst wurde mittels PCR eine 904 bp lange DNA-Sequenz, die den kompletten mesodermalen *Gata4* Enhancer enthielt, unter Verwendung von genomischer DNA der Maus als Vorlage amplifiziert. Mit spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern (siehe Tabelle 5) wurden Teilsequenzen aus dem Enhancer vervielfältigt. Für die PCR wurden 40 Zyklen verwendet, die einzelnen Reaktionsschritte dauerten jeweils 30 Sekunden. Die Temperaturen für die DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und Extension des DNA-Strangs betragen 94°C, 57°C bzw. 68°C. Die einzelnen Reaktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 50 µl, welches sich wie folgt zusammensetzte: 37,5 µl Wasser, 2 µl DNA [100 ng] des Ausgangskonstrukts, 5 µl 10x Puffer, 1,75 µl dNTPs [10 mM], 1,5 µl Vorwärtsprimer [10 µM], 1,5 µl Rückwärtsprimer [10 µM] und 0,5 µl Taq Polymerase. In der anschließenden Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte überprüft und mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

4.5.2 Restriktionsverdau des Vektors und der Insertionen

Zu 25 µl der gereinigten PCR-Produkte wurden jeweils 1 µl XhoI/NheI und 3 µl 10x Ligationspuffer hinzugegeben. Der Vektor pGL3basic (5 µg) wurde mit denselben Restriktionsenzymen verdaut (37°C für 15 Minuten). Anschließend wurde der Vektor nach dem MinElute PCR Purification Kit Protokoll gereinigt und enzymatisch dephosphoryliert.

4.5.3 Gel-Reinigung des Vektors und der Insertionen

Die Elektrophorese (100 V, 30 min) des Restriktionsverdaus erfolgte in einem 0,8% Agarosegel. Anschließend wurden die Produkte aus dem Gel herausgeschnitten und nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

4.5.4 Ligation des Vektors und der Insertionen

Zur Ligation wurden 0,5 µl des gereinigten Vektors, 2 µl der einzufügenden Produkte, 5 µl 2x Puffer, 1,5 µl H₂O und 1 µl Ligase verwendet und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

4.5.5 Transformation in Escherichia coli (E. coli) und Selektion mit Ampicillin

Jeweils 2 µl Ligationsansatz wurden zu den kompetenten E. coli gegeben und auf Eis gestellt. Nach 20 Minuten erfolgte eine 30-sekündige Hitzebehandlung im Wasserbad bei 42°C, gefolgt von zwei Minuten Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium ohne Ampicillin zu den Bakterienzellen (Invitrogen, Darmstadt) gegeben. Diese wurden daraufhin für eine Stunde in den Schüttelinkubator 3033 (GFL) gestellt, danach konzentriert, auf Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Am Folgetag wurden von jeder Agarplatte sechs Kolonien jeweils in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 2 ml LB-Medium und Ampicillin (100 µg/ml) überführt. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht im Schüttelinkubator gezüchtet.

4.5.6 Plasmidpräparation und spektrophotometrische DNA-Quantifizierung

Die Mini-Plasmidpräparation wurde mithilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Mittels Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese wurde die Plasmid-DNA analysiert. Von Bakterien,

die das korrekte Plasmid enthielten, wurden Maxi-Kulturen in 15 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angelegt. Nach Plasmidaufreinigung mit dem Nucleo Spin Protokoll erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration im Spektrophotometer (Bio-Rad Laboratories) anhand der Verhältnisse λ 260 zu λ 280.

4.6 Western Blot

Zellen und Gewebe wurden in PBS (PAA Laboratories, Cölbe) zweimal gewaschen, mit Laemmli Puffer lysiert (300 µl/Loch) und mithilfe des Labsonic U (B. Braun, Melsungen) ultrasonographisch aufgeschlossen sowie für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch anhand der OD₂₆₀ und OD₂₈₀ errechnet. Die Proteinproben wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Auftrennung der Proteingemische (20 µg je Spur) erfolgte in einem 10%igen denaturierenden Polyacrylamidgel in 1x SDS-Laufpuffer (Mini Protean 2 Cell, Bio-Rad Laboratories, München). Der Proteintransfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon P Transfer Membrane, GE Healthcare, Freiburg) erfolgte mit einem halbtrockenen Blottingsystem (Trans-Blot[®] SD, Bio-Rad Laboratories) in 1x Blottingpuffer für 45 min bei 15 V. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur in 5% Magermilch (Roth, Karlsruhe) in TBST-Puffer blockiert. Die Inkubation der Primärantikörper geschah über Nacht bei 4°C in 2,5% Magermilch. Es wurden folgende Antikörper verwendet: anti-Wt1 aus Kaninchen (C19, Katalognummer sc-192, Santa Cruz Biotechnology), anti-GATA4 aus Ziege (C-20, Katalognummer sc-1237, Santa Cruz Biotechnology) und anti-Aktin aus Maus (clone C4, Katalognummer MAB1501R, Millipore, Darmstadt) in 1:200 Verdünnungen. Danach wurde die Membran 3x 15 min mit TBST-Puffer gewaschen und die sekundären, an Peroxidase gebundenen Antikörper in 2,5% Magermilch (1:20.000 verdünnt) für 1 h hinzugegeben. Nach erneutem dreimaligen Waschvorgang erfolgte die Detektion der Sekundärantikörper über das Western Lightning Plus ECL Reagenz (PerkinElmer Life Sciences, Rodgau) gemäß den Herstellerangaben. Zur Belichtung wurde der Hyperfilm[™] MP (Amersham Biosciences, München) verwendet. Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde mithilfe eines Antikörpers gegen Pan-Aktin nachgewiesen, nachdem die gebundenen Antikörper durch 10-minütige Inkubation mit 0,2 N NaOH von der Membran entfernt worden waren.

4.7 RNA-Extraktion

Gesamt-RNA wurde aus Geweben mit dem RNeasyMicroKIT (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert.

4.8 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese wurde mit einer Gesamt-RNA Menge von 2 µg unter Verwendung von Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern (Invitrogen, Darmstadt) und Superscript™ II - reverser Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.9 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) erfolgte in 20 µl Doppelansätzen mit 2 µl cDNA (1:5 verdünnt), 50 nM Primer und ½ Vol 2x SYBR Green Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim) in MicroAmp® Optical 96-Loch-Platten und MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies, Darmstadt) mithilfe des StepOnePlus™ Systems (Invitrogen). Die PCRs wurden in einem GeneAmp5700 Thermocycler (Perkin Elmer Life Sciences) unter folgenden Bedingungen durchgeführt (45 Zyklen): DNA Denaturierung (15 s) bei 94°C, Primer Annealing (15 s) und Extension der doppelsträngigen DNA (60 s) bei 60°C, Detektion der SYBR Green Fluoreszenz (30 s) bei 77°C. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 5 angegeben. Zur Überprüfung der Produktidentität wurden bei jeder PCR die Schmelzkurven der Amplikons beurteilt. Zusätzlich wurden einmalig für jedes Primerpaar die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert. Die Auswertung der PCR erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Relative mRNA Expressionsniveaus wurden berechnet, indem der Ct-Wert eines Haushaltsgens (*Gapdh* bzw. β -Aktin) jeweils vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens (z.B. *Gata4*) subtrahiert wurde. Unterschiede in den mRNA-Niveaus wurden anschließend über die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ bestimmt (Livak und Schmittgen 2001).

4.10 Elektrophorese Mobilitätsshift Assay (EMSA)

4.10.1 Oligonukleotid-Markierung mit Digoxigenin

Zum Markieren des Einzelstrang-Oligonukleotids mit Digoxigenin wurde dieses in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l eingesetzt. 1 μ l Oligonukleotid wurde mit H₂O auf ein Volumen von 10 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden 4 μ l 5x Puffer, 4 μ l CoCl₂ (25 mM), 1 μ l DIG-ddUTP (1 mM) und 1 μ l terminale Transferase [400 U/ μ l] hinzugegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 20 μ l resultierte. Der Ansatz wurde 15 min lang bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l EDTA (0,2 M) auf Eis gestoppt.

4.10.2 Annealing der einzelsträngigen zu doppelsträngiger DNA

Zu dem markierten Oligonukleotid wurde die komplementäre DNA-Sequenz in ca. 22-fachem Überschuss pipettiert. Das Annealing erfolgte durch 5-minütiges Kochen im Wasserbad und anschließendes langsames Abkühlen auf Raumtemperatur.

4.10.3 Reaktionsansätze

Für den Bindungsansatz wurden 4 μ l 5x Bindungspuffer, 1 μ l poly[d(I-C)] [1 μ g/ μ l], 1 μ l rekombinantes WT1-Protein [0,2 μ g/ μ l], 1 pmol (0,22 μ l) Digoxigenin-markiertes Doppelstrang-Oligonukleotid gemischt und mit ddH₂O auf insgesamt 20 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert.

4.10.4 Gelelektrophorese, Transfer und Detektion

Für den EMSA wurde ein 6%iges, nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel vorbereitet. Vor Beginn wurden die Taschen mit Laufpuffer (0,5x TBE) gespült, und es erfolgte ein 15-minütiger Vorlauf bei 80 V. Vor Auftragen auf das Gel wurde den Proben 30%iges Glycerin zugegeben. Der Gellauf wurde bei 100 V für 45 min in einer Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Die Protein-DNA-Komplexe wurden aus dem Gel mittels Semidry-Blotting (Trans-Blot® SD) bei 0,1 A über 1 h auf eine Nylonmembran (Roche) überführt. Zur Fixierung wurde ein UV-Crosslinking (Stratalinker® UV crosslinker, Stratagene, Waldbronn) beider Seiten der Nylonmembran mit 12.000 J durchgeführt. Die Membranen wurden in EMSA Waschpuffer MABT

abgespült und anschließend mit 10 ml 1%igem Blockierungsreagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurde der Digoxigenin-Antikörper (1:10.000 in 1%igem Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer) der Membran zugesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde entfernt, indem die Membran zweimal mit MABT-Puffer für 15 min gewaschen wurde. Anschließend wurde die Membran im NBT/BCIP Entwicklungspuffer für 5 min äquilibriert und danach mit 1:50 NBT/BCIP Stammlösung (Roche, Mannheim) in Entwicklungspuffer über 30 min in einem lichtgeschützten Gefäß entwickelt. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von TE-Puffer gestoppt, und die Membran mit Phosphate Buffered Saline (PBS) gespült und getrocknet.

4.11 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

M15-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h bis zu einer Zahl von ca. 1×10^6 Zellen kultiviert und für die Chromatin-Immunopräzipitation mithilfe des Millipore ChIP-Assay Kits aufbereitet. Zur Fixierung der Protein-DNA-Bindungen wurde den Zellen nach Entfernen des Kulturmediums 4 %iges Formaldehyd hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit einer Mischung aus PBS und Complete™ (Roche, Mannheim) gewaschen und 15 min lang auf Eis in Lysepuffer/Complete™ lysiert. Anschließend wurde die DNA durch Ultraschallbehandlung (Labsonic U, B. Braun) gesichert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände in Immunpräzipitationspuffer/Complete™ 1:10 verdünnt und für 1 h bei 4°C mit Protein G Agarose/Heringsperma-DNA (Millipore, Darmstadt) inkubiert, um unspezifisch an Agarose bindende Proteine zu entfernen. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C mit 0,6 µg polyklonalem anti-WT1 Antikörper (AK), anti-Histon H3 AK und – als Negativkontrolle – normalem Kaninchen IgG. Daraufhin wurde Protein G Agarose/Heringsperma-DNA hinzugefügt und eine Stunde lang bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Komplexe bestehend aus Agaroseperlen, Antikörper und Chromatin wurden in mehreren Schritten gewaschen. Hierzu wurden nacheinander low salt Puffer, high salt Puffer, LiCl Puffer und zweimal TE-Puffer verwendet. Anschließend wurde die DNA in Elutionspuffer eluiert, in Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) (Invitrogen, Darmstadt) extrahiert und in 100%igem Äthanol präzipitiert. Danach wurde die DNA mittels quantitativer PCR amplifiziert. Es wurden Primer verwendet, die die WT1-Bindungssequenz im mesodermalen *Gata4* Enhancer flankierten (Tabelle 5). Als

Positivkontrolle diente der Promotor des Anti-Müller-Hormon-Rezeptor 2 Gens, ein bekanntes Zielgen von WT1 (Klattig et al. 2007a). Um unspezifische Bindungen zu erkennen, wurde das murine β -Aktin-Gen verwendet, welches keine WT1-Bindungsstelle aufweist. Die zur Amplifizierung verwendeten Primer sind in Tabelle 5 gelistet.

4.12 Immunfluoreszenzfärbungen

Terminiert verpaarten Mäusen wurden zu den bezeichneten Untersuchungszeitpunkten die Embryonen entnommen und deren Herzen unter dem Präparationsmikroskop exzidiert. Die Präparate wurden 20 min lang in 10 % (v/v) Formalin (J.T. Baker, München) auf Eis fixiert. Danach wurde das Gewebe 30 min lang in Löschungslösung (1x PBS/ 50 mM NH₄Cl) inkubiert und über Nacht in 1x PBS, 0,2% Rinderserum-Albumin, 0,05% Triton X-100 bei 4°C geblockt. Die Präparate wurden 16 h lang bei 4°C mit Primärantikörpern (jeweils 1:100 Verdünnung in Blockierungslösung) gegen WT1 (Kaninchen anti-Wt1, N-180, Santa Cruz Biotechnology) und GATA4 (Ziegen anti-Gata4, C-20, Katalognummer sc-1237) behandelt. Zur Detektion der Primärantikörper wurde Cy3-AffiniPure anti-Ziege IgG (Katalognummer 705-225-147, 1:100 Verdünnung, Jackson ImmunoResearch, Hamburg; rot fluoreszierend) und Cy2-AffiniPure anti-Kaninchen IgG (Katalognummer 711-165-152, 1:200 Verdünnung, Jackson ImmunoResearch; grün fluoreszierend) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-Diamino-2-Phenylindol, Roche) gegengefärbt.

Übersichtsbilder wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert100 Carl Zeiss), an das eine Digitalkamera (Spot RT Slider, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) angeschlossen war, aufgenommen. Die Bildnachbearbeitung wurde über Adobe Photoshop und ImageJ (Rasband, WS) vorgenommen.

4.13 Versuchstiere

Wt1^{+/-} heterozygote Mäuse (C57BL/6 Stamm, Jackson Labor, Bar Harbor, ME) wurden in den tierexperimentellen Einrichtungen der Charité nach geltenden Tierschutzverordnungen (Genehmigungsnummer T0308/12) verpaart und mittels PCR genotypisiert (Wagner et al. 2002b). Der Tag des Vaginalpfropfs wurde als Embryonaltag E0.5 festgesetzt.

4.14 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der gepaarte T-Test für verbundene Stichproben sowie ANOVA durchgeführt. *P*-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Bezüglich der quantitativen real-time PCR wurde nach der $\delta\delta\text{Ct}$ -Methode vorgegangen (Livak und Schmittgen 2001). Zunächst wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen δCt -Werte berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert der $\delta\delta\text{Ct}$ -Werte berechnet und deren Standardabweichung mithilfe der Gauß'schen Fehlerpropagation. Schließlich wurde mittels der Formel $2^{-\delta\delta\text{Ct}}$ (Livak und Schmittgen 2001) der x-fache Unterschied des mRNA-Expressionsniveaus normalisiert auf das Haushaltsgen und relativ zur Negativkontrolle berechnet. Für die graphische Darstellung wurde die Streuung mit aufgetragen.

