

Aus der Klinik für Neonatologie, Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Gewebespezifische Aktivierung des Erythropoietin-Gens durch den Wilms' Tumor-Suppressor 1

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Katharina Valeska BARTZ
aus Gießen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Chr. Dame
2. Prof. Dr. E. Metzen
3. Prof. Dr. Chr. Bühner

Datum der Promotion: 14. Juni 2009

Widmung

Den Stieren sagt man nach, sie verkörpern Kunst, Stärke und Schönheit gepaart mit Ausdauer, Geduld und praktischer Intelligenz.

Für Julia und Lisa, die mich schon so lange begleiten.

Zusammenfassung

Der hämatopoietische Wachstumsfaktor Erythropoietin (*Epo*) wird entwicklungsabhängig in der fetalen Leber und später in der ausgereiften Niere exprimiert. Gewebespezifische Regulationsmechanismen des *Epo*-Gens sind bislang unzureichend geklärt. Der Wilms' Tumor-Suppressor 1 (*Wt1*) ist für die normale Entwicklung des hämatopoietischen Systems relevant. Ziel der Dissertation war es, die Relevanz des Transkriptionsfaktors *Wt1*(-KTS) auf die Expression des *Epo*-Gens zu analysieren.

In humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293), die unter Normoxie kein *Epo* exprimieren, konnte nach stabiler Überexpression der *Wt1*(-KTS) Isoform eine Induktion der *Epo* mRNA und Protein-Expression gezeigt werden. Dieser Effekt war durch Hypoxie (1% O₂) nicht potenzierbar. In der Leber embryonaler Mausmutanten mit homozygoter *Wt1*-Defizienz (*Wt1*^{-/-}) wurde eine verminderte *Epo* mRNA-Expression im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen auf eine relevante Funktion von *Wt1*(-KTS) für die hepatische *Epo*-Expression während der embryonalen Entwicklung hin.

Zur Identifizierung anderer Zelltypen, in denen *Wt1*(-KTS) die *Epo*-Expression regulieren könnte, wurde mittels immunhistochemischer Färbungen von Geweben der embryonalen/fetalen Maus und der adulten Ratte die Expression von *Epo* und *Wt1* untersucht. In der adulten Ratte konnte *Wt1* in den Podozyten der Glomeruli der Nieren sowie nach hypoxischer Stimulation *Wt1* und *Epo* in Hepatozyten, die um die Zentralvene lokalisiert waren, nachgewiesen werden. Beide Proteine waren ebenfalls im sich entwickelnden Riechhirn und im Auge der embryonalen Maus co-lokalisiert.

Zusammengefasst konnte *Wt1*(-KTS) als neuer transkriptioneller Regulator für die gewebespezifische *Epo*-Expression identifiziert werden.

Schlagwörter: Erythropoietin, Wilms' Tumor-Suppressor, Hämatopoese, Transkription, Genregulation

Abstract

The molecular mechanisms of the developmental-stage and tissue-specific regulation of the erythropoietin (*Epo*) gene are poorly understood. Recent findings indicate that the Wilms' tumor suppressor (*Wt1*) might play a role in hematopoiesis. Herein, we tested the hypothesis that *Wt1(-KTS)* acts as a transcriptional regulator of the *Epo* gene.

Under normoxia, *Epo* mRNA and protein expression was induced in human embryonic kidney (HEK) 293 cells with forced expression of *Wt1(-KTS)*. Hypoxia (1% O₂) did not increase this effect. Furthermore, we detected a lower amount of *Epo* mRNA in the liver of embryonic *Wt1*^{-/-}-deficient mice than in wild-type mouse embryos from the same littermate. Our data indicate that *Wt1* has a pivotal role for hepatic *Epo* gene expression during embryonic development.

To elucidate further the implication of *Wt1* in regulating *Epo* gene expression *in vivo*, double-immunofluorescent labeling of *Wt1* and *Epo* proteins was performed in various organs of developing mice and adult rats. In adult rat kidney, *Wt1* was detected in the podocytes of the glomeruli. *Wt1* and *Epo* expression was found in hepatocytes localized around the portal vein of the adult liver. Both proteins have also been colocalized in the developing murine olfactory bulb and eye.

In summary, we identified *Wt1(-KTS)* as a novel transcriptional activator of the tissue-specific expression of *Epo*.

Keywords: Erythropoietin, Wilms' tumor suppressor, hematopoiesis, transcription, gene regulation

Publikationen

Originalarbeit

Dame C, Kirschner KM, **Bartz KV**, Wallach T, Hussels C, Scholz H. The Wilms' tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood* 2006; 107: 4282-90

Abstracts/Kongressbeiträge

Bartz K, Nafz B, Dame C, Scholz H. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is a transcriptional activator of the erythropoietin (EPO) gene. *European Journal of Physiology*, 2004; 447 (suppl. 1):S62.

(Vortrag, Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Leipzig)

Scholz H, **Bartz K**, Kirschner K, Dame C. The Wilms' tumor suppressor Wt1 is a transcriptional activator of the erythropoietin (EPO) gene at normoxia. *Kidney Blood Pressure Research* 2004; 27:312.

(Vortrag, Jahrestagung der Gesellschaft für Nephrologie, Basel)

Hagen P, Kirschner KM, **Bartz K**, Dame C, Scholz H. The Wilms' tumor transcription factor Wt1 activates the erythropoietin system during hematopoiesis. *European Journal of Physiology*, 2005; 449, suppl. 1: S121.

(Poster, Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Göttingen)

Dame C, Kirschner K, **Bartz K**, Wallach T, Scholz H. Gewebespezifische Aktivierung der Erythropoietin-Expression durch den Wilms Tumor-Suppressor Wt1. *Zeitschrift für Neonatologie und Geburtshilfe* 2005; 209:S3.

(Vortrag, Jahrestagung Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Magdeburg)

Dame C, Kirschner K, **Bartz K**, Wallach T, Scholz H. Tissue-specific activation of the erythropoietin gene by the Wilms' tumor suppressor Wt1(-KTS). *Pediatric Research* 2005; 58:367 (75).

(Vortrag, Annual Meeting of the European Society for Pediatric Research, Siena)

Abkürzungsverzeichnis

entsprechend der Originalversion

A	Adenosin
BFU	<i>Burst-forming unit</i>
BFU-E	<i>BFU-erythroid</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CFU-E	<i>CFU-erythroid</i>
CFU-GEMM	<i>CFU-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte</i>
CD34 ⁺	<i>Cluster of differentiation 34 positive Zellen</i>
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol (fluoreszierenden DNA-Farbstoff)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP's	2'-Desoxynukleosid-5'triphosphat(e)
DR2	<i>Direct repeat 2</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
E	Tag der Embryonalentwicklung
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
Epo	Erythropoietin
EtBr	Ethidium-Bromid
EtOH	Ethanol
g	Relative Zentrifugalkraft
G	Guanosin

GATA	Guanosin-Adenosin-Thymin-Adenosin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage - colony stimulating factor</i>
h	<i>Human</i>
HAF	<i>Hypoxia associated factor</i>
HbA	Adultes Hämoglobin
HbF	Fetales Hämoglobin
HEK 293	<i>Human embryonic kidney cells, Typ 293</i>
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
HNF-4	<i>Hepatic nuclear factor-4</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-3	Interleukin-3
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
M	Molar
m	<i>Murine</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
mut	Mutation, mutiert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
n. s.	Nicht signifikant
nt	Nukleotid
p	p-Wert, Ergebnis eines statistischen Signifikanztests
p21	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1A (CDKN1A)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Pro/Glu	Prolin/Glutamin

RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Smad	<i>Small mothers against decapentaplegic protein</i>
Sp1	<i>Simian-virus-40-protein 1/ Specificity protein 1</i>
s/w	Schwarz/Weiß
T	Thymin
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween [®] 20
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	Untranslatierte Region
Vit. D-R	Vitamin D-Rezeptor
Wt1	Wilms' Tumor-Suppressor 1
Wt1(-KTS)	Wt1-Isoform ohne die Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S)
Wt1(+KTS)	Wt1-Isoform mit Insertion der Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Erythropoietin	11
1.2	Der Wilms' Tumor-Suppressor 1	18
1.3	Potentielle Wt1-Bindungsstellen im <i>Epo</i> -Promotor	24
2	Aufgabenstellung und Versuchsplanung	25
3	Material	27
4	Methoden	35
5	Ergebnisse	47
5.1	Bindung von rekombinantem Wt1 an den humanen <i>Epo</i> -Promotor	47
5.2	Induktion der <i>Epo</i> -Promotor-Aktivität durch Wt1(-KTS)	49
5.3	Induktion von Epo durch Wt1(-KTS) <i>in vitro</i>	50
5.4	Auswirkung von Hypoxie auf die durch Wt1 induzierte Epo-Expression	52
5.5	<i>Epo</i> -Expression in Mausmutanten mit homozygoter <i>Wt1</i> -Deletion (<i>Wt1</i> ^{-/-})	54
5.6	Wt1-Expression in Niere und Leber der adulten Ratte	56
5.7	Epo-Expression in der Leber der adulten Ratte	58
5.8	Wt1- und Epo-Expression im Tractus olfactorius der sich entwickelnden Maus	59
5.9	Immunhistologische Doppelfärbung von Epo und Wt1 im Auge der sich entwickelnden Maus	60
6	Diskussion	61
7	Literaturverzeichnis	67
8	Anhang	73

1 Einleitung

1.1 Erythropoietin

1.1.1 Historie und Biologie des Erythropoietins

Bereits vor mehr als 100 Jahren beschrieb der französische Forscher Viault den Zusammenhang zwischen einem verminderten Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und erhöhten Erythrozyten-Werten im Blut von Teilnehmern einer dreiwöchigen Expedition in das Hochland von Morococha in Peru [1]. Dennoch dauerte es fast ein Jahrhundert bis 1977 die Identifizierung der Aminosäuresequenz des verantwortlichen Proteins gelang [2]. Erythropoietin (*Epo*) ist der primäre Wachstumsfaktor für die Proliferation und Differenzierung erythrozytärer Vorläuferzellen. Das ca. 30 kDa schwere Glykoprotein [3] besteht aus 165 Aminosäuren [4] und wird hauptsächlich in interstitiellen, peritubulären Zellen der adulten bzw. ausgereiften Niere und in fetalen Hepatozyten synthetisiert [5].

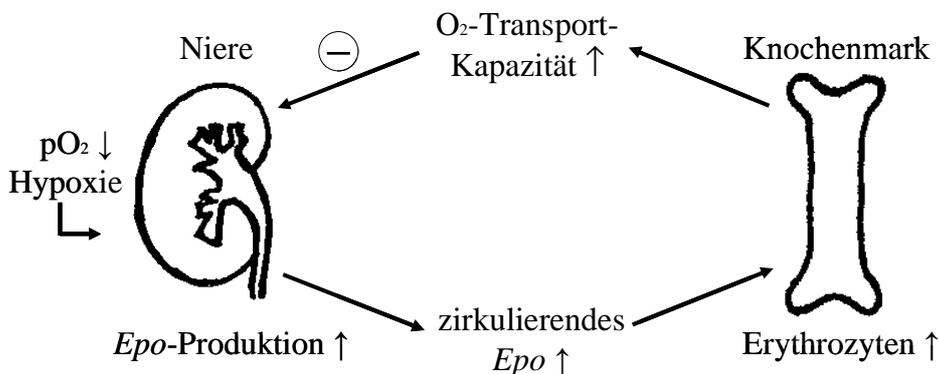


Abbildung 1: Regulation der Erythropoietin-abhängigen Blutbildung, modifiziert nach Ebert und Bunn 1999 [6]. Ein hypoxischer Stimulus, bedingt durch den Mangel von Erythrozyten, einen verminderten pO_2 oder eine verringerte Sauerstoff-Affinität zum Hämoglobin, führt zu einer gesteigerten Expression des *Epo*-Gens in den Nieren [6-8]. *De novo* synthetisiertes Epo gelangt über den Blutkreislauf zum Knochenmark, wo es nach Bindung an den *Epo*-Rezeptor die Proliferation und Differenzierung erythropoietischer Vorläuferzellen stimuliert [6]. Durch die verbesserte Oxygenierung bei erhöhter Sauerstofftransportkapazität wird ein negativer Feedback-Mechanismus auf die Epo-produzierenden Nierenzellen ausgeübt und die Epo-Synthese limitiert [6].

1.1.2 Epo-Expression während der embryonalen und fetalen Entwicklung

Während der Fetalperiode wird *Epo* primär in der Leber produziert [5]. Die Epo-produzierenden Hepatozyten und Ito-Zellen, ein nicht parenchymaler Subtyp der Hepatozyten [9, 10], sind um die Zentralvene lokalisiert. Beim Menschen beginnt ab der 30. Schwangerschaftswoche der Übergang der Epo-Synthese von der fetalen Leber zur Niere. Messungen der *Epo messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression in Leber und Nieren von Neugeborenen bzw. Säuglingen zeigen, dass dieser Wechsel nicht vor der sechsten Woche postnatal abgeschlossen ist [5]. Der Übergang ist genetisch determiniert und nicht vom pO_2 abhängig [11]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind weitgehend unverstanden. Säugetiere zeigen eine spezie-spezifische Kinetik des Wechsels der primären Epo-Synthese; er beginnt bei Mäusen und Ratten im mittleren Schwangerschaftsdrittel und endet zwischen dem 7. – 14. postnatalen Tag [12, 13].

Bei der Maus beginnt die „primitive“, Epo-**un**abhängige Hämatopoiese im Dottersack um den Tag der Embryonalentwicklung (E) 7,5. Durch Verdickungen innerhalb des extra-embryonalen Mesoderm entstehen Blutinseln innerhalb des Dottersackes, welche die ersten eigentlichen hämatopoietischen Vorläuferzellen produzieren [14]. Große ($> 20 \mu\text{m}$) *cluster of differentiation* 34 negative ($CD34^-$) Erythroblasten differenzieren sich zusammen mit den Blutgefäßen, reifen zu kernhaltigen Erythrozyten und synthetisieren fetales Hämoglobin (HbF), bestehend aus je zwei α - und γ -Hämoglobinketten ($\alpha_2\gamma_2$) [15, 16]. Hierdurch unterscheidet sich die „primitive“ von der nachfolgend „definitiven“ Hämatopoiese, welche durch kleinere ($< 20 \mu\text{m}$), kernlose, $CD 34^+$ Erythrozyten charakterisiert ist. Hauptkomponente des Hämoglobintetramers ist das aus 2x2 Einheiten bestehende HbA_1 ($\alpha_2\beta_2$), Nebenkomponente das HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) [17].

Die primitive Hämatopoese ist zeitlich begrenzt und endet mit der Etablierung der „definitiven“, Epo-**abhängigen** Hämatopoese um den Tag E 11,5 [12, 13, 18]. Mausmutanten mit homozygoter *Epo*-Deletion (*Epo*^{-/-}) versterben zwischen dem Tag E 11,5 und E 13,5 aufgrund der ausbleibenden „definitiven“ Hämatopoese [15, 19, 20]. Beim Mensch etabliert sich in der 14. Schwangerschaftswoche neben der Leber die definitive Hämatopoese im Knochenmark und ersetzt im weiteren Verlauf die Leber als primäres Organ der Hämatopoese.

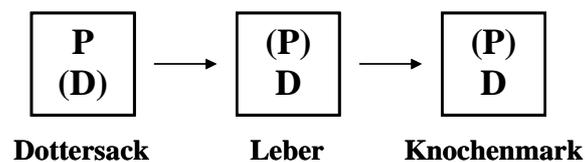


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wechsels von der primitiven zur definitiven Hämatopoese in den Organen, die für die Blutbildung während der embryonalen und fetalen Entwicklung relevant sind, **modifiziert nach C. Dame.** P = primitive Erythropoese, D = definitive Hämatopoese.

Abgesehen von Leber und Niere, die für die Synthese des im Blut zirkulierenden Epos relevant sind, wird *Epo* im Zentralen Nervensystem (ZNS) [21, 22], Rückenmark und Retina [23, 24], Milz [25], Knochenmark sowie den Reproduktionsorganen [23, 26] und der Plazenta [27] exprimiert. Hierbei unterliegt die *Epo*-Expression einer gewebe-spezifischen und entwicklungsabhängigen Regulation [26, 28]. Vor allem die *Epo*-Expression im ZNS ist aufgrund der zellprotektiven Eigenschaften von Epo nach einer hypoxisch-ischämischen Schädigung von besonderem klinischen Interesse [29, 30]. Im Maus-Modell kommt es bei Verwendung von Epo in einem Zeitintervall von bis zu sechs Stunden nach Beginn der Schädigung zu einem signifikant reduziertem Infarkt volumen einschließlich reduzierter Entzündungsreaktionen [31].

1.1.3 Regulierende Elemente im Epo-Gen

Das humane *Epo*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 7 in der Region p11-q22 lokalisiert [32, 33]. Es besteht aus fünf kodierenden Exons [34]. Regulatorische Einheiten wurden initial durch die Analyse von transgenen Mausmutanten, bei denen unterschiedliche Fragmente des *Epo*-Gens sowie der 5' und 3' flankierenden Regionen deletiert wurden, identifiziert [35-37].

