

### 3 Ergebnisbeschreibung

#### 3.1. Wt1 mRNA in normalen, hypertrophierten und infarzierten Rattenherzen

Die Wt1-Expression wurde in adulten Herzen normaler Ratten und von Versuchstieren mit Myokardhypertrophie mittels Rnase-Protectionassay quantifiziert. Als Hypertrophie-Modelle wurden spontan hypertensive Ratten (SHR) sowie Tiere mit transgener kardialer Überexpression der Gene für humanes Angiotensinogen und Renin (TGR) verwendet (43). Als Kontrollen dienten normale Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) ohne Herzmuskelhypertrophie. Eine weitere Versuchsgruppe bestand aus Ratten, bei denen durch Ligation des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie 6 Wochen zuvor ein Myokardinfarkt induziert worden war. Scheinoperierte (SHAM) Ratten wurden als Kontrollen verwendet. Jede der Versuchsgruppen umfasste 5 Tiere. Die Messungen wurden an Proben aus dem hypertrophierten linksventrikulären Myokard durchgeführt. Zur Normalisierung des Signals wurde die RNA eines Housekeeping-Gens (U6 snRNA) mitbestimmt.

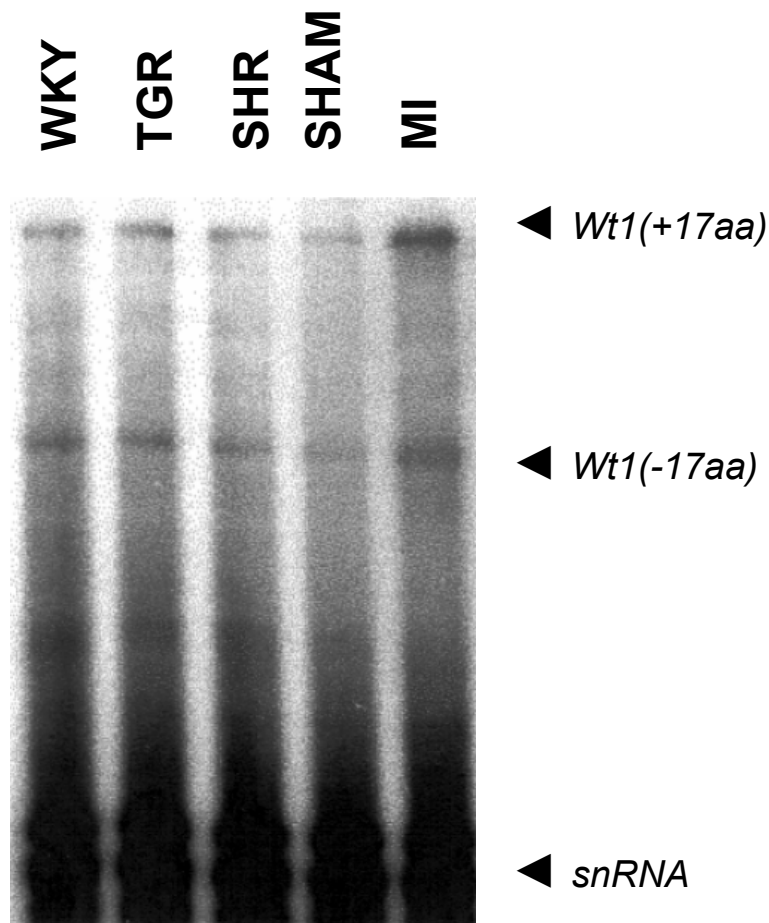
Abb. 4 zeigt das repräsentative Autoradiogramm eines RNase Protectionassays. Im Vergleich zum normalen Rattenherzen (WKY) konnte in der SHR und TGR Gruppe keine signifikante Veränderung der *Wt1* mRNA nachgewiesen werden. Allerdings war 6 Wochen nach Myokardinfarkt gegenüber den Herzen scheinoperierter Tiere eine deutliche Zunahme der Signalintensität als Anzeichen einer gesteigerten Wt1-Expression erkennbar.

#### 3.2. Wt1-Expression in post-ischämischen Rattenherzen

##### 3.2.1. Kinetik der post-ischämischen Wt1-Expression

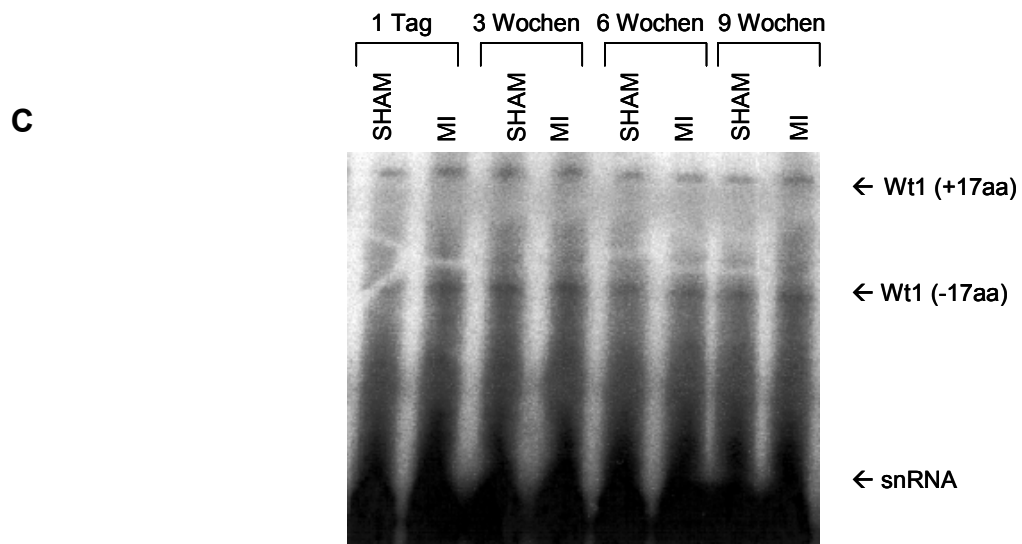
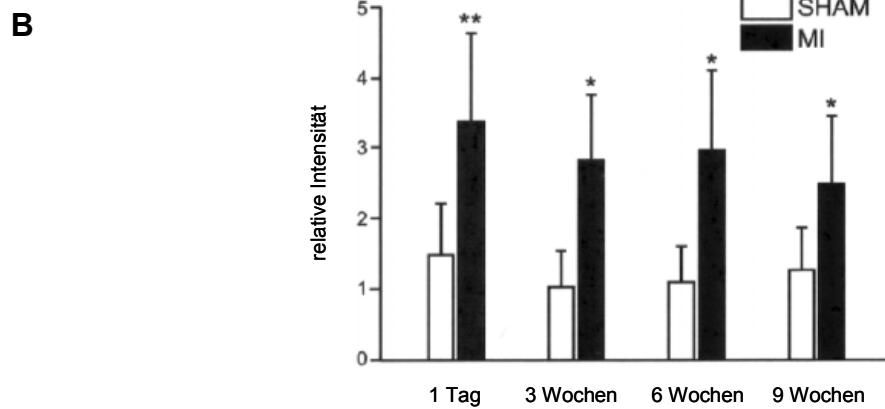
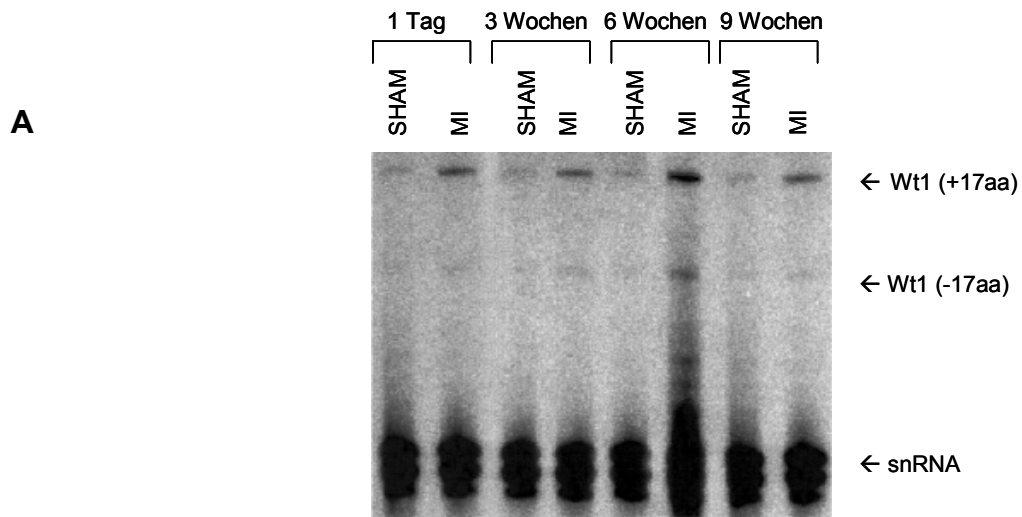
Die in Abb. 4 gezeigten Resultate dokumentieren erstmalig eine Regulation der Wt1-Expression im adulten Rattenherzen. Die Befunde demonstrieren weiterhin, dass die Expression von Wt1 im Herzen durch Ischämie induzierbar ist. Hingegen korreliert die Wt1-Expression offenbar nicht mit einer Myokardhypertrophie. Um den zeitlichen Verlauf der post-ischämischen Wt1-Expression im Herzen näher zu charakterisieren, wurden Rnase-Protectionassays zu verschiedenen Zeitpunkten (24 Stunden und 3, 6, bzw. 9 Wochen) nach Ligation des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD) zur Infarktinduktion durchgeführt. Die Ergebnisse sind als repräsentatives Autoradiogramm (Abb. 5A) und als relative Signalintensitäten (Abb.

