

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Material

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien in Analysequalität, Biochemikalien und Verbrauchsmaterialien bei folgenden Firmen bezogen: Dianova (Hamburg), Gibco BRL Life Technologies - Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), Vector Laboratories (Burlingame, USA).

2.2 Standardlösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage angesetzt.

DEPC-Wasser	0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC), autoklaviert
2× HBS	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
SSC	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
TBS	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,2
LB-Agar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar
SOC-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, pH 7,0
Laemmli-Probenpuffer	500 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 10% Glycerol, pH 6,8

2.3 Tiere

Mäuse mit heterozygotem *Wt1* Allel (*Wt1*^{+/-}) vom Stamm C57BL/6 (B6) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Heterozygote *Wt1*^{+/-} Mäuse vom Stamm MF1×B6 wurden von Prof. Dr. C. Englert (Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena), *WT280* YAC transgene Mäuse von Prof. Dr. A. Schedl (INSERM U636, Centre de Biochimie, Université de Nice, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden im institutseigenen Tierstall unter Beachtung der geltenden Tierschutzbestimmungen für die Versuchstierhaltung gehalten (Tierversuchsgenehmigung Aktenzeichen G0435/98 vom 29.01.1999). Futter und Wasser standen zur freien Verfügung. Der Morgen nach der terminierten Verpaarung wurde als Embryonaltag E0,5, der Tag der Geburt als Postnataltag P0 bezeichnet.

2.4 Zellkultur

Die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK) 293 (ATCC CRL-1573) und die humane Osteosarkomzelllinie U2OS (ATCC HTB-96) wurden von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, USA) bezogen. Die Zelllinie U2OS (Klon UB-27) mit Tetrazyklin-supprimierbarer Expression von Wt1(-KTS) wurde von Prof. Dr. C. Englert (Leibniz Institut für Altersforschung, Fritz Lipmann Institut, Jena) zur Verfügung gestellt. Zur Aufrechterhaltung selektiver Kulturbedingungen erfolgte das Wachstum der UB-27 Zellen in Gegenwart von G418 (500 µg/ml, Calbiochem, Bad Soden) und Puromycin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich). HEK 293 und U2OS Zellen wurden in 100 mm Kulturschalen in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin), 100 IU/ml Penicillin (Invitrogen) und 100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen) kultiviert. Der Zellinkubator (Heraeus, Langenselbold) hatte eine regulierte Innentemperatur von 37°C bei 21% O₂, 5% CO₂. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinierung von den Kulturschalen abgelöst und im Verhältnis 1:10 passagiert. Zur Hemmung der Wt1 Expression wurden die UB-27 Zellen in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) kultiviert. Zur Induktion der Expression von Wt1 wurde das tetrazyklinhaltige Kulturmedium entfernt, die Zellen dreimal sorgfältig in PBS gewaschen und anschließend 48 Stunden lang in supplementiertem DMEM ohne Tetrazyklin kultiviert.

2.5 Nicht-radioaktive mRNA *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Die *in situ* Hybridisierung erlaubt den Nachweis von Nukleinsäuren in Zellen von Gewebeschnitten durch (z. B. Digoxigenin-) markierte einzelsträngige Oligonukleotidsonden (i. d. R. RNA). Digoxigenin kann dann mit Hilfe eines z. B. Enzym-gekoppelten Antikörpers in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Die Hybridisierungsreaktion wurde modifiziert nach Braissant & Wahli (1998) durchgeführt. Zunächst wurden Digoxigenin-markierte RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription von linearisierter Plasmid-DNA generiert. Zur Herstellung eines *Pou4f2* Expressionsplasmids wurde aus embryonalen Mausaugen Gesamt-RNA extrahiert. Nach reverser Transkription wurde in einer PCR unter Verwendung der in Tabelle 1 genannten genspezifischen Oligonukleotidprimer ein 405 bp langes *Pou4f2* DNA-Fragment amplifiziert. Die Amplikons wurden dann in die *Bam*HI/*Pst*I Schnittstellen des Vektors pGEM[®]-4z (Promega) kloniert. Die Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden erfolgte dann mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) entsprechend den Herstellerangaben. Für sense *Pou4f2* RNA-Sonden wurde die

Plasmid-DNA mit *EcoRI* (Promega) linearisiert und die nachfolgende *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase (Roche) durchgeführt. Antisense-Sonden wurden entsprechend nach *HindIII*-Linearisierung (Promega) mit SP6-RNA-Polymerase (Roche) hergestellt.

Murine *Wtl* Plasmid-DNA (vollständige kodierende *Wtl* cDNA Sequenz in pCB6⁺) wurde von Prof. Dr. D. Haber (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung von sense *Wtl* RNA-Sonden erfolgte nach *NotI*-Linearisierung (Promega) mit T7-RNA-Polymerase (Roche). Antisense *Wtl* RNA-Sonden wurden mit SP6-RNA-Polymerase (Roche) nach *BamHI*-Verdau (Promega) hergestellt.