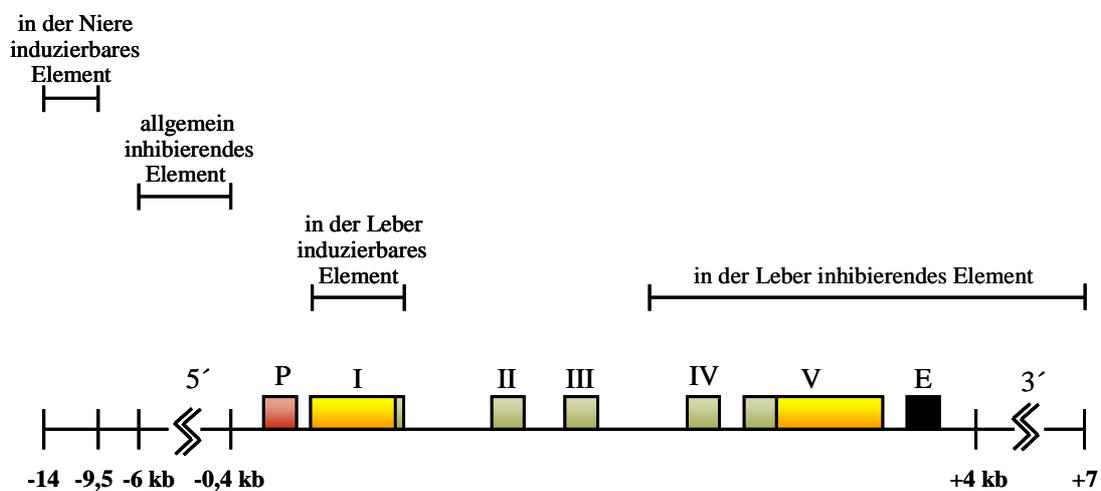


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Epo-Genlokus. Die nicht kodierenden Sequenzen der fünf Exons sind in Gelb, die translatierten in Grün dargestellt. Ein allgemein inhibierendes Element zwischen 0,4 und 6 Kilobasen (kb) 5' sowie ein in der Niere induzierbares Element zwischen 14 kb und 9,5 kb 5' vom *Epo*-Gen, konnten durch Deletionsanalysen identifiziert werden. Ein durch Hypoxie induzierbares Element, das 0,7 kb 3' und 0,4 kb 5' liegt, ist für die *Epo*-Expression in der Leber relevant. Ein weiteres negativ regulierendes Element für die *Epo*-Expression in der Leber wurde zwischen 2,2 und 7 kb 3' vom Gen lokalisiert. Durch *in vitro* Analysen gelang es, zwei weitere *cis acting elements*, den 117 Basenpaar (bp) langen minimalen 5'-*Epo* Promotor (P) sowie den 50 bp langen Hypoxie-abhängigen 3'-*Epo* Enhancer (E) zu identifizierten [35, 38].

1.1.4 Der *Epo*-Promotor

Der 117 bp lange minimale 5'-*Epo* Promotor in der untranslatierten Region, auf den sich die hier vorgelegte Forschungsarbeit fokussiert, scheint v.a. für die gewebespezifische Expression des *Epo*-Gens relevant zu sein [39]. Innerhalb des minimalen humanen *Epo*-Promotors konnten bislang drei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden:

- eine *Guanin-Adenosin-Tyrosin-Adenosin* (*GATA*)-Bindungsstelle bei Nukleotid (nt) -26 bis nt -29 relativ zur Transkriptionsstartstelle [40],
- eine Bindungsstelle für den *hypoxia associated factor* (*HAF*) bei nt -61 bis nt -45 [39] sowie
- eine Bindungsstelle für das *simian-virus-40-protein 1* (*Sp1*) bei nt -59 bis nt -47 [39, 41].

Während *GATA-2* und *GATA-3* nach Bindung an den Promotor die hepatische *Epo*-Expression (Hep3B Zellen) inhibieren [42-44], induziert *GATA-4* die hepatische *Epo*-Expression unter Normoxie [40, 43-45]. *GATA-4* könnte dabei, wie in regulierenden Elementen anderer Gene, als ein potenter Öffner des Chromatins agieren [46]. Eine Sequenz von 17 bp in Position nt -61 bis nt -45 relativ zur Transkriptionsstartstelle, an die die Faktoren *HAF* und *Sp1* binden, potenziert *in vitro* die *Epo*-Expression über eine Interaktion mit dem Enhancer [39, 41]. Während der Promotor die *Epo* mRNA-Expression unter Hypoxie um das ca. 10-fache steigert, kann über die Promotor-Enhancer-Interaktion die *Epo* mRNA-Expression bis zu 100-fach stimuliert werden [6]. Diese Promotor-Enhancer-Interaktion scheint durch *Smad* (*small mothers against decapentaplegic protein*), einen Signalfaktor innerhalb der ebenfalls Sauerstoff-abhängigen Kaskade des *transforming growth factor- β* (*TGF- β*), vermittelt zu werden. *Smad-3* bindet an Guanosin-Cytosin (GC)-reiche Regionen der Desoxyribonukleinsäure (DNA), vor allem an ein CAGAC-Motiv [39].

Eine funktionelle Interaktion zwischen dem 5'-Promotor und dem 3'-Enhancer scheint über eine Schleifenbildung (*looping*) der DNA zustande zu kommen [39]. Die Stabilität solcher Schleifen kann in anderen Promotoren durch Faktoren wie den Transkriptionsfaktor *Sp1* erhöht werden (*bending*) [47]. Vermutlich stabilisiert *Smad* durch Interaktion mit dem *hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)*, dem *hepatic nuclear factor-4 (HNF-4)*, *Sp1* sowie den Co-Aktivatoren CBP/p300 diese Promotor-Enhancer-Interaktion [39].

1.1.5 Der *Epo*-Enhancer

Der 3'-Enhancer des *Epo*-Gens ist insbesondere für die hypoxische Genexpression relevant. Dabei sind drei Bindungsstellen von besonderer Bedeutung:

- eine Bindungsstelle (CAC GTG CT) [48] oder (CCA CGT GG) [39] für *HIF- α* bzw. *HIF- β* ,
- ein CACA Element, das 7 bp 3' der *HIF* Bindungsstelle lokalisiert ist, für welches bislang kein Bindungsprotein bekannt ist, das aber nach Mutation die Hypoxie vermittelte Stimulierbarkeit des Enhancers einschränkt bzw. aufhebt [6, 49] und
- ein *direct site repeat 2 (DR-2)* bestehend aus zwei durch 2 bp getrennte Steroid-Rezeptoren, an die *HNF-4* bindet [35, 50, 51] und das mit dem CACA-Element eine Einheit zu bilden scheint [6].

Die an den *Epo*-Enhancer bindenden Faktoren *HIF* und *HNF-4* werden über die Co-Faktoren CBP/p300 und *Smad-3* stabilisiert [8, 39, 52].

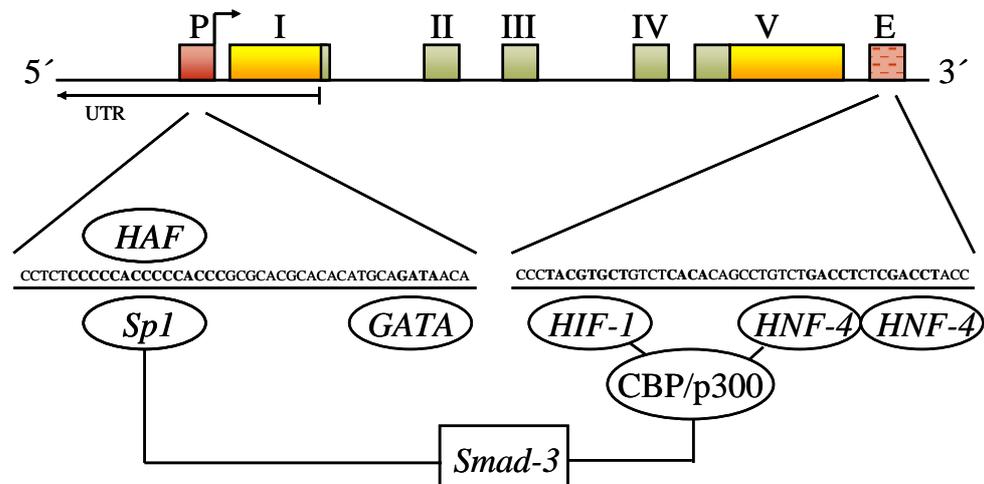


Abbildung 4: Erweiterte schematische Darstellung des Epo-Genlokus mit Promoter (P) und Enhancer (E). Die nicht kodierenden Sequenzen der fünf Exons sind in Gelb, die translatierten in Grün dargestellt. Bindungsproteine am Enhancer sind der *Hypoxia inducible factor-1* (HIF-1), der *Hepatic nuclear factor-4* (HNF-4) sowie die Co-Faktoren CBP/p300. Am Promoter binden GATA-Transkriptionsfaktoren, der *Hypoxia associated factor* (HAF) und das *Simian-virus-40-protein 1* (Sp1). Epo-Enhancer und -Promoter scheinen unter Hypoxie über Faktoren wie das *small mothers against decapentaplegic protein* (Smad-3) miteinander zu interagieren.

1.2 Der Wilms' Tumor-Suppressor 1

1.2.1 Der Wilms' Tumor

Der Wilms' Tumor, der auch als Nephroblastom bezeichnet wird, ist ein maligner, embryonaler Tumor der Niere und der häufigste Nierentumor im Kindesalter. Infolge einer Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 wird die Weiterentwicklung des Metanephron in epitheliale Strukturen (Tubuli und Glomeruli) sowie in mesenchymale Stromastrukturen verhindert [53]. Ca. 10% der Patienten mit einem Nephroblastom weisen eine Mutation im *Wilms' Tumor Suppressor 1 (Wt1)* Gen auf, dessen Protein als Tumor-Suppressor fungiert und einen Arrest der Tumorzellen in der G1-Phase bewirkt [54, 55]. In 10% der Fälle ist das Nephroblastom mit weiteren Fehlbildungen assoziiert. Zu dieser Gruppe zählt das WAGR-Syndrom, das durch Auftreten von **W**ilms' Tumor, **A**niridie, urogenitalen Fehlbildungen und mentaler **R**etardierung charakterisiert ist [56, 57]. In manchen Lehrbüchern steht G für Gonadoblastom, da die urogenitalen Fehlbildungen in der Regel Tumoren der Gonaden darstellen.

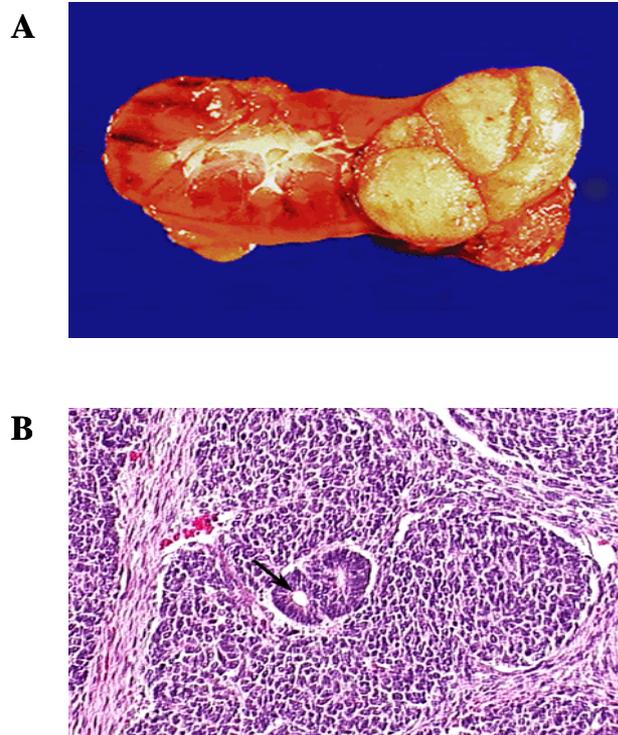


Abbildung 5: A) Makroskopischer Befund und B) mikroskopischer Aufbau des Wilms' Tumors.

1.2.2 Wt1 in der fetalen und embryonalen Entwicklung

Neben seiner Rolle in der Tumorgenese ist Wt1 für die normale Entwicklung des urogenitalen Traktes essentiell [58, 59]. Dabei zeigt die renale Wt1-Expression während der glomerulären Differenzierung ein Maximum in den sogenannten S-förmigen Nierenkörperchen. Danach fällt das Expressionsniveau ab und die Wt1-Expression persistiert lediglich in den Podozyten der Glomeruli [60]. Da es sich im urogenitalen System um epitheliales Gewebe mesenchymalen Ursprungs handelt, wird ein durch Wt1 vermittelter Übergang im Differenzierungszustand dieser Organe angenommen [61, 62]. Dieser Vorgang ermöglicht den Zellen, zwischen einem differenzierten, epithelialen und einem weniger differenzierten, mesenchymalen Zustand zu wechseln. Entwicklungsabhängige Expressionsmuster von Wt1 finden sich ferner in den Nebennieren [61], der Retina [63, 64], der Milz [63-65] sowie den Geschlechtsorganen [66, 67].

1.2.3 Regulierende Elemente im *Wt1*-Gen

Das ca. 50 kb große humane *Wt1*-Gen befindet sich auf Chromosom 11p13 [55]. Es besteht aus zehn Exons, von denen die letzten vier je einen der vier charakteristischen Zink-Finger des Proteins kodieren. Die Zink-Finger ermöglichen die Bindung an CG-reiche Fragmente der DNA, so dass *Wt1* als Transkriptionsfaktor agieren kann [68]. Bislang sind 24 Isoformen des *Wt1*-Proteins bekannt. Vier dieser Isoformen entstehen durch alternative Splicevorgänge, die restlichen durch Verwendung verschiedener Transkriptionsstartstellen oder andere Mechanismen.

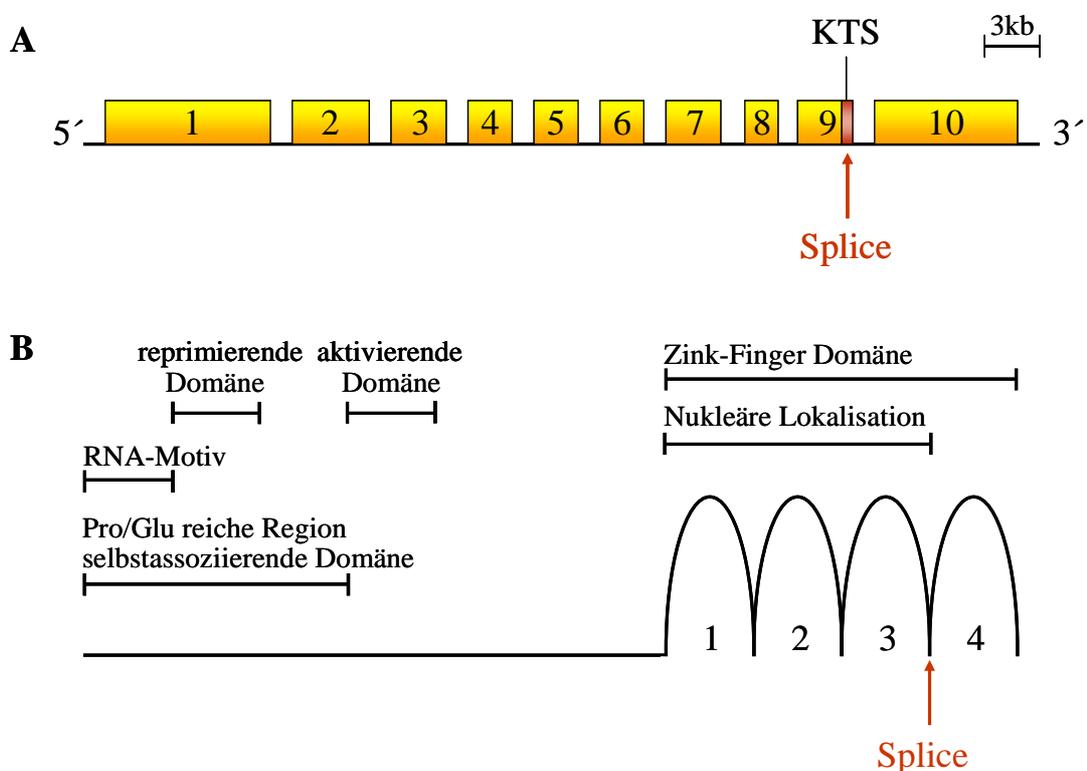


Abbildung 6: Schematische Darstellung des humanen *Wt1*-Genlokus (A) und des *Wt1*-Proteins (B). Eine Insertion der Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) am Ende von Exons 9 führt zur Abnahme der Bindungsaffinität CG-reicher DNA Fragmente. Der Prolin- und Glutamin-reiche N-Terminus des Proteins besitzt eine Selbstassoziierungsdomäne [55] und wird für Protein-Protein-Interaktionen und das *processing* der prä-RNA verantwortlich gemacht [69-71]. Das C-terminale Ende bindet über die Zink-Finger an die DNA der Zielgene

Bei der am häufigsten vorkommenden Splicevariante bedingt die Insertion der drei Aminosäuren Lysin (**K**), Threonin (**T**) und Serin (**S**) am Ende von Exon 9 bei der Wt1(+KTS) Isoform eine Konformationsveränderung des dritten und vierten Zink-Fingers. Dadurch wird die Struktur des translatierten Proteins so verändert, dass dessen Bindung an die DNA reduziert wird [72, 73]. In der Literatur wird die Wt1-Isoform ohne Insertion als Wt1(-KTS) bezeichnet. Während die Wt1(-KTS) Isoform als Transkriptionsfaktor fungiert, bindet die Wt1(+KTS) Isoform nur schwach an die DNA. Aufgrund ihrer Co-Lokalisation mit Elementen der prä-mRNA-Spleiß-Maschinerie [74] wird dieser Isoform ein regulatorischer Einfluss in der Ribonukleinsäuren (RNA)-Prozessierung zugeschrieben [73]. Insgesamt weisen ca. 80% aller Isoformen die Insertion der drei Aminosäuren KTS auf [73].

Das Wt1-Protein hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa und besteht aus einem Glutamin- und Prolin-reichen N-Terminus sowie vier C-terminal gelegenen Zink-Fingern der Klasse Krüppel Cys₂-His₂ [55, 73]. Während das N-terminale Ende, das eine Selbst-assoziiierungsdomäne besitzt [55], für Protein-Protein-Interaktionen und das *processing* der prä-RNA verantwortlich gemacht wird [69-71], bindet das C-terminale Ende mit den Zink-Finger an die DNA der Zielgene. Bindungsmotive sind zum einen GC-reiche Sequenzen (z. B. 5` GNG NGG GNG 3` [75] und 5` GCG TGG GAC T 3` [76] sowie TC-reiche Sequenzen (5` TCC 3`-repeats [77]). Abhängig vom Tumortyp vermag das Wt1 Protein Zielgene zu supprimieren oder zu aktivieren [55]. Zielgene, die durch Wt1(-KTS) supprimiert werden, sind beispielsweise der *insulin-like-growth factor* 1+2 [78] und dessen Rezeptor [79] oder der *epidermal growth factor*-Rezeptor 1 [80]. Zielgene wie der *Vitamin-D Rezeptor* [81, 82] oder *p21* [73] werden dagegen durch Wt1(-KTS) aktiviert. In hämatopoietischen Zellen sind bislang keine Zielgene des Wt1 bekannt.

1.2.4 Wt1 und Hämatopoiese

Wt1 wird in etwa zwei Prozent der CD34⁺ Zellen des gesunden Knochenmarks sowie in linienspezifischen Vorläuferzellen, jedoch nicht in ausgereiften, hämatopoietischen Zellen exprimiert [56, 57, 83-85]. Über die genaue Funktion von Wt1 in diesen Zelltypen ist wenig bekannt. Die Überexpression von Wt1 wirkt *in vitro* auf humane CD34⁺ hämatopoietische Vorläuferzellen anti-proliferativ, jedoch nicht pro-apoptotisch.

