

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

DISSERTATION

Die Rolle des Wilmstumorproteins WT1  
bei der Entwicklung der neuronalen Retina

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von

Gunnar Schley

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Scholz  
2. Prof. Dr. med. D. Katschinski  
3. Prof. Dr. med. A. Kurtz

Datum der Promotion: 23.03.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Wilmstumoren: Folgen einer gestörten Nierenentwicklung	1
1.2 Struktur und Funktion des <i>Wt1</i> Gens und seiner kodierten Proteine	2
1.3 Transkriptionale und post-transkriptionale Regulation durch WT1	5
1.4 Die Rolle von WT1 in der Entwicklung	6
1.5 Ziel der Arbeit, Fragestellung	10
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Chemikalien und Material	12
2.2 Standardlösungen und Puffer	12
2.3 Tiere	12
2.4 Zellkultur	13
2.5 Nicht-radioaktive mRNA <i>in situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden	13
2.6 Histologie	14
2.7 Immunhistologie	15
2.8 BrdU-Einbau <i>in vivo</i>	16
2.9 TUNEL-Assay	16
2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot	17
2.11 Isolierung von Gesamt-RNA	18
2.12 Reverse Transkription (RT)	18
2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.14 LightCycler Real-Time PCR	20
2.15 Restriktionsverdau von DNA	21
2.16 Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.17 Bakterientransformation	22
2.18 Maxipräparation von Plasmid-DNA	22
2.19 Transfektion von Zellkulturen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitations-Technik	22
2.20 Klonierung der 5' regulatorischen Region des humanen <i>POU4F2</i> Gens	23
2.21 Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassay (EMSA)	25
2.22 Statistik	26
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1 <i>Wt1</i> Expression in den Retinae von Wildtyp-Mäusen	27
3.2 Morphologie der Retina von Wildtyp- und <i>Wt1</i> -defizienten Mausembryonen	28
3.3 Morphologie des Sehnerven von Wildtyp- und <i>Wt1</i> -defizienten Mausembryonen	29
3.4 Verminderte Zellproliferation in den <i>Wt1</i> <sup>-/-</sup> Retinae zum Zeitpunkt E12	31
3.5 Vermehrte Apoptose in den <i>Wt1</i> <sup>-/-</sup> Retinae zum Zeitpunkt E18	32

3.6	Verlust des POU-Domänen-Transkriptionsfaktors Pou4f2 in den <i>Wt1</i> <sup>-/-</sup> Retinae	33
3.7	Wt1 und Pou4f2 sind in der embryonalen Retina kolokalisiert	36
3.8	Transgene Expression des humanen <i>WT1</i> Gens in <i>Wt1</i> <sup>-/-</sup> Mausembryonen bewirkt eine partielle Wiederherstellung des retinalen Phänotyps	37
3.9	Wt1 und Pou4f2 sind auch in nicht-neuronalen Geweben kolokalisiert	39
3.10	Die Wt1(-KTS) Isoform aktiviert die Pou4f2 Expression in kultivierten Zellen	42
3.11	Die Wt1(-KTS) Isoform aktiviert den <i>Pou4f2</i> Promotor	43
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1	Die Rolle von Wt1 für die Netzhautentwicklung in frühen Embryonalstadien (E12)	48
4.2	Die Rolle von Wt1 für die Netzhautentwicklung in späteren Embryonalstadien (E18)	49
4.3	Die Familie der Pou4f Transkriptionsfaktoren	50
4.4	Wt1 ist für die Expression von Pou4f2 in retinalen Ganglienzellen erforderlich	53
4.5	Retinaler Phänotyp von <i>Pou4f2</i> <sup>-/-</sup> und <i>Wt1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen: Gemeinsamkeiten und Unterschiede	54
4.6	Wt1 reguliert die Transkription von Pou4f2 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	55
4.7	Wt1 und Pou4f2 in nicht-neuronalen Geweben	56
4.8	Update	58
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>63</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>75</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>76</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	künstliches Bakterienchromosom (engl. bacterial artificial chromosome)
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Zytomegalievirus
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. counts per minute)
Da	Dalton (Molekulargewicht)
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>En</i>	<i>n</i> .ter Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere (lat. et alii)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht (engl. ganglion cell layer)
kb	Kilo Basenpaare
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (engl. HEPES buffered saline)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonat
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horse radish peroxidase)
LB	Luria Bertani
Luc	Luziferase
M	Molar (mol/l)
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
NBL	Neuroblastenschicht (engl. neuroblast layer)
NF	Neurofilament
OD <sub>λ</sub>	optische Dichte bei Wellenlänge λ
ONF	Sehnervenfasern (engl. optic nerve fibres)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PCNA	engl. proliferating cell nuclear antigen

PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (lat. pondus hydrogenii)
<i>P<sub>n</sub></i>	<i>n</i> .ter Postnataltag
RGC	retinale Ganglienzelle (engl. retinal ganglion cell)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RPE	retinales Pigmentepithel (engl. retinal pigment epithelium)
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte (engl. standard error of the mean)
SSC	Natriumcitrat (engl. sodium chloride sodium citrate)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. Tris buffered saline)
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TUNEL	engl. TdT-mediated dUTP nick end labelling
U	Enzymeinheiten (engl. units)
UV	Ultraviolett
V	Volt
YAC	künstliches Hefechromosom (engl. yeast artificial chromosome)

In nova fert animus mutatas dicere formas  
 corpora. Di coeptis - nam vos mutastis et illas -  
 aspirate meis primaque ab origine mundi  
 ad mea perpetuum deducite tempora carmen.

(Ovid, Metamorphosen I, 1 - 4)

## Danksagung

Ich danke herzlich meinem verehrten Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Scholz für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und klinischen Ausbildung, hervorragende Betreuung und hilfreiche Anregungen bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. K. D. Wagner gilt mein Dank für exzellente wissenschaftliche und persönliche Unterstützung meiner Arbeit, kreative Anregungen, interessante Diskussionen, Begeisterung und Faszination für wissenschaftliches Arbeiten.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. N. Wagner für Ratschläge bei der Immunhistochemie und Hilfestellung beim Erstellen der Abbildungen.

Frau I. Grätsch und Frau A. Richter danke ich für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit und Vermitteln von Labortechniken.

Allen gilt mein Dank für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. D. Haber (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) danke ich für die Bereitstellung der *Wt1* Expressionsplasmide, Herrn Prof. Dr. C. Englert (Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena) für die *Wt1* heterozygoten Mäuse und die Osteosarkomzellen U2OS mit induzierbarer *Wt1* Expression sowie Herrn Prof. Dr. A. Schedl (INSERM U636, Centre de Biochimie, Université de Nice, Frankreich) für die *WT280* YAC transgenen Mäuse. Frau Dr. V. Vidal (INSERM U636, Centre de Biochimie, Université de Nice, Frankreich) gilt mein Dank für die Paraffinschnitte.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Studium und die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben, für Ihre Unterstützung und die aufgebrachte Geduld.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Gunnar Schley, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Rolle des Wilmstumorproteins WT1 bei der Entwicklung der neuronalen Retina“ 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 27. Juni 2006

Gunnar Schley