5B) dargestellt. Bereits 24 Stunden nach Ligation der LAD war die *Wt1* mRNA im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nahezu verdoppelt. Eine gesteigerte *Wt1*-Expression im Herzen war auch 3, 6 und 9 Wochen nach Myokardinfarkt nachweisbar. Spätere Zeitpunkte wurden nicht untersucht. Messungen im nichtinfarzierten rechtsventrikulären Myokard zeigten keine Veränderungen der *Wt1* mRNA im Vergleich zu den scheinoperierten Versuchstieren (Abb. 5C).



**Abb. 4: Repräsentatives Autoradiogramm eines RNase Protectionassays zur Quantifizierung der *Wt1* mRNA in Proben aus dem linken Ventrikel der Ratte.**

Eine linksventrikuläre Hypertrophie lag bei Ratten mit transgener kardialer Überexpression der Gene für humanes Angiotensinogen und Renin (TGR) sowie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) vor. Wistar Kyoto Ratten (WKY) ohne Herzmuskelhypertrophie dienten als Kontrollen. MI = Ratten mit post-ischämischem Remodelling 6 Wochen nach Myokardinfarkt. SHAM = scheinoperierte Kontrolltiere ohne Myokardinfarkt. Anzahl der Tiere n=5 pro Gruppe. Es wurden je 20 µg Gesamt-RNA mit einer *Wt1*-antisense-RNA-Sonde hybridisiert. Zur Normalisierung des Signals wurde die RNA eines Housekeeping-Gens (U6 *snRNA*) in jeder Probe gemessen. Nach Myokardinfarkt (MI) ist eine deutliche Zunahme der Signalintensität als Zeichen einer gesteigerten *Wt1* Expression ersichtlich. *Wt1(+17aa)* und *Wt1(-17aa)* bezeichnen zwei alternative Spleissvarianten von *Wt1*.



**Abb. 5: Kinetik der myokardialen Wt1 mRNA Expression nach Infarkt.**

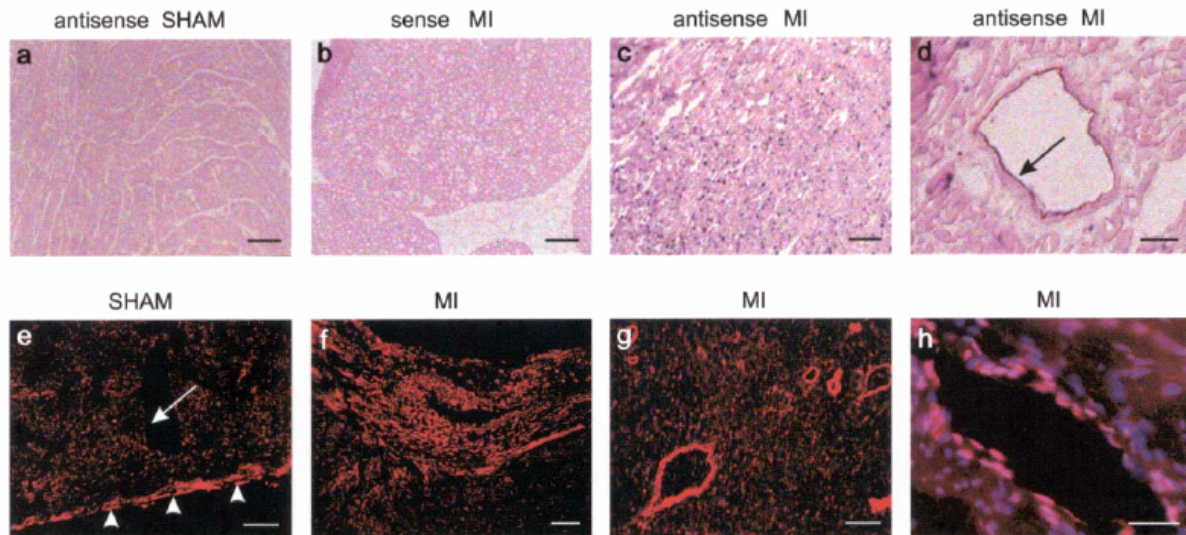
Die Messungen erfolgten mittels RNase Protectionassay jeweils getrennt im links- (A, B) und rechtsventrikulären (C) Myokard. Im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren (SHAM) war im linksventrikulären Myokard der Infarktgruppen (MI) zu allen Untersuchungszeitpunkten eine gesteigerte Wt1-Expression nachweisbar (A, B). Hingegen zeigten sich keine Unterschiede im nicht-infarzierten Myokardgewebe der rechten Ventrikel (C). \*P<0.05 und \*\*P<0.01 (ANOVA, n=5).

### 3.2.2. Lokalisation und Typisierung der Wt1 exprimierenden Zellen

Im nächsten Untersuchungsschritt sollten die Wt1 exprimierenden Zellen im normalen und post-ischämischen Myokard lokalisiert werden. Der Nachweis von *Wt1* mRNA erfolgte mittels *in situ* mRNA-Hybridisierung, der Nachweis auf Proteinebene wurde durch immunhistochemische Färbung mit einem gegen Wt1 gerichteten Antikörper erbracht. Es wurden jeweils ca. 80 Gewebsschnitte von je 5 Tieren pro Gruppe untersucht. Wie bereits in früheren Publikationen beschrieben (24, 25, 28), konnte Wt1 im normalen Herzen ausschließlich epikardial, nicht jedoch im Myokardgewebe detektiert werden (Abb. 6e). Die Lokalisation im Zellkern steht in Einklang mit der Funktion von Wt1 als Transkriptionsfaktor bzw. mit seiner hypothetischen Rolle als Spleissfaktor.

Interessanterweise war Wt1 nach Ligation der LAD nicht nur in Epikardzellen, sondern auch im Randbereich des infarzierten Gewebes nachweisbar (Abb. 6c, f). Bei höherer Auflösung ist zu erkennen, dass sich die postischämische Wt1-Expression einzelnen intramyokardialen Gefäßen zuordnen lässt (Abb. 6d, g).

Die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI beweist die nukleäre Lokalisation von Wt1 in den Gefäßzellen (Abb. 6h). Wt1 mRNA und Protein waren bereits 24h nach Infarktinduktion in der Gefäßwand detektierbar, und konnten dort noch 9 Wochen nach dem Infarkt ereignis nachgewiesen werden. Gefäße, die von der Infarktzone entfernt waren, ließen sich mit einem gegen Wt1 gerichteten Antikörper nicht zur Darstellung bringen. In den nichtinfarzierten rechten Ventrikeln der Tiere war ebenfalls kein Wt1 in der Gefäßwand nachweisbar.