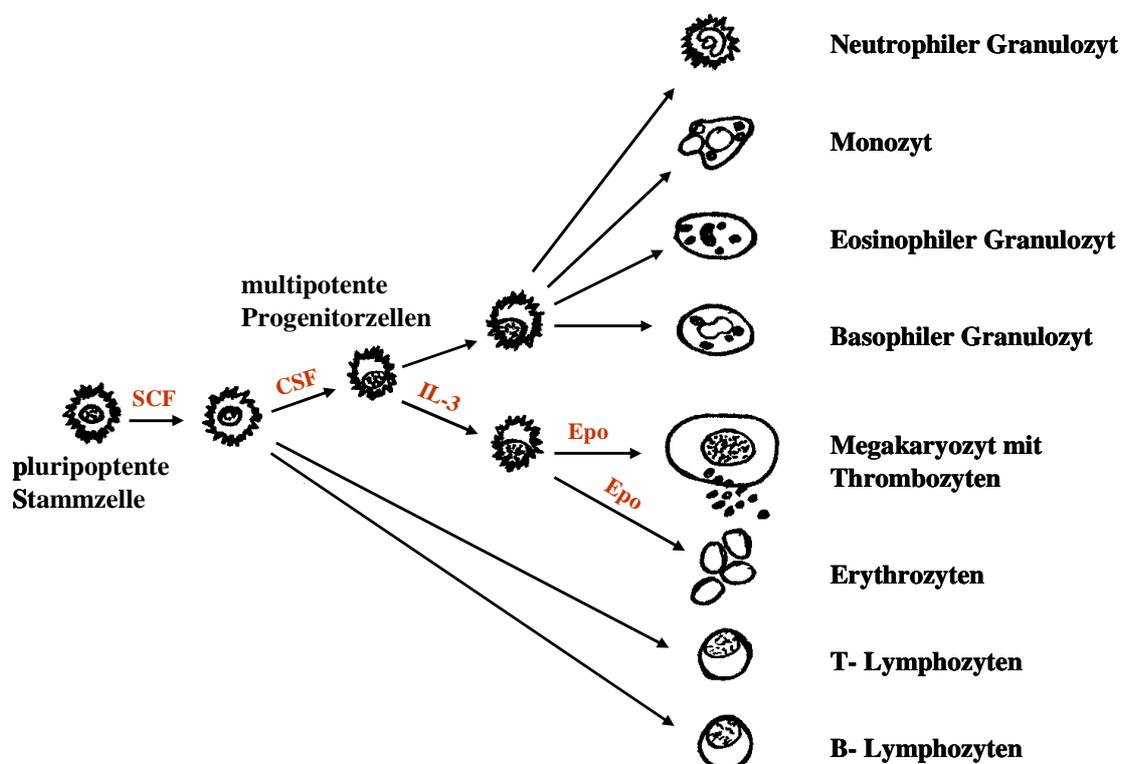


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zellulären Differenzierungsstadien der Hämatopoiese, modifiziert nach Cantor und Orkin 2002 [86]. Epo führt zu einer Freisetzung von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark. Diese differenzieren unter Einfluß von Wachstumsfaktoren und Interleukinen zu den multipotenten Progenitorzellen der einzelnen, unterschiedlichen Zellreihen. SCF = *stem cell factor*, CSF = *colonie stimulating factor*, IL-3 = Interleukin-3, Epo = Erythropoietin.

Mittels reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) konnte *Wt1* mRNA unter anderem in der fetalen Leber, im Dottersack sowie im adulten Knochenmark der Maus nachgewiesen werden [83]. Mausmutanten mit homozygoter *Wt1*-Deletion (*Wt1*^{-/-}) versterben am Tag E 13,5 der Embryonalentwicklung an Fehlbildungen des Herzens und des Zwerchfells [58], die sich in perikardialen Blutungen und Ödemen manifestieren [65]. Heterozygote *Wt1*^{+/-} Mäuse haben keinen auffälligen Phänotyp [58, 59, 73].

Fetale hämatopoietische Stammzellen, die aus der Leber *Wt1*-defizienter Mausmutanten isoliert wurden, zeigten eine um bis zu 75% verminderte Anzahl von *blast-forming units-erythroid* (BFU-E), *colony-forming-units-erythroid* (CFU-E) sowie von *colony-forming-unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte* (CFU-GEMM) [87]. Der Einfluss von *Wt1* auf die Hämatopoiese wird derzeit jedoch kontrovers diskutiert, da diese Befunde, die in transgenen C57/B56 Mausmutanten erhoben wurden, in einer anderen *Wt1*-Knockout Mutante (CBA-Maus) nicht reproduziert werden konnten [85, 87]. Weiterhin scheint *Wt1* eine Rolle in der Entwicklung oder Proliferation leukämischer Zellen, die *Wt1* stark exprimieren, zuzukommen [88, 89]. Bei Mäusen resultiert eine Hemmung der *Wt1*-Expression in einer verminderten Proliferation und Differenzierung leukämischer Zellen.

1.3 Potentielle Wt1-Bindungsstellen im *Epo*-Promotor

In der Sequenzanalyse des 117 bp langen und GC-reichen minimalen humanen 5'-*Epo*-Promotors konnten drei potentielle Bindungsstellen für Wt1 mit dem GnGGnG Konsensus-Motiv [75] gefunden werden. Die Bindungsstellen sind in Position der Nukleotide (nt) -109, -83 und -56 relativ zur Transkriptionsstartstelle lokalisiert (NCBI Accession number M11319.1) Andere Literaturangaben definieren die Transkriptionsstartstelle eine Aminosäure 5' vor dieser Position [51, 90].

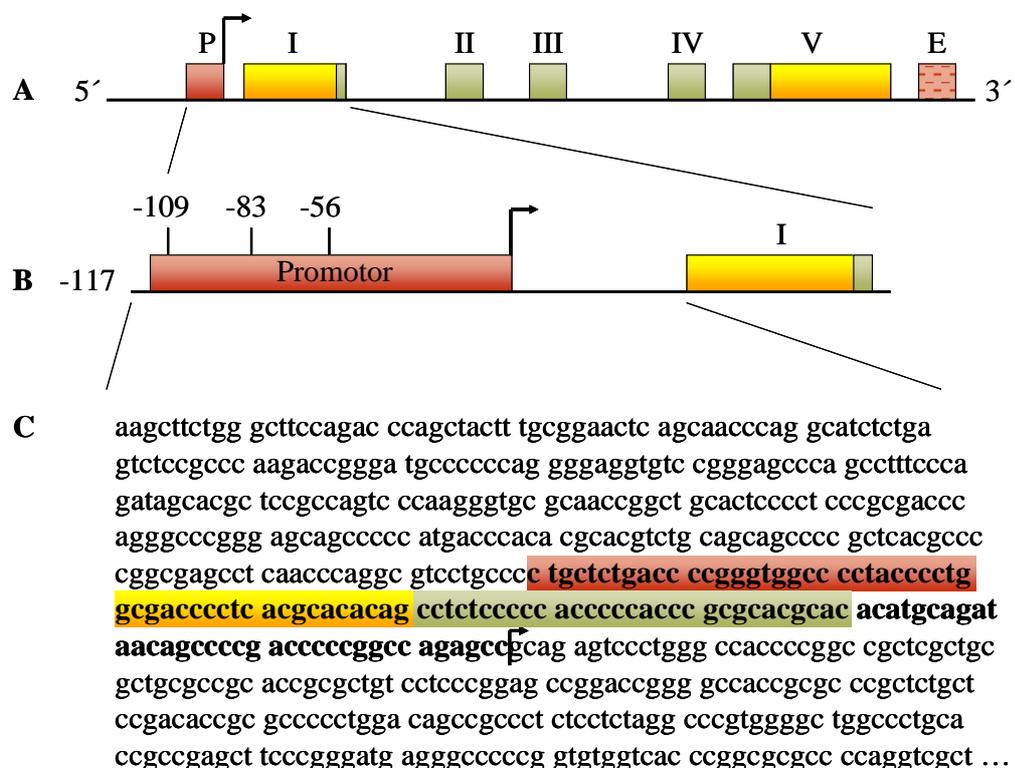


Abbildung 8: Schematische Darstellung des humanen Epo-Genlokus einschließlich der Wt1-Bindungsstellen. (A) Darstellung der fünf Exons einschließlich des minimalen 5' Promotors und des 3' Enhancers. (B) Potentielle Wt1-Bindungsstellen innerhalb des Epo-Promotors in Position nt -109, -83 und -56 relativ zur Transkriptionsstartstelle. (C) Ausschnitt der Originalsequenz des Epo Gens. Der Promoter ist fett gedruckt, die drei potentiellen Bindungsstellen innerhalb nt -116 bis -87, -86 bis -67 und -66 bis -37 sind farblich voneinander abgegrenzt.

2 Aufgabenstellung und Versuchsplanung

Epo wird nicht nur durch eine hypoxisch oder ischämisch bedingte Erniedrigung des pO_2 , sondern auch gewebespezifisch und entwicklungsabhängig reguliert. Die genauen molekularen Mechanismen der gewebespezifischen und entwicklungsabhängigen Genexpression sind noch weitgehend unklar. Ziel der vorgelegten Dissertationsarbeit war es, Mechanismen dieser gewebespezifischen Regulation der *Epo*-Genexpression zu analysieren. Da neueste Forschungsergebnisse den Einfluss von Wt1 auf die Hämatopoiese zeigten, ergab sich die Fragestellung, ob der Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) die Expression des *Epo*-Gens reguliert.

Die Arbeit fokussierte auf die Regulation und Aktivität des 117 bp langen 5' *Epo*-Promotors. Mittels Sequenzanalyse wurden zunächst innerhalb des *Epo*-Promotors drei/fünf potenzielle Wt1-Bindungsstellen identifiziert. Im sich anschließenden elektrophoretischen Mobilitätsshiftassay (EMSA) wurde nachgewiesen, dass rekombinantes Wt1(-KTS) an ein Fragment des *Epo*-Promotors in Position nt -60 bis nt -52 relativ zur Transkriptionsstartstelle bindet. Im nächsten Schritt konnte mittels Reporter-gen-Assays die Induzierbarkeit des *Epo*-Promotors durch Überexpression von Wt1(-KTS) gezeigt werden.

Aufgrund dieser Resultate wurde die Hypothese konkretisiert, dass der Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) die endogene *Epo*-Genexpression *in vivo* induziert und somit für die entwicklungsabhängige und gewebespezifische Regulation des *Epo*-Gens von Bedeutung ist. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse anderer Arbeiten unterstützt:

- Die gestörte Hämatopoiese bei *Wt1*^{-/-} Mäusen suggeriert eine Bedeutung von Wt1 für die *Epo*-Expression. So zeigten *Wt1*^{-/-} Mäuse eine verminderte Aktivität hämatopoietischer Stammzellen in der Leber sowie eine eingeschränkte Proliferation und Differenzierung linien-spezifischer Progenitorzellen, insbesondere der CFU-E [87].

- Mausmutanten mit homozygoter *Epo*- (*Epo*^{-/-}) oder *Wt1*-Deletion (*Wt1*^{-/-}) versterben etwa im gleichen Entwicklungsstadium zwischen Tag E 10,5 und E 13,5 [8, 58].
- Während der embryonalen Entwicklung wird *Wt1* in Geweben exprimiert, in denen auch hämatopoietische Stammzellen vorzufinden sind [83-85].
- Schließlich könnte die hypoxische Induktion von *Wt1* und *Epo* durch HIF zu einer synergistischen Stimulation der *Epo*-Produktion führen [8, 91].

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, den Einfluss von *Wt1*(-KTS) auf die *Epo*-Expression zu beschreiben. Desweiteren sollte die *Wt1*(-KTS) vermittelte Regulation des *Epo*-Gens in Abhängigkeit von Hypoxie analysiert werden. Abschließend sollte eine Analyse der Co-Lokalisation beider Faktoren die *in vivo* Relevanz des Regulationsmechanismus konkretisieren.

3 Material

3.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
<i>Aceton/Bis Solution 19:1</i>	J. T. Baker
Acrylamide	Bio Rad
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Sigma
Ammoniumpersulfat	Merck
ATP γ P ³²	ICN
<i>Bromphenol blue-xylene cyanole dye solution</i>	Sigma
Chloroform	J.T. Baker
<i>Complete mini protease-inhibitor</i>	Roche
<i>Distilled water DNase, RNase free</i>	Invitrogen
dNTP (100mM)	Invitrogen
DMSO	Sigma
DTT (0,1M)	Sigma/ Invitrogen
<i>ECL Detection Reagents</i>	Amersham Biosciences
EDTA	Invitrogen
Eisessig	Merck
Esel- und Mausserum	Jackson Immuno Research Lab.
Ethanol	J. T. Baker
Ether	Roth
Ethidiumbromid	Invitrogen
Formaldehyd	Merck
<i>FuGENE[®] 6 Transfection Reagent</i>	Roche
Glycerin	Merck
Glycin	Serva

Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
<i>Killik[®] Frozen Section Medium</i>	Bio Optica
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG
Methanol	Roth
2-Methyl-Butan	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholal	Acros Organics
Natronlauge	Merck
Oligo (dt) ₁₅ Primer	Promega
Paraformaldehyd	Merck
<i>Protein Assay Reagent</i>	Bio-Rad
<i>Purified BSA</i>	New England Biolabs
Rattenserum	Jackson Immuno Research Lab.
RNA-Extraktions-Kit	Ambion
<i>RNasin[®] ribonuclease inhibitor</i>	Promega
Saccharose	Merck
SDS	Sigma
Technischer Agar	Becton Dickinson
Temed	Merck
Tris	Roth
Triton x-100	Sigma
Trizol [®]	Invitrogen
Tween [®] 20	Sigma
Vectashield [®] Mounting Medium H-1200 mit DAPI	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid	Merck

3.2 Puffer- und Lösungszusammensätze

Puffer/Lösung	Bestandteile
10x Ladepuffer	50 % Glycerin 0,02 % <i>bromphenol blue xylene cyanol dye solution</i>
Laemli Puffer	62,5 mM TrisHCl, pH 6,8 2 % SDS 25 % Glycerin 0,01 % <i>bromphenol-blue-xylene cyanol-dye solution</i>
1x Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 1 % SDS, pH 8,6
RIPA Puffer	50 mM TrisHCl, pH 7,4 150 mM NaCl 10 mM EDTA 1 % <i>IGEPAL</i> 0,25 % Nadeoxycholat 0,1 % SDS 1 <i>Complete Protease Inhibitor</i>
1x TBS	300 mM TrisHCl 1,5 M NaCl, pH 7,6
TBS/T	1x TBS 0,1 % Tween 20
1x Transferpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 20 % Methanol
1x PBS	100 mM Phosphatpuffer 138 mM NaCl 2,7 mM KCl, pH 7,4

PCR Mix	2,5 µl 10x PCR Puffer (200 mM TrisHCl, pH 8,4 und 500 mM KCl)
	0,75 µl 50 mM MgCl ₂
	0,5 µl 10 mM dNTP Mix
	0,2 µl 5U/1 <i>Taq DNA Polymerase</i>
	ad 24 µl <i>RNase/DNase freies dH₂O</i>
RT Mix	4 µl 5x <i>First Stand Buffer</i>
	2 µl 10mM dNTP's
	1 µl 500 g/ml Oligo (dt) 15 Primer
	0,5 µl 0,1 M DTT
	0,5 µl 40 U/1 <i>RNasin</i>
	2 µl 200 U/1 <i>M-MLV Reverse Transkriptase</i>
1x TAE Puffer	40 mM Trisacetat
	1 mM EDTA, pH 7,0
TE Puffer	10 mM Tris
	1 mM EDTA, pH 7,4

Puffer	Hersteller
<i>5x DNA Ligase Buffer</i>	Invitrogen
<i>5x First-Strand Buffer</i>	Invitrogen
<i>5x Green GoTaq™ Buffer</i>	Promega
<i>10x NE Buffer 2</i>	New England BioLabs
<i>10x T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer</i>	New England BioLabs

3.3 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank	B6	Heraeus
CO ₂ Inkubator	CB 150	Binder
Digitalkamera	Spot RT	Slider Diagnostic Instruments
<i>Electrophoretic Gel System</i>	Midicell [®] Primo [™]	Thermo EC
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2	Carl Zeiss
Kryostat	CM 1900	Leica
Luminometer		Microlite TLX1
<i>Mastercycler</i>	gradient	Eppendorf
Photospektrometer	Smartspec 3000	BioRad
Polaroid GelCam	EPH-6	Polaroid
Sephadex [™] G-25-Säule		Amersham Bioscience
Stereomikroskop		Carl Zeiss
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Zentrifugen	5415D; 5417R	Eppendorf

3.4 Software

Programm	Version	Hersteller
iCycler IQ	3.1.	BioRad
Axio Vision	4.2.	Carl Zeiss
Metamorph	4.1.2.	Visitron Systems

3.5 Hilfsmittel

Hilfsmittel	Hersteller
Autoradiographische Kassette	Fisher Scientific
Bio Max MS Röntgenfilm	Kodak
<i>Blotting</i> Papier	BioWORLD
<i>Cell scraper</i>	Corning
Deckglas	Menzel
Eppendorfgefäß	Eppendorf
Falcon [®] Rörchen	BD Biosciences
Gefrierrohrchen	Eppendorf
Mini-Protean Zellkammer	BioRad
Mini-Trans-Blot Zellkammer	BioRad
Nitrocellulose Membran	Invitrogen
Novex [®] 4-20% Tris-Glycin Gele	Invitrogen
Petrischalen	Falcon
Polaroidfilm 667	Polaroid
Röntgenfilm	Invitrogen
Super Frost [®] plus Objektträger	Menzel-Gläser
Zellkulturflaschen	Falcon
Zentrifugenröhrchen	Sorvall

3.6 Humane Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Anbieter (Nummer)
HEK 293	Embryonale Niere	ATCC (CRL-1573)
U-2 OS	Osteosarkom	ATCC (HTB-96)

3.7 Nährmedien und Substrat-Lösungen für Zellkulturen

Produkt	Hersteller
D-MEM + 4,5 g/l Glukose + L-Glutamin-Pyruvat	Invitrogen
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>	Invitrogen
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ 10.000 µg/ml)	Biochrom

3.8 Kommerzielle Assays

Produkt	Hersteller
<i>Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay</i>	Upstate
<i>Dual-Luciferase Reporter Assay System</i>	Promega
<i>Luciferase Assay System</i>	Promega
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

3.9 Enzyme

Produkt	Hersteller
<i>GoTaq</i> TM DNA Polymerase	Promega
<i>M-MLV</i> Reverse Transkriptase	Invitrogen
<i>T4 Polynucleotide Kinase</i>	New England BioLabs

3.10 DNA- und Protein-Marker

Produkt	Hersteller
<i>Beetle Luciferin</i>	MGM Instruments
1 Kb Plus <i>DNA Ladder</i>	Invitrogen
<i>Precision Plus Protein Standards Dual Color</i>	Bio-Rad

3.11 Antikörper

primäre Antikörper	Hersteller
Epo (N-19) polyklonales Ziegen IgG	Santa Cruz
Wt1 (C19) polyklonales Kaninchen IgG	Santa Cruz
α -Tubulin (B7) monoklonales Maus IgG	Santa Cruz

sekundäre Antikörper	Hersteller
Kaninchen gegen Ziege IgG	Jackson Immuno Research Lab.
Ziege gegen Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Lab.
Ziege gegen Maus IgG	Jackson Immuno Research Lab.
Cy2 Esel gegen Ziege IgG	Jackson Immuno Research Lab.
Cy3 Esel gegen Ziege IgG	Jackson Immuno Research Lab.
Cy3 Esel gegen Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research Lab.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung der Zellen

Für *in vitro* Untersuchungen wurde mit humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) und einer Osteosarkomzelllinie (U-2 OS) gearbeitet. HEK 293 wachsen adhären und sind mit einer Adenovirus-5'-DNA transformiert. HEK 293 Zellen wurden in D-MEM Medium, welchem 10% fetales Kälberserum sowie 1% Penicillin/ Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert. U-2 OS Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium, welchem 10% fetales Kälberserum sowie 1% Penicillin/ Streptomycin zugesetzt wurden, kultiviert. Soweit an anderer Stelle nicht gesondert aufgeführt, wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37° C und 21% O₂ sowie 5% Kohlendioxid (CO₂) Begasung in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² im CO₂ Inkubator kultiviert.