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
6- und 12-Well-Platten	TPP, Trasadingen
CO ₂ -Inkubator CB210	Binder, Tuttlingen
Digitalkamera Spot RT Slider	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI
Elektrophoresekammern Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Epifluoreszenzmikroskop Axiovert100	Carl Zeiss
Gel Casting System 20 x 20 cm	Fisher Scientific
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Mannheim
Glasröhrchen 5 ml (75 x 12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Gyro-Rocker® STR9	Stuart Scientific
Konfokalmikroskop Leica DM 2500	Leica Microsystems, Wetzlar
Labsonic U	B. Braun, Melsungen
Lumat LB9501 Tube Luminometer	Berthold
Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories
Neubauer-Zählkammer improved	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Schüttelinkubator 3033	GFL
SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories
StepOnePlus™ system	Invitrogen, Karlsruhe
Stratalinker® UV crosslinker	Stratagene, Waldbronn
Thermal cycler UNO-II	Biometra, Göttingen

Trans-Blot [®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories
Zellkulturschale, 20 cm	TPP, Trasadingen

Tabelle 2: Chemikalien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
5x Puffer	Roche
100 bp DNA Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
AmpliTaqPolymerase, 10x PCR-Puffer	Applied Biosystems, Mannheim
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	REF 11 093 274 910, Roche
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich
Äthanol	Roth, Karlsruhe
Block-Reagenz	REF 11 096 176 001, Roche
BSA (10mg/ml)	New England Biolabs
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CoCl ₂	Roche Diagnostics
Complete und Complete Mini Protease-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics
Dapi (4',6-diamino-2-phenylindole)	Roche
DharmaFECT 1 Reagenz	Dharmacon
DIG-ddUTP	Roche Diagnostics
DMEM + 4500 mg/l Glukose + L-Glutamin-Pyruvat	PAA Laboratories, Cölbe

DNase/RNase freies destilliertes Wasser	Invitrogen
dNTP Set (100 mM)	Invitrogen
EDTA	Roth, Karlsruhe
FBS	Biochrom, Berlin
Filterpapiere	Whatman, Dassel
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formalin	J.T. Baker, München
GeneRuler™ 1 kb DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GoTaq™ DNA Polymerase (5 U/μl)	Promega, Mannheim
Heringsperma DNA (10 mg/ml)	Promega, Mannheim
Hyperfilm™ MP	Amersham Biosciences, München
Immobilon P Transfer Membrane	GE Healthcare, Freiburg
Isopropanolol	Merck, Darmstadt
Laemmli Puffer	Roth, Karlsruhe
LAR II (Luziferase Assay Reagenz II)	Promega, Mannheim
Magermilch	Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	Sigma
NBT/BCIP stock solution	REF 11 681 451 001, Roche
Oligo(dT)15 Primer (0,5 μg/μl)	Promega, Mannheim
One Shot® TOP10 chemically competent E.coli	Invitrogen, Darmstadt
P ³² γATP	MP Biomedicals
Passive Lysis Buffer (PLB)	Promega, Mannheim
PBS	PAA Laboratories, Cölbe

pCB6+	Promega, Mannheim
Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom
pGL3basic Reporter Plasmid	Promega, Mannheim
Poly[d(I-C)]	Roche
Protein Assay Reagenz	Bio-Rad
Protein G Agarose	Millipore, Schwalbach
Protran [®] Nitrocellulose Membran 0,2 µm	Whatman
Renilla-Substrat	Promega
Reporter Lyse Puffer	Promega
Restriktionsenzyme NheI, XhoI	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Polymerase II	Santa Cruz Biotechnologies
Schnelle alkaline Garnelen-Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
SDS	Sigma-Aldrich
siRNAs	Dharmacon, Thermo Fisher Scientific
Stop and Glow Buffer	Promega, Mannheim
Superscript [™] II reverse Transkriptase, 5x Erststrangpuffer, 0,1 M DTT	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green Master Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	New England Biolabs
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µl)	New England Biolabs
TEMED	Roth, Karlsruhe
terminale Transferase	Roche
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Universal Agarose	peQlab, Erlangen
Vectashield [®] mounting medium	Vector Laboratories, Inc., H-1000

Western Lightning Plus ECL reagent	PerkinElmer Life Sciences, Rodgau
------------------------------------	-----------------------------------

Tabelle 3: kommerzielle Kits

Kommerzielle Kit-Systeme	Hersteller
ChIP-Assay-Kit (#17-295)	Upstate, Lake Placid, New York
DNA 3'DIG Labeling Kit	Roche
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
Expand Long template PCR System	Roche
MinElute™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MinElute™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasyMicroKIT	Qiagen, Hilden

Tabelle 4: Pufferzusammensetzungen

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Ampicillin-Agarplatten	LB-Medium ; 15g/l Agarose ; 100 µg/ml Ampicillin
5x Bindungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM KCl; 250 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ ; 5 mM EDTA
1x Blottingpuffer	10 mM 6-Aminohexansäure; 10% (v/v) Methanol
5x DNA-Ladepuffer	42,5% (v/v) Glyzerin ; 0,25% (w/v) Bromphenolblau

Elutionspuffer	1% SDS; 0,1 M NaHCO ₃
EMSA Reaktionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 ; 50 mM KCl ; 50 mM NaCl ; 1 mM MgCl ₂ ; 1 mM EDTA ; 5 mM DTT ; 5mM Phenylmethylsulfonylfluorid
EMSA Waschpuffer MABT	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3 % (v/v) Tween 20; pH 7,5
HEBS 2x Puffer	16,4 g NaCl (0,28 M final) ; 11,9 g HEPES (0,05 M final); 0,21 g Na ₂ HPO ₄ (1,5 M final); pH 7,05
High Salt Waschpuffer	0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 8,1; 500 mM NaCl
Immunopräzipitationspuffer	0,01% SDS; 1,1% Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl, pH 8,1
LB-Medium	Für 1 Liter: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl
LiCl Waschpuffer	0,25 M LiCl; 1% NP-40; 1% Natriumdesoxycholat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,1
Löschungslösung	1x PBS; 50mM NH ₄ Cl
Low Salt Waschpuffer	0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 8,1; 150 mM NaCl
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH 7,5
NBT/BCIP Entwicklungspuffer	0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; pH 9,5
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,2 K ₂ HPO ₄ ; pH 7,3
Polyacrylamidgel 6%	0,5x TBE-Puffer; 6% Acrylamid/Bisacrylamid; 0,05 % TEMED; 0,075 % APS
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1% (w/v) SDS; pH 8,3
5 x TBE	54 g/l Tris-HCl; 27,5 g/l Borsäure; 10 mM

	EDTA
1x TBS	30 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl
TBST-Puffer	20 mM Tris-Base; 137 mM NaCl; 0,05% Tween 20; pH 7,6
TE-Puffer	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7,4 oder 8,0

Tabelle 5: Primer

Primer	Sequenz (5' – 3')	Restriktionsstellen
Gata4_ChIP-fwd	AATGCTAGCGGTCCTTAGGAGCTGAGCTT	
Gata4_ChIP-rev	GCTTCCCACCCTCCTCTG	
Amhr2_ChIP-fwd	CAGCTGGACAGCCAAGGTC	
Amhr2_ChIP-rev	CAGCCAAGCTTCCTACAAA	
β -actin_ChIP-fwd	ATAGGACTCCCTTCTATGAGC	
β -actin_ChIP-rev	5'-TCCACTTAGACCTACTGTGCA-3'	
Gata4_PCR-fwd	GATGGGACGGGACACTACCTG	
Gata4_PCR-rev	ACCTGCTGGCGTCTTAGATTT	
Gapdh_PCR-fwd	ACGACCCCTTCATTGACCTCA	
Gapd_PCR-rev	TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG	
Rojas-FW	AATGCTAGCGTGGTCATCCACAGGCCTTT	NheI
Rojas-RW	AATCTCGAGCCTCTCTATCCCCATCCTCA	XhoI
Rojas2-FW	CATGCTAGCAGCTCTCTAAAGACAAGGGC	NheI
Rojas2-RW	AATCTCGAGGGCCCTTGTCTTTAGAGAGC	XhoI
Rojas3-FW	AATGCTAGCGGTCCTTAGGAGCTGAGCTT	NheI
Rojas3-RW	GGTCTCGAGTGCAGGGATTGCTTCTGGA	XhoI

Rojas4-FW	GGTGCTAGCTCCAGAAGCAATCCCTGCA	NheI
Rojas5-FW	GCGGCTAGCTGCAACACAAAAAGCACAGA	NheI
Rojas6-FW	GTAGCTAGCCTGCAAGCGTGTATAGGAAG	NheI
Gata4_prom-fwd	ATTCTCGAGCGCTCGCAGCAGTCA	
Gata4_prom-rev	GTCAAGCTTCTGGCCAGCTCCAGT	

Tabelle 6: Oligonukleotide (synthetisch von Eurofins bezogen)

Oligonukleotide	Sequenz (5' – 3')
GS2-sense	CCTTCAGGGGAAGCTGGCTCCCTGTGACAT
GS2-antisense	ATGTCACAGGGAGCCAGCTTCCCCTGAAGG
GS3-sense	ATCCCTGCAGGCAGGGGGCCTGGGGGAAAG
GS3-antisense	CTTTCCCCCAGGCCCCCTGCCTGCAGGGAT
GS4-sense	GGTCAGGGAATAAGGAAATGAGGATGGGGA
GS4-antisense	ATCCCTGCAGGCAGGGGGCCTGGGGGAAAG
Epo-R-sense	GAGTGCTGGCCCCGCCCCCTCGGGG
Epo-R-antisense	CCCCGAGGGGGCGGGGCCAGCACTC

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Katalognummer/Hersteller
Kaninchen anti-WT1 polyklonaler AK (C-19)	sc-192, Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen Anti-Histon H3 polyklonaler AK	07-690, Millipore
Normales Kaninchen IgG	sc-2027, Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen anti-Wt1 AK (N-180)	Santa Cruz Biotechnology
Ziegen anti-GATA4 polyklonaler AK (C-20)	sc-1237, Santa Cruz Biotechnology

Cy2-AffiniPure Esel anti-Kaninchen IgG	711-165-152, Jackson ImmunoResearch
Cy3-AffiniPure Esel anti-Ziegen IgG	705-225-147, Jackson ImmunoResearch
Maus anti-Aktin monoklonaler AK, Klon C4	MAB1501R, Millipore
Esel anti-Kaninchen polyklonaler AK-HRP	sc-2313, Santa Cruz Biotechnology

Tabelle 8: Plasmide

Nummer	Plasmidbeschreibung	Bedeutung
p9	p-mWt1 C130	WT1(-KTS)
p10	p-mWt1 C132	WT1(+KTS)
p99	pCB6+	Leervektor für WT1
p265	pGL3basic	Leervektor für Gata4- Expressionsplasmide
p291	pGL3prom	Leervektor für Gata4- Expressionsplasmide
p292	p-RL-TK	Renilla-Luziferase Plasmid
p620	pGI3basicGata4promF2/R1	Verkürztes Gata4-Promotor Konstrukt
p621	pGL3promGata4F2/R1 δ SacI	Verkürztes Gata4-Promotor Konstrukt
p633	p-mRojas-FW1/RW1	Komplettes Gata4-Enhancer Konstrukt (904 bp)
p634	pGI3promGata4enhancer	Komplettes Gata4-Promotor Konstrukt
p722	p-mRojas-FW2/RW1	Verkürztes Gata4-Enhancer Konstrukt (450 bp)
p723	p-mRojas-FW1/RW2	Verkürztes Gata4-Enhancer Konstrukt (475 bp)

p731	p-mRojas-FW3/RW1	Verkürztes Gata4-Enhancer Konstrukt (222 bp)
p766	p-mRojas-FW4/RW1	Verkürztes Gata4-Enhancer Konstrukt (89 bp)
p788	p-mRojas-FW5/RW1	Verkürztes Gata4-Enhancer Konstrukt (168 bp)

5. Ergebnisse

5.1 WT1 ist für eine normale Expression von *Gata4* in Herz und Gonaden erforderlich

Experimentelle Arbeiten und klinische Beobachtungen deuten darauf hin, dass die beiden Transkriptionsfaktoren WT1 und GATA4 teilweise synergistische Funktionen in der Entwicklung von Herz und Gonaden ausüben (Kreidberg et al. 1993, Mundlos et al. 1993, Morrissey et al. 1996, Viger et al. 1998, Moore et al. 1999, Tevosian et al. 2002, Watt et al. 2004). Dies wirft die Frage auf, ob zwischen beiden Faktoren eine direkte Beziehung, z.B. im Sinne einer wechselseitigen Beeinflussung ihrer Expression, besteht.

Um zu überprüfen, ob WT1 für eine normale *Gata4* Expression während der Mausembryogenese erforderlich ist, wurde der *Gata4* mRNA Gehalt in verschiedenen Geweben von normalen und *Wt1*-defizienten Mausembryonen mittels qRT-PCR nach der SYBR-Green Methode vergleichend bestimmt. Es wurden jeweils 5 Wildtyp-Embryonen (*Wt1*^{+/+}) und ihre Wurfgeschwister mit homozygotem *Wt1*-Gendefekt (*Wt1*^{-/-}) zum Zeitpunkt E12,5 untersucht. Die gemessenen *Gata4* mRNA Werte wurden gegen die Transkripte des Haushaltsgens β -Aktin abgeglichen und nach der Gleichung $2^{-\delta\delta Ct}$ quantifiziert (Schmittgen und Livak 2001). Die in den Organen von Wildtyp-Mäusen ermittelten normalisierten Werte der *Gata4* mRNA Expression liegen entsprechend der $\delta\delta Ct$ -Methode (Schmittgen und Livak 2001) bei „1“. Im Vergleich zu den Gonadenanlagen von Wildtyp Embryonen war der *Gata4* mRNA Gehalt in *Wt1*-defizienten Mäusen der jeweiligen Wurfgeschwister um über 80% reduziert (Abb. 4). In den Herzen der *Wt1*^{-/-} Embryonen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der *Gata4* mRNA um ca. 40%. In den Lebern wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Diese Resultate dokumentieren, dass WT1 für eine normale Expression von *Gata4* in den sich entwickelnden Gonaden und Herzen notwendig ist.