Gefrierschnitte von 10 µm Dicke wurden 20 min lang in eisgekühltem 3% Paraformaldehyd (in DEPC-behandeltem PBS) fixiert, zweimal 15 min lang in PBS mit 0,1% aktivem DEPC gewaschen und dann für 15 min mit DEPC-behandeltem 5× SSC inkubiert. Es erfolgte eine Prähybridisierung für 2 h bei 58 °C mit einer Lösung von 50% Formamid und 5× SSC unter Zusatz von 60 µg/ml Heringsperma-DNA (Promega). Die sense und antisense Hybridisierung wurde anschließend für 48 h bei 58 °C mit 600 ng/ml Digoxigenin-markierter RNA-Sonde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach drei Waschschrritten (30 min in 2× SSC bei Raumtemperatur, 1 h in 2× SSC, 1 h in 0,1× SSC bei 37 °C) wurden die Schnittpräparate 90 min lang mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper (Roche; Verdünnung 1:500 in 100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 und 0,5%igem Roche Blockierungsreagenz) inkubiert und anschließend erneut zweimal 15 min lang gewaschen. Zur enzymatischen Farbentwicklung wurden die Schnitte mit 4,5 µl/ml NBT (Nitro-blau-tetrazoliumchlorid) (Roche) und 3,5 µl/ml BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat Toluidinsalz) (Roche) (in 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit TE-Puffer gestoppt. Danach wurde 1 h lang in 95% Ethanol und weitere 15 min lang in Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit Glycerin/PBS-Medium (2:1) eingedeckt, unter dem Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss) analysiert und mit der Digitalkamera (Spot RTTM Slider, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) unter Verwendung der Metamorph V4.1.2 Software (Visitron Systems, Puchheim) fotografiert.

2.6 Histologie

Zur histomorphologischen Beurteilung wurden Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin-Eosin färbt Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rot. Die Paraffinschnitte wurden von Dr. V. Vidal (INSERM U636, Centre de Biochimie, Université de Nice, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Schnitte wurden zunächst in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und in destilliertem Wasser gespült. Die Präparate

wurden dann nacheinander 5 min lang in Hämatoxylin gefärbt, 2 min in destilliertem Wasser gespült, in Leitungswasser 10 min lang gebläut, 5 min in 0,1% Eosin gefärbt und 2 min in Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit Glycerin/PBS-Medium (2:1) eingedeckt, unter dem Mikroskop (Axiovert S100, Zeiss) beurteilt und digital fotografiert.

2.7 Immunhistologie

Bei der Immunhistologie werden antigene Strukturen in Gewebeschnitten über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen. Die gewebengebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe werden durch Kopplung der Antikörper mit Markersubstanzen sichtbar gemacht. Als Marker eignen sich u. a. Enzyme (z. B. Peroxidase, alkalische Phosphatase) und Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Carbocyanin Cy2, Indocarbocyanin Cy3). Die Nachweissensitivität kann durch Biotin-gekoppelte Brückenantikörper, an die markiertes (Strept-)Avidin mit hoher Affinität bindet, erhöht werden.

Terminiert verpaarte, trächtige Mäuse wurden mit Diethylether narkotisiert und mittels Dekapitation getötet. Die Embryonen wurden isoliert und den Muttertieren die Organe entnommen. Die Präparate wurden über Nacht in Paraformaldehyd (3% in PBS) fixiert, in Isopentan-flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Tissue-Tek[®] O.C.T.[™] (Sakura Finetek, NL) eingebettet. Im Kryostaten (CM 1800, Leica, Bensheim) wurden bei -21 °C 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf SuperfrostPlus[®] Glasobjektträger aufgebracht. Die Kryoschnitte wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Immunmarkierung wurden die Gefrierschnitte zunächst mit kaltem Paraformaldehyd (3% in PBS) 5 min lang fixiert und dann für 10 min in PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen und zur Permeabilisierung des Gewebes erfolgte eine einstündige Präinkubation mit 10% Normalserum (Sigma) derjenigen Tierspezies, in welcher der Sekundärantikörper erzeugt wurde (in PBS, 3% BSA unter Zusatz von Avidin-Biotin-Blockierungsreagenzien (Vector)). Die Gewebeschnitte wurden dann über Nacht bei 4 °C mit folgenden Primärantikörpern inkubiert (jeweils verdünnt 1:150 in PBS, 0,3% Triton X-100, 3% BSA (Serva), 3% Normalserum): Anti-Pou4f1 monoklonales Maus IgG_{2b} (14A6, Santa Cruz, sc-8429), anti-Pou4f2 polyklonales Ziegen IgG (C-13, Santa Cruz, sc-6026), anti-Pou4f3 polyklonales Kaninchen IgG (BabCO, PRB-249C), anti-PCNA monoklonales Maus IgG_{2a} (PC10, Santa Cruz, sc-56), anti-Neurofilament 200 polyklonales Kaninchen IgG (N4142, Sigma), anti-BrdU monoklonales Maus IgG (Roche, BMC9318). Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal 15 min lang in PBS gewaschen und für 1 h mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:150 in PBS, 0,1% Triton X-100, 3% BSA) inkubiert.