4.1.2 Transfektion

0,5 µg des Reporter-gen-Konstruktes wurden zusammen mit 0,25 µg eines Cytomegalievirus gesteuerten β-Galaktosidase Plasmids sowie 1,25 µg eines Expressions-Konstruktes mit der Wt1(-KTS) oder Wt1(+KTS) Isoform transient in HEK 293 Zellen transfiziert. Bei Transfektion besaßen die Zellen eine Konfluenz von ca. 60% in 60 mm Petrischalen. Die Lipo-Transfektion der Zellen wurde mit dem FuGENE[®] 6 Transfektionsreagenz im Verhältnis 10:1 (FuGene[®]:DNA) gemäß Herstellerempfehlung durchgeführt. Kontrollexperimente wurden mit dem leeren pCB6⁺-Expressions- und dem pGL2-Basis-Reportervektor durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden unter Normoxie (21% O₂/ 5% CO₂) oder Hypoxie (1% O₂/ 5% CO₂) kultiviert. Das Medium wurde nach 24 Stunden gewechselt. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet.

4.2 Elektrophoretischer Mobilitätshiftassay

4.2.1 Herstellung der Sonden und Kompetitoren

Die synthetisierten Oligonukleotide mit den proximalen Abschnitten des *Epo*-Promotor wurden in TE-Puffer (pH 7,4) aufgelöst (1 µg/µl) und mit dH₂O verdünnt (100 ng/µl). Zur radioaktiven Markierung der Oligonukleotide wurden 1 µl der Erststrang-Oligonukleotide (100 ng/µl), 4 µl dH₂O, 1 µl 10x *T4 Polynucleotide Kinase Reaction Buffer*, 1 µl *T4 Polynucleotide Kinase* (10 U/µl) und 3 µl ATP γ P₃₂ (30 µCi) für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 90° C inaktiviert. Nach Zugabe von 4 µg Zweitstrang-Oligonukleotide (100 ng/µl) und 86 µl dH₂O wurde die Probe für 10 Minuten bei 90° C denaturiert und anschließend für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur hybridisiert. Die Sonde wurde über eine Sephadex™ G-25-Säule aufgereinigt und bei -20° C aufbewahrt. Zur Herstellung der Kompetitoren wurden 10 µl Erststrang-Oligonukleotide (1 µg/µl) mit 40 µl Zweitstrang-Oligonukleotide (1 µg/µl) vermischt, für 10 Minuten bei 90° C denaturiert und anschließend für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur hybridisiert. Die Proben wurden bei -20° C aufbewahrt.

4.2.2 Durchführung des EMSA

Für die DNA-Bindungsreaktionen wurden entweder 20 µg GST-Wt1(+KTS) oder 20 µg GST-Wt1(-KTS) Protein [92] mit je einem der radioaktiv markierten P₃₂ Doppestrang-Oligonukleotide auf Eis in 20 µl 1x Reaktions-Puffer inkubiert. Kontrollexperimente erfolgten durch Zugabe eines 5-fachen oder 100-fachen Überschuss der 21 bp langen Sequenz des *Vitamin D Rezeptor Promotors*. Die Auftrennung der Bindungsreaktionen erfolgte über drei Stunden in einem nicht-denaturiertem 5%-igem Polyacrylamidgel. Dafür wurden 7,5 ml 40% *Acrylamid/Bis Solution* im Verhältnis 19:1 und 12,5 ml 5x TBE mit dH₂O auf 60 ml aufgefüllt und anschließend mit 600 µl Ammoniumpersulfat sowie 60 µl Temed versetzt. Der EMSA wurde von Prof. Dame unter meiner Beihilfe durchgeführt.

Oligo*	Mutation	Einzelstrangsequenz
Oligo 1 -116/-87		5'-TGC TCT GAC CCC GGG TGG CCC CTA CCC CTG-3'
Oligo 2 -86/-67		5'-GCG ACC CCT CAC GCA CAC AG-3'
Oligo 3 -66/-37		5'-CCT CTC CCC CAC CCC CAC CCG CGC ACG CAC-3'
Mutante A -66/-37	-60 bis -58	5'-CCT CTC AAA CAC CCC CAC CCG CGC ACG CAC-3'
Mutante B -66/-37	-54 bis -52	5'-CCT CTC CCC CAC TTT CAC CCG CGC ACG CAC-3'
Mutante C -66/-37	-60/-58 & -54 bis -52	5'-CCT CTC AAA CAC TTT CAC CCG CGC ACG CAC-3'

Tabelle 1: Im EMSA verwendete Oligonukleotide. *Die angegebenen Zahlen entsprechen der Position der Nukleotide relativ zur Transkriptionsstartstelle des *Epo*-Gens. Die fett markierten Buchstaben in den Einzelstrangsequenzen zeigen die Nukleotidmutationen.

4.3 Reportergen-Assays

4.3.1 Plasmide

Der pGL2-Reporter-Vektor mit der 117 bp langen Sequenz des minimalen *Epo*-Promotors wurde freundlicherweise von Kerry L. Blanchard zur Verfügung gestellt [51], die Wt1-Expressionskonstrukte im pCB6⁺ Vektor von Daniel A. Haber [93]. Mittels PCR wurden die Mutationen der Wt1 Bindungsstelle in den *Epo* Promotor gezielt eingebaut. Dafür wurden folgende Primer generiert:

Primer Sequenzen für Reporter-gen-Assays

	F:	5' TAA GAG CTC TGC TCT GAC CCC GGG T 3'
	R:	5' ATT AAG CTT GCT CTG GCC GGG GGT CG 3'
mut	F:	5' TCA AAC ACT TTC ACC CGC GCA CG 3'
	R:	5' CGC GGG TGA AAG TGT TTG AGA GG 3'

Tabelle 2: Primer Sequenzen für Reporter-gen-Assays. Die fett markierten Buchstaben in den Sequenzen zeigen die mutierten Nukleotide. F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer, mut = Mutation.

4.3.2 Durchführung des Reporter-gen-Assay

Für die Untersuchung wurden Reporter-genkonstrukte à 0,5 µg zusammen mit 0,25 µg eines CMV-gesteuerten β-Galaktosidase-Plasmids, das den 117 bp langen, minimalen *Epo*-Promotor enthielt (pGL2p117), mit 1,25 µg eines Expressionsvektor für Wt1(-KTS), Wt1(+KTS) oder dem Leervektor (pCB6⁺) transfiziert. Zum Zeitpunkt der Transfektion betrug die Konfluenz der U-2 OS-Zellen ca. 60% in 60 mm Platten. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit der FuGENE 6[®] Transfektionsreagenz im Verhältnis 10:1 (FuGENE 6[®]:DNA). Anschließend wurden die Zellen unter Normoxie (20% O₂/ 5% CO₂) oder Hypoxie (1% O₂/ 5% CO₂) inkubiert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität mittels *beetle luciferin* als Substrat im Luminometer gemessen. Die Stimulation durch den Leervektor wurde gleich 1 gesetzt. Die β-Galaktosidase wurde durch das *Dual-Luciferase Reporter Assay System* entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Kontrollexperimente wurden mit dem leeren pCB6⁺ Expressions- sowie mit dem pGL2 Basis-Reporter-Vektor durchgeführt. Insgesamt erfolgten fünf unabhängige Versuche für jede Bedingung. Die Versuche wurden von Frau Dr. Kirschner unter meiner Beihilfe durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels Bonferroni Test, wobei P < 0,05 als statistisch signifikant gewertet wurde.

4.4 RT-PCR

4.4.1 Aufreinigung von RNA aus Mausgeweben

Die Ribonukleinsäure (RNA) wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kit aus den Gewebeproben der Maus nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die schockgefrorenen Embryonen wurden nach Zugabe von 400 µl Lyse-Puffer auf Eis mittels eines zuvor in flüssigen Stickstoff getauchten Pistills homogenisiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit einem Photospektrometer durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, wobei die $OD_{260} = 1,0$ einer Konzentration von 40 µg/ml entsprach, bestimmt. Die RNA wurde bis zur Verwendung für die reverse Transkription (RT) bei -80° C gelagert.

4.4.2 Aufreinigung von RNA aus HEK 293 Zellen

Die RNA wurde aus einer < 80% konfluenten Zellkulturflasche mit einer Bodenfläche von 75 cm² isoliert. Nach zweimaligem Waschen mit je 2 ml kaltem 1x PBS wurden zum Ernten der Zellen 2 ml frisches 1x PBS zugesetzt, die Zellen vom Boden der Kulturflaschen mittels *cell scraper* abgeschabt und in ein 10 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation über 1 Minute bei 20.800 x der relativen Zentrifugalkraft (g) und 4° C wurde das Pellet in je 400 µl Lyse Puffer und Ethanol auf Eis gelöst und die RNA mit dem Isolations-Kit gemäß der Herstellerempfehlung aufgearbeitet.

4.4.3 Durchführung der RT-PCR

Zur Generierung der *complementary* DNA (cDNA) wurden je 2 µg RNA mit 1 µl Oligo (dT) Primer und 1 µl 10 mM dNTPs ad 10 µl RNase und DNase freies destilliertes Wasser (dH₂O) für 15 Minuten bei 65° C im Thermomixer denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl 5x First-Strand Buffer, 2 µl 1 M DTT, 1 µl 40 U/µl *RNasin* sowie 0,5 µl 200 U/µl *MMLV-Reverse Transkriptase* wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für weitere 90 Minuten im Thermomixer bei 42° C revers transkribiert. Als Kontrollen wurden eine Wasserprobe mit Enzym sowie eine RNA-Probe ohne Enzym mitgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

Für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden je 1 µl cDNA mit 2,5 µl 10x Puffer, 0,75 µl 50 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTPs und 0,2 µl 5U/ 1 *Taq DNA Polymerase* ad 25 µl dH₂O inkubiert. Die initiale Denaturierung erfolgte für zwei Minuten bei 94° C, die Denaturierung der DNA über 30 Sekunden bei 94° C, das Annealing der Wt1 und GAPDH Primer für 90 Sekunden bei 60° C und für Epo bei 64° C. Die Primer-Extension erfolgte über 30 Sekunden bei 72° C. Insgesamt wurden je 30 Zyklen für die GAPDH-PCR sowie je 32 Zyklen für die Epo- und Wt1-PCR durchgeführt. Nach Zugabe von 10% 10x *nucleic acid loading buffer* zu den PCR-Produkten wurden diese auf einem 1%-igem Ethidium-Bromid-haltigem Agarose-Gel aufgetragen und unter ultraviolettem Licht visualisiert.

Einprozentige (w/v) Agarose-Gele wurden durch Auflösen von 1g Agarose in 100 ml 1x TAE hergestellt. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf 50° C wurden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Als Marker wurde der 1 Kilobasen (kb) plus DNA Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm durchgeführt. Die Visualisierung der PCR-Produkte wurde mit der Polaroid GelCam EPH-6 unter Verwendung eines s/w Polaroidfilms 667 dokumentiert.

Primersequenzen für PCR Analysen

<i>m Epo</i>	F:	5' CAT CTG CGA CAG TCG AGT TCT G 3'
	R:	5' TGC ACA ACC CAT CGT GAC AT 3'
Länge des Amplikons: 298 bp		
<i>m GAPDH</i>	F:	5' ACG ACC CCT TCA TTG ACC TCA 3'
	R:	5' TTT GGC TCC ACC CT TCA AGTG 3'
Länge des Amplikons: 251 bp		
<i>h Epo (1)</i>	F:	5' AAT GTC CTG CCT GGC TGT GG 3'
	R:	5' CAG CAG GCC GTA GAA GTC TGG 3'
Länge des Amplikons: 260 bp		
<i>h Epo (2)</i>	F:	5' TAG AAT GTC CTG CCT GGC TGT 3'
	R:	5' CCT CCA TCC TCT TCC AGG CAT 3'
Länge des Amplikons: 494 bp		
<i>h Wt1</i>	F:	5' ATC AGA TGA ACC TAG GAG 3'
	R:	5' CTG GGT ATG CAC ACA TGA 3'
Länge des Amplikons: 269 bp		
<i>h GAPDH</i>	F:	5' AAG GTC ATC CAT GAC AAC TT 3'
	R:	5' TTC AGC TCA GGG ATG ACC TT 3'
Länge des Amplikons: 191 bp		
<i>h β-Aktin</i>	F:	5' TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG 3'
	R:	5' CGT CAC ACT TCA TGA TGG AGT 3'
Länge des Amplikons: 591 bp		

Tabelle 3: Primersets für PCR-Analysen. F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer, m = murin, h = human.

4.4.4 Durchführung der Real-time PCR

Für die Quantifizierung der RNA wurde eine TaqMan[®] Real-time PCR unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Primer und dem TaqMan[®] Universal PCR Master Mix nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (20µl-Ansatz, Denaturierung auf 20 Sekunden erhöht). Die RNA-Mengen wurden anhand von Standardreihen unter Verwendung der iCycler IQ Software errechnet und im Verhältnis zur gemessenen Menge an β -Aktin mRNA angegeben.

Primer Sequenzen für TaqMan[®] Real-time PCR Analysen

<i>m Epo</i>	F:	5' CAT CTG CGA CAG TCG AGT TCT G 3'
	R:	5' TGC ACA ACC CAT CGT GAC AT 3'
<i>m β-Aktin</i>	F:	5' AAC TGC AGA GGA CTC CTA TGT GGG TGA CG 3'
	R:	5' CGG GAT CCG ATG GCT ACG TAC ATG GCT GG 3'

Tabelle 4: Primersets für die TaqMan[®] Real-time PCR. F = Vorwärtsprimer, R = Rückwärtsprimer, m = murin.

4.5 Western Blot

4.5.1 Aufreinigung von Gesamtzellprotein aus HEK 293 Zellen

Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums wurden die Zellen aus Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² bei einer Konfluenz < 80% zweimal mit 2 ml kaltem 1x PBS gewaschen. Nach nochmaliger Zugabe von 2 ml frischem 1x PBS wurden die Zellen vom Boden abgeschabt und in ein 2 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation über 1 Minute bei 20.800 x g und 4° C wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 60 µl RIPA Puffer resuspendiert und über 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um Zelldebris zu pelletieren, wurde das Zelllysate anschließend für weitere 10 Minuten bei 20.800 x g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Konzentration der Proteine im Photospektrometer mit der Methode nach Bradford bestimmt. Die Gesamtprotein-Extrakte wurden bei -20° C gelagert.

4.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach Bradford. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden abfallende Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) (10, 5, 2,5 und 1 µg/ml) verwendet. Für die Proteinmessung wurden jeweils 800 µl Proteinlösung der einzelnen Standardreihen mit 200 µl Proteinassay-Reagenz vermengt. Für den Leerwert wurden 800 µl H₂O und zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben 5 µl Proteinextrakt in 795 µl H₂O (1:160) verdünnt und mit jeweils 200 µl Proteinassay-Reagenz inkubiert. Alle Proben wurden im Photospektrometer quantifiziert.

4.5.3 Durchführung Western Blot

20 µg Gesamtzellprotein wurden mit der äquivalenten Menge Laemmli Puffer vermischt und über fünf Minuten bei 95° C denaturiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben auf ein Novex Tris-Glycine 4-20% Western Ready-Gel aufgetragen. Als Marker für das Molekulargewicht der Proteine wurde der *Precision Plus Protein Dual Color Standard* verwendet. Die Proben wurden 90 Minuten lang unter Verwendung eines Laufpuffers bei 0,04 Ampere in der Mini-Protean Zellkammer aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µg in der Mini-Trans-Blot Zellkammer bei 30 Volt und 4° C über 90 Minuten unter Verwendung eines Transferpuffers übertragen. Dabei wurden Gel und Nitrocellulosemembran in einer Sandwich-Technik beidseitig in Mini Trans-Blot Filterpapier und Saugschwämme eingebettet.

Im nächsten Schritt wurden die transferierten Proteine mit *Fast Green* visualisiert und unter Weißlichtbeleuchtung mit einer Polaroid GelCam EPH-6 und einem s/w Polaroidfilm 667 fotografiert. Danach wurde die Membran dreimal in TBS/0,1% Tween (TBS/T) gewaschen und für eine Stunde mit 5%-iger (w/v) Trockenmilchlösung in TBS/T geblockt und anschließend in TBS/T gewaschen (2x abspülen, dann 1x 15 Minuten, 2x 10 Minuten waschen). Nach dem Waschen wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4° C inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschen. Im letzten Schritt wurde der Blot mit je 750 µl *ECL Detection Reagenz* benetzt und die Proteine nach fünf Minuten auf einem Bio Max MS Röntgenfilm visualisiert.