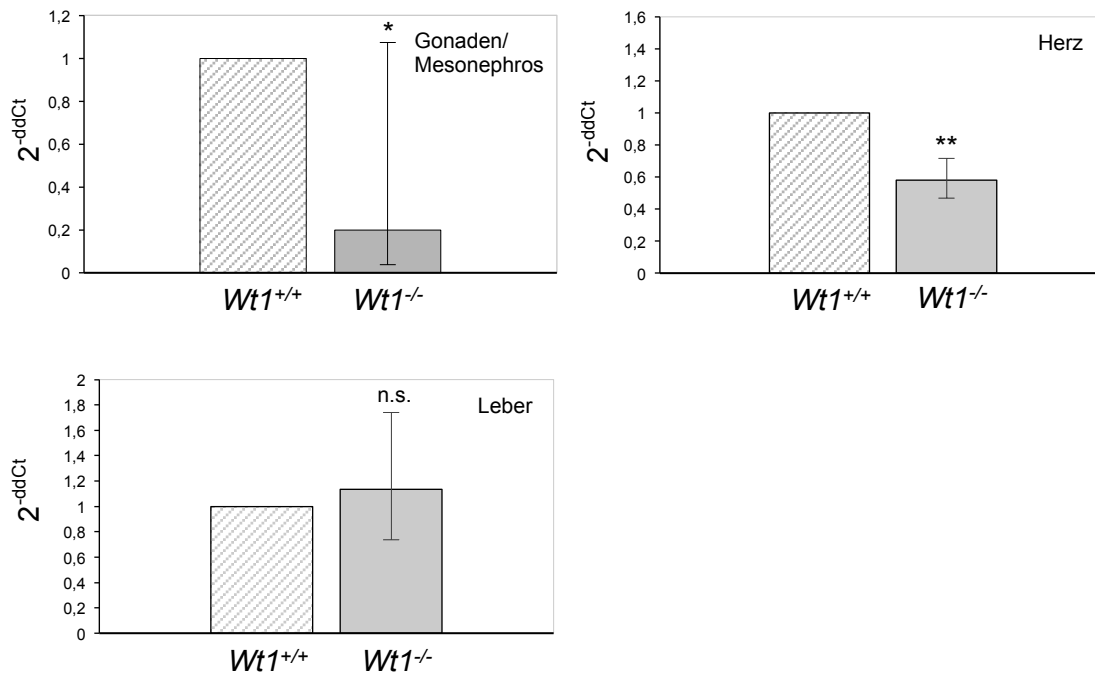


Abbildung 4: *Gata4* mRNA Gehalt in Organen von Mausembryonen mit Wildtyp (*Wt1*^{+/+}) bzw. homozygot deletierten (*Wt1*^{-/-}) *Wt1*-Allelen. Die mRNA-Quantifizierung erfolgte durch qRT-PCR nach der 2^{-ddCt}-Methode unter Bezug auf das Haushaltsgen β -Aktin. Die bei Mausembryonen vom Wildtyp gemessenen Werte liegen definitionsgemäß bei 1. Dargestellt wird die Streuung des x-fachen Unterschieds. t-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 5$. n.s., nicht signifikant.

5.2 WT1 und GATA4 werden im Herz und in den Gonaden von Mausembryonen überlappend exprimiert

Um das Verteilungsmuster der WT1 und GATA4 Proteine zu untersuchen, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Mausembryonen (E12,5) und von den Gonaden adulter Wildtyp Mäuse durchgeführt. Die Darstellung von GATA4 Protein erfolgte unter Verwendung eines rot fluoreszierenden Cy3-konjugierten Sekundärantikörpers, während WT1 mit einem grün fluoreszierenden Cy2-Konjugat nachgewiesen wurde. Im Falle einer Kolo-kalisation beider Proteine resultiert nach Überlagerung ein gelbes Fluoreszenzsignal. Im embryonalen Mauserherzen wird GATA4 sowohl im Epikard als auch in den Kardiomyozyten exprimiert (Abb. 5B, D). Hingegen ist WT1 ausschließlich in epikardialen Zellen nachweisbar (Abb. 5C, D). Bei Verwendung von Normalseren anstelle spezifischer Antikörper wurde kein Fluoreszenzsignal beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Eine Kolokalisation von GATA4 und WT1 wurde in den Kernen der Sertolizellen des ausdifferenzierten Hodens beobachtet (Abb. 5F-H). Auch in den folliculären Granulosazellen des Mausovars sind beide Proteine nukleär kolokalisiert (Abb. 5J-L).

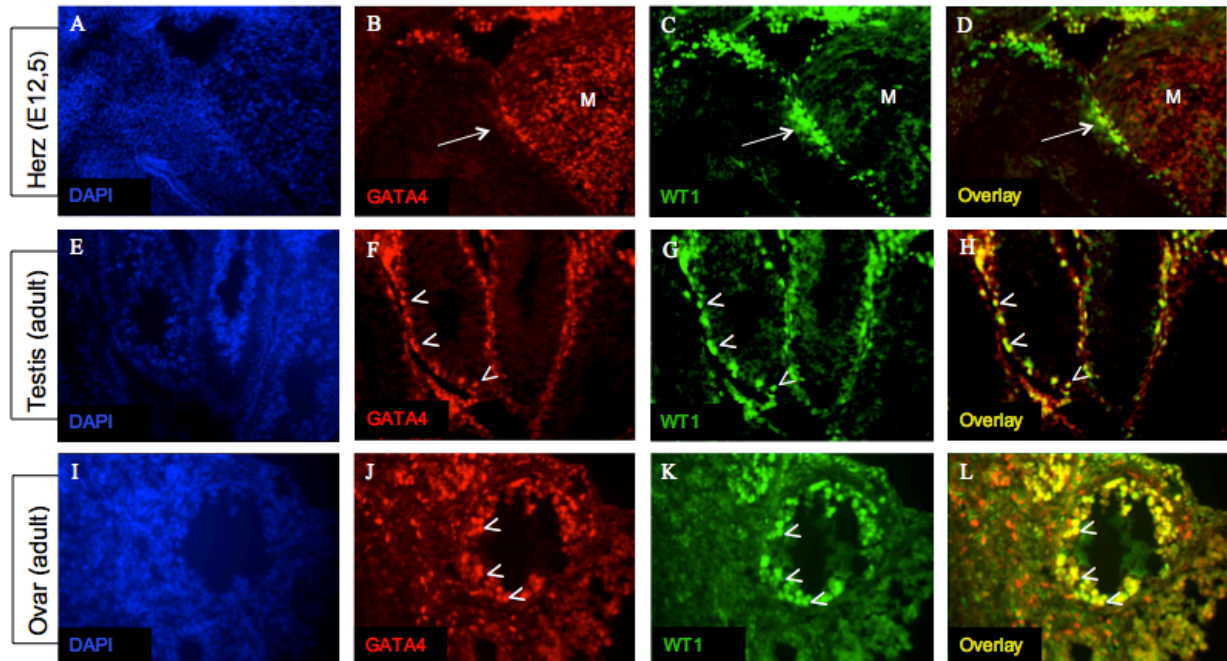


Abbildung 5: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von GATA4 und WT1. Beide Proteine werden im embryonalen Epikard (→) exprimiert, GATA4 zusätzlich in den Kardiomyozyten (B-D). In den Gonaden adulter Mäuse sind beide Proteine in den Sertolizellen des Testis (F-H) bzw. in den Granulosazellen des Ovars (J-L) nukleär kolokalisiert (>). M, Myokard. DAPI-Kernfärbungen (A, E, I).

5.3 WT1 stimuliert die Expression von GATA4

Die *Gata4* mRNA Expression ist in den Herzen und Gonadenanlagen von Mäusen mit *Wt1*-Gendefekt signifikant verringert (Abb. 4), und beide Proteine zeigen in den Wildtypen ein überlappendes zelluläres Verteilungsmuster (Abb. 5). Somit stellt sich die Frage, ob WT1 die *Gata4* Expression unmittelbar oder indirekt reguliert. Um den Zusammenhang von WT1 und GATA4 näher zu untersuchen, wurden M15-Zellen verwendet, die ursprünglich aus der Mesonephros/Gonaden-Region von transgenen Mäusen isoliert wurden (Larsson et al. 1995) und beide Proteine exprimieren. Zur Hemmung der WT1 Expression wurden die M15-Zellen simultan mit vier verschiedenen siRNAs gegen *Wt1* transfiziert. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion mit siRNAs ohne Zielsequenz im Mausgenom (non-targeting siRNA). Es wurden 5 unabhängige Transfektionsexperimente jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Im Western Blot zeigte sich eine effiziente Hemmung der WT1 Expression nach Transfektion von M15-

Zellen mit gepoolten siRNAs (Abb. 6B). Die Hemmung der WT1 Expression verursachte eine Abnahme der *Gata4* mRNA um ca. 50% (Abb. 6A) sowie einen deutlichen Rückgang von GATA4 Protein (Abb. 6B). Diese Ergebnisse zeigen, dass WT1 für eine normale Expression von GATA4 in M15 Zellen erforderlich ist.

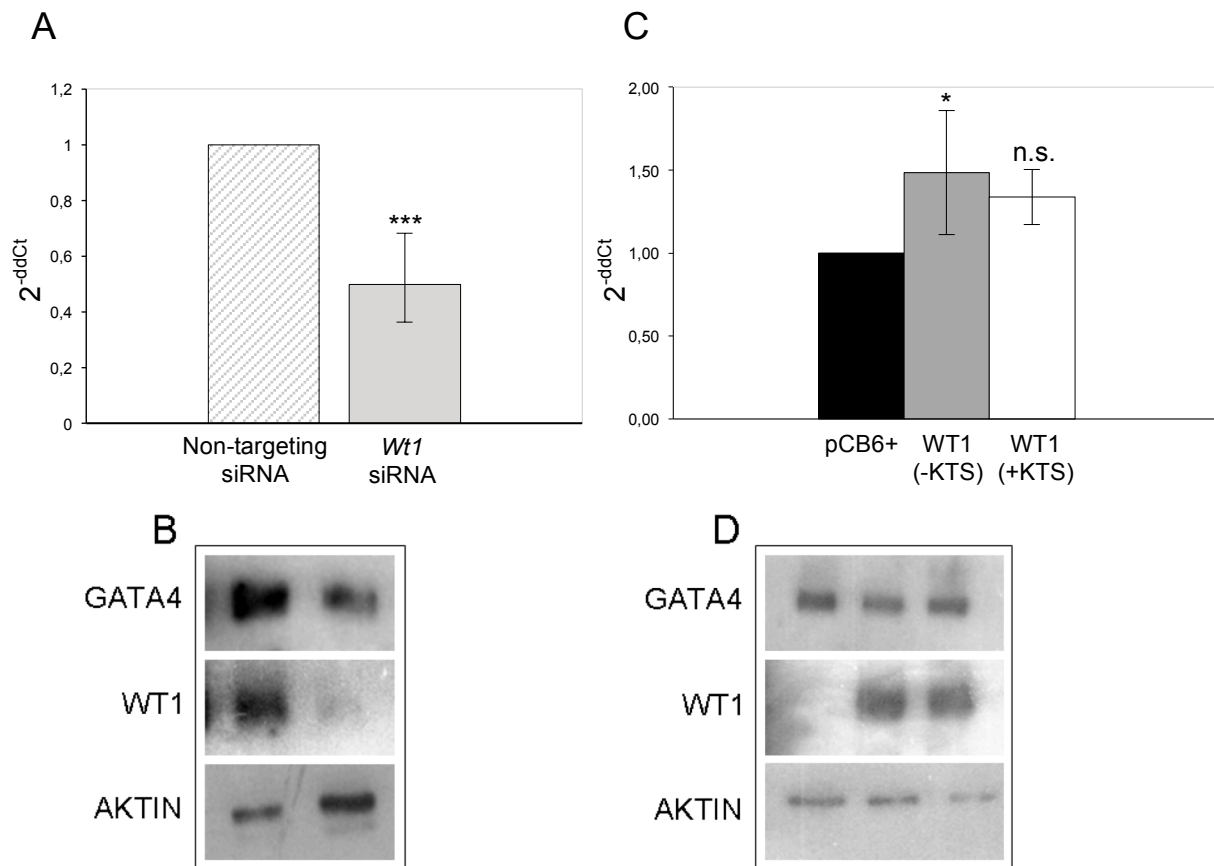


Abbildung 6: WT1 stimuliert die Expression von GATA4. M15 Zellen (A, B) wurden mit siRNA gegen *Wt1* transfiziert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Western Blot (B), *Gata4* mRNA wurde durch qRT-PCR quantifiziert (A). Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion der M15-Zellen mit non-targeting siRNA. Die WT1(-KTS) und WT1(+KTS) Isoformen wurden in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) überexprimiert (C, D). Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion mit Leervektor (pCB6⁺). Die Proteine wurden mittels Western Blot nachgewiesen (D), die Quantifizierung der *Gata4* mRNA geschah durch qRT-PCR (C). Dargestellt ist der x-fache Unterschied sowie die Streuung. * $p < 0,05$, *** $p < 0,005$, $n = 5$. n.s., nicht signifikant.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Überexpression von WT1 die Expression von GATA4 in einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) stimuliert. Für die Versuche wurden HEK293-Zellen verwendet, da diese eine vergleichsweise geringe endogene WT1 Expression aufweisen. Transfektion mit der WT1(-KTS) Variante bewirkte eine signifikante ($p < 0,05$), ca. 1.5-fache Zunahme der *Gata4* mRNA in HEK293 Zellen, während die WT1(+KTS) Isoform keinen signifikanten Einfluss hatte

(Abb. 6C). Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion mit Leervektor (pCB6⁺). Im Western Blot waren keine Veränderungen von GATA4 Protein in HEK293-Zellen mit und ohne WT1 Überexpression erkennbar (Abb. 6D).

5.4 Die stimulierende Wirkung von WT1 auf die *Gata4* Expression wird nicht durch den *Gata4* Promotor vermittelt

Die gezeigten Resultate (Abb. 4-6) deuten darauf hin, dass WT1 die Expression von *Gata4* stimuliert. Um den zugrundeliegenden Regulationsmechanismus zu analysieren, wurde zunächst überprüft, ob der Promotor des *Gata4* Gens durch WT1 induzierbar ist. Hierzu wurden Firefly-Luziferase Konstrukte, die zwei 2361 bzw. 464 Basenpaare lange Fragmente des murinen *Gata4* Promotors enthielten, in HEK293-Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte gemeinsam mit der als Transkriptionsfaktor wirksamen WT1(-KTS) Isoform. Zur Kontrolle wurde ein leeres Reporterplasmid (pGL3basic) bzw. leerer Expressionsvektor (pCB6⁺) transfiziert. Zum Abgleich der Transfektionseffizienzen erfolgte die Kotransfektion eines Renilla-Luziferaseplasmids. Die Experimente wurden jeweils als Doppelansätze durchgeführt, aus denen die Durchschnittswerte errechnet wurden. Abbildung 7 zeigt die Resultate aus fünf voneinander unabhängig vorgenommenen Transfektionen. Hierbei wurde die Grundaktivität des jeweiligen Reporterkonstruktes in Gegenwart des Leervektors (pCB6⁺) auf 1 normiert. Es zeigt sich, dass die Aktivitäten der beiden *Gata4* Promotorkonstrukte durch Kotransfektion von WT1(-KTS) nicht signifikant beeinflusst wurden (Abb. 7).