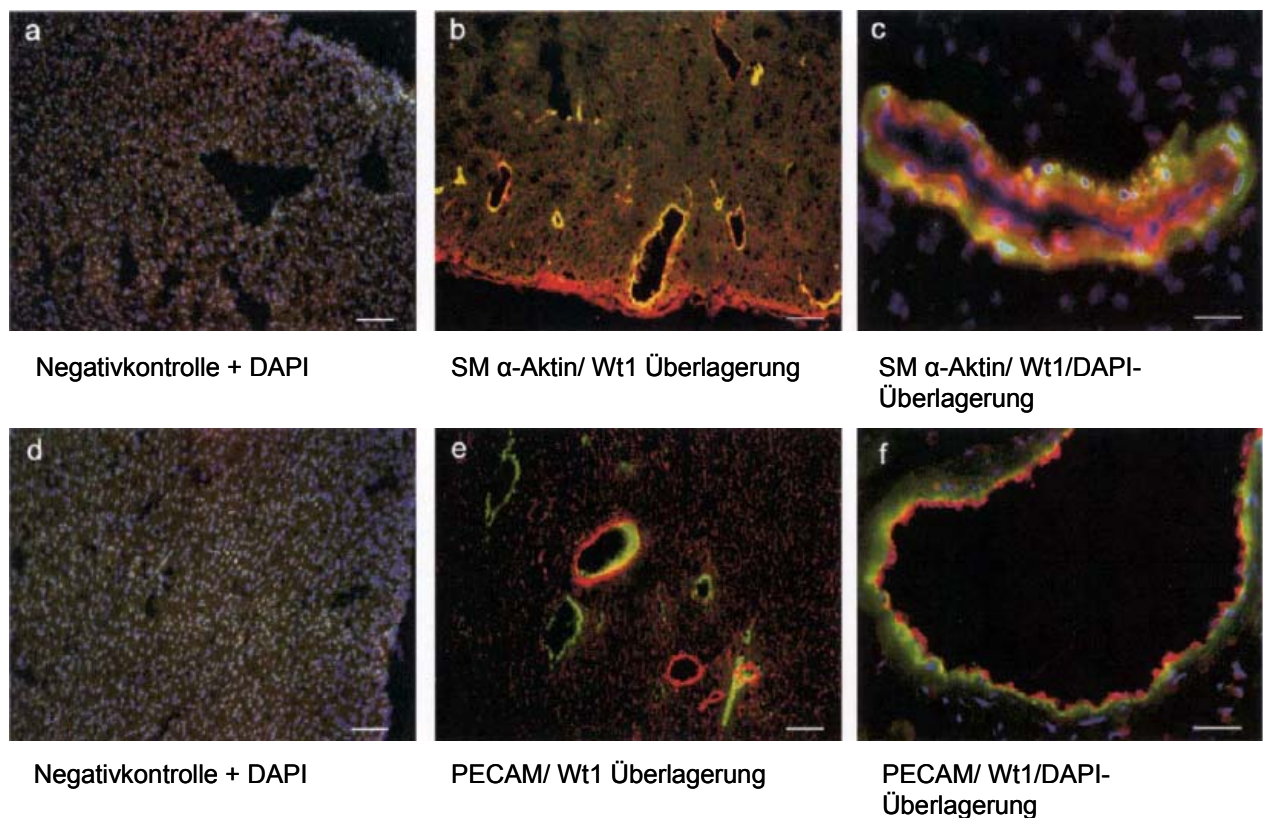
**Abb. 6: Wt1 im normalen und infarzierten Herzmuskel.**

Der Nachweis von Wt1 mRNA erfolgte mittels in situ Hybridisierung (a-d), Wt1 Protein wurde immunhistochemisch lokalisiert (e-h). Die Gewebeproben wurden aus scheinoperierten Ratten (SHAM) sowie 24h nach Ligation des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (MI) gewonnen. Im Vergleich zu den SHAM Ratten, die Wt1 ausschließlich epikardial exprimieren (Pfeilspitzen in Abb. e), zeigt sich nach Ischämie ein deutliches Wt1 Signal in der Randzone des Infarktes (f). Bei höherer Auflösung lässt sich Wt1 den Wänden der infarkt-nahen Gefäße zuordnen (g). Die Gegenfärbung mit DAPI (blau) lässt eine nukleäre Lokalisation des Wt1 Signals erkennen (h). In-situ Hybridisierung mit einer spezifischen Wt1 mRNA antisense-Sonde bestätigt die Expression in den Koronargefäßwänden nach Infarkt (Pfeil in d). Die Kontrollhybridisierung mit einer sense-Sonde ergibt kein spezifisches Signal (b). Es wurden mindestens jeweils 40 Schnitte von 5 unterschiedlichen Tieren untersucht. Die Maßstab balken entsprechen 100  $\mu$ m (a, b, c, e, f, g) bzw. 20  $\mu$ m (d, h).

Zur Typisierung der Wt1 exprimierenden Zellen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen für Wt1 und verschiedene Markerproteine durchgeführt (Abb. 7). Der Nachweis glatter Gefäßmuskelzellen erfolgte mit einem gegen  $\alpha$ -Aktin gerichteten polyklonalen Antikörper, während Gefäßendothelzellen durch einen polyklonalen anti-PECAM-1/CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1)-Antikörper identifiziert wurden. Wegen des Cy3-konjugierten Zweitantikörpers emittierten die Wt1 exprimierenden Zellen ein rotes Fluoreszenzsignal, wohingegen die Cy2-gefärbten Zelltyp-Markerproteine in grüner Farbe fluoreszierten. Folglich resultierte bei Kolo-kalisation mit Wt1 ein gelbes Überlappungssignal.

In Abb. 7b und c erkennt man die überlappende Verteilung von Wt1 und  $\alpha$ -Aktin in den Myokardgefäßen nach Infarkt. Es ist ersichtlich, dass eine signifikante Anzahl  $\alpha$ -Aktin positiver Zellen der glatten Gefäßmuskulatur auch Wt1 exprimiert. Bei höherer Auflösung (Abb. 7c) lässt das grüne Signal erkennen, dass einige  $\alpha$ -Aktin exprimierende Zellen in der Gefäßwand Wt1 negativ sind. Außerdem wird sichtbar, dass ein spezifisches Wt1-Immunfluoreszenzsignal (rot) von Zellen ausgeht, die  $\alpha$ -

Aktin-negativ sind und die innere Gefäßzirkumferenz auskleiden. Zellen der luminalen Gefäßzirkumferenz in der Randzone des Infarktgebiets konnten durch Doppelfärbung mit einem PECAM-1-Antikörper als endothelial charakterisiert werden (Abb. 7e, f). Durch Inkubation der Gewebeschnitte mit Normalseren anstelle von Erstantikörpern wurde eine unspezifische Färbung ausgeschlossen (Abb. 7a, d). Diese Resultate zeigen, dass nach regionaler Gewebischämie sowohl Gefäßmuskelzellen als auch vaskuläre Endothelzellen im Infarkttrandbezirk Wt1 exprimieren.