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
Epo (N-19); 1:1000	Kaninchen gegen Ziege IgG; 1:2500
Wt1 (C19); 1:500	Ziege gegen Kaninchen IgG; 1:5000
α-Tubulin (B7); 1:500	Ziege gegen Maus IgG; 1:2000

Tabelle 5: Verwendete Antikörperkombinationen für Western-Blot Analyse.

4.6 Immunhistochemie

4.6.1 Aufarbeitung der Gewebeproben

Die frisch entnommenen Leberproben der adulten Ratte wurden über Nacht bei 4° C in 3% Paraformaldehyd fixiert, dann für 1 Minute in eiskaltem 2-Methyl-Butan und anschließend über 2 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Frisch entnommene Mausembryonen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden in *Killik Frozen Section Medium* eingebettet, im Kryostaten auf eine Schichtdicke von 8 µm geschnitten und auf *Super Frost[®] plus* Objektträger transferiert.

4.6.2 Durchführung der Immunhistochemie

Vor der Färbung wurden die Gewebeschnitte für je 3 Minuten mit einer 3:2 Aceton-Methanol-Lösung und anschließend in einer 8:1 Methanol-H₂O₂-Lösung fixiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Gewebeschnitte in kaltem 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur über eine Stunde mit 10% Eselserum, 5% Rattenserum, 3% BSA und 1‰ Triton in 1x PBS in einer feuchten Kammer geblockt und permeabilisiert. Die auf dem Objektträger verbliebene Flüssigkeit wurde vorsichtig über die Seite des Objektträgers abgetropft. Im nächsten Schritt wurde der jeweilige primäre Antikörper Epo (N19) oder Wt1 (C19) im Verhältnis 1:100 in 5% Eselserum, 3% BSA, 3‰ Triton in 1x PBS gelöst, auf die Gewebeschnitte aufgetragen und über Nacht bei 4° C mit der Lösung inkubiert.

Nach drei Waschschritten über je 15 Minuten in 1x PBS wurden die Gewebeschnitte mit dem sekundären Cy2 oder Cy3 gelabelten Antikörper im Verhältnis 1:150 in 3% BSA, 1‰ in 1x PBS für 75 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten 3 Waschschriffe über je 10 Minuten in 1x PBS. Die auf den Objektträgern verbliebene Flüssigkeit wurde wieder vorsichtig über die Seite des Objektträgers abgetropft. Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit einem Tropfen Einbettmedium *Vector VIP 4.600 Mounting Medium mit DAPI* beträufelt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Kontrollen

wurden in gleicher Weise behandelt, allerdings ohne Inkubation mit dem primären Antikörper. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioplan2 unter Verwendung der Metamorph Software ausgewertet. Fotografien wurden mit der Digital-kamera Spot RT angefertigt.

4.7 Tierversuche und Labor

Die Embryonen der terminiert verpaarten Mäuse des Typs C57/BL6 wurden in Übereinstimmung mit dem europäischen und deutschen Gesetz zum Gebrauch von Labortieren entnommen. Eine genehmigte Tötungsanzeige lag vor (Landesamt Für Gesundheit und Soziales G0435/98). Der Morgen, an dem beim Muttertier ein vaginaler Schleimpfropf festgestellt wurde, wurde als Gestationstag E 0,5 definiert. Die Tötung der trächtigen Mäuse wurde in Ether-Narkose durch zervikale Translokation durchgeführt.

Nach Tötung der trächtigen Mäuse wurde die Bauchdecke mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und das Abdomen mit einer Adson Pinzette und einer Schere eröffnet. Der Uterus wurde *in toto* entnommen und in eine Petrischale mit eiskaltem 1x PBS transferiert. Anschließend wurden die Embryonen einzeln entnommen. Unter dem Stereomikroskop wurde das korrekte Gestationsalter anhand morphologischer Kriterien bestätigt (M. H. Kaufmann, *The Atlas of Mouse Development*). Nach Abtrennung einer Gliedmaße zur Isolierung der genomischen DNA für die Genotypisierung wurde der restliche Embryo in ein 1,5 ml Gefrierrohrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die adulten Rattengewebe stammen aus Experimenten anderer Arbeitsgruppen am Johannes-Müller-Institut für Physiologie der Charité- Universitätsmedizin, Berlin.

5 Ergebnisse

5.1 Bindung von rekombinantem Wt1 an den humanen *Epo*-Promotor

Eine Bindung von Wt1 an den humanen *Epo*-Promotor wurde mittels Mobilitätsshiftassay (EMSA) untersucht. Dafür wurden drei verschiedene Phosphor³² markierte DNA-Fragmente der drei potentiellen Bindungsstellen mit rekombinantem GST-Wt1-Protein (Wt1(+KTS) versus Wt1(-KTS)) [92] inkubiert.

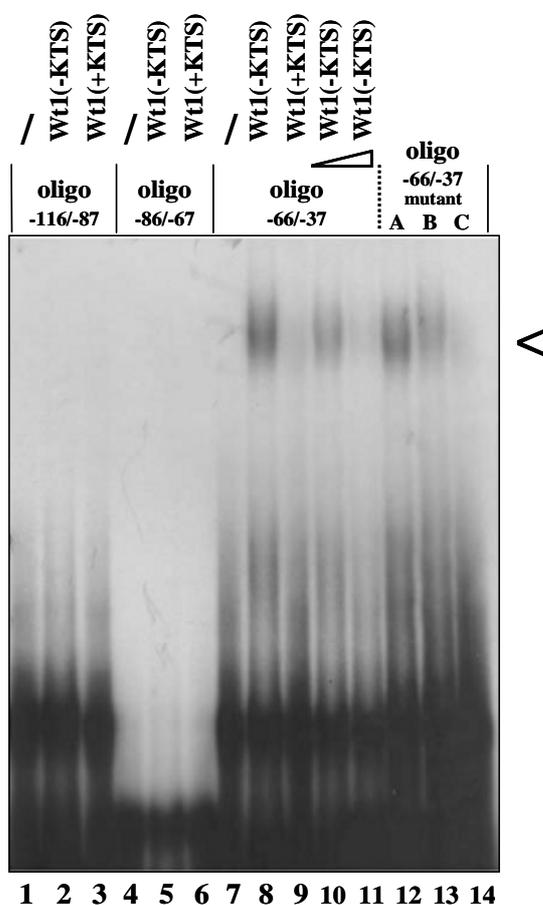


Abbildung 9: EMSA zum Nachweis der Bindung von rekombinantem Wt1-Protein an unterschiedliche DNA-Fragmente des *Epo*-Promotors. Nach Bindung von Wt1 entstanden Shifts (<) durch Bildung von Komplexen mit geringerer Mobilität. Zugabe von 5 bzw. 100-fachen Überschuss eines Oligonukleotides mit bekannter Wt1(-KTS) Bindungsstelle aus dem Vitamin D-Rezeptor Promotor führte zur Konkurrenz der Bindung. Für Detail-Analysen wurden Tripelmutationen (Mutante A, B, C – s. Tbl. 1, S. 37 im Methodenteil) eingefügt. Dabei erkennt man eine Abnahme der Shifts von A über B nach C, welches die Relevanz der Mutation C belegt. Die Auftrennung erfolgte in einem 5 %-igem nicht-denaturiertem Polyacrylamidgel.

Der EMSA zeigt die Bindung von Wt1(-KTS) an den minimalen *Epo*-Promotor. Im *Epo*-Promotor bindet die Wt1(-KTS)-Isoform, die als Transkriptionsfaktor fungiert, nur an das Oligonukleotid -66/-37 relativ zur Transkriptionsstartstelle, nicht jedoch an die beiden anderen Oligonukleotide. Die Verwendung der Wt1(+KTS) Isoform führte dagegen nur zu einer schwachen Bindung. Zugabe von 5-fachem bzw. 100-fachem Überschuss eines Oligonukleotides aus dem *Vitamin D-Rezeptor*-Promotor mit beschriebener Wt1(-KTS) Bindungsaffinität [92], führte zur Konkurrenz der Supershifts. Da sich in dem Oligonukleotid -66/-37 zwei überlappende, potentielle Bindungsstellen für Wt1 befinden, wurden für Detail-Analysen Tripelmutationen eingefügt (Mutante A, B, C). Durch Mutationen der Nukleotide in Position nt -60 bis -58 sowie in Position nt -54 bis -52 konnte gezeigt werden, dass Wt1(-KTS) eine höhere Affinität an die mehr 3' lokalisierte Bindungsstelle besitzt. Dieser Versuch beweist, dass ein Fragment von nt -60 bis -52 relativ zur Transkriptionsstartstelle im minimalen *Epo*-Promotor Wt1(-KTS) bindet.

5.2 Induktion der *Epo*-Promotor-Aktivität durch Wt1(-KTS)

Die Induktion oder Suppression der Promoter-Aktivität durch einen Transkriptionsfaktor kann mittels Reporteragen-Assays überprüft werden. Um die Frage nach der funktionellen Bedeutung der Bindung von Wt1(-KTS) an den *Epo*-Promotor zu beantworten, wurde die Zelllinie U-2 OS mit einem Luziferasevektor, der den 117 bp langen, minimalen *Epo*-Promotor enthielt (pGL2p117), mit einem Expressionsvektor für Wt1(-KTS), Wt1(+KTS) oder dem Leervektor (pCB6⁺) transfiziert.

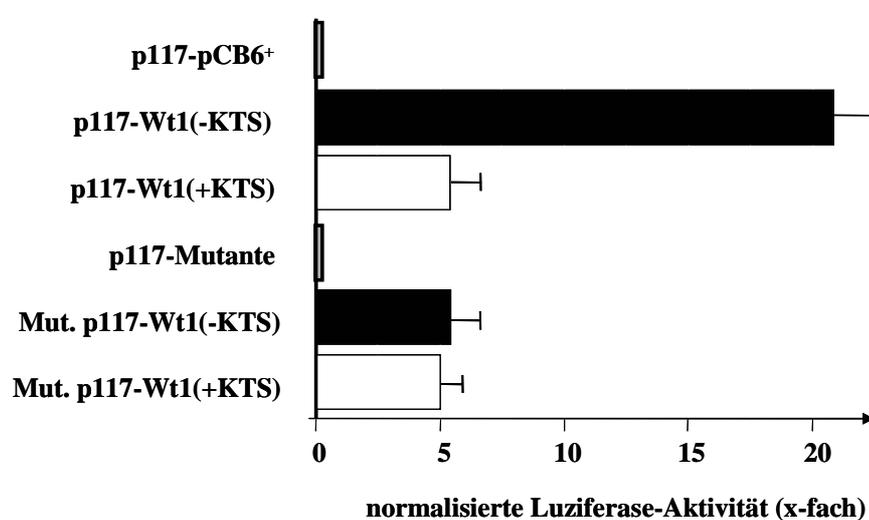


Abbildung 10: Induktion des *Epo*-Promotors durch Wt1 in U-2 OS Zellen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit FuGENE 6[®]-Reagenz im Verhältnis 10:1 (FuGENE 6[®]:DNA). Kontrollen wurden mit dem leeren pCB6⁺ Expressions- sowie dem pGL2 Basis-Reporter-Vektor transfiziert. Die Luziferase-Aktivität wurde mittels *beetle luciferin* als Substrat im Luminometer gemessen. Die Stimulation durch den Leervektor wurde gleich 1 gesetzt. * P < 0,05.

Der Assay zeigte, dass Wt1(-KTS) die Aktivität des *Epo*-Promotors um das ca. 20-fache (+/- 3,3; p < 0,05) stimulierte, während Wt1(+KTS) nur zu einer 5,4-fachen (+/- 2,3; n.s.) Stimulation führte. Die Mutation der Wt1-Bindungsstelle im *Epo*-Promotor (Mut p117) resultierte in einer signifikanten Abschwächung der Induzierbarkeit durch Wt1(-KTS). Der Reporteragen-Assay weist die Aktivierung des *Epo*-Promotors durch Wt1(-KTS) nach. Die Mutation im Wt1-Motiv, für das *in vitro* die Bindung von Wt1(-KTS) nachgewiesen wurde, bestätigt die funktionelle Relevanz des DNA-Elements.

5.3 Induktion von Epo durch Wt1(-KTS) *in vitro*

Nachdem die Induzierbarkeit des *Epo*-Promotors durch die Wt1(-KTS) Isoform gezeigt werden konnte, sollte geklärt werden, ob Wt1(-KTS) die Epo-Expression *in vitro* reguliert. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293), die normalerweise kein *Epo* exprimieren, wurden dafür mit dem pCB6⁺ Wt1(-KTS), dem pCB6⁺ Wt1(+KTS) oder mit dem leeren pCB6⁺ Expressionsplasmid transient transfiziert.

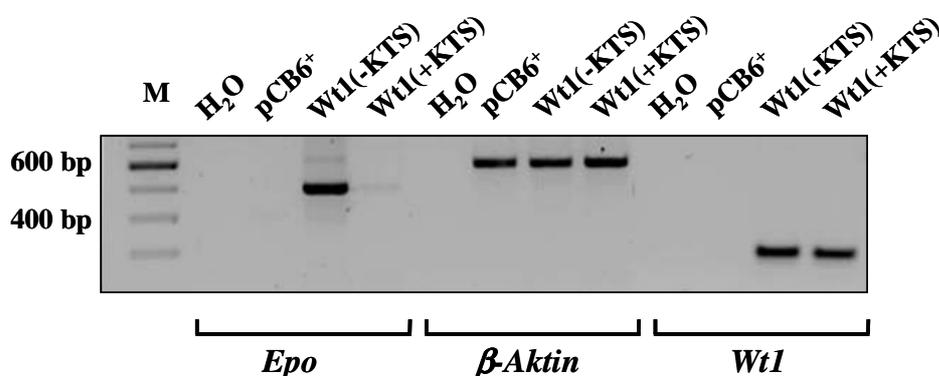


Abbildung 11: RT-PCR-Analyse der *Epo* mRNA-Expression in HEK 293 Zellen nach transienter Transfektion mit Wt1(-KTS), Wt1(+KTS) und dem Leervektor (pCB6⁺). Erwartete Produktgrößen: *Epo* = 494 bp, β -Aktin = 591 bp, *Wt1* = 299 bp, M = Marker. Darstellung als Negativ-Abzug.

In HEK 293 Zellen kam es nach Transfektion mit dem Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) zu einer Induktion der *Epo* mRNA-Expression. Die Transfektion mit der Wt1(+KTS) Isoform hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression der *Epo* mRNA. Der Nachweis äquivalenter Mengen *Wt1* mRNA bestätigt die Effektivität der Transfektion der HEK 293 Zellen. Die Amplifikation der β -Aktin mRNA belegt, dass äquivalente Mengen mRNA eingesetzt wurden.

Mittels Western Blot konnte in stabil mit Wt1(-KTS) transfizierten HEK 293 Zellen eine deutliche Induktion der Wt1 Protein-Expression nachgewiesen werden. Für den Nachweis äquivalenter Proteinmengen in den beiden Ansätzen wurde α -Tubulin analysiert. Im Western Blot konnten somit die Ergebnisse der RT-PCR auf Proteinebene bestätigt werden.

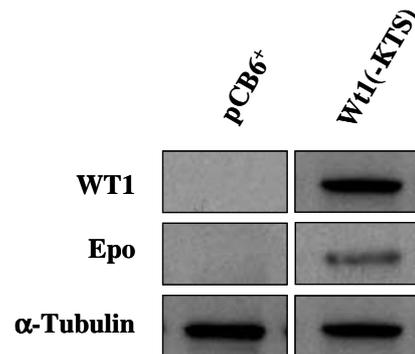


Abbildung 12: Die stabile Überexpression von Wt1(-KTS) induziert die Epo-Expression in HEK 293 Zellen. Gesamtzellproteine wurden isoliert, aufgereinigt und mittels Gelelektrophorese in einem 4-20%-igem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern wurden das Wt1-, Epo- und α -Tubulin-Protein mittels HRE-Reaktion detektiert.

5.4 Auswirkung von Hypoxie auf die durch Wt1 induzierte Epo-Expression

Nachdem die Induktion der Epo-Expression durch den Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) unter Normoxie nachgewiesen werden konnte, sollte analysiert werden, ob dieser Effekt unter Hypoxie modulierbar ist. Die Rationale zu diesem Experiment ergab sich aus zwei Überlegungen. Zum einen wird die *Wt1*-Expression in bestimmten Geweben wie Herz und Nieren unter Hypoxie stimuliert [91], zum anderen könnte nach Aktivierung des *Epo*-Promotors durch Wt1 eine Interaktion zwischen dem 5'-Promotor und 3'-Enhancer vermittelt werden, ähnlich wie dies für den Transkriptionsfaktor Sp1 postuliert wird [39].

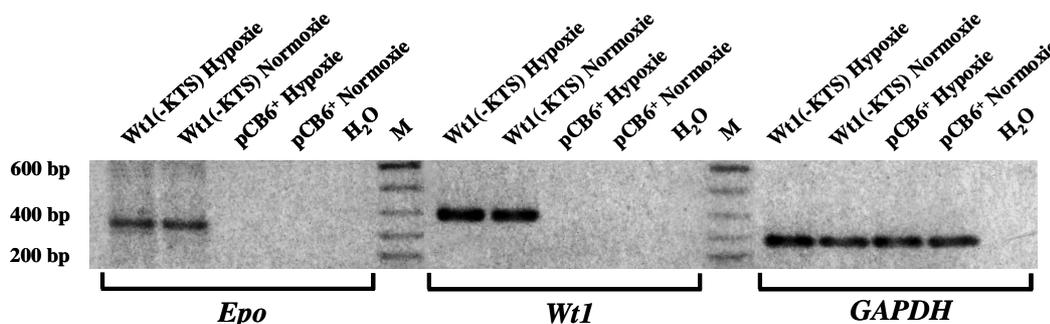


Abbildung 13: RT-PCR-Analyse der Expression von Epo, Wt1 sowie GAPDH in HEK 293 Zellen nach Wt1(-KTS) Überexpression unter Normoxie (21% O₂) versus Hypoxie (1% O₂) über 6 Stunden. Produktgrößen: Epo = 260 bp, Wt1 = 269 bp, GAPDH = 191 bp, M = Marker. Darstellung als Negativ-Abzug.

Untransfizierte HEK 293 Zellen wurden neben stabil Wt1(-KTS) transfizierten HEK 293 Zellen über einen Zeitraum von 6 bzw. 24 Stunden unter Normoxie (21% O₂) versus Hypoxie (1% O₂) kultiviert. Mittels RT-PCR-Analyse war die Induktion der *Epo* mRNA-Expression durch Wt1(-KTS) sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie nachweisbar. Unter Hypoxie versus Normoxie wurde eine gleich starke Induktion der *Epo* mRNA-Expression festgestellt. Zum Nachweis äquivalenter Mengen eingesetzter mRNA wurde die *GAPDH* mRNA als Kontrolle amplifiziert.