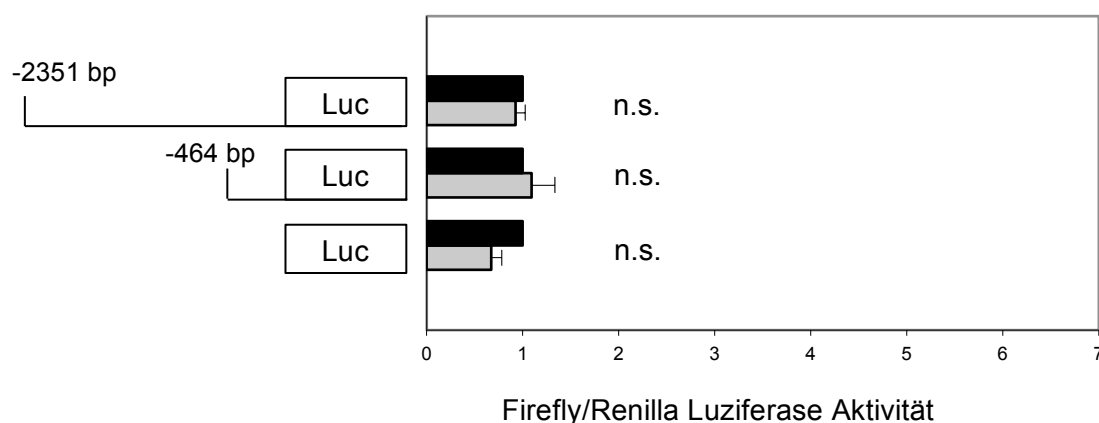


Abbildung 7: Fehlender Einfluss der WT1(-KTS) Variante auf den murinen *Gata4* Promotor. Zwei unterschiedlich lange Promotorkonstrukte (2351 bzw. 464 bp) bzw. pGL3basic Leervektor (Luc) wurden gemeinsam mit einem WT1(-KTS) Expressionsplasmid (grauer Balken) oder pCB6⁺ Leervektor (schwarzer Balken) in HEK293-Zellen transient kotransfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurde zusätzlich ein Renilla Luziferase Plasmid transfiziert. Angegeben ist das Verhältnis aus Firefly zu Renilla Luziferaseaktivität, wobei die Aktivitäten mit dem pCB6⁺ Leervektor auf 1 gesetzt wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind das Ergebnis aus 5 unabhängigen Transfektionsexperimenten in Doppelansätzen. n.s., nicht signifikant (gepaarter *t*-Test).

5.5 WT1 transaktiviert den mesodermalen *Gata4*-Enhancer

5.5.1 Subklonierung verschieden langer Fragmente aus dem mesodermalen *Gata4*-Enhancer

Die molekularen Mechanismen, die für eine gewebespezifische Expression von GATA4 während der Embryonalentwicklung verantwortlich sind, werden zurzeit intensiv untersucht. Mittels Sequenzanalyse konnten im *Gata4* Genlocus von Mensch und Maus mehrere konservierte, nicht kodierende Bereiche identifiziert werden (G1-G5, Abb. 8A). Untersuchungen an transgenen Mäusen ergaben, dass der 4368 Basenpaare umfassende Bereich G2 für die gewebespezifische GATA4 Expression im lateralen Mesoderm notwendig ist (Rojas et al. 2005). Aus dem lateralen Mesoderm gehen u.a. das Epi-/Perikard sowie Pleura und Peritoneum hervor, die allesamt WT1 exprimieren. Die G2 Region ist im *Gata4* Gen der Maus zwischen 45.3 and 40.9 Kilobasen 5' zur Transkriptionsstartstelle lokalisiert. Innerhalb des G2 Elements wurden durch Vergleich der Sequenzen von Maus und Opossum drei hochkonservierte Regionen (CR1-CR3, Abb. 8B) entdeckt, von denen das ca. 0,7 Kilobasen lange CR2 Element für eine transgene Expression im lateralen Mesoderm und den daraus abgeleiteten Geweben ausreichend war (Rojas et al. 2005).

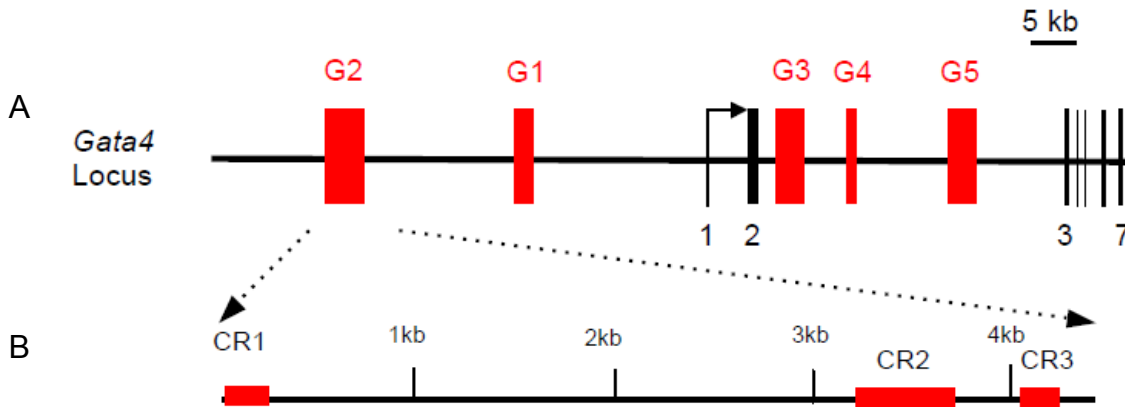


Abbildung 8: Muriner *Gata4*-Locus (A). Dargestellt sind die fünf konservierten Bereiche in den nicht kodierenden Abschnitten des *Gata4* Gens (G1-G5), sowie die sieben Exons. Der rechteckige Pfeil markiert den Transkriptionsstartpunkt. Der ca. 40 kbp 5' zum Transkriptionsstart gelegene distale Enhancer G2 ist für eine Expression im lateralen Mesoderm notwendig. In (B) wird G2 mit den drei hochkonservierten Regionen CR1-CR3 genauer dargestellt. Die ca. 0,7 kb lange CR2 Region ist für die Expression im lateralen Mesoderm ausreichend (nach Rojas et al. 2005).

```

CGTGGTCATCCACAGGCGCTTTAGAACACACACACACACACACACACACTTGAGCATAACACA
CGTGAGCGCTCTCTCGCACGTGCACACACATATAGGCACATACGCATGCACACAGGCACACA
CGCATGCACACAGGCACATACGCACATACGCATGCAAGACAGTGTGGTCCACACCTAAGTTGC
AGATAAAGCTGAAGGAAGCCTGTGAATGAATCTGTAGATAAAAACTCCAGTATCTGGGCAGGT
AACACCCAATGACAACAGAGCTGTGTTGACTTACGCTTTTCCTTATCGGAGGGAATCAGGTAT
TCGTGTAATCAGAAAAGGATTTGATGGATGCCAGCTCATTGGTGTCTCTAGCCAATAGACAG
GTTTGGTTAAACAAAATATATATTCTCCATTATCTCCAGTGGCGACTATCACTACAACCTCCCCC
TCCCCTCTCCTCCAAGCTCTCTAAAGACAAGGGCCATTATCTGGAGCTTGTAAGAGTTTCATGG
CTTGCAAGGCTCTGCTGAAATCACTCTGACAATGTGCAACCCAGGCCAGCCGAGTCATTGT
GGCAGACAGATGAGCCCTGCATTATCTCTACTGTCTTGGCAATAAACCCCTTTTCTGAAGATG
CTTGTTTAGACTACCCAGGGGAAGGCCAGGTACCAGCTCCCTCAGTGGGAGGGGTCCTTAG
GAGCTGAGCTTCTACAGATGTCTGCTGAGCTGTTTCAAGTTGGGAGGTGCAACACAAAAAGCA
CAGATCCTCAGGGGAAGCTGGCTCCCTGTGACATAGACTGCAAGCGTGTATAGGAAGGAAAA
TTCCAGAAGCAATCCCTGCAGGCAGGGGGCCTGGGGGAAAGTAGGAAGTATTGGTCAGGGA
ATAAGGAAATGAGGATGGGGATAGAGAGG

```

Abbildung 9: Nukleotidsequenz des mesodermalen *Gata4* Enhancers (schwarz) mit den bekannten Bindungsstellen von Fox-, Smad- und Gata- Transkriptionsfaktoren sowie die komplette Sequenz des ca. 900 bp großen Plasmids p633 (zusätzlich rot markierte Nukleotide) nach Rojas et al. 2005.

Um zu überprüfen, ob der mesodermale *Gata4* Enhancer durch WT1 reguliert ist, wurde zunächst die CR2 Region kloniert und in den pGL3basic Reportervektor ligiert (Nukleotidsequenz in Abb. 9, Plasmid p633 in Abb. 10). Danach wurden unter Verwendung von p633 als DNA Template unterschiedlich lange Enhancerfragmente mittels PCR amplifiziert und in pGL3basic ligiert (Abb. 10). In Kotransfektionsexperimenten wurde untersucht, ob die verschiedenen Reporterkonstrukte durch WT1 induzierbar sind.

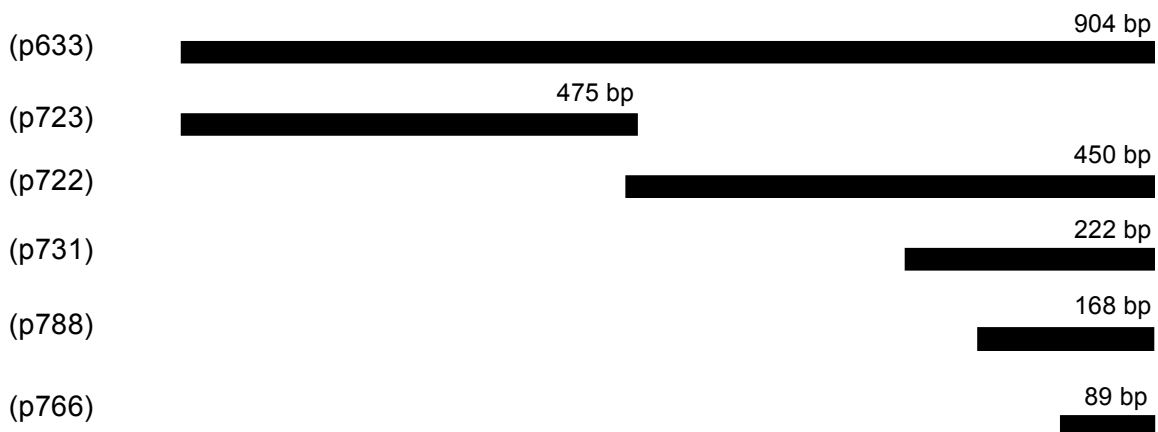


Abbildung 10: Darstellung der in den Reporterassays verwendeten *Gata4* Enhancerbereiche. Alle *Gata4* Sequenzen wurden in den pGL3basic Reportervektor ligiert. Das Plasmid p633 enthält den vollständigen Enhancer.

5.5.2 WT1 aktiviert den murinen *Gata4* Enhancer

Um zu ermitteln, ob WT1 den mesodermalen *Gata4* Enhancer reguliert, wurden die verschiedenen Reporterkonstrukte gemeinsam mit der WT1(-KTS) Isoform in HEK293-Zellen kotransfiziert. Die Transfektionen (n=5) erfolgten jeweils als Doppelansätze unter Verwendung der beiden Leervektoren pGL3basic und pCB6⁺ als Negativkontrollen. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurden die Zellen zusätzlich mit einem Renilla-Reporterplasmid kotransfiziert. Die Kotransfektion von WT1(-KTS) bewirkte eine ca. 4-fache Aktivitätszunahme von p633 ($p < 0.05$), das den kompletten *Gata4* Enhancer enthielt (Abb. 11). Ebenfalls aktiviert wurden das 450-bp Konstrukt (p722) und signifikant das 222-bp (p731) Konstrukt. Hingegen wurde der pGL3basic Leervektor (LUC) durch WT1(-KTS) nicht signifikant stimuliert (Abb. 11). Mit Hilfe dieser

Reporterassays lässt sich der WT1-sensitiv Bereich im untersuchten *Gata4* Enhancer auf eine ca. 50 Basenpaare lange Sequenz eingrenzen (vgl. p731 und p788).

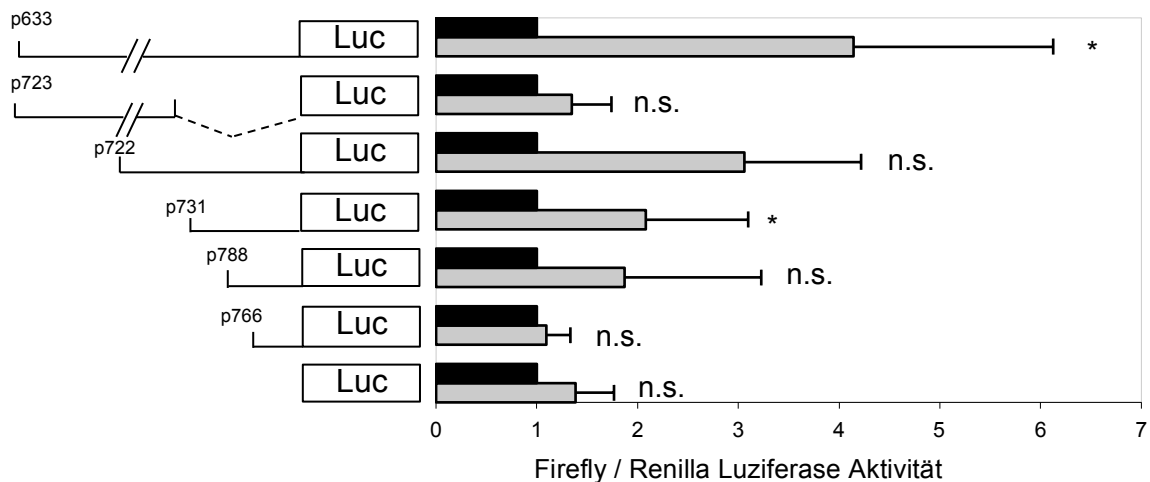


Abbildung 11: Regulation des murinen *Gata4* Enhancers durch die WT1(-KTS) Isoform. HEK293-Zellen wurden mit unterschiedlich langen Reporterkonstrukten und einem Expressionsplasmid für die WT1(-KTS) Isoform (graue Balken) kotransfiziert. Als Negativkontrolle erfolgte die Transfektion mit pCB6⁺ Leervektor (schwarze Balken). Zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurde mit einem Renilla-Luziferase-Reporterplasmid kotransfiziert. Dargestellt ist das Verhältnis von Firefly zu Renilla Luziferaseaktivität, wobei die mit dem pCB6⁺ Leervektor erzielten Aktivitäten jeweils auf 1 gesetzt sind. Mittelwerte und Standardabweichungen aus n=5 Experimenten in Doppelansätzen. **p*<0.05, n.s.: nicht signifikant (gepaarter *t*-Test).

5.6 WT1 Protein bindet an den mesodermalen *Gata4* Enhancer

Die Bindung des WT1 Proteins an den mesodermalen *Gata4* Enhancer wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) untersucht. Mit Hilfe dieser Technik können Protein-DNA Interaktionen in Zellen bzw. Geweben nachgewiesen werden. Für die Experimente wurden M15 Zellen aus dem Mesonephros der Maus verwendet, die als eine der wenigen verfügbaren Zelllinien ein robustes WT1 Expressionsniveau aufweisen (Abb. 6). Die Immunpräzipitation wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen WT1 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Immunglobulin G von Kaninchen verwendet, als Positivkontrolle diente die Präzipitation mit einem gegen Histon gerichteten Antikörper. Die PCR der präzipitierten DNA wurde mit Primern durchgeführt, welche die vermuteten WT1-Bindungsstellen im mesodermalen Enhancer flankieren. Um den Erfolg der Immunpräzipitation zu überprüfen, wurde zur Kontrolle eine Sequenz

aus dem Promoter des anti-Müller Hormon 2 Rezeptor Gens (*Amhr2*), einem bekannten WT1 Zielgen, amplifiziert (Klattig et al. 2007a).