Folgende Sekundärantikörper wurden eingesetzt: biotinyliertes anti-Ziegen IgG aus Kaninchen (Vector, BA-5000), biotinyliertes anti-Kaninchen IgG aus Ziege (Vector, BA-1000), M.O.M.[™] biotinyliertes anti-Maus IgG (Vector, BMK-2202). Dann wurden die Gewebeschnitte dreimal 10 min lang in PBS gewaschen, 30 min lang mit Streptavidin-Cy3 Konjugat (Sigma) (Verdünnung 1:200 in PBS, 0,1% Triton X-100, 3% BSA) inkubiert, erneut dreimal 10 min lang in PBS gewaschen und abschließend eingedeckt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector).

Zum Nachweis einer Kolokalisation von Wt1 und Pou4f2 erfolgte die indirekte Doppelimmunfluoreszenzfärbung in 2 Schritten. Dazu wurden die Gewebeschnitte über Nacht bei 4 °C mit folgenden Primärantikörpern inkubiert (Verdünnung jeweils 1:20 in PBS, 0,3% Triton X-100, 3% BSA, 3% Normalserum): Anti-WT1 polyklonales Kaninchen IgG (C-19, Santa Cruz, sc-192) und anti-Pou4f2 polyklonales Ziegen IgG (C-13, Santa Cruz, sc-6026). Nach dreimaligem Waschen von je 15 min Dauer mit PBS wurden die Gewebeschnitte 1 h lang mit den beiden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern (in PBS, 0,1% Triton X-100, 3% BSA) behandelt: Cy2-konjugiertes anti-Kaninchen IgG aus Esel 1:75 (Dianova, 711-226-152), Cy3-konjugiertes anti-Ziegen IgG aus Esel 1:100 (Dianova, 705-166-147). Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Gewebeschnitte eingedeckt. Die Präparate wurden unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss) beurteilt und digital fotografiert.

2.8 BrdU-Einbau *in vivo*

Das Thymidinanalogon 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) wird während der S-Phase des Zellzyklus kompetitiv in die zelluläre DNA eingebaut. Über die BrdU-Inkorporation kann daher die S-Phase detektiert und die Zellproliferation gemessen werden.

Trächtigen Mäusen wurde BrdU (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II, Roche) in einer Dosis von 5 mg/100 g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Ether-narkotisierten Tiere wurden nach 3 h getötet und die Embryonen entnommen. Der BrdU Nachweis erfolgte immunhistologisch an Gefrierschnittpräparaten wie unter 2.7 beschrieben unter Verwendung eines monoklonalen anti-BrdU Antikörpers.

2.9 TUNEL-Assay

Beim programmierten Zelltod (Apoptose) entstehen durch Aktivierung von Endonukleasen doppelsträngige DNA-Fragmente und Einzelstrangbrüche (nicks). Diese DNA-Strangbrüche in apoptotischen Zellen können *in situ* identifiziert werden, indem Fluorochrom-markierte Nukleotide durch die terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) an die freien 3'-Hydroxyl-

Enden der DNA-Brüche eingefügt und mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL).

Mit Paraformaldehyd fixierte Gefrierschnitte wurden in PBS, 0,1% Triton X-100 gewaschen, mit je 50 µl TUNEL Reaktionsgemisch (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein; Roche) für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Dunkeln inkubiert, in PBS gewaschen und mit Vectashield® Mountingmedium (Vector) eingedeckt. Die Präparate wurden unter dem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss) ausgewertet und digital fotografiert.

2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

Subkonfluente Zellen wurden in Laemmli-Probenpuffer 3 min lang bei 95 °C im Heizblock (Eppendorf, Hamburg) denaturiert, anschließend eisgekühlt und kurz zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte jeweils an 2 µl Aliquots unter Verwendung des Bradford Protein Assays (Biorad, München) entsprechend den Herstellerangaben. Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Blau G-250 durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt ($\lambda=465$ nm ohne, $\lambda=595$ nm mit Protein). In einem 10% Polyacrylamid-Gel wurden jeweils 20 µg Protein elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Elektrotransfer in einer halbtrockenen Blotting-Apparatur (BioRad, München) auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde das Gel anschließend mit Coomassie-Blau-Lösung gefärbt (0,25% Coomassie Blau R-250, 50% Methanol, 10% Essigsäure). Die nachfolgende Entfärbung erfolgte über Nacht bei 4 °C in 30% Ethanol, 10% Essigsäure. Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran wurden mit 5% Magermilchpulver (Blotto) in TBS, 0,05% Tween 20 über 1 h lang blockiert. Nach Waschen in TBS, 0,05% Tween 20 wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit folgenden Primärantikörpern in der Verdünnung 1:1.000 in TBS, 5% Blotto, 0,05% Tween 20 inkubiert: Anti-WT1 polyklonales Kaninchen IgG (180, Santa Cruz, sc-846), anti-Pou4f2 polyklonales Ziegen IgG (C-13, Santa Cruz, sc-6026). Nach 3×15 min langem Waschen der Membran in TBS, 0,05% Tween 20 erfolgte die einstündige Inkubation mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern in der Verdünnung 1:5.000 in TBS, 3% Blotto, 0,05% Tween 20: HRP-konjugiertes anti-Kaninchen IgG aus Ziege (Vector, PI-1000), HRP-konjugiertes anti-Ziegen IgG aus Pferd (Vector, PI-9500). Danach wurde die Membran erneut dreimal 15 min lang in TBS, 0,05% Tween 20 gewaschen. Die Proteinbanden wurden mit einem Chemilumineszenz-Verstärkersystem (ECL Plus-Kit, Amersham Biosciences) auf einem Röntgenfilm dargestellt. Dabei oxidiert die an den Sekundärantikörper gebundene