Der Western Blot bestätigte die Ergebnisse auf Proteinebene. Die Induktion der Epo-Expression durch den Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) in HEK 293 Zellen werden unter hypoxischen Bedingungen nicht verstärkt.

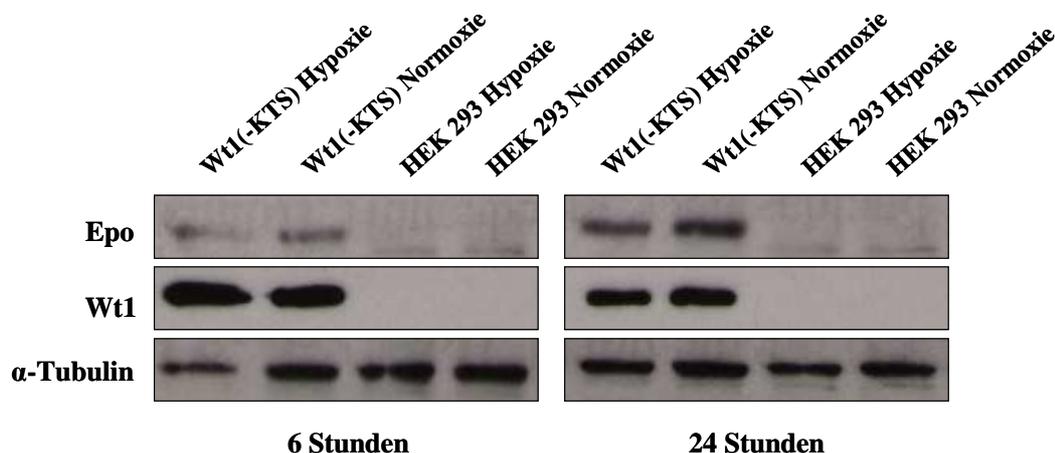


Abbildung 14: Western-Blot-Analyse der Wt1-induzierten Epo-Expression in HEK 293 Zellen nach Transfektion mit dem pCB6⁺ Wt1(-KTS)-Plasmid unter 6 bzw. 24-stündiger Normoxie *versus* Hypoxie. Gesamtzellproteine wurden nach Isolierung und Aufreinigung mittels Gelelektrophorese in einem 4-20%-igem SDS-Gel aufgetrennt und nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen Epo, Wt1 und α-Tubulin mittels ECL-Reagenz detektiert.

Zusammengefasst zeigen die Experimente, dass Wt1(-KTS) in HEK 293 Zellen die Expression der *Epo* mRNA und des Epo-Proteins unter Normoxie induziert. Unter Hypoxie erfolgte keine Verstärkung dieses Effektes.

5.5 *Epo*-Expression in Mausmutanten mit homozygoter *Wt1*-Deletion (*Wt1*^{-/-})

Während der Fetalzeit wird *Epo* überwiegend in der Leber exprimiert [5]. Um die Bedeutung von *Wt1*(-KTS) auf die endogene *Epo*-Expression *in vivo* zu analysieren, wurde *Epo* in der Leber embryonaler Mausmutanten (Tag 11,5 der Entwicklung) mit homozygoter *Wt1*-Defizienz (*Wt1*^{-/-}) im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen (*Wt1*^{+/+}) des gleichen Muttertiers analysiert.

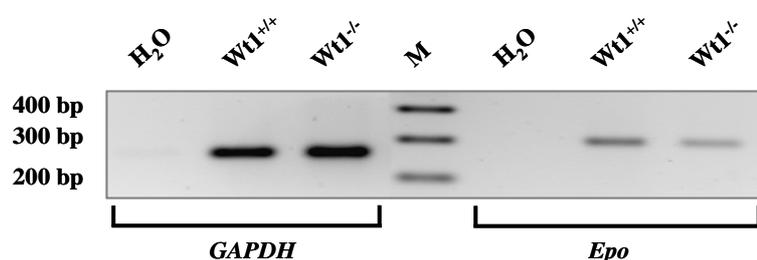


Abbildung 15: RT-PCR-Analyse der *Epo* mRNA-Expression in der Leber von embryonalen Mausmutanten (E 11,5) mit homozygoter *Wt1*-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp. Produktgrößen: *Epo* = 298 bp, *GAPDH* = 251 bp, M = Marker. Darstellung als Negativ-Abzug.

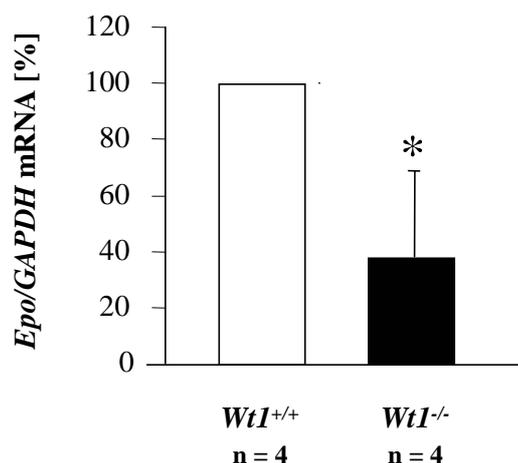


Abbildung 16: Quantifizierung der *Epo* mRNA-Expression im Verhältnis zur *GAPDH* mRNA-Expression in der Leber von embryonalen Mausmutanten (E 11,5) mit homozygoter *Wt1*-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp mittels real-time PCR.

Die konventionelle PCR-Analyse zeigte bei *Wt1*-Defizienz eine deutliche Reduktion der *Epo* mRNA-Expression in der fetalen Leber im Vergleich zum Wildtyp. Eine äquivalente Menge an Gesamt-RNA wurde durch Amplifizierung von *GAPDH* belegt. Die signifikanten Ergebnisse der quantifizierten Analyse sind in einem Säulendiagramm aufgetragen. Damit bestätigt die Untersuchung *in vivo* die Bedeutung von *Wt1* für die hepatische *Epo* mRNA-Expression während der embryonalen Entwicklung der Maus.

5.6 Wt1-Expression in Niere und Leber der adulten Ratte

Um die *in vivo* Relevanz von Wt1 auf die Epo-Expression auch in anderen Organen zu überprüfen, sollte mittels Immunhistochemie eine mögliche Co-Lokalisation von Wt1 und Epo in Organen der fetalen und adulten Ratte oder Maus beschrieben werden. Hierfür wurden zunächst Einzelfärbungen für die beiden Proteine durchgeführt. Die Nieren gelten als das Organ, welches Wt1 am stärksten exprimiert [58, 94].

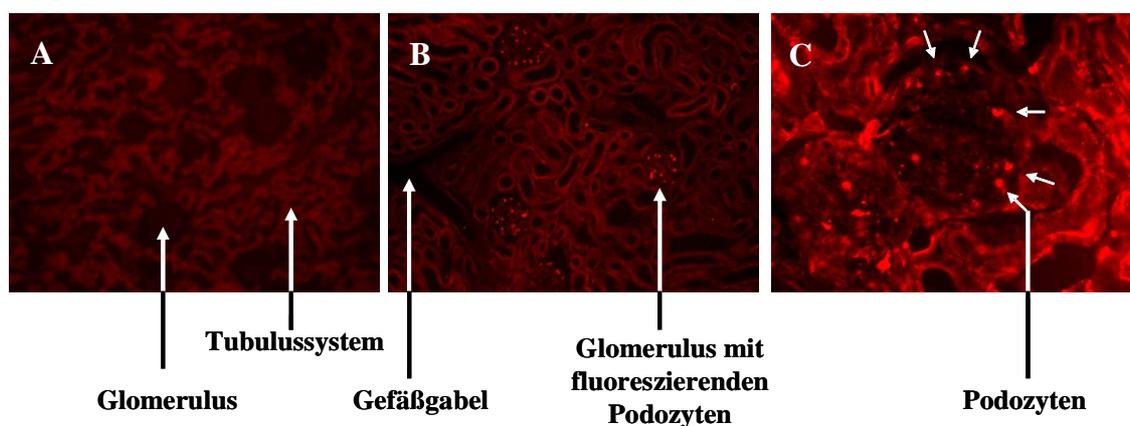


Abbildung 17: Expression von Wt1 in den Podozyten der Nierenglomeruli der adulten Ratte. (A) Kontrollaufnahme (100-fache Vergrößerung), (B) Nachweis von Wt1 im Zellkern der Podozyten (100-fache Vergrößerung), (C) Detailvergrößerung eines Glomerulus (320-fache Vergrößerung).

Das Wt1-Protein wurde immunhistochemisch in den Podozyten der Nierenglomeruli der adulten Ratte nachgewiesen, dargestellt durch die rote Fluoreszenz des zweiten Antikörpers. Damit konnte das in der Literatur beschriebene Expressionsprofil für Wt1 bestätigt werden [58, 60]. In der adulten Leber war das Wt1-Protein nur unter Verwendung einer 0,3 %-igen Triton-Lösung in den Zellkernen der Hepatozyten nachweisbar, die um die Vena centralis lokalisiert sind. Um die Wt1-Expressionsraten zu erhöhen, wurden die Ratten vor Organentnahme einer 24-stündigen Hypoxie (8% O₂) ausgesetzt.

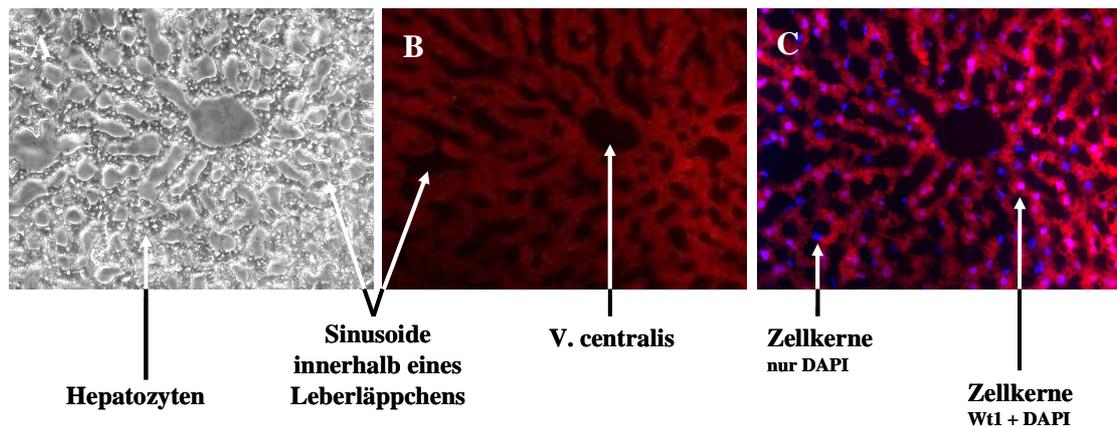


Abbildung 18: Expression von Wt1 in der adulten Leber der Ratte nach 24-stündiger Hypoxie (8% O₂). (A) Phasenkontrastaufnahme (200-fache Vergrößerung), (B) Negativ-Kontrolle (200-fache Vergrößerung), (C) Co-Immunhistochemie für Wt1 (rot) und Detektion der Zellkerne durch DAPI (blau fluoreszierender DNA-Marker) (200-fache Vergrößerung). Es resultiert die Mischfarbe Rosa, wenn beide Strukturen angefärbt sind. Nachweis von Wt1 im Zellkern der um die Vena centralis gelegenen Hepatozyten; in weiter peripher lokalisierten Zellen kann das Wt1-Protein nicht nachgewiesen werden.

5.7 Epo-Expression in der Leber der adulten Ratte

Ferner wurden immunhistochemische Einzelfärbungen für Epo etabliert. Die Epo-produzierenden Hepatozyten und Ito-Zellen liegen um die Venae centrales, in denen der Sauerstoffgehalt nach Passage des Blutes durch die Vena portae am geringsten ist. Um die Epo-Expression zu erhöhen, wurden die Ratten vor Organentnahme einer 24-stündigen Hypoxie (8% O₂) ausgesetzt.

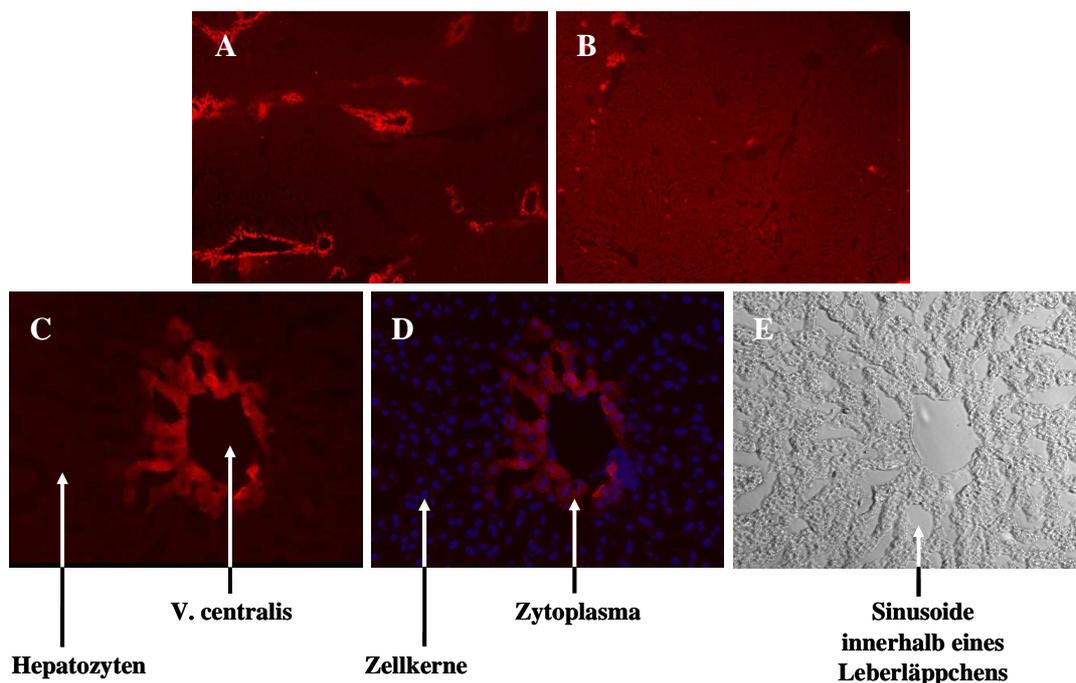


Abbildung 19: Expression von Epo in der adulten Leber der Ratte nach 24-stündiger Hypoxie (8% O₂). (A) Übersichtsaufnahme (40-fache Vergrößerung), Epo ist in Zellen rund um die Venae centrales detektierbar. (B) Negativ-Kontrolle (40-fache Vergrößerung). (C) Nachweis von Epo (rot) im Zytoplasma der um die Vena centralis gelegenen Hepatozyten; in weiter peripher lokalisierten Zellen kann das Epo-Protein nicht nachgewiesen werden (200-fache Vergrößerung). (D) Co-Immunhistochemie für Epo und Färbung der Zellkerne durch DAPI (blau) (200-fache Vergrößerung), (E) Phasenkontrastaufnahme (200-fache Vergrößerung).

Immunhistochemisch kann das Epo-Protein in den Hepatozyten, die rund um die Vena centralis lokalisiert sind, angefärbt werden. Möglicherweise ist die Epo-Expression in weiter peripher gelegenen Hepatozyten zu gering, um mittels Immunhistochemie erfasst zu werden.

5.8 Wt1- und Epo-Expression im Tractus olfactorius der sich entwickelnden Maus

In weiteren immunhistochemischen Untersuchungen wurden Mausembryonen (E 13,5) bezüglich ihrer Wt1- und Epo-Expression analysiert. Aufgrund der zellprotektiven Eigenschaften von Epo galt dabei dem ZNS ein besonderes Interesse [22, 95, 96].

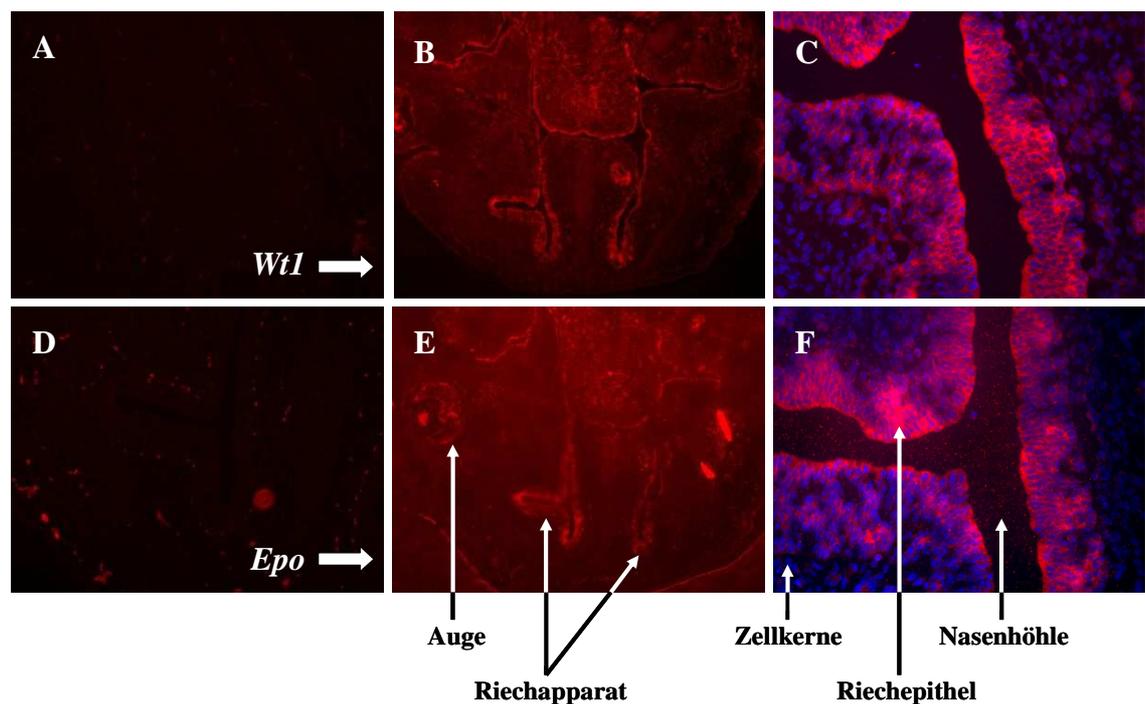


Abbildung 20: Expression von Epo und Wt1 im Riechhirn der embryonalen Maus. (A) Negativ-Kontrolle für Wt1 (40-fache Vergrößerung). (B) Übersichtsaufnahme der Cy3-gelabelten Wt1-Detektion (40-fache Vergrößerung). (C) Detailaufnahme für Wt1 in Rot; die Zellkerne sind mittels DAPI Kernfärbung in Blau dargestellt (360-fache Vergrößerung). (D) Negativ-Kontrolle für Epo (40-fache Vergrößerung), (E) Übersichtsaufnahme der Cy3-gelabelten Epo-Färbung (40-fache Vergrößerung). (F) Detailaufnahme für Epo in Rot; die Zellkerne sind mittels DAPI Kernfärbung in Blau dargestellt (360-fache Vergrößerung).

