

Aus dem Johannes-Müller-Centrum für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Mechanismen und pathophysiologische Konsequenzen einer
hypoxievermittelten Expression des Wilmstumor-Transkriptionsfaktors
WT1 in Herzmuskelgefäßen“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Anja Bondke

aus Berlin

Gutachter:

- 1. Prof. Dr.med. H. Scholz**
- 2. Prof. Dr.med. J. Fandrey**
- 3. Prof. Dr. H. H. Marti**

Datum der Promotion:

16. Oktober 2006

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	7
1	Einleitung und Fragestellung	9
1.1.	Wilmstumor: Folge einer gestörten Nierenentwicklung	9
1.2.	Struktur und Funktion des <i>WT1</i> -Gens	11
1.3.	<i>WT1</i> in der Embryogenese	13
1.4.	<i>WT1</i> und Herzentwicklung	15
1.5.	Aufgabenstellung	17
2	Materialien und Methoden	19
2.1.	Materialien	19
2.1.1.	Geräte	19
2.1.2.	Chemikalien	20
2.1.3.	Lösungen	24
2.1.4.	Verbrauchsmaterialien	26
2.2.	Versuchstiere	26
2.3.	Infarktinduktion, Gewebegewinnung	26
2.4.	RNA-Extraktion	27
2.5.	RNAse-Protectionassay zur Quantifizierung der <i>Wt1</i> mRNA	27
2.6.	Immunhistochemische Färbungen	29
2.7.	Nichtradioaktive mRNA in situ Hybridisierung	30
2.8.	Zellkultur	31
2.9.	Plasmide	31
2.10.	Transfektionsexperimente	34
2.11.	Quantitative LightCycler Echtzeit- Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	34
2.12.	Elektrophorese Mobilitätsshift Assay (EMSA, Gelshift-Assay)	35
2.13.	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	37
2.14.	Statistische Auswertung	38

3	Ergebnisse	39
3.1.	<i>Wt1</i> mRNA in normalen, hypertrophierten und infarzierten Rattenherzen	39
3.2.	Wt1-Expression in post-ischämischen Rattenherzen	39
3.2.1.	Kinetik der postischämischen Wt1-Expression	39
3.2.2.	Lokalisation und Typisierung der Wt1 exprimierenden Zellen	42
3.2.3.	Assoziation von Wt1 mit Proliferations- und Vaskulogenesefaktoren	45
3.3.	Stimulation der Wt1-Expression durch Hypoxie <i>in vivo</i>	46
3.3.1.	<i>Wt1</i> mRNA in normalen Rattenherzen und nach systemischer Hypoxie	46
3.3.2.	Wt1-Proteinexpression bei systemischer Hypoxie: Kolokalisation mit hypoxieinduzierbarem Faktor 1 (HIF-1)	48
3.4.	Stimulation der Wt1-Expression durch Hypoxie <i>in vitro</i>	48
3.4.1.	Sauerstoffregulierte WT1-Expression in kultivierten Zellen	48
3.4.2.	Aktivierung des <i>Wt1</i> -Promotors durch Hypoxie	51
3.4.3.	Charakterisierung von HIF-1 als Mediator der hypoxieabhängigen Wt1-Expression	53
4	Diskussion	56
4.1.	WT1-Expression nach Myokardinfarkt	57
4.2.	WT1-Expression während der embryonalen Herzentwicklung	58
4.3.	Stimulation der WT1-Expression durch Hypoxie	59
4.4.	Hypoxieaktivierte Genexpression und hypoxieinduzierbarer Transkriptionsfaktor HIF-1	61
4.5.	HIF-1 als Mediator der sauerstoffabhängigen WT1-Expression	62
4.6.	(Patho)physiologische Konsequenzen einer sauerstoffabhängigen <i>WT1</i> -Regulation	63
4.7.	Ausblick	64

5	Zusammenfassung	66
6	Literaturnachweis	68
7	Danksagung	75
8	Lebenslauf und Publikationsliste	76
9	Erklärung	79

5 Zusammenfassung

Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor ist das Wilmstumorgen WT1 für die normale Embryogenese erforderlich. Mausembryonen mit inaktiviertem Wt1 Gen ($Wt1^{-/-}$) weisen u.a. eine gestörte Herzmuskelentwicklung auf, die durch ein hypoplastisches Ventrikelmyokard charakterisiert ist. Ursache für den myokardialen Phänotyp ist bei den $Wt1^{-/-}$ Embryonen wahrscheinlich ein partieller Defekt des Epikards, dem regulären Ort der Wt1-Expression im Herzmuskel.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression von Wt1 nach experimentellem Myokardinfarkt bei Ratten aktiviert ist. Im Vergleich zum intakten rechtsventrikulären Gewebe, war Wt1 im infarzierten linken Ventrikel zwischen dem 1. Tag und der 9. Woche nach Ligation der linken Koronararterie um mehr als das Doppelte erhöht. Mittels mRNA in situ Hybridisierung und immunhistochemischer Verfahren konnte nachgewiesen werden, dass Wt1 nach Myokardinfarkt nicht mehr ausschließlich epikardial vorkommt, sondern auch in den infarktnahen Blutgefäßen exprimiert wird. Die Wt1-positiven Gefäßzellen konnten als Endothel- und glatte Muskelzellen identifiziert werden. Eine auffallend ähnliche Verteilung wiesen der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF und die zellulären Proliferationsmarker PCNA bzw. PECAM-1/CD31 in den Koronargefäßen des ischämischen Herzens auf.

Ähnlich der Wirkung einer regionalen Gewbeischämie konnte eine vaskuläre Expression von Wt1 im Herzmuskel auch durch systemische Exposition von Ratten bei 8% O₂ bzw. 0.1% CO ausgelöst werden. An Zellkulturen wurde der Mechanismus der sauerstoffabhängigen Regulation von WT1 näher untersucht. Die WT1-Expression wurde sowohl in einer Ostosarkomlinie (U2OS) als auch in lymphoblastären Zellen (Reh) durch Hypoxie (1% O₂) und hypoxieähnliche Maßnahmen (Inkubation in Gegenwart von 100 µM CoCl₂ bzw. Desferrioxamin) stimuliert. Mit Hilfe von Reporterassays konnte nachgewiesen werden, dass der Promotor der Wt1-Gens durch Hypoxie induzierbar ist. Der hypoxieempfindliche Bereich im Wt1-Promotor wurde mittels gezielter Mutagenese und anhand von Gelshiftexperimenten als klassische Bindungsstelle für hypoxieinduzierbaren Faktor-1 (HIF-1) identifiziert.

Diese Resultate zeigen, dass lokale Gewbeischämie und Sauerstoffmangel die Expression von Wt1 in den Blutgefäßen des Herzmuskels stimulieren. Als ein Vermittler der Hypoxiewirkung spielt der Transkriptionsfaktor HIF-1 eine wichtige

Rolle. Die enge Assoziation mit Vaskulogenesefaktoren im ischämischen Herzmuskel deutet darauf hin, dass WT1 für die transkriptionelle Kontrolle der myokardialen Vaskularisation von Bedeutung sein könnte. Diese Möglichkeit wird durch den kürzlich erbrachten Nachweis gestützt, dass WT1 für die Vaskulogenese im embryonalen Myokard notwendig ist. Die Identifizierung molekularer WT1-Zielgene bei der Vaskularisation des Herzmuskels wird eine sowohl aus grundlagenwissenschaftlicher Sicht als auch aus klinischer Perspektive interessante Herausforderung für zukünftige Arbeiten darstellen.