

3. Ergebnisse

3.1 *Wt1* Expression in den Retinae von Wildtyp-Mäusen

Zunächst wurden die zellspezifische Expression und der zeitliche Expressionsverlauf von *Wt1* in den Retinae von Wildtyp-Mäusen (*Wt1*^{+/+}) untersucht. Es wurden Querschnittpräparate (n=100) von *Wt1*^{+/+} Mäusen (Stamm C57BL/6 (B6)) vier verschiedener Entwicklungsstufen angefertigt. Die *Wt1* mRNA Expression in den Retinae wurde mittels nicht-radioaktiver mRNA *in situ* Hybridisierung unter Verwendung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden studiert.

Wt1 mRNA war erstmals am 12. Embryonaltag (E12) in neuronalen Vorläuferzellen und der sich entwickelnden Augenlinse nachweisbar (Abb. 3A). Am 15. Tag der Embryonalentwicklung (E15) (Abb. 3C) und dem 1. Tag *post partum* (P1) (Abb. 3D) wurde *Wt1* mRNA zunehmend in der entstehenden Ganglienzellschicht exprimiert. Bei adulten Mäusen war *Wt1* mRNA weder in der Retina noch in der Linse nachweisbar (Abb. 3E). Kontrolllexperimente wurden unter Verwendung des komplementären sense Strangs als Sonde für die *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Die sense Sonde lieferte kein spezifisches Hybridisierungssignal in den Retinae altersentsprechender Mausembryonen. Beispielhaft ist in Abb. 3B die Hybridisierung mit der sense Sonde an der Retina eines E12 Embryos gezeigt.

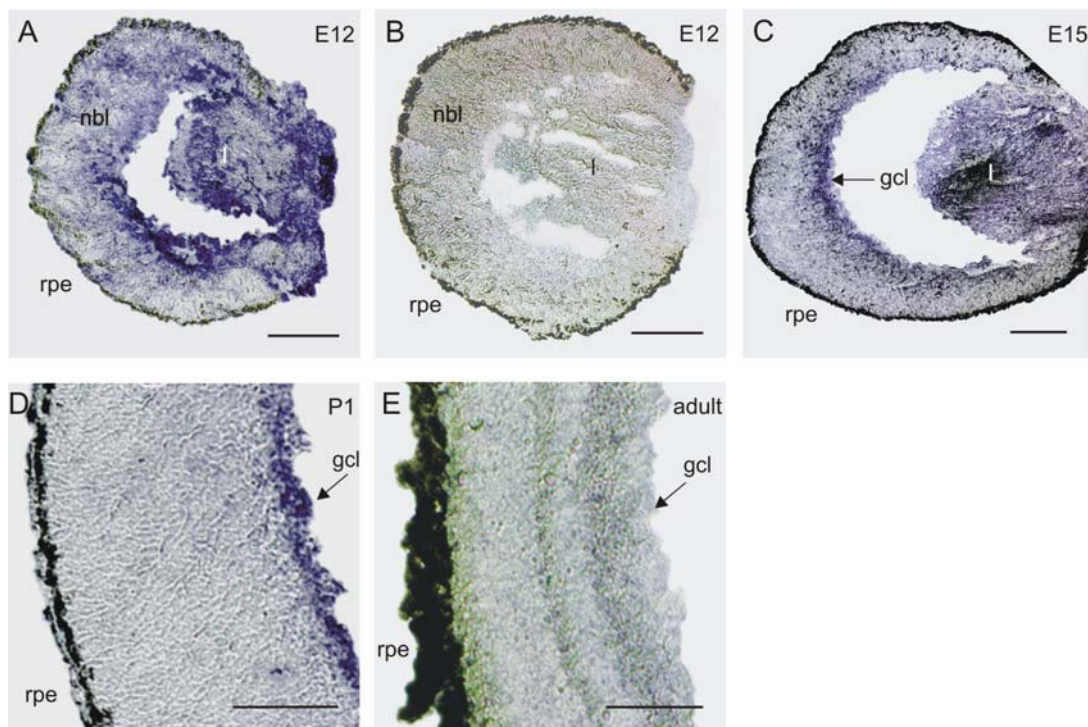


Abb. 3: Nachweis von *Wt1* mRNA mittels mRNA *in situ* Hybridisierung in den Retinae von Wildtyp (*Wt1*^{+/+}) Mäusen (Stamm C57BL/6 (B6)) zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. (A) *Wt1* mRNA

wurde zum Zeitpunkt E12 in neuronalen Progenitorzellen (nbl) und in der Linse (l) exprimiert. (B) Mit der sense Sonde konnte kein spezifisches Hybridisierungssignal nachgewiesen werden. (C, D) Im Entwicklungsverlauf wurde *Wtl* zu den Zeitpunkten E15 (C) und P1 (D) in der entstehenden Ganglienzellschicht (gcl) exprimiert. (E) Die Retinae adulter Tiere zeigten keine *Wtl* Expression. Retinales Pigmentepithel (rpe), Maßstab 100 μm .

3.2 Morphologie der Retina von Wildtyp- und *Wtl*-defizienten Mausembryonen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Expression von *Wtl* für die Ausbildung einer normalen Netzhautstruktur notwendig ist. Dazu wurden Paraffinschnittpräparate (n=40) von Wildtyp- (*Wtl*^{+/+}) und *Wtl*-defizienten Mausembryonen (*Wtl*^{-/-}) angefertigt, HE-gefärbt und die Retinamorphologie zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten verglichen. Mäuse vom Stamm C57BL/6 mit homozygot inaktiviertem *Wtl* Gen starben zwischen Tag 13 (E13,5) und 15 (E15,5) der Embryonalentwicklung (Kreidberg et al., 1993). Durch Kreuzung der *Wtl*^{-/-} Mutation auf Mausembryonen vom Stamm MF1×B6 konnte ihre Letalität in ca. 16% der Fälle bis zum Entwicklungszeitpunkt E18,5 hinausgezögert werden (Herzer et al., 1999). Die morphologischen Untersuchungen wurden daher zum Zeitpunkt E12 an Mausembryonen der Stämme C57BL/6 (B6) (jeweils n=4) und MF1×B6 (jeweils n=5), zum Zeitpunkt E18 am Stamm MF1×B6 (jeweils n=5) durchgeführt. Wegen der embryonalen Letalität der *Wtl*^{-/-} Mäuse konnte die Netzhautmorphologie postnatal nicht studiert werden. Aufgrund signifikanter Unterschiede in der Zelldichte in verschiedenen Regionen der Retina bei der Maus (Drager & Olsen, 1981) wurden stets Schnittpräparate von der gleichen Region *Wtl*^{-/-} und *Wtl*^{+/+} Retinae analysiert und verglichen.

Zum Entwicklungszeitpunkt E12 hatten die *Wtl*^{-/-} Mausembryonen vom Stamm C57BL/6 (B6) (Abb. 4D, E) deutlich dünnere Retinae mit weniger neuronalen Zellen als altersidentische *Wtl*^{+/+} Embryonen (Abb. 4A, B). Die Abbildungen 4B und 4E zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Netzhaut aus den Abbildungen 4A bzw. 4D. Bei den Wildtyp-Mäusen bestand die neuronale Retina im Mittel aus 10 Zellreihen, bei den Knockout-Embryonen dagegen lediglich aus durchschnittlich 4 Reihen. Beim Mausstamm MF1×B6 waren die Phänotypveränderungen der *Wtl*^{-/-} Retinae weniger stark ausgeprägt im Vergleich zum Stamm C57BL/6 (B6).

Zum Entwicklungszeitpunkt E18 waren die Augen der Embryonen mit homozygot inaktiviertem *Wtl* Gen signifikant kleiner als bei altersentsprechenden Wildtyp-Mäusen. Der maximale Durchmesser der Augen wurde für die *Wtl*^{-/-} Embryonen auf 1403±30 μm und für die *Wtl*^{+/+} Embryonen auf 1735±29 μm bestimmt ($P < 0,0001$; Wilcoxon Test). Die Retinae der *Wtl*^{-/-} Mausembryonen (Abb. 4F) waren deutlich dünner als bei den Wildtypen (Abb. 4C).

Insbesondere fanden sich bei den *Wt1*^{-/-} Embryonen in der entstehenden Ganglienzellschicht ca. 40% weniger Zellen als bei Wildtyp-Mäusen.

Die Augen und Netzhäute von embryonalen (E12, E18) und adulten heterozygoten Mäusen (*Wt1*^{+/-}) zeigten im Vergleich zu den Wildtypen keine morphologischen Auffälligkeiten.

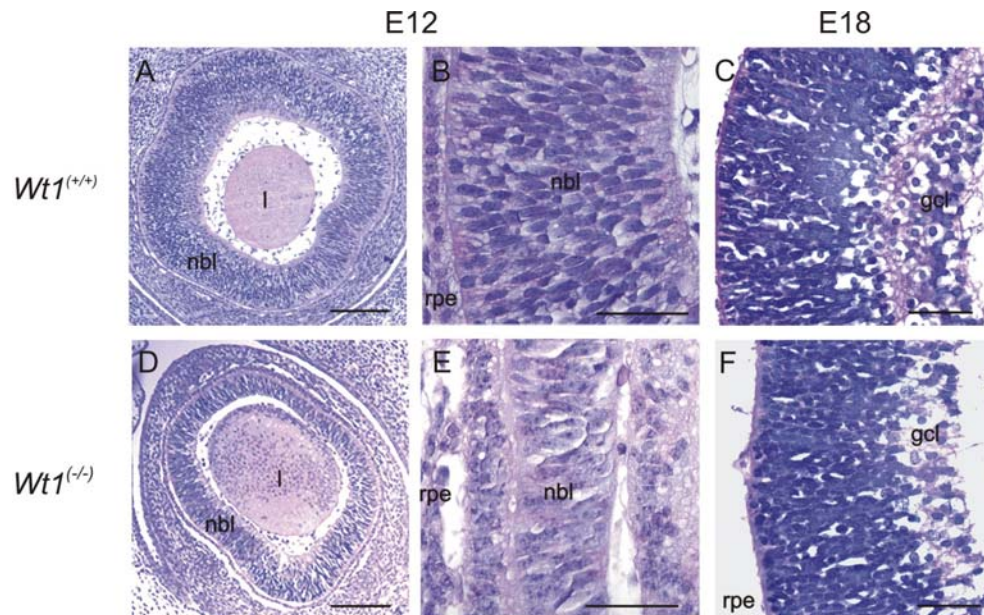


Abb. 4: HE-Färbung der Netzhäute von *Wt1*^{+/+} (A-C) und *Wt1*^{-/-} (D-F) Mäusen zu den Zeitpunkten E12 (A, B, D, E) und E18 (C, F). (A, B, D, E) Bei E12 Embryonen (Stamm C57BL/6 (B6)) mit *Wt1*-Defekt (D, E) war die neuronale Retina (nbl) deutlich dünner und zellärmer als in den *Wt1*^{+/+} Retinae (A, B). (B) und (E) zeigen Ausschnittsvergrößerungen von (A) bzw. (D). (C, F) Bei E18 Embryonen (Stamm MF1×B6) waren in der unreifen Ganglienzellschicht (gcl) von *Wt1*^{-/-} Retinae (F) ca. 40% weniger Zellen enthalten als in den *Wt1*^{+/+} Retinae (C). Retinales Pigmentepithel (rpe), Maßstab 100µm (A, D) 50 µm (B, C, E, F).