Meerrettich-Peroxidase Luminol unter Lichtemission. Die Lichtquanten werden mittels Autoradiografie detektiert. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und mit der Imagequant Software (Amersham) densitometrisch ausgewertet. Zum Entfernen gebundener Antikörper wurde die Membran 30 min lang bei 56 °C in 0,2 M Glycin, pH 2,5 gewaschen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem anti- α -Aktin polyklonalen Ziegen IgG (C-11, Santa Cruz, sc-1615) in einer Verdünnung von 1:500 in TBS, 5% Blotto, 0,05% Tween 20 inkubiert und wie oben beschrieben weiter behandelt.

2.11 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit Trizol-Reagenz (Gibco BRL) entsprechend den Herstellerangaben nach der Einzelschrittmethod von Chomczynski und Sacchi (1987). Frische Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert und jeweils ca. 100 mg Material in 1 ml Trizol homogenisiert. Kultivierte Zellen (ca. 10^6 Zellen in einer 35 mm Kulturschale) wurden direkt mit 1 ml Trizol lysiert. Die Proben wurden dann 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform und erneuter Inkubation erfolgte die Zentrifugation (12.000 rpm, 15 min, 4 °C). Aus der wässrigen Oberphase wurde die RNA mit 500 μ l Isopropylalkohol präzipitiert, der Fällungsansatz nach Inkubation zentrifugiert (12.000 rpm, 10 min, 4 °C), das Pellet mit 75% Ethanol (in DEPC-behandeltem Wasser) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min, 4 °C) in einer adäquaten Menge DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration (Verdünnung 1:100) wurde in einem Spektralphotometer (Beckman DU 540, Beckman Instruments Inc., USA) die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Messungen erfolgten in Mikroquarzküvetten jeweils als Doppelbestimmungen. Eine OD_{260} von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml. Eine Aussage über die Protein-kontamination der präparierten RNA erlaubte der Quotient OD_{260} / OD_{280} , der stets zwischen 1,8 und 2,0 lag (Reinheit 70-95%). Die RNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.12 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird ausgehend von einer RNA-Matrize die entsprechende einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Sie kann in einer nachfolgenden PCR amplifiziert werden. Bei der reversen Transkription können Oligo-dT-Primer, die an den Poly-A⁺-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden, als Startpunkt für die Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, dienen.

Es wurden 2 µg isolierte Gesamt-RNA und 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 mg/ml; Gibco BRL) in einem Volumen von 12 µl für 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend schnell auf 4 °C abgekühlt. Dann wurden 1 µl dNTP-Gemisch (jeweils 10 mM; Gibco BRL), 4 µl 5× RT-Puffer (Gibco BRL) und 2 µl DTT (0,1 M) und nach 5 min Inkubation bei 42 °C noch 1 µl SuperScript™ II RT (Gibco BRL) zugegeben. Die RT-Reaktion erfolgte 50 min lang bei 42 °C. Durch Erhitzen auf 72 °C über 10 min wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die RT-Reaktion wurde automatisiert in einem Thermocycler (Uno II, Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen Amplifikation von DNA-Abschnitten zwischen zwei flankierenden Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Doppelstränge gebunden sind. Die Vervielfältigung erfolgt durch eine thermostabile Taq (*Thermus aquaticus*) DNA Polymerase in einem zyklischen Prozess aus Hitze-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation in einem exponentiellen Reaktionsverlauf.

Die 50 µl PCR-Reaktionsansätze enthielten 2 µl Matrizen-DNA, je 1 µl sense und antisense Primer (10 µM), 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM; Gibco BRL), 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U; Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und 5 µl zugehörigen 10× PCR-Puffer (Perkin Elmer). Nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 95 °C folgten 25-30 Zyklen mit jeweils 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 55 °C, 30 s Elongation bei 72 °C sowie, nach dem letzten Zyklus, eine abschließende Elongation für 7 min bei 72 °C. Die PCR wurden automatisiert in einem Thermocycler (Uno II, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte gegen die ubiquitär exprimierten Housekeeping-Gene *β-Aktin* oder *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese (100 V in 0,5× TBE) in einem Ethidiumbromid-gefärbten 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Anregung mit UV-Licht einer Wellenlänge von $\lambda=254$ nm unter einen UV-Transilluminator (UVP Inc., Upland, USA) visualisiert und fotografisch dokumentiert (Intas®, Göttingen). Zur Kontrolle der Fragmentgröße diente ein 100 bp DNA-Längenstandard (Gibco BRL). Die DNA Fragmente konnten aus dem Agarosegel unter Verwendung des Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) wieder isoliert werden. Die bei der PCR verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von Gibco BRL Life Technologies hergestellt und sind in Tabelle 1 angegeben.