5.9 Immunhistologische Doppelfärbung von Epo und Wt1 im Auge der sich entwickelnden Maus

Die nachfolgende Untersuchung konzentrierte sich auf Organe, die Epo und Wt1 exprimieren, in denen Epo aber eher eine autokrine oder parakrine Funktion besitzt. Wt1- und Epo-Protein konnten im embryonalen Auge der Maus detektiert werden.

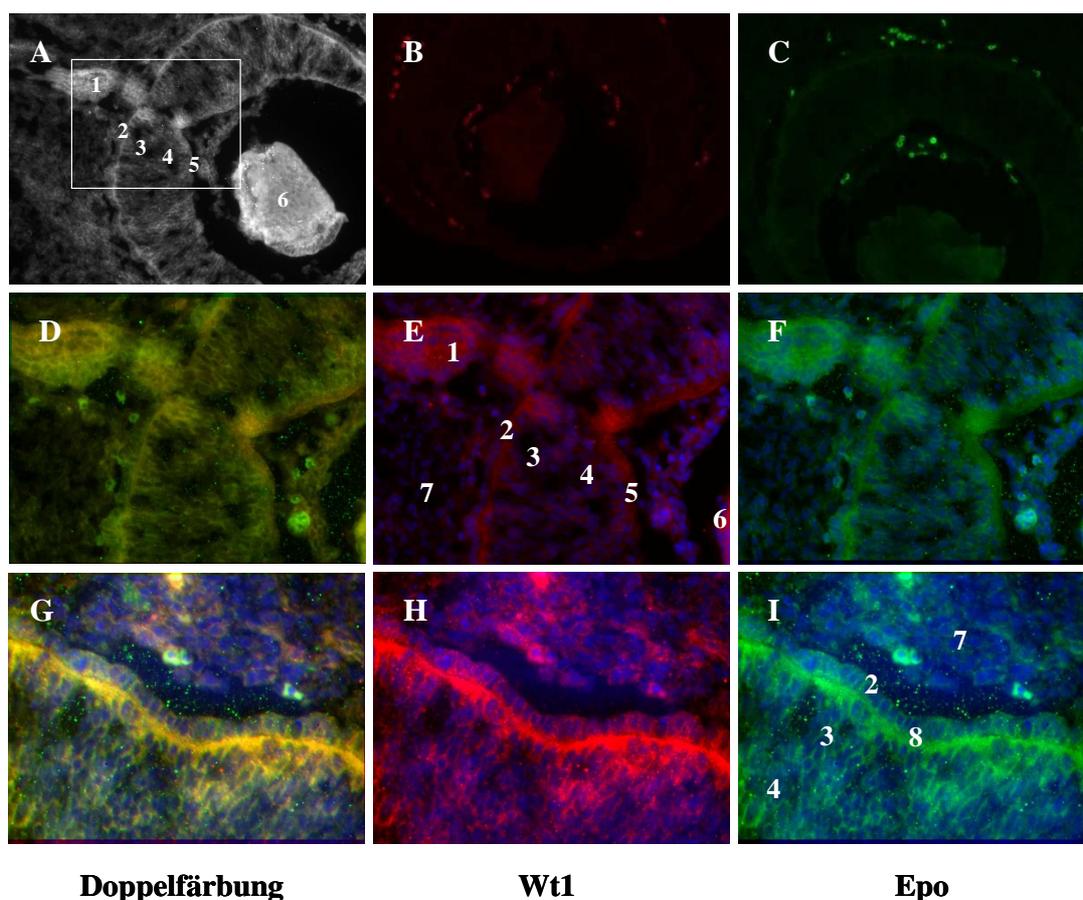


Abbildung 21: Immunhistologische Doppelfärbung für Epo und Wt1 im Auge der fetalen Maus (E 12). (A) Übersichtsaufnahme (40-fache Vergrößerung). (B) Cy3-gelabelte Kontrolle für Wt1 (Rot; 40-fache Vergrößerung). (C) Cy2-gelabelte Kontrolle für Epo (Grün; 40-fache Vergrößerung). (D) 200-fache Vergrößerung des in A markierten Bereichs. Dabei entsteht durch Überlagerung der Bilder E und F die Mischfarbe Gelb, wenn beide Fluoreszenzen im Präparat gebunden sind. (E) Einzelaufnahme der Cy3-markierten Wt1-Detektion. (F) Einzelaufnahme der Cy2-markierten Epo-Detektion. Die Zellkerne sind mittels DAPI in Blau dargestellt. (G), (H) + (I) Fokussierung auf das Pigmentepithel der Retina (360-fache Vergrößerung). 1 = Nervus opticus, 2 = Pigmentepithel, 3 = äußere Körnerschicht, 4 = Ganglienschicht, 5 = innere Körnerschicht, 6 = Linse, 7 = perioculäres Gewebe, 8 = Membrana limitans externa.

6 Diskussion

Die Expression des humanen *Epo*-Gens wird hauptsächlich durch *cis*-Elemente im 3'-Enhancer sowie im 5'-Promotor reguliert [6, 8]. In der vorgelegten Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) als Regulator der *Epo*-Expression identifiziert werden. Im *Epo*-Promotor bindet die Wt1(-KTS) Isoform an das Konsensus-Motiv in Position nt -63 bis -52 relativ zur Transkriptionsstartstelle (s. Abb. 9 auf S. 47). Diese GC-reiche Sequenz ist im Genom stark konserviert (NCBI: M11319 und M26652) [97].

In Reporter-gen-Assays in U-2 OS Zellen führte das Wt1(-KTS)-Expressionsplasmid zu einer Induktion der *Epo*-Promotoraktivität (s. Abb. 10 auf S. 49). Bei Verwendung des Wt1(+KTS)-Expressionsplasmids konnte dagegen keine veränderte Reporter-gen-Aktivität beobachtet werden. Wt1(+KTS) besitzt durch Insertion der drei Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T) und Serin (S) im Vergleich zu Wt1(-KTS) zwar eine reduzierte, jedoch nicht vollständig aufgehobene DNA-Bindungsaffinität [98]. Eine durch Wt1(+KTS) induzierte geringe *Epo*-Promoteraktivität ist deshalb vermutlich durch eine transkriptionelle Restaktivität zu erklären. Die funktionelle Bedeutung der Wt1(+KTS) Isoform ist bislang nur teilweise verstanden. Aufgrund der Co-Lokalisation mit Elementen der prä-mRNA Maschinerie werden Wt1(+KTS) Aufgaben in der RNA-Prozessierung und im Splicing zugeschrieben [74, 99].

Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz wurde das gleiche Expressionsplasmid in HEK 293 Zellen transfiziert. Unter Normoxie konnte in HEK 293 Zellen, die normalerweise kein *Epo* synthetisieren, nach stabiler Transfektion mit dem Wt1(-KTS) Expressionsplasmid eine Induktion der *Epo* mRNA und Protein-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 11 und 12 auf S. 50 f). Nach Transfektion des Wt1(+KTS) Expressionsplasmids wurde dies dagegen nicht beobachtet.

Ferner war es das Ziel zu analysieren, inwiefern der Effekt von Wt1 auf die *Epo*-Expression unter Hypoxie moduliert wird. Die Begründung für dieses Experiment ergab sich aus dem Vorbefund, dass neben *Epo* auch *Wt1* gewebespezifisch unter Hypoxie durch HIF-1 α stimuliert wird [91].

HIF ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer basischen helix-loop-helix α - und β -Untereinheit [100], letztere auch bekannt als ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear locator*). Ursprünglich wurde HIF als Schlüsselregulator der hypoxisch vermittelten Epo-Expression identifiziert [8]. Während ARNT konstitutiv exprimiert wird, erfolgt der Abbau der α -Untereinheit in Abhängigkeit vom pO_2 durch das Ubiquitin-Proteasom System. Zusätzlich führt ein hoher pO_2 zu einer Aktivierung des *factor inhibiting HIF (FIH)-1*, welches seinerseits alle α -Untereinheiten inaktiviert [101]. Insgesamt ist die sauerstoffabhängige Regulation der einzelnen Untereinheiten bislang unklar. Während HIF-1 α vornehmlich für die hypoxische Epo-Induktion in der Leber verantwortlich ist, reguliert HIF-2 α die Epo-Expression in der Niere [102].

In stabil mit Wt1(-KTS) transfizierten HEK 293 Zellen konnte die Induktion der Epo mRNA-Expression unter Normoxie gezeigt werden. Im Wt1-Promotor konnte ein Hypoxie-empfindliches Element identifiziert werden, welches für die Hypoxie-induzierbare Aktivierung des Wt1-Gens verantwortlich ist. Eine Verstärkung der Epo-Synthese durch Wt1(-KTS) unter Hypoxie blieb jedoch aus. In nativen HEK 293 Zellen ohne Wt1-Überexpression führte Hypoxie ebenfalls zu keiner Induktion der Epo-Genexpression (s. Abb. 13 und 14 auf S. 52 f). Der Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) aktiviert die Epo-Expression in HEK 293 Zellen folglich sauerstoff-unabhängig.

Warum Hypoxie weder zu einer Verstärkung der Epo-Expression in stabil mit Wt1(-KTS) transfizierten Zellen noch zu einer Induktion in nativen HEK 293 Zellen führte, bleibt unklar. Die Bindungsstelle für Wt1 befindet sich innerhalb des minimalen 5'-Promoters, während die hypoxische Induktion des Epo-Gens vorrangig durch den 3'-Enhancer vermittelt wird. Möglicherweise bewirkt Wt1(-KTS) eine Interaktion zwischen Promotor und Enhancer, so dass die HIF-induzierte Stimulation sekundär mit der Aktivierung des Promotors einhergeht. Ein solches Phänomen wurde für den Transkriptionsfaktor Sp1 bereits postuliert [39]. Dabei vermittelt Sp1 durch Bindung an den Promotor eine Konformationsänderung der DNA (*looping*), wodurch weit voneinander entfernt liegende DNA-Fragmente miteinander physikalisch interagieren können [47].

Die Bindungsstelle für Wt1(-KTS) im minimalen *Epo*-Promotor überlappt mit den Bindungsstellen für Sp1 in Position nt -57 bis -45 sowie für HAF in Position nt -61 bis -45. Beide Transkriptionsfaktoren induzieren in Hep3B-Zellen den *Epo*-Promotor unter Hypoxie und sind für die optimale Stimulation der Hypoxie-induzierten *Epo* mRNA-Expression relevant [39, 41]. Unter Normoxie ist dagegen die Bindung von Sp1 an den *Epo*-Promotor nur schwach ausgeprägt [39, 41]. Weiterführende Versuche in unserer Arbeitsgruppe zeigen mittels EMSA, dass ansteigende Konzentrationen von rekombinantem Sp1-Protein zu einer verstärkten Bindung von Wt1(-KTS)-Protein an den minimalen *Epo*-Promotor führen und *vice versa*. Die Co-Transfektion von Wt1(+KTS) und Sp1 bewirkte allerdings keine Verstärkung der durch Wt1 induzierten *Epo*-Promotor Aktivität [103]. Folglich scheint der Transkriptionsfaktor Wt1(-KTS) lediglich das *bending* von Sp1 an den *Epo*-Promotor zu stabilisieren, gleiches könnte im Umkehrschluss für Sp1 gelten. Die gewebeabhängigen Unterschiede der *Epo*-Expression unter Hypoxie [26, 28] könnten also in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Wt1(-KTS) durch eine unterschiedliche Bindung von Sp1 an den *Epo*-Promotor bedingt sein. Für den 3' *Epo*-Enhancer ist ein *bending* der DNA bereits beschrieben [6].

Ein weiterer Faktor einer Promotor-Enhancer-Interaktion könnte Smad-3 sein. Smad-3 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Schlüsselregulator innerhalb des Zytokin-gesteuerten *transforming growth factor- β* (TGF- β) Signalweges fungiert. Innerhalb des *Epo*-Enhancer bindet Smad-3 in unmittelbarer Nähe zur HNF-4 Bindungsstelle [39]. Versuche an Schneierzellen, die transient mit *Epo* sowie Sp1, HIF-1 α und Smad-3 transfiziert wurden, zeigten nach Co-Transfektion mit Sp1, HIF und Smad-3 wesentlich höhere *Epo*-Expressionsraten im Vergleich zu Einzeltransfektion mit Smad-3 [39]. Gleichzeitig führte die alleinige Transfektion dieser Zellen mit Sp1 und HNF-4 zu keiner Stimulation der *Epo*-Expression. Erst nach zusätzlicher Transfektion mit Smad-3 war das Reporter gen aktiviert. Möglicherweise vermittelt Smad-3 unter Hypoxie eine Interaktion zwischen *Epo*-Promotor und Enhancer durch Bindung an Sp1. Auch dies könnte gewebespezifische Unterschiede der *Epo*-Expression unter Hypoxie erklären [26, 28]. Interessanterweise versterben Mausmutanten mit homozygoter Smad-3 Deletion um den Tag E 10,5 aufgrund einer Anämie und

Leberhypoplasie [104]. Mäuse mit homozygoter *Epo*-Deletion (*Epo*^{-/-}) oder *Wt1*-Deletion (*Wt1*^{-/-}) versterben in demselben Entwicklungsstadium (E 10,5 bis E 13,5) [8, 58].

Aus Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen war bekannt, dass *Wt1* während der embryonalen Entwicklung in Geweben exprimiert wird, in denen Hämatopoiese erfolgt [83-85]. Um die Relevanz von *Wt1*(-KTS) für die endogene *Epo*-Expression *in vivo* zu analysieren, wurde die *Epo*-Expression in der Leber embryonaler Mausmutanten mit homozygoter *Wt1*-Defizienz (*Wt1*^{-/-}) im Vergleich zu Wildtyp Embryonen (*Wt1*^{+/+}) des gleichen Wurfs bestimmt. Dabei zeigte sich eine signifikant verminderte hepatische *Epo* mRNA-Expression bei homozygoter *Wt1*-Defizienz (s. Abb. 15 und 16 auf S. 54). Einige Jahre zuvor konnte der Transkriptionsfaktor *GATA-4*, der in fetalen, jedoch nicht in adulten Hepatozyten exprimiert wird, als erster gewebespezifischer Aktivator der hepatischen *Epo*-Synthese identifiziert werden [40]. Dabei bindet *GATA-4* ähnlich dem *Wt1* als Zinkfingerprotein an die DNA und moduliert die Expression der mRNA. *GATA-4* öffnet sehr potent das Chromatin und ermöglicht so die Aktivierung der Transkription des *Epo*-Gens. Während *GATA-4* die *Epo*-Expression stimuliert, supprimieren *GATA-2* und *-3 in vitro* und *in vivo* das *Epo*-Gen über eine Bindungsstelle im minimalen *Epo*-Promotor [42]. Die signifikant verminderte *Epo*-mRNA Expression in der Leber der Mausmutanten mit homozygoter *Wt1*(-KTS)-Defizienz belegt, dass *Wt1*(-KTS) neben *GATA-4* die hepatische *Epo*-Expression *in vivo* reguliert.

Während der Fetalzeit wird *Epo* zu über 90 Prozent in der Leber produziert [5]. Ab der 30. Schwangerschaftswoche beginnt der genetisch determinierte [11] Übergang der *Epo*-Synthese von der fetalen Leber zur adulten Niere. Unter chronischem Sauerstoffmangel ist es dem menschlichen Organismus jedoch möglich, die hepatische *Epo*-Synthese ausreichend zu reaktivieren. Mittels Immunhistochemie konnte *Epo*-Protein im Zytoplasma periportal gelegener Hepatozyten von Hypoxie-exponierten, adulten Ratten (8% O₂ über acht Stunden) nachgewiesen werden (s. Abb. 19 auf S. 58). Dieses Expressionsmuster *Epo*-produzierender Zellen zeigt, dass *Epo* v.a. in den Hepatozyten exprimiert wird, die im Vergleich zum restlichen, gut perfundiertem Leberparenchym relativ schlecht oxygeniert sind. *Wt1*-Protein konnte immunhistochemisch im Zellkern *Epo*-exprimierender Hepatozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 18 auf S. 57).

In der adulten Niere scheint *Wt1* dagegen nicht die *Epo*-Expression zu regulieren. *Wt1* fehlt in peritubulären, interstitiellen Fibroblasten, die mittels *in situ* Hybridisierung [6, 105] bzw. in transgenen (BAC-*Epo*)-Mausmutanten [42] als *Epo*-produzierende Zellen identifiziert wurden. Vielmehr ist in der adulten Niere die *Wt1*-Expression auf die Podozyten der Glomeruli begrenzt [59, 60]. Während der Nierenentwicklung wird *Wt1* im mesodermalen Mesenchym exprimiert, welches im weiteren Verlauf mit der Ureterknospe verschmilzt. Die so auf die Ureterknospe übertragenen Wachstumsfaktoren aus dem Mesenchym induzieren die Proliferation epithelialer Kondensate um die Ureterknospe herum und differenzieren letztendlich zum Tubulussystem einschließlich der primären Nephrone [94]. Obwohl beide *Wt1*-Isoformen Einfluss auf die frühe Nierenentwicklung haben, scheint *Wt1(-KTS)* für die Entwicklung der Podozyten vorrangig relevant zu sein [106]. Das für *Wt1* beschriebene Expressionsprofil in den Podozyten der Glomeruli der adulten Rattenniere konnte in eigenen immunhistochemischen Färbungen bestätigt werden (s. Abb. 17 auf S. 56) [60]. Die Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass *Wt1* nur für die *Epo*-Expression in der Leber eine Rolle spielt.