Abbildung 13 zeigt die Anreicherung von amplifizierter DNA in den Immunpräzipitaten im Vergleich zur Verwendung von Normalseren. Präzipitation mit dem WT1-Antikörper bewirkt eine signifikante ($p < 0,05$), 2,5-fache Anreicherung der *Gata4* Enhancer DNA sowie eine ebenfalls signifikante ($p < 0,05$), ca. 1,8-fache Zunahme der *Amhr2* Promotor DNA. Im Vergleich hierzu verursacht die Präzipitation mit einem anti-Histon Antikörper eine ca. 80-fache Zunahme der präzipitierten DNAs.

Diese Resultate zeigen, dass WT1-Protein bei intakter zellulärer Chromatinstruktur an den mesodermalen *Gata4* Enhancer bindet.

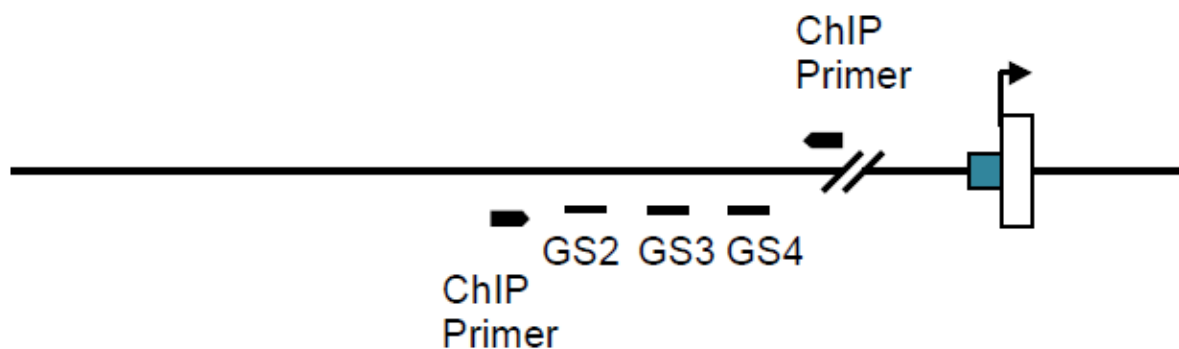


Abbildung 12: Schema des durch die entsprechenden Primer zu amplifizierenden ca. 220 bp langen *Gata4* Enhancers ca. 40 kbp antegrad des als graue Box dargestellten Promotors sowie des als weiße Box dargestellten ersten Exons mit dem Transkriptionsstartpunkt markiert durch den Pfeil in 5'-3'-Richtung. Mit GS2-4 sind die verschiedenen synthetischen Oligonukleotide benannt, die im Bereich der potentiellen WT1-Bindungsstellen liegen.

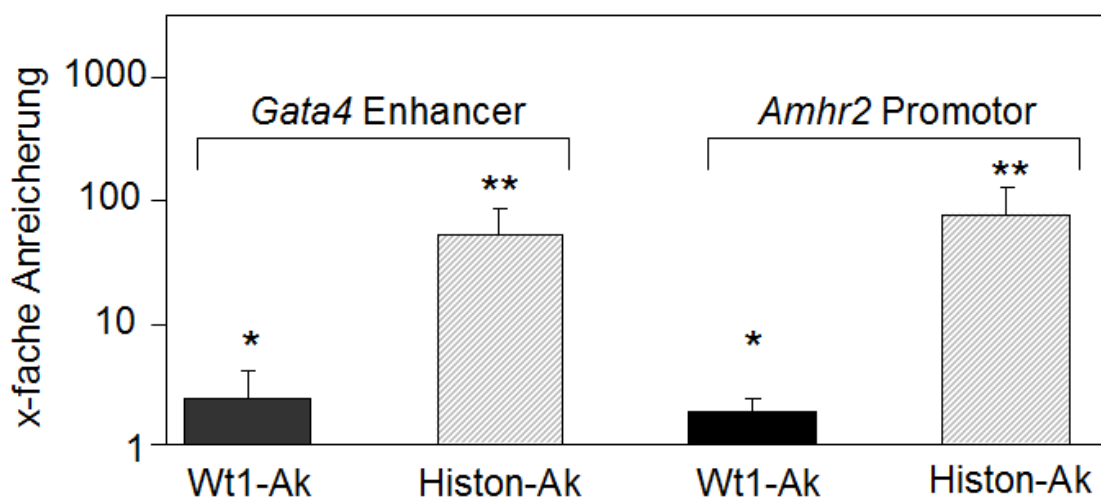


Abbildung 13: ChIP-Assay zum Nachweis einer Bindung von WT1 an den *Gata4* Enhancer. Die Immunpräzipitationen wurden mit Antikörpern (AK) gegen WT1 und Histon durchgeführt. Als Kontrolle wurden anstelle spezifischer Antikörper die entsprechenden Normalseren verwendet. Die Darstellung zeigt die x-fache Anreicherung amplifizierter DNA in den Immunpräzipitaten im Vergleich zu den Serumkontrollen, die auf „1“ gesetzt wurden. Als Positivkontrolle diente der Promotor des Anti-Müller-Hormon-Rezeptor 2 Gens, einem bekannten WT1-Zielgen (Klattig et al. 2007a). Mittelwerte \pm Standardabweichungen. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, $n = 6$.

Mit Hilfe der Reporterassays konnte der WT1-sensitive Bereich im *Gata4* Enhancer auf eine aus ca. 50 Basenpaaren bestehende Sequenz eingegrenzt werden (Abb. 11). In dieser Region befindet sich ein GC-reiches Element (GS2) mit Homologie zu bekannten WT1 Bindungsstellen (Abb. 12). Mittels Elektrophoresemobilitätsshiftassay (EMSA) wurde untersucht, ob WT1 Protein diese Sequenz bindet. Hierzu wurde das 30 bp lange, doppelsträngige GS2 Oligonukleotid mit Digoxigenin markiert und mit der WT1(-KTS) Isoform inkubiert. Als Negativkontrolle erfolgte die Inkubation der Oligonukleotidsonde mit Reaktionspuffer, d.h. in Abwesenheit von WT1(-KTS). Zur Überprüfung des EMSA wurde ein Oligonukleotid aus dem proximalen Promotor des Erythropoietinrezeptorgens (Epo-R) verwendet. Dieses Oligonukleotid enthält eine nachgewiesene WT1-Bindungsstelle (Kirschner et al. 2008). Der EMSA zeigt eine deutliche Retardationsbande des mit WT1(-KTS) inkubierten GS2 Oligonukleotids (Abb. 14, Spur 4). Eine Interaktion mit WT1(-KTS) wurde auch für die Epo-R Sonde nachgewiesen (Abb. 14, Spur 2), wohingegen die Kontrollen ohne Protein keine Retardationsbanden zeigten (Abb. 14, Spuren 1 und 3). Diese Resultate dokumentierten, dass WT1(-KTS) Protein an das GS2 Element im mesodermalen *Gata4* Enhancer bindet.

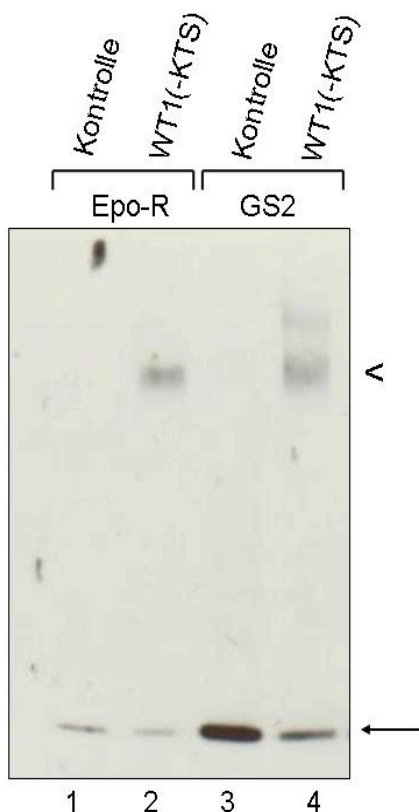


Abbildung 14: Elektrophoresemobilitätsshiftassay (EMSA) zum Nachweis einer WT1(-KTS) Proteinbindung an das GS2 Element im mesodermalen *Gata4* Enhancer. Die Digoxigenin markierten Oligonukleotid-Sonden wurden mit rekombinantem WT1(-KTS) Protein bzw. mit Reaktionspuffer (Kontrollen) inkubiert und anschließend in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde ein Oligonukleotid aus dem Promotor des Erythropoietinrezeptorgens mit bekanntem WT1 Bindungsmotiv verwendet. Die Retardationsbanden zeigen eine Bindung von WT1(-KTS) an GS2 bzw. die Oligonukleotidsequenz aus dem *Epo-R* Promotor an (<). Der Pfeil markiert die freien, nicht-gebundenen Sonden.

6. Diskussion

Die beiden Zinkfingertranskriptionsfaktoren GATA4 und WT1 sind für die normale Embryogenese, insbesondere für die Entwicklung von Herz und Gonaden, erforderlich (Pritchard-Jones et al. 1990, Arceci et al. 1993, Kreidberg et al. 1993, Kuo et al. 1997, Molkentin et al. 1997, Moore et al. 1999, Davies et al. 2004). Mausembryonen mit Inaktivierung des *Gata4* bzw. des *Wt1* Gens zeigen ähnliche Phänotypanomalien (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999, Tevosian et al. 2002, Watt et al. 2004). Weitere Hinweise auf funktionelle Synergismen von GATA4 und WT1 ergeben sich aus dem Nachweis gemeinsamer Zielgene (Viger et al. 1998, Tremblay et al. 2001, Tevosian et al. 2002, Matsuzawa-Watanabe et al. 2003, Dame et al. 2004, 2006, Gao et al. 2006, Manuylov et al. 2007, Miyamoto et al. 2008). Vor diesem Hintergrund habe ich untersucht, ob die Expression von GATA4 einer direkten Kontrolle durch WT1 unterliegt. Ein Schwerpunkt der Arbeit betrifft die Frage, ob ein kürzlich identifizierter Enhancer, der die Expression von GATA4 im lateralen Mesoderm steuert (Rojas et al. 2005), durch WT1 reguliert wird.

6.1 Koexpression von WT1 und GATA4 im Epikard und in den Gonaden

Im Falle einer positiven Regulation des *Gata4* Gens durch WT1 ist zu erwarten, dass beide Proteine in denselben Zellen vorkommen. Um dies zu überprüfen, wurden Immundoppelfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Diese zeigen, dass die beiden Proteine WT1 und GATA4 in den Kernen embryonaler Epikardzellen zum Zeitpunkt E12,5 kolokalisiert sind (Abb. 5). Diese Beobachtung befindet sich in Übereinstimmung mit der in verschiedenen Arbeiten nachgewiesenen Bedeutung von WT1 und GATA4 als Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung des Epikards aus dem lateralen Mesoderm (Moore et al. 1999, Watt et al. 2004, Serluca 2008, Zeng et al. 2011, Rudat und Kispert 2012, Kolander et al. 2014). Im Unterschied zu WT1, dessen Expression auf das Epikard beschränkt ist, konnte GATA4 zusätzlich auch in Kardiomyozyten nachgewiesen werden, in denen es u.a. die Gene α MHC (Molkentin et al. 1994), BNP (He et al. 2002) und ANF (Thuerauf et al. 1994) reguliert (Abb. 5, Arceci et al. 1993, Molkentin et al. 1994, Molkentin 2000, He et al. 2002, Zeng et al. 2011, Hu et al. 2013). Neben dem embryonalen Epikard wurde eine Kolokalisation von GATA4 und WT1 auch in den Gonaden adulter Mäuse beobachtet. Die Färbungen der gonadalen Gewebeschnitte zeigen eine nukleäre Koexpression von WT1 und GATA4 in

Sertolizellen des Testis sowie in Granulosazellen der Ovarien (Abb. 5, Pelletier et al. 1991, Mundlos et al. 1993, Viger et al. 1998, Ketola et al. 1999). Im Unterschied zu anderen Arbeiten, die eine (schwache) Expression von GATA4 in interstitiellen steroidogenen Leydigzellen berichten (Viger et al. 2008, Bielinska et al. 2007), konnte ich GATA4 in diesen Zellen nicht nachweisen. Die Gründe für diese Diskrepanz sind ungeklärt. Es lässt sich spekulieren, dass der GATA4 Proteingehalt in den Leydigzellen des verwendeten Mausstamms zu gering war, um durch die Fluoreszenzantikörper detektiert zu werden. Eine Kreuzreaktivität der sekundären Antikörper mit anderen Proteinen konnte in der Negativkontrolle durch Weglassen des Primärantikörpers ausgeschlossen werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse der Immundoppelfärbungen auf einen Zusammenhang von GATA4 und WT1 in der Entwicklung des Epikards und bei der Differenzierung von Sertoli- bzw. Granulosazellen der männlichen und weiblichen Gonaden hin.

6.2 Bedeutung von WT1 für die *Gata4* Expression *in vivo* und *in vitro*

Um weitere Hinweise auf eine Regulation der *Gata4* Genexpression durch WT1 zu erhalten, wurde der *Gata4* mRNA Gehalt in den Organen von Wildtypen und *Wt1*-defizienten Mausembryonen (*Wt1*^{-/-}) vergleichend analysiert. Da Mäuse mit homozygotem *Wt1* Gendefekt ab dem 13. Embryonaltag letal sind (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999), wurden die Untersuchungen an 12,5 Tage alten Mausembryonen durchgeführt. Im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern war das Niveau der *Gata4* mRNA in den Gonaden der *Wt1*^{-/-} Embryonen um ca. 80% reduziert (Abb. 4). Allerdings zeigte sich in der statistischen Auswertung bei relativ großer Standardabweichung eine grenzwertige Signifikanz mit $p < 0,05$. Jedoch sind diese Ergebnisse kongruent zu denen von Klattig et al. (Klattig et al. 2007b). Eine signifikante Abnahme der *Gata4* mRNA um ca. 50% wurde auch in den Herzen der *Wt1*^{-/-} Embryonen im Vergleich zu Wildtypen festgestellt (Abb. 4). Die geringeren Auswirkungen einer *Wt1*-Defizienz auf den *Gata4* mRNA Gehalt in den Herzen als in den Gonaden lässt sich am ehesten damit erklären, dass GATA4 im Gegensatz zu WT1 nicht nur im Epikard, sondern auch in Kardiomyozyten vorkommt (Abb. 5, Heikinheimo et al. 1994, Pu et al. 2004). Während die epikardiale *Gata4* Expression bei homozygoter *Wt1*-Inaktivierung signifikant reduziert ist, bleibt das Expressionsniveau in Kardiomyozyten vermutlich unverändert. Keine signifikanten Unterschiede der *Gata4*

mRNA wurden in den WT1-negativen Lebern von Wildtypen und *Wt1*^{-/-} Embryonen festgestellt, die als Kontrollen dienten (Abb. 5).