Gen NCBI-Nr.	Oligonukleotidsequenz	Fragment- größe
<i>Pou4f1</i> NM 011143.3	5'-CAT GAT CGC GCT CAA GCC CAT-3' (sense) 5'-CCG CTT CTG CTT CTG TCT CTG-3' (antisense)	274 bp
<i>Pou4f2</i> NM 138944.2	5'-AAC TGC AGG CAA TAT ATT CGG CGG GCT GG-3' (sense) 5'-CGG GAT CCT TAG GTG CTC AAG CAG CTC GC-3' (antisense)	300 bp
<i>Pou4f2</i> NM 138944.2	5'-AAC TGC AGG CAA TAT ATT CGG CGG GCT GG-3' (sense) 5'-CGG GAT CCT GCT TGG TGC ATG GGG TTC AT-3' (antisense)	405 bp
<i>Pou4f3</i> NM 138945.1	5'-GAA GCT TTG ATG AGA GCC TGC-3' (sense) 5'-GAT GTG CTC AAG TAA GTC GCC-3' (antisense)	229 bp
β -Aktin NM 007393.1	5'-ACC AAG GTG TGA TGG TGG GAA TG-3' (sense) 5'-CGC TCG TTG CCA ATA GTG ATG-3' (antisense)	642 bp
<i>BAC Klon</i> AC 093887.3	5'-ACA CAG TGA AGC GCG GTG TCT-3' (sense) 5'-GTA GCC GAA GGG AAC TCC TAG-3' (antisense)	387 bp
Δ C5-1	5'-GCT TGC AGG AAA TCC-3' (sense) 5'-GGG GGC TGG CAC AAA-3' (antisense)	Mutagenese- Primer
Δ C5-2	5'-CAG CAG CAT ATG CGC-3' (sense) 5'-CCT GCT TGC TGT TCA-3' (antisense)	Mutagenese- Primer

Tabelle 1: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotidprimer.

2.14 LightCycler Real-Time PCR

Soll eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte erfolgen, so kann bei einer Real-Time PCR die Bildung der entstehenden PCR-Produkte während der Synthese gemessen werden. Dazu können sequenzspezifische FRET-Fluoreszenzsonden (Hybridisierungssonden) eingesetzt werden. Dabei ist die eine Hybridisierungssonde an ihrem 3' Ende, die andere an ihrem 5' Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Binden beide Oligonukleotide in kurzem Abstand an ihre Zielsequenz, so wird die Anregungsenergie des Fluoreszenzfarbstoffs der ersten Hybridisierungssonde (z. B. Fluorescein) auf den Farbstoff der zweiten Hybridisierungssonde (z. B. LC Red 640, LC Red 705) übertragen und verstärkt, so dass eine Fluoreszenzemission detektierbar ist (FRET-Prinzip, Fluoreszenz Resonanz Energietransfer). Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge der neu gebildeten DNA-Stränge und damit auch zur Menge an Ausgangs-DNA.

Die PCR-Amplifizierung erfolgte mit dem Roche LightCycler System unter Benutzung der zugehörigen Reagenzien (DNA Master Hybridization Probes; Roche). Die bei der LightCycler PCR verwendeten Primer wurden von TIB MOLBIOL (Berlin) hergestellt und sind in Tabelle 2 verzeichnet.

Gen NCBI-Nr.	Oligonukleotidsequenz	Fragment- größe
<i>GAPDH</i> NM 002046.3	5'-AAC AGC GAC ACC CAC TCC TC-3' (sense) 5'-GGA GGG GAG ATT CAG TGT GGT-3' (antisense)	258 bp
<i>GAPDH FL</i> NM 002046.3	5'-CAT GGC CTC CAA GGA GTA AGA CCC CT-X 5'-LC Red705-ACC ACC AGC CCC AGC AAG AGC A-p	Hybridisierungs- sonde
<i>POU4F2</i> NM 004575.1	5'-GGA GAA GAA GCG CAA GC-3' (sense) 5'-TCT GGA GAG GCC AAG AGT C-3' (antisense)	223 bp
<i>POU4F2 FL</i> NM 004575.1	5'-GCC TAC TTT GCC ATT CAG CCT CG-X 5'-LC Red640-CCC TCC TCT GAA AAG ATC GCC G-p	Hybridisierungs- sonde

Table 2: Sequenzen der für die LightCycler Real-Time PCR verwendeten Oligonukleotidprimer.

2.15 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme bakterieller Herkunft, die in Doppelstrang-DNA definierte, oft palindromische Sequenzen erkennen und schneiden. Dabei können entweder stumpfe (blunt ends) oder 5'- bzw. 3'-überhängende DNA Enden (sticky ends) entstehen. Es lassen sich auch Doppelverdaus mit zwei Enzymen gleichzeitig durchführen.