Der Einfluss von *Wt1* auf die Hämatopoiese wird jedoch kontrovers diskutiert. So konnte einerseits gezeigt werden, dass murine, fetale Leberzellen mit *Wt1*-Defizienz (*Wt1*^{-/-}) weniger *CFU-E*, *CFU-GM* und *CFU-GEMM* produzieren als native Wildtypzellen [87]. Andererseits können *Wt1*-defiziente Maus-Leberzellen nach Transplantation in Wildtyp Empfängertiere, deren Knochenmark eine letale Bestrahlung erhalten hatte, ein normal funktionierendes hämatopoietisches System aufbauen [85]. Denkbar ist, dass die hämatopoietischen Defekte bei Mäusen mit *Wt1*-Defizienz durch Fehlregulation eines oder mehrerer hämatopoietischer Signalwege zustande kommen. Eine alternative Hypothese ist, dass *Wt1* über Regulation des *Epo*-Rezeptors die oben beschriebenen Effekte vermittelt.

Neben seiner Rolle in der Hämatopoiese ist *Epo* für die normale Entwicklung weiterer Organe einschließlich des Herzens und des ZNS erforderlich [107]. Aufgrund seiner zellprotektiven Eigenschaften ist die gewebespezifische Regulation des *Epo*-Gens von besonderem klinischem Interesse [22, 95, 96]. *Wt1* ist nicht nur für die urogenitale Entwicklung, sondern auch für die Reifung des ZNS von Bedeutung. So zeigen *Wt1*^{-/-} Mäuse eine ausbleibende Entwicklung retinaler Ganglienzellen [63] und eine gestörte Ausbildung des Riechepithels [108]. Deshalb wurden die Expressionsraten von *Epo* und *Wt1* während der embryonalen Entwicklung der Maus in verschiedenen Organen untersucht. Im Riechepithel konnten *Epo* und *Wt1*-Protein am Entwicklungstag E 12,5 mittels Immunhistochemie erstmals co-lokalisiert werden (s. Abb. 20 auf S. 59). Dabei waren sowohl *Epo*- und *Wt1*-Protein auf das gesamte sich entwickelnde Riechepithel verteilt. Im embryonalen Auge der Maus, welches bezüglich seiner Affektion im WAGR-Syndrom von besonderem klinischen Interesse ist, konnten *Epo* und *Wt1*-Protein in der Retina ebenfalls erstmals co-lokalisiert nachgewiesen werden (s. Abb. 21 auf S. 60).

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit erstmals die funktionelle Relevanz des Transkriptionsfaktors *Wt1*(-KTS) als neuer Regulator der *Epo*-Expression unter Normoxie aufgezeigt werden. Unter Hypoxie, welche die endogene *Epo*-Expression signifikant stimuliert, wird durch *Wt*(-KTS) jedoch keine Zunahme der Expressionsrate erreicht. *In vivo* ist *Wt1* für die normale *Epo*-Expression in der fetalen Leber von Bedeutung. Beide Proteine co-lokalisieren im Riechhirn und der Retina der embryonalen Maus. Diese Co-Lokalisation suggeriert auch in diesem Organsystem eine gewebespezifische Regulation des *Epo*-Gens durch den Transkriptionsfaktor *Wt1*(-KTS). Vermittelt wird die gewebespezifische Induktion des *Epo*-Gens über ein DNA-Motiv im minimalen 5' *Epo*-Promotor.

7 Literaturverzeichnis

1. Viault, F., *Sur l'augmentation considerable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de l'Amerique du Sud*. C R Acad Sci Paris 111, 1890. 917-918.
2. Miyake, T., C.K. Kung, and E. Goldwasser, *Purification of human erythropoietin*. J Biol Chem, 1977. **252**(15): p. 5558-64.
3. Davis, J.M., et al., *Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells*. Biochemistry, 1987. **26**(9): p. 2633-8.
4. Imai, N., et al., *Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin*. J Biochem (Tokyo), 1990. **107**(3): p. 352-9.
5. Dame, C., et al., *Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3218-25.
6. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1864-77.
7. Jelkmann, W. and E. Metzen, *Erythropoietin in the control of red cell production*. Ann Anat, 1996. **178**(5): p. 391-403.
8. Fandrey, J., *Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(6): p. R977-88.
9. Koury, S.T., et al., *Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization*. Blood, 1991. **77**(11): p. 2497-503.
10. Maxwell, P.H., et al., *Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice*. Kidney Int, 1993. **44**(5): p. 1149-62.
11. Flake, A.W., et al., *Erythropoietin production by the fetal liver in an adult environment*. Blood, 1987. **70**(2): p. 542-5.
12. Shams, I., E. Nevo, and A. Avivi, *Ontogenetic expression of erythropoietin and hypoxia-inducible factor-1 alpha genes in subterranean blind mole rats*. Faseb J, 2005. **19**(2): p. 307-9.
13. Madan, A., et al., *Regulated basal, inducible, and tissue-specific human erythropoietin gene expression in transgenic mice requires multiple cis DNA sequences*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2735-41.
14. Moore, M.A. and D. Metcalf, *Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo*. Br J Haematol, 1970. **18**(3): p. 279-96.
15. Wu, H., et al., *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor*. Cell, 1995. **83**(1): p. 59-67.
16. Luo, H.Y., et al., *Embryonic hemoglobins are expressed in definitive cells*. Blood, 1999. **94**(1): p. 359-61.
17. Tavassoli, M., *Embryonic and fetal hemopoiesis: an overview*. Blood Cells, 1991. **17**(2): p. 269-81; discussion 282-6.
18. Palis, J. and M.C. Yoder, *Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man*. Exp Hematol, 2001. **29**(8): p. 927-36.
19. Klingmuller, U., et al., *Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3016-21.

20. Wu, H., et al., *Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1806-10.
21. Dame, C., et al., *Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 2000. **125**(1-2): p. 69-74.
22. Jelkmann, W., *Effects of erythropoietin on brain function*. Curr Pharm Biotechnol, 2005. **6**(1): p. 65-79.
23. Gassmann, M., et al., *Non-erythroid functions of erythropoietin*. Adv Exp Med Biol, 2003. **543**: p. 323-30.
24. Juul, S.E., S.A. Stallings, and R.D. Christensen, *Erythropoietin in the cerebrospinal fluid of neonates who sustained CNS injury*. Pediatr Res, 1999. **46**(5): p. 543-7.
25. Mide, S.M., et al., *Effects of human recombinant erythropoietin on differentiation and distribution of erythroid progenitor cells on murine medullary and splenic erythropoiesis during hypoxia and post-hypoxia*. In Vivo, 2001. **15**(2): p. 125-32.
26. Chikuma, M., et al., *Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(6): p. E1242-8.
27. Conrad, K.P., et al., *Expression of erythropoietin by the human placenta*. Faseb J, 1996. **10**(7): p. 760-8.
28. Tan, C.C., et al., *Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia*. Am J Physiol, 1992. **263**(3 Pt 2): p. F474-81.
29. Juul, S. and U. Felderhoff-Mueser, *Epo and other hematopoietic factors*. Semin Fetal Neonatal Med, 2007. **12**(4): p. 250-8.
30. Noguchi, C.T., et al., *Role of erythropoietin in the brain*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. **64**(2): p. 159-71.
31. Brines, M.L., et al., *Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10526-31.
32. Powell, J.S., et al., *Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6465-9.
33. Watkins, P.C., et al., *Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter----q22*. Cytogenet Cell Genet, 1986. **42**(4): p. 214-8.
34. Jacobs, K., et al., *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 806-10.
35. Semenza, G.L., et al., *Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(3): p. 930-8.
36. Semenza, G.L., et al., *Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8725-9.
37. Semenza, G.L., et al., *Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2301-5.
38. Kochling, J., P.T. Curtin, and A. Madan, *Regulation of human erythropoietin gene induction by upstream flanking sequences in transgenic mice*. Br J Haematol, 1998. **103**(4): p. 960-8.

39. Sanchez-Elsner, T., et al., *A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads*. J Mol Biol, 2004. **336**(1): p. 9-24.
40. Dame, C., et al., *Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2955-61.
41. Gupta, M., P.T. Mungai, and E. Goldwasser, *A new transacting factor that modulates hypoxia-induced expression of the erythropoietin gene*. Blood, 2000. **96**(2): p. 491-7.
42. Obara, N., et al., *Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression*. Blood, 2008. **111**(10): p. 5223-32.
43. Imagawa, S., et al., *L-arginine rescues decreased erythropoietin gene expression by stimulating GATA-2 with L-NMMA*. Kidney Int, 2002. **61**(2): p. 396-404.
44. Imagawa, S., M. Yamamoto, and Y. Miura, *Negative regulation of the erythropoietin gene expression by the GATA transcription factors*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1430-9.
45. Imagawa, S., et al., *Erythropoietin gene expression by hydrogen peroxide*. Int J Hematol, 1996. **64**(3-4): p. 189-95.
46. Cirillo, L.A., et al., *Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 279-89.
47. Su, W., et al., *DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1*. Genes Dev, 1991. **5**(5): p. 820-6.
48. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
49. Firth, J.D., B.L. Ebert, and P.J. Ratcliffe, *Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21021-7.
50. Firth, J.D., et al., *Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6496-500.
51. Blanchard, K.L., et al., *Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5373-85.
52. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of transcription by hypoxia requires a multiprotein complex that includes hypoxia-inducible factor 1, an adjacent transcription factor, and p300/CREB binding protein*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4089-96.
53. Discenza, M.T., et al., *WT1 is a modifier of the Pax2 mutant phenotype: cooperation and interaction between WT1 and Pax2*. Oncogene, 2003. **22**(50): p. 8145-55.
54. Ellisen, L.W., *Regulation of gene expression by WT1 in development and tumorigenesis*. Int J Hematol, 2002. **76**(2): p. 110-6.
55. Scharnhorst, V., A.J. van der Eb, and A.G. Jochemsen, *WT1 proteins: functions in growth and differentiation*. Gene, 2001. **273**(2): p. 141-61.
56. Bremond-Gignac, D., et al., *Three patients with hallucal polydactyly and WAGR syndrome, including discordant expression of Wilms tumor in MZ twins*. Am J Med Genet A, 2005. **134**(4): p. 422-5.

57. Breslow, N.E., et al., *Characteristics and outcomes of children with the Wilms tumor-Aniridia syndrome: a report from the National Wilms Tumor Study Group*. J Clin Oncol, 2003. **21**(24): p. 4579-85.
58. Kreidberg, J.A., et al., *WT-1 is required for early kidney development*. Cell, 1993. **74**(4): p. 679-91.
59. Kreidberg, J.A., *Gene targeting in kidney development*. Med Pediatr Oncol, 1996. **27**(5): p. 445-52.
60. Mundlos, S., et al., *Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues*. Development, 1993. **119**(4): p. 1329-41.
61. Moore, A.W., et al., *YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis*. Development, 1999. **126**(9): p. 1845-57.
62. Wagner, K.D., et al., *The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction*. Faseb J, 2002. **16**(9): p. 1117-9.
63. Wagner, K.D., et al., *The Wilms' tumor gene Wt1 is required for normal development of the retina*. Embo J, 2002. **21**(6): p. 1398-405.
64. Wagner, N., et al., *The Wilms' tumor suppressor Wt1 is associated with the differentiation of retinoblastoma cells*. Cell Growth Differ, 2002. **13**(7): p. 297-305.
65. Herzer, U., et al., *The Wilms tumor suppressor gene wt1 is required for development of the spleen*. Curr Biol, 1999. **9**(15): p. 837-40.
66. Natoli, T.A., et al., *Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis*. Dev Biol, 2004. **268**(2): p. 429-40.
67. Shimizu, M., et al., *Immunohistochemical detection of the Wilms' tumor gene (WT1) in epithelial ovarian tumors*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(2): p. 158-63.
68. Reddy, J.C. and J.D. Licht, *The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know?* Biochim Biophys Acta, 1996. **1287**(1): p. 1-28.
69. Caricasole, A., et al., *RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7562-6.
70. Charlieu, J.P., et al., *Does the Wilms' tumour suppressor gene, WT1, play roles in both splicing and transcription?* J Cell Sci Suppl, 1995. **19**: p. 95-9.
71. Davies, R.C., et al., *WT1 interacts with the splicing factor U2AF65 in an isoform-dependent manner and can be incorporated into spliceosomes*. Genes Dev, 1998. **12**(20): p. 3217-25.
72. Haber, D.A., et al., *Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9618-22.
73. Lee, S.B. and D.A. Haber, *Wilms tumor and the WT1 gene*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 74-99.
74. Larsson, S.H., et al., *Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing*. Cell, 1995. **81**(3): p. 391-401.
75. Rauscher, F.J., 3rd, et al., *Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1259-62.
76. Ellisen, L.W., et al., *The Wilms tumor suppressor WT1 directs stage-specific quiescence and differentiation of human hematopoietic progenitor cells*. Embo J, 2001. **20**(8): p. 1897-909.
77. Wang, Z.Y., et al., *A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8896-900.

78. Drummond, I.A., et al., *Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1*. Science, 1992. **257**(5070): p. 674-8.
79. Werner, H., et al., *Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1*. J Mol Neurosci, 1996. **7**(2): p. 111-23.
80. Madden, S.L., et al., *Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product*. Science, 1991. **253**(5027): p. 1550-3.
81. Maurer, U., et al., *The Wilms' tumor gene product (WT1) modulates the response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 by induction of the vitamin D receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3727-32.
82. Lee, T.H. and J. Pelletier, *Functional characterization of WT1 binding sites within the human vitamin D receptor gene promoter*. Physiol Genomics, 2001. **7**(2): p. 187-200.
83. Fraizer, G.C., et al., *Expression of the tumor suppressor gene WT1 in both human and mouse bone marrow*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4704-6.
84. Moore, A.W., et al., *YAC transgenic analysis reveals Wilms' tumour 1 gene activity in the proliferating coelomic epithelium, developing diaphragm and limb*. Mech Dev, 1998. **79**(1-2): p. 169-84.
85. King-Underwood, L., et al., *Wt1 is not essential for hematopoiesis in the mouse*. Leuk Res, 2005. **29**(7): p. 803-12.
86. Cantor, A.B. and S.H. Orkin, *Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners*. Oncogene, 2002. **21**(21): p. 3368-76.
87. Alberta, J.A., et al., *Role of the WT1 tumor suppressor in murine hematopoiesis*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2570-4.
88. Pritchard-Jones, K. and L. King-Underwood, *The Wilms tumour gene WT1 in leukaemia*. Leuk Lymphoma, 1997. **27**(3-4): p. 207-20.
89. Inoue, K., et al., *Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1405-12.
90. Imagawa, S., et al., *Regulatory elements of the erythropoietin gene*. Blood, 1991. **77**(2): p. 278-85.
91. Wagner, K.D., et al., *Oxygen-regulated expression of the Wilms' tumor suppressor Wt1 involves hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)*. Faseb J, 2003. **17**(10): p. 1364-6.
92. Wagner, K.D., et al., *Activation of vitamin D receptor by the Wilms' tumor gene product mediates apoptosis of renal cells*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(6): p. 1188-96.
93. Haber, D.A., et al., *WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant*. Science, 1993. **262**(5142): p. 2057-9.
94. Scholz, H. and K.M. Kirschner, *A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 54-9.
95. Jelkmann, W., *Molecular biology of erythropoietin*. Intern Med, 2004. **43**(8): p. 649-59.
96. Keswani, S.C., et al., *A novel endogenous erythropoietin mediated pathway prevents axonal degeneration*. Ann Neurol, 2004. **56**(6): p. 815-26.
97. Shoemaker, C.B. and L.D. Mitsock, *Murine erythropoietin gene: cloning, expression, and human gene homology*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(3): p. 849-58.
98. Bickmore, W.A., et al., *Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript*. Science, 1992. **257**(5067): p. 235-7.
99. Hewitt, S.M., et al., *Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8588-92.

100. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
101. Lando, D., et al., *FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor*. Genes Dev, 2002. **16**(12): p. 1466-71.
102. Maxwell, P.H., *Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator*. Exp Physiol, 2005. **90**(6): p. 791-7.
103. Dame, C., et al., *Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4282-90.
104. Dickson, M.C., et al., *Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice*. Development, 1995. **121**(6): p. 1845-54.
105. Koury, S.T., M.C. Bondurant, and M.J. Koury, *Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization*. Blood, 1988. **71**(2): p. 524-7.
106. Roberts, S.G., *Transcriptional regulation by WT1 in development*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 542-7.
107. Wu, H., et al., *Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis*. Development, 1999. **126**(16): p. 3597-605.
108. Wagner, N., et al., *A splice variant of the Wilms' tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system*. Development, 2005. **132**(6): p. 1327-36.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christof Dame für die Überlassung des Themas, die Forschungsmöglichkeiten in seinem Labor und die Gewährung einer studentischen Forschungsförderung während meiner einjährigen Forschungszeit. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere bei Frau Iwona Wallach für das Erlernen der RT-PCR und den Umgang mit Zellkulturen. Frau Christiane Hussels danke ich für das Bestellen der nötigen Materialien, Herrn Boris Thurisch für das Erlernen der Western-Blots. Frau Dr. Juan Zhang und Frau Kristin Hönig möchte ich für ihre kreativen Anregungen während meiner Forschungstätigkeit danken.

Ganz ausdrücklich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Holger Scholz, Johannes-Müller Institut für Physiologie der Charité, bedanken, der mich ebenfalls bei einem Großteil meiner Dissertationsarbeit betreute, mich in die Immunhistochemie eingewiesen und mir seine Laboratorien zur Verfügung gestellt hat. Ein besonderer Dank gilt in diesem Forschungsteam den beiden fabelhaften MTAs Frau Richter und Frau Grätsch, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir viele nützliche Tipps zur RNA-Präparation in das meinige geflüstert haben. Frau Dr. Karin Kirschner danke ich für Ihre künstlerischen Anregungen. Desweiteren bedanke ich mich bei allen weiteren Menschen, die diese Dissertationsschrift in irgendeiner Weise unterstützt haben und hier namentlich nicht aufgeführt sind.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater, der mich nicht nur finanziell unterstützt hat, und meiner jüngeren Schwester Lisa, die beide standhaft an mich glauben. Lisa, Herrn Dr. Christian Pille, Dr. Marcus Czabanka und Frau Franka Dietz danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich noch meinen Freunden Chorge, Chulia, Skymarshall, AnnA, Anne, Rich und dem ehrwürdigen Ritter in schimmernder Rüstung Sir Chill Master, die für die nötige seelische Entspannung an den Wochenenden gesorgt haben, sowie den *3 Caberas y un amigo* für den besten Kaffee der Stadt. Vielen, vielen Dank.

Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektrischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katharina Valeska Bartz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Gewebespezifische Aktivierung des Erythropoietin Gens durch den Wilms’ Tumor-Suppressor 1“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 20. August 2008

Katharina V. Bartz