3.3 Morphologie des Sehnerven von Wildtyp- und *Wt1*-defizienten Mausembryonen

Retinale Ganglienzellen entstehen bei der Maus zwischen E11 und P3 (Sidman, 1961; Young, 1985). Als Projektionsneurone der Retina entsenden sie ihre Axone im Sehnerven zum Mittelhirn (Colliculus superior, Nucleus geniculatus lateralis). Axone sind im Sehnerven der Maus ab E12,5 nachweisbar (Sidman, 1961). Da die mikroskopischen Befunde auf eine spezifische Funktion von *Wt1* bei der Entwicklung retinaler Ganglienzellen hindeuten (*Abb. 4*), wurde in weiteren Untersuchungen die Integrität des Sehnerven als weiteres Kriterium zur Beurteilung des retinalen Ganglienzellverlusts bei *Wt1*-defizienten Mausembryonen herangezogen. Es wurden Schnittpräparate durch den Sehnerven von *Wt1*^{+/+} und *Wt1*^{-/-} Mausembryonen (Stamm MF1×B6; jeweils n=5) zum Entwicklungszeitpunkt E18 angefertigt

und die Ganglienzellaxone mittels Immunfärbung für das Neurofilament (NF) 200, einem Intermediärfilament neuronaler Zellen, dargestellt.

Längsschnitte durch den Sehnerven von Wildtyp ($Wt1^{+/+}$)-Mäusen am 18. Embryonaltag (E18) zeigten klar den Austritt der intakten Sehnervenfasern aus der Retina (Abb. 5A). Bei Mausembryonen mit homozygot inaktiviertem $Wt1$ Gen ($Wt1^{-/-}$) dagegen brach der Sehnerv regelmäßig ca. 100 μm jenseits des Discus nervi optici, der Austrittsstelle der gebündelten Ganglienzellaxone aus der Retina, blind endend ab (Abb. 5C). In Querschnitten durch den Sehnerven, die ca. 400 μm jenseits des Discus nervi optici erfolgten, kamen die einzelnen Axonbündel bei den $Wt1^{+/+}$ Embryonen in der NF200 Immunfärbung deutlich zur Darstellung (Abb. 5B). Im Gegensatz dazu ließ sich bei den $Wt1^{-/-}$ Mutanten keine spezifische NF200 Immunreaktivität nachweisen (Abb. 5D). Diese Resultate zeigen, dass $Wt1^{-/-}$ Mausembryonen offensichtlich ein gestörtes Wachstum der retinalen Ganglienzellaxone aufweisen. Die Immunfärbung für NF200 zeigte bei den heterozygoten E18 Mausembryonen ($Wt1^{+/-}$) im Vergleich zu den Wildtypen ($Wt1^{+/+}$) keine auffälligen Unterschiede.

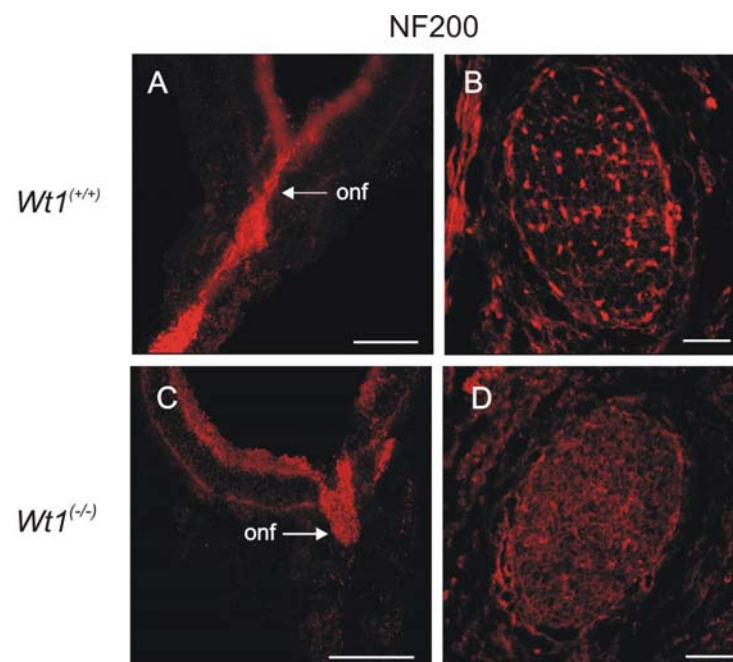


Abb. 5: Immunfärbung für Neurofilament (NF) 200 im Sehnerven von $Wt1^{+/+}$ (A, B) und $Wt1^{-/-}$ (C, D) Mausembryonen (Stamm MF1 \times B6) zum Entwicklungszeitpunkt E18. Im Unterschied zu den Wildtyp-Embryonen (A) endete der Sehnerv (onf) bei den $Wt1^{-/-}$ Mäusen (C) ca. 100 μm jenseits der Austrittsstelle aus der Netzhaut. In Querschnitten, die ca. 400 μm hinter dem Discus nervi optici erfolgten, kamen einzelne Axonbündel bei $Wt1^{+/+}$ Embryonen durch NF200-Färbung klar zur Darstellung (B). Im Gegensatz dazu waren bei den $Wt1^{-/-}$ Mäusen keine NF200-positiven Nervenfasern erkennbar (D). Maßstab 200 μm (A, C), 100 μm (B, D).

3.4 Verminderte Zellproliferation in den *Wtl*^{-/-} Retinae zum Zeitpunkt E12

Als mögliche Ursachen für die verringerte Zellzahl in den *Wtl*^{-/-} Retinae kommen grundsätzlich eine verminderte Bildung retinaler Vorläuferzellen sowie ein vermehrter Zelluntergang, z. B. durch Apoptose, in Betracht. Zum Nachweis einer möglichen Proliferationsstörung in den *Wtl*-defizienten Retinae wurde die Expression des endogenen Proliferationsmarkers PCNA und der Einbau des Thymidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in die genomische DNA als exogener Marker mit immunhistochemischen Methoden analysiert. Untersucht wurden für den Zeitpunkt E12 Mausembryonen vom Stamm C57BL/6 (B6) (jeweils n=4) und für E18 vom Stamm MF1×B6 (jeweils n=4).

Zum Entwicklungszeitpunkt E12 zeigte die Immunfärbung für PCNA in den neuronalen Progenitorzellen der Retinae *Wtl*-defizienter Mausembryonen (Abb. 6C) ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal als bei den Wildtyp (*Wtl*^{+/+})-Mäusen (Abb. 6A). Entsprechend war der BrdU-Einbau in den Neuroblasten der *Wtl*^{-/-} (Abb. 6D) im Vergleich zu den *Wtl*^{+/+} Retinae (Abb. 6B) deutlich vermindert. Pro Stadium und Tier wurden in je 3 Retinaschnitten die BrdU-positiven Neuroblasten unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei fanden sich in den Retinae der *Wtl*^{-/-} Mäuse ca. 10-mal weniger BrdU-positive Zellen als bei den *Wtl*^{+/+} Mausembryonen ($P < 0,05$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test). Offenbar liegt zum Entwicklungszeitpunkt E12 eine deutliche Proliferationsstörung neuronaler Vorläuferzellen in den Retinae *Wtl*-defizienter Mausembryonen (Stamm C57BL/6 (B6)) vor. Im Unterschied zum Zeitpunkt E12 zeigten sich am 18. Embryonaltag (E18) bei *Wtl*^{+/+} und *Wtl*^{-/-} Mäusen (Stamm MF1×B6) keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich der Zahl PCNA- und BrdU-positiver Netzhautzellen. *Wtl*^{+/+} und *Wtl*^{+/-} Retinae unterschieden sich nicht hinsichtlich PCNA-Immunfärbung und BrdU-Einbau.

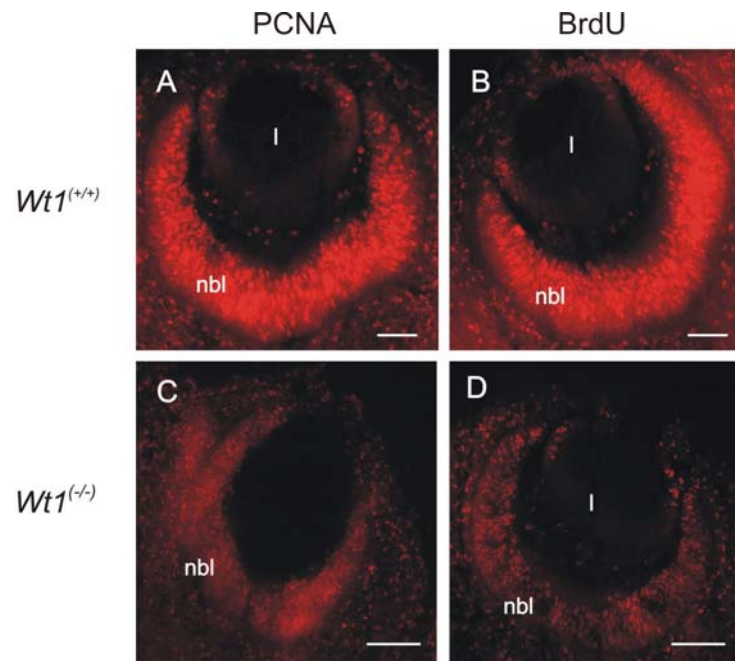


Abb. 6: Immunhistologischer Nachweis des zellulären Proliferationsmarkers PCNA (A, C) und der BrdU-Inkorporation (B, D) bei Wildtyp (A, B) und Knockout (C, D) Mäusen (Stamm C57BL/6 (B6)) zum Zeitpunkt E12. (A, C) In den Neuroblasten (nbl) der *Wt1^{+/+}* Retinae (C) war die PCNA-Immunreaktivität deutlich schwächer als in den *Wt1^{+/+}* Retinae (A). (B, D) In den *Wt1^{-/-}* Retinae (D) fanden sich ca. 10-mal weniger BrdU-positive Zellen als bei den *Wt1^{+/+}* Mäusen (B). Linse (l), Maßstab 100 µm.

3.5 Vermehrte Apoptose in den *Wt1^{-/-}* Retinae zum Zeitpunkt E18

Der Verlust der *Wt1* Funktion bewirkte bei *Wt1^{-/-}* Mäusen eine verstärkte Apoptose im Primordium der Milz (Herzer et al., 1999) und im metanephrogenen Blastem (Kreidberg et al., 1993). Daher wurde untersucht, ob *Wt1^{-/-}* Embryonen im Vergleich zu Wildtyp (*Wt1^{+/+}*)-Mäusen auch eine vermehrte Apoptose retinaler Zellen aufweisen. Der Nachweis apoptotischer Netzhautzellen erfolgte mittels TUNEL-Assay zu den embryonalen Entwicklungszeitpunkten E12 und E14 (Stamm C57BL/6 (B6); jeweils n=5) sowie E18 (Stamm MF1×B6; n=5). Für jedes Stadium wurden pro Tier 5 Retinaschnitte nahe des Discus opticus durch Auszählen der TUNEL-positiven (apoptotischen) Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Zu den Entwicklungszeitpunkten E12 und E14 fand sich bei *Wt1^{+/+}* und *Wt1^{-/-}* Embryonen kein signifikanter Unterschied in der Anzahl TUNEL-positiver Netzhautzellen. Am 18. Embryonaltag (E18) allerdings waren in den Retinae *Wt1*-defizienter Mäuse ca. 4-mal mehr TUNEL-positive Zellen als bei den Wildtypen nachweisbar ($P < 0,001$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test) (Abb. 7A). Die Abbildungen 7B und 7C zeigen repräsentative TUNEL-Assays einer Wildtyp- (Abb. 7B) bzw. *Wt1^{-/-}* Retina (Abb. 7C) zum Zeitpunkt E18. Etwa 60% der apoptotischen Zellen

waren in der unreifen Ganglienzellschicht lokalisiert. Zu keinem der untersuchten Entwicklungszeitpunkte gab es einen signifikanten Unterschied in der Zahl apoptotischer Zellen in den Retina von Wildtyp ($Wt1^{+/+}$) und $Wt1^{+/-}$ heterozygoten Embryonen.

Komplementierung des endogenen $Wt1$ Defekts durch YAC transgene Expression von 280 kb des humanen $WT1$ Gens ($WT280$ YAC) resultierte in einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate auf ein Niveau, das von dem der $Wt1^{+/+}$ Retinae nicht signifikant verschieden war (Abb. 7A). Auch bei den transgenen Mäusen wurden zu jedem Entwicklungszeitpunkt jeweils 5 verschiedene Embryonen untersucht.

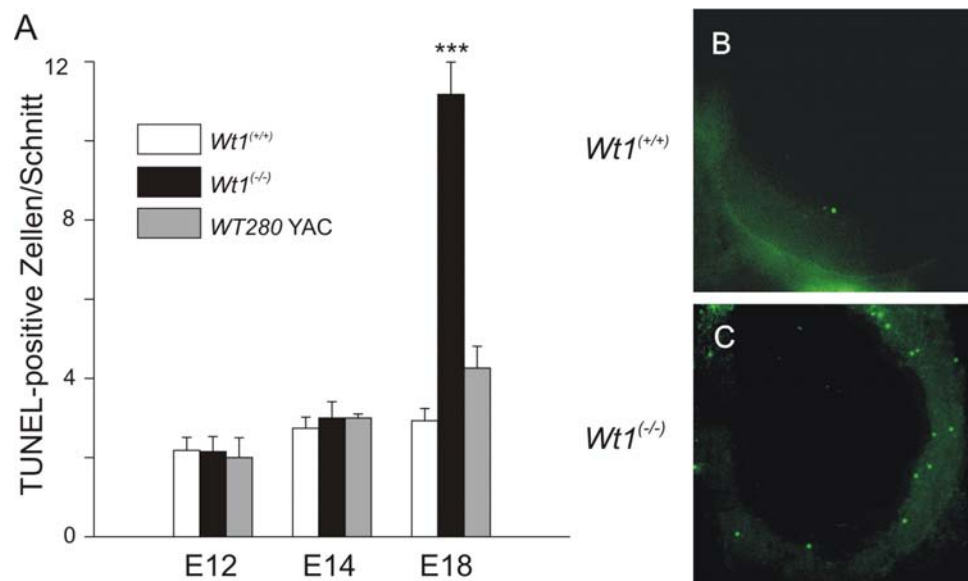


Abb. 7: (A) Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen pro Gewebeschnitt in den Retinae von Wildtyp- ($Wt1^{+/+}$), $Wt1$ -defizienten ($Wt1^{-/-}$) und $Wt1$ -defizienten Embryonen mit Komplementierung durch den humanen $WT1$ -Locus ($WT280$ YAC) zu den angezeigten Entwicklungsstadien. (B, C) Repräsentative TUNEL-Assays mit Nachweis apoptischer Zellen in der Netzhaut eines Wildtyp- (B) und eines $Wt1$ -defizienten Mausembryos (C) (Stamm MF1×B6) zum Zeitpunkt E18. Ca. 60% der apoptotischen Netzhautzellen befanden sich in der unreifen Ganglienzellschicht. Maßstab 100 μ m. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 verschiedenen Embryonen. *** bezeichnet $P < 0,001$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test.

3.6 Verlust des POU-Domänen-Transkriptionsfaktors Pou4f2 in den $Wt1^{-/-}$ Retinae

Die normale Entwicklung des Auges und der Retina wird durch zahlreiche sezernierte Liganden, neuronale Wachstumsfaktoren, Hormone und Transkriptionsfaktoren reguliert (Übersicht in Freund et al., 1996; Jean et al., 1998).

Die POU Familie von Transkriptionsfaktoren wurde aufgrund eines gemeinsamen DNA-Bindungsmotivs definiert, das ursprünglich in den Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct-1 und Oct-2

bei Säugetieren und Unc-86 bei der Nematode *Caenorhabditis elegans* identifiziert wurde. Die drei strukturell verwandten Klasse IV POU-Domänen Transkriptionsfaktoren Pou4f1 (ehemals Brn-3.0, Brn-3a), Pou4f2 (Brn-3.2, Brn-3b) und Pou4f3 (Brn-3.1, Brn-3c) werden mit einem charakteristischen, überlappenden Muster in (somato-)sensorischen Ganglien und sensomotorischen Hirnstammarealen exprimiert. Von ihnen ist vornehmlich der Transkriptionsfaktor Pou4f2 für die Entwicklung der Retina und die Differenzierung retinaler Ganglienzellen erforderlich. Embryonale und adulte Mäuse mit gezielter homozygoter Inaktivierung von *Pou4f2* zeigten einen selektiven Verlust von ca. 70% der retinalen Ganglienzellen, einen reduzierten Sehnervendurchmesser, eine erhöhte Apoptoserate in der Ganglienzellschicht und Störungen der retinokollikulären Projektion von Ganglienzellaxonen (Erkman et al., 1996, 2000; Gan et al., 1996, 1999; Wang et al., 2000; Xiang, 1998). Da der retinale Phänotyp *Wt1*-defizienter Embryonen Ähnlichkeit mit dem Netzhautdefekt bei Mäusen mit inaktiviertem *Pou4f2* Gen aufweist, wurde untersucht, ob *Wt1* für die Expression von Pou4f2 in der embryonalen Netzhaut erforderlich ist. Dazu wurden Immunfärbungen für Pou4f1, Pou4f2 und Pou4f3 an den Retinae von jeweils 5 Wildtyp (*Wt1*^{+/+})-Mäusen und *Wt1*^{-/-} Embryonen (Stamm MF1×B6) zum Entwicklungszeitpunkt E18 durchgeführt.

Pou4f1, Pou4f2 und Pou4f3 waren immunhistologisch in den Zellkernen retinaler Ganglienzellen von E18 Wildtyp-Mäusen nachweisbar (*Abb. 8A-C*). In den Retinae *Wt1*-defizienter Mäuse war Pou4f2 Protein weder zum Zeitpunkt E18 (*Abb. 8E*) noch während früherer Entwicklungsstadien immunhistologisch nachweisbar. Dagegen blieben Pou4f1 und Pou4f3 in den *Wt1*^{-/-} Retinae detektierbar (*Abb. 8D bzw. F*). Die Retinae von *Wt1*^{+/+} und *Wt1*^{+/-} E18 Mäusen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Expression von Pou4f1, Pou4f2 und Pou4f3.

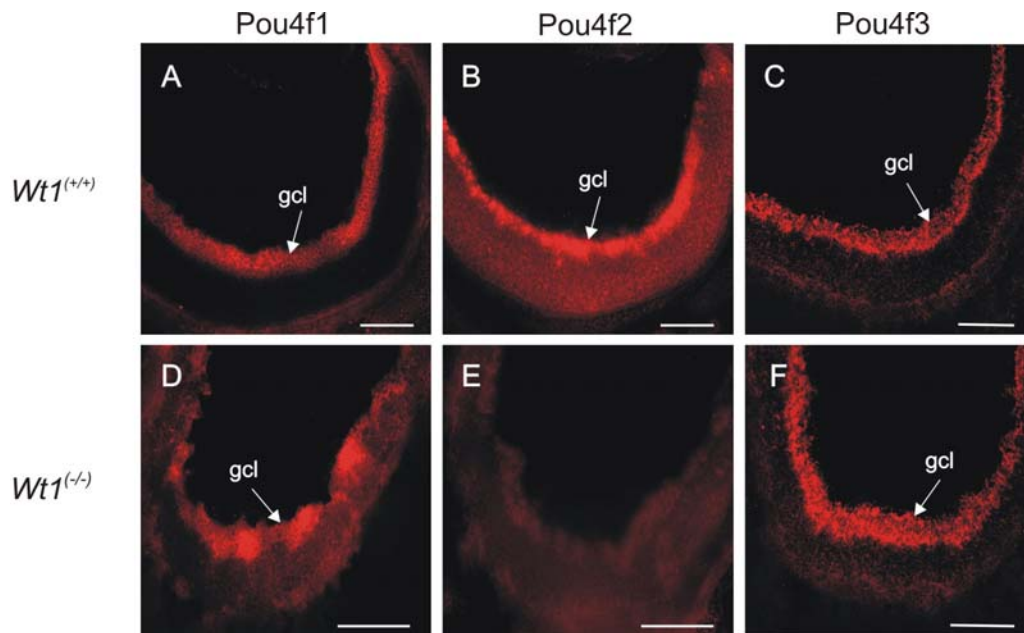


Abb. 8: Immunfärbungen für Pou4f1 (A, D), Pou4f2 (B, E) und Pou4f3 (C, F) in $Wt1^{+/+}$ (A-C) und $Wt1^{-/-}$ (D-F) Retinae (Mausstamm MF1×B6) zum Zeitpunkt E18. (A-C) In den Wildtyp ($Wt1^{+/+}$) Retinae wurden Pou4f1 (A), Pou4f2 (B) und Pou4f3 (C) Protein in den unreifen Ganglienzellen (gcl) exprimiert. (D-F) In den Retinae von $Wt1^{-/-}$ Embryonen waren Pou4f1 (D) und Pou4f3 (F) in den Ganglienzellen (gcl) nachweisbar, Pou4f2 (E) konnte hingegen nicht detektiert werden. Maßstab 100 μm .

Um diese Befunde auf mRNA Ebene zu bestätigen, wurden die Augen von jeweils fünf E18 Mausembryonen vom Wildtyp und mit homozygot inaktiviertem *Wt1* Gen präpariert, aus ihnen Gesamt-RNA extrahiert und nach reverser Transkription mit für *Pou4f1*, *Pou4f2* und *Pou4f3* spezifischen Primern in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Zur semiquantitativen Beurteilung der eingesetzten mRNA Menge erfolgte die Normalisierung gegen das Housekeeping-Gen β -Aktin. Die amplifizierten DNA Fragmente waren 274 bp (*Pou4f1*), 300 bp (*Pou4f2*), 229 bp (*Pou4f3*) und 624 bp (β -Aktin) lang. Entsprechend der Ergebnisse bei den Immunfärbungen war *Pou4f2* mRNA bei $Wt1^{-/-}$ Mäusen im Unterschied zu $Wt1^{+/+}$ Embryonen nicht nachzuweisen (Abb. 9B), während *Pou4f1* und *Pou4f3* Transkripte bei den Knockout-Mäusen detektierbar blieben (Abb. 9A bzw. C).

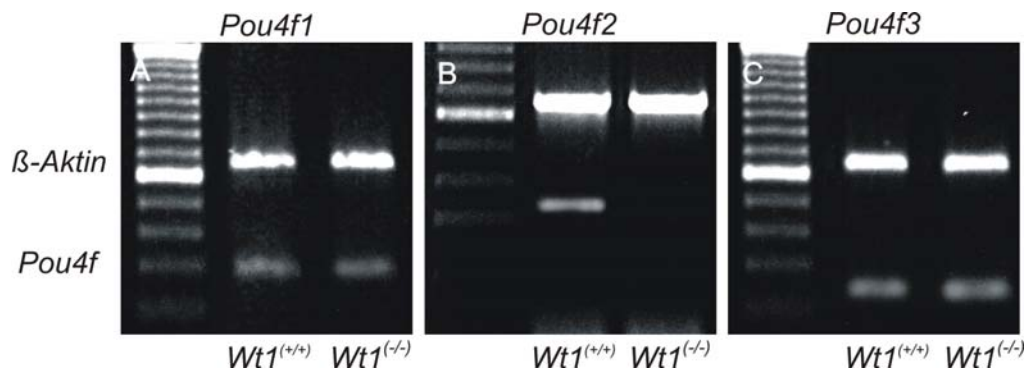


Abb. 9: RT-PCR Nachweis von *Pou4f1* (A), *Pou4f2* (B) und *Pou4f3* mRNA (C) in RNA Extrakten aus den Augen von *Wt1*^{+/+} und *Wt1*^{-/-} Mäusen (Stamm MF1×B6) zum Zeitpunkt E18. *Pou4f2* mRNA (B) war bei *Wt1*^{-/-} Mäusen nicht nachzuweisen. Bei der *Pou4f1* (A) und *Pou4f3* (C) mRNA Expression zeigte sich kein Unterschied zwischen *Wt1*^{+/+} und *Wt1*^{-/-} Embryonen.

Diese Resultate zeigen, dass der POU-Domänen-Transkriptionsfaktor Pou4f2 in den Retinae *Wt1*-defizienter Mäuse offenbar nicht exprimiert wird. Da Pou4f1 und Pou4f3 in den *Wt1*^{-/-} Retinae ohne signifikante Veränderungen vorkommen, ist die fehlende Pou4f2 Expression nicht ausschließlich auf den Verlust retinaler Ganglienzellen in den *Wt1* Knockout Mäusen zurückzuführen, sondern kann als Ausdruck einer spezifischen Dysregulation gewertet werden. Die bislang dargestellten Ergebnisse sprechen somit dafür, dass *Wt1* für die normale Expression von Pou4f2 in der embryonalen Retina notwendig ist.

3.7 *Wt1* und Pou4f2 sind in der embryonalen Retina kolokalisiert

Um zu untersuchen, ob *Wt1* und Pou4f2 in der Retina ein überlappendes Expressionsmuster zeigen, wurden Immundoppelfärbungen für *Wt1* und Pou4f2 an Schnittpräparaten der Retinae von Wildtyp (*Wt1*^{+/+})- und Knockout (*Wt1*^{-/-})- Embryonen (Stamm MF1×B6; jeweils n=5) zum Entwicklungszeitpunkt E18 durchgeführt. *Wt1*-positive Zellen wurden mit einem Cy2-konjugierten (grün fluoreszierenden) und Pou4f2-positive Zellen mit einem Cy3-gekoppelten (rot fluoreszierenden) Sekundärantikörper dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt.

Wt1 und Pou4f2 Protein waren immunhistologisch in retinalen Ganglienzellen von Wildtyp-Mäusen am 18. Embryonaltag (E18) nachweisbar (Abb. 10A bzw. 10B). Die nukleäre Kolokalisation beider Proteine war an der intensiven Gelbfluoreszenz bei der Überlagerung der Signale für *Wt1* und Pou4f2 erkennbar (Abb. 10C). In der Netzhaut von Mausembryonen mit inaktiviertem *Wt1* Gen wurde weder *Wt1* noch insbesondere Pou4f2 nachgewiesen (Abb. 10D).

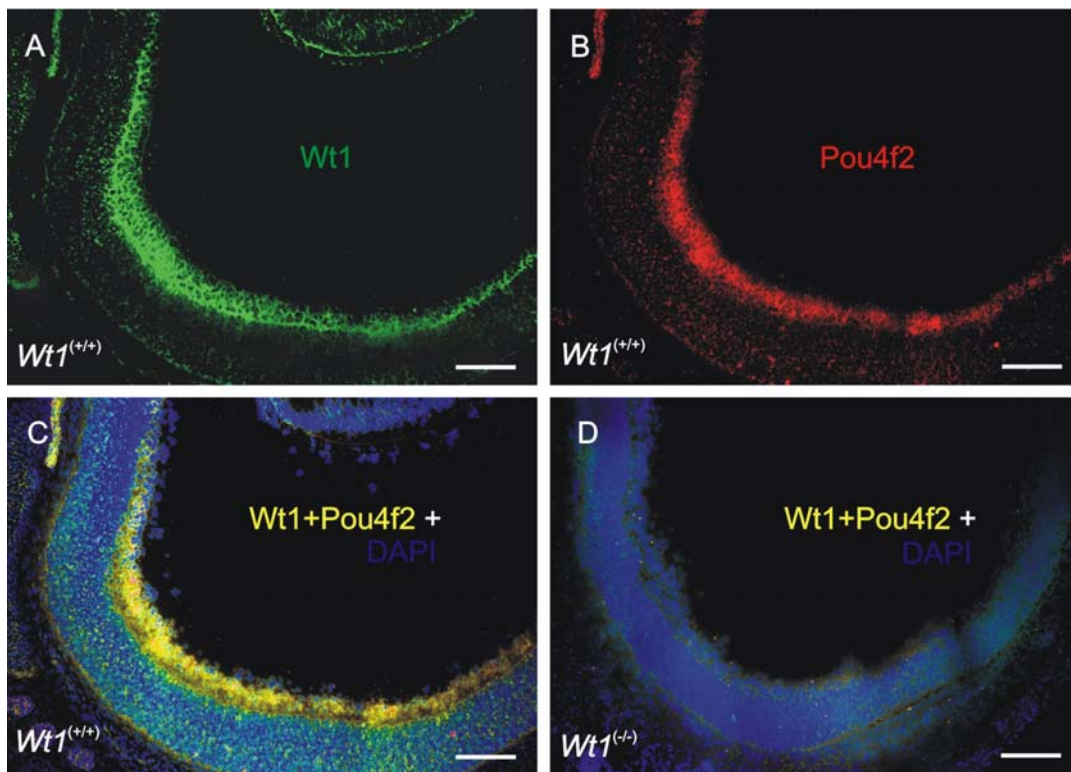


Abb. 10: Immunhistologischer Nachweis von Wt1 und Pou4f2 in der Retina von $Wt1^{+/+}$ (A-C) und $Wt1^{-/-}$ (D) Mausembryonen (Stamm MF1×B6) zum Zeitpunkt E18. (A) Wt1 (grüne Fluoreszenz) und (B) Pou4f2 (rot) waren in den Zellkernen retinaler Ganglienzellen von Wildtyp-Mäusen nachweisbar. (C) Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale (gelb) zeigte deutlich die nukleäre Koexpression beider Proteine. (D) In den $Wt1^{-/-}$ Retinae war weder Wt1 noch Pou4f2 Immunreaktivität nachweisbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (C, D). Maßstab 100 μ m

3.8 Transgene Expression des humanen *WT1* Gens in $Wt1^{-/-}$ Mausembryonen bewirkt eine partielle Wiederherstellung des retinalen Phänotyps

Moore et al. (1999) erzeugten eine transgene Mauslinie durch pronukleäre Injektion eines künstlichen Hefechromosoms (YAC) als Vektor für 280 kb des humanen *WT1* Gens (*WT280* YAC). Die bei *Wt1*-defizienten Embryonen normalerweise zu beobachtenden Epikard- und Zwerchfeldefekte waren bei den $Wt1^{-/-}; WT280^{+/-}$ transgenen Tieren vollständig, die Anomalien des Urogenitalsystem und der Nebennieren partiell kompensiert. Die transgenen Mäuse überlebten bis zu 48 Stunden nach der Geburt (P2) (Moore et al., 1999). An dieser transgenen Mauslinie wurde überprüft, ob der retinale Phänotyp und Expressionsverlust von Pou4f2 bei den $Wt1^{-/-}$ Mäusen kausal durch die Abwesenheit von *Wt1* verursacht waren und durch YAC basierte transgene *WT280* Expression revertiert werden konnten. Dazu wurden, wie bereits zuvor für die Wildtyp ($Wt1^{+/+}$)- und $Wt1^{-/-}$ Mäuse, am 18. Embryonaltag (E18) HE-Färbungen und Immun-

färbungen für Pou4f2 und das Neurofilament (NF) 200 an retinalen Schnittpräparaten transgener Mäuse (n=5) durchgeführt und beurteilt.

In den HE-Färbungen wiesen die Retinae *WT280* YAC transgener Mausembryonen (*Abb. 11G*) im Vergleich zu den *Wt1*^{-/-} Embryonen (*Abb. 11D*) keine auffälligen histomorphologischen Unterschiede auf. Der Defekt des Sehnerven von *Wt1*^{-/-} Mäusen (*Abb. 11F*) war in der Immunfärbung für NF200 bei den *WT280* YAC transgenen Mäusen (*Abb. 11J*) nicht nachweisbar. Die Immunfärbung für Pou4f2 zeigte, dass Pou4f2 bei den *WT280* YAC transgenen Mäusen (*Abb. 11H*) im Unterschied zu den *Wt1*^{-/-} Mäusen (*Abb. 11E*) in den Ganglienzellen der Retina exprimiert wurde. Die Befunde bei Mäusen mit YAC transgener Expression des humanen *WT1* Gens (*WT280* YAC) (*Abb. 11G-J*) und bei Wildtyp-Mäusen (*Abb. 11A-C*) waren in den HE-Färbungen (*Abb. 11G bzw. 11A*) sowie den Immunfärbungen für Pou4f2 (*Abb. 11H bzw. 11B*) und NF200 (*Abb. 11J bzw. 11C*) größtenteils vergleichbar.

Die weitgehende Wiederherstellung der Retinamorphologie *WT280* YAC transgener Embryonen zeigte sich auch in der geringen Zahl apoptotischer (TUNEL-positiver) Zellen zum Entwicklungszeitpunkt E18 (*Abb. 7A*), die sich von altersentsprechenden Wildtyp-Mäusen nicht signifikant unterschied.

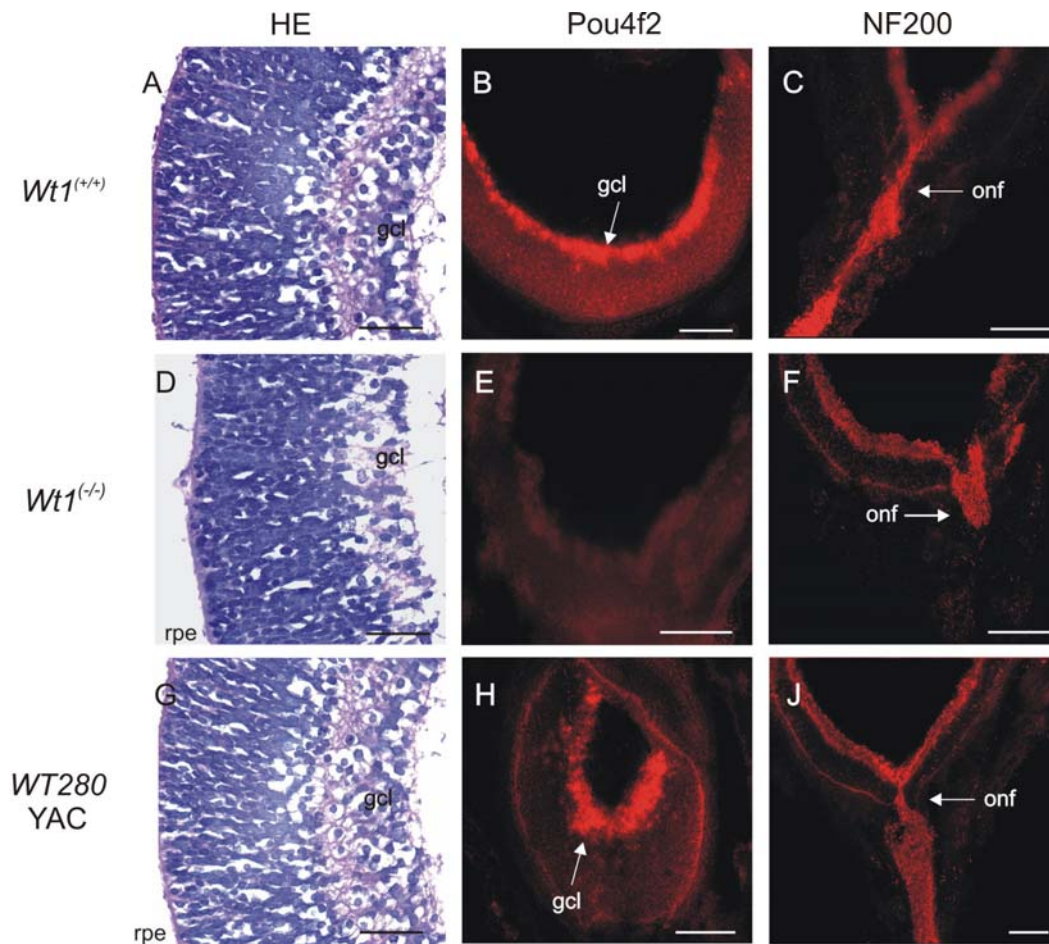


Abb. 11: HE-Färbungen (A, D, G) sowie Immunfärbungen für Pou4f2 (B, E, H) und Neurofilament (NF) 200 (C, F, J) der Netzhäute von *Wt1*^{+/+} (A-C), *Wt1*^{-/-} (D-F) und *WT280* YAC transgenen Mäusen (G-J) zum Zeitpunkt E18. Es zeigte sich die partielle Wiederherstellung der normalen Netzhautmorphologie durch transgene Expression des humanen *WT1* Gens als YAC Konstrukt in *Wt1*-defizienten Mausembryonen. Die Ganglienzellschicht (gcl) der *WT280* YAC transgenen Mäuse war im Vergleich zu den Wildtypen normal ausgebildet (G vs. A), der Ganglienzellmarker Pou4f2 nachweisbar (H vs. B) und das Wachstum der Sehnervenfasern (onf) wiederhergestellt (J vs. C). *Wt1*^{-/-} spezifische retinale Defekte waren nicht nachweisbar (D-F). Retinales Pigmentepithel (rpe), Maßstab 50 µm (A, D, G), 100 µm (B, E, H), 200 µm (C, F, J).

3.9 *Wt1* und *Pou4f2* sind auch in nicht-neuronalen Geweben kolokalisiert

Pou4f2 wird hauptsächlich in postmitotischen neuronalen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert. Es wurde aber auch in nicht-neuronalen Zellen, z. B. von Mammae, Testes, Ovarien und Uterus nachgewiesen (Budhram-Mahadeo et al., 2001). *Wt1* wird hauptsächlich in epithelialen Geweben mesodermaler Herkunft exprimiert, wie z. B. in Nieren und Gonaden sowie im die Leibeshöhle auskleidenden und die viszerale Organe umgebenden Mesothel. In entodermalen Organen konnte dagegen bislang keine *WT1* Expression gezeigt werden.

Um den Zusammenhang von Wt1 und Pou4f2 zu bestätigen, wurde untersucht, ob beide Proteine auch in nicht-neuronalen Geweben eine ähnliche zelluläre Verteilung aufweisen. An Schnittpräparaten verschiedener Organe adulter Wildtyp-Mäuse (Stamm MF1×B6; n=5) wurden Doppelimmunfärbungen von Wt1 und Pou4f2 durchgeführt. Wt1-positive Zellen wurden mit einem Cy2-konjugierten (grün fluoreszierenden) und Pou4f2-positive Zellen mit einem Cy3-gekoppelten (rot fluoreszierenden) Sekundärantikörper visualisiert. Die Kolo-kalisation beider Proteine zeigte sich an der gelben Fluoreszenz nach Überlagerung beider Signale. Zusätzlich erfolgte der Nachweis von *Pou4f2* mRNA in diesen Organen mittels nicht-radioaktiver mRNA *in situ* Hybridisierung unter Verwendung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden, und *Pou4f2* Transkript wurde durch eine enzymatische Farbstoffreaktion (blau) detektiert. Repräsentative Immunfärbungen und RNA *in situ* Hybridisierungen sind in den Abbildungen 12 bis 14 gezeigt. In der adulten Niere wird Wt1 ausschließlich in den glomerulären Podozyten exprimiert (Mundlos et al., 1993). Entsprechend wurden Wt1 und insbesondere auch Pou4f2 Protein immunhistologisch in den Podozyten der Glomeruli nachgewiesen (Abb. 13A-D). Die intensive Gelbfluoreszenz nach Überlagerung der Signale für Wt1 (Abb. 13B) und Pou4f2 (Abb. 13C) dokumentierte eindeutig die nukleäre Kolo-kalisation beider Proteine (Abb. 13D). Die Abbildungen 13B-D stellen Ausschnittsvergrößerungen eines Nierenglomerulus in Abbildung 13A dar. Vereinbar mit der Expression von Pou4f2 Protein wurde auch *Pou4f2* Transkript in den glomerulären Podozyten nachgewiesen (Abb. 13E). In RNA Extrakten embryonaler (E18) Nieren von *Wt1*^{-/-} Mäusen konnte *Pou4f2* mittels RT-PCR nicht amplifiziert werden.

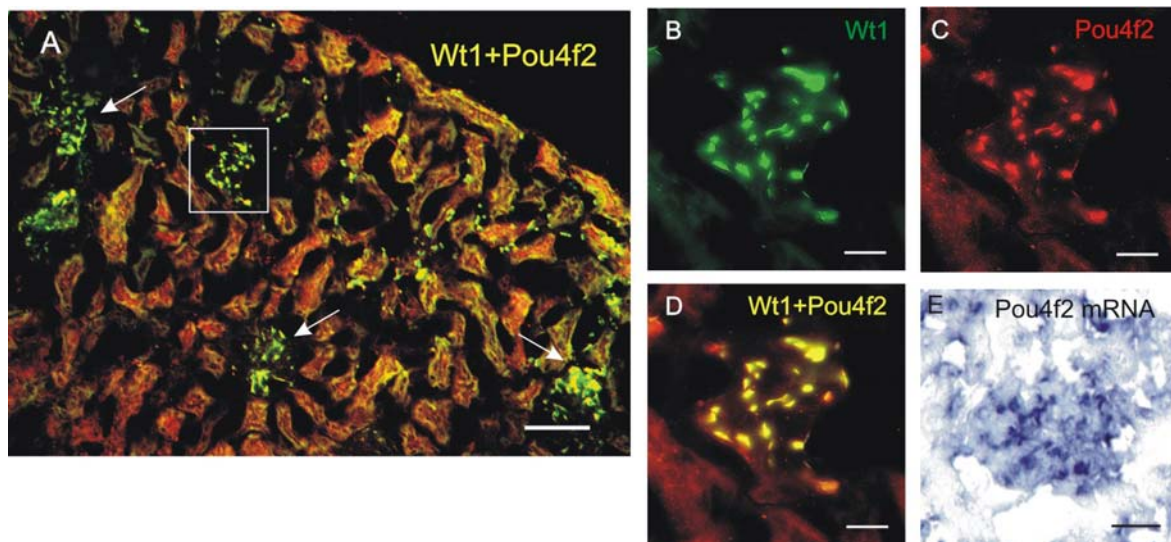


Abb. 12: Nachweis von Wt1 und Pou4f2 Protein mittels Immundoppelfärbungen (A-D) sowie von *Pou4f2* mRNA mittels *in situ* Hybridisierung (E) in der Niere adulter Wildtyp-Mäuse. (B-D) sind Ausschnittsvergrößerungen eines Glomerulus (Quadrat) in (A). (B) Wt1 (grün) und (C) Pou4f2 (rot)

waren in den Podozyten der Glomeruli nachweisbar. (D) Die nukleäre Kolokalisation beider Proteine war nach Überlagerung der Fluoreszenzsignale an der Gelbemission erkennbar. (E) Auch die Expression von *Pou4f2* mRNA war in den glomerulären Podozyten nachweisbar. Maßstab 100 μm (A) und 10 μm (C-E).

In ähnlicher Weise wurden Wt1 und Pou4f2 Protein sowie ihre Kolokalisation im Epithel von Gallenblase (Abb. 14A-D) und Magen (Abb. 15A-D) adulter Wildtyp-Mäuse immunhistologisch nachgewiesen. Dieser Befund wurde durch den Nachweis von *Pou4f2* mRNA in der Gallenblasen- und Magenschleimhaut (Abb. 14E bzw. 15E) bestätigt.

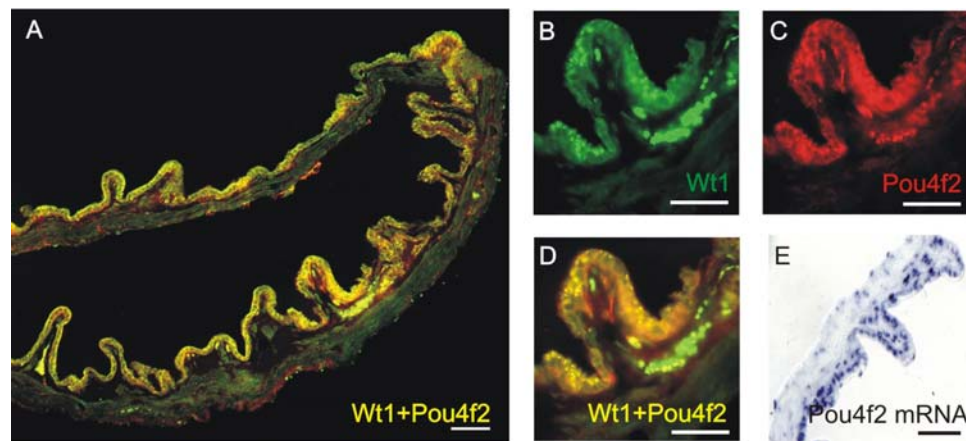


Abb. 13: Doppelimmunfärbungen für Wt1 und Pou4f2 und *in situ* Hybridisierung von *Pou4f2* mRNA in der Gallenblase von adulten Wildtyp-Mäusen. (B-D) zeigen Ausschnittsvergrößerungen der Gallenblasenschleimhaut in (A). (B) Wt1 (grün) und (C) Pou4f2 (rot) wurden im Epithel der Gallenblase exprimiert und (D) waren in den Epithelzellen nukleär kolokalisiert (gelb). (E) *Pou4f2* mRNA war in den Epithelzellen ebenfalls nachweisbar. Maßstab 400 μm (A), 250 μm (B-D), 300 μm (E).

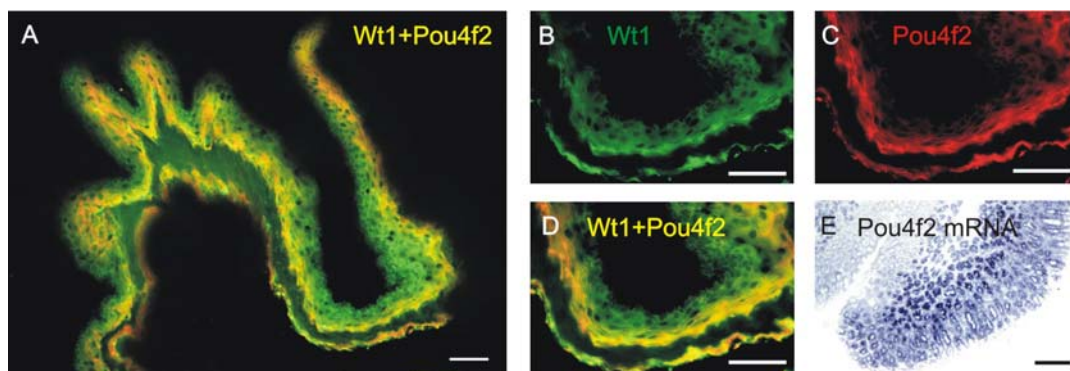


Abb. 14: Immunhistologischer Nachweis von Wt1 und Pou4f2 Protein (A-D) sowie *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von *Pou4f2* mRNA (E) im Magen adulter Wildtyp-Mäuse. (B-D) zeigen einen Ausschnitt der Magenschleimhaut in (A). Nach Überlagerung der Fluoreszenzsignale für (B) Wt1 (grün) und (C) Pou4f2 (rot) war die (D) nukleäre Kolokalisation in den Epithelzellen der Magenmukosa (gelb) erkennbar. (E) *Pou4f2* Transkript wurde in den Magenepithelzellen ebenfalls exprimiert. Maßstab 40 μm (A-D) und 50 μm (E).

Diese Befunde dokumentieren, dass *Wt1* und *Pou4f2* nicht nur in der embryonalen Neuroretina, sondern auch in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben kolokalisiert sind. Das Fehlen von *Pou4f2* in der Retina *Wt1*-defizienter Mausembryonen legt die Vermutung nahe, dass ein regulatorischer Zusammenhang zwischen *Wt1* und *Pou4f2* besteht.

3.10 Die *Wt1*(-KTS) Isoform aktiviert die *Pou4f2* Expression in kultivierten Zellen

Unter Anwendung molekular- und zellbiologischer Techniken wurde die Möglichkeit einer Regulation von *Pou4f2* durch *Wt1* überprüft. Zunächst wurde untersucht, ob die forcierte Expression von *Wt1* das endogene *Pou4f2* Gen in kultivierten Zellen aktiviert. Mangels einer *Wt1* exprimierenden Zelllinie aus der neuronalen Retina wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK) 293 mit *Wt1*(-KTS) Expressionskonstrukten (Buckler et al., 1991) sowie mit nicht-rekombinantem („leerem“) pCB6⁺ Vektor stabil transfiziert. Die *Wt1*(-KTS) Isoformen sind als Transkriptionsfaktoren wirksam, während die *Wt1*(+KTS) Spleißvarianten, die drei zusätzliche Aminosäuren (Lysin, Threonin, Serin; KTS) in der Zinkfingerdomäne enthalten, vermutlich eine Rolle bei der post-transkriptionalen mRNA Prozessierung spielen (vgl. 1.3). Zusätzlich wurde eine humane Osteosarkomzelllinie (U2OS) mit induzierbarer Expression von *Wt1*(-KTS) untersucht. Der Klon UB27 exprimiert *Wt1*(-KTS) unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-reprimierbaren Promotors (Englert et al., 1995b). Die Proteinexpression wurde mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung polyklonaler anti-WT1 und anti-*Pou4f2* Antikörper an jeweils 5 unabhängigen Klonen *Wt1*(-KTS)- und pCB6⁺-transfizierter HEK 293 Zellen sowie an jeweils 5 Klonen induzierter und nicht-stimulierter UB27 Zellen bestimmt. Zur Quantifizierung der *Pou4f2* Expression auf mRNA Ebene wurde eine LightCycler Real-Time RT-PCR an je 4 Klonen *Wt1*(-KTS)- und pCB6⁺-transfizierter HEK 293 Zellen durchgeführt.

In mit Leervektor (pCB6⁺) transfizierten HEK 293 Zellen (HEK293-pCB6⁺) war weder endogenes WT1 noch POU4F2 im Western-Blot nachweisbar (*Abb. 15A*). Im Gegensatz dazu waren in HEK 293 Zellen mit forcierter *Wt1*(-KTS) Expression (HEK293-*Wt1*) WT1 und POU4F2 Protein vorhanden (*Abb. 15A*). Äquivalente Proteinmengen wurden durch ein vergleichbares Expressionsniveau von β -Aktin in *Wt1*(-KTS) und pCB6⁺ transfizierten Zellen repräsentiert (*Abb. 15A*). Eine Zunahme von POU4F2 Protein wurde auch in UB27 Zellen nach Induktion der *Wt1*(-KTS) Expression durch Inkubation in tetrazyklinfreiem Kulturmedium (UB27-tet) festgestellt (*Abb. 15A*). Mittels Densitometrie wurde ein ca. 4-facher Anstieg der endogenen POU4F2 Expression in induzierten UB27 Zellen nachgewiesen. Diese Befunde konnten auf mRNA Ebene mittels LightCycler Real-Time RT-PCR bestätigt werden. In *Wt1*-transfizierten HEK 293 Zellen (HEK293-*Wt1*) war die auf *GAPDH* normalisierte *POU4F2*

mRNA Menge durchschnittlich 8-mal größer als in pCB6⁺-transfizierten HEK 293 Zellen (HEK293-pCB6⁺) ($P < 0,01$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test) (Abb. 15B). Diese Ergebnisse zeigen, dass das zelluläre Expressionsniveau von WT1 und Pou4f2 eng korreliert. Pou4f2 könnte somit ein neues Zielgen des Transkriptionsfaktors Wt1 sein.

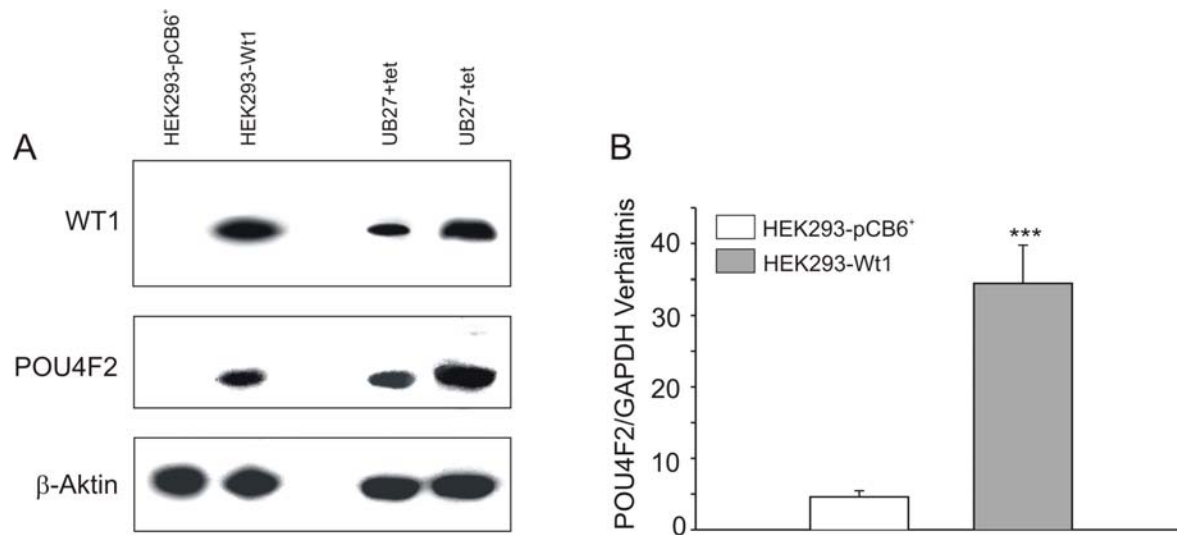


Abb. 15: (A) Nachweis von WT1, POU4F2 und β -Aktin mittels Western-Blot in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) 293 und humanen Osteosarkomzellen (U2OS). HEK 293 Zellen wurden stabil mit Wt1(-KTS) Expressionskonstrukten (HEK293-Wt1) oder „leerem“ pCB6⁺ Vektor (HEK293-pCB6⁺) transfiziert. U2OS Zellen (Klon UB27) wurden zur Induktion der Wt1 Expression in Abwesenheit von Tetrazyklin (UB27-tet) kultiviert. In HEK293-pCB6⁺ Zellen war POU4F2 nicht nachweisbar. Wt1 transfizierte Zellen (HEK293-Wt1) enthielten dagegen signifikante Mengen POU4F2. Die POU4F2 Expression war in stimulierten UB27 Zellen ohne Tetrazyklin (UB27-tet) im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen (UB27+tet) ca. 4-fach erhöht. Bei der β -Aktin Expression waren keine Unterschiede feststellbar.

(B) Quantifizierung von *POU4F2* mRNA mittels LightCycler Real-Time RT-PCR in stabil mit Wt1(-KTS) Expressionskonstrukten (HEK293-Wt1) oder leerem pCB6⁺ Vektor (HEK293-pCB6⁺) transfizierten HEK 293 Zellen. *POU4F2* Transkripte wurden gegen *GAPDH* mRNA normalisiert. In *Wt1*-exprimierenden HEK 293 Zellen ist im Vergleich zu den pCB6⁺ transfizierten Zellen eine ca. 8-mal höhere *POU4F2* mRNA Expression nachweisbar. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 4 verschiedenen Zellklonen. *** bezeichnet $P < 0,01$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test.

3.11 Die Wt1(-KTS) Isoform aktiviert den *Pou4f2* Promotor

In weiteren Experimenten sollte der Mechanismus der POU4F2 Regulation durch Wt1(-KTS) näher untersucht werden. Es wurde überprüft, ob der humane *POU4F2* Promotor durch Wt1(-KTS) direkt aktivierbar ist. Dazu wurde die 5' regulatorische Sequenz des humanen *POU4F2* Gens aus einem künstlichen Bakterienchromosom (BAC) isoliert und ein 3852 bp langer Abschnitt mit dem Promotor von *POU4F2* in die *XhoI* Restriktionsstelle des pGL2-Basic Reporterplasmids ligiert. Dieses Konstrukt wurde *pPOU4F2*₃₈₅₂ genannt. Der Einfluss von Wt1

Protein auf die Aktivität des *POU4F2* Promotors wurde mittels Luziferase-Assay nach transienter Kotransfektion in humane Osteosarkomzellen U2OS untersucht. Dazu wurde das Reporterkonstrukt *pPOU4F2*₃₈₅₂ zusammen mit pCB6⁺ Expressionsvektoren für Wt1(-KTS) und Wt1(+KTS) (Buckler et al., 1991) mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transient in U2OS Osteosarkomzellen transfiziert. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurde zusätzlich ein Expressionskonstrukt für β -Galaktosidase unter Kontrolle eines Zytomegalievirus (CMV)-Promotors kotransfiziert. Die Zelllinie U2OS wurde bereits zuvor von anderen Untersuchern zur Identifizierung von Wt1 Zielgenen verwendet und war in eigenen Voruntersuchungen effizienter transfizierbar als humane embryonale Nierenzellen (HEK) 293. Die transfizierten U2OS Zellen wurden 48 h lang kultiviert. Anschließend wurden in Zelllysaten von je 7 unabhängigen Zellklonen die gegen β -Galaktosidase normalisierten Luziferaseaktivitäten des *POU4F2* Reporterkonstrukts bestimmt. Als Negativkontrollen erfolgten Transfektionen mit „leerem“ pCB6⁺ Vektor anstelle der Wt1 Expressionskonstrukte.

Die Transfektion mit Wt1(+KTS) Expressionskonstrukten bewirkte keine signifikante Änderung der basalen Luziferaseaktivität des Reporterkonstrukts *pPOU4F2*₃₈₅₂ (Abb. 16A). Dagegen nahm die Luziferaseaktivität des Reporterkonstrukts *pPOU4F2*₃₈₅₂ bei Kotransfektion mit Wt1(-KTS) Expressionskonstrukten um ca. das 4-fache zu (Abb. 16A) ($P < 0,05$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test).

Um das Bindungselement für Wt1 im *POU4F2* Promotor zu identifizieren, wurde das *POU4F2*₃₈₅₂ Promotor-Reporterkonstrukt durch Restriktionsverdau an seinem 5' Ende sukzessive verkürzt. Der Verdau mit den Restriktionsenzymen *XmnI*, *StuI* bzw. *NdeI* erzeugte 2893 bp (*pPOU4F2*₂₈₉₃), 1987 bp (*pPOU4F2*₁₉₈₇) bzw. 1485 bp (*pPOU4F2*₁₄₈₅) lange Promotor-Reporterkonstrukte. Diese Vektoren wurden mit Expressionskonstrukten für Wt1(-KTS) und β -Galaktosidase transient in Osteosarkomzellen U2OS transfiziert. Nach 48 h wurde in Zelllysaten von je 5 unabhängigen Zellklonen die relative Luziferaseaktivität der *POU4F2* Reporterkonstrukte bestimmt. Als Negativkontrollen erfolgten Transfektionen mit nicht-rekombinantem pCB6⁺ Vektor anstelle des Wt1(-KTS) Expressionskonstrukts.

Wt1(-KTS) aktivierte die 3852 bp lange Sequenz aus der 5' regulatorischen Region des humanen *POU4F2* Gens (*pPOU4F2*₃₈₅₂) um das 3- bis 4-fache (Abb. 16B). Auch die 2893 bp (*pPOU4F2*₂₈₉₃) und 1987 bp Fragmente (*pPOU4F2*₁₉₈₇) wurden durch Wt1(-KTS) signifikant stimuliert (Abb. 16B) ($P < 0,05$; ANOVA mit Bonferroni-Test als post-hoc Test). Weitere Verkürzung des *POU4F2* Promotors auf 1485 bp 5' vom Transkriptionsstartpunkt im *POU4F2* Gen (*pPOU4F2*₁₄₈₅) resultierte dann in einem Verlust der Induzierbarkeit des Reporterkonstrukts durch Wt1(-KTS) (Abb. 16B). Somit konnte der Wt1-sensitive Bereich im *POU4F2* Promotor

auf einen Abschnitt zwischen -1485 bp und -1987 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt eingegrenzt werden. Die Sequenzanalyse ergab in diesem 502 bp Bereich zwei GC-reiche Elemente, von denen die näher zum Transkriptionsstartpunkt gelegene 5'-CGAGGGTGTG-3' Sequenz Homologie mit der hoch affinen WT1 Konsensusbindungsstelle (WTE) 5'-CGTGGG(A/T)G-3' aufwies (Nakagama et al., 1995). Aus dem ca. 2,9 kb Promotor-Reporterkonstrukt *pPOU4F2*₂₈₉₃ wurde eine 24 bp Nukleotidsequenz, welche die vermutete Wt1 Bindungsstelle 5'-CGAGGGTGTG-3' enthielt, mittels PCR-Mutagenese deletiert. Das resultierende Promotor-Reporterkonstrukt *pPOU4F2*_{ΔWRE} war durch Wt1(-KTS) bei transienter Kotransfektion nicht stimulierbar (Abb. 16B). Somit wurde das cis-regulatorische Element für die Aktivierung des *POU4F2* Promotors durch Wt1(-KTS) identifiziert.

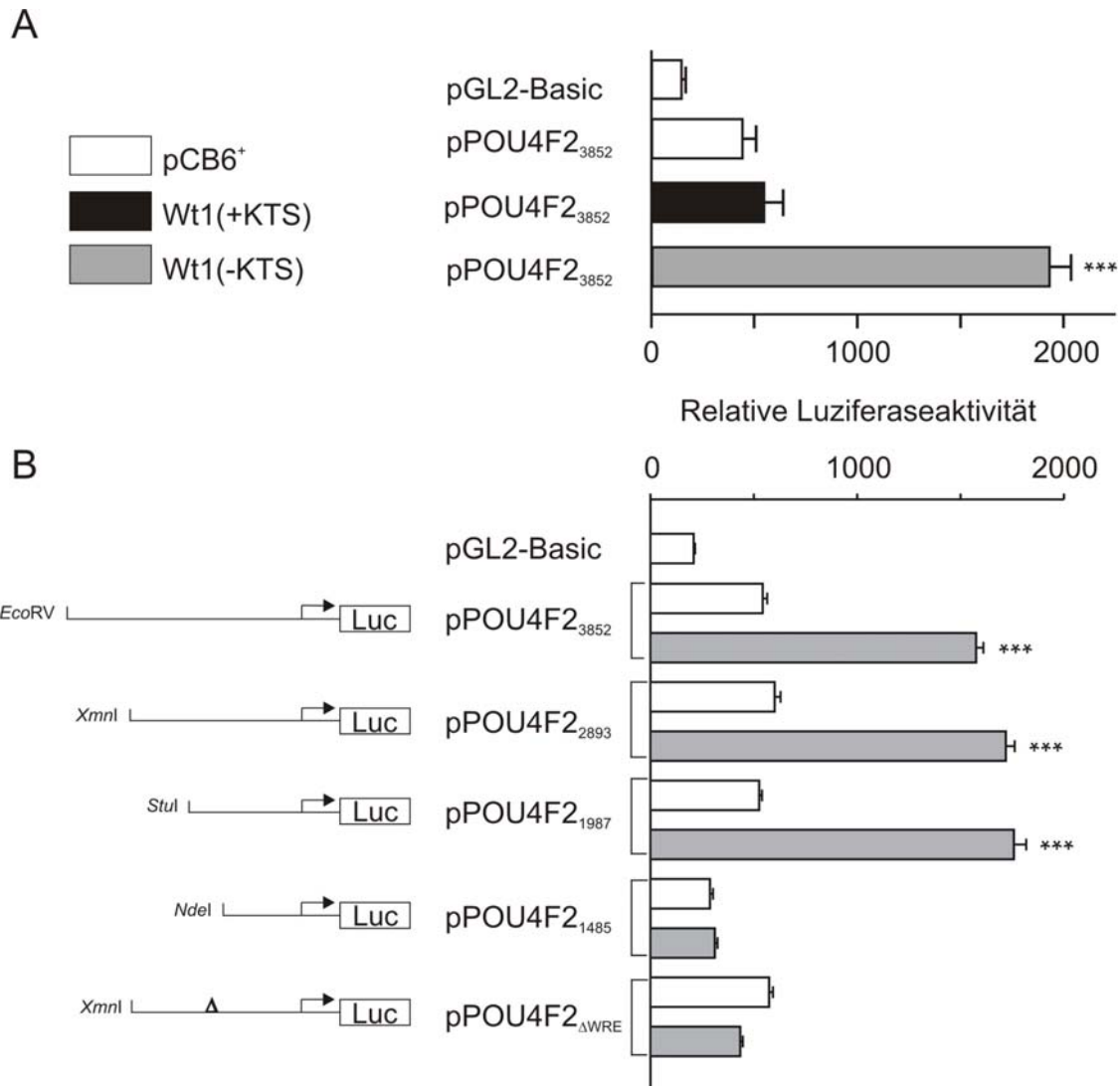


Abb. 16: (A) Transaktivierung des putativen *POU4F2* Promotors durch WT1(-KTS). Ein ca. 3,8 kb langes *EcoRV/XhoI* Fragment aus der 5'-regulatorischen Region des humanen *POU4F2* Gens wurde in das

pGL2-Basic Reporterplasmid kloniert. Das Promotor-Reporterkonstrukt *pPOU4F2*₃₈₅₂ wurde zusammen mit pCB6⁺ Expressionsvektoren für Wt1(-KTS) und Wt1(+KTS) transient in humane Osteosarkomzellen U2OS transfiziert. Die Aktivität des Luziferase-Reportergens wurde gegen β -Galaktosidase normalisiert. Das *pPOU4F2*₃₈₅₂ Promotor-Reporterkonstrukt wurde durch die Wt1(-KTS) Isoform 4-fach stimuliert, während Wt1(+KTS) keinen signifikanten Effekt hatte. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von jeweils 7 verschiedenen Zellklonen. *** bezeichnet $P < 0,05$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test.

(B) Auch ein ca. 2,9 kb (*pPOU4F2*₂₈₉₃) und ca. 2,0 kb (*pPOU4F2*₁₉₈₇) langes *POU4F2* Promotor-Reporterkonstrukt waren durch die Wt1(-KTS) Spleißvariante signifikant aktivierbar. Deletion einer 502 bp Sequenz (*pPOU4F2*₁₄₈₅ vs. *pPOU4F2*₁₉₈₇) verhinderte die Transaktivierung des *POU4F2* Promotors durch Wt1. Innerhalb dieser Sequenz resultierte Entfernen eines 24 bp Fragments, welches das Wt1(-KTS) Bindungselement 5'-CGAGGGTGTG-3' enthielt (*pPOU4F2* _{Δ WRE}), in einem Verlust der Wt1 Induzierbarkeit. Angegeben sind relative Luziferaseaktivitäten als Mittelwerte \pm SEM von jeweils 5 verschiedenen Zellklonen. *** bezeichnet $P < 0,05$; ANOVA mit Bonferroni als post-hoc Test.

Mittels Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassay (EMSA) wurde die Spezifität der Wt1(-KTS) Bindung an das identifizierte cis-Element im *POU4F2* Promotor untersucht. Dazu wurde rekombinantes Wt1(-KTS) Protein mit einem Retikulozytenlysatsystem *in vitro* translatiert und mit einem P³²-radioaktiv markierten, doppelsträngigen 22 bp Oligonukleotid *POU4F2*₂₂ (5'-CAGCCCCCGAGGGTGTGTGTGT-3'), das die potenzielle Wt1-Bindungsstelle im humanen *POU4F2* Promotor enthielt, inkubiert. Nach Elektrophorese in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel zeigten sich beim Reaktionsansatz von Wt1(-KTS) und *POU4F2*₂₂ in der Autoradiographie 2 Banden, die durch Interaktion mit rekombinanten Wt1(-KTS) Proteinen unterschiedlicher Größe oder Bildung von Wt1 Dimeren bedingt sein können (Abb. 17). Die Sequenzspezifität der Interaktion von Wt1(-KTS) und *POU4F2*₂₂ wurde durch eine nicht-markierte, 21 bp Doppelstrang-Oligonukleotidsequenz (5'-TGAACCTAGTGGGCGTGGTTG-3') mit der Wt1-Bindungsstelle aus dem Promotor des Vitamin D Rezeptors der Maus überprüft (Wagner et al., 2001). Ansteigende Mengen (10- bis 250-facher molarer Überschuss) dieses Kompetitors verdrängten *POU4F2*₂₂ aus seiner Bindung an Wt1(-KTS) (Abb. 17). Wt1(-KTS) Protein band dagegen nicht die Oligonukleotidsequenz *POU4F2*₂₂ mut., in dem die Wt1-Bindungsstelle mutiert war (5'-CAGCCCCCGAGTAATTGTGTGT-3') (Abb. 17). Diese Befunde zeigen die spezifische Bindung von Wt1(-KTS) an das identifizierte Wt1 Bindungselement im *POU4F2* Promotor.

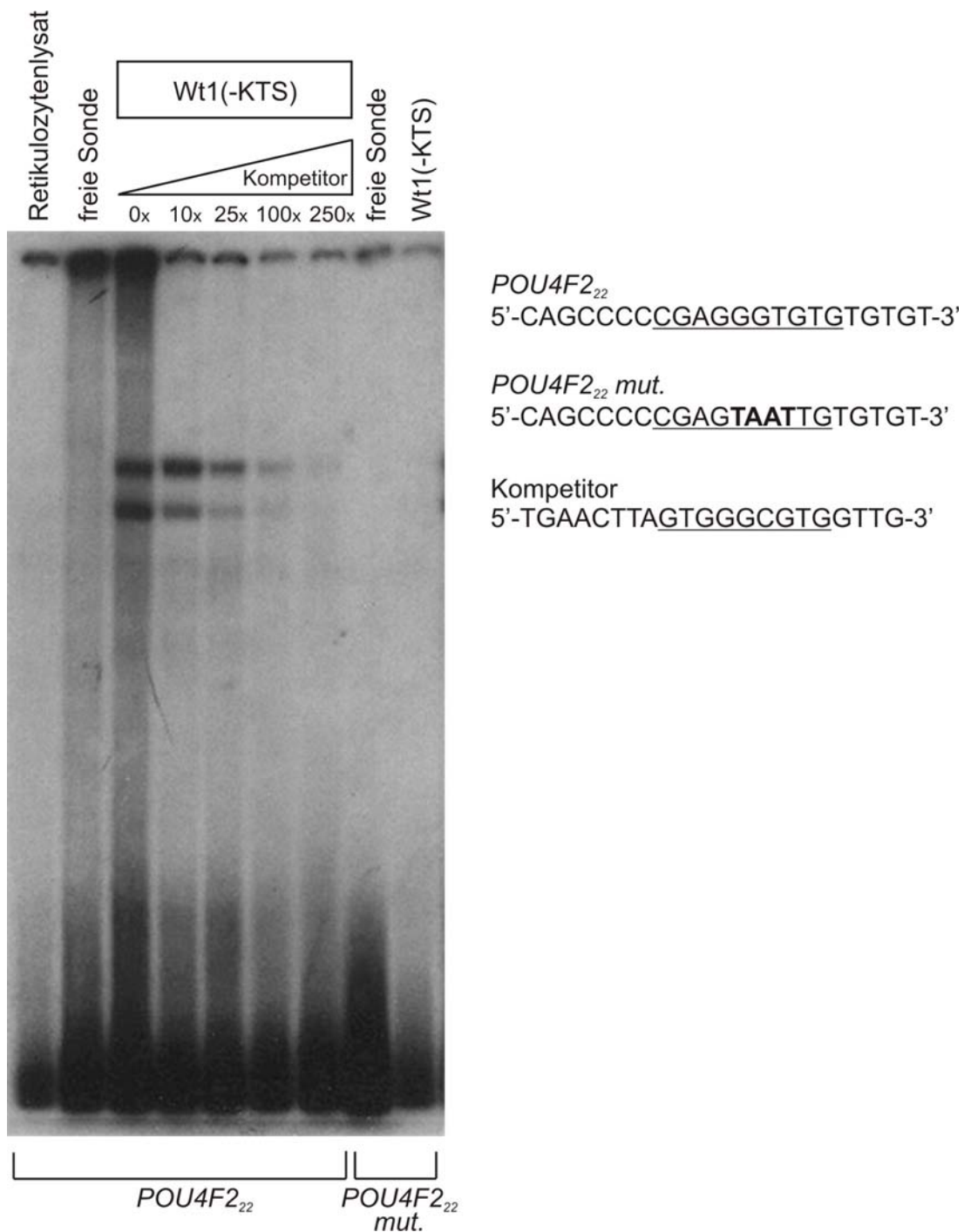


Abb. 17: Elektrophorese Mobilitätsgelshiftassay (EMSA) zum Nachweis der Bindung von Wt1(-KTS) Protein an das identifizierte Wt1 cis-Element im humanen *POU4F2* Promotor. Rekombinantes Wt1(-KTS) Protein wurde mittels Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert und mit einem P³²-markierten Oligonukleotid (*POU4F2₂₂*) mit der potenziellen Wt1 Bindungsstelle inkubiert. Nach Gelelektrophorese waren in der Autoradiographie zwei Retardationsbanden erkennbar. Die Wt1(-KTS) Bindung ließ sich durch Inkubation mit einem unmarkierten Oligonukleotid (Kompetitor) mit einem Wt1 Konsenselement aus dem murinen Vitamin D Rezeptorpromotor in ansteigender Konzentration kompetieren. Ein Oligonukleotid (*POU4F2₂₂ mut.*) mit mutierter Wt1 Bindungsstelle zeigte keine Wt1(-KTS)-Bindungsaktivität.