**Abb. 7: Typisierung Wt1 exprimierender Zellen im post-ischämischen Myokard.**

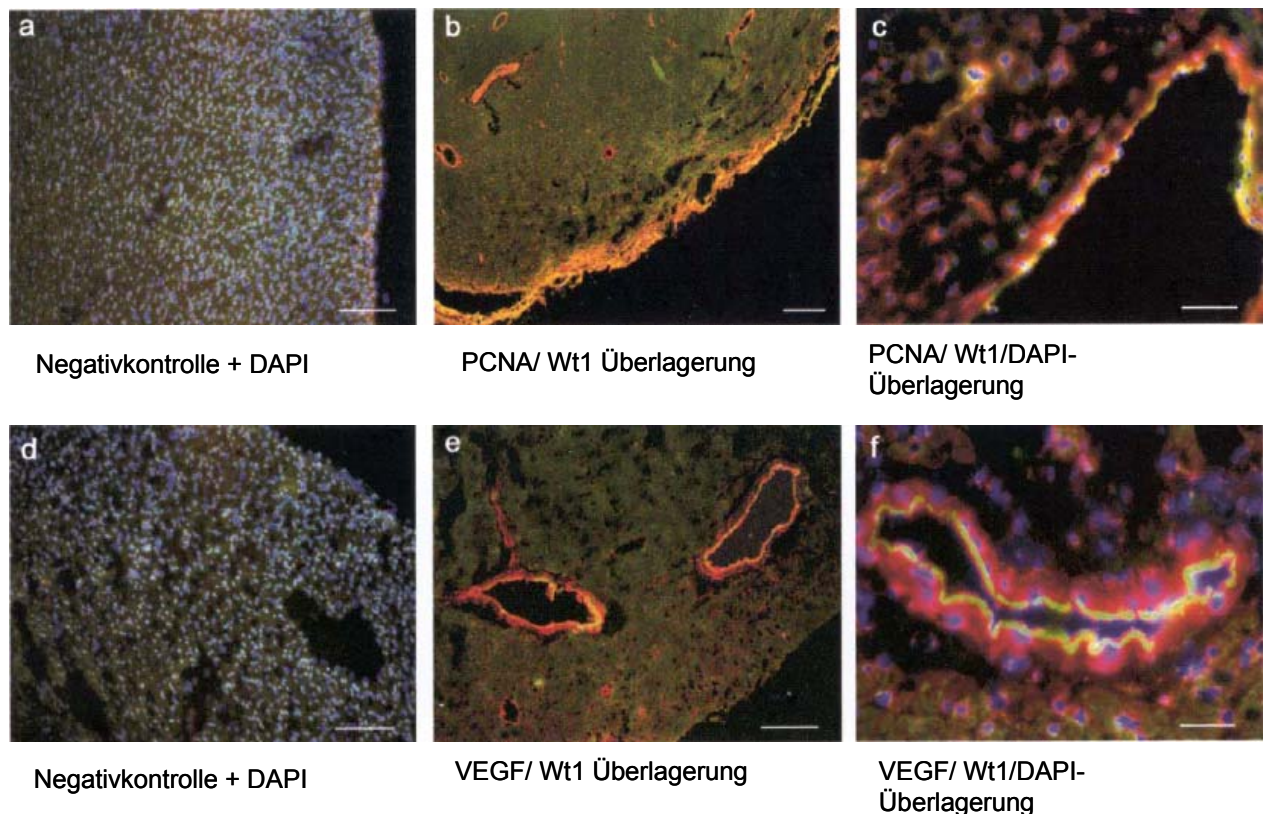
Wt1-positive Zellen sind mit Cy3-Chromophor rot markiert, während die Zelltyp-Markerproteine ein grünes Cy2-Signal emittieren. Zellen der glatten Gefäßmuskulatur sowie des Gefäßendothels wurden durch immunhistochemischen Nachweis von SM (smooth muscle)  $\alpha$ -Aktin (b, c) bzw. PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD-31, e, f) identifiziert. Zellkerne kommen mit DAPI zur Darstellung (blaues Signal). Es zeigt sich postischämisch eine Wt1-Expression in SM- $\alpha$ -Aktin-positiven Zellen (gelbes Überlappungssignal) sowie in SM- $\alpha$ -Aktin-negativen Zellen an der inneren Gefäßzirkumferenz (b, c). PECAM-1-positive Gefäßendothelzellen zeigen postischämisch ebenfalls eine Wt1-Expression (gelbes Überlappungssignal) (e, f). Die Negativkontrollen ohne Erstantikörper wurden zum Ausschluss einer unspezifischen Färbung durchgeführt (a, d). Es wurden mindestens jeweils 24 Schnitte von 3 Tieren untersucht. Die Maßstabalken entsprechen 100 $\mu$ m (a, b, c, e, f, g) bzw. 20 $\mu$ m (d, h).

### 3.2.3. Assoziation von Wt1 mit Proliferations- und Vaskulogenesefaktoren

Es stellt sich die Frage, welche (patho)physiologische Bedeutung der vaskulären *de novo* Expression von Wt1 nach Myokardinfarkt zukommt. Wesentliche Voraussetzung für die Reparatur des geschädigten Gewebes ist das Einsprossen von kapillaren Gefäßen aus dem Randbereich des Nekroseareals. Die dazu notwendige Ausbildung neuer Blutgefäße aus präexistierenden Kapillaren wird als Vaskulogenese bezeichnet und erfordert die Aktivierung eines spezifischen genetischen Programms. Interessanterweise charakterisiert der im Infarkttrandbereich exprimierte Marker PECAM-1 nicht nur endotheliale Zellen, sondern spielt auch eine Rolle in der Gefäßentwicklung (51-53). Die Kolo-kalisation von PECAM-1 und Wt1 legt deshalb die Vermutung nahe, dass Wt1 im Randgebiet des Myokardinfarktes als Teil einer vaskulogenen Antwort auf regionale Gewebeischämie zu verstehen ist.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde die Expression weiterer vaskulogeneseassoziiierter Proteine mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung analysiert. Dabei ergab sich eine überlappende vaskuläre Verteilung von Wt1 und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) im Infarkttrandbezirk (Abb. 8). Bereits 24 h nach Infarkt war die PCNA-Expression deutlich erhöht, während bei scheinoperierten Tieren PCNA nur vereinzelt in den Blutgefäßen vorkam (Daten nicht gezeigt).

Ebenso ließ sich Wt1 mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor), einem humoralen Mediator der Angiogenese (54-56), in infarktnahen Gefäßen kolo-kalisieren (Abb 8). Bei den scheinoperierten Tieren sowie in den nichtinfarzierten rechten Ventrikeln fand sich kein spezifisches Fluoreszenzsignal für VEGF.



**Abb. 8: Kolokalisation von Wt1, PCNA und VEGF in den infarktnahen Gefäßen.** Proliferierende Zellen wurden durch immunhistochemischen Nachweis von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) bzw. VEGF (vascular endothelial growth factor) identifiziert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blaues Signal). Post-ischämisch zeigt sich eine Koexpression von Wt1 mit PCNA bzw. VEGF (gelbes Überlappungssignal). Die Negativkontrollen ohne spezifischen Erstantikörper emittieren keine Fluoreszenz. In den Herzen der scheinoperierten Tiere konnte eine vaskuläre Expression von Wt1 und VEGF nicht nachgewiesen werden. Es wurden mindestens jeweils 30 Schnitte von 3 Tieren pro Versuchsgruppe untersucht. Die Maßstab balken entsprechen 100  $\mu\text{m}$  (a, b, d, e) bzw. 20  $\mu\text{m}$  (c, f)

### 3.3. Stimulation der Wt1-Expression durch Hypoxie in vivo

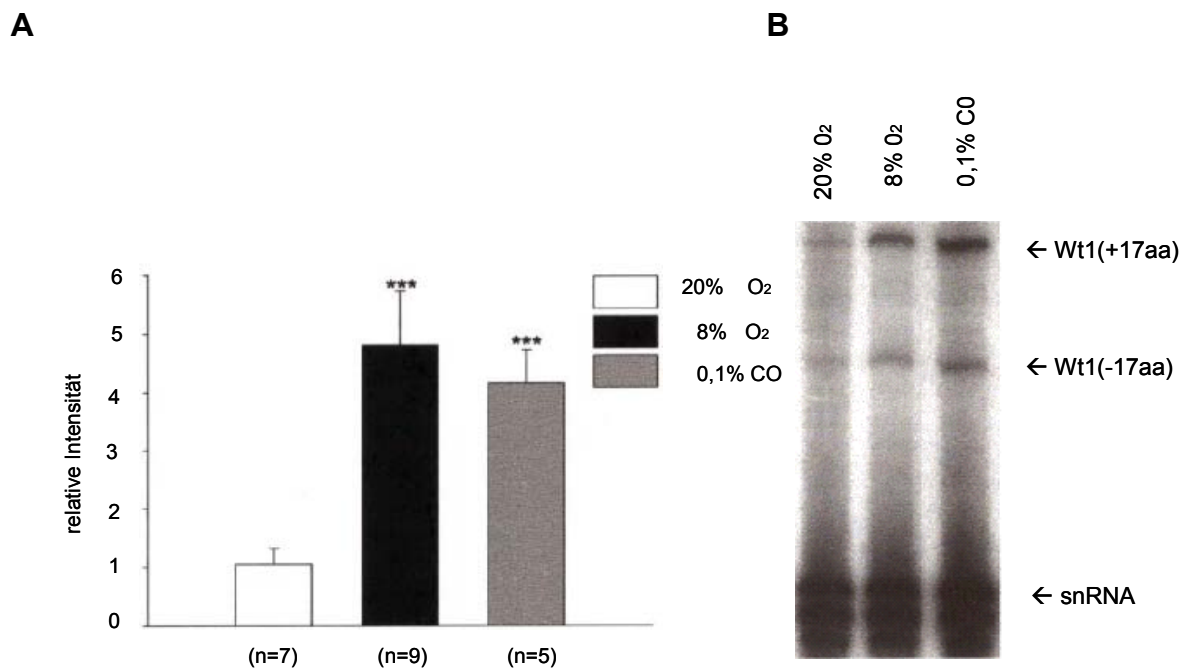
#### 3.3.1. Wt1 mRNA in normalen Rattenherzen und nach systemischer Hypoxie