Üblicherweise wurden 1 µg DNA, 1 µl (10 U) Reaktionsenzym und 2 µl des zugehörigen 10× Restriktionspuffers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Alle Restriktionsenzyme und zugehörigen Puffer wurden von Promega bezogen. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte, falls möglich, die Hitzeinaktivierung des Enzyms (für 20 min bei 65 °C) oder die Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Gibco BRL) mit anschließender Ethanol-Fällung. Dann wurden die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und unter Verwendung des Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben wieder aus dem Agarosegel isoliert.

Um eine Selbstligation von geschnittenen Vektoren mit kompatiblen oder nicht-überhängenden DNA-Enden zu vermeiden, wurden sie an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde die geschnittene Vektor-DNA mit intestinaler Phosphatase vom Kalb (Roche) nach Herstellerangaben inkubiert. Um überhängende 5'-Enden von zu klonierenden DNA-Fragmenten mit Phosphatgruppen aufzufüllen, wurde eine T4 Polynukleotidkinase (Promega) nach Herstellerangaben verwendet.

2.16 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen verknüpfen 3'- und 5'-Enden zweier DNA-Doppelstränge. Um DNA-Fragmente (Inserts) mit linearisierter Vektor-DNA zu verknüpfen, wurden zumeist 2 µl mittels Restriktionsverdau linearisierter Vektor und 10 µl Insert-DNA mit 1 µl T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) und 2 µl vom Hersteller mitgelieferten 10× DNA-Ligase-Puffer (Gibco BRL) in einem Gesamt-

volumen von 20 µl für 16 h bei 14 °C im Wasserbad inkubiert. Die einzusetzende Menge an Insert-DNA wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

Menge Insert [ng] = 3 × Menge Vektor [ng] × Länge Insert [bp] / Länge Vektor [bp].

2.17 Bakterientransformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in kompetente Bakterienzellen. Dazu wurde eine Lösung von 100 µl kompetenten *Escherichia coli*-Zellen (Stamm DH5α) und 3 µl DNA aus den Ligationsansätzen 30 min lang auf Eis inkubiert, für 2 min bei 42 °C im Wasserbad erwärmt und dann für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurden die Kulturen 1 h lang bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, das durch Zentrifugation (5 min bei 3.000 rpm) erhaltene Pellet in 100 µl SOC-Medium resuspendiert und die Bakterien auf eine Agar-Platte aufgetragen. Die Inkubation der Bakterien erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Zur Selektion der auf LB-Medium ausplattierten Bakterien wurde dem Agar Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Nach Auswertung von Minipräp-Kulturen wurde die endgültige Plasmid-DNA aus bakteriellen Schüttelkulturen unter Verwendung des Qiaprep Maxi System (Qiagen) gewonnen. Die korrekte Identität der DNA wurde durch Restriktionsverdau und anschließende Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Verifizierung der Restriktionsanalyse erfolgte durch automatisierte DNA-Sequenzierung (Auftragsarbeit an die Firma TIB MOLBIOL, Berlin).

2.18 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Anzucht der transformierten Bakterien wurde jeweils eine Bakterienkolonie in 200 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz entsprechend der Plasmidresistenz überimpft und über Nacht unter Schütteln (200-400 rpm) bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgten die alkalische Lyse der Bakterien und die anschließende Reinigung der freigesetzten Plasmid-DNA über Anionenaustauschersäulen mit dem kommerziell erhältlichen Qiaprep Maxi System (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt.

2.19 Transfektion von Zellkulturen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitations-Technik

Transfektion (aus Transformation und Infektion) ist der Transfer von Fremd-DNA in Zellen mit anschließender Expression und Weitergabe an die Tochterzellen. Säugerzellen können unlösliche DNA-Calciumphosphat-Kopräzipitate phagozytieren. Über die Endosomen gelangt die Fremd-DNA in die Zellen (transiente Transfektion). Eine stabile Transfektion wird erreicht, wenn linearisierte Plasmid-DNA im Zellkern stabil in das Wirtsgenom integriert wird. Die Selektion

positiver Klone erfolgt z. B. durch Antibiotika entsprechend der Plasmidresistenz. Es ist möglich, verschiedene Plasmide gemeinsam zu transfizieren (Kotransfektion).