Für den geringeren *Gata4* mRNA Gehalt in den Gonadenanlagen und Herzen der *Wt1*^{-/-} Embryonen im Vergleich zu Wildtypen gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen können diese Beobachtungen darauf hindeuten, dass die GATA4 Expression in diesen Geweben direkt oder indirekt durch WT1 stimuliert wird. Da WT1 depletierte Tiere unter anderem eine Störung der Gonadenentwicklung sowie Epikarddefekte aufweisen (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999), könnte ein reduziertes *Gata4* Niveau in WT1-negativen Mäusen auch Folge der geschädigten Gewebestruktur sein. Weiterhin bestehen die Organanlagen aus heterogenen Zellpopulationen, die eine Unterscheidung direkter und indirekter Effekte von WT1 auf die *Gata4* Expression erschweren.

Um eine potenzielle Regulation der *Gata4* Expression durch WT1 näher zu untersuchen, bediente ich mich der Zelllinie M15. M15-Zellen wurden ursprünglich aus dem Mesonephros von Mäusen mit transgener Expression des T-Antigens etabliert (Larsson et al. 1995). Zusätzlich zu klassischen Genen des Mesonephros wie *Wt1*, *Pax-2*, *Lim-1*, *c-ret* (Armstrong et al. 1992, Larsson et al. 1995, Kuure et al. 2000) enthalten M15-Zellen im Westernblot gut detektierbare Mengen an GATA4 (Abb. 6). Transfektion von M15-Zellen mit einer gegen *Wt1* gerichteten siRNA bewirkte eine signifikante Abnahme der *Gata4* mRNA um ca. 50% (Abb. 6). Eine Hemmung der GATA4 Expression nach Transfektion von M15-Zellen mit *Wt1* siRNA war auch auf Proteinebene mittels Westernblot nachweisbar (Abb. 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass WT1 für ein normales Expressionsniveau von GATA4 in den Gonadenanlagen und im Epikard *in vivo* sowie in M15-Zellen *in vitro* erforderlich ist. Die weiteren Untersuchungen waren auf die Bedeutung von WT1 für die Entwicklung des Epikards und dabei insbesondere auf die Regulation eines mesodermalen *Gata4* Enhancers durch WT1 fokussiert.

6.3 *In vitro* Regulation des mesodermalen *Gata4* Enhancers durch *Wt1*

Um eine mögliche Regulation des *Gata4* Gens durch WT1 zu untersuchen, wurden zunächst Kotransfektionsexperimente mit *Gata4* Promotor-Reporterkonstrukten und WT1 Expressionsplasmiden durchgeführt. WT1 Bindungsstellen sind GC-reich und besitzen Homologie zu den Bindungsstellen des *early growth response (EGR)* Gens

(Rauscher et al. 1990). Suzuki et al. konnten zeigen, dass EGR1 an den *Gata4* Promotor bindet und diesen hemmt (Suzuki et al. 2007). In Übereinstimmung mit den kürzlich publizierten Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe (Mazaud-Guittot et al. 2014) wurden die Aktivitäten der unterschiedlich langen *Gata4* Promotorkonstrukte durch WT1 jedoch nicht signifikant beeinflusst (Abb. 7). Möglicherweise befinden sich in den untersuchten Promotorabschnitten hemmende Elemente, die eine durch WT1 vermittelte Aktivierung neutralisieren. Ebenso ist denkbar, dass WT1 die *Gata4* Expression über promotorferne Enhancer aktiviert.

Rojas et al. identifizierten ein ca. 40 kb 5' vor dem Transkriptionsstart gelegenes Enhancerelement, das die Expression von *Gata4* im lateralen Mesoderm (Seitenplattenmesoderm) steuert (Abb. 3 und 8, Rojas et al. 2005). Aus dem lateralen Mesoderm entwickeln sich u.a. die serösen Auskleidungen der großen Körperhöhlen, d.h. Pleura, Peritoneum und Epi-/Perikard (Armstrong et al. 1992, Chau und Hastie 2012). Die Kotransfektionsexperimente ergaben, dass ein ca. 900 bp langer Enhancerabschnitt durch WT1 signifikant, ca. 4-fach stimuliert wird (Abb. 11). Da der verwendete pGL3basic Reportervektor keine eukaryotischen Promotor- bzw. Enhancersequenzen enthält, lässt sich schlussfolgern, dass der untersuchte Enhancerbereich zur Rekrutierung von RNA-Polymerase II befähigt ist. Durch sukzessive Verkürzung der Enhancerkonstrukte vom 5'-Ende her konnte der WT1-sensitive Bereich im mesodermalen *Gata4* Enhancer auf eine ca. 50 Basenpaare lange Sequenz eingegrenzt werden (Abb. 11). Diese zeigte allerdings nicht dasselbe Aktivierungsausmaß wie der vollständige Enhancer, sondern lediglich eine 2-fache signifikante Aktivitätssteigerung durch Kotransfektion von WT1 (Abb. 11). Dies deutet darauf hin, dass in verschiedenen Bereichen des *Gata4* Enhancers mehrere WT1-sensitive Elemente lokalisiert sind, und/ oder dass die Wirkung von WT1 durch weitere Kofaktoren beeinflusst wird. Außerdem kann auch GATA4 selbst seinen eigenen Enhancer aktivieren (Rojas et al. 2005). Für die Untersuchungen wurden HEK293-Zellen aus der embryonalen Nierenanlage verwendet, da sich diese mit vergleichsweise hoher Effizienz transfizieren lassen. Die mithilfe eines GFP-Expressionsplasmids ermittelten, durch Calciumphosphat-Präzipitation erzielten Transfektionseffizienzen betragen 40-60% (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von HEK293-Zellen, in denen epikardspezifische Faktoren vermutlich fehlen, stellt eine Limitierung der Arbeit da. Für weiterführende Untersuchungen ist es deshalb notwendig, epikardiale Zelllinien in die Experimente mit einzubeziehen.

6.4 Direkte Bindung des WT1 Proteins an die *Gata4* Enhancer Sequenz

Da WT1 *in vitro* den *Gata4* Enhancer stimuliert, habe ich als nächstes mittels EMSA überprüft, ob das WT1 Protein direkt an eine Stelle im Enhancer bindet. Die Wahl der für die EMSAs verwendeten Oligonukleotide erfolgte aufgrund ihrer Homologie zu bekannten GC-reichen WT1-Konsensusmotiven (Klattig et al. 2007a, Hartwig et al. 2010, Motamedi et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass das GS2 Oligonukleotid, welches im WT1-sensitiven Enhancerbereich lokalisiert ist, die transkriptionskompetente WT1(-KTS) Variante bindet (Abb. 14).

Die Verwendung synthetischer Oligonukleotide zum Nachweis von DNA-Protein Interaktionen ist dadurch limitiert, dass hierbei der Kontext der natürlichen Chromatinstruktur fehlt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Bindung von WT1 Protein an den mesodermalen *Gata4* Enhancer mithilfe der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) untersucht. Diese Methode ermöglicht die Analyse von Protein-DNA Interaktionen in Zellen und Geweben bei erhaltener Chromatinstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass WT1 Protein an das *Gata4* Enhancer-Chromatin bindet und sich die genomische Enhancer-DNA mit Antikörpern gegen WT1 2,5-fach anreichern lässt (Abb. 12). Als Negativkontrolle wurde normales Kaninchenserum verwendet, als Positivkontrolle diente die Promotorsequenz des bekannten WT1-Zielgens *Amhr2* (Klattig et al. 2007a). Die Präzipitation mit einem gegen WT1 gerichteten Antikörper bewirkte eine ca. 1,8-fache Anreicherung der *Amhr2* Promotor DNA (Abb. 12). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass WT1 Protein an den mesodermalen *Gata4* Enhancer bindet. Da die Bindung auch bei erhaltener Chromatinstruktur erfolgt, ist davon auszugehen, dass WT1 direkt die Enhanceraktivität stimuliert. Dies ist mechanistisch möglich, indem WT1 z.B. weitere Kofaktoren rekrutiert und/ oder die Chromatinstruktur so verändert, dass eine Steigerung der *Gata4* Genexpression erfolgt. Beispielsweise könnte es auch wie bei dem *WNT4* Gen zu einem Chromatin flip-flop kommen, durch den *Gata4* je nach Zustand aktiviert oder supprimiert wird (Essafi et al. 2011). Einschränkend ist anzumerken, dass die ChIP-Assays mit Chromatin von M15-Zellen aus dem Mesonephros der Maus durchgeführt wurden. M15-Zellen wurden verwendet, da sie sowohl immunpräzipitierbare Mengen an WT1 Protein enthalten, als auch das *Gata4* Gen exprimieren. Zur Validierung der erzielten Resultate ist es wichtig, für nachfolgende Untersuchungen Zellen bzw. Gewebe mesodermalen Ursprungs zu benutzen.

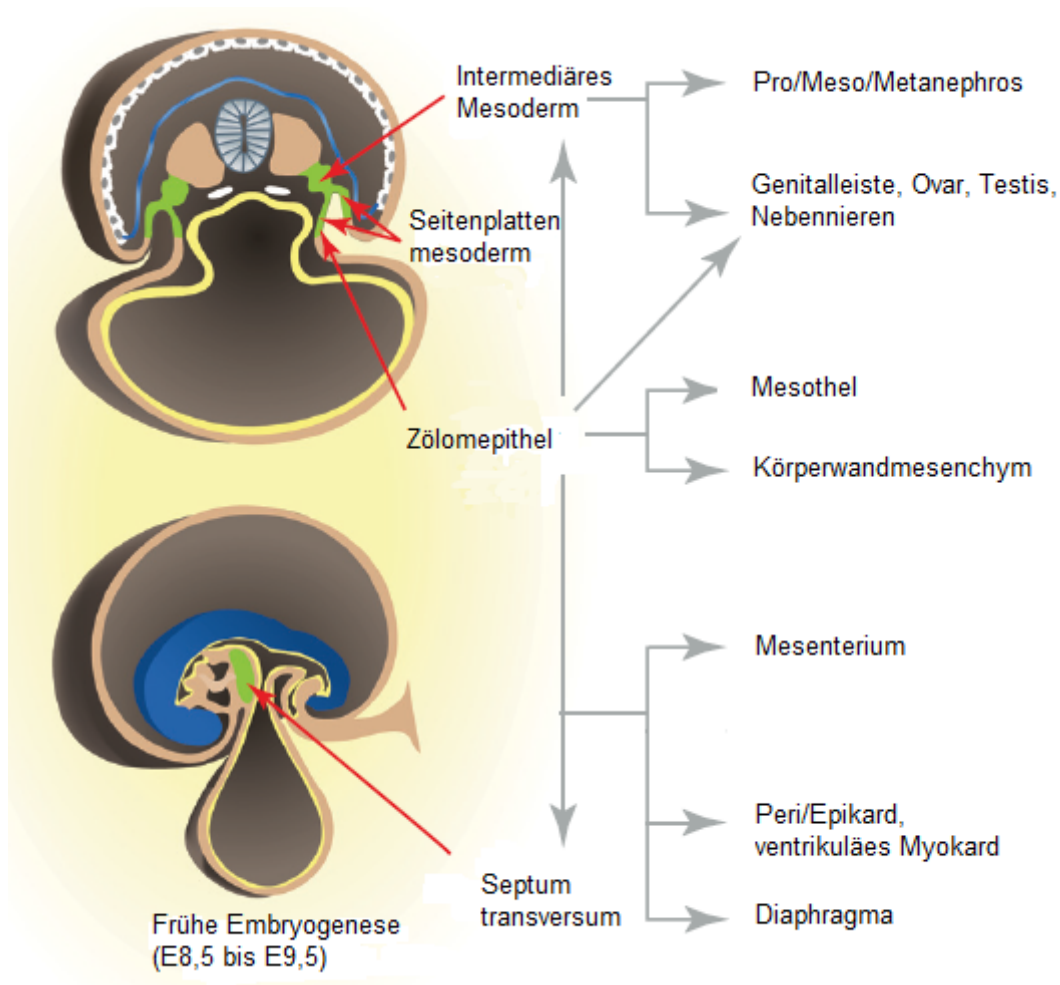


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Mesodermentwicklung mit den Wt1 exprimierenden Geweben (modifiziert nach Chau und Hastie 2012).

6.5 Die Bedeutung des lateralen Mesoderms in der Entwicklung

Aus dem lateralen Mesoderm gehen während der Embryonalentwicklung vor allem mesotheliale Gewebe wie das Epikard, die Pleura und das Peritoneum hervor (Abb. 15). Im Mesoderm und später auch im Epikard werden wie bereits beschrieben WT1 und GATA4 koexprimiert. Bei homozygoter Deletion beider Gene resultieren ähnliche Phänotypen mit Fehlbildungen des Epikards (Moore et al. 1999, Kreidberg et al. 1993, Tevosian et al. 2002, Watt et al. 2004). Für die Entwicklung des Seitenplattenmesoderms spielt bone morphogenetic protein 4 (Bmp4) eine essentielle Rolle (Winnier et al. 1995). In einer Arbeit von Rojas et al. wurde der im lateralen Mesoderm aktive Enhancer des *Gata4* Gens entdeckt, welcher unter der indirekten Kontrolle von Bmp4 steht. Dieser Enhancer steuert die Expression von GATA4 im viszeralem Mesoderm und im Septum Transversum (Rojas et al. 2005), aus denen das

proepikardiale Organ bzw. das Epikard hervorgehen (Männer 2001). In meiner Arbeit konnte nun eine Aktivierung des *Gata4* Enhancers durch WT1 nachgewiesen werden. Daher kann man spekulieren, dass die mesothelialen Fehlbildungen in *Wt1/Gata4*-deletierten Tieren auf einer fehlerhaften Differenzierung des lateralen Mesoderms beruhen, wenn der *Gata4* Enhancer nicht ausreichend durch WT1 aktiviert wird. Eine weitere Signalverstärkung des *Gata4* Enhancers könnte zusätzlich durch eine WT1 vermittelte Aktivierung von *Bmp4* erfolgen (Gao et al. 2014). Des Weiteren spielt auch ein Autoregulationsmechanismus über GATA4 eine Rolle für die Aktivierung des Enhancers (Rojas et al. 2005). Durch WT1 wird hier wahrscheinlich noch eine zusätzliche Verstärkung des Signals erzielt.

Abgesehen vom Epikard entstehen auch die Koronararterien aus dem proepikardialen Organ (Mikawa und Gourdie 1996, Majesky 2004). Auch in der Entwicklung der Herzmuskelgefäße spielen WT1 und GATA4 eine zentrale Rolle. So ist die Interaktion von GATA4 mit seinem Co-Faktor Fog2 wichtig für die Entwicklung der Koronargefäße (Crispino et al. 2001, Zhou et al. 2009). Ferner ist epikardiales GATA4 zur Rekrutierung subepikardialer Endothelzellen erforderlich, aus welchen der koronare vaskuläre Plexus differenziert (Kolander et al. 2014). Des Weiteren differenzieren aus WT1-positiven epikardialen Zellen über epithelial-mesenchymale Transition (EMT) u.a. vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen (Rudat und Kispert 2012). Hierbei werden beide Transkriptionsfaktoren im Epikard exprimiert und haben synergistische Effekte in der Ausbildung des koronaren vaskulären Plexus. Einerseits koordiniert WT1 die Differenzierung von Gefäßzellen aus dem Epikard, andererseits führen GATA4-abhängige epikardiale Signale zu einer Rekrutierung endothelialer Zellen aus dem Proepikard in das Sub-Epikard (Kolander et al. 2014). WT1 ist für die Stabilisierung dieser neu entstandenen Gefäße notwendig (Scholz et al. 2009, Wagner et al. 2005a). Somit zeigt sich, dass auch in der Koronarvaskulogenese eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren über den mesodermalen *Gata4* Enhancer möglicherweise eine entscheidende Rolle spielt.

Interessant ist weiterhin, dass homozygot negative Mäuse für *Wt1* und *Gata4* außer den mesothelialen Defekten auch eine ausgeprägte Hypoplasie des Myokards aufweisen (Kreidberg et al. 1993, Moore et al. 1999, Kolander et al. 2014). Bemerkenswert ist dabei, dass WT1 im Gegensatz zu GATA4 nicht in Kardiomyozyten exprimiert wird, sondern ausschließlich epikardial vorkommt (Arceci et al. 1993, Heikinheimo et al. 1994, Zeng et al. 2011). Dies deutet auf eine differenzierte Beeinflussung des Myokards durch

das Epikard hin. Ebenso wie die glatten Muskelzellen der Koronararterien können auch Kardiomyozyten aus WT1-positiven Epikardzellen über die EMT entstehen (Scholz et al. 2009, Cai et al. 2008, Zhou et al. 2008). Weiterhin befindet sich das embryonale Herzmuskelgewebe unter dem Einfluss proliferativer Signale aus dem Epikard. Unter anderem werden im Epikard Erythropoietin (Epo) und Retinsäure gebildet, die beide eine wichtige Rolle in der Myokardentwicklung spielen (Stuckmann et al. 2003, Olivey und Svensson 2010, Scholz und Kirschner 2011). Interessanterweise werden nicht nur Epo und Retinsäure, sondern auch deren Rezeptoren WT1-abhängig exprimiert (Dame et al. 2006, Kirschner et al. 2008, Scholz und Kirschner. 2011, Guadix et al. 2011). Ferner steuert auch GATA4 gemeinsam mit Sp1 die Expression des Epo-Rezeptors in Kardiomyozyten (von Salisch et al. 2011). Die Ergebnisse meiner Arbeit deuten darauf hin, dass eine verminderte mesodermale *Gata4* Expression zur myokardialen Hypoplasie bei *Wt1*-Defizienz beiträgt. So kann man festhalten, dass WT1 und GATA4 für die Entwicklung der vom Mesoderm abstammenden Gewebe von zentraler Bedeutung sind. Die ähnlichen kardialen Mausphänotypen, die aus einer Deletion der *Wt1* bzw. *Gata4* Gene resultieren, lassen sich mit einer unzureichenden Aktivierung des mesodermalen *Gata4* Enhancers durch WT1 erklären. Daher sollte als nächster Schritt die gemeinsame Regulation über den mesodermalen *Gata4* Enhancer im Tiermodell *in vivo* überprüft werden.

6.6 Klinisch relevante Aspekte der epi-/myokardialen Expression von WT1 und GATA4

Die Regulation der *Gata4* Expression durch WT1 hat nicht nur in der Embryogenese eine wichtige Funktion, sondern ist möglicherweise auch im adulten Organismus medizinisch relevant. Besondere Beachtung verdienen hier hypoxische bzw. ischämische Zustände wie beispielsweise ein Myokardinfarkt. Im Promotor des *Wt1* Gens der Maus wurde ein hypoxieresponsives Element (HRE) identifiziert. Bindung des Transkriptionsfaktors HIF-1 an dieses Element bewirkt eine Transaktivierung von *Wt1* in myokardialen Blutgefäßen (Wagner et al. 2003). Dieser Mechanismus könnte für die beobachtete vaskuläre *de novo* Expression von WT1 im Infarkttrandbereich verantwortlich sein (Wagner et al. 2002b).

Desweiteren können aus dem Epikard stammende, WT1-positive Mesenchymzellen (EPDCs) zu Fibroblasten und neuen Kardiomyozyten differenzieren (Wessels und Pérez-Pomares et al. 2004, Martínez-Estrada et al. 2009, Scholz und Kirschner 2011)

und dadurch möglicherweise die myokardiale Narbenbildung nach Infarkt reduzieren. Infolge einer Myokardischämie kommt es zu einem absoluten Anstieg von EPDCs. Diese sind aufgrund ihrer Expression der Oberflächenantigene CD34 und c-kit als kardiale Stammzellen anzusehen (Limana et al. 2007). Ferner wird nach ischämischer Schädigung des Herzmuskelgewebes eine vermehrte Expression von embryonalen epikardialen Genen wie *Wt1* beobachtet (Limana et al. 2011, Smart et al. 2011, Wagner et al. 2002b). Interessant ist nun, dass diese subepikardialen c-kit+ Zellen den kardialen Transkriptionsfaktor GATA4 exprimieren und sich somit als funktionelle *de novo* Kardiomyozyten präsentieren (Limana et al. 2007).

Die Expression von *Gata4* wird ebenfalls über sauerstoffabhängige Mechanismen reguliert. Beispielsweise wurde eine Aktivierung der *Gata4* Genexpression durch hypoxische Präkonditionierung (Suzuki et al. 2004) sowie durch akute intermittierende Hypoxie (Park et al. 2007) beschrieben. In Reporter-genexperimenten konnte eine *Gata4* Aktivierung durch Hif1 α nachgewiesen werden (Nagao et al. 2008). Folglich lässt sich postulieren, dass sowohl *Wt1* als auch *Gata4* über hypoxische Signalkaskaden reguliert werden. Während des Myokardinfarktes erfolgt eine Reaktivierung embryonaler Gene. Es ist denkbar, dass hierbei auch die Aktivierung der *Gata4* Expression über den mesodermalen Enhancer von Bedeutung ist. Somit würde zusätzlich zur hypoxieinduzierten Expression von *Wt1* und *Gata4* eine Transaktivierung des *Gata4* Gens durch WT1 den autoregenerativen Effekt nach Ischämie verstärken. Möglicherweise gibt es außer den bereits entdeckten *Gata4* Enhancern noch weitere, bislang unbekannte Elemente, die eine Aktivität in Epikardzellen aufweisen und in adulten Organismen reaktiviert werden können.

In einigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass GATA4 gemeinsam mit anderen kardialen Transkriptionsfaktoren (Mef2c und Tbx5, GMT) geeignet ist, kardiale Fibroblasten in Kardiomyozyten zu reprogrammieren (Inagawa et al. 2012, Qian et al. 2012, Song et al. 2012). Dies reduzierte das Infarktareal und trug zu einer moderaten Verringerung der kardialen Dysfunktion bei. Dieser Effekt konnte durch die Gabe des angiogen wirksamen Thymosin β 4 (Tb4) (Qian et al. 2012) oder VEGF (Mathison et al. 2012) noch weiter gesteigert werden. Auch die WT1-positiven epikardialen Progenitorzellen können durch Aktivierung mit Thymosin β 4 zu *de novo* funktionellen Kardiomyozyten im Infarkttrandbereich differenzieren (Smart et al. 2011). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die beschriebene Regulation der *VEGF* Genexpression durch WT1 (McCarty und Loeb. 2011) und GATA4 (Heineke et al. 2007).

Ein anderer klinisch relevanter Gesichtspunkt betrifft die Behandlung einer durch Chemotherapeutika vom Typ des Doxorubicin ausgelösten Kardiomyopathie (Kim et al. 2003, Aries et al. 2004). Nach Behandlung mit Doxorubicin wurde eine Herunterregulierung von *Gata4* mRNA und eine Zunahme der Apoptose von Kardiomyozyten unter anderem aufgrund der verminderten Aktivierung des anti-apoptotischen Bcl-X berichtet (Kim et al. 2003, Aries et al. 2004). Dieser Effekt wird durch eine p53-abhängige Hemmung der Bindung des CBF (CCAAT binding factor)/NF-Y (Nuclear factor Y) an die CCAAT-Box im *Gata4* Promotor und eine dadurch verminderte Transkription sowie Aktivität von GATA4 ausgelöst (Park et al. 2011). Andererseits wird durch eine ektope *Gata4* Expression die Bildung von Kardiomyozyten angeregt (Grépin et al. 1997). Durch die Gabe von Epo können die kardialen Nebenwirkungen der Anthrazykline über eine Erhöhung der *Gata4* und *Bcl-2* Expression abgeschwächt werden (Li et al. 2006, Shan et al. 2009). Somit wird der in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien (Chateauvieux et al. 2011, Jelkmann und Elliott 2013) nachgewiesene kardioprotektive Effekt von Epo möglicherweise über eine gesteigerte *Gata4* Expression vermittelt (Dame 2013). Des Weiteren kann auch WT1 das Protoonkogen *Bcl-2* direkt aktivieren und dadurch eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika vom Typ des Doxorubicin verursachen (Mayo et al. 1999). Somit ergibt sich ein komplexes Regulationsnetzwerk zwischen WT1, GATA4 und Epo (u.a. Dame et al. 2004, Dame et al. 2006, von Salisch et al. 2011, Shan et al. 2009), das möglicherweise wichtige kardioprotektive Wirkungen besitzt.

Die koronare Herzerkrankung und der akute Myokardinfarkt sind Erkrankungen mit einer hohen Mortalitätsrate. Aktuelle Therapien wirken entweder prophylaktisch oder symptomatisch, einen bereits eingetretenen Schaden des Herzmuskels kann man jedoch nicht mehr rückgängig machen. Deshalb ist es wichtig, neue Behandlungskonzepte zu erproben. Ein vielversprechender Ansatzpunkt ist hierbei die extrinsische supportive Reaktivierung embryonaler Signalkaskaden insbesondere im Epikard. Es bleibt zu klären, ob der mesodermale *Gata4* Enhancer auch in dieser Situation im Tiermodell aktiviert wird. Darüber hinaus ist in zukünftigen Studien zu untersuchen, inwieweit die Ergebnisse aus Tiermodellen auch auf den Menschen übertragbar sind und gegebenenfalls der Weiterentwicklung von neuen innovativen Therapien dienen können.

7. Literaturverzeichnis

1. Moore KL, Persaud TV. Einführung. In: Embryologie. 5. Auflage. Elsevier, München: Urban&Fischer Verlag, 2007: 1-18.
2. Montenarh M. Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007:255-283.
3. Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide Gene at the Human Chromosome 11 Wilms' Tumor Locus. *Cell* 1990;60:509-520.
4. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 1990;343:774-778.
5. 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. USA* 1991;88:9618-9622.
6. Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor – a case of disrupted development. *Annu Rev Genet* 1994;28:523-558.
7. Scholz H, Kirschner KM. A Role for the Wilms' Tumor Protein WT1 in Organ Development. *Physiology* 2005;20:54-59.
8. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through different functional domains. *J Biol Chem* 1993;268:9172-9175.
9. Roberts SG. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:542-547.
10. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 2001;273:141-161.
11. Englert C, Vidal M, Maheswaran S, et al. Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:11960-11964.

12. Kennedy D, Ramsdale T, Mattick J, Little M. An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nature Genet* 1996;12:329-332.
13. Depping R, Schindler SG, Jacobi C, Kirschner KM, Scholz H. Nuclear transport of Wilms' tumour protein Wt1 involves importins α and β . *Cell Physiol Biochem* 2012;29:223-232.
14. Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 1996;271:8646-8654.
15. Dallosso AR, Hancock AL, Brown KW, Williams AC, Jackson S, Malik K. Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet* 2004;13:405-415.
16. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum Mol Genet* 2006;15:R196-R201.
17. Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ 3rd, Sukumar S. RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev* 1994;8:720-731.
18. Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 1990;250:1259-1262.
19. Hartwig S, Ho J, Pandey P, et al. Genomic characterisation of Wilms' tumor suppressor 1 targets in nephron progenitor cells during kidney development. *Development* 2010;137:1189-1203.
20. Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, et al. WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J* 1999;18:3990-4003.
21. 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* 2005a;19:2631-2642.
22. 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;81:391-401.

23. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 1990;346:194-197.
24. Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Glaser T, Housman DE. Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor gene (WT1) during kidney development. *Mol Cell Biol* 1991;11:1707-1712.
25. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 1992;40:85-97.
26. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman DE. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991;5:1345-1356.
27. 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;119:1329-1341.
28. 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;126:1845-1857.
29. Scholz H, Kirschner KM. Oxygen-dependent gene expression in development and cancer: lessons learned from the Wilms' tumor gene, WT1. *Front Mol Neurosci* 2011;4:4.
30. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993;74:679-691.
31. Davies JA, Lodomery 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;13:235-246.
32. Herzer U, Crocoll A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen. *Curr Biol* 1999;9:837-840.
33. Wagner KD, Wagner N, Vidal VP, Schley G, Wilhelm D, Schedl A. The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina. *EMBO J* 2002a;21:1398-1405.

34. Wagner N, Wagner KD, Hammes A, et al. A splice variant of the Wilms' tumour suppressor *Wt1* is required for normal development of the olfactory system. *Development* 2005b;132:1327-1336.
35. Alberta JA, Springett GM, Rayburn H, et al. Role of the *WT1* tumor suppressor in murine hematopoiesis. *Blood* 2003;101:2570-2574.
36. Männer J, Pérez-Pomares JM, Macías D, Muñoz-Chápuli R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 2001;169:89-103.
37. Wessels A, Pérez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:43-57.
38. 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;174:221-232.
39. Dettman RW, Denetclaw WJ, Ordahl CP, Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 1998;193:169-181.
40. Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Muñoz-Chápuli. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* 2002;46:1005-1013.
41. Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from *Tbx18* epicardial cells. *Nature* 2008;454:104-108.
42. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008;454:109-113.
43. Wagner KD, Wagner N, Bondke A, et al. The Wilms' tumor suppressor *Wt1* is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J* 2002b;16:1117-1119.
44. Smart N, Bollini S, Dube KN, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 2011;474:640-644.

45. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
46. 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;42:89-93.
47. Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, et al. Acute Multiple Organ Failure in Adult Mice Deleted for the Developmental Regulator Wt1. *PLoS Genet* 2011;7:1-16.
48. Morrison AA, Viney RL, Saleem MA, Lodomery MR. New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295:F12-F17.
49. Suri M, Kelehan P, O'Neill D, et al. WT1 mutations in Meacham syndrome suggest a coelomic mesothelial origin of the cardiac and diaphragmatic malformations. *Am J Med Genet Part A* 2007;143A:2312-2320.
50. Oji Y, Miyoshi S, Maeda H, et al. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. *Int J Cancer* 2002;100:297-303.
51. Wagner N, Panelos J, Massi D, Wagner KD. The Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with melanoma proliferation. *Pflugers Arch* 2008;455:839-847.
52. Wang J, Oue T, Uehara S, Yamanaka H, Oji Y, Fukuzawa MJ. The role of WT1 gene in neuroblastoma. *Pediatr Surg* 2011;46:326-331.
53. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 2007;21:868-876.
54. Huff V. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nat Rev Cancer* 2011;11:111-121.
55. Hartkamp J, Roberts SG. HtrA2, taming the oncogenic activities of WT 1. *Cell Cycle* 2010;9:2508-2514.
56. Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 1993;13:2235-2246.

57. Morrisey EE, Ip HS, Tang Z, Parmacek MS. GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *J Biol Chem* 1997;272:8515–8524.
58. Molkenin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2000;275:S. 38949–38952.
59. Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, et al. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *AM J Med Genet* 1999;83:201-206.
60. Heikinheimo M, Scandrett JM, Wilson DB. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol* 1994;164:361-373.
61. Morrisey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS. GATA-6: A zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* 1996;177:309-322.
62. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, et al. Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology* 2002;143:3136-3143.
63. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997;11:1048–1060.
64. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997;11:1061–1072.
65. Narita N, Bielinska M, Wilson DB. Wild-type endoderm abrogates the ventral development defects associated with GATA-4 deficiency in the mouse. *Dev Biol* 1997;189:270-274.
66. Watt AJ, Battle MA, Li J, Duncan SA. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12573–12578.

67. Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, et al. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev* 2001;15:839-844.
68. Pu WT, Ishiwata T, Juraszek AL, Ma Q, Izumo S. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol* 2004;275:235-244.
69. Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, et al. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest* 2005;115:1522-1531.
70. Molkenin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994;14:4947-4957.
71. Thuerauf DJ, Hanford DS, Glembotski CS. Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J Biol Chem* 1994;269:17772-17775.
72. He Q, Mendez M, LaPointe MC. Regulation of the human brain natriuretic peptide gene by GATA-4. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E50-7.
73. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol* 2012;100:253-277.
74. Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 2003;424:443-447.
75. Rajagopal SK, Ma Q, Obler D, et al. Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Card* 2007;43:677-685.
76. Kobayashi S, Lackey T, Huang Y, et al. Transcription factor gata4 regulates cardiac BCL2 gene expression in vitro and in vivo. *FASEB J* 2006;20:800-802.
77. Kim Y, Ma AG, Kitta K, et al. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 2003;63:368-377.
78. Aries A, Paradis P, Lefebvre C, Schwartz RJ, Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *PNAS* 2004;101:6975-6980.
79. Watt AJ, Zhao R, Li J, Duncan SA. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Mol Biol* 2007;7:37.

80. Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 2002;129:4627-4634.
81. Bouma GJ, Washburn LL, Albrecht KH, Eicher EM. Correct dosage of Fog2 and Gata4 transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14994-14999.
82. Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, et al. Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 1997;138:3505-3514.
83. Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 1998;125:2665–2675.
84. Bielinska M, Seehra A, Toppari J, Heikinheimo M, Wilson DB. GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. *Dev Dyn* 2007;236:203-213.
85. Kyrölahti A, Euler R, Bielinska M, et al. GATA4 regulates sertoli cell function and fertility in adult male mice. *Mol Cell Endocrinol* 2011a;333:85-95.
86. Kyrölahti A, Vetter M, Euler R, et al. GATA4 deficiency impairs ovarian function in adult mice. *Biol Reprod* 2011b;84:1033-1044.
87. Lourenço D, Brauner R, Rybczynska R, Nihoul-Fékété C, McElreavey K, Bashamboo A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *PNAS* 2011;108:1597-1602.
88. Zhou P, He A, Pu WT. Regulation of Gata4 transcriptional activity in cardiovascular development and disease. *Curr Top Dev Biol* 2012;100:143-169.
89. Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, et al. Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Gen Dev* 2001;15:2702-2719.
90. Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, Dai YS, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1-

- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 2001;21:7460-69.
91. Wang J, Feng XH, RJ Schwartz. SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *J Biol Chem* 2004;279:49091-49098.
 92. Callis TE, Pandya K, Seok HY, et al. MicroRNA-208a is a regulator of hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2772-2786.
 93. Sharma A, Masri J, Jo OK, et al. Protein kinase C regulates internal initiation of translation of the GATA-4 mRNA following vasopressin-induced hypertrophy of cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2007;282:9505-9516.
 94. Rojas A, De Val S, Heidt AB, Xu SM, Bristow J, Black BL. Gata4 expression in lateral mesoderm is downstream of BMP4 and is activated directly by Forkhead and GATA transcription factors through a distal enhancer element. *Development* 2005;132:3405-3417.
 95. Rojas A, Schachterle W, Xu SM, Black BL. An endoderm-specific transcriptional enhancer from the mouse Gata4 gene requires GATA and homeodomain protein-binding sites for function in vivo. *Dev Dyn* 2009;238:2588-2598.
 96. Rojas A, Schachterle W, Xu SM, Martín F, Black BL. Direct transcriptional regulation of Gata4 during early endoderm specification is controlled by FoxA2 binding to an intronic enhancer. *Dev Biol* 2010;346:346-355.
 97. Schachterle W, Rojas A, Xu SM, Black BL. ETS-dependent regulation of a distal Gata4 cardiac enhancer. *Dev Biol* 2012;361:439-449.
 98. Mazaud Guittot S, Bouchard MF, Robert-Grenon JP, et al. Conserved usage of alternative 5' untranslated exons of the GATA4 gene. *PLoS ONE* 2009;4:e8454.
 99. Saito Y, Kojima T, Takahashi N. Mab21l2 is essential for embryonic heart and liver formation. *PLoS ONE* 2012;7:e32991.
 100. Serluca FC. Development of the proepicardial organ in the zebrafish. *Dev Biol* 01. Muñoz-Chápuli R, Macías D, González-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Pérez-Pomares JM. The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:1070-1082.

101. Limana F, Capogrossi MC, Germani A. The epicardium in cardiac repair: from the stem cell view. *Pharmacol Ther* 2011;129:82-96.
102. Hu YC, Okumura LM, Page DC. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PloS Genet* 2013;9:e1003629.
103. Tremblay JJ, Viger RS. GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 2001;142:977-986.
104. Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue JI, Semba K. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene* 2003;22:7900-7904.
105. Gao F, Maiti S, Alam N, et al. The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:11987-11992.
106. Manuylov NL, Fujiwara Y, Adameyko II, Poulat F, Tevosian SG. The regulation of Sox9 gene expression by the GATA4/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Dev Biol* 2007;307:356-367.
107. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol* 2008;9:44.
108. Dame C, Sola MC, Lim KC, et al. Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J Biol Chem* 2004;279:2955-2961.
109. Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS, Scholz H. Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* 2006;107:4282-4290.
110. Wagner KD, Wagner N, Wellmann S, et al. Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *FASEB J* 2003;17:1364-1366.
111. Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299: F1–F13.

112. Von Salisch S, Klar M, Thurisch B, Bungert J, Dame C. Gata4 and Sp1 regulate expression of the erythropoietin receptor in cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* 2011;15:1963-1972.
113. Kirschner KM, Hagen P, Hussels CS, Ballmaier M, Scholz H, Dame C. The Wilms' tumor suppressor Wt1 activates transcription of the erythropoietin receptor in hematopoietic progenitor cells. *FASEB J* 2008;22:2690–2701.
114. Kingston RE, Chen CA, Rose JK. Calcium phosphate transfection. *Curr Protoc Mol Biol* 2003; Chapter 9: Unit 9.1.
115. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
116. 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* 2007a;27:4355-4364.
117. Klattig J, Sierig R, Kruspe D, Makki MS, Englert C. WT1-mediated gene regulation in early urogenital ridge development. *Sex Dev* 2007b;1;238-254.
118. Zeng B, Ren XF, Cao F, Zhou XY, Zhang J. Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. *J Biomed Sci* 2011;18:67.
119. Rudat C, Kispert A. Wt1 an epicardial fate mapping. *Circ Res* 2012;111:165-169.
120. Kolander KD, Holtz MJ, Cossette SM, Duncan SA, Misra RP. Epicardial GATA factors regulate early coronary vascular plexus formation. *Dev Biol* 2014;386:204-215.
121. Ketola I, Rahman N, Toppari J, et al. Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 1999;140:1470-1480.
122. Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev* 2000;92:31-45.
123. Suzuki YJ, Nagase H, Wong CM, et al. Regulation of Bcl-xL expression in lung vascular smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:678–687.

124. Mazaud-Guittot S, Prud'homme B, Bouchard MF, et al. GATA4 autoregulates its own expression in mouse gonadal cells via its distal 1b promoter. *Biol Reprod* 2014;90:25,1-15.
125. Chau YY, Hastie ND. The role of Wt1 in regulating mesenchyme in cancer, development, and tissue homeostasis. *Trends Genet* 2012;28:515–524.
126. Motamedi FJ, Badro DA, Clarkson M, et al. WT1 controls antagonistic FGF and BMP-pSMAD pathways in early renal progenitors. *Nat Commun* 2014;5:4444.
127. Essafi A, Webb A, Berry RL, et al. A Wt1-controlled chromatin switching mechanism underpins tissue-specific wnt4 activation and repression. *Dev Cell* 2011;21:559–574.
128. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Gen Dev* 1995;9:2105-2116.
129. Gao Y, Toska E, Denmon D. WT1 regulates the development of the posterior taste field. *Development* 2014;141:2271-2278.
130. Majesky MW. Development of coronary vessels. *Curr Top Dev Biol* 2004;62:225-259.
131. Zhou B, Ma Q, Kong SW, et al. Fog2 is critical for cardiac function and maintenance of coronary vasculature in the adult mouse heart. *J Clin Invest* 2009;119:1462-1476.
132. Scholz H, Wagner KD, Wagner N. Role of the Wilms' tumour transcription factor, Wt1, in blood vessel formation. *Pflugers Arch* 2009;458:315-323.
133. Stuckmann I, Evans S, Lassar AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* 2003;255:334-349.
134. Olivey HE, Svensson EC. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ Res* 2010;106:818–832.
135. Guadix JA, Ruiz-Villalba A, Lettice L, et al. Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development* 2011;138:1093-1097.

136. Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* 2007;101:1255-1265.
137. Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, Das DK. GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:1195–1203.
138. Park AM, Nagase H, Kumar SV, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on the heart. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:723-729.
139. Nagao K, Taniyama Y, Kietzmann T, Doi T, Komuro I, Morishita R. HIF-1 α signaling upstream of NKX2.5 is required for cardiac development in xenopus. *J Biol Chem* 2008;283:11841-11849.
140. Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, et al. Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res* 2012;111:1147-1156.
141. Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012;485:593-598.
142. Song K, Nam, YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 2012;485:599-604.
143. Mathison M, Gersch RP, Nasser A, et al. In vivo cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J Am Heart Assoc* 2012;1:e005652.
144. McCarty G, Awad O, Loeb DM. WT1 protein directly regulates expression of vascular endothelial growth factor and is a mediator of tumor response to hypoxia. *J Biol Chem* 2001;286:43634-43643.
145. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest* 2007;117:3198-3210.
146. Park AM, Nagase H, Liu L, et al. Mechanism of Anthracycline-mediated downregulation of GATA4 in the heart. *Cardiovasc Res* 2011;90:97-104.
147. Grépin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* 1997;124:2387-2395.

148. Li L, Takemura G, Li Y, et al. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 2006;113:535-543.
149. Shan X, Xu X, Cao B, et al. Transcription factor GATA-4 is involved in erythropoietin-induced cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2009;134:384-392.
150. Chateauviex S, Grigorakaki C, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond. *Biochem Pharmacol* 2011;82:1291-1303.
151. Jelkmann W, Elliott S. Erythropoietin and the vascular wall: the controversy continues. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:S37-S43.
152. Dame C. GATA4: the missing link between Epo and cardioprotection?! *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23:e19-e20.

8. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMH	Anti-Müller Hormon
α -MHC	α -myosin heavy chain
AMHR2	Anti-Müller Hormon Rezeptor 2
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANOVA	analysis of variance
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	bovine serum albumin
CBF	CCAAT binding factor
Cdh1	E-cadherin
cDNA	copy DNA
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
c-ret	Rezeptor-Tyrosinkinase
C _t	threshold cycle
Cy	Cyanin
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	desoxy-Nukleosidtriphosphate
DSD	Disorder of sexual development
E	Embryonaltag
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPDCs	epicardially derived cells
EGR	early growth response
EMSA	Elektrophorese Mobilitätsshift Assay
EMT	epithelial/(epikardial)-mesenchymale Transition
EPO	Erythropoietin
Epo-R	Erythropoietinrezeptor

Erk	extracellular-signal-regulated kinase
FBS	fetales bovines Serum
Fog-2	friend-of-GATA-Protein 2
Foxf1	Forkhead box protein F1
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GMT	GATA4, Mef2c, Tbx5
HEBS	Hepes buffered saline
HEK293	humane embryonale Nierenzellen
HIF-1	hypoxia-inducible factor
His	Histidin
HRE	Hypoxie responsives Element
J	Joule
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
KTS	Lysin, Threonin, Serin
LAR	Luziferase Assay Reagent
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
Lim1	LIM homeobox 1
M15	Mesonephros
mA	Milliampere
MABT	maleic acid buffer containing Tween
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	Multiple Cloning Site
Mef2c	myocyte-specific enhancer factor 2C
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-Y	nuclear factor Y
OD	optische Dichte
PAX2	paired box gene 2
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

PLB	Passive Lysis Buffer
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGB	Stop and Glow Buffer
siRNA	small interference RNA
Snai1	Snail
Sox9	Sex determining region Y – box 9
Sp1	specificity protein 1
SRY	Sex determining Region of Y
Tb4	Thymosin β 4
TBE	Tris, Borsäure, EDTA
TBST	Tris buffered saline with Tween
Tbx5	T-box 5
TE	Tris, EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
5'-UTR	5' untranslatierte Region
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
WAGR	Wilms tumor, aniridia, growth retardation
WNT4	wingless-typ MMTV integration site 4
WT1	Wilmstumor-Transkriptionsfaktor 1

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matti Klockziem, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation des *GATA4* Gens durch den Wilmstumor-Transkriptionsfaktor WT1“ 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.“

23.03.2018

Matti Klockziem

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Publikationen

Kongressbeiträge

M Klockziem, LJ Rudigier, M Klar, KM Kirschner, C Dame, H Scholz. The Wilms' tumor suppressor *Wt1* regulates *Gata4* gene expression through activation of distal enhancer element. *Acta Physiologica Scandinavica* 2014, Volume 210, Issue Supplement s695.

12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holger Scholz für die Ermöglichung und hervorragende Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Darüber hinaus möchte ich auch den Kollegen der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Charlotte Jacobi für die Unterstützung bei Western Blots und dem ChIP Assay danken. Dr. Lina Sciesielski danke ich für die Einführung in die Laborpraxis.

Ebenso wurden viele Dinge leichter durch Inge Grätsch und Angelika Richter, die bei den Immunfluoreszenzfärbungen halfen sowie durch Barbara Mitko und Christin Staar.

Dr. Martin Klar danke ich für seine stets konstruktive Kritik, anregenden Diskussionen sowie Betreuung im Labor.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern danken für ihre fortwährende Unterstützung und Motivation.