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurden auslösende Faktoren für die vaskuläre Wt1-Expression nach Myokardinfarkt analysiert. Der Nachweis von Wt1 bereits 24 h nach Infarkt weist darauf hin, dass lokale Ischämie ein wichtiges Signal für die Stimulation der Wt1-Expression sein könnte. Da Gewebhypoxie, d.h. die Herabsetzung des lokalen Sauerstoffgehalts im betroffenen Perfusionsareal, eine frühe Folge und wichtige Komponente der Ischämie ist, war zu untersuchen, ob die spezifische Aktivierung der Wt1-Expression nach kardialer Ischämie durch Hypoxie vermittelt ist.

Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewandt, um eine systemische Hypoxie zu erzeugen. Zum einen wurden Ratten (n=9) jeweils 6 h lang einer normobaren Hypoxie mit inspiratorischer Sauerstoffkonzentration von 8% ( $F_{iO_2} =$



0.08) ausgesetzt. In einem zweiten Modell wurden die Ratten (n=5) über den gleichen Zeitraum gegenüber einer Beimischung von 0.1% Kohlenmonoxid zur Inspirationsluft ( $F_i\text{CO}_2 = 0.001$ ) exponiert. Als Vergleichsgruppe dienten Tiere, die konstant bei normaler Raumluft mit einer Sauerstoffkonzentration von 20% ( $F_i\text{O}_2 = 0.2$ ) gehalten wurden. Aus den linken Ventrikeln der Tiere wurde Gesamt-RNA präpariert und für den Rnase-Protectionassay zum Nachweis der *Wt1* mRNA verwendet. Sowohl bei 8%  $\text{O}_2$  als auch mit 0.1% Kohlenmonoxid resultierte eine deutliche Zunahme des *Wt1* mRNA Gehalts im Herzen (Abb. 9). Die densitometrische Auswertung ergab einen mehr als 4-fachen *Wt1* mRNA-Anstieg im hypoxischen Gewebe (Abb. 9B). Im Gegensatz dazu war die U6 snRNA unter allen Bedingungen konstant. Außer im Herzen wurde unter Hypoxie- bzw. Kohlenmonoxidexposition eine verstärkte *Wt1*-Expression auch in den Nieren, nicht jedoch in anderen Organen (z.B. Gehirn, Milz) festgestellt (57).



**Abb. 9: *Wt1* mRNA Expression in normoxischen und hypoxischen Rattenherzen.**

Repräsentatives Autoradiogramm (A) und densitometrische Auswertung (B) der RNase Protectionassays zum Nachweis von *Wt1* mRNA. Die Hypoxieexposition der Versuchstiere erfolgte 6h lang bei einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 8% ( $F_i\text{O}_2 = 0.08$ , n=9) oder einer Atmosphäre mit einer inspiratorischen Kohlenmonoxidkonzentration von 0.1% ( $F_i\text{CO} = 0.001$ , n=5). Als Kontrollen dienten Versuchstiere, die bei 20% Sauerstoffgehalt in der Inspirationsluft gehalten wurden. Im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen kam es unter Hypoxie (8%  $\text{O}_2$ ) bzw. bei 0.1% Kohlenmonoxid zu einem mehr als vierfachen Anstieg der *Wt1*-Expression.

### 3.3.2 Wt1-Expression bei systemischer Hypoxie: Kolo-kalisation mit hypoxieinduzierbarem Faktor-1 (HIF-1)

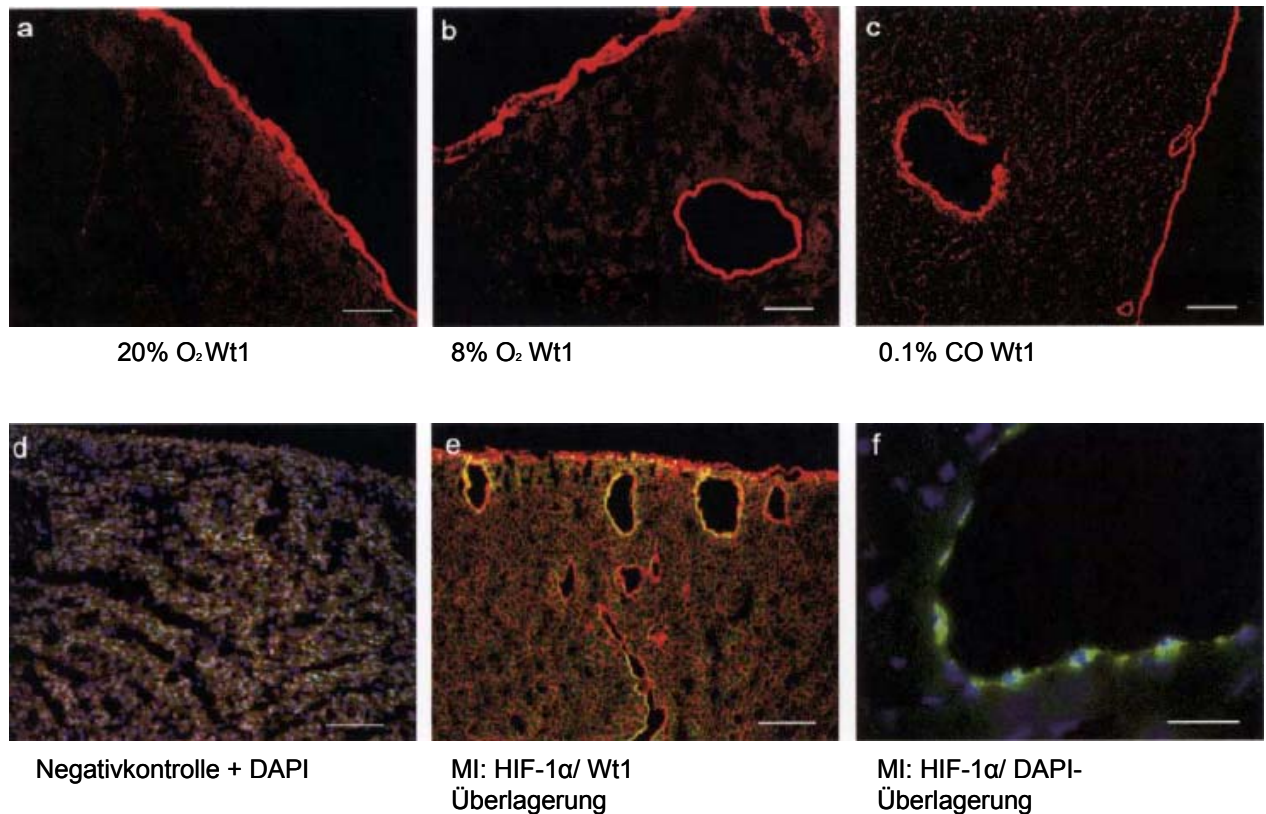
Durch Immunfluoreszenzmarkierung wurde das Proteinexpressionsmuster von Wt1 bei systemischer Hypoxie bestimmt. In Analogie zu den Beobachtungen am post-ischämischen Myokard konnte Wt1 unter Hypoxie ( $F_iO_2 = 0.08$ ) bzw. bei Kohlenmonoxidexposition ( $F_iCO = 0.001$ ) nicht nur im Epikard, sondern auch in den Myokardgefäßen nachgewiesen werden. Im Unterschied zu den Infarktexperimenten resultierte Hypoxie- bzw. Kohlenmonoxidexposition in einer über den gesamten Herzmuskel verteilten vaskulären Wt1-Expression.

Um Hypoxie als Hauptkomponente der Ischämie und wichtigen Faktor der Wt1-Expression nach Myokardinfarkt zu verifizieren, wurde HIF-1 über seine sauerstofflabile Untereinheit HIF-1 $\alpha$  nachgewiesen. Mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen konnte die Koexpression von HIF-1 $\alpha$  (grünes Fluoreszenzsignal) und Wt1 (Rotfluoreszenz) in den infarktnahen Gefäßen 24h nach Ligation der LAD demonstriert werden (Abb. 10). Die Gegenfärbung mit DAPI ergab eine nukleäre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  (Abb. 10f). HIF-1 $\alpha$  kam im rechtsventrikulären Gewebe der Tiere und in den Herzen scheinoperierter Ratten nicht zur Darstellung.

## 3.4. Stimulation der Wt1-Expression durch Hypoxie in vitro

### 3.4.1. Sauerstoffregulierte Wt1-Expression in kultivierten Zellen

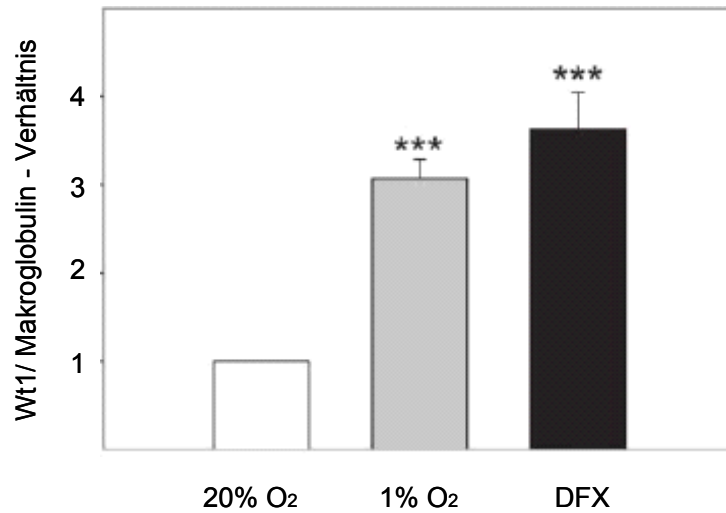
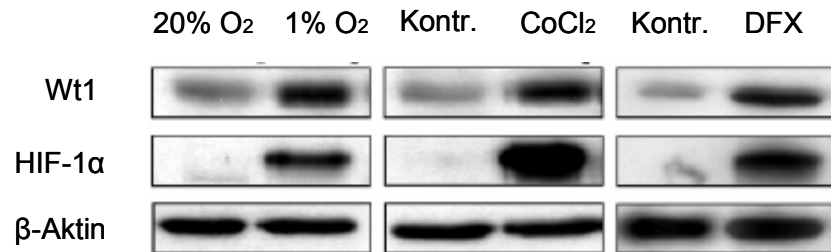
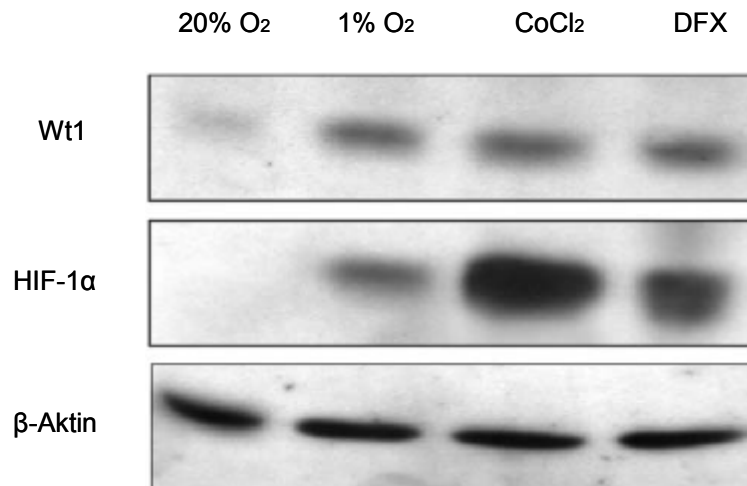
Um den molekularen Mechanismus der hypoxieabhängigen Wt1-Expression zu analysieren, musste zunächst ein geeignetes Zellkulturmodell etabliert werden. Da primäre Zellkulturen zur Untersuchung der Wt1-Expression nicht zur Verfügung stehen, wurden mehrere permanente Zelllinien bezüglich einer sauerstoffregulierten Expression von Wt1 überprüft. Zwei der getesteten Zelllinien reagierten auf ein vermindertes Sauerstoffangebot mit einer Zunahme der Wt1-Expression: eine humane Osteosarkomzelllinie (U2OS) und humane Lymphoblastenzellen (Reh). Diese beiden Linien wurden für die weiteren Experimente verwendet. Zur Verifizierung einer hypoxieabhängigen Wt1-Expression wurden U2OS- und Reh-Zellen 16h lang bei 1%  $O_2$  inkubiert. Eine Zunahme der Expression von Wt1 unter Hypoxie konnte in beiden Zelllinien sowohl mittels quantitativer RT-PCR auf der mRNA Ebene als auch durch Westernblotanalyse für das Protein nachgewiesen werden (Abb. 11).



**Abb. 10: Nachweis von Wt1 und HIF-1 in normoxischen und hypoxischen Rattenherzen.**

Wt1 kommt im normoxischen Gewebe (20% inspiratorische O<sub>2</sub>-Konzentration) ausschließlich im Epikard vor (a). Unter hypoxischen Bedingungen (8% O<sub>2</sub> bzw. 0.1% CO) lässt sich Wt1 zusätzlich in Myokardgefäßen nachweisen (b, c). In den infarktnahen Gefäßen ist Wt1 (rot) mit HIF-1 (grün) kolokalisiert (gelbes Überlappungssignal in e). Die DAPI-Gegenfärbung zeigt bei hoher Auflösung eine nukleäre Lokalisation von HIF-1α (f). Die Negativkontrollen ohne Erstantikörper ergaben kein Fluoreszenzsignal. Es wurden mindestens jeweils 30 Schnitte von 3 Tieren untersucht.

Eine Stimulation der Wt1-Expression bei Normoxie (20% O<sub>2</sub>) wurde auch durch Inkubation der Zellen mit Kobaltchlorid (CoCl<sub>2</sub>, 100 µM) und Desferrioxamin (DFX, 100 µM) verursacht (Abb. 11). Beide Substanzen wirken durch Verdrängung zweiwertiger Eisenkationen (Fe<sup>2+</sup>), die ein Kofaktor der HIF-1α-Prolylhydroxylase sind. Hydroxylierung der α-Untereinheit von HIF-1 ist Voraussetzung für deren sauerstoffabhängige Degradation (58, 59). Entsprechend wurde mit CoCl<sub>2</sub> bzw. DFX ähnlich wie unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) ein Anstieg der HIF-1α Expression in U2OS- und Reh-Zellen beobachtet (Abb. 11). Im Gegensatz dazu war der Gehalt an β-Aktin unter den verschiedenen Versuchsbedingungen unverändert. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl Reh- als auch U2OS-Zellen über die für eine sauerstoffabhängige Regulation des *Wt1*-Gens notwendigen Mechanismen verfügen. Wegen ihrer besseren Transfizierbarkeit wurden die nachfolgenden Experimente ausschließlich an U2OS-Zellen durchgeführt.

**A****U-2OS****Reh****C**

**Abb. 11: Expression von WT1 und HIF-1α in Osteosarkom- (U2OS) und Lymphoblastenzellen (Reh).**

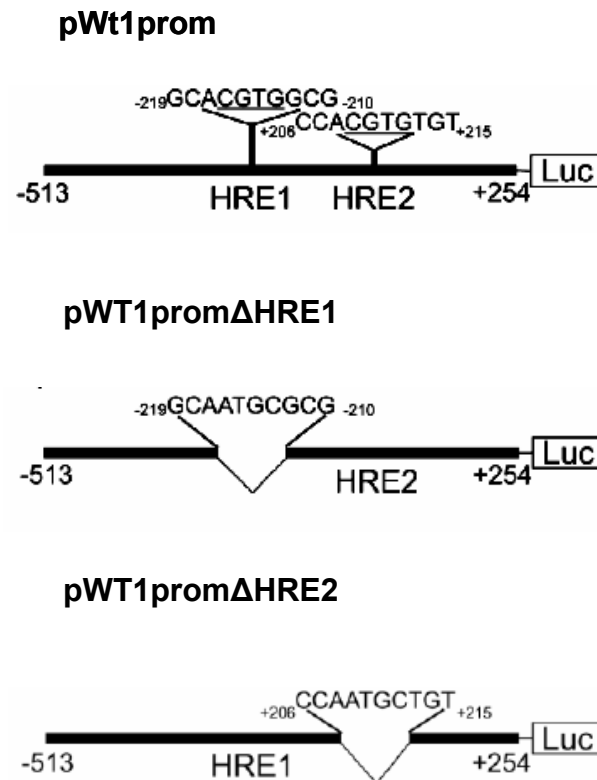
Der Proteinnachweis in U2OS-Zellen erfolgte durch Westernblot Analyse (A). Die Expressionsanalyse in Reh-Zellen wurde mittels quantitativer RT-PCR (B) und Westernblot (C) durchgeführt. Während Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) kommt es ebenso wie bei Behandlung der Zellen mit CoCl<sub>2</sub> bzw. Desferrioxamin (DFX) (je 100 μM) bei 20 % O<sub>2</sub> zu einer deutlichen Zunahme der WT1-Expression. Parallel dazu erfolgt ein Anstieg von HIF-1α, während der Gehalt an β-Aktin unter allen Versuchsbedingungen konstant bleibt.

### 3.4.2. Aktivierung des *Wt1*-Promotors durch Hypoxie

Weiterhin wurde der molekulare Mechanismus, über den Sauerstoffmangel zu einer gesteigerten Expression von *Wt1* führt, analysiert. Da das *Wt1*-Gen überwiegend transkriptionell reguliert ist, wurde überprüft, ob der *Wt1*-Promotor durch Hypoxie aktivierbar ist. Dazu wurden U2OS-Zellen mit *Wt1*-Promotor-Reporterkonstrukten transient transfiziert und anschließend 16 Stunden lang bei Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) inkubiert. Die transfizierte *Wt1*-Sequenz hatte eine Länge von 767 bp und erstreckte sich von -513 bp bis +254 bp relativ zur Transkriptionsstartstelle des murinen *Wt1*-Gens (Abb. 12). Die Bestimmung der *Wt1*-Promotoraktivitäten erfolgte indirekt durch luminometrische Messung der Aktivitäten der transfizierten Luziferase-Reporter.

Zunächst wurden Experimente mit dem „Wildtyp-Konstrukt“ (p*Wt1*prom) durchgeführt. Exposition der transfizierten Zellen gegenüber 1% O<sub>2</sub> führte im Vergleich zur Inkubation bei 20% O<sub>2</sub> zu einer ca. 6-fachen Zunahme der gegen  $\beta$ -Galaktosidase normalisierten Luziferaseaktivitäten (Abb. 12B). Ebenso resultierte die Behandlung der transfizierten Zellen mit CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) bei Normoxie (20% O<sub>2</sub>) in einer etwa 9-fachen Zunahme der Luziferaseaktivität gegenüber unbehandelten Zellen (Abb. 12B). Kotransfektion eines HIF-1 $\alpha$ -Expressionskonstrukts steigerte die Luziferaseaktivität auf das 21-fache des Ausgangswerts (Abb. 12B). Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion des „leeren“ pGL2basic Reportervektors, dessen basale Aktivität durch die verschiedenen Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wurde (Abb. 12B). Diese Resultate zeigen, dass der Promotor des *Wt1*-Gens sauerstoffabhängig reguliert ist. Die Ergebnisse deuten ferner darauf hin, dass HIF-1 eine Rolle als Vermittler des Hypoxieeffektes spielt.

**A**



**B**

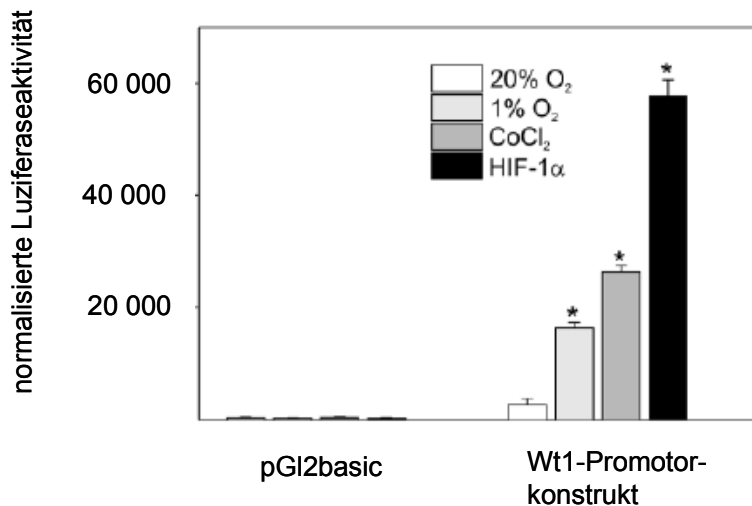
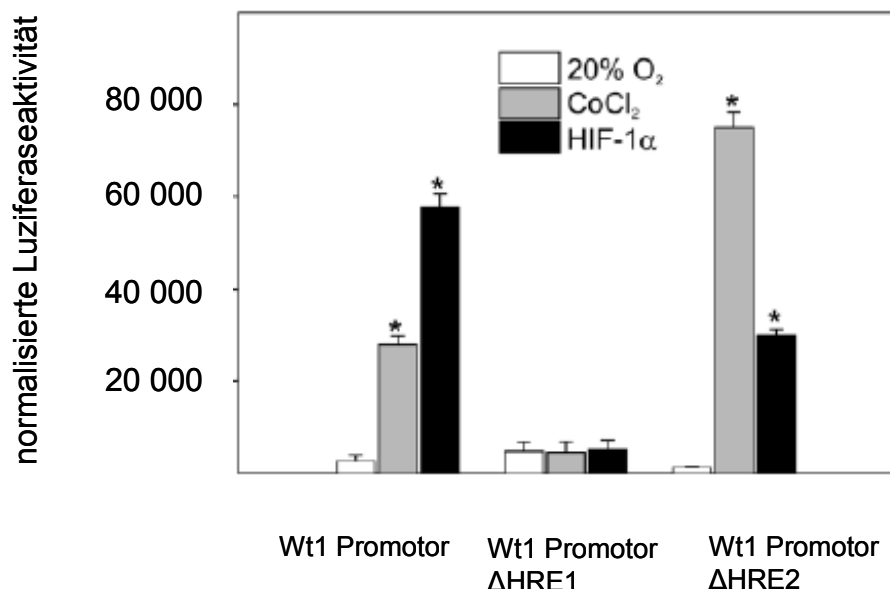


Abb. 12: Schema der verwendeten Wt1-Promotorkonstrukte (A) und Aktivität des transfizierten Wildtyp-Promotors (pWt1prom) in U2OS-Zellen (B).

pWT1prom enthielt zwei potenzielle HIF-1 Bindungsstellen (hypoxia responsive elements, HREs) an den Positionen -217 bp (HRE-1) bzw. +208 bp (HRE-2) relativ zur Transkriptionsstartstelle. Bei zwei weiteren verwendeten Reporterkonstrukten waren die beiden HREs jeweils deletiert (pWT1 $\Delta$ HRE1 bzw. pWT1 $\Delta$ HRE2). Die normalisierten Luziferaseaktivitäten zeigen eine signifikante Stimulation des murinen Wt1-Promotors (pWt1 prom) unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) bzw. in Gegenwart von CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) bei Normoxie (20% O<sub>2</sub>). Eine Zunahme der Promotoraktivität erfolgt auch bei Kotretransfektion eines HIF-1 $\alpha$ -Expressionskonstruktes. Die Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet (n=5 verschiedene in Doppelansätzen durchgeführte Experimente).

### 3.4.3 Charakterisierung von HIF-1 als Mediator der hypoxieabhängigen Wt1-Expression

Um die cis-regulatorischen Elemente für die sauerstoffabhängige Regulation im Wt1-Promotor zu lokalisieren, wurden die beiden potenziellen HIF-1 Bindungsstellen HRE1 bzw. HRE2 gezielt eliminiert. Deletion von HRE2 blieb ohne signifikanten Einfluß auf die Hypoxiesensibilität des Wt1-Promotorkonstrukts, wohingegen die Deletion von HRE1 zu einem Verlust der Stimulierbarkeit durch HIF-1 bzw. CoCl<sub>2</sub> führte (Abb. 13). Diese Resultate zeigen, dass offenbar die erwartete HIF1-Bindungsstelle HRE1 für die sauerstoffabhängige Regulation des Wt1-Promotors relevant ist.



**Abb. 13: Aktivität verschiedener Wt1-Promotor-Reporterkonstrukte in transient transfizierten U2OS-Zellen.**

Deletion von HRE1 ( $\Delta$ HRE-1), nicht jedoch von HRE2 ( $\Delta$ HRE-2), hatte einen Verlust der Induzierbarkeit durch CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) bzw. HIF-1 $\alpha$  zur Folge. Die Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05 (n=5).

Mittels Elektrophorese-Mobilitätsshiftassays (EMSA) wurde das im Wt1-Promotor lokalisierte Element HRE1 im Hinblick auf Bindung von HIF-1 überprüft. Dazu wurde ein <sup>32</sup>P-markiertes Oligonukleotid, welches die HRE1-Sequenz enthielt, mit Kernextrakten normoxischer (20% O<sub>2</sub>) und hypoxischer (1% O<sub>2</sub>) U2OS-Zellen inkubiert. Außerdem wurden Kernextrakte von U2OS-Zellen, die über einen Zeitraum von 16 Stunden mit CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) behandelt worden waren, verwendet. Das

repräsentative Autoradiogramm eines EMSA ist in Abb. 14 gezeigt. Neben verschiedenen unspezifischen bzw. konstitutiven (c) Signalen sind im Autoradiogramm auch Retardationsbanden in den mit Kernextrakten von hypoxischen bzw. CoCl<sub>2</sub>-inkubierten U2OS-Zellen durchgeführten Experimenten erkennbar (HIF-1 $\alpha$ ). Mit Extrakten aus normoxischen Zellen wurden diese Banden nicht beobachtet. Durch Zugabe eines unmarkierten Oligonukletid-Kompetitors in 100-fachem molarem Überschuss, der das hypoxieresponsive Element (HRE) aus dem 3'-Enhancer des Erythropoietingens (3'-Epo) enthielt (50), waren die Retardationsbanden supprimierbar. Präinkubation der hypoxischen Kernextrakte mit einem anti-HIF-1 $\alpha$ -Antikörper verursachte eine zusätzliche Retardierung des Oligonukleotids. Dieser sog. Supershift identifiziert HIF-1 $\alpha$  als spezifischen Bindungsfaktor in den hypoxischen Kernextrakten. Entsprechend hatten Mutationen (Wt1-HRE1mut.) des Oligonukleotids einen Verlust der HIF-1-Bindung zur Folge. Ein Oligonukleotid mit der HIF-1-Bindungsstelle aus dem 3'-Enhancer des Erythropoietingens (3'-Epo) diente als Positivkontrolle für die Experimente.

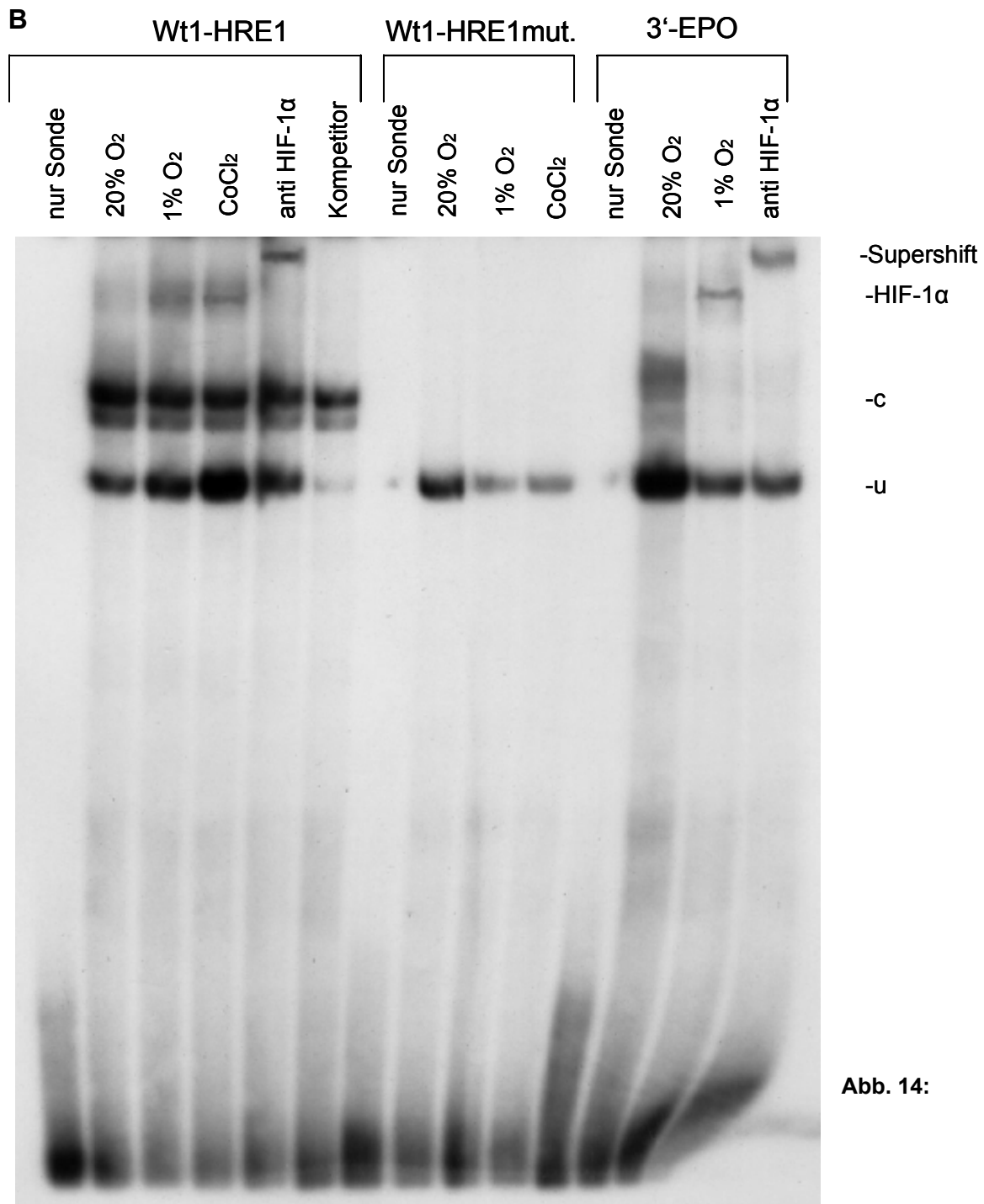
**A**

5'-GAGAGCACGTGGCGGGCCAG-3' (Wt-HRE1)

5'-GAGAGCTTTTGGCGGGCCAG-3' (Wt-HRE1mut)

5'-GCCACGTGCTGTCTCA-3' (3'-EPO)





**Abb. 14:**

**Elektrophorese Mobilitätsshiftassay (EMSA) zum Nachweis der Bindung von HIF-1 an das identifizierte HRE1 im Promotor des Wt1 Gens.**

(A) Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

(B) Eine spezifische Retardationsbande (< HIF-1α) ist bei Verwendung von Kernextrakten aus hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) U2OS-Zellen erkennbar, nicht jedoch mit Extrakten aus normoxischen Zellen (20% O<sub>2</sub>). Ebenso ergibt sich ein Retardierungssignal mit Kernextrakten aus U2OS-Zellen, die zuvor mit CoCl<sub>2</sub> (100 μM) inkubiert worden waren. Zugabe eines nicht-markierten Kompetitor-Oligonukleotids mit der HIF-1 Bindungssequenz aus dem 3'-Enhancer des Erythropoietingens (3'-EPO) resultierte in einem Verlust der Retardierungsbande. Präinkubation der Reaktionsansätze mit einem gegen HIF-1α gerichteten Antikörper verursachte einen Supershift. Das mutierte Bindungselement Wt1-HREmut. hatte keine Affinität für HIF-1α.