Bei allen Transfektionsexperimenten wurden ausschließlich vitale Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 60 mm Zellkultur-schalen mit 3 ml Kulturmedium bei einer Dichte von ca. $1-2 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 ausgesät. Die Transfektion erfolgte bei ca. 60% Konfluenz. Es wurden 3 μg *POU4F2* Reporter-Promotor-konstrukt, 16 μg *Wt1* Expressionskonstrukt (*Wt1* cDNA in pCB6⁺ Plasmid; Prof. Dr. D. Haber, Massachusetts General Hospital, Boston, USA) und 1 μg β -Galaktosidase Expressionskonstrukt in 450 μl sterilem H_2O gelöst. Anschließend wurden 50 μl CaCl_2 -Lösung (2,5 M) und tropfenweise 500 μl $2 \times$ HBS zugegeben. Das nach 30 min Inkubation gebildete feine Präzipitat wurde vorsichtig auf die Zellen pipettiert und über Nacht im Kulturmedium belassen. Nach Mediumwechsel am folgenden Tag wurden die Zellen weitere 48 h lang kultiviert und danach lysiert. Die Zellyse erfolgte mit 400 μl Reporter Lyse Puffer (Promega) für 15 min, nachdem zuvor zweimal mit PBS gewaschen worden war. Nach Zentrifugation (1.200 rpm, 2 min, 4 °C) wurde das Zellysate im Überstand abgenommen. Die Aktivität des *POU4F2* Promotors wurde über ein Luziferase-Reportergen im pGL2-Basic Plasmid analysiert. Die Luziferaseaktivität im Zellysate wurde mit dem Luciferase Assay System (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt und im Luminometer (Microplate TLX1, Dynatech Laboratories Inc., USA) gemessen. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde mit dem β -Galactosidase Enzyme Assay System mit Reporter Lysis Buffer (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 420$ nm im Spektralphotometer (Beckman DU 540) gemessen. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Transfektionseffizienz, d. h. gegen die jeweilige β -Galaktosidaseaktivität, normiert. Als Negativkontrollen wurden nicht-transfizierte Zellen verwendet. Stabile Klone wurden mit dem Aminoglykosid-Antibiotikum G418 (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Gibco BRL) selektiert und separat expandiert. In isolierten Klonen wurden die *Wt1* Expression mittels Western-Blot unter Verwendung eines polyklonalen anti-WT1 IgG bestimmt.

2.20 Klonierung der 5' regulatorischen Region des humanen *POU4F2* Gens

Ein künstliches Bakterienchromosom (BAC) mit dem vollständigen humanen *POU4F2* Gen in *Escherichia coli* DH10B wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin) bezogen (RZPD Klon Nr. RPCIB753D12667Q2). Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium unter Zusatz von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol vermehrt. Die BAC-DNA wurde mittels Alkalilyse nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Der BAC-Klon wurde zunächst mittels Southern-Blot Hybridisierung überprüft. Dazu wurden jeweils 20 μg Plasmid-

DNA mit *ScaI*, *XhoI/EcoRV* bzw. *XhoI/BgIII* enzymatisch verdaut und in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach 30 minütiger Inkubation in 0,25 M HCl zur DNA Fragmentierung erfolgten die alkalische Denaturierung für 20 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH und anschließende Renaturierung in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0. Danach wurde die DNA über Nacht mittels Kapillartransfer bei Raumtemperatur in $10\times$ SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) übertragen und durch anschließende UV-Exposition darauf fixiert.

Als Vorlage zur Herstellung einer DNA-Sonde für die Southern-Hybridisierung diente eine 387 bp lange Sequenz, die ca. 2,4 kb 5' vom Transkriptionsstartpunkt im humanen *POU4F2* Gen lokalisiert war. Diese Sequenz wurde unter Verwendung der in Tabelle 1 genannten Primer (*BAC Klon*) mittels PCR synthetisiert. Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde erfolgte unter Verwendung von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham) nach der Zufallsprimermethode (Prime-It[®] II Random Primer Labeling Kit, Stratagene). Die Sonde wurde dann über NucTrap-Säulen[®] (Stratagene) aufgereinigt. Die spezifische Aktivität betrug $>10^8$ cpm/ μg . Eine Prähybridisierung erfolgte 3 h lang bei 65 °C in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,2, 7% SDS, 0,2 g BSA, 1 mM EDTA. Nach Zugabe der DNA-Sonde wurde anschließend über Nacht bei 65 °C die Hybridisierungsreaktion durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst in $2\times$ SSC, 0,1% SDS und danach hochstringent in $0,2\times$ SSC, 0,1% SDS bei 65 °C gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Exposition auf einem Röntgenfilm bei -65 °C.

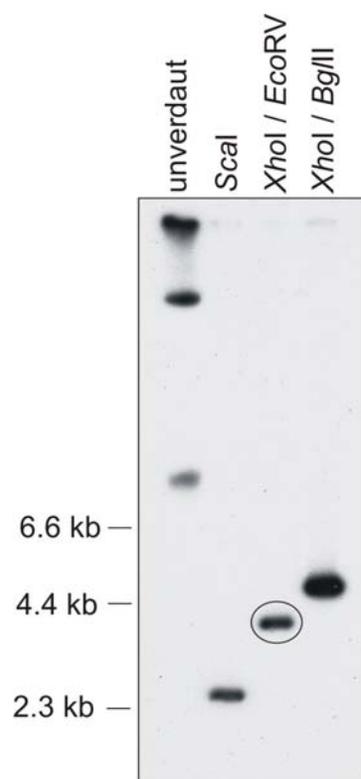


Abb. 2: Southern-Blot Hybridisierung von DNA aus dem BAC Klon mit dem humanen *POU4F2* Gen. Nach Restriktionsverdau von Plasmid-DNA mit *ScaI*, *XhoI/EcoRV* bzw. *XhoI/BgIII* und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurden die Restriktionsfragmente vom Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Die 387 bp lange, P^{32} -markierte DNA-Sonde hybridisierte gegen den unverdauten BAC-Klon sowie gegen ein ca. 2,7 kb langes *ScaI*, ein ca. 3,8 kb langes *XhoI/EcoRV* (eingekreist) und ein ca. 4,9 kb langes *XhoI/BgIII* Fragment aus dem BAC Klon. Im Autoradiogramm wurde die Hybridisierung sichtbar.

Das ca. 3,8 kb lange *XhoI/EcoRV* Fragment aus der 5' regulatorischen Region des humanen *POU4F2* Gens wurde in die *XhoI* Restriktionsstelle des pGL2-Basic Reporterplasmids (Promega) ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde *pPOU4F2₃₈₅₂* genannt und mittels automatisierter DNA-Sequenzierung bestätigt (Auftragsarbeit an die Firma TIB MOLBIOL, Berlin). Weitere, vom 5'-Ende her verkürzte Promotor-Reporterkonstrukte wurden durch Verdau von *pPOU4F2₃₈₅₂* mit *XmnI*, *StuI* bzw. *NdeI* und anschließende Religation des jeweiligen Plasmids generiert. Die dadurch entstandenen Konstrukte wurden *pPOU4F2₂₈₉₃*, *pPOU4F2₁₉₈₇* bzw. *pPOU4F2₁₄₈₅* genannt. Die gezielte Deletion eines 24 bp Oligonukleotids mit der vermuteten Wt1 Bindungsstelle aus dem 2893 bp *POU4F2* Fragment erfolgte durch PCR-basierte Überhangverlängerungs-Mutagenese unter Verwendung der in Tabelle 1 angegebenen Mutagenese-Primer und anschließende Religation in das Reporterplasmid (*pPOU4F2_{ΔWRE}*).

2.21 Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassay (EMSA)

Der Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassay (EMSA) dient zum Nachweis einer Protein-DNA Interaktion *in vitro*. Dazu wird ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment mit Kernprotein-extrakten oder rekombinantem Protein inkubiert. Im Falle einer Protein-DNA-Interaktion wandern die hochmolekularen Komplexe langsamer im nativen, d.h. nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel und können mittels Autoradiografie als verzögerte Banden (Shifts) dargestellt werden. Die Spezifität der Protein-DNA-Interaktion wird über Kompetitionsexperimente nachgewiesen, wobei dem radioaktiv markierten DNA-Fragment ein nicht markiertes Oligonukleotid als homologer oder heterologer Kompetitor zugegeben wird.

Rekombinantes Wt1(-KTS) Protein wurde mit einem Retikulozytenlysatsystem (TnT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega) *in vitro* transkribiert und translatiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des Bradford Protein Assays (Biorad, München) nach Herstellerangaben. Für die EMSA-Experimente wurden folgende doppelsträngige Oligonukleotide verwendet, die von Gibco BRL Life Technologies hergestellt wurden: Das 22 bp lange Oligonukleotid 5'-CAGCCCCCGAGGGTGTGTGTGT-3' (*POU4F2₂₂*) enthielt die potenzielle Wt1 Bindungsstelle aus dem humanen *POU4F2* Promotor. In einem weiteren 22 bp Oligonukleotid 5'-CAGCCCCCGAGTAATTGTGTGT-3' (*POU4F2₂₂ mut.*) war die vermeintliche Wt1 Bindungssequenz mutiert. Das 21 bp Oligonukleotid 5'-TGAAGTTAGTGGGCGTGGTTG-3' enthielt die bereits identifizierte Wt1(-KTS) Bindungsstelle aus dem Vitamin D Rezeptor Promotor der Maus (Wagner et al., 2001). Es diente in ansteigendem molarem Überschuss als spezifischer Kompetitor und verdrängte *POU4F2₂₂* aus

seiner Bindung an Wt1(-KTS). Die Oligonukleotide *POU4F2₂₂* und *POU4F2₂₂ mut.* wurden jeweils am 5'-Ende durch die T4-Polynukleotid-Kinase (Gel Shift Assay System, Promega) mit [γ -³²P]ATP (Amersham) radioaktiv markiert und anschließend über Sephadex[®] G-25 Säulen (Sigma-Aldrich) aufgereinigt. Die spezifische Aktivität wurde im Szintillationszähler (LS6500, Beckman) bestimmt. In die Bindungsreaktionen wurden jeweils 20 ng rekombinantes Wt1(-KTS) Protein und 2×10^5 cpm markiertes Oligonukleotid in Gelshift Bindungspuffer (Promega) eingesetzt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte 30 min lang bei Raumtemperatur. Die Reaktionsprodukte wurden in einem nicht-denaturierenden 10% Polyacrylamid-Gel mittels Elektrophorese (200 V bei 4 °C in 0,5× TBE) aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels unter Vakuum bei 60 °C (BioRad Gelrockner) wurden die Banden mittels Autoradiografie auf einem Röntgenfilm abgebildet.

2.22 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mittels ANOVA Test und Bonferroni Folgetest als post hoc-Analyse. Ein *P*-Wert kleiner als 0,05 ($P < 0,05$) wurde als statistisch signifikant angenommen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte üblicherweise als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM).